

Theorie zu kraftmikroskopischen Einzelmolekülexperimenten an Biopolymeren

Von der Fakultät Mathematik und Physik der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Oliver Braun
aus Stuttgart

Hauptberichter: Prof. Dr. U. Seifert
Mitberichter: Prof. Dr. G. Mahler
Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2004

II. Institut für Theoretische Physik
Universität Stuttgart

2004

Inhaltsverzeichnis

Symbolverzeichnis	7
Kurzfassung	11
Summary	17
Einleitung	21
1 Grundlagen	23
1.1 Biomoleküle	23
1.1.1 Die Proteinfaltung	23
1.1.2 Das Schlüssel-Schloss-Prinzip	24
1.1.3 Der molekulare Informationsträger DNA	24
1.2 Die experimentelle Kraftmikroskopie	25
1.3 Allgemeine Problemstellung	27
1.3.1 Die Messgrößen und ihre Bedeutung	27
1.3.2 Einführung in die theoretische Beschreibung eines Übergangs	29
1.3.3 Weiterführende Fragestellungen	32
1.4 Die Entwicklung der Theorie zur Kraftmikroskopie	32
2 Das 2-Zustandssystem	35
2.1 Ein einfaches Modell der Proteinfaltung	35
2.1.1 Die statischen Zustände	35
2.1.2 Die Relaxationsdynamik ohne äußerer Kraft	36
2.1.3 Die Übergangsraten unter dem Einfluss äußerer Kraft	38
2.2 Die fluktuierende Messfeder	40
2.3 Periodisch angeregte Übergänge	42
2.3.1 Eine analytische Lösung der Mastergleichung	42
2.3.2 Die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten aus den Daten	48
2.3.3 Die Konsequenzen einer weichen Messfeder	50
2.4 Die Zeitskalentrennung	52
2.4.1 Gleichgewichtsmessung	53
2.4.2 Übergang vom Gleichgewicht zum Nichtgleichgewicht	53
2.4.3 Schnelle Experimente	54

3	Multidomänen-Biopolymere	59
3.1	2-Zustandssysteme in Serie am Beispiel Titin	59
3.1.1	Experimentelles Vorgehen	59
3.1.2	Das Modell	60
3.1.3	Weiterführende Fragestellung	63
3.1.4	Die Kramers-Moyal-Entwicklung und die Ratengleichung	63
3.1.5	Die Mean-Field-Dynamik in der Nähe des Gleichgewichts	65
3.1.6	Das Übergangsregime	72
3.1.7	Das Sägezahnregime	75
3.1.8	Fazit zu Kapitel 3.1	79
3.2	Periodisch angeregte Übergänge an Multidomänen-Biopolymeren	79
3.2.1	Die Floquet-Theorie angewandt auf die Mastergleichung	79
3.2.2	Eine Näherungslösung	81
4	Der Reißverschluss-Übergang der DNA	85
4.1	Neuere Entwicklungen	85
4.2	Theorie zur Beschreibung des Reißverschluss-Experimentes	86
4.2.1	Ein einfaches DNA-Modell	86
4.2.2	Das experimentelle Protokoll	88
4.3	Die konstante Koordinate	89
4.3.1	Die Gleichgewichtsverteilung für reine Basenpaarsequenzen	89
4.3.2	Der Mittelwert für reine Basenpaarsequenzen	90
4.3.3	Die Gleichgewichtsverteilung für gemischte Basenpaarsequenzen	91
4.3.4	Das deterministische Modell für gemischte Basenpaarsequenzen	94
4.3.5	Die Grenzen der Gleichgewichtsannahme	97
4.4	Die konstante Kraft	99
4.4.1	Die Gleichgewichtsverteilung für reine Basenpaarsequenzen	99
4.4.2	Der Mittelwert für reine Basenpaarsequenzen	100
4.4.3	Die Gleichgewichtsverteilung für gemischte Basenpaarsequenzen	102
4.4.4	Die Nichtgleichgewichtsverteilung	102
5	Rezeptor-Ligand-Systeme	107
5.1	Das theoretische Konzept der Kraftspektren	107
5.1.1	Begriffsbestimmungen und neuere Entwicklungen	107
5.1.2	Das Modellsystem	108
5.1.3	Die stochastische Kraft	109
5.2	Das Inversionsproblem	114
5.2.1	Inversion durch Iteration	114
5.2.2	Die Integration unter der Gleichgewichtsannahme	116
5.3	Kraftspektren komplexer Übergänge	119
5.3.1	Die Grenze der Gleichgewichtsannahme zwischen zwei Minima	120
5.3.2	Die Mastergleichung für zwei Minima im Nichtgleichgewicht	123

5.3.3	Die Interpretation der Kraftspektren	124
6	Die Jarzynski-Gleichung	127
6.1	Einführung der Gleichung und neuere Entwicklungen	127
6.2	Die Rekonstruktion des Freien Energieprofils I	129
6.2.1	Das periodische und lineare Protokoll im Vergleich	129
6.2.2	Ein zusätzlicher Freiheitsgrad	134
6.3	Die Fokker-Plancksche Beschreibung	136
6.3.1	Das Fluktuations-Dissipations-Theorem	136
6.3.2	Die Arbeit und die dissipierte Arbeit	138
6.3.3	Das z -aufgelöste FD-Theorem	143
6.3.4	Die Konvergenz des rekonstruierten Freien Energieprofils	143
6.4	Die Rekonstruktion des Freien Energieprofils II	148
6.4.1	Zwei verschiedene Rekonstruktionsvorschriften im Vergleich	148
7	Ausblick	153
A	Theoretische Hilfsmittel	155
A.1	Die Kramers-Übergangsraten	155
A.2	Eine Herleitung der Jarzynski-Gleichung	156
A.3	Die gewichtete Histogramm Methode	158
B	Anhang zu Kap.3.1	161
B.1	Näherungslösung der Grenzgesewindigkeit für Titin	161
	Literaturverzeichnis	165
	Lebenslauf	177

Symbolverzeichnis

α	Nenner der Antwortamplitude
β	inverse, mit k_B skalierte Temperatur
γ, γ_0	Verhältnis der Übergangsraten, der spontanen
χ	charakteristische Funktion
χ_i	Mikrofreiheitsgrade in einem Polymermodell
δ	Überschüssige Konturlänge in der Fluktuation
$\delta(x)$	Diracsche Deltafunktion
ΔG_{ij}^0	ungestörte Freie Energiedifferenz zwischen Zustand i und j
$\Delta Q, \Delta W$	Wärmefluss, aufgewendete Arbeit pro Zeitschritt
Δx	Abstand der Minima im Energieprofil des 2-Zustandsmodells
Δ, δ	Operatoren zur Differenzbildung
ϵ	eine Differenz-Bindung
η	Biegesteifigkeit der DNA
κ_{ij}	stationäre Übergangsraten von i nach j
λ, λ_F	Phasenverschiebung der Besetzungswahrscheinlichkeit, der mittleren Kraftkurve
Λ, Λ^0	inverse Relaxationszeit, spontane
μ	Ziehrate
ν	Laderate
$\phi, \phi(t)$	Abreiß- und Entfaltungswahrscheinlichkeit
Φ, Φ_{eq}, Φ_0	Besetzungswahrscheinlichkeit, im Gleichgewicht, stationärer Anteil
Π, Π_a	periodischer Anteil der Wahrscheinlichkeit, Amplitude
ρ	Zustandsdichte
ϑ_j	mit L_j skalierte Ziehgeschwindigkeit
σ_o	Varianz der stochastischen Variable o
τ	mittlere Abreißzeit
τ_{eq}	Relaxationszeit
τ_{eq}^{max}	relevante interne Zeitskala
$\Theta(x)$	Heaviside-Stufenfunktion
ε	Floquet-Eigenwert
ω	Kreisfrequenz
ω_1, ω_2	bedingter Mittelwert von $e^{-\beta W}$ bzw. $e^{-2\beta W}$
\tilde{x}	mit Parametern skalierte Position der AFM-Messfeder
ξ	Reibungskonstante

ζ	Trajektorie von z
ζ_j	Position des j . Entfaltungs-Übergangs
A, B	Koeffizienten in der Mean-Field-Gleichung
a, b, c	Funktionen der Modellparameter
a_i, b_i, c_i	Fitparameter
B	Bias-Fehler
$C_i, C_i(z)$	i . Kumulante, auf z bedingte
$D(n)$	Separationsfunktion der DNA
d, ∂	Differentialoperator, partieller
$D, D^{(2)}$	Diffusionskoeffizient
$D^{(1)}$	Driftkoeffizient
F, \mathcal{F}	deterministische, stochastische Kraft
F_0	typische Kraft bei AFM-Experimenten
F_0, F_a	stationäre Kraft, Amplitude der Kraft
F_1, F_2	Gleichgewichtskraft in den Zuständen 1, 2
F_c, F_{poly}	Kraft an der Messfeder, am Biopolymer
$G(z), G(r)$	Freies Energieprofil
G, G_i	Freie Energie, im Zustand i
g_J, g_0, g_1	Fouriertransformierte Funktionen
g_t	statistische Gewichte
h	Häufigkeit
$H(r, t), H(z, t)$	effektive Hamiltonsche Funktion, auch: Potential, Energie
$k_0, k_{poly}, k_{linker}$	Federkonstante der Messfeder, des Biopolymers, des Linkers
k_B	Boltzmannkonstante
k_{ij}, k_{ij}^0	Übergangsraten von Zustand i nach j , spontane
k_{ij}^k	Übergangsrate der k . Domäne
k_{off}, k_{off}^0	Abreißrate (engl.: off-rate), spontane
L, L_i	Konturlänge des Biopolymers, im Zustand i
L_p	Persistenzlänge
L_u, L_f	Konturlänge im ent- bzw. gefalteten Zustand (engl.: un-, folded)
M	Gesamtzahl an Sprünge
m	Steigung der Geraden $\langle n \rangle(x)$
M_{ij}	Anzahl an Sprünge von i nach j
N	Gesamtzahl an Perioden, an Basenpaare der DNA
n	Anzahl an offenen Basenpaaren, Bindungen, Segmenten
N_u	(diskrete) Anzahl an offenen Bindungen, entfaltenen Domänen
$p(\bar{x}), \tilde{p}(F_c)$	Wahrscheinlichkeitsdichten
$P(N_u)$	diskrete Verteilung
$P(t), P_1(t), P_f(t)$	Wahrscheinlichkeit eines Ereignisses bis zum Zeitpunkt t
$p(t), p_{u,j}(t), q(t)$	Wahrscheinlichkeitsdichten
p, q	Sprungwahrscheinlichkeit

p_{eq}, p_0	Boltzmann-Verteilung, stationäre Verteilung
r	Reaktionskoordinate
$r_1, r_2, \dots; z_1, z_2, \dots$	Position der Minima
$r_a, r_b, \dots; z_a, z_b, \dots$	Position der Maxima bzw. Barrieren
T	Temperatur, Periodendauer
t	Zeit
T_{tot}	Gesamtmesszeit
u	Verhältnis aus Position und skaliertes Konturlänge
v, \bar{v}	Ziehgeschwindigkeit, mit N skalierte
V_0	Kopplungspotential der Messfeder
v_{max}, v_0	Grenzgeschwindigkeit zum Nichtgleichgewicht
W, W_{diss}	Arbeit, dissipierte
W_1	mittlere dissipierte Arbeit, bedingt auf z
W_2	mittlere quadratische dissipierte Arbeit, bedingt auf z
x, \bar{x}	Position der Messfeder, mit N skalierte
x_0, x_a	Vorauslenkung, Amplitude der Messfeder
x_f, x_{21}	Abstand zwischen äußerem Minimum und Barriere
x_u, x_{12}	Abstand zwischen innerem Minimum und Barriere
Z	Zustandssumme
z, z_0, z_a	End-zu-End-Abstand, stationärer Anteil, Amplitude
Z_0, Z_N	Zustandssumme zum Prozessbeginn, zum Prozessende
Z_r	die r-eingeschränkte Zustandssumme
Z_{in}, Z_i	Zustandssumme bis zur Barriere, für den Zustand i
Φ, Φ_i	globale Besetzungswahrscheinlichkeit, Komponenten
$\mathbf{K}, \mathbf{K}_0, \mathbf{K}_1$	Übergangsmatrix, stationärer Anteil, Amplitude
\mathcal{C}	reelle Zahl
\mathcal{H}	gesamte Hamiltonsche Funktion
\mathcal{I}	Verstärkungsfaktor für die Übergangsraten
\mathcal{L}_z	Fokker-Planck-Operator
\mathcal{N}	Normierungskonstante

Kurzfassung

In den letzten Jahren wurden einige Kraftmikroskope, wie das „Atomic Force Microscope“ (AFM), die optische und magnetische Pinzette sowie die Biomembransonde und damit zusammenhängende experimentelle Techniken entscheidend weiterentwickelt. In dieser Arbeit beschäftigen wir uns mit der theoretischen Beschreibung kraftmikroskopischer Experimente, die an einzelnen Biomolekülen durchgeführt werden.

Die zu untersuchenden Biopolymere unterscheiden sich wesentlich hinsichtlich ihres Aufbaus. Einige Proteine lassen sich mit Hilfe von Kraftmikroskopen entfalten, während die dabei auftretenden Kräfte gemessen werden können. Zu diesen Systemen zählt das bekannte und häufig untersuchte Muskelprotein Titin. Desweiteren gibt es die Rezeptor-Ligand-Systeme, die aus zwei zueinander passenden Proteinen bestehen. Durch Anwendung von Kraft kann die Bindung aufgebrochen werden, so dass zwei einzelne vorliegen. Schließlich sei noch das wichtige Biopolymer DNA genannt, deren Einzelstränge auseinandergezogen werden können, wodurch sie sich ähnlich eines Reißverschlusses voneinander lösen.

An die verschiedenen Systeme wird also über ein Kraftmikroskop eine Kraft angelegt, um die Bindungstypen, die für die jeweilige Konformation verantwortlich sind, auszumessen. Für die inter- und intramolekulare Wechselwirkungen kommen dabei die elektrostatische und die van der Waals-Wechselwirkung, Wasserstoffbrücken sowie sonstige chemische Bindungen in Frage.

Eine zentrale Aufgabenstellung bezüglich all dieser Experimente liegt in der Interpretation der Messdaten, die man durch kraftmikroskopische Untersuchungen oder durch molekulardynamische Simulationen erhält. Eine rein deterministische Beschreibung hilft dabei selten weiter, da die Biomoleküle über das umgebende Medium, meist Wasser, an ein Wärmebad gekoppelt sind. Auch eine thermodynamische Beschreibung ist unbrauchbar, da wir es mit Einzelmolekülen zu tun haben, also mit sehr kleinen Systemen. Die stochastischen Kräfte wirken sich auf die Dynamik der Biopolymere derart aus, dass nur eine statistische Auswertung der Daten in Frage kommt. Die Theorie zu kraftmikroskopischen Experimenten basiert also grundsätzlich auf der statistischen Physik. Da man es zusätzlich mit getriebenen Systemen zu tun hat, die von außen durch Anwenden von Kräften gestört sind, muss man davon ausgehen, dass eine reine Gleichgewichtsbeschreibung nicht erfolgreich sein wird. Wir benötigen also hauptsächlich Hilfsmittel aus der Theorie der Nichtgleichgewichtsprozesse, dazu zählen die Langevin-Gleichung, die Fokker-Planck-Gleichung, die Mastergleichung und zuletzt die Jarzynski-Gleichung.

Für die verschiedenen biomolekularen Systeme stehen unterschiedliche Modellbilder zur Verfügung. Diese werden auf ihre Aussagekraft hin untersucht und gegebenenfalls

erweitert. Zunächst stellen wir ihre Grundlagen dar und zeigen anschließend ihre Anwendungen auf.

Jede erreichbare Konfiguration des zu untersuchenden Biopolymers ist durch die Freie Energie gekennzeichnet. Wir gehen im Sinne einer adiabatischen Näherung davon aus, dass nach der Elimination der schnell veränderlichen Variablen eine einzige Reaktionskoordinate ausreicht, den Zustand zu beschreiben. In diesem Zusammenhang sprechen wir vom „Freien Energieprofil“. Diese Funktion beinhaltet die Information über die Bindungsarten sowie die Bindungsdynamik, so dass bei ihrer vollständigen Kenntnis das Problem gelöst wäre. Das Freie Energieprofil führt zusammen mit dem Kopplungspotential der Messfeder zu deterministischen Kräften. Durch Ankopplung an das Wärmebad erhält man stochastische Kräfte auf die Reaktionskoordinate, die wir als Markov-Prozess charakterisieren. Die zeitliche Entwicklung einer einzelnen Trajektorie ist durch die Langevin-Gleichung gegeben, diejenige der gesamten Aufenthaltswahrscheinlichkeit durch die Fokker-Planck-Gleichung. Für diese Beschreibung benötigt man den Reibungskoeffizienten oder die Diffusionskonstante, die als bekannt vorausgesetzt werden.

Häufig wird das Problem allerdings durch die vollständige Beschreibung zu komplex und manche Aufgabenstellungen könnten damit nicht in vertretbarem Aufwand gelöst werden. Das betrifft vor allem die Multidomänen-Biopolymere, die aus einer Vielzahl sequenziell angeordneter Proteinsegmente bestehen. Hierbei werden wir zu einer effektiven Beschreibung übergehen. Bei einem Freien Energieprofil, das mehrere Minima besitzt, kann man die kontinuierliche Langevin-Dynamik durch eine diskrete Zustandsbeschreibung ersetzen. Die durch Barrieren getrennten Minima des Freien Energieprofils werden dann als diskrete Zustände betrachtet. Die stochastischen Übergänge von Zustand i nach j werden mit Hilfe der Übergangsraten k_{ij} charakterisiert, die auf der Grundlage der Kramers-Theorie berechnet werden können. Damit ist die zeitliche Entwicklung der Besetzungswahrscheinlichkeit durch die Mastergleichung festgelegt.

Aus beiden zueinander komplementären Beschreibungen, der kontinuierlichen und der diskreten, wird je nach Aufgabenstellung die geeignetere ausgewählt.

Das einfachste Modell zur Beschreibung eines Faltungs-, Entfaltungsübergangs eines Biopolymers ist das 2-Zustandsmodell, welches in Kapitel 2 ausführlich untersucht wird. Dabei bezeichnen die beiden Zustände 1 und 2 die gefaltete und entfaltete Konformation. Unter Abwesenheit von äußeren Störungen wird die Gleichgewichtsverteilung auf der Zeitskala $1/(k_{12} + k_{21})$ erreicht. Die äußere Kraft führt dazu, dass die Energieniveaus der Zustände angehoben bzw. abgesenkt und damit die Übergangsraten modifiziert werden.

Eine wesentliche experimentelle Vorgabe ist das Protokoll, mit dem die Messfeder bewegt wird. Wir unterscheiden grundsätzlich zwei verschiedene Protokolle, das lineare und das periodische. In bisherigen Experimenten wurde sehr häufig das lineare Protokoll verwendet. Die in diesem Fall dem Entfaltungsübergang oder dem Abreißen zugeordnete mittlere Kraft als Funktion der Ziehgeschwindigkeit nennt man „Kraftspektrum“. Die Größen, die man aus solch einem Spektrum entnehmen kann, sind die spontane Übergangsrate und der Abstand des Minimums zur Barriere im Freien Energieprofil. Das lineare Protokoll liefert demnach nur Informationen den Abreißprozess oder den Entfal-

tungsübergang betreffend. Wir schlagen das periodische Protokoll als wesentliche Neuerung vor, mit dessen Hilfe man auch Größen des Faltungsübergangs berechnen kann, d.h. den zugehörigen Abstand sowie die spontane Rate.

Steht als experimentell kontrollierbarer Parameter des linearen Protokolls nur die Ziehgeschwindigkeit zur Verfügung, erweist sich für das periodische neben der Frequenz auch die Vorauslenkung als wesentlich. Wählt man diese entsprechend, wird die Antwortamplitude des periodischen Anteils der Besetzungswahrscheinlichkeit maximal. Zudem leiten wir eine Beziehung für die Frequenz und die innere Relaxationszeit her, die analog zur stochastischen Resonanz interpretiert werden kann. An einem 2-Zustandssystem kann die Differentialgleichung für die Wahrscheinlichkeit näherungsweise analytisch gelöst werden. Man besitzt also mit einem Protein, das einen solchen Faltungs- und Entfaltungsübergang aufweist, die experimentelle Möglichkeit, theoretische Vorhersagen bezüglich der stochastischen Resonanz zu überprüfen.

Das 2-Zustandssystem eignet sich zudem, die wesentlichen Unterschiede zwischen Gleichgewicht und Nichtgleichgewicht aufzuzeigen. Zunächst kann man sehr häufig annehmen, dass die Relaxationszeit innerhalb der Minima selbst kleiner als die experimentelle Zeitskala ist. Vergleicht man die verbleibenden beiden relevanten Zeitskalen, die Übergangszeit mit der Zeitskala der äußeren Störung, so ergeben sich drei verschiedene Regimes: das Gleichgewichtsregime, wenn die innere Zeitskala kleiner als die äußere ist, das Übergangsregime, wenn sie vergleichbar sind, und das Nichtgleichgewichtsregime, wenn die äußere kleiner ist als die Übergangszeit.

Diese Unterscheidung kann auch bei komplexeren Multidomänen-Biopolymeren festgestellt und direkt gemessen werden. Die Kraftkurve, die mit Hilfe des linearen Protokolls erhältlich ist, fluktuiert entweder um einen Mittelwert, so dass einzelne Übergänge nicht identifiziert werden können, oder sie zeigt ausgeprägte Spitzen beim Entfalten einer Domäne. Die theoretische Beschreibung dieses Befundes in Kapitel 3 beruht auf der Mastergleichung. Wir leiten daraus eine Mean-Field-Gleichung für den Mittelwert und die Varianz her und schlussfolgern eine Bedingung für die Ziehgeschwindigkeit, für die das Experiment noch im Gleichgewicht abläuft. Mit Parametern verschiedener Multidomänen-Biopolymere untersuchen wir schließlich die vorliegenden Experimente auf den Aspekt des Gleichgewichts hin. Dabei wird deutlich, dass es bei dem häufig verwendeten Protein Titin kaum möglich ist, im Gleichgewicht zu ziehen, während Polysaccharide noch bei sehr hohen Ziehgeschwindigkeiten im Gleichgewicht untersucht werden können.

Schließlich wenden wir die Methode des periodischen Protokolls auch auf Multidomänen-Biopolymere an und berechnen die Antwortamplitude der mittleren Kraft.

Desweiteren kann mit Hilfe eines Kraftmikroskops die Denaturierung einer DNA gemessen werden. Dabei werden die Einzelstränge der DNA entsprechend einem Reißverschluss auseinandergezogen. Wir zeigen in Kapitel 4, wie dieser experimentelle Aufbau mit den bis dahin erarbeiteten Konzepten der statistischen Physik beschrieben werden kann. Auch hierbei gehen wir von der Mastergleichung aus. Im Falle gleicher Basenpaare lässt sich die Wahrscheinlichkeitsverteilung für das Gleichgewicht berechnen. Für

unterschiedliche Basenpaare kommt die Schwierigkeit hinzu, dass neben den fluktuierenden Kräften durch die thermische Kopplung zusätzlich eine „eingefrorene“ Unordnung in der DNA zu berücksichtigen ist. Das bewirkt einen stochastischen Verlauf in der Verteilungsfunktion und in der Kurve des Mittelwerts. Darüberhinaus untersuchen wir zwei experimentelle Protokolle: Zum einen wird die Messfeder nach einer zeitabhängigen Funktion positioniert, zum anderen wird die Kraft konstant gehalten. Das erste Protokoll führt zu einem langsamen linearen Anstieg der mittleren Anzahl getrennter Basenpaare. Das zweite führt zu einem sehr scharfen Übergang vom gebundenen zum geöffneten Zustand. Wir berechnen den zugehörigen kritischen Exponenten des Mittelwertes. Die zeitliche Entwicklung der Verteilungsfunktion lässt sich für dieses Protokoll nur numerisch bestimmen. Wir legen anhand einer Beispielstudie dar, wie sich die natürliche bzw. generierte Basenpaarsequenz auf die Verteilungsfunktion auswirkt.

Neben den Faltungs- und Entfaltungsübergängen der Proteine sowie dem Denaturieren der DNA besteht großes Interesse an den Rezeptor-Ligand-Systemen, deren Ziehexperimente wir in Kapitel 5 untersuchen. Bei dieser Gelegenheit werden wir die theoretischen Voraussetzungen für die Kraftspektren diskutieren. Desweiteren vergleichen wir verschiedene Methoden, aus den Messdaten Informationen über das Freie Energieprofil zu ermitteln. Eine vollständige Rekonstruktion der Freien Energielandschaft aus einer statistischen Auswertung der Trajektorien ist unter der Voraussetzung möglich, dass vor der Barriere eine Gleichgewichtsverteilung vorliegt. Eine Rekonstruktion allein aus den Daten des Kraftspektrums stellt sich hingegen als weniger günstig heraus. Ist die Gleichgewichtsannahme nicht gerechtfertigt - wir werden dazu zwei Grenzfälle untersuchen -, kann man auf zwei Alternativen ausweichen:

Erstens, man misst das Kraftspektrum und erhält daraus einige wichtige Größen des Freien Energieprofils. Für komplexere Potentiale mit metastabilen Zuständen zeigen wir, wie die Daten nur unter Einbeziehung der Varianz eindeutig ausgewertet werden können.

Zweitens, besteht die Möglichkeit, aus Nichtgleichgewichtstrajektorien mit Hilfe der Jarzynski-Gleichung das Freie Energieprofil zu rekonstruieren. Wir zeigen in Kapitel 6 anhand eines Beispiels, wie dies machbar ist. Dabei vergleichen wir die Fehler der rekonstruierten Freien Energieprofile zweier verschiedener Protokolle miteinander. Anhand eines Fallbeispiels belegen wir, dass die Ergebnisse des periodischen Protokolls besser sind als die des linearen. Ferner minimieren wir den Fehler bezüglich der experimentell zugänglichen Parameter, der Geschwindigkeit sowie der Frequenz.

Die Jarzynski-Gleichung stellt, unabhängig davon ob sich das System im Gleichgewicht befindet oder nicht, eine Beziehung zwischen der Mittelung über die exponentierte Arbeit der Trajektorien und der Freien Energiedifferenz zwischen zwei Zuständen her. Bei Anwendung dieser Gleichung müssen allerdings Probleme hinsichtlich der statistischen Konvergenzeigenschaften gelöst werden. Dazu verwenden wir die gewichtete Histogramm Methode, eine etablierte Form der statistischen Auswertung der Daten aus Monte-Carlo-Simulationen. Wir untersuchen den auftretenden Fehler, der sich aus der Varianz aufgrund der Datenstreuung und dem Bias, dem systematischen Fehler der Mittelung, zusammensetzt. Ferner leiten wir die zeitlichen Entwicklungsgleichungen für die

dissipierte Arbeit her, die ein Maß für das Nichtgleichgewicht darstellt. Anhand eines konkreten Beispiels zeigen wir, dass der Übergang über eine Freie Energie-Barriere das System am weitesten aus dem Gleichgewicht treibt. Das führt letztlich dazu, dass dort die Konvergenzeigenschaft der Jarzynski-Gleichung am schlechtesten ist.

Schließlich vergleichen wir in einer weiteren numerischen Beispielstudie zwei verschiedene Formeln zur Rekonstruktion des Freien Energieprofils. In beiden Herleitungen verwenden wir die gewichtete Histogramm Methode, zum einen basierend auf der Jarzynski-Gleichung, zum anderen auf Gleichgewichtsformeln. Aufgrund dieses Vergleiches zeigt sich, dass die Jarzynski-Gleichung bei endlicher Messdauer über einen großen Bereich der Ziehgeschwindigkeit hinweg keinen Vorteil gegenüber der genäherten Gleichgewichtsberechnung darstellt. Dies liegt unter anderem an dem großen systematischen Fehler, den der Mittelungsvorgang der Exponentialfunktion in der Jarzynski-Gleichung verursacht.

Zusammenfassend haben wir in dieser Arbeit sowohl eine Vielzahl unterschiedlicher, kraftmikroskopisch relevanter Systeme untersucht, die sich in der Bindungsanordnung unterscheiden, als auch eine Reihe theoretischer Ansätze angewandt und, wo erforderlich, erweitert.

Summary

In the last few years much progress has been achieved in the field of force microscopy. Several different microscopes have been developed further, e.g. the atomic force microscope (AFM), the optical and magnetical tweezers as well as the bio-membrane force probe. In this work, we concentrate on the theoretical description of related experiments in force microscopy on single biomolecules.

The probed biopolymers are different in structure. First of all there are proteins, which can be unfolded with force microscopes while measuring the acting force. One of these is the well known and often probed muscle protein titin. Furthermore, there are receptor-ligand systems, which consist of two binding partners. By applying a force they rupture apart. Finally there is the very important biopolymer DNA, which has already been investigated by many force microscopy experiments. DNA can be pulled apart like a zipper.

The unifying property of all single molecule experiments is a force pulling those binding sites apart that are responsible for the stability of the native configuration. Examples for inter- and intramolecular interactions are electrostatic and van der Waals interactions, hydrogen bonds and all kinds of chemical bonds.

The main objective in this work is the interpretation of data obtained from real force microscopy measurement and molecular dynamic simulation. A pure deterministic theory is not appropriate, since the biomolecule is coupled to a heat bath via the surrounding medium, e.g. water. For a thermodynamic description we would need a larger system than just a single molecule. Due to stochastic forces only a statistical description is applicable. Furthermore, the system is driven out of equilibrium by an experimentally controlled force. Thus we need primarily tools from non-equilibrium statistical mechanics, like the Langevin equation, the Fokker-Planck equation, the Master equation and finally Jarzynski's relation.

For each system, we need a different model depending on the molecular details of the biomolecule. We investigate these models and extend them, where necessary. We first point out the basics and then we formulate their applications.

Every configuration of the biopolymer is characterized by its free energy. According to the adiabatic approximation we assume that all fast variables are eliminated and that it will be sufficient to describe the state of the polymer by a single variable, called the reaction coordinate. The free energy profile as a function of this coordinate contains the full information about the bonds and the evolution dynamics. Thus the ultimate goal of this work is to extract the free energy profile, which completely characterizes the behavior of the molecule, from experimental and simulation data.

The free energy profile and the coupling potential due to the measuring device, e.g. the cantilever of the AFM, are responsible for the deterministic forces. The heat bath leads to stochastic forces. Together the resulting dynamics can be described by the Langevin equation. The evolution of the probability density can be calculated via the Fokker-Planck equation.

In many cases, the full theory is much too complex to be solved with adequate effort, in particular for the multi-domain biopolymers, which consist of several sequentially ordered protein domains. Therefore, the continuous stochastic dynamics is replaced by a discrete description by identifying the separated minima in the free energy profile with the states. The transition from state i to j is characterized by a transition rate k_{ij} and the appropriate evolution equation for the probability of occupation is the Master equation.

A friction or, equivalently, a diffusion coefficient enters the Langevin equation. The spontaneous rates are then given by the Kramer's transition rate theory. These complementary descriptions may be chosen for suitable cases depending on the main task of the theory.

One of the simplest models to describe un- and refolding transitions of a biopolymer is the 2-state model, which is investigated in chapter 2. The different states 1 and 2 refer to the folded and unfolded biopolymer conformation. In the absence of an external perturbation the equilibrium distribution is reached on a time scale of $1/(k_{12} + k_{21})$. An external force leads to an increase and decrease of the free energy of the states, thus altering the transition rates exponentially.

An essential experimental specification is the protocol according to which the measuring cantilever is moved. We differentiate between two types, the linear and the periodic one. Up to now, in most experiments the linear protocol is used. In that case, the mean force, at which the protein unfolds or receptor-ligand system ruptures, as a function of the ramp velocity is the so called "force spectrum". The quantities which can be extracted from these spectra are the spontaneous rate and the distance from the minimum to the barrier in the free energy profile. With such a linear protocol we can only get information on the unfolding or rupture transition. We propose a periodic protocol, which can be used to obtain also quantities relevant to the folding transition. In contrast to the linear protocol, where the ramp velocity is the only adjustable parameter, the periodic one has frequency as well as preloading as additional parameters. If one chooses them appropriately, the response amplitude of the periodic part of the occupation probability is maximal. We derive a relation between the frequency and the internal relaxation time scale, that is analogous to stochastic resonance. In our example of a 2-state system we can solve the master equation with some approximations. With a single molecular system, which undergoes un- and refolding transitions, one is not only able to use force microscopy to answer relevant biological questions, but also to exemplify well known concepts in theory, like stochastic resonance.

The 2-state system is well suited to show the differences between equilibrium and non-equilibrium behavior. First of all we consider the relaxation time scale within each potential well as fast compared to the experimental one. If one compares the two re-

maining time scales, the transition time scale and the one on which the experimental manipulation is done, three regimes can be distinguished. First there is the equilibrium regime, where the internal time scale is much smaller than the external one. Second there is the crossover regime, where they are comparable, and third the non-equilibrium regime, where the manipulation time scale is smaller than the transition over the barrier time scale.

This elementary differentiation can also be observed on multi-domain biopolymers. The force as a function of the position of the cantilever measured by a linear ramp is either fluctuating around a mean value, such that single transitions can not be identified, or it shows single distinguishable peaks on each unfolding event. The crossover regime is less well-defined. The theoretical description of this observation as given in chapter 3 is based on the Master equation. We derive a mean-field description for the mean value and the variance and obtain a condition for the ramp velocity for which the experiment is effectively done in equilibrium. Using different model parameters, we examine previous experiments on the aspect whether or not they are in equilibrium. We conclude that the experiments on polysaccharides are in equilibrium for a large range of ramp velocities, whereas for titin this is not the case for all experiments.

We also apply the method of the periodic protocol on multi-domain biopolymers and calculate the response amplitude of the mean force.

For DNA, denaturation can be measured by using force microscopy. The single strands were pulled apart from one end of the double stranded DNA like a zipper.

We show in chapter 4 how this setup can be described with the by then familiar concepts of the Master equation. In the case of only one kind of base pairs the equilibrium probability density may be calculated. The case of different base pairs is further complicated by the possibility of frozen disorder. This leads to a stochastic characteristic in the density and in the mean value. In addition to the two different base pairs, which occur both in real DNA, we discuss two experimental protocols. First, the cantilever is positioned according to a time dependent protocol, second the force is held fixed, while the position is regulated automatically. The first protocol leads to a slow linear increase of the mean value of separated base pairs. The second protocol instead leads to a sharp transition from the bounded state to the totally unbound. We calculate the critical exponent of the mean value of this transition. The evolution of the probability density can only be calculated numerically. We show in an exemplary study how the natural and synthetic sequences of base pairs affect the solution.

In addition to the un- and refolding transitions of proteins and the denaturation of DNA much interest is spent on receptor ligand systems, which we investigate in chapter 5. We discuss the theoretical assumptions for the force spectra. We compare different methods to extract information on the free energy profile, whereas full reconstruction of the profile from trajectories is possible under the equilibrium condition inside the well whereas a reconstruction from the force spectrum is not feasible. If the assumption of equilibrium is not justified - we consider two borderline cases - one can alternatively follow two lines of approach.

First, one may use the force spectra and obtain important information on the free energy profile. For complex profiles we show how these data can be extracted by using additionally the variance of the force.

Second there is the possibility to use Jarzynski's relation to reconstruct the free energy profile even from non-equilibrium trajectories. We show in chapter 6 by means of an example how to proceed. We compare the error of the reconstructed profiles of two different protocols and show that the results of the periodic one is significantly better than the results of the linear one. Furthermore, we minimize the error with respect to the experimental parameters such as the ramp velocities and the frequency.

Jarzynski established an equation for the mean average of the exponentiated work over trajectories and the free energy difference, independent of the system being near or far out of equilibrium. To use this relation one has to overcome difficulties in statistical convergence. To this end we employ a well known statistical technique in Monte Carlo simulations called the weighted histogram method. We investigate the systematic (bias) and stochastic error. Furthermore, we derive an evolution equation for the dissipated work, which is a measure for the non-equilibrium. By means of a numerical simulation we show that the system is furthest from equilibrium at the instance of transition of the barrier. Therefore the height of the barrier is most difficult to extract from data.

Finally, we compare in a further numerical simulation two different recipes for reconstruction of the free energy profile. In both derivations we make use of the weighted histogram method. First, we employ again Jarzynski's relation, second, we use equilibrium conditions. On the basis of this comparison we show that Jarzynski's relation is unfavorable over a large range of ramp velocities. The reason is the large systematic error, which comes from averaging the exponential function.

Summarizing, we have investigated a large number of different systems relevant in single molecule force microscopy, which differ mainly in the arrangement of bonds. Furthermore, we applied several theoretical concepts and, where necessary, improved them.

Einleitung

Für die Funktion molekularer biologischer Systeme spielen inter- und intramolekulare Wechselwirkungen eine wesentliche Rolle. Mit der Entwicklung der Kraftmikroskopie hat man eine experimentelle Methode entdeckt, offene Fragen in diesem Bereich systematisch zu beantworten. Dazu benötigt man jedoch ausgefeilte theoretische Konzepte aus der statistischen Physik der Nichtgleichgewichtsprozesse. Durch die steigenden Anforderungen an die Präzision der Experimente und an die Modellbildungen, sind in den letzten Jahren auf diesem Gebiet wichtige Fortschritte erzielt worden.

Die Biophysik, zu der diese Art der Forschung zählt, hat sich zur Aufgabe gemacht, biologische Fragestellungen mit Hilfe von physikalischen Methoden zu behandeln. Die Arbeit auf diesem Grenzgebiet stellt eine hohe Anforderung sowohl an die Kommunikationsfähigkeit der Wissenschaftler untereinander als auch an die Selbstkritik. Physiker sind von ihrer Ausbildung her gewohnt, Phänomene reduktionistisch zu vereinfachen, derart wurden in dieser Disziplin schon immer die größten Erfolge erzielt. Jedoch geht diese Vorgehensweise meist auf Kosten des Verständnisses des Gesamtzusammenhangs. Das komplexe Zusammenspiel aller Prozesse in der Zelle stellt daher eine große Herausforderung dar. Einzelne physikalische Erklärungsansätze sind notwendige Bestandteile einer umfassenderen Theorie, von der wir heute noch weit entfernt sind.

In dieser Arbeit werden wir uns mit typischen kraftmikroskopischen Experimenten und theoretischen Problemen in diesem Umfeld beschäftigen. Dabei stehen die wegweisenden Experimente am Protein Titin und der DNA im Vordergrund. Auch die biologisch relevanten und physikalisch interessanten Rezeptor-Ligand Systeme werden untersucht. Insbesondere Fragestellungen hinsichtlich der Dynamik der Entfaltungs- und Reißvorgänge unter äußerer Kraft werden eine Rolle spielen. Die zentrale Zielsetzung dieser Arbeit besteht darin, aus experimentell oder numerisch gewonnenen Datensätzen möglichst viele Informationen über das untersuchte molekulare System zu extrahieren. Interessant und gleichzeitig problematisch ist dabei die Tatsache, dass die kraftspektroskopischen Experimente an biofunktionalen Molekülen diese meist aus dem thermischen Gleichgewicht treiben. Daher wird der Übergang vom Gleichgewicht zum Nichtgleichgewicht besonders in den Mittelpunkt gerückt. Einerseits werden erprobte experimentelle Vorgehensweisen betrachtet, andererseits werden Neuerungen wie das periodische Ziehen vorgeschlagen und diskutiert.

Bei unseren theoretischen Untersuchungen finden bekannte und neue Methoden der statistischen Physik der Nichtgleichgewichtsprozesse Verwendung. Unter den häufig angewandten befinden sich die Mastergleichung und die Fokker-Planck-Gleichung zur Beschreibung stochastischer Markov-Prozesse. Eine Methode, die erst in jüngster Zeit ent-

wickelt wurde, beruht auf der Jarzynski-Gleichung. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, das Freie Energieprofil auch aus Nichtgleichgewichtsdaten vollständig zu rekonstruieren. Wir werden ihre Anwendungsmöglichkeiten anhand von Beispielen aufzeigen und dabei auch statistische Problemstellungen bezüglich der Konvergenz bearbeiten.

Zunächst stellen wir in Kapitel 1 in einem kurzen Überblick einige biologisch relevante Systeme vor, an denen schon kraftmikroskopische Experimente durchgeführt wurden. Zudem werden wir die experimentellen Grundlagen, die grundsätzlichen Fragestellungen und einige theoretische Hilfsmittel darstellen. In Kapitel 2 legen wir anhand eines 2-Zustandssystem einige Methoden und Begriffsbestimmungen dar. Wir werden exemplarisch zeigen und theoretisch begründen, wie mit Hilfe der periodischen Anregung in diesem Bereich Fortschritte zu erzielen sind. Die Kapitel 3, 4 und 5 sind gemäß den untersuchten Systemen geordnet. Diese Gliederung ist vom theoretischen Standpunkt sinnvoll, da die Systeme unterschiedliche molekulare Bindungseigenschaften aufweisen, welche sich auf die Modellbildung auswirken. Kapitel 6 stellt im Vergleich dazu eine Besonderheit dar, da es durch die Behandlung der Jarzynski-Gleichung anstatt eines Systems eine Methode zum Inhalt nimmt. Diese ist in ihrer universellen Anwendbarkeit nicht auf biophysikalische Fragestellungen beschränkt und kann deshalb allgemeiner betrachtet werden. Wir werden einige interessante Fragen, z.B. die statistische Konvergenzeigenschaft betreffend, untersuchen und beantworten.

Vor jedem der zu untersuchenden Systeme wird noch einmal ein Resümee der aktuellen experimentellen Ergebnisse gezogen und die theoretisch angewandten Konzepte erläutert.

1 Grundlagen

1.1 Biomoleküle

1.1.1 Die Proteinfaltung

Proteine in lebenden Zellen sind komplexe molekulare Maschinen mit einer mesoskopischen Ausdehnung von 10 bis 100 nm, die für den gesamten Zellstoffwechsel verantwortlich sind. Sie bestehen aus einer linearen Kette von Aminosäuren, für deren Funktion neben ihrem molekularen Aufbau ebenso wichtig ist, dass sie in einer spezifischen dreidimensional gefalteten Struktur vorliegen (siehe zur Einführung z.B. [1]). Bisher ist es jedoch noch nicht gelungen, die Konfiguration aufgrund der primären Abfolge der Aminosäuren vorherzusagen [2–6].

Im Jahre 1957 wurde das Prinzip formuliert, dass die natürliche dreidimensionale Struktur dem thermodynamisch stabilen Zustand entspricht [7]. Man fand in diesem Zusammenhang heraus, dass die enzymatische Aktivität des Proteins Bovine Ribonuclease entscheidend von der Konformation abhängt. Inaktive, denaturierte Proteine erlangen ihre volle enzymatische Funktionalität durch Rückfaltung in ihren natürlichen Zustand. Der Zusammenhang zwischen dem nativen Zustand des Proteins und der thermodynamisch stabilen Konformation erscheint naheliegend, wenn man von einem thermischen Gleichgewicht in der Zelle ausgeht. Diese Annahme ist jedoch keineswegs selbstverständlich. Zum Beispiel geht die spontane Faltung der Proteine *in vitro*, also außerhalb der lebenden Zelle, viel langsamer vor sich als *in vivo*, innerhalb der lebenden Zelle, wo durch die aktive Hilfe von Enzymen dieser Prozess beschleunigt wird. Der thermodynamisch stabile Zustand ist durch das Minimum der Freien Energie gegeben, da das Protein physiologisch in Kontakt mit einem Wärmebad ist, welches eben die Temperatur der lebenden Zelle aufweist. Die Freie Energielandschaft in Abhängigkeit von einer oder mehreren Reaktionskoordinaten zu beschreiben, ist ein bekanntes Konzept aus der Thermodynamik. Um es auf die vorliegende Problemstellung hin anzuwenden, nehmen wir an, dass die Konformation des Proteins durch wenige Variablen bestimmt ist. Die meisten Freiheitsgrade, die „schnellen Variablen“, seien ausintegriert und wenige unabhängige „langsame Variablen“ verbleiben als sog. Reaktionskoordinaten zur Beschreibung der Dynamik der Faltung und Entfaltung. Insbesondere ist der native Zustand durch das globale Minimum innerhalb der Freien Energielandschaft bestimmt. Es ist immer noch eine ungelöste Aufgabe, den Faltungspfad in einem hochdimensionalen Phasenraum zu berechnen. Zudem stellen sich auch experimentelle Fragen, z.B. wie die Reaktionskoor-

dinate als Observable gemessen werden kann.

1.1.2 Das Schlüssel-Schloss-Prinzip

Eines der wichtigsten Konzepte zur Funktionsfähigkeit aller lebenden Organismen ist das sogenannte Schlüssel-Schloss-Prinzip. Viele Prozesse an denen zwei oder mehr Proteine beteiligt sind, benötigen einen zuverlässigen Zuordnungsmechanismus, der bestimmt, welche Biomoleküle miteinander interagieren und welche nicht. Diese molekulare Erkennung basiert auf den spezifischen Bindungen, die dafür sorgen, dass wie bei einem Schlüssel, der zu einem Schloss passt, zwei bestimmte Proteine aneinander binden und somit auch interagieren [8]. Die Systeme, die solch eine Affinität zueinander aufweisen, nennt man auch „Rezeptor-Ligand-Systeme“.

Die spezifische Bindung zwischen zwei Proteinen besteht nicht aus einer einzelnen Wechselwirkung - das wäre biologisch zu unzuverlässig, sondern aus einer Vielzahl von Wechselwirkungen. Dazu zählen Wasserstoffbrücken, elektrostatische Wechselwirkung, van der Waals-Kräfte. Diese Bindungsmechanismen führen zu einer Freien Energielandschaft, die physikalisch gesehen sowohl die Bindungstypen als Information enthält als auch die Bindungsdynamik bestimmt.

Die physikalische Fragestellung zielt also auch hier wieder darauf ab, mit experimentellen Mitteln und theoretischen Konzepten die Freie Energielandschaft zu bestimmen.

1.1.3 Der molekulare Informationsträger DNA

Die DNA ist ein besonderes Biomolekül. Es enthält in sogenannten Genen alle Informationen, die für die Funktionen lebender Zellen notwendig sind. Nachdem die DNA als Informationsträger identifiziert wurde, war es nur noch eine Frage der Zeit, bis die molekulare Struktur 1953 herausgefunden wurde [9]. Trotz des guten mikroskopischen Verständnisses der DNA bleiben noch viele Fragen offen. Die DNA als Doppelhelix besteht außen aus einem Zucker-Phosphat Gerüst und innen aus einer Abfolge von zwei zueinander passenden Basenpaaren, die mit zwei Wasserstoffbrückenbindungen bei Guanine-Cytosine (G-C) und drei bei Adenine-Thymine (A-T) gebunden sind. Für gewöhnlich liegt also die DNA als Doppelstrang in den Zellen vor. Zur Dekodierung sowie zur Verdopplung muss dieser Doppelstrang aufgelöst werden, dies geschieht *in vivo* enzymatisch. *In vitro* allerdings kann die DNA sowohl thermisch als auch mit Hilfe von Mikrokraftsonden gespalten werden.

Die RNA, die bei der Dekodierung der Gene immer entsteht, ist vom molekularen Aufbau her verschieden von der DNA. Sie tritt gewöhnlich als Einzelstrang auf, kann sich jedoch entlang einzelner Abschnitte zu sog. „Hairpins“ falten. Man sollte also aus physikalischer Sicht die Hairpin-Dynamik mit ähnlichen Modellen abbilden und beschreiben können, wie die DNA, vor allem wenn es um Experimente geht, bei denen eine Kraft angelegt wird.

Die großen Vorteile der DNA/RNA-Proben bestehen sowohl in der schon erwähnten genauen Kenntnis des molekularen Aufbaus als auch in der beliebigen Generierbarkeit ihrer Sequenz. Diese beiden Eigenschaften machen sie als Modellsysteme so attraktiv.

1.2 Die experimentelle Kraftmikroskopie

In der Kraftmikroskopie verzeichnete man in den letzten Jahren große Fortschritte, kontrollierte mechanische Manipulationen an einzelnen Biopolymeren vorzunehmen. Verschiedene technische Methoden haben sich parallel weiterentwickelt und finden für unterschiedliche Zwecke in der Biophysik Verwendung. Darüber geben wir in diesem Unterkapitel einen kurzen Überblick (siehe dazu die Übersichtsartikel [8, 10–18]).

Das Raster-Kraftmikroskop (AFM)¹ wurde ursprünglich zur Untersuchung von Oberflächen entwickelt. Es besteht aus einer Mikronadel, die unter Verwendung eines piezoelektrischen Kristalls mit einer Genauigkeit von bis zu 1 Å positioniert werden kann. Sehr bald wurde eine neue experimentelle Anwendung der Kraftmikroskope erkannt. Mit der Spitze der AFM-Messfeder, die einen Durchmesser von etwa 10 nm hat, kann man einzelne Biomoleküle desselben Durchmessers aus einer dichten Schicht auf einer Trägersubstanz herausziehen. Dabei ist es möglich, kleinste Kräfte, in der Größenordnung von pN, auf das einzelne Molekül zu übertragen und zu messen [19, 20] (siehe Abbildung 1.1).

Parallel dazu entwickelten sich die optischen Kraftsonden, die auf dem Grundprinzip beruhen, dass dielektrische Kügelchen in optischen Fallen, bestehend aus zwei entgegengesetzten Laserstrahlen, eingefangen werden können. Hierbei führen kleinste Kräfte zu Auslenkungen der Kügelchen aus ihrer Ruhelage, so dass auch hiermit Einzelmolekülexperimente durchgeführt werden können [21]. Der Unterschied zu den AFM ist, dass optische Sonden kleinere effektive Federkonstanten besitzen und daher eine höhere Auflösung der Kraft, bis zu einigen Zehntel pN, haben.

In diesem Zusammenhang sei auch die magnetische Pinzette erwähnt, die ein ähnliches Prinzip wie den optischen Sonden zugrundeliegt. Mit diesen Kraftmikroskopen werden Kügelchen in magnetischen statt optischen Fallen festgehalten, wodurch Auflösungen der Kraft von bis zu 10 fN möglich sind [22, 23].

Eine von der Auflösung her vergleichbare Methode, um Kräfte zu messen, ist die Biomembran-Kraftsonde² [24, 25]. Dabei wird ein Biomembranvesikel mit Hilfe einer Mikropipette kontrolliert. Kleinste Kräfte, die auf die Membran wirken, führen zu einer optisch messbaren Verformung des Vesikels.

Ähnlich breit gefächert, wie die experimentellen Methoden, sind inzwischen die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der Mikrokräften. Die Möglichkeiten der kontrollierten mechanischen Manipulation einzelner Biopolymere löste großes Interesse aus. Vor allem auf dem Gebiet der Selbstorganisation einzelner Proteine sind noch viele Fragen

¹engl: atomic force microscope

²engl.: biomembrane force probe

unbeantwortet, die man nun hofft, mit Hilfe der erzielten experimentellen Fortschritte und den entsprechenden theoretischen Konzepten aufklären zu können. Es stehen dabei verschiedene Systeme im Blickfeld. Zumeist handelt es sich um die Zielsetzung, inter- oder intramolekulare Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrücken, wechselwirkende statische Ladungen, van der Waals-Kräfte u.a. zu verstehen und daraus entsprechende Schlussfolgerungen für die Funktion und die Selbstorganisation der biofunktionalen Moleküle zu ziehen.

Es ist hier nicht möglich, alle Richtungen, die in den letzten Jahren verfolgt wurden, aufzuzeigen, daher haben wir uns auf die für diese Arbeit relevanten und wichtigsten beschränkt.

Zu den ersten Systemen, die mit Mikrokraftsonden getestet wurden, zählen Rezeptor-Ligand-Systeme, wie z.B. Biotin-Streptavidin [19, 25], Tropomyosin-Actin [26] und andere [27]. Bei diesen Experimenten werden zwei spezifisch gebundene Proteine auseinandergezogen bis sie sich trennen.

Zu den Systemen, deren intramolekulare Wechselwirkungen erforscht werden, zählen die DNA [22, 23, 28–38], RNA-Hairpins [39–42], Polysaccharide [43, 44], Proteine, wie z.B. Titin [45–52], Tenascin [53], das Membranprotein Bacteriorhodopsin [54, 55] u.v.a. Zu diesem Zweck werden die Biopolymere mit Hilfe einer Kraftsonde auseinandergezogen bis Konformationsänderungen auftreten, z.B. Entfaltungen, wie bei Titin oder auch charakteristische Änderungen der Biegesteifigkeit, wie bei der DNA.

Nicht nur spezifische Wechselwirkungen können mit Kraftmikroskopen studiert werden, auch biomechanische Funktionen einzelner Moleküle sind von großem Interesse. Dazu zählen molekulare Motoren, die erfolgreich mit optischen Kraftsonden untersucht wurden, z.B. Kinesin [56] und Myosin [57], die aktiv eine lineare Kraft erzeugen, sowie die F_0F_1 -ATPase [58], ein diskret rotierender Motor. Selbst bei komplexen Vorgängen von Enzymen, wie die RNA-Polymerase [59] sowie die DNA-Topoisomerase [60], können die dabei auftretenden Kräfte gemessen werden.

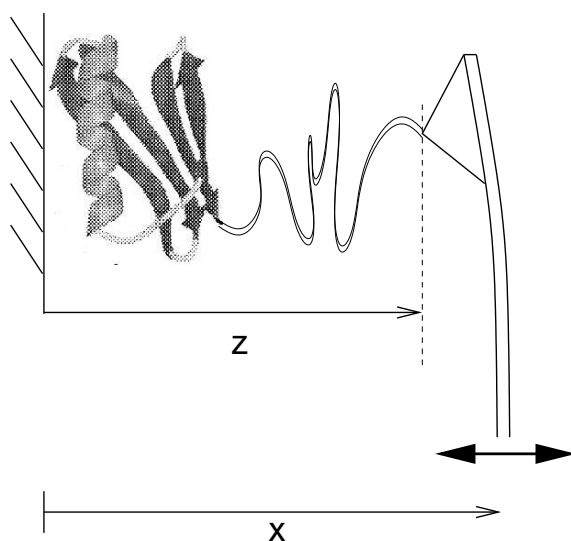


Abb. 1.1: Eine schematische Skizze des experimentellen Aufbaus einer AFM-Messung. Die Messfeder, deren Auslenkung mit Hilfe eines Lasers sehr genau gemessen werden kann, ist an einem Biopolymer befestigt, das wiederum auf einer Trägersubstanz aufgebracht ist. Der End-zu-End-Abstand wird im Weiteren mit z bezeichnet, die Position der Messfeder mit x . Der dünn gezeichnete Teil ist das Verbindungspolymer, der dick eingezeichnete das betrachtete Biopolymer.

1.3 Allgemeine Problemstellung

1.3.1 Die Messgrößen und ihre Bedeutung

Zur Definition des experimentellen Ablaufs in der Kraftmikroskopie verwendet man den Begriff des Protokolls, also die Vorgabe der von der Zeit t abhängigen Position der Messfeder

$$x = x(t) , \quad (1.1)$$

siehe Abbildung 1.1. Die Auslenkung der Feder ($x - z$) ist die Messgröße, die zunächst auch als Zeitserie vorliegt. Durch thermische Bewegungen der Moleküle auf der betrachteten Längenskala erhält man stochastische Messreihen, die nur statistisch ausgewertet werden können. Dadurch erhält man Histogramme in Abhängigkeit der Position der Messfeder oder von bestimmten Ereignissen, wie dem Zeitpunkt des Abreißen der Bindung. Mit Hilfe der Federkonstante ist es möglich, die zur Auslenkung gehörige Kraft zu berechnen. Die Koordinate z ergibt gleichzeitig den End-zu-End-Abstand des Biopolymers, das zwischen einem festgehaltenen Substrat und der Feder eingespannt ist, wobei häufig noch ein Verbindungspolymer dazwischengeschaltet ist.

Eine erfolgreiche Interpretation der Messergebnisse hängt notwendig davon ab, dass man sich bewußt macht, welche Größen messbar sind und welche nicht.

Wir haben schon in den einleitenden Abschnitten zum biologischen Hintergrund erläutert, dass die vollständige Kenntnis der Freien Energielandschaft wünschenswert wäre. Eine direkte Messung dieser Größe ist allerdings aus folgenden Gründen nur in wenigen Ausnahmefällen möglich:

Erstens ist auffällig, dass eine drastische Reduzierung der Anzahl der Freiheitsgrade vorliegt. Wir können nicht selbstverständlich davon ausgehen, dass man aus der Statistik einer fluktuierenden Koordinate z die Dynamik des Übergangs eindeutig erhält. Das ist nur dann der Fall, wenn eine einzige Reaktionskoordinate, die sich durch die Elimination aller schnellen Variablen ergibt, die Dynamik bestimmt. Im Folgenden werden wir deshalb eher den Begriff „Freies Energieprofil“ verwenden, das als Funktion einer einzigen Reaktionskoordinate r definiert wird.

Zweitens befindet sich zwischen der Feder und dem betrachteten Biomolekül ein Verbindungspolymer, das zwar eindeutig die Kraft auf die Bindung überträgt, das es aber unmöglich macht, die Reaktionskoordinate r selbst zu messen. Man kann jedoch in einer idealisierten Betrachtung der Messung die Ausdehnung des Verbindungspolymers gegen Null gehen lassen. Je näher die reale Messung diesem Idealbild kommt, desto einfacher ist es, das Freie Energieprofil der Reaktionskoordinate selbst zu bestimmen. Wir werden die Auswirkungen des Verbindungspolymers ausführlich untersuchen und geben zu den jeweiligen betrachteten Modellen an, wie die Situation zu bewerten ist.

Drittens ist die Freie Energie eine Größe aus der Gleichgewichtsstatistik. Jede Messung lenkt das Gesamtsystem aus dem Gleichgewicht aus; diese Aussage werden wir noch ausführlich theoretisch begründen. Die Schwierigkeit, aus Messungen im Nichtgleichgewicht

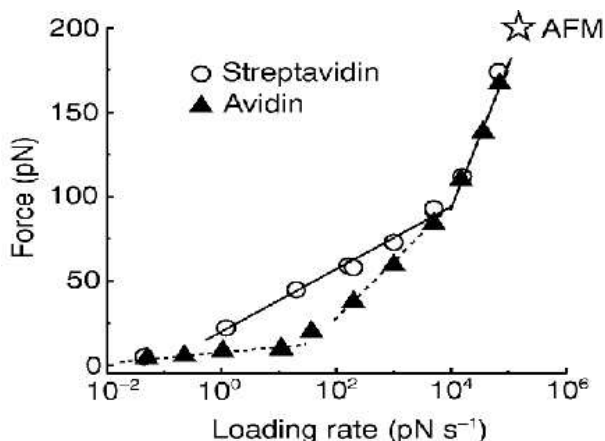


Abb. 1.2: Die Kraftspektren der Rezeptor-Ligand-Systeme Biotin-Avidin (Dreiecke) und Biotin-Streptavidin (Kreise) aus den Experimenten von Merkel *et al.*, entnommen aus [25]. Logarithmisch aufgetragen wird dabei die mittlere Abreißkraft als Funktion der Ziehgeschwindigkeit v nach dem experimentellen Protokoll (1.2). Hierbei sind verschieden steile Kurvenverläufe zu erkennen, die jeweils mit verschiedenen internen Barrieren korrespondieren. Zur Theorie der Kraftspektren siehe Kapitel 5.1.

Freie Energiedifferenzen zu extrahieren, stellt für die Theorie eine erhebliche Herausforderung dar.

Die inhärente Auslenkung aus dem Gleichgewicht ist letztlich der Grund, warum insbesondere für viele Rezeptor-Ligand-Systeme und viele Proteinentfaltungen die meisten Experimente zwangsläufig im Nichtgleichgewicht durchgeführt werden. Als häufig verwendete Methode wird die mittlere Abreißkraft in Abhängigkeit von der Ziehgeschwindigkeit v des linearen Protokolls

$$x(t) = x_0 + vt, \quad (1.2)$$

im Folgenden auch „lineare Rampe“ genannt, gemessen. Dabei ist x_0 die Position zum Zeitpunkt $t = 0$. Das Resultat einer solchen Messung nennt man Kraftspektrum, wobei die Interpretation und die Aussagekraft dieses Spektrums noch ausführlich im Zusammenhang mit den theoretischen Konzepten in Kapitel 5 zu diskutieren sind. Abbildung 1.2 zeigt exemplarisch zwei solcher Kraftspektren für Biotin-Avidin und Biotin-Streptavidin als Ergebnisse der Messungen von Merkel *et al.* in [25].

Die Grundfrage der vorliegenden Arbeit lautet somit: Wie kann man aus den Daten der kraftmikroskopischen Messungen einzelner Biopolymere Aussagen über das zugrundeliegende Freie Energieprofil erhalten?

Dabei wird besonders auf die theoretische Unterscheidung von Gleichgewichts- und Nichtgleichgewichtsmessungen Wert gelegt und entsprechende Möglichkeiten der Auswertung anhand konkreter Beispiele dargestellt.

1.3.2 Einführung in die theoretische Beschreibung eines Übergangs

Das Freie Energieprofil

Wie schon erwähnt, muss man bei der Untersuchung eines an ein Wärmebad angeschlossenen Moleküls stochastische Kräfte berücksichtigen, die nur mit Hilfe einer statistischen Theorie beschrieben werden können. Zur Modellbildung eines molekularen Übergangs benötigen wir also einige Begriffe aus der statistischen Physik (z.B. [61]). Die in dieser Arbeit verwendete Definition der Freien Energie ist

$$G \equiv -\beta^{-1} \ln Z , \quad (1.3)$$

wobei $\beta = 1/k_B T$ die mit der Boltzmann-Konstanten k_B skalierte inverse Temperatur T ist und die Zustandssumme

$$Z \equiv \int d^d \chi e^{-\beta \mathcal{H}(\{\chi_i\})} . \quad (1.4)$$

Die Integration geht dabei über den gesamten d -dimensionalen Phasenraum aller mikroskopischen Freiheitsgrade χ_i mit dem Boltzmanngewicht $\exp(-\beta \mathcal{H}(\{\chi_i\}))$. Ein konkretes Polymermodell definiert die zugehörige Hamiltonsche Funktion $\mathcal{H}(\{\chi_i\})$.

Wir werden nun das Freie Energieprofil für unsere Problemstellung spezifizieren. In dieser Arbeit beschäftigen wir uns meist mit der Freien Energie als Funktion einer Reaktionskoordinate r .

Die r -eingeschränkte Freie Energie ist eine Verallgemeinerung der Definition (1.3)

$$G(r) \equiv -\beta^{-1} \ln Z_r , \quad (1.5)$$

wobei

$$Z_r \equiv \int d^d \chi \delta(r(\{\chi_i\}) - r) e^{-\beta \mathcal{H}(\{\chi_i\})} \quad (1.6)$$

die r -eingeschränkte Zustandssumme ist. Die Diracsche Deltafunktion schränkt den Phasenraum so ein, dass die momentane Koordinate als Funktion der Mikrofreiheitsgrade $r(\{\chi_i\})$ gerade dem festgelegten Wert r entspricht. Die auf diese Weise definierte Freie Energie kann konkave instabile Bereiche aufweisen, in denen sich eine Trajektorie im statistischen Mittel nicht lange aufhält, sondern immer in Richtung eines nahe gelegenen Minimums relaxiert.

Die Freie Energie (1.5) bestimmt, wie wir später sehen werden, die Dynamik der Reaktionskoordinate. Entsprechend kann ein Freies Energieprofil für den End-zu-End-Abstand definiert werden, das die Dynamik von z bestimmt. In manchen zu untersuchenden Beispielen fallen die Reaktionskoordinate r und der End-zu-End-Abstand z zusammen, so dass nur ein einziger Freiheitsgrad übrigbleibt.

Wir haben bisher nur das ungestörte Freie Energieprofil $G(r)$ als Funktion einer Reaktionskoordinate betrachtet. Die Kopplung an eine externe Messfeder entspricht idealisiert

einem harmonischen Potential $V_0(x(t), r)$, das das Freie Energieprofil des Übergangs verändert. Wir führen daher eine effektive Hamiltonsche Funktion

$$H(r, t) \equiv G(r) + V_0(x(t), r) \quad (1.7)$$

ein, die wir im Folgenden auch „Energie“ oder „Potential“ nennen. Das Kopplungspotential V_0 ist über das experimentelle Protokoll zeitabhängig.

Die Mastergleichung und die Fokker-Planck-Gleichung

Aufgrund der thermischen Kopplung des zu untersuchenden molekularen Systems an ein Wärmebad, liegt es nahe, die Dynamik der Reaktionskoordinate als Markovschen Langevin-Prozess zu charakterisieren [62, 63]. Zudem sorgt die Viskosität des umgebenden Mediums, meist eine wässrige Lösung, dafür, dass die Trägheitskräfte gegenüber den Reibungskräften vernachlässigt werden können. Die zeitliche Dynamik kann unter diesen Voraussetzungen als überdämpfte Bewegung in einem Energiepotential H unter dem Einfluss der deterministischen Kraft

$$F(r, t) = -\frac{\partial H(r, t)}{\partial r} \quad (1.8)$$

beschrieben werden. Desweiteren benötigen wir die Annahme einer stochastischen Zufallskraft $\mathcal{F}(t)$, die eine Gaußsche Verteilung mit der zeitlichen Korrelation

$$\langle \mathcal{F}(t)\mathcal{F}(t') \rangle = \delta(t - t') \quad (1.9)$$

aufweist. Die Langevin-Gleichung für die zeitliche Entwicklung einzelner Trajektorien lautet damit

$$\frac{d}{dt}r = \frac{F(r, t)}{\xi} + \sqrt{2D}\mathcal{F}(t) . \quad (1.10)$$

Die Diffusionskonstante D ist mit der Reibungskonstanten ξ über die Einsteinrelation $D = k_B T/\xi$ verknüpft. Diese Relation ist eine spezielle Form des Fluktuations-Dissipations-Theorems. Sie folgt aus der Annahme, dass die resultierende Verteilung der Koordinate r sich im Fall zeitunabhängiger deterministischer Kräfte an die Gleichgewichtsverteilung annähert.

Eine dazu gleichwertige statistische Beschreibung erhält man mit der Fokker-Planck-Gleichung

$$\frac{\partial p(r, t)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial r} \frac{F(r, t)}{\xi} p(r, t) + \frac{\partial^2}{\partial r^2} D p(r, t) , \quad (1.11)$$

einer partiellen Differentialgleichung zweiter Ordnung, welche die zeitliche Entwicklung einer Wahrscheinlichkeitsdichte $p(r, t)$ angibt [62]. Den Vorfaktor F/ξ bezeichnet man

auch als Driftkoeffizienten. Die Größe $p(r, t)dr$ ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich die Trajektorie zur Zeit t im Ortsintervall $[r, r + dr]$ befindet.

Die Mastergleichung ist eine allgemeinere Beschreibung Markovscher Prozesse, mit der sowohl kontinuierliche Prozesse als auch diskrete Zustände beschrieben werden können [64, 65]. Die zeitliche Entwicklung der Wahrscheinlichkeit $\Phi_i(t)$ für die Besetzung des diskreten Zustandes i wird durch die Gleichung

$$\frac{\partial \Phi_i(t)}{\partial t} = \sum_j k_{ji} \Phi_j(t) - k_{ij} \Phi_i(t) \quad (1.12)$$

beschrieben. Hier und im Folgenden bezeichnet k_{ij} die Übergangsrate vom diskreten Zustand i zum Zustand j . Die Rate entspricht der Wahrscheinlichkeit pro Zeiteinheit eines Übergangs, ausgehend von einem besetzten Zustand.

Mit Hilfe eines verallgemeinerten H-Theorems von Boltzmann kann gezeigt werden, dass eine stationäre Lösung der Mastergleichung (1.12) existiert [64].

Für einen kontinuierlichen stochastischen Prozess, dessen Zeitentwicklung durch die Fokker-Planck-Gleichung (1.11) beschrieben wird, kann in manchen Fällen eine diskrete Mastergleichung abgeleitet werden. Die diskreten Zustände entsprechen dann den getrennten Minima in einer Potentiallandschaft. Die effektiven Übergangsraten, die man aus einer Analyse der überdämpften Bewegung in einem stationären Potential erhält, sind die Kramers-Raten [66], zum Beispiel von Zustand 1 nach 2 (siehe Anhang (A.1))

$$k_{12} = \beta D \frac{\sqrt{|H''|_{r_1} |H''|_{r_a}}}{2\pi} e^{-\beta \Delta H} . \quad (1.13)$$

Darin gehen die als gegeben betrachtete Diffusionskonstante, die Höhe der Barriere ΔH sowie die lokalen Krümmungen des Potentials am Minimum bei r_1 und am Maximum bei r_a ein. Für zeitabhängige Potentiale hingegen entsprechen die effektiven Übergangsraten nicht exakt den Kramers-Raten [67, 68]. Wir werden aber im Sinne einer adiabatischen Näherung für die spontanen Raten immer die Kramers-Raten verwenden, deren Gültigkeit für den Fall einer linearen Rampe über einen großen Bereich der Zeitskalen hinweg gezeigt wurde [69]. Diese Näherung bedeutet, dass die stochastische Variable innerhalb der Minima immer schnell bezüglich der Übergangszeiten über die Barriere relaxiert.

Zusammenfassend beschreiben wir noch einmal die zwei komplementären Modellbilder. Erstens betrachten wir nach Gleichung (1.10) eine überdämpfte Bewegung in einem effektiven Potential, das sich aus dem Freien Energieprofil und dem externen Koppungspotential zusammensetzt. Alle weiteren physikalischen Kopplungen an die Umgebung werden in einer einzigen Konstanten zusammengefasst, der Diffusionskonstanten D . Diese muss in der Praxis entweder gemessen oder aus einer mikroskopischen Theorie abgeleitet werden. Wir setzen sie als bekannt voraus. Zweitens reduzieren wir die kontinuierliche Bewegung auf eine effektive Zustandsbeschreibung nach Gleichung (1.12). Darin spielen die Kramers-Raten die entscheidende Rolle, die zwar aus den vorigen Modellannahmen berechnet werden können, die aber umgekehrt nicht in eindeutiger Weise

denselben Satz an Informationen liefern. Wie wir später zeigen werden, erhält man aus dem Verhältnis der Übergangsraten nur die Freie Energiedifferenz der Zustände.

1.3.3 Weiterführende Fragestellungen

Da wir nun die wesentlichen Grundzüge der Theorie bereitgestellt haben, listen wir die weiterführenden Fragestellungen auf.

Zunächst muss anhand der konkreten Beispiele entschieden werden, welche Modellbildung herangezogen werden kann. Das hängt einerseits von der Zielsetzung und andererseits von der Komplexität des Systems ab. Je nachdem welche Parameter in die Modelle eingehen, erhält man bei der Auswertung der Daten nur einen Ausschnitt der Gesamtinformation. Eine wesentliche Fragestellung dieser Arbeit liegt darin, verschiedene Modelle auf ihre Aussagekraft und Anwendbarkeit hin zu untersuchen. Dabei steht auch der Vergleich von zwei experimentellen Protokollen, dem linearen und dem periodischen, im Vordergrund.

Ein weiterer Aspekt, der anhand konkreter Beispiel untersucht wird, ist die Frage nach dem Übergang vom Gleichgewicht zum Nichtgleichgewicht, wobei die Methode der Untersuchung schon durch die Wahl des Modells festgelegt wird.

Nicht zuletzt versuchen wir immer, die schon bekannten Modelle auch auf neue, meist komplexere Situationen, anzuwenden.

1.4 Die Entwicklung der Theorie zur Kraftmikroskopie

In diesem Unterkapitel werden wir einen Überblick über den Stand der Forschung geben. Eine Vertiefung der Theorien findet man in den darauffolgenden Kapiteln zu den unterschiedlichen Gebieten.

Die experimentellen Entwicklungen kraftmikroskopischer Methoden führten zunächst zu einer Aufbereitung der Arbeiten von Kramers, der die spontanen Übergangsraten über eine Barriere berechnete [70] (Anhang A.1). Diese sind auch im Nichtgleichgewicht gültig, wobei immer die Annahme getroffen wird, dass innerhalb des Minimums die Relaxation schnell gegenüber der Übergangszeit ist. Bell betrachtete die Zelladhesion und stellte in [71] fest, dass schon bei einer kleinen Kraft der Gleichgewichtszustand bei dem ungebundenen, freien Zustand liegt. Er stellte die Gleichung für die durch eine angelegte Kraft modifizierte Übergangsrate auf. Diese wird in der vorliegenden Arbeit auch häufig verwendet.

Evans und Ritchie erkannten als erste die Bedeutung der Laderate bei Reißexperimenten an Ligand-Rezeptor-Systemen [72]. Die wahrscheinlichste Abreißkraft hängt logarithmisch von der Laderate ab, skaliert mit der spontanen Übergangsrate. Dabei wurde eine einzige Übergangsrate, die Kramers-Rate zugrundegelegt und alle weiteren Details des Freien Energieprofils vernachlässigt. Eine Untersuchung der Verteilung der Abreißkraft unter denselben Voraussetzungen wurde etwa gleichzeitig von Izrailev *et al.*

durchgeführt [73]. Der exakte analytische Ausdruck für die mittlere Abreißkraft wurde zuerst von Gergely *et al.* berechnet [74]. Bei dieser Art von Messung erhält man die spontane Rate und den Abstand des Minimums zur Barriere.

Heymann und Grubmüller zeigten in [75], wie mit Hilfe einer weiterführenden statistischen Analyse aus den Kraftspektren ein mittleres Kraftprofil ermittelt werden kann.

Desweiteren berechneten Hummer und Szabo für einen Spezialfall Übergangsraten, die von Bells Ausdruck verschieden sind [76].

Ein wesentlicher Fortschritt wurde mit der Begründung der Jarzynski-Gleichung [77] erzielt. Damit wurde es möglich, einen theoretischen Zusammenhang zwischen Nichtgleichgewichtsmessungen an beliebigen Systemen und Gleichgewichtsgrößen, wie die Freie Energiedifferenz, herzustellen. Auch das gesamte Freie Energieprofil, z.B. von Proteinen, kann damit berechnet werden, wie in [78, 79] mit unterschiedlichen Messprotokollen demonstriert wurde.

Weitere nennenswerte Entwicklungen der Theorie betreffen spezielle Anwendungen der dynamischen Reißtheorie, wie z.B. die Betrachtung parallel angeordneter Bindungen als Modell für Zelladhäsion [80] sowie eine Reihe sequenziell angeordneter Bindungen als Modell für Multidomänen-Biopolymere wie Titin [81] und entsprechend eines Reißverschlusses angeordnet zur Modellierung der DNA [82]. Zudem wurden Fortschritte in der theoretischen Modellierung komplexerer Übergänge mit metastabilen Zuständen erzielt [83].

2 Das 2-Zustandssystem

2.1 Ein einfaches Modell der Proteinfaltung

2.1.1 Die statischen Zustände

In diesem Kapitel werden wir das einfachste Modell, das man zur Beschreibung der Proteinfaltung überhaupt heranziehen kann, untersuchen. Die Abbildung (2.1) dient dabei als Illustration der Modellbildung. Wir unterscheiden hier zwei verschiedene Zustände. Im ersten Zustand besteht das Biopolymer aus einem wohlgeordneten gefalteten und einem gestreckten Anteil. Meist ist der Zustand durch das Vorhandensein einer oder mehrerer atomarer Bindungen fixiert. Die Konturlänge beträgt in diesem Zustand $L = L_1$.

Der zweite Zustand ist der entfaltete Zustand. Nach dem Öffnen der Bindungen ist die Konturlänge auf $L = L_1 + \delta L$ angewachsen.

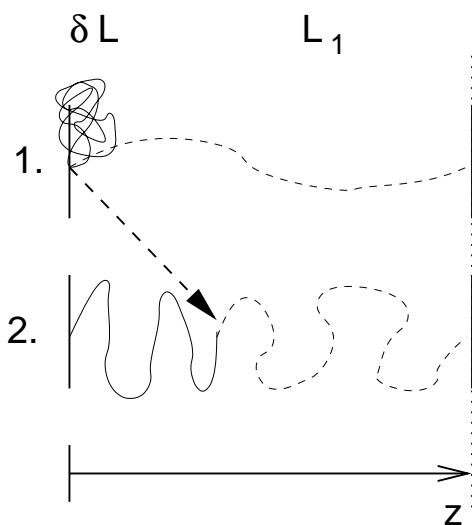


Abb. 2.1: Schematische Darstellung zweier Konformationszustände eines Proteins. In Zustand 1 ist das Protein gefaltet und besitzt effektiv die Konturlänge L_1 , entlang der die Kraft wirkt. In Zustand 2 ist das Protein entfaltet und die effektive Konturlänge hat sich um δL vergrößert, so dass bei gleichem End-zu-End-Abstand z eine kleinere Kraft wirkt. Der gestrichelte Pfeil deutet den Übergangsprozess an, bei dem einerseits die spezifischen Bindungen aufgehen und andererseits der geordnete Faltungszustand durch thermische Fluktuationen in einen entropisch bevorzugten Zustand übergeht.

Die Kraft entlang eines Polymers bei festgehaltenem End-zu-End-Abstand z hängt von der Konturlänge ab, weshalb beim Entfalten ein Abfall der Kraft zu verzeichnen ist. Sie kann mit Hilfe eines geeigneten Polymermodells berechnet werden. Für Biopolymere, wie die Proteine und die DNA, wird meist das semiflexible Polymermodell (WLC)¹ verwendet. Dabei wird angenommen, dass zum Verbiegen des Polymers Energie notwendig

¹engl.: worm-like-chain model

ist. Die Kraft F als Funktion des End-zu-End-Abstandes z des Biopolymers wird hierbei im Rahmen dieses Modells gemäß

$$F(z, L) = \frac{1}{\beta L_p} \left(\frac{1}{4(1 - z/L)^2} - \frac{1}{4} + \frac{z}{L} \right) \quad (2.1)$$

berechnet [28, 29]. Die Persistenzlänge L_p ist ein Maß für die Steifheit. Sie gibt die Längenskala an, auf der die Korrelation für die Richtung des Polymers abfällt. Der Ausdruck (2.1) unterliegt in seiner Gültigkeit Einschränkungen, die sich dahingehend auswirken, dass die Persistenzlänge, z.B. für Titin sehr unterschiedlich gemessen wird: von $L_p = 0.2$ nm [48] bis zu $L_p = 0.8$ nm [49], je nachdem in welchem Bereich der Kraft die Messpunkte liegen. Dies liegt daran, dass dieses Modell als einzigen Parameter die Persistenzlänge enthält. Vorschläge zur Erweiterung dieses Modell unter Verwendung von bis zu 6 weiteren Parametern gibt es neuerdings [84]. Die erzielte Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment ist weitaus besser als mit der Näherungsformel (2.1), die bis zu 10 Prozent Abweichungen bei $z/L \simeq 0.5$ aufweist. Allerdings würde die Menge an neuen Parametern die hier untersuchten Modelle nur um ein vielfaches unübersichtlicher machen und keine weiterführenden Erkenntnisse liefern.

Die Freie Energiedifferenz zwischen den beiden Zuständen nach Abbildung 2.1 besteht aus einem positiven spezifischen Bindungsanteil und aus einem negativen Anteil, der durch den Entropiezuwachs beim Entfalten zu erklären ist. Im gefalteten Zustand ist ein hoher Ordnungsgrad festzustellen, der auf die tertiären Strukturen, wie „ α -Helizes“ und „ β -Sheets“, zurückzuführen ist. Diese entstehen aus dem komplexen Wechselspiel zwischen sterischer Abstoßung und sonstigen nichtspezifischen Wechselwirkung verschiedener Proteinteile. Die spezifischen Bindungen sind dafür verantwortlich, dass die gefaltete Konfiguration stabil ist. Entfernt man in einem Gedankenexperiment diesen Bindungsanteil bleibt ein relativ flaches Minimum für größere r aufgrund der nichtspezifischen Wechselwirkungen und der entropischen Beiträge.

2.1.2 Die Relaxationsdynamik ohne äußerer Kraft

Die Dynamik des Entfaltens wird, wie in Kapitel 1.3.2 erläutert, auf die Langevin-Dynamik einer einzigen Reaktionskoordinate r zurückgeführt. Diese kann durch eine stochastische Bewegung in einem Freien Energieprofil $G(r)$ beschrieben werden, siehe Abbildung 2.2. Hierbei wird die Wahl dieses speziellen Freien Energieprofils davon bestimmt, dass die beiden Minima den beiden Zuständen entsprechen und die Barriere der dynamischen Hemmung, die durch die spezifische Bindung gegeben ist. Die Voraussetzungen für eine Beschreibung der zeitlichen Entwicklung von Φ , der Wahrscheinlichkeit zur Besetzung des Zustands 1, mit Hilfe der Mastergleichung (1.3.2)

$$\frac{d}{dt}\Phi = -(k_{12}^0 + k_{21}^0)\Phi + k_{21}^0, \quad (2.2)$$

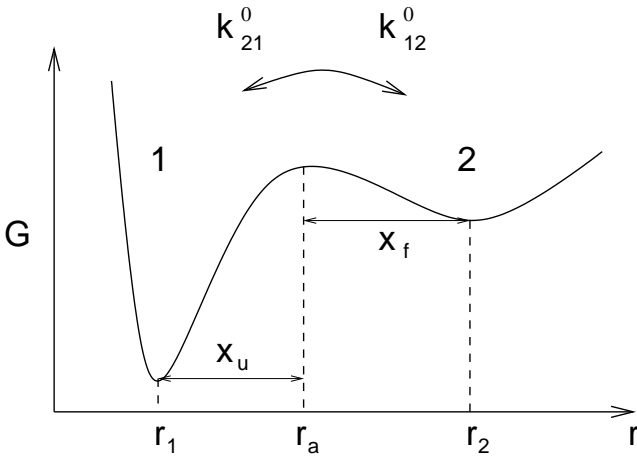


Abb. 2.2: Ein typisches Doppelmuldenpotential der Freien Energie G in Abhängigkeit von einer Reaktionskoordinate r . Die Zustände korrespondieren zum gefalteten und entfalteten Zustand nach Abbildung 2.1. Die Vorwärtsrate k_{12}^0 und die Rückwärtsrate k_{21}^0 sind die jeweiligen spontanen Kramers-Raten. Die Abstände x_u und x_f sind wichtige Parameter für die Änderung der Raten nach Gleichung 2.18.

werden als gegeben angenommen, dabei bezeichnen k_{ij}^0 die spontanen Übergangsraten von Zustand i nach j .

Wenn die Raten zeitunabhängig sind, ist die Lösung der Gleichung (2.2) mit der Anfangsbedingung $\Phi(0) = 1$ durch

$$\Phi(t) = \Phi_0 \left(1 - e^{-\Lambda^0 t}\right) + e^{-\Lambda^0 t} \quad (2.3)$$

gegeben. Im Limes großer Zeiten $t \gg 1/\Lambda^0$ nähert sie sich unabhängig von der jeweiligen Anfangsbedingung der Funktion

$$\Phi_0 \equiv \lim_{t \rightarrow \infty} \Phi(t) = \frac{k_{21}^0}{k_{12}^0 + k_{21}^0} \quad (2.4)$$

an. Die inverse natürliche Zeitskala

$$\Lambda^0 \equiv (k_{12}^0 + k_{21}^0) \quad (2.5)$$

ergibt somit die Relaxationszeit

$$\tau_{eq} = 1/\Lambda^0. \quad (2.6)$$

Für Zeiten $t \gg \tau_{eq}$ kennen wir zudem aus der statistischen Physik [61] die Besetzungswahrscheinlichkeit im Gleichgewicht,

$$\Phi_0 = \frac{e^{-\beta G_1}}{Z} \quad (2.7)$$

$$1 - \Phi_0 = \frac{e^{-\beta G_2}}{Z} \quad (2.8)$$

mit der Zustandssumme $Z = e^{-\beta G_1} + e^{-\beta G_2}$ als Normierung. Somit können wir mit den Gleichungen (2.4) und (2.7) die Beziehung

$$\frac{k_{21}^0}{k_{12}^0} = e^{-\beta(G_1 - G_2)} \quad (2.9)$$

zwischen den Raten und den Energien herstellen, die auch als detaillierte Bilanz² bekannt ist. Dies ist eine direkte Konsequenz aus der Kopplung an das Wärmebad und ein spezielles Beispiel des Prinzips der detaillierten Bilanz [64]. In einem verallgemeinerten Zugang lautet dieses Prinzip

$$k_{ji}^0 p_0(j) = k_{ij}^0 p_0(i) \quad (2.10)$$

mit der stationären Wahrscheinlichkeit $p_0(i)$ des Zustandes i . Allerdings gilt (2.10) nicht für die stationäre Lösung jeder beliebigen Mastergleichung. Im Falle einer endlichen, linearen Kette mit Übergängen nur zwischen benachbarten Zuständen, ist die detaillierte Bilanz jedoch immer erfüllt. Für das betrachtete 2-Zustandssystem lautet also die detaillierte Bilanz

$$\Phi_0 k_{12}^0 = (1 - \Phi_0) k_{21}^0, \quad (2.11)$$

welche mit Gleichung (2.9) identisch ist.

2.1.3 Die Übergangsraten unter dem Einfluss äußerer Kraft

Der Einfluss der Feder, bzw. auch des Verbindungspolymers, welches das Protein mit der Messfeder verbindet, führt in linearer Näherung einfach zum Anheben bzw. Absenken der Minima des Freien Energieprofils. Für die Freie Energiedifferenz zwischen dem ersten Minimum bei r_1 und dem Maximum bei r_a gilt

$$\Delta G_{1a} = G(r_a) - G(r_1) + V_0(x - r_a) - V_0(x - r_1) \quad (2.12a)$$

$$= \Delta G_{1a}^0 + V_0(x - r_a) - V_0(x - r_a + x_u) \quad (2.12b)$$

$$\approx \Delta G_{1a}^0 - x_u \frac{\partial V_0(x)}{\partial x} + O(x_u^2 V_0'') \quad (2.12c)$$

mit $\Delta G_{1a}^0 \equiv G(r_a) - G(r_1)$ und

$$x_u \equiv r_a - r_1. \quad (2.13)$$

Im Folgenden wird in Gleichung (2.12c) nur die lineare Ordnung berücksichtigt. Die Kraft auf die Messfeder beträgt gerade

$$F(x) \equiv -\frac{\partial V_0(x)}{\partial x}, \quad (2.14)$$

²engl.: detailed balance

so dass Gleichung (2.12c) bis zur linearen Ordnung in x_u

$$\Delta G_{a2} = \Delta G_{a2}^0 - x_u F(x) \quad (2.15)$$

ergibt. Äquivalent dazu gilt für die Differenz der Freien Energie zwischen dem Maximum und dem zweiten Minimum bei r_2

$$\Delta G_{a2} = \Delta G_{a2}^0 + x_f F(x) , \quad (2.16)$$

mit $\Delta G_{2a}^0 \equiv G(r_a) - G(r_2)$ und

$$x_f \equiv r_2 - r_a . \quad (2.17)$$

Gleichungen (2.12) und (2.16) führen entsprechend dem Bellschen Ausdruck nach [71] zu modifizierten Kramerschen Übergangsraten (1.13)

$$k_{12}(x) = k_{12}^0 e^{\beta x_u F(x)} \quad (2.18a)$$

$$k_{21}(x) = k_{21}^0 e^{-\beta x_f F(x)} , \quad (2.18b)$$

die dann in der Mastergleichung (2.2) anstelle der spontanen Übergangsraten eingesetzt werden.

Wir haben bisher idealisiert angenommen, dass entlang des gesamten Polymers zu jeder Zeit dieselbe Kraft wirkt, was sicher nicht der physikalischen Realität entspricht. Der Übergang benötigt eine gewisse Zeit, da die Spannung durch thermische Fluktuationen erst entlang des Polymers propagieren muss. Die Längenskala, auf der diese Propagation stattfindet, ist nach der Zeit t für semiflexible Polymere während des Ziehens von der Ordnung $(\kappa/T)^{1/2}(\zeta Ft)^{1/4}$ mit der Kraft F , der Biegesteifigkeit κ und dem Reibungskoeffizienten ζ [85]; für beispielsweise DNA und einer typischen schwachen Kraft von $F \simeq 0.1$ pN beträgt dieser Ausdruck $1\mu\text{m} (t/\text{s})^{1/4}$. Das heißt die Propagation verknüpft eine Längenskala mit einer Zeitskala über die Potenz 1/4. Die relevante Längenskala entspricht der Größenordnung der Potentialstruktur, also einige nm. Solange die Zeit für die Propagation der Spannung sehr viel kleiner ist als typische andere Zeitskalen, auf denen das Potential experimentell durch eine Kopplung verändert wird, kann man idealisiert davon ausgehen, dass sich die Spannung augenblicklich im Polymer ausbreitet. Typische Werte für die von uns betrachteten Manipulationen an Biopolymeren erreichen Werte für Zeitskalen im Bereich von ms, für die Längenskala von einigen nm. Die Spannung benötigt nach den Zahlenwerten für die DNA für dieselbe Strecke ca. 10^{-12} s, propagiert also bedeutend schneller. Jüngste Veröffentlichungen zeigen, dass aufgrund der Nichtlinearität des Systems die Propagation der Störung von der Prozessführung abhängt [86]. Beim Entspannen des Polymers propagiert die Spannung proportional zu $t^{1/2}$, hingegen für sehr kleine Zeiten bzw. kleine Kräfte proportional zu $t^{1/8}$.

2.2 Die fluktuierende Messfeder

Eine auf die Reaktionskoordinate reduzierte Mastergleichung vom Typ (2.2) beinhaltet nicht mehr die Fluktuationen der Messfeder. Wir werden diese Näherung im folgenden Unterkapitel untersuchen und Korrekturterme herleiten.

Die experimentellen Untersuchungen liefern zunächst die Kraft als Zeitreihe und, nach einer Auswertung der Histogramme, als Funktion der Position x der Kopplungsfeder (siehe Abbildung 1.1). Im Ensemblemittel kann die Kraft im Polymer F_{poly} mit der Federkraft gleichgesetzt werden,

$$k_0(x - \langle z \rangle) = F_{poly} . \quad (2.19)$$

Daraus erhält man durch die Wahl eines geeigneten Polymermodells den Mittelwert $\langle z \rangle$, der als stabiler Zustand identifiziert werden kann. Für den Fall mehrerer interner Zustände der Reaktionskoordinate r , die sich zugleich auf die Kraft im Polymer auswirken, z.B. über die Konturlänge, wird aus Gleichung (2.19)

$$k_0(x - \langle z|r \rangle) = F_{poly} , \quad (2.20)$$

indem man statt des Mittelwertes den bedingten Mittelwert $\langle z|r \rangle$ einsetzt. Des Weiteren nehmen wir vereinfacht wieder ein 2-Zustandsmodell an, so dass r nur zwei Werte, r_1 und r_2 , annehmen kann. Die Verbundwahrscheinlichkeit, die nun den gesamten Prozess beschreibt, ist $P(z, r)$. Die zugehörige Entwicklungsgleichung ist eine Mischung aus Mastergleichung und Fokker-Planck-Gleichung [87]. Durch die Einschränkung des Zustandsraumes auf zwei mögliche Zustände von r verbleibt

$$\frac{\partial P(z, r_1; t)}{\partial t} = -k_{12}P(z, r_1; t) + k_{21}P(z, r_2; t) + \mathcal{L}_z P(z, r_1; t) \quad (2.21)$$

mit dem Fokker-Planck-Operator \mathcal{L}_z , der auf die Koordinate z wirkt aber durchaus auch von r abhängt, genauso wie die Übergangsraten k_{ij} über die Kraft von z abhängen. Eine Trennung der Variablen erhält man mit Hilfe der adiabatischen Näherung oder auch Elimination der schnell veränderlichen Variablen. Dabei spielen Projektoren eine wichtige Rolle [63,64]. Wir werden zugunsten der Anschauung auf die Darstellung streng mathematischer Details verzichten. Zunächst führen wir die bedingte Wahrscheinlichkeit $p(z|r)$ über die Definitionsgleichung

$$P(z, r) \equiv p(z|r)\Phi(r) \quad (2.22)$$

ein. Man erhält nun zwei Entwicklungsgleichungen, eine für die bedingte Wahrscheinlichkeit, von der angenommen wird, dass sie sich auf sehr kleiner Zeitskala verändert, während die Veränderung von $\Phi(r)$ auf größeren stattfindet. Daher geht man zunächst von der Gültigkeit von

$$\frac{\partial p(z|r; t)}{\partial t} = \mathcal{L}_z p(z|r; t) \quad (2.23)$$

aus. Diese Gleichung wird näherungsweise durch die Verteilung

$$p(z|r; t) \sim e^{-(z-\langle z|r \rangle)^2/2\sigma^2} \quad (2.24)$$

gelöst, wobei $\langle z|r \rangle$ explizit aus dem Kräftegleichgewicht (2.20) berechnet werden kann. Die Varianz ergibt sich aus der einfachen Annahme, dass innerhalb des quadratisch angenäherten Potentialminimums thermische Fluktuationen stattfinden, so dass

$$k_B T \simeq \frac{k_0}{2} \sigma^2 \quad (2.25)$$

gilt. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Varianz hier proportional zu $1/k_0$ ist, also invers proportional zur Federkonstanten. Die zweite Gleichung ergibt sich dann aus Integration von Gleichung (2.21) über z und unter Verwendung von Gleichung (2.23)

$$\frac{\partial \Phi(r_1; t)}{\partial t} = -\langle k_{12}|r_1 \rangle \Phi(r_1; t) + \langle k_{21}|r_2 \rangle (1 - \Phi(r_1; t)) \quad (2.26)$$

mit den bedingten Mittelwerten

$$\langle k_{ji}|r \rangle \equiv \int k_{ji}(z) p(z|r) dz . \quad (2.27)$$

Aus Gleichung (2.23) zusammen mit (2.25) ergibt sich im Limes $k_0 \rightarrow \infty$ für $p(z|r)$ eine Diracsche Deltafunktion, so dass in diesem Fall exakt

$$\langle k_{ji}|r \rangle = k_{ji}(\langle z|r \rangle) \quad (2.28)$$

gilt. Für weniger steife Federn können die Korrekturterme mit Hilfe der Sattelpunktsnäherung [88] aus dem Integral (2.27) berechnet werden und man erhält bis zur zweiten Ordnung

$$\langle k_{ji}|r \rangle \approx k_{ji}(\langle z|r \rangle) + \frac{1}{2} k_{ji}''|_{\langle z|r \rangle} \sigma^2 . \quad (2.29)$$

Wenn man das WLC-Modell in der Näherung eines geringen End-zu-End-Abstandes betrachtet, so ergibt sich aus dem Ausdruck (2.1) für die Kraft ein Hooksches Gesetz mit der Polymerfederkonstanten

$$k_{poly} \equiv \frac{3}{2\beta L L_p} . \quad (2.30)$$

Da das zugehörige Potential quadratisch ist, spricht man vom Gaußschen Polymermodell [89]. Es beinhaltet die universalen Eigenschaften vieler mikroskopischer Modelle. Damit lautet der Korrekturterm zweiter Ordnung in Gleichung (2.29)

$$\frac{1}{2} k_{ji}''|_{\langle z|r \rangle} \sigma^2 = \frac{\beta x_{u,f}^2 k_{poly}^2}{k_0} k_{ji}(\langle z|r \rangle) . \quad (2.31)$$

Die Fluktuation der Messfeder kann genau dann vernachlässigt werden, wenn der dimensionslose Vorfaktor klein gegenüber 1 ist. Für typische Werte von etwa $x_{u,f} \simeq 1 - 10$ nm, $k_B T = 4.14$ pN nm, $k_{poly} \simeq 0.1$ pN/nm und typische Federhärten von AFM Messfedern von $k_0 \simeq 5 - 10$ pN/nm [8] ist die Abschätzung dieses Faktors $2 \cdot 10^{-3} - 4 \cdot 10^{-2}$. Von daher darf also in vielen Fällen wirklich von einer Gleichung der Art (2.28) ausgegangen werden.

Bei gegebenem Protokoll $x = x(t)$ ergibt sich somit der End-zu-End-Abstand des Biopolymers, falls man die Fluktuationen vernachlässigt, aus dem Kräftegleichgewicht zwischen Messfeder und WLC-Polymer (2.20). Diese Beziehung müsste also für $\langle z|r \rangle$ gelöst werden. Für Gaußsche Polymere ist die Lösung

$$z \approx x(1 + k_{poly}/k_0)^{-1} . \quad (2.32)$$

Da die Messfeder allerdings gegenüber dem WLC-Polymer eine vergleichsweise große Federkonstante besitzt, kann zudem in vielen der folgenden Betrachtungen die Entwicklung

$$z \approx x(1 - k_{poly}/k_0) + O((k_{poly}/k_0)^2) \quad (2.33)$$

benutzt werden. In nullter Ordnung von k_{poly}/k_0 ist die Kraft auf das Polymer durch den Ausdruck des WLC-Modells (2.1) gemäß

$$F(x, L) = \frac{1}{\beta L_p} \left(\frac{1}{4(1 - x/L)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L} \right) \quad (2.34)$$

gegeben, indem dort die Koordinate x statt z eingesetzt wird. Veränderungen, die sich aufgrund endlicher Federhärte ergeben, werden explizit an einigen Stellen betrachtet.

2.3 Periodisch angeregte Übergänge

2.3.1 Eine analytische Lösung der Mastergleichung

Die periodische Wahrscheinlichkeitsverteilung

Die kontrollierte mechanische Manipulation einzelner Biomoleküle eröffnet auch die Möglichkeit, die Vorhersagen bekannter Theorien zu testen. Wir werden zeigen, wie die stochastische Resonanz hierbei eine Rolle spielen kann (siehe Übersichtsartikel [90]). Stochastische Resonanz ist ein bekanntes Phänomen. Sie tritt universell bei beliebigen periodisch getriebenen stochastischen Übergängen auf. Dabei bezieht sich der Begriff Resonanz auf das Signal-Rausch-Verhältnis, welches maximal werden kann. Dazu muss über eine experimentell zugängliche Größe, wie die Stärke des Rauschens oder die anregende Frequenz, eine Resonanzbedingung für die beiden relevanten Zeitskalen erfüllt

sein, die erstens durch die mittlere Übergangszeit und zweitens durch die anregende Periodendauer gegeben ist. Eine ähnliche Bedingung werden wir für asymmetrische Freie Energieprofile mittels einer Analyse des statistischen Fehlers erhalten.

Wir werden die Kraftmikroskopie dahingehend erweitern, dass wir ein von der linearen Rampe (Gl. 1.2) verschiedenes Protokoll für die Position der Messfeder betrachten, das periodische Protokoll [79, 91]. Dies wird in zweifacher Hinsicht interessante Ergebnisse liefern: Erstens ist die lineare Rampe für Experimente außerhalb des Gleichgewichts nur geeignet, den Entfaltungsübergang zu messen. Mit Hilfe des periodischen Protokolls spielen hingegen auch die Faltungsübergänge eine wesentliche Rolle. Zweitens sind die Anwendungsbeispiele der stochastischen Resonanz bisher sehr begrenzt. Hiermit steht nun ein System zur Verfügung, das sehr einfach dazu verwendet werden kann, die theoretischen Vorhersagen experimentell zu testen.

Wir werden ausgehend vom 2-Zustandssystem mit Hilfe der Mastergleichung eine analytische Näherungslösung berechnen und zeigen, wie diese benutzt werden kann, um Informationen über das zugrundeliegende Freie Energieprofil zu erhalten.

Für die periodische Anregung verwenden wir das Protokoll der Position der Messfeder

$$x(t) = x_0 + x_a \cos(\omega t) , \quad (2.35)$$

wobei x_0 die zeitunabhängige Vorauslenkung der Feder, x_a die Amplitude und ω die Frequenz der Anregung ist. Diese Art periodischer Anregung stellt experimentell keine große Herausforderungen dar. Periodische Protokolle für AFM³ werden auch bei Oberflächenuntersuchungen verwendet [92]. Im Folgenden wird angenommen, dass die Amplitude klein gegenüber der Konturlänge des Polymers ist, also $x_a \ll L$.

Für zeitabhängige Messungen muss das Modell erweitert werden. Die Mastergleichung (2.2) muss neu formuliert werden

$$\frac{d}{dt}\Phi = -(k_{12}(t) + k_{21}(t))\Phi + k_{21}(t) , \quad (2.36)$$

unter Berücksichtigung zeitabhängiger Raten (2.18)

$$k_{12} = k_{12}^0 e^{\beta x_u F(x(t), L_1)} \quad (2.37a)$$

$$k_{21} = k_{21}^0 e^{-\beta x_f F(x(t), L_2)} . \quad (2.37b)$$

In Zustand 1 ist die Konturlänge $L = L_1$, in Zustand 2 ist $L = L_2 \equiv L_1 + \delta L$, wobei δL die Differenzlänge bezeichnet, die bei dem Übergang frei wird.

Zur Berechnung der Kraft $F(x(t), L)$ verwenden wir Gleichung (2.34). Diese kann mit dem periodischen Protokoll (2.35) bis zur linearen Ordnung in x_a/L gemäß

$$F(x(t), L) \approx F(x_0, L) + F(x_0, L)' x_a \cos(\omega t) \quad (2.38a)$$

$$= F(x_0, L) + \frac{1}{\beta L_p} \left(\frac{x_a}{L} + \frac{x_a}{2L(1 - x_0/L)^3} \right) \cos(\omega t) \quad (2.38b)$$

$$\equiv F_0 + F_a \cos(\omega t) \quad (2.38c)$$

³engl.: tapping mode

entwickelt werden, wobei F_0 die Kraft aufgrund der Vorauslenkung x_0 und F_a die Amplitude des periodischen Anteils ist.

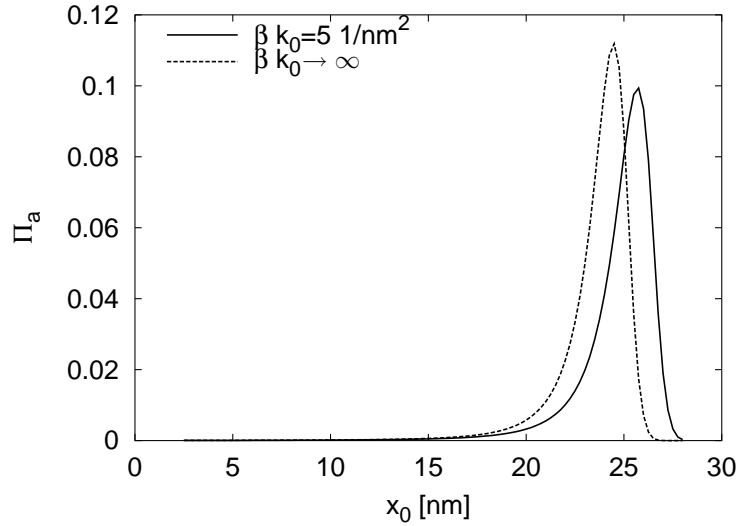


Abb. 2.3: Die Amplitude des periodischen Anteils der Besetzungswahrscheinlichkeit nach Gleichung (2.45), sowohl für den Fall einer unendlichen als auch endlichen Federkonstanten k_0 . Die leichte Verschiebung ist auf eine Streckung der x_0 -Achse zurückzuführen. Die ausgewählten Parameter betragen: $\tilde{k}_{21} = 10 \text{ s}^{-1}$, $\tilde{k}_{12} = 0.01 \text{ s}^{-1}$, $x_u = 0.1 \text{ nm}$, $x_f = 0.25 \text{ nm}$, $L_p = 0.2 \text{ nm}$, $L = 30 \text{ nm}$, $\delta L = 5 \text{ nm}$, $\omega = 1 \text{ s}^{-1}$, $x_a = 0.5 \text{ nm}$. Dies sind repräsentative Werte eines Übergangs, bei dem nicht so viel Länge freigesetzt wird, wie z.B. bei Titin.

Damit werden die Raten (2.37) bis zur linearen Ordnung $O(x_a/L)$

$$k_{12} = k_{12}^0 e^{\beta x_u (F_0(L_1) + F_a(L_1) \cos(\omega t))} \quad (2.39a)$$

$$\approx k_{12}^0 e^{\beta x_u F_0(L_1)} (1 + \beta x_u F_a(L_1) \cos(\omega t)) \quad (2.39b)$$

$$\equiv \kappa_{12} (1 + \beta x_u F_a(L_1) \cos(\omega t)) , \quad (2.39c)$$

wobei die Rate κ_{12} eingeführt wurde, die nur von der Vorauslenkung x_0 abhängt und zeitunabhängig ist. Gleichung (2.39) gilt äquivalent für k_{21} . Eine entsprechende Aufteilung in einen zeitunabhängigen Anteil Φ_0 und einen zeitabhängigen Anteil $\Pi(t)$ kann auch für die Lösung der Mastergleichung (2.36) als Ansatz

$$\Phi(t) = \Phi_0 + \Pi(t) \quad (2.40)$$

gewählt werden. Der zeitunabhängige Anteil ergibt dieselbe Lösung wie für den statischen Fall, entsprechend Gleichung (2.4)

$$\Phi_0 = \frac{\kappa_{21}}{\kappa_{12} + \kappa_{21}} . \quad (2.41)$$

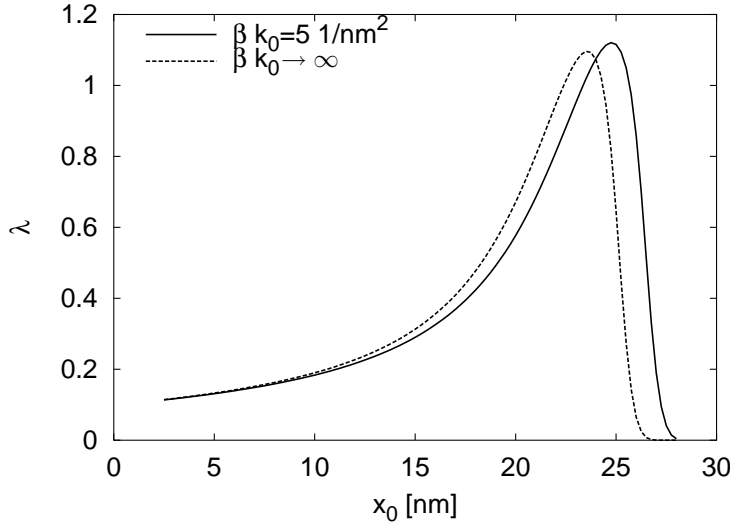


Abb. 2.4: Die Phasenverschiebung λ über x_0 nach Gleichung (2.45) besitzt ein Maximum. Hier sind die Kurven unter Verwendung einer unendlichen sowie einer endlichen Federkonstanten gegenübergestellt.

Setzt man (2.40) in die Mastergleichung (2.36) ein, so erhält man wieder bis zur linearen Ordnung in x_a/L die zeitliche Entwicklungsgleichung für $\Pi(t)$

$$\frac{d}{dt}\Pi(t) = -(\beta x_u F_a(L_1) + \beta x_f F_a(L_2))\kappa_{12}\Phi_0 - (\kappa_{12} + \kappa_{21})\Pi(t) . \quad (2.42)$$

Die Lösung von Gleichung (2.42) ist

$$\Pi(t) = e^{-\Lambda t} \left[\Pi(0) + \int_0^t \alpha e^{i\omega t'} e^{\Lambda t'} dt' \right] \quad (2.43)$$

mit den Abkürzungen

$$\alpha \equiv -(\beta x_u F_a(L_1) + \beta x_f F_a(L_2))\kappa_{12}\Phi_0 \quad (2.44a)$$

$$\Lambda \equiv (\kappa_{12} + \kappa_{21}) , \quad (2.44b)$$

wobei Λ die inverse innere Zeitskala der Konformationsübergänge ist. Im Grenzfall großer Zeiten $t \gg 1/\Lambda$ wird die Lösung periodisch stationär, d.h. sie nähert sich dem Grenzzyklus

$$\Pi(t) \equiv \Pi_a \cos(\omega t - \lambda) = \frac{\alpha}{\sqrt{\omega^2 + \Lambda^2}} \cos(\omega t - \lambda) \quad (2.45)$$

an, mit der Phasenverschiebung

$$\lambda = \arctan(\omega/\Lambda) \quad (2.46)$$

gegenüber der Anregung, wobei das negative Vorzeichen der Amplitude noch berücksichtigt werden muss.

Abbildungen 2.3 und 2.4 zeigen das analytische Ergebnis (2.45) für ein Beispielsystem mit den in der Bildunterschrift angegebenen Parametern. Die Antwortamplitude ($\alpha/\sqrt{\omega^2 + \Lambda^2}$) besitzt ein Maximum als Funktion der Vorauslenkung x_0 . Es ist durch die Lösung der Gleichung

$$\frac{\partial}{\partial x_0} \frac{\alpha}{\sqrt{\omega^2 + \Lambda^2}} = 0 \quad (2.47)$$

gegeben, die nur numerisch berechnet werden kann. Die Phasenverschiebung (2.46) hat auch ein Maximum über der Vorauslenkung x_0 bei x_0^* . Man erhält aus $\lambda' = 0$ die Gleichung $\kappa'_{21} + \kappa'_{12} = 0$ und daraus die implizite Lösung für x_0^*

$$\frac{x_f}{x_u} = \frac{\kappa_{12} F_0(L_1)'}{\kappa_{21} F_0(L_2)'} , \quad (2.48)$$

dabei bezeichnen $F_0(L_1)'$ und $F_0(L_2)'$ die Ableitungen des zeitunabhängigen Anteils der Kraft

$$F_0(L)' = \frac{1}{\beta L_p} \left(\frac{1}{L} + \frac{1}{2L(1 - x_0^*/L)^3} \right) . \quad (2.49)$$

Die Tatsache, dass die Amplitude der periodischen Antwortfunktion (2.45) ein Maximum besitzt, ist ein deutlicher Hinweis auf ein Resonanzphänomen. Hierbei handelt es sich aber nicht um die typische Zeitskalenbedingung der stochastischen Resonanz, sondern um eine Resonanzbedingung für die Vorauslenkung, d.h. letztlich für geometrische Parameter des asymmetrischen Freien Energiepotentials mit vorausgesetzten äußeren und inneren Zeitskalen. Die maximale Antwortamplitude ist demnach nicht einfach durch die gleiche Potentialhöhe der beiden Zustände, sondern durch die Lösung der Gleichungen (2.47) bzw. (2.48) gegeben.

Die gemittelte periodische Kraft

Aus der Lösung der Mastergleichung (2.36) kann jede beliebige Observable statistisch berechnet werden, z.B. ist der Ensemblemittelwert der Kraft

$$\langle F(t) \rangle = \Phi F(z(t), L_1) + (1 - \Phi) F(z(t), L_2) \quad (2.50)$$

auch eine periodische Funktion. Der zeitunabhängige Anteil, also der Offset, ist formal durch die zeitliche Mittelung gegeben

$$\overline{\langle F \rangle} = \Phi_0 F_0(L_1) + (1 - \Phi_0) F_0(L_2) , \quad (2.51)$$

welche hier mit dem Überstrich gekennzeichnet ist. Der periodische Anteil der Kraft entspricht somit bis zur linearen Ordnung der Amplituden dem Realteil der komplexwertigen Gleichung

$$\langle \langle F \rangle \rangle - \overline{\langle F \rangle} \equiv F_a e^{i(\omega t + \lambda_F)} = (\delta F_a \Phi_0 - F_a(L_2) + \delta F_0 \Pi_a e^{-i\lambda}) e^{i\omega t}, \quad (2.52)$$

wobei F_a die Amplitude bezeichnet und λ_F die Phasenverschiebung der Kraft. Dabei verwenden wir die Bezeichnungen

$$\delta F_0 \equiv F_0(L_1) - F_0(L_2) \quad (2.53a)$$

$$\delta F_a \equiv F_a(L_1) - F_a(L_2). \quad (2.53b)$$

Das Quadrat der reellen Amplitude beträgt

$$F_a^2 = \Pi_a^2 \delta F_0^2 - 2 \cos \lambda \delta F_0 \Pi_a (\delta F_a \Phi_0 - F_a(L_2)) + (\delta F_a \Phi_0 - F_a(L_2))^2 \quad (2.54)$$

und die Phasendifferenz

$$\lambda_F = - \arctan \left(\frac{\sin \lambda}{\cos \lambda + (\delta F_a \Phi_0 - F_a(L_2)) / \delta F_0 \Pi_a} \right). \quad (2.55)$$

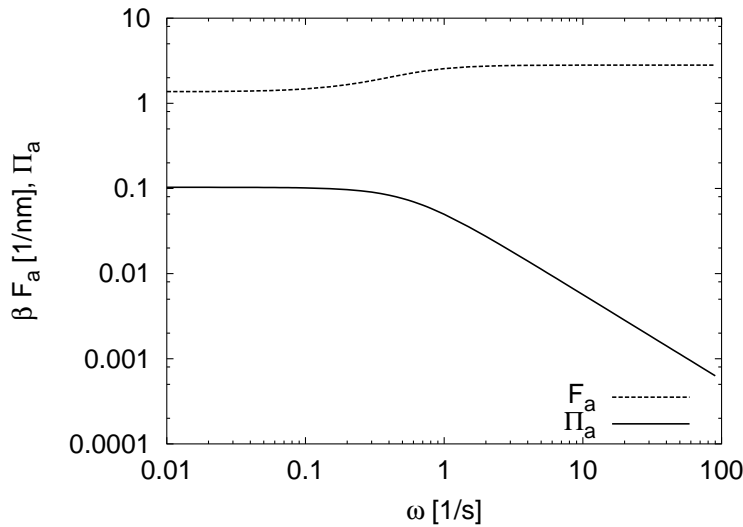


Abb. 2.5: Die Amplituden der Kraft (Gl. (2.54)) und der Besetzungswahrscheinlichkeiten (Gl. (2.45)) in Abhängigkeit der Frequenz. Die Amplitude der Kraft steigt an und nähert sich einem konstanten Wert, während diejenige der Besetzungswahrscheinlichkeit algebraisch mit $1/\omega$ abfällt. Hierbei wurde eine unendliche Federkonstante verwendet.

Die Amplitude des periodischen Anteils der Kraft hat die Eigenschaft, mit steigender Frequenz auch größer zu werden, im Gegensatz zur Amplitude der Besetzungswahrscheinlichkeit, die das gegenteilige Verhalten zeigt, siehe Abbildung 2.5. Dies ist im Wesentlichen darauf zurückzuführen, dass bei sehr hohen Frequenzen die Übergänge völlig

zufällig und nicht mehr korreliert mit der Anregung stattfinden. Während also bei kleineren Frequenzen die mittlere Kraft durch die korrelierten Übergänge verringert wird, ist bei großen Frequenzen ein unkorrelierter Widerstand vorhanden.

Die Einführung der Kraft als zusätzliche Observable, außer der Besetzungswahrscheinlichkeit $\Phi(t)$, mag zunächst nicht notwendig erscheinen. Sie erweist sich allerdings als nützlich für den Fall mehrerer sequenziell angeordneter Domänen. Die periodische Anregung an diesen Systemen wird in Kapitel 3.2 ausführlich diskutiert.

2.3.2 Die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten aus den Daten

Bisher haben wir nicht die Frage untersucht, wie die Besetzungswahrscheinlichkeit Φ aus experimentellen oder simulierten Daten zu berechnen ist und wie ein Experiment ausgelegt werden muss, um die notwendige Datenmenge zu liefern. Aus den folgenden Überlegungen erhalten wir eine wichtige Schlussfolgerung für die Gesamtmesszeit.

Die Besetzungswahrscheinlichkeit Φ ist über ein Ensemble definiert, d.h. einer großen Anzahl an gleich präparierten Systemen, an denen das gleiche Experiment durchgeführt wird. Der Ensemblemittelwert kann durch einen phasenempfindlichen zeitlichen Mittelwert einer einzelnen Trajektorie ersetzt werden, da $\Phi(t)$ nach einer Relaxationszeit von $1/\Lambda$ die Periodendauer $T = 2\pi/\omega$ besitzt. Wenn man diese beiden Mittelungsmethoden vergleicht, so erweist sich die zeitliche Mittelung einer einzigen Trajektorie insofern als vorteilhaft, da nur einmal die Relaxationszeit abgewartet und das System nur einmal präpariert werden muss.

Nach unseren bisherigen Annahmen ist $z(t)$ eine bistabile, zwischen zwei Minima fluktuierende Observable. Daher nehmen wir an, dass die Konformation des Polymers eindeutig bestimmt werden kann. Der Zustand 1 wird mit $p(t) = 1$ und der Zustand 2 mit $p(t) = 0$ gewichtet. Die Besetzungswahrscheinlichkeit kann daher mit

$$\Phi_N(t) = \frac{\sum_{n=0}^{N-1} p(t + nT)}{N} \quad (2.56)$$

aus den Daten abgeschätzt werden, wobei $N = T_{tot}/T$ die Anzahl der Perioden und T_{tot} die gesamte Messzeit ist. Jetzt kann die Frage beantwortet werden, welche Frequenz optimal ist, um den statistischen Fehler zu minimieren. Die Autokorrelation von $p(t)$ ist bis zur ersten Ordnung in x_a/x_0 [90]

$$\text{cov}(p(t), p(t + \Delta T)) \equiv \langle (\langle p(t) \rangle - p(t)) (\langle p(t + \Delta T) \rangle - p(t + \Delta T)) \rangle = \sigma_p^2 e^{-\Lambda \Delta T} \quad (2.57)$$

mit der Varianz der einzelnen Messung an einem 2-Zustandssystem $\sigma_p^2 = \Phi(1 - \Phi)$. Wir betrachten dazu die von N abhängige stochastische Variable $\Phi_N(t)$, die um den Mittelwert, also um die tatsächliche Besetzungswahrscheinlichkeit $\Phi(t)$, mit der Varianz

$$\sigma_{\Phi_N}^2 = \sum_{n=0}^{N-1} \sigma_p^2 (\partial \Phi_N / \partial p_n)^2 + \sum_{n \neq m}^{N-1} (\partial \Phi_N / \partial p_n) (\partial \Phi_N / \partial p_m) \text{cov}(p_n, p_m) \quad (2.58)$$

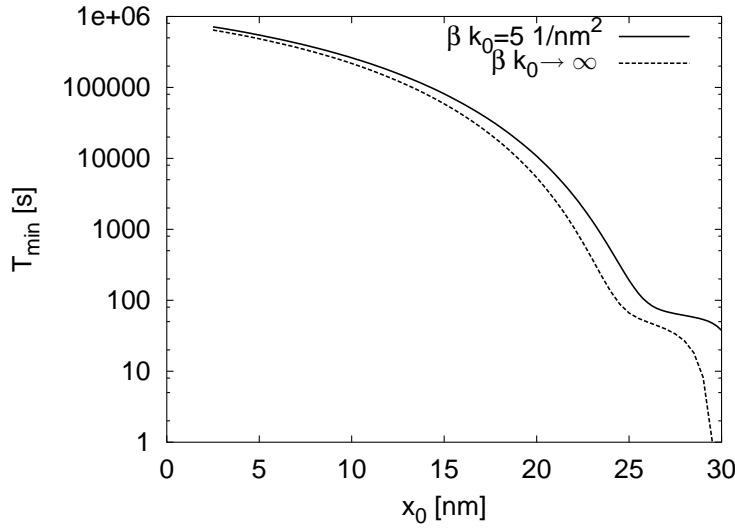


Abb. 2.6: Die nach der Frequenz ω^* optimierte totale Messzeit T_{min} (Gl. (2.63)) als Funktion von x_0 . Hierbei wurde wieder eine unendliche und eine endliche Federkonstante k_0 angenommen. Um x_0^* herum ist die Messzeit deutlich kleiner als für geringere Auslenkung. Berücksichtigt man, dass das Polymer bei größeren Auslenkungen fast gestreckt ist, so erhält man ein Minimum etwa bei x_0^* .

fluktuiert [63]. Zusammen mit Gleichung (2.57) erhält man

$$\begin{aligned} \sigma_{\Phi_N}^2 &= \frac{\sigma_p^2}{N} \left(1 + \frac{N-1}{N} e^{-\Lambda T} + \frac{N-2}{N} e^{-2\Lambda T} + \dots \right) \\ &\approx \frac{\sigma_p^2}{N} (1 + e^{-\Lambda T} + e^{-2\Lambda T} + \dots) , \end{aligned} \quad (2.59)$$

also näherungsweise eine geometrische Summe, die zu

$$\sigma_{\Phi_N}^2 \approx \frac{\sigma_p^2}{N(1 - e^{-\Lambda T})} \quad (2.60)$$

aufsummiert werden kann. Man bezeichnet die Wurzel daraus auch als Messfehler. Dieser muss, damit die periodische Antwortfunktion gemessen werden kann, kleiner als die zugehörige Amplitude sein. Daraus folgt die Bedingung $\sqrt{\sigma_{\Phi_N}^2} \lesssim |\Pi_a|$. Die gesamte Messzeit muss daher die Bedingung

$$T_{tot} \gtrsim \frac{2\pi\Phi_0(1 - \Phi_0)(\omega^2 + \Lambda^2)}{\alpha^2\omega(1 - e^{-\Lambda 2\pi/\omega})} \quad (2.61)$$

erfüllen, wobei der phasenabhängige Faktor $\Phi(1 - \Phi)$ durch $\Phi_0(1 - \Phi_0)$ ersetzt wurde, was in nullter Ordnung in x_a/L gültig ist. Die rechte Seite von Gleichung (2.61) hat ein

Minimum bei

$$\omega^* = \Lambda , \quad (2.62)$$

unter Vernachlässigung der Exponentialfunktion im Nenner von (2.61), da $e^{-\Lambda 2\pi/\omega^*} \ll 1$ ist.

Das Ergebnis (2.62) kann in Analogie zur stochastischen Resonanz gedeutet werden, da es eine Bedingung für die externe Zeitskala der periodischen Anregung im Vergleich zur internen des stochastischen Überganges darstellt.

Die minimale Messzeit mit der optimierten Frequenz ω^* ist

$$T_{min} \equiv T_{tot}(\omega^*) = 4\pi\kappa_{12}\kappa_{21}/\Lambda\alpha^2 \quad (2.63)$$

und hängt noch von der Vorspannung x_0 ab. In Abbildung 2.6 ist die Funktion (2.63) dargestellt. Im Fall einer harten bzw. unendlich harten Feder ist bei ca. x_0^* eine Schwelle zu sehen. Für noch größere x_0 sinkt die Messzeit hin zum Pol der Kraft, allerdings ist dort die Gaußsche Näherung sicher nicht mehr gültig. Berücksichtigt man die Auslenkung der Messfeder in diesem Bereich als zusätzlichen Freiheitsgrad, erhält man tatsächlich ein Minimum [91]. Das bedeutet, dass die maximale Antwortamplitude bei x_0^* sich auch auf die Messzeit auswirkt, die ungefähr dort minimal wird. In diesem nun aufgezeigten Zusammenhang kann man auch von einer Resonanzbedingung bei x_0^* sprechen.

2.3.3 Die Konsequenzen einer weichen Messfeder

Die Näherung als Gaußsches Polymer

Die bisherigen Ergebnisse beruhen alle auf der Bedingung, dass die Federkonstante der Messfeder gegenüber der des Polymers viel größer ist. Nun untersuchen wir, wie die Ergebnisse modifiziert werden, wenn man die Auslenkung der Messfeder einbezieht.

Der zusätzliche Freiheitsgrad ist der End-zu-End-Abstand z . Für die Kraft, die auf das Polymer wirkt, wird nun der ursprüngliche Ausdruck des WLC-Modells (2.1)

$$F(z, L) = \frac{1}{\beta L_p} \left(\frac{1}{4(1 - z/L)^2} - \frac{1}{4} + \frac{z}{L} \right)$$

verwendet. In den Formeln, in denen die Kraft eine Rolle spielt, muss diese Veränderung berücksichtigt werden, z.B. bei den Raten. Der End-zu-End-Abstand fluktuiert bistabil zwischen zwei Potentialminima hin und her, wobei angenommen wird, dass innerhalb der Minima die Equilibrierung schnell sein soll, verglichen mit den Übergangszeiten. Im Folgenden wird also vielmehr der bedingte Mittelwert verwendet, wie in Kapitel 2.2 $\langle z|r \rangle$, wobei r den Zustand des Biopolymers, also gefaltet oder entfaltet, bezeichnet. Die Bezeichnung z wird aber aus Gründen der Einfachheit dennoch beibehalten. Entsprechend Gleichung (2.19) muss die Kraft auf die Messfeder (mit der Federkonstanten k_0) der des WLC-Modells gleichgesetzt werden

$$F_c \equiv k_0(x - z) = F(z, L) ,$$

was nicht allgemein analytisch für z lösbar ist. Für kleine Kräfte kann die Gleichung (2.1) bis zur linearen Ordnung in z/L durch

$$F(z, L) \approx \frac{3z}{2\beta L_p L} \quad (2.64)$$

angenähert werden. Die effektive Polymer-Federkonstante (Gl. (2.30)) lautet für das WLC-Modell also

$$k_{poly}(L) \equiv 3/(2\beta L_p L) .$$

Sie ist gewöhnlich kleiner als diejenige der Messfeder. Mit dieser Näherung ergibt sich die bekannte Lösung (Gl. (2.32))

$$z = (1 + k_{poly}/k_0)^{-1} x .$$

Diese Funktion ist aber über die Polymerfederkonstante (2.30) abhängig von L , also muss man von einer Funktion $z = z(x, L)$ ausgehen. Die Koordinate z ist in dieser Näherung linear von x abhängig und wird daher auch periodisch nach

$$z(t) = z_0 + z_a \cos(\omega t) . \quad (2.65)$$

moduliert. Damit lautet die relevante Kraft

$$F(z(t), L) \approx F(z_0, L) + \frac{1}{\beta L_p} \left(\frac{z_a}{L} + \frac{z_a}{2L(1 - z_0/L)^3} \right) \cos(\omega t) \quad (2.66)$$

bis zur linearen Ordnung in z_a/L . Eine endlich harte Feder verändert das Ergebnis zunächst kaum. x_0 wird also durch $z_0(x_0)$ und x_a durch $z_a(x_a)$ ersetzt. Die veränderte x_0 -Abhängigkeit der Antwortamplitude und der Phase der Besetzungswahrscheinlichkeit führt im Wesentlichen zu einer Verschiebung der Kurven hin zu etwas größeren x_0 -Werten, wie in Abbildungen 2.4 und 2.3 zu sehen ist.

Wenn die Differenzlänge δL viel kleiner als die Konturlänge L ist, gilt bis zur nullten Ordnung in $\delta L/L$ die Beziehung $z(x, L_1) \approx z(x, L_2)$, d.h. die x_0 -Achse wird um den konstanten Faktor $(1 + k_{poly}/k_0)^{-1}$ gestreckt auf die z -Achse abgebildet.

Das fast gestreckte Polymer

Anders wird die Situation, wenn die Näherung der Gaußkette nicht verwendet werden kann, wenn also das Polymer beinahe gestreckt ist. In diesem Fall ist das Polymer keine idealisierte entropische Feder mit einer kleinen Federkonstanten, d.h. sie kann nicht mehr vernachlässigt werden. In typischen Entfaltungsexperimenten misst man Kräfte um 50-150 pN, was einer erheblichen Streckung des Biopolymers entspricht. Im Grenzfall eines

fast gestreckten Polymers, d.h. für $z \simeq L$ erhält man im WLC-Modell (Gl. (2.1) die Näherung

$$F(z, L) \approx \frac{1}{4\beta(1 - L/z)^2} \quad (2.67)$$

und daraus mit (2.19) die kubische Gleichung

$$k_0(x - L + \delta) = \frac{L^2}{4\beta L_p \delta^2} \quad (2.68)$$

mit $\delta \equiv L - z$, was der überschüssigen Konturlänge entspricht, die in der thermischen Fluktuation gespeichert ist. Auch die Funktion $\delta = \delta(x, L)$ hängt also von der momentanen Konturlänge L ab.

Mit dieser nichtlinearen Funktion wird im Allgemeinen die harmonische Anregung zu einer anharmonischen Antwort von $\delta(t)$ führen. Für $x_a \ll x_0$ gilt allerdings $\delta_a \ll \delta_0$ und in erster Ordnung in δ_a/δ_0 erhält man damit

$$\delta(t) = \delta_0 + \delta_a \cos(\omega t) , \quad (2.69)$$

wobei δ_0 die Lösung von Gleichung (2.68) mit $x = x_0$ ist. Die zugehörige Antwortamplitude δ_a ist

$$\delta_a = -\frac{x_a}{3 + 2(x_0 - L)/\delta_0} . \quad (2.70)$$

In linearer Ordnung in δ_a/δ_0 gilt für die Kraft

$$F(\delta, L) \approx \frac{L^2}{4\beta L_p \delta_0^2} \left(1 - \frac{2\delta_a}{\delta_0} \cos(\omega t) \right) . \quad (2.71)$$

Alle weiteren Gleichungen, insbesondere die Lösungen (2.41) und (2.43), hängen von diesen neuen Amplituden ab. Die Ergebnisse sind in [91] dargestellt und ausführlich diskutiert. Dort verwendeten wir für die Parameter das Beispiel Tenascin FN-III [53].

2.4 Die Zeitskalentrennung

In diesem Unterkapitel stellen wir einige grundsätzliche Unterschiede zwischen Messungen im Gleichgewicht und Messungen im Nichtgleichgewicht im Überblick dar. Dazu verwenden wir das 2-Zustandsmodell, das wir zu Beginn dieses Kapitels begründet haben.

2.4.1 Gleichgewichtsmessung

Für die Gleichgewichtsmessung sei eine konstante Kraft angenommen. Zunächst betrachten wir ein System, das auf der Skala der Beobachtungszeit t schnell relaxiert, also in den Gleichgewichtszustand equilibriert. Im Fall des 2-Zustandssystems heißt das, dass die Raten k_{ji} groß gegen $1/t$ sind, oder präziser $\Lambda \gg 1/t$, mit

$$\Lambda \equiv (k_{12} + k_{21}) . \quad (2.72)$$

Die Gleichgewichtslösung ist nach Gleichung (2.4) unabhängig von der jeweiligen Anfangsbedingung

$$\Phi_0 \equiv \lim_{t \rightarrow \infty} \Phi(t) = \frac{k_{21}}{k_{12} + k_{21}} . \quad (2.73)$$

Durch Messung der Aufenthaltszeit t_1 im Zustand 1 lässt sich mit

$$\Phi_0 = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{t_1}{t} \quad (2.74)$$

die Aufenthaltswahrscheinlichkeit bestimmen. Der Grenzwert in Gleichung (2.74) ist in der Praxis im Vergleich zur Relaxationszeit $\tau_{eq} = 1/\Lambda$ zu bilden.

Die detaillierte Bilanz (2.9) ergibt sich für den Fall des an einer Messfeder gekoppelten 2-Zustandssystems

$$\begin{aligned} \frac{\Phi_0}{1 - \Phi_0} &= \frac{k_{21}}{k_{12}} = e^{-\beta(G_1 + x_u F(x) - G_2 + x_f F(x))} \\ &= \left(\frac{k_{21}^0}{k_{12}^0} \right) e^{-\beta \Delta x F(x)} \end{aligned} \quad (2.75)$$

mit $\Delta x \equiv x_f + x_u$. Da diese Messung als Funktion der Position der Messfeder durchgeführt werden kann, und die Kraft aus der Messung, z.B. über die Auslenkung der Messfeder bekannt ist, lassen sich über diese einfache Gleichung (2.75) zwei Größen bestimmen. Zum einen das Verhältnis der spontanen Übergangsraten ohne Kraft, zum anderen der Abstand der Minima Δx in dem zugrundeliegenden Freien Energieprofil [39].

Bisher haben wir nicht festgelegt, wie die Gleichgewichtszustände zur Auswertung der Gleichung (2.74) eingenommen werden. Ein Vergleich zwischen den äußeren Messzeitskalen und inneren Relaxationszeitskalen ergibt grundlegende Unterscheidungen.

2.4.2 Übergang vom Gleichgewicht zum Nichtgleichgewicht

Eine Schwierigkeit besteht darin, den Übergang vom Gleichgewicht zum Nichtgleichgewicht mathematisch exakt zu fassen. Es gibt drei Zeitskalen, die in unterschiedlichem Verhältnis zueinander stehen können. Dabei ist meist die kleinste Zeit die Relaxationszeit innerhalb der Minima des Freien Energieprofils. Auf der Annahme, dass keine äußere

Störung annähernd so schnell ist, beruht die Verwendung von Kramers-Raten und der Formulierung des Problems anhand der Mastergleichung (2.36). Aufgrund dieser Näherung verbleiben die beiden Zeitskalen der Übergangszeit und der äußeren Störungs- oder Beobachtungszeit.

Ist die Zeitskala des experimentellen Protokolls wesentlich größer, so kann man den adiabatischen Grenzfall annehmen, das heißt, die Gleichgewichtslösung (2.73) ist zu jedem Zeitpunkt gültig.

Sind die beiden relevanten Zeitskalen etwa von der gleichen Größenordnung bedeutet das, dass man den adiabatischen Grenzfall nicht mehr anwenden darf. Die zeitliche Entwicklung der Lösung wird wichtig. Zur analytischen Berechnung kann ein angepasster Lösungsansatz je nach experimentellem Protokoll $x(t)$ weiterhelfen. Im vorigen Unterkapitel 2.3 wurde die periodische Störung ausführlich analytisch betrachtet. Der zeitunabhängige Anteil der Lösung (2.41) entsprach dem Gleichgewichtsanteil, der zeitabhängige (2.43) einem stationären Grenzzyklus. Bei dieser Unterscheidung wird deutlich, dass „stationär“ nicht dem Gleichgewicht entspricht. Im Gleichgewicht verschwindet die zeitliche Ableitung, im stationären Grenzfall hingegen nicht.

Für lineare Protokolle gilt im Wesentlichen dasselbe, nur dass kein stationärer Grenzfall auftreten kann. Eine Näherungsbetrachtung dieses Protokolls führt auf die schon erwähnte Analyse der Kraftspektren [72].

Beide Protokolle, das lineare und das periodische, decken also je nach Frequenz oder Geschwindigkeit viele Zeitskalen ab: vom adiabatischen Grenzfall bis hin zur vollständigen Nichtgleichgewichtssituation. Grundsätzlich muss angemerkt werden, dass jegliche zeitliche Veränderung der Übergangsraten eine Abweichung vom Gleichgewicht bedingt. Bei der theoretischen Betrachtung unterschiedlicher Modelle werden wir immer die Grenzen der Annahmen aufzeigen und dabei auch den Übergang zum Nichtgleichgewicht untersuchen.

2.4.3 Schnelle Experimente

Sowohl der adiabatische Grenzfall, als auch derjenige der schnellen Störung kann mit einfachen Mitteln behandelt werden. Für den zweiten Fall werden wir hier einige nützliche Gleichungen herleiten.

Als fern vom thermodynamischen Gleichgewicht bezeichnet man ein System, bei dem die typische Zeitskala einer äußeren Störung kleiner ist als die innere Relaxationszeit. Das kann im Extremfall dazu führen, dass das System eine lange Zeit im Nichtgleichgewicht beobachtet wird. Ein gutes Beispiel dafür ist Glas, eine unterkühlte Schmelze, die für die Dauer der menschlichen Beobachtungszeit im Nichtgleichgewicht verharrt. Wie wir später sehen werden, ist auch Titin ein Beispiel, bei dem die experimentelle Beobachtungszeit meist zu kurz für Gleichgewichtsmessungen ist, da die Übergangsraten sehr klein sind. Diese Systeme sind dynamisch gehemmt, da sie für lange Zeit in einem Zustand verbleiben und Übergänge seltene Ereignisse darstellen. In diesem Fall können experimentelle Störungen am Freien Energieprofil als augenblicklich beschrieben wer-

den. Zwei dieser möglichen schnellen Prozessführungen werden wir im Folgenden kurz beschreiben.

Die schnelle lineare Rampe

Zunächst untersuchen wir die schnelle lineare Rampe bis zu einem konstanten Wert der Position x . Die Kraft steigt also zu Beginn des Experiments auf einer Zeitskala an, die viel kleiner ist als die der inneren Relaxationszeit. Der Anstieg wird im Folgenden als instantan betrachtet. Da wir nicht an der Langzeitentwicklung interessiert sind, vernachlässigen wir die Rückrate k_{21} und nehmen an, dass das System sich zur Zeit $t = 0$ in Zustand 1 befinde.

Unter diesen Bedingungen beträgt die Relaxationszeit

$$\tau_{eq} \approx \frac{1}{k_{12}}, \quad (2.76)$$

d.h. sie entspricht der Populationszeit des Zustandes 2. Die zeitliche Entwicklung der Wahrscheinlichkeit ist durch die Zuverlässigkeitstheorie gegeben, die sich aus dem relevanten Teil der Mastergleichung (2.36) herleiten lässt. Wir werden diese Theorie hier darstellen und in den Kapiteln 3 und 5 darauf zurückgreifen. Die grundlegende Gleichung für die zeitliche Entwicklung der Wahrscheinlichkeit ist in diesem Fall

$$\frac{d}{dt}\Phi = -k_{12}\Phi, \quad (2.77)$$

wobei wir in (2.36) k_{21} vernachlässigt haben. Die Lösung von Gleichung (2.77) ist die Besetzungswahrscheinlichkeit

$$\Phi(t) = e^{-\int_{t_0}^t k_{12} dt'} = e^{-k_{12}t}, \quad (2.78)$$

die der Wahrscheinlichkeit für keinen Übergang bis zur Zeit t entspricht. Das Integral im Exponenten in (2.78) ist in diesem Fall sehr einfach zu lösen, da k_{12} als zeitunabhängig angenommen wurde. In vielen anderen Fällen ist jedoch dieses Integral analytisch nicht lösbar. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Übergang zu einer beliebigen Zeit vor dem Zeitpunkt t stattfindet, beträgt

$$P(t) \equiv 1 - \Phi(t). \quad (2.79)$$

Die Wahrscheinlichkeit $p(t)$ für einen Übergang innerhalb des Zeitintervalls $[t, t + dt]$ ist die zeitliche Ableitung von (2.79)

$$p(t) = \frac{\partial P(t)}{\partial t} = k_{12}e^{-k_{12}t}. \quad (2.80)$$

Diese Verteilung kann konkret mit Hilfe eines Histogramms gemessen werden. Dazu werden die Übergangszeiten t_1 vieler Experimente ermittelt und in

$$p(t) = \langle \delta(t - t_1) \rangle = \frac{\partial}{\partial t} \langle \Theta(t - t_1) \rangle \quad (2.81)$$

eingesetzt, wobei die Klammern $\langle \dots \rangle$ die Mittelung über alle Experimente darstellen und Θ die gewöhnliche Stufenfunktion ist.

Im Folgenden werden wir die Kraft untersuchen, die auf die Messfeder vor und nach dem Übergang wirkt. Nach der linearen Rampe, solange das System in Zustand 1 verweilt, ist die Kraft F konstant, bis sie zum Zeitpunkt des Übergangs um δF auf einen geringeren Wert F_0 absinkt. Diese zeitliche Stufenfunktion wird im Folgenden mit $F(t)$ bezeichnet. Die Beziehung zwischen dem Abfall der Kraft und der Übergangswahrscheinlichkeit ist damit

$$\langle F(t) - F_0 \rangle = \delta F \langle \Theta(t - t_1) \rangle \quad (2.82a)$$

$$= \delta F \int_{t_0}^t p(t') dt' \quad (2.82b)$$

$$= \delta F P(t) . \quad (2.82c)$$

Somit ist nach einer Mittelung über ausreichend viele Experimente auch die Kraft eine exponentiell abfallende Kurve gemäß (2.79). Dabei muss die Frage nach der konkreten Anzahl an Experimenten offenbleiben, wobei angemerkt sei, dass diese Frage nur innerhalb der mathematischen Statistik beantwortet werden kann. Eine Abschätzung einer Verteilung mit Hilfe eines χ^2 -Tests gelingt nur mit ausreichend vielen Intervallen von mindestens 10 und hinreichend vielen Treffern von mindestens 5 in den jeweiligen Intervallen [93]. Das führt letztlich zu einer Abschätzung, die sich nach den seltensten Ereignissen richtet. Der exponentielle Abfall der Wahrscheinlichkeitsverteilungen liefert demnach k_{12} , welche mit den Kräften $F(x)$ über

$$k_{12} = k_{12}^0 e^{\beta x_u F(x)} \quad (2.83)$$

zusammenhängen. Daraus lässt sich also die spontane Übergangsrate k_{12}^0 und der Parameter x_u berechnen.

Dasselbe Protokoll, nur in umgekehrter Richtung lässt sich auch zur Bestimmung der anderen Rate k_{21}^0 und des Parameters x_f einsetzen. Dazu muss aus dem Zustand 2 gestartet werden und anschließend eine umgekehrte lineare Rampe gefahren werden, so dass eine Endposition erreicht wird, die einen Übergang in den Zustand 1 erlaubt, wobei ein Anstieg der Kraft auf die Messfeder gemessen wird.

Die schnelle periodische Störung

Das zweite Protokoll, welches wir im Allgemeinen für die gehemmten Systeme untersuchen, ist die periodische Störung mit einer sehr großen Frequenz ω . Die Mastergleichung (2.36) kann für diese Art von Anregung über eine Periode gemittelt werden, da sich die Wahrscheinlichkeit auf einer viel größeren Zeitskala verändert. Die linke Seite

$$\frac{1}{T} \int_t^{t+T} \frac{\partial \Phi(t')}{\partial t'} dt' = \frac{1}{T} [\Phi(t')]_t^{t+T} \approx \frac{d}{dt} \Phi(t) \quad (2.84)$$

wird dadurch also nicht verändert. Die rechte Seite kann abgeschätzt werden. Dazu werden zunächst die zeitunabhängigen Anteile und die während des Intervalls T konstante Größe $\Phi(t)$ aus dem Integral gezogen

$$\frac{1}{T} \int_t^{t+T} k_{12}^0 e^{\beta x_u (F_0 + F_a \sin(\omega t'))} \Phi(t') dt' = k_{12}^0 e^{\beta x_u F_0} \Phi(t) \frac{1}{T} \int_t^{t+T} e^{\beta x_u F_a \sin(\omega t')} dt' . \quad (2.85)$$

Die Kraft wurde dazu aufgeteilt in einen zeitunabhängigen Anteil und den periodischen Anteil. Das Integral hat keine geschlossene Lösung, kann allerdings für $\beta x_u F_a \gg 1$ mit Hilfe der Sattelpunktmethode gelöst werden [88],

$$\begin{aligned} \frac{1}{T} \int_t^{t+T} e^{\beta x_u F_a \sin(\omega t')} dt' &\approx \frac{1}{T} \int_t^{t+T} e^{\beta x_u F_a \left(1 - \frac{\omega^2}{2} (t' - T/4)\right)} dt' \\ &\approx e^{\beta x_u F_a} \sqrt{\frac{1}{2\pi \beta x_u F_a}} . \end{aligned} \quad (2.86)$$

Das bedeutet, dass die Frequenz keinen Einfluss auf die Verstärkung der Rate hat. Für die andere Übergangsrate lässt sich dieselbe Näherung durchführen, damit sind die neuen Raten

$$k_{ij} = k_{ij}^0 \mathcal{I} \quad (2.87)$$

mit dem Verstärkungsfaktor \mathcal{I} , der in Abbildung 2.7 dargestellt ist. Anschaulich bedeutet dies, dass die zugrundeliegenden Energieniveaus derart schnell aus den ungestörten Niveaus oszillatorisch ausgelenkt werden, dass die effektiven gemittelten Raten verstärkt werden, sowohl die Hin- als auch die Rückraten.

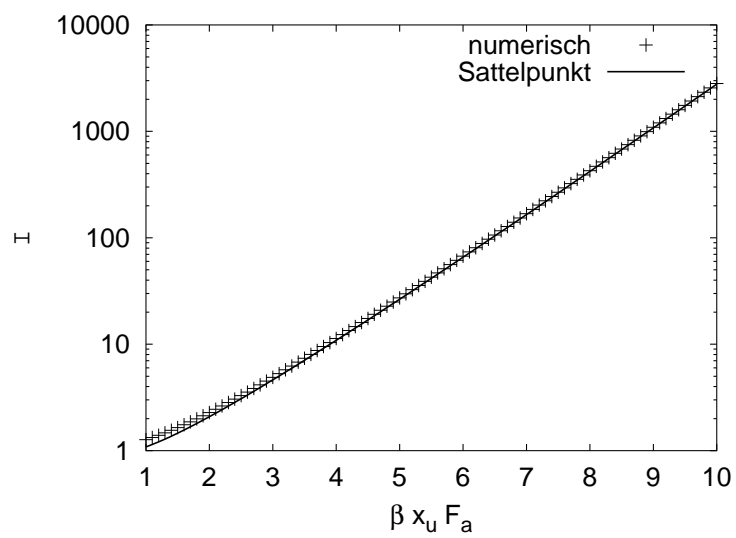


Abb. 2.7: Der Verstärkungsfaktor \mathcal{I} als Funktion der dimensionslosen Amplitude $\beta x_u F_a$. Die Punkte ergeben sich aus der numerischen Lösung des Integrals (2.85), während die durchgezogene Linie die Sattelpunktsnäherung (2.86) darstellt.

3 Multidomänen-Biopolymere

3.1 2-Zustandssysteme in Serie am Beispiel Titin

3.1.1 Experimentelles Vorgehen

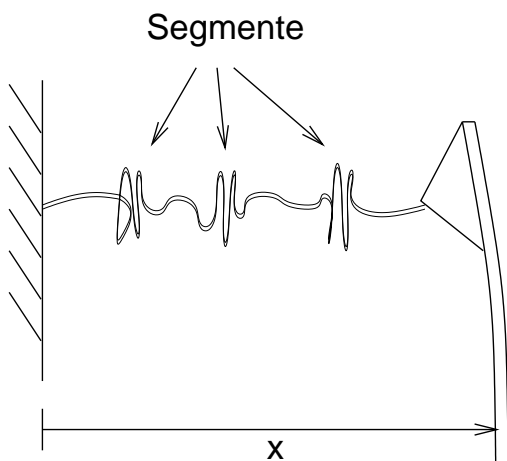


Abb. 3.1: Ein schematischer experimenteller Aufbau einer AFM-Messung an einem Multidomänen-Biopolymer, z.B. Titin. Exemplarisch dargestellt sind drei gefaltete, sequenziell angeordnete Segmente. Die Position der Messfeder wird mit x bezeichnet.

Als Multidomänen-Biopolymere bezeichnet man solche Proteine, die eine sequenzielle Domänenstruktur aufweisen. Zum Beispiel besteht das natürliche Muskelprotein Titin aus unterschiedlichen aufeinanderfolgenden Immunoglobulin-Segmenten (Ig), während synthetisch hergestellte Proteine meist aus gleichartigen Domänen, z.B. Ig27 oder Ig8, zusammengesetzt sind.

Zieht man entsprechend der Abbildung 3.1 mit einem Kraftmikroskop an dem einen Ende des Polymers, während das andere auf einem Träger fixiert ist, so erhält man eine Kraftkurve $F(x)$ als Funktion der Position der Messfeder x . Abbildung 3.2 zeigt eine solche Kurve aus Messungen an Titin [45]. In diesem Beispiel wurde an sieben gleichartigen, synthetisch hergestellten Ig8-Domänen gezogen. Jede der Spitzen in der Kraftkurve ist auf einen Entfaltungsvorgang zurückzuführen, wobei die Domänen einzeln ihre Konfiguration ändern und zusätzliche Konturlänge frei wird.

Ähnliche Experimente wurden an Polysacchariden durchgeführt [43]. Ein Unterschied zu Titin besteht darin, dass die Kraftkurve $F(x)$ gewöhnlich keine Spitzen aufweist, wie bei Titin, sondern, von kleinen thermischen Fluktuationen abgesehen, glatt ist. Zudem ergeben die linearen Hin- und Rückprotokolle im Gegensatz zu Titin dieselben Kraftkurven als Funktion der Position x . Beides zusammen lässt darauf schließen, dass diese

Art von Messungen an Polysacchariden im Gleichgewicht, hingegen an Titin im Nichtgleichgewicht stattfinden.

Am Beispiel Titin wurden sowohl experimentelle Untersuchungen als auch molekulardynamische Simulationen durchgeführt [94, 95]. Wir werden im Gegensatz zu den groß angelegten numerischen Studien ein statistisches Modell betrachten, das mit vergleichsweise wenigen Voraussetzungen auskommt.

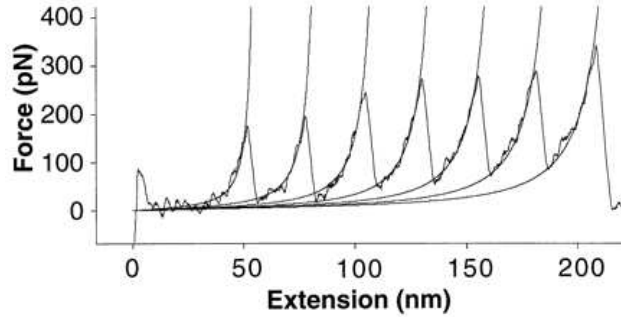


Abb. 3.2: Die von Rief *et al.* experimentell ermittelte Kraftkurve $F(x)$ in Abhängigkeit von der Position der Messfeder x durch Ziehen an sieben sequenziell angeordneten Titinsegmenten Ig8 (entnommen aus [45]). Die Kraftkurve fällt extrem ab, wenn sich eine der Domänen entfaltet. Zusätzlich zur gemessenen sind die theoretischen Kraftkurven $F(x, L)$ (Gl. (2.34)) für jede diskrete Konturlänge L (Gl. (3.1)) eingezeichnet.

3.1.2 Das Modell

Die Grundannahmen und die Parameter

Für die folgenden Betrachtungen greifen wir ein Modell auf, das zur Auswertung der Messergebnisse an Titin schon angewandt wurde [81]. Wir zeigen, wie damit der Übergang vom Gleichgewicht zum Nichtgleichgewicht in Abhängigkeit von der Ziehgeschwindigkeit v beschrieben werden kann. Dieses Modell ist geeignet, eine sequenzielle Anordnung vieler Segmente zu beschreiben, die einzeln und unabhängig voneinander Konformationsübergänge aufweisen, im Folgenden mit „Falten“ und „Entfalten“ bezeichnet. Es ist eine Verallgemeinerung des in Kapitel 2 eingeführten einfachen 2-Zustandsmodells. Die Übergänge werden nach dem Schema der Abbildungen 2.1 und 2.2 beschrieben. Die Kraft im Polymer berechnet sich entsprechend der eines WLC-Polymers (Gl. (2.34)) nach

$$F(x, L) = \frac{1}{\beta L_p} \left(\frac{1}{4(1 - x/L)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L} \right).$$

Die Konturlänge

$$L = N_f L_f + N_u L_u \quad (3.1)$$

ist eine Funktion der Anzahl N_f an gefalteten und der Anzahl N_u an entfalteten Domänen. Die Größen L_f und L_u sind die Konturlängen der Domänen, je nachdem in welchem der beiden Zustände sie sich befinden. Die Gesamtzahl an Segmenten

$$N \equiv N_f + N_u \quad (3.2)$$

wird konstant gehalten. Die Konturlänge L ist also eine diskontinuierliche Funktion, welche nach Definition (3.1) springt, wenn sich eine Domäne faltet oder entfaltet.

Die Kraft führt in jedem der Segmente zu einer Anhebung des ersten Minimums und einer Absenkung des zweiten Minimums im Freien Energieprofil (Abb. 2.2). Die Übergangsraten betragen in linearer Näherung nach (2.18)

$$k_{12}(L, x) = k_{12}^0 e^{\beta x_u F(L, x)} \quad (3.3a)$$

$$k_{21}(L, x) = k_{21}^0 e^{-\beta x_f F(L, x)}, \quad (3.3b)$$

wobei die Kraft des WLC-Modells (2.34) im Exponenten eingesetzt wird. Dies führt zu einer Abhängigkeit der Übergangsraten von der Konturlänge L und damit von der Konfiguration. Man erhält also eine indirekte Kopplung der Domänen untereinander. Die spontanen Übergangsraten k_{ij}^0 sind die Kramers-Raten, x_u und x_f die Abstände der Minima zur Barriere im Freien Energieprofil. Da die Position x experimentell nach dem Protokoll (1.2)

$$x(t) = x_0 + vt$$

verändert wird, sind die Ausdrücke für die Kraft (2.34) und die Übergangsraten (3.3) auch implizit zeitabhängig.

Die Modellparameter sind somit gegeben durch die beiden Übergangsraten k_{ij}^0 , die Konturlängen L_f und L_u , die Persistenzlänge L_p , die gesamte Anzahl an Domänen N und die intrinsischen Abstände x_u und x_f des Freien Energieprofils, siehe Abb. 2.2. Die Ziehgeschwindigkeit v ist der experimentell am einfachsten zugängliche Parameter, den wir hier in Einheiten von L_u/s angeben bzw., um mit Experimenten vergleichen zu können, auch in nm/s. Die Werte für Titin, die im Folgenden benutzt werden, sind: $x_u = 0.3$ nm, $x_f = 15$ nm, $L_p = 0.4$ nm, $L_f = 4$ nm, $L_u = 32$ nm, $k_{12}^0 = 3 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $k_{21}^0 = 2 \text{ s}^{-1}$. Für Dextran werden wir die folgenden Parameter verwenden: $x_u = x_f = 0.032$ nm, $L_p = 0.15$ nm, $L_u = 0.565$ nm und $L_f = 0.5$ nm, $k_{12}^0 = 1 \text{ s}^{-1}$ und $k_{21}^0 = 5.7 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$, entnommen aus [81].

Die Mastergleichung und die detaillierte Bilanz

Die für Kraftmessungen relevante Konfiguration ist mit der Anzahl der entfalteten Domänen N_u vollständig bestimmt. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung $P(N_u, t)$ entwickelt

sich gemäß der Mastergleichung

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial t} P(N_u, t) = & -P(N_u, t)((N - N_u)k_{12}(N_u) + N_u k_{21}(N_u)) \\ & + P(N_u + 1, t)(N_u + 1)k_{21}(N_u + 1) \\ & + P(N_u - 1, t)(N - N_u + 1)k_{12}(N_u - 1) , \end{aligned} \quad (3.4)$$

dabei sind $k_{12}(N_u)$ und $k_{21}(N_u)$ die Übergangsraten für jedes Segment in Abhängigkeit von N_u [87]. Da die Zustände entlang einer endlichen linearen Kette aufgereiht sind, kann von der Gültigkeit der detaillierten Bilanz (Gl. (2.10))

$$P(N_u + 1, t)(N_u + 1)k_{21}(N_u + 1) = P(N_u, t)(N - N_u)k_{12}(N_u) \quad (3.5)$$

ausgegangen werden. Mit Hilfe dieser Gleichung ist es möglich, die Gleichgewichtsverteilung zu berechnen. Dazu starten wir mit der Gleichung (3.5) für $P(1)$

$$P(1) = P(0)N \frac{k_{12}(0)}{k_{21}(1)} . \quad (3.6)$$

Diejenige für $P(2)$ lautet

$$P(2) = P(1) \frac{(N - 1) k_{12}(1)}{2 k_{21}(2)} \quad (3.7a)$$

$$= P(0) \frac{N(N - 1) k_{12}(0)k_{12}(1)}{1 \cdot 2 k_{21}(1)k_{21}(2)} , \quad (3.7b)$$

wobei wir in der 2. Zeile (3.6) verwendet haben. Auf diese Weise können wir jedes Ergebnis rekursiv in der Gleichung für das jeweils größere N_u verwenden und erhalten damit allgemein die Gleichgewichtslösung

$$P(N_u) = P(0) \frac{N!}{(N - N_u)!N_u!} \left(\prod_{n=0}^{N_u-1} \frac{k_{12}(n)}{k_{21}(n+1)} \right) . \quad (3.8)$$

Die Normierungskonstante $P(0)$ kann aus der Normierungsbedingung

$$\sum_{N_u} P(N_u) = 1 \quad (3.9)$$

bestimmt werden. Der End-zu-End-Abstand x ist für die Gleichgewichtslösung konstant. Zudem muss als Einschränkung für die Lösung (3.8) gelten, dass alle Möglichkeiten N_u auch realisiert werden können. Da der End-zu-End-Abstand jedoch nicht größer sein darf als die Konturlänge, muss die Bedingung $x < NL_f$ gefordert werden. Ist dies nicht der Fall, muss die Rekursion im Allgemeinen mit der Gleichung für dasjenige N_0 starten, für das die Bedingung $x < (N - N_0)L_f + N_0L_u$ noch gilt.

Die Gleichgewichtslösung (3.8) entspricht der Boltzmannverteilung, was leicht gezeigt werden kann. In Abbildung 3.3 ist ein Beispiel für 4 Titinsgemente dargestellt. Auffallend ist, dass sich nur benachbarte Zustände wesentlich überschneiden, hingegen übernächste kaum.

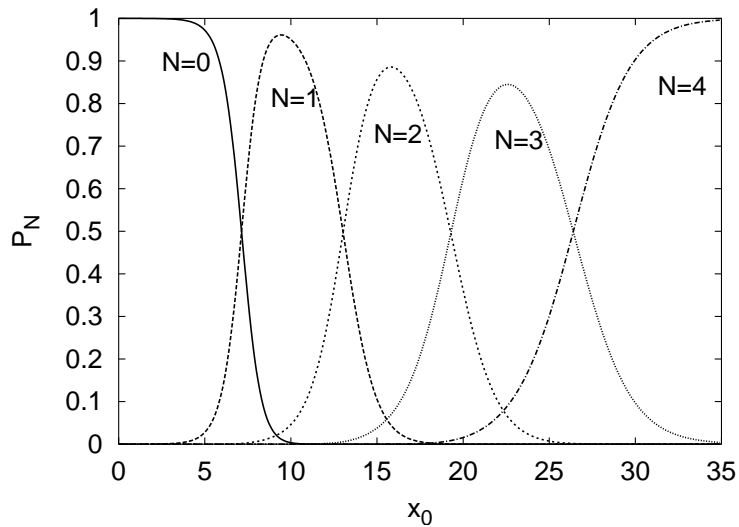


Abb. 3.3: Die Besetzungswahrscheinlichkeit der Makrozustände P_N im Gleichgewicht für Titin als Darstellung der Gleichgewichtslösung (3.8). Hierbei wird deutlich, dass nur benachbarte Kurven sich wesentlich überlappen.

3.1.3 Weiterführende Fragestellung

Wenn man die Ergebnisse der erwähnten Experimente und der Simulationen, die auf den Modellannahmen basieren, für verschiedene Ziehgeschwindigkeiten v miteinander vergleicht, so kann man bei beiden qualitativ drei Regimes unterscheiden [81]. Für kleine Ziehgeschwindigkeiten befindet man sich im Gleichgewichtsregime, d.h. die Kraftkurve als Funktion der Auslenkung x ist eine glatte Funktion und einzelne Übergänge können nicht identifiziert werden. Die Kraftkurven für die Vorwärts- und Rückwärtsrampe liegen aufeinander. Bei etwas schnelleren Ziehgeschwindigkeiten, im Übergangsbereich, werden einzelne Faltungs- und Entfaltungsereignisse erkannt. Die Kraftkurven für die Vorwärts- und Rückwärtsrampe liegen nicht mehr aufeinander. Für große Ziehgeschwindigkeiten befindet man sich im Nichtgleichgewichtsregime, das wir im Folgenden auch „Sägezahnregime“ nennen, da keine Faltungsübergänge sondern nur Entfaltungsübergänge gemessen werden. Außerdem liegen die Kraftkurven für die Vorwärts- und Rückwärtsrampe weit voneinander entfernt.

Wir werden im Folgenden die Frage untersuchen, wodurch die Regimes quantitativ in Abhängigkeit von der Ziehgeschwindigkeit voneinander abgegrenzt sind.

3.1.4 Die Kramers-Moyal-Entwicklung und die Ratengleichung

Der Übergang von einer Gleichgewichtssituation zu einer Nichtgleichgewichtssituation kann anhand der Ratengleichungen gezeigt werden. Sie folgen aus der Mastergleichung (3.4) mit Hilfe einer Kramers-Moyal-Entwicklung. Im Folgenden werden die Argumente

von $P(N_u, t)$ weggelassen, und die Striche ' bezeichnen Ableitungen nach N_u , die im Grenzübergang als kontinuierliche Variable betrachtet werden darf. Dazu muss insbesondere $N \gg 1$ sein, so dass nach $\epsilon \ll N$ mit $\epsilon = 1$ entwickelt werden kann. Gleichung (3.4) wird damit

$$\frac{\partial}{\partial t} P = - P(N - N_u)k_{12} - PN_u k_{21} \quad (3.10a)$$

$$\begin{aligned} & + \left(P + \epsilon P' + \frac{1}{2} \epsilon^2 P'' \right) \left(N_u + \epsilon \right) \left(k_{21} + \epsilon k'_{21} + \frac{1}{2} \epsilon^2 k''_{21} \right) \\ & + \left(P - \epsilon P' + \frac{1}{2} \epsilon^2 P'' \right) \left(N - N_u + \epsilon \right) \left(k_{12} - \epsilon k'_{12} + \frac{1}{2} \epsilon^2 k''_{12} \right) \\ & = \frac{\partial}{\partial N_u} \left(\epsilon P \left(N_u k_{21} - (N - N_u) k_{12} \right) \right) \\ & + \frac{\partial^2}{\partial N_u^2} \left(\frac{1}{2} P \epsilon^2 \left(N_u k_{21} + (N - N_u) k_{12} \right) \right) . \end{aligned} \quad (3.10b)$$

Nun wird die Wahrscheinlichkeitsdichte $p(N_u)$ über die Gleichung

$$p(N_u) \epsilon \equiv P(N_u) \quad (3.11)$$

definiert. Für die Dichte erhält man die Fokker-Planck-Gleichung

$$\frac{\partial}{\partial t} p(N_u) = - \frac{\partial}{\partial N_u} D^{(1)}(N_u) p(N_u) + \frac{\partial^2}{\partial N_u^2} D^{(2)}(N_u) p(N_u) \quad (3.12)$$

mit dem Driftkoeffizienten $D^{(1)}$ und dem Diffusionskoeffizienten $D^{(2)}$

$$D^{(1)} \equiv (N - N_u)k_{12}(N_u) - N_u k_{21}(N_u) \quad (3.13a)$$

$$D^{(2)} \equiv \frac{(N - N_u)k_{12}(N_u) + N_u k_{21}(N_u)}{2} . \quad (3.13b)$$

Die Ratengleichung erhält man, indem man Gleichung (3.12) mit N_u multipliziert und von 0 bis N integriert,

$$\frac{d}{dt} \langle N_u \rangle = \int_0^N dN_u p(N_u) \left((N - N_u)k_{12}(N_u) - N_u k_{21}(N_u) \right) . \quad (3.14)$$

Für eine um den Mittelwert stark zentrierte Funktion $p(N_u)$ ist es sinnvoll, die Übergangsraten $k_{12}(N_u)$ und $k_{21}(N_u)$ um diesen Mittelwert $n = \langle N_u \rangle$ gemäß

$$k_{12}(N_u) = k_{12}(n) + (N_u - n)k'_{12}(n) + \frac{1}{2}(N_u - n)^2 k''_{12}(n) + \dots \quad (3.15a)$$

$$k_{21}(N_u) = k_{21}(n) + (N_u - n)k'_{21}(n) + \frac{1}{2}(N_u - n)^2 k''_{21}(n) + \dots \quad (3.15b)$$

zu entwickeln. Mit $\Delta n \equiv N_u - n$ ergibt sich damit für Gleichung (3.14)

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}n = \int_0^N dN_u p(N_u) & \left((N - n - \Delta n) \left[k_{12}(n) + \Delta n k'_{12}(n) + \frac{1}{2} \Delta n^2 k''_{12}(n) + \dots \right] \right. \\ & \left. - (n + \Delta n) \left[k_{21}(n) + \Delta n k'_{21}(n) + \frac{1}{2} \Delta n^2 k''_{21}(n) + \dots \right] \right) \end{aligned} \quad (3.16a)$$

$$\begin{aligned} = & (N - n)k_{12}(n) - nk_{21}(n) - \sum_{i=1}^{\infty} \frac{1}{i!} \langle \Delta n^{i+1} \rangle \left(\frac{\partial}{\partial n} \right)^i (k_{12}(n) + k_{21}(n)) \\ & + \sum_{j=2}^{\infty} \frac{1}{j!} \langle \Delta n^j \rangle \left((N - n) \left(\frac{\partial}{\partial n} \right)^j k_{12}(n) - n \left(\frac{\partial}{\partial n} \right)^j k_{21}(n) \right) . \end{aligned} \quad (3.16b)$$

Die Fluktuationen Δn^2 können für eine große Anzahl an Segmenten vernachlässigt werden. Zur Begründung wird erneut Gleichung (3.12) mit Δn^2 multipliziert und anschließend über n integriert. Als Ergebnis erhält man die zeitliche Entwicklungsgleichung für die zentralen zweiten Momente

$$\frac{d}{dt} \langle \Delta n^2 \rangle = - \langle \Delta n^2 \rangle \left(D^{(2)''} - 2D^{(1)'} \right) + (N - n)k_{12} + nk_{21} \quad (3.17)$$

mit den Ableitungen der Koeffizienten

$$D^{(1)'} = ((N - n)k'_{12} - nk'_{21} - k_{12} - k_{21}) \quad (3.18a)$$

$$D^{(2)''} = \frac{1}{2}(N - n)k''_{12} + \frac{1}{2}nk''_{21} - k'_{12} - k'_{21} , \quad (3.18b)$$

wobei die Abhängigkeit der Übergangsraten von n weggelassen wurde und das Symbol $'$ die Ableitung nach n bezeichnet. Im Gleichgewicht verschwindet die zeitliche Ableitung, daraus folgt nach Umstellung von Gleichung (3.17) der Zusammenhang $\langle \Delta n^2 \rangle \sim N$, da für die Raten und ihre Ableitungen $k_{ij} \sim c + N^{-1}$, $k'_{ij} \sim N^{-2}$ und $k''_{ij} \sim N^{-3}$ gilt, wobei c eine Konstante ist. Daraus folgt für Gleichung (3.16b), dass die Terme in den Summen von der Ordnung $(1/N)$ und für große N deshalb vernachlässigbar sind. Zudem ergibt sich für das relative Schwankungsquadrat $\langle \Delta n^2 / N^2 \rangle \sim 1/N$, was einer immer lokalisierteren Verteilung für wachsendes N entspricht.

3.1.5 Die Mean-Field-Dynamik in der Nähe des Gleichgewichts

Die statische Relaxation

Die Mean-Field-Dynamik bezeichnet die Dynamik des Mittelwertes unter Vernachlässigung der Fluktuationen. Aus Gleichung (3.16b) folgt unter diesen Voraussetzungen

$$\frac{d}{dt}n(x, t) = -n(t)[k_{12}(x, n(x, t)) + k_{21}(x, n(x, t))] + Nk_{12}(x, n(x, t)) , \quad (3.19)$$

wobei $n(t) = \langle N_u \rangle(t)$ den Ensemblemittelwert der entfaltenen Domänen bezeichnet. In [96] wird Gleichung (3.19) zur Berechnung des Mittelwertes im Gleichgewicht her-

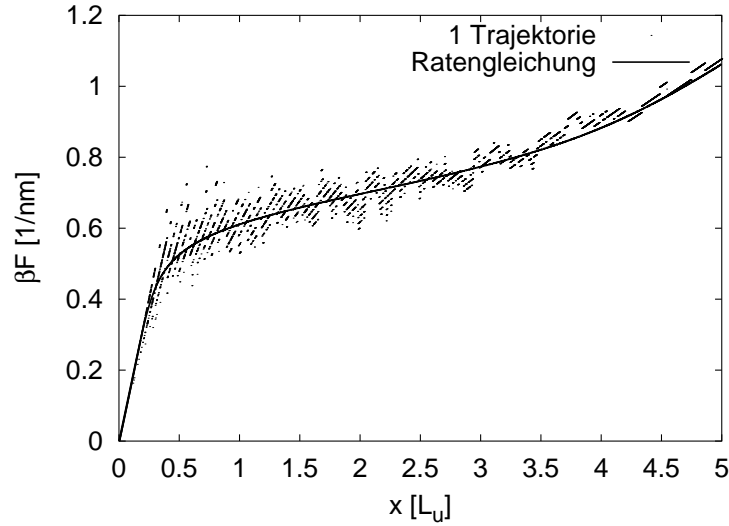


Abb. 3.4: Die Kraft als Funktion der Auslenkung x für Titin mit $N = 50$ und $v = 5.5 \cdot 10^{-6} L_u/s$. Die einzelne Trajektorie ist das Ergebnis einer stochastischen Simulation, die kontinuierliche Kurve ist das Ergebnis der Ratengleichung. Die Trajektorie fluktuiert hierbei um den Mittelwert.

angezogen. Der Mittelwert beschreibt eine kontinuierliche Kurve in Abhängigkeit von der Auslenkung x , um den die stochastische Trajektorie fluktuiert. Für große N stimmt die stochastische Dynamik einzelner Trajektorien mit der Mean-Field-Dynamik überein, wie in Abbildung 3.4 gezeigt wird. Dort sind Ergebnisse numerischer Simulationen der Mittelwertgleichung (3.19) und eine stochastische Trajektorie dargestellt, die mit Hilfe einer Monte-Carlo-Methode nach [81] berechnet wurden.

Da wir die Statistik einer linearen Kette von N Domänen untersuchen, liegt die Vermutung nahe, dass sie in irgendeiner Weise skaleninvariant zu ihrer Größe N ist. Für die Mean-Field-Dynamik ist diese Annahme richtig. Wir betrachten also die mit N skalierten Variablen

$$\bar{x} \equiv \frac{x}{N}, \quad p \equiv \frac{n}{N}, \quad l \equiv \frac{L}{N}. \quad (3.20)$$

Mit der Differenzlänge zwischen dem gefalteten und dem entfaltenen Zustand

$$\delta L \equiv L_u - L_f \quad (3.21)$$

wird die reskalierte Länge

$$l = p\delta L + L_f. \quad (3.22)$$

Die reskalierte Ratengleichung lautet somit

$$\frac{d}{dt}p(\bar{x}, t) = -p(\bar{x}, t)[k_{12}(\bar{x}, p(\bar{x}, t)) + k_{21}(\bar{x}, p(\bar{x}, t))] + k_{12}(\bar{x}, p(\bar{x}, t)) . \quad (3.23)$$

Die Gleichgewichtslösung $p_0(\bar{x})$, d.h. der Mittelwert der Verteilung (3.8), ist durch die implizite Relation

$$p_0 = \frac{\gamma(\bar{x}, p_0)}{\gamma(\bar{x}, p_0) + 1} \quad (3.24)$$

gegeben, die man aus Gleichung (3.23) erhält, indem man die totale zeitliche Ableitung gleich Null setzt. Dabei bezeichnet

$$\gamma \equiv k_{12}/k_{21} \quad (3.25)$$

das Verhältnis der Raten.

Unter „statischer Relaxation“ verstehen wir die Relaxation ins Gleichgewicht bei konstanter Koordinate x . Eine kleine zeitabhängige Auslenkung $\delta p(t) \ll 1$ aus der zeitunabhängigen Gleichgewichtslösung p_0 berechnet sich nach Gleichung (3.23), indem $p(t) = p_0 + \delta p(t)$ eingesetzt und bis zur linearen Ordnung in $\delta p(t)$ entwickelt wird. Somit erhält man die Differentialgleichung

$$\frac{d}{dt}\delta p(t) = -\delta p(t) [k_{12}(p_0) + k_{21}(p_0) + p_0(k'_{12}(p_0) + k'_{21}(p_0)) - k'_{12}(p_0)] , \quad (3.26)$$

wobei die Auslenkung \bar{x} konstant gehalten wird. Der Strich ' bedeutet die Ableitung nach p_0 . Die Lösung von Gleichung (3.26) beschreibt einen exponentiellen Abfall mit der Relaxationszeit

$$\tau_{eq} = [k_{12}(p_0) + k_{21}(p_0) + p_0(k'_{12}(p_0) + k'_{21}(p_0)) - k'_{12}(p_0)]^{-1} . \quad (3.27)$$

Diese ist abhängig von der Position x , wie in Abbildung 3.5 für Titin dargestellt. Die Kurve $\tau_{eq}(x)$ wird bei Reskalierung auf $\tau_{eq}(\bar{x})$ unabhängig von der Anzahl der Segmente. Das folgt aus der Definition von p (Gl. 3.20), die unabhängig von der Anzahl der Segmente bei konstantem Verhältnis x/L ist. Dieselbe Eigenschaft hat Gleichung (3.27), welche die Lösung τ_{eq} als Funktion von \bar{x} liefert.

Die von außen angetriebene Mean-Field-Dynamik

Nun betrachten wir eine komplexere Situation, die sich daraus ergibt, dass die Position x zeitabhängig ist. Wir erhalten die zeitliche Entwicklung von $p(\bar{x}, t) = p_0(\bar{x}(t)) + \delta p(\bar{x}, t)$ aus der Differentialgleichung (3.23) entsprechend

$$\frac{d(p_0(\bar{x}(t)) + \delta p(\bar{x}, t))}{dt} = -(p_0 + \delta p) \cdot A(p_0 + \delta p) + B(p_0 + \delta p) , \quad (3.28)$$

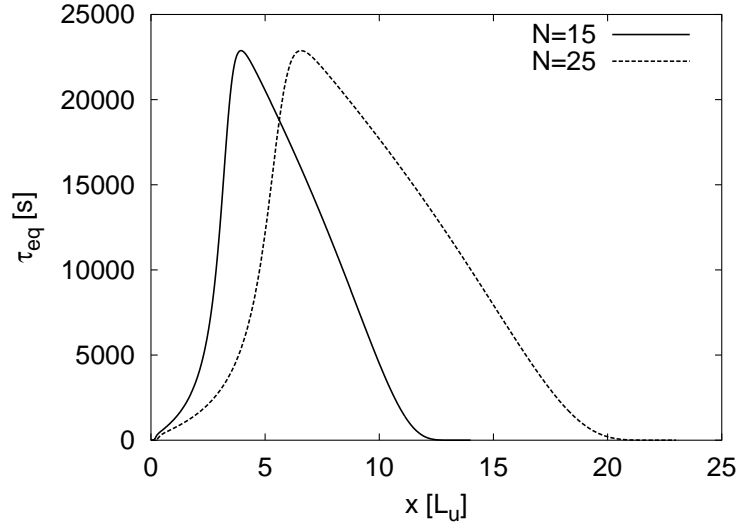


Abb. 3.5: Die Relaxationszeit τ_{eq} für Titin mit $N = 15$ und $N = 25$, als Funktion der Auslenkung x . Die Skalierungseigenschaft bezüglich der Anzahl der Segmente N ist deutlich zu erkennen.

wobei die Abhängigkeiten von $\bar{x}(t)$ auf der rechten Seite nicht explizit aufgeführt wurden. Die Koeffizienten sind

$$A \equiv k_{12} + k_{21} \quad (3.29a)$$

$$B \equiv k_{12} . \quad (3.29b)$$

Die linke Seite von Gleichung (3.28) enthält die totale Ableitung nach t , daher ist

$$\frac{d}{dt}(p_0(\bar{x}(t)) + \delta p(\bar{x}, t)) = \bar{v} \frac{\partial p_0}{\partial \bar{x}} + \frac{d}{dt} \delta p(\bar{x}, t) . \quad (3.30)$$

Für die rechte Seite von Gleichung (3.28) werden alle Terme bis zur linearen Ordnung in δp berechnet, das ergibt

$$-p_0 A(p_0) - p_0 \delta p A'(p_0) - \delta p A(p_0) + B(p_0) + \delta p B'(p_0) = -\delta p \tau_{eq}^{-1} , \quad (3.31)$$

wobei $-p_0 A(p_0) + B(p_0) = 0$ und $-p_0 A'(p_0) - A(p_0) + B'(p_0) = \tau_{eq}^{-1}$ benutzt wurde. Insgesamt folgt daraus die Differentialgleichung

$$\frac{d}{dt} \delta p(\bar{x}, t) = -\bar{v} \frac{\partial p_0}{\partial \bar{x}} - \delta p \tau_{eq}^{-1} , \quad (3.32)$$

die die zeitliche Entwicklung einer Störung bestimmt, unter gleichzeitiger Veränderung der Auslenkung. Nun betrachten wir konkret die Auswirkungen einer lineare Rampe nach Gleichung (1.2).

Die Grenze der Gleichgewichtsannahme

Da für die Mean-Field-Gleichung nur die Fluktuationen vernachlässigt werden, ist sie auch für die Dynamik in der Nähe des Gleichgewichts gültig. Daher lässt sich mit ihrer Hilfe sehr gut die Abweichung der Mittelwert-Trajektorien zur Gleichgewichtslösung berechnen, was in diesem Unterabschnitt nun gezeigt wird.

Startet man aus einer Gleichgewichtssituation heraus, ist die rechte Seite von Gleichung (3.32) zunächst negativ. Das heißt, δp wird so lange kleiner werden, bis der zweite positive Term der rechten Seite den ersten negativen ausgleicht. Nehmen wir im Folgenden an, dass das Maximum der Differenz der Mean-Field-Trajektorie zum Gleichgewichtswert

$$\delta p_{max} \equiv \max\{|\delta p(t)|\} \quad (3.33)$$

beträgt, d.h. die zeitliche Änderung der Differenz verschwindet an dieser Stelle. Daraus folgt aus Gleichung (3.32) die Bedingung

$$\delta p_{max} \tau_{eq}^{-1}(\bar{x}) - \bar{v} \frac{\partial p_0(\bar{x})}{\partial \bar{x}} \gtrsim 0, \quad (3.34)$$

wobei die Gleichheit für die Position \bar{x} gegeben ist, bei der die Abweichung δp maximal ist. Für die Geschwindigkeit erhalten wir durch Umformen von (3.34) die Ungleichung

$$\bar{v} \lesssim \frac{\delta p_{max} (\partial p_0 / \partial \bar{x})^{-1}}{\tau_{eq}(\bar{x})}, \quad (3.35)$$

die für jede Auslenkung \bar{x} gelten muss. Bei vorgegebenem δp_{max} ist es möglich, mit dieser Ungleichung zu testen, ob eine Trajektorie unter der Schranke bleibt. Global ergibt sich daraus für die Geschwindigkeit die obere Schranke

$$\bar{v}_{max} = \min \left\{ \frac{\delta p_{max} (\partial p_0 / \partial \bar{x})^{-1}}{\tau_{eq}(\bar{x})} \right\}. \quad (3.36)$$

Dieser Ausdruck ist analytisch nur schwer auszuwerten. Eine etwas langwierige Näherungsrechnung für den Fall Titin ist im Anhang B.1 dargestellt.

Da jede stochastische Trajektorie mit der Schwankung $\sigma_{\bar{x}} = \sqrt{\langle \Delta n^2 \rangle} / N$ um die Gleichgewichtskurve fluktuiert, ist eine wesentliche Abweichung erst für $\delta p_{max} \gtrsim \sigma_{\bar{x}}$ gegeben. Aus Gleichung (3.17) erhält man mit $\partial / \partial n = N^{-1} \partial / \partial p$ für das Schwankungsquadrat

$$\sigma_{\bar{x}}^2 \approx \frac{(1-p)k_{12} + pk_{21}}{2N\tau_{eq}^{-1}}. \quad (3.37)$$

Für eine obere Schranke $\bar{v}_0 < \bar{v}_{max}$ der skalierten Geschwindigkeit folgt aus der Rechnung in B.1 für Titin der genäherte Ausdruck

$$\bar{v}_0 \approx \frac{k_{12}^0}{\sqrt{N}} e^{\frac{1}{2}a(b+2+\ln b - \ln a)} \frac{2L_p}{3(x_u + x_f)} \left(2(L_u + L_f) + \delta L \ln \left(\frac{k_{21}^0}{k_{12}^0} \right) \right). \quad (3.38)$$

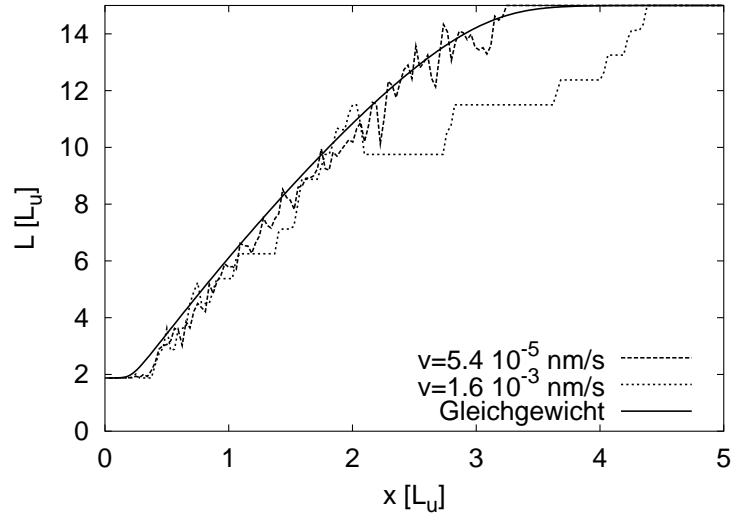


Abb. 3.6: Die Konturlänge L von Titin zweier Trajektorien, berechnet mit Hilfe einer numerischen Monte-Carlo-Simulation nach [81]. Zum Vergleich wurden zwei unterschiedliche Ziehgeschwindigkeiten verwendet und die Gleichgewichtslösung dargestellt. Für $v < v_0$ kann man erkennen, dass die fluktuierende Kurve nicht sehr von der Gleichgewichtslösung abweicht. Für $v > v_0$ beobachtet man eine erhebliche Differenz von der Gleichgewichtslösung bei den diskontinuierlichen Stufen.

Dabei sind $a \equiv x_u/(x_f + x_u)$ und $b \equiv \ln\left(\frac{p_0 \delta L k_{21}^0}{l_0 k_{12}^0}\right) - 1$ von den Modellparametern abhängige Konstanten, die für Titin $a \simeq 0.02$ und $b \simeq 10$ betragen.

Die Abhängigkeit der unskalierten Geschwindigkeit v von N ist, wie man an Gleichung (3.38) erkennen kann, proportional zu \sqrt{N} . Für Titin mit $N = 15$ ergibt sich als obere Schranke der unskalierten Ziehgeschwindigkeit $v_0 \simeq 8.6 \cdot 10^{-4}$ nm/s. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Dort werden zwei Trajektorien der Konturlänge von Einzelexperimenten mit unterschiedlichen Ziehgeschwindigkeiten miteinander verglichen, die im einen Fall deutlich unter und im anderen Fall deutlich über der oberen Schranke v_0 liegt.

Als ein wesentliches Resultat der Betrachtung bisher kann festgestellt werden, dass typische Experimente mit AFM an Titin immer im Nichtgleichgewicht ablaufen, da gewöhnlich höhere Ziehgeschwindigkeiten gewählt werden. Für ein Experiment mit der Ziehgeschwindigkeit v_0 , bei dem Titin eine Strecke von ca. 100 nm auseinandergezogen werden soll, muss mit einer Experimentierdauer von etwa 1.3 Tage gerechnet werden.

Für Dextran stellt sich die Situation hingegen anders dar. Die Entfaltung der Domänen geschieht nicht mehr im linearen Regime der Kraft. Aus diesem Grund kann die Lösung der Gleichung (3.35) bzw. (3.36) nur numerisch bestimmt werden. Abbildung 3.7 zeigt die rechte Seite der Gleichung (3.35) sowohl für Titin als auch Dextran jeweils multipliziert mit der Anzahl an Domänen N . Beachtenswert ist die Abhängigkeit von

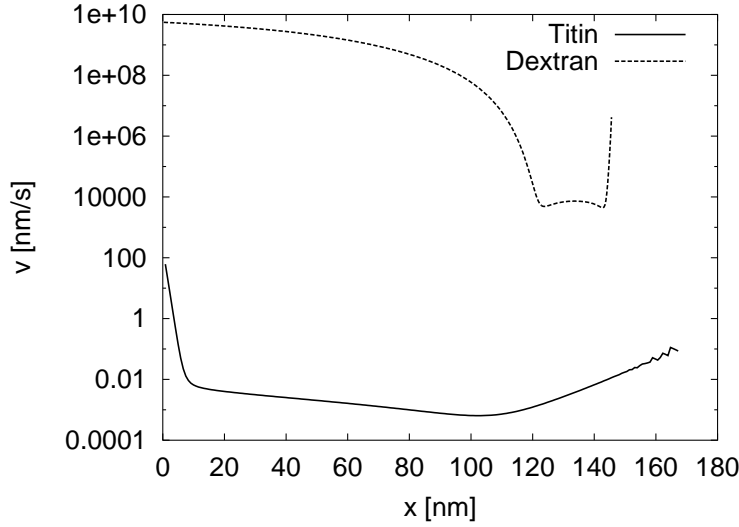


Abb. 3.7: Die obere Grenze der Ziehgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Position der Messfeder für Titin mit $N = 15$ und Dextran mit $N = 275$ Domänen nach der rechten Seite von Ungleichung (3.35). Die Minima der Kurven ergeben jeweils die maximale globale Geschwindigkeit, bis zu der sich das System noch im Gleichgewicht befindet.

der Position der Messfeder. Der Funktionswert am Minimum der Kurve für Titin mit $N = 15$ stimmt mit unserer bisherigen Abschätzung der globalen oberen Schranke der unskalierte Ziehgeschwindigkeit gut überein: man entnimmt $v_{max} \simeq 6.4 \cdot 10^{-4}$ nm/s. Für Dextran mit $N = 275$ Domänen kann man den Wert $v_{max} \simeq 5 \mu\text{m/s}$ ablesen. Für Dextran ergibt sich damit, dass eine erheblich höhere Ziehgeschwindigkeit als bei Titin das System nicht aus dem Gleichgewicht auslenkt. Das hat sowohl mit den höheren Übergangsraten als auch mit der größeren Anzahl an Domänen zu tun. Abbildung 3.8 zeigt einen weiteren Vergleich zweier Trajektorien mit der Gleichgewichtslösung für Dextran. Auch hier kann die Vorhersage der Theorie anhand der Simulationen bestätigt werden.

Man erhält somit, wie zu erwarten war, für die verschiedenen Parametersätze sehr unterschiedliche Kurven für die obere Schranke der Ziehgeschwindigkeit. Für jedes Multidomänen-Biopolymer müssen also die Gleichungen (3.35) bzw. (3.36) individuell gelöst werden.

Überlegen wir uns als letzten Punkt in diesem Abschnitt den Verlauf der Kraftkurve beim Übergang vom Gleichgewicht zum Nichtgleichgewicht. Eine Hysterese zwischen den Kräften der Vorwärts- und der Rückwärtsrampe gilt als Beleg für Nichtgleichgewicht. Da für die Vorwärtsrampe mit $v > 0$ gezeigt wurde, dass $\delta p < 0$ ist, folgt daraus für die Konturlänge $l = (p_0(\bar{x}) + \delta p)$ im Vergleich zur Gleichgewichtslösung l_0 immer die Relation $l < l_0$. Für ein umgekehrtes Vorzeichen der Geschwindigkeit dreht sich auch das Längenverhältnis um, also $l > l_0$. Für die Kraft im WLC-Polymer liegt damit bei der Vorwärtsrampe weniger Konturlänge vor als bei der Rückwärtsrampe, was schließlich zu einer Differenz der Kraft bei gleicher Auslenkung x führt.

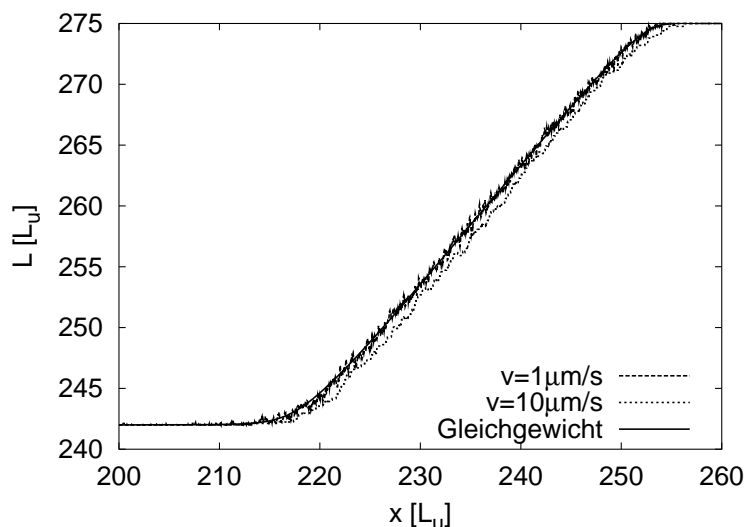


Abb. 3.8: Zwei Trajektorien der Konturlänge von Einzelexperimenten mit Dextran ($N = 275$) über der Auslenkung x , die mit Hilfe der Monte-Carlo-Methode berechnet wurden. Die Gleichgewichtslösung wird hierbei mit zwei verschiedenen Ziehgeschwindigkeiten verglichen, zum einen im Gleichgewicht, mit $v < v_0$, zum anderen mit $v > v_0$, bei der die Abweichung von der Gleichgewichtslösung über die Fluktuation hinaus ersichtlich wird.

Diese Betrachtung sowie die des gesamten Unterkapitels wurde auf einer Mean-Field-Gleichung aufgebaut, die die Dynamik des Mittelwerts unter Vernachlässigung der Fluktuationen beschreibt. In der Nähe des Gleichgewichtes ist diese Gleichung ausreichend. Fern vom Gleichgewicht benötigt man jedoch andere Ansätze, die wir im Folgenden behandeln.

3.1.6 Das Übergangsregime

Als das Übergangsregime bezeichnen wir den Bereich, in dem die Dynamik erheblich von derjenigen im Gleichgewicht abweicht. Die Ziehgeschwindigkeit ist somit größer als die berechnete obere Schranke für das Gleichgewichtsregime (Gl. (3.36)), aber einige Faltungsübergänge finden immer noch statt. Wir werden zeigen, wie dieser Bereich mit Hilfe von Übergangswahrscheinlichkeiten beschrieben und nur unscharf eingegrenzt werden kann.

Dazu greifen wir auf die in Kapitel (2.4) entwickelte Zuverlässigkeitstheorie zurück. Die Wahrscheinlichkeit $P_0(t)$, dass N Domänen bis zur Zeit t im gefalteten Zustand verbleiben ist nach Gleichung (2.78)

$$P_0(t) = \exp\left(-\int_0^t Nk_{12}(t')dt'\right). \quad (3.39)$$

Die Wahrscheinlichkeit des Gegenereignisses für einen Entfaltungsübergang im Intervall

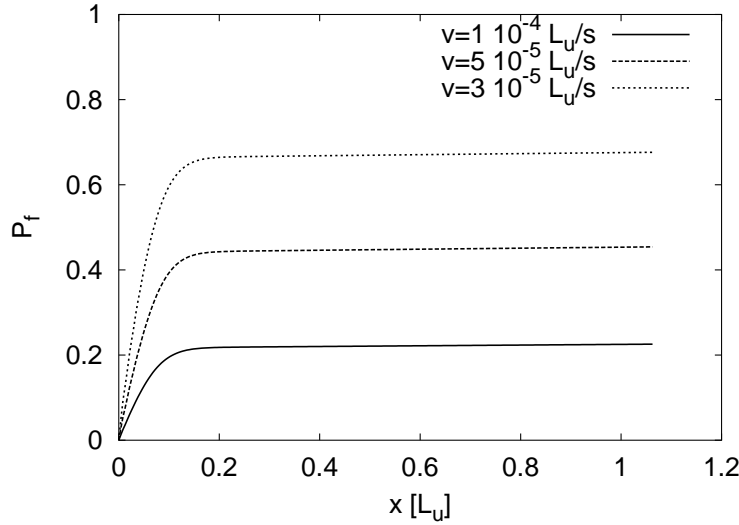


Abb. 3.9: Die Wahrscheinlichkeit $P_f(x)$, dass sich das erste offene Segment bei einer Auslenkung kleiner als x wieder faltet.

$[0, t]$ ist damit $P_u(t) = 1 - P_0(t)$. Die Ableitung nach t ist die Wahrscheinlichkeitsdichte

$$p_u(t) = Nk_{12}(t)\exp\left(-\int_0^t Nk_{12}(t')dt'\right). \quad (3.40)$$

Die Größe $p_u(t)dt$ gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass sich eine Domäne im Zeitintervall $[t, t + dt]$ entfaltet. Die maximale Zeit t_1^{max} , bis die erste Domäne mit der Wahrscheinlichkeit 1 entfaltet ist, ist über die Bedingung $x = L$ durch die Konturlänge des WLC-Polymers gegeben, d.h. $t_1^{max} = NL_f/v$, dann würde k_{12} unendlich. Wir müssen im Folgenden unterscheiden zwischen dem Ereignis, dass sich die erste entfaltete Domäne wieder faltet, und dem Gegenereignis dass sich eine weitere entfaltet oder sich nichts verändert. Dazu benötigen wir die bedingte Wahrscheinlichkeit

$$P_1(t|t_1) = \exp\left(-\int_0^{(t-t_1)} k_{21}(t'|t_1)dt'\right), \quad (3.41)$$

dass die erste, zur Zeit t_1 entfaltete Domäne in diesem Zustand bis zur Zeit t überlebt. Darin beträgt die auf den Zeitpunkt t_1 bedingte Übergangsrate

$$k_{21}(t'|t_1) = k_{21}^0 e^{-\beta x_f F(v(t'+t_1)+x_0, L)}. \quad (3.42)$$

Die Auslenkung sei durch die lineare Rampe (1.2) vorgegeben. Die Wahrscheinlichkeit $P_f(t)$, dass eine entfaltete Domäne zum Zeitpunkt t wieder im gefalteten Zustand vorliegt, ist das Produkt aus der Wahrscheinlichkeit $p_u(t_1)$, dass sie sich zum Zeitpunkt $t_1 < t$ entfaltet und der Wahrscheinlichkeit $(1 - P_1(t|t_1))$, sich zu irgendeinem Zeitpunkt

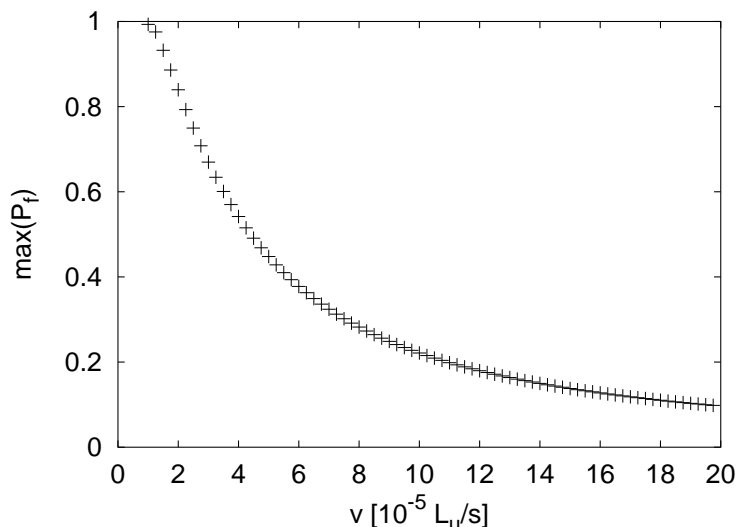


Abb. 3.10: Die maximale Wahrscheinlichkeit $P_f(x)$ entsprechend Abb. 3.9 als Funktion der Geschwindigkeit v .

kleiner als t wieder zu falten. Der Zeitpunkt t_1 spielt für die weitere Betrachtung keine Rolle und kann von 0 bis t gemäß

$$P_f(t) = \int_0^t dt_1 (1 - P_1(t|t_1)) p_u(t_1) \quad (3.43)$$

integriert werden. Diese Größe können wir nun für unterschiedliche Geschwindigkeiten miteinander vergleichen. Sie ist keine Wahrscheinlichkeitsdichte, so dass sie weder über t normiert ist, noch zu einem Zeitpunkt auf 1 ansteigen muss. Sie muss allerdings streng monoton steigend sein, da sich diese Wahrscheinlichkeit auf das Intervall $[0, t]$ bezieht, also auf irgendeinen Zeitpunkt kleiner als t . Mit ansteigendem t kann sie per Konstruktion nicht sinken, darf allerdings nicht über 1 ansteigen. Der Integrand in Gleichung (3.43) ist ein Produkt aus einer abfallenden Funktion $(1 - P_1(t|t_1))$ und einer ansteigenden $p_u(t_1)$. Wenn der Überlapp dieser beiden Funktionen klein ist, ist das ganze Integral klein. Dies geschieht offensichtlich dann, wenn die Entfaltungswahrscheinlichkeit erst in der Nähe der maximalen Zeit ansteigt. Dieses Regime, bei dem die Rückraten systematisch unterdrückt sind, nennt man das Sägezahnregime.

Das Integral (3.43) ist analytisch nicht lösbar. Abbildung 3.9 zeigt typische numerische Resultate der Funktion $P_f(t)$. Die Monotonie ist gut zu beobachten, außerdem die asymptotische Annäherung an einen maximalen Wert kleiner als 1.

Abbildung 3.10 zeigt für Titin diesen maximalen Wert in Abhängigkeit von der Ziehgeschwindigkeit. Für kleine Ziehgeschwindigkeiten $v < 2 \cdot 10^{-5} L_u/s$ ist die Wahrscheinlichkeit für eine Rückfaltung der ersten entfalteten Domäne näherungsweise 1. Trotzdem ist man schon weit über der Grenze für die Gleichgewichtslösung. Dieser erhebliche Unterschied erklärt sich unter anderem dadurch, dass das Gleichgewicht nicht nur für die erste

Domäne hohe Rückraten erfordert, sondern für jede weiter auch. Für Geschwindigkeiten $v \approx 4 \cdot 10^{-5} L_u/s$ ist die Wahrscheinlichkeit für die Rückfaltung schon auf 0.5 gesunken. Für noch größere Geschwindigkeiten fällt der Wert schnell ab. Auf Null wird die Wahrscheinlichkeit nicht absinken, insofern ist eine Festlegung der Grenze in diese Richtung weitgehend willkürlich. Mit $v > 2 \cdot 10^{-4} L_u/s$ zum Beispiel findet in 9 von 10 Versuchen keine Rückfaltung der ersten Domäne mehr statt. Daher ist diese 10-Prozent-Marke ein möglicher Grenzwert, ab der das Übergangsregime in das Sägezahnregime übergeht.

3.1.7 Das Sägezahnregime

Die Übergangswahrscheinlichkeiten

Wenn im Verlauf des gesamten Experimentes kein einziger Faltungsübergang auftritt, bezeichnet man die zugehörige Kraftkurve als Sägezahnkurve [81], da sie bei jedem Entfalten einer Domäne durch die freigewordene zusätzliche Konturlänge absinkt. Jeder Entfaltungsvorgang kann also durch ein Maximum in der Kraftkurve einzeln aufgelöst werden. Die Anzahl der Maxima entspricht damit exakt der Anzahl der Domänen N . Zur Charakterisierung dieses Regimes benutzen wir ein weiteres Mal die Übergangswahrscheinlichkeiten. Bei kleineren Geschwindigkeiten zeigen sich noch große Schwankungen in der Anordnung und der Höhe der Maxima, bei großen Geschwindigkeiten werden die Abstände immer regelmäßiger. Diese zunächst heuristische Beobachtung kann innerhalb der dargelegten Theorie verstanden werden.

Zunächst sei angemerkt, dass die Kraft entlang eines WLC-Polymers (Gl. (2.34)) skaleninvariant bezüglich dem Verhältnis aus Auslenkung und Konturlänge L ist, d.h.

$$F(x, L) = F(Cx, CL) = F(x/L) \quad \text{mit } C \in \mathbb{R} . \quad (3.44)$$

Das ist letztlich der Grund für die Regelmäßigkeit des Sägezahnmodells im Verlauf der Kraftkurve. Darum führen wir die Variablen

$$\zeta_j \equiv x/L_j \quad (3.45)$$

zugehörig zu dem Übergang j ein, wobei L_j die Konturlänge vor dem Entfaltungsübergang ist. Das bedeutet, dass die Kraft ihre Pole jeweils bei $\zeta_j = 1$ und die mittlere Auslenkung für den Entfaltungsübergang $\langle \zeta_j \rangle$ wenig kleiner ist als 1. Die reskalierte Geschwindigkeit

$$\vartheta_j \equiv v/L_j \quad (3.46)$$

wird für verschiedene j konstant gehalten, indem die Geschwindigkeit v verändert wird, um eine skaleninvariante Situation noch besser zu realisieren. Die einzige nicht skalierbare Variable, die sich dann bei jedem Übergang zwangsläufig verändert, ist die Anzahl an Domänen im gefalteten Zustand. Wir werden zeigen, wie die mittlere Position für den Übergang $\langle \zeta_j \rangle$ von der Geschwindigkeit v und von der Anzahl $N - j$ abhängt.

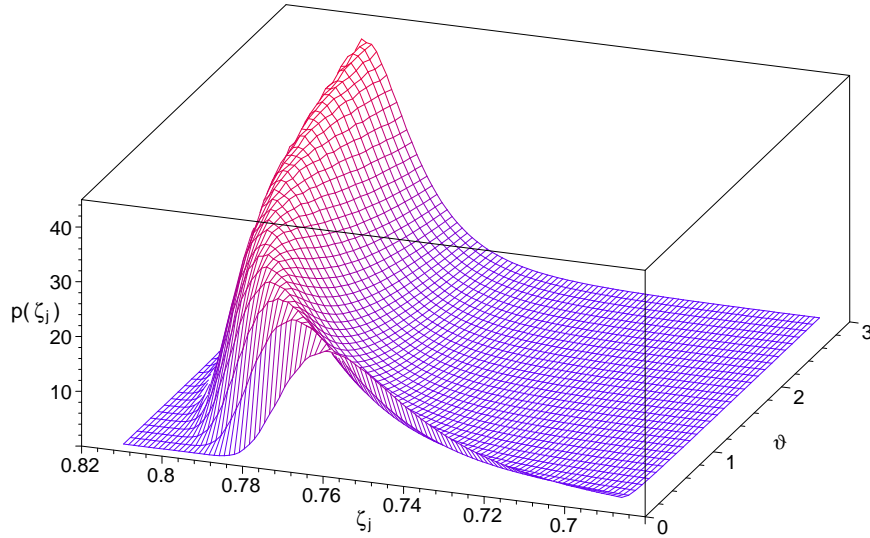


Abb. 3.11: Die Wahrscheinlichkeitsdichte $p(\zeta_j)$ (3.47) für verschiedene reskalierte Geschwindigkeiten ϑ und $j = 10$. ζ_j ist der reskalierte Ort des Übergangs j . Die Übergangszeit t hängt von dem Ort über die lineare Rampe (3.49) ab. Für höhere Geschwindigkeiten ist die Verteilung lokalisierter und der Mittelwert nähert sich asymptotisch 1 an.

Zu diesem Zweck untersuchen wir die Wahrscheinlichkeitsdichte $p_{u,j}(t|t_{j-1}, t_{j-2} \dots)$ des Zeitpunktes t der Entfaltung der Domäne j , die von den Zeitpunkten $t_{j-1}, t_{j-2} \dots$ aller Ereignisse zuvor abhängt. Für große Geschwindigkeiten ist das Maximum der Dichte beim Pol der Kraft stark lokalisiert, so dass wir für die Wahrscheinlichkeitsdichte allein die Abhängigkeit vom vorigen Ereignis entsprechend (3.40) gemäß

$$p_{u,j}(t|t_{j-1}, t_{j-2} \dots) = p_{u,j}(t|t_{j-1}) = k_{12}^j(t)(N-j)e^{\int_{t_{j-1}}^t (N-j)k_{12}^j(t')dt'} \quad (3.47)$$

annehmen können mit der Übergangsrate

$$k_{12}^j(t) = k_{12}^0 e^{\beta x_u F(vt, L_j)} . \quad (3.48)$$

Zudem hat auch die untere Grenze des Integrals im Exponenten in Gleichung (3.47) keinen Einfluss, so dass wir stattdessen Null einsetzen können. Das Integral in der Wahrscheinlichkeitsdichte (3.47) kann nur numerisch gelöst werden. Die Abbildung 3.11 stellt das Ergebnis in Abhängigkeit von ζ und ϑ dar. Die Zeit wurde mit Hilfe der linearen Rampe

$$\zeta_j(t) = \vartheta t \quad (3.49)$$

eliminiert. Für größere ϑ weist die Verteilung eine immer geringere Varianz auf und nähert sich dem Mittelwert 1 an. Die Positionen der Übergänge werden also immer regelmäßiger, bis deren Abstände etwa der Differenz der freiwerdenden Konturlänge entsprechen. Für Titin bedeutet das einen Abstand der Spitzen in der Kraftkurve von ca. 28 nm, siehe Abbildung 3.2.

Die Mittelwerte der Übergangspitionen

Eine analytische Berechnung des Mittelwertes aus der Verteilungsfunktion (3.47) ist nicht exakt möglich. Wir zeigen, wie man mit Hilfe einiger Näherungen dennoch einen Ausdruck dafür erhält. Nehmen wir an, j Domänen befinden sich im entfalteten Zustand. Nach Gleichung (3.41) ergibt sich die Wahrscheinlichkeit, dass in dieser Situation $(N - j)$ Domänen bis zur Zeit t gefaltet bleiben

$$P_j(t) = \exp\left(-\int_0^t (N - j)k_{12}^j(t)dt\right). \quad (3.50)$$

Indem wir die Näherung benutzen, dass die mittlere Übergangszeit τ durch $P_j(\tau) \simeq 1/e$ festgelegt sei, erhalten wir

$$1 = \int_0^\tau (N - j)k_{12}^j(t)dt. \quad (3.51)$$

Als Integrationsvariable benutzen wir anstelle der Zeit $\delta\zeta_j = 1 - \zeta_j$, den skalierten Abstand zur senkrechten Asymptote bei $\zeta_j = 1$. Für die untere Grenze des Integrals (3.51) ergibt sich somit 1 und für die obere Grenze $\langle\delta\zeta_j\rangle$. Mit diesen Ersetzungen wird aus dem Integral (3.51)

$$1 = -\int_1^{\langle\delta\zeta_j\rangle} \frac{d\delta\zeta_j}{\vartheta} k_{12}^0(N - j) e^{\frac{x_u}{L_p} \left(\frac{1}{4\delta\zeta_j^2} + \frac{3}{4} - \delta\zeta_j\right)} \quad (3.52a)$$

$$\approx -\int_1^{\langle\delta\zeta_j\rangle} \frac{d\delta\zeta_j}{\vartheta} k_{12}^0(N - j) e^{\frac{x_u}{L_p} \frac{1}{4\delta\zeta_j^2}}, \quad (3.52b)$$

wobei in (3.52b) die Näherung $\langle\delta\zeta_j\rangle \ll 1$ eingeht, die dort geeignet ist, wo der Integrand lokalisiert ist. Der Integrand in (3.52b) stellt eine stark abfallende Funktion von $\delta\zeta_j$ in der Nähe von $\zeta_j = \langle\delta\zeta_j\rangle$ dar. Eine Entwicklung des Exponenten um $\langle\delta\zeta_j\rangle$ ergibt mit Hilfe der Sattelpunktsnäherung am Rand [88] als Lösung des Integrals

$$1 = \frac{2L_p \langle\delta\zeta_j\rangle^3}{x_u} \frac{k_{12}^0(N - j)}{\vartheta} e^{\frac{x_u}{L_p} \frac{1}{4\langle\delta\zeta_j\rangle^2}}. \quad (3.53)$$

Nun müssen wir diese Gleichung nach $\langle\delta\zeta_j\rangle$ auflösen. Dazu führen wir die Größe ν ein, die multipliziert mit $\delta\zeta_j$ die Funktionsstelle markiert, an dem der Integrand gleich dem Integral ist, d.h.

$$\frac{2L_p \langle\delta\zeta_j\rangle^3}{x_u} e^{\frac{x_u}{L_p} \frac{1}{4\langle\delta\zeta_j\rangle^2}} = e^{\frac{x_u}{L_p} \frac{1}{4\nu^2 \langle\delta\zeta_j\rangle^2}}. \quad (3.54)$$

Ist der Integrand stark am Rand lokalisiert, gilt $1 < \nu < 1 + \epsilon$, mit $\epsilon \ll 1$ für einen großen Wertebereich der anderen Parameter. In linearer Ordnung in $\langle\delta\zeta_j\rangle$ erhalten wir

$$\langle\delta\zeta_j\rangle = \frac{1}{2\nu} \left(\frac{x_u}{L_p}\right)^{\frac{1}{2}} \left[\ln\left(\frac{\vartheta}{k_{12}^0}\right) - \ln(N - j)\right]^{-\frac{1}{2}}, \quad (3.55)$$

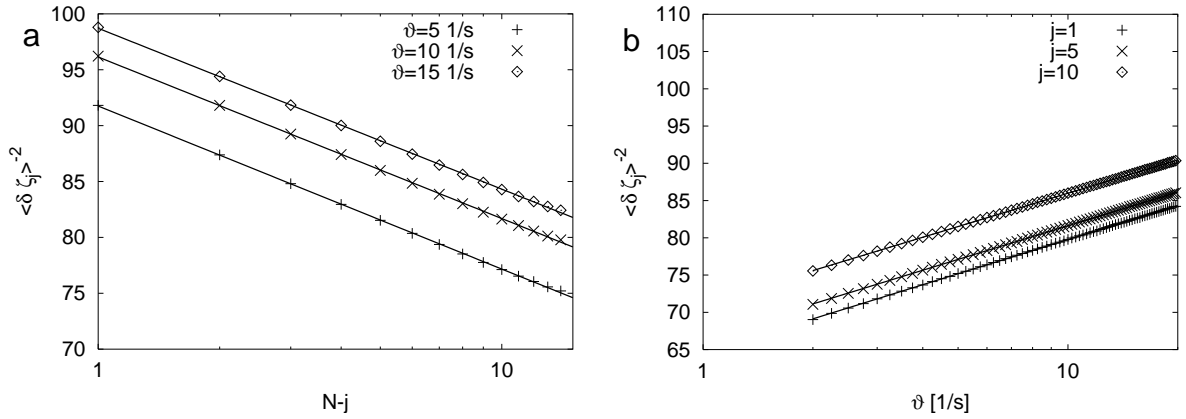


Abb. 3.12: a) Die aus der vollständigen Verteilung (3.47) gemittelte Entfaltungslänge als Nachweis der wurzel-logarithmischen $(N-j)$ -Abhängigkeit von $\langle \delta \zeta_j \rangle$ nach Gleichung (3.55). Man erhält für die angepasste Testfunktion $\delta \zeta_j^{-2} = a \ln(N-j) + b(\vartheta)$ den Parameterwert $a \simeq -6.3$. b) Dieselbe gemittelte Entfaltungslänge wie in a) als Nachweis der wurzel-logarithmischen ϑ -Abhängigkeit von $\langle \delta \zeta_j \rangle$ nach Gleichung (3.55). Für die Testfunktion $\delta \zeta_j^{-2} = a \ln \vartheta + b_j$ erhält man $a \simeq 6.5$.

indem wir die Gleichungen (3.53) und (3.54) miteinander kombinieren. Der Parameter ν ergibt sich aus Gleichung (3.54) entsprechend

$$\nu \approx 1 - 2 \left(\frac{L_p}{x_u} \right) \langle \delta \zeta_j \rangle^2 \ln \left(\frac{2L_p}{x_u} \langle \delta \zeta_j \rangle^3 \right). \quad (3.56)$$

Daraus folgt, dass $\langle \delta \zeta_j \rangle$ in (3.55) in führender Ordnung wurzel-logarithmisch von ϑ und $(N-j)$ abhängt. Mit Hilfe numerisch berechneter Daten wurde dieses Ergebnis in den Abbildungen 3.12a und 3.12b verifiziert. Hierbei erhielten wir für den Parameter ν den Wert von ca. 1.1.

Die Gleichung (3.55) erlaubt es, die regelmäßige Struktur der Maxima zu verstehen, siehe auch Abbildung 3.2. Die Auslenkungen, an denen die Entfaltungsübergänge stattfinden, sind nämlich genau

$$\langle x_j \rangle = L_j - \langle \delta x_j \rangle = L_j(1 - \langle \delta \zeta_j \rangle). \quad (3.57)$$

Vernachlässigt man die j -Abhängigkeit von $\langle \delta \zeta_j \rangle$, so folgt

$$\langle \delta \zeta \rangle \approx \frac{1}{2\nu} \left(\frac{x_u}{L_p} \right)^{\frac{1}{2}} \left[\ln \left(\frac{\vartheta}{k_{12}^0} \right) \right]^{-\frac{1}{2}}. \quad (3.58)$$

Damit erhalten wir näherungsweise eine lineare Beziehung zwischen der Konturlänge L_j und den Maxima in der Kraftkurve bei $\langle x_j \rangle$.

3.1.8 Fazit zu Kapitel 3.1

Das zentrale Anliegen, die unterschiedlichen Regimes in den experimentellen Messkurven der Kraft als Funktion der Position der Messfeder zu verstehen, ist mit Hilfe des vorgestellten Modells gelungen. Wir konnten drei Regimes qualitativ und quantitativ gegeneinander abgrenzen und haben bei jedem gezeigt, wie die Ziehgeschwindigkeit gewählt werden muß. Selbstverständlich bleiben Fragen offen. Wir haben zum Beispiel nicht systematisch die Abhängigkeit der Ergebnisse von allen Parametern explizit untersucht. Jedoch ist es mit Hilfe der hergeleiteten Formeln möglich, die Parameter anderer konkreter Systeme einzusetzen, die jeweiligen Funktionen numerisch zu lösen und daraufhin nachfolgende Experimente zu optimieren.

3.2 Periodisch angeregte Übergänge an Multidomänen-Biopolymeren

3.2.1 Die Floquet-Theorie angewandt auf die Mastergleichung

In diesem Unterkapitel werden wir das in Kapitel 2.3 eingeführte periodische Protokoll (2.35)

$$x(t) = x_0 + x_a \cos(\omega t)$$

auf ein Multidomänen-Biopolymer anwenden. Nehmen wir im Folgenden N makroskopisch ununterscheidbare, sequenziell angeordnete Domänen an. Das Polymer besitzt, wenn alle Segmente gefaltet sind, die Konturlänge L und bei jedem Übergang wird die Differenzlänge δL frei. Die zugehörige Mastergleichung (3.4) wurde schon eingeführt. Wir schreiben sie so um, dass die Funktion $P(N)$ in einem $N + 1$ -dimensionalen Vektor angeordnet wird, $\Phi = \{P(0), P(1), \dots, P(N)\}$. Dann kann (3.4) als Matrixgleichung

$$\frac{d}{dt}\Phi = \mathbf{K}\Phi \quad (3.59)$$

mit der Übergangsmatrix

$$\mathbf{K} = \begin{pmatrix} -Nk_{12}(0) & 1k_{21}(1) & 0 & \cdots \\ Nk_{12}(0) & -(N-1)k_{12}(1) - 1k_{21}(1) & 2k_{21}(2) & \cdots \\ 0 & \cdots & & \\ \vdots & \vdots & & \end{pmatrix} \quad (3.60)$$

formuliert werden. Desweiteren seien $k_{ij}(N_u)$ die periodisch zeitabhängigen Raten in Abhängigkeit der entfalteten Domänen N_u entsprechend (2.37). Unter den genannten Voraussetzungen können wir \mathbf{K} in eine Summe aus zwei Matrizen zerlegen, wobei die

erste zeitunabhängig und die zweite periodisch zeitabhängig ist. Aus Gleichung (3.59) erhält man bis zur linearen Ordnung in (x_a/L)

$$\frac{\partial}{\partial t} \Phi = (\mathbf{K}_0 + \mathbf{K}_1 e^{i\omega t}) \Phi , \quad (3.61)$$

wobei \mathbf{K}_0 dieselbe Matrix wie \mathbf{K} ist, außer dass k_{ij} nach Gleichung (2.39) durch κ_{ij} ersetzt wurde. Die Matrix \mathbf{K}_1 beinhaltet die Amplituden des periodischen Anteils, entsprechend Gleichung (2.39). Da die Übergangsmatrix $\mathbf{K}_0 + \mathbf{K}_1 e^{i\omega t}$ periodisch in der Dauer $T = 2\pi/\omega$ ist, ergeben sich Floquet-Lösungen von (3.61) nach [97]

$$\Phi(t) = e^{-\varepsilon t} \Phi_\varepsilon(t) \quad (3.62)$$

mit den Floquet-Eigenwerten ε und den ebenfalls periodischen Floquet-Moden

$$\Phi_\varepsilon(t) = \Phi_\varepsilon(t + T) . \quad (3.63)$$

Die zugehörige Eigenwertgleichung lautet

$$\left[\mathbf{K}_0 + \mathbf{K}_1 e^{i\omega t} - \frac{\partial}{\partial t} \right] \Phi_\varepsilon = -\varepsilon \Phi_\varepsilon . \quad (3.64)$$

Der Index an der Besetzungswahrscheinlichkeit bezeichnet den Floquet-Eigenwert. Wir sind an der stationären Eigenlösung interessiert, die nach der Floquet-Theorie zum niedrigsten Eigenwert $\varepsilon = 0$ gegeben ist, gemäß

$$\left[\mathbf{K}_0 + \mathbf{K}_1 e^{i\omega t} - \frac{\partial}{\partial t} \right] \Phi_0 = 0 . \quad (3.65)$$

Diese Gleichung kann mit Hilfe eines Fourierreihenansatzes

$$\Phi_0 = \sum_{n=0}^{\infty} \Phi_0^n e^{i\omega n t} \quad (3.66)$$

gelöst werden. Der Index rechts oben an der Besetzungswahrscheinlichkeit numeriert die Fourierkoeffizienten durch. Setzt man diesen Ansatz ein, folgen die hierarchisch gekoppelten Gleichungen

$$\sum_n (\mathbf{K}_0 \Phi_0^n e^{i\omega n t} + \mathbf{K}_1 \Phi_0^n e^{i\omega(n+1)t} - i\omega n \Phi_0^n e^{i\omega n t}) = 0 . \quad (3.67)$$

Die erste für $n = 0$

$$\mathbf{K}_0 \Phi_0^0 = 0 , \quad (3.68)$$

ergibt die Gleichgewichtslösung (3.8)

$$(\Phi_0^0)_j = (\Phi_0^0)_0 \frac{N!}{(N-j)!j!} \left(\prod_{n=0}^{j-1} \frac{\kappa_{12}(n)}{\kappa_{21}(n+1)} \right) \quad (3.69)$$

mit der Normierungskonstanten $(\Phi_0^0)_0$. Der Index rechts außen an der Klammer numeriert die Komponenten des Besetzungsvektors durch.

Die nächsten zwei Gleichungen der Hierarchie (3.67) sind

$$\mathbf{K}_0 \Phi_0^1 + \mathbf{K}_1 \Phi_0^0 - i\omega \Phi_0^1 = 0 \quad (3.70a)$$

$$\mathbf{K}_0 \Phi_0^2 + \mathbf{K}_1 \Phi_0^1 - i2\omega \Phi_0^2 = 0 . \quad (3.70b)$$

Da \mathbf{K}_1 proportional zu x_a/L ist, folgt aus (3.70a), dass Φ_0^1 dieselbe Abhängigkeit hat. Die Amplitude Φ_0^2 ist entsprechend (3.70b) von der Ordnung $(x_a/L)^2$ und Φ_0^n demnach von der Ordnung $(x_a/L)^n$. Das heißt, die höheren Fouriermoden sind zwar nicht Null, aber vernachlässigbar klein.

3.2.2 Eine Näherungslösung

Wir nehmen nun an, dass die Wahrscheinlichkeit in den ersten beiden Zuständen lokalisiert ist, d.h. nur die ersten beiden Besetzungswahrscheinlichkeiten $(\Phi_0)_0$ und $(\Phi_0)_1$ wesentlich verschieden von Null sind,

$$(\Phi_0)_0 + (\Phi_0)_1 \simeq 1 \quad (3.71a)$$

$$(\Phi_0)_j \simeq 0 \quad \text{für } j > 1 . \quad (3.71b)$$

Der zeitunabhängige Anteil ist nach Gleichung (3.69)

$$(\Phi_0^0)_1 = (\Phi_0^0)_0 \frac{\kappa_{12}(0)}{\kappa_{21}(1)} . \quad (3.72)$$

Zusammen mit der Normierungsbedingung (3.71a) erhalten wir

$$(\Phi_0^0)_0 = \frac{\kappa_{21}(1)}{\kappa_{12}(0) + \kappa_{21}(1)} . \quad (3.73)$$

Der zeitabhängige Anteil der Lösung entspricht nach Gleichung (3.59) näherungsweise einem 2-Zustandssystem mit modifizierten Übergangsraten, die um den Faktor der statistischen Multiplizität größer sind.

Die Zeitskala, auf der diese Annahme gilt, hängt mit den Verlusttermen zusammen. Für Zeiten $t \ll 1/((N-1)\kappa_{12}(1))$ wird die nächste Domäne nicht entfaltet. Grundsätzlich müssen also die beiden relevanten Übergangsraten die Bedingung

$$(N-1)\kappa_{12}(1) \ll \kappa_{21}(1) \quad (3.74)$$

erfüllen. Setzt man die Raten ein, erhält man

$$(N - 1)k_{12}^0 e^{\beta x_u F(x, L + \delta L)} \ll k_{21}^0 e^{-\beta x_f F(x, L + \delta L)} , \quad (3.75)$$

woraus erstens die Bedingungen $k_{12}^0 \ll k_{21}^0$ folgt und zweitens die Exponenten hinreichend klein sein müssen. Das ist für eine große Längenänderung, wie bei Titin, gewährleistet. Die Besetzungswahrscheinlichkeit bleibt daher in den ersten beiden Zuständen lokalisiert, d.h. auf einen Unterraum eingeschränkt. Dieselbe Beschränkung ist bei den weiteren Zuständen nur dann gegeben, wenn die relevanten Verlustterme der jeweiligen Unterräume der Matrix (3.60) klein sind, d.h. allgemein

$$(N - n)k_{12}(n) \gg nk_{21}(n) \quad (3.76a)$$

$$(N - n - 1)k_{12}(n + 1) \ll (n + 1)k_{21}(n + 1) \quad (3.76b)$$

mit $N > n \geq 0$, wobei diese Bedingungen nur in einem Intervall für die Auslenkung x_0 richtig sein können. Eine Einschränkung auf den Unterraum eines 2-Zustandssystems kann man auch daran erkennen, dass die Besetzungswahrscheinlichkeiten im Gleichgewicht nur für die benachbarten Zustände wesentlich überlappen. Für Titin ist diese Bedingung gegeben, wie in Abbildung 3.3 leicht zu überprüfen ist.

Entsprechend Gleichung (2.50) berechnet sich die mittlere Kraft gemäß

$$\langle F(t) \rangle = \sum_{n=0}^N (\Phi_0)_n F(x, L + n\delta L) . \quad (3.77)$$

Sie besitzt auch einen zeitunabhängigen Anteil und einen periodischen Anteil. Die Antwortamplituden der Besetzungswahrscheinlichkeiten wären mehrere Kurven und würden jeweils nur einen Übergang repräsentieren, während die mittlere Kraftkurve die Antwort des Gesamtsystems darstellt. Abbildung 3.13 zeigt die Amplitude des zeitabhängigen Anteils von Gleichung (3.77) für 4 Titin-Domänen in Reihe und zum Vergleich die Amplituden für 2-Zustandssysteme mit modifizierten Übergangsraten. Dabei wird ersichtlich, dass sie mit den jeweiligen Abschnitten der Gesamtkurve sehr gut übereinstimmen und die Bedingungen (3.76) daher auf diesen Fall zutreffen. Für die Berechnung dieser Kurven verwendeten wir ein einfaches Euler-Verfahren zur Integration der Gleichung (3.59). Die Maxima der mittleren Amplitude der Kraft sind etwa dort, wo sich zwei benachbarte Zustände im Gleichgewicht mit einer Besetzungswahrscheinlichkeit von ca. 0.5 überlappen, siehe zum Vergleich auch die Abb. 3.3. Die Höhe der Maxima der Einzelkurven nimmt mit zunehmender Anzahl an entfalten Domänen ab, so dass das zweite und dritte in der Gesamtkurve nur noch als Schwelle zu sehen sind.

Wir haben in diesem Unterkapitel gezeigt, dass das periodische Protokoll auch bei Multidomänen-Biopolymeren angewandt werden kann. Die Messkurven, z.B. die Antwortamplitude des periodischen Anteils der Kraft (Abb. 3.13), können herangezogen werden, um die Parameter der einzelnen Übergänge durch geeignete Fitverfahren auszuwerten. Eine Einschränkung der Dynamik auf den Unterraum eines 2-Zustandssystems

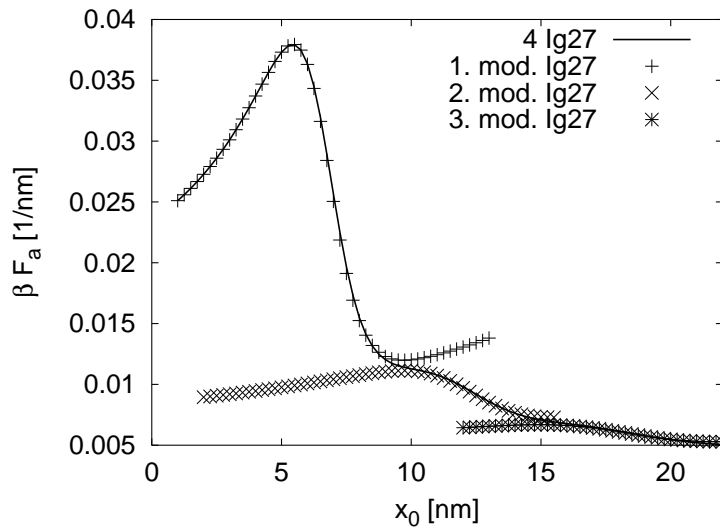


Abb. 3.13: Die durchgezogene Linie stellt die aus (3.59) numerisch berechnete Amplitude des periodischen Anteils der Kraft für 4 Ig27 Domänen dar. Die Punkte zeigen jeweils das zugehörige 2-Zustandssystem mit modifizierten Raten.

kann nicht allgemein vorausgesetzt werden, dazu müssen die Bedingungen (3.76) erfüllt sein. Gelten diese, kann die Lösung allerdings sehr einfach abschnittsweise aus den Lösungen (2.41) und (2.43) berechnet werden.

4 Der Reißverschluss-Übergang der DNA

4.1 Neuere Entwicklungen

In diesem Kapitel wenden wir uns speziellen Experimenten an der DNA zu. Ihr molekularer Aufbau wurde schon im einführenden Kapitel 1.1.3 erläutert. Im Folgenden werden wir zusammenfassend wichtige Entwicklungen der letzten Jahre in der Kraftmikroskopie an der DNA darstellen.

Die DNA erfährt aufgrund ihres molekularen Aufbaus unter Zugkraft eine Torsionsspannung [30,98], die einen Übergang zwischen zwei verschiedenen Konfigurationen auslöst. Für schwache Kräfte befindet sich die DNA im B-Zustand, der gekennzeichnet ist durch eine Persistenzlänge von ca. 50 nm und einer kleinen Konturlänge. Bei einer Spannung von 50–100 pN geht sie in den S-Zustand über mit einer geringeren Persistenzlänge von ca. 12 nm [99] und einer um 1.5- bis 2-fach längeren Konturlänge [29,31,32]. Meist wird dieser Übergang mit dem Auseinanderbrechen der Paarbindungen assoziiert [37]. Es ist bisher nicht geklärt, ob diese Modellvorstellung vollständig stimmig ist, da die Persistenzlänge des S-Zustandes nicht doppelt so groß ist wie die der Einzelstrang-DNA (ss-DNA) von $L_p = 0.75$ nm [36,99]. Insofern wurde eine Übergangsstruktur vorgeschlagen, die zwar noch Doppelstrang-DNA (dsDNA) ist, aber nicht mehr in der ursprünglichen Doppelhelix-Konfiguration vorliegt [99].

Die DNA kann auch thermisch denaturieren, das heißt, die Bindungen brechen bei höherer Temperatur aufgrund thermischer Fluktuationen auf. Dabei zeigt sich ein Phasenübergang von der Doppelstrang-DNA zur Einzelstrang-DNA. Es stellt sich heraus, dass bei diesem Vorgang des Aufbrechens die kollektiven Eigenschaften der Basenpaarbindungen eine wesentliche Rolle spielen.

Das wichtigste Modell, das vor einigen Jahren für die DNA vorgeschlagen wurde, beruht auf dem Energiefunktional

$$H[D(n)] = \int_0^N dn \left\{ \frac{1}{2} \eta(D(n)) \left(\frac{dD}{dn} \right)^2 + U(D(n)) \right\} \quad (4.1)$$

in Abhängigkeit der Gesamtzahl an Basenpaarbindungen N und der Funktion $D(n)$, dem halben Abstand des Basenpaars n [98,100–102]. Der erste Term in (4.1) beschreibt die Biegeenergie entlang der DNA. Die Funktion $\eta(D(n))$ bezeichnet die Biegesteifigkeit

des DNA-Stranges, die vom Separationszustand abhängt. Der zweite Term in (4.1), also $U(D(n))$, beschreibt die Bindungswechselwirkung und Torsionsenergie der Basenpaare entlang der dsDNA.

Auf dieser Grundlage lassen sich Gleichgewichtskonfigurationen berechnen. Als ein Übergang von einer zur anderen wird der von der dsDNA zur ssDNA behandelt, wobei die Freie Energiedifferenz thermisch überwunden werden kann [102, 103]. In einer Weiterentwicklung des Modells wird die stochastische Dynamik der Separationsfunktion $D(n)$ mit Hilfe einer Langevin- bzw. Fokker-Planck-Dynamik beschrieben [44, 104]. Mit dieser Methode ist es allerdings bisher nicht gelungen gemischte Basenpaarsequenzen systematisch zu behandeln.

Eine interessante Frage, die sich mit dem Übergang bei konstanter Kraft stellt, betrifft den Exponenten des Mittelwertes der geöffneten Basenpaare $\langle n \rangle$, der bei Annäherung an die kritische Kraft den Übergang bestimmt [35]. Dabei wurde jedoch vereinfachend angenommen, dass der Mittelwert an der kritischen Stelle divergent ist. Dies kann aufgrund der endlichen Anzahl der Basenpaare jedoch nur eine Näherung sein. Wir werden im Rahmen unserer Theorie einen exakten Ausdruck für den Mittelwert erhalten und können damit den Exponenten korrekt bestimmen.

In diesem Kapitel werden wir zeigen, wie man mit Hilfe der Mastergleichung die stochastische Dynamik der Einzelbindungen beschreiben kann. Die mikroskopischen Beiträge zur Freien Energiedifferenz zwischen gebundenen und freien Basenpaaren, dazu zählen Bindungsenergien, Biegeenergien, Torsionsenergien und entropische Beiträge werden in dem Modell nicht explizit unterschieden. Lediglich die gesamte Freie Energiedifferenz spielt für die Übergangsraten eine Rolle.

In dem von uns betrachteten Experiment werden am oberen Ende der DNA die beiden Einzelstränge auseinandergezogen, so dass sie sich entsprechend einem Reißverschluss voneinander trennen [23, 33, 82], siehe Abbildung 4.1. Ein ähnlicher Vorgang ist das Auseinanderziehen von RNA-Strängen, die sich zu Haarnadelschleifen¹ verbinden, die man auch reißverschlussähnlich aufziehen kann. Zum einen gibt es die Vorgehensweise die RNA an beiden Enden auseinanderzuziehen [39, 40], was den Nachteil hat, dass mehrere Schleifen zufällig aufgehen, zum anderen kann man sie durch eine Nanopore ziehen und sie dabei definiert der Reihe nach öffnen [38, 41].

4.2 Theorie zur Beschreibung des Reißverschluss-Experimentes

4.2.1 Ein einfaches DNA-Modell

Der Aufbau des von uns betrachteten Experimentes ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Danach bezeichnet z den End-zu-End-Abstand des ssDNA Abschnittes und x die Position

¹engl.: Hairpin-Loops

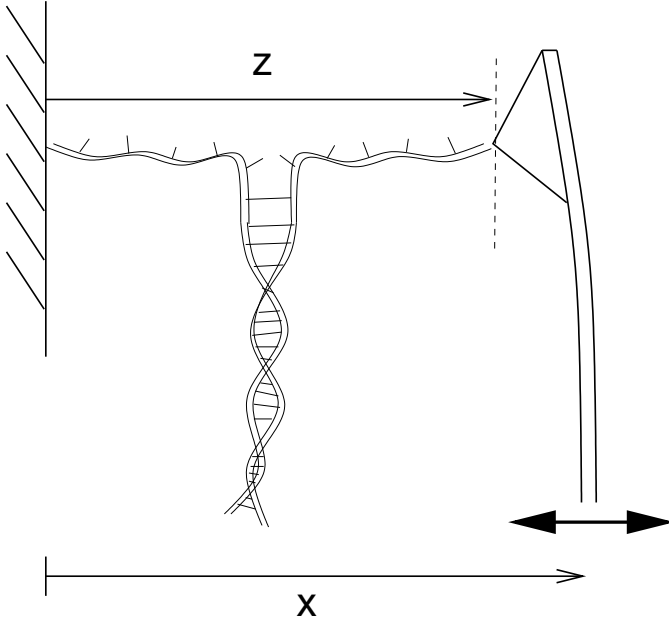


Abb. 4.1: Eine schematische Skizze des kraftspektroskopischen Experiments nach [33]. Die einzelnen ssDNA-Stränge sind von der gleichen Seite der dsDNA zwischen Substrat und Messfeder evtl. über Verbindungspolymere eingespannt. Die Koordinate x bezeichnet auch hier die Position der Messfeder.

der Messfeder. Experimentell ist nur die Koordinate x zu kontrollieren. Wie wir gezeigt haben, ist die Gleichsetzung dieser beiden Größen dann gerechtfertigt, wenn wir eine mit der ssDNA vergleichsweise steife Messfeder annehmen.

Die Funktion $P(N_b)$ bezeichnet die Wahrscheinlichkeit für N_b gebundene Basenpaare. Ihre zeitliche Entwicklung wird durch die Mastergleichung

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}P(N_b) = & -P(N_b)(k_{12}(N_b) + k_{21}(N_b)) \\ & + P(N_b - 1)k_{21}(N_b - 1) + P(N_b + 1)k_{12}(N_b + 1) \end{aligned} \quad (4.2)$$

beschrieben, deren Terme der rechten Seite sich aufgrund der linearen Anordnung der Bindungen in den fehlenden Vorfaktoren vom Fall der Multidomänen-Biopolymere (3.4) unterscheiden.

Die Übergangsraten berechnen sich nach der Kramers-Theorie gemäß

$$k_{21}(N_b) = k_{21}^0(N_b)e^{-\beta x_{21}F(x,L)} \quad (4.3a)$$

$$k_{12}(N_b) = k_{12}^0(N_b)e^{\beta x_{12}F(x,L)} \quad (4.3b)$$

mit der Anzahl gebundener Basenpaare N_b und der freien Konturlänge der ssDNA

$$L = L_0 + (N - N_b)\delta L \quad (4.4a)$$

$$\approx (N - N_b)\delta L \quad (4.4b)$$

mit der Längenänderung δL beim Aufbrechen eines einzelnen Basenpaares und der Gesamtzahl N vorhandener Basenpaare. Die Näherung (4.4b) gilt für $(N - N_b)\delta L \gg L_0$,

was bei genügend großer Anzahl geöffneter Basenpaare $N - N_b$ zwangsläufig gilt. Die spontanen Übergangsraten $k_{21}^0(N_b)$ und $k_{12}^0(N_b)$ hängen von N_b ab, d.h. dass für verschiedene Basenpaare unterschiedliche spontane Raten gelten. In [33] werden die Freien Energiedifferenzen angegeben, die mit dem Aufbrechen und Trennen einzelner Basenpaare verbunden sind. Man kann sie entsprechend Gleichung (2.9) als Verhältnis der spontanen Übergangsraten

$$\frac{k_{21}^0(AT)}{k_{12}^0(AT)} = 18.1 \quad \text{und} \quad \frac{k_{21}^0(GC)}{k_{12}^0(GC)} = 3.7 \quad (4.5)$$

ausdrücken. Diese Werte haben wir in allen folgenden Simulationen dieses Kapitels verwendet. Die Übergangsraten selbst erhält man nicht aus Experimenten im Gleichgewicht, was bedeutet, dass eine interne Zeitskala damit nicht festgelegt werden kann.

Die Kraft $F(x, L)$, die entlang der ssDNA wirkt, wird idealisiert über die oberste geschlossene Bindung vom linken Einzelstrang zum rechten übertragen (Abb. 4.1). Dabei wird die Tatsache vernachlässigt, dass die ssDNA über die Krümmung die Kraft abgestuft auf mehrere Bindungen überträgt. Aufgrund der linearen Anordnung und der Persistenzlänge von nur $L_p = 0.75$ nm (dies entspricht etwa 2 Bindungabstände in der dsDNA) idealisieren wir das Modellsystem so, dass immer nur ein Basenpaar betroffen ist, das sich öffnen und aufgrund von Fluktuationen in der ssDNA auch wieder schließen kann. Die Persistenzlänge der ssDNA wird unterschiedlich angegeben, z.B. in [33] eine Kuhnlänge von $b = 1.5 - 2.7$ nm, die der halben Persistenzlänge entspricht. Hier bleibt also eine gewisse Unsicherheit in der Parameterbestimmung.

Die ssDNA ist beim Abreißprozess schon erheblich gestreckt. Die Kraft entsprechend des WLC-Modells kann für den Grenzfall $x \simeq L$ durch den Ausdruck

$$F \approx \frac{1}{\beta L_p} \left(\frac{L^2}{4(x - L)^2} \right) \quad (4.6)$$

angenähert werden. Dies ergibt bei einer mittleren Kraft von 12.5 pN nach [33] ein konstantes Verhältnis von $x/L \simeq 0.7$, zudem ist die zugehörige Differenz des End-zu-End-Abstandes pro Basenpaar mit $\delta x \simeq 0.95$ nm angegeben. Nehmen wir nun die für Ursprungsgeraden geltende Beziehung $x/L = \delta x/\delta L$ an, die wir später zeigen werden, so erhalten wir für die Längenänderung $\delta L \simeq 1.35$ nm.

4.2.2 Das experimentelle Protokoll

Das experimentelle Protokoll ist, wie wir schon am Unterschied zwischen linearem und periodischem Protokoll gesehen haben, entscheidend für die Messwerte, die man erhält.

Wir haben bisher als experimentelles Protokoll die externe zeitabhängige Kontrolle der Position der Messfeder $x = x(t)$ bezeichnet. Es gibt noch eine andere Möglichkeit, den experimentellen Ablauf zu definieren. Anstelle der Position kann auch die Kraft, die auf die Messfeder wirkt, geregelt werden. Die Realisierung für eine zeitlich konstante Kraft

erfolgt zum Beispiel mit Hilfe eines magnetischen Tweezers in einem Gradientenfeld [23]. Damit wirkt unabhängig von der Position des Kügelchens eine konstante Kraft.

Dieses alternative Protokoll, das wir mit „konstante Kraft“ bezeichnen, wurde auch bei Experimenten an DNA verwendet [23]. Dabei zeigten sich große Unterschiede zu den Ergebnissen des anderen Protokolls, das wir mit „konstante Koordinate“ bezeichnen. Wir werden im Folgenden die Auswirkungen beider Protokolle nacheinander untersuchen.

4.3 Die konstante Koordinate

4.3.1 Die Gleichgewichtsverteilung für reine Basenpaarsequenzen

Die Messfeder wird in dem hier betrachteten Protokoll entsprechend einer linearen Rampe mit einer konstanten Geschwindigkeit v gezogen, die zunächst als so klein angenommen wird, dass das System nicht weit vom Gleichgewicht entfernt ist. Man kann also quasistatische Lösungen mit den Messergebnissen vergleichen, wie z.B. in [33]. Wir werden nun die Gleichgewichtsverteilung mit unseren Modellannahmen berechnen und einige Eigenschaften aufzeigen. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung $P(N_b)$ für die Anzahl gebundener Basenpaare N_b im Gleichgewicht kann mit Hilfe der detaillierten Bilanz

$$P(N_b)k_{12}(N_b) = P(N_b - 1)k_{21}(N_b - 1) \quad (4.7)$$

berechnet werden. Die erste relevante Gleichung ist

$$P(N - 1) = P(N) \frac{k_{12}(N)}{k_{21}(N - 1)}, \quad (4.8)$$

aus der man rekursiv die nächste gewinnt

$$P(N - 2) = P(N) \frac{k_{12}(N - 1)}{k_{21}(N - 2)} \frac{k_{12}(N)}{k_{21}(N - 1)}. \quad (4.9)$$

Die allgemeine Lösung für eine beliebige Anzahl offener Basenpaare n lautet damit

$$P(N - n) = \mathcal{N} \prod_{j=0}^{n-1} \frac{k_{12}(N - j)}{k_{21}(N - j - 1)} \quad (4.10)$$

mit der Normierungskonstanten $\mathcal{N} = P(N)$. Zunächst werden wir den Fall betrachten, wenn alle Bindungen vom selben Typ sind, d.h. k_{12}^0 und k_{21}^0 hängen nicht von n ab. Wenn wir die Übergangsraten (4.3) einsetzen, erhalten wir die Verteilung

$$P(N - n) = \mathcal{N} \left(\frac{k_{12}^0}{k_{21}^0} \right)^n \exp \left[\sum_{j=0}^{n-1} \beta x_{12} F(N - j) + \beta x_{21} F(N - j - 1) \right]. \quad (4.11)$$

In Abbildung 4.2 ist eine dieser Verteilungen dargestellt.

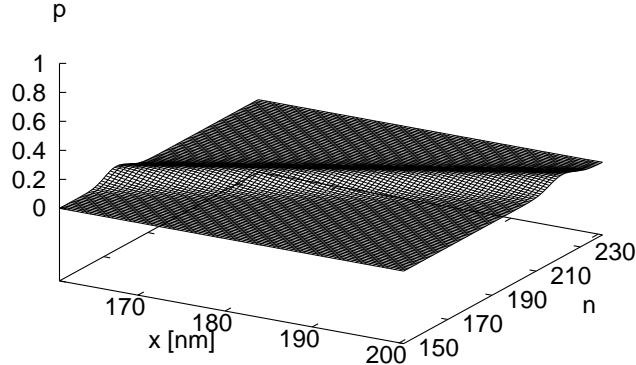


Abb. 4.2: Die Wahrscheinlichkeitsdichte $p(n, x)$ nach Gleichung (4.11) einer reinen Sequenz an Basenpaaren, mit den mittleren Übergangsraten. Eingefrorene fluktuierende Anteile aufgrund der Anordnung der Basenpaare treten nicht auf (vgl. Abb. 4.4) und der Mittelwert steigt linear an.

4.3.2 Der Mittelwert für reine Basenpaarsequenzen

Der Mittelwert der Verteilung (4.10) kann nicht analytisch berechnet werden. Jedoch für den wahrscheinlichsten Wert, dem Maximum der Verteilung, erhält man eine Näherungslösung, indem man die Ableitung der Verteilung nach n gleich Null setzt. Desweiteren wird die Summe im Exponenten in ein Integral umgewandelt, woraus sofort

$$\beta x_{12} F(N - n - 1) + \beta x_{21} F(N - n - 2) = -\ln \left(\frac{k_{12}^0}{k_{21}^0} \right) \quad (4.12)$$

folgt. Diese Gleichung entspricht zusammen mit den Raten (4.3)

$$k_{12}(N - n - 1) = k_{21}(N - n - 2), \quad (4.13)$$

was als Gleichgewichtsbedingung naheliegender erscheint. Nun kann mit dem Ansatz für die Kraft (4.6) aus Gleichung (4.12) durch einige einfache Umformungen eine lineare Beziehung zwischen der mittleren Anzahl geöffneter Basenpaare $\langle n \rangle$ und der Koordinate x hergeleitet werden, sie lautet

$$\langle n \rangle = mx - L_0 / \delta L \quad (4.14)$$

mit der Steigung

$$m = \left[\delta L \left(1 - \left(2 \sqrt{\ln \gamma_0^{-1} L_p / \Delta x} \right)^{-1} \right) \right]^{-1} \quad (4.15)$$

mit $\gamma_0 \equiv k_{12}^0/k_{21}^0$ und $\Delta x \equiv x_{12} + x_{21}$. Die Gerade ist geringfügig nach unten aus dem Ursprung verschoben. Die maximale Steigung ist im Grenzfall $\ln \gamma_0^{-1} \rightarrow \infty$ gegeben als $m = 1/\delta L$. In Abbildung 4.3 sind sowohl die Geraden $\langle n \rangle(x)$ für die beiden reinen Sequenzen als auch die Kurve für eine reale Sequenz dargestellt. Wie wir explizit zeigen werden, ist der Mittelwert der gemischten Basenpaarsequenz $\langle n \rangle$ durch die beiden Geraden begrenzt, die je nach Basenpaare eine größere und eine kleinere Steigung aufweisen.

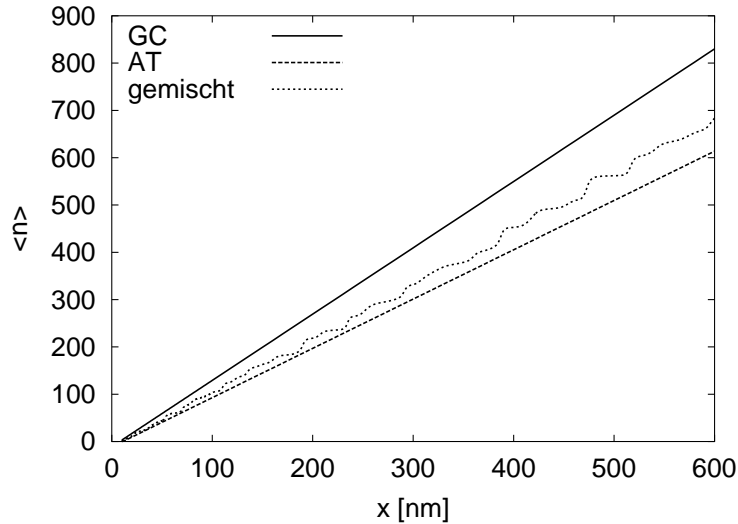


Abb. 4.3: Die mittlere Anzahl geöffneter Basenpaare als Funktion der Auslenkung x für drei unterschiedliche Fälle, numerisch aus der Verteilung (4.11) berechnet: 1. eine reine GC-Sequenz, 2. eine reine AT-Sequenz, 3. ein Ausschnitt der λ -phage Gensequenz [105]. Die dritte Kurve fluktuiert um eine mittlere Gerade, bleibt aber immer zwischen den Grenzgeraden. Für Gleichgewichtskurven wie diese, benötigt man nur die Verhältnisse aus den spontanen Übergangsraten.

Die Skalierbarkeit des Mittelwertes lässt sich auf die Skalierbarkeit der Kraft (4.6) zurückführen, denn es gilt

$$F(\mathcal{C}x, \mathcal{C}n) \approx F(x, n) \quad \text{mit } \mathcal{C} \in \mathbb{R}, \quad (4.16)$$

allerdings nur für $n\delta L \gg L_0$.

4.3.3 Die Gleichgewichtsverteilung für gemischte Basenpaarsequenzen

Nun werden wir verschiedene Bindungstypen unterscheiden. Die Verteilung (4.11) muss modifiziert werden, da der Vorfaktor $(k_{12}^0/k_{21}^0)^n$ eine Funktion der von den Basenpaarbindungen abhängigen Übergangsraten ist. Wir werden in unseren Beispielen die bekannte Gensequenz von λ -phage aus dem Internet [105] verwenden.

Bis zur Bindung n ergibt sich also ein Anteil an AT-Paaren: $n/2 + \Delta n(n)$ und einer an GC-Paaren: $n/2 - \Delta n(n)$. Jede dieser Bindungen wird durch einen zugehörigen Faktor $k_{12}^0(AT)/k_{21}^0(AT)$ oder $k_{12}^0(GC)/k_{21}^0(GC)$ charakterisiert. Daraus folgt für die Verteilung

$$P(N - n) = \mathcal{N} \left(\frac{k_{12}^0(AT)k_{21}^0(GC)}{k_{21}^0(AT)k_{12}^0(GC)} \right)^{\Delta n(n)} \left(\frac{k_{12}^0(AT)k_{12}^0(GC)}{k_{21}^0(AT)k_{21}^0(GC)} \right)^{n/2} \cdot \exp \left[\sum_{j=0}^{n-1} \beta x_{12} F(N - j) + \beta x_{21} F(N - j - 1) \right]. \quad (4.17)$$

Die Differenz $\Delta n(n)$ ist eine Funktion von n und beinhaltet den eingefrorenen fluktuierenden Anteil der Basenpaarsequenz, d.h. die Abweichung vom „Mittelwert“ $\Delta n = 0$. Die Schranken, die durch die Bedingung

$$-\frac{n}{2} \leq \Delta n(n) \leq \frac{n}{2}, \quad (4.18)$$

gegeben sind, resultieren daraus, dass die Anzahl der Basenpaare nicht kleiner als Null werden kann. Eine Gleichverteilung beider Basenpaare entspricht einem linearen „Random walk“ der Differenzgröße $\Delta n(n)$, wobei beide Richtungen mit gleicher Wahrscheinlichkeit gewählt werden können. Dieser Prozess hat den Mittelwert Null und die Varianz proportional zu n .

Wenn $\Delta n(n) = 0$ in Gleichung (4.17) eingesetzt wird, so erhält man die „mittlere“ Verteilung, die dieselbe Form hat wie zuvor Gleichung (4.11), allerdings mit neuen Übergangsraten

$$k_{12}^0 = \sqrt{k_{12}^0(AT)k_{12}^0(GC)} \quad (4.19a)$$

$$k_{21}^0 = \sqrt{k_{21}^0(AT)k_{21}^0(GC)}. \quad (4.19b)$$

Das Verhältnis der mittleren Raten mit den Werten aus (4.5) beträgt

$$\frac{k_{21}^0}{k_{12}^0} = 9.25. \quad (4.20)$$

Die Übergangsraten werden also geometrisch, die Energiedifferenzen algebraisch gemittelt. Die Verteilung zu den mittleren Raten nennen wir $P_0(n, x)$. Sie hat keine zufälligen Anteile und verhält sich demgemäß wie die ursprüngliche Verteilung (4.11). Sie besitzt also auch den Mittelwert, der mit (4.14) angegeben werden kann. Die gesamte Verteilung

$$P(n, x) = \left(\frac{k_{12}^0(AT)k_{21}^0(GC)}{k_{21}^0(AT)k_{12}^0(GC)} \right)^{\Delta n(n)} P_0(n, x) \quad (4.21)$$

ist also ein Produkt der beiden Anteile.

Wichtig für die weitere Argumentation ist, dass der stochastische Vorfaktor keine x -Abhängigkeit aufweist. Wenn man also den Anteil $P_0(n, x)$ aufträgt, erhält man eine fortlaufende Folge von näherungsweise gaußschen Verteilungen, die sich mit steigendem x lediglich in Richtung größerem n verschieben, siehe dazu die Abbildung 4.2. Der Graph der gesamten Verteilung in Abbildung 4.4 ist somit wie folgt zu verstehen: Der stochastische Vorfaktor ist nicht x -abhängig und ergibt nur eine Veränderung in n -Richtung, die zu starken Lokalisierungen, d.h. Spitzen, führt. Diese Strukturen wachsen entsprechend der Verschiebung von P_0 in x -Richtung an und fallen dann wieder ab.

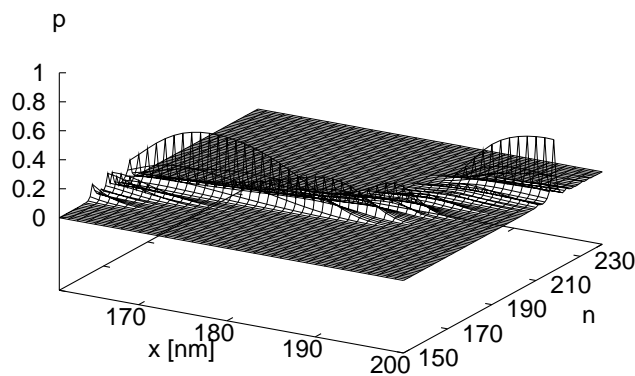


Abb. 4.4: Die Wahrscheinlichkeitsdichte $p(n, x)$ nach Gleichung (4.17) eines Ausschnittes der λ -phage-Gensequenz. Die stochastische Struktur in n -Richtung führt zu starker Lokalisierung der Dichte. In x -Richtung hat sich vom „Support“ der Gesamtfunktion nichts verändert, wie ein Vergleich mit Abbildung 4.2 bestätigt.

Dies alles hat auch Auswirkungen auf den tatsächlich gemessenen Mittelwert an geöffneten Basenpaaren $\langle n \rangle$. Betrachtet man nochmal die Abbildung 4.3, so erschließen sich daraus die Verhältnisse der Übergangsraten. Der Mittelwert fluktuiert entsprechend der Abfolge der Basenpaare scheinbar zufällig zwischen den Grenzgeraden, welche durch die Sequenzen gleicher Basenpaare gegeben sind. Die mittlere Steigung entspricht Gleichung (4.15) mit den mittleren Raten (4.19). Nimmt man mit dieser Erkenntnis die Gleichgewichtsbedingung (4.13) zu Hilfe, so erhält man aus dem Verhältnis der mittleren Raten

$$\frac{k_{12}^0}{k_{21}^0} = e^{-\beta \Delta x F_c}, \quad (4.22)$$

wobei die Kraft $F_c \simeq 12.5$ pN die mittlere, nahezu konstante Abreißkraft ist. Daraus erhält man die noch unbekannte Größe $\Delta x = 0.7$ nm. Mit diesem Wert wurden auch die Simulationen durchgeführt. Die einzelnen Längen x_{12} und x_{21} sind weiterhin unbekannt und nur aus weiterführenden Daten erhältlich. Für die Folgenden numerischen

Simulationen haben wir vereinfachend angenommen, dass $x_{12} = x_{21} = \Delta x/2$ gilt. Bei dieser Abschätzung wurde zudem die Annahme getroffen, dass die internen Längen für die Übergänge bei unterschiedlichen Basenpaaren gleich sind und sie sich lediglich in den spontanen Raten unterscheiden.

Wir haben also von der Mastergleichung (4.2) ausgehend gezeigt, wie die Ergebnisse der Messungen im Gleichgewicht ausgewertet werden können. Vor allem hat man damit die Möglichkeit, explizit die Wahrscheinlichkeitsverteilung, den Mittelwert und wenn nötig weitere Momente zu berechnen.

Bevor wir die Nichtgleichgewichtssituation betrachten, fügen wir ein Unterkapitel ein, das uns erlaubt, den Mittelwert der Verteilung (4.21) anschaulich zu interpretieren.

4.3.4 Das deterministische Modell für gemischte Basenpaarsequenzen

Um eine Vorstellung von der Art der Prozesse zu bekommen, die mit den Plateaus und Sprüngen im Mittelwert der offenen Bindungen für gemischte Basenpaarsequenzen (Abb. 4.3) zusammenhängen, untersuchen wir ein einfaches deterministisches Modell.

Bisher haben wir gezeigt, dass der Mittelwert $\langle n \rangle$ für gemischte Basenpaare durch die Geraden der reinen Systeme mit jeweils nur einer Sorte von Basenpaaren begrenzt ist. Für das deterministische Modell nehmen wir einfach an, dass die Bindungen bei einer bestimmten Kraft reißen, also bei F_{AT} soll die AT-Basenpaarbindung aufgehen und bei F_{GC} die Bindung GC. Die Kraft in Abhängigkeit vom End-zu-End-Abstand ist der Ausdruck aus dem WLC-Modell. Die Längenänderung δL bei dem Aufbrechen jeder Bindung ist konstant, so dass man eine Reihe von Konturlängen erhält L_1, L_2, \dots , mit $L_n = L_0 + n\delta L$, die äquidistant sind. Beim Aufbrechen einer Bindung sinkt die Kraft um δF . Die Kraftdifferenz kann bis zur linearen Ordnung in $(\delta L/L)$ durch die Abschätzung

$$F = \frac{1}{\beta L_p} \left(\frac{1}{4(1 - x/(L + \delta L))^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L + \delta L} \right) \quad (4.23a)$$

$$\equiv F_0 + \delta F + O((\delta L/L)^2) \quad (4.23b)$$

bestimmt werden. Damit ist also

$$\delta F \equiv -\frac{1}{\beta L_p} \left(\frac{x}{2L(1 - x/L)^3} + \frac{x}{L} \right) \frac{\delta L}{L}. \quad (4.24)$$

Die Differenzlänge wird bei einer bestimmten Kraft, z.B. F_{AT} , gewonnen, dabei wird nach Gleichung (4.24) eine negative Kraftdifferenz gemessen. Wenn dasselbe Basenpaar wieder folgt, so muss zum Aufbrechen erneut diese Kraft aufgebracht werden, indem die Position x um die Strecke δx vergrößert wird. Dies erhöht die Kraft um $\delta \tilde{F}$, für die gilt

$$F = \frac{1}{\beta L_p} \left(\frac{1}{4(1 - (x + \delta x)/L)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x + \delta x}{L} \right) \quad (4.25a)$$

$$\equiv F_0 + \delta\tilde{F} + O\left(\left(\frac{\delta x}{L}\right)^2\right). \quad (4.25b)$$

In linearer Ordnung von $(\delta x/L)$ ergibt sich also

$$\delta\tilde{F} \equiv \frac{1}{\beta L_p} \left(\frac{1}{2(1-x/L)^3} + 1 \right) \frac{\delta x}{L}. \quad (4.26)$$

Sobald die Kraftdifferenz ausgeglichen ist, also $\delta\tilde{F} = -\delta F$ gilt, kann die nächste Bindung aufgehen. Daraus folgt die Gleichung

$$\delta x = \delta L \frac{x}{L} \quad (4.27)$$

die wir schon zur Bestimmung von δL verwendet haben. Die Differenzlänge δL ist grundsätzlich konstant. Die Kraft hängt nur vom Quotienten x/L ab und da diese immer um F_{AT} herum lokalisiert ist, folgt, dass die Differenz δx auch nicht davon abhängt, wieviele Bindungen schon offen sind.

Der Fall für gemischte Basenpaare ist daraus einfach abzuleiten. Ein Sprung von δn aufgehenden Bindungen erfolgt, wenn nach einer starken AT-Bindung mehrere schwache GC-Bindungen folgen. Es gehen weitere GC-Bindungen auf, solange die Kraft über der Grenze liegt, also $F_{GC} < F < F_{AT}$, und solange schwache Bindungen vorhanden sind, siehe Abbildung 4.5. Die maximale Anzahl der Bindungen, die nacheinander aufgehen können, beträgt

$$n_{max} = \frac{F_{AT} - F_{GC}}{\delta F} = \beta(F_{AT} - F_{GC})L_p \left(\frac{x}{2L(1-x/L)^3} + \frac{x}{L} \right)^{-1} \frac{L}{\delta L}. \quad (4.28)$$

Aus Gleichung (4.28) folgt, dass die vertikale Differenz der Grenzgeraden in Abbildung 4.3 linear mit L und daher auch mit n wächst.

Neben dieser grundsätzlichen Begrenzung ist zudem die Abschätzung wichtig, wieviele GC-Bindungen in einem einfachen statistischen Modell hintereinander folgen können. Wenn die Wahrscheinlichkeit für eine GC-Bindung $p_{GC} = p_{AT} = 0.5$ ist, dann ist die für eine Sequenz von n gleichen Bindungen unter Berücksichtigung der Ränder

$$p(n) = p^{n+2}. \quad (4.29)$$

Die Häufigkeit $h(n)$ ergibt sich aus der kombinatorischen Regel: Wahrscheinlichkeit mal Anzahl der Möglichkeiten, d.h.

$$h(n) = p^{n+2}(N - n - 2) + 2p^{n+1} \quad (4.30a)$$

$$= p_{AT}^n (p^2(N - n - 2) + 2p). \quad (4.30b)$$

Der zweite Term in Gleichung (4.30a) hat seine Ursache in den Rändern, an denen nur eine Länge von $n+1$ Bindungen vorgegeben ist. Bei einer Gesamtlänge von $N = 1000$ ist

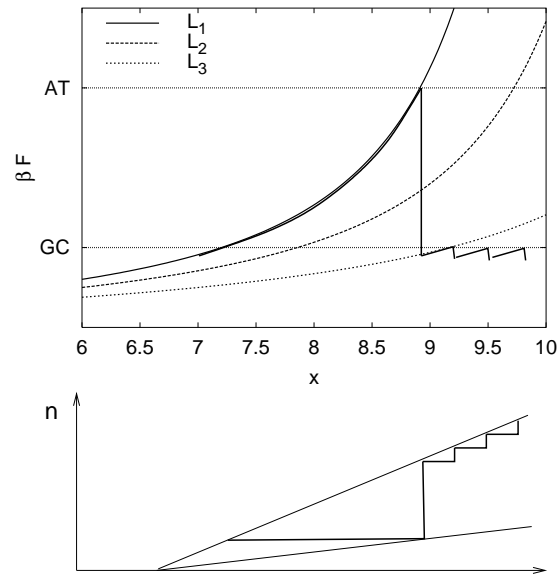


Abb. 4.5: Das schematisch dargestellte deterministische Modell bietet eine einfache Erklärung für die Sprünge und Plateaus in der Kurve der mittleren geöffneten Basenpaare $n(x)$. Oben sind drei Kraftkurven als Funktion von x für unterschiedliche (nicht aufeinander folgende) ssDna-Konturlängen dargestellt. Die gemessene Kraft steigt bis zum Schwellwert für die starke Basenpaarbindung AT an. Beim Aufgehen der Bindungen fällt die Kraft ab, solange schwache GC-Basenpaarbindungen folgen, bis die Kraft entweder unter den Schwellwert für GC-Bindungen fällt, wie hier dargestellt, oder bis ein AT-Basenpaar folgt. Unten ist, entsprechend der Kraftmessung oben, die Zahl der offenen Bindungen n aufgetragen.

das größte zusammenhängende Stück mit der statistischen Häufigkeit von 1 durch $n = 8$ gegeben. Das heißt, die Häufigkeiten der zusammenhängenden Stücke mit definiertem n verändert sich nicht mit wachsendem x .

Plateaus treten immer dann auf, wenn die Position x anwächst, während keine Bindung aufgeht, d.h. wenn eine starke AT-Basenpaarbindung einer oder mehrerer schwacher GC-Basenpaare folgt. Die Kraft steigt dabei bis zum höheren Schwellwert F_{AT} an. Die maximale Plateaubreite ist damit durch die Differenz gegeben, die von den beiden Grenzgeraden vorgegeben ist. Da die Sprünge δn aber statistisch nach der Verteilung (4.30) vorgegeben sind, folgt für die Plateaubreite dieselbe statistische Verteilung.

Das deterministische Modell liefert also eine Erklärung für die Plateaus und die Sprünge in der Kurve $\langle n \rangle(x)$. Wie sich gezeigt hat, wächst einerseits die Begrenzung durch die Geraden linear mit x und damit auch die Größe der Strukturen. Andererseits ist die Größe limitiert durch die Anzahl gleichartiger Bindungspaare, die hintereinander folgen. Diese ist in unserem Fall vorgegeben durch die Gleichverteilungsannahme. In natürlichen DNA-Sequenzen muss diese Annahme verbessert werden hinsichtlich der realen

Häufigkeiten.

4.3.5 Die Grenzen der Gleichgewichtsannahme

Die Frage, die im Folgenden untersucht wird, ist die nach der Grenze der Gleichgewichtsannahme. Zunächst werden wir uns mit einer Sequenz an gleichartigen Basenpaarbindungen beschäftigen.

Die relevante Relaxationszeit kann nur durch eine entsprechende Analyse der Mean-Field-Dynamik berechnet werden. Die wesentlichen Zwischenergebnisse werden hier angegeben, während die Rechnung entsprechend der in Kapitel 3.1.5 durchgeführt wird.

Aus der diskreten Mastergleichung (4.2) kann mit Hilfe der Kramers-Entwicklung eine entsprechende kontinuierliche Fokker-Planck-Gleichung hergeleitet werden. Diese lautet

$$\frac{d}{dt}P(N_u) = -\frac{\partial}{\partial N_u}P(N_u)(k_{12} - k_{21}) + \frac{1}{2}\frac{\partial^2}{\partial N_u^2}P(N_u)(k_{21} + k_{12}) , \quad (4.31)$$

wobei N_u die Anzahl der offenen Bindungen ist. Die Mean-Field-Gleichung für den Mittelwert $n = \langle N_u \rangle$ lautet

$$\frac{d}{dt}n = k_{12}(n) - k_{21}(n) , \quad (4.32)$$

was sich von dem Fall vieler Domänen in Reihe (Gl. 3.19) dadurch unterscheidet, dass die Vorfaktoren wegfallen. Das ist auch einsichtig, da nach diesem Modell jeweils nur eine einzige Bindung auf- und zugehen kann. Auch hier erhält man wieder die Gleichgewichtsbedingung $k_{12} = k_{21}$, die keinesfalls für beide Basenpaarbindungen erfüllt sein kann.

Für eine kleine zeitlich veränderliche Störung δn ergibt sich demnach eine Relaxationszeit in das Gleichgewicht von $\tau = (k'_{21} - k'_{12})^{-1}$. Die Ableitung nach n kann mit $L \simeq n\delta L$ als Ableitung nach L geschrieben werden, d.h.

$$\tau^{-1} = \beta\delta L \frac{\partial F}{\partial L}(-x_{21}k_{21} - x_{12}k_{12}) \quad (4.33a)$$

$$= -\beta\delta L \frac{\partial F}{\partial L}k_{12}\Delta x , \quad (4.33b)$$

wobei hier $k_{21} \simeq k_{12}$ nahe am Gleichgewicht angenommen wurde. Die Ableitung $\partial F/\partial L$ ist im Grenzfall einer fast gestreckten ssDNA

$$\frac{\partial F}{\partial L} \approx -\frac{x}{2\beta L_p L^2(1-x/L)^3} \sim 1/n . \quad (4.34)$$

Unter der Annahme, dass x/L nahezu konstant ist, ist die Ableitung (4.34) proportional zu $1/n$. Die Forderung einer Ziehgeschwindigkeit v , bei der das System innerhalb der

Fluktuationen noch im Gleichgewicht bleibt, führt entsprechend (3.35) auf die Bedingungsgleichung

$$v \lesssim \left(\frac{\partial n}{\partial x} \right)^{-1} \sqrt{\langle \delta n^2 \rangle} / \tau . \quad (4.35)$$

Solange diese Ungleichung erfüllt ist, kann vom Gleichgewicht ausgegangen werden. Der Term auf der rechten Seite ist eine Funktion von x , kann aber auch durch den eindeutigen Zusammenhang zwischen der Koordinate x und der mittleren Anzahl offener Bindungen $n = n(x)$ (Gl. (4.14)) von n abhängig gemacht werden.

Man kann die Bedingung (4.35) auch ohne Rechnung motivieren. Sie entspricht einer Abschätzung der äußeren Zeitskala, die durch das Inverse der experimentellen Veränderungsrate $v \partial n / \partial x$, normiert auf die thermische Fluktuation $\sqrt{\langle \delta n^2 \rangle}$, gegeben ist, gegen die interne Relaxationszeit τ . Die Ableitung $\partial n / \partial x$ ergibt einfach die Steigung der Geraden (4.14)

$$\left(\frac{\partial n}{\partial x} \right) = m . \quad (4.36)$$

Diese Steigung lässt sich auch aus den experimentellen Daten in [33] bestimmen zu $m \simeq 1 \text{ nm}^{-1}$. Die Breite der thermischen Fluktuation δn^2 um den Mittelwert n lässt sich mit Hilfe der Freien Energie abschätzen

$$\delta n^2 \simeq \left(\frac{\partial^2 \beta G}{\partial n^2} \right)^{-1} . \quad (4.37)$$

Die zweite Ableitung der Freien Energie ist näherungsweise gleich der ersten Ableitung der Freien Energiedifferenz

$$\Delta G = \Delta G_0 - x_{12} F(x, n) - x_{21} F(x, n + 1) \quad (4.38a)$$

$$\approx \Delta G_0 - \Delta x F(x, n) \quad (4.38b)$$

für $n \gg 1$. Daraus folgt für die Fluktuation

$$\frac{1}{\delta n^2} \simeq -\beta \delta L \Delta x \frac{\partial F(x, n)}{\partial L} \quad (4.39a)$$

$$\sim 1/n . \quad (4.39b)$$

Für die Grenzgeschwindigkeit v_0 , ab der die Gleichgewichtsbedingung für größere Ziehgeschwindigkeiten nicht mehr erfüllt ist, erhält man somit die Abschätzung

$$v_0 \simeq m^{-1} k_{12} \sqrt{|\partial F / \partial L| \beta \delta L \Delta x} \quad (4.40a)$$

$$\simeq 3.5 \text{ nm } k_{12} / \sqrt{n} . \quad (4.40b)$$

Dabei wurden dieselben Parameter wie zuvor verwendet, d.h. $x/L \simeq 0.7$, $L_p = 0.75$ nm, $\Delta x \simeq 0.7$ nm. Die $1/\sqrt{n}$ -Abhängigkeit in Gleichung (4.40) bedeutet, dass bei größerer Anzahl geöffneter Bindungen die Relaxationszeit schneller sinkt als die Fluktuationen zunehmen. Daraus folgt, dass die Grenze für zunehmendes n abnimmt. Für λ -phage mit $N \simeq 50000$ beträgt $1/\sqrt{N} \simeq 4.5 \cdot 10^{-3}$. Aus dem Vergleich mit den experimentellen Kurven in [33] lässt sich eine Grenzggeschwindigkeit von $v_0 \simeq 200$ nm/s feststellen. Das bedeutet für die Raten im Gleichgewicht die sinnvolle Abschätzung $k_{12} \simeq k_{21} \simeq 13 \cdot 10^3$ s⁻¹.

Die bisherige Betrachtung zur Grenze des Gleichgewichts gilt für eine Sorte von Basenpaarbindungen. Für verschiedene Typen von Basenpaaren ist es sinnvoll anzunehmen, dass solange man Gleichgewichtstrajektorien für die stärkeren Bindungspaare (AT) erzeugt, dies auch für Sequenzen mit gemischten Basenpaaren der Fall ist. Die Grenzggeschwindigkeit für das Gleichgewicht ist nämlich für stärkere Bindungen grundsätzlich kleiner als für schwächere.

In diesem Unterkapitel wurde die Grenze der Gleichgewichtsannahme untersucht. Zieht man mit einer Geschwindigkeit, die größer ist als die in Gleichung (4.40) angegebene, so muss die Mastergleichung (4.2) numerisch gelöst werden. Die Gleichgewichtslösung (4.21) ist in diesem Fall selbstverständlich nicht mehr gültig.

4.4 Die konstante Kraft

4.4.1 Die Gleichgewichtsverteilung für reine Basenparsequenzen

Beim Auseinanderziehen der DNA besteht sowohl im experimentellen Vorgehen als auch im statistischen Ergebnis ein großer Unterschied, ob man die Kraft oder die Auslenkung konstant hält. Obwohl die Beziehung zwischen der Auslenkung x und der Kraft $F = F(x, n)$ als Funktion $x = x(F, n)$ umkehrbar ist, gibt es keine Möglichkeit, $P(n; x)$ in $P(n; F)$ in einem Schritt umzuwandeln. Die Parameter x und F sind über eine Koordinatentransformation miteinander verknüpft, die jedoch von der stochastischen Variablen n abhängt. Wir betrachten zunächst den Fall einer reinen Sequenz an Basenpaaren. Die Übergangsraten sind bei konstanter Kraft

$$k_{12} = k_{12}^0 e^{\beta x_{12} F} \quad (4.41a)$$

$$k_{21} = k_{21}^0 e^{-\beta x_{21} F} \quad (4.41b)$$

Einer der bemerkenswertesten Unterschiede zu dem Fall konstanter Auslenkung ist, dass für gleiche Basenpaare die Raten unabhängig von n sind. Darum ist die Wahrscheinlichkeitsverteilung für $N - n$ gebundene Basenpaare in diesem Fall

$$P(N - n) = P(N) \prod_{j=0}^{n-1} \frac{k_{12}}{k_{21}} \quad (4.42a)$$

$$= \mathcal{N} \gamma^n \quad (4.42b)$$

mit $\gamma \equiv k_{12}/k_{21}$. Die Normierungskonstante beträgt

$$\mathcal{N} = (\gamma - 1)/(\gamma^N - 1) \quad (4.43a)$$

$$\simeq \ln \gamma / (\gamma^N - 1), \quad (4.43b)$$

wobei (4.43a) das exakte Ergebnis ist und in (4.43b) die Variable n kontinuierlich gewählt wurde. Dies ist nur dann möglich, wenn $\gamma \simeq 1$ ist, also in der Nähe des kritischen Übergangs. Da wir nachher den kritischen Exponenten ausrechnen wollen, geben wir durchgehend die Ergebnisse für beide Fälle an. Die Verteilung (4.42) mit den Übergangsraten $k_{21} = 1 \text{ s}^{-1}$ und $k_{12} = 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Für die Betrachtungen des Gleichgewichts betreffend, ist jedoch allein das Verhältnis aus den Übergangsraten und nicht der absolute Wert der Raten entscheidend.

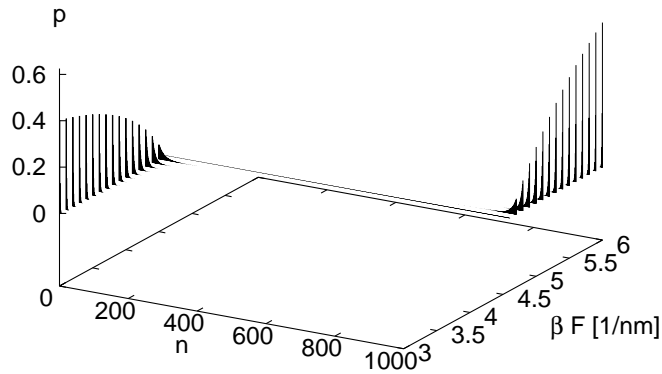


Abb. 4.6: Die Gleichgewichtsverteilung $P(n)$ für eine konstante Kraft nach Gl. (4.42) einer reinen AT-Sequenz mit der Basenpaaranzahl $N = 1000$.

4.4.2 Der Mittelwert für reine Basenpaarsequenzen

Der Mittelwert lässt sich mit Hilfe der Verteilungsfunktion (4.42) hier einfach explizit ausrechnen

$$\langle n \rangle = \frac{N\gamma^N(\gamma - 1) - (\gamma^N - 1)\gamma}{(\gamma^N - 1)(\gamma - 1)} \quad (4.44a)$$

$$\simeq \frac{1}{\ln \gamma} \left(\frac{\gamma^N(N \ln \gamma - 1) + 1}{\gamma^N - 1} \right). \quad (4.44b)$$

Auch hier wurde in (4.44a) wieder der exakte Wert angegeben und in (4.44b) der für die kontinuierliche Variable n . Der Mittelwert, wie auch in Abbildung 4.6 zu sehen, hat

einen scharfen Übergang von Null nach N . Für kleine Kräfte gilt $k_{21} \gg k_{12}$. Daraus folgt für die Näherungslösung des Mittelwertes

$$\langle n \rangle \approx \frac{\gamma}{1 - \gamma} \quad (4.45a)$$

$$\simeq \frac{1}{\ln \gamma^{-1}}. \quad (4.45b)$$

Für große Kräfte gilt umgekehrt $k_{12} \gg k_{21}$. Dann ist der Mittelwert etwa

$$\langle n \rangle \approx N - \frac{\gamma}{\gamma - 1} \quad (4.46a)$$

$$\simeq N - \frac{1}{\ln \gamma}. \quad (4.46b)$$

Ein Vergleich zwischen den Gleichungen (4.45) und (4.46) zeigt die Symmetrie, die zwischen dem vollständig geöffneten und dem geschlossenen Zustand besteht.

Wir interessieren uns im Folgenden für das Skalenverhalten des Übergangs, um unser Ergebnis mit den bisherigen zu vergleichen [35]. Zu diesem Zweck führen wir einen Öffnungsparameter $f = F_c - F$ ein, der genau dann Null ist, wenn der Mittelwert $\langle n \rangle = N/2$, d.h. wenn $k_{12} = k_{21}$, ist. Durch Umformung dieser Bedingung erhält man die kritische Kraft

$$F_c = \frac{1}{\beta \Delta x} \ln \gamma_0^{-1}. \quad (4.47)$$

In Abbildung 4.7 liegt sie für AT-Bindungen bei etwa 18 pN, was nach den Experimenten in [23] die richtige Größenordnung ist. Für den Öffnungsparameter folgt aus Gleichung (4.47)

$$f = \frac{1}{\beta \Delta x} \ln \gamma^{-1}. \quad (4.48)$$

Für $\beta \Delta x f \gg 1$, also für $F \ll F_c$, erhält man aus Gleichung (4.45b) das Skalenverhalten

$$\langle n \rangle \approx \frac{1}{\beta \Delta x} f^{-1}. \quad (4.49)$$

Das entspricht dem Ergebnis einer anderen Gleichgewichtsrechnung nach [44], bei der die Freie Energie linear mit der Anzahl der geöffneten Basenpaare ansteigt und zu einer kontinuierlichen Koordinate übergegangen wurde.

Für den viel interessanteren Fall $|\beta \Delta x f| \ll 1$ allerdings, also für $F \simeq F_c$, erhält man aus Gleichung (4.44b) das asymptotische Grenzverhalten bis zur linearen Ordnung in f

$$\langle n \rangle \approx \frac{N}{2} + \frac{N^2}{12} \beta \Delta x f + O(N^3 (\beta \Delta x f)^2). \quad (4.50)$$

Die Konstante $N/2$ erhält man aufgrund der Definition von f , welche den Wert $f = 0$ genau auf die Hälfte an geöffneten Basenpaaren festlegt. Die Symmetrie der Abweichung von $N/2$ zwischen $f > 0$ und $f < 0$ ist dabei auch gewährleistet. Das Ergebnis (4.50) konnte aus anderen Theorien bisher nicht abgeleitet werden. Eine wesentliche Voraussetzung für die Gültigkeit dieser Näherung ist die Konvergenz der Summe. Diese ist nur gewährleistet unter der Einschränkung des Intervalls für die Kraft gemäß

$$f \ll \frac{12}{N^2 \beta \Delta x} . \quad (4.51)$$

Bei realistisch großer Anzahl an Basenpaaren N ist das Gültigkeitsintervall dementsprechend klein. Die Gensequenz beispielsweise von λ -phage mit $N = 50000$ ergibt mit $\Delta x = 0.7$ nm eine Obergrenze für die Kraftdifferenz f von $0.28 \cdot 10^{-7}$ pN, also eine außerordentlich kleine. Interessant wird das Ergebnis (4.50) also erst bei sehr kleinen Basenpaarsequenzen mit $N \simeq 10$.

4.4.3 Die Gleichgewichtsverteilung für gemischte Basenpaarsequenzen

Für eine gemischte Sequenz zweier verschiedener Basenpaare muss wieder eine Unterscheidung zwischen den Übergangsraten $k_{ij}^0(AT)$ und $k_{ij}^0(GC)$ berücksichtigt werden. Die Verteilungsfunktion berechnet sich damit zu

$$P(N - n) = \mathcal{N} \left(\frac{k_{12}^0(AT)k_{21}^0(GC)}{k_{21}^0(AT)k_{12}^0(GC)} \right)^{\Delta n(n)} \left(\frac{k_{12}^0}{k_{21}^0} \right)^n e^{\beta n F \Delta x} \quad (4.52)$$

mit den mittleren Raten

$$k_{12}^0 = \sqrt{k_{12}^0(AT)k_{12}^0(GC)} \quad (4.53a)$$

$$k_{21}^0 = \sqrt{k_{21}^0(AT)k_{21}^0(GC)} , \quad (4.53b)$$

der Differenz aus der Anzahl an AT- und GC-Basenpaaren $\Delta n(n)$ und der Normierung \mathcal{N} . Der stochastische Teil ist also derselbe wie bei der Verteilung für konstante Auslenkung (4.21), während der deterministische Anteil davon verschieden ist. Der charakteristisch scharfe Übergang bleibt bestehen, wie in Abbildung 4.7 zu sehen ist. Aufgrund des deterministischen Faktors ist dieser wieder bei $k_{12} = k_{21}$. Durch den stochastischen Term treten dabei einige lokalisierte Zustände auf, die dieselbe Ursache haben wie bei der Verteilungsfunktion für konstante Auslenkung.

4.4.4 Die Nichtgleichgewichtsverteilung

Die bisherigen Wahrscheinlichkeitsverteilungen, wie z.B. Gleichung (4.52), basieren auf der Gleichgewichtsannahme. Wir haben gezeigt, dass im Fall der konstanten Koordinate

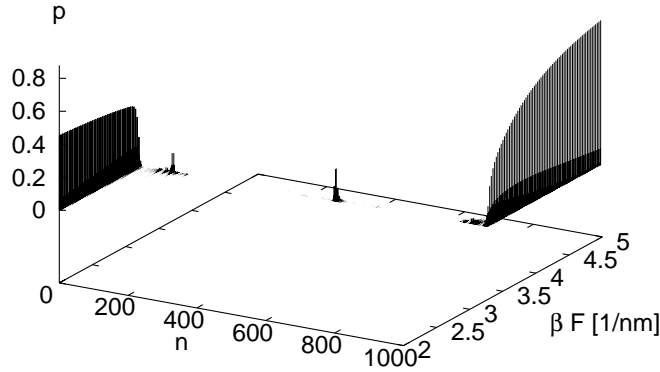


Abb. 4.7: Die Gleichgewichtsverteilung $P(n)$ für eine konstante Kraft nach Gl. (4.52) eines Ausschnittes von $N = 1000$ Basenpaaren aus der λ -phage Gensequenz. Die statistisch abwechselnden Basenpaare führen zu lokalisierten Zwischenzuständen.

die Ziehgeschwindigkeit einer Beschränkung unterliegt (4.35). Im Fall konstanter Kraft weist die Verteilungsfunktion einen scharfen Übergang auf. Für die Werte der Kraft, für die alle Basenpaare geschlossen oder geöffnet sind, ist die Gleichgewichtsverteilungsfunktion robust, d.h. die Änderungsrate der Kraft kann große Werte annehmen, ohne aus dem Gleichgewicht auszulenken. Sehr kritisch dagegen ist der Übergangsbereich, aufgrund der sprunghaften Veränderung der Anzahl geöffneter Bindungen. Das betrifft jede Veränderung der Kraft, die über den kritischen Wert hinausgeht. Die zugehörige Abreißdynamik spielt sich dann im Nichtgleichgewicht ab.

Diese Beschreibung trifft auf Experimente mit konstanter Kraft zu. Dort wird die Dynamik dominiert von metastabilen Zuständen [23]. Das heißt, um zu einem Verständnis dieser metastabilen Zustände zu gelangen, muss man die Nichtgleichgewichtsdynamik untersuchen. Wir unterscheiden dabei wieder zwischen einer reinen Sequenz an Basenpaaren und einer Sequenz an gemischten Basenpaaren.

Zunächst führen wir die notwendigen Größen für einen einfachen Einschnittmechanismus ein, der für beide Fälle Anwendung findet. Die Zeitdifferenz Δt sei als mittlere Sprungzeit durch

$$(k_{12} + k_{21})\Delta t = 1 \quad (4.54)$$

definiert. Die Häufigkeit der jeweiligen Übergänge innerhalb der Sprungzeit $p = k_{12}\Delta t$ und $q = k_{21}\Delta t$ kann aufgrund von Gleichung (4.54) auch als Übergangswahrscheinlichkeit gedeutet werden. Die gesamte Anzahl der Sprünge wird mit $M = M_{12} + M_{21}$ bezeichnet, wobei $M_{12} = Mp$ und $M_{21} = Mq$ die jeweiligen Anteile der beiden Übergänge sind.

Die gesamte Zeitdauer für M Sprünge ist damit $T \equiv M\Delta t$. Die mittlere Anzahl offener Basenpaarbindungen beträgt

$$\langle n \rangle = M_{12} - M_{21} = (k_{12} - k_{21})T . \quad (4.55)$$

Falls die Differenz der Übergangsraten nicht verschwindet, wächst die Anzahl der offenen Basenpaare linear in der Zeit T . Die mittlere Abreißzeit ist damit

$$\tau = \frac{N}{k_{12} - k_{21}} . \quad (4.56)$$

Für den Fall, dass $k_{12} \gg k_{21}$ gilt, ist der Abreißprozess driftdominiert. Wenn hingegen $k_{12} \simeq k_{21}$ gilt, würde sich nach den bisherigen Gleichungen der Mittelwert kaum verändern. Trotzdem kann die DNA auseinanderreißen, indem die Verteilung immer breiter wird. Die Abreißzeit ist also allein von der Varianz abhängig, welche für einen „Random walk“ um den Ursprung $\sqrt{\langle n^2 \rangle} = \sqrt{Mqp}$ beträgt. Aufgrund der „reflektierenden Wand“ bei $n = 0$ kommt noch ein Faktor von $\sqrt{2}$ hinzu. Damit lautet also

$$\sqrt{\langle n^2 \rangle} = \sqrt{2Mpq} = \sqrt{\frac{2k_{21}k_{12}T}{k_{21} + k_{12}}} , \quad (4.57)$$

was eine Wurzel-Abhängigkeit von T ergibt. Die mittlere Abreißzeit ist damit

$$\tau = \frac{N^2(k_{12} + k_{21})}{2k_{12}k_{21}} . \quad (4.58)$$

Durch den Zusammenhang mit N^2 ist diese meist sehr viel größer als die Zeit aus Gleichung (4.56). Beim Berechnen der Gleichgewichtsverteilungsfunktion wurde deutlich, dass die Verteilung nur an einer Stelle eine große Varianz aufweist, nämlich bei $F \simeq F_c$. Überall sonst ist die Varianz so klein, dass spontanes Abreißen nicht möglich ist. Das Gültigkeitsintervall dieser Aussage kann anhand der Entwicklung (4.50) abgeschätzt werden und ist, wie wir zeigen konnten, für große N sehr klein. Eine genaue Berechnung des zulässigen Intervalls wäre nur möglich, indem man die Varianz von n in Abhängigkeit von F und anschließend deren Breite bestimmen würde.

Für eine Sequenz gemischter Basenpaare nehmen wir nun an, dass für beide Sorten an Basenpaaren GC und AT die Kraft ausreichend sei, um im Nichtgleichgewicht zu sein, d.h. im driftdominierten Regime. Die Ergebnisse der numerischen Simulation werden in den Abbildungen 4.8 und 4.9 gezeigt. In 4.8 ist die Wahrscheinlichkeitsdichte einer generierten Sequenz dargestellt. Immer dort, wo die starken AT-Basenpaarbindungen und anschließend die schwachen GC-Basenpaarbindungen auftreten, ergeben sich metastabile Zustände. Die Barrierenhöhe ist durch die Anzahl der AT-Basenpaare gegeben, die hintereinander folgen, was deutlich wird beim Vergleich von 5 AT-Basenpaaren bei $n = 60$ mit 2 AT-Basenpaaren sonst. Dieser Zustand wird länger besetzt, d.h. die Übergangszeit ist nach Gleichung (4.56) etwa doppelt so groß. Die Barrierenabstände hingegen sind durch die Anzahl der GC-Basenpaare gegeben, die anschließend hintereinander folgen.

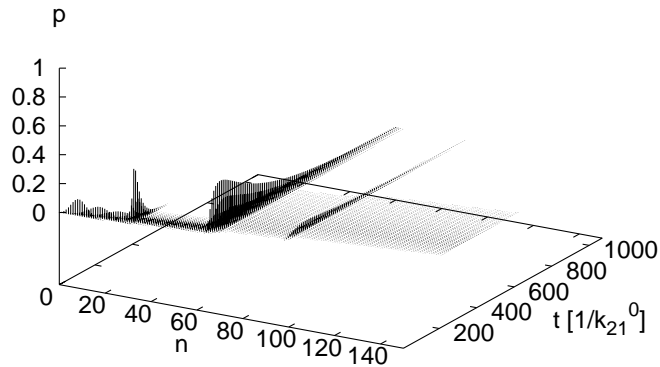


Abb. 4.8: Die aus Gleichung (3.59) numerisch ermittelte Wahrscheinlichkeitsdichte $P(n, t)$ (eingezeichnet für $p > 1 \cdot 10^{-3}$). Die konstante Kraft $F = 16.5$ pN wirkt auf eine GC-Sequenz mit AT-Barrieren bei $n = 30$ (2 AT), $n = 60$ (5 AT), $n = 90$ (2 AT). Hierbei wird das Zusammenspiel der verschiedenen starken Basenpaarbindungen verständlich. Bei den AT-Basenpaaren ist je nach Barrierenhöhe die Aufenthaltswahrscheinlichkeit länger als bei den GC-Basenpaaren. Ein systematischer Vergleich mit experimentelle Daten würde hierbei die fehlende Zeitskala festlegen.

In Abbildung 4.9 ist die Wahrscheinlichkeitsdichte unter konstanter Kraft für λ -phage dargestellt. Es zeigen sich zwar auch lokalisierte Zustände, die durch die Anordnungen der Basenpaare bestimmt sind, jedoch stimmen sowohl die Abstände als auch die Barrierenhöhen nicht mit den metastabilen Zuständen in [23] überein. Dort werden teilweise bis zu 1000 Basenpaare auf einmal übersprungen und die metastabilen Zustände haben eine Lebensdauer von Minuten oder sogar länger. Daraus folgt, dass für diese Art von Experimenten die Voraussetzungen der Theorie in einigen Aspekten unzureichend sind. Man kann mutmaßen, dass die DNA bei diesen Versuchen aus geometrischen Gründen eine sterische Behinderung erfährt oder dass die Trägheit der Messapparatur eine entscheidende Auswirkung auf die Messergebnisse haben. Desweiteren könnte sich die Annahme als falsch herausstellen, dass die Kraft auf der Zeitskala der Einzelereignisse konstant ist.

Wir haben uns in diesem Unterkapitel mit der Nichtgleichgewichtsverteilung beschäftigt, die nur numerisch zugänglich ist. Wir haben jedoch mit Hilfe eines „Random-Walks“ eine Formel zur Abschätzungen der mittleren Aufenthaltszeiten in metastabilen Zuständen hergeleitet.

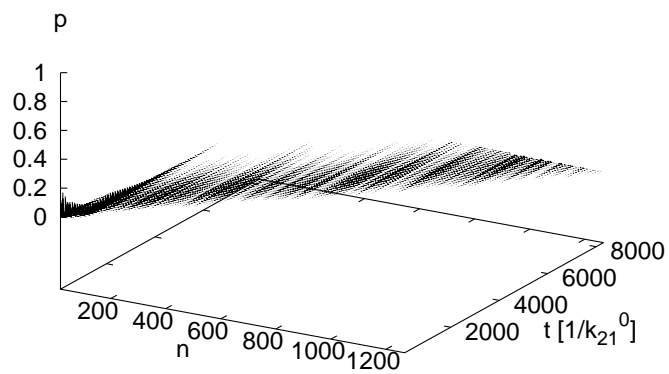


Abb. 4.9: Die aus Gleichung (3.59) numerisch ermittelte Wahrscheinlichkeitsdichte $P(n, t)$ eines Ausschnittes der Gensequenz von λ -phage bei konstanter Kraft $F = 18$ pN. Es treten zwar offensichtlich metastabile Zustände auf, aber die Verweildauern aufgrund der Barrierenhöhen reichen nicht aus, die Dynamik von [23] zu reproduzieren.

5 Rezeptor-Ligand-Systeme

5.1 Das theoretische Konzept der Kraftspektren

5.1.1 Begriffsbestimmungen und neuere Entwicklungen

Das folgende Kapitel hat die umfangreiche Klasse der Rezeptor-Ligand-Systeme zum Inhalt. Im Grundlagenteil 1.1 haben wir auf ihre weitreichende Bedeutung hingewiesen. In der nun folgenden theoretischen Modellbildung ist der wichtigste Unterschied im Vergleich zu derjenigen der Proteinfaltung, dass zwischen Rezeptor und Ligand keine Polymerverbindung besteht. Im ungebundenen Zustand ist der Abstand zwischen Rezeptor und Ligand beliebig groß und die Rückraten werden somit für die Reißdynamik vernachlässigt. Dementsprechend wird in Abbildung 5.1 der freie Zustand 2 nicht als Minimum dargestellt. Für die Abreißdynamik spielt es letztlich keine Rolle, wie das Potential außerhalb der Barriere genau verläuft.

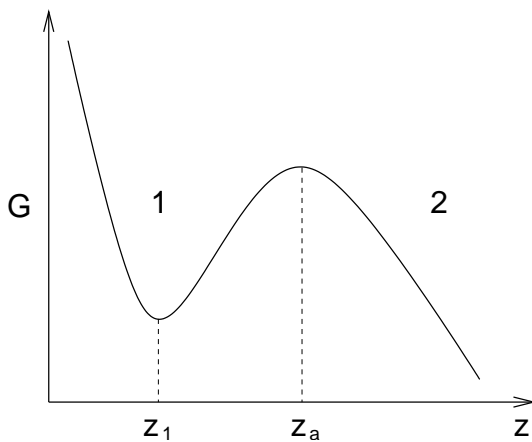


Abb. 5.1: Beispiel eines Freien Energieprofils für ein Rezeptor-Ligand-System mit einem Minimum bei z_1 und einer Barriere bei z_a . Der gebundene Zustand wird mit 1, der freie mit 2 benannt.

Bei vielen aktuellen Reißexperimenten werden die mittleren Kräfte beim Abreißen in Abhängigkeit der Ziehgeschwindigkeit gemessen, die sog. „Kraftspektren“, um über das freie Energieprofil der Bindung Teilinformationen zu erhalten [19, 24, 25, 72, 106]. Evans und Ritchie wiesen zuerst nach, dass die Reißkraft an Rezeptor-Ligand-Systemen von der Ziehgeschwindigkeit v abhängt [72], siehe dazu auch [73, 74, 76]. Die wesentlichen Voraussetzungen dieser Theorie sind die zeitliche Entwicklung der an der Messfeder mit der Federkonstanten k_0 gemessenen Kraft

$$F_c = -k_0 vt, \quad (5.1)$$

und die Übergangswahrscheinlichkeit nach der Zuverlässigkeitstheorie (Gl. (2.80))

$$\phi(t) = k_{off}(t) \exp \left[- \int_0^t k_{off}(t') dt' \right] \quad (5.2)$$

mit der Übergangsrate (2.18)

$$k_{off}(t) = k_{off}^0 e^{\beta |F_c| (z_a - z_1)} , \quad (5.3)$$

der Kramerschen spontanen Übergangsrate k_{off}^0 sowie dem Abstand vom Minimum zur Barriere des Potentials ($z_a - z_1$), siehe Abbildung 5.1. Durch Einsetzen von Gleichung (5.1) in (5.2) erhält man die Verteilung der Abreißkraft in Abhängigkeit der Ziehgeschwindigkeit und durch eine weiterführende Analyse dieser Funktion die wahrscheinlichste Abreißkraft

$$-F_c = F_0 \ln \frac{k_0 v}{F_0 k_{off}^0} \quad (5.4)$$

mit der typischen Kraft

$$F_0 \equiv k_B T / (z_a - z_1) . \quad (5.5)$$

Auf diese Weise gelingt es, für verschiedene Ziehgeschwindigkeiten v einige Eigenschaften des zugrundeliegenden Freien Energieprofils zu bestimmen: die Distanz zwischen dem Minimum und dem Maximum ($z_a - z_1$) und die spontane Übergangsrate k_{off}^0 .

Heymann und Grubmüller setzten in [107] auch voraus, dass die Verteilung der Reaktionskoordinate vor der Barriere im Gleichgewicht ist. Durch eine quasistatische Analyse des Wahrscheinlichkeitsstromes über die Barriere gelang es ihnen, Teile des gemittelten Kraftprofils $\partial_z G(z)$ aus den Daten der Kraftspektren zu berechnen.

Kaum Beachtung fand bisher die Tatsache, dass das Kraftspektrum nur ein kleiner Teil, nämlich der Mittelwert, aus einer viel umfassenderen Information ist: der Verteilungsfunktion der Kraft. Im Folgenden wird diese Verallgemeinerung theoretisch begründet und weiterführende Schlussfolgerungen daraus gezogen. Desweiteren werden wir die bekannten Ergebnisse als Spezialfälle nochmal erhalten und in diesem Zusammenhang auf die notwendigen Näherungen eingehen.

5.1.2 Das Modellsystem

Für die theoretische Modellbildung nehmen wir an, dass das Rezeptor-Ligand-System die Energie

$$H(z, x) = G(z) + V_0(z, x(t)) \equiv G(z) + \frac{k_0}{2} (x(t) - z)^2 \quad (5.6)$$

besitze. Dabei ist $G(z)$ das Freie Energieprofil der zugrundeliegenden Reaktionskoordinate, die wir mit z bezeichnen (Abb. 5.1). Sie ist über das harmonische Potential V_0 an eine

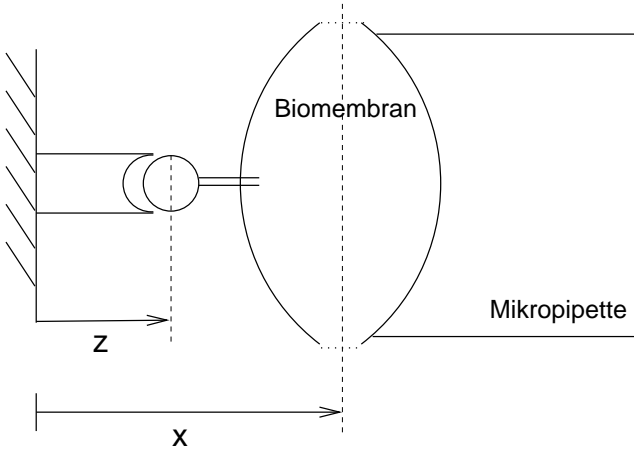


Abb. 5.2: Eine schematische Skizze des Aufbaus einer Biomembran-Kraftsonde, bei einem Experiment an einem Rezeptor-Ligand-System. Die Koordinate z bezeichnet hier die Reaktionskoordinate. Die Position x des geschlossenen Vesikels wird mit Hilfe der Mikropipette kontrolliert. Die Kraft wird dabei über die Verformung der Membran gemessen.

Messfeder mit der Federkonstanten k_0 an der Position $x(t)$ gekoppelt, siehe Abbildung 5.2. Auf die Bindungskordinate wirken zwei verschiedene Kräfte: die deterministische Kraft $F(z, x) = -\partial z/\partial H(z, x)$ und die Gaußsche stochastische Kraft $\mathcal{F}(t)$, die zeitlich delta-korreliert ist. Wir nehmen an, dass der Einfluss des Wärmebades damit vollständig beschrieben ist. Die Trajektorien ergeben sich dann aus der Langevin-Gleichung

$$\dot{z} = \frac{F(z, x)}{\xi} + \sqrt{2D}\mathcal{F}(t) , \quad (5.7)$$

wobei ξ der Reibungs- und D der Diffusionskoeffizient ist. Zur vollständigen Beschreibung des Experimentes müssen wir zudem die zeitliche Dynamik der Position der Messfeder angeben. Für die folgende Betrachtung verwenden wir ein lineares Protokoll gemäß

$$x(t) = vt + x_0 , \quad (5.8)$$

wobei x_0 eine konstante Vorauslenkung ist und v die Ziehgeschwindigkeit.

5.1.3 Die stochastische Kraft

Die zeitabhängige Wahrscheinlichkeitsdichte

Die Kraft wird durch die Auslenkung der Messfeder bzw. durch die Deformation des Biomembranvesikels bestimmt, die an den Liganden angebracht ist. Einen Linker werden wir bei dieser Betrachtung nicht mit einbeziehen.

Befindet sich die Reaktionskoordinate bei z , wird auf die Messfeder die Kraft gemäß

$$F_c(z, x) = -\frac{\partial H(z, x)}{\partial x} = k_0(z - x) \quad (5.9)$$

ausgeübt. Da die zeitliche, stochastische Dynamik von z und $\left(\frac{F_c}{k_0} + x\right)$ gemäß Gleichung (5.9) gleich ist, gilt für die zugehörigen Wahrscheinlichkeitsdichten

$$p(z, t) = p\left(\frac{F_c}{k_0} + x, t\right) . \quad (5.10)$$

Für die Wahrscheinlichkeitsdichte der Kraft $\bar{p}(F_c)$ gilt zudem die Gleichheit

$$\bar{p}(F_c, t)dF_c = p(z, t)dz , \quad (5.11)$$

d.h. die Koordinatentransformation ist zu jedem Zeitpunkt eindeutig umkehrbar, so dass die Wahrscheinlichkeit für eine Koordinate z gleichzeitig auch für die zugehörige Kraft gilt. Daraus folgt der Zusammenhang

$$\bar{p}(F_c, t)dF_c = \frac{1}{k_0}p\left(\frac{F_c}{k_0} + x, t\right) dF_c . \quad (5.12)$$

Der Ausdruck $\langle \dots \rangle$ bezeichnet im Folgenden die Mittelung über die fluktuierende Koordinate z oder äquivalent dazu über die Kraft. Der so gebildete Mittelwert der Kraft

$$\langle F_c(t) \rangle = \int \frac{dF_c}{k_0} F_c p\left(\frac{F_c}{k_0} + x(t), t\right) \quad (5.13a)$$

$$= \int dz k_0 (z - x(t)) p(z, t) \quad (5.13b)$$

$$= k_0 (\langle z(t) \rangle - vt - x_0) \quad (5.13c)$$

hängt somit von der Zeit t ab. Die Vorauslenkung x_0 legen wir praktischerweise so fest, dass mit

$$x_0 = \langle z(0) \rangle \quad (5.14)$$

auch $\langle F_c(0) \rangle = 0$ gilt.

Die Übergangswahrscheinlichkeit und die mittlere Reißkraft

Nun haben wir mit der Langevin-Gleichung (5.7) ein Hilfsmittel, um Trajektorien und damit im Prinzip die Verteilungsfunktion vor der Barriere zu berechnen. Für den Übergang über die Barriere greifen wir nun wieder darauf zurück, dass die Übergangswahrscheinlichkeit gleich dem Wahrscheinlichkeitsstrom über die Barriere ist.

Die Verteilung $\phi(t)$ gibt die Wahrscheinlichkeit an, im zeitlichen Intervall $[t, t + dt]$ die höchste Barriere zu überqueren. Die Mittelung über $\phi(t)$ kennzeichnen wir mit dem Überstrich. Den Mittelwert der Abreißzeit nennen wir im Folgenden τ . Die Wahrscheinlichkeitsverteilung wird wie zuvor (siehe Kap. 2.4.3) gemäß

$$\phi(t) = k_{off}(t)\Phi(t) \quad (5.15)$$

definiert, mit der Übergangsrate $k_{off}(t)$ und der Besetzungswahrscheinlichkeit

$$\Phi(t) \equiv \int_{-\infty}^{z_a} p(z, t) dz , \quad (5.16)$$

wobei z_a die Koordinate der Barriere ist, bzw. das lokale Maximum. Die Zeitabhängigkeit in den Gleichungen (5.13) kann nun mit Hilfe einer weiteren Mittelung über die Verteilung der Abreißzeit $\phi(t)$ eliminiert werden. Man erhält damit

$$\overline{\langle F_c \rangle} = \int_0^\infty dt \phi(t) \langle F_c(t) \rangle \quad (5.17a)$$

$$= \int_0^\infty dt \phi(t) k_0 (\langle z(t) \rangle - vt - x_0) \quad (5.17b)$$

$$= \int_0^\infty dt \phi(t) k_0 \langle z(t) \rangle - k_0 (v\tau + x_0) \quad (5.17c)$$

$$= k_0 (\overline{\langle z(t) \rangle} - k_0 (v\tau + x_0)) \quad (5.17d)$$

$$= k_0 \left(1 + \sum_{n=2}^{\infty} \frac{1}{n!} \overline{\delta t^n} \frac{\partial^n}{\partial \tau^n} \right) \langle z(\tau) \rangle - k_0 (v\tau + x_0) \quad (5.17e)$$

mit den n . zentralen Momenten der Abreißzeit $\overline{\delta t^n}$, die alle von v abhängen. Bis zur quadratischen Ordnung in der Momentenentwicklung gilt also

$$\overline{\langle F_c \rangle} = k_0 (\langle z(\tau) \rangle - (v\tau + x_0)) + \frac{k_0}{2} \overline{\delta t^2} \langle z \rangle'' . \quad (5.18)$$

Heymann und Grubmüller verwenden in [107] diese Gleichung nur bis zur linearen Ordnung. Eine Abschätzung der Varianz der Abreißzeit würde allerdings erst zeigen, ob diese Näherung gerechtfertigt ist. Aus den experimentellen Daten in [25] erhält man $\overline{\delta t^2} \simeq 1/16 \text{ s}^2$. Die weitaus schwierigere Abschätzung betrifft die zweifache zeitliche Ableitung $\langle z \rangle''$. Nimmt man ein quadratisches Potential-Minimum an, aus dem man mit einer harmonischen Kopplung ein überdämpftes Teilchen herauszieht, so ist die zweite Ableitung $\langle z \rangle''$ Null. Dieses nichttriviale Ergebnis folgt aus einer Rechnung im Unterkapitel 5.2.2. Über die Abweichung des Potentials vom quadratischen Minimum kann aufgrund der vorliegenden Daten für dieses Beispiel keine Aussage gemacht werden. Bei beliebig komplizierten Freien Energieprofilen kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass die Terme höherer Ordnung in Gleichung (5.17e) vernachlässigt werden dürfen.

Die Verteilung der Reißkraft

In den meisten Ziehexperimenten an Rezeptor-Ligand-Systemen wird gewöhnlich die Kraft beim Abreißen der Bindung gemessen. Die statistische Verteilung dieser Größe bezeichnen wir mit $\tilde{p}(F_c)$. Es bereitet allerdings Schwierigkeiten diese Kraft eindeutig zu identifizieren. Im Trajektorienbild lässt sich die Problematik folgendermaßen veranschaulichen: Ob eine Trajektorie die Barriere überquert, kann erst zum Zeitpunkt des Reißens eindeutig festgestellt werden. Die maximale Kraft ergibt sich dann im Nachhinein, indem diese Trajektorie zurückverfolgt wird bis zum minimalen Umkehrpunkt, der zeitlich

noch mit dem Reißen assoziiert wird. Im Bild der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten lässt sich dieses Problem umgehen. Wir haben gezeigt, dass wir die Wahrscheinlichkeitsverteilung $\bar{p}(F_c, t)$ der Kraft zu jeder Zeit definieren konnten. Das Kraftspektrum erhalten wir demgemäß durch Integration über t mit der Gewichtung $\phi(t)$ nach

$$\tilde{p}(F_c) \equiv \int_0^\infty dt \phi(t) \bar{p}(F_c, t) . \quad (5.19)$$

Eine ähnliche Definition verwendeten auch Heymann und Grubmüller [107]. Dort wurde allerdings für $\bar{p}(F_c, t)$ direkt die Boltzmannverteilung eingesetzt.

Ein Spezialfall der Verteilung der Reißkraft

Ein Spezialfall ergibt sich, wenn man den Mittelwert $(\langle z \rangle - x_0)$ als klein gegenüber νt annimmt. So vereinfacht sich Gleichung (5.13) zu

$$F_c(t) \approx -\nu t . \quad (5.20)$$

Hierbei benötigt man die gemäß

$$\nu \equiv k_0 v \quad (5.21)$$

definierte Laderate¹. Gleichung (5.20) bedeutet für die Verteilung der Kraft eine scharfe Delta-Distribution

$$p\left(\frac{F_c}{k_0} + x(\tau), \tau\right) = \delta(F_c - F_c(t)) . \quad (5.22)$$

Es wird also nicht mehr unterschieden, wo sich die Reaktionskoordinate im Potential befindet, d.h. der darauf beruhende fluktuierende Anteil der Kraft wird vernachlässigt. Für die gemessene Verteilung der Reißkraft $\tilde{p}(F_c)$ ergibt sich damit eine erhebliche Vereinfachung gemäß

$$\tilde{p}(F_c) = \int_0^\infty dt \phi(t) \delta(F_c - F_c(t)) \quad (5.23a)$$

$$= \phi(t(F_c)) \left| \frac{dt}{dF_c} \right| , \quad (5.23b)$$

wobei $t = t(F_c)$ das nach t aufgelöste experimentelle Protokoll (5.20) ist. Gleichung (5.23b) wurde in [76] als Definitionsgleichung der Verteilung der Abreißkraft angegeben. In unserer allgemeineren Darstellung folgt sie erst aus der Näherung (5.20).

Wir nehmen zudem an, dass für die Übergangsrate der einfache Ansatz

$$k_{off}(t) = k_{off}^0 e^{\mu t} \quad (5.24)$$

¹engl.: loading rate

gilt, wobei die Ziehrate gemäß ihrer Definition

$$\mu \equiv \nu/F_0 \quad (5.25)$$

das Verhältnis der Zuwachsrate der Federkraft zur typischen Kraft F_0 (Gl. (5.5)) angibt. Damit erhält man aus der Mastergleichung (2.77)

$$\phi(t) = k_{off}\Phi(t) = -\frac{d}{dt}\Phi(t) \quad (5.26)$$

die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Abreißzeit

$$\phi(t) = k_{off}(t) \exp \left[-\int_0^t k_{off}(t') dt' \right] \quad (5.27a)$$

$$= k_{off}^0 \exp \left[\mu t - \frac{1}{\mu} k_{off}^0 (e^{\mu t} - 1) \right]. \quad (5.27b)$$

Aus Gleichung (5.20) folgt die Variablentransformation $t = -F_c/\nu$ und damit aus Gleichung (5.23b) für die Verteilung der Kraft [73]

$$\tilde{p}(F_c) = \frac{1}{\nu} k_{off}^0 \exp \left[-\frac{F_c}{F_0} - \frac{1}{\mu} k_{off}^0 (e^{-\frac{F_c}{F_0}} - 1) \right]. \quad (5.28)$$

Die einzigen relevanten Größen des Potentials, die in diese einfache Theorie eingehen, sind der Abstand vom Minimum zur Barriere sowie die spontane Übergangsrate k_{off}^0 . Daher sind dies auch die einzigen Ergebnisse, die aus diesen Modellgleichungen mit Hilfe konkreter Messdaten berechnet werden können.

Die logarithmische Abhängigkeit des wahrscheinlichsten Wertes von v ergibt sich aus folgender Betrachtung. Leitet man die Verteilung (5.28) partiell nach F_c ab und setzt das Ergebnis gleich Null, so erhält man

$$\tilde{p}(F_c) \left(-\frac{1}{F_0} + \frac{1}{\nu} k_{off}^0 e^{-\frac{F_c}{F_0}} \right) = 0, \quad (5.29)$$

woraus die bekannte Gleichung (5.4)

$$-F_c = F_0 \ln \frac{\nu}{F_0 k_{off}^0}.$$

folgt [72]. Diese Rechnung ist allerdings nur gültig für $v \geq F_0 k_{off}/k_0$, da für kleinere Geschwindigkeiten die Verteilung kein Maximum besitzt.

5.2 Das Inversionsproblem

5.2.1 Inversion durch Iteration

Die Wahrscheinlichkeitsdichte der Kraft, die man beim Abreißen der Bindung messen kann, lautet gemäß (5.19)

$$\tilde{p}_v(F_c) \equiv \int_0^\infty dt \phi_v(t) \bar{p}(F_c, t) .$$

Alle darin vorkommenden Verteilungen hängen von der Ziehgeschwindigkeit v bzw. der Laderate ν ab. Die Inversion bezeichnet die Problemstellung, aus den gemessenen Verteilungen $p_v(F_c)$ und $\phi_v(t)$ die Verteilung $\bar{p}(F_c, t)$ und damit letztlich Informationen über das Freie Energieprofil zu gewinnen. Eine Vereinfachung der Gleichung (5.19) erhält man, indem man $\bar{p}(F_c, t)$ um die mittlere Abreißzeit τ entwickelt. Mit $t = \tau + \delta t$ folgt dann

$$\tilde{p}_v(F_c) = \left(1 + \sum_{n=2}^{\infty} \frac{1}{n!} \overline{\delta t^n} \frac{\partial^n}{\partial \tau^n} \right) \bar{p}(F_c, \tau) \quad (5.30a)$$

$$\approx \bar{p}(F_c, \tau) + \frac{1}{2} \overline{\delta t^2} \frac{\partial^2}{\partial \tau^2} \bar{p}(F_c, \tau) . \quad (5.30b)$$

Die Zeile (5.30b) erfolgt unter der Annahme, dass $\phi(t)$ mit einer Gaußverteilung hinreichend gut angenähert werden kann und alle höheren zentralen Momente $\overline{\delta t^n}$ klein sind. In niedrigster Ordnung lautet Gleichung (5.30b)

$$\bar{p}(F_c, \tau) \approx \tilde{p}_v(F_c) . \quad (5.31)$$

Sie erfordert bei der Auswertung die Abhängigkeit der Ziehgeschwindigkeit von der mittleren Abreißzeit $v = v(\tau)$, da die linke Seite von Gleichung (5.31) nur von τ abhängt und nicht mehr von v . Diese Funktion erhält man, indem zu jeder Geschwindigkeit die zugehörige gemittelte Abreißzeit berechnet wird. Die nächsten höheren Terme in Gleichung (5.30b) können dann iterativ berechnet werden, indem die Ableitungen nach τ explizit ausgewertet werden und die höheren zentralen Momente $\overline{\delta t^n}$ aus den Messdaten ermittelt werden.

Man hat durch Berechnung der Gesamtverteilung $\bar{p}(F_c, \tau)$ noch keine direkte Information über die Freie Energie gewonnen. Dazu müssen weitere Näherungen durchgeführt werden. Wir gehen bei der folgenden Betrachtung davon aus, dass die Wahrscheinlichkeitsdichte vor der Barriere der Boltzmann-Verteilung

$$\bar{p}(F_c, t) = \frac{1}{k_0 Z_{in}(t)} e^{-\beta H(z,t)|_{z=F_c/k_0+x(t)}} \quad (5.32)$$

entspricht, wobei

$$Z_{in} = \int_{-\infty}^{z_a} dz e^{-\beta H(z,t)} \quad (5.33)$$

die inneren Zustandssumme ist. Nach der Bestimmung von $\bar{p}(F_c, t)$, wäre die Berechnung von $H(z, t)$ und damit von $G(z)$ zumindest iterativ möglich. Man erhält das Potential (5.6) durch Verwendung der Gleichung

$$H(z, t) = -\beta \ln [k_0 Z_{in} \bar{p}(k_0(z - x(t), t))] , \quad (5.34)$$

wobei Z_{in} zunächst konstant gewählt wird. Durch fortlaufende Iteration von Gleichungen (5.33) und (5.34) kann das Potential schließlich berechnet werden.

Dieses Verfahren ist allerdings schwer zu verifizieren, da über die Konvergenz der beiden notwendigen Iterationsvorschriften zur Lösung der Gleichungen (5.30) und (5.32) bisher nichts bekannt ist. Die Näherung, die Verteilungsfunktion der Abreißzeit $\phi(t)$ mit einer Gaußsche Normalverteilung zu identifizieren, wird für kleine Ziehgeschwindigkeiten, für die diese Verteilung kein Maximum besitzt, sicher nicht gerechtfertigt sein. Ein letzter Kritikpunkt betrifft den Aufwand der Messungen. Zu jeder Ziehgeschwindigkeit v muss eine Verteilung $\tilde{p}_v(F_c)$ aufgenommen werden, was nur mit hinreichend vielen Messwerten möglich ist. Damit die Ableitung nach τ gemäß Gleichung (5.30) ausgewertet werden kann, müssen zudem die Ziehgeschwindigkeiten v sehr dicht gewählt werden. Der Aufwand dieser Methode wäre also sehr hoch im Vergleich zu derjenigen, die im nächsten Kapitel vorgestellt wird.

Dieselben Iterationsvorschriften erhält man, wenn man statt Gleichung (5.19) die Mittelwertgleichung (5.18)

$$\overline{\langle F_c \rangle} = k_0(\langle z(\tau) \rangle - k_0(v\tau + x_0)) + \frac{k_0}{2} \overline{\delta t^2} \langle z \rangle'' .$$

hinzuzieht, um $\langle z(\tau) \rangle$ auszurechnen. Aus dem Zusammenhang

$$\langle z(\tau) \rangle = \int_0^\infty dt' \int_{-\infty}^{z_a} dz z \phi(t') p_0(z, t') \quad (5.35)$$

ergibt sich durch die soeben beschriebene Iterationsvorschrift die Verteilung $p_0(z, t)$ und daraus wieder die Freie Energie.

Die hier vorgestellte Formulierung unter Berücksichtigung der Verteilungsfunktionen ist eine konsequente Weiterentwicklung der Methode von Heymann und Grubmüller [107]. Sie verwenden Gleichung (5.18) bis zur linearen Ordnung in δt . Durch Bestimmung von $\overline{x(v)}$ mit Hilfe des Wahrscheinlichkeitsstromes über die Barriere und der Beziehung $\overline{x(v)} = v\tau(v) + x_0$, erhält man aus Gleichung (5.18)

$$\langle z(v) \rangle = \overline{x(v)} - \frac{\overline{\langle F_c(v) \rangle}}{k_0} , \quad (5.36)$$

durch Invertieren $v = v(\langle z \rangle)$ und damit aus dem Kraftspektrum die Funktion $F(v(\langle z \rangle))$. Das auf diese Weise erhaltene Kraftprofil wird als Konvolution einer Gaußverteilung mit Varianz $\sigma^2 \equiv 1/\beta k_0$ und dem wahren Kraftprofil verstanden. Ein Kritikpunkt ist

allerdings, dass drei gemittelte Größen $\overline{\langle F_c \rangle}$, $\tau(v)$ und $\langle z(v) \rangle$ miteinander in Beziehung gesetzt werden. Dies gilt für beliebige Verteilungen bei linearen Zusammenhängen exakt und für nichtlineare Funktionen als Näherung nur für Gaußsche Verteilungen mit geringer Varianz.

5.2.2 Die Integration unter der Gleichgewichtsannahme

Eine weitaus einfachere Methode, das Freie Energieprofil zu berechnen, ist die Integration von Trajektorien $F_c(x)$ unter derselben Voraussetzung, dass vor der Barriere eine Boltzmann-Verteilung existiert. Die Messung der Trajektorien stellt eine höhere Anforderung an die experimentelle Technik. Allerdings ist das mit den heutigen ausgereiften Methoden eigentlich kein Hindernis mehr. Wir werden diesbezüglich einige Formeln herleiten und auf ihre Begrenzung hinweisen.

Die Zustandssumme vor der Barriere

$$Z_{in} = \int_{-\infty}^{z_b} e^{-\beta(G(z) + \frac{1}{2}k_0(z-vt-x_0)^2)} dz \quad (5.37)$$

hängt von v und t ab. Wenn wir jedoch auf die Position der Messfeder $x = vt + x_0$ zurückgreifen, so erhalten wir nach Differenzierung von (5.37) die einfache Gleichung

$$\frac{1}{Z_{in}(x)} \frac{\partial Z_{in}(x)}{\partial x} = -\beta \langle F_c(x) \rangle . \quad (5.38)$$

Diese Differentialgleichung ist analytisch integrierbar und man erhält

$$Z_{in}(x) = Z_0 e^{-\beta \int^x dx' \langle F_c(x') \rangle} \quad (5.39)$$

mit der unbekanntenen Konstanten Z_0 . Nicht nur die Zustandssumme Z_{in} kann auf diese Weise leicht berechnet werden, sondern auch das Freie Energieprofil als Funktion von z . Wenn wir $\langle F_c(x) \rangle$ ermittelt haben, können wir $\langle z(x) \rangle$ aus Gleichung (5.13c) gemäß

$$\langle z(x) \rangle = \frac{\langle F_c(x) \rangle}{k_0} + x$$

berechnen. Wenn wir ein Maximum der Verteilung innerhalb der Barriere annehmen, so können wir $\langle z(x) \rangle$ mit dem Minimum des gesamten Potentials (5.6) identifizieren. Also ist

$$\frac{\partial H(z, x)}{\partial z} \equiv \frac{\partial G(z)}{\partial z} + F_c = 0 , \quad (5.40)$$

jeweils an den Stellen $z = z_{min}$ und $x = x(z_{min})$ als Umkehrfunktion von $\langle z(x) \rangle = z_{min}$. Das ist nichts anderes als das Kräftegleichgewicht, das integriert

$$G(z) - G(0) = \int_0^z dz_{min} k_0 (x(z_{min}) - z_{min}) \quad (5.41)$$

ergibt. Die Konstante $G(0)$ ist im Grunde frei wählbar, da bei allen physikalischen Vorgängen nur die Freie Energiedifferenz eine Rolle spielt. Demgemäß wird diese Konstante bei den Auswertungen des Freien Energieprofils als zusätzlicher Fit-Parameter betrachtet.

Die Grenze des Auflösungsvermögens

Die kleinste Struktur, die aufgelöst werden kann, hängt von der Fluktuation der Koordinate z innerhalb der Barriere ab, also von $\langle \delta z^2 \rangle$. Messbar ist sie über die Fluktuation der Kraft bei konstantem x gemäß

$$\langle \delta F_c^2 \rangle = k_0^2 \langle \delta z^2 \rangle . \quad (5.42)$$

Berechnen wir die Fluktuation direkt aus der Wahrscheinlichkeitsdichte, so folgt

$$\langle \delta z^2 \rangle = \int_{-\infty}^{z_a} dz (z - \langle z \rangle)^2 \frac{e^{-\beta(G(z) + \frac{1}{2}k_0(z-vt-x_0)^2)}}{Z_{in}} \quad (5.43)$$

$$(5.44)$$

und mit Hilfe der Sattelpunktsnäherung ergibt die Varianz

$$\langle \delta z^2 \rangle = \frac{1}{\beta(G''(\langle z \rangle) + k_0)} . \quad (5.45)$$

Solange man ein Maximum der Verteilung annehmen kann, stellt Gleichung (5.45) den Bezug zwischen der Fluktuation und der Krümmung des Freien Energieprofils her. Strukturen, die kleiner sind als $\sqrt{\langle \delta z^2 \rangle}$, können nicht aufgelöst werden.

In den Abbildungen 5.3 und 5.4 sind die Ergebnisse einer exemplarischen Simulation dargestellt. Dazu wurden Trajektorien mit Hilfe einer diskretisierten Langevin-Gleichung (5.7) für ein Fallbeispiel simuliert und der Ensemblemittelwert berechnet, siehe Abb. 5.3. Das zugrundeliegende Freie Energieprofil wird in Abbildung 5.4 gezeigt. Zum Vergleich sind die verschiedenen, mit Gleichung (5.41) berechneten, Freien Energieprofile eingezeichnet. Dabei wird die Bedeutung der Federkonstanten in Gleichung (5.45) verständlich. Je größer k_0 , desto geringer sind die Fluktuationen und desto genauer kann das Freie Energieprofil rekonstruiert werden.

Die Grenze der Gleichgewichtsannahme

Die wesentlichen Ergebnisse der vorigen Unterkapitel hängen von der entscheidenden Annahme ab, dass die Verteilungsfunktion vor der Barriere zu jedem Zeitpunkt die Gleichgewichtsverteilung ist. Deshalb ist es wichtig, die Grenzen dieser Voraussetzung zu kennen.

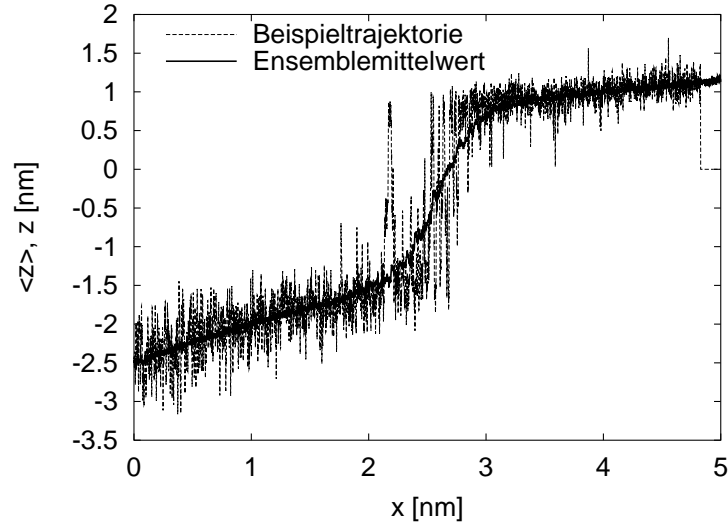


Abb. 5.3: Eine Beispieltrajektorie der Reaktionskoordinate z nach Gleichung (5.7) und der Ensemblemittelwert $\langle z \rangle$ als Funktion der Position der Messfeder x . Das zugrundeliegende Freie Energieprofil ist in Abb. 5.4 dargestellt.

Nehmen wir im einfachsten Fall an, dass innerhalb der Barriere das Potential eine harmonische Form

$$G(z) = \frac{k}{2}(z - z_1)^2 \quad (5.46)$$

mit einem Minimum bei z_1 besitzt. Wenn die Messfeder nach dem Protokoll $x(t) = vt$ bewegt wird, befindet sich das System sofort inhärent im Nichtgleichgewicht. Um die Verteilungsfunktion $p(z, t)$ zu erhalten, muss die Fokker-Planck-Gleichung gelöst werden. Wir interessieren uns jedoch nur für den Mittelwert $\langle z \rangle$, dessen zeitliche Entwicklung durch die Mittelwertgleichung

$$\langle \dot{z} \rangle = \int dz \frac{F(z)}{\xi} p(z, t) \quad (5.47)$$

$$= -\frac{1}{\xi} [k(\langle z \rangle - z_1) + k_0(\langle z \rangle - x)] \quad (5.48)$$

bestimmt ist. Die Gleichgewichtslösung für zeitunabhängiges x beträgt

$$\langle z \rangle_{eq} = \frac{kz_1 + k_0x}{k + k_0} . \quad (5.49)$$

Für zeitabhängiges x ist die Lösung von (5.47) damit

$$\langle z(t) \rangle = A_0 e^{-\frac{k+k_0}{\xi}t} + \langle z(t) \rangle_{eq} - \frac{k_0 v \xi}{(k + k_0)^2} , \quad (5.50)$$

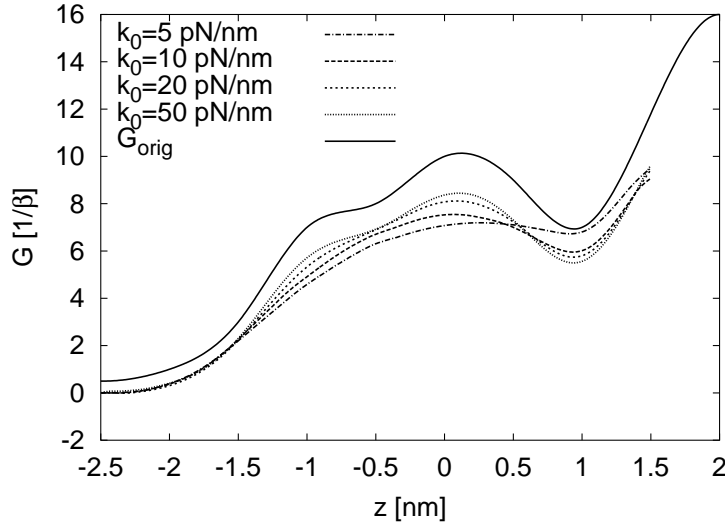


Abb. 5.4: Das Freie Energieprofil G_{orig} und mehrere Rekonstruktionen mit Hilfe der Formel (5.41) für verschiedene Federkonstanten. Die vertikale Verschiebung der Freien Energie ist aufgrund der unbestimmten Freien Energie des ungestörten Systems erlaubt. Die Ziehgeschwindigkeit ist konstant und so klein, dass vor der Barriere eine Gleichgewichtsverteilung angenommen werden darf.

wobei $\langle z(t) \rangle_{eq}$ die Gleichgewichtslösung zu jedem festen Zeitpunkt t ist. Die Konstante A_0 ist durch die Anfangsbedingung festgelegt. Dieser Term verschwindet exponentiell mit der charakteristischen Zeit $\xi/(k + k_0)$, während der letzte Term die konstante Differenz

$$\Delta z = \frac{k_0 v \xi}{(k + k_0)^2} \quad (5.51)$$

darstellt, die linear von v abhängt. Gleichung (5.51) legt zudem nahe, dass die Abweichung von der Ordnung $1/k_0$ und deshalb für größere Federkonstanten kleiner ist. Eine Bestätigung für Gleichung (5.51) findet man in der Diplomarbeit [108], in der dieses Problem exakt gelöst wird.

Mit der bisherigen Argumentation ist die Differenz der Mittelwerte als Abweichung vom Gleichgewicht zu interpretieren. Dass dies in der Tat richtig ist, folgt aus einer Rechnung in Kapitel 6.3.2, in welchem die dissipierte Arbeit in einen linearen Zusammenhang mit der systematischen Abweichung der Trajektorien gesetzt wird.

Für beliebige Potentiale gilt diese Rechnung nicht. Wir werden deshalb im weiteren Verlauf noch einen komplexeren Fall betrachten.

5.3 Kraftspektren komplexer Übergänge

Nachdem wir uns bisher mit den Möglichkeiten beschäftigt haben, Informationen über den gesamten Verlauf des Freien Energieprofils zu erhalten, wenden wir uns nun einem

weiteren Problem zu. Häufig kann nicht angenommen werden, dass die Verteilung vor der Barriere der Boltzmannverteilung entspricht. Das ist insbesondere dann der Fall, wenn sich mehrere Minima vor der Barriere befinden, deren Besetzung sich schon bei kleinen Ziehgeschwindigkeiten im Nichtgleichgewicht befinden können, was wir im Folgenden zeigen werden.

Viele Rezeptor-Ligand-Systeme gehen aufgrund einer ganzen Reihe von spezifischen Wechselwirkungen eine Bindung ein, die zusammen ein komplexes Freies Energieprofil bilden. Beispiele dafür sind Biotin-Avidin und Biotin-Streptavidin, da dort beim Abreißen metastabile Zwischenzustände zu beobachten sind [25]. Nun besteht grundsätzlich die Möglichkeit, bei komplexen Energielandschaften mehrdimensionale Zustandsräume anzunehmen, wie z.B. in [109–111]. Das erschwert allerdings die Analyse der Kraftspektren deutlich. Die Entscheidung, auf welches Modell man bei der Datenanalyse zurückgreift, hängt von dem zu untersuchenden System und der Zielsetzung ab. Wir werden uns weiterhin auf den eindimensionalen Fall konzentrieren. Auch hierzu wurden schon wichtige Erkenntnisse gewonnen. In [112] wurde gezeigt, dass komplexe Potentiale zur Mehrdeutigkeit in der Interpretation führen. Wir werden dieses Argument in unserer Darstellung nachvollziehen und einen Lösungsweg aufzeigen.

5.3.1 Die Grenze der Gleichgewichtsannahme zwischen zwei Minima

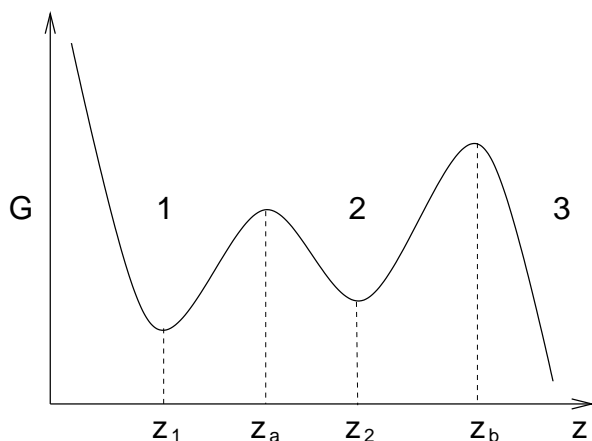


Abb. 5.5: Ein Beispiel eines komplexen Freien Energieprofils mit zwei Minima bei z_1 und z_2 , getrennt durch ein Maximum bei z_a , vor der Hauptbarriere bei z_b . Die Zustände sind durchnummeriert mit 1, 2 für die beiden gebundenen Zustände und 3 für den freien Zustand.

Wir betrachten nun ein komplexes Potential entsprechend der Abbildung 5.5, das im einfachsten Fall zwei Minima bei z_1 und z_2 besitzt, die durch eine Barriere bei z_a voneinander getrennt sind. Die Hauptbarriere, die die gebundenen Zustände 1 und 2 vom freien Zustand 3 trennt, befindet sich an der Stelle z_b . Die gesamte Energie wird durch eine Kopplung an ein harmonisches Potential einer Messfeder (Gl. (5.6)) zeitlich verändert.

Zunächst untersuchen wir, inwieweit die Besetzung zweier getrennter Zustände vor

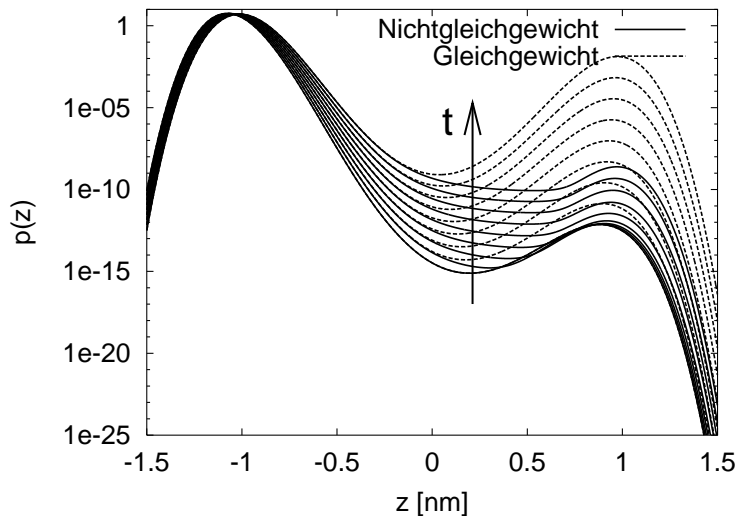


Abb. 5.6: Die Gleichgewichtsverteilung zusammen mit einer Nichtgleichgewichtsverteilung der Reaktionskoordinate z . Das zugrundeliegende Doppelmuldenpotential besitzt Minima bei -1 und 1 . Der genaue Verlauf ist hierfür nicht von Bedeutung. Gestartet wurde aus dem Gleichgewicht. Das Potential wurde mit Hilfe einer harmonischen Kopplung entsprechend (5.6) mit einer linearen Rampe zeitlich verändert und sowohl die Fokker-Plancksche Dynamik als auch die Gleichgewichtsverteilung zu den festgehaltenen Zeitpunkten numerisch berechnet. Hierbei wird die Grenze der Gleichgewichtsannahme deutlich. Die Gleichgewichtslösung wächst nach einiger Zeit schneller im rechten Zustand an, als die Nichtgleichgewichtsverteilung.

der Barriere im Gleichgewicht miteinander stehen können und wo die Grenzen dieser Annahme liegen.

Wir werden den Gleichgewichtsansatz weiterhin auf die Zustände selbst anwenden, indem wir annehmen, dass sich die Wahrscheinlichkeitsdichte innerhalb der Potentialminima im Gleichgewicht befindet. Die Gesamtverteilung ist nicht zwingend im Gleichgewicht. Um die Abweichung von der Gleichgewichtsverteilung zu berechnen, entwickeln wir die Dynamik der Besetzungswahrscheinlichkeit für sehr kleine Zeiten und vergleichen sie mit der Änderung der Gleichgewichtsverteilung. Die Abweichung zeigt sich in verschiedenen Besetzungswahrscheinlichkeiten der Zustände, siehe auch Abbildung 5.6, in der der grundsätzliche Unterschied anhand eines numerischen Lösungsbeispiels gezeigt wird. Wir berechnen nun zunächst die zeitliche Änderung der Besetzungswahrscheinlichkeit Φ_{eq} des Zustandes 1 im Gleichgewicht nach

$$\frac{\partial}{\partial t} \Phi_{eq} = \frac{\partial}{\partial t} \int_{-\infty}^{z_a} e^{-\beta(G(z)+V_0(x,z))} \frac{dz}{Z_{in}}. \quad (5.52)$$

Wir teilen die Zustandssumme vor der Barriere in zwei Summanden gemäß

$$Z_{in} = \underbrace{\int_{-\infty}^{z_a} e^{-\beta(G(z)+V_0(x,z))} dz}_{Z_1} + \underbrace{\int_{z_a}^{z_b} e^{-\beta(G(z)+V_0(x,z))} dz}_{Z_2} \quad (5.53)$$

$$\equiv Z_1 + Z_2$$

auf. Falls die Verteilung im ersten Minimum lokalisiert ist, gilt $Z_1 \gg Z_2$. Wir machen uns klar, dass die Besetzung des ersten Zustands als

$$\Phi_{eq} = Z_1/Z_{in} \approx \left(1 - \frac{Z_2}{Z_1}\right) \quad (5.54)$$

geschrieben werden kann. Gleichung (5.52) kann gelöst werden, indem von Z_{in} die Norm Z_1 für das Integral abgespalten wird,

$$\frac{\partial}{\partial t} \Phi_{eq} \approx -\beta v \left(1 - \frac{Z_2}{Z_1}\right) \int_{-\infty}^{z_a} F(z) e^{-\beta(G(z)+V_0(x,z))} \frac{dz}{Z_1} \quad (5.55a)$$

$$= -\Phi_{eq}(t) \beta v F_c(\langle z \rangle_1) \quad (5.55b)$$

mit der Abkürzung

$$\langle z \rangle_1 \equiv \int_{-\infty}^{z_a} z e^{-\beta(G(z)+V_0(x,z))} \frac{dz}{Z_1}, \quad (5.56)$$

dem Mittelwert der Boltzmann-Verteilung auf dem eingeschränkten Intervall $[-\infty, x_a]$. Im Grenzfall kleiner Zeiten gilt also

$$\Phi_{eq}(t) \approx \Phi(0) (1 - \beta k_0 v^2 t^2 / 2), \quad (5.57)$$

wobei wir für die Kraft wieder näherungsweise $F_c(\langle z \rangle) \simeq k_0 v t$ eingesetzt haben.

Die Nichtgleichgewichtsverteilung ist durch die Übergangsrate $k_{12} = k_{12}^0 e^{\mu t}$ mit der Ziehrate $\mu = k_0 v \beta (z_a - z_1)$ aus Kapitel 5.1.3 gegeben. Daraus folgt die dort berechnete Lösung (5.27) bis zur Ordnung t^2

$$\Phi(t) \approx \Phi(0) (1 - k_{12}^0 t - (k_{12}^0 \mu - (k_{12}^0)^2) t^2 / 2). \quad (5.58)$$

Im Grenzfall kleiner Zeiten fällt also die Besetzung des ersten Zustandes für das Nichtgleichgewicht zunächst linear in t ab, während für die Gleichgewichtsannahme der führende Term von der Ordnung t^2 ist. Das bedeutet, dass die Kramers-Abschätzung zunächst einen schnelleren Abfall der Besetzung zur Folge hat. Für größere Zeiten allerdings ist die Abnahme der Gleichgewichtsverteilung schneller, falls die Entwicklungskoeffizienten der quadratischen Ordnung von den Gleichung (5.57) und (5.58) die Beziehung

$$\beta k_0 v^2 > (k_{12}^0 \mu - (k_{12}^0)^2) \quad (5.59)$$

erfüllen. Falls $k_{12}^0 \ll \mu$ ist, kann die quadratische Ordnung $(k_{12}^0)^2$ vernachlässigt werden, und die Bedingung (5.59) vereinfacht sich zu

$$v > k_{12}^0(z_a - z_1) . \quad (5.60)$$

Für typische Zahlenwerte von $(z_a - z_1) \simeq 0.5 \text{ nm}$ und $k_{12}^0 \simeq 2 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ [25] ergibt sich eine kritische Ziehgeschwindigkeit von $v_c \simeq 1 \cdot 10^{-2} \text{ nm/s}$, die meist überschritten wird. Die Abweichung zwischen (5.57) und (5.58) wird auch in Abbildung 5.6 deutlich, in der die Besetzung des zweiten Zustandes für die Gleichgewichtsverteilung schneller ansteigt als für die Nicht-Gleichgewichtsverteilung, die länger in Zustand 1 lokalisiert bleibt.

5.3.2 Die Mastergleichung für zwei Minima im Nichtgleichgewicht

Für eine Beschreibung der zeitlichen Dynamik der Besetzungswahrscheinlichkeiten benötigen wir die Mastergleichung. Die Minima untereinander stehen zwar nicht mehr im Gleichgewicht, aber die Relaxationszeiten innerhalb der Zustände werden weiterhin als kurz gegenüber den äußeren Veränderungen angenommen, so dass die Kramers-Übergangsraten benutzt werden dürfen. Unter dem Einfluss einer äußeren Kraft werden diese nach Gleichung (2.18) berechnet. Mit der verallgemeinerten Ziehrate $\mu_{12} \equiv \beta k_0 v(z_a - z_1)$ erhält man

$$k_{12}(t) = k_{12}^0 e^{\mu_{12} t} . \quad (5.61)$$

Äquivalent gilt für die Rückrate mit $\mu_{21} \equiv \beta k_0 v(z_2 - z_a)$

$$k_{21}(t) = k_{21}^0 e^{-\mu_{21} t} \quad (5.62)$$

und für die Übergangsrates, die zum Reißen der Bindung führt,

$$k_{23}(t) = k_{23}^0 e^{\mu_{23} t} \quad (5.63)$$

mit $\mu_{23} \equiv \beta k_0 v(z_b - z_2)$. Die k_{ij}^0 bezeichnen wieder die spontanen Kramers-Raten. Wir erhalten damit ein System dreier gekoppelter Differentialgleichungen

$$\frac{d}{dt} \Phi_1 = -k_{12} \Phi_1 + k_{21} \Phi_2 \quad (5.64a)$$

$$\frac{d}{dt} \Phi_2 = k_{12} \Phi_1 - k_{21} \Phi_2 - k_{23} \Phi_2 \quad (5.64b)$$

$$\frac{d}{dt} \Phi_3 = k_{23} \Phi_2 . \quad (5.64c)$$

Die letzte dieser drei Gleichungen (5.64c) beschreibt den Gesamtverlust der gebundenen Zustände $\Phi_1 + \Phi_2$, da Φ_3 die Besetzungswahrscheinlichkeit des freien Zustandes bezeichnet und eine mögliche Rückrate hierbei vernachlässigt wird. Das bedeutet, dass

das System schon vollständig durch die ersten beiden Gleichungen beschrieben wird. In Matrixschreibweise lautet es

$$\frac{d}{dt}\Phi = \mathbf{K}(t)\Phi \quad (5.65)$$

mit $\Phi = \begin{pmatrix} \Phi_1 \\ \Phi_2 \end{pmatrix}$ und $\mathbf{K} = \begin{pmatrix} -k_{12} & k_{21} \\ k_{12} & -(k_{21} + k_{23}) \end{pmatrix}$. Aus Gründen der Normierung erhält man

$$\Phi_3 = 1 - (\Phi_1 + \Phi_2) \quad (5.66)$$

und für die Abreißwahrscheinlichkeit

$$\phi(t) = -\frac{d}{dt}(\Phi_1 + \Phi_2) = k_{23}\Phi_2 . \quad (5.67)$$

Da die Matrix \mathbf{K} zeitabhängig und nicht diagonal ist, erhält man keine analytische zeitabhängige Lösung [97]. Indem man die zeitliche Ableitung der Mastergleichung (5.65) Null setzt

$$0 = \mathbf{K}(t)\Phi , \quad (5.68)$$

erhält man die Gleichgewichtslösung $\Phi = 0$, oder auch $\Phi_3 = 1$. Die einzige stabile Lösung ist somit der freie Zustand 3.

5.3.3 Die Interpretation der Kraftspektren

Da wir nun von dem Fall ausgehen, dass bei komplexeren Übergängen die metastabilen Zustände, d.h. die Zustände vor der Barriere, untereinander nicht mehr im Gleichgewicht stehen, können wir auch nicht die Methode der Integration der Trajektorien im Gleichgewicht anwenden. Wir müssen also auf die Kraftspektren zurückgreifen. Dabei nehmen wir die in Kapitel 5.1.3 erläuterten Näherungen als gerechtfertigt an.

Wir untersuchen nun die numerisch ermittelten Kraftspektren, d.h. die Mittelwerte der Reißkraft $\langle F_c \rangle$, in Abhängigkeit der Ziehgeschwindigkeiten. Zur numerischen Lösung von Gleichung (5.65) benutzen wir ein Eulersches Integrationsverfahren. Dabei setzen wir für das experimentelle Protokoll der Kraft wieder eine lineare Rampe mit $F_c = -\nu t$, mit der variablen Laderate ν (Gl. (5.21)) an. Für die spontanen Raten wählen wir $k_{12}^0 = 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $k_{21}^0 = 10 \text{ s}^{-1}$ und $k_{23}^0 = 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Die Abstände $\delta z_{1b} \equiv z_b - z_1 = 0.5 \text{ nm}$ und $\delta_{1a} \equiv z_a - z_1 = 0.1 \text{ nm}$ werden konstant gehalten, während die anderen beiden $\delta z_{a2} \equiv z_2 - z_a$ und $\delta z_{2b} \equiv z_b - z_2$ für die Simulationen jeweils unterschiedlich gewählt werden (zu den Bezeichnungen siehe Abb. 5.5). Zudem nehmen wir für die Federkonstante einen Wert von $k_0 = 1/(\beta \text{nm}^2)$ an.

Abbildung 5.7 zeigt den Mittelwert $\langle F_c(v) \rangle$ über mehrere Dekaden der Laderate. Zur Auswertung experimenteller Daten wurde meist Gleichung (5.4) verwendet (vgl. [25]).

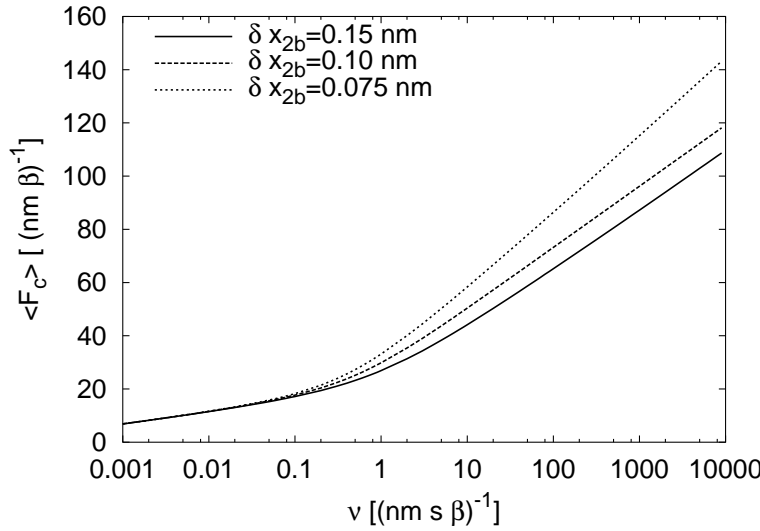


Abb. 5.7: Der Mittelwert der Reißkraft über mehrere Dekaden der Laderate ν . Der Unterschied zwischen den dargestellten Graphen liegt in der Position des 2. Minimums z_2 , während die beiden Abstände $\delta z_{1b} = 0.5$ nm sowie $\delta z_{1a} = 0.1$ nm konstant bleiben. Für kleine Laderaten beträgt die Steigung $2 (\text{nm}\beta)^{-1}$ für alle drei Fälle, für große Laderaten ist die Steigung $10 (\text{nm}\beta)^{-1}$ für $\delta z_{2b} \geq \delta z_{1a} = 0.1$ nm. Für kleinere Werte von δz_{2b} wird sie deutlich größer.

Danach ist die Steigung der logarithmisch aufgetragenen mittleren Reißkraft gerade $F_0 \equiv 1/(\beta\delta z_{ij})$ mit dem zugehörigen Abstand δz_{ij} des betrachteten Übergangs. Damit erhält man für kleine Laderaten den gesamten Abstand $\delta z_{1b} = \delta z_{1a} + \delta z_{a2} + \delta z_{2b}$. Für große Laderaten kann man einen der inneren Abstände δz_{1a} oder δz_{2b} berechnen. Diese Zuordnung ist allein auf der Grundlage des Kraftspektrums nicht eindeutig [112], da je nach Längenverhältnis entweder die innere oder die äußere Barriere dominiert. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 5.7 dargestellt. Die Steigung der logarithmisch aufgetragenen Funktion bei großen Laderaten hängt davon ab, welcher der beiden inneren Abstände kleiner ist, d.h. welche Barriere zuletzt dominiert. Für $\delta z_{1a} < \delta z_{2b}$ ist dies die erste Barriere, d.h. die Steigung ist $1/\delta z_{1a}$. Für $\delta z_{1a} > \delta z_{2b}$ ist die zweite Barriere dominierend und die Steigung entsprechend $1/\delta z_{2b}$. Das bedeutet jedoch nicht, dass die verschiedenen Fälle nicht auseinanderzuhalten sind. In Abbildung 5.8 sind die Varianzen dargestellt, die eine Unterscheidung zulassen.

Für alle drei Fälle ist die Varianz gleich im Bereich kleiner Laderaten. Im Zwischenbereich von $\nu = 0.1$ bis $10 (\text{nm s } \beta)^{-1}$ steigt die Varianz stark an. Jenseits von $\nu = 10 (\text{nm s } \beta)^{-1}$ ist die Varianz für $\delta z_{1a} = \delta z_{2b}$ konstant. Für $\delta z_{2b} = 0.075$ nm steigt die Varianz logarithmisch an und für $\delta z_{2b} = 0.15$ nm steigt sie auch erst logarithmisch an, flacht aber dann etwas ab. Daraus folgt, dass die drei Fälle hiermit klar zu unterscheiden sind: Dominiert für große Laderaten die äußere Barriere, so steigt die Varianz logarithmisch an, dominiert hingegen die innere, so bleibt der Anstieg der Varianz hinter einem lo-

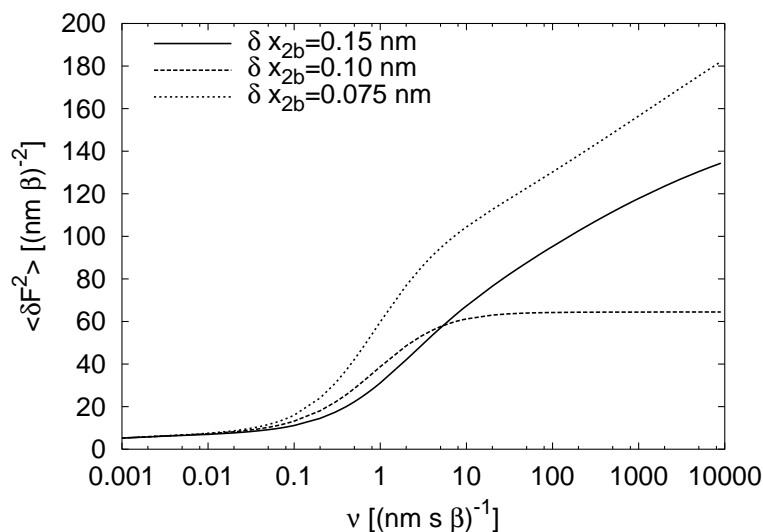


Abb. 5.8: Die Varianz der Abreißkraft zu denselben numerischen Simulationen wie in Abbildung 5.7. Durch Hinzunahme dieser Daten ist es möglich, das Kraftspektrum für zwei Minima vor der Barriere eindeutig auszuwerten.

garithmischen zurück. Bei Gleichheit der relevanten inneren Abstände ist kein weiterer Anstieg der Varianz zu erkennen.

Die spontanen Übergangsraten erhält man aus dem Achsenabschnitt ν_0 der logarithmisch aufgetragenen Reißkraft über der Laderate, für den gemäß Gleichung (5.4)

$$\nu_0 = F_0 k_{ij}^0 \quad (5.69)$$

gilt. Für große Laderaten erhält man also k_{23}^0 oder k_{12}^0 , für kleine Laderaten die effektive Übergangsrate von Zustand 1 nach 3, $k_{12}^0 k_{23}^0 / k_{21}^0$. Auch hier besteht keine Möglichkeit, alle drei Übergangsraten aus den Mittelwertkurven allein zu berechnen.

6 Die Jarzynski-Gleichung

6.1 Einführung der Gleichung und neuere Entwicklungen

Wir stellen zur Einführung den Zweiten Hauptsatz der Thermodynamik für den speziellen Fall einer isotherm verrichteten Arbeit vor. Dazu betrachten wir ein an ein Wärmebad angeschlossenes System, das mit Hilfe einer beliebigen äußeren Kopplung, z.B. einer Messfeder, von einem Gleichgewichtszustand in einen anderen gebracht wird. Der Weg im Phasenraum, im Folgenden auch als Trajektorie bezeichnet, den das System dabei nimmt, ist durch zufällige Kräfte des Wärmebades beeinflusst. Für jede Realisierung erhält man die geleistete Arbeit, indem man das wegabhängige Integral

$$W(t) \equiv \int_0^t dt' \partial_\tau H(\zeta(t'), \tau)|_{\tau=t'} \quad (6.1)$$

berechnet, wobei $\zeta(t')$ mit $0 < t' < t$ eine Trajektorie bezeichnet, die zur Zeit $t' = 0$ aus dem Gleichgewicht heraus startet und zur Zeit $t' = t$ eine beliebige Endposition erreicht. H ist die zugehörige Energie. Die verrichtete mittlere Arbeit $\langle W \rangle$ steht nach dem zweiten Hauptsatz der Thermodynamik mit der Freien Energiedifferenz ΔG in der Relation

$$\langle W \rangle \geq \Delta G, \quad (6.2)$$

wobei das Gleichheitszeichen für reversible Prozesse im Gleichgewicht gilt. Der Mittelwert $\langle \dots \rangle$ ist als Ensemblemittelwert über alle möglichen Trajektorien nach einem festgelegten experimentellen Protokoll zu verstehen. Definiert man die dissipierte Arbeit als die Differenz

$$\langle W_{diss} \rangle \equiv \langle W \rangle - \Delta G, \quad (6.3)$$

so erkennt man sofort, dass bei reversiblen Prozessen im Mittel keine Dissipation stattfindet. Die Jarzynski-Gleichung stellt im Gegensatz zur Ungleichung (6.2) eine exakte Beziehung zwischen der Freien Energiedifferenz und der Arbeit W her [77,113], sie lautet

$$e^{-\beta \Delta G} = \langle e^{-\beta W} \rangle. \quad (6.4)$$

Die Mittelung erfolgt hierbei wieder über alle Realisierungen bei festgelegter Prozessführung. Im Anhang A.2 wird eine der möglichen Herleitungen für die Jarzynski-Gleichung

(6.4) vorgestellt. Die Verallgemeinerung von 2 Zuständen auf ein z -aufgelöstes Freies Energieprofil $G(z)$ (siehe auch Anhang A.2) lautet

$$e^{-\beta[H(z,t)-G_0]} = \langle \delta[z - \zeta(t)] e^{-\beta W(t)} \rangle . \quad (6.5)$$

Die Deltafunktion selektiert dabei für die Mittelung nur die Trajektorien, die zur Zeit $t' = t$ bei der Endposition z ankommen. Die Konstante $G_0 = -\beta^{-1} \ln Z_0$ ist die Freie Energie zur Zeit $t = 0$ mit der ungestörten Zustandssumme

$$Z_0 = \int_0^\infty dz' e^{-\beta H(z',0)} . \quad (6.6)$$

Die beiden Gleichungen (6.4) und (6.5) sind unter sehr allgemeinen Voraussetzungen gültig, unabhängig von der Prozessführungen, d.h. sowohl nahe am Gleichgewicht als auch fern vom Gleichgewicht. Einzige Bedingung ist, dass die Kopplung an ein Wärmebad hinreichend gut als Markovscher Prozess modelliert werden kann, was entweder eine einfache Langevin-Dynamik ohne Gedächtnis oder bei diskreten Zuständen eine Mastergleichung zugrundelegt [114, 115].

Realistische Ziehprotokolle an Einzelmolekülen sowohl in Experimenten als auch in Simulationen erzeugen häufig Trajektorien im Nichtgleichgewicht. Die verallgemeinerte Gleichung (6.5) ermöglicht auch aus diesen Daten die Rekonstruktion des Freien Energieprofils, also einer Gleichgewichtsgröße. Das ist der große Vorteil dieser Gleichung im Vergleich zu anderen Methoden.

Man kann die Jarzynski-Gleichung (6.4) als Verallgemeinerung des Zweiten Hauptsatzes und des Fluktuations-Dissipations-Theorems verstehen. Sie hat zur Entdeckung einiger allgemeinerer Zusammenhänge beigetragen [114, 116], wodurch sich das Verständnis von Prozessen im Nichtgleichgewicht beträchtlich erweitert hat. Zur Theorie sind in den letzten Jahren einige wichtige Arbeiten erschienen. Viele Veröffentlichungen zum Beweis der Gleichung (6.4) werden im Anhang A.2 genannt. In einer aktuellen Arbeit weist Shirts *et al.* auf die bemerkenswerte Tatsache hin, dass die Jarzynski-Gleichung einem Spezialfall der Maximierung der Wahrscheinlichkeiten¹ entspricht [117]. Bei dieser Rechnung werden sowohl Hin- als auch Rücktrajektorien gleichermaßen berücksichtigt, was zu einer allgemeineren Darstellung sowie zu einer verbesserten Formel zur Bestimmung der Freien Energiedifferenz führt.

Die Möglichkeit, auch Nichtgleichgewichtsdaten mit Hilfe der Jarzynski-Gleichung auszuwerten, wurde frühzeitig erkannt [113]. Es vergingen allerdings einige Jahre, bis diese Methode für Einzelmolekülexperimente zuerst in Simulationen aufgegriffen [78] sowie kurze Zeit später auch experimentell am Beispiel der RNA verwendet wurde [118].

Die effektive Verwendung, insbesondere der Gleichung (6.4) in molekulardynamischen Simulationen, ist Gegenstand aktueller Forschung [119]. Park *et al.* vergleicht in [120] verschiedene Methoden, das Freie Energieprofil von Deca-Alanine aus Molekulardynamiksimulationen zu berechnen, indem er reversible und irreversible Trajektorien auswertet. Die dabei verwendeten vier verschiedenen Mittelungsschemata basieren auf der

¹engl.: maximum likelihood method

Jarzynski-Gleichung (6.4), auf der Kumulantenentwicklung bis zur ersten, zweiten sowie bis zur dritten Ordnung. Da die Trajektorien im Grenzfall starker Kopplung mit Federkonstanten von $k = 500\text{pN}/\text{\AA}$ erzeugt wurden, bedeutet dies, dass die stochastische Koordinate immer dem harmonischen Kopplungspotential folgt und nur wenig um das Minimum fluktuiert. Daher benötigt man in diesem Limes die verallgemeinerte z -aufgelöste Formel (6.5) nicht.

Eine alternative Anwendung der Jarzynski-Gleichung ist z.B. in [121] zu finden. Dort wird gezeigt, dass das chemische Exzesspotential einer dreidimensionalen Lennard-Jones-Flüssigkeit berechnet werden kann. Es werden sowohl Gleichgewichtstrajektorien als auch Nichtgleichgewichtstrajektorien zur Berechnung herangezogen und die Ergebnisse miteinander verglichen unter der Bedingung konstanter Gesamtmesszeit. Dies wird auch bei unserer Betrachtung eine wesentliche Rolle spielen. Dort wurde herausgefunden, dass beide Methoden über einen weiten Parameterbereich vergleichbare Ergebnisse liefern.

In [122] wird die Block-Mittelung als Hilfsmittel zur Berechnung des Pfadmittelwertes in der Jarzynski-Gleichung untersucht. In diesem Zusammenhang wurde jedoch die in [78] eingeführte gewichtete Histogramm Methode nicht diskutiert.

Eine für die praktische Anwendung sehr relevante Frage ist diejenige nach der Konvergenz der Mittelungen von Nichtgleichgewichtsdaten entsprechend der Jarzynski-Gleichung. Die wichtigsten Veröffentlichungen dazu sind [123, 124], in denen der statistische Fehler untersucht wird, der sich aus der Streuung sowie der systematischen Abweichung zusammensetzt.

Der Vollständigkeit halber seien hier noch die Veröffentlichungen [125] und [126] genannt. Darin wurden an kolloidalen Systemen Trajektorien gemessen, die, einzeln ausgewertet, im Widerspruch zum Zweiten Hauptsatz (6.2) stehen sollen. Dies ist selbstverständlich nicht der Fall, da mit diesem Hauptsatz nur eine Aussage über den Ensemblemittelwert getroffen wird.

6.2 Die Rekonstruktion des Freien Energieprofils I

6.2.1 Das periodische und lineare Protokoll im Vergleich

Das Modellsystem und die Problemstellung

Wir untersuchen im folgenden Abschnitt ein Experiment, dessen Aufbau in Abbildung 6.1 dargestellt ist. Zudem ist dort eine schematische Skizze des zugrundeliegenden Freien Energieprofils sowie die verwendeten Bezeichnungen zu sehen. Für einen festgehaltenen End-zu-End-Abstand z zur Zeit t sei die Energie des Gesamtsystems, also Molekül und Messfeder, durch

$$H(z, t) = G(z) + V_0(z, x(t)) \equiv G(z) + \frac{k_0}{2} (x(t) - z)^2 \quad (6.7)$$

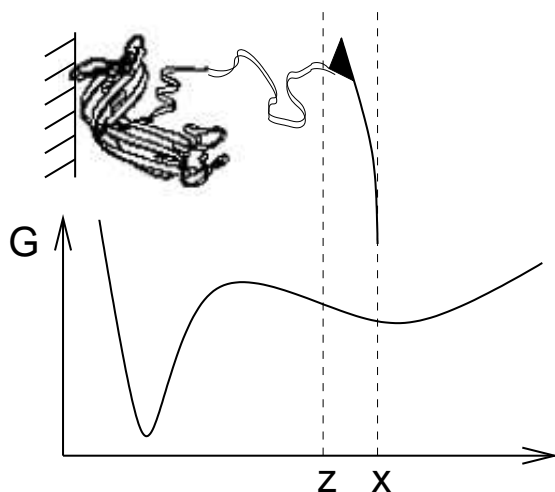


Abb. 6.1: Oben: eine schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus, unten: ein Freies Energieprofil $G(z)$. Die Koordinate x bezeichnet die kontrollierbare Position der Messfeder und z den End-zu-End-Abstand des Biopolymers.

gegeben. Dabei ist $G(z)$ das Freie Energieprofil des ungestörten Moleküls mit dem Verbindungspolymer, das zunächst nicht explizit berücksichtigt wird. Der zweite Term ist das harmonische Potential der externen Kopplung, d.h. der Messfeder, mit der effektiven Federkonstanten k_0 . Da das Molekül an ein Wärmebad der Temperatur T gekoppelt ist, ist die zeitliche Entwicklung von z stochastisch beeinflusst.

Bisher wurde in der Kraftspektroskopie meist die lineare Rampe (Gl. (1.2))

$$x(t) = x_0 + vt \quad (6.8)$$

mit der Vorauslenkung x_0 zur Zeit $t = 0$ und konstanter Geschwindigkeit v als Protokoll verwendet. Dabei wird die Kraft auf die Messfeder gemessen, woraus letztlich das Freie Energieprofil des Moleküls $G(z)$ zu bestimmen ist. Die lineare Rampe erweist sich aber nicht immer als ideale Wahl. Es zeigt sich, dass die thermodynamisch instabilen Bereiche der Freien Energie kaum erreicht werden, da die Trajektorie dort eine sehr geringe Aufenthaltswahrscheinlichkeit aufweist und eine Art „Schnappbewegung“² vollzieht.

Um diesen Nachteil auszugleichen und dennoch die Jarzynski-Gleichung zur Rekonstruktion verwenden zu können, zeigen wir, dass das Protokoll

$$x(t) = x_0 + x_a \sin(\omega t) \quad (6.9)$$

mit der Vorauslenkung x_0 , der Amplitude x_a und der Frequenz ω eine geeignete Wahl ist. Abbildung 6.2 stellt zwei Trajektorien, die mit den beiden experimentellen Protokollen (6.9) und (6.8) erzielt wurden, gegenüber.

Simulierte Experimente

In diesem Unterkapitel vergleichen wir das periodische (6.9) mit dem linearen Protokoll (6.8) auf der Grundlage von numerischen Simulationen anhand eines Beispiels, vgl. [79].

²engl.: snapping motion

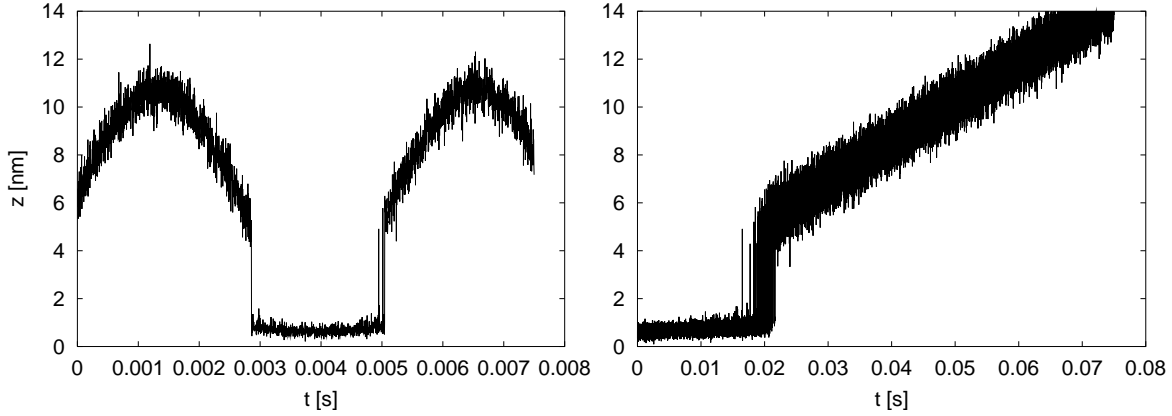


Abb. 6.2: Beispieltrajektorien, erzeugt mit Hilfe der beiden unterschiedlichen Protokolle. Links ist das Messresultat des periodischen Protokolls (6.9) etwa eine Periode lang dargestellt, rechts, eine ganze Trajektorie als Ergebnis des linearen Protokolls (6.8).

Dazu haben wir ein Freies Energieprofil $G(z)$ mit Hilfe experimenteller Daten aus Messungen am Membranprotein Bakteriorhodopsin (BR) [54, 55] erstellt. Das Beispielprofil besitzt zwei Minima, das tiefere repräsentiert den gebundenen Zustand, das flache, entropische repräsentiert den geöffneten Zustand, siehe Abb. 6.1. Für BR wurden mehrere Übergängen gefunden, die mit der Entfaltung der tertiären Struktur zusammenhängen. Einzelne Maxima in der Kraftkurve lassen sich jeweils einem bestimmten Übergang zuordnen. Die Kraft, die zum Überwinden der Maxima aufgewendet werden muss, variiert von 25 pN bis zu 100 pN. Mit einer Längenskala von einigen Nanometern, ergibt sich daraus eine typische Energiebarriere von $20 k_B T$. Wir haben einen dieser Übergänge isoliert betrachtet und eine Länge von 2 nm bei einer Höhe von $23 k_B T$ angenommen. Um beide Protokolle, die lineare und die periodische Rampe, zu vergleichen, haben wir mit den in der Bildbeschreibung zu Abbildung 6.3 angegebenen Parametern jeweils zehn Trajektorien $\zeta(t)$ mit konstanter Gesamtmeszeit erzeugt. Dazu haben wir numerisch die diskretisierte Langevin-Gleichung

$$\Delta z = -\frac{1}{\xi} \frac{\partial H(z, t)}{\partial z} \Delta t + \sqrt{2D\Delta t} \mathcal{F}(t) \quad (6.10)$$

unter Verwendung des Potentials (6.7) ausgewertet. Die Gaußschen Zufallskräfte $\mathcal{F}(t)$ verschwinden im Mittel, haben also keinen systematischen Anteil und eine zeitliche Korrelation gemäß $\langle \mathcal{F}(t) \mathcal{F}(t') \rangle = \delta(t - t')$. Die Diffusionskonstante D ist mit dem Reibungskoeffizienten ξ über die Einsteinrelation $D = k_B T / \xi$ verknüpft. Der Zeitschritt Δt unterliegt dabei der Bedingung, dass der aus Gleichung (6.10) resultierende räumliche Schritt Δz sehr viel kleiner sein muss als die Längenskala, die durch das Energieprofil vorgegeben ist. Zudem muss die Rate, mit der die Datenpunkte $\zeta(t)$ aufgenommen werden, kleiner sein als der inverse Zeitschritt, aber groß genug, um die Bewegung der

Messfeder hinreichend genau aufzulösen. Dies stellt an reale Messapparaturen einen hohen Anspruch.

Die Computersimulation enthält eine Skalenfreiheit, d.h. eine Energieeinheit, eine Zeiteinheit (ZE) und eine Längeneinheit (LE) sind frei wählbar. Wir haben die Energie in Einheiten von $k_B T$ berechnet, die Längeneinheit ergibt sich aus der Skala am vorgegebenen Freien Energieprofil und die Zeiteinheit schließlich aus der Diffusionskonstante, die in unserem Fall in den Simulationen $1 \text{ LE}^2/\text{ZE}$ und $10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ in realen Einheiten beträgt. Eine Umskalierung ist somit jederzeit möglich, dabei muss jedoch der Zusammenhang zwischen der Längeneinheit und der Zeiteinheit, der durch die Diffusionskonstante gegeben ist, beachtet werden.

Die Auswertung der Daten

Gleichung (6.5) liefert zu jedem Zeitpunkt ein Freies Energieprofil. Man könnte nun alle auf diese Weise erhaltenen zusammenzählen und durch die gesamte Anzahl teilen. Alternativ dazu gibt es aber eine Theorie, wie aus mehreren Verteilungen unter Minimierung des Fehlers eine einzige ermittelt werden kann. Diese Methode ist in der Literatur unter dem Namen „gewichtete Histogramm Methode“³ bekannt [127]. Sie gilt allerdings streng genommen nur für Monte-Carlo-Simulationen, kann aber mit Hilfe einer zusätzlichen Annahme auch für den vorliegenden Fall verwendet werden (siehe Anhang A.3). Daraus erhält man nach [78] eine verbesserte Formel zur Berechnung des Freien Energieprofils gemäß

$$G(z) - G_0 = -\beta^{-1} \ln \sum_t \frac{\langle \delta(z - \zeta(t)) \exp(-\beta W(t)) \rangle}{\langle \exp(-\beta W(t)) \rangle} / \sum_t \frac{\exp[-\beta V_0(z, x(t))]}{\langle \exp(-\beta W(t)) \rangle}. \quad (6.11)$$

Mit dieser Formel haben wir die simulierten Trajektorien beider Protokolle ausgewertet. Abbildung 6.3 belegt, dass die periodische Last signifikant bessere Daten zur Bestimmung des Freien Energieprofils liefert als die lineare Rampe unter denselben experimentellen Bedingungen, also einer äquivalenten gesamten Messdauer und einer gleichen Anzahl an Trajektorien [121]. In der Praxis ist die Länge der periodischen Trajektorie im Gegensatz zur linearen Rampe nicht limitiert. Allerdings ist eine allzu lange Trajektorie, wie später belegt wird, auch nicht sinnvoll, da der Fehler letztlich wieder ansteigt. Vor allem im Bereich der Barriere bei $z \simeq 4 \text{ nm}$ ist die Verbesserung deutlich. Diese ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die Barriere von beiden Seiten und mehr als einmal überquert wird.

Die Optimierung nach Frequenz und Geschwindigkeit

Die Qualität des rekonstruierten Freien Energieprofils hängt entscheidend von der Frequenz der periodischen Rampe und von der Geschwindigkeit der linearen Rampe ab.

³engl.: weighted histogram method

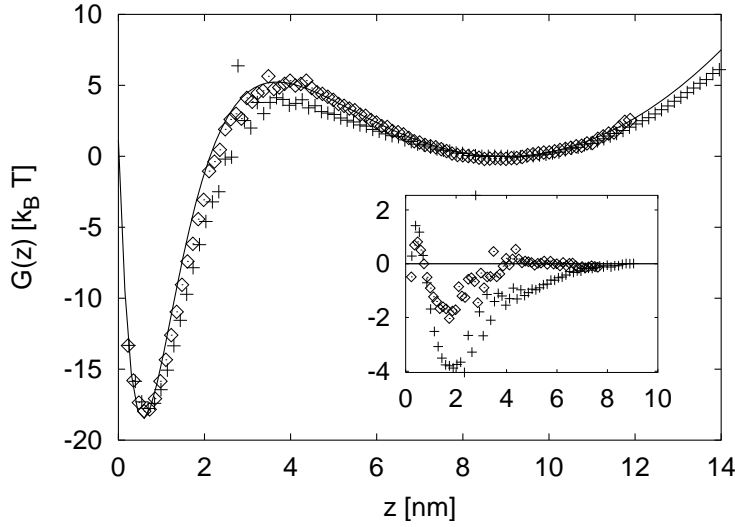


Abb. 6.3: Vergleich des rekonstruierten Freien Energieprofils $G(z)$ unter Verwendung des periodischen (\diamond) gegenüber des linearen (+) Protokolls, berechnet mit Gl. (6.11). Die durchgehende Linie ist das originale Freie Energieprofil $G(z)$. Für beide Methoden wurden 10 Trajektorien der Dauer 75 ms verwendet, eine Federkonstante von $k_0 = 11.6$ pN/nm und eine Diffusionskonstante von $D = 10^{-7}$ cm²/s, [siehe die Gln. (6.7) und (6.10)]. Für periodische Last benutzen wir die optimierte Frequenz $\omega^* = 1.2 \times 10^3$ s⁻¹ (bestimmt durch Abb. 6.4), die Vorauslenkung $x_0 = 6$ nm, und die Amplitude $x_a = 5$ nm in Gl. (6.9). Für die lineare Rampe benutzen wir die optimale Geschwindigkeit $v^* = 200$ nm/s (bestimmt durch Abb. 6.4). Der kleine Graph stellt die Differenz zwischen dem rekonstruierten und dem originalen Freien Energieprofil dar, das damit also der Nulllinie entspricht.

Um diese Beobachtung zu quantifizieren, haben wir jeweils den mittleren quadratischen Fehler

$$\sigma^2 \equiv \langle [\tilde{G}(z) - G(z)]^2 \rangle_{z_i} \quad (6.12)$$

berechnet. Der Mittelwert wird dabei über die diskreten Werte z_i im z -Intervall zwischen den beiden Minima genommen. Die auf Gleichung (6.11) basierende rekonstruierte Freie Energie bezeichnen wir hierbei zur Unterscheidung mit $\tilde{G}(z)$. Je besser die Rekonstruktion, desto kleiner ist σ^2 . Die Messzeit und die Anzahl der Trajektorien werden wie zuvor konstant gehalten. Abbildung 6.4 zeigt den Fehler σ^2 der rekonstruierten Freien Energie und die Vertrauensintervalle auf der Basis von jeweils 10 Messungen unter denselben Bedingungen. Für das periodische Protokoll beträgt die optimale Frequenz $\omega^* \simeq 1.2 \times 10^3$ s⁻¹, mit einem Fehler von $\sigma^2 \simeq 0.9 (k_B T)^2$. Diese ist etwas kleiner als die Übergangsrate, die in unserem Beispiel mit entsprechender Vorauslenkung etwa 7×10^3 s⁻¹ beträgt. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen konnte nicht erhärtet werden. Für kleinere und größere Frequenzen als ω^* ist die Qualität der rekonstruierten Freien

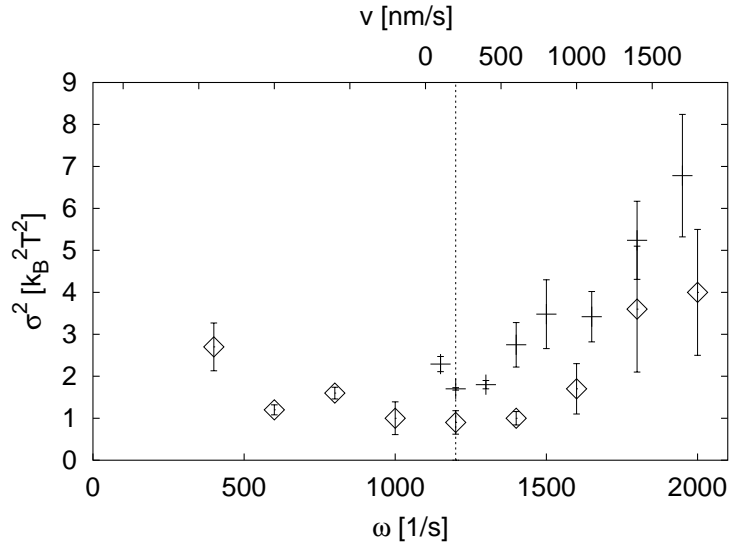


Abb. 6.4: Der mittlere quadratische Fehler σ^2 und die Fehlerbalken des rekonstruierten Freien Energieprofils zu den jeweiligen Parameterwerten ω für die periodische Last (untere Skala \diamond) und v für die lineare Rampe (obere Skala, +). Mit beiden Methoden wurden jeweils 10 Durchgänge verwendet und statistisch ausgewertet. Zu jedem Messpunkt haben wir neben dem Mittelwert den Fehlerbalken berechnet und dargestellt. Die optimale Geschwindigkeit v^* und Frequenz ω^* , bei denen der Fehler minimiert ist, sind mit der vertikalen gestrichelten Linie gekennzeichnet.

Energie schlechter. Die beste Frequenz ergibt sich somit aus einer Optimierung bezüglich dem Vorteil der verbesserten Datenausbeute einerseits und dem Nachteil andererseits, dass höhere Frequenzen zu einer langsameren Konvergenz der Trajektorienmittelung in der Jarzynski-Gleichung führen. Darüberhinaus sollte die Frequenz klein genug sein, so dass die Reaktionskoordinate der äußeren Anregung folgen kann.

Für die lineare Rampe wird der Fehler für größere Ziehgeschwindigkeiten v größer. Da die gesamte Messdauer begrenzt ist, erhält man für die Mindestgeschwindigkeit, um die Barriere zu überschreiten, den Wert $v \simeq 100$ nm/s. Der kleinste Fehler von $\sigma^2 \simeq 1.7 (k_B T)^2$ wird jedoch bei einer optimalen Geschwindigkeit von $v^* \simeq 200$ nm/s festgestellt. Für einen objektiven Vergleich verwenden wir in Abbildung 6.3 für beide Protokolle jeweils den optimalen Wert, den wir aus der Abb. 6.4 ablesen.

6.2.2 Ein zusätzlicher Freiheitsgrad

Meist wird zwischen dem zu untersuchenden Biopolymer und der Messfeder aus experimentellen Gründen ein Verbindungspolymer⁴ benötigt. Wir untersuchen nun, wie dieses in die bestehende Theorie integriert werden kann. Der zusätzliche Freiheitsgrad bezieht

⁴engl.: linker

sich auf die Reaktionskoordinate r in dem eigentlich interessanten Objekt $G_0(r)$, dem Freien Energieprofil des Moleküls, während im vorigen Kapitel nur $G(z)$ ermittelt werden konnte. Die Beziehung zwischen beiden kann durch die gesamte Freie Energie

$$G(r, z) = G_0(r) + G_1(r - z) , \quad (6.13)$$

die von r und z abhängt, ausgedrückt werden. Dabei beschreibt $G_1(r - z)$ diejenige des Verbindungspolymers.

Die Auswertung der Daten mit der Jarzynski-Gleichung (6.5) ergibt die Freie Energie $G_J(z)$, die mit $G(z, r)$ über

$$\frac{e^{-\beta G_J(z)}}{\int dz e^{-\beta G_J(z)}} = \frac{\int dr e^{-\beta(G_0(r)+G_1(r-z))}}{\int \int dr dz e^{-\beta G(r,z)}} \quad (6.14)$$

verknüpft ist. Wir stellen nun mehrere theoretische Ansätze vor, aus dieser Gleichung $G_0(r)$ auszurechnen.

Die rechte Seite von (6.14) ist ein Faltungsintegral, das im Fourier-Raum nach dem Faltungstheorem (siehe z.B. [93]) zu dem gewöhnlichen Produkt

$$g_J(k) = g_0(k) \cdot g_1(k) \quad (6.15)$$

wird, wobei $g_J(k)$, $g_0(k)$ und $g_1(k)$ die Fourier-Transformierten von $e^{-\beta G_J(z)}$, $e^{-\beta G_0(r)}$ und $e^{-\beta G_1(r-z)}$ sind. Mit Hilfe von Gleichung (6.15) kann also das Integral (6.14) einfach invertiert werden, indem im Fourier-Raum die Funktion $g_J(k)$ durch $g_1(k)$ dividiert wird. Es stellt sich jedoch heraus, dass diese Division nicht unproblematisch ist. Meist ist nämlich $e^{-\beta G_1(r-z)}$ eine viel breitere Funktion als die strukturierte Funktion $e^{-\beta G_0(r)}$, die eine Breite von einigen Å besitzt. Im Fourier-Raum ist das genau umgekehrt, so dass die Funktion $g_1(k)$ eine sehr schmale Kurve ist, durch die dividiert wird. Aus der Messtheorie ist bekannt, dass bei Faltungen dieser Art die bekannte Kurve, die im Grunde eine Messfunktion ist, keine kleineren Strukturen aufzulösen in der Lage ist als ihre eigene Breite. Dies führt schließlich zu einer Bedingung für die Breite der Funktion $e^{-\beta G_1(r-z)}$, die mit Hilfe von $G_1(r - z) \approx k_{linker}(r - z)^2/2$ als Gaußverteilung für ein Gaußsches Polymer oder ein WLC-Polymer für kleine Kräfte angenähert werden kann. Für die Federkonstante des Verbindungspolymers muss daher die Abschätzung

$$\frac{1}{k_{linker}} = \sigma^2 = \frac{2L_p L \beta}{3} \approx 1 \text{Å}^2 \beta \quad (6.16)$$

gelten. Wenn man typische Größenordnungen für die Konturlänge, also mehrere nm, und die Persistenzlänge $L_p \simeq 0.4$ nm einsetzt [81], so ergibt sich nicht die notwendige Längenskala. Damit ist die Invertierung des Integrals aus der Sicht der Theorie problematisch. Dies lässt sich auch damit begründen, dass die Einführung echter neuer Freiheitsgrade in der Auswertung immer zu mehrdeutigen Ergebnissen führt.

Eine andere Möglichkeit bietet sich mit der Anwendung der Sattelpunktsnäherung im Integral von (6.14) an. Dazu wird der Exponent um sein Minimum am Ort $\langle r \rangle$ bis zur zweiten Ordnung entwickelt. Die Lösung ist

$$G_J(z) \approx G_0(\langle r \rangle) + G_1(z - \langle r \rangle). \quad (6.17)$$

Dabei wurde zudem wieder die Gaußsche Näherung für das Verbindungspolymer angenommen, also ein harmonisches Potential für $G_1(r - z)$. Die gesuchte Freie Energie $G_0(\langle r \rangle)$ erhält man aus (6.17), wenn zusätzlich die Beziehung $\langle r \rangle = \langle r(z) \rangle$ bekannt ist. Diese lässt sich aus dem Kräftegleichgewicht

$$\frac{\partial G_J(z)}{\partial z} = F_{linker}(z - \langle r \rangle) \quad (6.18)$$

berechnen, die aus der Ableitung von (6.17) nach z folgt. Gleichung (6.18) gilt allerdings nur für stabile Bereiche des Freien Energieprofils. Das heißt, dass man damit die instabilen Bereiche, insbesondere die Barriere, nicht berechnen kann.

Als Fazit kann festgestellt werden, dass die Rekonstruktion des Freien Energieprofils $G_0(r)$ nur schwer realisierbar ist, wenn man aus experimentellen Gründen ein langes Verbindungspolymer zwischen Messfeder und Bindung benötigt. Zwei Möglichkeiten bleiben zur Auswahl: Erstens, man misst direkt die Trajektorien der Reaktionskoordinate r mit Hilfe von Fluoreszenzspektroskopie [128]. Das wird momentan allerdings aufgrund experimenteller Schwierigkeiten für diese Systeme nicht durchgeführt. Zweitens, man verwendet ein Verbindungspolymer, das so kurz wie möglich ist. Wenn es kürzer wäre als seine Persistenzlänge, könnte man es näherungsweise als steifen Stab modellieren. Dann wäre eine Umrechnung auf die Reaktionskoordinate auch möglich.

6.3 Die Fokker-Plancksche Beschreibung

6.3.1 Das Fluktuations-Dissipations-Theorem

Obwohl die Jarzynski-Gleichung schon seit 1997 bekannt ist, fand sie bisher nur selten Verwendung in der Auswertung experimenteller Daten. Eines der wenigen Beispiele dazu ist [118]. Zur Auswertung computergenerierter Daten aus molekulardynamischen Simulationen wurde diese Gleichung hingegen schon öfter angewandt [119, 120]. Der Grund für den zögerlichen Umgang mit dieser Gleichung sind die Probleme ihrer Konvergenzeigenschaft. Dabei sind Schwierigkeiten aus zwei unterschiedlichen Richtungen ersichtlich: Erstens müssen unter den Nichtgleichgewichtstrajektorien auch einige mit negativer dissipierter Arbeit dabeisein. Darum fallen makroskopische Systeme von vorneherein weg. Zweitens war aus der Statistik schon seit längerem bekannt, dass die Mittelung über eine Exponentialfunktion durch die zwangsläufig langreichweitigen Flanken der Verteilung Konvergenzprobleme aufwirft.

Erst in neueren Veröffentlichungen nahm man sich von theoretischer Seite her dem Problem der Konvergenzeigenschaften der Jarzynski-Gleichung an [123, 124]. Wir werden einige zentrale Aussagen wiederholen und eine Weiterentwicklung hinsichtlich der gewichteten Histogramm Methode präsentieren.

Der zentrale Grenzwertsatz liefert für eine große Anzahl N an Daten die Varianz der Freien Energie, welche mit der Jarzynski-Gleichung berechnet wurde, zu $\sigma_{\mathcal{Y}}^2/(\beta^2 N)$, wobei $\sigma_{\mathcal{Y}}^2$ die Varianz der Verteilung $p(\mathcal{Y})$ der Zufallsvariable $\mathcal{Y} \equiv e^{-\beta W_{diss}}$ ist [124]. Für einen Gaußschen Prozess ist die Verteilung der dissipierten Arbeit auch gaußverteilt [129], d.h.

$$p(W_{diss}) = \frac{1}{\sigma_W \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(W_{diss} - \langle W_{diss} \rangle)^2}{2\sigma_W^2}\right). \quad (6.19)$$

Für diese Prozesse kann $\sigma_{\mathcal{Y}}^2$ explizit zu

$$\sigma_{\mathcal{Y}}^2 = (\langle e^{-2\beta W_{diss}} \rangle - \langle e^{-\beta W_{diss}} \rangle^2) \quad (6.20a)$$

$$= e^{\beta^2 \sigma_W^2} - 1 \quad (6.20b)$$

berechnet werden, wobei σ_W^2 die Varianz von $p(W_{diss})$ und von $p(W)$ ist. Da beide Verteilungen nur um die Differenz ΔG auf der W -Achse verschoben sind, sind alle zentralen höheren Momente ab dem zweiten identisch. Außerdem benutzen wir die Beziehung

$$\langle e^{-\beta W_{diss}} \rangle = 1, \quad (6.21)$$

die aus der Jarzynski-Gleichung (6.4) folgt, indem diese so umgeformt wird, dass beide Exponentialfunktionen auf derselben Seite stehen. Zudem verwendeten wir das Fluktuations-Dissipations-Theorem (FD-Theorem) [124], das in diesem Fall $2\langle W_{diss} \rangle = \beta\sigma_W^2$ lautet und für Gaußsche Prozesse exakt gilt.

Aus Gleichung (6.20b) folgt für $\beta^2 \sigma_W^2 \ll 1$ die Beziehung $\sigma_{\mathcal{Y}} \approx \beta\sigma_W$, d.h. beide Varianzen sind ungefähr gleich. Für eine größere Varianz der dissipierten Arbeit erhält man jedoch immer $\sigma_{\mathcal{Y}}^2 > \beta^2 \sigma_W^2$. Das heißt, die mit der Jarzynski-Gleichung abgeschätzte Freie Energie konvergiert immer langsamer als der Mittelwert der Verteilung $p(W_{diss})$.

Es ist auch sehr instruktiv, den Zusammenhang zwischen der Jarzynski-Gleichung und der charakteristischen Funktion $\chi(k)$, also der Fourier-Transformierten der Verteilung $p(W_{diss})$, aufzuzeigen. Sie ist gemäß

$$\chi(k) \equiv \int dW_{diss} p(W_{diss}) e^{-ikW_{diss}} \quad (6.22)$$

definiert. Der Logarithmus davon wird als „Kumulantenentwicklung“ bezeichnet. Sie lautet in diesem Fall

$$\ln \chi(k) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-ik)^n}{n!} C_n. \quad (6.23)$$

Mit Gleichung (6.21) und der Definition (6.22) erhält man $\chi(-i\beta) = 1$ und der Logarithmusbildung

$$0 = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-\beta)^n}{n!} C_n \quad (6.24a)$$

$$= -C_1 + \frac{\beta}{2} C_2 - \frac{\beta^2}{6} C_3 + \dots \quad (6.24b)$$

Diese Summe ist exakt und konvergent, wenn die vorigen Größen im statistischen Sinne existieren. Das FD-Theorem erhält man als Näherung sofort aus den beiden ersten Termen der Summe (6.24) unter Vernachlässigung aller weiteren gemäß

$$C_1 = \frac{\beta}{2} C_2 \quad (6.25)$$

Das FD-Theorem ist für alle Gaußschen Prozesse und andere Prozesse gültig, die in der Nähe des Gleichgewichts ablaufen, für die also die Verteilung der Arbeit auch gaußverteilt ist [129]. Die Varianz σ_y^2 von $e^{-\beta W_{diss}}$ beträgt in Abhängigkeit von der charakteristischen Funktion

$$\sigma_y^2 = \chi(-2i\beta) - \chi(-i\beta)^2 \quad (6.26a)$$

$$= \chi(-2i\beta) - 1 \quad (6.26b)$$

$$= \exp\left(\sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-2\beta)^n}{n!} C_n\right) - 1 \quad (6.26c)$$

$$\approx (e^{-2\beta C_1 + 2\beta^2 C_2 - 4/3\beta^3 C_3 + \dots}) - 1 \quad (6.26d)$$

Mit dem FD-Theorem (6.25) ist dieses Resultat konsistent mit dem Ergebnis (6.20b) und ergibt zudem die Korrekturterme in einer Kumulantenentwicklung im Exponenten.

6.3.2 Die Arbeit und die dissipierte Arbeit

Begriffsbestimmung

Die dissipierte Arbeit ist eine der zentralen Größen bei der Erweiterung des zweiten Hauptsatz der Thermodynamik hin zur Jarzynski-Gleichung. Der zweite Hauptsatz (6.2) besagt nur, dass die mittlere dissipierte Arbeit größer oder gleich Null ist. Mit der Jarzynski-Gleichung wird darüberhinaus entsprechend Gleichung (6.21) eine Aussage über den Mittelwert der exponenzierten dissipierten Arbeit getroffen.

Die dissipierte Arbeit kann für einfache Modellsysteme, wie dem 2-Zustandsmodell, explizit berechnet werden [130]. In einer neueren Veröffentlichung [115] wird darauf hingewiesen, dass zwischen verschiedenen definierten Arbeiten sehr sorgfältig unterschieden werden muss. Die akkumulierte Arbeit W , definiert in Gleichung (6.1), ist die

Arbeit, die in die Jarzynski-Gleichung (6.4) eingesetzt wird. Die übertragene Arbeit $W_T \equiv \int \partial_{\zeta(t')} V_0(\zeta(t'), t') d\zeta$ wird dagegen von der externen Kopplung am System verrichtet. Beide unterscheiden sich um den Energiebetrag, der in der externen Kopplung, also der Messfeder, gemäß

$$W(t) = W_T(t) + V_0(\zeta(t), t) - V_0(\zeta(0), 0) \quad (6.27)$$

gespeichert ist.

Die zeitlichen Entwicklungsgleichungen

Im Folgenden werden wir nur die akkumulierte und die dissipierte Arbeit diskutieren. Wenn man das harmonische Potential $V_0(z, t) = (k_0/2)(x(t) - z)^2$ für die Kopplung annimmt, lautet die zeitliche Entwicklungsgleichung für die akkumulierte Arbeit

$$\frac{d}{dt} W(t) = \frac{\partial}{\partial t} V_0(\zeta(t), t) = k_0 \dot{x}(t)(x(t) - \zeta(t)) . \quad (6.28)$$

Diejenige für die dissipierte Arbeit ergibt sich demnach zu

$$\frac{d}{dt} W_{diss}(t) = \frac{d}{dt} W(t) - \frac{d}{dt} \Delta G(t) \quad (6.29a)$$

$$= \frac{d}{dt} W(t) - \frac{\int dz \frac{\partial}{\partial t} V_0(z, t) e^{-\beta H(z, t)}}{\int dz e^{-\beta H(z, t)}} \quad (6.29b)$$

$$= k_0 \dot{x}(t) \left(\frac{\int dz z e^{-\beta H(z, t)}}{\int dz e^{-\beta H(z, t)}} - \zeta(t) \right) , \quad (6.29c)$$

welche mit dem Boltzmannmittelwert $\bar{z}(t) = \int dz z e^{-\beta H(z, t)} / \int dz e^{-\beta H(z, t)}$ auf die sehr anschauliche Form

$$\frac{d}{dt} W_{diss}(t) = k_0 \dot{x}(t)(\bar{z}(t) - \zeta(t)) \quad (6.30)$$

gebracht werden kann. Eine wesentliche Bedingung für dissipierte Arbeit ist demnach eine systematische Abweichung der Trajektorie vom Mittelwert der Gleichgewichtsverteilung. Umgekehrt folgt für die Verteilung $p(\zeta) = \delta(\zeta - \bar{z})$ keine akkumulierte Arbeit, da damit $\frac{d}{dt} W_{diss}(t) = 0$ gilt. Die zugehörigen Lösungen werden als „quasistatische Prozesse“ bezeichnet.

Die Dissipation beim Übergang über eine Barriere ist deshalb größer als in den jeweiligen Minima, da dort die systematische Abweichung der Trajektorie vom Mittelwert am größten ist.

Die Bewegungsgleichung für ζ ist durch Gleichung (6.10) gegeben. Die beiden Gleichungen (6.10) und (6.30) sind gekoppelt und müssen daher gemeinsam gelöst werden.

Die Fokker-Planck-Gleichung für die dissipierte Arbeit

Betrachten wir im Folgenden die Verbundwahrscheinlichkeit $p(z, W_{diss})$. Die Fokker-Planck-Gleichung für diese Verteilung lautet

$$\frac{\partial p(z, W_{diss})}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial z} \frac{F(z)}{\xi} p(z, W_{diss}) + D \frac{\partial^2 p(z, W_{diss})}{\partial z^2} - k_0 \dot{x}(t) (\bar{z}(t) - z) \frac{\partial p(z, W_{diss})}{\partial W_{diss}} \quad (6.31)$$

mit $F(z) = -\partial H(z, t)/\partial z$. Dies ist eine (2+1)-dimensionale partielle Differentialgleichung, die numerisch vollständig integriert werden könnte, allerdings ist der Aufwand unnötig hoch. Um das Problem zu vereinfachen, führen wir bedingte Wahrscheinlichkeiten gemäß

$$p(W_{diss}, z) \equiv p(W_{diss}|z)p(z) \quad (6.32)$$

ein. Die bedingten z -abhängigen Momente werden entsprechend

$$W_1 \equiv \langle W_{diss}|z \rangle \equiv \int W_{diss} p(W_{diss}|z) dW_{diss} \quad (6.33a)$$

$$W_2 \equiv \langle W_{diss}^2|z \rangle \equiv \int W_{diss}^2 p(W_{diss}|z) dW_{diss} \quad (6.33b)$$

berechnet. Diese Definitionen können analog auf alle höheren Momente erweitert werden. Die Integration der Gleichung (6.31) über W_{diss} ergibt zunächst die einfache Fokker-Planck-Gleichung für die Verteilung $p(z)$,

$$\frac{\partial p(z)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial z} \frac{F(z)}{\xi} p(z) + D \frac{\partial^2 p(z)}{\partial z^2} . \quad (6.34)$$

Multipliziert man Gleichung (6.31) zuerst mit W_{diss} und führt anschließend die Integration durch, erhält man

$$\frac{\partial}{\partial t} (W_1 p(z)) = -\frac{\partial}{\partial z} \frac{F(z)}{\xi} W_1 p(z) + D \frac{\partial^2 W_1 p(z)}{\partial z^2} + k_0 \dot{x}(t) (\bar{z}(t) - z) p(z) . \quad (6.35)$$

Verwendet man die Gleichung (6.34) für die zeitliche Entwicklung von $p(z)$, so folgt die nun betrachtete Entwicklungsgleichung des Mittelwertes

$$\dot{W}_1 = \left(-\frac{F(z)}{\xi} + 2D \frac{p'}{p} \right) W_1' + DW_1'' + k_0 \dot{x}(t) (\bar{z}(t) - z) . \quad (6.36)$$

Der Punkt $\dot{}$ bezeichnet die zeitliche Ableitung, der Strich $'$ die Ableitung nach z . Der letzte Term in Gleichung (6.36) ist ein Quellterm für den Mittelwert W_1 . Die Anfangsbedingung für diese Gleichung lautet $W_1(t=0) = 0$, d.h. dass zu Beginn noch keine Arbeit dissipiert wurde.

Abbildung 6.5 zeigt die Ergebnisse der numerischen Simulation von Gleichung (6.36). Dabei verwendeten wir das Crank-Nicholson-Verfahren zur Lösung des Diffusionsterms und das Lax-Verfahren zur Stabilisierung des Driftterms [131].

Die Struktur der Gleichung (6.36) legt folgendes Verständnis des Mittelwertes, zu sehen in 6.5a, nahe: Zunächst ist die dissipierte Arbeit auf der rechten Seite der Barriere negativ, da das Wärmebad die gesamte Energie für den energetisch ungünstigen Übergang liefert. Die Abflachung, sowohl rechts als auch links, hängt mit dem Vorzeichen des Driftterms zusammen, das entgegen dem in der Fokker-Planck-Gleichung für $p(z)$ gerichtet ist. Damit lässt sich auch die Verschiebung der Stufe nach links verstehen. Physikalisch bedeutet das, wenn die Trajektorie sich gegen den Berg nach links bewegt, benötigt man immer mehr Energie aus dem Wärmebad, was die dissipierte Arbeit absenkt.

Auf dieselbe Weise wie Gleichung (6.36) kann man die für die zeitliche Entwicklung von W_2 herleiten. Diese lautet

$$\dot{W}_2 = \left(-\frac{F(z)}{\xi} + 2D\frac{p'}{p} \right) W_2' + DW_2'' + k_0\dot{x}(t)(\bar{z}(t) - z)2W_1 \quad (6.37)$$

und hat einen von (6.36) verschiedenen Quellterm, der von W_1 abhängt. Von diesem Unterschied abgesehen, ist die Struktur der beiden Gleichungen identisch. Abbildung 6.5b zeigt das numerisch berechnete bedingte zweite Moment nach Gleichung (6.37) unter denselben Bedingungen wie in Abbildung 6.5a. Aus den Ergebnissen beider Simulationen lässt sich auch die bedingte Varianz berechnen, die in Abbildung 6.5c dargestellt ist. Das Maximum befindet sich bei etwa $z \simeq 4$ nm, der Position der Barriere, rückt aber dann entsprechend dem zeitabhängigen Potential (Abb. 6.5d) immer weiter nach links. Unabhängig von der Tatsache, dass diese Simulationen numerisch bedingt mit einer unrealistisch hohen Laderate durchgeführt wurden, zeigen sie trotzdem eine interessante qualitative Übereinstimmung mit dem Fehler der rekonstruierten Freien Energie in Abbildung 6.3. Dort ist die größte Abweichung bei $z \simeq 2$ nm festzustellen, also knapp links von der Barriere. Dieser Befund wird demnach dadurch begründet, dass das Maximum der Varianz der dissipierten Arbeit mit fortschreitender Zeit nach links wandert und nicht, wie man vielleicht vermuten könnte, bei der ursprünglichen Position der Barriere bleibt.

Dieselbe Struktur wie Gleichungen (6.36) und (6.37) zeigen auch die Bewegungsgleichungen der höheren Momente. Es tritt immer eine Kopplung an das nächst niedrige Moment auf. Sehr hilfreich ist dabei die Tatsache, dass diese Hierarchie schon geschlossen ist, das heißt nämlich, dass keine höheren Momente in den Gleichungen auftreten. Im Prinzip können alle weiteren Momente numerisch ohne zusätzliche Näherung berechnet werden. Der Formalismus der Greenschen Funktion legt zudem nahe, dass man nur eine einzige Greensche Funktion $G(z - z', t - t')$ für alle Momente benötigt. Diese erfüllt die Gleichung

$$\left(\frac{\partial}{\partial t} - \left(-\frac{F(z)}{\xi} + 2D\frac{p'}{p} \right) \frac{\partial}{\partial z} + D\frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) G(z - z', t - t') = \delta(z - z')\delta(t - t'). \quad (6.38)$$

Die zeitabhängigen Lösungen der ersten und zweiten Momente lauten damit

$$W_1 = \iint dz' dt' G(z - z', t - t') k_0 \dot{x}(t') (\bar{z}(t') - z') \quad (6.39a)$$

$$W_2 = \iint dz' dt' \iint dz'' dt'' G(z - z', t - t') G(z' - z'', t' - t'') \cdot 2k_0 \dot{x}(t') (\bar{z}(t') - z') k_0 \dot{x}(t'') (\bar{z}(t'') - z'') . \quad (6.39b)$$

Die hier vorgestellte allgemeine Fokker-Plancksche Beschreibung ist auch für die akkumulierte Arbeit möglich, statt der dissipierten. Der einzige Unterschied ist der Quellterm, der in den Momentengleichungen $k_0 \dot{x}(x - z)$ anstelle von $k_0 \dot{x}(\bar{z} - z)$ lauten würde.

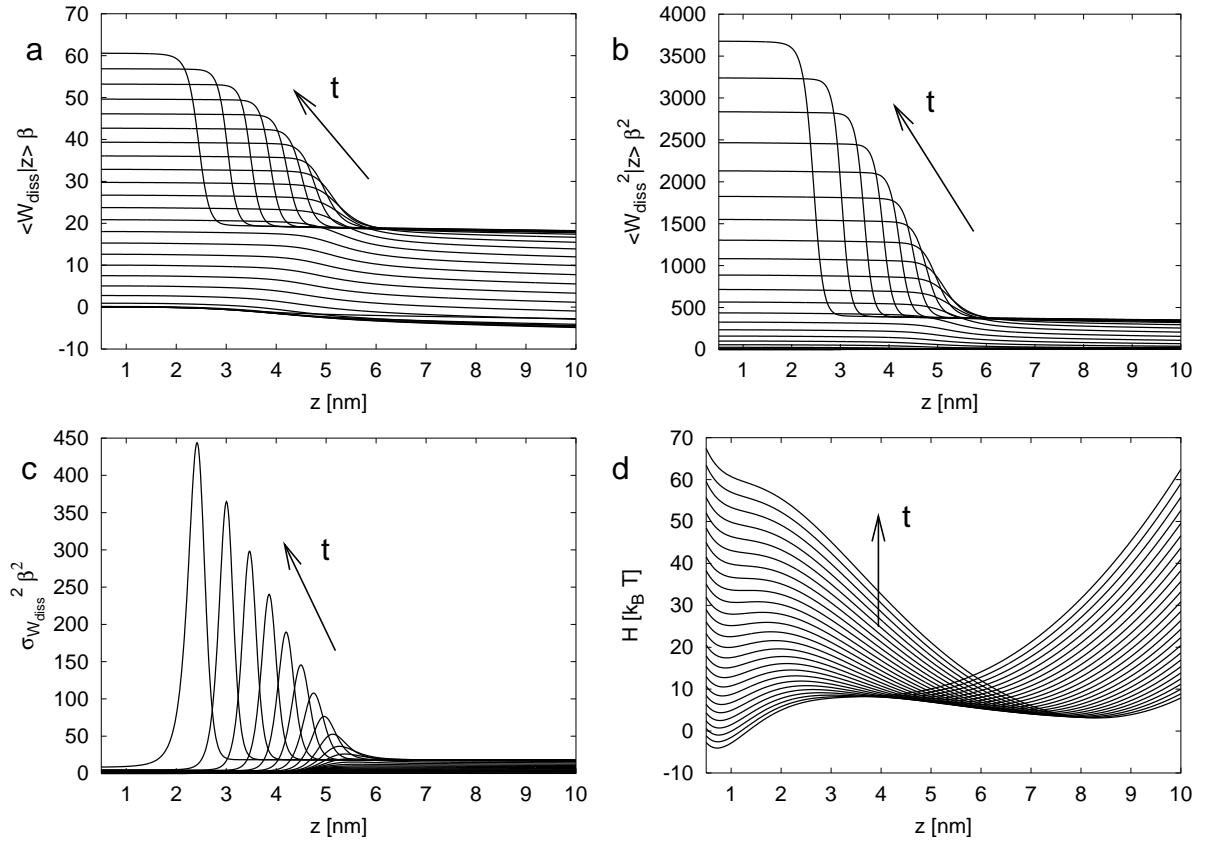


Abb. 6.5: a) Der Mittelwert der dissipierten Arbeit W_1 bedingt auf die Koordinate z nach Gleichung (6.36) beim Ziehen mit einer linearen Rampe ($v = 2$ mm/s). Die zugrundeliegende Freie Energie ist in Abb. 6.5d dargestellt. b) Das z -bedingte zweite Moment W_2 für die dissipierte Arbeit, nach Gleichung (6.37). c) Das zentrale zweite Moment der dissipierten Arbeit, berechnet aus den Werten der Abbildungen a und b. d) Das den Simulationen zugrundeliegende zeitabhängige Potential. Der zeitunabhängige Anteil ist derselbe wie in Abb.6.3.

6.3.3 Das z -aufgelöste FD-Theorem

Mit der bedingten Wahrscheinlichkeit haben wir die nötigen Hilfsmittel, die z -aufgelöste Version der Jarzynski-Gleichung (6.5) neu zu formulieren. Wir werden zunächst die Pfadmittelung durch eine gewöhnliche bedingte Mittelung gemäß

$$e^{-\beta[H(z,t)-G_0]} = \langle \delta[z - \zeta(t)] e^{-\beta W(t)} \rangle \quad (6.40a)$$

$$= \int p(W|z)p(z)e^{-\beta W(t)} dW \quad (6.40b)$$

$$= \langle e^{-\beta W} | z \rangle p(z) . \quad (6.40c)$$

ersetzen. Mit der Verteilung $p(z)$ muss multipliziert werden, da eine Integration über z konsistent zur ursprünglichen Fassung (6.4) sein muss. Die z -aufgelöste charakteristische Funktion analog zu (6.22) lautet

$$\chi(k, z) \equiv \chi(k|z)p(z) = \int dW p(W|z)p(z)e^{-ikW} , \quad (6.41)$$

welche eine Entwicklung in z -bedingte Kumulanten entsprechend

$$\ln \chi(k|z) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-ik)^n}{n!} C_n(z) \quad (6.42)$$

ermöglicht. Gleichung (6.40b) zusammen mit der Definition (6.41) ergibt an der Stelle $k = -i\beta$ eine neue Kumulantenentwicklung entsprechend zu (6.24), außer dass zwei zusätzliche Terme auf der linken Seite auftreten

$$-\beta[H(z, t) - G_0] + \ln p(z) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-\beta)^n}{n!} C_n(z) . \quad (6.43)$$

Das ursprüngliche FD-Theorem muss also für z -aufgelöste Betrachtung gemäß

$$G(z) - G_0 = -V_0(z, t) - \frac{1}{\beta} \ln p(z) + C_1(z) - \frac{\beta}{2} C_2(z) \quad (6.44)$$

neu definiert werden. Diese Gleichung wurde zum ersten Mal in [119] hergeleitet und verwendet. Dort wurden allerdings sofort die ersten beiden Terme der rechten Seite zu Null addiert, was nur unter der Voraussetzung einer sehr harten Messfeder näherungsweise angenommen werden darf.

6.3.4 Die Konvergenz des rekonstruierten Freien Energieprofils

Der Fehler der gewichteten Histogramm Methode

Die Argumenten von Gore *et al.* in [124] nachvollziehend, betrachten wir eine Folge von Zufallszahlen $\mathcal{Y}_t(z) = \langle \delta[z - \zeta(t)] e^{-\beta W(t)} \rangle_{N_t(z)}$ mit der Anzahl $N_t(z)$ an Daten in dem

Zeitintervall $[t, t + \Delta t]$ der Länge Δt im Intervall $[z, z + \Delta z]$. Mit einer Messrate S und der Anzahl an N Trajektorien beträgt diese Größe $N_t(z) = NS\Delta t p(z)\Delta z$. Gemäß dem zentralen Grenzwertsatz nehmen wir an, dass $\mathcal{Y}_t(z)$ für große $N_t(z)$ normalverteilt mit dem Mittelwert $\bar{\mathcal{Y}}_t(z) = e^{-\beta[H(z,t)-G_0]}$ und der Varianz

$$\sigma_{\mathcal{Y}_t(z)}^2 = \text{Var}(\delta[z - \zeta(t)] e^{-\beta W(t)}) / N_t(z) \quad (6.45)$$

ist. Das Freie Energieprofil ist nach $G(z) \equiv -\beta^{-1} \ln \rho$ mit der auf diese Weise definierten Zustandsdichte ρ verknüpft. Der Zusammenhang zwischen dem Fehler der Zustandsdichte und dem des Freien Energieprofils ergibt sich demnach zu

$$\sigma_G^2 = \sigma_\rho^2 \left(\frac{\partial G}{\partial \rho} \right)^2 \quad (6.46a)$$

$$= \sigma_\rho^2 \frac{1}{\beta^2 \rho^2} \quad (6.46b)$$

$$= \frac{\sum_t g_t^2 \sigma_{\rho_t}^2}{(\sum_t g_t)^2} \frac{1}{\beta^2 \rho^2}, \quad (6.46c)$$

mit den Gewichten g_t aus der gewichteten Histogramm Methode. In der letzten Umformung verwendeten wir den Ausdruck (A.30) für σ_ρ^2 aus Anhang A.3. Das heißt insbesondere, dass die Korrelationen der Messungen bei aufeinanderfolgenden Zeitintervallen hierbei nicht berücksichtigt werden.

Nun kann man die Fehler verschiedener Gewichtungsmethoden miteinander vergleichen, also den der naiven Mittelung $g_t = 1$ mit dem der gewichteten Histogramm Methode, bei der $g_t \sim e^{-\beta V_0(z,t)} / Z_t$ verwendet wird. Z_t ist die Zustandssumme zum Zeitpunkt t . Der in Gleichung (6.46) auftretende Fehler $\sigma_{\rho_t}^2$ der Zustandsdichte kann mit Hilfe der umgeformten Jarzynski-Gleichung (6.5)

$$\rho_t(z) = Z_0 \frac{\langle \delta[z - \zeta(t)] e^{-\beta W(t)} \rangle}{e^{-V_0(z,t)}} \quad (6.47)$$

und mittels der Gaußschen Formel zur Fehlerfortpflanzung zu

$$\sigma_{\rho_t}^2 = \sigma_{\mathcal{Y}_t(z)}^2 \left(\frac{\partial \rho_t}{\partial \mathcal{Y}_t(z)} \right)^2 \quad (6.48)$$

$$= \frac{\text{Var}(\delta[z - \zeta(t)] e^{-\beta W(t)}) Z_0^2}{N_t(z) e^{-2\beta V_0(z,t)}} \quad (6.49)$$

berechnet werden. Die Varianz, die im Zähler auftritt lässt sich mit den Abkürzungen

$$\omega_1 \equiv \int e^{-\beta W} p(W|z) dW \quad (6.50)$$

$$\omega_2 \equiv \int e^{-2\beta W} p(W|z) dW \quad (6.51)$$

gemäß

$$\text{Var}(\delta[z - \zeta(t)]e^{-\beta W(t)}) = (\omega_2 p(z)^2 - (\omega_1 p(z))^2) \quad (6.52)$$

ausdrücken.

Die zeitliche Entwicklung der Varianz unter Vorgabe eines Protokolls

Die Bewegungsgleichungen für ω_1 und ω_2 erhalten wir wieder aus einer Fokker-Planck-Gleichung, diesmal für $p(W, z)$ entsprechend (6.31), indem wir mit $e^{-\beta W}$ bzw. $e^{-2\beta W}$ multiplizieren und dann über W integrieren. Diese Rechnung liefert

$$\dot{\omega}_1 = \left(-\frac{F(z)}{\xi} + 2D\frac{p'}{p} \right) \omega_1' + D\omega_1'' - \beta k_0 \dot{x}(t)(x(t) - z)\omega_1 \quad (6.53)$$

$$\dot{\omega}_2 = \left(-\frac{F(z)}{\xi} + 2D\frac{p'}{p} \right) \omega_2' + D\omega_2'' - 2\beta k_0 \dot{x}(t)(x(t) - z)\omega_2 . \quad (6.54)$$

Das Protokoll wird wieder mit der Vorgabe der Funktion $x(t)$ spezifiziert. Die Anfangsbedingung gewinnt man aus der Anfangsverteilung $p(W|z; t = 0) = \delta(W)$, woraus $\omega_1(t = 0) = \omega_2(t = 0) = 1$ folgt. Gleichung (6.46c) lautet mit ω_1 und ω_2

$$\sigma_G^2 = \frac{1}{NS\Delta t\Delta z\beta^2} \frac{\sum_t (w_2 p(z) - w_1^2 p(z)) Z_0^2 / Z_t^2}{(\sum_t e^{-\beta H(z,t)} / Z_t)^2} \quad (6.55)$$

für die gewichtete Histogramm Methode und

$$\sigma_G^2 = \frac{1}{NS\Delta t\Delta z\beta^2} \frac{\sum_t (w_2 p(z) - w_1^2 p(z)) Z_0^2 e^{2\beta H(z,t)}}{(\sum_t 1)^2} \quad (6.56)$$

für die naive Mittelung.

Numerisches Fallbeispiel

Wir haben, ähnlich wie zur Berechnung der dissipierten Arbeit, einige exemplarische numerische Simulationen durchgeführt. Die zugrundeliegende Freie Energie ist wieder dieselbe wie in Abbildung 6.3. Um die beiden Varianzen (6.55) und (6.56) zu berechnen, benötigen wir die vollständige Lösung der Gleichungen (6.53) und (6.54) zusammen mit (6.34), der Fokker-Planck-Gleichung für $p(z, t)$. Das numerische Verfahren ist dasselbe wie für die dissipierte Arbeit. Die in Experimenten und numerischen Simulationen der Langevin-Gleichung typischerweise verwendeten Geschwindigkeiten und Frequenzen wurden aus rechen-technischen Gründen nicht erreicht. Die Ergebnisse der numerischen Rechnung in Abbildung 6.6 liefern eine eindeutige Bestätigung der Tatsache, dass die Mittelung mit Hilfe der gewichteten Histogramm Methode bedeutend bessere Ergebnisse liefert als die naive Mittelung. Dargestellt ist die Entwicklung der Varianz der

jeweiligen Verfahren an zwei verschiedenen Positionen z als Funktion der gesammelten Datenmenge. Dadurch ist zudem ersichtlich, wie unterschiedlich diese Menge an Daten ist, die an verschiedenen Stellen des Potentials überhaupt gesammelt werden kann. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass für $z = 1$ nm (Abb. 6.6a) ein Minimum der Varianz existiert. Statistisch kann das so gedeutet werden: Überstreicht der Mittelwert die Stelle z , ist die Qualität der Daten optimal. Wenn der Mittelwert sich weiter entfernt kommen noch weitere hinzu, diese werden aber immer unwahrscheinlicher und haben auch eine entsprechend hohe Varianz. Die Datenqualität nimmt also ab, je länger gemessen wird. Interessant ist auch die Tatsache, dass die naive Mittelung, obwohl sie auf längeren Zeiten schlechter abschneidet, zwischendurch eine geringere Varianz aufweist als die gewichtete Histogramm Methode. Dies liegt mit großer Wahrscheinlichkeit daran, dass die Gewichte keine exakte Minimierung der Varianz darstellen, wie in Anhang A.3 gezeigt.

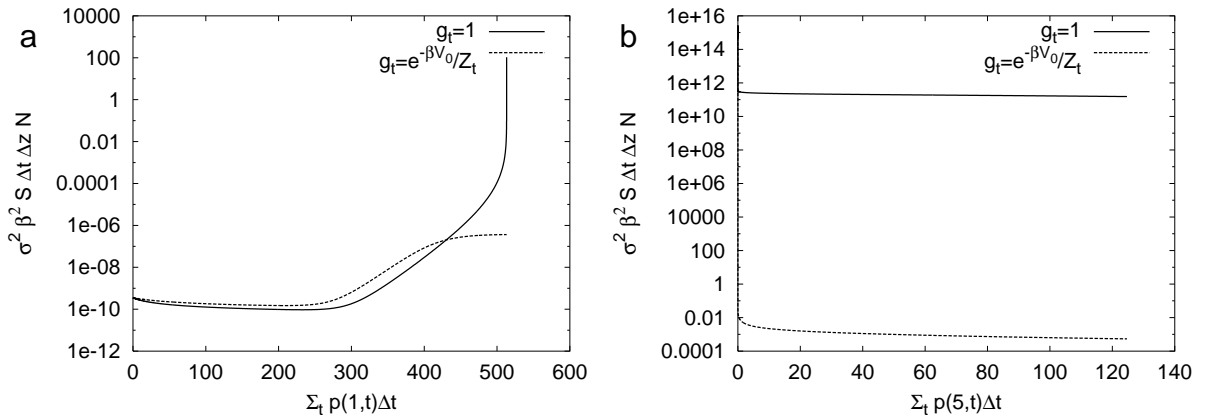


Abb. 6.6: a) Relevanter Teil der Varianz der geschätzten Freien Energie über der normierten Datenmenge bei $z = 1$ nm nach Gleichung (6.55) mit Hilfe numerischer Simulationen. Verwendet wurde die lineare Rampe mit $v = 0.1$ mm/s. Die Kurve für die gewichtete Histogramm Methode konvergiert gegen einen konstanten Wert, während bei der naiven Mittelung die Varianz immer größer wird. b) Dieselbe Simulation wie in Abbildung a, nur mit $z = 5$ nm also hinter der Barriere.

Abbildung 6.7a zeigt den Grenzwert der Varianz, gegen den diese konvergiert. Beachtenswert ist die Ähnlichkeit des Kurvenverlaufs zum verwendeten Freien Energieprofil (6.3). Zwischen der Varianz bei den Minima und beim Maximum liegen einige Größenordnungen.

Eine Interpolation in Richtung kleiner Geschwindigkeiten ist allerdings nicht einfach möglich, wie Abbildung 6.7b nahelegt: Die Varianz skaliert nicht algebraisch mit der Geschwindigkeit.

Für die bisherigen Abbildungen der Varianzen haben wir nur die lineare Rampe als experimentelles Protokoll zugrundegelegt. Das periodische Protokoll ist bei den numerisch erreichten Frequenzen nicht sinnvoll auswertbar. Konkret bedeutet das, dass die statistischen Fehler pro Periode stärker als linear anwachsen. Daher wäre es in diesem

Frequenzbereich vorteilhaft, die Trajektorien zu verkürzen und möglichst viele zu wählen.

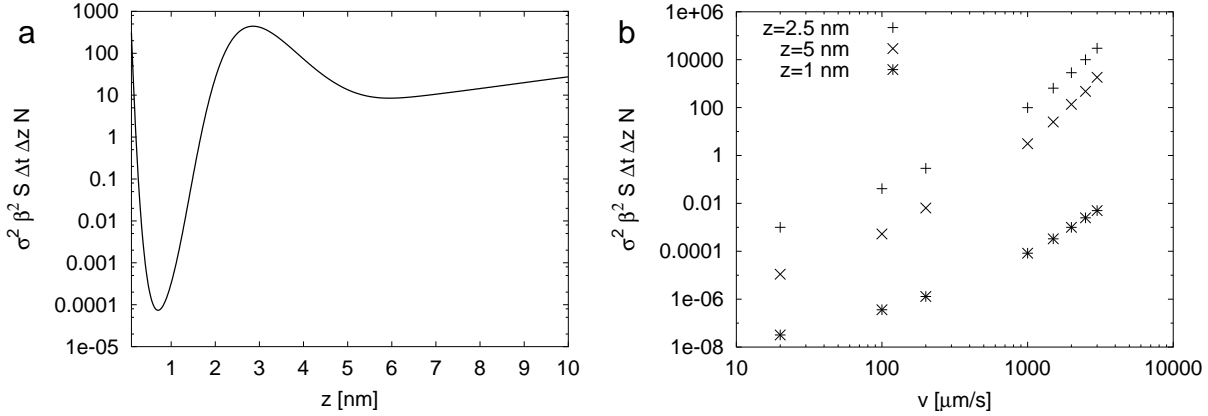


Abb. 6.7: a) Die Varianz für die gewichtete Histogramm Methode im Limes großer Zeiten ($v = 2$ mm/s) nach Gleichung (6.55). Das Maximum ist deutlich in der Nähe der Barriere und die Minima entsprechen den Minima des Freien Energieprofils. b) Die Varianz für große Zeiten für die gewichtete Histogramm Methode in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit nach Gleichung (6.55). Es zeigt sich kein eindeutiges Skalerverhalten, das heißt, eine systematische Skalierung in Richtung kleiner Geschwindigkeiten ist somit nicht möglich.

Die systematische Abweichung

Bisher haben wir eine Fehleranalyse allein auf der Grundlage der Varianz durchgeführt, haben jedoch noch nicht den systematischen Fehler B , auch „Bias“ genannt, beachtet. Als systematische Differenz aus der abgeschätzten und der tatsächlichen Freien Energie tritt er bei der Berechnung der Freien Energie mit der Jarzynski-Gleichung immer auf. Für unendlich viele Messdaten verschwindet er. In der Statistik werden die Funktionen, deren Mittelwerte diese Eigenschaft besitzen *nicht erwartungstreue Schätzer* genannt. In unserem bisher betrachteten Fall hängen alle Größen von z ab, damit ist also nach [124]

$$\frac{\rho(z)}{\tilde{\rho}(z)} = e^{\beta B} = e^{\beta^2 \sigma_G^2(z)}, \quad (6.57)$$

wobei $\tilde{\rho}(z)$ die Abschätzung der Zustandsdichte mit Gleichung (6.5) ist und $\rho(z)$ die tatsächliche. Da die Fehlerquadrate $\sigma_G^2(z)$ zeitlich veränderlich sind, folgern wir aus Gleichung (6.57), dass dies auch für den Bias gelten muss. Die gewichtete Histogramm Methode summiert die gewichteten Zustandsdichten, die zu verschiedenen Zeitintervallen berechnet werden. Das bedeutet aber für die statistisch kombinierte Zustandsdichte

$$\tilde{\rho}(z) = \sum_t g_t \rho_t(z) e^{-\beta B t} / \sum_t g_t, \quad (6.58)$$

und damit tritt der Bias auch in der Summe auf, die alle Zeitintervalle durchläuft. Eine systematische Biaskorrektur ist in diesem Fall nach der numerischen Summenbildung nicht möglich. Wenn man das numerische Ergebnis in Abbildung (6.3) betrachtet, so erkennt man, dass der Bias offenbar eine wesentliche Fehlerquelle ist, der bei *beiden* Methoden auftritt und eine systematische Abweichung von der realen Freien Energie bewirkt. Eine Korrektur müsste also noch vor der Summenbildung berechnet werden. Die Abschätzungen, die dafür in der Literatur veröffentlicht wurden, beziehen sich jedoch nur auf den Gaußschen Fall. Nach [124] beträgt der Bias

$$B \approx \langle W_{diss} \rangle / N^\alpha \quad (6.59)$$

mit einem vom Mittelwert der dissipierten Arbeit abhängenden Exponenten α bei einer Gesamtzahl von N Messwerten. Ein Korrekturverfahren würde eine größere Anzahl an Trajektorien benötigen, um den Mittelwert der Arbeit zu jedem Zeitpunkt t hinreichend gut zu bestimmen.

Die Varianz ist also nicht die einzige Fehlerquelle, die für die rekonstruierte Freie Energie eine Rolle spielt. Hinzu kommt noch der schwer abzuschätzende Bias-Fehler.

6.4 Die Rekonstruktion des Freien Energieprofils II

6.4.1 Zwei verschiedene Rekonstruktionsvorschriften im Vergleich

Aufgrund des Befundes des vorigen Unterkapitels, dass die statistische Qualität der Daten abnehmen kann, haben wir die Trajektorien in einer erneuten Simulation deutlich kürzer gewählt. Für die Auswertung mit der Jarzynski-Gleichung hat dies keine nennenswerte Verbesserung bewirkt.

Wir werden eine Formel herleiten, die auf der Gleichgewichtsnäherung und der gewichteten Histogramm Methode beruht und die mit sehr kurzen Trajektorien deutlich bessere Ergebnisse liefert als die Jarzynski-Gleichung.

Wir gehen von der Boltzmann-Verteilung im Gleichgewicht aus, die man bei Mittelung über alle Trajektorien gemäß

$$p(z) \equiv \langle \delta[z - \zeta(t)] \rangle = e^{-\beta(G(z)+V_0(z,t))} / Z_t \quad (6.60)$$

ausdrücken kann. Die Zustandsdichte ρ_t lautet für diesen Fall also

$$\rho_t = e^{\beta V_0(z,t)} Z_t \langle \delta[z - \zeta(t)] \rangle . \quad (6.61)$$

Die gewichtete Histogramm Methode mit dem Gewicht $g_t \sim e^{-\beta V_0(z,t)} / Z_t$ liefert die Formel zur Rekonstruktion der Freien Energie

$$G(z) - G_0 = -\beta^{-1} \ln \sum_t \langle \delta(z - \zeta(t)) \rangle / \sum_t \frac{\exp[-\beta V_0(z, x(t))]}{\langle \exp(-\beta W(t)) \rangle} . \quad (6.62)$$

Dabei wurde noch die Zustandssumme Z_t mit Hilfe der Jarzynski-Gleichung (6.4) ersetzt. Nahe am Gleichgewicht kann allerdings davon ausgegangen werden, dass die Verteilung der Arbeit schmal ist, so dass sich schließlich aus der Näherung

$$\langle \exp(-\beta W(t)) \rangle \approx \exp(-\beta \langle W(t) \rangle) + \frac{\beta^2}{2} \sigma_W^2 \quad (6.63)$$

mit $\beta^2 \sigma_W^2 / 2 \ll 1$ aus Gleichung (6.62)

$$G(z) - G_0 = -\beta^{-1} \ln \sum_t \langle \delta(z - \zeta(t)) \rangle / \sum_t \frac{\exp[-\beta V_0(z, x(t))]}{\exp(-\beta \langle W(t) \rangle)} \quad (6.64)$$

ergibt. Zum Vergleich sei hier die schon zitierte Formel (6.11) angegeben

$$G(z) - G_0 = -\beta^{-1} \ln \sum_t \frac{\langle \delta(z - \zeta(t)) \rangle \langle \exp(-\beta W(t)) \rangle_z}{\langle \exp(-\beta W(t)) \rangle} / \sum_t \frac{\exp[-\beta V_0(z, x(t))]}{\langle \exp(-\beta W(t)) \rangle}, \quad (6.65)$$

die auf der Jarzynski-Gleichung (6.5) beruht. Die Schreibweise $|_z$ bedeutet die Mittelung bedingt auf die Koordinate z . Die wesentlichen Unterschiede zwischen den Gleichungen (6.64) und (6.65) sind, dass einerseits in (6.64) die bedingte Mittelung im Zähler nicht vorhanden ist und andererseits die Exponentialfunktion in den Nennern nicht gemittelt, sondern der Mittelwert exponenziert wird.

Wir haben diese beiden Gleichungen anhand einer Wiederholung der numerischen Simulation des Fallbeispiels aus Kapitel 6.2.1 miteinander verglichen. Dafür benutzten wir dieselben Parameter wie in Abb. 6.3, bis auf eine kürzere Gesamtmessdauer von $T = 250$ ms und eine Gesamtzahl von 50 Trajektorien. Die Ergebnisse für das periodische Protokoll sind in Abbildung 6.8 dargestellt. Offensichtlich unterscheiden sich die rekonstruierten Freien Energieprofile sehr voneinander bezüglich ihrer Qualität. Wesentlich bessere Ergebnisse wurden mit der Gleichung (6.64) erzielt, also unter der Gleichgewichtsannahme. Entscheidend für die Verbesserung ist die Länge der Trajektorien. Verwendet man Trajektorien der ursprünglichen Länge mit derselben Frequenz, so ergeben sich auch für die bessere Formel größere systematische Abweichungen im Bereich der Barriere.

Das lineare Protokoll ergibt entsprechend dem Befund aus Kapitel 6.2.1 nicht ganz so gute Ergebnisse. Sehr interessante Ergebnisse erhält man jedoch aus dem direkten Vergleich der beiden Gleichungen unter Veränderung der Ziehgeschwindigkeit, dargestellt in Abbildung 6.9. Auch hierbei wurde deutlich, dass Gleichung (6.64), die eigentlich auf Gleichgewichtsannahmen beruht, deutlich bessere Ergebnisse lieferte als Gleichung (6.65). Anhand der Verteilungen der Arbeit konnten wir ausschließen, dass diese Simulationen im Gleichgewicht stattgefunden haben. Der erhebliche Unterschied der Qualität des rekonstruierten Freien Energieprofils lässt sich somit auf die schlechte Konvergenz der Jarzynski-Gleichung zurückführen.

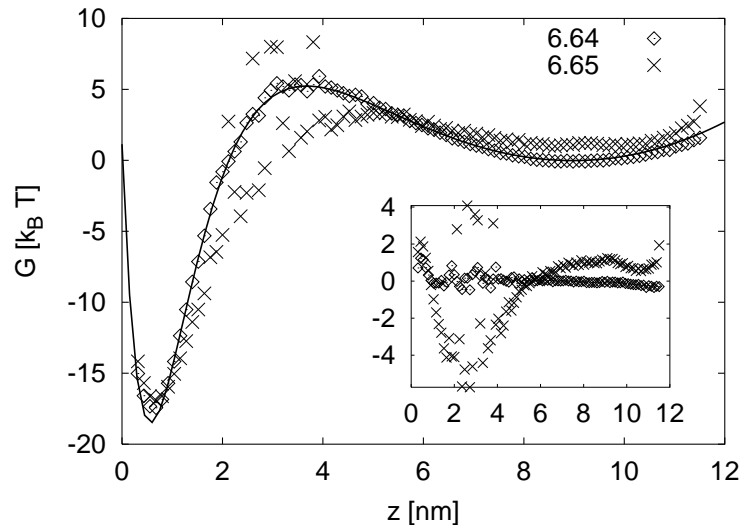


Abb. 6.8: Das mit zwei verschiedenen Mittelungsarten rekonstruierte Freie Energieprofil mit 50 Trajektorien der Dauer 5 ms und einer Frequenz von $\omega^* = 1.2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Das entspricht etwa einer Periode pro Trajektorie. Das schlechtere Ergebnis wurde mit Gleichung (6.65), das bessere mit Gleichung (6.64) erzielt, dessen mittlere Fehler über das dargestellte Intervall der Koordinate z $\sigma^2 = 0.09 (k_B T)^2$ beträgt. Der kleine Graph zeigt die Differenz zwischen der rekonstruierten und der tatsächlichen Freien Energie.

Zusammenfassend zu diesem Unterkapitel kann festgestellt werden, dass die Jarzynski-Gleichung zwar eine interessante Einsicht in den Zusammenhang zwischen Gleichgewichts- und Nichtgleichgewichtsgrößen liefert. Zur Rekonstruktion des Freien Energieprofils ist sie mit den bisherigen Methoden allerdings nur eingeschränkt zu empfehlen. Aus Abbildung 6.9 kann man folgern, dass eine langsame Messung, die weniger Trajektorien nahe dem Gleichgewicht erzeugt, eine bessere Abschätzung der Freien Energiedifferenz liefert als eine große Anzahl schneller Messungen, ausgewertet mit der Jarzynski-Gleichung. Voraussetzung für diese Aussage ist allerdings, dass man die gewichtete Histogramm Methode verwendet, die neue Probleme hinsichtlich des systematischen Fehlers aufwirft. Würde man ein Verfahren zur Bias-Korrektur entwickeln, so wäre das Ergebnis, das mit der Jarzynski-Gleichung erzielt würde, sicher deutlich besser als bisher.

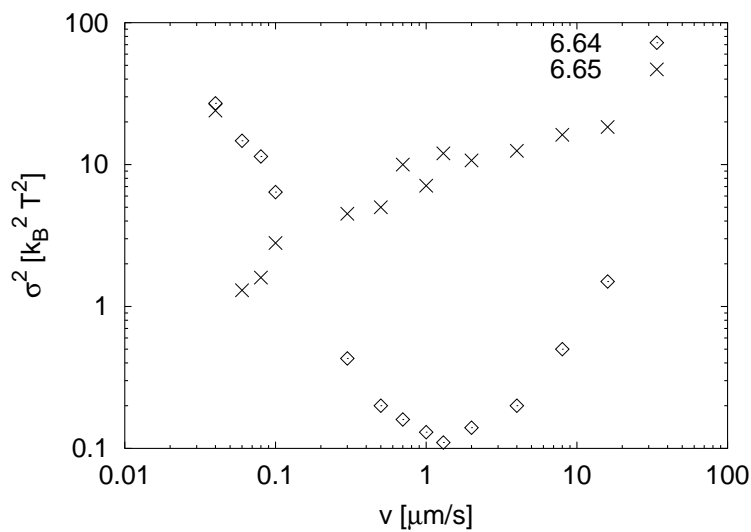


Abb. 6.9: Eine systematische Studie des globalen Fehlers σ^2 (Gl. (6.12)) von zwei Rekonstruktionsvorschriften in Abhängigkeit der Ziehgeschwindigkeit der linearen Rampe. Die gesamte Messzeit wurde dabei konstant $T = 250$ ms gehalten. Die Anzahl der Trajektorien wurde durch die Ziehgeschwindigkeit bestimmt, so dass bei $v = 2\mu\text{m/s}$ 50 mal gezogen werden konnte, bei der niedrigsten Geschwindigkeit, die eingezeichnet ist, gerade noch 2 mal. Es zeigt sich eine starke Abhängigkeit der globalen Qualität der rekonstruierten Freien Energie. Über einen weiten Bereich schneidet die Gleichgewichtsformel (6.64) weit besser ab als die Formel, die auf der Jarzynski-Gleichung basiert (6.65).

7 Ausblick

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits in der vorangestellten Zusammenfassung beschrieben. In dem nun folgenden Abschnitt werden Perspektiven aufgezeigt und einige weiterführende Fragen angeschnitten.

Das in Kapitel 2 anhand eines 2-Zustandsmodells eingeführte periodische Protokoll stellt eine attraktive Möglichkeit in kraftspektroskopischen Anwendungen dar, die Faltungsübergänge zusätzlich zu den Entfaltungsübergängen zu untersuchen. Die Theorie der stochastischen Resonanz, die bisher wenig praktische Anwendungen vorzuweisen hat, liefert dafür die in wesentlichen Zügen dargestellte Grundlage. Auf diesem Gebiet bleiben jedoch noch einige interessante Fragestellungen offen, die über das konkrete biophysikalische System hinaus experimentell untersucht werden können. Eine solche besteht zum Beispiel darin, wie ein metastabiler Zustand in die Theorie integriert werden kann und wie sich dieser dann auf die Statistik der Übergänge unter Verwendung eines periodischen Protokolls auswirkt. Die Wahl der Beschreibungsmethode müsste erneut auf der Grundlage der vorhandenen Parameterwerte beurteilt werden.

Die Theorie könnte auch dahingehend erweitert werden, eine Kombination aus linearem und periodischem Protokoll bzw. eine Überlagerung verschiedener experimenteller Zeitskalen einzubinden. Für den zweiten Vorschlag wäre es mit Hilfe der Trennung der Variablen möglich, miteinander gekoppelte Gleichungen auf getrennten Zeitskalen herzuleiten. Dabei spielen auch Effekte eine Rolle, die sich aus kontinuierlichen Veränderungen der Parameter bzw. der Zeitskalen ergeben, wie wir anhand der stochastischen Resonanz an einem typischen Beispiel der Kraftmikroskopie zeigen konnten.

Interessante Problemstellungen für die Zukunft ergeben sich nicht zuletzt aus Grenzbeobachtungen, wie beispielsweise die in dieser Arbeit angeschnittene und bisher nicht vollständig gelöste Frage nach dem Übergang vom Gleichgewicht zum Nichtgleichgewicht. Die hierzu vorgestellten Untersuchungen basieren auf der dissipierten Arbeit und der Abweichung der Wahrscheinlichkeitsdichte von der Boltzmann-Verteilung als Maß der Auslenkung vom Gleichgewicht. Trotz ihrer breiten Anwendungsmöglichkeiten ist diese Methode lediglich als Extrapolation der Gleichgewichtstheorie zu werten. Sie findet somit auch dort ihre Grenzen, wo die dazu notwendigen Voraussetzungen nicht mehr erfüllt sind. Das gilt besonders für das Verhalten der dynamischen Variablen, deren Kopplungen, die in der Nähe des Gleichgewichts vernachlässigbar sind, im Nichtgleichgewicht wichtig werden. In diesem Zusammenhang könnte eine Theorie Anwendung finden, die sich mit dem Übergang dynamischer Systeme von regulärem zu chaotischem Verhalten beschäftigt. Darin erweist sich zum Beispiel der Begriff der Periodenverdopplung von großer Bedeutung. Ein chaotisches Szenario wird demnach aufgrund einer Kaska-

de von Periodenverdopplungen erreicht. Eine Anwendung des vorhandenen Wissens auf einen höherdimensionalen Raum dynamischer Variablen unter Berücksichtigung der stochastischen, thermischen Störungen wäre innerhalb der Theorie der Kraftspektroskopie in Zukunft eine notwendige und lohnende Forschungsbetätigung. Ein wesentliches Ziel besteht insbesondere darin, die Gültigkeitsbereiche der jeweiligen Betrachtungsweisen präziser als bisher abzustecken. Das betrifft auch selbstverständlich erscheinende Konzepte, wie die Temperatur, und die in der Literatur diskutierte, keineswegs universelle Gültigkeit der Jarzynski-Gleichung.

Im Verlauf der Arbeit haben wir uns anhand spezieller Fallbeispiele damit beschäftigt, wie das Freie Energieprofil mit Hilfe der Jarzynski-Gleichung und der Trajektorien des linearen und des periodischen Protokolls ermittelt werden kann. Eine wesentliche Frage, die bisher nicht beantwortet werden konnte, ist: Wie kann die optimale Frequenz aus anderen Parametern berechnet werden? Es erscheint naheliegend, beim periodischen Protokoll einen Zusammenhang zur stochastischen Resonanz zu vermuten. Dies könnte nur mit Hilfe einer numerischen Untersuchung exakt belegt werden. Zudem wäre auf der Grundlage der in Kapitel 6 dargestellten Fokker-Planckschen Beschreibung zu klären, inwiefern sich die dissipierte Arbeit des periodischen Protokolls von der des linearen unterscheidet, desweiteren, wie groß die ideale Trajektorienlänge eigentlich ist. Auf der Grundlage der vorgestellten numerischen Simulationen der Fokker-Planck Gleichungen konnten diese Fragen bisher nicht zufriedenstellend beantwortet werden.

Eine weitere unbeantwortete Frage ist, wie sich die Methode der Jarzynski-Gleichung gegenüber anderen Gleichgewichtsmethoden letztlich behaupten würde, wenn man numerisch einen großen Parameterbereich des Freien Energieprofils abdecken und zudem die Längen der Trajektorien sowie die gesamte Messzeit systematisch über einen langen Zeitraum variieren könnte. Noch nicht geklärt ist außerdem die Rolle des systematischen Fehlers bei der Rekonstruktion des gesamten Freien Energieprofils. Eine Fehlerkorrektur im Zusammenhang mit der Methode der Jarzynski-Gleichung würde sicher bessere Ergebnisse liefern als bisher.

A Theoretische Hilfsmittel

A.1 Die Kramers-Übergangsraten

Betrachtet man bei einer stochastischen Bewegung das Verlassen eines abgeschlossenen Gebietes Ω führt dies auf die sog. Rückwärts-Kolmogorov-Gleichung

$$\frac{\partial q(x, t)}{\partial t} = \mathcal{L}^\dagger q(x, t) \quad (\text{A.1})$$

mit den Randbedingungen

$$q(x, 0) = 1 \text{ für } x \in \Omega \quad (\text{A.2})$$

$$q(x, t) = 0 \text{ für } x \in \partial\Omega, \quad (\text{A.3})$$

wobei \mathcal{L}^\dagger der adjungierte Fokker-Planck-Operator ist und $q(x, t)$ die Wahrscheinlichkeit, den Bereich Ω vom Startpunkt x aus *nach* der Zeit t zu verlassen [132, 133]. Die resultierende Wahrscheinlichkeitsdichte, denselben Bereich zum Zeitpunkt t zu verlassen, beträgt damit

$$\phi(x, t) = -\frac{\partial}{\partial t} q(x, t). \quad (\text{A.4})$$

Nun kann das Problem äquivalent in Form von Momenten dieser Verteilung formuliert werden, was zu anderen partiellen Differentialgleichungen führt [69]. Wir benötigen jedoch für die hier untersuchten Probleme nicht die gesamte Verteilung in Abhängigkeit von der Koordinate x , sondern lediglich die reduzierte Übergangswahrscheinlichkeit

$$\phi(t) \equiv \int_{-\infty}^{\infty} \phi(x, t) p(x, t=0) dx, \quad (\text{A.5})$$

die über die Anfangsverteilung $p(x, t=0)$ gemittelt wurde. Als Näherung nehmen wir an, dass A.5 als einfaches Produkt gemäß

$$\phi(t) = k_{off} \Phi(t) \quad (\text{A.6})$$

mit der Besetzungswahrscheinlichkeit $\Phi(t)$ formuliert werden kann. Diese Übergangsraten k_{off} ist die Kramers-Rate, die in ihrer allgemeinsten Form

$$k_{off}^{-1} = \frac{1}{D} \int_{-\infty}^{x_a} dx e^{-\beta H(x)} \int_{x_1}^{x_2} dx e^{\beta H(x)} \quad (\text{A.7})$$

lautet [62,66], dabei seien bei x_a ein Maximum und bei x_1 und x_2 Minima. H bezeichnet das Potential, in dem die stochastische Bewegung mit der Diffusionskonstante D stattfindet. Beide Integrale können mit Hilfe der Sattelpunktsnäherung [88] gelöst werden. Das zweite Integral ergibt

$$k_{off}^{-1} = \frac{1}{D} \sqrt{\frac{2\pi}{\beta|H''(x_a)|}} e^{\beta H(x_a)} \int_{-\infty}^{x_a} e^{-\beta H(x)} dx \quad (\text{A.8a})$$

$$= \frac{1}{D} \sqrt{\frac{2\pi}{\beta|H''(x_a)|}} e^{\beta H(x_a)} Z_{in} , \quad (\text{A.8b})$$

mit der Zustandssumme für den linken Bereich bis zum Maximum

$$Z_{in} = \int_{-\infty}^{x_a} e^{-\beta H(x)} dx . \quad (\text{A.9})$$

Löst man das zweite Integral näherungsweise, so lautet das bekannte Ergebnis [66, 70]

$$k_{off} = \frac{\beta D \sqrt{|H''|_{x_1} |H''|_{x_a}}}{2\pi} e^{-\beta(H(x_a) - H(x_1))} . \quad (\text{A.10})$$

A.2 Eine Herleitung der Jarzynski-Gleichung

Nach Jarzynskis erster Veröffentlichung zu dieser Gleichung [77] folgten mehrere theoretische Beiträge zu diesem Thema [78, 113–116], mit jeweils eigenen Zugängen und Beweisen. Die Voraussetzung für die Jarzynski-Gleichung ist immer die detaillierte Bilanz, die äquivalent zur Mikroreversibilität ist. Eine genaue Untersuchung des Gültigkeitsbereiches ist in [108, 115] zu finden.

Im Folgenden greifen wir den kompakten Beweis aus [115] auf. Die gesamte Zeitdauer eines parametrisierten Prozesses wird dabei eingeteilt in N Schritte der Dauer dt , bezeichnet mit t_i , von t_0 bis t_N . Die zeitlich veränderlichen Variablen werden gekennzeichnet mit \mathbf{x}_j , mit $j = 0, \dots, N$. Zu Beginn eines jeden Zeitintervalls wird der zeitabhängige Anteil $V(\mathbf{x}, t)$ der Hamiltonschen Funktion $H_j(\mathbf{x}_i) \equiv H(\mathbf{x}_i) + V_j(\mathbf{x}_i)$ augenblicklich verändert. Der Index bezeichnet hier jeweils das Zeitintervall. Eine Version der detaillierten Bilanz ist die sog. balancierte stochastische Abbildung, nach der die kanonische Verteilung von einem Zeitschritt zum nächsten auf sich selbst abgebildet wird, gemäß

$$\int d\mathbf{x}_{j-1} e^{-\beta H_j(\mathbf{x}_{j-1})} g(\mathbf{x}_{j-1}|\mathbf{x}_j) = e^{-\beta H_j(\mathbf{x}_j)} . \quad (\text{A.11})$$

Der Kurzzeitpropagator $g(\mathbf{x}_{j-1}|\mathbf{x}_j)$ entspricht also einer Diracschen Deltafunktion für die kanonische Verteilung. Das sind die einzigen Voraussetzungen. Die Arbeit in diskreter

Schreibweise ergibt sich aus der Differenz des zeitabhängigen Anteils der Energie $V(\mathbf{x}, t)$

$$\Delta V_j = V_{j+1}(\mathbf{x}_{j+1}) - V_j(\mathbf{x}_j) \quad (\text{A.12a})$$

$$= V_{j+1}(\mathbf{x}_{j+1}) - V_{j+1}(\mathbf{x}_j) + V_{j+1}(\mathbf{x}_j) - V_j(\mathbf{x}_j) \quad (\text{A.12b})$$

$$\equiv \Delta Q_j + \Delta W_j, \quad (\text{A.12c})$$

wobei $\Delta Q_j \equiv V_{j+1}(\mathbf{x}_{j+1}) - V_{j+1}(\mathbf{x}_j)$ der Wärmefluss und $\Delta W_j \equiv V_{j+1}(\mathbf{x}_j) - V_j(\mathbf{x}_j)$ die Arbeit ist. Diese Aufteilung des Prozesses ist physikalisch sinnvoll und notwendig für die weitere Rechnung. Die gesamte Arbeit entlang einer Trajektorie beträgt

$$W = \sum_{j=0}^{N-1} \Delta W_j, \quad (\text{A.13})$$

welche so in der Jarzynski-Gleichung auftritt. Vorausgesetzt wird zudem, dass die Trajektorie aus dem thermischen Gleichgewicht bei \mathbf{x}_0 startet, also entsprechend der Boltzmann-Verteilung $e^{-\beta H(\mathbf{x}_0)}/Z_0$, wobei Z_0 die Zustandssumme des Anfangszustandes ist. Die Mittelung der linken Seite der Jarzynski-Gleichung (6.4) kann mit der Pfadintegralformulierung berechnet werden gemäß

$$\begin{aligned} \langle e^{-\beta \sum_{j=0}^{N-1} \Delta W_j} \rangle &\equiv \iint d\mathbf{x}_0 d\mathbf{x}_N e^{-\beta H(\mathbf{x}_0) - \beta \sum_{j=0}^{N-1} \Delta W_j} g(\mathbf{x}_0|\mathbf{x}_N)/Z_0 \\ &= \int \dots \int d\mathbf{x}_0 \dots d\mathbf{x}_N e^{-\beta H(\mathbf{x}_0) - \beta \sum_{j=0}^{N-1} \Delta W_j} g(\mathbf{x}_0|\mathbf{x}_1) \dots g(\mathbf{x}_{N-1}|\mathbf{x}_N)/Z_0 \\ &= \int \dots \int d\mathbf{x}_1 \dots d\mathbf{x}_N e^{-\beta H(\mathbf{x}_1) - \beta \sum_{j=1}^{N-1} \Delta W_j} g(\mathbf{x}_1|\mathbf{x}_2) \dots g(\mathbf{x}_{N-1}|\mathbf{x}_N)/Z_0 \\ &= \int d\mathbf{x}_N e^{-\beta H(\mathbf{x}_N)}/Z_0 \\ &= Z_N/Z_0 \end{aligned} \quad (\text{A.14})$$

mit der Zustandssumme Z_N des Endzustandes. Der letzte Ausdruck entspricht tatsächlich der rechten Seite der Jarzynski-Gleichung, womit sie bewiesen ist. Für die zweite Zeile benötigt man eine der Eigenschaften von Propagatoren

$$g(\mathbf{x}_a|\mathbf{x}_e) = \int d\mathbf{x}_z g(\mathbf{x}_a|\mathbf{x}_z)g(\mathbf{x}_z|\mathbf{x}_e), \quad (\text{A.15})$$

d.h. dass der Anfangszustand \mathbf{x}_a auf einen beliebigen Zwischenzustand \mathbf{x}_z propagiert werden kann und von dort aus auf den Endzustand \mathbf{x}_e durch den zweiten Propagator. Die Tatsache, dass jeder Zwischenzustand erreicht werden kann, wird durch das Integral über alle Zwischenzustände ausgedrückt. Auf diese Weise können die Kurzzeitpropagatoren eingeführt werden. Die dritte und vierte Zeile erhält man durch wiederholte Anwendung

von Gleichung (A.11), so dass das übrige Integral über $d\mathbf{x}_N$ einfach der Zustandssumme im Endzustand entspricht.

Die Verallgemeinerung für das z -aufgelöste Freie Energieprofil ist naheliegend. Fügt zwischen die Mittelungskammern die Diracsche Delta-Distribution $\delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}_N)$ ein, so ergibt sich daraus am Ende statt der Zustandssumme einfach

$$\langle e^{-\beta \sum_{j=0}^{N-1} \Delta W_j} \delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}_N) \rangle = \int d\mathbf{x}_N e^{-\beta H(\mathbf{x}_N)} \delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}_N) / Z_0 \quad (\text{A.16a})$$

$$= e^{-\beta H(\mathbf{x})} / Z_0, \quad (\text{A.16b})$$

was der verallgemeinerten Jarzynski-Gleichung entspricht. Dies bedeutet schlicht, dass der Endzustand nun nicht allein durch den Kontrollparameter bestimmt ist, sondern dass durch die Deltafunktion eine zusätzliche Auswahl der Trajektorien durchgeführt wird. In der Mittelung werden demnach diejenigen berücksichtigt, die zum Zeitpunkt t_N den Punkt \mathbf{x}_N im Phasenraum erreichen.

A.3 Die gewichtete Histogramm Methode

Die Methode der gewichteten Histogramme [127, 134–136] basiert auf dem gewichteten Mittelwert \bar{x} , gebildet aus einer Reihe von fehlerbehafteten Mittelwerten x_i mit der zugehörigen Varianz σ_i gemäß

$$\bar{x} = \frac{\sum_i g_i x_i}{\sum_i g_i}. \quad (\text{A.17})$$

Dabei sind $g_i = 1/\sigma_i^2$ die idealen Gewichte, die den Fehler von \bar{x} minimieren. Nach dem Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetz beträgt dieser für statistisch unabhängige Summanden x_i

$$\sigma_{\bar{x}}^2 = \sum_i \sigma_i^2 \left(\frac{\partial \bar{x}}{\partial x_i} \right)^2 = \frac{\sum_i \sigma_i^2 g_i^2}{(\sum_i g_i)^2}. \quad (\text{A.18})$$

Die Ableitung der Varianz (A.18) nach g_j soll gemäß

$$\frac{\partial \sigma_{\bar{x}}^2}{\partial g_j} = \frac{2\sigma_j^2 g_j}{(\sum_i g_i)^2} - \frac{2\sum_i \sigma_i^2 g_i^2}{(\sum_i g_i)^3} = 0 \quad (\text{A.19})$$

verschwinden. Alle g_i , die also die Gleichung

$$\sum_i (\sigma_j^2 g_j g_i - \sigma_i^2 g_i^2) = 0 \quad (\text{A.20})$$

erfüllen, minimieren den Fehler. Da die Fehler aber unabhängig voneinander variieren, muss jeder Summand einzeln verschwinden. Das führt schließlich auf die Gewichte $g_i = 1/\sigma_i^2$ mit der gesamten Varianz

$$\sigma_x^2 = \frac{1}{\sum_i g_i} . \quad (\text{A.21})$$

Wir werden nun zeigen, wie Gleichung (A.17) für Histogramme erweitert werden kann.

Mit Hilfe der speziellen Hamiltonschen Funktion $H(z, t) = G(z) + V_0(z, t)$ definieren wir die Zustandsdichte

$$\rho(z) \equiv e^{-\beta G(z)} , \quad (\text{A.22})$$

die mit der verallgemeinerten Jarzynski-Gleichung (6.5) über

$$\rho_t(z) = Z_0 \frac{\langle \delta[z - \zeta(t)] e^{-\beta W(t)} \rangle}{e^{-\beta V_0(z,t)}} \quad (\text{A.23})$$

zusammenhängt, wobei $Z_0 \equiv e^{-\beta G_0}$ die Zustandssumme bei $t = 0$ ist. Die Dichte hängt nach der Definition nicht von t ab, aber um die unterschiedlichen gemessenen Zustandsdichten zu verschiedenen Zeitabschnitten zu unterscheiden, indizieren wir sie mit t . Entsprechend Gleichung (A.17) kann die Zustandsdichte statistisch aus den einzelnen Messungen gemäß

$$\rho(z) = \frac{\sum_t g_t(z) \rho_t(z)}{\sum_t g_t(z)} \quad (\text{A.24})$$

kombiniert werden. Der Fehler wird mit den entsprechenden Gewichten $g_t(z) = 1/\sigma_\rho^2(z)$ minimal, wobei die z -Abhängigkeit überall berücksichtigt werden muss. Nun besteht also die Aufgabe darin, die Fehler der einzelnen Messungen zu bestimmen oder, wenn nötig, abzuschätzen.

Zunächst, folgt man [127], ergeben sich die Fehler eines Monte-Carlo Histogramms $N_t(z)$ entsprechend der Poisson-Verteilung

$$\sigma_{N_t}^2(z) = \overline{N_t(z)} , \quad (\text{A.25})$$

wobei $\overline{N_t(z)}$ den Mittelwert aller Histogramme mit dem Parameterwert t bezeichnet. Die Histogramme sind bei gegebenem Parameterwert t mit der Zustandsdichte über die Wahrscheinlichkeitsdichte

$$p_t(z) = \frac{\rho(z) e^{-\beta V_0(z,t)}}{Z_t} \quad (\text{A.26})$$

verknüpft, wobei Z_t die Zustandssumme zur Zeit t ist. Ein gemessenes Histogramm liefert auf diese Weise eine Realisierung der Zustandsdichte

$$\rho_t(z) = \frac{Z_t \overline{N_t(z)}}{e^{-\beta V_0(z,t)} n_t} \quad (\text{A.27})$$

mit der Anzahl n_t an Daten eines Histogramms zum Parameterwert t . Daraus resultiert wieder mit Hilfe des Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetzes der Fehler

$$\begin{aligned}\sigma_\rho^2 &= \left(\frac{Z_t}{e^{-\beta V_0(z,t)} n_t} \right)^2 \sigma_{N_t}^2 \\ &= \frac{\rho(z)^2}{N_t(z)} .\end{aligned}\tag{A.28}$$

Wie man erwarten kann, gilt $\sigma_\rho^2(z) \sim 1/\overline{N_t(z)}$. Die resultierenden Gewichte $g_t(z)$ ergeben die bekannte gewichtete Histogramm Formel, wie in [127] angegeben.

Im Falle der Jarzynski-Gleichung muss erneut der Fehler der Histogramme betrachtet werden, da man nicht von Poissonverteilungen ausgehen kann, wie bei Monte-Carlo-Simulationen. Es ist wenig bekannt über die Fehler bei beliebigen Nichtgleichgewichtstrajektorien durch den Phasenraum. Es scheint jedoch vernünftig, von dem allgemeinen Ausdruck $\sigma_\rho^2(z) \sim 1/\overline{N_t(z)}$ zu starten, der auch für das Nichtgleichgewicht richtig wäre, wenn man vom zentralen Grenzwertsatz für die Summe der Mittelwertbildung ausgeht. Die z -aufgelöste Anzahl an Daten für den Parameterwert t ist jedoch nicht mehr durch die Gleichgewichtsverteilung gegeben. Man benötigt in $\overline{N_t(z)} = p_t(z)n_t$ die Nichtgleichgewichtsverteilung. Da wir diese aber in der Praxis erst nach der Auswertung haben, müssen wir hier als Näherung die Gleichgewichtsverteilung annehmen. Damit erhält man

$$g_t(z) \sim \frac{e^{-\beta V_0(z,t)}}{Z_t} .\tag{A.29}$$

Es sei angemerkt, dass dieses Ergebnis folglich den Fehler nicht mehr minimiert. Man kann allerdings anhand von Simulationen zeigen (siehe Kap. 6.3), dass für diese Gewichte kleinere Fehler herauskommen, als wenn man naiv $g_t = 1$ wählt. Die Anzahl an Daten n_t zu jedem Parameterwert t hängt in diesem speziellen Fall nicht von t ab, da die Anzahl an Trajektorien in jedem Zeitabschnitt konstant ist. In diesem Fall ist die Anzahl $n_t = S\Delta t N$, mit der Messrate S , der Breite der Zeitintervalle Δt und der Gesamtzahl an Trajektorien N . Der Gesamtfehler kann wieder mit

$$\sigma_\rho^2 = \frac{\sum_t \sigma_{\rho_t}^2 g_t^2}{(\sum_t g_t)^2}\tag{A.30}$$

abgeschätzt werden. Die Varianz σ_{ρ_t} , also der statistische quadratische Fehler der einzelnen Messung, kann mit Hilfe der Fokker-Planckschen Darstellung berechnet werden, siehe Kap. 6.3.

B Anhang zu Kap.3.1

B.1 Näherungslösung der Grenzgeschwindigkeit für Titin

Eine analytische Berechnung der maximalen Ziehgeschwindigkeit nach Gleichung (3.36)

$$\bar{v}_{max} = \min \left\{ \frac{\delta p_{max} (\partial p_0 / \partial \bar{x})^{-1}}{\tau_{eq}(\bar{x})} \right\} . \quad (B.1)$$

in Abhängigkeit von den Parametern ist nicht möglich. Dabei bezeichnet δp_{max} die maximale Abweichung vom Mittelwert $p_0(\bar{x})$ als Funktion der Position der Messfeder \bar{x} . Alle Variablen sind mit der Gesamtzahl N an Segmenten reskaliert. τ_{eq} bezeichnet die Relaxationszeit unter der Annahme einer festen Position \bar{x} .

Das Problem liegt darin, dass die Funktion $p_0(\bar{x})$ nicht explizit bekannt und zudem das globale Minimum des gesamten Ausdrucks (3.36) nicht analytisch berechenbar ist. Wir werden hier einen Näherungsausdruck herleiten, der für Titin und ähnliche Biopolymere gilt. Zu diesem Zweck führen wir zunächst eine kleinere obere Schranke

$$\bar{v}_0 = \frac{\min \{ \delta p_{max} (\partial p_0 / \partial \bar{x})^{-1} \}}{\max \{ \tau_{eq}(\bar{x}) \}} \quad (B.2)$$

ein. Die relevante Längenskala lautet somit $\min \{ \delta p_{max} (\partial p_0 / \partial \bar{x})^{-1} \}$ und die relevante interne Zeitskala

$$\tau_{eq}^{max} \equiv \max \{ \tau_{eq}(\bar{x}) \} . \quad (B.3)$$

Desweiteren benötigen wir die Gleichgewichtslösung (Gl. (3.24))

$$p_0 = \frac{\gamma(\bar{x}, p_0)}{\gamma(\bar{x}, p_0) + 1}$$

und die abkürzenden Bezeichnungen

$$\gamma \equiv k_{12}/k_{21} \quad \text{und} \quad \gamma_0 \equiv k_{12}^0/k_{21}^0 . \quad (B.4)$$

In linearer Ordnung in x/L beträgt die Kraft im WLC-Modell

$$F(\bar{x}) \approx \frac{1}{\beta L_p} \frac{3\bar{x}}{2l} . \quad (B.5)$$

Nach Einführung einer mit einigen Parametern skalierten Position

$$\tilde{x} \equiv \frac{3\bar{x}\Delta x}{2L_p} \quad (\text{B.6})$$

mit

$$\Delta x \equiv x_u + x_f \quad \text{und} \quad l_0 \equiv l(p_0) \quad (\text{B.7})$$

beträgt das Verhältnis der Raten (B.4)

$$\gamma = \gamma_0 \exp\left(\frac{\tilde{x}}{l_0}\right) . \quad (\text{B.8})$$

Mit der Abkürzung $u(\tilde{x}) \equiv \tilde{x}/l_0(\tilde{x})$ lautet die inverse Relaxationszeit nach Gleichung (3.27)

$$\tau_{eq}^{-1} = k_{12}^0 e^{u \frac{x_u}{\Delta x}} \left(1 + \gamma_0^{-1} e^{-u} + (1 - p_0) \delta L \frac{x_u}{\Delta x} \frac{u}{l_0} + p_0 \delta L \frac{x_f}{\Delta x} \frac{u}{l_0} \gamma_0^{-1} e^{-u} \right) ,$$

dabei haben wir die Beziehung $l = L_f + p\delta L$ eingesetzt. Die folgende Rechnung gilt nur für ähnliche Fälle wie Titin. Das gilt insbesondere für die Einschränkung, dass am Maximum von τ_{eq} die Gleichung $p_0 \approx 1$ erfüllt ist, siehe Abb. B.1. Dies hängt z.B. bei Titin damit zusammen, dass die Rückraten schon sehr klein sind, sobald die Zustände 2 besetzt werden. Wir führen den Parameter

$$c \equiv \frac{p_0 \delta L}{l_0} \quad (\text{B.9})$$

ein, der um das Maximum herum unabhängig von \tilde{x} angenommen wird. Daraus folgt für die Relaxationszeit

$$\tau_{eq}^{-1} \approx k_{12}^0 e^{u \frac{x_u}{\Delta x}} \left(1 + \gamma_0^{-1} e^{-u} c \frac{x_f}{\Delta x} u \right) , \quad (\text{B.10})$$

wobei wir die Abschätzung $c \frac{x_f}{\Delta x} u \gg 1$ verwendet haben, die nur in der Nähe des Maximalwerts $u_m = u(\tilde{x}_m)$ gilt. Der Logarithmus dieser Gleichung nach \tilde{x} abgeleitet und Null gesetzt ergibt

$$0 = \frac{x_u}{x_f} - c \gamma_0^{-1} (u - 1) e^{-u} . \quad (\text{B.11})$$

Durch Iteration erhält man schließlich

$$(u_m - 1) \approx \ln(x_f/x_u) + b + \ln(\ln(x_f/x_u) + b) , \quad (\text{B.12})$$

wobei $b \equiv \ln(c/\gamma_0) - 1$ gewählt wurde. Daraus folgt für das Maximum der Relaxationszeit

$$(\tau_{eq}^{max})^{-1} \approx k_{12}^0 e^{a(b+2+\ln b) - a \ln a} , \quad (\text{B.13})$$

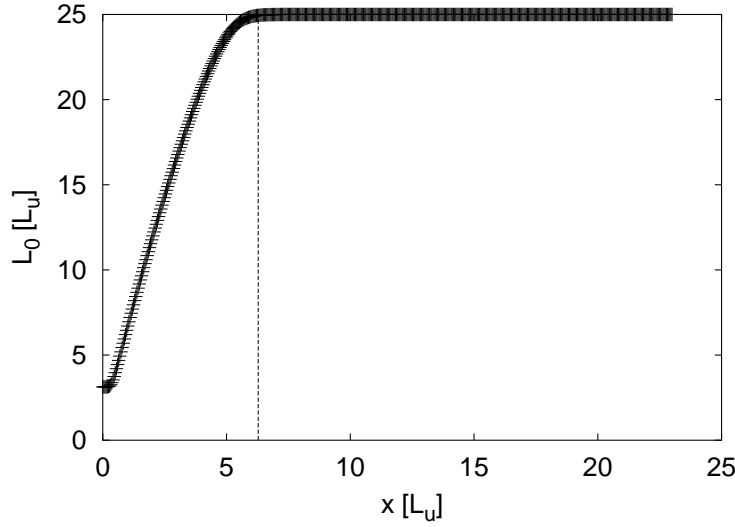


Abb. B.1: Die mittlere Konturlänge L_0 im Gleichgewicht für Titin über der Auslenkung \bar{x} mit $N = 25$ Domänen. Die vertikale Linie ist die Auslenkung, für die τ_{eq} maximal wird.

mit dem dimensionslosen Parameter

$$a \equiv x_u / (x_f + x_u) . \quad (\text{B.14})$$

Abbildung B.2 zeigt die Relaxationszeit (B.13) mit den Konstanten $b \simeq 10$ und $a \simeq 0.02$ für die Parameterwerte von Titin. Es ergibt sich demnach eine gute Übereinstimmung der Näherungslösung mit der numerischen Lösung.

Um die obere Schranke für die Geschwindigkeit zu berechnen, benötigt man noch die Ableitung $dp_0/d\bar{x}$, die direkt aus der Ableitung der impliziten Gleichung (3.24) folgt

$$\frac{dp_0}{d\bar{x}} = \frac{(1 - p_0)\dot{\gamma}}{(\gamma + 1) + (p_0 - 1)\gamma'} , \quad (\text{B.15})$$

wobei $\dot{\gamma}$ die partielle Ableitung nach \bar{x} und γ' die partielle Ableitung nach p_0 bezeichnet. Die Wahrscheinlichkeit p_0 ist eine Funktion von \bar{x} , die von 0 auf 1 ansteigt. Näherungsweise ist das Maximum ihrer Steigung bei $p_0 = 1/2$, was numerisch nachgeprüft wurde. Gleichung (3.24) liefert damit $\gamma = 1$, woraus sich die Ableitungen $\dot{\gamma} = (3\Delta x)/(L_p(L_u + L_f))$ und $\gamma' = (2\delta L)/((L_u + L_f) \ln \gamma_0)$ ergeben. Setzen wir diese Ausdrücke in Gleichung (B.15) ein, so erhalten wir für die relevante Länge die Näherung

$$\frac{1}{\max(dp_0/d\bar{x})} \delta p_{max} \approx \frac{2L_p}{3\Delta x} (2(L_u + L_f) - \delta L \ln \gamma_0) \delta p_{max} . \quad (\text{B.16})$$

Nun wird für δp_{max} eine Grenze gesucht, die sich, wie schon erläutert, an den Fluktuationen orientieren muß. Dazu benötigen wir das Maximum der Schwankung nach Gleichung

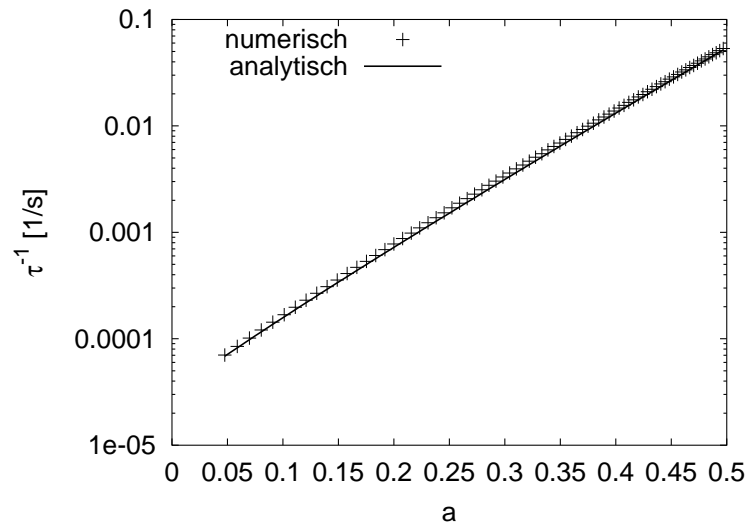


Abb. B.2: Die inverse maximale Relaxationszeit für verschiedene Parameterwerte a (Gl. (B.14)). Für Titin ist $x_u \ll x_f$ und damit $a \approx x_u/x_f \ll 1$. Die analytische Lösung wird durch Gleichung (B.13) wiedergegeben. Die Punkte erhält man aus numerischen Berechnungen des Maximums der Gesamtgleichung für die Relaxationszeit (3.27).

(3.37). Eine einfache Rechnung zeigt, dass das Maximum bis zur Ordnung $1/N$ durch die Bedingung $k_{12} = k_{21}$, also wieder $\gamma = 1$, gegeben ist. Aus $x_u \ll x_f$ folgt zudem $k_{12} \approx k_{12}^0$. Daraus folgt für die maximale Abweichung

$$\delta p_{max} \approx \sigma_{max} \approx \sqrt{\frac{k_{12}^0}{(N\tau_{eq}^{max})^{-1}}} . \quad (\text{B.17})$$

Für die obere Schranke \bar{v}_0 der skalierten Geschwindigkeit erhält man damit schließlich den Ausdruck

$$\bar{v}_0 \approx \frac{k_{12}^0}{\sqrt{N}} e^{\frac{1}{2}a(b+2+\ln b-\ln a)} \frac{2L_p}{3\Delta x} (2(L_u + L_f) - \delta L \ln \gamma_0) . \quad (\text{B.18})$$

Literaturverzeichnis

- [1] G. M. Cooper, *The Cell* (ASM Press, Washington D.C., 1997).
- [2] T. Lazaridis and M. Karplus, “New view” of protein folding reconciled with the old through multiple unfolding simulations”, *Science* **278**, 1928 (1997).
- [3] S. Takada, “Go-ing for the prediction of protein folding mechanism”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 11698 (1999).
- [4] C. Beck, X. Siemens, and D. L. Weaver, “Diffusion-collision model study of misfolding in a four-helix bundle protein”, *Biophys. J.* **81**, 3105 (2001).
- [5] A. Fernández, “Conformation-dependent environments in folding proteins”, *J. Chem. Phys.* **114**, 2489 (2001).
- [6] A. Fernández, “Cooperative walks in a cubic lattice: Protein folding as a many body problem”, *J. Chem. Phys.* **115**, 7293 (2001).
- [7] M. Sela, F. H. White, and C. B. Anfinsen, “Reductive cleavage of disulfide bridges in ribonuclease”, *Science* **125**, 691 (1957).
- [8] M. Rief and H. Grubmüller, “Force spectroscopy of single biomolecules”, *Chem-PhysChem* **3**, 255 (2002).
- [9] J. D. Watson and F. H. C. Crick, “Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid”, *Nature* **171**, 737 (1953).
- [10] M. Ludwig, M. Rief, L. Schmidt, H. Li, F. Oesterhelt, M. Gautel, and H. E. Gaub, “AFM, a tool for single-molecule experiments”, *Appl. Phys. A* **68**, 173 (1999).
- [11] A. Engel, H. E. Gaub, and D. J. Muller, “Atomic force microscopy: A forceful way with single molecules”, *Curr. Biol.* **9**, 133 (1999).

- [12] A. D. Mehta, M. Rief, J. A. Spudich, D. A. Smith, and R. M. Simmons, "Single-molecule biomechanics with optical methods", *Science* **283**, 1689 (1999).
- [13] O. H. Willemsen, M. M. E. Snel, A. Cambi, J. Greve, B. G. D. Grooth, and C. G. Figdor, "Biomolecular interactions measured by atomic force microscopy", *Biophys. J.* **79**, 3267 (2000).
- [14] H. Clausen-Schaumann, M. Seitz, R. Krautbauer, and H. E. Gaub, "Force spectroscopy with single bio-molecules", *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 524 (2000).
- [15] E. Evans, "Probing the relation between force - lifetime - and chemistry in single molecular bonds", *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**, 105 (2001).
- [16] R. Merkel, "Force spectroscopy on single passive biomolecules and single biomolecular bonds", *Phys. Rep.* **346**, 344 (2001).
- [17] T. R. Strick, M. N. Dessinges, G. Charvin, N. H. Dekker, J. F. Allemand, D. Bensimon, and V. C. V., "Stretching of macromolecules and proteins", *Rep. Prog. Phys.* **66**, 1 (2003).
- [18] C. Bustamante, Z. Bryant, and S. B. Smith, "Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics", *Nature* **421**, 423 (2003).
- [19] E.-L. Florin, V. T. Moy, and H. E. Gaub, "Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs", *Science* **264**, 415 (1994).
- [20] A. L. Chen and V. T. Moy, "Atomic force microscopy in cell biology", *Method. Cell Biol.* **68**, 301 (2002).
- [21] R. M. Simmons, J. T. Finer, S. Chu, and J. A. Spudich, "Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap", *Biophys. J.* **70**, 1813 (1996).
- [22] T. R. Strick, J.-F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, and V. Croquette, "The elasticity of a single supercoiled DNA molecule", *Science* **271**, 1835 (1996).
- [23] C. Danilowicz, V. W. Coljee, C. Bouzigues, D. K. Lubensky, D. R. Nelson, and M. Prentiss, "DNA unzipped under a constant force exhibits multiple metastable intermediates", *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 1694 (2003).

- [24] E. Evans, K. Ritchie, and R. Merkel, “Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces”, *Biophys. J.* **68**, 2580 (1995).
- [25] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, and E. Evans, “Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy”, *Nature* **397**, 50 (1999).
- [26] A. Vilfan, “The binding dynamics of tropomyosin on actin”, *Biophys. J.* **81**, 3146 (2001).
- [27] J. W. Weisel, H. Shuman, and R. I. Litvinov, “Protein-protein unbinding induced by force: single-molecule studies”, *Curr. Opin. Struc. Biol.* **13**, 227 (2003).
- [28] C. Bustamante, J. F. Marko, E. D. Siggia, and S. Smith, “Entropic elasticity of λ -phage DNA”, *Science* **265**, 1599 (1994).
- [29] J. F. Marko and E. D. Siggia, “Stretching DNA”, *Macromolecules* **28**, 8759 (1995).
- [30] R. D. Kamien, T. C. Lubensky, P. Nelson, and C. S. O’Hern, “Direct determination of DNA twist-stretch coupling”, *Europhys. Lett.* **38**, 237 (1997).
- [31] J. F. Marko, “DNA under high tension: Overstretching, undertwisting, and relaxation dynamics”, *Phys. Rev. E* **57**, 2134 (1998).
- [32] A. Ahsan, J. Rudnick, and R. Bruinsma, “Elasticity theory of the b-DNA to s-DNA transition”, *Biophys. J.* **74**, 132 (1998).
- [33] U. Bockelmann, B. Essevaz-Roulet, and F. Heslot, “DNA strand separation studied by single molecule force measurements”, *Phys. Rev. E* **58**, 2386 (1998).
- [34] T. Strunz, K. Oroszlan, R. Schäfer, and H.-J. Güntherodt, “Dynamic force spectroscopy of single DNA molecules”, *PNAS* **96**, 11277 (1999).
- [35] D. K. Lubensky and D. R. Nelson, “Pulling pinned polymers and unzipping DNA”, *Phys. Rev. Lett.* **85**, 1572 (2000).

- [36] H. Clausen-Schaumann, M. Rief, C. Tolksdorf, and H. E. Gaub, “Mechanical stability of single DNA molecules”, *Biophys. J.* **78**, 1997 (2000).
- [37] M. C. Williams, J. Rouzina, and V. A. Bloomfield, “Thermodynamics of DNA interactions from single molecule stretching experiments”, *Acc. Chem. Res.* **35**, 159 (2002).
- [38] A. F. Sauer-Budge, J. A. Nyamwanda, D. K. Lubensky, and D. Branton, “Unzipping kinetics of double-stranded DNA in a nanopore”, *Phys. Rev. Lett.* **90**, 238101 (2003).
- [39] J. Liphardt, B. Onoa, S. B. Smith, I. T. Jr., and C. Bustamante, “Reversible unfolding of single RNA molecules by mechanical force”, *Science* **292**, 733 (2001).
- [40] J. M. Fernandez, S. Chu, and A. F. Oberhauser, “Pulling on hair(pins)”, *Science* **292**, 653 (2001).
- [41] U. Gerland, R. Bundschuh, and T. Hwa, “Mechanical pulling through a nanopore can reveal the secondary structure of single RNA molecules”, *arXiv:cond-mat/0306126*, (2003).
- [42] S. Harlepp, T. Marchal, J. Robert, J. F. Leger, A. Xayaphoummine, H. Isambert, and D. C. D., “Probing complex RNA structures by mechanical force”, *Eur. Phys. J. E* **12**, 605 (2003).
- [43] M. Rief, F. Oesterhelt, B. Heymann, and H. E. Gaub, “Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by AFM”, *Science* **275**, 1295 (1997).
- [44] D. K. Lubensky and D. R. Nelson, “Single molecule statistics and the polynucleotide unzipping transition”, *Phys. Rev. E* **65**, 031917 (2002).
- [45] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez, and H. E. Gaub, “Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM”, *Science* **276**, 1109 (1997).
- [46] L. Tskhovrebova, J. Trinick, A. Sleep, and R. M. Simmons, “Elasticity and unfolding of single molecules of the giant muscle protein titin”, *Nature* **387**, 308 (1997).

- [47] A. Minajeva, M. Kulke, J. M. Fernandez, and W. A. Linke, “Unfolding of titin domains explains the viscoelastic behaviour of skeletal myofibrils”, *Biophys. J.* **80**, 1442 (1998).
- [48] M. S. Z. Kellermayer, S. B. Smith, H. L. Granzier, and C. Bustamante, “Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers”, *Science* **276**, 1112 (1997).
- [49] M. Rief, M. Gautel, A. Schemmel, and H. E. Gaub, “The mechanical stability of immunoglobulin and fibronectin iii domains in the muscle protein titin measured by atomic force microscopy”, *Biophys. J.* **75**, 3008 (1998).
- [50] P. E. Marszalek, H. Lu, H. Li, M. Carrion-Vazquez, A. F. Oberhauser, K. Schulten, and J. M. Fernandez, “Mechanical unfolding intermediates in titin modules”, *Nature* **402**, 100 (1999).
- [51] A. Krammer, H. Lu, B. Isralewitz, K. Schulten, and V. Vogel, “Forced unfolding of the fibronectin type iii module reveals a tensile molecular recognition switch”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 1351 (1999).
- [52] S. B. Fowler, R. B. Best, J. L. T. Herrera, T. J. Rutherford, A. Steward, E. Paci, M. Karplus, and J. Clarke, “Mechanical unfolding of a titin ig domain: Structure of unfolding intermediate revealed by combining AFM, molecular dynamics simulations, nmr and protein engineering”, *J. Mol. Biol.* **322**, 841 (2002).
- [53] A. F. Oberhauser, P. E. Marszalek, H. P. Erickson, and J. M. Fernandez, “The molecular elasticity of the extracellular matrix protein tenascin”, *Nature* **393**, 181 (1998).
- [54] F. Oesterhelt, D. Oesterhelt, M. Pfeiffer, A. Engel, H. E. Gaub, and D. J. Muller, “Unfolding pathway of individual bacteriorhodopsin”, *Science* **288**, 143 (2000).
- [55] D. J. Muller, M. Kessler, F. Oesterhelt, C. Möller, D. Oesterhelt, and H. E. Gaub, “Stability of bacteriorhodopsin α -helices and loops analyzed by single molecule force spectroscopy”, *Biophys. J.* **83**, 3578 (2002).
- [56] K. Svoboda, C. F. Schmidt, B. J. Schnapp, and S. M. H. Block, “Direct observation of kinesin steps”, *Nature* **365**, 721 (1993).

- [57] J. T. Finer, R. M. Simmons, and J. A. Spudich, “Single myosin molecule mechanics - piconewton forces and nanometer steps”, *Nature* **368**, 113 (1994).
- [58] H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, and K. Kinosita, “Direct observation of the rotation of f-1-atpase”, *Nature* **386**, 299 (1997).
- [59] H. Yin, M. D. Wang, K. Svoboda, R. Landick, S. M. Block, and J. Gelles, “Transcription against an applied force”, *Science* **270**, 1563 (1995).
- [60] T. R. Strick, V. Croquette, and D. Bensimon, “Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type ii topoisomerase”, *Nature* **404**, 901 (2000).
- [61] F. Schwabl, *Statistische Mechanik* (Springer Verlag, Heidelberg, 2000).
- [62] H. Risken, *The Fokker-Planck Equation, Methods of Solution and Applications* (Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1990).
- [63] C. W. Gardiner, *Handbook of stochastic Methods* (Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1985).
- [64] H. Haken, *Synergetik* (Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1982).
- [65] R. Kubo, M. Toda, and N. Hashitsume, *Statistical Physics II* (Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1991).
- [66] P. Hänggi, P. Talkner, and M. Borkovec, “Reaction-rate theory: fifty years after Kramers”, *Rev. Mod. Phys.* **62**, 251 (1990).
- [67] A. Mielke, “Noise induced stability in fluctuating, bistable potentials”, *Phys. Rev. Lett.* **84**, 818 (2000).
- [68] A. Mielke, “Effective rate equations for the overdamped motion in fluctuating potentials”, *Phys. Rev. E* **62**, 021106 (2001).
- [69] J. Shillcock and U. Seifert, “Escape from a metastable well under a time-ramped force”, *Phys. Rev. E* **57**, 7301 (1998).

- [70] H. A. Kramers, *Physica (Utrecht)* **7**, 284 (1940).
- [71] G. I. Bell, “Models for specific adhesion of cells to cells”, *Science* **200**, 618 (1978).
- [72] E. Evans and K. Ritchie, “Dynamic strength of molecular adhesion bonds”, *Biophys. J.* **72**, 1541 (1997).
- [73] S. Izrailev, S. Stepaniants, M. Balsera, Y. Oono, and K. Schulten, “Molecular dynamics study of unbinding of the avidin-biotin complex”, *Biophys. J.* **72**, 1568 (1997).
- [74] C. Gergely, J. C. Voegel, P. Schaaf, B. Senger, M. Maaloum, J. K. H. Horber, and J. Hemmerle, “Unbinding process of adsorbed proteins under external stress studied by atomic force microscopy spectroscopy”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 10802 (2000).
- [75] B. Heymann and H. Grubmüller, “Molecular dynamics force probe simulations of antibody/antigen unbinding: Entropic control and nonadditivity of unbinding forces”, *Biophys. J.* **81**, 1295 (2001).
- [76] G. Hummer and A. Szabo, “Kinetics from nonequilibrium single-molecule pulling experiments”, *Biophys. J.* **85**, 5 (2003).
- [77] C. Jarzynski, “Nonequilibrium equality for free energy differences”, *Phys. Rev. Lett.* **78**, 2690 (1997).
- [78] G. Hummer and A. Szabo, “Free energy reconstruction from nonequilibrium single-molecule pulling experiments”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 3658 (2001).
- [79] O. Braun, A. Hanke, and U. Seifert, “Probing molecular free energy landscapes by periodic loading”, *Phys. Rev. Lett.* **93**, 158105 (2004).
- [80] U. Seifert, “Rupture of multiple parallel molecular bonds under dynamic loading”, *Phys. Rev. Lett.* **84**, 2750 (2000).
- [81] M. Rief, J. M. Fernandez, and H. E. Gaub, “Elastically coupled two-level system as a model for biopolymer extensibility”, *Phys. Rev. Lett.* **81**, 4764 (1998).

- [82] M. Rief, H. Clausen-Schaumann, and H. E. Gaub, “Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules”, *Nat. Struct. Biol.* **6**, 346 (1999).
- [83] B. Jun and D. L. Weaver, “One-dimensional potential barrier model of protein folding with intermediates”, *J. Chem. Phys.* **116**, 418 (2002).
- [84] C. Bouchiat, M. D. Wang, J.-F. Allemand, T. Strick, S. M. Block, and V. Croquette, “Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements”, *Biophys. J.* **86**, 409 (1999).
- [85] U. Seifert, W. Wintz, and P. Nelson, “Straightening of thermal fluctuations in semiflexible polymers by applied tension”, *Phys. Rev. Lett.* **77**, 5389 (1996).
- [86] O. Hallatschek, E. Frey, and K. Kroy, “Propagation and relaxation of tension in stiff polymers”, arXiv:cond-mat/0405367, (2004).
- [87] H. Quian, “Equations for stochastic macromolecular mechanics of single proteins: Equilibrium fluctuations, transient kinetics, and nonequilibrium steady-state”, *J. Phys. Chem. B* **106**, 2065 (2002).
- [88] C. M. Bender and S. A. Orszag, *Advanced Mathematical Methods for Scientists and Engineers* (Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2000).
- [89] M. Doi, *Introduction to polymer physics* (Clarendon Press, Oxford, 1996).
- [90] L. Gammaitoni, P. Hänggi, P. Jung, and F. Marchesoni, “Stochastic resonance”, *Rev. Mod. Phys.* **70**, 223 (1998).
- [91] O. Braun and U. Seifert, “Periodically driven stochastic un- and refolding transitions of biopolymers”, *Europhys. Lett.* **68**, 746 (2004).
- [92] J. P. Cleveland, B. Anczykowski, A. E. Schmid, and V. B. Elings, “Energy dissipation in tapping-mode atomic force microscopy”, *Appl. Phys. Lett.* **72**, 2613 (1998).
- [93] I. N. Bronstein, A. Semendjajew, G. Musiol, and H. Mühlig, *Taschenbuch der Mathematik* (Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main, Thun, 2001).

- [94] M. Gao, H. Lu, and K. Schulten, "Simulated refolding of stretched titin immunoglobulin domains", *Biophys. J.* **81**, 2268 (2001).
- [95] D. E. Makarov, P. K. Hansma, and H. Metiu, "Kinetic monte carlo simulation of titin unfolding", *J. Chem. Phys.* **114**, 9663 (2001).
- [96] I. L. Jäger, "The "sticky chain": A kinetic model for the deformation of biological macromolecules", *Biophys. J.* **81**, 1897 (2001).
- [97] E. A. Coddington and N. Levinson, *Theory of Ordinary Differential Equations* (McGraw-Hill Book Company, New York, Toronto, London, 1986).
- [98] S. Cocco and R. Monasson, "Statistical mechanics of torque induced denaturation of DNA", *Phys. Rev. Lett.* **83**, 5178 (1999).
- [99] C. Storm and P. C. Nelson, "The bend stiffness of s-DNA", *Europhys. Lett.* **62**, 760 (2003).
- [100] T. Dauxois and M. Peyrard, "Entropy-driven transition in a one-dimensional system", *Phys. Rev. E* **51**, 4027 (1995).
- [101] D. Cule and T. Hwa, "Denaturation of heterogeneous DNA", *Phys. Rev. Lett.* **79**, 2375 (1997).
- [102] S. Cocco, R. Monasson, and J. F. Marko, "Force and kinetic barriers to unzipping of the DNA double helix", *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 8608 (2001).
- [103] S. Cocco, R. Monasson, and J. F. Marko, "Force and kinetic barriers to initiation of DNA unzipping", *Phys. Rev. E* **65**, 041907 (2002).
- [104] A. Hanke and R. Metzler, "Bubble dynamics in DNA", *J. Phys. A* **36**, 473 (2003).
- [105] M. Ehrmann, *DNA sequences* (<http://www.cf.ac.uk/biosi/staff/ehrmann/tools/dnasequences.htm>, Cardiff, 2001).
- [106] D. F. J. Tees, J. T. Woodward, and D. A. Hammer, "Reliability theory for receptor-ligand bond dissociation", *J. Chem. Phys.* **114**, 7483 (2001).

- [107] B. Heymann and H. Grubmüller, “Dynamic force spectroscopy of molecular adhesion bonds”, *Phys. Rev. Lett.* **84**, 6126 (2000).
- [108] T. Speck, *Diplomarbeit: Statistik der Dissipierten Arbeit* (Inst. f. Theoret. Physik II, Uni Stuttgart, 2004).
- [109] D. T. Leeson, F. Gai, H. M. Rodriguez, L. M. Gregoret, and R. B. Dyer, “Protein folding and unfolding on a complex energy landscape”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 2527 (2000).
- [110] P. G. Bolhuis, “Transition-path sampling of β -hairpin folding”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 12129 (2003).
- [111] M. F. Hagan, A. R. Dinner, D. Chandler, and A. K. Chakraborty, “Atomistic understanding of kinetic pathways for single base-pair binding and unbinding in DNA”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 13922 (2003).
- [112] D. Bartolo, I. Derényi, and A. Ajdari, “Dynamic response of adhesion complexes: Beyond the single path picture”, *Phys. Rev. E* **65**, 051910 (2002).
- [113] C. Jarzynski, “Equilibrium free-energy differences from nonequilibrium measurements: A master equation approach”, *Phys. Rev. E* **56**, 5018 (1997).
- [114] G. E. Crooks, “Path-ensemble averages in systems driven far from equilibrium”, *Phys. Rev. E* **61**, 2361 (2000).
- [115] J. M. Schurr and B. S. Fujimoto, “Equalities for the nonequilibrium work transferred from an external potential to a molecular system. Analysis of single molecule extension experiments”, *J. Phys. Chem. B* **107**, 14007 (2003).
- [116] G. E. Crooks, “Entropy production fluctuation theorem and the nonequilibrium work relation for free energy differences”, *Phys. Rev. E* **60**, 2721 (1999).
- [117] M. R. Shirts, E. Bair, G. Hooker, and V. S. Pande, “Equilibrium free energies from nonequilibrium measurements using maximum-likelihood methods”, *Phys. Rev. Lett.* **91**, 140601 (2003).

- [118] J. Liphardt, S. Dumont, S. B. Smith, I. T. Jr., and C. Bustamante, “Equilibrium information from nonequilibrium measurements in an experimental test of jarzynski’s equality”, *Science* **296**, 1832 (2002).
- [119] M. O. Jensen, S. Park, E. Tajkhorshid, and K. Schulten, “Energetics of glycerol conduction through aquaglyceroporin glpf”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 6731 (2002).
- [120] S. Park, F. Khalili-Araghi, E. Tajkhorshid, and K. Schulten, “Free energy calculation from steered molecular dynamics simulations using jarzynski’s equality”, *J. Chem. Phys.* **119**, 3559 (2003).
- [121] D. A. Hendrix and C. Jarzynski, “A ”fast growth” method of computing free energy differences”, *J. Chem. Phys.* **114**, 5974 (2001).
- [122] F. M. Ytreberg and D. M. Zuckerman, “Efficient use of non-equilibrium measurement to estimate free energy differences for molecular systems”, e-print physics/0403093, (2004).
- [123] D. M. Zuckerman and T. B. Woolf, “Theory of a systematic computational error in free energy differences”, *Phys. Rev. Lett.* **89**, 180602 (2002).
- [124] J. Gore, F. Ritort, and C. Bustamante, “Bias and error in estimates of equilibrium free-energy differences from nonequilibrium measurements”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 12564 (2003).
- [125] G. M. Wang, E. M. Sevick, E. Mittag, D. J. Searles, and D. J. Evans, “Experimental demonstration of violation of the second law of thermodynamics for small systems and short time scales”, *Phys. Rev. Lett.* **89**, 050601 (2002).
- [126] D. M. Carberry, J. C. Reid, G. M. Wang, E. M. Sevick, D. J. Searles, and D. J. Evans, “Fluctuation and irreversibility: An experimental demonstration of a second-law-like theorem using a colloidal particle held in an optical trap”, *Phys. Rev. Lett.* **92**, 140601 (2004).
- [127] A. M. Ferrenberg and R. H. Swendsen, “Optimized monte carlo data analysis”, *Phys. Rev. Lett.* **63**, 1195 (1989).

- [128] W. E. Moerner, “A dozen years of single-molecule spectroscopy in physics, chemistry, and biophysics”, *J. Phys. Chem. B* **106**, 910 (2002).
- [129] T. Speck and U. Seifert, “Distribution of work in isothermal non-equilibrium processes”, arXiv:cond-mat/0406279, (2004).
- [130] F. Ritort, C. Bustamante, and I. T. Jr., “A two-state kinetic model for the unfolding of single molecules by mechanical force”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 13544 (2002).
- [131] W. H. Press, B. P. Flannery, S. A. Teukolsky, and W. T. Vetterling, *Numerical Recipes in C* (Cambridge University Press, Cambridge, 1995).
- [132] J. Grasman and O. A. V. Herwaarden, *Asymptotic Methods for the Fokker-Planck Equation and the Exit Problem in Applications* (Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1999).
- [133] Y. N. Lin’kov, *Asymptotic Statistical Methods for Stochastic processes* (Oxford University Press, Oxford, 2001).
- [134] C. H. Bennett, “Efficient estimation of free-energy differences from monte-carlo data”, *J. Comput. Phys.* **22**, 245 (1976).
- [135] C. L. Martin, “Multiple-histogram method for quantum monte carlo simulation”, *Phys. Rev. B* **59**, 1870 (1999).
- [136] E. Marinari, “Optimized monte carlo methods”, arXiv:cond-mat/9612010, (2003).

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Oliver Braun
Geburtstag	18.05.1974
Geburtsort	Stuttgart

Wissenschaftlicher Werdegang

1994-2000	Physikstudium an der Universität Stuttgart
1997-1998	Studienaufenthalt in USA, Oregon State University
6/2000	Abschluss: Physik-Diplom, Diplomarbeit bei Prof. Dr. R. Friedrich
2000-2001	Wissenschaftlicher Angestellter am III. Inst. f. Theoret. Physik, Universität Stuttgart bei Prof. Dr. R. Friedrich
ab 2002	Wissenschaftlicher Angestellter am II. Inst. f. Theoret. Physik, Universität Stuttgart und Promotion bei Prof. Dr. U. Seifert

Danksagung

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Herrn Prof. Dr. U. Seifert für die wissenschaftliche Betreuung und Förderung der vorliegenden Dissertation und die gelungene, stets positive Zusammenarbeit,
- Herrn Prof. Dr. G. Mahler für die Übernahme des Mitberichtes,
- Andreas Hanke für die engagierte Mitarbeit bei der Veröffentlichung der Ergebnisse,
- Frau W. Meyer-Haake und Frau A. Steinhauser für ihre stets freundliche Hilfsbereitschaft,
- allen meinen Kollegen für die interessanten Diskussionsrunden und das angenehme Arbeitsklima,
- den Kollegen unserer Arbeitsgruppe, besonders Thomas Speck für wichtige Impulse, die in diese Arbeit eingeflossen sind,
- Roman Bedau und Raimar Finken für die Korrekturlesung,
- Isabel Rica Mendez für die Korrekturlesung sowie für die Unterstützung und Förderung meiner Promotion während der gesamten Zeit,
- meiner Familie für ihr Interesse am Fortgang meiner Arbeit.