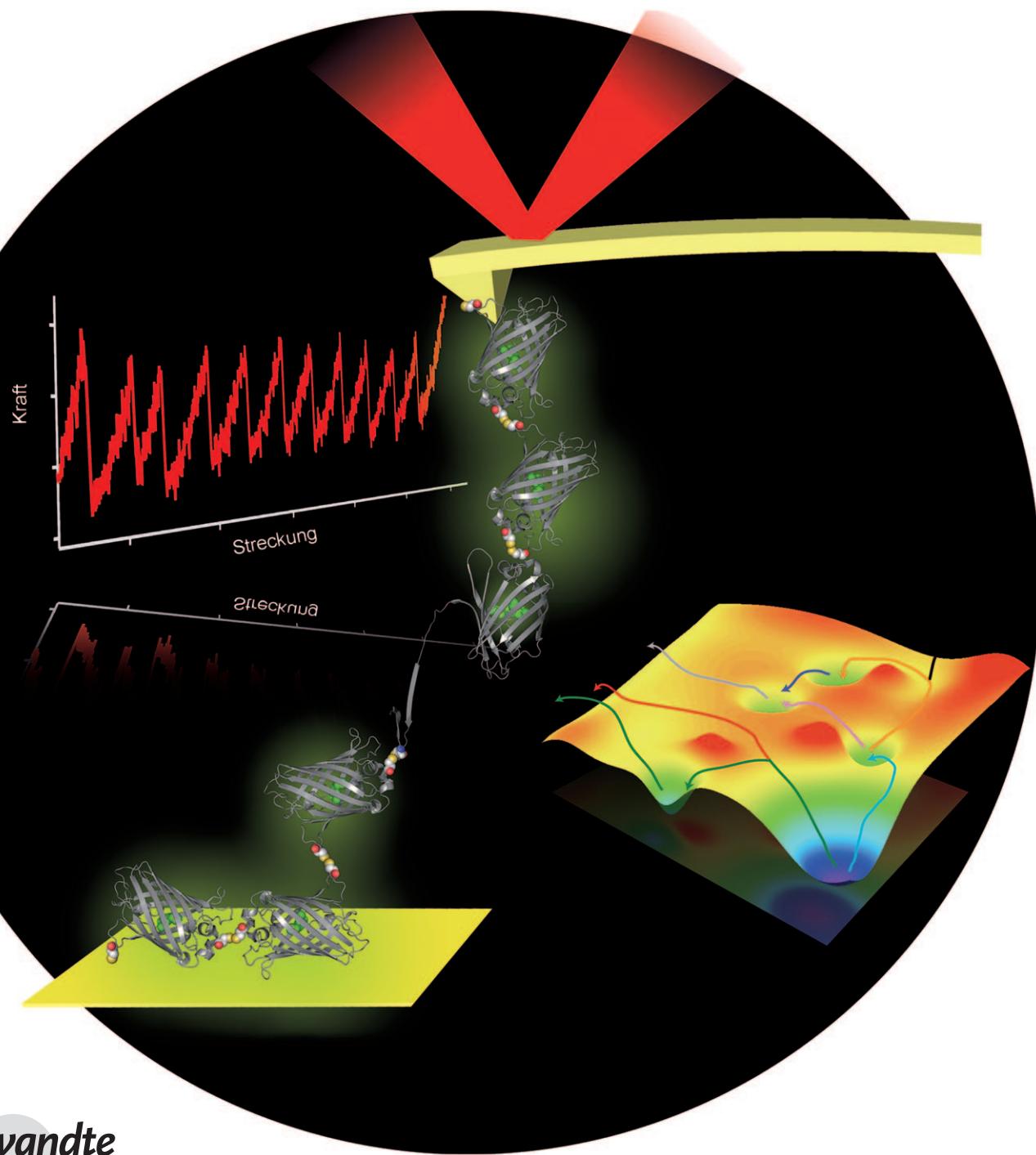


# Mechanische Kontrolle des Entfaltungspfades des grün fluoreszierenden Proteins\*\*

Morten Bertz,\* Andrea Kunfermann und Matthias Rief



Proteinfaltung ist ein komplexer Vorgang, bei dem die Polypeptidkette ausgehend von einer Vielzahl unstrukturierter Zustände eine wohldefinierte gefaltete Raumstruktur einnimmt. Um den Faltungspfad eines Proteins zu beschreiben, werden oft Denaturierungsmittel eingesetzt, die den Übergang zwischen gefaltetem und entfaltetem Zustand induzieren. In einer zellulären Umgebung laufen Faltungs- und Entfaltungsprozesse von Proteinen jedoch oft deutlich anders ab, als dies im Reagenzglas der Fall ist. Als Beispiele seien die Entfaltung und nachfolgende Translokation durch eine Importpore oder in eine molekulare Entfaltungsmaschine genannt. Es ist anzunehmen, dass die beteiligten Faltungs-, Rückfaltungs- und Entfaltungspfade voneinander verschieden sind.<sup>[1]</sup>

Auch mechanische Kräfte können die Entfaltung eines Proteins bewirken. Im Gegensatz zu chemischen Denaturierungsmitteln sind mechanische Kräfte jedoch Vektoren und wirken in wohldefinierten Raumrichtungen auf ein Protein ein. Daher können mittels Einzelmolekülkraftspektroskopie lokale Eigenschaften der Energielandschaft eines Proteins untersucht werden und so direkt auf die dabei durchlaufenen Entfaltungspfade und besetzten Intermediate sowie deren Struktur geschlossen werden.<sup>[2-6]</sup> Solche mechanischen Experimente am grün fluoreszierenden Protein (GFP) haben gezeigt, dass bei einer an N- und C-Terminus anliegenden Kraft zunächst eine N-terminale  $\alpha$ -Helix entfaltet.<sup>[2]</sup> Anschließend werden zwei weitere Intermediate durchlaufen, bei denen sukzessive N-terminale  $\beta$ -Stränge entfernt werden. Die Strukturen dieser Intermediate konnten durch Molekulardynamiksimulationen untermauert werden.<sup>[3]</sup> Interessanterweise wurde auch in Experimenten mit Denaturierungsmitteln ein Intermediate beobachtet; es unterscheidet sich strukturell allerdings deutlich von den mechanisch induzierten Intermediaten.<sup>[7,8]</sup> Dies scheint auf den ersten Blick wenig verwunderlich, da angenommen werden kann, dass die beteiligten Faltungs- und Entfaltungspfade sehr verschieden sind.

Kürzlich wurden gezielt eingeführte Cysteinreste an der Oberfläche des GFP genutzt, um über Disulfidbrücken verknüpfte Polyproteine herzustellen.<sup>[9]</sup> Die Position der Cysteinreste legt dabei die Richtung fest, in der die Kraft auf die Proteinstruktur wirkt. Beim Anlegen einer Kraft an die Aminosäuren 3 und 212 von GFP trat ein weiteres Entfal-

tungsintermediat auf,<sup>[9]</sup> über dessen Struktur bisher jedoch noch nichts bekannt ist.

Hier beschreiben wir, wie sich die Variation der räumlichen Angriffspunkte der Kraft nutzen lässt, um gezielt zwischen zwei verschiedenen Entfaltungspfaden zu schalten. Wir werden zeigen, dass das Scheren des Moleküls parallel zu seinen  $\beta$ -Faltblättern zu einem Entfaltungsintermediat führt, das dem Intermediat in Lösung ähnlich ist. Wirkt die Kraft hingegen senkrecht auf die  $\beta$ -Faltblätter des GFP-Moleküls ein, werden einzelne Sekundärstrukturelemente von der GFP-Struktur abgeschnitten; ein solcher Entfaltungspfad könnte beispielsweise bei Importvorgängen eine Rolle spielen.

In früheren Experimenten wurde bereits gezeigt, dass eine an den Resten 3 und 212 anliegende Kraft zu einer Bifurkation des Entfaltungspfades führt:<sup>[9]</sup> Das Protein entfaltet entweder nach einem Zwei-Zustands-Mechanismus (rote Kreise, Abbildung 1a) oder wird nur partiell entfaltet (grüne Kreise), woraufhin das entstandene Intermediat zusammenbricht (blaue Kreise). Disulfidbrücken oder Glycin-Repeats dienen uns als lokale Sonden, um dieses Intermediat strukturell zu charakterisieren. Beide Sonden bewirken Änderungen des Konturlängenzuwachses nach einem Bruchereignis: Disulfidbrücken verkürzen die gestreckte Polypeptidkette um die Zahl an Aminosäuren zwischen den Cysteinresten.<sup>[3,4]</sup> Glycin-Repeats verlängern das entfaltete Molekül.<sup>[6]</sup> In beiden untersuchten disulfidverbrückten Mutanten von GFP(3-212) – GFP(3-212)25 × 54 (Abbildung 1b) und GFP(3-212)154 × 195 (Abbildung 1c) – konnte die Bifurkation des Entfaltungspfades beobachtet werden (vgl. Hintergrundinformationen). Die Längenzuwachsverteilungen von GFP(3-212) und den Mutanten sind in Abbildung 1e-g gezeigt. Eine Disulfidbrücke, die sich in dem Teil des Proteins befindet, der im partiellen Bruchereignis entfaltet wird, wird die grüne Verteilung zu kürzeren Längenzuwächsen verschieben. Wir beobachten dies für die Mutante GFP(3-212)154 × 195. Die N-terminale Disulfidbrücke 25 × 54 wiederum verkürzt den Längenzuwachs nach der Entfaltung des Intermediats (blaue Verteilung). Wir können damit festhalten, dass GFP in der Zugrichtung (3-212) zunächst C-terminal aufbricht und das entstandene Intermediat von gefalteten Aminosäuren im N-terminalen Bereich gebildet wird. Im alternativen Pfad ohne Intermediat bricht das Molekül wahrscheinlich vom N-Terminus her auf (vgl. Hintergrundinformationen).

Disulfidbrücken als Sonden liefern nur ein grobes Bild der Struktur des Intermediats. Glycin-Repeats hingegen können feinere Strukturinformationen bis hinab zu einzelnen Sekundärstrukturelementen liefern. In der Mutante GFP(3-212)G<sub>6</sub> 116 wurden sechs Glycinreste am N-terminalen Ende von  $\beta$ -Strang 6 eingeführt (Abbildung 1d). In dieser Mutante ist der Längenzuwachs nach der Entfaltung des Intermediats (Abbildung 1h) länger als in GFP(3-212). Dies weist darauf hin, dass  $\beta$ -Strang 6 im Intermediat noch gefaltet ist. Somit besteht das Intermediat von GFP(3-212) aus den  $\beta$ -Strängen 1–6 (Aminosäuren 1–128).

Ein strukturell ähnliches Intermediat ist im Gleichgewicht in Wasserstoff-Deuterium-Austauschexperimenten<sup>[8]</sup> sowie bei der Rückfaltung von säuredenaturiertem GFP beobachtet worden.<sup>[7]</sup> Darüber hinaus stimmen die Grenzen unseres

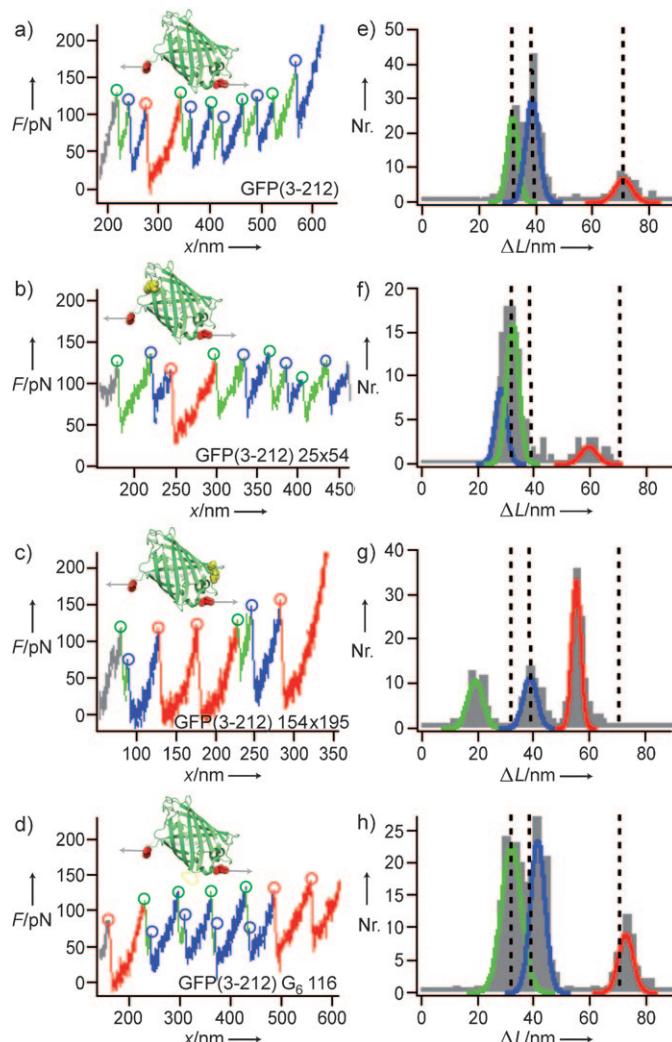
[\*] M. Bertz  
Physikdepartment E22, Technische Universität München  
James-Franck-Straße, 85748 Garching (Deutschland)  
Fax: (+49) 89-289-12523  
E-Mail: morten.bertz@ph.tum.de

Prof. M. Rief  
Physikdepartment E22, Technische Universität München und  
Munich Center for Integrated Protein Science CiPS<sup>M</sup> (Deutschland)

A. Kunfermann  
Department Chemie, Lehrstuhl für Biophysikalische Chemie, Technische Universität München

[\*\*] Wir danken Dr. Hendrik Dietz für wissenschaftliche Inspiration und experimentelle Vorarbeiten. Diese Arbeit wurde unterstützt von der DFG (Grant RI 990/3-1).

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200802987> zu finden.



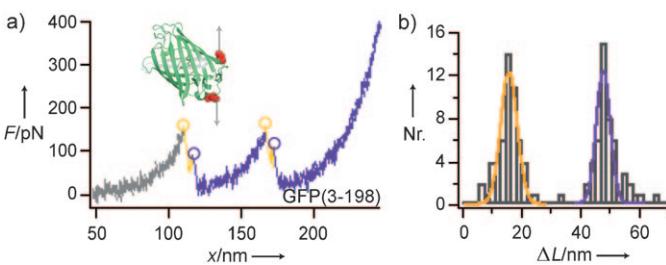
**Abbildung 1.** a)–d) Kraft-Ausdehnungs-Kurven von GFP(3-212) und GFP(3-212)-Varianten. Grüne Kreise markieren partielle Bruchereignisse, blaue die Entfaltung des Intermediats und rote vollständige Bruchereignisse. Nachfolgende Längenzuwächse sind entsprechend eingefärbt. e)–h) Längenzuwachsverteilungen ( $\Delta L$ ) von GFP(3-212) und Varianten (graue Balken). Durchgezogene Linien stellen an die Populationen angepasste Normalverteilungen dar (grün: partieller Bruch, blau: Bruch des Intermediats, rot: vollständiger Bruch). Mittlere Längenzuwächse von GFP(3-212) sind als schwarze gestrichelte Linien dargestellt.

Entfaltungsintermediats mit einem split-GFP überein,<sup>[10]</sup> was die Bedeutung dieses Intermediats für die Faltung weiter unterstreicht. Molekulardynamiksimulationen in Kombination mit Experimenten haben ergeben, dass dieser Teil des GFP für sich genommen bereits strukturiert ist und ein ausgebildetes Chromophor aufweist.<sup>[11]</sup> In kürzlich durchgeföhrten Einzelmoleköl-FRET-Experimenten an der GFP-Variante Citrine wurden ebenfalls zwei Entfaltungspfade während der chemischen Denaturierung beobachtet – allerdings ohne direkte Strukturinformationen. Einer dieser Pfade führt über ein schwach fluoreszierendes Intermediat, während der andere direkt zum entfalteten Zustand führt.<sup>[12]</sup> Es wird gemeinhin angenommen, dass die bei der mechanischen Entfaltung beschrittenen Pfade völlig verschieden von Faltungs-

pfaden in Lösung sind. Unsere Ergebnisse allerdings zeigen, dass der kraftinduzierte Entfaltungspfad von GFP in der Zugrichtung (3-212) dem Gleichgewichtsfaltungs-/entfaltungspfad bemerkenswert ähnlich ist.

Der oben beschriebene Entfaltungspfad von GFP(3-212) unterscheidet sich deutlich von der N-C-terminalen Zugrichtung (3-229) (vgl. Abbildung 3). In GFP(3-229) entfaltet zunächst eine N-terminale  $\alpha$ -Helix, woraufhin N-terminale  $\beta$ -Strände folgen. In GFP(3-229) wirkt die Kraft orthogonal zu den  $\beta$ -Faltblättern, die die GFP-Struktur bilden (siehe Abbildung 3, orangefarbener Pfeil). Dies erlaubt das sukzessive Abschälen („unzipping“) einzelner Sekundärstrukturelemente von der GFP-Struktur. In GFP(3-212) hingegen wirkt die Kraft parallel zu den  $\beta$ -Faltblättern, wodurch diese geschert werden. Offenbar ist es also möglich, durch die Wahl des C-terminalen Kraftangriffspunkts das Moleköl in einen anderen Teil seiner Energielandschaft zu steuern.

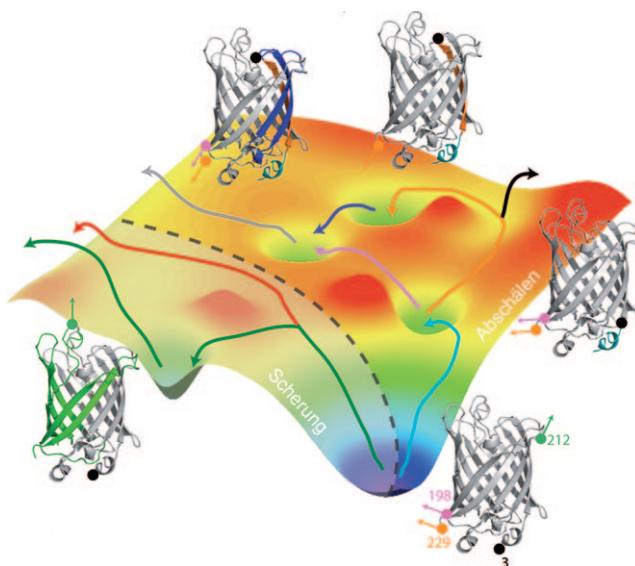
Wenn also der C-terminalen Kraftangriffspunkt derart gewählt wird, dass die Kraft orthogonal zu den  $\beta$ -Faltblättern wirkt, sollte das Moleköl einen Entfaltungspfad ähnlich dem von GFP(3-229) einschlagen. Zu diesem Zweck wurde eine Mutante erstellt, in der die Kraft an den Resten 3 und 198 anliegt (GFP(3-198)). Das Entfaltungsverhalten dieser Mutante (Abbildung 2a) unterscheidet sich deutlich von dem



**Abbildung 2.** a) Kraft-Ausdehnungs-Kurve von GFP(3-198). Das initiale Bruchereignis ist durch einen orangefarbenen Kreis gekennzeichnet, die Entfaltung des Intermediats durch einen violetten Kreis. b) Längenzuwachsverteilungen ( $\Delta L$ ) von GFP(3-198). Durchgezogene Linien stellen angepasste Normalverteilungen dar (orange: partieller Bruch,  $\Delta L = (15.9 \pm 0.7)$  nm, violett: Bruch des Intermediats,  $\Delta L = (48.5 \pm 0.7)$  nm).

von GFP(3-212). Das initiale Bruchereignis führt zu einem Intermediat, von dem aus das Moleköl komplett entfaltet. Der gesamte Längenzuwachs von GFP(3-198) von  $(64.6 \pm 0.5)$  nm ist deutlich geringer als erwartet (69.0 nm). Auch in GFP(3-229) wurde dieser fehlende Längenzuwachs beobachtet und mit der Entfaltung der N-terminalen  $\alpha$ -Helix bei niedrigen Kräften erklärt.<sup>[2]</sup> Darüber hinaus ist das Intermediat von GFP(3-198) konsistent mit dem Entfalten dreier N-terminaler  $\beta$ -Strände, einem Intermediat, das auch auf dem Entfaltungspfad von GFP(3-229) auftritt. Diese beiden Punkte sprechen stark dafür, dass der Entfaltungspfad von GFP(3-198) dem von GFP(3-229) sehr ähnlich ist. Ob dieser „Unzipping“-Entfaltungspfad für physiologische Vorgänge relevant ist, ist nicht völlig klar. Allerdings haben Martin et al. vorgeschlagen, dass ein derartiges Intermediat populiert werden kann, wenn GFP in die Pore der AAA + -Protease ClpXP gezogen wird.<sup>[13]</sup>

In Abbildung 3 ist die komplexe Energielandschaft von GFP dargestellt, wie sie durch Kraftspektroskopie-Experimente in verschiedenen Zugrichtungen zugänglich wird. Wirkt die Kraft senkrecht zu den  $\beta$ -Faltblättern, entfaltet das



**Abbildung 3.** Mechanische Kontrolle über die komplexe Energielandschaft von GFP: Wenn der N-terminale Kraftangriffspunkt unverändert bleibt, erlaubt es die Wahl des C-terminalen Kraftangriffspunkts (orangefarbener Kreis für Aminosäure 229, violetter für 198 und grüner für 212), das Protein in verschiedene Bereiche seiner Energielandschaft zu steuern. Entfaltete Sekundärstrukturelemente sind entsprechend den zugehörigen Übergängen (Pfeile in der Energielandschaft) eingefärbt. Strukturierte Abschnitte der Intermediate sind grau dargestellt.

Molekül über das Abschälen einzelner Strukturelemente, wie für GFP(3-229) und GFP(3-198) gezeigt. In beiden Zugrichtungen entfaltet zunächst eine N-terminale  $\alpha$ -Helix (hellblauer Pfad). In GFP(3-229) werden daraufhin zwei weitere N-terminale Intermediate (orange und dunkelblau) durchlaufen; alternativ dazu führt die Entfaltung vom C-Terminus her direkt zum entfalteten Zustand (schwarz).<sup>[2,3]</sup> Diese Bifurkation und eines der beiden Intermediate werden in GFP(3-198) umgangen (violett).

Das Scheren des Proteins findet in einem anderen Teil seiner Energielandschaft statt (blass wiedergegebener Teil in Abbildung 3): Das Aufbrechen des Moleküls vom C-Terminus aus führt zu einem Intermediat, das aus den ersten sechs

$\beta$ -Strängen besteht (grüner Pfad). Der zweite Pfad (rot) führt direkt zum entfalteten Zustand. Dieser Abschnitt der Energielandschaft enthält ein Energieminimum, dass von GFP auch im Gleichgewicht<sup>[8]</sup> oder auf dem Faltungspfad<sup>[7]</sup> besetzt wird. Damit scheint dieser Pfad ein faltungsartiger Pfad zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass mechanische Kraft einzigartige Möglichkeiten eröffnet, die Energielandschaft eines Proteins zu untersuchen und die Bewegung auf ihr zu steuern. Unsere Experimente erlauben somit ein tiefgreifenderes Verständnis der Energielandschaft eines Proteins. Durch ähnliche Experimente können künftig die Faltungs-/Entfaltungsvorgänge nachgestellt werden, die ein Protein während seines Lebenszyklus in einer Zelle erfährt, wie beispielsweise die Entfaltung beim Transport durch eine Pore.<sup>[14]</sup>

Eingegangen am 22. Juni 2008  
Online veröffentlicht am 11. September 2008

**Stichwörter:** Einzelmoleküluntersuchungen · Protein-Engineering · Proteininfaltung · Proteinstrukturen · Rastersondenverfahren

- [1] A. R. Fersht, V. Daggett, *Cell* **2002**, *108*, 573.
- [2] H. Dietz, M. Rief, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16192.
- [3] M. Mickler, R. I. Dima, H. Dietz, C. Hyeon, D. Thirumalai, M. Rief, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 20268.
- [4] M. Bertz, M. Rief, *J. Mol. Biol.* **2008**, *378*, 447.
- [5] F. Oesterhelt, D. Oesterhelt, M. Pfeiffer, A. Engel, H. E. Gaub, D. J. Müller, *Science* **2000**, *288*, 143.
- [6] M. Carrion-Vazquez, P. E. Marszalek, A. F. Oberhauser, J. M. Fernandez, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11288.
- [7] S. Enoki, K. Saeki, K. Maki, K. Kuwajima, *Biochemistry* **2004**, *43*, 14238.
- [8] J. R. Huang, T. D. Craggs, J. Christodoulou, S. E. Jackson, *J. Mol. Biol.* **2007**, *370*, 356.
- [9] H. Dietz, F. Berkemeier, M. Bertz, M. Rief, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 12724.
- [10] T. Ozawa, S. Nogami, M. Sato, Y. Ohya, Y. Umezawa, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5151.
- [11] V. V. Demidov, N. V. Dokholyan, C. Witte-Hoffmann, P. Chalsani, H. W. Yiu, F. Ding, Y. Yu, C. R. Cantor, N. E. Broude, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 2052.
- [12] A. Orte, T. D. Craggs, S. S. White, S. E. Jackson, D. Kleinerman, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7898.
- [13] A. Martin, T. A. Baker, R. T. Sauer, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 139.
- [14] D. K. West, D. J. Brockwell, E. Paci, *Biophys. J.* **2006**, *91*, L51.