

Überraschend einfache Einzelmolekülmechanik der Faltung von Proteinen**

Michael Schlierf und Matthias Rief*

In den letzten zehn Jahren hat sich die Einzelmolekülkraftspektroskopie zu einer außerordentlich nützlichen Methode entwickelt, um die Entfaltungsenergielandschaft von Proteinen zu untersuchen.^[1,2] Ein entscheidender Vorteil dieser Technik ist die präzise Kontrolle der Reaktionskoordinate. In älteren Kraftspektroskopieexperimenten war die Reaktionskoordinate auf die N-C-terminale Richtung eines Proteins beschränkt. Jedoch wurde kürzlich die Möglichkeit geschaffen, mithilfe von Disulfidbrücken zur Konstruktion von Polyproteinen verschiedene, nahezu beliebige Zugrichtungen in Kraftspektroskopieexperimenten zu verwirklichen.^[3] In diesen Experimenten wurde eine starke Anisotropie der Entfaltungsenergielandschaft beobachtet. Unterschiedliche Zugrichtungen ergaben Entfaltungsraten, die sich über mehrere Größenordnungen erstreckten.^[4] Dagegen wurde bisher die Auswirkung von Kraft auf den Faltungspfad nur selten untersucht, da bei aktiver Faltung wesentlich niedrigere Kräfte auftreten, was mit technischen Herausforderungen verbunden ist.^[5-7] Hier beschreiben wir die Entwicklung von Einzelmolekülexperimenten, um die Anisotropie der Faltungsmechanik eines Proteins unter der Einwirkung von Kraft zu untersuchen.

Die zugrundeliegende Idee und die experimentelle Umsetzung sind in Abbildung 1 skizziert. Die bisweilen übliche Geometrie, um die Mechanik der Proteinfaltung zu untersuchen, ist im obersten Szenario (blau) dargestellt. Eine Aminosäurekette wird am N- und C-Terminus gehalten, sodass die ausgeübte Kraft auf die gesamte Kette wirkt, während das Protein faltet. Für eine Untersuchung des Einflusses von Kraft auf die Faltung eines Proteins wäre es wünschenswert, diese N-C-terminale Zuggeometrie mit anderen Geometrien, in denen die mechanische Kraft nur auf Abschnitte der Kette ausgeübt wird, zu vergleichen (mittleres und unteres Szenario in Abbildung 1). Wir verwendeten das Protein Ubiquitin, das in früheren Faltungs- und Entfaltungsexperimenten bereits untersucht wurde.^[6,8] Es konnte gezeigt werden, dass Ubiquitin gegen eine mechanische Kraft in N-C-terminaler Richtung faltet. Die drei vorgeschlagenen Zuggeometrien aus

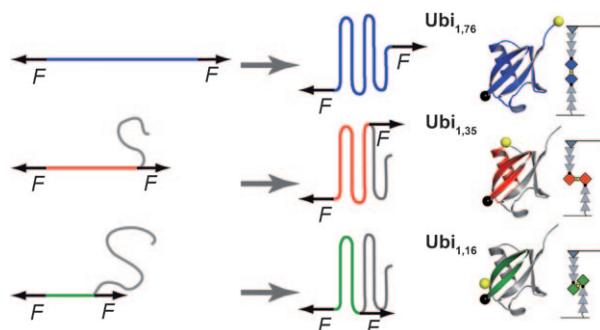


Abbildung 1. Anisotropie der Faltungsmechanik unter äußerer Kraft. In herkömmlichen Experimenten (obere Reihe) wurde die Kraft zwischen N- und C-Terminus des Proteins angelegt (blau). Andere Zugrichtungen ergeben eine teilweise verkürzte, aktiv kontrahierende Polypeptidkette (mittlere und untere Reihe; rot und grün). Die theoretischen Szenarien konnten mithilfe der drei rechts gezeigten Ubiquitinstrukturen verwirklicht werden. Die Anbindung des Ubiquitins an die Oberfläche und die Blattfeder erfolgte über Ig-Moleküle (graue Dreiecke).

Abbildung 1 wurden mithilfe von Cysteinmodifikationen, die eine Wahl des Kraftangriffspunkts ermöglichen, verwirklicht. Die Kraft wurde in der ersten Zuggeometrie durch die Reste 1 und 76 ausgeübt (blau), in der zweiten Geometrie durch die Reste 1 und 35 (rot) und in der dritten Geometrie durch die Reste 1 und 16 (grün). Die Teile der Aminosäurekette, die während des Faltungsprozesses jeweils unter Kraft stehen, sind in den Strukturen in Abbildung 1 farblich hervorgehoben. Der N-Terminus des Ubiquitins wurde über je drei Immunoglobulindomänen (Ig) des humanen Titins (I91-I93) an die Oberfläche und die Blattfeder Spitze gebunden. Titindomänen entfalten im Durchschnitt bei höheren Kräften als Ubiquitin und zeigen eine um ein bis zwei Größenordnungen langsamere Rückfaltung.^[9] Die an den Stellen 76, 35 und 16 eingefügten Cysteine ermöglichen eine Dimerisierung der Konstrukte, wie sie in der rechten Spalte der Abbildung 1 dargestellt ist. In Entfaltungskurven konnte der Entfaltungsfingerabdruck der beiden Ubiquitindomänen eindeutig beobachtet werden (siehe Hintergrundinformationen).

Für die Rückfaltungsexperimente verwendeten wir folgendes Protokoll: Beide Ubiquitindomänen sowie eine bis drei Ig-Domänen wurden zunächst entfaltet. Anschließend wurde die entfaltete und gestreckte Polypeptidkette mit einer kontinuierlichen Geschwindigkeit $v_p = 5 \text{ nm s}^{-1}$ bis auf eine Ausdehnung von ca. 20 nm über der Oberfläche relaxiert. Danach wurde die Polypeptidkette mit der gleichen Geschwindigkeit bis zur anfänglichen Ausdehnung gestreckt. Driftartefakte konnten durch Lock-in-Detektion minimiert werden, indem eine kleine Oszillationsamplitude von 7 nm

[*] Dr. M. Schlierf, Prof. Dr. M. Rief
Physikdepartment E22, TU München
James-Franck-Straße, 85748 Garching (Deutschland)
Fax: (+49) 89-289-12523
E-Mail: mrief@ph.tum.de
Homepage: <http://www.e22.physik.tu-muenchen.de/>

[**] M.S. dankt dem Internationalen Doktorandenkolleg NanoBioTechnologie (IDK-NBT). Der Deutschen Exzellenzinitiative wird für finanzielle Unterstützung im Rahmen der Nanosystem-Initiative München (NIM) gedankt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200804723> zu finden.

auf die Blattfederbewegung moduliert wurde (wie in Lit. [7] beschrieben; siehe auch Hintergrundinformationen). Dieses zusätzliche Lock-in-Signal kann dann verwendet werden, wenn Drift die eindeutige Identifizierung von Faltungereignissen erschwert. Die Faltungereignisse treten als diskrete Ereignisse in Lock-in-Kurven auf (siehe Lit. [7] und Hintergrundinformationen). Die Abbildungen 2 a–c zeigen typische Kraftausdehnungsfaltungskurven (farbig) und anschließende Entfaltungskurven (grau) für die drei Ubiquitinkonstrukte $\text{Ubi}_{1,76}$, $\text{Ubi}_{1,35}$ und $\text{Ubi}_{1,16}$. Die Kurven zeigen jeweils zwei eindeutige Rückfaltungspeaks (schwarze Pfeile) bei niedrigen Kräften und in den anschließenden Entfaltungskurven zwei Entfaltungspeaks bei höheren Kräften. Eine Analyse der Konturlängenveränderungen ermöglicht die Zuordnung dieser Ereignisse zu Faltungs- und anschließenden Entfaltungereignissen von individuellen Ubiquitindomänen der drei Konstrukte. Die theoretisch erwarteten Konturlängenzuwächse der drei Geometrien betragen: $\Delta L_c = 24 \text{ nm}$ für $\text{Ubi}_{1,76}$, $\Delta L_c = 10.9 \text{ nm}$ für $\text{Ubi}_{1,35}$ und $\Delta L_c = 5.3 \text{ nm}$ für $\text{Ubi}_{1,16}$. Wir finden jeweils die Werte $\Delta L_c = 23.5 \text{ nm}$, $\Delta L_c = 10.7 \text{ nm}$ bzw. $\Delta L_c = 5.9 \text{ nm}$.

In früheren Faltungsstudien des N-C-terminal verlinkten Ubiquitins ($\text{Ubi}_{1,76}$) mittels AFM-Kraftklemme wurde ein sehr komplexes Verhalten für den Faltungspfad von Ubiquitin

unter äußerer Kraft beobachtet.^[6] In diesem Fall faltete eine Kette aus mehreren Ubiquitinen durch einen kooperativen Kollaps anstatt in diskreten Einzeldomäenschritten, wie man es für einen einfachen Zweizustandsfalter beobachtet.^[6] Dagegen beobachten wir diskrete Faltungereignisse der individuellen Ubiquitindomänen. Unsere Ergebnisse stimmen gut mit Daten aus Molekulardynamiksimulationen überein.^[10]

Wir haben aus den Rückfaltungereignissen Rückfaltungskraftverteilungen erstellt, wie sie in Abbildung 2 d gezeigt sind. Als Rückfaltungskraft definieren wir die Kraft, von der aus das Rückfaltungereignis startet, d.h. die mit den schwarzen Pfeilen in Abbildung 2 a–c gekennzeichneten Mulden. $\text{Ubi}_{1,76}$ weist die niedrigste mittlere Faltungskraft von $F_{\text{avg}} = 4.0 \pm 0.9 \text{ pN}$ ($n = 44$) sowie die schmalste Rückfaltungskraftverteilung auf. Die mittlere aktive Faltungskraft von $\text{Ubi}_{1,35}$ ist mit $F_{\text{avg}} = 6.8 \pm 1.2 \text{ pN}$ ($n = 41$) höher, bei einer außerdem breiteren Verteilung. Das kürzeste Konstrukt, $\text{Ubi}_{1,16}$, zeigt die höchste mittlere Rückfaltungskraft $F_{\text{avg}} = 11.2 \pm 2.7 \text{ pN}$ ($n = 51$) und die breiteste Verteilung. Anscheinend falten Polypeptidketten, die weniger sich aktiv gegen eine Kraft kontrahierende Aminosäuren enthalten, bei höheren Kräften als Konstrukte, in denen die gesamte Polypeptidkette gegen eine äußere Kraft kontrahieren muss. Wie

kann man dieses Verhalten verstehen? Kürzlich wurden zwei einfache Modelle, die die Proteinfaltung unter Kraft beschreiben, entwickelt.^[7, 11] In diesen Modellen wird angenommen, dass die Einwirkung von äußerer Kraft die FaltungsbARRIERE zusätzlich erhöht, aufgrund des energetischen Aufwandes für die Kontraktion der Polypeptidkette gegen eine Kraft. Unsere Daten ermöglichen nun erstmalig die Überprüfung dieser Modelle.

Die kraftinduzierte zusätzliche FaltungsbARRIERE in Abhängigkeit von der Polypeptidspacerlänge und -elastizität sowie der Blattfederhärte kann wie in Lit. [7] beschrieben berechnet werden. Die sich ergebenen Rückfaltungskraftverteilungen können mithilfe der bekannten kraftfreien Faltungsgeschwindigkeit ($k_f(F=0) = 200 \text{ s}^{-1}$)^[12] und der Polypeptidelastizität^[7] ohne freie Angleichparameter abgeleitet werden. Für $\text{Ubi}_{1,76}$, $\text{Ubi}_{1,35}$ und $\text{Ubi}_{1,16}$ berechneten wir die drei erwarteten Faltungskraftverteilungen unter Berücksichtigung der Länge der kraftbelasteten Polypeptidkette während der Faltung. Die Übereinstimmung zwischen den experimentellen Daten und den berechneten Verteilungen ist erstaunlich (Abbildung 2 d). Es sei darauf hingewiesen,

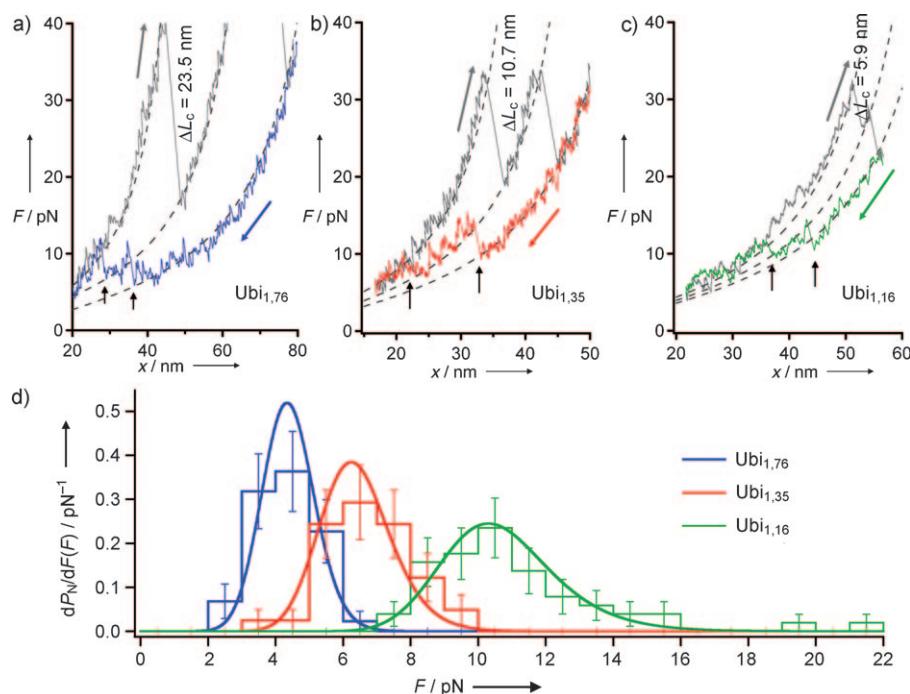


Abbildung 2. Aktive Faltungskraft in unterschiedlichen Zugrichtungen. a) Typische Rückfaltungskraftausdehnungskurve (blau) und anschließende Entfaltungskraftausdehnungskurve (grau) für $\text{Ubi}_{1,76}$. Während der Relaxation des entfalteten $\text{Ubi}_{1,76}$ -Dimers können zwei deutliche Rückfaltungspeaks (schwarze Pfeile) detektiert werden. b) Typische Rückfaltungskraftausdehnungskurve (rot) und Entfaltungskraftausdehnungskurve für $\text{Ubi}_{1,35}$. Die Rückfaltungereignisse (schwarze Pfeile) wurden bei höheren Kräften gemessen als in (a). c) Typische Rückfaltungskraftausdehnungskurve (grün) und Entfaltungskraftausdehnungskurve für $\text{Ubi}_{1,16}$. Trotz des geringen Konturlängenzuwächses ΔL_c konnten die Rückfaltungereignisse (schwarze Pfeile) am einfachsten detektiert werden, da die Kräfte in diesem Szenario am höchsten sind. d) Experimentelle Rückfaltungskraftverteilung von $\text{Ubi}_{1,76}$ (blau, $n = 44$), $\text{Ubi}_{1,35}$ (rot, $n = 41$) und $\text{Ubi}_{1,16}$ (grün, $n = 51$). Die berechneten Faltungskraftverteilungen aus dem einfachen RückfaltungsbARRIEREMODELL sind in entsprechenden Farben dargestellt.

dass nicht nur die mittlere Faltungskraft, sondern auch die Verteilungsbreite nahezu perfekt übereinstimmt. Überraschenderweise kann die Mechanik der Faltung von Proteinen mit unterschiedlichen Kraftangriffspunkten mit nur einer kraftfreien Faltungsrate und einem entropischen Polymerelastizitätsmodell der entfalteten Polypeptidkette beschrieben werden. Entgegen der Entfaltungsmechanik sind Rückfaltungskräfte unabhängig von Feinheiten der endgültigen Tertiärstruktur und der detaillierten Aminosäuresequenz, sofern diese die Polypeptidelastizität nicht verändert. Rückfaltungskräfte von Proteinen können somit gezielt durch die Wahl der Kraftangriffspunkte gestaltet werden. Die hier gefundene einfache Rückfaltungsmechanik für Ubiquitin wurde bereits erfolgreich auch für das Protein ddFilamin verwendet,^[7] sodass wir damit rechnen, dass unser Modell generell für die Beschreibung der Proteinfaltung unter äußerer Kraft anwendbar ist.

Diese einfache Beschreibung der Faltungsenergielandschaft wird naturgemäß nur für Zweizustandsfalter Gültigkeit behalten. Bei Mehrzustandsfaltern sollte die detaillierte Analyse der Rückfaltungskraftverteilung Hinweise auf die Struktur und Dynamik der Faltungzwischenzustände geben. Erst kürzlich konnten wir nachweisen, dass der Faltungzwischenzustand des Aktinvernetzers ddFilamin die aktive Faltungskraft deutlich erhöhen kann und somit dem Protein hilft, unter Krafteinfluss seine native Struktur zu finden.^[7]

Wir konnten hier zeigen, dass eine äußere Kraft die Faltungskinetik von Proteinen beeinflusst, indem sie eine zusätzliche Energiebarriere aufgrund der aktiven Kontraktion gegen die Kraft erzeugt. Die Faltungskinetik kann gut mit einer kraftfreien Faltungsrate und der Anzahl der sich aktiv kontrahierenden Aminosäuren reproduziert werden. Wir

gehen davon aus, dass durch die geschickte Wahl von Kraftangriffspunkten auf einer sich faltenden Polypeptidkette diese Experimente hilfreich bei der Charakterisierung von Faltungzwischenzuständen auf dem Faltungspfad von Proteinen sein können.

Eingegangen am 26. September 2008
Online veröffentlicht am 19. Dezember 2008

Stichwörter: Einzmoleküluntersuchungen · Protein-Engineering · Proteinfaltung · Proteinstruktur

- [1] A. Borgia, P. M. Williams, J. Clarke, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, 77, 101.
- [2] D. J. Brockwell, *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, 35, 1564.
- [3] H. Dietz, M. Bertz, M. Schlierf, F. Berkemeier, T. Bornschlögl, J. P. Junker, M. Rief, *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 80.
- [4] H. Dietz, F. Berkemeier, M. Bertz, M. Rief, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 12724.
- [5] C. Cecconi, E. A. Shank, C. Bustamante, S. Marqusee, *Science* **2005**, 309, 2057.
- [6] J. M. Fernandez, H. Li, *Science* **2004**, 303, 1674.
- [7] M. Schlierf, F. Berkemeier, M. Rief, *Biophys. J.* **2007**, 93, 3989.
- [8] M. Schlierf, H. Li, J. M. Fernandez, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 7299.
- [9] M. Carrion-Vazquez, A. F. Oberhauser, S. B. Fowler, P. E. Marszalek, S. E. Broedel, J. Clarke, J. M. Fernandez, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 3694.
- [10] R. B. Best, G. Hummer, *Science* **2005**, 308, 498; DOI: 10.1126/science.1106969.
- [11] R. B. Best, G. Hummer, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 3706.
- [12] S. E. Jackson, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 1845.