

# Untersuchung der konformationsregulierten Funktion der Titinkinase durch mechanische „pump-and-probe“-Experimente mit einzelnen Molekülen\*\*

Elias M. Puchner und Hermann E. Gaub\*

Die Funktion von Proteinen, wie katalytische Aktivität oder molekulare Erkennung, ist eng verbunden mit deren Konformation und Dynamik. Da Proteinkonformationen durch Kräfte beeinflusst werden, entwickelten sich im Lauf der Evolution passive und aktive Mechanismen, die es biologischen Systemen ermöglichen, auf mechanische Signale zu reagieren. Da diese Kräfte jedoch in vorgegebener Richtung auf Biomoleküle wirken und äußerst gering sind, ist ihre Untersuchung in Ensemble-Experimenten schwierig und muss auf der Ebene einzelner Moleküle durchgeführt werden. Die auf der Rasterkraftmikroskopie (AFM) beruhende<sup>[1]</sup> Einzelmolekül-Kraftspektroskopie<sup>[2]</sup> (EMKS) hat sich zu einer leistungsstarken Technik für die Untersuchung solcher Biomoleküle in deren natürlichem Parameterraum aus Kraft und Ausdehnung entwickelt.<sup>[3,4]</sup> Außerdem weist sie die nötige Auflösung im submolekularen Nanometer- und Pico-Newton-Bereich auf, um intermolekulare Konformationsänderungen und deren Funktion sowohl zu kontrollieren als auch zu detektieren sowie um Proteinfaltung<sup>[5-7]</sup> oder -entfaltung<sup>[8-10]</sup> zu erforschen.

Hier stellen wir ein neues AFM-basiertes Einzelmolekül-Verfahren vor, mit dem sich Proteine sequenziell entlang ihres natürlichen Entfaltungspfades in die verschiedenen Konformationen überführen lassen, wonach deren zugehörige Funktion ausgelesen werden kann. Das Grundprinzip dieser Art von Experiment ist analog zu „pump-and-probe“-Verfahren, die in der NMR- und Ultrakurzzeit-Laserspektroskopie bereits etabliert sind: Zuerst wird ein bestimmter

Zustand eines Ensembles von Molekülen mit einem Laser- oder Radiofrequenzpuls präpariert. Dieser Zustand entwickelt sich nun und wird nach einer bestimmten Zeit mit einem zweiten Puls ausgelesen. Im Fall des hier vorgestellten mechanischen Einzelmolekül-„pump-and-probe“-Verfahrens werden die einzelnen Moleküle nacheinander untersucht, und die Wiederholung des Experimentes resultiert in einem Ensemble von Messkurven, aus dem Werte mit hoher statistischer Sicherheit bestimmt werden können.

Zuerst wird das Protein kontaktiert und zwischen einer piezpositionierbaren Goldoberfläche und der Spitze eines AFM-Federhebels gestreckt, um es in einen bestimmten Konformationszustand zu überführen, der durch die Ausdehnung vorgegeben wird. Diese Konformation wird nun für eine vorgegebene Zeitspanne präpariert, indem die Ausdehnung über einen einfachen Regelkreis konstant gehalten wird. Während dieser Zeit hat das Protein Gelegenheit, die Funktion der präparierten Konformation auszuüben, wie das Binden von Liganden<sup>[4,11,12]</sup> oder katalytische Reaktionen.<sup>[9,13]</sup> Nach dieser Reaktionszeit wird das Protein weiter entfaltet, um mechanisch detektierbare und reaktionsinduzierte Veränderungen der Energielandschaft des Proteins auszulesen. Diese können z. B. in zusätzlichen Barrieren sowie Änderungen der Barrierenhöhe oder -position bestehen. Die räumliche Präzision des AFM ermöglicht es nun, alle unterschiedlichen Konformationen entlang der Zugrichtung selektiv zu präparieren und ihre Kompetenz für die zugehörige Funktion zu überprüfen. Darüber hinaus kann die Nichtgleichgewichtskinetik der Reaktion mit zugehörigen Hin- und Rückgeschwindigkeiten durch Variation der Präparationszeit abgeleitet werden. Wir wenden dieses Verfahren nun an, um die Funktionen der unterschiedlichen Konformationen des Kraftsensors Titinkinase (TK) entlang seines natürlichen mechanischen Aktivierungspfades und in seiner weitgehend natürlichen molekularen Umgebung zu untersuchen. Unsere experimentellen Befunde zeigen, dass die aktivierte und für die Bindung des Cosubstrats Adenosintriphosphat (ATP) kompetente Konformation von zwei Barrieren abgeschirmt wird, die durch physiologische Kräfte in einer streng vorgegebenen Reihenfolge überwunden werden können.

Das autoinhibierte Muskelenzym TK ist an idealer Position in die M-Bandenstruktur des Sarkomers<sup>[14]</sup> integriert, um ein gestörtes Gleichgewicht der Krafterzeugung aufzuspüren.<sup>[15]</sup> Kürzlich wurde in einer Kombination aus Einzelmolekül-Kraftspektroskopie, Moleküldynamiksimulationen und Enzymatik gezeigt, dass die Bindungstasche für das Co-substrat ATP durch eine kraftinduzierte Konformationsänderung aktiviert wird.<sup>[16]</sup> Diese Erkenntnis lässt zusammen

[\*] Prof. Dr. H. E. Gaub  
Lehrstuhl für Angewandte Physik  
Center for Nanoscience and Nanosystems Initiative Munich  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Amalienstraße 54, 80799 München (Deutschland)  
E-Mail: Gaub@lmu.de  
Homepage: <http://www.biophysik.physik.uni-muenchen.de/projects/molecular-force-sensor>

Dr. E. M. Puchner  
Lehrstuhl für Angewandte Physik, Center for Nanoscience und  
Center for Integrated Protein Science Munich, Ludwig-Maximilians-  
Universität München (Deutschland)

[\*\*] Wir danken M. Gautel und seinen Mitarbeitern A. Alexandrovich und B. Brandmeier für die Titinkinase-Proteinkonstrukte sowie S. Stahl, A. Fornof und H. Engelke für hilfreiche Diskussionen. E. M. Puchner dankt dem „International Doctorate Program NanoBio-Technology“ (IDK-NTB) für Unterstützung. Diese Arbeit wurde von der DFG unterstützt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200905956> zu finden.

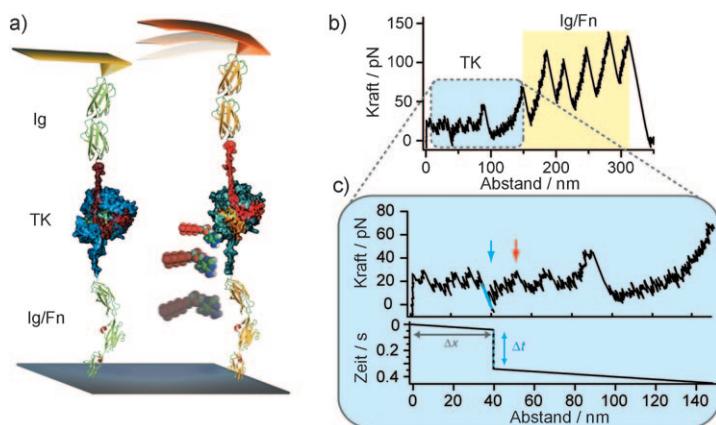
mit dem bisher erforschten Signalweg darauf schließen, dass TK als Kraftsensor agiert, um die Expression von Muskelgenen und Proteineumsatz zu steuern.<sup>[17]</sup> Allerdings gab es bisher keine experimentelle Möglichkeit zu untersuchen, welche der kraftinduzierten Konformationen entlang des komplexen mechanischen Aktivierungsweges diejenige mit aktiverter Bindungstasche ist. Hier wenden wir nun das mechanische Einzelmolekül-„pump-and-probe“-Verfahren an, um vorgegebene TK-Konformationen für bestimmte Zeit und mit hoher Präzision mechanisch zu präparieren. Danach überprüfen wir anhand einer zusätzlichen Barriere im Kraftspektrum, die durch Wechselwirkung von ATP mit der Bindungstasche verursacht wird, ob ATP gebunden hat. Wie in Abbildung 1 dargestellt, wird das natürliche Segment der M-Bande, bestehend aus TK und dem umgebenden Immun-

zusätzliche Barriere und eine Veränderung der Inkremente zu 9.1, 19.4, 10.1, 7.5, 16.4 und  $58.3 \text{ nm} \pm 2\%$  (Details können Lit. [16] entnommen werden).

In einem „pump-and-probe“-Zyklus wird TK zuerst bis zu einer bestimmten Konformation entfaltet, die durch den Abstand zwischen den beiden Enden des gestreckten Proteins festgelegt ist. Diese Konformation wird nun durch Festhalten des Abstands 300 ms präpariert. Währenddessen hat ATP die Möglichkeit, an die präparierte Konformation mit einer durch die Gleichgewichtskonstante bedingten Wahrscheinlichkeit zu binden. Nach dieser Zeit wird TK weiter entfaltet, um anhand der ATP-Barriere auszulesen, ob ATP an diese Konformation gebunden hat oder nicht (Abbildung 1 c). Wie in Abbildung 2 dargestellt, können durch Variation der Position, an der TK präpariert wird, alle Konformationen auf

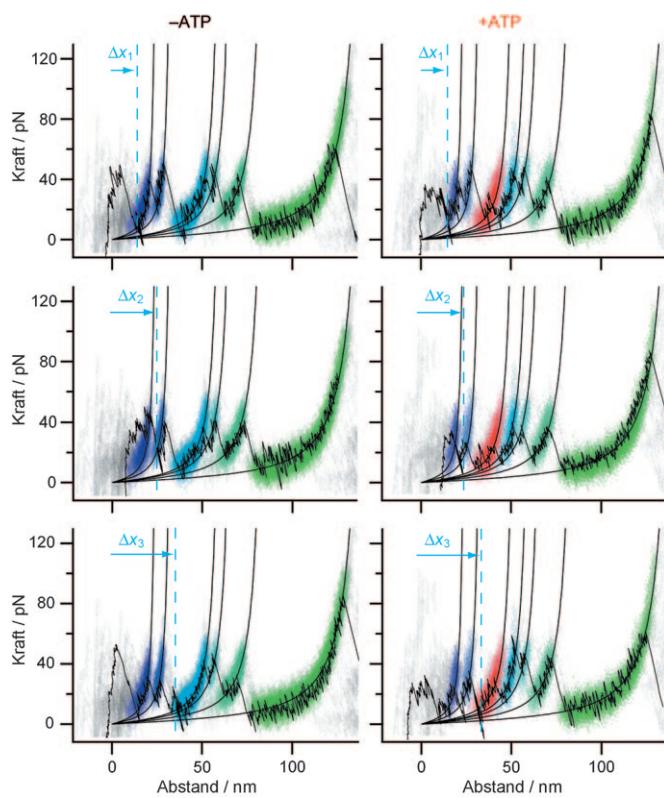
ihre Kompetenz für die ATP-Bindung überprüft werden. Die häufige Wiederholung dieser Experimente und das Zählen der Bindungsereignisse für die jeweilige Konformation ermöglicht nun die Bestimmung der zugehörigen Affinitäten. Abbildung 3 zeigt die Ergebnisse, die offenbaren, dass der Gleichgewichtswert der ATP-Bindung nur gemessen wird, wenn die Konformation nach Barriere 2 präpariert wird. Die beobachteten Werte für die Konformationen vor der ersten Barriere und zwischen den ersten beiden Barrieren entsprechen keinem Hintergrundsignal, sondern sind auf die endliche Zuggeschwindigkeit zurückzuführen. Denn selbst wenn eine geschlossene Konformation 300 ms lang präpariert wurde, ist die Bindungstasche der TK während dem sequenziellen Entfaltungsweg kurze Zeit geöffnet, sodass der zugehörige Nichtgleichgewichtswert beobachtet wird (zum Vergleich ist die in Lit. [16] gemessene Nichtgleichgewichtskinetik in Abbildung 3 dargestellt). Deshalb zeigen diese Befunde, dass die Konformationen vor den ersten beiden Barrieren keine Affinität zu ATP zeigen, wogegen die Konformation nach der zweiten Barriere ATP mit dem Gleichgewichtswert von ca. 350  $\mu\text{M}$  bindet.

Unsere experimentellen Befunde stimmen gut mit an TK durchgeföhrten Moleküldynamiksimulations und deren Vergleich mit EMKS-Experimenten überein und stützen die strukturelle Erklärung des kraftinduzierten Aktivierungspfades aus Abbildung 3 b. Die Titinkinase weist somit eine zweifache, hintereinander geschaltete mechanische Autoinhibition auf, was einem von der Natur raffiniert eingesetzten Mechanismus entspricht, mit dessen Hilfe ein fehlerhaftes Auslösen des Signalweges vermieden und gleichzeitig empfindlich auf Kräfte reagiert werden kann – denn auf der einen Seite dürfen die Barrieren nicht durch thermische Fluktuationen überwunden werden, und auf der anderen Seite sollten die Barrieren niedrig genug sein, dass die physiologischen Kräfte, die auf die M-Banden-Struktur des Muskel-Sarkomers einwirken, ausreichend für die mechanische Aktivierung sind. Das Abschirmen des aktivierten Zustands hinter zwei sequenziellen Barrieren mit genügend niedrigen Kräften ist tatsächlich eine gute Lösung, da die strikte Abfolge es sogar noch unwahrscheinlicher macht, dass beide Barrieren fälschlicherweise überwunden werden.



**Abbildung 1.** Einzelmolekül-„pump-and-probe“-Verfahren. a) In einem Zyklus des Experiments wird das natürliche Proteinkonstrukt aus der Titinkinase und den umliegenden Ig/Fn-Domänen zwischen der Spitze eines AFM-Federhebels und der Oberfläche gestreckt. b) Die aufgezeichneten Kraft-Abstands-Kurven weisen eine strikte Hierarchie auf: Zuerst entfaltet TK bei Kräften unter 50 pN, und danach hinterlassen die fünf Ig/Fn-Domänen ihren Fingerabdruck. c) In einem „pump-and-probe“-Zyklus wird TK bis zu einer bestimmten Konformation gebracht, die durch den Abstand  $\Delta x$  (blauer Pfeil) vorgegeben ist. Diese Konformation wird nun für eine bestimmte Zeitspanne  $\Delta t$ , in der ATP die Möglichkeit zum Binden hat, gehalten. Danach wird TK weiter gedehnt um auszulesen, ob ATP gebunden hat oder nicht. Erfolgreiche Bindung verursacht eine zusätzliche Barriere (roter Pfeil), die mit großer Genauigkeit detektiert wird.

globulin (Ig) und Fibronektin (Fn), in der Gegenwart von 2 mM ATP zwischen der Spitze eines AFM-Federhebels und einer Goldoberfläche gestreckt (Probenvorbereitung, Datenaufnahme und Auswahl der Messkurven erfolgten gemäß Lit. [16]). Die Kraft-Abstands-Kurven, wie in Abbildung 1 b, weisen eine strikte Hierarchie auf und enthalten einen Fingerabdruck,<sup>[18]</sup> der die Identifizierung des Kurventeils ermöglicht, in dem TK sequenziell aktiviert wurde: Am Ende sind fünf Konturlängen-Inkremente mit ca. 30 nm sichtbar, die durch das unabhängige Entfalten der fünf Ig/Fn-Domänen verursacht werden, wogegen der Anfangsbereich niedriger Kraft auf das sequenzielle Aktivieren und Entfalten der TK zurückzuführen ist. Wenn ATP nicht an die aktivierte Bindungstasche bindet, werden fünf unterscheidbare Barrieren mit Konturlängen-Inkrementen von 9.1, 28.6, 7.3, 18.0 und 57.9 nm beobachtet. Das Binden von ATP verursacht eine

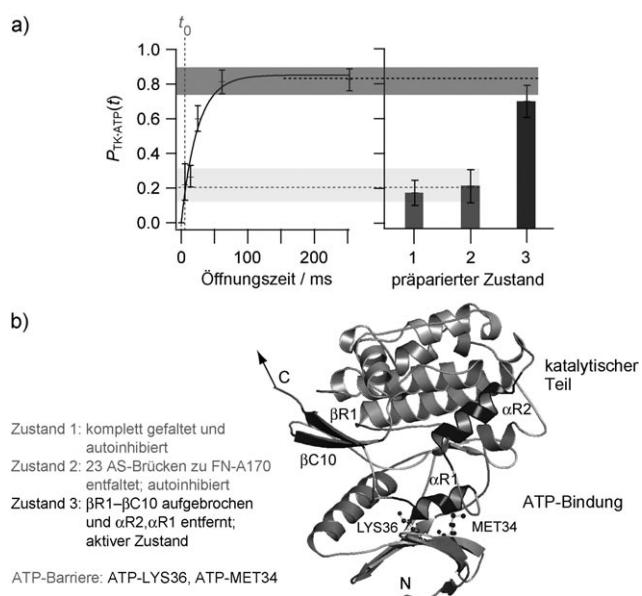


**Abbildung 2.** Untersuchung der verschiedenen Konformationen auf Kompetenz für ATP-Bindung. Die farbige Überlagerung von Messkurven zeigt die fünf aufeinander folgenden Barrieren der TK in der An- und Abwesenheit der ATP-Barriere, die durch Wechselwirkung mit der Bindungstasche verursacht wird. Die schwarzen Kurven sind Beispiele für „pump-and-probe“-Zyklen, in denen die Konformation vor der ersten Barriere, zwischen den ersten beiden Barrieren und nach der zweiten Barriere 300 ms lang präpariert wurde. In allen Fällen wird ein bestimmter Bruchteil an Kurven detektiert, in denen ATP gebunden hat.

Der vorgestellte Einzelmolekülansatz zur Messung von Gleichgewichts- und Nichtgleichgewichtskinetiken an mechanisch präparierten Konformationszuständen ist eine allgemein einsetzbare und nützliche Methode, um auch andere kraft- und konformationskontrollierte Prozesse,<sup>[19]</sup> z.B. bei der Abschirmung von Bindungsstellen<sup>[20,21]</sup> in „catch-bonds“<sup>[22]</sup> oder in Motorproteinen,<sup>[23]</sup> zu untersuchen. Zukünftige Experimente an anderen autoinhibitierten Kinasen, die keine mechanische Funktion aufweisen,<sup>[24,25]</sup> könnten Einblicke in die Evolution von Kraft detektierenden Mechanismen liefern.

### Experimentelles

Das TK-Proteinkonstrukt A168-M2 (867 Aminosäuren von Position 24422 bis 25288 im menschlichen Herz-Titin N2B, Zugangsnummer NP\_003310.3) wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um M. Gautel (King's College London) zur Verfügung gestellt. Die Expression und Aufreinigung ist in den Hintergrundinformationen von Lit. [16] beschrieben. 20 µL Proteinlösung (1 mg mL<sup>-1</sup>) wurden 20 min lang auf einer frisch bedampften Goldoberfläche inkubiert, die anschließend dreimal mit dem Messpuffer aus 40 mM Hepes/KOH, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM Dithiothreitol und 2 mM ATP (pH 7.2)



**Abbildung 3.** Identifizierung des aktiven Zustands und strukturelle Erklärung. a) Links: Nichtgleichgewichtskinetik der ATP-Bindung, die in Lit. [16] publiziert ist. Bei hohen Ziegeschwindigkeiten ist die Bindungstasche nur kurz geöffnet, weshalb eine geringe Wahrscheinlichkeit der ATP-Bindung beobachtet wird, dagegen wird bei langen Öffnungszeiten Sättigung im Gleichgewichtswert gemessen. Rechts: Bindungswerte der verschiedenen Konformationen, die präpariert wurden. Der Wert der ATP-Bindung erreicht nur innerhalb des experimentellen Fehlers den des Gleichgewichts, wenn die Konformation nach der zweiten Barriere präpariert wurde ( $\Delta x_3$  in Abbildung 2). Die Konformationen davor weisen lediglich den Wert auf, der auf die endliche Ziegeschwindigkeit zurückzuführen ist, und zeigen deshalb keine detektierbare Affinität zu ATP. Der Datensatz enthält 273 einzelne „pump-and-probe“-Kurven, und die Fehlerbalken zeigen das jeweilige 95%-Konfidenzintervall. b) Diese Befunde stimmen gut mit der strukturellen Erklärung aus Moleküldynamiksimulationen überein: Vor der ersten Barriere ist TK komplett gefaltet und autoinhibiert, und nach dieser Barriere wird ein 23 Aminosäuren (AS) langes Bindeglied entfernt. Bei der zweiten Barriere bricht das C-terminale β-Faltblatt, sodass die inhibitorischen Strukturelemente αR1 und αR2 das katalytische Zentrum freigeben.

gewaschen wurde. EMKS-Experimente erfolgten mit Bio-Levern A (Olympus) und einem selbst entwickelten AFM,<sup>[26]</sup> das mit Einzelmolekülfloreszenzmessungen kombiniert werden kann.<sup>[27]</sup> Das „pump-and-probe“-Verfahren und die Datenanalyse wurden mit Igor Pro 5.0 (Wavemetrics) programmiert und vom MFP3D-Controller (Asylum Research) ausgeführt. Um die Datenbasis zu vergrößern und statistische Fehler zu minimieren, wurden in Abbildung 3 zwei Datensätze kombiniert: Einer wurde mit einer Zuggeschwindigkeit von 1 µm s<sup>-1</sup> aufgenommen (Abtastfrequenz 2 kHz, 161 Kurven), der andere mit 2 µm s<sup>-1</sup> (Abtastfrequenz 4 kHz, 112 Kurven). Beide Zuggeschwindigkeiten verursachen weitaus kürzere Öffnungszeiten (18 und 9 ms mit einer angenommenen Öffnungslänge von 18 nm), die (verglichen mit der Präparationszeit von 300 ms) weit vom Gleichgewicht entfernt liegen. Da der Unterschied zwischen den Öffnungszeiten von 9 und 18 ms klein ist verglichen mit der Präparationszeit von 300 ms, können beide Datensätze kombiniert werden, ohne den gemessenen Unterschied zwischen Nichtgleichgewichts- und Gleichgewichtsbindung von ATP zu verfälschen. Nach einer Wartezeit auf der Oberfläche von 0.5 s wurden die drei verschiedenen Konformationen bei Abständen von 20, 25 und 45 nm 300 ms lang präpariert, was weit im Gleichgewicht für die ATP-Bindung liegt

(siehe Abbildung 3a). Kurven, die das komplette Entfaltungsprofil der TK aufweisen, wurden automatisch mit einer Methode zur Mustererkennung ausgewählt, die in Lit. [18] beschrieben ist. Da das Proteinkonstrukt an unterschiedlichen Positionen kontaktiert werden kann, sind die Kurven um eine Länge gegeneinander verschoben, die der unterschiedlichen Länge der gefalteten Polypeptidkette entspricht (korrigiert in Abbildung 2). Deshalb maximiert die vorgegebene Präparationslänge lediglich die Wahrscheinlichkeit, eine der Konformationen zu untersuchen, und es kommt vor, dass beispielsweise Zustand 1 oder Zustand 2 bei einer Länge von 25 nm präpariert wird. Allerdings ermöglicht es die klare Signatur, jede einzelne Messkurve verlässlich der richtigen Konformation zuzuordnen (präparierter Zustand in Abbildung 3).

Eingegangen am 22. Oktober 2009  
Online veröffentlicht am 13. Januar 2010

**Stichwörter:** Einzelmoleküluntersuchungen ·  
Laserspektroskopie · Rastersondenverfahren · Sensoren ·  
Enzyme

- 
- [1] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 930.
  - [2] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez, H. E. Gaub, *Science* **1997**, *276*, 1109.
  - [3] E. M. Puchner, H. E. Gaub, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 605.
  - [4] J. P. Junker, F. Ziegler, M. Rief, *Science* **2009**, *323*, 633.
  - [5] J. M. Fernandez, H. Li, *Science* **2004**, *303*, 1674.
  - [6] M. Schlierf, M. Rief, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 835; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 820.
  - [7] S. Garcia-Manyes, L. Dougan, C. L. Badilla, J. Brujic, J. M. Fernandez, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 10534.
  - [8] A. Valbuena, J. Oroz, R. Hervas, A. M. Vera, D. Rodriguez, M. Menendez, J. I. Sulkowska, M. Cieplak, M. Carrion-Vazquez, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 13791.
  - [9] A. Grützner, S. Garcia-Manyes, S. Kotter, C. L. Badilla, J. M. Fernandez, W. A. Linke, *Biophys. J.* **2009**, *97*, 825.
  - [10] D. N. Greene, T. Garcia, R. B. Sutton, K. M. Gernert, G. M. Benian, A. F. Oberhauser, *Biophys. J.* **2008**, *95*, 1360.
  - [11] Y. Cao, M. M. Balamurali, D. Sharma, H. B. Li, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 15677.
  - [12] M. Bertz, M. Rief, *J. Mol. Biol.* **2009**, *393*, 1097.
  - [13] A. P. Wiita, R. Perez-Jimenez, K. A. Walther, F. Grater, B. J. Berne, A. Holmgren, J. M. Sanchez-Ruiz, J. M. Fernandez, *Nature* **2007**, *450*, 124.
  - [14] S. Lange, E. Ehler, M. Gautel, *Trends Cell Biol.* **2006**, *16*, 11.
  - [15] S. Lange, F. Xiang, A. Yakovenko, A. Vihola, P. Hackman, E. Rostkova, J. Kristensen, B. Brandmeier, G. Franzen, B. Hedberg, L. G. Gunnarsson, S. M. Hughes, S. Marchand, T. Sejersen, I. Richard, L. Edstrom, E. Ehler, B. Udd, M. Gautel, *Science* **2005**, *308*, 1599.
  - [16] E. M. Puchner, A. Alexandrovich, A. L. Kho, U. Hensen, L. V. Schäfer, B. Brandmeier, F. Gräter, H. Grubmüller, H. E. Gaub, M. Gautel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 13385.
  - [17] L. Tskhovrebova, J. Trinick, *Curr. Biol.* **2008**, *18*, R1141.
  - [18] E. M. Puchner, G. Franzen, M. Gautel, H. E. Gaub, *Biophys. J.* **2008**, *95*, 426.
  - [19] V. Vogel, M. P. Sheetz, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21*, 38.
  - [20] C. P. Johnson, H. Y. Tang, C. Carag, D. W. Speicher, D. E. Discher, *Science* **2007**, *317*, 663.
  - [21] A. del Rio, R. Perez-Jimenez, R. Liu, P. Roca-Cusachs, J. M. Fernandez, M. P. Sheetz, *Science* **2009**, *323*, 638.
  - [22] W. Thomas, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2008**, *10*, 39.
  - [23] A. D. Mehta, R. S. Rock, M. Rief, J. A. Spudich, M. S. Mooseker, R. E. Cheney, *Nature* **1999**, *400*, 590.
  - [24] M. Good, G. Tang, J. Singleton, A. Remenyi, W. A. Lim, *Cell* **2009**, *136*, 1085.
  - [25] N. A. Sallee, G. M. Rivera, J. E. Dueber, D. Vasilescu, R. D. Mullins, B. J. Mayer, W. A. Lim, *Nature* **2008**, *454*, 1005.
  - [26] S. W. Stahl, E. M. Puchner, H. E. Gaub, *Rev. Sci. Instrum.* **2009**, *80*, 073702.
  - [27] H. Gumpp, S. W. Stahl, M. Strackharn, E. M. Puchner, H. E. Gaub, *Rev. Sci. Instrum.* **2009**, *80*, 063704.