

Nachweis für ein breites Ensemble von Übergangszuständen bei der Faltung von Calmodulin durch Einzelmolekül-Kraftspektroskopie**

Jan Philipp Junker und Matthias Rief*

Die Einzelmolekül-Kraftspektroskopie hat in den letzten Jahren zahlreiche neue Einblicke in die Proteinfaltung und -entfaltung gewährt.^[1–7] Die Verwendung mechanischer Kraft als Denaturans bietet klare Vorteile gegenüber thermischer und chemischer Entfaltung. So kann z.B. die freie Energielandschaft der Proteinfaltung lokal untersucht werden,^[8] und der Entfaltungspfad von Proteinen lässt sich aktiv steuern.^[9] Allerdings wurde in früheren Veröffentlichungen eingewandt, dass sich die Entfaltungspfade, die durch Einzelmolekül-Kraftspektroskopie untersucht werden, stark von den Pfaden bei chemischer Denaturierung unterscheiden könnten,^[10] was einen Vergleich zwischen Einzelmolekül-kraftspektroskopischen Experimenten und konventionellen Faltungsstudien erschweren oder ausschließen würde.

Dieser Einwand wurde bislang nur unter Nichtgleichgewichtsbedingungen überprüft, d.h. unter Bedingungen, die entweder Faltung oder aber Entfaltung begünstigen. Durch die Etablierung der AFM-gestützten Niedrig-Drift-Kraftspektroskopie ist es jüngst möglich geworden, Proteinfaltung und -entfaltung unter Gleichgewichtsbedingungen zu untersuchen, wodurch die Beobachtung etlicher Faltungs-/Entfaltungs-Übergänge eines einzelnen Proteinmoleküls in einer einzigen Messkurve gelingt.^[7,11] Hier untersuchen wir Faltungs- und Entfaltungspfade des Calcium-abhängigen Signalmoleküls Calmodulin (CaM) nahe am thermodynamischen Gleichgewicht, indem wir Kraft in verschiedenen Zuggeometrien anlegen. CaM ist ein kleines Protein, das aus zwei Domänen besteht, die in AFM-Experimenten beide Zwei-Zustands-Faltung zeigen.^[7] Anhand der hier vorgestellten Experimente können wir unterscheiden, ob die Faltungs- und Entfaltungspfade in unterschiedlichen Zugrichtungen nahe am Gleichgewicht auf einen gemeinsamen Pfad

konvergieren, und wir können herausfinden, ob ein spezifischer kraftfreier Pfad („Nullkraftpfad“) existiert.

Für Einzelmolekül-kraftspektroskopische Experimente werden üblicherweise Proteinkonstrukte wie das in Abbildung 1a gezeigte genutzt, wobei das zu untersuchende Protein (z.B. CaM) auf DNA-Ebene zwischen Proteindomänen eingebaut wird, die quasi als Griffe für die Anbindung an die Oberfläche und die AFM-Blattfederspitze dienen, sodass ein einzelnes Multidomänen-Protein exprimiert wird. Allerdings ist diese Technik auf N-C-terminale Zugrichtungen beschränkt. Wir haben eine Methode für die Erstellung wohldefinierter Heteropolymere mit nahezu frei wählbaren Kraftangriffspunkten entwickelt, die an die Merrifield-Synthese angelehnt ist und bei der das Proteinkonstrukt aus einzeln exprimierten Protein-Bausteinen in Lösung auf Protein-Ebene zusammengesetzt wird (Abbildung 1b). Griff-Proteine mit einem 6 × His-Tag werden zunächst an eine Ni^{2+} -NTA-Matrix (NTA = Nitrilotriessigsäure) gebunden, daraufhin werden das zu untersuchende Protein und wiederum Griff-Proteine als Kettenabschluss (beide ohne His-Tag) schrittweise durch Bildung von Disulfid-Brücken ange-

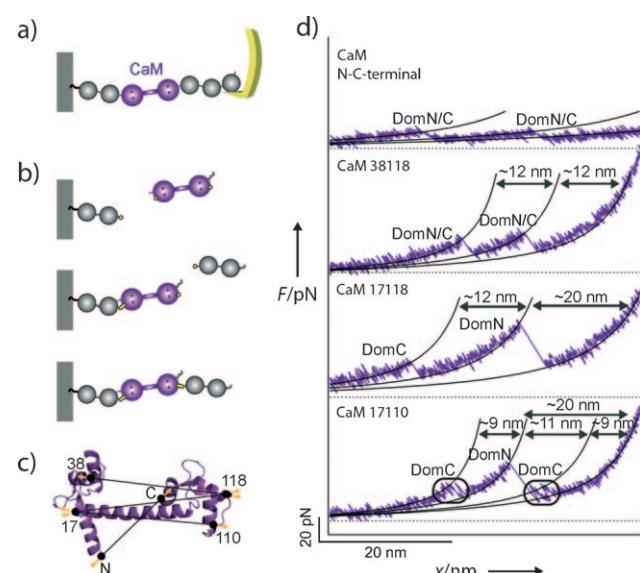


Abbildung 1. a) Prinzip des experimentellen Aufbaus. Das Proteinkonstrukt besteht aus CaM (violett) und Griff-Domänen (grau). b) Schrittweise Synthese von wohldefinierten Heteropolymeren mit alternativen Zuggeometrien. c) Struktur von CaM mit Skizze der untersuchten Zugrichtungen. d) Beispielkurven von CaM in vier verschiedenen Zugrichtungen bei $\nu_{\text{zieh}} = 50 \text{ nm s}^{-1}$. Die Kurven zeigen zwei Entfaltungseignisse, was darauf hindeutet, dass beide Domänen von CaM unabhängig voneinander entfalten. Wechsel der Kraftangriffspunkte führt zu deutlich unterschiedlichen Entfaltungskräften.

[*] Prof. M. Rief

Physik-Department E22, Technische Universität München
Munich Center for Integrated Protein Science CiPS^M
James-Franck-Straße, 85748 Garching (Deutschland)
Fax: (+49) 89-289-12523
E-Mail: mrief@ph.tum.de

Dr. J. P. Junker
Physik-Department E22, Technische Universität München
James-Franck-Straße, 85748 Garching (Deutschland)

[**] Wir danken Dr. M. Schlierf für inspirierende Diskussionen sowie M. Bertz und F. Ziegler für Hilfe bei der Erstellung des Manuskripts. Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Antrag RI 990/3-1, für finanzielle Unterstützung. J.P.J. wurde vom Internationalen Graduiertenkolleg „Materials Science of Complex Interfaces“ gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200905747> zu finden.

fügt.^[12,13] Die Cystein-Reste des zu untersuchenden Proteins können durch das Kupplungsreagens Dithiodipyridin geschützt werden, um die Bildung von Homopolymeren zu vermeiden (siehe Hintergrundinformationen).

Wir haben diese Technik dazu verwendet, die Entfaltungskinetik einzelner CaM-Moleküle in drei Nicht-N-C-terminalen Richtungen zu untersuchen (Abbildung 1c). Durch Mutieren der Aminosäuren 38 und 118 in Cystein-Reste (CaM 38118) erhöhen sich die mittleren Entfaltungskräfte der N- und der C-terminalen Domäne von CaM (DomN und DomC) auf ca. 25 pN bei einer Ziehgeschwindigkeit v_{zieh} von 50 nm s⁻¹, im Vergleich zu ca. 13 pN in N-C-terminaler Richtung^[7] (Abbildung 1d). Die gemessenen Längenzuwächse von 12 nm für beide Domänen entsprechen exakt den erwarteten Werten (siehe Hintergrundinformationen). Damit sind die beiden Domänen in dieser Zugrichtung ununterscheidbar. Durch Verändern des Kraftangriffspunkts an DomN von Aminosäurerest 38 zu 17 (CaM 17118) erhöht sich der Konturlängenzuwachs von DomN auf ca. 20 nm, was wiederum voll und ganz mit dem Erwartungswert übereinstimmt. Interessanterweise steigen in dieser Zugrichtung die Entfaltungskräfte noch weiter auf ca. 40 pN an. Die Entfaltungskraft von DomC bleibt dagegen unverändert. Dies legt nahe, dass die beiden Domänen von CaM unabhängig voneinander entfalten. Wird der C-terminalen Kraftangriffspunkt zusätzlich zu Aminosäurerest 110 verändert (CaM 17110), so ändert sich die Entfaltungskraft von DomC nicht in nennenswertem Maße. Allerdings können nun auch Rückfaltungsergebnisse beobachtet werden, was in Übereinstimmung mit der Beobachtung ist, dass durch Verkürzen der Konturlänge, die unter Kraft gesetzt wird, die Faltungsgeschwindigkeit unter Kraft ansteigt.^[8] Für CaM 17110 können nun Gleichgewichtsübergänge von DomC an zwei Stellen in der Kurve beobachtet werden, vor und nach der Entfaltung von DomN. Dies ist darauf zurückzuführen, dass DomC nun zurückfaltet, sobald die anliegende Kraft niedriger als ca. 15 pN ist (siehe eingekreiste Segmente in Abbildung 1d, untere

Teilgrafik). Somit finden wir für CaM, ähnlich wie bei Experimenten mit E2lip3^[14] und GFP^[12] eine ganze Bandbreite von mechanischen Stabilitäten in verschiedenen Richtungen.

Als nächstes untersuchten wir auch die Faltung gegen mechanische Kraft bei unterschiedlichen Kraftangriffspunkten, um gezielt unterschiedliche Pfade anzusteuern. Zur Vereinfachung der Dateninterpretation verwendeten wir Proteinkonstrukte mit isolierter DomN, wobei wir den N-terminalen Kraftangriffspunkt variierten (Aminosäurereste 1, 17 oder 38, siehe auch Skizzen in Abbildung 2a–c). Der C-terminalen Kraftangriffspunkt wurde dagegen unverändert am C-Terminus von DomN belassen, entsprechend zu DomN im vollständigen CaM (Abbildungen 1b und c). Abbildungen 2a und b zeigen typische Vorwärts-Rückwärts-Ziehzyklen von DomN 17 und DomN 38, die bei einer Ziehgeschwindigkeit von 10 nm s⁻¹ aufgezeichnet wurden. Wie zuvor sind die Entfaltungskräfte von DomN 17 deutlich höher als die von DomN 38, und die Hysterese zwischen Vorwärts- und Rückwärtskurve, die ein Maß dafür darstellt, wie weit der Ziehzyklus vom Gleichgewicht entfernt ist, ist deutlich höher für DomN 17 (siehe auch Abbildung S1). Die Gleichgewichtsenergetik wurde zusätzlich durch Verwendung des Crooks-Fluktuationstheorems bestätigt (Abbildung S2).^[15] Bei dieser Ziehgeschwindigkeit befindet sich DomN 1, die am wenigsten stabile der untersuchten Zugrichtungen, bereits im Gleichgewicht bezüglich der Faltung (Abbildung 2c), sodass zahlreiche Übergänge in einer einzelnen Kurve beobachtet werden können.

Wir ermittelten Rückfaltungskraftverteilungen durch Messen der Kraft für das erste Rückfaltungsergebnis beim Annähern der Blattfeder an die Oberfläche (Pfeile in Abbildung 2a–c) und analysierten die Rückfaltungskräfte mit einem Modell, in dem die Faltungsgeschwindigkeit k_f der einzige freie Parameter ist.^[8,16,17] Durch Vergleich der Rückfaltungskraftverteilungen mit Monte-Carlo-Simulationen (siehe Hintergrundinformationen) finden wir, dass eine Nullkraft-Faltungsgeschwindigkeit $k_f = 50\,000 \text{ s}^{-1}$ die Daten

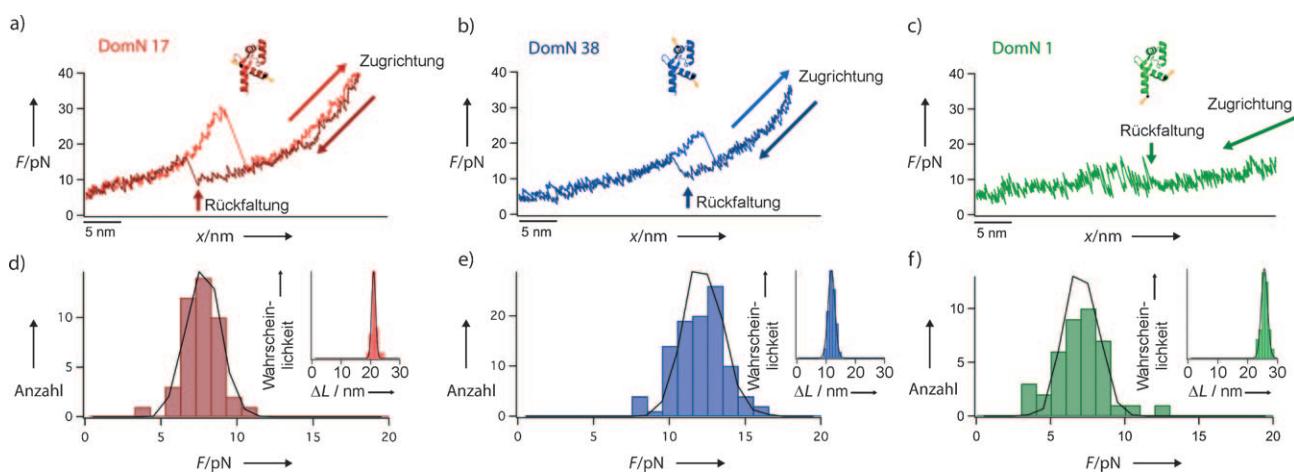


Abbildung 2. a) Entfaltungs- (hellrot) und Rückfaltungskurve (dunkelrot) von DomN 17 bei $v_{zieh} = 10 \text{ nm s}^{-1}$. b) Entfaltungs- (hellblau) und Rückfaltungskurve (dunkelblau) von DomN 38 bei $v_{zieh} = 10 \text{ nm s}^{-1}$. c) Faltungs-/Entfaltungskurve von DomN 1 im Gleichgewicht bei $v_{zieh} = 10 \text{ nm s}^{-1}$. d–f) Rückfaltungskraftverteilungen von DomN 17, 38 und 1. Ergebnisse aus Monte-Carlo-Simulationen mit $k_f = 50\,000 \text{ s}^{-1}$ sind als schwarze Kurven gezeigt. Die Einschübe zeigen Histogramme für die Konturlängenzuwächse der Entfaltungsübergänge. Die Mittelwerte sind $20.7 \pm 1.2 \text{ nm}$ für DomN 17, $11.8 \pm 1.2 \text{ nm}$ für DomN 38 und $25.6 \pm 1.3 \text{ nm}$ für DomN 1.

im Rahmen der experimentellen Genauigkeit für alle Zugrichtungen reproduzieren kann (Abbildung 2d–f). Dieser Befund legt nahe, dass die Faltungspfade für alle Zugrichtungen entweder gleich sind oder zumindest über Übergangszustände mit ähnlicher freier Energie verlaufen.

Um die Entfaltungspfade von CaM genauer zu verstehen, bestimmten wir die mittlere Entfaltungskraft von DomN in drei Richtungen bei unterschiedlichen Ziegeschwindigkeiten (Abbildung 3a). Die Analyse der Geschwindigkeitsabhängigkeit von Entfaltungskräften ist eine sehr empfindliche Methode zur Unterscheidung zwischen verschiedenen Pfaden bei Einzelmolekül-kraftspektroskopischen Experimenten zur Proteinfaltung. Verschiedene Pfade mit unterschiedlichen Werten für Δx_{N-TS} (Abstand zwischen nativem Zustand N und Übergangszustand TS auf der Reaktionskoordinate, siehe auch Abbildung 3c) führen zu unterschiedlichen linearen Steigungen, wenn die mittlere Entfaltungskraft F_{mittel} als Funktion von $\lg v_{\text{zieh}}$ dargestellt wird.^[10,18] Wir finden einen klaren linearen Zusammenhang zwischen F_{mittel} und $\lg v_{\text{zieh}}$ für alle drei Zugrichtungen, was nahelegt, dass beim Übergang von Gleichgewichts- zu Nichtgleichgewichtsbedingungen keine Pfadwechsel stattfinden. Die Steigungen sind allerdings für die drei Zugrichtungen deutlich unterschiedlich, was uns

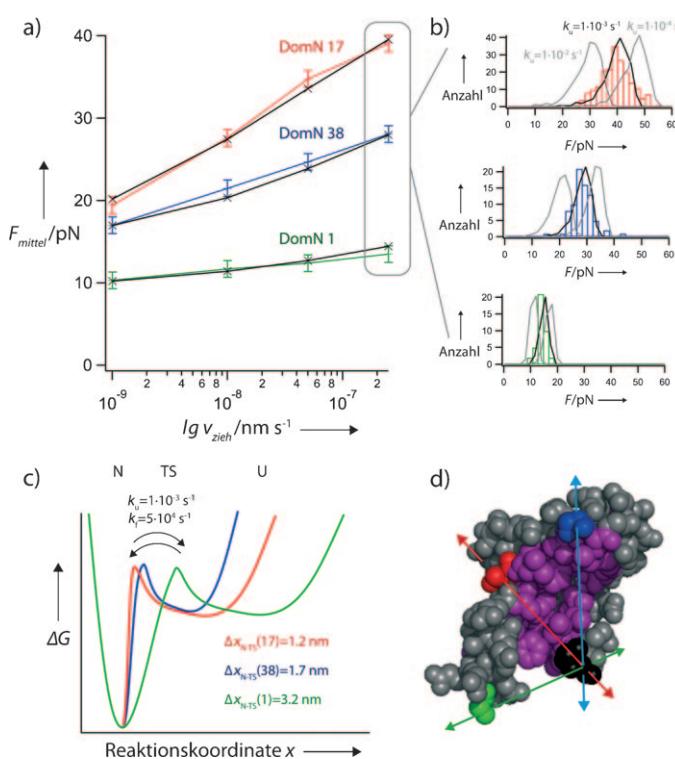


Abbildung 3. a) Geschwindigkeitsabhängigkeit der mittleren Entfaltungskräfte von DomN. Ergebnisse aus Monte Carlo-Simulationen sind in Schwarz gezeigt. b) Entfaltungskraftverteilungen von DomN 17, DomN 38 und DomN 1 bei $v_{\text{zieh}} = 250 \text{ nm s}^{-1}$. Schwarze Kurven: Monte-Carlo-Simulationen mit $k_u = 0.001 \text{ s}^{-1}$; graue Kurven: Simulationen mit um einen Faktor 10 höherer oder niedriger Entfaltungsgeschwindigkeit. c) Freie Energienlandschaften, extrapoliert auf Nullkraft. d) Struktur von DomN. Die experimentell variierten N-terminalen Kraftangriffspunkte sind rot, blau und grün dargestellt, der C-terminale Kraftangriffspunkt ist schwarz gezeigt. Der hydrophobe Kern von CaM, der bei gebundenem Ca^{2+} zum Teil lösungsmittellexponiert ist, ist violettblau dargestellt.

zeigt, dass die Potentialbreite Δx_{N-TS} für die drei Zugrichtungen unterschiedliche Werte annimmt. Dies ist ein direkter Hinweis darauf, dass bei der Entfaltung für jede Zuggeometrie ein anderer Pfad vorliegt.

Wie können wir nun die Beobachtung von scheinbar ähnlichen Faltungspfaden mit klar unterschiedlichen Entfaltungspfaden in Einklang bringen? Aus Gründen der Mikroreversibilität müssen die Pfade für Faltung und Entfaltung im thermodynamischen Gleichgewicht für jede einzelne Zuggeometrie identisch sein. Daher müssen auch die Faltungspfade unterschiedlich sein, wenn sich die Entfaltungspfade für die verschiedenen Zugrichtungen unterscheiden. Auch wenn die entfalteten Zustände für die drei Zugrichtungen verschieden sind, da unterschiedliche Segmente der Polypeptidkette unter Kraft stehen, gibt es Hinweise darauf, dass die entfalteten Zustände ähnliche freie Enthalpien haben. Unsere Analyse mittels des Crooks-Fluktuationstheorems (siehe Hintergrundinformationen) führt zu Werten für die freie Energie der Proteinfaltung von DomN 17 und 38, die in guter Übereinstimmung mit dem bereits früher bestimmten Wert für DomN 1 sind.^[7] Es ist an dieser Stelle wichtig festzuhalten, dass in dieser Analyse die trivialen Unterschiede in der freien Enthalpie des entfalteten Zustands, die vom Streichen unterschiedlich langer entropischer Ketten herrühren, durch Modelle für die Polymerelastizität herausgerechnet werden. Darüber hinaus sind nicht-native Wechselwirkungen im entfalteten Zustand oft schwach im Vergleich zur thermischen Energie.^[19]

Aus diesem Grund erfordern die identischen Nullkraft-Faltungsgeschwindigkeiten, die wir für die drei mechanisch induzierten Pfade finden, auch identische Nullkraft-Entfaltungsgeschwindigkeiten. Wir sind jetzt in der Lage, diese Voraussage anhand von Monte-Carlo-Simulationen zu überprüfen. Im Rahmen der experimentellen Genauigkeit können die experimentellen Daten für alle drei Pfade durch eine identische Nullkraft-Entfaltungsgeschwindigkeit von $k_u = 0.001 \text{ s}^{-1}$ reproduziert werden, indem wir lediglich Δx_{N-TS} variieren (schwarze Linien in Abbildung 3a). Als Kontrolle zeigen wir in Abbildung 3b, dass diese Parameter auch die bei 250 nm s^{-1} gemessenen Entfaltungskraftverteilungen korrekt reproduzieren. Das bedeutet, dass die extrapolierte Nullkraft-Faltungs- und -Entfaltungsgeschwindigkeit für alle drei untersuchten Zugrichtungen den selben Wert hat, obwohl die Faltungs-/Entfaltungspfade strukturell klar verschieden sind. In Abbildung 3c ist die freie Energienlandschaft für die drei Zugrichtungen schematisch dargestellt, wobei die Barriehöhe für jede Richtung die gleiche ist. Wenn wir uns die Struktur von DomN vor Augen führen (Abbildung 3d), können wir einen Hinweis auf einen möglichen Grund für die unterschiedlichen Potentialbreiten finden. Während die geringen Potentialbreiten von DomN 17 und DomN 38 Richtungen entsprechen, bei denen Kraft direkt an den hydrophoben Kern von DomN angelegt wird (violett in Abbildung 3d), entspricht die große Potentialbreite von DomN 1 einem Kraftangriffspunkt am Ende einer α -Helix, die vom hydrophoben Kern wegführt. Möglicherweise erscheint dass Protein entlang dieser Richtung „weicher“, mit einem größeren Wert für Δx_{N-TS} , da hier

zunächst die α -Helix deformiert werden kann, bevor die ganze Struktur von DomN zusammenbricht. In einer einfachen Analogie könnte die N-terminale α -Helix von DomN als „Hebel“ wirken, der die Ausdehnung vergrößert und die zur Entfaltung von DomN 1 nötige Kraft senkt.

In den drei untersuchten Zugrichtungen sind die Strukturen der Übergangszustände vermutlich sehr unterschiedlich, da sie entlang verschiedener Koordinaten polarisiert sind. Die Beobachtung, dass für alle Geometrien die gleiche Faltungs- und Entfaltungskinetik vorliegt, ist ein direktes experimentelles Indiz für ein breites und energetisch entartetes Ensemble von Übergangszuständen, wie es für schnell faltende Proteine bereits vorhergesagt wurde.^[20,21]

Als Zusammenfassung können wir festhalten, dass wir Einzelmolekül-Kraftspektroskopie verwendet haben, um gezielt strukturell unterschiedliche Pfade zu besetzen und deren Faltungs-/Entfaltungskinetik zu untersuchen. Anstelle des zuvor postulierten Pfadwechsels zu einem Nullkraftpfad mit höherer Entfaltungsgeschwindigkeit^[10] beobachten wir verschiedene Pfade mit ähnlicher Energetik. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei Nullkraftbedingungen eine Vielzahl energetisch äquivalenter Pfade die Faltung und Entfaltung von CaM dominieren.

Der geringe Grad an nicht-nativen Wechselwirkungen auf dem Faltungspfad und die vergleichsweise hohe Konformationsentropie des Übergangszustands, die in einem solchen Szenario vorliegen würden, könnten eine Voraussetzung für ultraschnell faltende Proteine auf der μ s-Zeitskala sein.^[22] Darüber hinaus deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die extrapolierten Nullkraftgeschwindigkeiten aus Einzelmolekül-kraftspektroskopischen Experimenten nahe am Gleichgewicht trotz unterschiedlicher Pfade vergleichbar zu durch chemische Denaturierung bestimmten Geschwindigkeiten sein können. Für langsamer faltende Proteine mit wohldefinierten Übergangszuständen könnte dagegen ein anderes Faltungsverhalten vorliegen. Die Beantwortung der Frage, ob die Robustheit der Barrierenhöhen in Einzelmolekül-kraftspektroskopischen Experimenten eine allgemeine Eigen-

schaft kleiner α -helicaler Proteine nahe am Gleichgewicht ist, wird eine wichtige Aufgabe für zukünftige Arbeiten sein.

Eingegangen am 13. Oktober 2009,
veränderte Fassung am 3. Dezember 2009
Online veröffentlicht am 29. März 2010

Stichwörter: Calmodulin · Einzelmolekül-Untersuchungen · Kraftspektroskopie · Proteinfaltung · Proteinstrukturen

- [1] A. F. Oberhauser, M. Carrion-Vazquez, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 6617.
- [2] A. Borgia, P. M. Williams, J. Clarke, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 101.
- [3] J. M. Fernandez, P. E. Marszalek, H. Lu, H. Li, M. Carrion-Vazquez, A. F. Oberhauser, K. Schulter, *Nature* **1999**, *402*, 100.
- [4] C. Cecconi, E. A. Shank, C. Bustamante, S. Marqusee, *Science* **2005**, *309*, 2057.
- [5] M. Kessler, K. E. Gottschalk, H. Janovjak, D. J. Muller, H. E. Gaub, *J. Mol. Biol.* **2006**, *357*, 644.
- [6] Q. Peng, H. Li, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 1885.
- [7] J. P. Junker, F. Ziegler, M. Rief, *Science* **2009**, *323*, 633.
- [8] M. Schlierf, M. Rief, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 835; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 820.
- [9] M. Bartz, A. Kunfermann, M. Rief, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8314; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8192.
- [10] P. M. Williams, S. B. Fowler, R. B. Best, J. L. Toca Herrera, K. A. Scott, A. Steward, J. Clarke, *Nature* **2003**, *422*, 446.
- [11] J. P. Junker, M. Rief, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 14361.
- [12] H. Dietz, F. Berkemeier, M. Bartz, M. Rief, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 12724.
- [13] H. Dietz, M. Bartz, M. Schlierf, F. Berkemeier, T. Bornschlogl, J. P. Junker, M. Rief, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 80.
- [14] D. J. Brockwell, E. Paci, R. C. Zinober, G. S. Beddard, P. D. Olmsted, D. A. Smith, R. N. Perham, S. E. Radford, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 731.
- [15] G. E. Crooks, *J. Stat. Phys.* **1998**, *90*, 1481.
- [16] M. Schlierf, F. Berkemeier, M. Rief, *Biophys. J.* **2007**, *93*, 3989.
- [17] R. B. Best, G. Hummer, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3706.
- [18] E. Evans, K. Ritchie, *Biophys. J.* **1997**, *72*, 1541.
- [19] E. Paci, M. Vendruscolo, M. Karplus, *Proteins Z* **2002**, *47*, 379.
- [20] D. Thirumalai, C. Hyeon, *Biochemistry* **2005**, *44*, 4957.
- [21] V. Munoz, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2007**, *36*, 395.
- [22] A. Akmal, V. Munoz, *Proteins* **2004**, *57*, 142.