

Ein „Kraftpuffer“ schützt Titinimmunglobulin**

João M. Nunes, Ulf Hensen, Lin Ge, Manuela Lipinsky, Jonne Helenius, Helmut Grubmüller* und Daniel J. Muller*

Titinfilamente bestimmen maßgeblich die Struktur und Funktion des Sarkomers.^[1] Sie verbinden die ca. 1 μm voneinander entfernte M- mit der Z-Scheibe des Sarkomers, das aus vier Abschnitten besteht: der M-Scheibe, dem A-Band, dem I-Band und der Z-Scheibe. Die Elastizität des Titins wird der Region um das I-Band zugeschrieben,^[2,3] das außer Immunglobulinen (Igs) auch N2- und PEVK-Abschnitte enthält. Diese verhalten sich wie ungeordnete entropische Federn und sind leicht dehnbar.^[4] Ig-Domänen im I-Band haben die für die Ig-Familie typische β -Faltblattstruktur.^[5,6]

Die mechanischen Eigenschaften von Titin-Ig wurden bereits ausführlich mit Einzelmolekülkraftspektroskopie (EMKS) untersucht.^[7–10] Die Entfaltung proximaler und distaler I-Bandabschnitte verläuft nach einem Zwei- bzw. Drei-Stufen-Modell.^[4] Das distale Titin-Ig I27 entfaltet sich bei mechanischer Beanspruchung über einen Zwischenzustand,^[7,8,11,12] der mutmaßlich durch die Zerstörung des H-Brückennetzwerks zwischen den β -Faltblättern A und B entsteht, wobei der Rest von I27 intakt bleibt.^[8,12] Bei Entfernung des β -Faltblatts A verschwindet der Zwischenzustand, wobei die Stabilität von I27 nicht beeinträchtigt wird.^[13] Verblüffenderweise ist die für den Übergang zum Zwischenzustand benötigte Kraft, anders als die Gesamtentfaltungskraft, temperaturinvariant.^[14]

Wir zeigen am Beispiel eines I27-Octamers (I27₈), dass für den Zwischenzustand zusätzlich zur Temperaturinvarianz auch eine Geschwindigkeitsinvarianz gilt, denn unabhängig von der Ziehgeschwindigkeit beträgt in unseren Messungen die Übergangskraft ca. 95 pN. Folglich senken Spannkkräfte

von $\ll 95$ pN die Energiebarriere zwischen gefaltetem und Zwischenzustand kaum. Weil I27 über diesen Zwischenzustand entfalten muss, folgern wir, dass diese Geschwindigkeitsinvarianz I27 vor einer Entfaltung bei kleinen, physiologisch relevanten Kräften schützt. Des Weiteren bilden die Beiträge aller Igs der distalen I-Bandabschnitte einen „Kraftpuffer“, der Titin vor mechanischer Beanspruchung schützt.

Zur Untersuchung der I27-Entfaltung unter quasinatürlichen Bedingungen mithilfe der EMKS wurden I27₈-Polymere kovalent über C-terminale Cysteinreste an Goldoberflächen gebunden. Durch Absenken der EMKS-Spitze auf das Polymer wurde dessen N-Terminus unspezifisch gebunden. Beim Zurückziehen der Spitze wurde die mechanische Reaktion von I27₈ aufgezeichnet (Abbildung 1). Kraft-Abstands(K-A)-Kurven zeigen charakteristische Sägezahnmuster, die auf die sequenzielle Entfaltung von I27₈ bei Kräften von 150–300 pN schließen lassen (Abbildung 1a).^[7] Jedes entfaltete I27-Protein verlängert das gestreckte Polypeptid um ca. 28 nm^[8] und verringert die Spannung kurzfristig. Bei weiterem Anheben der EMKS-Feder steigt die Kraft wieder, bis sich die nächste Domäne entfaltet. Wir verwendeten eine automatische Routine (siehe Hintergrundinformationen), um Übergangszustände und Entfaltungsmaxima in den Kraft-Abstands-Graphen zuverlässig zu identifizieren (Abbildung 1c).

Frühere I27-EMKS-Messungen wurden in PBS-Puffern durchgeführt (PBS = Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung), die extrazellulären Bedingungen nachempfunden waren. Unsere EMKS wurde hingegen in zytosolähnlichen Puffern durchgeführt (siehe Hintergrundinformationen). Für alle Puffer wurden ähnliche Entfaltungskräfte (Zwischenzustand und Totalentfaltung) gemessen (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen).

Ein Zwischenzustand wurde für ca. 95 % aller ersten Entfaltungen registriert, unabhängig von der Zahl der nachfolgenden Entfaltungen (Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen). Zur Untersuchung von Strukturübergängen und Wechselwirkungen der I27-Entfaltung haben wir atomistische Kraftmoleküldynamiksimulationen (KMD-Simulationen)^[15,16] durchgeführt. Da die K-A-Kurven keine Abhängigkeit der Entfaltungskraft von der I27-Zahl zeigen (Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen), verwendeten wir ein I27-Monomer (Röntgenkristallstruktur: PDB-Code 1WAA)^[17] für die KMD-Simulation. Insgesamt 14 Simulationen wurden ausgeführt (Abbildung 2; Abbildung S6 in den Hintergrundinformationen). Wie die EMK-Spektren zeigen die simulierten K-A-Kurven in den meisten Fällen (12 von 14) zwei Maxima pro I27-Entfaltung. Wegen der viel höheren Ziehgeschwindigkeiten bei den Simulationen

[*] J. M. Nunes,^[†] L. Ge, M. Lipinsky, Dr. J. Helenius, Prof. D. J. Muller Biotechnologiezentrum, TU Dresden 01307 Dresden (Deutschland) und Department of Biosystems Science and Engineering, ETH Zürich 4058 Basel (Schweiz) Fax: (+41) 61-387-3994 E-Mail: daniel.muller@bsse.ethz.ch Dr. U. Hensen,^[‡] Prof. H. Grubmüller Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie 37077 Göttingen (Deutschland) Fax: (+49) 551-201-2302 E-Mail: hgrubmu@gwdg.de

[†] J.M.N. und U.H. trugen gleichermaßen zu dieser Arbeit bei.

[**] Wir danken Jane Clarke für das I27₈-Konstrukt, C. Stange für Hilfe bei der Proteinreinigung sowie C. Bippes, K. T. Sapra und J. Howard für Diskussionen. Die Max-Planck-Gesellschaft, DFG, EU, Fundação para a Ciência e Tecnologia und der Freistaat Sachsen haben diese Arbeit gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200906388> zu finden.

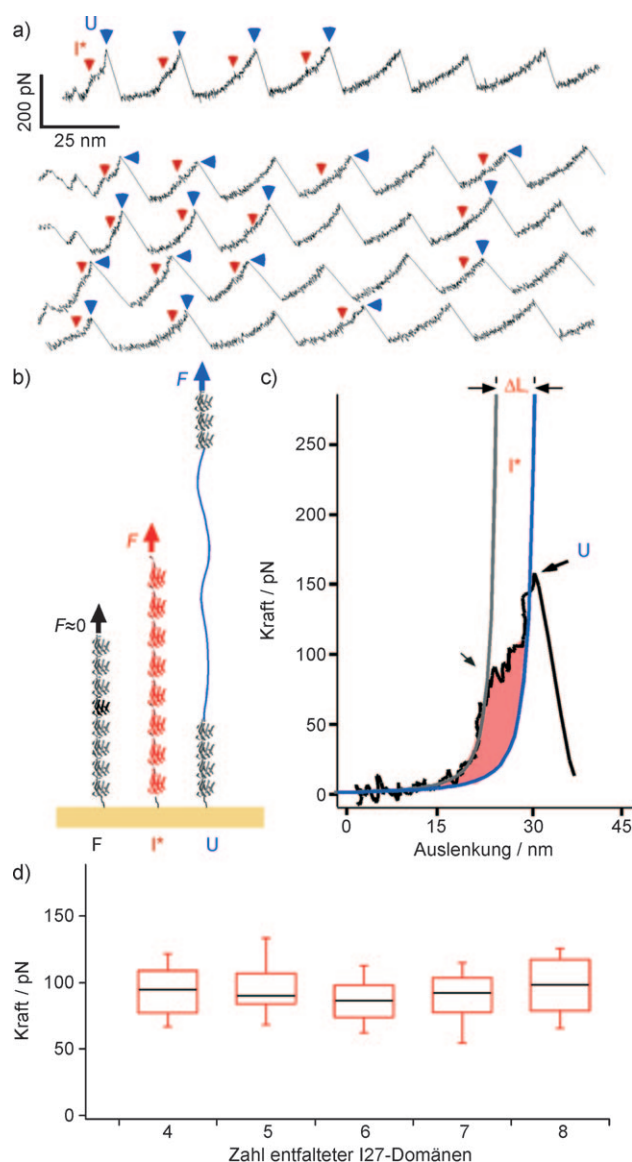


Abbildung 1. a) K-A-Kurve: Sägezahnmuster der sequenziellen I27-Entfaltung. Pfeile zeigen Übergangszustände I* des Entfaltungsprozesses (rot) und vollständige Entfaltung von I27 (U; blau). Die Detektionswahrscheinlichkeit eines Zwischenzustands sinkt mit der Zahl bereits entfalteter I27-Proteine. b) I27, gebunden an einen Goldsteg und mit einer EMKS-Spitze gezogen. Bei ca. 95 pN entfalten sich alle I27-Proteine in einen Zwischenzustand (I*, rot), gefolgt von der vollständigen Entfaltung bei höheren Kräften (U, blau). c) Eine Angleichung an die Kraftmaxima erfolgte mit dem „Worm-like-chain“-Modell, um Entfaltungskräfte für I* (rot) und U (blau) abzuschätzen; ΔL ist die Differenz zwischen Zwischenzustand und vollständiger Entfaltung. d) Boxplots der Kräfte aller ersten Entfaltungen zum Zwischenzustand (bei allen Ziehgeschwindigkeiten) gegen die Zahl der Ig-Entfaltungen eines I27-Polymers (für 8, 7, 6, 5 und 4 Ig-Entfaltungen wurden $n=84$, 45, 37, 22 bzw. 30 Ereignisse analysiert).

(0.8 ms^{-1}) wurden dort allerdings deutlich höhere Entfaltungskräfte erhalten als bei den EMKS-Messungen ($0.1\text{--}5 \mu\text{ms}^{-1}$).

Zur Bestimmung der Entfaltungskinetik wurden dynamische EMKS-Messungen (DKS-Messungen) durchgeführt, in denen I27 mit unterschiedlichen Ziehgeschwindigkeiten

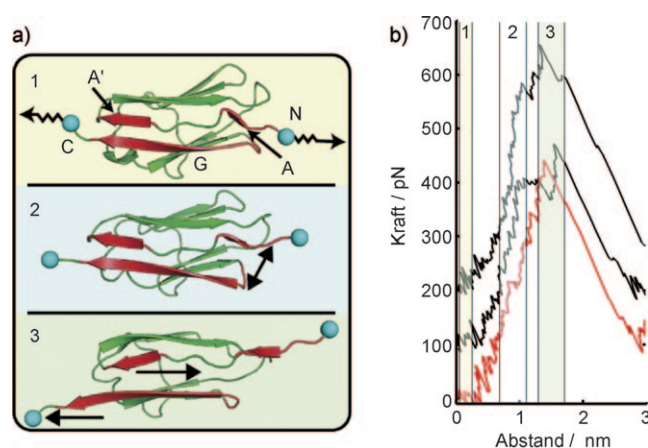


Abbildung 2. KMD-Simulationen der kraftinduzierten I27-Entfaltung. a) Entfaltungsphasen (1: gefaltet, 2: Zwischenzustand, 3: entfaltet). β -Faltblätter A, A' und G sind rot gefärbt. Harmonische Federpotentiale wurden an N- und C-terminale C α -Atome (aquamarinfarbene Kugeln) angelegt und mit konstanter Geschwindigkeit auseinander gezogen (Pfeile in 1). b) Exemplarische K-A-Kurven mit (schwarz) oder ohne Zwischenzustand (rot); zur besseren Sichtbarkeit sind die y-Werte der beiden schwarzen Kurven um 100 und 200 pN verschoben, vollständige Übersicht in Abbildung S6 der Hintergrundinformationen. Hintergrund und Ziffern entsprechen (a).

entfaltet wurde (Abbildung 3a; Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Die Kraft zur Totalentfaltung hing logarithmisch von der Geschwindigkeit l_r der Kraftzunahme^[18] ab. Die Kraft zum Erreichen des Zwischenzustands hingegen stieg nur wenig mit steigendem l_r -Wert. Aus KMD-Simulations- und DKS-Messdaten wurden Geschwindigkeitskonstanten und eine qualitative Gibbs-Energie-Landschaft abgeleitet. Entfaltungsgeschwindigkeiten bei Nullkraft, $k_{u,0}$, und Entfaltungslängen x_u (Tabelle 1) sowohl für den Übergang zum Zwischenzustand als auch für die vollständige Entfaltung wurden aus 95%-Konfidenzintervallen der linearen Regression der DKS-Messdaten auf Grundlage des Bell-Evans-Modells erhalten (Abbildung 3a).^[18] Die graphische Darstellung der Energielandschaft (Abbildung 3b, violett) zeigt zwei Energiebarrieren, deren Höhen aus $k_{u,0}$ und einer Versuchsfrequenz von 10^7 s^{-1} (siehe Hintergrundinformationen) abgeschätzt wurden. Die Abstände zur ersten Barriere und zwischen beiden Barrieren waren aus KMD-Simulationen hergeleitet. Diese könnten aber auch experimentell erhalten werden, indem man ΔL (Abbildung 1c) durch die Zahl der vollständig gefalteten Ig-Domänen teilt.^[8] Wie man sieht, ergänzen sich DKS-Messungen und KMD-Simulationen.

Zur Prüfung, ob die erhaltene Gibbs-Energie-Landschaft mit den EMKS-Daten über die Annäherung des Bell-Evans-Modells und die relativ kurzen Zeitskalen der KMD-Simulationen hinaus konsistent ist, beschrieben wir die erzwungene I27-Entfaltung mithilfe von Brownsche-Dynamik(BD)-Simulationen, die der Smoluchowskischen Diffusionsgleichung gehorchen. In den BD-Simulationen wird die Entfaltung durch ein Partikel beschrieben, das innerhalb eines zeitabhängigen Potentials diffundiert. Dieses Potential besteht aus einem zeitunabhängigen Anteil, der die Energie-

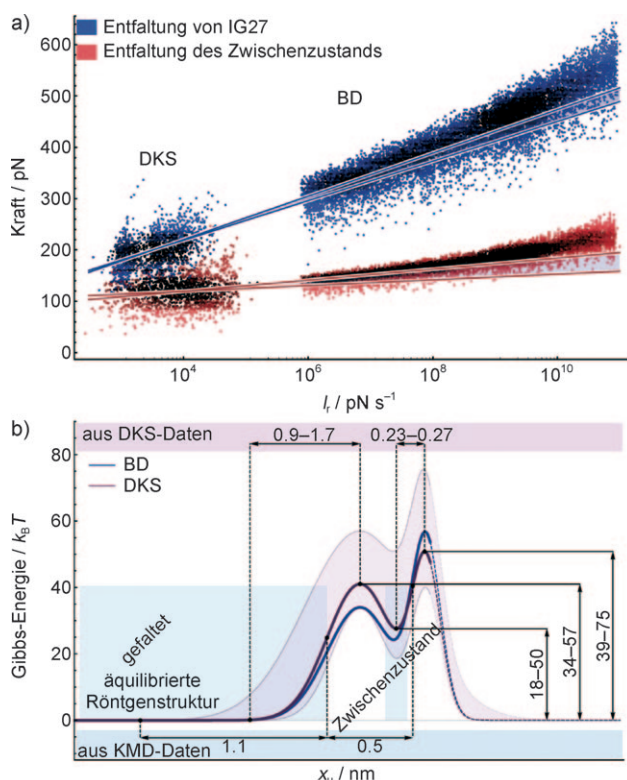


Abbildung 3. Kinetik der I27-Entfaltung. a) Abhängigkeit der I27-Übergangskraft und Gesamtentfaltungskraft von der Geschwindigkeit der Kraftzunahme (links: DKS-Messungen, 4521 analysierte Ereignisse), rechts: BD-Simulationen (11 300 Simulationen): Die Farbe weist die Ortspunktdichte aus, d. h. die Häufigkeit, mit der eine bestimmte Kraft detektiert wurde (dunklere Farben entsprechen höheren Dichten). Geraden zeigen 95 % Konfidenzintervalle von Bell-Evans-Regressionen.^[18] b) Gibbs-Energie-Landschaften der I27-Entfaltung, abgeleitet aus DKS-Messungen und KMD-Simulationen (violette Fläche aus Fehleranalyse der DKS-Messdaten, Mittelwert als violette Linie), sowie BD-Potential, das für (a) verwendet wurde (blaue Linie). Gefaltete und Übergangszustände sind angezeigt.

Tabelle 1: Kinetische Parameter der I27-Entfaltung, abgeleitet (siehe Hintergrundinformationen) von DKS-Messungen sowie von KMD- und BD-Simulationen.

	erste Barriere			zweite Barriere	
	$k_{u,0}$ [s^{-1}]	x_u [nm]	k_f [s^{-1}]	$k_{u,0}$ [s^{-1}]	x_u [nm]
DKS/KMD	1.3×10^{-18} – 1.6×10^{-8}	0.9–1.7	1600 ± 51	4.1×10^{-4} – 3.2×10^{-3}	0.23–0.27
BD	1.7×10^{-8}	1.1	450	3.7×10^{-4}	0.23

landschaft der Proteinentfaltung (mit zwei Barrieren) wiedergibt, und einem zeitabhängigen Anteil für die Kraft, die durch die Feder auf das Protein ausgeübt wird (siehe Hintergrundinformationen).^[19] 11 300 BD-Simulationen wurden mit $l_r = 10^6$ – 10^{11} pN s^{-1} durchgeführt (Abbildung 3a). Positionen, Breiten und Höhen der Energiebarrieren wurden iterativ bis zur Übereinstimmung mit den DKS-Regressionen angepasst. Die Streuung der BD-Kräfte ist gut in Einklang mit den erzwungenen Übergängen über eine einfache Energiebarriere (Abbildung S7 in den Hintergrundinformationen).^[20] Gleiches gilt für die DKS-Daten der Totalentfaltung,

jedoch nicht für die experimentell gemessenen Übergangszustände, wo höhere Streuung auftritt. Wir führen dies auf Schwierigkeiten bei der genauen Bestimmung des Zwischenzustandes aus EMKS-Kurven zurück, besonders für spätere Entfaltungszustände.

Das experimentelle Gibbs-Energie-Potential (Abbildung 3b, blau) stimmt überwiegend mit dem Bell-Evans-Potential überein (violett). Aus diesem Potential wurden Geschwindigkeitskonstanten unter Verwendung gleicher Versuchsgeschwindigkeiten (10^7 s^{-1}) bestimmt (Tabelle 1). Wir schließen, dass dieses Potential die Gibbs-Energie-Landschaft der I27-Entfaltung beschreibt.

Als nächstes untersuchten wir die Strukturveränderungen des Zwischenzustandes. In allen Simulationen geht ein Bruch der H-Brücken zwischen den β -Faltblättern A und G (Abbildung 2a, Pfeil in Bild 2) der Bildung eines Zwischenzustandes voraus. Danach brechen die H-Brücken zwischen A' und G (Abbildung 2a, rot in Bild 3), gefolgt von einer Gleitbewegung (Abbildung 2a, Pfeile in Bild 3), die die I27-Struktur deformiert. Dies widerspricht früheren KMD-Simulationen, die den Bruch zwischen den β -Faltblättern A und B als Beginn der I27-Entfaltung angeben.^[8,12] Diese früheren Simulationen verwendeten allerdings die NMR-Struktur einer I27-Mutante, in der einige Aminosäuren wie I2 oder T78 durch andere ersetzt waren oder fehlten. Zusätzlich ist das H-Brückennetzwerk zwischen den β -Faltblättern A und B in der Röntgenkristallstruktur des von uns verwendeten I27-Wildtyps dichter.^[17] Dies unterstreicht die Empfindlichkeit von Entfaltungsweg und Kraftprofil im Hinblick auf kleine Strukturänderungen in I27 und möglicherweise auch auf die geringeren Ziehgeschwindigkeiten unserer Simulationen. Übereinstimmend mit unseren Beobachtungen zeigt eine Kraftverteilungsanalyse eine dominante Wechselwirkung der β -Faltblätter A und G.^[17]

Frühere EMKS-Untersuchungen an I27 ließen darauf schließen, dass der Zwischenzustand nur bei hohen l_r -Werten^[21] – und daher nicht unter physiologischen Bedingungen – auftritt. Wir detektieren diese Übergangszustände allerdings in 95 % der Fälle, obwohl die niedrigsten Ziehgeschwindigkeiten der mechanischen Beanspruchung im Muskel nahe kommen. Die Auslenkungsgeschwindigkeit pro gefaltetes Protein beträgt 2.5 s^{-1} . Ein Sarkomer der Länge $2 \mu\text{m}$ kann mit $6 \mu\text{m s}^{-1}$ kontrahieren, was einer Kontraktionsgeschwindigkeit von 3 s^{-1} ^[22] entspricht. Das Hauptmaximum der Entfaltung war nicht von der Abwesenheit eines Zwischenzustandes (5 % der Fälle) beeinträchtigt (Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen), woraus wir schließen, dass beide Entfaltungswege identisch sind. Tatsächlich geht die Ablösung des β -Faltblatts A in unseren KMD-Simulationen der Totalentfaltung stets voraus.

Unsere Beobachtung, dass der I27-Zwischenzustand unabhängig von der Ziehgeschwindigkeit stets bei der gleichen Kraft gebildet wird (Abbildung 3a; Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen), legt seine Funktion als „Kraft-

puffer“ nahe: Diese erste Barriere wirkt als kinetische Sicherung, die die Lebensdauer von I27 erheblich verlängert.

Es wird ein funktionaler Zusammenhang zwischen Mechanik und Topologie von Titin sichtbar. Die mechanischen Eigenschaften des distalen Titins puffern Muskelkraft: KMD-Simulationen an I27 zeigen, dass die Loslösung des β -Faltblatts A zu einem Zwischenzustand führt (Abbildung 2), dessen Schutzwirkung gegen hohe Dehnkräfte sich mit der Zahl der in Serie geschalteten I27-Monomere erhöht.^[8] Dies verleiht Titin eine Kraftaufnahmefähigkeit, die in situ die Entfaltung von Igs verhindert.^[1,23]

Unsere Arbeit zeigt erstmals, wie Proteine Bindungen aufbauen, um mechanischer Beanspruchung zu widerstehen. Normalerweise widerstehen Bindungen einer steigenden Kraft, bis sie bei einem bestimmten Grenzwert schlagartig brechen. Allerdings verringern sogar kleine Kräfte die Energiebarrieren und verlagern den Hauptzustand in Richtung des ungebundenen/entfalteten Zustands.^[18] Ausnahmen bilden dabei Fangbindungen, die optimale Bindungsstärken bei bestimmten Ziegeschwindigkeiten aufweisen.^[24] Die H-Brücken zwischen β -Faltblatt A und den β -Faltblättern B und G von distalen Igs sind offenbar so konstruiert, dass die Energiebarriere, die den gefalteten Zustand schützt, bei physiologischen Ziegeschwindigkeiten fast nicht beeinflusst wird. Dadurch bleibt die Kraft, die zur Überwindung der Barriere und zur Bildung des Zwischenzustands benötigt wird, konstant. Im distalen Ig stellt dieses System einen wirksamen Entfaltungsschutz dar. Es bleibt zu zeigen, in welchen anderen molekularen Systemen solche „Kraftpuffer“ vorgefunden werden können und welche Rolle sie dort spielen.

Eingegangen am 12. November 2009

Online veröffentlicht am 30. März 2010

Stichwörter: Energielandschaft · Immunglobulin · Proteinfaltung · Rastersondenverfahren · Titin

- [1] L. Tskhovrebova, J. Trinick, *Nat. Immunol.* **2003**, 4, 679.
- [2] W. A. Linke, M. Ivemeyer, P. Mundel, M. R. Stockmeier, B. Kolmerer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 8052.
- [3] K. Wang, R. McCarter, J. Wright, J. Beverly, R. Ramirez-Mitchell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 7101.
- [4] H. Li, W. A. Linke, A. F. Oberhauser, M. Carrion-Vazquez, J. G. Kerkvliet, H. Lu, P. E. Marszalek, J. M. Fernandez, *Nature* **2002**, 418, 998.
- [5] L. Tskhovrebova, J. Trinick, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 46351.
- [6] S. Labeit, B. Kolmerer, *Science* **1995**, 270, 293.
- [7] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez, H. E. Gaub, *Science* **1997**, 276, 1109.
- [8] P. E. Marszalek, H. Lu, H. Li, M. Carrion-Vazquez, A. F. Oberhauser, K. Schulten, J. M. Fernandez, *Nature* **1999**, 402, 100.
- [9] A. F. Oberhauser, P. K. Hansma, M. Carrion-Vazquez, J. M. Fernandez, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 468.
- [10] X. Zhuang, M. Rief, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, 13, 88.
- [11] M. Carrion-Vazquez, P. E. Marszalek, A. F. Oberhauser, J. M. Fernandez, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 11288.
- [12] M. Sotomayor, K. Schulten, *Science* **2007**, 316, 1144.
- [13] S. B. Fowler, R. B. Best, J. L. Toca Herrera, T. J. Rutherford, A. Steward, E. Paci, M. Karplus, J. Clarke, *J. Mol. Biol.* **2002**, 322, 841.
- [14] Y. Taniguchi, D. J. Brockwell, M. Kawakami, *Biophys. J.* **2008**, 95, 5296.
- [15] H. Grubmüller, B. Heymann, P. Tavan, *Science* **1996**, 271, 997.
- [16] B. Isralewitz, S. Izrailev, K. Schulten, *Biophys. J.* **1997**, 73, 2972.
- [17] W. Stacklies, M. C. Vega, M. Wilmanns, F. Gräter, *PLoS Comput. Biol.* **2009**, 5, e1000306.
- [18] E. Evans, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2001**, 30, 105.
- [19] S. Izrailev, S. Stepaniants, M. Balseira, Y. Oono, K. Schulten, *Biophys. J.* **1997**, 72, 1568.
- [20] S. Koch, M. Wang, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, 91, 028103.
- [21] P. M. Williams, S. B. Fowler, R. B. Best, J. L. Toca-Herrera, K. A. Scott, A. Steward, J. Clarke, *Nature* **2003**, 422, 446.
- [22] C. A. Opitz, M. Kulke, M. C. Leake, C. Neagoe, H. Hinssen, R. J. Hajjar, W. A. Linke, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 12688.
- [23] W. A. Linke, A. Grutzner, *Pflugers Arch.* **2008**, 456, 101.
- [24] W. E. Thomas, V. Vogel, E. Sokurenko, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, 37, 399.