

Kraftspektroskopie von einzelnen Biomolekülen

Biologische Makromoleküle besser begreifen – mit Einzelmolekül-Kraftmessungen und Computersimulationen

Matthias Rief und Helmut Grubmüller

Praktisch alle Stoffwechselvorgänge im Körper werden durch hochspezialisierte Proteine bewirkt oder gesteuert – man kann sie mit gutem Recht als die biochemischen „Nano-Maschinen“ der Zelle bezeichnen. Jüngste Fortschritte, besonders bei Einzelmolekülexperimenten und deren Simulation mithilfe von Hochleistungscomputern, erlauben es, einigen dieser „Nano-Maschinen“ bei der Arbeit zuzusehen. Dabei treten erstaunliche Mechanismen zutage: Man beobachtet z. B. fein abgestimmte Bewegungen der Bindungstasche eines Rezeptor-Proteins bei der Erkennung eines Ligandenmoleküls oder die Entfaltung von Titin, das als molekularer Stoßabsorber Muskelzellen schützt. Gegenwärtig sind wir aber außerstande, solche Präzisionsfeinmechaniken zu konstruieren – wir beginnen gerade, deren Mechanismen zu verstehen und die Eigenschaften ihrer Funktion zu berechnen und vorherzusagen.

Eine hervorragende Eigenschaft biologischer Systeme ist die Selbstorganisation. Die Vielzahl an spezifischen, modulierbaren Wechselwirkungen der Biomoleküle untereinander erlaubt die Bildung von komplexen Systemen wie Zellen und ganzen Organismen. Allein die räumliche Struktur der Moleküle für sich, also die Faltung der Proteine oder auch die Struktur der DNA, ist schon ein beeindruckendes Beispiel der Selbstorganisation. Über 13000 aufgeklärte Proteinstrukturen belegen eindrucksvoll deren komplexe und gleichzeitig hochgeordnete räumliche Organisation (siehe Infokasten „Proteinstruktur“). Für ein Verständnis solcher Selbstorganisationsprozesse auf molekularer Ebene muss man herausfinden, auf welche Weise die beteiligten interatomaren Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrücken, Kräfte zwischen Partialladungen, chemische Bindungskräfte, van der Waals-Wechselwirkungen etc., letztendlich zu einer Struktur führen. Experimentelle Information über die daraus resultierende sehr komplexe Potentiallandschaft ist rar.

Schon seit langer Zeit kann man die Bindungs- oder Faltungsenergie der beteiligten Wechselwirkungen messen. Sie lassen sich z. B. mithilfe der Kalorimetrie als Durchschnittswerte in großen Ensembles bestimmen. Solche Experimente liefern jedoch keine Information über die Details der Potentiallandschaften, die die räumliche Struktur der Biomoleküle bestimmen. Erst

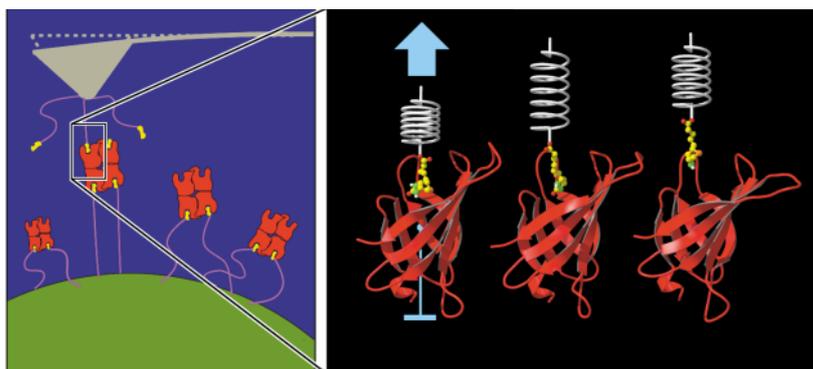


Abb. 1: Mit dem Rasterkraftmikroskop ist es möglich, einzelne Moleküle kontrolliert zu belasten und die dabei auftretenden Kräfte zu messen. Dazu werden Liganden (gelb) bzw. Rezeptoren (rot) über Linkermoleküle (magenta) an Mikroskopspitze (grau) bzw. Oberfläche (grün) geheftet. Im Experiment (links) wie auch in der Computersimulation (rechts) wird der Ligand einer anwachsenden Zugkraft unterworfen und die Kraft am Abreißpunkt bestimmt.

die Entwicklung der Rastersondentechniken erlaubt es, Kräfte, die die Struktur von Biomolekülen stabilisieren, direkt am einzelnen Molekül zu messen und daraus Aussagen über dessen Potentiallandschaft zu gewinnen. Im Folgenden wollen wir anhand von Beispielen zeigen, wie dies in Kombination von Experiment und Theorie möglich ist.

Kraftspektroskopie

Wie kann man nun einzelne Moleküle an ihren Enden einspannen, sie kontrolliert belasten und die dabei wirkenden Kräfte messen? Mit der Erfindung des Rastertunnelmikroskops durch Gerd Binnig und Heinrich Rohrer im Jahre 1982 und später des Rasterkraftmikroskops durch Binnig, Gerber und Quate haben wir Werkzeuge zur Hand, mit denen genau dies möglich ist. Obwohl diese Techniken anfänglich zum Abbilden von Oberflächen mit atomarer Auflösung entwickelt worden waren, wurden sie auch bald als Instrumente zur Manipulation von Atomen und Molekülen verwendet. So kann man die mikroskopisch kleine Blattfeder eines Kraftmikroskops als Piconewton-Kraftmessgerät verwenden (Abb. 1). Über piezoelektrische Stellelemente lässt sich die Feder auf Ångström genau positionieren. Die Federauslenkung, als Maß für die wirkende Kraft, wird über einen einfachen Lichtzeiger mit ebenso hoher Präzision gemessen.

Dr. Matthias Rief, Lehrstuhl für Angewandte Physik, Biophysik und neue Materialien, Ludwig-Maximilians-Universität München, Amalienstraße 54, 80799 München, E-Mail: Matthias.Rief@physik.uni-muenchen.de

Dr. Helmut Grubmüller, Arbeitsgruppe für Theoretische Molekulare Biophysik, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Am Faßberg 11, 37077 Göttingen, E-Mail: hgrubmu@gwdg.de

Die Spitze einer Kraftmikroskopnadel hat einen Krümmungsradius von ungefähr 10 nm. Biopolymere besitzen ebenfalls eine typische Größe von einigen Nanometern. Damit ist sichergestellt, dass selbst aus einer dicht belegten Oberfläche genau eines oder einige wenige Moleküle ausgewählt werden können, an denen sich dann gezielt mechanische Experimente durchführen lassen. Dieses Messprinzip soll zunächst am Beispiel der molekularen Erkennung verdeutlicht werden.

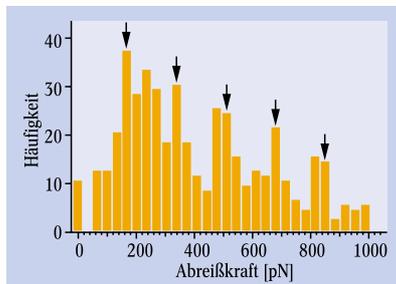


Abb. 2: Verteilung der am Avidin/Biotin-Komplex gemessenen Abreißkräfte. Die Pfeile zeigen deren beobachtete Quantisierung, die aus dem gleichzeitigen Abreißen von einem, zwei, usw. Bindungspaaren resultiert.

chergestellt, dass in einer verwirrenden Vielfalt von Botenstoffen im menschlichen Körper jeder sein ihm zugeordnetes Ziel findet. Ein natürliches Maß dafür, wie gut die Moleküle aneinander haften, ist die Kraft, mit der sie aneinander festhalten. Ein Zelladhäsionsmolekül beispielsweise erfüllt seine Aufgabe sicher dann besonders gut, wenn es sehr stark an seinem Gegenpart festhält. Eine hohe Bindungskraft wäre somit wünschenswert. Viele Krankheiten sind auf Fehlfunk-

Molekulare Erkennung

Die spezifische Bindung eines Ligandenmoleküls („Schlüssel“) an ein Rezeptor-Protein („Schloss“) ist ein wesentliches Funktionsprinzip bei molekularen Erkennungsvorgängen im menschlichen Körper. So spürt das Immunsystem feindliche Eindringlinge dadurch auf, dass es Antikörper produziert, die ganz speziell an Strukturen auf der Oberfläche der Fremdmoleküle binden. Auch zur Kommunikation von Nervenzellen müssen Neurotransmitter an den ihnen zugeordneten Rezeptoren am Ionenkanal andocken und ihn so steuern. Nur durch eine hochspezifische Bindung ist si-

tionen solcher molekularen Erkennungsprozesse zurückzuführen. Ein detailliertes Verständnis des molekularen Bindungsprozesses könnte zusammen mit Messungen der Bindungskraft dazu beitragen, maßgeschneiderte Medikamente zu entwickeln, die mit hoher Effizienz dort binden, wo sie benötigt werden.

Messung von Abreißkräften

Ernst-Ludwig Florin, Vincent Moy und Hermann Gaub ist es erstmals gelungen, die Bindungskräfte einzelner Moleküle zu messen. Als Modellsystem haben sie Biotin und Streptavidin gewählt [2], zwei Biomoleküle, deren Struktur bis ins Detail aufgeklärt ist und von denen bekannt ist, dass sie eine hohe Bindungsenergie und -spezifität besitzen.

Wie in Abb. 1, links, gezeigt, wurden im Experiment einzelne Biotinmoleküle (gelb) über chemische Linkermoleküle (magenta) kovalent an die Kraftmikroskopspitze (grau) gebunden. In gleicher Weise wurde eine Oberfläche (grün) mit Streptavidin-Molekülen (rot) „bestückt“. Dann wurde die Kraftmikroskopspitze mit der Oberfläche in Kontakt gebracht, sodass sich einige Streptavidin/Biotin-Komplexe bildeten, anschließend zurückgezogen und die Abreißkraft gemessen. Wenn man dieses Experiment viele hundert Male wiederholt, ergibt sich eine Verteilung der Bindungskräfte, die eine Quantisierung erkennen lässt (Abb. 2). Die Maxima im Kraft-Histogramm (Pfeile) entsprechen der Bindungskraft von einem, zwei, usw. Bindungspaaren, im vorliegenden Fall ca. 160 pN pro Bindungspaar.

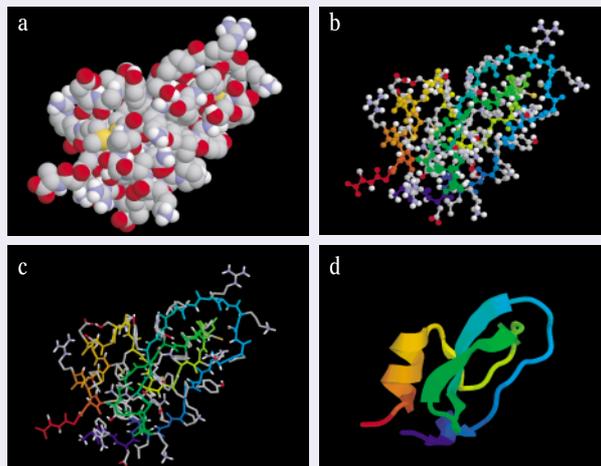
Dieses Experiment demonstrierte zum ersten Mal, dass es in der Tat möglich ist, Bindungskräfte zwischen *einzelnen* Ligand-Rezeptor-Molekülen zu messen. Auch konnte gezeigt werden, dass die effektive Länge der Ligand-Rezeptor-Bindung ca. 5 Å beträgt – deutlich länger als die Bindungslänge einer einzelnen Wasserstoffbrücke oder einer van der Waals-Wechselwirkung.

Proteinstruktur

Proteine sind komplex gefaltete Polymere mit der Summenformel $H(NH-HCR-CO)_n-OH$, die aus den 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren aufgebaut sind; „R“ steht dabei für einen der 20 Aminosäurereste. Die Abfolge (Sequenz) dieser Reste entlang der Polypeptidkette („Primärstruktur“) ist genetisch festgelegt und bestimmt die Art, die räumliche Struktur („Tertiärstruktur“) und die Funktion des jeweiligen Proteins.

Im Unterschied zu den meisten anderen Polymeren ist die Position jedes einzelnen Atoms eines Proteinmoleküls genau definiert – teilweise bis auf Bruchteile eines Ångströms – und lässt sich etwa durch Röntgenbeugung an Proteinkristallen ebenso genau bestimmen.

Abb. a) zeigt das relativ kleine Protein *Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor* (BPTI), das aus 58 Aminosäuren besteht und bei Be-



darf das Verdauungsenzym *Trypsin* blockieren kann. Abgesehen von unpolaren Wasserstoffatomen sind alle 568 Atome des Moleküls als Kugeln mit ihrem van der Waals-Radius dargestellt: Kohlenstoffatome grau, Sauerstoffatome rot, Stickstoffatome blau, polare Wasserstoffatome weiß und Schwefelatome gelb.

Proteins trägt sechs Atome $-CO-HC_\alpha-NH-$ zum Proteinrückgrat bei. Vom sog. C_α zweigt jeweils eine der 20 verschiedenen Seitengruppen ab; etwa die rechts oben erkennbare eines Arginins.

Zur übersichtlicheren Darstellung der „Architektur“ des Proteins wird oft – auch in diesem Artikel – eine vereinfachende „Bänderdarstellung“ (d) gewählt, die lediglich den Verlauf des Proteinrückgrats zeigt und auf die Darstellung der Seitengruppen ganz verzichtet. Zusätzlich werden die beiden häufigsten lokalen Strukturmodule („Sekundärstrukturelemente“) der Peptidkette, Helices (rot/orange) und Faltblätter (grün/cyan), durch Schraubenlinien bzw. Pfeile symbolisiert. Allen vier Darstellungsformen liegt immer ein atomar aufgelöstes Strukturmodell zugrunde.

Die Abb. b) und c) zeigen das gleiche Protein so, dass dessen chemische Struktur besser erkennbar ist. Zusätzlich wurde der räumliche Verlauf der Peptidkette hervorgehoben, indem das sog. Proteinrückgrat in einem kontinuierlichen Übergang eingefärbt ist: von rot über gelb, grün nach blau. Jede der 58 Aminosäuren des

Dies war ein direkter Hinweis darauf, dass die gemessene Bindungskraft aus dem Zusammenwirken mehrerer solcher Wechselwirkungen resultiert.

Ligand-Rezeptor-Trennung im Computer

Wie der Vorgang der Bindungstrennung nun genau, d. h. in atomarem Detail abläuft, folgt nicht unmittelbar aus den Messungen. Wir haben daher die relevanten Teile des Experiments im Computer Atom für Atom nachgebildet und simuliert [3]. Dabei wurde die äußerst rechenintensive, aber recht genaue Methode der Molekulardynamik-Simulation eingesetzt (Info-kasten „Molekulardynamik-Simulation“), die alle interatomaren Kräfte berücksichtigt und daraus die Bewegung eines jeden einzelnen Atoms durch numerische Integration der Newtonschen Bewegungsgleichungen berechnet.

Zusätzlich zu den interatomaren Kräften mussten wir auch die Zugkraft modellieren, die durch das Zurückziehen der Kraftmikroskopspitze auf den Liganden ausgeübt wird (Abb. 1, rechts). Dies wurde erreicht durch ein harmonisches Potential (im Bild symbolisiert durch eine Feder), das in Ziehrichtung (hier nach oben) genau auf dasjenige Atom des Ligandenmoleküls (gelb) wirkt, das im Experiment kovalent an das Linker-Polymer gebunden ist. Wie auch die Kraftmikroskopspitze im Experiment wurde dieses Potential in der Simulation gleichförmig nach oben verschoben, während der Schwerpunkt des Rezeptorproteins (rot) fixiert wurde.

Wie in der Serie von drei Schnappschüssen zu erkennen ist, liegt das Biotinmolekül zu Beginn der Simulation (links) in der sog. Bindungstasche des Rezeptors, in der es durch zahlreiche interatomare Kräfte (überwiegend von der Waals-Kontakte und Wasserstoffbrückenbindungen) fixiert wird. Übersteigt die auf das Biotin so ausgeübte Zugkraft die Summe dieser Kräfte, so beginnt sich das Biotin vom Streptavidin schrittweise zu lösen (mittleres Bild). Die dafür aufzuwendende Kraft lässt sich aus der Ausdehnung der „Feder“ zu diesem Zeitpunkt ablesen. Ist der Komplex getrennt (rechtes Bild), kann das Biotin dem Zug folgen, und die Zugkraft nimmt wieder ab. Die während dieses Prozesses maximale aufgewendete Kraft stimmt sehr gut mit der gemessenen Abreißkraft überein, so dass wir jetzt ein mikroskopisches Modell des, wie sich zeigt, recht komplexen Reaktionswegs der Trennung von Streptavidin/Biotin zur Verfügung haben. Ein solches Modell ermöglicht es z. B., Mutanten vorzuschlagen, welche die Bindungseigenschaften und -kräfte gezielt verändern, und diese dann auch zu testen.

Elastizität von Zuckerpolymeren

Sind wir in den vorangegangenen Abschnitten auf die Bindungskräfte zwischen Molekülen eingegangen, so wollen wir jetzt zeigen, dass die Einzelmolekül-Kraftspektroskopie auch Informationen über intramolekulare Kräfte liefern kann: Welche molekularen Kräfte beeinflussen die mechanischen Eigenschaften einzelner Polymermoleküle? Wodurch ist die Stabilität von Proteinen bestimmt? Am Beispiel der Elastizität von Zuckerpolymeren (Polysaccharide) wollen wir das Wechselspiel zwischen Kraftmikroskopie-Experiment und -Simulation illustrieren.

Polysaccharide spielen als Strukturelemente in Pflanzen (z. B. Holz) eine wichtige Rolle; ein großer Teil der Biomasse der Erde besteht aus Polysacchari-

den. Polysaccharide sind aus vielen Glucose-Untereinheiten aufgebaut, die miteinander verkettet sind (vgl. Abb. 4, links). Sie unterscheiden sich durch die Art der Verkettung: Beim Dextran (oben) ist das eine Glucosemonomer mit seinem seitlich am Glucosering angebrachten C_1 -Kohlenstoffatom über ein Sauerstoffatom mit dem C_6 -Atom des anderen Monomers verbunden; bei Amylose (Mitte) und Zellulose (unten) führt die Verknüpfung stattdessen zum C_4 -Atom.

Im Experiment sind die Dextranstränge auf einer Goldunterlage verankert und mit Rezeptormolekülen versehen, die spezifisch an die Liganden binden, mit denen die Spitze belegt ist (Abb. 3) [4]. Im Gegensatz zur erzwungenen Ligand-Rezeptor-Trennung interessiert hier nicht eine Abreißkraft, sondern die elastischen Eigenschaften des Polymers, also dessen Dehnung als Funktion der angelegten Kraft.

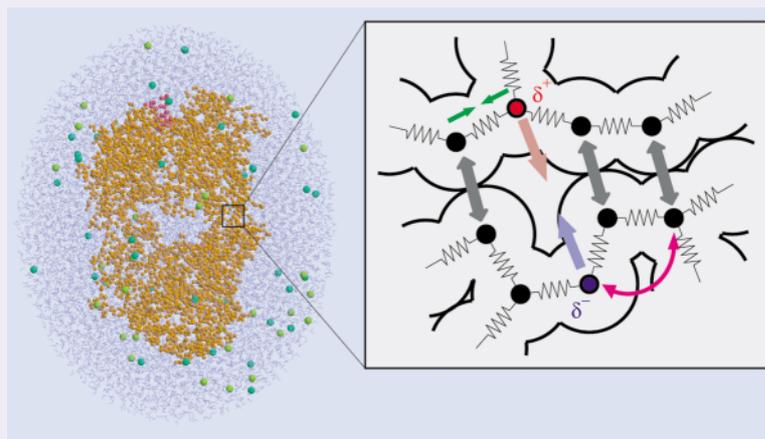
Abbildung 4, rechts, zeigt drei gemessene Kraft-Dehnungskurven (rot) für die betrachteten Polysaccharide. Die Kraft-Dehnungskurven von Dextran und Amylose zeigen alle ein ähnliches Muster. Bei niedrigen Kräften ist die Elastizität von entropischen Kräften bestimmt: Allein die Einschränkung der Zahl der möglichen Konformationen des Polymerrückgrats aufgrund der Streckung führt zu einer Rückstellkraft, selbst wenn keine elastischen Elemente in der Kette sind. Entropische Kräfte sind beispielsweise für die Elastizität von Gummi verantwortlich. Bei höheren Kräften weist die Kraft-Dehnungskurve eine charakteristische Schulter

Molekulardynamik-Simulationen

In einem Makromolekül (links, rot, bzw. Ausschnitt rechts) wirken interatomare Kräfte unterschiedlichen Typs. Chemische Bindungskräfte, dargestellt durch Federn, zwingen gebundene Atome in ihren Gleichgewichtsabstand (grüne Pfeile) oder Gleichgewichtswinkel (magenta). Die Pauli-Abstoßung (graue Pfeile) verhindert, dass sich Atome durchdringen. Langreichweitige Kräfte schließlich,

berücksichtigt. Die Atombewegungen werden in klassischer Näherung durch numerische Integration der Newtonschen Bewegungsgleichungen beschrieben; eine bei Zimmertemperatur für fast alle Fragestellungen sehr gute Näherung.

Da sich die Kräfte mit der Atombewegung rasch ändern, müssen alle Kräfte in kurzen Zeitschritten (typischerweise 10^{-15} s) wiederholt berech-



insbesondere Coulomb-Kräfte (rot, blau) zwischen den meist partiell geladenen Atomen (δ^+ , δ^-), tragen wesentlich zur Stabilität einer Proteinstruktur bei. All diese Kräfte (und noch einige weitere) bestimmen die räumliche Struktur des Proteins und die Bewegung jedes einzelnen Atoms. Sie werden daher in einer Molekulardynamik-(MD-)Simulation entsprechend

net werden. Nach einigen 10^6 derartigen Integrationsschritten erhält man eine Beschreibung der Bewegung eines jeden Atoms innerhalb der kurzen Zeitspanne einiger Nanosekunden. Dies ist gegenwärtig die Länge einer typischen MD-Simulation, begrenzt durch die heute verfügbare Computerleistung.

auf (Pfeil): Das Polymer dehnt sich aus, ohne dass die Kraft wesentlich zunimmt. Vermutlich löst diese kritische Kraft eine intramolekulare Strukturänderung des Polymers („Konformationsübergang“) aus, die dessen effektive Länge vergrößert. Trotz des recht geringen Unterschieds in der Verbrückung unterscheiden sich die kritischen Kräfte von Dextran und Amylose (700 pN vs. 280 pN) recht deutlich. Noch verblüffender ist der Unterschied der elastischen Eigenschaften zur Zellulose: Obwohl sie chemisch identisch mit der Amylose ist und sich nur durch die Stereospezifität des asymmetrischen C₁-Atoms unterscheidet, zeigt die Kraft-Dehnungskurve von Zellulose überhaupt keine Schulter.

Auch hier ermöglichten Molekulardynamik-Simulationen detaillierte Modelle. Tatsächlich hatten wir die Schulter in der Kraft-Dehnungskurve von Dextran bereits in früheren Simulationen gesehen, was die beschriebenen Messungen motiviert hat [4]. Insbesondere

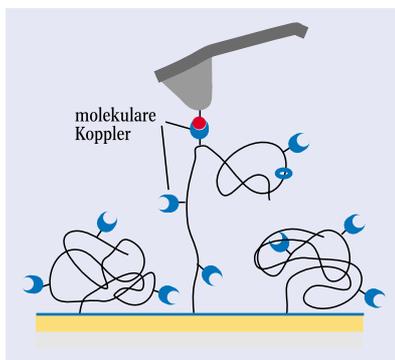


Abb. 3: Prinzipielle Vorgehensweise bei Einzelmolekül-Dehnexperimenten mit dem Kraftmikroskop. Das zu untersuchende Polymer wird über molekulare Koppler an der Spitze des Kraftmikroskops (grau) befestigt, die dann zurückgezogen wird.

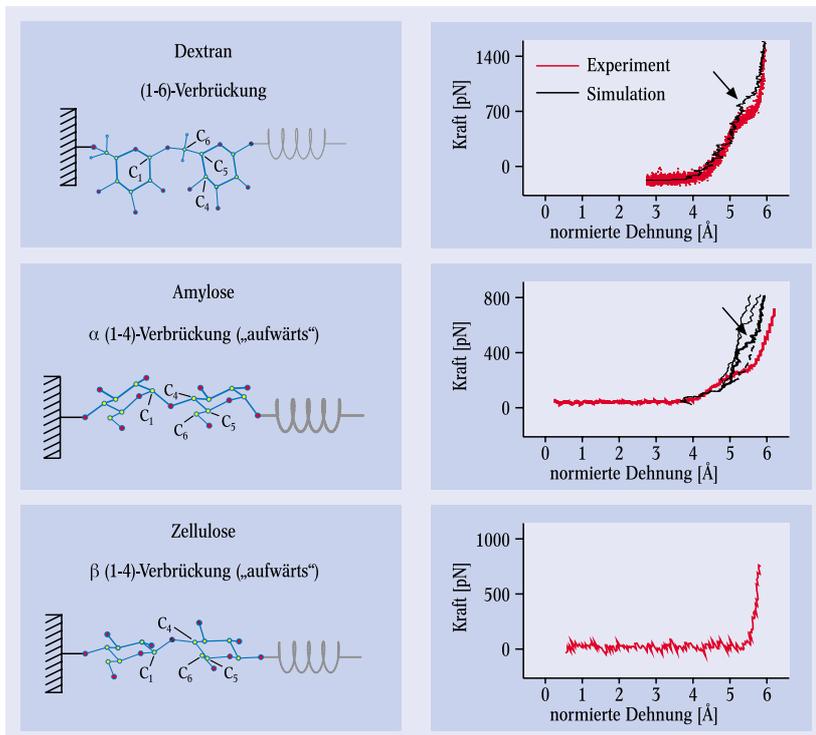


Abb. 4: Links: Strukturen der untersuchten Zuckerpolymere Dextran, Amylose und Zellulose (als Dimere gezeigt). Zur simulierten Dehnung wird ein Atom an einem Ende des Polymers fixiert, während das andere Ende einem harmonischen Potential (Feder) unterworfen wird, das gleichmäßig in Ziehrichtung bewegt wird (Pfeil).

Rechts: Gemessene (rot) und berechnete (schwarz) Kraft-Dehnungskurven der drei untersuchten Polysaccharide. Für Amylose zeigen die durchgezogenen Linien den Einfluss unterschiedlicher Seitengruppen; die gestrichelte Linie zeigt das Elastizitätsverhalten ohne Berücksichtigung von Seitengruppen.

war nun die Art des intramolekularen Konformationsübergangs von Interesse. Abbildung 4 (links) zeigt die prinzipielle Vorgehensweise. Auch hier wurde das rechte Ende des jeweiligen Polymers einem „Federpotential“ unterworfen, während das linke Ende ortsfest gehalten wurde. Um eine eventuelle Längenabhängigkeit auszuschließen, wurden Polymere bis zu einer Länge von 16 Monomeren simuliert; der besseren Übersicht halber zeigt Abb. 4 lediglich Dimere.

Abbildung 4 (rechts) zeigt Kraft-Dehnungskurven (schwarz), die aus solchen Simulationen erhalten wurden. Deutlich zu erkennen sind auch hier Schultern bei Dextran und Amylose. Im Gegensatz dazu zeigt Zellulose keine Schulter, in Übereinstimmung mit dem Experiment.

Die Simulationen bestätigten die Vermutung, dass intramolekulare Konformationsübergänge für dieses charakteristische Verhalten verantwortlich sind (Abb. 5). Wie sich zeigte, treten dabei zwei verschiedene Typen von Konformationsübergängen auf: solche, die die gegenseitige Lage der einzelnen Monomere zueinander verändern, wie etwa im Fall des Dextrans (links), und solche, die innerhalb der einzelnen Monomere stattfinden und deren Konformation ändern, wie im Fall der Amylose (rechts).

Auch das recht unterschiedliche Verhalten von Amylose und Zellulose kann durch die Simulationen erklärt werden: Zwar treten in beiden Polymeren Konformationsübergänge auf; im Gegensatz zur Amylose ist der Konformationsübergang der Zellulose jedoch nur mit einer sehr geringen Verlängerung der Monomere verbunden, sodass er makroskopisch in der Kraft-Dehnungskurve nicht in Erscheinung tritt.

Bei der Amylose gelang uns eine weitere interessante Beobachtung: Im Experiment werden an die Zuckermonomere so genannte Schutzgruppen gebunden (im Bild nicht gezeigt), welche die Löslichkeit der Polymere gewährleisten; diese Schutzgruppen wurden auch in den Simulationen berücksichtigt. Wird dieser Effekt aber vernachlässigt, so ändert sich die Kraft-Dehnungskurve drastisch (Abb. 4, gestrichelte Kurve): Eine nun auftretende inhibitorische Wechselwirkung der Konformationsübergänge benachbarter Monomere unterdrückt die Schulter nahezu vollständig. Ferner ließen sich die elastischen Eigenschaften von Amylose durch relativ geringe Modifikationen der Seitengruppen erheblich verändern (dünne Linien) – ein für die Materialwissenschaften interessanter Befund, der sich auch auf andere Polymere übertragen lassen sollte.

Erzwungene Proteinfaltung

Eine wesentlich kompliziertere Situation finden wir bei der erzwungenen Entfaltung von Proteinen vor. Deren komplexe dreidimensionale Struktur wird von verschiedenen konkurrierenden schwachen Wechselwirkungen stabilisiert (Infokasten „Proteinstruktur“). Daher weist der Konfigurationsraum von Proteinen – ähnlich wie bei Gläsern – eine sehr große Zahl lokaler Energieminima auf, sodass es mehrere Sekunden bis Minuten dauern kann, bis das Protein bei der Faltung „sein“ globales Minimum der freien Energie findet. Aus demselben Grund ist für den Theoretiker das sog. „Faltungsproblem“, d. h. die Vorhersage der räumlichen Struktur eines Proteins allein aus der Kenntnis der Abfolge seiner Aminosäuren, gegenwärtig – und wohl auch in naher Zukunft – eines der herausragenden Probleme. Vom Studium der erzwungenen Entfaltung

erwarteten wir daher nicht zuletzt auch, Einblicke in den Prozess der Proteinfaltung zu erlangen.

Als Beispiel haben wir das Muskelprotein Titin gewählt. Titin ist für die passive Elastizität des Muskels verantwortlich: Wird eine Muskelzelle gedehnt, sorgt Titin dafür, dass sie anschließend wieder ihre ursprüngliche Form annimmt. Einzelne Titinmoleküle können sich dabei auf über das Doppelte ihrer ursprünglichen Länge ausdehnen. Wie dieser Mechanismus der Titin-Elastizität auf molekularer Ebene abläuft, war lange Zeit ungeklärt.

Titin besteht aus einer Serie von über zweihundert Modulen, so genannten Immunglobulindomänen (Ig-Domänen, vgl. Abb. 6, oben), die wiederum jeweils aus ca. 90 Aminosäuren bestehen und in eine Faltblattstruktur [Abb. 7, Inset (1)] falten. Mit der Einzelmolekül-Kraftspektroskopie haben wir die Entfaltungskräfte dieser Ig-Domänen untersucht [5].

Ein Abschnitt aus dem Titin des Herzmuskels, der aus acht dieser Ig-Domänen besteht, wurde auf einer Oberfläche immobilisiert und im Kraftmikroskop gedehnt (Abb. 6, oben). Dabei bildet sich ein ausgeprägtes Sägezahnmuster aus (Abb. 6, unten, schwarze Kurven). Jeder „Zahn“ (Peak) entspricht dem Entfaltungsprozess einer einzelnen Domäne. Dabei brechen die Domänen beim Erreichen der maximalen Kraft in einem Alles-oder-Nichts-Prozess auseinander. Der Abstand zwischen zwei Peaks entspricht exakt dem Längenzuwachs, den man erwartet, wenn die ca. 90 Aminosäuren einer Domäne vom völlig gefalteten in den komplett entfalteten Zustand einer Polypeptidkette übergehen. Die ansteigenden Flanken der jeweiligen Peaks spiegeln die entropische Elastizität des entfalten Proteins wider.

Eine Analyse der Kurvenform (rote Fitkurven) ergibt eine Persistenzlänge (ein Maß für die Steifigkeit der entfalteten Kette) von ca. 0,4 nm. Wenn man das Protein vollständig entfaltet hat und die Kette wieder relaxiert (blaue Kurve in Abb. 6), dann weist diese Kurve keinerlei Diskontinuitäten auf, die Anzeichen einer Rückfaltung sein könnten.

Tatsächlich stellt sich heraus, dass Rückfaltung nur bei extrem kleinen Kräften (ca. 2 pN) stattfinden kann. Da die blaue Kurve offensichtlich einen anderen Verlauf hat als die Sägezahnkurve bei der Entfaltung, ist dieses Experiment nicht reversibel und der Entfaltungsprozess findet somit weit vom Gleichgewicht statt. Im Gleichgewicht müssten sowohl Rückfaltungsereignisse als auch Entfaltungsereignisse bei derselben Kraft stattfinden und beide Kurven dieselbe Form besitzen. Die Tatsache, dass der erzwungene Entfaltungsprozess im Nichtgleichgewicht stattfindet, erklärt die hohen Entfaltungskräfte. Eigentlich müsste man aus den Flächen unterhalb der Kraft-Dehnungskurven die freie Enthalpie des Faltungsprozesses bestimmen können. Vergleicht man jedoch die (kalorimetrisch bestimmte) freie Enthalpie pro gefalteter Domäne (ca. $10 k_B T$) mit der mechanisch deponierten Energie während der erzwungenen Entfaltung einer Domäne (schraffierter Bereich in Abb. 6, ca. $1000 k_B T$), so ergibt sich ein Unterschied von zwei Größenordnungen. Fast die ganze mechanische Energie wird dissipiert – und genau das macht Titin zum mechanischen Stoßfänger im Muskel. Titin entfaltet sich bei gelegentlich auftretenden extremen Kräften, bevor andere Komponenten geschädigt werden. Bei einer anschließenden Relaxierung des Muskels können die entfalten Domänen dann wieder zurück-

fallen. Paul Hansma von der University of California in Santa Barbara hat kürzlich vorgeschlagen, nach diesem Prinzip Klebstoffe zu synthetisieren, die neben hoher Bruchfestigkeit auch sehr viel Energie aufnehmen können.

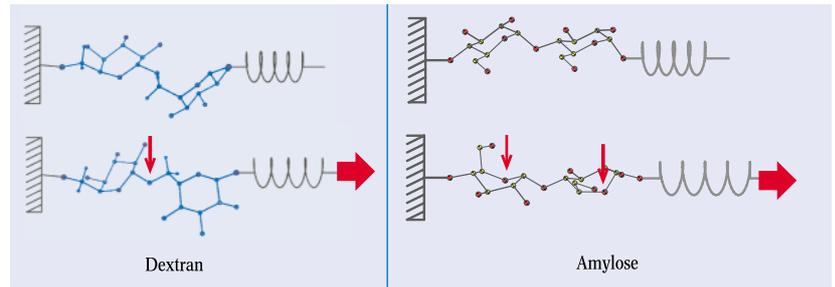


Abb. 5: Kraftinduzierte Strukturänderungen (Pfeile) in Dextran (links) und Amylose (rechts). Im relaxierten Zustand nehmen die Zuckermomere die energetisch günstige „Sesselform“ ein (oben); nach Anlegen einer Zugkraft drehen sich die

Monomere im Dextran gegeneinander um die Längsachse des Polymers (links unten); Amylose zeigt einen *intramonomeren* Übergang von der ursprünglichen Sesselform zu einer „Wannenform“ (unten rechts).

Aus der angesprochenen Diskrepanz zwischen freier Enthalpie im Gleichgewicht und dissipierter Energie bei der erzwungenen Entfaltung lässt sich eine weitere Eigenschaft der Entfaltungskräfte ableiten: Die Entfaltungskräfte müssen von der Ziehgeschwindigkeit abhängen. Da unter Gleichgewichtsbedingungen (unendlich langsame Ziehgeschwindigkeit) die Fläche unterhalb der Kurve sich dem Wert von $10 k_B T$ annähern muss, nimmt folglich auch die Entfaltungskraft mit sinkender Ziehgeschwindigkeit ab.

Eine quantitative Beschreibung ist mithilfe der Übergangsratentheorie möglich. Bereits eine vereinfachte Ableitung zeigt den Haupteffekt: eine logarithmische Abhängigkeit der Entfaltungskraft von der Ziehgeschwindigkeit (Infokasten „Geschwindigkeitsabhängigkeit von Abreiß-/Entfaltungskräften“). Ent-

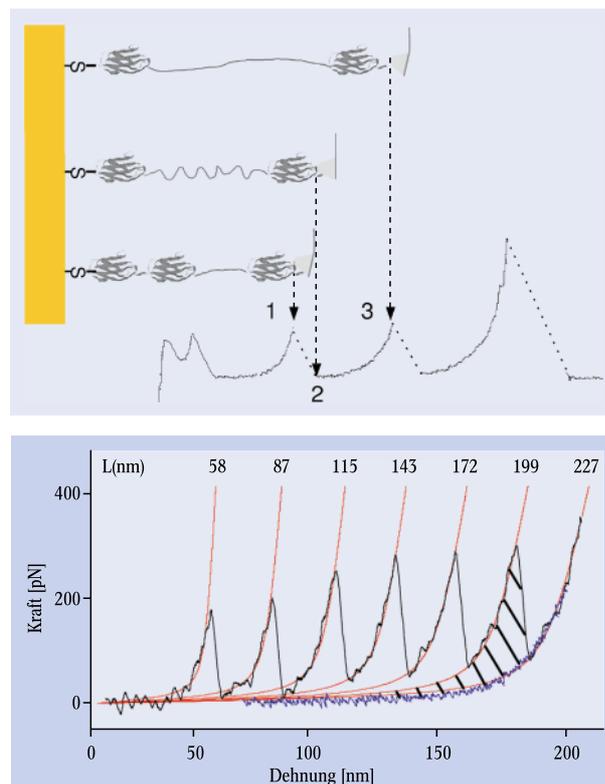


Abb. 6: ► oben: Ein Abschnitt aus dem Titin des Herzmuskels, das aus acht Immunglobulindomänen aufgebaut ist, wurde auf einer Oberfläche immobilisiert und im Kraftmikroskop gedehnt. ► unten: Jeder „Zahn“ der Kraft-Dehnungskurve entspricht dem Entfaltungsprozess einer einzelnen Domäne.

sprechende Messungen der Entfaltungskräfte von Titin für unterschiedliche Kraftzunahmeraten wurden in der Arbeitsgruppe von J. Fernandez an der Mayo Clinic Rochester, USA, und von uns in der Arbeitsgruppe von H. Gaub an der Universität München durchgeführt [5, 8]. Wie erwartet, liegen die Entfaltungskräfte in logarithmischer Auftragung auf einer Geraden (Abb. 7, blau/grün).

Dynamische Kraftspektroskopie

Eine genauere Analyse, die am Ende des Infokastens „Geschwindigkeitsabhängigkeit von Abreiß-/Entfaltungskräften“ skizziert ist, lässt Abweichungen von diesem einfachen Verhalten erwarten. Insbesondere zeigt sich, dass solche Abweichungen durch die Details der jeweiligen Energielandschaft bestimmt sind, die z. B. dem Entfaltungsprozess zugrunde liegt. Damit sollte es umgekehrt möglich sein, allein aus einer Messung der Änderung der Entfaltungskraft mit der Rate der Kraftzunahme ortsaufgelöste Informationen über diese Energielandschaft zu gewinnen. Diese Vorgehensweise wird als „dynamische Kraftspektroskopie“ bezeichnet.

Wie Evan Evans von der British Columbia University in Vancouver, Canada, zuerst zeigte, lässt sich mit

der Dynamischen Kraftspektroskopie die Lage einzelner Barrieren in der Energielandschaft der Streptavidin/Biotin-Bindung mit einer Genauigkeit unterhalb eines Ångströms bestimmen, ohne dabei eine entsprechende instrumentelle Ortsauflösung zu benötigen.

Wir konnten sogar noch einen Schritt weitergehen: Berücksichtigt man zusätzlich, dass auch die Lage jeder *einzelnen* Barriere mit zunehmender Zugkraft kontinuierlich verschoben wird, dann sollte sich aus dem gemessenen Verlauf eines dynamischen Kraftspektrums der gesamte Verlauf großer Teile der Energielandschaft ablesen lassen, sodass z. B. das Brechen einzelner Wasserstoffbrückenbindungen auflösbar wäre. Die Ableitung der entsprechenden Theorie ist uns kürzlich gelungen [10].

Proteinentfaltung im Computer

Gleichzeitig ermöglicht die skizzierte einfache Rantentheorie den Vergleich von Experiment und Simulation. Auch der recht komplexe Vorgang der erzwungenen Proteinentfaltung lässt sich dank der inzwischen zur Verfügung stehenden äußerst leistungsfähigen Parallelrechner seit kurzem simulieren. Die roten Datenpunkte in Abb. 7 zeigen die in unseren Simulationen

Geschwindigkeitsabhängigkeit von Abreiß-/Entfaltungskräften

Wir betrachten den Verlauf $G(x)$ der Gibbsschen freien Energie (blaue Kurve) entlang einer Reaktionskoordinate x , welche die Entfaltung des Proteins beschreibt – etwa der Abstand der beiden Enden des Proteins. Eine Barriere trennt den gefalteten bzw. gebundenen Zustand (links) vom entfalteten bzw. ungebundenen Zustand (rechts). In einem realen Protein ist die Energielandschaft selbstverständlich ungleich komplexer. Trotzdem gelten ganz allgemein die folgenden Überlegungen für alle aktivierten Prozesse, in denen eine Barriere zu überwinden ist, also, z. B. auch für die im Text beschriebene erzwungene nichtkovalente Ligand/Rezeptor-Trennung [6] und ähnliche Einzelmolekülexperimente, etwa mit „optischen Pinzetten“. Über den Boltzmann-Faktor bestimmt die Höhe ΔG^\ddagger der Barriere die spontane Entfaltungsrate k_0 , also die Zeit, die das Protein im Mittel benötigt, um thermisch aktiviert und ohne äußere Einwirkung die Barriere zu überwinden. Für Titin etwa beträgt diese Zeit ca. eine Stunde. Würde man das Ziehexperiment langsamer ausführen als diese Zeitspanne, so würde man überhaupt keine Entfaltungskraft messen: Das Protein hätte sich schon spontan entfaltet, noch bevor eine nennenswerte Zugkraft

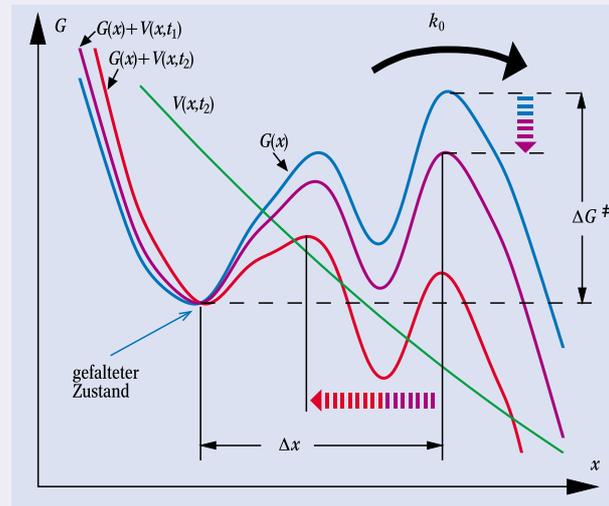
aufgewendet worden wäre.

Wie in den skizzierten Simulationen beschreiben wir die einwirkende Zugkraft durch ein zeitabhängiges harmonisches Potential, $V(x,t) = \frac{1}{2} k (x-vt)^2$ (grün), wobei k die effektive Federhärte des Hebelarms des Kraftmikroskops ist. Gleich dem piezogesteuerten Sub-

nahezu konstante Kraft $F(t) = kv t$, die mit der Rate kv linear in der Zeit zunimmt.

Auf diese Weise verformt die Wirkung der angelegten Kraft die Energielandschaft (violett, rot) dergestalt, dass die Höhe der zu überwindenden Barrieren etwa mit der Rate $kv\Delta x$ abnimmt, wobei wir die ebenfalls auftretende

die Rate der Kraftzunahme festgesetzten Zeitskala τ ein thermisch aktiviertes Überqueren möglich ist. Die zu diesem Zeitpunkt wirkende Zugkraft wird dann als Entfaltungskraft gemessen. Aus dieser Bedingung lässt sich ableiten, dass die Entfaltungskraft $F(kv)$ logarithmisch mit der Rate kv der Kraftzunahme anwächst, $F(kv) = (k_B T / \Delta x) \ln(v/k_0 \Delta x)$. Bei dieser Herleitung wurde vereinfachend angenommen, dass die durch das Ziehpotential $V(x,t)$ bedingte Verformung der Energielandschaft $G(x)$ die Position x ihres Minimums und Maximums und damit Δx unverändert lässt. Bereits für den dargestellten Fall *zweier* Barrieren wird obige Annahme verletzt: Ab einer kritischen Zugkraft nämlich wird die linke Barriere zum globalen Maximum (rote Kurve) und damit bestimmend für den Boltzmann-Faktor. Ab diesem Zeitpunkt (der zwischen t_1 und t_2 liegt) verkürzt sich die effektive Entfaltungslänge Δx sprunghaft, und nach obiger Gleichung erhöht sich die logarithmische Steigung der Entfaltungskraft entsprechend. Auf diese Weise spiegelt sich die Form der Energielandschaft $G(x)$ in der Abhängigkeit $F(kv)$ der Abreißkraft von der Rate der Kraftzunahme, dem sog. dynamischen Kraftspektrum, wider.



stratträger wird das Minimum von $V(x,t)$ mit der Geschwindigkeit v bewegt. Ist die Feder, wie skizziert, weich, also deren thermische Fluktuation $(k_B T/k)^{1/2}$ klein gegenüber der Abreißlänge Δx , dann ist das Ziehpotential im Bereich der Barriere annähernd eine Gerade, und es wirkt dort eine räumlich

leichte Verschiebung des Minimums zunächst vernachlässigen wollen. Steigern wir die Zugkraft nun also schneller als die spontane Entfaltungsrate k_0 , d. h., $1/\tau = kv\Delta x / \Delta G^\ddagger > k_0$, dann wird das Protein genau dann entfalten, wenn das Ziehpotential die Barriere soweit abgesenkt hat, dass auf der durch

für verschiedene Kraftzunahmeraten auftretenden Entfaltungskräfte. Wegen der (trotz hoher Rechenleistung) auf wenige zehn Nanosekunden beschränkten Simulationszeitspanne müssen die Kraftzunahmeraten deutlich höher als im Experiment gewählt werden. Darüber hinaus treten im Bereich oberhalb von 10^{15} pN/s Reibungskräfte auf, die einen zusätzlichen, *linearen* Anstieg γv der Entfaltungskraft bedingen. Da sich der Reibungskoeffizient γ recht genau aus den Simulationen bestimmen lässt, kann dieser Effekt berücksichtigt und damit auch die Steigung des logarithmischen Anstiegs der Entfaltungskraft aus den Simulationen abgeleitet werden. Entsprechend wurde die durchgezogene Kurve ausschließlich aus den Simulationsergebnissen sowie aus der Kenntnis der spontanen Entfaltungsrate gewonnen. Dass die experimentellen Werte auf dieser Kurve liegen, zeigt, dass unsere Simulationen den Vorgang der Proteinentfaltung recht genau beschreiben.

Zur Illustration des Entfaltungsweges zeigt Abb. 7 sechs Momentaufnahmen. Man erkennt, dass sich die Faltblätter AB und A'G schon sehr früh entfalten (1–3). Überraschenderweise bestimmt bereits dieser erste Schritt die Entfaltungskraft; die weitere Entfaltung des Proteins (3–6) erfordert nur noch eine sehr geringe Kraft und kann daher im Experiment nicht beobachtet werden. Die effektive Entfaltungslänge von 5 Å ist damit auch sehr kurz, wenn man bedenkt, dass das vollständig gestreckte Protein um ca. 260 Å länger als das gefaltete ist (vgl. auch Abb. 6, unten). Ferner fällt auf, dass in Abb. 7 im Teilbild (6) zwar alle Faltblätter vollständig aufgelöst sind, der größte Teil des Proteins zu diesem Zeitpunkt aber nach wie vor eine recht kompakte Gestalt aufweist. Dieser Befund stützt die Vorstellung, wonach sich die Proteinfaltung in zwei Schritten gliedert lässt: erstens in einen anfänglichen hydrophoben Kollaps, der durch hydrophobe Wechselwirkungen getrieben wird, und zweitens in eine darauf folgende Phase interner Umordnungen, die schließlich zur natürlichen Proteinstruktur führt.

Diese Ergebnisse stimmen mit Simulationsrechnungen der Arbeitsgruppe von Klaus Schulten (University of Illinois at Urbana/Champaign) überein [9]. Aufgrund der beschriebenen zentralen Rolle des Faltblatts AB konnte eine Mutante vorgeschlagen werden, die den Entfaltungsvorgang gezielt verändern sollte. Diese Vorhersage wurde kürzlich in der Arbeitsgruppe von J. Fernandez bestätigt [11].

Die beschriebenen und zahlreiche andere Beispiele zeigen: Die Funktionsweise wie auch der Zweck vieler Proteine ist *mechanisch*. Mit diesen „Nano-Maschinen“ führt uns die Natur Wunderwerke der Nanotechnologie vor, deren mechanische Elemente oft aus nur wenigen Atomen bestehen. So wird etwa bei der ATP-Synthese die benötigte Energie über eine elastische „Kurbelwelle“ zugeführt, deren Durchmesser nur 1,2 nm beträgt.

Dank des Human Genome Projects und anderer Sequenzierungsprojekte besitzen wir gegenwärtig ca. 10^7 „Teilleisten“ (Sequenzen) dieser „Maschinen“; von ca. 13 000 ist uns der räumliche Aufbau in atomarem Detail bekannt. Deren Funktionsmechanismen zu enträtseln ist eine große Herausforderung. Sie erfordert den gemeinsamen Einsatz vieler unterschiedlicher Techniken. Ein besseres Verständnis dieser „Nano-Maschinen“ wird uns in die Lage versetzen, deren Tricks etwa in der Nanotechnologie zu nutzen. Kraftmikroskopie und Computersimulationen können hier wichtige

Beiträge liefern.

Gleichzeitig eröffnet sich uns ein neuer Blickwinkel: Neben die thermodynamische Ensemble-Beschreibung im Gleichgewicht tritt nun die Betrachtung der mechanischen Eigenschaften *einzelner* Moleküle, oft fern vom Gleichgewicht. Wir messen deren Reaktion auf angelegte Kräfte – ganz ähnlich der Untersuchung makroskopischer Maschinen.

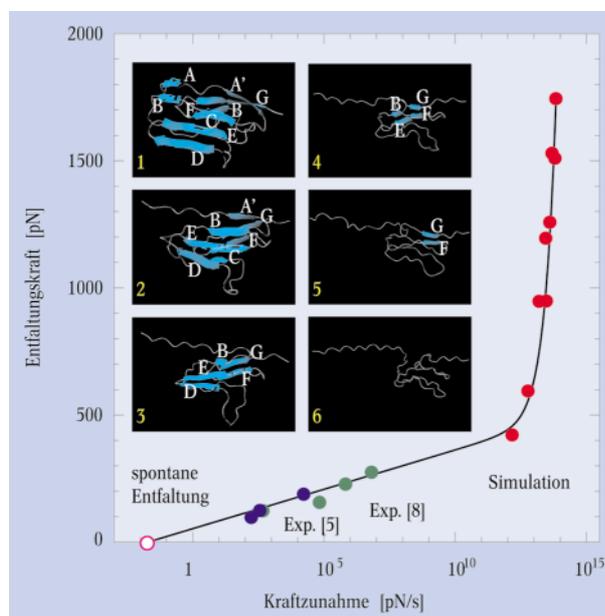


Abb. 7: Gemessene (blau [5], grün [8]) und berechnete (rot) Entfaltungskräfte für Titin als Funktion der Anstiegsrate kv der angelegten Zugkraft (die Größe der Punkte gibt den Messfehler an). Die Bilder zeigen Schnappschüsse des Proteins während der simulierten Entfaltung.

In Ergänzung der Sequenz- und Struktur-basierten Werkzeuge der Bioinformatik steht uns mit der akkuraten Simulation der molekularen Dynamik von Einzelmolekülexperimenten auch das nötige theoretische Rüstzeug zur Verfügung. Sie gibt uns atomar aufgelöste und überprüfbare Modelle der kraftinduzierten Vorgänge an die Hand und erlaubt es gleichsam, den „Maschinen“ bei der Arbeit zuzusehen.

*

Weitere Informationen und Publikationen zu den beschriebenen Arbeiten unter www.biophysik.physik.uni-muenchen.de und www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/071. Wir bedanken uns bei Holger Wagner für die Überlassung der Simulationsdaten zu Abb. 7.

Literatur

- [1] C. Branden und J. Tooze: Introduction to Protein Structure, Garland Publishing, New York (1991)
- [2] E.-L. Florin et al., Science **264**, 415 (1994)
- [3] H. Grubmüller et al., Science **271**, 997 (1996)
- [4] M. Rief et al., Science **275**, 1295 (1997)
- [5] M. Rief et al., Science **276**, 1109 (1997)
- [6] S. Izraïlev et al., Biophys. J. **72**, 1568 (1997)
- [7] B.L. Smith et al., Nature **399**, 761 (1999)
- [8] M. Carrion-Vazquez et al., Proc. Natl. Acad. Sci. **96**, 3694 (1999)
- [9] H. Lu et al., Biophys. J. **75**, 662 (1998)
- [10] B. Heymann und H. Grubmüller, Phys. Rev. Lett. **84**, 6126 (2000)
- [11] P. Marszalek et al., Nature **402**, 100 (1999)