

Zerren an Biomolekülen im Computer

Mechanische Kräfte sind lebenswichtig – im großen wie im kleinen Maßstab. Eine Forschungsgruppe am Heidelberger Institut für Theoretische Studien untersucht ihre Wirkung auf der kleinsten Ebene: vom Protein bis hin zur einzelnen chemischen Bindung.

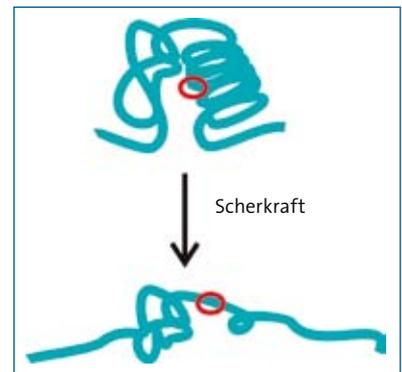
Von Ilona Baldus und Frauke Gräter

Ob Pflanze oder Säugetier, kein Lebewesen kann ohne Einwirkung mechanischer Kräfte überleben. Ein beeindruckendes Beispiel dafür kommt aus der Raumfahrt: Während eines mehrwöchigen Aufenthalts im All würde ein Astronaut ohne spezielles Krafttraining einen erheblichen Teil seiner Knochenmasse verlieren. Woran liegt das? Der menschliche Körper erneuert ständig sein Knochengewebe und baut es dafür kontinuierlich ab. Der gleichzeitige erneute Aufbau hängt allerdings davon ab, wie stark der Knochen benutzt wird – das heißt, in welchem Maß Kräfte durch Stehen, Gehen und Laufen darauf einwirken. Im Weltall ist die Gravitation um ein Vielfaches geringer als am Erdboden, was die Belastung der Knochen stark reduziert und ihren Wiederaufbau verzögert. Nur das Krafttraining im All verhindert also, dass ein Raumfahrer mit stark geschwächtem Skelett auf die Erde zurückkehrt.

Der große Einfluss mechanischer Kräfte auf das Leben zeigt sich selbst auf der Ebene einzelner Zellen. Auch sie reagieren in einer ungewohnten Umgebung manchmal anders als normal, wie beispielsweise André E. X. Brown und Dennis E. Discher von der University of Pennsylvania in Philadelphia 2009 festgestellt haben. Demnach wachsen Nervenzellen auf dem harten Boden der im Labor verwendeten Petrischalen weitaus schlechter als auf einer weichen, elastischen Oberfläche, an der sie fester haften. Das wirft natürlich die Frage auf, wie lebende Organismen oder gar einzelne Zellen die auf sie einwirkende mechanische Kraft eigentlich spüren. Verfügen sie über spezielle Sensoren, die einen Zug

Kontrolle der Blutgerinnung

Der **Von-Willebrand-Faktor** spielt eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung. Scherspannungen beim Austreten von Blut aus einer Wunde strecken das verknäuelte fadenförmige Molekül. Dadurch wird es klebrig und verbindet sich mit Blutplättchen zu engmaschigen Netzwerken. Wie Computersimulationen ergaben, legt die Entfaltung allerdings auch eine Stelle frei, an der Enzyme das Molekül zerschneiden können (roter Kreis). Das verhindert ein Überschießen der Gerinnungsreaktion und die Bildung von Thromben. In der Schemazeichnung ist nur der relevante Teil des in Wahrheit viel größeren Proteins gezeigt.



oder Druck registrieren und mit einem Signal darauf antworten, das ein biochemisches Programm in Gang setzt?

Der Antwort auf diese Frage sind Forscher in den letzten Jahren ein gutes Stück näher gekommen. Offenbar gibt es tatsächlich Kraftsensoren, und vereinzelt wurden sie auch schon identifiziert. Wie sie genau funktionieren, lässt sich experimentell aber nur schwer und oft ausschließlich indirekt beobachten; denn es handelt sich meistens um Proteine, also Eiweißstoffe, die typischerweise nicht mehr als wenige Nanometer (milliardstel Meter) messen.

In der Gruppe für »Molekulare Biomechanik« am Heidelberger Institut für Theoretische Studien (HITS) benutzen wir deshalb leistungsstarke Computer und physikalische Modelle, um den Einfluss mechanischer Kräfte auf einzelne Proteinmoleküle zu ergründen. Wir möchten die Funktionsweise solcher win-

zigen molekularen Kraftsensoren im Detail verstehen. Manche Krankheiten beruhen darauf, dass das Messen und Verarbeiten der mechanischen Kraft in bestimmten Geweben gestört ist. Mit unseren Untersuchungen verfolgen wir das Ziel, in Zusammenarbeit mit Medizinern die molekularen Mechanismen hinter solchen Störungen aufzudecken.

Scherkräfte im Blut

Der so genannte Von-Willebrand-Faktor (VWF) bietet ein anschauliches Beispiel für den Einfluss mechanischer Kräfte auf Vorgänge in Lebewesen. Es handelt sich um ein Protein im Blut, das die Blutgerinnung einleitet. Fehlt der VWF oder wirkt er nur unzureichend, kommen Blutungen nicht zum Stillstand, was tödlich sein kann. In diesem Fall sprechen Mediziner auch vom Von-Willebrand-Syndrom. Umgekehrt kann eine zu starke Wirkung des VWF, also eine über-

mäßige Blutgerinnung, die Bildung von Pfropfen – Thrombosen – verursachen. Mechanische Kräfte kontrollieren das Gleichgewicht zwischen Blutfluss und -gerinnung in den Adern und besonders im Umkreis einer Wunde.

Generell gilt: Wann immer eine Flüssigkeit durch ein Rohr strömt, entsteht eine Scherkraft, weil die Strömung in der Rohrmitte schneller ist als am Rand. Ein mit schwimmender Faden wird dadurch gestreckt. Der VWF ist ein solcher Faden, allerdings so winzig klein und dünn, dass er sich nur im Mikroskop erkennen lässt. Er geht im Scherfluss, der bei einer Verletzung besonders hoch ist, von einem verknäuelten in den langgestreckten Zustand über (Kasten links). Als Folge davon wird er besonders klebrig und verbindet sich mit anderen solchen Fäden und mit Blutplättchen zu engmaschigen Netzwerken. Sie bilden das erste Gerüst für Blutgerinnsel, die das Ausfließen von Blut verhindern.

Interessanterweise gibt es im langen Fadenmolekül des VWF eine Stelle, an der ihn ein anderer Blutbestandteil, eine Protease, zerschneiden kann. Im verknäuelten Zustand ist diese Schnittstelle tief im Inneren – in der so genannten A2-Domäne – verborgen und damit für die molekulare Schere schlecht zugänglich. Wir vermuteten jedoch, dass sie frei gelegt wird, wenn sich der Faden durch die Scherkraft streckt.

Um Klarheit zu gewinnen, untersuchten wir den Vorgang in Computersimulationen. Hierzu befestigten wir an den Enden des verknäuelten Proteins virtuelle Federn und bewegten diese voneinander weg. Das klingt viel einfacher, als es ist. Tatsächlich erforderte es sehr aufwändige Rechnungen, denen Modelle der klassischen newtonschen Physik zu Grunde lagen. Am Ende aber konnten wir so ermitteln, wie sich der VWF unter Zugspannung entfaltet. In der Tat geben bestimmte Teile des Fadenmoleküls sukzessive der Kraft nach und lösen sich voneinander. Dabei wird schließlich auch die Spaltstelle frei gelegt, an der die Schneidezynase ansetzen können.

Das ist für die biologische Rolle des VWF sehr wichtig. Die Netzwerke, zu denen sich die von der Scherkraft gestreckten Fäden zusammenlagern, sind zwar für die Blutgerinnung notwendig, doch ein unbegrenztes Wachstum würde das Gefäß für alle Zeit

komplett verstopfen. Besonders hohe Zugkräfte entfalten den VWF deshalb so weit, dass die Protease Zutritt zur Schnittstelle erhält. So kann sich ein Gleichgewicht zwischen Blutgerinnung und Auflösung der Blutpfropfen einstellen. Der Kraftsensor dafür ist der VWF. Er übersetzt ein rein mechanisches in ein biochemisches Signal – ein lebenswichtiger Vorgang.

Bindungsbruch unter Spannung

Spielen mechanische Kräfte auch in noch kleineren Dimensionen eine Rolle? Jegliche feste Materie besteht aus Atomen, die durch chemische Bindungen zusammengehalten werden. Diese ähneln Klebstoffen unterschiedlicher Haftkraft. Je nach Funktion des Moleküls sind sie sehr stark oder leicht zu lösen. Manche wirken als Schalter, der nach Bedarf geöffnet wird, andere sollen einer molekularen Struktur dauerhafte Stabilität verleihen. Das gilt zum Beispiel für die Bindungen, die das Rückgrat eines Proteins aufbauen.

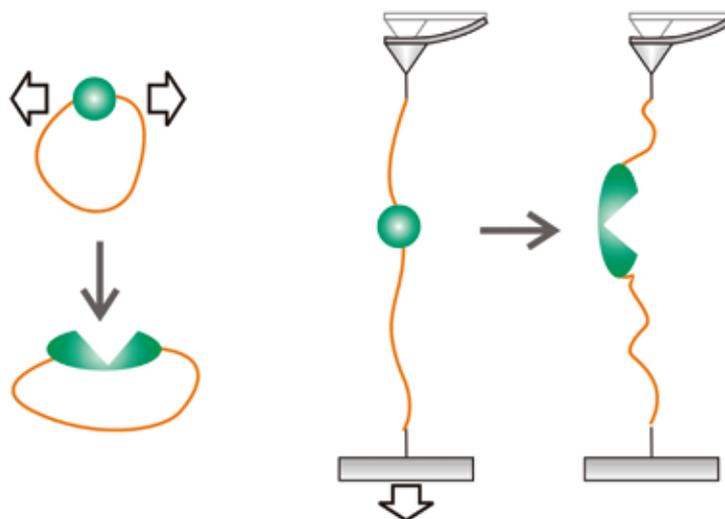
Angesichts der großen Bedeutung mechanischer Signale in Lebewesen liegt die Vermutung nahe, dass Zugspannungen auch

chemische Bindungen in Molekülen verstärken oder schwächen können. Wann und wie passiert das? Dieser Frage sind wir nachgegangen. Wir wollten wissen, wie leicht sich eine Bindung lösen lässt, wenn man von beiden Seiten daran zieht wie an einem Seil. Allerdings ist rohe Gewalt nicht immer das beste Mittel. Man denke nur an eine klemmende Tür. Meist gibt sie zwar umso eher nach, je stärker man dagegedrückt. Trotzdem ist es nicht immer angebracht, sich mit voller Wucht dagegenzuwerfen. Besser versucht man vielleicht zunächst, die Tür vorsichtig mit der Klinke zu öffnen. Auch bei der chemischen Bindung hängt die ideale Öffnungsmethode vom Einzelfall ab.

In Proteinen gibt es verschiedenste Wechselwirkungen zwischen den Atomen. Zwei davon wollen wir hier betrachten: Wasserstoffbrücken und kovalente Bindungen. Erstere ähneln Klettverschlüssen. Einzeln lassen sie sich leicht lösen, aber im Verbund sind sie sehr stabil. Wasserstoffbrücken halten Strukturelemente wie das Beta-Faltblatt und die Alpha-Helix zusammen. Im letzteren Fall sind die Proteinbausteine, die Aminosäuren, wie

Auf Biegen und Brechen

Inwieweit mechanische Kräfte das Öffnen einer Bindung erleichtern, lässt sich experimentell ermitteln. So herrscht in Ringmolekülen je nach ihrer Größe eine unterschiedlich starke Spannung (links). Man kann nun prüfen, ob sich dieser Umstand auf die Geschwindigkeit des Bindungsbruchs auswirkt. Eine andere Möglichkeit ist, das Molekül in ein Kraftmikroskop einzuspannen und durch Verbiegen des Tastarms (Cantilevers) einen Zug darauf auszuüben (rechts).

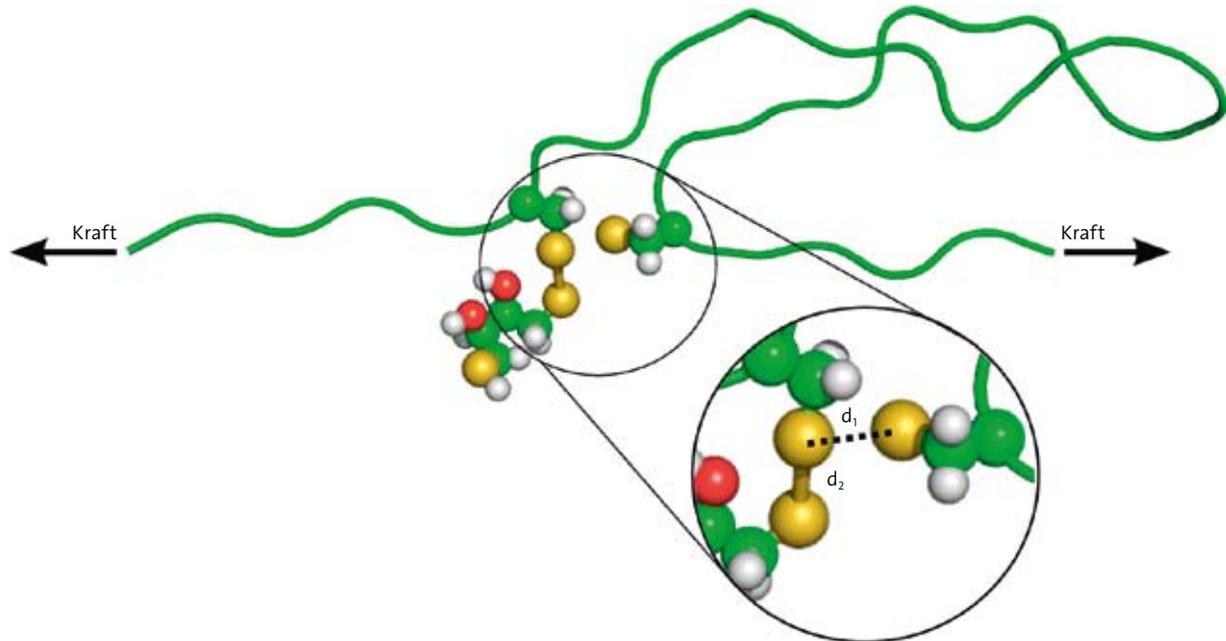


ILONA BALDUS UND FRAUKE GRÄTER

Molekulare Brückensprengung

Das kleine Molekül DTT (Dithiothreitol) zerstört die Disulfidbrücke d_1 in einem Protein (Titin) unter Bildung einer neuen Disulfidbrücke d_2 . Wie Computersimulationen ergaben, erleich-

tert eine angelegte Zugspannung den Bindungsbruch vor allem dadurch, dass das Schwefelatom von DTT schon aus größerer Entfernung die neue Disulfidbindung eingehen und die alte dabei lösen kann.



ILONA BALDUS UND FRAUKE GRÄTER

in einer Wendeltreppe angeordnet: Das Rückgrat bildet das Gerüst und die Wasserstoffbrücken das Gelände. In einem Beta-Faltblatt verlaufen zwei Abschnitte des Proteinrückgrats parallel zueinander. Wasserstoffbrücken verbinden diese Stränge durch elektrostatische Kräfte miteinander. Beta-Faltblätter geben Proteinen zwar große Stabilität, lassen sich aber bei genügend Zugkraft auftrennen.

Kovalente Bindungen sind wesentlich fester. Dabei teilen sich zwei Atome ein Elektronenpaar. Ein biologisch wichtiges Beispiel sind Schwefel-Schwefel-Bindungen oder, wie Chemiker sagen, Disulfidbrücken. Sie bilden sich etwa zwischen zwei Molekülen der Aminosäure Cystein. Solche Bindungen haben meist die Aufgabe, die Struktur des Proteins zu stabilisieren – auch gegen von außen einwirkende Zugkräfte.

Neuerdings lässt sich im Labor beobachten, wie Disulfidbrücken oder andere kovalente Bindungen unter Zugspannung aufbrechen (Kasten auf S. 19). Dazu befestigt man ein einzelnes Molekül in einem Kraftmikroskop mit einem Ende an der Unterlage und

mit dem anderen an der Spitze des Tastarms. Dieser besteht aus einer Blattfeder, mit der sich eine mechanische Kraft auf das eingespannte Molekül ausüben lässt. So kann man direkt verfolgen, wie leicht sich die Bindung bei welcher Zugkraft öffnet.

Doch nackte Gewalt führt dabei nicht zum Ziel. Wie in der Natur geht es darum, die Bindung so sanft wie möglich zu lösen. Das gelingt durch Zugabe von kleinen Hilfsmolekülen, so genannten Reduktionsmitteln. Diese enthalten bei Disulfidbrücken ein Schwefelatom, das sich mit dem einen Teil der Disulfidbrücke verbindet und so den anderen daraus verdrängt.

Derartige Messungen im Labor ergaben, dass sich Disulfidbindungen in Proteinen unter Mitwirkung eines Reduktionsmittels sehr leicht aufbrechen lassen. Zugspannungen von wenigen hundert Piconewton reichen bereits aus. Das entspricht in etwa der Kraft, die ein einzelner Mensch aufwenden müsste, um mit der gesamten Weltbevölkerung zusammen ein 1-Euro-Stück hochzuhalten. Dabei gilt: Je größer die Zugspannung, desto in-

stabiler wird die Bindung und desto schneller löst sie sich. Dies ist ganz ähnlich wie bei einem Gummiband: Je stärker man daran zieht, desto eher reißt es.

Man könnte meinen, die Mechanochemie einer solchen Reaktion damit verstanden zu haben – gerade weil man sich den Effekt der Zugkraft intuitiv vorstellen kann. Aber wie so oft sind die Zusammenhänge komplexer, als sie auf den ersten Blick erscheinen. So gibt es Reaktionspartner, bei denen die mechanische Kraft das Öffnen der chemischen Bindung erschwert! In einem anderen Fall, den eine Gruppe um Roman Boulatov von der University of Illinois in Urbana-Champaign 2009 entdeckte, löst sich die Disulfidbrücke unabhängig von der an ihr angreifenden Zugspannung immer gleich schnell. Für dieses Experiment bauten die Wissenschaftler die Schwefel-Schwefel-Bindung in kleine ringförmige Moleküle ein. Über die Größe des Rings konnten sie die darin herrschende Spannung gezielt verändern (siehe Kasten auf S. 19).

Wie beeinflusst eine mechanische Kraft also eine chemische Bindung? Warum er-

leichtert sie in bestimmten Fällen deren Öffnung? Wird die Bindung durch die Zugspannung vorgedehnt oder auf andere Weise geschwächt? Oder ist sie einfach nur leichter zugänglich für das Reduktionsmittel, weil das gesamte Molekül dabei auseinandergezogen wird?

In unserer Forschungsgruppe am HITS in Heidelberg suchen wir auf numerischem Weg nach Antworten auf diese Fragen. Deshalb haben wir den Bindungsbruch am Computer simuliert. Dabei zeigte sich in Einklang mit den experimentellen Befunden, dass sich Bindungen normalerweise mit steigender Kraft schneller lösen.

Wir können allerdings auch gewissermaßen genauer hinschauen, was im Einzelnen passiert. So erhalten wir Einblicke in Abläufe, die experimentell nur sehr schwer und mit großem Aufwand zugänglich wären. Zum Beispiel können wir die Reaktion in Einzelschritte zerlegen. Das Öffnen der Disulfidbrücke beginnt damit, dass sich das Schwefelatom des Reduktionsmittels der Bindung nähert, die unter Spannung steht. Es nimmt mit einem der beiden Brückenschwefelatome Kontakt auf und bildet mit ihm eine neue Disulfidbindung. Dabei wird das andere Schwefelatom verdrängt und die ehemalige Disulfidbrücke gesprengt (Kasten links).

Paradoxe Wirkung einer äußeren Zugkraft

Diesen Vorgang bezeichnen Chemiker als bimolekulare nukleophile Substitutionsreaktion (S_N2). Am Computer haben wir die einzelnen Schritte unter die Lupe genommen. Dabei interessierten wir uns für zwei Messgrößen: den Abstand zwischen den Schwefelatomen in der aufbrechenden (d_1) und in der neu entstehenden Disulfidbrücke (d_2).

Das Ergebnis war überraschend. Zwar hatten wir erwartet, dass sich beide Bindungslängen, also d_1 und d_2 , während des Reaktionsprozesses ändern und die ursprüngliche Schwefel-Schwefel-Bindung von der Zugkraft verlängert wird. Allerdings fiel die Dehnung nur sehr gering aus. Wirklich unerwartet war hingegen, dass auch d_2 von der externen Kraft beeinflusst wird, obwohl diese nur auf d_1 wirkt. Wie wir feststellten, muss sich unter Zugspannung das Schwefelatom des Reduktionsmittels der Bindung nicht mehr so weit nähern, um sie zu öffnen. Sie zer-

bricht schon in größerem Abstand, weil sie von der äußeren Kraft geschwächt ist. Das beschleunigt die Reaktion.

Wie man sieht, sind der Ablauf des Bindungsbruchs und der Einfluss der Kraft darauf komplexe Angelegenheiten. Das macht die Computersimulationen und ihre Interpretation äußerst aufwändig. Es gibt jedoch eine dazu komplementäre Methode, die direkter und dadurch einfacher ist: die Betrachtung der Energielandschaft einer Reaktion. Daraus lässt sich unmittelbar ersehen, wie leicht eine Umsetzung abläuft.

Energielandschaften gleichen Gebirgen. Am wohlsten fühlen sich die Stoffe im Tal. Je tiefer es ist, desto besser. Der Weg von einem Tal ins andere führt über einen Berg oder Pass. Im Falle der Disulfidbrücke ist das zu erreichende Tal die offene Bindung.

Auch die Rolle der mechanischen Kraft lässt sich mit der Energielandschaft veranschaulichen. Sie hebt das betreffende Molekül ein Stück weit aus seinem Tal heraus, was den Weg über den Berg bereits deutlich erleichtert. Außerdem senkt sie das zu erreichende Tal ab und erniedrigt zugleich den Pass dorthin.

Wir haben auch solche Energielandschaften berechnet. Dabei bestätigte sich, dass mit steigender Zugkraft, die auf eine Disulfidbrücke wirkt, das Tal für die offene Bindung immer weiter absinkt. Das macht das Lösen der Verknüpfung energetisch vorteilhafter. Im Einklang mit den Ergebnissen der Computersimulation dehnt die Kraft also nicht einfach nur die Disulfidbrücke, sondern wirkt sich auf das ganze Molekül aus. So ändert sie Winkel und dreht Strukturelemente, was die Schwefel-Schwefel-Bindung zusätzlich destabilisiert. Sobald die Brücke bricht, können Winkel und verzerrte Strukturelemente ihre ursprüngliche Position wieder einnehmen. Bei diesem Entspannen wird sehr viel Energie frei. Auch hier bietet sich der Vergleich mit dem Gummiband an: Spannt man es stark und zerschneidet es, so kehrt es mit einem kräftigen Schnalzen in seinen ungespannten Zustand zurück.

Wie man sieht, sind lebendige Systeme auf verschiedenste Weise mechanischen Kräften ausgesetzt. Biologische Strukturen, von kleinen Eiweißmolekülen bis zu Zellen und Geweben, haben im Verlauf der Evolution die Fähigkeit erlangt, gezielt darauf zu reagieren. So kann der Organismus mechanische

Reize als lebenswichtige Informationen direkt in biochemische Signale umwandeln und verarbeiten. Computersimulationen, wie wir sie in der Gruppe »Molekulare Biomechanik« am HITS in Heidelberg durchführen, helfen Schlüsselprozesse aufzudecken, die sich diese Kraftsensoren zu Nutze machen. Die Erkenntnisse, die wir dabei gewinnen, schaffen letztendlich die Voraussetzung dafür, korrigierend in Störungen der Signalkaskade bei Krankheiten einzugreifen oder die natürlichen Vorbilder im Labor für andere Zwecke nachzuahmen. Wir sind gespannt! ∞

DIE AUTORINNEN



Ilona Baldus (oben) hat an der Universität Heidelberg Chemie studiert. Sie ist Doktorandin bei Frauke Gräter und untersucht den Einfluss mechanischer Kräfte auf Redoxpotenziale von Proteinen.



Frauke Gräter ist seit 2009 Leiterin der Forschungsgruppe »Molekulare Biomechanik« am Heidelberger Institut für Theoretische

Studien (HITS). Zuvor leitete sie eine Nachwuchsforschergruppe, die an der Chinese Academy of Sciences in Shanghai, einem Partnerinstitut der Max-Planck-Gesellschaft, und an der Universität Heidelberg angesiedelt war. Nach ihrer Promotion an der Universität Göttingen war die Chemikerin bis 2007 am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen und an der Columbia University in New York tätig.

QUELLEN

- Baldauf, C. et al.:** Shear-Induced Unfolding Activates von Willebrand Factor A2 Domain for Proteolysis. In: *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7, S. 2096–2105, 2009
- Brown, A. E. X., Discher, D. E.:** Conformational Changes and Signaling in Cell and Matrix Physics. In: *Current Biology* 19, S. R781–R789, 2009
- Kucharski, T. J. et al.:** Kinetics of Thiol/Disulfide Exchange Correlate Weakly with the Restoring Force in the Disulfide Moiety. In: *Angewandte Chemie* 121, S. 7174–7177, 2009
- Li, W., Gräter, F.:** Atomistic Evidence of how Force Dynamically Regulates Thiol/Disulfide Exchange. In: *Journal of the American Chemical Society* 132, S. 16790–16795, 2010
- Wiita, A. P. et al.:** Probing the Chemistry of Thioredoxin Catalysis with Force. In: *Nature* 450, S. 124–127, 2007