

Funktionsanalyse einzelner Motormoleküle mittels der kombinierten Mikronadel/Laserfallen-Technik

Vom Fachbereich Physik
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von

Dipl. Phys. Christine Ruff
geb. am 09.09.1969 in Stuttgart

2000

Referent: Prof. Dr. Wolfgang Ertmer
Koreferent: Prof. Dr. Manfred Schliwa
Tag der Promotion: 19.12.2000

Zusammenfassung

Gerichtete Bewegung wird in lebenden Organismen auf allen Ebenen durch Motormoleküle bewerkstelligt. Diese wandeln die in der Zelle in Form von ATP vorliegende chemische Energie in mechanische Arbeit um und können so Fortbewegung und Transport entlang von Strukturproteinen ausführen. Der molekulare Motor Myosin II ist als Bestandteil des Muskels seit langem bekannt und seine biochemischen, kinetischen und physiologischen Eigenschaften sind bereits eingehend untersucht worden, ohne daß die Details der chemomechanischen Energieumwandlung verstanden sind. Mittels mechanischer Messungen auf Einzelmolekülebene ist es möglich geworden, die Schrittgröße oder die aufgewendete Kraft eines Myosinmoleküls bei Wechselwirkung mit einem Aktinfilament direkt im *in vitro* assay zu messen. Allerdings sind für die Schrittgröße von Myosin II bislang unterschiedlich große Werte (5-15 nm) ermittelt worden.

Mit einer neuartigen Kombination aus Mikronadel und Laserfalle und einer verfeinerten Analyse­methode wurde in dieser Arbeit die Schrittgröße von Myosin zu 5 nm bestimmt. Durch systematische Untersuchungen konnte eindeutig demonstriert werden, daß die biologischen Details des *in vitro* assays (Anbindung, Anzahl der Myosinköpfe, Orientierung zwischen Myosinkopf und Aktinfilament) keinen verändernden Einfluß auf die gemessene Schrittgröße ausüben. Mit der Verwendung eines Nukleotidanalogs wurden schwache Wechselwirkungen als Teilschritt des Transduktionszyklus' isoliert auf Einzelmolekülebene untersucht. Sie zeichnen sich durch kurze Lebenszeiten aus und führen zu keiner meßbaren Konformationsänderung des Myosinkopfes. Bei Messungen an genetisch hergestellten Myosinkonstrukten mit unterschiedlich langer, künstlicher Halsregion zeigte sich, daß die Länge dieses Hebelarms mit der jeweiligen Schrittgröße korreliert. Durch eine Drehung der Halsregion um 30° um einen in der Motordomäne befindlichen Angelpunkt werden die kleinen, aus der ATP Hydrolyse resultierenden strukturellen Änderungen in eine mehrere Nanometer große Bewegung relativ zum Aktinfilament umgesetzt.

Aus der Gesamtheit der Ergebnisse ergibt sich ein auch mit mikroskopischen Beobachtungen konsistentes Bild der Funktionsweise von Myosin II: Auch ohne Einbindung in die im Muskel vorliegenden dicken Filamente kann sich der Myosinkopf nach der vom Aktinfilament vorgegebenen Orientierung ausrichten und vollführt nach Anbindung an das Aktinfilament einen Schritt, dessen Länge durch die Abmessungen der Halsregion des Moleküls bestimmt wird. Mit den vorgestellten Ergebnissen sind die Voraussetzungen für weitere Einblicke auf funktioneller Ebene in den „Bauplan“ molekularer Motoren gegeben.

Schlagworte: Mikronadel-Laserfallensystem, Einzelmolekülmessung, Myosin

Abstract

Molecular motors generate directed motion at all levels of organisation in living organisms. They transduce chemical energy derived from ATP hydrolysis to mechanical work, and produce movement and transport along protein filaments. Myosin II, which is responsible for muscular contraction, has been known for many years and its biochemical, kinetic and physiological characteristics have been studied extensively, although molecular details of chemomechanical transduction are still not well understood. Mechanical measurements of step size and force from single myosin molecules provide one way to gain insights into the necessary details. While such measurements have become possible in recent years the reported step sizes vary considerably (5-15 nm) and its not possible to differentiate between different molecular models.

Using a new type of transducer by combining a microneedle with a laser trap and a refined analysis the step size of myosin II has been determined in this study to be 5 nm. Systematic investigations of biological details of the *in vitro* assay indicate that neither attachment to the substrate, number of myosin heads nor orientation between head and actin filament influence the measured step size. Utilizing an ATP analogon weak interactions as a part of the chemomechanical cycle have been studied at the level of a single molecule. They are short-lived and show no detectable conformational change. Step size measurements of genetically engineered myosin constructs with an artificial neck domain of varying length clearly demonstrate that the individual step size is directly related to the length of the neck domain. The neck serves as a lever arm and amplifies small structural changes from ATP hydrolysis into displacements of several nm by rotating $\sim 30^\circ$ about a fulcrum point located inside the motor domain. These results establish a model for the mechanical function consistent with microscopic observations of myosin II: The myosin head is able to adjust its orientation relative to the actin filament, incorporation in a thick filament is not necessary to achieve this orientation. After attachment to the actin filament the myosin head generates a displacement whose amplitude is determined by the length of the neck region. The presented results set the stage for further insights into the blueprint of molecular motors.

Key words: Microneedle/lasertrap transducer, single molecule measurements, Myosin

Inhalt:

1. Einleitung	
1.1. Motormoleküle	1
1.2. Myosin	2
1.3. Einzelmolekülmessungen an Myosin	5
1.4. Ziel dieser Arbeit	8
2. Messung und Analyse von Akto-Myosin Wechselwirkungen auf Einzelmolekülebene	
2.1. Einleitung	12
Es gibt verschiedene Methoden zur Messung von einzelnen Akto-Myosin Wechselwirkungen	13
Es gibt verschiedene Methoden zur Analyse der Rohdaten	15
2.2. Ergebnisse	18
Mikronadeln sind als Sensor geeignet, um die Wechselwirkung eines einzelnen Motormoleküls mit einem an der Nadel befestigten Aktinfilament zu messen	18
Reduktion der Positionsfluktuation des Sensors während der Wechselwirkung erlaubt deren Detektion	20
Mit einem variablen Analysefenster lassen sich Wechselwirkungen optimal identifizieren	21
Die Schrittgröße von Myosin beträgt ~ 5 nm	22
2.3. Diskussion	25
Diskussion der Meßmethoden	25
Korrektur der Schrittgrößen	28
Diskussion der Analysemethoden	29
3. Die Schrittgröße von Myosin ist 5 nm	
3.1. Einleitung	32
3.2. Ergebnisse	37
(1) Die Schrittgröße eines Myosinmoleküls hängt nicht von der Anzahl	37

der Myosinköpfe ab	
(2) Die Anbindung des Moleküls an Substrat hat keinen Einfluß auf die Schrittgröße	41
(3) Die Orientierung des Myosinkopfes relativ zum Aktinfilament beeinflusst die Schrittgröße nicht	42
3.3. Diskussion der Ergebnisse	44
(1) Die Schrittgröße eines Myosinmoleküls hängt nicht von der Anzahl der Myosinköpfe ab	44
(2) Die Anbindung des Moleküls an Substrat hat keinen Einfluß auf die Schrittgröße	45
(3) Die Orientierung des Myosinkopfes relativ zum Aktinfilament beeinflusst die Schrittgröße nicht	47
4. Zwischenschritte des Querbrückenzyklus	
4.1. Einleitung	50
4.2. Schwache Wechselwirkung kann auch auf Einzelmolekülebene gemessen werden	53
4.3. Bei sehr geringer ATP γ S Konzentration kommt es zu einer Positionsänderung zwischen Myosinkopf und Aktinfilament	56
4.4. Diskussion	57
5. Analyse der Hebelarm-Hypothese auf Einzelmolekülebene	
5.1. Einleitung	62
5.2. Ergebnisse	66
(1) Myosinkonstrukte mit künstlichem Hebelarm sind funktionelle Motormoleküle	66
(2) Die Schrittgröße ist proportional zur Länge des Halsdomäne	69
(3) Der Drehpunkt des Hebelarmes liegt innerhalb der Motordomäne	70
(4) Der Hebelarm bewegt sich durch den „power stroke“ um $\sim 30^\circ$	72
5.3. Diskussion	72
(1) Myosinkonstrukte mit künstlichem Hebelarm sind funktionelle Motormoleküle	72

(2) Die Schrittgröße ist proportional zur Länge des Halsdomäne	73
(3) Der Drehpunkt des Hebelarmes liegt innerhalb der Motordomäne	74
(4) Der Hebelarm bewegt sich durch den „power stroke“ um $\sim 30^\circ$	75
6. Zusammenfassung und Ausblick	77
Anhang	
Materialien und Methoden	85
1. Experimenteller Aufbau	85
2. <i>In vitro motility assay</i>	87
2.1. Puffer und Lösungen	87
2.2. Substrat	88
2.3. Proteine	89
2.4. Markierung und Polymerisation von F-Aktin	92
2.5. Beschichtung der Latexperlen	92
2.6. Durchführung des <i>in vitro motility assays</i>	92
3. Analyse der Daten	93
4. Zur Messung der Orientierungsabhängigkeit (3. Kapitel)	94
4.1. Einköpfiges Myosin	94
4.2. LMM Myosin Cofilamente	95
4.3. Ätzen der Deckgläser	96
5. <i>Motility assay</i> mit Konstrukten aus <i>Dictyostelium discoideum</i> (5. Kapitel)	97
5.1. Konstrukte aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	97
5.2. Protokoll der Einzelmolekülassays	98
5.3. Polarisationsmarkierte Aktinfilamente	98
Literatur	100
Verzeichnis der Abkürzungen	111
Verzeichnis der Abbildungen	112
Lebenslauf	115

1. Einleitung

1.1. Motormoleküle

Molekulare Motoren sind Enzyme, die chemische Energie aus der Zelle in mechanische Arbeit umwandeln. Indem sie koordinierte Bewegung auf verschiedenen Ebenen ermöglichen, übernehmen sie diverse lebenswichtige Funktionen: Innerhalb der Zelle transportieren sie vesikuläre Strukturen und erfüllen vielfältige Aufgaben im Rahmen der Zellteilung, beispielsweise die Trennung replizierter Chromosomenstränge. Fortbewegung von ganzen Zellen oder Amöben wird ebenfalls von Motorproteinen bewerkstelligt, und sie sind verantwortlich für die Kontraktion der Muskeln und generieren somit Bewegung auch auf makroskopischer Ebene.

Die dafür notwendige Energie beziehen sie aus der Bindung und anschließenden Hydrolyse von ATP (*Adenosinetriphosphat*). ATP ist ein energiereiches Nukleotid, das aus Adenin, einer Ribose und einer Einheit aus 3 Phosphaten besteht und in biologischen Systemen als Speicher freier Energie dient. Nach Freisetzung der Spaltprodukte ADP (*Adenosinediphosphat*) und anorganischem Phosphat kann eine erneute Bindung von ATP erfolgen, nach jedem Hydrolysezyklus steht dem Motor freie Energie von 60 kJ/mol zur Verfügung, die durch die Kopplung an einen mechanischen Zyklus mit Konformationsänderungen in Bewegung umgesetzt wird.

Bislang sind fast 100 (Vale und Milligan, 2000) verschiedene Motormoleküle in der Zelle entdeckt worden, je nach Bewegungsmodus unterteilt man diese in lineare und rotierende Motoren. Es existieren drei verschiedene Familien linearer Motoren, die sich in einer festen Richtung entlang dynamisch in der Zelle ausgebildeter Schienensysteme bewegen. Dyneine und Kinesine wechselwirken mit Mikrotubuli, Myosine binden an und bewegen sich entlang von Aktinfilamenten. Die Charakterisierung der Wechselwirkung von Myosin mit Aktin auf der Ebene einzelner Moleküle ist Gegenstand dieser Arbeit, deshalb erfolgt im nächsten Abschnitt zunächst eine genauere Beschreibung dieses Motormoleküls.

1.2. Myosin

Als wesentlicher Bestandteil des Muskels ist Myosin das am längsten bekannte Motormolekül (seit 1864, Kühne). Bis vor ca. 15 Jahren waren nur 2 Myosine entdeckt (Myosin I und Myosin II ("konventionelles Myosin")), inzwischen sind aber durch molekularbiologische Methoden (Genklonierung, DNA-Sequenzierung) 15 verschiedene Klassen der Myosinfamilie beschrieben worden (Übersicht in Sellers, 2000; Wu *et al.*, 2000; Mermall *et al.*, 1998; Hoyt *et al.*, 1997). Ihnen allen gemeinsam ist die zyklische Wechselwirkung mit Aktinfilamenten, gekoppelt an die Hydrolyse von ATP. Dementsprechend verfügen alle Myosinmoleküle über eine fast identische Motordomäne mit Bindungsstellen für Aktin und ATP, an die sich über eine α -helikale Halsregion eine Schwanzregion variabler Länge anschließt. Unterschiedlich viele (0-6) leichte Ketten sind um den Hals gewunden, dadurch wird dieser stabilisiert und die Aktivität des Moleküls reguliert. Die einzelnen Arten von Myosin übernehmen diverse Aufgaben (Muskelkontraktion, Zellmotilität, Zellteilung, Organellentransport, Signaltransduktion etc.) und haben dementsprechend vielfältige, darauf abgestimmte Funktionsmechanismen, die

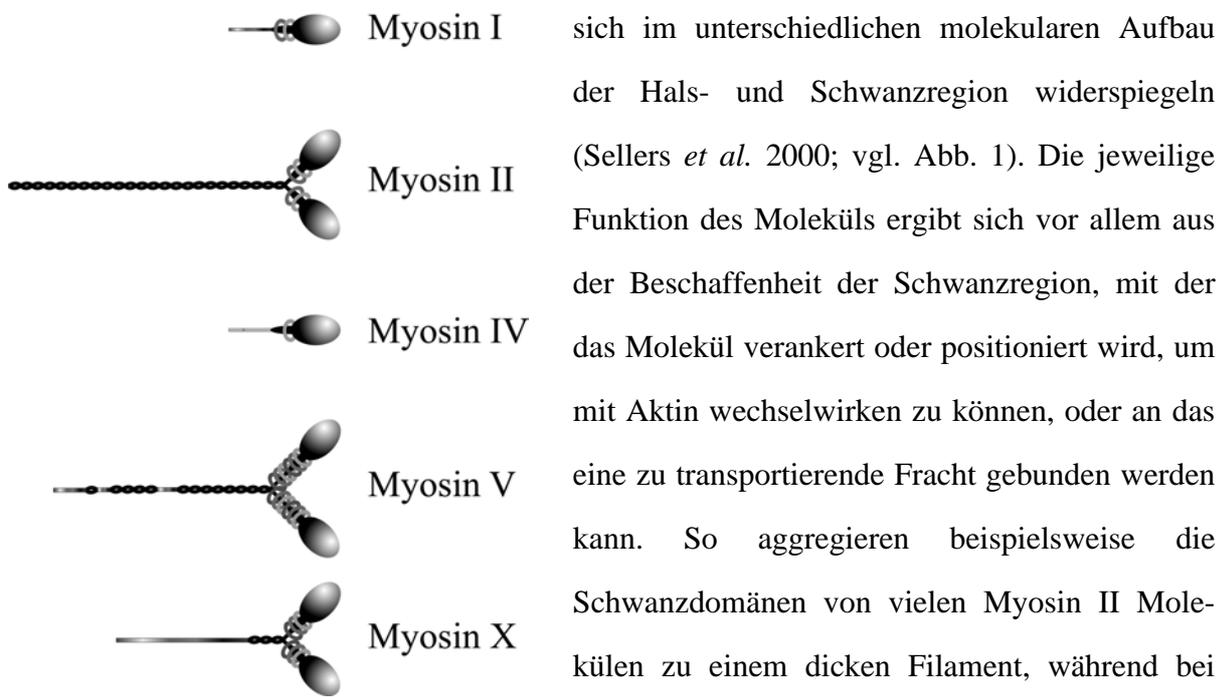


Abb. 1.1.: Schematischer Aufbau unterschiedlicher Myosine am Beispiel Myosin I,II,IV,V,X: An die Kopfdomäne (hier oval skizziert) schließt sich eine unterschiedliche Anzahl an Binderegionen für leichte Ketten (hier ringförmig dargestellt) an, teilweise dimerisieren 2 schwere Ketten zu einem doppelköpfigen Molekül.

sich im unterschiedlichen molekularen Aufbau der Hals- und Schwanzregion widerspiegeln (Sellers *et al.* 2000; vgl. Abb. 1). Die jeweilige Funktion des Moleküls ergibt sich vor allem aus der Beschaffenheit der Schwanzregion, mit der das Molekül verankert oder positioniert wird, um mit Aktin wechselwirken zu können, oder an das eine zu transportierende Fracht gebunden werden kann. So aggregieren beispielsweise die Schwanzdomänen von vielen Myosin II Molekülen zu einem dicken Filament, während bei Myosin V der Schwanz als Bindeglied zu einer Membran dient (Reck-Peterson *et al.*, 2000). Häufig entstehen durch hydrophobe Wechselwirkungen α -helikaler Regionen des Schwanzes

(*coiled-coil*) dimere Myosine, die zwei Motordomänen aufweisen (z.B. Myosin II, Myosin V, Myosin X (vgl. Abb. 1.)). Dementsprechend zeigen sich die strukturellen Unterschiede zwischen den verschiedenen Myosinen vor allem in Länge und Sequenz ihrer Schwanzdomänen.

Für das Verständnis des Funktionsmechanismus des molekularen Motors ist die Kopplung der ATP Hydrolyse mit der Erzeugung von Bewegung oder Kraft wesentlich.

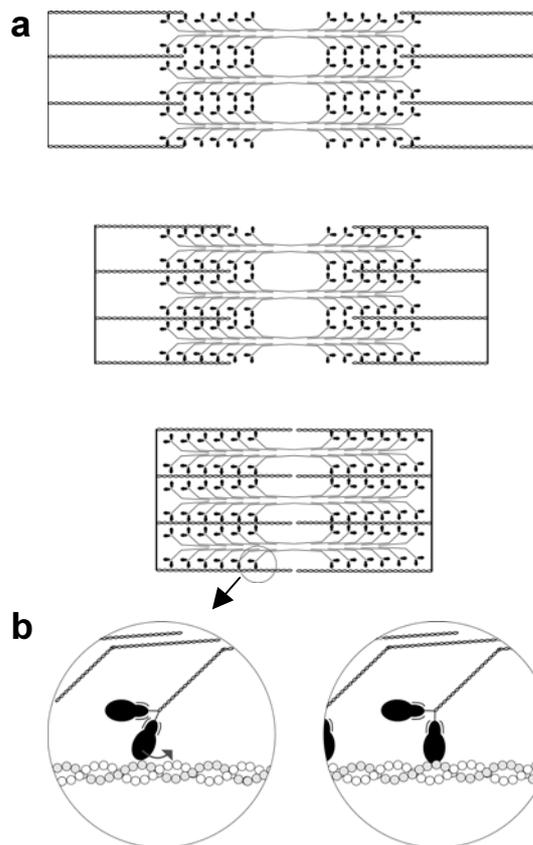


Abb. 1.2.: (a) Schematische Darstellung des *sliding filament* Modells: Die dicken Myosinfilamente (in der Mitte des Sarkomers) gleiten relativ zu den Aktinfilamenten und bewirken so eine Verkürzung des Sarkomers. (b) Schematische Darstellung der *swinging myosin crossbridge hypothesis* (H.E. Huxley, 1969): Durch die Bewegung der angebotenen Myosinköpfe wird das Aktinfilament verschoben.

Aus mikroskopischen Untersuchungen von Muskel (Elektronenmikroskopie (H.E. Huxley, 1953), Interferenzmikroskopie (A.F. Huxley und Nieddergerhrke, 1954) und Elektronenmikrographie (Reedy *et al.*, 1965)) wurde das "*sliding filament model*" entwickelt, wonach die makroskopische Verkürzung von Muskel auf dem Gleiten der dicken Myosinfilamente relativ zu den Aktinfilamenten beruht (vgl. Abb. 1.2.(a)). Ergänzend postulierte die "*swinging myosin crossbridge hypothesis*" (H.E. Huxley, 1969, vgl. Abb. 1.2.(b)) die Verschiebung des Aktinfilaments durch eine Bewegung der daran angebotenen Myosinköpfe. Damit war eine an die Hydrolyse von ATP gekoppelte Konformationsänderung des Myosins und die damit verbundene Bewegung entlang des Filaments bereits postuliert worden, ohne daß die chemomechanische Umwandlung im Detail verstanden war.

Die Lösung der Kristallstruktur (Rayment *et al.*, 1993a) eines Myosinfragments gab erstmals Aufschluß über den genauen Aufbau des Moleküls und damit auch über dessen mögliche Funktionsweise. Wegen der Größe und der stark asymmetrischen Form (Rayment und Holden, 1994) ist es bisher nicht gelungen, ein komplettes Myosinmolekül zu kristallisieren, wohl aber den eigentlichen „Kopf“ des Moleküls, das Fragment S1 (S1 = *subfragment* 1).

Es umfaßt die Aktin- und Nukleotidbindungsstellen und die beiden leichten Ketten und wird durch enzymatischen Verdau von Voll-Längenmyosin an der Verbindung zwischen Hals und Schwanzdomäne hergestellt. Für die Kristallographie kann S1 über einen solchen Verdau oder aber auch über die Expression rekombinanter Moleküle gewonnen werden (Rayment *et al.*, 1993a; Houdusse *et al.*, 1999; Dominguez *et al.*, 1998).

S1 zeigte eine asymmetrische, längliche Struktur von etwa 16,5 nm Länge (incl. Hals-region) und 4 - 6,5 nm Durchmesser. Dieses Fragment beinhaltet die Bindestellen für Aktin und ATP und verfügt bereits über die notwendige Ausstattung, um Bewegung zu generieren. Die Bindestelle für Aktin umfaßt Bestandteile sowohl der oberen als auch unteren 50 kDa Domäne der schweren Kette, was die Vermutung nahe gelegt hat, daß die Bindung stereospezifisch erfolgt. Die Unterteilung der Kopfdomäne in 3 Bereiche (25 kDa, 50 kDa und 20 kDa, vgl. Abb. 1.3.) hatte sich aus den bei tryptischem Verdau der flexiblen Verbindungsstücke resultierenden Segmenten ergeben. Ihre Benennung reflektiert das jeweilige Molekulargewicht (Balint *et al.*, 1978; Mornet *et al.*, 1979). Mit der engen Bindung vor allem der unteren 50 kDa Region mit dem Aktinfilament könnte eine Konformationsänderung zwischen der unteren und oberen 50 kDa Region verbunden sein, die eine Übertragung auf die etwa 3,5 nm

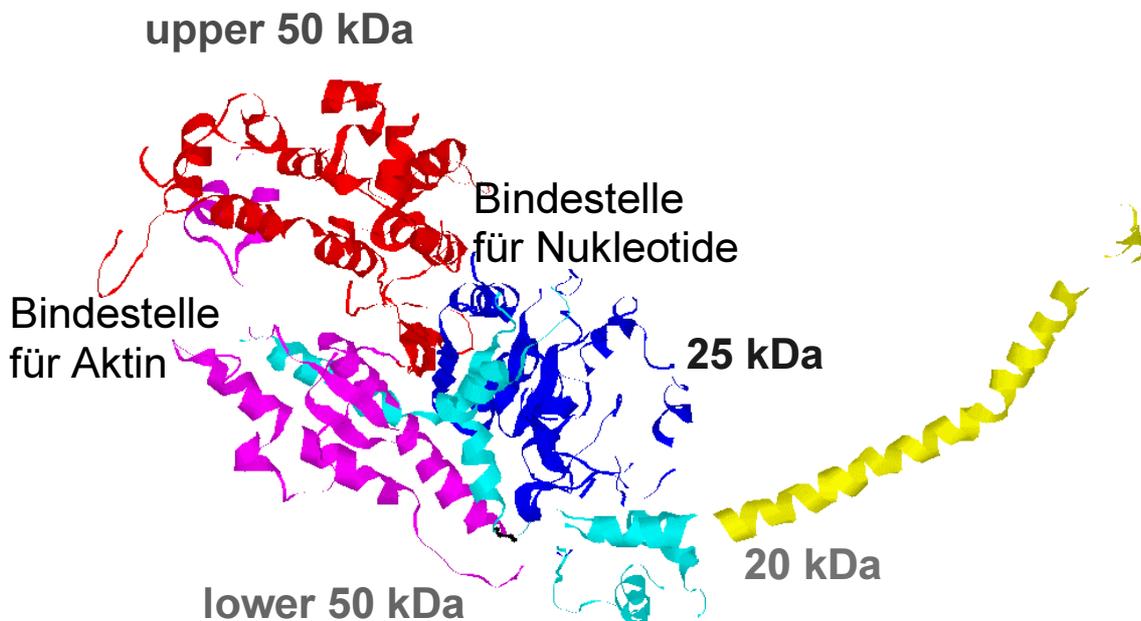


Abb. 1.3.: Struktur des Myosinfragments S1 (nach Rayment *et al.*, 1993a), die beiden leichten Ketten sind nicht gezeigt. Die verschiedenen Domänen des Moleküls sind zum besseren Verständnis unterschiedlich eingefärbt.

entfernte Nukleotidbindungsstelle ermöglicht und damit eine Freisetzung der Spaltprodukte in Gang setzen könnte (Rayment *et al.*, 1994).

An den katalytischen Teil des Myosins schließt sich eine etwa 8,5 nm lange α -Helix an, um die 2 leichte Ketten gewunden sind. Die relativ kleinen Konformationsänderungen im Kopf des Moleküls könnten mit Hilfe dieses Hebelarms in eine Relativbewegung in der Größenordnung einiger nm (bis zu 20 nm bei einem Drehwinkel des Hebelarms von 90° , Rayment *et al.*, 1993a; Cooke, 1997) umgewandelt werden. Diese sogenannte Hebelarm Hypothese, die einen durch ATP induzierten „Kraftschlag“ (*power stroke*) des Myosinmoleküls relativ zum Aktinfilament beschreibt, präzisierte die bisher vorhandene Ansicht über die Funktionsweise von Myosin im Muskel.

Die Lösung der Struktur des Myosins hat zu einem wesentlich besseren Verständnis der Funktion des Moleküls geführt, indem bestimmten Sequenzen strukturell isolierte „Bauteile“ zugeordnet werden konnten. Aber auch ergänzt durch elektronenmikroskopische Aufnahmen (Rayment *et al.*, 1993b; Schroeder *et al.*, 1993) konnten immer nur statische Bilder von bestimmten Konformationszuständen in Abwesenheit von Aktin betrachtet werden. Studien an Muskel oder sich in Lösung befindlichen Myosinmolekülen können grundsätzlich nur zur Abschätzung der mechanischen Eigenschaften des Myosins führen (beispielsweise die Größe der Konformationsänderung, vgl. Kapitel 2), weil die Meßergebnisse über eine nicht bekannte Anzahl von Molekülen gemittelt werden, die sich möglicherweise auch gegenseitig beeinflussen und zeitlich nicht korreliert sind. Mechanische Untersuchungen des Einzelmoleküls sind deshalb die einzige Möglichkeit, detaillierte Kenntnis über die molekularen Mechanismen des Motors zu erlangen.

1.3. Einzelmolekülmessungen an Myosin

Auf Grund der geringen Größe von Myosin (~ 20 nm und damit unterhalb der Auflösungsgrenze konventioneller Lichtmikroskopie) kann das dynamische Verhalten eines einzelnen Moleküls nicht direkt visualisiert werden. Durch Fluoreszenzmarkierung der Aktinfilamente (Yanagida *et al.*, 1984) konnte erstmals die Wechselwirkung aus dem Muskelverband isolierter Motoren *in vitro* visualisiert werden, indem man im sogenannten *motility assay* die

Gleitgeschwindigkeit der Aktinfilamente auf einem mit Myosin bedeckten künstlichen Substrat untersuchte (Kron & Spudich, 1986). Dabei zeigte sich unter anderem, daß schon das durch Verdauung gewonnene Myosinfragment S1 in der Lage war, Aktin zu transportieren (Toyoshima *et al.*, 1987).

Mit der Entwicklung neuer biophysikalischer Techniken wurde es möglich, einzelne Moleküle zu manipulieren. So können mittels einer optischen Falle kleine dielektrische Kugeln festgehalten oder bewegt werden (Ashkin 1998), an die ein einzelnes Molekül befestigt wird. Dessen Wechselwirkung mit einer sich auf dem Substrat befindlichen Schiene (Aktinfilament oder Mikrotubulus) kann über die dadurch veränderte Position oder Positionsfluktuation der Mikroperle charakterisiert werden (Block *et al.*, 1990). So konnte beispielweise die Schrittgröße von Kinesin direkt gemessen werden (Svoboda *et al.*, 1993), indem man die schrittweise Bewegung eines an der Perle aufgetragenen Kinesinmoleküls entlang eines auf dem Boden befindlichen Mikrotubulus mit nanometerpräziser Detektion verfolgte (Abb. 1.4.a).

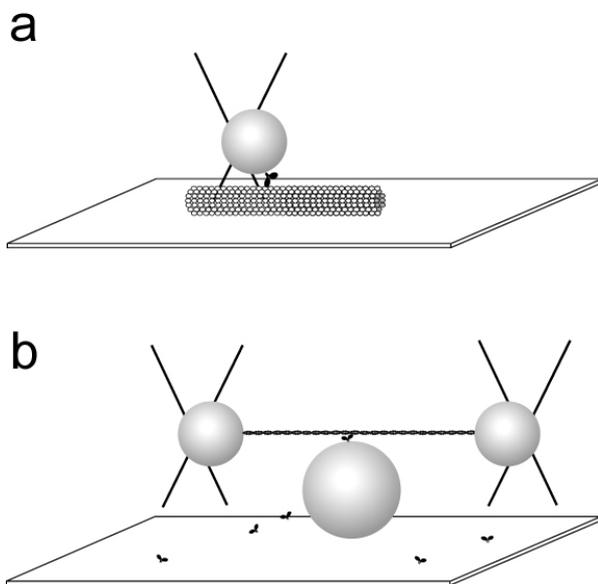


Abb. 1.4.: Experimenteller Aufbau zur Messung von (a) der Bewegung einzelner, an eine in der Laserfalle befindlichen Perle angebundene Kinesine auf einem auf dem Substrat befestigten Mikrotubulus (Block *et al.*, 1990) und (b) der Wechselwirkung zwischen einem Myosin und einem Aktinfilament (3 *bead geometry*, Finer *et al.*, 1994). Das Aktinfilament wird mittels der beiden Perlen vorgespannt und in die Nähe einer mit wenigen Myosinmolekülen bedeckten, auf dem Substrat befindlichen Glaskugel gebracht.

Mit Hilfe eines zwischen zwei manipulierbaren Mikroperlen aufgespannten Aktinfilaments (Doppellaserfalle oder 3 *bead geometry*, Finer *et al.*, 1994, vgl. Abb. 1.4.b) konnten die transienten Interaktionen eines auf dem Substrat aufgetragenen Myosinmoleküls mit diesem Filament detektiert werden. Auch Mikronadeln (Kishino *et al.*, 1988; Ishijima *et al.*, 1991) oder das Prinzip der *atomic force microscopy* (Nakajima *et al.*, 1997; Hansma und Pietrasanta, 1998) eignen sich zur mechanischen Manipulation einzelner Moleküle.

Neben der Schrittgröße kann mit diesen Techniken auch die durch den Motor

aufgewandte Kraft (Ishijima *et al.*, 1991, Svoboda und Block, 1994) gemessen, und die Wechselwirkung hinsichtlich der Steifheit der Verbindung der daran beteiligten Moleküle (Veigel *et al.*, 1998) charakterisiert werden. Mit Einzelmolekültechniken können nicht nur die Motormoleküle untersucht werden, sondern auch die mechanischen Eigenschaften der Schienen, auf denen sie sich bewegen (Mikrotubuli oder Aktinfilamente) oder die anderer einzelner Polymere (Übersicht in Wang, 1999).

Die gleichzeitige Entwicklung verbesserter fluoreszenzmikroskopischer Techniken (*total internal reflection microscopy*) hat die Möglichkeit eröffnet, einzelne fluoreszenzmarkierte Moleküle zu betrachten. Damit ist es gelungen, die Bewegung eines über dessen Fluoreszenz visualisierten Motors direkt zu verfolgen (Vale *et al.*, 1996). Wenn die „Beleuchtung“ mittels eines durch Totalreflexion erhaltenen evaneszenten Feldes über das Objektiv erfolgt, kann ein experimenteller Aufbau für die Einzelmolekülmessungen (Laserfalle, Mikronadel) gleichzeitig genutzt werden und das mechanische Ereignis kann direkt mit der chemischen Umsetzung von ATP korreliert werden (Ishijima *et al.*, 1998).

Die Kombination solcher mechanischer Untersuchungen auf Einzelmolekülebene mit molekularbiologischen Methoden und Strukturbiologie schafft die Voraussetzungen für ein fundiertes Verständnis der Funktionsweise molekularer Motoren. Für Myosin II (konventionelles Myosin) können den strukturellen Bestandteilen der Motordomäne bereits bestimmte Funktionen (Aktinbindung, Nukleotidbindung, Kraftübertrag, Regulation etc.) zugeordnet werden. In verschiedenen Systemen aus Wirtszellen, beispielsweise in *Dictyostelium discoideum*, können aber auch gentechnisch gezielt veränderte Myosinkonstrukte exprimiert und aufgereinigt werden (Zusammenfassung in Ruppel und Spudich, 1996; Geeves & Holmes, 1999). Die Funktionsanalyse solcher selektiv veränderter Myosinmutanten kann detaillierte Erkenntnisse bezüglich der Mechanik der Motoren liefern.

Gleichzeitig stehen aber auch diverse „native“ Varianten des Motormoleküls Myosin in Form der unkonventionellen Myosine für die Erforschung der Funktionsweise von Motorproteinen zur Verfügung. Die verschiedenen Myosine unterscheiden sich strukturell (Übersicht in Sellers, 2000) und damit verbunden in ihren Geschwindigkeiten bzw. Schrittgrößen und in ihrer Fähigkeit, Kräfte zu generieren oder Lasten zu transportieren (Wolenski *et al.*,

1993; Molloy *et al.*, 1995; Veigel *et al.*, 1999; Mehta *et al.*, 1999b). Die meisten charakterisierten Myosinarten bewegen sich in Plusrichtung des Aktinfilaments, inzwischen jedoch wurde auch ein Myosin gefunden, das „rückwärts“ läuft (Wells *et al.*, 1999). Dieses Myosin VI fungiert als Vesikelmotor und weist in seiner Struktur ein zusätzliches, ~ 53 Aminosäuren umfassendes Teilstück zwischen der katalytischen Domäne und der Binderegion für die leichten Ketten auf, das vermutlich zu einer Umkehrung der Direktionalität führt, indem sich der Hebelarm des Moleküls in die entgegengesetzte Richtung bewegt.

Konventionelles Myosin II und die meisten anderen bisher untersuchten Mitglieder der Myosinfamilie verhalten sich bei der Wechselwirkung mit dem Aktinfilament nichtprozessiv, d.h. sie sind nur während eines kleinen Teils des chemomechanischen Zyklus an das Aktinfilament gebunden. Die Ursache dafür liegt vermutlich in dem Umstand, daß Myosin meist im Verband vieler Motoren (z.B. innerhalb des dicken Filaments bei Myosin II) vorliegt. Mit Myosin V wurde jedoch ein Myosin beschrieben (Cheney *et al.*, 1993), das sich prozessiv (während des gesamten Zyklus gebunden) entlang von Aktin bewegen kann (Mehta *et al.*, 1999a), ohne von diesem abzudiffundieren. Auch Myosin IX (Übersicht in Mooseker *et al.*, 1995) könnte ein solches Verhalten zeigen, da es an der Bindestelle für Aktin ein zusätzliches Teilstück in seiner Struktur aufweist, das die Affinität für Aktin und damit die Wahrscheinlichkeit prozessiver Bewegung entlang des Filaments erhöhen könnte. Die Korrelation derartiger struktureller Unterschiede in der Motordomäne der verschiedenen Myosine und Myosinmutanten mit ihrem kinetischen und mechanischen Verhalten kann Aufschluß darüber geben, welche Rolle die einzelnen Bestandteile eines Motors spielen und an welcher Stelle die Kommunikation zwischen diesen stattfindet (Cope *et al.*, 1996; Mermall *et al.*, 1998; Sellers *et al.*, 1996; Geeves & Holmes, 1999).

1.4. Ziel dieser Arbeit

Hauptziel dieser Arbeit war zunächst die Messung der Schrittgröße (und damit die Größe der Konformationsänderung) von Myosin II, denn die exakte Bestimmung der Schrittgröße eines Motormoleküls ist von übergeordneter Bedeutung: Als grundsätzlicher biophysikalischer Parameter charakterisiert die Schrittgröße einen Motor, damit kann dieser direkt mit

anderen Motormolekülen verglichen werden. Die funktionale Auswirkung gezielter Veränderungen, z.B. durch Punktmutationen, auf dessen Fähigkeit zur Erzeugung von Bewegung kann in Struktur-Funktionsanalysen *in vitro* detailliert untersucht werden und so weitere Einsicht in den Mechanismus des Moleküls als Folge des Zusammenwirkens seiner verschiedenen Komponenten liefern. Die Schrittgröße als Folge der ATP Hydrolyse kann direkt gemessen werden und ergänzt damit die strukturellen Beobachtungen. Gleichzeitig können damit die vorhandenen Modelle zur Fortbewegung des Motors überprüft werden: Eine Schrittgröße >10 nm würde mit den Erkenntnissen aus der Struktur (Länge des Hebelarmes) der Hebelarm Hypothese (vgl. Kapitel 5) widersprechen, und auch eine Schrittgröße >6 nm wäre nur bei einer beträchtlichen Umlagerung innerhalb der Motordomäne möglich (Rayment *et al.*, 1993b). Eine mögliche Erklärung für größere Distanzen wäre, daß die resultierende Verschiebung durch die Abfolge mehrerer Schritte zustande kommt (Yanagida *et al.*, 1993a; Ishijima *et al.*, 1998). Mehrere Schritte in Folge einer einzelnen ATP Hydrolyse sind allerdings mit strukturellen Beobachtungen nur schwer vereinbar, wonach nur ein einziger Kraftschlag pro Umsatz eines ATP Moleküls möglich ist (Rayment & Holden, 1994).

Die Bestimmung der exakten Schrittgröße eines einzelnen Motormoleküls gestaltet sich jedoch nicht einfach: Auf Grund der geringen Kräfte (einige pN) und geringen Distanzen (einige nm), die für die Wechselwirkung eines Myosinmoleküls mit Aktin charakteristisch sind, werden hohe Anforderungen an das Meßsystem, aber auch an die Analyse und Interpretation der Rohdaten gestellt. Im für die Funktionsfähigkeit der Moleküle notwendig wässrigen Medium unterliegt ein für die geringen Kräfte geeigneter Sensor dem Einfluß Brownscher Molekularbewegung, welche die zu messenden Distanzen um etwa eine Größenordnung übertrifft. In den vier Labors Spudich (Stanford, USA), Molloy (York, UK), Yanagida (Osaka, Japan) und Warshaw (Vermont, USA), aus denen bisher Ergebnisse aus Einzelmolekülmessungen an Myosin berichtet worden sind, wird mit unterschiedlichen Methoden gemessen und analysiert. Bereits für die Schrittgröße von Myosin wurden dabei Werte von 5 - 20 nm gefunden (Finer *et al.*, 1994; Molloy *et al.*, 1995, Guilford *et al.*, 1997, Tanaka *et al.*, 1998), dementsprechend variieren auch weitere Ergebnisse aus den Einzelmolekülexperimenten zur

detaillierten Mechanik des Motors (Kitamura *et al.*, 1999; Tyska *et al.*, 1999). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit zum einen geklärt werden, wie groß tatsächlich die von Myosin II generierte Verschiebung des Aktinfilaments ist, und zum anderen, worauf die unterschiedlichen Ergebnisse beruhen, die bisher veröffentlicht worden sind.

Mit dem kombinierten Mikronadel-Laserfallen Aufbau wurde eine zur Doppellaserfalle alternative Meßmethode angewandt, die im Vergleich dazu den Vorteil besitzt, die Rotation des freien Aktinfilaments als Folge der Rotation beider Perlen in der Falle herabzusetzen. Im 2. Kapitel dieser Arbeit werden die Vor- und Nachteile und ein möglicher verfälschender Einfluß aller Meßmethoden und aller Analysemethoden diskutiert, um diese als Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse ausschließen zu können. Für die Auswertung und Interpretation der eigenen Daten wurde ein verfeinertes Analyseverfahren entwickelt.

Neben der Bestimmung der Schrittgröße konnten auch viele andere Details der Funktionsweise von Myosin ergründet werden, indem systematisch einzelne Komponenten des *in vitro assays* verändert wurden (Aufbringung des Moleküls, Anzahl der Myosinköpfe, Orientierung zum Aktinfilament). Es wurde untersucht, ob auf Einzelmolekülebene ein funktioneller Unterschied feststellbar ist, wenn das Molekül (oder ein Fragment desselben) direkt oder über einen Antikörper auf das künstliche Substrat adsorbiert worden ist, verglichen mit einer eher physiologischen Umgebung (inkorporiert in ein dickes Filament).

Myosin II ist im Muskelverband ein zweiköpfiges Molekül, und die Rolle des zweiten Kopfes bei der Kraftgenerierung ist umstritten (Veigel *et al.*, 1999; Tyska *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 1998). Aus diesem Grund wurde der Einfluß auf die Schrittgröße an ein- und doppelköpfigem Myosin, Myosinfragmenten und klonierten Konstrukten untersucht. Durch die Einbettung von nativem Myosin in fluoreszenzmarkierte LMM Cofilamente konnte die Orientierung zwischen Kopf und Aktinfilament bestimmt werden, indem der relative Winkel zwischen dem Cofilament und dem aufgespannten Aktinfilament gemessen wurde. Durch Messungen an einzelnen inkorporierten Myosinköpfen bei variabler Orientierung sollte untersucht werden, inwieweit eine physiologisch korrekte Anordnung Auswirkungen auf die generierte Verschiebung hat.

Die Ergebnisse über den Einfluß der biologischen Randbedingungen (Adsorption, Anzahl der Köpfe und Orientierung) auf die Funktionsfähigkeit einzelner Myosinmoleküle sind im 3. Kapitel der Arbeit zusammengefaßt. Damit ist zudem eindeutig geklärt worden, ob diese Unterschiede, die in den bisher bekannten *in vitro assays* vorliegen, für die variierenden Ergebnisse bei der Bestimmung der Schrittgröße verantwortlich sein können.

Durch die Verwendung eines Nukleotidanalogs sollte erstmals auf Einzelmolekülebene die Existenz schwacher Wechselwirkungen als Vorstufe der eigentlichen Hydrolyse überprüft werden. In Anwesenheit von ATP werden diese sehr kurzlebigen Zustände durch die kraftgenerierenden Wechselwirkungen überlagert, deshalb wurden die mit einem nur sehr langsam hydrolysierten Analogon (ATP γ S) generierten Wechselwirkungen bei unterschiedlicher Nukleotidkonzentration charakterisiert. Die Ergebnisse sind Gegenstand des 4. Kapitels.

Im 5. Kapitel schließlich findet sich die experimentelle Bestätigung der Hebelarm Hypothese auf Einzelmolekülebene. Die Schrittgröße wurde für insgesamt 8 größtenteils molekularbiologisch hergestellte Myosinkonstrukte mit unterschiedlicher Hebelarmlänge bestimmt und in Relation zu dieser gesetzt. Die Diskussion zu den einzelnen Meßergebnissen findet sich am Ende des jeweiligen Kapitels (2 - 5), aus diesem Grund folgt im 6. Kapitel zusammen mit dem Ausblick eine Zusammenfassung und abschließende Bewertung aller Ergebnisse.

2. Messung und Analyse von Akto-Myosin Wechselwirkungen auf Einzelmolekülebene

2.1. Einleitung

Die Verkürzung von Muskel entsteht durch die zyklische Wechselwirkung der beiden Proteine Aktin und Myosin, dabei wird chemische Energie aus der Hydrolyse von ATP durch den molekularen Motor Myosin in mechanische Arbeit umgewandelt (vgl. 1. Kapitel), indem er ans Aktinfilament anbindet und dieses verschiebt. Obwohl das kontraktile System mit unterschiedlichen Methoden bereits ausführlich untersucht worden ist, sind Details der chemo-mechanischen Transduktion noch unklar. Insbesondere die Schrittgröße eines einzelnen Myosinmoleküls als wichtiger Parameter zur mechanischen Charakterisierung des Motors ist seit vielen Jahren Gegenstand der Forschung.

Mit theoretischen Überlegungen und Messungen an Muskel war bereits versucht worden, die Schrittgröße zu bestimmen: Im Jahre 1969 stellte H.E. Huxley sein Modell der *swinging myosin crossbridge theory* vor (vgl. Abb. 1.2.(a),(b)), in dem für die Schrittgröße von Myosin durch dessen Abmessung 40 nm als obere Grenze angenommen wurde (H.E. Huxley, 1969). Durch Messung der Kraftänderung in Muskelfasern nach schneller Längenänderung gelangten A.F. Huxley und Simmons im Jahre 1971 zu einer ersten Abschätzung von ~10 nm für diese Größe (Huxley & Simmons, 1971). Messungen der Verkürzungsgeschwindigkeit an Muskelfibrillen führten zu einer geschätzten Schrittgröße von 15 nm (Ma und Taylor, 1989).

Wegen der geringen Abmessung der beteiligten Proteine (einige nm) kann ihr Verhalten im Lichtmikroskop mit dem durch Diffraktion limitierten Auflösungsvermögen von ~ 0,2 µm nicht direkt untersucht werden. Ein wesentlicher Schritt war deshalb die Markierung einzelner Aktinfilamente mit Rhodamin-Phalloidin (Yanagida *et al.*, 1984). Mit dem sogenannten *motility assay* kann die Bewegung dieser fluoreszenzmarkierten Filamente auf einem „Rasen“ vieler Myosinmotoren *in vitro* beobachtet und daraus die sogenannte Gleitgeschwindigkeit bestimmt werden (Harada *et al.*, 1987). Aus der beobachteten Gleitgeschwindigkeit berechneten Yanagida und Mitarbeiter die Schrittgröße zu 120-200 nm/ATP (Harada *et al.*,

1990) während Spudich und Mitarbeiter mittels eines Gleitassays mit geringer Motorendichte diese mit 5-20 nm/ATP bezifferten (Uyeda *et al.*, 1991). Die divergenten Ergebnisse resultieren vor allem aus der Tatsache, daß diese Methode immer nur eine indirekte Abschätzung der Schrittgröße eines einzelnen Moleküls erlaubt und aus ungenauen Daten für den Umsatz von ATP.

Die Ergebnisse aus mechanischen Studien und biochemischen Untersuchungen an aufgereinigten Molekülen in Lösung können ebenfalls immer nur Informationen über den mittleren Wert einer meist unbekannt Anzahl von Molekülen bei einer unbekannt Verteilung der Zwischenzustände liefern. Eine exakte Aussage zur Mechanik eines Myosinmoleküls oder eine detaillierte Charakterisierung unterschiedlicher Motoren ist nur möglich, wenn direkt am Einzelmolekül gemessen wird.

Es gibt verschiedene Methoden zur Detektion von einzelnen Akto-Myosin Wechselwirkungen

Die Manipulation einzelner Moleküle in einem *in vitro assay* mittels einer Mikronadel (Yanagida *et al.*, 1993a) oder einer optischen Falle (Svoboda *et al.*, 1993) kombiniert mit einem entsprechenden Detektionsvermögen hat die Messung an einzelnen Motormolekülen realisierbar gemacht. Seit den ersten Messungen sind verschiedene Möglichkeiten zur Registrierung entwickelt worden, um die Wechselwirkung eines einzelnen Myosinmoleküls mit Aktin zu messen, aber im Prinzip lassen diese sich auf zwei unterschiedliche experimentelle Anordnungen zurückführen:

(i) Ein einzelnes Motormolekül befindet sich auf dem Substrat, dabei dient meist eine auf dem Boden befestigte Glasperle oder eine aus dem Glas geätzte Stufe als Sockel. Darüber wird ein einzelnes Aktinfilament mit je einer Latexkugel an jedem Ende in der Lösung aufgespannt und festgehalten, indem die beiden Kugeln mittels zweier Laserfallen manipuliert werden („3 bead geometry“, Finer *et al.*, 1994, Abb. 2.1.A). Eine der beiden Latexkugeln kann durch eine sehr feine Glasnadel ersetzt werden, die in diesem Fall als Sensor dient. Dieser Aufbau wird in dieser Arbeit verwendet und ausführlich beschrieben (Abb. 2.1.B).

(ii) Umgekehrt kann auch das Aktinfilament (oder ein Bündel mehrerer Filamente) auf dem Substrat befestigt werden. Das Motormolekül wird an einen geeigneten Sensor angebracht, der sich oberhalb des Aktins in Lösung befindet. Als Sensor kommen Mikronadeln (Ishijima *et al.*, 1994), evtl. mit zusätzlicher Spitze versehen (Kitamura *et al.*, 1999), oder eine Latexperte innerhalb einer Laserfalle in Frage (Block *et al.*, 1990).

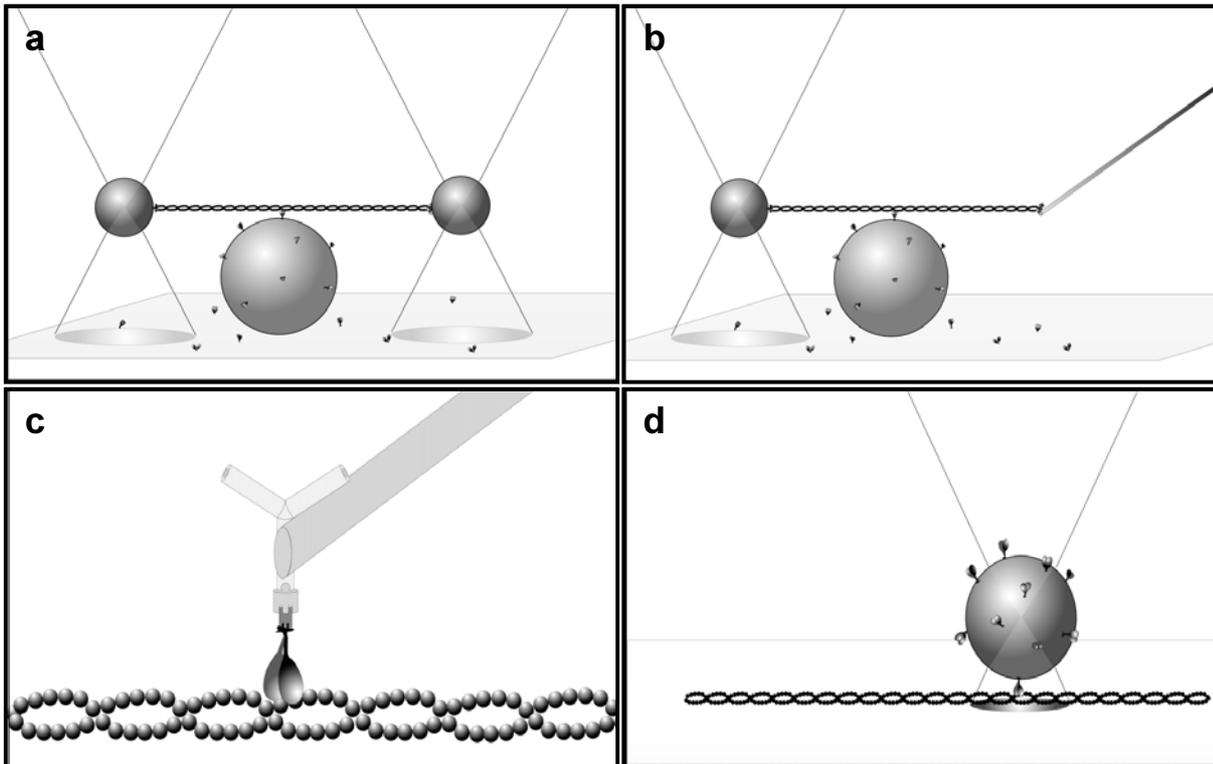


Abb. 2.1.: Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um Akto-Myosin Einzelwechselwirkungen zu messen: (a) „3 bead geometry“, (b) Kombination aus Laserfalle und Mikronadel, (c) „whisker tip“, (d) Perlenassay.

Die kleinen Schrittdistanzen (einige nm) und geringen Kräfte (einige pN), die bei Einzelmolekülwechselwirkungen auftreten, erfordern einen Sensor geringer Steifheit, damit der Motor ungehindert den vollen Arbeitshub („*power stroke*“) ausführen kann. Im Fall der Latexkugeln in der Laserfalle hängt die Steifheit dieses Sensors von den Eigenschaften der Laserfalle ab. Bei den üblicherweise zum *Trappen* verwandten Wellenlängen und Laserleistungen beträgt die Steifheit einer 1 μm großen Latexkugel 0,02 – 0,03 pN/nm. Wenn ein Aktinfilament in der Doppellaserfalle mittels Manipulation der beiden Fallen vorgespannt worden ist, addieren sich die Steifheiten der beiden Perle, so daß die resultierende Steifheit des Sensors 0,04 – 0,06 pN/nm beträgt. Ähnlich verhält es sich, wenn statt der zweiten Perle eine Mi-

kronadel verwandt wird, auch hier addiert sich nach Aufspannen des Aktinfilaments zu der Steifheit der Nadel noch die der Perle in der Laserfalle, wobei in diesem Fall die Steifheiten der Nadeln variieren (siehe Ergebnisse).

Die Steifheit der Sensoren bei umgekehrter Anordnung (siehe Abb. 2.1.C, 2.1.D) ist von ähnlicher Größe. Aufgrund dieser geringen Steifigkeit unterliegen alle Sensoren Brownscher Bewegung in der Größenordnung einiger 10 nm und die relative Bewegung zwischen Motormolekül und Aktinfilament ist eine Gemeinsamkeit der beschriebenen Systeme, unabhängig davon, ob nun der Motor oder das Aktinfilament fest mit dem Substrat verbunden sind (und der Gegenpart an den Sensor gebunden ist).

Es gibt verschiedene Methoden zur Analyse der Rohdaten

Da die Brownsche Molekularbewegung des Sensors einige 10 nm beträgt ($\kappa_{\text{Sensor}} = 0,04 - 0,06$ pN/nm, $\text{Var}[x] = k_B T / \kappa_{\text{Sensor}}$) und die Zeitauflösung des Systems (~ 1 ms, siehe Ergebnisse) nicht ausreicht, um den Beginn eines Einzelschrittes direkt aufzulösen, müssen die Rohdaten statistisch ausgewertet werden, um eine Aussage über die Schrittgröße machen zu können. Während der Anbindung des Motormoleküls an das Aktinfilament ist das Rauschen des Sensors deutlich reduziert, da zur Steifheit des gesamten Ensembles die der Querbrücke des Myosins (verbindet Myosin mit Aktin) addiert wird und diese mit $\kappa_{\text{qb}} \sim 0,7$ pN/nm (Veigel *et al.*, 1998) bzw. $\kappa_{\text{qb}} \sim 1,6$ pN/nm (Bagshaw, 1993) die Gesamtsteifheit dominiert.

Die mechanischen Eigenschaften (i) der Anbindung des Motormoleküls an das Substrat und der Verbindung zwischen Aktinfilament und Perle bzw. Mikronadel oder (ii) der Anbindung des Aktinfilaments ans Substrat und entsprechend die Befestigung des Motormoleküls am Sensor können allerdings diese Reduktion des Rauschens negativ beeinflussen (mindern) und erfordern zudem gegebenenfalls eine Korrektur der gemessenen Schrittgröße (vgl. Ergebnisse). Je nach Meßaufbau und Art der Ankopplung des Motors bzw. des Aktinfilaments variiert die Qualität der Rohdaten bezüglich der Reduktion des Rauschens während der Anbindung und erfordert entsprechend mehr oder weniger stringente Kriterien, um die einzelnen Wechselwirkungen vom Rauschen trennen zu können. Die verschiedenen Methoden der Datenanalyse haben alle gemeinsam, daß sie sich die Reduktion des Rauschens während

der Wechselwirkung zunutze machen, unterscheiden sich aber im Detail in den genauen Kriterien zur Detektion der Wechselwirkung und der weiteren Interpretation der Daten.

Bei der ersten Analyse der Schrittgrößen (Finer *et al.*, 1994) wurden die Rohdaten analysiert, indem eine Nulllinie definiert wurde als die mittlere Position des Sensors, die Position einer Wechselwirkung wurde anschließend relativ zu dieser Nulllinie gemessen. Als Wechselwirkung wurden alle Ereignisse mit einer deutlichen Verschiebung des Sensors relativ zu dieser Nulllinie betrachtet. Dabei wurde nicht berücksichtigt, daß die Position des Sensors zu Beginn der Wechselwirkung durch die Brownsche Bewegung der Perle nicht immer die der Nulllinie entspricht, sondern entsprechend um diese fluktuiert. Vermutlich führte die Nichtberücksichtigung aller Wechselwirkungen unterhalb der Nulllinie und innerhalb des Rauschens in der Analyse zu einer Überschätzung der tatsächlichen Schrittgröße mit 11 nm.

Molloy *et al.* stellten 1995 eine alternative Methode zur Analyse vor (im Folgenden „Histogramm-Analyse“ genannt), welche die thermische Diffusion des Sensors mit der damit verbundenen Streuung der Anfangsposition der Wechselwirkungen berücksichtigte, indem die Verteilung vieler solcher Ereignisse relativ zur Nulllinie des freien Rauschens analysiert wurde. Das Resultat ist eine gaußförmige Verteilung (entsprechend der Position des fluktuiierenden Sensors relativ zu dessen Nulllinie), die allerdings um genau den Betrag der Schrittgröße verschoben ist. Die Richtung der Verschiebung hängt von der Polarität des Aktinfilaments ab. Damit kann aus dem Betrag der Verschiebung der Positionsverteilung vieler Wechselwirkungen die Schrittgröße der einzelnen Wechselwirkung bestimmt werden. Eine Wechselwirkung wurde im Unterschied zur bisherigen Interpretation durch die während der Anbindung des Myosinmotors an das freie Aktinfilament reduzierte Varianz des Meßsystems detektiert (unabhängig von der Position). Basierend auf dieser Analyse wurde für Rohdaten aus dem gleichen Meßsystem (*3 bead geometry*) eine Schrittgröße von ~ 5 nm für die beiden Myosinfragmente S1 und HMM postuliert (Veigel *et al.*, 1998; Veigel *et al.*, 1999), wobei ursprünglich (Molloy *et al.*, 1995) für S1 mit ~4 nm und HMM mit ~7 nm unterschiedlich große Werte gemessen worden waren.

In der Arbeitsgruppe von David Warshaw wurde ebenfalls mittels der Doppellaserfalle Myosinfragmente charakterisiert, allerdings wurden die Daten mit einer alternativen Analy-

semethode ausgewertet, der „*mean variance analysis*“ (ursprünglich für Daten aus Einzelkanalmessungen entwickelt (Patlak 1993)), bei der mit einem bestimmten Zeitfenster sowohl die Varianz als auch die mittlere Position berechnet und in einem dreidimensionalen Histogramm dargestellt werden. Da sich die Wechselwirkungen in der Varianz vom freien Rauschen unterscheiden, kann ihre mittlere Position relativ zu der des freien Rauschens direkt abgelesen werden. Für natives Myosin wurde damit eine Schrittgröße von 11 nm (Guilford *et al.*, 1997) und für einköpfiges Myosin von 5-6 nm (Tyska *et al.*, 1999) angegeben.

Wie die bisher vorgestellten Analysemethoden wurde auch die Folgende für das „*3 bead assay*“ entwickelt (Mehta *et al.*, 1997), die die bei Anbindung des Motors gestörte Korrelation zwischen der Position der beiden Perlen in der Laserfalle zur Definition der Ereignisse verwendet. Die Ablenkung der Perlen während einer solchen Wechselwirkung (Detektion erfolgt über Positionsbestimmung *beider* Perlen und anschließender Korrelationsanalyse) wird anschließend entsprechend der Histogramm-Methode analysiert und interpretiert, damit wird für HMM eine Schrittgröße von 4 - 5 nm gemessen.

Eine Beobachtung ganz anderer Art, nämlich daß die von Myosin generierte Verschiebung sich aus einer unterschiedlichen Anzahl (2-5) aufeinanderfolgender einzelner 5.3 nm großer Schritte zusammensetzt, stammt aus den Messungen, die Yanagida und Kollegen (Kitamura *et al.*, 1999) mit der umgekehrten Meßanordnung (Aktin fest auf dem Substrat, Motormolekül am Sensor befestigt, Abb. 2.1.C) durchgeführt haben. Zur Analyse wurde eine für prozessive Motormoleküle entwickelte Methode benutzt (Svoboda *et al.*, 1993). Diese jeweilige Abfolge mehrerer Schritte wird interpretiert als Resultat der Hydrolyse eines einzigen ATP Moleküls und steht damit sowohl in der Art der Wechselwirkung als auch in deren Interpretation im Widerspruch zu allen bisher veröffentlichten Ergebnissen.

Damit ist auch mehrere Jahre nach den ersten Einzelmolekülmessungen an Myosin die Frage nach der exakten Schrittgröße umstritten. Vorrangiges Ziel dieser Arbeit sollte deshalb die Bestimmung der tatsächlichen Größe der von einem Myosinmolekül generierten Verschiebung sein. Die Messungen dazu wurden mit einer alternativen Sensorik durchgeführt, der hier verwandte Mikronadel-Laserfallen-Aufbau stellt eine Kombination aus Mikronadel und

einer Perle in der Laserfalle dar, diese sind verbunden durch ein Aktinfilament. Sowohl Mikronadel als auch Laserfalle wurden bereits in früheren Untersuchungen zur Analyse einzelner/weniger Motoren eingesetzt (Chaen *et al.*, 1989, Ishijima *et al.*, 1991, Finer *et al.*, 1994). Da Myosin immer nur transiente Wechselwirkungen mit dem Aktinfilament eingeht, ist die Mikronadel mit einem daran befestigten Aktinfilament alleine nicht geeignet, um an einem einzelnen Motor dessen Schrittgröße zu messen. Durch die Kombination mit einer Perle in der Laserfalle am anderen Ende des Filaments kann dieses Filament in der Lösung vorgespannt und gehalten werden, wobei hier die Mikronadel als Sensor dient, um als Ersatz der einen Perle des konventionellen 3 *bead assays* mögliche, signalverändernde Einflüsse der Doppellaserfalle (z.B. durch Rotation des Ensembles) ausschließen zu können. Die Analyse der Meßdaten erfolgte mit einer aus der „Histogramm-Analyse“ verfeinerten Methode. Die Meß- und Analyseverfahren und die damit erhaltenen experimentellen Ergebnisse werden in diesem Kapitel vorgestellt.

2.2. Ergebnisse

Mikronadeln sind als Sensor geeignet, um die Wechselwirkung eines einzelnen Motor-moleküls mit einem an der Nadel befestigten Aktinfilament zu messen

Das kombinierte Mikronadel-Laserfallen System stellt eine Abwandlung der Doppellaserfalle dar, wobei eine der beiden Latexperlen durch ein Glasnadel ersetzt wird (Abb. 2.1.B). Das fluoreszenzmarkierte Aktinfilament wird mittels modifiziertem Myosin (NEM-

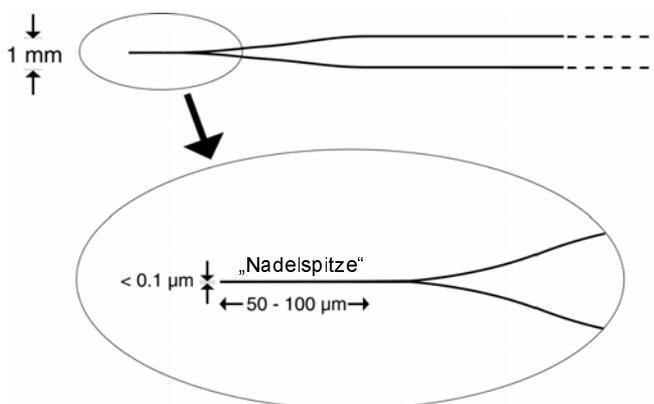


Abb. 2.2.: Skizze/Abmessungen einer Mikronadel. Die flexible Nadelspitze dient als Sensor.

Myosin, siehe Methoden zu Kapitel 2) auf der einen Seite an einer sehr dünnen ($L \sim 50 - 100 \mu\text{m}$, $d < 0.1 \mu\text{m}$) Spitze einer Glasnadel (vgl. Abb. 2.2.) fixiert. Auf der anderen Seite erfolgt eine Befestigung an einer Latexperle ($d = 1 \mu\text{m}$), die sich in einer Laserfalle befindet. Durch Positionierung der Laserfalle kann so das Aktinfilament vorge-

spannt werden. Die Glasnadel dient gleichzeitig als Sensor, indem deren Bild im Hellfeld vergrößert auf eine Quadrantendiode (S1557, Hamamatsu) projiziert wird. Aus der Differenz des Ausgangsstroms der Quadranten kann die Position der Nadel mit Angström-Genauigkeit detektiert werden, die Bandbreite des Detektors ist > 8 kHz. Die Auflösung des Detektors wird lediglich durch Schrotrauschen limitiert. Abbildung 2.4.a zeigt die Position einer sehr steifen Nadel über 10 s, das Rauschen beträgt hier 0.28 nm rms.

Die Brownsche Molekular-bewegung des Sensors kombiniert mit Detektionssystemen entsprechender Bandbreite bestimmt die Zeitauflösung der Messung. Für eine Latexperle in der Laserfalle beträgt die Bandbreite ~ 600 Hz, bei einer Mikronadel hängt sie von den geometrischen Abmessungen der flexiblen Nadelspitze ab und beträgt typisch ebenfalls einige hundert Hertz. Die Kalibrierung des Detektors erfolgt mittels der Modulation des Signals durch sinusförmige Bewegung des Detektors.

Die mechanischen Eigenschaften der Nadelspitze werden ermittelt, indem zum einen deren Bewegung für ~ 1 min aufgezeichnet wird und aus der Brownschen Fluktationsbewegung die Steifheit κ_{Nadel} errechnet wird (Äquipartitionstheorem):

$$\frac{1}{2} \kappa_{\text{Nadel}} \langle x^2 - x^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T$$

k_B = Boltzmann-Konstante,

T = Temperatur

Zum anderen kann die Steifheit

auch aus dem Energiespektrum $S(f)$ der Bewegung der Nadel über ebenfalls ~ 1 min bestimmt werden. Über Anpassen einer Lorentzfunktion $S(f)$, die bis zur Eckfrequenz f_c praktisch konstant ist und dann mit $1/f^2$ abfällt (vgl. Abb. 2.3., $S(f)$ rot) läßt sich die Steifheit κ_{Nadel} direkt aus dieser Eckfrequenz f_c ermitteln:

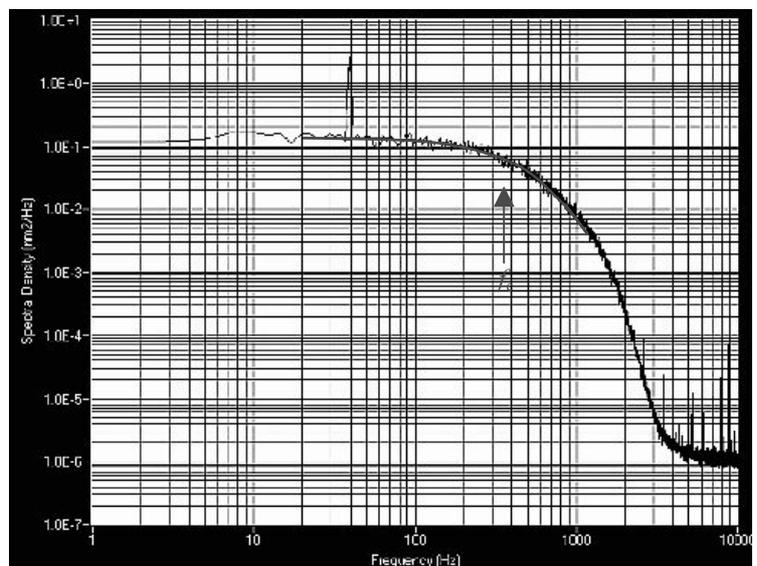


Abb. 2.3.: Spektrum der Fluktuation einer freien Nadel über 1 min. Ab der Eckfrequenz f_c fällt das Spektrum mit $1/f^2$ ab. In dieses Spektrum wird eine Lorentzfunktion (rot) eingepaßt, aus der die Steifheit der Nadel errechnet wird.

$$S_x(f) = \frac{k_B T}{\gamma \pi^2 (f_c^2 + f^2)} \quad \kappa_{\text{Nadel}} = 2\gamma \kappa f_c \quad \gamma = \text{Reibungskoeffizient}$$

In Abbildung 2.3. ist das Spektrum einer etwas steiferen Nadel dargestellt. Sie weist eine Steifheit von ~ 0.05 pN/nm und eine Bandbreite von ~ 400 Hz auf.

Reduktion der Positionsfluktuation des Sensors während der Wechselwirkung erlaubt deren Detektion

Die Bewegung des Sensors, d.h. der freien Nadel in Flüssigkeit, wird von deren mechanischen Eigenschaften (Steifheit, Zeitkonstante) bestimmt. Je nach Abmessung des flexiblen Teils („Nadelspitze“) verfügt eine für die Registrierung geeignete Nadel über eine Steif-

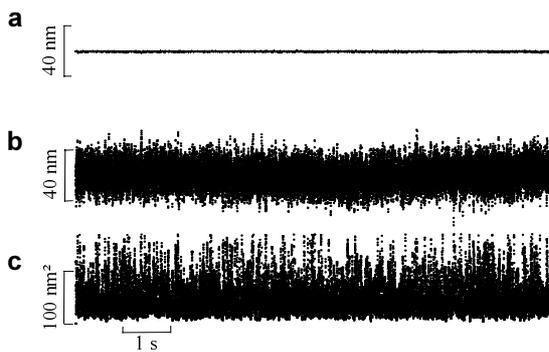


Abb. 2.4.: a) Zeitserie (jeweils 10 s) einer sehr steifen Nadel (~ 85 pN/nm), b) Zeitserie einer Nadel geringer Steifheit (~ 0.04 pN/nm), c) zugehörige Varianz (zu b). die Varianz wurde mittels eines 10 ms langen Zeitfensters berechnet.

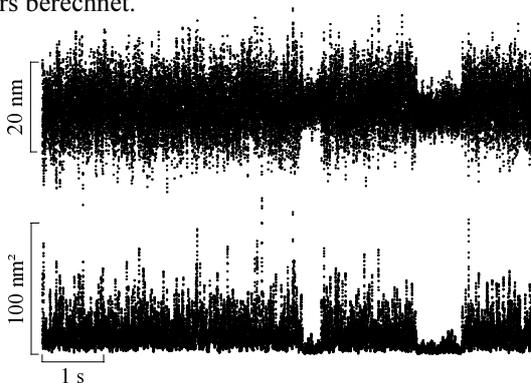


Abb. 2.5.: Zeitserie einer (vorgespannten) Nadel mit transienten Wechselwirkungen.

heit von $\sim 0.01 - 0.05$ pN/nm. Eine Aufzeichnung des freien Rauschens einer Nadel findet sich in Abb. 2.4.b). Die freie Nadel fluktuiert hier 50-60 nm von Spitze zu Spitze, die dazu berechnete Varianz (mittels eines 10 ms langen Zeitfensters) beträgt ~ 100 nm² entsprechend einer Steifheit der Nadel von ~ 0.04 pN/nm. Falls das Aktinfilament mittels der Perle in der Laserfalle an dessen anderem Ende vorgespannt ist, addiert sich zu der Steifheit der Nadel noch die der Laserfalle (hier 0.02 pN/nm).

Sobald aber eine Wechselwirkung mit einem sich auf dem Substrat befindlichen Motormolekül stattfindet, d.h. der Motor bindet ans Aktinfilament, erhöht sich die Steifheit des gesamten Ensembles durch die Addition der Steifheit der Querbrücken

über den Zeitraum des Anbindens deutlich. Der eigentliche Kraftschlag hat am Anfang der

Wechselwirkung stattgefunden und kann mit der vorhandenen Zeitauflösung nicht aufgelöst werden.

Mit einem variablen Analysefenster lassen sich Wechselwirkungen optimal identifizieren

Neben der eigentlichen Detektion ist die korrekte Identifikation und Interpretation der Einzelmolekülwechselwirkungen auf Grund der vorherrschenden geringen Kräfte und Distanzen nicht trivial. Wie im vorangegangenen Absatz gezeigt, lassen sich die Wechselwirkungen anhand der damit verbundenen Reduktion des Rauschens identifizieren. Da eine direkte Auflösung des eigentlichen Kraftschlags des Myosins mit den bekannten Meßmethoden nicht möglich ist, bedarf es einer statistischen Betrachtung vieler solcher Ereignisse. Erst indem die Positionen mehrerer Ereignisse relativ zu der Nullposition der freien Nadel analysiert werden, läßt sich die Schrittgröße anhand der Verschiebung der resultierenden Verteilung bestimmen. Um die Schrittgröße mit einer Genauigkeit von ± 1 nm bestimmen zu können, sind erfahrungsgemäß ~ 100 Wechselwirkungen notwendig, für eine Fehlerabweichung $< 10\%$ bedarf es einiger 100 solcher Ereignisse. Entsprechend müssen dafür Rohdaten mit einer zeitlichen Länge von mehreren Stunden ausgewertet werden. Die Auswertung soll dabei möglichst

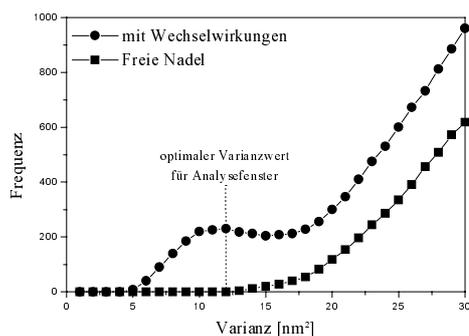


Abb. 2.6.: Anzahl an „Events“ bei fester Zeit (10 ms) für eine Zeitserie mit Wechselwirkung (Kreise) und die einer freien Nadel (Quadrate). Die Anzahl der Ereignisse wurde anhand zweier Datensätze gleicher zeitlicher Länge bestimmt, der eine stellte das Rauschen der freien Nadel dar, der andere enthielt Wechselwirkungen mit einem HMM-Molekül.

Daraus läßt sich die optimale Höhe für das Analysefenster bestimmen, in diesem Fall 10-12 nm².

schnell und objektiv geschehen. Die Analyse der Daten erfolgt aus diesem Grund mittels Computer. Mittels eines bestimmten Kriteriums werden die Wechselwirkungen innerhalb des Rauschens identifiziert und deren Positionen in einem Histogramm zusammengefaßt.

Bei der „Histogramm-Analyse“ (Molloy *et al.*, 1995) erfolgt die Identifikation über ein vorgegebenes Analysefenster konstanter zeitlicher Länge und konstantem Varianzwert, d.h. zu jeder Zeitserie wird die zugehörige Varianz berechnet und jeder Abschnitt, der für einen bestimmten

Mindestzeitraum (typischerweise 10 – 20 ms) eine auf einen bestimmten Höchstwert reduzierte Varianz aufweist, zählt als „Ereignis“.

Wenn man für einen Datensatz mit einem Analysefenster konstanter zeitlicher Länge aber variabler Mindestvarianz die Anzahl der „Ereignisse“ bestimmt, die bei der (mehrfachen) Analyse mit dem jeweiligen Analysefenster dem damit verbundenen Kriterium genügen, erhält man mit dem ansteigenden Varianzwert ab einer bestimmten Schwelle eine ebenfalls ansteigende Zahl an „Ereignissen“ (siehe Abb. 2.6. , hier oberhalb von 5 nm²). Aber auch im Rauschen einer freien Nadel werden mit steigender Mindestvarianz und damit einem immer weniger stringenten Kriterium oberhalb einer Varianzschwelle (abhängig von den mechanischen Eigenschaften des Sensors, vgl. Diskussion, in der Abb. 2.6. ab einer Varianz von 13 nm²) „Ereignisse“ detektiert. Da es sich dabei nicht um tatsächliche Wechselwirkungen des Motors mit dem Aktinfilament handelt, ergibt eine Analyse der Positionen solcher „Ereignisse“ keine Verschiebung deren Verteilung. Da während der Anbindung des Motors über diesen Zeitraum die Varianz deutlich reduziert wird, verglichen mit der des freien Rauschens, werden die Wechselwirkungen bei fest vorgegebenen Zeitfenster schon bei einer geringeren Mindestvarianz detektiert (vgl. wiederum Abb. 2.6.).

Indem man die Anzahl der „Ereignisse“ in Abhängigkeit der Varianz bestimmt, läßt sich der optimale Varianzwert für das Analysefenster bestimmen (in der Abbildung 2.6. 12 nm²), mit diesem Kriterium werden dann genau die „Ereignisse“ detektiert, die von tatsächlichen Wechselwirkungen herrühren. Anschließend wird deren Position im Verhältnis zur Nulllinie der Nadel gemäß der „Histogramm-Analyse“ ausgewertet.

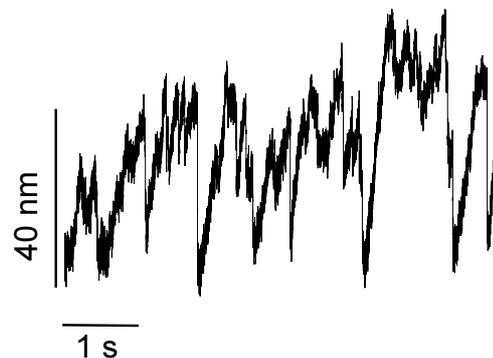


Abb. 2.7.: Zeitserie der Wechselwirkung multipler HMM-Moleküle mit einem Aktinfilament.

Die Schrittgröße von Myosin beträgt ~5 nm

Um die Wechselwirkung eines einzelnen Myosinmoleküls mit dem Aktinfilament zu studieren, wird die Myosindichte direkt auf dem Substrat so stark reduziert, daß nur noch transiente Ereignisse zu beobachten sind (Proteinkonzentration < 0.1 µg/ml, statistisch befindet sich damit <1 Molekül in Reichweite des Aktinfilaments). Das vorgespannte Arrangement

aus Nadel, Aktinfilament und Perle in der Laserfalle wird langsam über eine der auf dem Boden befindlichen Perlen abgesenkt, bis einzelne Wechselwirkungen mit einem sich auf der Perle befindlichen Motor beobachtet werden. Die Position der Nadel wird in Abschnitten von ~ 1 min über einen längeren Zeitraum (bis zu 1 h) registriert und gespeichert. Verringert man die Myosinkonzentration noch weiter, nimmt die Häufigkeit der Wechselwirkungen ab, ohne daß sich an deren Qualität etwas ändert. Bei Kontrollmessungen ohne Beschichtung des Substrats mit Motormolekülen bzw. nur mit BSA-Beschichtung (*bovine serum albumin*) treten diese transienten Interaktionen nicht auf. Bei höheren Konzentrationen beobachtet man zunächst eine Zunahme im Auftreten von (transienten) Einzelinteraktionen bzw. dann eine sägezahnartige Auslenkung der freien Nadel über weite Distanzen (vgl. Abb. 2.7., hier beträgt die Proteinkonzentration $>1 \mu\text{g/ml}$, d.h. es befinden sich 5 - 10 Moleküle in Reichweite des Aktinfilaments). Für die Berechnung der Anzahl der Moleküle in Reichweite in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration wurde vorausgesetzt, daß sich alle mit der Lösung applizierten Moleküle auf dem Substrat absetzen und voll funktionsfähig sind, wegen der Geometrie der Perle ($d = 2 \mu\text{m}$) können alle Moleküle auf einer Fläche von $0,05 \mu\text{m}^2$ mit dem darüber aufgespannten Aktinfilament wechselwirken.

Abb. 2.8. zeigt „Rohdaten“ aus Messungen an Einzelmolekülen mit dem Myosinfragmenten S1 (a) und die zugehörige Varianz (b) bei einer ATP-Konzentration von $1 \mu\text{M}$ (zur Struktur des Myosins und von S1: Vgl. Kapitel 3). Während der Anbindung des Myosinkopfes an das Aktinfilament reduziert sich die Varianz auf $5\text{-}10 \text{ nm}^2$. Analysiert man diese Daten mit

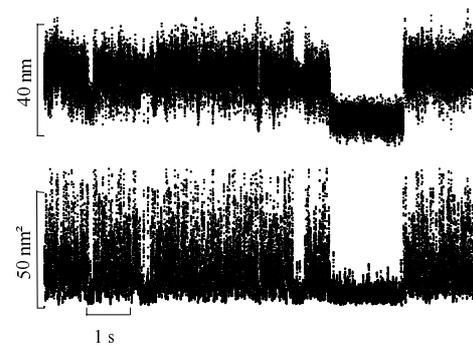


Abb. 2.8.: Zeitserie (a) und zugehörige Varianz (b) der Wechselwirkung eines S1 Moleküls mit dem Aktinfilament.

einem entsprechenden Analysefenster (zeitliche Länge: 10 ms / Höhe der Varianz: $5\text{-}10 \text{ nm}^2$) und betrachtet anschließend die Position mehrerer Hundert solcher Aktomyosin Wechselwirkungen, so erhält man eine gaußförmige Verteilung, die um 5.24 nm gegen die mittlere Position des freien Sensors verschoben ist (siehe Abb. 2.9.). Diese Verschiebung entspricht der Schrittgröße des einzelnen Moleküls (Molloy *et al.*, 1995). Wenn nicht anders angegeben,

wird die Position der einzelnen Wechselwirkungen jeweils zur (zeitlichen) Mitte der Anbindung ermittelt. Analysiert man die mittlere Position aller Wechselwirkung in den ersten (letzten) 10 ms des Anbindungszeitraumes, so erhält man mit $5,27 \pm 0,30$ nm ($5,32 \pm 0,29$ nm) ähnliche Werte wie bei der zeitlich mittleren Position, während der Anbindung des Myosinkopfes an das Aktinfilament ist für S1 somit keine weitere Konformationsänderung detektierbar. Die Richtung der Verschiebung wird durch die Polarität des Aktinfilaments bestimmt (Sellers und Kachar, 1990). Die mittlere Dauer der in Abbildung 2.9. gezeigten Wechselwirkungen beträgt ~ 46 ms, wenn man von einem einfachen exponentiellen Abfall ausgeht.

Die Nulllinie der Nadel wird bei der Datenanalyse für jeden Abschnitt einzeln bestimmt, um den Einfluß eines eventuellen Drifts möglichst gering zu halten, wurden die Rohdaten in 10 s Abschnitten ausgewertet und die Positionen aller so erhaltenen Wechselwirkungen addiert.

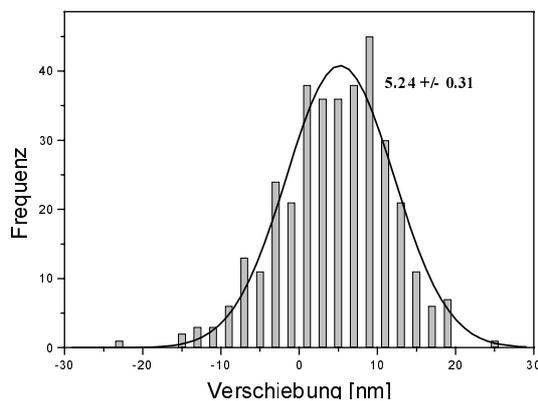


Abb. 2.9.: Verteilung von 353 Wechselwirkungen von S1 mit $1 \mu\text{M}$ ATP, 1 Aktinfilament

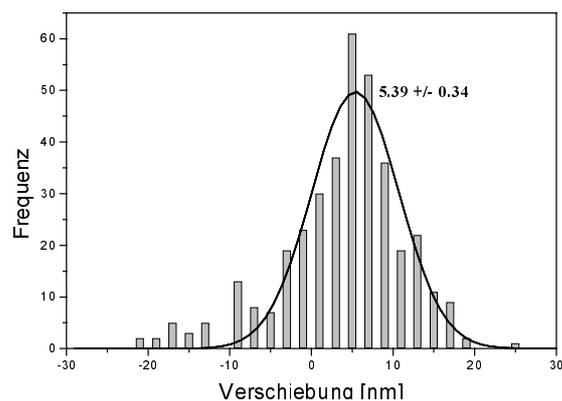


Abb. 2.10.: Verteilung von 368 Wechselwirkungen von Wildtyp Myosin mit $1 \mu\text{M}$ ATP, 2 Filamente.

Da die Richtung der Verschiebung von der Polarität des Aktinfilamentes abhängt, können die resultierenden Verteilungen aus Messungen an unterschiedlichen Aktinfilamenten nicht direkt addiert werden, sondern die einzelnen Ergebnisse müssen je nach Polarisierung des Filaments erst orientiert werden. Je nach Betrag der Verschiebung sind eine unterschiedliche Anzahl an Wechselwirkungen notwendig, um die Verteilungen korrekt orientieren zu können (vgl. Kapitel 2.2., S.21). Die hier gezeigte Verteilung stammt von einem einzigen Filament und die Messung dauerte insgesamt ~ 20 min. Bei der Analyse der Rohdaten aus Messungen mit Voll-Längen-Myosin (Wildtyp) erhält man eine ähnlich große Verschiebung ($5,39 \pm$

0,34 nm) der Position aller Wechselwirkungen (Abb. 2.10.). Hier wurden die resultierenden Verteilungen aus 2 Messungen addiert.

Damit resultiert aus den gezeigten Messungen für Myosin (und das Myosinfragment S1) eine Schrittgröße von ~ 5 nm. Mit der Steifheit des gesamten Ensembles während der Anbindung des Myosinkopfes (0.4 – 0.6 pN/nm) und der gemessenen Schrittlänge von 5.3 nm errechnet sich unter diesen (nichtisometrischen) Bedingungen eine pro Wechselwirkung geleistete Arbeit von 7 - 10 pN·nm.

2.3. Diskussion

Diskussion der Meßmethoden

Um Einzelmolekülwechselwirkungen detektieren und analysieren zu können, muß ein Sensor über eine der Kräfte im pN-Bereich angepaßte Impedanz verfügen. Die erforderliche geringe Steifigkeit des Sensors führt dazu, daß dieser auf Grund der Brownschen Molekularbewegung Fluktuationen von mehreren 10 nm erfährt, diese sind aber deutlich größer als die durch die Konformationsänderung eines einzelnen Myosinmoleküls resultierenden Verschiebungen (ca. 5 nm). Um eine Wechselwirkung detektieren zu können, muß sich das während der Anbindung des Motors reduzierte Rauschen des Sensors deutlich von den Fluktuationen des freien Sensors unterscheiden. Bei der Anbindung des Motors wird die Gesamtsteifigkeit des Systems dominiert durch die Steifigkeit der Querbrücken ($\kappa_{qb} \sim 0,7$ pN/nm (Veigel *et al.*, 1998) oder $\kappa_{qb} \sim 1,6$ pN/nm (Bagshaw, 1993)), d.h. die Fluktuation der Varianz des Sensors beträgt dann noch ~ 5 nm². Allerdings ist die tatsächliche Reduktion des Rauschens oft vermindert, z.B. durch Rotation des Arrangements aus den beiden Perlen und dem Filament bei der Doppellaserfalle, durch eine elastische Anbindung der Moleküle an den Sensor und ans Substrat oder durch das longitudinal nachgiebige Aktinfilament (je nach dessen Länge).

Neben der Reduktion des Rauschens bestimmt die zeitliche Auflösung des Meßinstruments das Detektionsvermögen. Um den Beginn eines Einzelschrittes auflösen zu können, müßte die Zeitkonstante des Sensors deutlich im ns-Bereich liegen. In Kombination mit der

erforderlichen geringen Steifigkeit ist dies für keines der vorgestellten Meßsysteme möglich. Die Dauer der Anbindung des Motors liegt im Bereich einiger ms (je nach ATP-Konzentration), so daß der verwandte Sensor entsprechend schnell sein muß, um die Wechselwirkung vom freien Rauschen unterscheiden zu können.

Die hier entwickelte Analysemitte mit dem variablen Fenster verdeutlicht diese Tatsachen: Eine stärkere Reduktion des Rauschens während der Anbindung des Motors vergrößert den Abstand zwischen der Verteilung tatsächlicher Wechselwirkungen und den ab einer bestimmten Varianzschwelle fälschlicherweise detektierten, „zufälligen“ Ereignissen

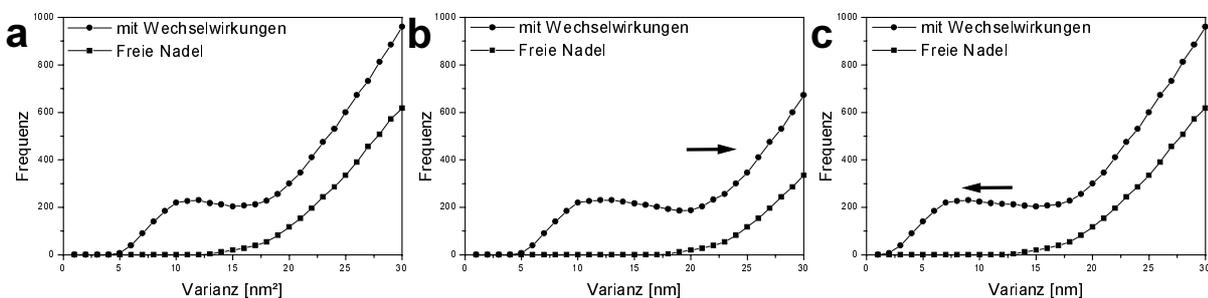


Abb. 2.11.: Anzahl der Wechselwirkungen in einem Datensatz je nach Varianz der Ereignisse, diese haben eine konstante Länge (10 ms). (a) Unterhalb einer Varianz von 13 nm² können die Wechselwirkung vom freien Rauschen der Nadel separiert werden. (b) „schnellere Nadel“ (berechnet aus den Daten (a): freie Nadel zu höherer Schwellenvarianz verschoben, Wechselwirkungen aus (a) addiert), die Schwelle, ab der auch im Rauschen der freien Nadel „Events“ detektiert werden, nimmt zu. (c) „Wechselwirkungen mit stärkerer Reduktion des Rauschens“ (berechnet aus den Daten (a): Wechselwirkungen aus (a) zu niedrigerer Varianzschwelle verschoben, freie Nadel aus (a) addiert), die tatsächlichen Wechselwirkungen werden bei einer geringeren Varianz detektiert und lassen sich so noch besser vom Rauschen der freien Nadel separieren.

(vgl. Abb. 2.11.c), wenn die Anzahl der Ereignisse auf einer festen Länge in Abhängigkeit der Varianz betrachtet wird. Gleichzeitig wird bei einer verbesserten Zeitkonstante des Sensors (hier der Nadel) diese Varianzschwelle zu höheren Werten verschoben (vgl. Abb. 2.11.b).

Die Doppellaserfalle zeichnet sich durch die beste zeitliche Auflösung aus (500 - 600 Hz) (Veigel *et al.*, 1998), die zeitliche Auflösung des kombinierten Mikronadel-Laserfallen-Systems variiert mit den mechanischen Eigenschaften der jeweiligen Nadel (in dem hier verwandten Aufbau typisch ~300 Hz), dagegen ist das von Kitamura vorgestellte System mit aufgesetzter Spitze wesentlich langsamer (30 - 60 Hz). Dafür ist die Reduktion des Rauschens bei dieser Meßkonfiguration sehr gut: Während der Anbindung des an der aufgesetzten Spitze der Nadel befindlichen Myosinmoleküls an das auf dem Substrat befestigten Aktin erhöht sich die Steifigkeit von 0,03 pN/nm auf 0,2 - 1,5 pN/nm (Kitamura *et al.*, 1999,

die Erhöhung der Steifheit auf max. 1,5 pN/nm steht allerdings im Widerspruch zu (Veigel *et al.*, 1998), wo die die Gesamtsteifheit dominierende Querbrückensteifheit 0,7 pN/nm beträgt).

Bei der Doppellaserfalle beträgt die Steifheit der einzelnen Falle jeweils 0,02 – 0,03 pN/nm. Allerdings variiert die Zunahme der gesamten Steifheit infolge der Aktomyosin-Wechselwirkung bei den veröffentlichten Daten. In der Arbeitsgruppe von Molloy beträgt der Wert 0,17 pN/nm (Molloy *et al.*, 1995) – 0,5 pN/nm (Veigel *et al.*, 1999), während im Labor von Warshaw lediglich maximale Steifheiten von 0,08 pN/nm (Tyska *et al.*, 1999) – 0,13 pN/nm (Guilford *et al.*, 1997) erreicht werden. Die Reduktion des Rauschens bei (Tanaka *et al.*, 1998) ist von ähnlicher Größe: Während der Wechselwirkungen mit Myosin beträgt die Varianz noch 40 -50 nm² (entsprechend einer Steifheit von 0,08 – 0,1 pN/nm), verglichen mit dem Rauschen des freien Arrangements aus Aktinfilament und Latexperlen von 100 - 200 nm² (0,02 – 0,04 pN/nm).

Das Verhältnis zwischen dem freien und reduzierten Rauschen des kombinierten Mikronadel-Laserfallen Aufbaus ist etwas besser als das der Doppellaserfalle: Die Steifheit während der Anbindung des Myosinkopfes beträgt ~0,6 pN/nm, so daß die Varianz im günstigsten Fall auf <5 nm² reduziert wird und sich deutlich von der der freien Nadel (~100 nm²) unterscheidet. Da die Art der Anbindung des Aktinfilaments mittels NEM-modifizierten Myosins der des Doppellaserfallenexperiments entspricht, liegt die Ursache für dessen etwas schlechteres Signal-Rauschverhältnis darin, daß die Perlen in den beiden Laserfallen rotieren können, was bei einer einseitigen Anbindung des Filaments an eine Mikronadel deutlich reduziert wird.

Eine Reduktion der ATP-Konzentration mit der damit verbundenen verlängerten Interaktionszeit des Myosins am Aktinfilament erleichtert die Separation der Wechselwirkungen von freien Rauschen, so daß damit auch weniger sensitive Meßsysteme detektieren können. Das Mikronadel-Laserfallen Experiment eignet sich auch für die Analyse sehr kurzer (10 ms) Wechselwirkungen, hat aber den Nachteil, daß die experimentelle Handhabung deutlich schwieriger als bei Messungen mit der Doppellaserfalle ist. Zudem lassen sich bei Messungen mit der Doppellaserfalle während einer Messung die Steifheiten der Fallen verändern.

Bei keinem der vorgestellten Meßsystemen sollte es grundsätzlich zu einer Verfälschung der gemessenen Schrittgrößen kommen. Abhängig von den mechanischen Eigenschaften der jeweiligen Meßsysteme muß sich an die Analyse noch eine Korrektur anschließen, die die ermittelte Schrittgröße hinsichtlich parasitärer Einflüsse in der Abschwächung des Signals berichtigt. In einen eventuellen Vergleich unterschiedlicher Ergebnisse muß deshalb berücksichtigt werden, ob diese Korrektur bereits erfolgt ist.

Korrektur der Schrittgrößen

Bei der vorgestellten Analysemethode muß noch berücksichtigt werden, daß nicht die Schrittgröße direkt gemessen wird, sondern die Auslenkung der Nadel. Die Befestigung des Aktinfilamentes an der Perle und der Nadel, die des Myosinmoleküls an das Substrat und die Verbindung zwischen Myosinkopf und Aktinfilament stellen keine unendlich feste Verbindung dar und reduzieren dadurch die gemessene Auslenkung der Nadel gegenüber der tatsächlichen Schrittgröße. Besonders die Steifheit der Anbindung des Aktinfilaments durch NEM Myosin variiert. Aus der Steifheit des gesamten Ensembles während der Anbindung des Myosinkopfes (κ_{ges}) läßt sich aus der Auslenkung der Nadel (d_{Nadel}) die tatsächliche Schrittgröße (d_{Myosin}) abschätzen:

$$d_{Myosin} = d_{Nadel} [(\kappa_t + \kappa_{ges}) / \Delta\kappa_{ges}] \quad \text{mit } \kappa_t = \text{Steifheit des Ensembles}$$

Für das hier vorgestellte System beträgt κ_{ges} maximal $\sim 0,5 - 0,6$ pN/nm, κ_t setzt sich aus der Steifheit der Perle in der Laserfalle (0,02 pN/nm) und der der Nadel (0,01 – 0,05 pN/nm) zusammen. Damit ergibt sich ein Korrekturfaktor von maximal 1,12, d.h. die Schrittgröße ist um bis zu 12% unterschätzt worden.

Eine genauere Methode als die Analyse der Brownschen Fluktuation während der Anbindung errechnet den Korrekturfaktor unter Berücksichtigung der Komponenten von κ_{ges} (Steifheit der Querbrücke κ_{Qb} , Steifheit der Anbindung des Aktinfilaments κ_{con} ; hergeleitet aus Veigel *et al.*, 1998):

$$d_{Myosin} = d_{Nadel} [1 + 0.5 \kappa_t \kappa_{con}^{-1} + \kappa_t \kappa_{Qb}^{-1}]$$

Mit den aus Messungen mit der Doppellaserfalle bestimmten Werten (Veigel *et al.*, 1998) für κ_{con} (0.3 pN/nm) und κ_{qb} (0.7 pN/nm) erhält man einen (maximalen) Korrekturfaktor von 1,15. Alle in dieser Arbeit angegebenen Schrittgrößen sind nicht korrigiert. Die zitierten Schrittgrößen aus anderen Veröffentlichungen sind ebenfalls zum Großteil nicht korrigiert worden und erhöhen sich je nach Eigenschaften des jeweiligen Meßsystems noch um 10 – 50 %.

Diskussion der Analysemethoden

Die von Molloy entwickelte Histogramm-Methode (Molloy *et al.*, 1995) eignet sich für alle Rohdaten mit einem relativ guten „Signal-Rauschverhältnis“ (Verhältnis zwischen Fluktuation des freien Sensors und Fluktuation während der Anbindung des Motors) und einer entsprechenden Zeitauflösung, ansonsten birgt sie die Gefahr, daß mit einem fest definiertem Analysefenster (bestimmte zeitliche Mindestlänge und bestimmte Varianz) Wechselwirkungen nicht als solche erkannt und damit „verpaßt“ werden, weil sie sich nicht genügend vom Rauschen unterscheiden, oder daß „falsche“ Wechselwirkungen ohne Verschiebung mit in die Analyse einbezogen werden und das Ergebnis verfälschen. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Analysemethode (siehe Kapitel 2.6.) mit einem variablen Analysefenster minimiert diese Nachteile.

Wenn man bei der *mean variance analysis* (Patlak, 1993; Guilford *et al.*, 1997) die aus dem freien Rauschen resultierende Verteilung abzieht, ermöglicht dies auch eine Analyse von Rohdaten mit weniger gutem Signal-Rauschverhältnis, da bei der verbleibenden Verteilung (bestehend aus allen Meßpunkten während der Anbindung des Motors) dann keine Überlagerung mit den Meßpunkten des freien Rauschens des Sensors mehr stattfindet. Der Vorteil des Verfahrens liegt darin, daß alle Daten (alle Meßpunkte) berücksichtigt werden, ohne daß eine (möglicherweise ungenaue) Vorauswahl der Wechselwirkungen anhand bestimmter Kriterien erfolgen muß. Grundsätzlich sollte diese Art der Analyse zu gleichen Ergebnissen wie die Histogramm-Methode führen, da in beiden Fällen die Position vieler einzelner Wechselwirkungen relativ zu der durch das freie Rauschen definierte Nulllinie bestimmt wird. Allerdings unterscheiden sich die Methoden in der relativen Gewichtung der einzelnen Ereignisse. Wäh-

rend bei der Histogramm-Methode die Position einer einzelnen Wechselwirkung jeweils einen Punkt in der Verteilung ausmacht, gehen bei der *mean variance analysis* unterschiedlich viele Datenpunkte in die Verteilung ein, deren Anzahl wird maßgeblich durch die zeitliche Länge der einzelnen Wechselwirkung bestimmt, so daß beispielsweise eine 10 s andauernde Wechselwirkung entsprechend mehr Gewicht hat, als wenn mehrere sehr kurze Ereignisse aufgezeichnet werden. Wenn aber, wie im Fall der Histogramm-Analyse, mehrere hundert Wechselwirkungen unterschiedlicher Länge zusammengefaßt werden, mittelt sich dieser Effekt heraus. Die tatsächliche Anzahl der berücksichtigten Wechselwirkung kann aus der Verteilung nicht ermittelt werden. Leider wird in Publikationen (Guilford *et al.*, 1997; Tyska *et al.*, 1999) meist nur die zeitliche Länge der Rohdaten (30-60 s), die in die Analyse eingegangen sind, angegeben, aber man kann vermuten, daß relativ wenige Wechselwirkungen (<20) dabei in die Verteilung eingegangen sind, dies birgt die Gefahr einer Selektion der Rohdaten anhand der „sichtbaren“ Wechselwirkungen und der damit verbundenen Verfälschung des Ergebnisses. Aus der Histogramm-Analyse hat sich gezeigt, daß mehrere hundert Wechselwirkungen analysiert werden müssen, um eine gaußförmige Verteilung und eine Abweichung <10% zu erhalten.

Die Analyse der Korrelation zwischen der Position von 2 Perlen in der Doppellaserfalle (Mehta *et al.*, 1997) eignet sich ausschließlich für Meßsysteme, bei denen die Bewegung zweier Sensoren mit dem dazwischen aufgespannten Aktinfilament beobachtet wird. Sie unterscheidet sich von der Histogramm-Methode im Auswahlkriterium für Wechselwirkungen und stellt eine gute Ergänzung bei Daten mit für die „Histogrammanalyse“ mit Varianzkriterium nicht genügender Reduktion des Rauschens während der Anbindung des Myosins dar.

Die von Kitamura und Kollegen beschriebenen „*Dwell States*“ sind für einen nicht-prozessiven Motor wie Myosin II untypisch. In den Rohdaten aus dem „3 bead assay“ oder aus Messungen mit dem Mikronadel-Laserfallen Aufbau konnten im Gegensatz zu den in (Kitamura *et al.*, 1999) gezeigten Daten keinerlei aufeinanderfolgenden Schritte beobachtet werden, deshalb ist die für den prozessiven Motor Kinesin entwickelte Analyse (Svoboda *et al.*, 1993) nicht geeignet für die Interpretation der ausschließlich beobachteten transienten Aktomyosin-Wechselwirkungen.

Das individuell angepaßte Analysefenster ermöglicht eine klare Trennung der Wechselwirkungen vom Rauschen und damit eine optimale Bestimmung der tatsächlichen Wechselwirkungen und generell eine Überprüfung der Qualität der Rohdaten. Das der ursprünglichen Histogramm-Analyse immanente Risiko, daß im Rauschen enthaltene Ereignisse, die nicht von spezifischer Wechselwirkung herrühren, die ermittelte Schrittgröße verfälschen, wird minimiert. Auch Ereignisse die zu keiner Verschiebung führen (z.B. bei Messungen mit Nukleotidanaloga), können zweifelsfrei detektiert und von nichtspezifischen Reduktionen des Rauschens unterschieden werden.

Bei den Diskussionen über die tatsächliche Schrittgröße von Myosin wird in den meisten Veröffentlichungen nicht nur mit Unterschieden in der Analyse argumentiert, sondern es kommt auch ein Einfluß der „biologischen“ Randbedingungen (z.B. die Anbringung des Motors ans Substrat) für die unterschiedlichen Ergebnisse in Frage. Diese sind im Rahmen dieser Arbeit erstmals systematisch variiert und auf ihren Einfluß auf die gemessenen Schrittgrößen untersucht worden, die Ergebnisse dazu finden sich im nächsten Kapitel.

3. Die Schrittgröße von Myosin ist 5 nm

3.1. Einleitung

Wie im vorigen Kapitel schon angedeutet, haben unterschiedliche Labore voneinander abweichende Ergebnisse für die Schrittgröße von Myosin II gefunden. Die unterschiedlichen Meßmethoden sind prinzipiell alle geeignet, um Einzelmolekülwechselwirkungen (korrekt) zu detektieren. Die Bestimmung der Schrittgröße aus den Rohdaten bedarf je nach verwandter Analyse einer gewissen Anzahl an Ereignissen oder bestimmten Kriterien zur Definition eines solchen Ereignisses, bei sorgfältigem Umgang mit diesen Anforderungen sollten aber für alle vorgestellten Methoden eine Verfälschung der Schrittgröße ausgeschlossen werden können (siehe Diskussion Kapitel 2). Durch die je nach Art der Messung und den dabei verwandten Molekülen unterschiedlichen Randbedingungen ist zusätzlich ein verändernder Einfluß auf die Mechanik des einzelnen Moleküls als Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse denkbar. Die bisher bekannten Messungen variieren in den folgenden 3 Punkten:

- (1) Je nachdem, welche Fragmente des Myosins untersucht wurde, handelt es sich um ein- oder zweiköpfige Moleküle (vgl. Abb. 3.2.-3.7.).
- (2) Im *in vitro assay* wurden die einzelnen Moleküle auf unterschiedliche Weise an das (künstliche) Substrat gebunden (vgl. Abb. 3.8.-3.10.).
- (3) Die willkürliche Orientierung des Myosinkopfes relativ zum Aktinfilament im Einzelmolekül assay entspricht nicht der im Muskel vorgegebenen festen Anordnung (vgl. Abb. 3.11.-3.16.).

Diese unterschiedlichen Bedingungen wurden systematisch variiert, um zu klären, inwiefern die verschiedenen Messungen miteinander vergleichbar sind, und um letztendlich die tatsächliche Schrittgröße zu bestimmen.

(1) Anzahl der Myosinköpfe

Myosin II ist, wie auch andere Moleküle aus der Myosinfamilie, ein zweiköpfiges Molekül. Die funktionelle Bedeutung des zweiten Kopfes bei der Wechselwirkung mit einem einzelnen Aktinfilament ist bisher ungeklärt.

So kann auch S1, ein einköpfiges Myosinfragment (siehe Abb. 3.1.), bestehend aus Motordomäne (*heavy chain*) und den beiden leichten Ketten (*essential light chain*, *regulatory light chain*), im *in vitro* Motilitätsassay Aktinfilamente bewegen (Toyoshima *et al.*, 1987) und Kräfte erzeugen (Kishino *et al.*, 1988; Molloy *et al.*, 1995). Um die Rolle des zweiten Kopfes zu untersuchen, wurden die Ergebnisse für einköpfiges Myosin bzw. Myosinfragmente mit dem jeweiligen doppelköpfigen Pendant (S1 zu HMM, einköpfiges Myosin zu zweiköpfigem) in verschiedenen *in vitro* Experimenten und kinetischen Untersuchungen verglichen. Die bisher publizierten Resultate sind dabei nicht konsistent. Beispielsweise wurde im Gleitassay (Ito *et al.*, 1999) eine doppelt so große Gleitgeschwindigkeit und in Einzelmolekülmessungen mit der Doppellaserfalle (Tyska *et al.*, 1999; Molloy *et al.*, 1995 (allerdings revidiert in späteren Publikationen: Veigel *et al.*, 1998; Veigel *et al.*, 1999)) eine Verdoppelung der Schrittgröße für zweiköpfiges Myosin (~10 nm) im direkten Vergleich mit Einköpfigem (5-6 nm) beobachtet. Auf der anderen Seite existieren sowohl in der *in vitro* Motilität (Toyoshima *et al.*, 1987; Harada *et al.*, 1987; Iwane *et al.*, 1997; Miyata *et al.*, 1994) als auch bei Messungen mit der Doppellaserfalle (Mehta *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1998) Ergebnisse, die gleiche Gleitgeschwindigkeiten, Schrittgrößen und Kräfte (Kishino *et al.*, 1988) unabhängig von der Anzahl der Köpfe umfassen.

Oftmals wird diese Diskrepanz in den Ergebnissen dem Umstand zugeschrieben, daß mit unterschiedlichen Myosinen bzw. Myosinfragmenten gemessen wurde. Neben den aus Verdau von Vollängenmyosin gewonnenen Fragmenten S1 und HMM (Molloy *et al.*, 1995; Mehta *et al.*, 1997) wurde ein- und zweiköpfiges Myosin (Tyska *et al.* 1999; Tanaka *et al.*, 1998) und genetisch erzeugte Myosinfragmente verglichen. Tabelle 3.1. zeigt eine Übersicht der verwandten Myosine und der jeweiligen Ergebnisse.

Um die tatsächliche Schrittgröße und eine eventuelle Abhängigkeit von der Anzahl der Myosinköpfe zu ermitteln, wurden im Rahmen dieser Arbeit drei verschiedene Kombinationen aus einköpfigen Myosin(fragment) und dem entsprechenden zweiköpfigen Partner verglichen: Neben den Myosinfragmenten S1 und HMM (beide aus enzymatischem Verdau) wurde (durch enzymatischen Verdau geschnittenes) einköpfiges, (natives) zweiköpfiges Myosin und klonierte Konstrukte aus *Dictyostelium discoideum* mit einem („M765-2R“, entspricht

S1 mit künstlicher Halsregion) und zwei („HMM-2R“, mit 2 künstlichen Halsregionen) Köpfen auf ihr mechanisches Verhalten im Einzelmolekül assay untersucht.

Motility Assay	Molekül	Gleitgeschw.
Toyoshima <i>et al.</i> , 1987	S1 (Papain-Mg, Papain-EDTA, Chymotryptic)	1 – 2 $\mu\text{m s}^{-1}$
	HMM	7,5 $\mu\text{m s}^{-1}$
	Myosin (Filament/löslich)	3 – 4 $\mu\text{m s}^{-1}$
	einköpfiges HMM	> 7,5 $\mu\text{m s}^{-1}$
Ito <i>et al.</i> , 1999	Myosin Wildtyp (aus <i>Dictyostelium</i>)	3,45 $\mu\text{m s}^{-1}$
	einköpfiges Myosin (aus <i>Dictyostelium</i>)	1,83 $\mu\text{m s}^{-1}$
Iwane	S1 (über Biotin-Avidin System angebunden)	6,8 $\mu\text{m s}^{-1}$
	Natives Myosin (Huhn)	6,5 $\mu\text{m s}^{-1}$
Anson <i>et al.</i> , 1996	Dictyostelium S1	124 nm s^{-1}
Uyeda <i>et al.</i> , 1996	Myosin Wildtyp (aus <i>Dictyostelium</i>)	3 $\mu\text{m s}^{-1}$
Einzelmolekülmessung		Schrittgröße
Veigel <i>et al.</i> , 1999	S1 (aus Papainverdau)	5.5 nm
Kitamura <i>et al.</i> , 1999	S1 (aus Papainverdau)	13 nm*
Tyska <i>et al.</i> , 1998	Natives zweiköpfiges Myosin	10 nm
	einköpfiges Myosin	5 - 6 nm
Veigel <i>et al.</i> , 1998	HMM (aus Papainverdau)	5.04 nm
Tanaka <i>et al.</i> , 1998	Natives zweiköpfiges Myosin in Rod	0 - 10 nm**
	einköpfiges Myosin in Rod	0 - 10 nm**
Mehta <i>et al.</i> , 1997	HMM (aus Papainverdau)	4 - 5 nm
Guilford <i>et al.</i> , 1997	Natives zweiköpfiges Myosin	10.6 nm
Ishijima <i>et al.</i> , 1996	Natives zweiköpfiges Myosin in Rod	23 nm
Finer <i>et al.</i> , 1994	HMM (aus Papainverdau)	11 nm

Tabelle 3.1.: Übersicht über bisher veröffentlichte Gleitgeschwindigkeiten (aus *motility assays*) und Schrittgrößen (aus Einzelmolekülmessungen) von nativem Myosin II, Fragmenten (S1 und HMM) von Myosin II und in *Dictyostelium discoideum* exprimierte Myosine. Die Ergebnisse zeigen große Unterschiede in den erhaltenen Ergebnissen. Inwieweit diese Ergebnisse vergleichbar sind, obwohl an verschiedenen Myosinformen gemessen wurde, soll in diesem Kapitel untersucht werden.

* im Mittel 13 nm, aber im Einzelnen $x \cdot 5,5 \text{ nm}$, $x = 1-5$

** in Abhängigkeit von der Orientierung zwischen Myosin- und Aktinfilament

(2) Die Anbindung des Moleküls ans Substrat

Der Einfluß der Art der Adsorption einzelner Motormoleküle ist bislang umstritten. Vor allem in der *in vitro* Motilität hat sich gezeigt, daß die Gleitgeschwindigkeit von Aktinfilamenten auf einköpfigen Myosinfragmenten maßgeblich von deren Ankopplung ans Substrat beeinflußt wird (Toyoshima *et al.*, 1987; Iwane *et al.*, 1997; Anson *et al.*, 1996), wobei der Mechanismus einer die Gleitgeschwindigkeit verändernden Anbindung nicht geklärt worden ist (vgl. Diskussion). Diese Ergebnisse aus der *in vitro* Motilität werden für Messungen an Einzelmolekülen häufig herangezogen, um die beobachteten Unterschiede in den gemessenen Schrittgrößen zu begründen. Um einen eventuellen Einfluß auf die mechanische Funktionalität einzelner Myosinmotoren zu ermitteln, wurde in dieser Arbeit direkt die Schrittgröße von S1 bzw. einköpfigen Myosin systematisch unter verschiedenen Bedingungen gemessen: Zum Einen wurde die Schrittgröße von S1 Molekülen (aus enzymatischem Verdau), die direkt auf Nitrocellulose adsorbiert waren (und im Gleitassay eine verminderte Geschwindigkeit zeigen), untersucht. Außerdem wurde mit einem einköpfigen Myosinkonstrukt aus *Dictyostelium discoideum* gemessen (M864, entspricht Kaninchen S1, siehe auch Kapitel 5), welches über ein *HisTag* System spezifisch (mit Antikörper) ans Substrat gebunden war. Mit einköpfigen Myosin, inkorporiert in LMM Cofilamente, wurde schließlich eine der physiologischen Situation im Muskel am ähnlichsten Bedingung geschaffen, um zu untersuchen, ob diese die Fähigkeit des Moleküls zur Generierung von Bewegung begünstigt.

(3) Orientierung des Myosinkopfes relativ zum Aktinfilament

Bei Messungen im Einzelmolekül assay sind die einzelnen Motormoleküle relativ zum Aktinfilament willkürlich ausgerichtet, während Myosin im Muskel durch die Einbindung ins dicke Filament eine feste Orientierung hat. Da für die Bestimmung der Schrittdistanz immer einige hundert einzelne Wechselwirkungen zusammen analysiert werden, besteht theoretisch auch bei einer sehr geringen Motordichte die Möglichkeit, daß innerhalb der typischen Zeitdauer einer solchen Messung durch Diffusion oder Drift des Aktinfilamentes nicht immer von ein und demselben Motor aufgezeichnet wird, sondern die Wechselwirkung mehrerer einzelner Moleküle hintereinander gemessen werden. Die einzelnen Moleküle haben relativ zum

Aktinfilament eine unterschiedliche Orientierung, falls diese einen Einfluß auf die jeweilige Schrittgröße hat, wäre die resultierende Schrittgröße dann der durchschnittliche Wert verschiedener Einzelergebnisse.

Eine solche Winkelabhängigkeit der Schrittgröße wurde von der Gruppe um Toshio Yanagida durch ein experimentelles Ergebnis unterstützt (Tanaka *et al.*, 1998). Dabei wurde die Schrittdistanz von einköpfigen Myosin (über die Auslenkung der Perle in der Doppellaserfalle) gemessen, das in fluoreszenzmarkierten Myosinrods inkorporiert ist. Damit kann der Winkel zwischen Aktinfilament (ebenfalls fluoreszenzmarkiert) und Myosinkopf bestimmt werden. Bei (fast) paralleler Anordnung von Myosinrod und Aktinfilament wurden Auslenkungen der Perle von über 10 nm beobachtet, bei einem Winkel von 60° dagegen sank dieser Wert auf ca. 3 nm. Ein Winkel $>90^\circ$ hatte negative Auslenkungen zur Folge, die den gleichen Betrag und eine entsprechende Winkelabhängigkeit wie die Werte bei Winkeln $<90^\circ$ aufwiesen. Während in der zitierten Veröffentlichung für Winkel zwischen 60° und 150° überhaupt keine Wechselwirkungen gemessen werden konnten, gibt es inzwischen zusätzliche Daten (T. Yanagida, Vortrag Biophysical Meeting 2000, New Orleans), die auch Wechselwirkungen bei senkrechter Orientierung beinhalten. Die Schrittgröße ist dabei ~ 0 nm, so daß die Daten einer linearen Verteilung folgen (mit Maximalwerten bei 0° und Minimum (negative Werte) bei 180°).

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu eigenen Beobachtungen, wonach das resultierende Histogramm unterschiedlich vieler Wechselwirkungen (und damit die Schrittgröße) immer um eine ähnliche Distanz verschoben ist, auch wenn kurze Abschnitte (je 10 s) einzeln ausgewertet wurden. Wenn also während einer Messung durch eine langsame Driftbewegung des Aktinfilamentes zu anderen Molekülen Wechselwirkungen von unterschiedlichen Motoren mit immer anderer Orientierung zum Aktinfilament und damit verbunden unterschiedlicher Schrittgröße aufgezeichnet werden, müßte sich dies in einer abschnittswisen Analyse bemerkbar machen, auch wenn in der Gesamtanalyse über einen langen Zeitraum hinweg ein gemittelter Wert ermittelt wird. Außerdem stehen die Ergebnisse einer winkelabhängigen Schrittgröße im Widerspruch zu der hohen Flexibilität des Myosinmoleküls (Nishizaka *et al.*, 2000).

3.2. Ergebnisse: (1) Die Schrittgröße eines Myosinmoleküls hängt nicht von der Anzahl der Myosinköpfe ab

(a) S1 und HMM

Die Myosinfragmente S1 und HMM werden aus Vollängenmyosin (Kaninchen, vgl. Skizze/Abb. 3.1.) über einen Papainverdau gewonnen. Während S1 nur aus einem Myosinkopf und den beiden leichten Ketten besteht, umfaßt das Molekül HMM 2 Köpfe mit jeweils beiden leichten Ketten. Die Moleküle

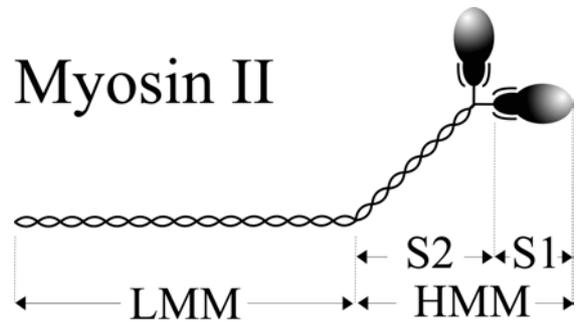


Abb. 3.1.: Skizze des Moleküls Myosin II und seiner Fragmente S1 und HMM. S1 besteht aus einem Myosinkopf mit den beiden leichten Ketten, HMM besteht aus 2 Köpfen, die über eine gewundene Region (S2) miteinander verbunden sind.

wurden in einer geringen Konzentration (ca. 0,1 $\mu\text{g/ml}$) direkt auf die mit Nitrocellulose bedeckte Glasoberfläche bzw. Silikaperlen adsorbiert und ihre Wechselwirkung mit einem einzelnen Aktinfilament über mehrere Minuten lang registriert. Bei jeder Wechselwirkung eines S1- oder HMM-Moleküls wird die Varianz auf 5 – 10 nm^2 reduziert (vgl. Kapitel 2).

Analysiert man eine Reihe solcher Wechselwirkungen mit der in Kapitel 2 beschriebenen

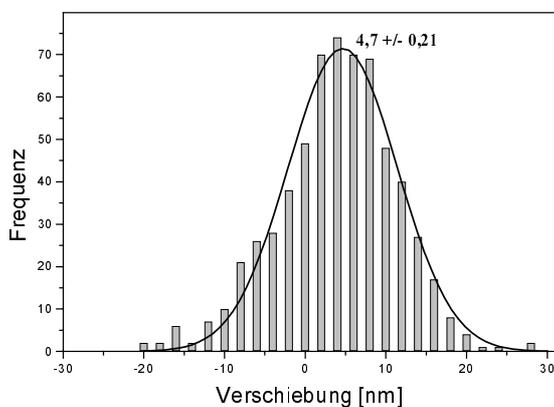


Abb. 3.2.: Verteilung aus 622 S1-Wechselwirkungen, gemessen an 2 Filamenten.

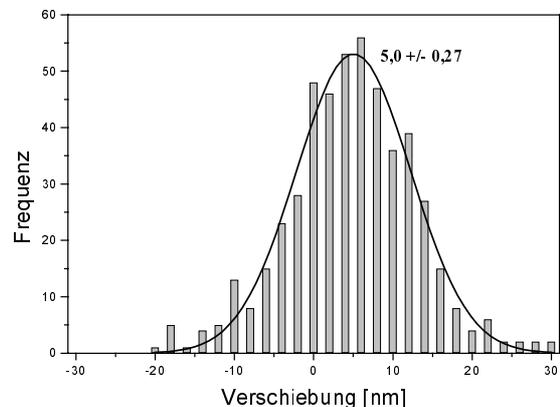


Abb. 3.3.: Verteilung aus 496 HMM-Wechselwirkungen, gemessen an 2 Filamenten.

nen Histogrammmethode mit einem 10 ms Analysefenster, so erhält man aus der Verschiebung der resultierenden Verteilung für S1 eine Schrittgröße von 4,7 nm, die nur unwesentlich kleiner als die für HMM (5,0 nm) ist (Abb. 3.2. und 3.3.). Vergleicht man die beiden Verteilungen mit einem t-Test, dann sind die beiden Mittelwerte innerhalb des 95% Konfidenzintervalls nicht statistisch signifikant unterschiedlich ($t = -1,84$, $p = 0,07$). Für die beiden

Myosinfragmente erhält man damit eine annähernd identische Schrittgröße, unabhängig von der Anzahl der Köpfe.

(b) Ein- und zweiköpfiges Myosin im LMM Cofilament

Um eine der physiologischen Situation im Muskel ähnliche Umgebung einzuführen, wurden Cofilamente aus LMM *in vitro* aggregiert, in die natives Myosin und „geschnittenes“ einköpfiges Myosin inkorporiert waren. Diese „dicken Filamente“ entstanden durch Dialyse einer Lösung mit LMM (teilweise fluoreszenzmarkiert) gegen eine Lösung mit wesentlich geringerer KCl-Konzentration über Nacht (siehe Methoden). Der Aggregationsschritt ist im (Anhang Methoden zu Kapitel 3) ausführlich dargestellt. Die Myosinkonzentration wurde relativ gering gewählt (molares Verhältnis 1:500 - 1:2000), um gewährleisten zu können, daß es sich tatsächlich um die Wechselwirkung eines einzelnen Myosinkopfes mit dem Aktinfilament handelte. Die LMM Cofilamente wurden direkt auf Glas adsorbiert, da sich vergleichsweise mehr Myosinfilamente auf Glas als auf einer vorher mit Nitrocellulose beschichteten

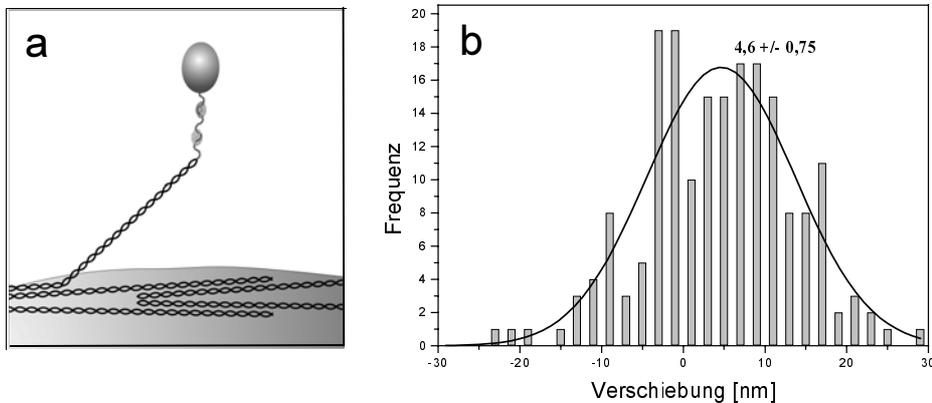


Abb. 3.4.: (a) Skizze des einköpfigen Myosins, eingebettet in dickes Filament, und (b) resultierende Verteilung von 190 IHD (IHD = 1 *head*) Wechselwirkungen, 1 Filament .

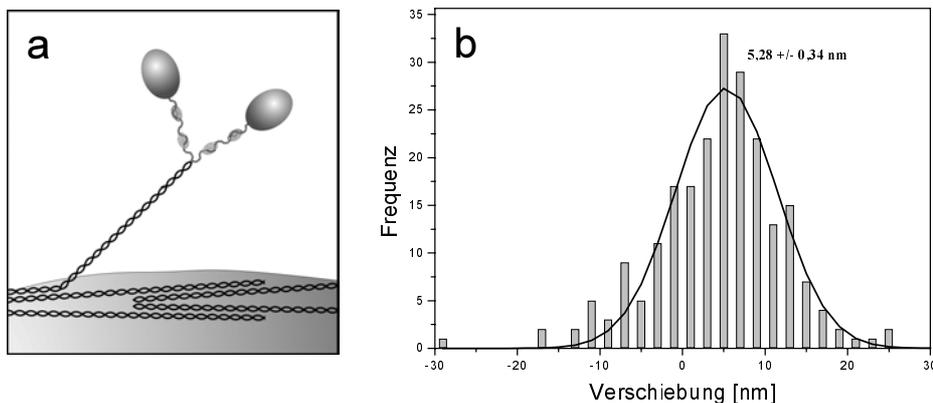


Abb. 3.5.: (a) Skizze des doppelköpfigen Myosins und (b) resultierende Verteilung von 223 Wechselwirkungen des 2HD Myosins, 1 Filament.

Oberfläche fanden (siehe auch Kapitel 3.2. zum Einfluß der Anbindung an das Substrat). Für diese Messungen wurden vorher in destilliertem Wasser verdünnte Silicaperlen ($d = 2 \mu\text{m}$) auf das Deckglas aufgebracht, um als „Podest“ eine Wechselwirkung des Myosins mit dem in der Lösung aufgespannten Aktinfilament zu ermöglichen (siehe Kapitel 2 zum Aufbau). Vor der Messung konnte über Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert werden, ob sich ein Cofilament über die Perle gelegt hatte, da das polymerisierte LMM zu einem Teil mit Farbstoff markiert war. Die beobachteten Wechselwirkungen entsprachen denen aus Messungen mit Myosinfragmenten, d.h. durch die Anbindung des Myosinkopfes ans Aktinfilament kam es zu einer Reduktion des Rauschens des Sensors. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 3.4. (einköpfiges Myosin) und 3.5. (zweiköpfiges Myosin) dargestellt. Für das einköpfige Myosin beträgt die gemessene Schrittgröße $4,6 \pm 0,75 \text{ nm}$ und ist damit dem Ergebnis für zweiköpfiges Myosin ($5,3 \pm 0,34 \text{ nm}$) sehr ähnlich. Vergleicht man die beiden Verteilungen mit einem t-Test, so zeigt sich, daß innerhalb des 95% Konfidenzintervalls die Mittelwerte nicht statistisch signifikant unterschiedlich sind ($t = 0,12, p = 0,90$). Auch hier zeigt sich also, daß die Anzahl der Köpfe keinen nennenswerten Einfluß auf die gemessene Schrittgröße hat. Die gemessene Distanz für ein Einzelmolekül beträgt wiederum wie bei den Myosinfragmenten $\sim 5 \text{ nm}$.

(a) M765-2R und HMM-2R

Um ausschließen zu können, daß es sich bei den Messungen an den Myosinfragmenten bzw. an „geschnittenem“ einköpfigen Myosin um Artefakte durch unvollständigen Verdau oder ähnliches handeln könnte, wurde auch an gentechnisch erzeugten ein- und zweiköpfigen Myosinkonstrukten gemessen. Zum einen handelte es sich um Myosin II aus *Dictyostelium discoideum*, das auf die Aminosäure 765 verkürzt (*truncated*) und mit einem künstlichen Hebelarm aus 2 α -Aktininrepeats (siehe Kapitel 5. zu den Konstrukten mit künstlichem Hebelarm) versehen worden war, und zum anderen um ein entsprechendes zweiköpfiges Konstrukt (HMM-2R, ebenfalls auf (beide) 765 Aminosäure(n) gekürzt und die „leichte Ketten-Region“ durch 2 α -Aktininrepeats ersetzt). Zur Veranschaulichung sind diese beiden Konstrukte in Abbildung 3.6.(a) (M765-2R) und 3.7.(a) (HMM-2R) skizziert.

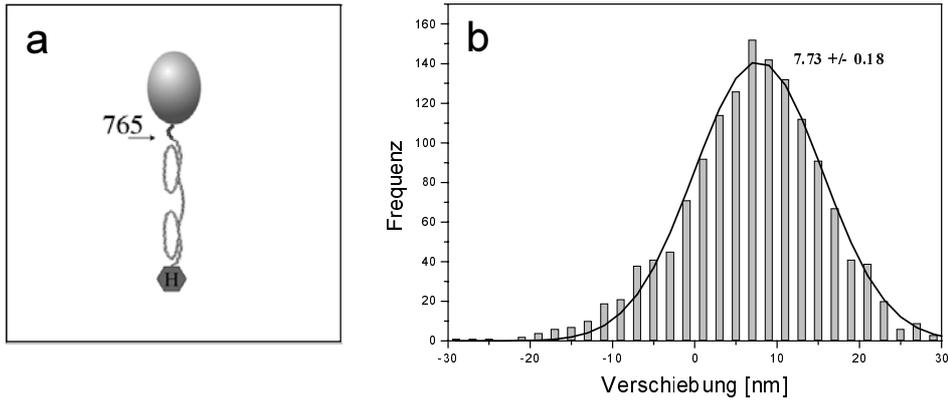


Abb. 3.6.: (a) Skizze des Konstrukts M765-2R (enthält 2 *Actininrepeats*) und (b) resultierende Verteilung aus 1413 M765-2R-Wechselwirkungen, 4 Filamente gepoolt.

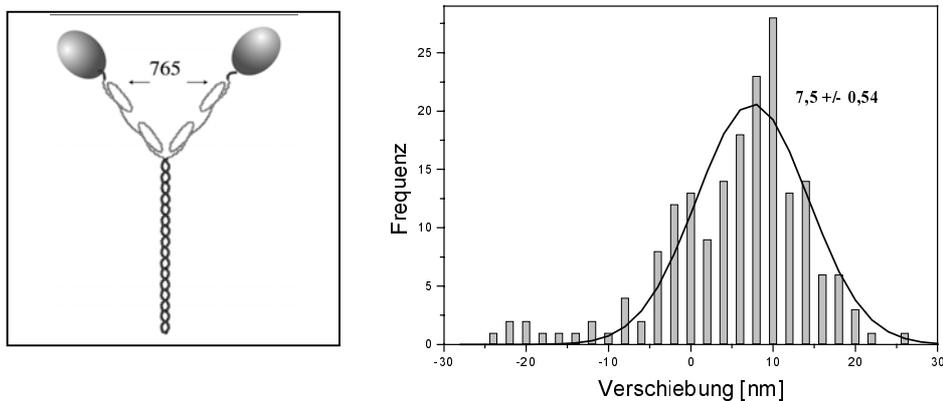


Abb. 3.7.: (a) Skizze des Konstrukts HMM-2R (je 2 *Actininrepeats* an den Aminosäuren 765) und (b) resultierende Verteilung aus 186 HMM-2R-Wechselwirkungen, 1 Filament.

Die Ergebnisse der beiden Messungen für M765-2R und HMM-2R (beide auf Nitrocellulose adsorbiert) sind in den Abbildungen 3.6.(b) und 3.7.(b) dargestellt. Beide Konstrukte generieren Schrittgrößen von 7-8 nm (HMM-2R: $7,50 \pm 0,54$ nm, M765-2R: $7,61 \pm 0,19$ nm), unabhängig davon, ob es sich um ein- oder zweiköpfige Myosinkonstrukte handelte. Die im Vergleich zu Myosin II größere Schrittgröße rührt von dem längeren Hebelarm der Konstrukte mit 2 α -Aktininrepeats und ist konsistent mit der „Lever arm Hypothese“ (vgl. Kapitel 5). Damit zeigt sich, daß diese gentechnisch erzeugten Myosinkonstrukte mechanisch funktionsfähige Motoren darstellen und die Schrittgröße auch in diesem Fall unabhängig von der Anzahl der Köpfe ist.

(2) Die Anbindung des Moleküls an Substrat hat keinen Einfluß auf die Schrittgröße

Um die Anbindung des Moleküls zu untersuchen, wurden Messungen ausschließlich an einköpfigem Myosin und Myosinkonstrukten durchgeführt, da Unterschiede in der Gleitgeschwindigkeit je nach Ankopplung ans Substrat vor allem für das einköpfige Myosinfragment S1 berichtet worden sind (vgl. Tabelle 2). Hier wurde S1 zum einen direkt auf die mit Nitrocellulose beschichtete Oberfläche aufgebracht. Abbildung 3.8.(a) skizziert das Myosinkonstrukt und seine Anbringung aufs Substrat. Das Ergebnis aus der Schrittmessung ist daneben abgebildet und beträgt knapp 5 nm.

Bei der gentechnischen Herstellung von Myosinen mittels des *Dictyostelium discoideum* Systems (siehe Methoden) besteht die Möglichkeit, über Histidine C-terminal einen HisTag einzufügen. Dieser Tag erleichtert die Aufreinigung und kann dazu verwendet werden, mit dem entsprechenden Antikörper auf dem Substrat das einzelne Myosinmolekül spezifisch zu adsorbieren (siehe Abb. 3.9.(a)). Mit M864 wurde ein Myosinkonstrukt ausgewählt, das von seiner Größe und mit den beiden leichten Ketten S1 entspricht. Auch hier ergibt sich bei der Messung der Schrittdistanz, die ein solches Molekül zurücklegt, ein Wert von ~ 5 nm (siehe Abb. 3.9.(b)).

Um eine der Situation im Muskel entsprechende Umgebung zu schaffen, wurde einköpfiges Myosin (zu geringem Anteil) in künstlich aggregierte Filamente aus LMM eingebettet. Diese wurden direkt auf das Substrat adsorbiert (vgl. Abb. 3.4.(a)) und in direkte Nähe des aufgespannten Aktinfilaments gebracht. Die Verteilung der daraus resultierenden Wechselwirkungen ist in Abb. 3.4.(b) gezeigt. Sie weist wiederum eine Verschiebung von knapp 5 nm auf.

In allen 3 Fällen erhält man somit eine Schrittgröße von jeweils ~5 nm. Vergleicht man die resultierenden Verteilungen mittels ANOVA, so ist keiner der Mittelwerte statistisch signifikant unterschiedlich zu den anderen (0,05-level, $F = 0,17$, $p = 0,84$). Bei der Wechselwirkung von einzelnen Myosinmotoren mit einem Aktinfilament hat die Ankopplung des Motors folglich keinen Einfluß auf die Schrittgröße.

(3) Die Orientierung des Myosinkopfes relativ zum Aktinfilament beeinflusst die Schrittgröße nicht

Um eine mögliche Orientierungsabhängigkeit der Schrittgröße untersuchen zu können, wurden Messungen mit fluoreszenzmarkierten LMM Cofilamenten für unterschiedliche Winkel zwischen Myosinkopf und Aktinfilament durchgeführt. Je nach Winkel wurde dabei Myosin in einem molaren Verhältnis von 1 : 500 bis 1 : 2000 zugegeben, um gewährleisten zu können, daß es sich tatsächlich nur um Wechselwirkungen eines einzelnen Myosinkopfes mit

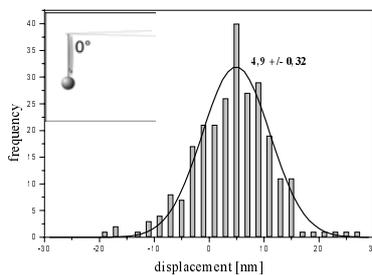


Abb. 3.10.: Verteilung von 254 1HD-Wechselwirkungen, 1 Filament, eingeschloss. Winkel 0° , Kasten: Skizze der Anordnung

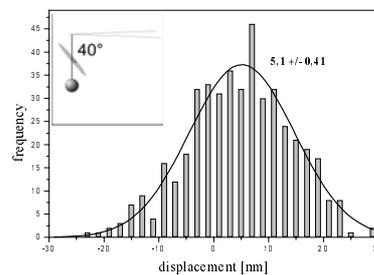


Abb. 3.11.: Verteilung von 445 1HD-Wechselwirkungen, 1 Filament, eingeschloss. Winkel 40° , Kasten: Skizze der Anordnung

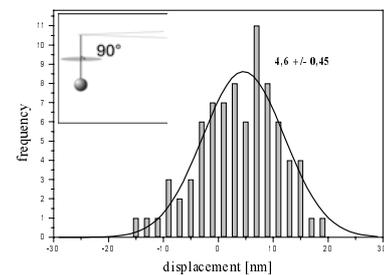


Abb. 3.12.: Verteilung von 80 1HD-Wechselwirkungen, 1 Filament, eingeschloss. Winkel 90° , Kasten: Skizze der Anordnung

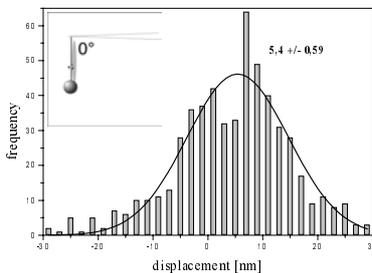


Abb. 3.13.: Verteilung von 553 2HD-Wechselwirkungen, 1 Filament, eingeschloss. Winkel 0° , Kasten: Skizze der Anordnung

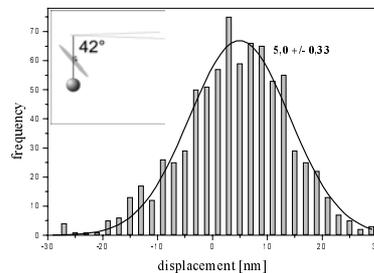


Abb. 3.14.: Verteilung von 777 2HD-Wechselwirkungen, 1 Filament, eingeschloss. Winkel 42° , Kasten: Skizze der Anordnung

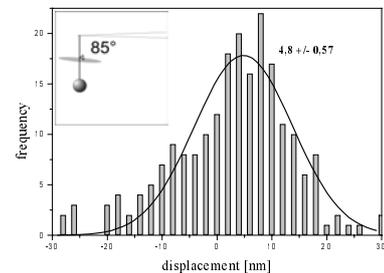


Abb. 3.15.: Verteilung von 212 2HD-Wechselwirkungen, 1 Filament, eingeschloss. Winkel 85° , Kasten: Skizze der Anordnung

dem Aktinfilament handelte. Der Winkel zwischen LMM Cofilament und Aktinfilament wurde vor jeder Messung im Fluoreszenzbild bestimmt, dabei konnte auch kontrolliert werden, daß es sich tatsächlich nur um ein einzelnes Cofilament handelte. Um den tatsächlichen Winkel zwischen Cofilament und Aktin bestimmen zu können, mußte neben dem gemessenen Winkel auch bekannt sein, an welcher Stelle des Cofilaments relativ zu dessen Zentrum gemessen wurde. Da die polymerisierten Filamente häufig eine Länge von $> 10 \mu\text{m}$ aufwiesen und es schwer zu sagen war, an welcher Position relativ zur *bare zone* des dicken Filamentes

(Zentrum) und damit in welche Richtung relativ zum Aktinfilament gemessen wurde, wurde lediglich der eingeschlossene Winkel bestimmt, so daß der maximale Winkel 90° betrug.

Unabhängig vom eingeschlossenen Winkel, also auch bei senkrechter Ausrichtung, konnten Wechselwirkungen registriert werden, wobei sich deren Häufigkeit nur geringfügig von denen bei (fast) paralleler Ausrichtung unterschied. Die mittlere Anzahl der Wechselwirkungen lag bei paralleler Ausrichtung bei $0,5 - 4 \text{ s}^{-1}$, bei einem Zwischenwinkel $> 45^\circ$ betrug dieser Wert $0,5 - 1 \text{ s}^{-1}$. Wenn man berücksichtigt, daß ein Teil der Messungen einen tatsächlichen Winkel zwischen 90° und 180° aufweisen kann (s.o.), so unterscheidet sich die Frequenz der Wechselwirkungen maximal um einen Faktor 10.

Abbildungen 3.10. - 3.12. zeigen exemplarische Beispiele bei 3 Winkeln der Messungen mit einköpfigen Myosin, während in Abb. 3.13. - 3.15. die entsprechenden Schrittdistanzen nativen Myosins dargestellt sind. Alle Ergebnisse aus insgesamt 4 Messungen mit einköpfigen Myosin und 12 Messungen mit zweiköpfigem sind dann in Abbildung 3.16. zusammengefaßt. Die Messungen für jeden Winkel wurden jeweils an einem einzigen Aktinfilament gemessen.

Für das einköpfige Myosin wurde unabhängig vom Winkel eine Schrittgröße von $\sim 5 \text{ nm}$ gemessen, wobei der bei senkrechter Orientierung erhaltene Wert mit $4,6 \pm 0,45 \text{ nm}$ etwas geringer ausfällt als bei (nahezu) paralleler Orientierung. Wie schon durch die Ergebnisse aus Kapitel 3.1. zu erwarten, weist auch das doppelköpfige Myosin die gleiche Schritt-

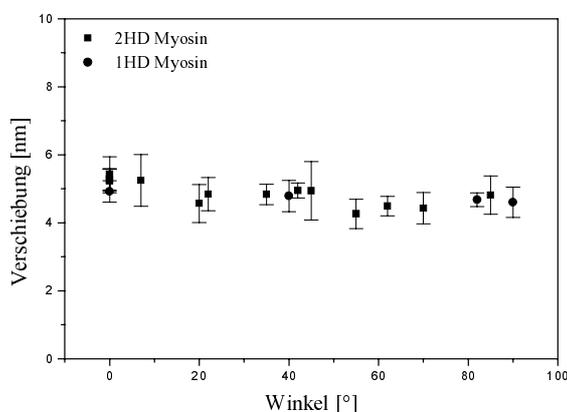


Abb. 3.16.: Zusammenfassung aller an einköpfigen („1HD“) und zweiköpfigen („2HD“) Myosin gemessenen Verschiebungen in Abhängigkeit des Winkels zwischen Aktin- und Cofilament

größe von $\sim 5 \text{ nm}$ auf. Auch hier ergibt sich bei einem vergrößerten Winkel zwischen dickem Filament und Aktin keine wesentliche Änderung in der Schrittgröße. Bei paralleler Ausrichtung beträgt diese $5,4 \pm 0,5 \text{ nm}$, mit einer Zunahme des Winkels verringert sich die Schrittgröße wieder geringfügig, bei fast senkrechter Ausrichtung (85° , Abb. 3.16.) beträgt sie $4,8 \pm 0,57 \text{ nm}$. Diese leichte Abnahme der

Schrittgröße zeigt sich in der Zusammenfassung aller Ergebnisse in Abbildung 3.15.: Eine lineare Regression der Daten ergibt für einköpfiges Myosin eine Steigung von $-0,0031$ bzw. für zweiköpfiges Myosin von $-0,0101$, diese Steigung ist (mit $P < 0,001$) statistisch signifikant.

3.3. Diskussion der Ergebnisse

(1) Die Schrittgröße eines Myosinmoleküls hängt nicht von der Anzahl der Myosinköpfe ab. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der funktionelle Einfluß des zweiten Myosinkopfes untersucht, indem die Schrittgrößen verschiedener Myosine (natives Myosin/ geschnittenes einköpfiges Myosin), Myosinkonstrukte (HMM-2R/M765-2R) und Myosinfragmente (HMM/S1) mit jeweils einem und zwei Köpfen systematisch verglichen wurden. Die Ergebnisse aus den Messungen mit S1 und HMM bestätigen die von Molloy und Mitarbeitern inzwischen veröffentlichten Schrittgrößen (Veigel *et al.*, 1998; Veigel *et al.*, 1999), die ebenfalls Werte um 5 nm als Schrittlänge für beide Myosinfragmente gefunden haben.

Dagegen bleibt die Diskrepanz zu den Beobachtungen aus dem Labor von David Warshaw (Tyska *et al.*, 1999) bestehen, die für Skelettmuskel eine Verdoppelung der Schrittgröße bei zweiköpfigem Myosin verglichen mit der von Einköpfigem gefunden haben. Auch bei der Verwendung von nativem Myosin innerhalb eines LMM Myosin Cofilamentes und damit in einer der Situation im Muskel ähnlichen Umgebung, wurden in dieser Arbeit keine Schrittgrößen > 6 nm gemessen. Stattdessen weist einköpfiges Myosin genau wie zweiköpfiges eine Schrittgröße von ~ 5 nm auf.

An gentechnisch erzeugten ein- und zweiköpfigen Myosinkonstrukten wurde erstmals vergleichend die Schrittgröße bestimmt. Das Ergebnis ist eine ebenfalls praktisch identische Schrittdistanz für das ein- und zweiköpfige Konstrukt und damit mit den beiden anderen Messungen an Myosin und dessen Fragmenten konsistent. In allen Fällen wurde für das einköpfige Myosin, Konstrukt oder Fragment die gleiche Schrittgröße wie für das doppelköpfige Pendant gemessen. Durch die Kombination dieser vergleichenden Messungen kann ausgeschlossen werden, daß der für die Herstellung der Myosinfragmente erforderliche enzymatische Verdau oder eine den zweiten Kopf immobilisierende Adsorption von HMM-Konstruk-

ten die Bestimmung der Schrittgröße verfälscht hat. Mit den im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Resultaten ist ein eventueller funktioneller Einfluß des zweiten Kopfes auf die Schrittgröße in Einzelmolekülmessungen damit sehr unwahrscheinlich.

Diese Beobachtung steht für den Skelettmuskel im Einklang mit den Resultaten aus biochemischen Studien (Greene und Eisenberg, 1980; Greene 1981) und FRET Spektroskopie (Iwane *et al.*, 1997), die in Anwesenheit eines Nukleotids die Anbindung von höchstens einem Myosinkopf an das Aktinfilament schlußfolgern. Conibear und Geeves (1998) schlußfolgerten aus ihren kinetischen Untersuchungen an S1 und HMM, daß eine gleichzeitige Anbindung des zweiten Kopfes an dasselbe Aktinfilament in Anwesenheit eines Nukleotids nicht möglich ist, weil der zweite Kopf nicht von schwach gebunden zu stark gebunden übergehen wird, sondern abdissoziiert. Dies wird ebenfalls bestätigt durch Elektronenmikroskopie an HMM im *in vitro* Gleitassay (Katayama 1998). Keines der untersuchten HMM Moleküle war in Anwesenheit von ATP mit beiden Köpfen gleichzeitig an ein Aktinfilament gebunden, stattdessen befand sich der zweite (ungebundene) Kopf stets vom Filament möglichst weit abgewandt, so daß eine Mitwirkung am *power stroke* als unwahrscheinlich angesehen werden kann.

Da der zweite Kopf offensichtlich keine Rolle bei der Schrittgröße in Einzelmolekülmessungen spielt, ist dessen funktionelle Bedeutung unklar. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß im Muskel eine etwas veränderte Situation zu der in Einzelmolekülmessungen herrscht. Im Sarkomer ist es durchaus möglich, daß der zweite Kopf gleichzeitig an ein weiteres Aktinfilament binden kann (deren Abstand beträgt ~ 20 nm (Bagshaw, 1993), der Winkel zwischen den beiden Köpfen ist dann 60°) und dabei ebenfalls eine kraftgenerierende Konformationsänderung durchführt. Zumindest im Rigor ist eine solche Bindung der beiden Köpfe an unterschiedliche Aktinfilamente („*interfilament binding*“) bereits beschrieben worden (Taylor *et al.*, 1984).

(2) Die Ankopplung des Moleküls ans Substrat hat keinen Einfluß auf die Schrittgröße

Prinzipiell gibt es mehrere, unterschiedliche Möglichkeiten der Befestigung von Myosin oder Myosinkonstrukten auf Glas. Zunächst kann der Motor direkt auf eine gereinigte

Glasfläche aufgebracht werden, diese kann aber auch mit Nitrocellulose beschichtet werden (Toyoshima *et al.*, 1987) oder silanisiert werden. Bei gentechnisch erzeugten Myosinkonstrukten kann ein Tag für Antikörper C-terminal ins Molekül eingebaut werden, der dann an vorher aufs Glas aufgebrauchte Antikörper bindet (Anson *et al.*, 1996), aber auch spezielle Antikörper gegen bestimmte Domänen des Wildtyps eignen sich zur spezifischen Anbindung (Winkelmann *et al.*, 1995). Außerdem kann solch ein kloniertes Konstrukt über ein Biotin-Streptavidinsystem nach dem gleichen Prinzip spezifisch angebunden werden. Der Vorteil dieser Art der Anbindung liegt in der höheren Wahrscheinlichkeit, daß die Motordomäne nicht auf dem Substrat klebt (und damit nicht mehr mit dem Aktinfilament wechselwirken kann). Durch die Einbettung von Voll-Längenmyosin oder einköpfigen Myosins in eine der Situation im dicken Filament ähnliche Struktur (LMM Cofilamente oder Myosinrods) sollte die Motordomäne funktionell optimal ausgerichtet sein.

Die optimale Funktionalität möglichst vieler Motoren spielt im Gleitassay eine wesentliche Rolle, da eine Beschädigung des einzelnen Moleküls durch Wechselwirkung mit dem künstlichen Substrat die Gleitgeschwindigkeit vermindert (Iwane *et al.*, 1997), so daß es nicht überrascht, daß S1 je nach Art der Anbindung unterschiedliche Gleitgeschwindigkeiten zeigt (Toyoshima *et al.*, 1987; Waller *et al.*, 1995; Iwane *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu den Beobachtungen aus der *in vitro* Motilität ist die Schrittgröße des einzelnen Moleküls nicht von der Art der Anbindung abhängig. S1 direkt auf Nitrocellulose adsorbiert, kann ebenso einen vollständigen Kraftschlag von ~5 nm generieren, wie einköpfiges Myosin, das in ein LMM Myosin Cofilament eingebettet wurde. Während bei Einzelmolekülmessungen nur von intakten Motoren aufgezeichnet werden kann (wenn der Motor nicht funktionsfähig ist, kommt es nicht zu wiederholten transienten Wechselwirkungen), wird im Gleitassay das Verhalten vieler Motoren gleichzeitig beobachtet. Dabei kann ein geringer Anteil denaturierten Proteins möglicherweise zu einer Verlangsamung der Gleitgeschwindigkeit führen, wenn nicht funktionelle Motoren gleichzeitig mit funktionellen an das Aktinfilament angreifen (Iwane *et al.*, 1997). Erhöht eine solche spezifische Anbindung (beispielsweise auch über ein Biotin-Avidin System) den Anteil funktioneller Motoren deutlich, kann sich die Gleitgeschwindigkeit im Vergleich zu einem Assay mit nichtspezifischer Anbindung in einem transienten Übergangs-

bereich der Motordichte erhöhen, ohne daß sich an den mechanischen Eigenschaften des *einzelnen* Moleküls etwas ändert.

Die Adsorption eines Myosinkonstruktes über einen HisTag Antikörper verändert die Schrittgröße nicht, damit kann ausgeschlossen werden, daß dadurch der funktionelle Hebelarm des Moleküls verlängert wird (siehe auch Kapitel 5). Der funktionelle Einfluß der Anbindung des Einzelmoleküls an ein künstliches Substrat ist hier erstmalig systematisch untersucht worden. Die Tatsache, daß die gemessene Schrittgröße praktisch unabhängig von der Art der Anbindung ist, hat zur Folge, daß die in verschiedenen Laboren gemessenen Schrittgrößen direkt verglichen werden können.

(3) Die Orientierung des Myosinkopfes relativ zum Aktinfilament beeinflusst die Schrittgröße nicht

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß weder ein- noch zweiköpfiges Myosin eine Veränderung der Schrittgröße mit einem unterschiedlichen Winkel zwischen Aktinfilament und Myosinkopf aufweist. Unabhängig von der Orientierung des Myosinkopfes beträgt die resultierende Schrittlänge immer ~5 nm. Auch hier hat die Anzahl der Myosinköpfe keinen Einfluß auf die gemessene Verschiebung (siehe (1)). Damit bestätigt sich zudem weder die Beobachtung von Tanaka *et al.* (1998), daß bei fast paralleler Ausrichtung Schrittgrößen deutlich größer 10 nm gemessen werden, noch daß bei senkrechter Orientierung überhaupt keine bzw. nur Wechselwirkungen ohne Verschiebung beobachtet werden. Das Myosinmolekül ist in der Lage, sich entsprechend der vom Aktinfilament vorgegebenen Richtung auszurichten und nach Anbindung an dasselbe einen vollständigen *power stroke* von ~ 5 nm auszuführen. Dies wird bestätigt durch Beobachtungen aus der *in vitro motility*, die ebenfalls eine große Flexibilität der Myosinköpfe demonstrieren, indem diese eingebettet in ein dickes Filament F-Aktin in beide Richtungen transportieren können (Toyoshima 1991; Sellers und Kachar, 1990), auch wenn die Gleitgeschwindigkeit nach der *bare zone* deutlich abnimmt, was eventuell einer schlechteren Koordination der um 180° gedreht eingebetteten Myosinköpfe zuzuschreiben ist. Die Analyse der Brownschen Rotationsbewegung eines kurzen Aktinfilaments, welches von einem einzelnen HMM Molekül festgehalten wurde (Nishizaka *et al.*, 2000), ergab als Ab-

schätzungen mit $(2.3 \pm 1.9) 10^{22}$ N·m/rad eine sehr geringe Torsionssteifheit. In der Myosinstruktur muß es folglich flexible Elemente geben, die eine Drehung des Kopfes ermöglichen, so daß dieser sich der vom Aktinfilament vorgegebene Ausrichtung anpassen kann. Die Verwendung spezifischer Antikörper für verschiedene Regionen des Myosinmoleküls hat ergeben, daß Myosine mit einer nicht gerichteten Anbindung ans Substrat an der S2 oder LMM Region höhere Gleitgeschwindigkeiten aufweisen als solche, bei denen die Anbindung über die 2. leichte Kette erfolgte (Winkelmann *et al.*, 1995). Vermutlich ist also die Verbindung zwischen S2 und S1 flexibel (Bagshaw, 1993) und gewährleistet so im Muskel, daß der Myosinkopf optimal zu Bindestellen der benachbarten Aktinfilamente ausgerichtet wird, so daß immer ein vollständiger Kraftschlag erfolgt, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt.

Zusammenfassung der Ergebnisse aus diesem Kapitel

Es war das Ziel dieser Untersuchung, die tatsächliche Schrittgröße von Myosin zu bestimmen bzw. zu klären, ob die unterschiedlichen biologischen Bedingungen zu einer Veränderung der bisher publizierten Ergebnisse geführt haben könnten. Die hier gewonnenen Resultate zeigen, daß die Schrittgröße vollkommen unabhängig von der Anzahl der Myosinköpfe, der Ankopplung ans Substrat und der relativen Orientierung des Myosinkopfes zum Aktinfilament ist. Damit sind die Ergebnisse aus allen bekannten Schrittgrößenmessungen direkt vergleichbar.

Mit diesen Messungen wird eindeutig belegt, daß die Schrittgröße von Myosin II ~ 5 nm beträgt. Anderslautende Ergebnisse v.a. von Warshaw und Kollegen (Guilford *et al.*, 1997; Tyska *et al.*, 1998) sind meiner Meinung nach die Folge eines Analysefehlers, da die verwandte *mean variance analysis* großer Sorgfalt bzw. einer ausreichenden Menge an Rohdaten bedarf (vgl. Kapitel 2/Diskussion). Die Ergebnisse von Tanaka *et al.*, 1998 konnten nicht bestätigt werden, besonders da diese einen Mehrschrittmechanismus beinhalten, wonach Myosin bei optimaler Orientierung (Myosinfilament und Aktinfilament parallel) pro hydrolysiertem ATP Molekül mehrere Schritte à 5,3 nm zurücklegt und damit insgesamt eine größere Verschiebung generiert. Dieser auch von Kitamura *et al.* (1999) beobachtete Mehrschritt-

mechanismus wurde in keiner der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen beobachtet und konnte ebenfalls von Molloy und Kollegen noch nie bestätigt werden.

Gleichzeitig ist damit der Funktionsmechanismus von Myosin II transparenter geworden. Neben der genauen Größe des *power strokes* hat sich gezeigt, daß die mechanischen Eigenschaften des Moleküls unabhängig davon sind, wie dieses ans Substrat angebunden ist, die Einbindung in eine im Muskel vorliegende Umgebung (dickes Filament) ist weder notwendig noch verbessert sie den Betrag der Schrittgröße. Dank (mindestens) eines flexiblen Elementes kann sich der Myosinkopf zur vom Aktinfilament vorgegebenen Richtung ausrichten und anschließend einen Schritt konstanter Länge ausführen. Meine Beobachtungen sind konsistent mit einem relativ einfachen Mechanismus, nämlich der in Kapitel 5 weiter untersuchten Hebelarm Hypothese.

4. Zwischenschritte des Querbrückenzyklus

4.1. Einleitung

Die Kontraktion von Muskel beruht auf einer zyklischen Wechselwirkung zwischen Myosin und Aktin, bei der ATP hydrolysiert wird. Lynn und Taylor entwickelten 1971 für diesen Querbrückenzyklus ein einfaches Modell, welches zur Veranschaulichung in Abbildung 4.1. skizziert ist. Demnach stellt man sich diesen Zyklus wie folgt vor: Zunächst ist der Myosinkopf im nukleotidfreien Zustand ans Aktin gebunden (Abb. 4.1.(a)). Der an das Aktinfilament angebundene Myosinkopf wird als „Querbrücke“ bezeichnet, weil damit die beiden Filamente (dünnes Aktinfilament und dickes Myosinfilament) verbunden werden. Infolge der Anbindung von ATP löst sich der Myosinkopf (Abb. 4.1.(b)) und durchläuft gekoppelt an die Hydrolyse von ATP in ADP und einen Phosphatrest eine Konformationsänderung (Abb. 4.1.(c)). Mit den gebundenen Hydrolyseprodukten bindet der Kopf wieder ans Aktinfilament (d) und erfährt nach der Dissoziation des Phosphats und von ADP eine weitere Konformationsänderung, bei der die aus der Hydrolyse resultierende Änderung der freien Energie in me-

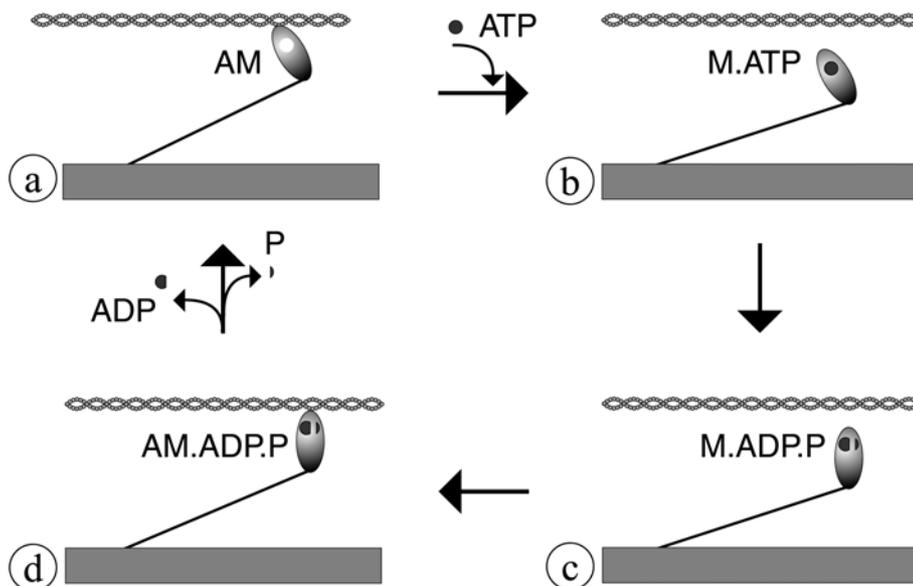


Abb. 4.1.: Querbrückenzyklus nach Lynn und Taylor (1971). Mit dem chemischen Zyklus (Bindung und Hydrolyse von ATP, Abdissoziation der Spaltprodukte ADP und P_i) sind Konformationsänderungen des Myosinkopfes korreliert: Der nukleotidfrei ans Aktin gebundene Myosinkopf (a) löst sich durch die Bindung von ATP (b) vom Aktinfilament, durch die anschließende Hydrolyse (c) von ATP bindet er wieder ans Filament (d) und führt als Folge der Abdissoziation der Spaltprodukte eine Konformationsänderung durch.

chanische Arbeit umgewandelt wird. Damit ist der Myosinkopf wieder nukleotidfrei an das Aktinfilament gebunden (a) und kann bei weiterer ATP-Anbindung erneut den Zyklus durchlaufen.

In mechanischen Studien an Muskelfasern und biochemischen Untersuchungen hat sich gezeigt, daß bei der Anbindung des Myosinkopfes an das Aktinfilament mehrere unterschiedliche Zustände vorliegen können (Stein *et al.*, 1979; Eisenberg *et al.*, 1980; Geeves *et al.*, 1984), da ATP Hydrolyse auch stattfinden kann, wenn Myosin an Aktin gebunden ist (Stein *et al.*, 1979). In diesem um Zwischenzustände erweiterten Modell (Übersichten in Eisenberg und Hill, 1985; Geeves 1991) unterscheidet man bei den Wechselwirkungen von Myosinkopf und Aktinfilament zwischen schwach und stark gebundenen Zuständen: Zu den schwach gebundenen Konformationen gehört Myosin mit gebundenem ATP ($M \bullet ATP$) und Myosin mit gebundenen Hydrolyseprodukten ($M \bullet ADP \bullet P_i$), die stark gebundenen Zustände liegen bei nukleotidfreier Anbindung an Aktin ($A \bullet M$) oder in Anwesenheit von ADP ($A \bullet M \bullet ADP$) vor (Greene und Eisenberg, 1980). Goody und Holmes schlugen 1983 vor, daß die Stärke der Anbindung des Myosinkopfes ans Aktinfilament umgekehrt mit der Anbindung des Nukleotids korreliert ist, d.h. je schwächer die Anbindung an das Aktinfilament, umso fester ist das Nukleotid oder Nukleotidanalogen an den Myosinkopf gebunden. Beim Übergang von schwacher zu starker Anbindung findet nach den Vorstellungen von Greene und Eisenberg (1980) über eine Konformationsänderung die Umsetzung der freigewordenen Energie aus der Hydrolyse in mechanische Arbeit statt (Übersicht in Brenner und Eisenberg, 1987).

Die Anbindung des Myosinkopfes an das Aktinfilament erfolgt also in mehreren Teilschritten: Zunächst erfolgt eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen positiv geladenen Aminosäuren an der 20-50 kDa Verbindung und negativ geladenen Aminosäuren der Aktinuntergruppe 1. Charakteristische Eigenschaften dieser schwachen Wechselwirkung sind kurze Lebenszeiten (Stein *et al.*, 1979; Chalovich *et al.*, 1981) und vergleichsweise niedrige Affinität für Aktin (Stein *et al.*, 1979).

Mit dem Bekanntwerden der Struktur von Myosin entwickelten Rayment *et al.* (1993b) ein molekulares Modell der verschiedenen Wechselwirkungen: In Anschluß an die

schwachen Wechselwirkung treten hydrophobe Reste von Aktin und Myosinkopf in stereospezifischen Kontakt, dabei wird die untere Domäne des 50 kDa Fragments mit der Aktinuntergruppe 1 (und zum Teil auch mit der Aktinuntergruppe 3) verbunden. Damit ist eine Orientierung des Myosinkopfes entsprechend der vom Aktinfilament vorgegebenen Richtung verknüpft. Kommt es schließlich zur starken Wechselwirkung, wird auch der obere Bereich des 50 kDa Fragments mit dem Aktinfilament verbunden (Aktinuntergruppe 2), dabei verringert sich die Lücke zwischen unterem und oberem 50 kDa Fragment. Damit ändern sich die Positionen der einzelnen Domänen zueinander und der nächste chemische Schritt (Dissoziation des Phosphats) führt zu der krafterzeugenden Konformationsänderung ("*power stroke*"), bei der das Aktinfilament relativ zum Myosin bewegt wird. Die hier beschriebene schrittweise Anbindung des Myosinkopfes ist in Abb. 4.2. zur Veranschaulichung skizziert.

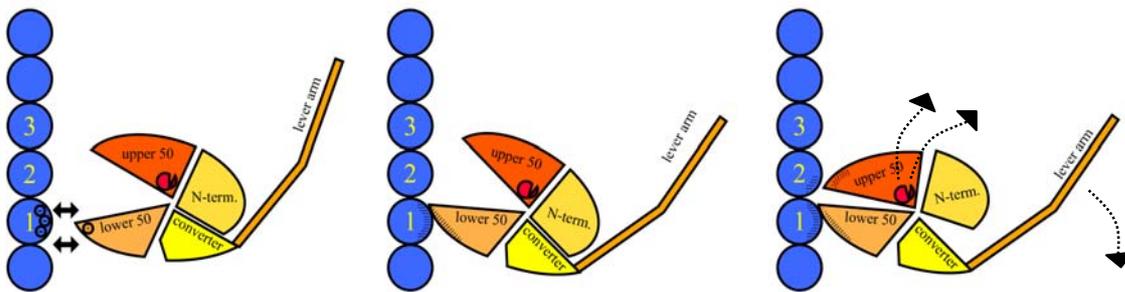


Abb. 4.2.: Die Anbindung des Myosinkopfes an Aktin erfolgt in mehreren Schritten: Zunächst kommt es zunächst zu elektrostatischer Wechselwirkung zwischen Aktin (negativ) und der *lower 50* Domäne des Myosinkopfes (a), daran schließen sich hydrophobe Interaktionen der *lower 50* Domäne an (b), schließlich treten ebenfalls hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Aktin und *upper 50* Domäne auf, dies führt zu einer Verengung der Kluft zwischen *lower 50* und *upper 50* Domäne (c) (adaptiert von Rayment *et al.*, 1993b).

Die Charakterisierung von Wechselwirkung auf Einzelmolekülebene erfolgt über die Detektion der Reduktion des freien Rauschens (vgl. Kapitel 2) und die Analyse des damit verbundenen Kraftschlags. Wie in den beiden vorherigen Kapiteln gezeigt, beträgt die aus der Konformationsänderung resultierende Verschiebung bei ATP Hydrolyse ~ 5 nm. Die schwachen Wechselwirkungen sind auf Grund ihrer sehr viel kürzeren Lebensdauer (bis zur Hydrolyse von ATP oder Abgabe des anorganischen Phosphats) schwieriger zu detektieren als die stark gebundenen, nukleotidfreien Zustände, die sich gegebenenfalls auch über eine Verringerung der Nukleotidkonzentration zeitlich verlängern lassen.

Um die schwachen Wechselwirkungen als Teil des mechanochemischen Zyklus⁴ isoliert untersuchen zu können, besteht die Möglichkeit, ATP durch nicht- oder nur sehr langsam hydrolysierte Nukleotidanaloga zu ersetzen, die einen schwachen Zustand repräsentieren. So wurde durch Messungen an Muskelfasern (Kraft *et al.*, 1992) gezeigt, daß mit MgATP γ S Querbrücken in einem schwach gebundenen Zwischenzustand erzeugt werden (MgATP γ S wird sehr viel langsamer als MgATP hydrolysiert (Goody *et al.*, 1975)).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe dieses Nukleotidanalogs schwache Wechselwirkungen erstmals auch auf Einzelmolekülebene direkt nachgewiesen. Außerdem wurden mittels Titration (schrittweise Reduktion der Nukleotidkonzentration) untersucht, welche Wechselwirkungen bei niedriger Nukleotidkonzentration auftreten können.

4.2. Schwache Wechselwirkung kann auch auf Einzelmolekülebene gemessen werden

Messungen sehr kurzer Wechselwirkungen mit 10 μ M ATP

Bei der Datenanalyse von HMM Rohdaten, die auf Grund einer besonders rigiden Verbindung zwischen den Komponenten des Arrangements aus Nadel und Perle ein sehr gutes Signal-Rauschverhältnis aufwiesen, war die Detektion von Wechselwirkungen sehr kurzer Dauer (10 ms) möglich (vgl. Kapitel 2). Im Gegensatz zu den Verteilungen bei der Analyse längerer Wechselwirkungen weist das resultierende Histogramm lediglich eine Verschiebung von 2- 3 nm auf (Abb. 4.3.) und entspricht keiner streng symmetrischen, gaußförmigen Verteilung. Stattdessen wird dieses Histogramm viel besser durch die Summe zweier verschiede-

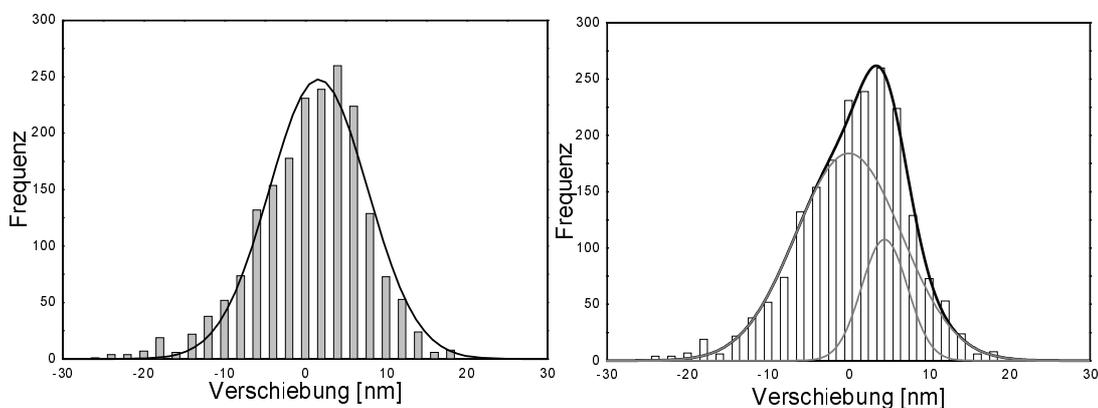


Abb. 4.3.: Die Summe (schwarz) aus 2 Gaußverteilungen (grau) beschreibt eine Verteilung von 1938 kurzen (10 ms) HMM Wechselwirkungen besser als eine einzige Gaußverteilung (links).

ner Verteilungen beschrieben, die beide gaußförmig sind und ihren Mittelpunkt bei 0 und bei 5 nm haben. Bei separater Analyse der Wechselwirkungen längerer Dauer (20-40 ms) bei gleichbleibender Varianz (Abb. 4.4.(a)), verringert sich der Anteil der um Null symmetrischen Verteilung und die aus der Verschiebung des resultierenden Histogramms ermittelte Schrittgröße erhöht sich dadurch stetig auf > 5 nm (Abb. 4.4.(b)).

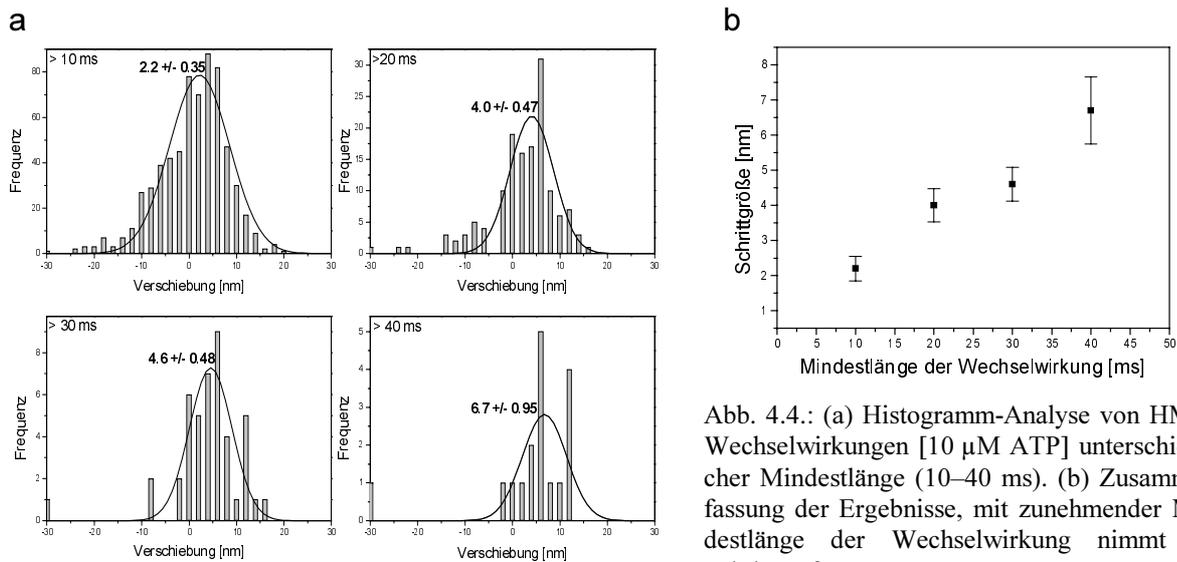
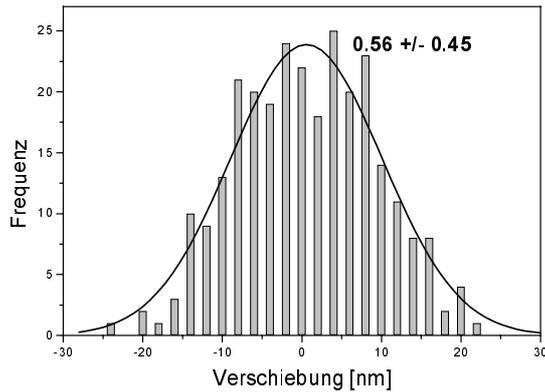
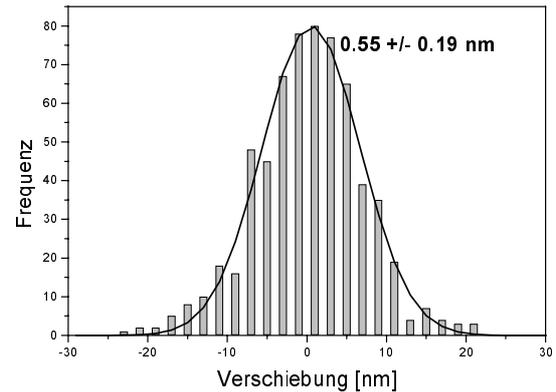


Abb. 4.4.: (a) Histogramm-Analyse von HMM-Wechselwirkungen [10 µM ATP] unterschiedlicher Mindestlänge (10–40 ms). (b) Zusammenfassung der Ergebnisse, mit zunehmender Mindestlänge der Wechselwirkung nimmt die Schrittgröße zu.

Das in Abb. 4.3 gezeigte Histogramm enthält damit einen signifikanten Anteil sehr kurzer Wechselwirkungen, die zu keiner detektierbaren Konformationsänderung geführt haben. Diese kurzzeitigen Anbindungen des Myosinkopfes mit einer damit verbundenen Reduktion des Rauschens (aber ohne *power stroke*) könnten auf schwache Wechselwirkungen zurückzuführen sein, oder aber es handelte sich um unspezifische kurzzeitige Reduktionen des freien Rauschens. Die beobachtete Asymmetrie trat nur bei Rohdaten aus Messungen mit HMM und S1 mit einer extrem guten Reduktion des Rauschens während der Anbindung auf, weshalb unspezifische Reduktionen unwahrscheinlich sind (vgl. 2. Kapitel). Um gezielt die schwachen Wechselwirkungen isoliert untersuchen zu können, wurde das nur sehr langsam hydrolysierbare ATP Analogon ATP γ S verwandt.

Messungen mit ATP γ S

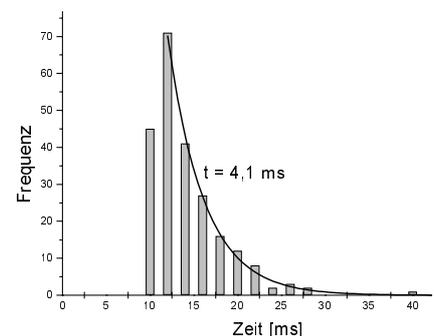
Die maximale Nukleotidkonzentration, mit der gemessen wurde, betrug 10 mM ATP γ S. Um eine Verunreinigung mit ATP auszuschließen, wurde allen Lösungen Hexokinase und Glucose zugegeben (siehe Methoden).

Abb. 4.6.: Verteilung S1 mit 10 mM ATP γ S, N = 279Abb. 4.7.: Verteilung S1 mit 1 mM ATP γ S, N = 636

Ein Beispiel für Rohdaten aus einer Messung an S1 mit dieser ATP γ S Konzentration ist in Abb. 4.5. dargestellt. Die detektierten Wechselwirkung beinhalten eine Reduktion des Rauschens auf $\sim 5 \text{ nm}^2$ (bei einer Steifheit des freien Nadel-Aktinfilament-Perlen Ensembles von 0.03 pN/nm), dies ist vergleichbar mit ATP Messungen.

Die mittlere Länge der beobachteten Wechselwirkungen beträgt $4,1 \text{ ms}$ (siehe Abb. 4.8.). Die resultierende Verteilung der gemessenen Wechselwirkungen (Abb. 4.6.) ist gaußförmig und zeigt praktisch keine Verschiebung zur Position der freien Nadel. Auch bei einer ATP γ S Konzentration von 1 mM ergibt sich bei der Analyse der Position vieler Wechselwirkungen eine gaußförmige Verteilung um Null (Abb. 4.7.). Die hier analysierten Rohdaten stammen jeweils aus einer Messung an einem einzelnen Filament und wurden in kurzen Teilabschnitten (10 s) analysiert, um ausschließen zu können, daß das Ergebnis aus der Mittelung mehrerer von Null deutlich unterschiedlicher Schrittstrecken zusammengesetzt ist.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß mittels des ATP Analogons ATP γ S schwache Wechselwirkungen auch auf Einzelmolekülebene detektiert werden können. Die Interaktionen sind sehr kurz und nicht mit einer Positionsänderung zwischen Aktinfilament und Myosinkopf verbunden.

Abb. 4.8.: Mittlere Dauer der Wechselwirkungen bei 10 mM ATP γ S unter der Annahme eines einfachen exponentiellen Abfalls.

4.3. Bei sehr geringer ATP γ S-Konzentration kommt es zu einer Positionsänderung zwischen Myosinkopf und Aktin

Bei einer ATP γ S-Konzentration von 100 μ M erhält man bei der Analyse der Position mehrerer Wechselwirkungen eine leicht asymmetrische Gaußverteilung, die um ~ 2 nm verschoben ist (siehe Abb. 4.9.). Reduziert man die ATP γ S Konzentration weiter auf 10 μ M, so

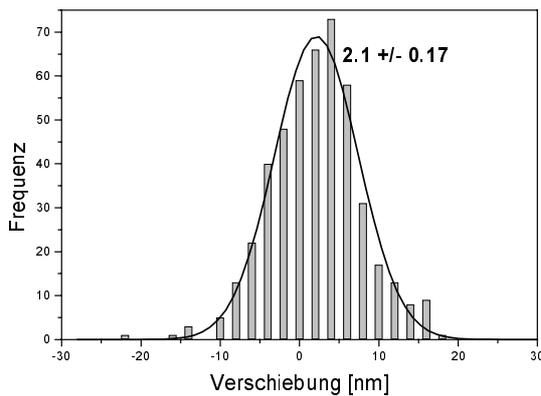


Abb. 4.9.: S1 mit 100 μ M ATP γ S, N = 203, 1 Filament.

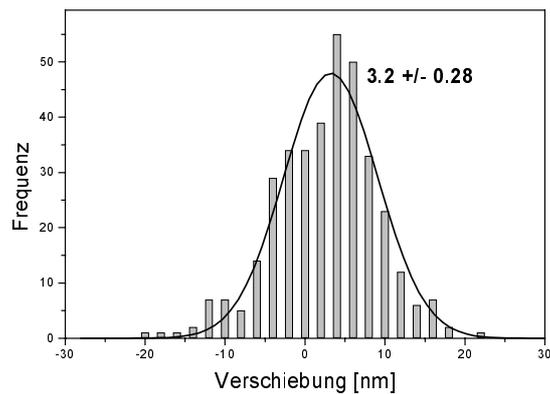


Abb. 4.10.: S1 mit 10 μ M ATP γ S, N = 636, 2 Filamente.

ist die resultierende Verteilung ebenfalls asymmetrisch, aber noch etwas weiter verschoben. Damit beträgt die mittlere Schrittgröße bei dieser Titrationsstufe ~ 3 nm (siehe Abb. 4.10.).

Diese Tendenz der zunehmenden Schrittgröße bei abnehmender Nukleotidanalogenkonzentration setzt sich noch weiter fort, bei einer ATP γ S Konzentration von 1 μ M ergibt sich eine Schrittgröße von ~ 5 nm (Abb. 4.11) und bei 0.1 μ M ATP γ S schließlich ist die mittlere

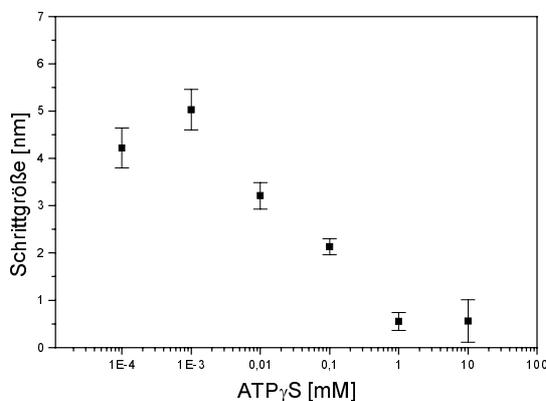


Abb. 4.13.: Schrittgrößen von S1 im Konzentrationsbereich 0.1 μ M - 10 mM ATP γ S

Schrittgröße einiger hundert Wechselwirkungen ~ 4.5 nm, hierbei wurden die einzelnen Ergebnisse aus Messungen an 3 verschiedenen Aktinfilamenten zusammengefaßt. Die Anzahl der Wechselwirkungen innerhalb einer festen Zeit nimmt mit abnehmender ATP γ S Konzentration ab, deshalb wurden bei 10 μ M und 1 μ M ebenfalls jeweils 2 Messungen zusammengefaßt, um

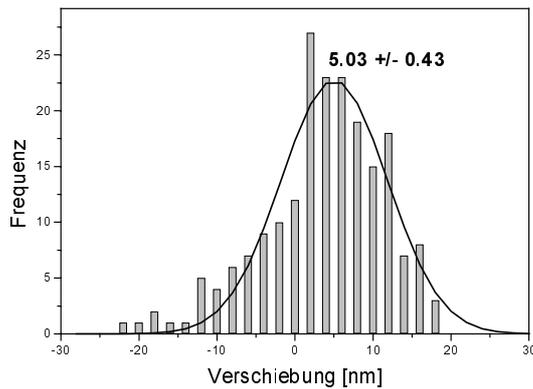


Abb. 4.11.: S1 mit 1 μM ATP γS , N = 202, 2 Filamente

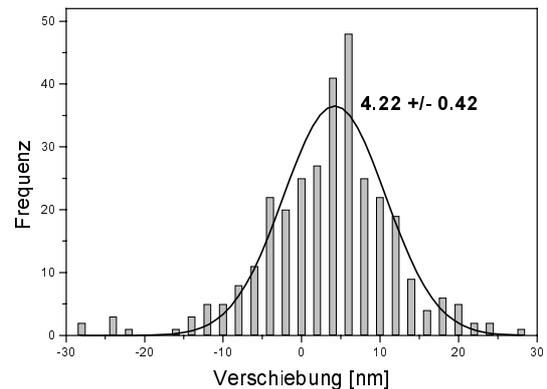


Abb. 4.12.: S1 mit 0.1 μM ATP γS , N = 317, 3 Filamente

wenigstens ~ 200 Wechselwirkungen zusammen analysieren zu können. Die Einzelergebnisse wiesen jeweils eine eindeutige Verschiebung in eine bestimmte Richtung auf, so daß die Filamente damit orientiert werden konnten (vgl. Kapitel 2 zur Orientierung der Filamente). Das Histogramm aus der Messung mit der höchsten ATP γS Verdünnung ist symmetrischer als die bei den intermediären Konzentrationen analysierten Verteilungen (vgl. Diskussion).

Die Ergebnisse aller Messungen sind in Abbildung 4.13. zusammengefaßt. Dabei ist die resultierende Verschiebung in Abhängigkeit von der ATP γS Konzentration aufgetragen. Es zeigt sich, daß oberhalb einer Konzentration des Nukleotidanalogs von ~ 1 mM Wechselwirkungen detektiert werden können, die analog zu ATP getriebenen Interaktionen durch die Anbindung des Myosinkopfes zu einer Reduktion des Rauschens führen, aber im Gegensatz dazu mit keiner meßbaren Schrittgröße des Myosins verbunden sind. Eine Verdünnung von ATP γS führt, im Kontrast zu den Beobachtungen bei Messungen mit ATP, nicht zu einer zeitlichen Verlängerung der Aktomyosin-Wechselwirkungen, sondern hat ein Ansteigen der gemessenen Schrittgröße zur Folge, ab einer ATP γS Konzentration beträgt die gemessene Verschiebung ~ 5 nm und entspricht damit der auch bei Messungen mit ATP beobachteten Schrittgröße.

4.4. Diskussion

Die Existenz schwacher Wechselwirkungen konnten mittels des Nukleotidanalogs ATP γS erstmals auf Einzelmolekülebene gemessen werden. Dabei bindet der Myosinkopf für

kurze Zeit an das Aktinfilament an, so daß das Rauschen des Sensors für diesen Zeitraum analog zu der Anbindung infolge einer ATP-Hydrolyse reduziert wird. Allerdings kommt es im Unterschied zu Messungen mit ATP nicht zu einer detektierbaren Konformationsänderung des Myosinkopfes, d.h. es wird keine Verschiebung zwischen Kopf und Aktinfilament generiert. Dies bestätigt die Beobachtungen aus mechanischen Messungen an Muskelfasern, wozu nach als Charakteristikum der schwachen Wechselwirkungen beschrieben wurde, daß zwar ein Anstieg in der Steifheit der Faser, aber dennoch keine Kraftgenerierung meßbar sind (Brenner *et al.*, 1982; Kraft *et al.*, 1992). Beim Übergang zu intermediären ATP γ S Konzentrationen (< 1 mM) wurden Wechselwirkungen detektiert, die mit einer relativen Verschiebung zwischen Myosinkopf und Aktinfilament verbunden sind, die geringer ausfällt (< 5 nm), als die bei der Wechselwirkung mit ATP beobachteten Interaktionen (vgl. Kapitel 2,3). Erst bei sehr geringer ATP γ S Konzentration (< 1 μ M) weist die resultierende Verteilung mehrerer Wechselwirkungen eine vergleichbar große Verschiebung von ~ 5 nm auf. Grundsätzlich ist denkbar, daß die Schrittgröße bei Verdünnung des Nukleotids sukzessive zunimmt, dann müßten die resultierenden Verteilungen mehrerer Wechselwirkungen jeweils symmetrische Gaußverteilungen mit einer der Schrittgröße entsprechenden Verschiebung entsprechen. Gerade die bei intermediären ATP γ S Konzentrationen resultierenden Verteilungen weisen aber eine Asymmetrie auf, die damit erklärt werden könnte, daß es sich um die Summe zweier Verteilungen handelt, die jeweils symmetrisch sind und keine Verschiebung ($I_{0\text{ nm}}$) bzw. eine

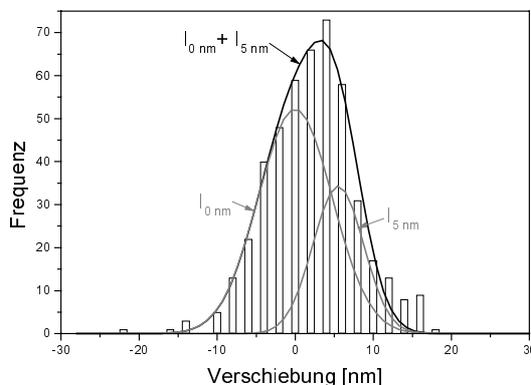


Abb. 4.14.: Die resultierende Verteilung mehrerer Wechselwirkungen bei 0,1 mM ATP γ S wird durch die Summe zweier Gaußverteilungen beschrieben: ($I_{0\text{ nm}} + I_{5\text{ nm}}$).

Verschiebung von 5 nm ($I_{5\text{ nm}}$) aufweisen. Für alle Histogramme der Messungen mit ATP γ S wurden 2 einzelne Gaußverteilungen mit unterschiedlicher Verschiebung ($I_{0\text{ nm}}$, $I_{5\text{ nm}}$) angepaßt, deren Summe die tatsächliche Verteilung besser beschreibt. Zur Veranschaulichung ist dies als Beispiel für 0,1 mM ATP γ S in Abb. 4.14. gezeigt.

Anschließend wurde die Fläche der beiden einzelnen Gaußverteilungen in Relati-

on zueinander gesetzt, um die Auswirkung der schrittweisen Nukleotidverdünnung auf den jeweiligen Anteil der beiden Verteilungen zu betrachten. Dieses Verhältnis $I_{5\text{ nm}}/I_{0\text{ nm}}$ in Abhängigkeit der Nukleotidkonzentration ist in Abb. 4.15. aufgetragen.

Für die mit einer Verschiebung des Aktinfilaments verbundenen Wechselwirkungen bei niedrigen ATP γ S Konzentrationen sind verschiedene Ursachen denkbar. Da eine solche Konformationsänderung vermutlich beim Übergang von schwach zu stark bindenden Zuständen stattfindet (Eisenberg und Greene, 1980), kann der Myosinkopf kein ATP γ S mehr gebunden haben, sondern liegt teilweise in einem stark gebundenen Zustand vor. Die Korrelation der generierten Verschiebung mit der Nukleotidkonzentration läßt vermuten, daß eine eventuelle Hydrolyse des Nukleotidanalogs ATP γ S nicht die Hauptursache für das Auftreten starker Wechselwirkungen ist. Eine starke Anbindung infolge eines nukleotidfreien Kopfes sollte bei sehr niedriger ATP γ S Konzentration zeitlich signifikant verlängert werden, dies war aber für die untersuchten Konzentrationen nicht der Fall. Eventuell sind deshalb weitere Messun-

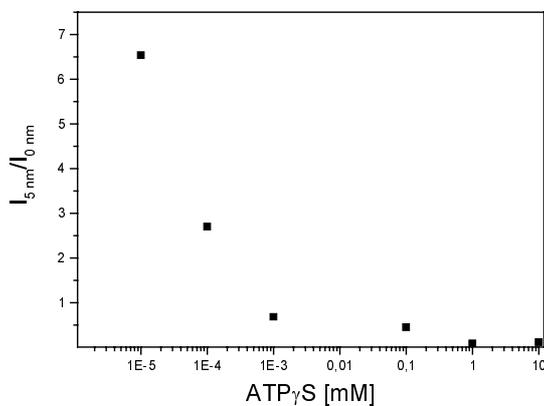


Abb. 4.15.: Bei sehr geringer ATP γ S Konzentration überwiegen Wechselwirkungen, die mit einer Konformationsänderung verbunden sind ($I_{0\text{ nm}} \ll I_{5\text{ nm}}$). Mit zunehmender ATP γ S Konzentration nimmt der Anteil an Wechselwirkungen ohne Konformationsänderung zu ($I_{0\text{ nm}} \gg I_{5\text{ nm}}$).

gen mit Nukleotidkonzentrationen $< 0,1 \mu\text{M}$ notwendig.

Die Abnahme der schwachen Wechselwirkungen mit niedrigerer Nukleotidkonzentration deckt sich mit biochemischen Beobachtungen (Resetar und Chalovich, 1995), wonach bei unvollständiger Sättigung mit ATP γ S eine Mischung aus schwach und stark bindenden Zuständen vorliegt. Vor allem in Experimenten mit hoher Myosindichte entsteht außerdem

ADP, dessen Bindungskonstante ungefähr der von ATP γ S entspricht. Deshalb ist eine mögliche Erklärung für die Zunahme der Verschiebung bei abnehmender ATP γ S Konzentration, daß sich der Kopf mit ADP in einen stark gebundenen Zustand befindet. Diese Hypothese ist in Abbildung 4.16. dargestellt.

Unklar bleibt, wie der Kopf mit dem gebundenen ATP γ S in den mit ADP gebundenen Zustand übergeht, denkbar ist die Abdissoziation des Thiophosphats (s.o.) oder die Abdissoziation des ATP γ S-Moleküls mit anschließender Bindung eines ADPs aus der Umgebung. Deshalb sollte in Zukunft untersucht werden, wie sich Myosin auf Einzelmolekülebene in Gegenwart von ADP verhält. An Muskelfasern sind diesbezüglich bereits diverse Studien erfolgt: Schoenberg und Eisenberg untersuchten 1987 die Auswirkungen der Zugabe von ADP auf gehäutete Muskelfasern im Rigor und kamen zu dem Ergebnis, daß sowohl die Steifheit der Muskelfasern, als auch die Ratenkonstanten für die Ablösung der Querbrücken für im Rigor und mit ADP gebundene Myosinköpfe sehr ähnlich sind.

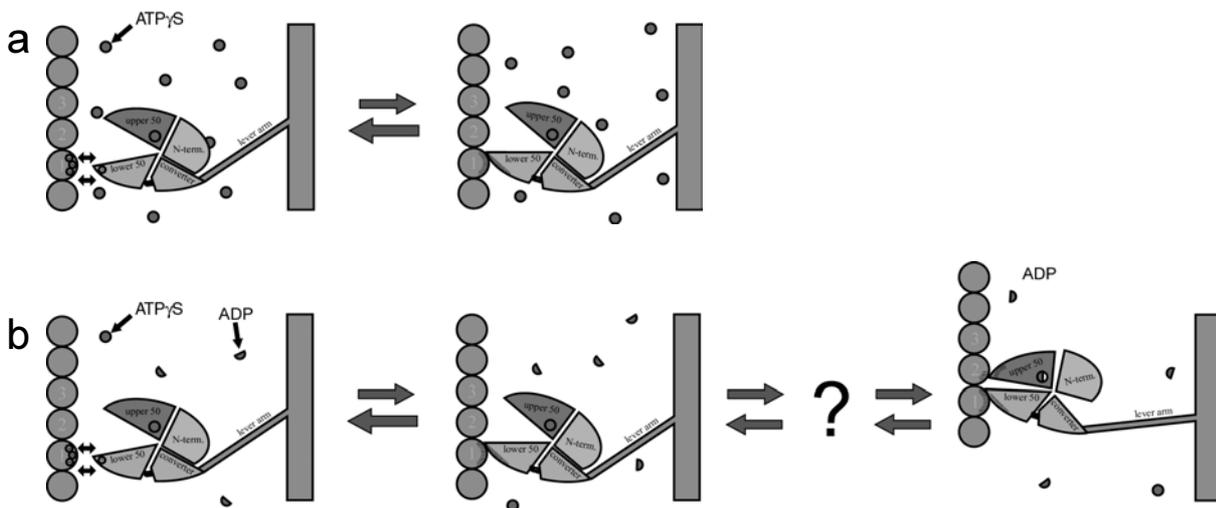


Abb. 4.16.: Arbeitshypothese: Bei hoher ATP γ S Konzentration bindet der Myosinkopf kurzzeitig an das Aktinfilament, ohne daß es zu einer Verschiebung kommt. Bei niedriger ATP γ S Konzentration (b) kommt es vermutlich in Folge der Anbindung eines ADP Moleküls zu einer Verschiebung zwischen Aktinfilament und Myosinkopf.

Mittels Elektronenspinresonanz (ESR) wurde eine Rotation der Querbrücken bei Zugabe von ADP zu Muskelfasern im Rigor detektiert (Ajtai *et al.*, 1989). Auch mindestens eine Konformationsänderung des weiterhin angehefteten Myosinkopfes konnte mit ähnlichen Studien (Raucher *et al.*, 1994) und Röntgenbeugung (Takemori *et al.*, 1995) aufgezeigt werden. Allerdings postulierten Wakabayashi und Mitarbeiter (Kim *et al.*, 1998) auf Grund ihrer ebenfalls mit Röntgenbeugung erhaltenen Ergebnisse, daß fast die Hälfte der ehemals im Rigor vollständig gebundenen Köpfe auf Grund der Zugabe von ADP vom Aktinfilament angelöst werden. Anhand weiterer Röntgenbeugungsexperimenten an Fasern mit ADP zeigten sie, daß

diese große strukturelle Ähnlichkeit mit mechanisch gedehnten Fasern aufweisen (Takezawa *et al.*, 1999) und die Zugabe von ADP eine im Querbrückenzyklus rückwärts gerichtete Bewegung (Rotation der Binderegion der leichten Ketten um $10 - 20^\circ$) zur Folge hat.

Über Dünnschichtchromatographie wurde die chemische Zusammensetzung der verwandten Lösungen im Anschluß an die Messungen kontrolliert. Neben ATP γ S befand sich auch ADP in der Lösung, der Anteil war jeweils $\sim 30\%$. Vor der Messung war kein ADP in der Lösung nachweisbar, damit war es entweder aus im Myosin aus der Aufreinigung stammenden ATP (mittels Hexokinase in ADP umgewandelt) oder aus der Hydrolyse oder Wechselwirkung mit Hexokinase aus ATP γ S entstanden. Grundsätzlich ist es also denkbar, daß die gemessene Verschiebung bei niedriger ATP γ S aus der Verunreinigung der Lösung mit ADP und einer mit der Bindung von ADP einhergehenden Konformationsänderung des Myosinkopfes resultiert. H

Um diese Hypothese zu verifizieren, sind weitere Messungen notwendig, so könnte durch Beigabe von Apyrase oder veränderte ADP Konzentration (Zugabe von ADP) bei intermediären ATP γ S Werten untersucht werden, ob sich der jeweilige Anteil der Verteilungen mit und ohne Verschiebung verändert.

5. Analyse der Hebelarm Hypothese auf Einzelmolekülebene

5.1. Einleitung

Der kontraktile Mechanismus von Muskel beruht darauf, daß Aktin- und Myosinfilamente ohne Verkürzung aneinander vorbei gleiten können und so eine Verkürzung des Sarkomers bewirken (A.F. Huxley und Niedergehrke, 1954). Dabei bewegen sich die Myosinköpfe unter der Hydrolyse von ATP in Richtung des Plusendes des Aktinfilaments. Während jedem dieser Querbrückenzyklen (vgl. Kapitel 4) legt ein einzelner Myosinkopf eine feste Distanz zurück. Die Schrittgröße des einzelnen Kopfes beträgt, wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt, 5 nm.

Ursprünglich war man davon ausgegangen, daß der gesamte Kopf um die Verbindung zum Aktinfilament rotiert (H.E. Huxley, 1969, A.F. Huxley, 1971). Mit der Lösung der ato-

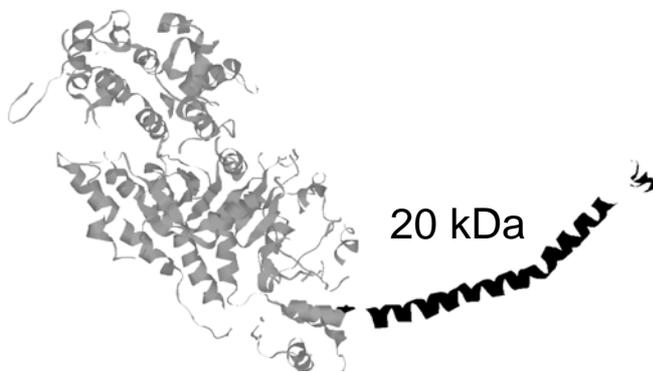


Abb. 4.1.: Huhn S1 Struktur nach (Rayment *et al.*, 1993): Die 20 kDa Domäne besteht aus einer ~ 8 nm langen α -Helix.

maren Struktur von Aktinmonomeren (Kabsch *et al.*, 1990) und dem Myosinfragment S1 (Rayment *et al.*, 1993) wurde das Hebelarm-Modell („*lever arm hypothesis*“) aufgestellt, das erklärt, wie kleine Konformationsänderungen in der Motordomäne zu den resultierenden Verschiebungen in der Größenordnung einiger

nm führen können. Die 20 kDa Domäne, die aus einer ca. 8 nm langen α -Helix mit 2 stabilisierenden leichten Ketten besteht (vgl. Abb. 5.1.), könnte als beweglicher Hebelarm fungieren. Damit wären als Schrittgröße bis zu 20 nm (bei einer Winkeländerung von 90°) möglich (Rayment *et al.*, 1993).

Weitere kristallografische Untersuchungen an Myosinfragmenten mit unterschiedlichen Nukleotiden und Nukleotidanaloga ergaben bisher mindestens drei verschiedene Strukturklassen (Fisher *et al.*, 1995; Smith und Rayment, 1995, 1996), allerdings waren die verwandten Motorfragmente relativ kurz (730-740 Aminosäuren) und immer in Abwesenheit von

Aktin betrachtet worden, so daß eine präzise Beziehung von den bisher beobachteten Zuständen zu den jeweiligen Schritten im Hydrolysezyklus noch nicht vollständig hergestellt worden ist (Houdusse *et al.*, 1999).

Viele weitere biophysikalischen Techniken haben seitdem bewiesen, daß sich bei der Interaktion mit dem Aktinfilament vor allem die 20 kDa Domäne bewegt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen weisen 2 verschiedene Formen des Myosinkopfes auf (Tokunaga *et al.*, 1991) und zeigen, daß es zwischen Motor- und regulatorischer Domäne zu Verschiebungen kommt, so kann sich die Binderegion der leichten Ketten bis zu 12 nm auf beiden Achsen relativ zur katalytischen Domäne bewegen (Burgess *et al.*, 1997). Über die Anbringung von Spinproben an der Binderegion der leichten Ketten und EPR Messungen konnte eine axiale Rotation des Hebelarms um mindestens 30° postuliert werden (Baker *et al.*, 1998, Hopkins *et al.*, 1998).

Für Brushborder Myosin I (Jontes *et al.*, 1995) und für Myosin der glatten Muskulatur (Whittaker *et al.*, 1995) war in der 3D helikalen Rekonstruktion von dekoriertem Aktin eine Umlagerung des Hebelarmes (Reorientierung) nach der Abgabe von ADP sichtbar. Trotz der unterschiedlichen Bemühungen ist es bisher nicht gelungen die Hebelarm Hypothese eindeutig zu verifizieren.

Einen indirekten Test der Hebelarm Hypothese stellte die Messung der Gleitge-

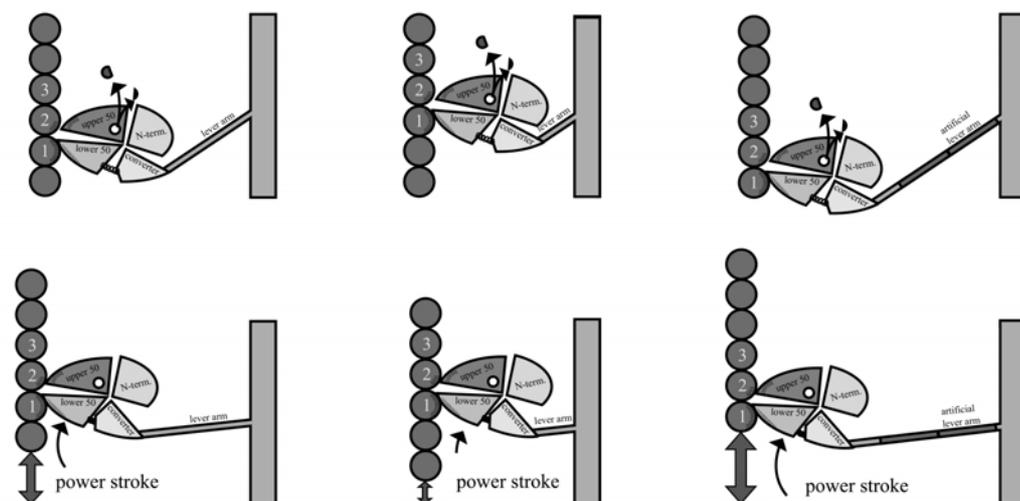


Abb. 5.2.: Test der Hebelarm Hypothese: Ein verkürzter (b) bzw. verlängerter (c) Hebelarm sollte zu einer kleineren (b) bzw. größeren Schrittdistanz führen.

schwindigkeiten im *motility assay* an genetisch hergestellten *Dictyostelium* Mutanten dar, die unterschiedlich viele leichte Ketten (0 - 3) aufweisen. Damit besitzen diese einen verschieden langen funktionellen Hebelarm und sollten sich in den mechanischen Eigenschaften (Schrittgröße bzw. Gleitgeschwindigkeit) entsprechend unterscheiden (Uyeda *et al.*, 1996). Alle vier Proteine waren in der Lage, Aktin im Gleitassay zu transportieren, und die entsprechende Gleitgeschwindigkeit nahm linear mit der Anzahl der leichten Ketten zu. Einen ähnlichen Ansatz wählten auch Anson und Kollegen (Anson *et al.*, 1996), nur daß sie die Länge des Hebelarms variierten, indem die leichte Ketten-Binderegion durch einen künstlichen Hebelarm aus einem oder zwei α -Aktininsegmenten (ebenfalls aus *Dictyostelium*) ersetzt wurde. Auch diese Konstrukte wiesen mit dem Wildtyp vergleichbare Gleitgeschwindigkeiten auf, und auch hier waren Hebelarmlänge und Gleitgeschwindigkeit direkt korreliert.

Allerdings ist die Gleitgeschwindigkeit v nicht nur von der Schrittlänge d abhängig, sondern die Dauer τ_s des jeweiligen Einzelschrittes beeinflusst diese ebenfalls. Für die mittlere Gleitgeschwindigkeit v_{av} eines Filaments, das mit N Motoren wechselwirkt, gilt dann (Uyeda *et al.*, 1991)):

$$v_{av} = d / \tau_s \cdot \left(1 - \left(1 - \frac{v_s}{\tau_c}\right)^N\right) \quad \text{mit } \tau_c = \text{Dauer des ATPase Zyklus pro Kopf}$$

Unter der Voraussetzung $\tau_s/\tau_c = 0,05$ (Uyeda *et al.*, 1990) ergibt sich bei der Beteiligung von 10 Myosinköpfen eine durchschnittliche Geschwindigkeit $v_{av} = 0,4(d/\tau_s)$, und für $N = \infty$ ist $v_{av} = d/\tau_s$. Da sich die Anzahl der beteiligten intakten Myosinköpfe nur abschätzen läßt und eventuell im Assay vorhandenes totes Protein die gemessene Gleitgeschwindigkeit beeinflussen kann, ist es notwendig, direkt die Schrittgröße in Abhängigkeit von der Hebelarmlänge zu bestimmen. Gleichzeitig läßt sich so ein die Gleitgeschwindigkeit verändernder Einfluß der jeweiligen kinetischen Eigenschaften der unterschiedlichen Myosinkonstrukte umgehen.

Um die Gültigkeit der Hebelarmhypothese auf Einzelmolekülebene zu testen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Messungen der Schrittgrößen an 5 verschiedenen *Dictyostelium discoideum* Konstrukten mit unterschiedlichen Hebelarmlängen durchgeführt. Die Variation der

Hebelarmlänge erfolgte durch den Ersatz der Binderegion für die leichten Ketten durch einen künstlichen Hebelarm aus einem oder zwei α -Aktininmotiven. An der Aminosäure 1-761 bzw. 1-765 wurden die ein oder zwei α -Aktininmotive angefügt. Entsprechend werden diese Konstrukte im Folgenden M765, M761-1R, M765-1R, M761-2R und M765-2R genannt, wobei 1R und 2R die Anzahl der α -Aktininmotive beziffern (siehe auch Methoden). Das Konstrukt mit dem längsten Hebelarm (M765-2R) unterscheidet sich vom kürzesten um 12 nm Hebelarmlänge. Die Konstrukte wurden am MPI für medizinische Forschung in Heidelberg in der Arbeitsgruppe von Dietmar Manstein kloniert und aufgereinigt und sind teilweise im Gleitassay charakterisiert worden (Anson *et al.*, 1996). Abbildung 5.3. skizziert alle verwandten Konstrukte.

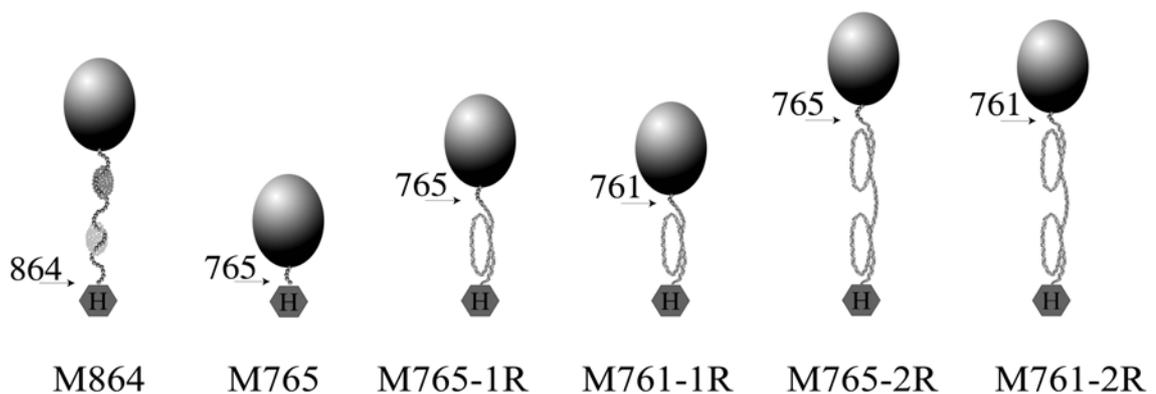


Abb. 5.3.: Skizze aller verwandten Konstrukte: M864 weist beide (native) leichte Ketten auf, M765 fehlt die Binderegion für die leichten Ketten, bei M761-1R und M765-1R wurde jeweils ein α -Aktininrepeat an den Aminosäuren 761 bzw. 765 angebracht und M761-2R und M765-2R verfügen entsprechend über 2 α -Aktininrepeats. Alle Konstrukte sind mit einem C-terminalen HisTag versehen (in der Skizze ein Sechseck), der zur Aufreinigung diente und gleichzeitig zur spezifischen Anbringung des Motors ans Substrat über einen Antikörper verwandt wurde.

Um einen eventuell die Funktionalität des Moleküls verändernden Einfluß durch die Ersetzung der nativen Binderegion der leichten Ketten durch einen künstlichen Hebelarm ausschließen zu können, wurden die Ergebnisse mit dem Dictyostelium- S1 entsprechendem Konstrukt (M864) und den aus enzymatischem Verdau gewonnenen Molekülen S1 und HMM verglichen. Ergänzend dazu wurde von einem doppelköpfigen Konstrukt mit einem ebenfalls verlängerten, künstlichen Hebelarm (HMM-2R, 2 α -Aktininmotive an Aminosäure 765) die Schrittgröße bestimmt. Grundsätzliches Ziel dieser Untersuchungen sollte der Beweis sein, daß die Ersetzung der Binderegion für die leichten Ketten durch einen künstlichen Hebelarm

mechanisch kompetente Motoren hervorbringt. Durch die Variation der Abmessungen des Hebelarmes sollte damit erstmals auch auf Einzelmolekülebene direkt gezeigt werden, daß tatsächlich lediglich die Länge des Hebelarms die Schrittgröße festlegt. Über eine Extrapolation der gemessenen Schrittgrößen aller Moleküle sollte der Drehpunkt und der Drehwinkel des Hebelarms bestimmt werden.

5.2. Ergebnisse

(1) Myosinkonstrukte mit künstlichem Hebelarm sind funktionelle Motormoleküle

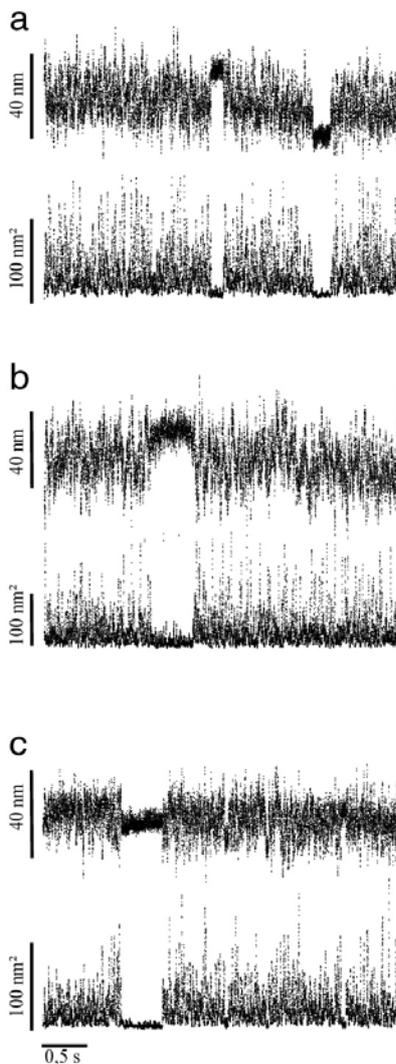


Abb. 5.4.: je 4 s einer Registrierung der Position der Nadel mit der zugehörigen Varianz für (a) M765, (b) M765-1R, (c) M765-2R.

Im Einzelmolekül assay weisen die Myosinkonstrukte mit künstlichen Hebelarmen aus α -Aktininmotiven ein ähnliches Verhalten wie S1 und HMM auf, d.h. während der Anbindung des einzelnen Moleküls wird das Rauschen der Nadel deutlich reduziert. Abbildung 5.4. zeigt als Beispiel je eine 4 s lange Registrierung der Wechselwirkung eines einzelnen M765 (a), M765-1R (b), M765-2R (c) Moleküls mit einem Aktinfilament. Bei der Analyse der Rohdaten mittels der Histogramm-Methode erhält man als Resultat (Verschiebung der resultierenden Verteilung) ebenfalls vergleichbar mit den Ergebnissen für S1 und HMM Schrittgrößen von einigen nm.

Um eine möglichst genaue Aussage über die jeweilige Schrittgröße der einzelnen Konstrukte machen zu können, wurden die Einzelmolekülwechselwirkungen aus mehreren Messungen addiert. Die maximale Abweichung einer einzelnen Messung von der resultierenden Schrittgröße beträgt 20%, so daß alle Verteilungen zweifelsfrei orientiert werden konnten (zur Orientierung: Vgl. Kapitel 2/Ergebnisse).

Die Konstrukte M761-1R und M765-1R zeigen mit Verschiebungen der resultierenden Verteilungen (siehe Abb. 5.5.(a),(b)) von 3,84 nm bzw. 4,07 nm deutlich niedrigere Werte als die beiden Konstrukte mit zwei α -Aktininmotiven (7,06 nm (M761-2R) bzw. 7,73 nm (M765-2R), siehe Abb. 5.5.(c),(d)). Damit findet fast eine Verdoppelung der Schrittgröße statt, wenn zwei statt einem α -Aktininmotiv als Hebelarm fungieren.

Als Kontrolle für die Messungen an Molekülen mit künstlichem Hebelarm wurde die Schrittgröße eines dem Motorfragment entsprechenden Konstrukts (M864) mit beiden (nativen) leichten Ketten bestimmt. Das Ergebnis liegt mit 5,4 nm (vgl. Abb. 5.5.(e)) erwartungsgemäß zur Hebelarm Hypothese zwischen den Werten für den Motor mit einem bzw. zwei α -Aktininmotiven, entsprechend der Länge des natürlichen Hebelarms von ~ 8.5 nm, verglichen mit der Länge eines α -Aktinins von 6 nm. Außerdem ist die Schrittgröße des gentechnisch erzeugten *Dictyostelium*-S1 komparabel mit der von aus enzymatischem Verdau nativen Myosins (Kaninchen) gewonnenem S1 und HMM (vgl. Kapitel 3).

Alle Ergebnisse der Messungen an den Konstrukten mit den künstlichen Hebelarmen (M761-1R, M765-1R, M761-2R, M875-2R) und mit der Binderegion der leichten Ketten als natürlichem Hebelarm bestätigen die Hypothese, wonach die Länge des Hebelarms direkten Einfluß auf die Schrittgröße hat. Bei Extrapolation der Daten zum Drehpunkt des Hebelarms (entsprechend 0 nm Schrittgröße) zeigt sich, daß dieser nicht an der Verbindung zwischen Kopf und Hals liegen kann, sondern vielmehr im Inneren der Kopfdomäne lokalisiert ist.

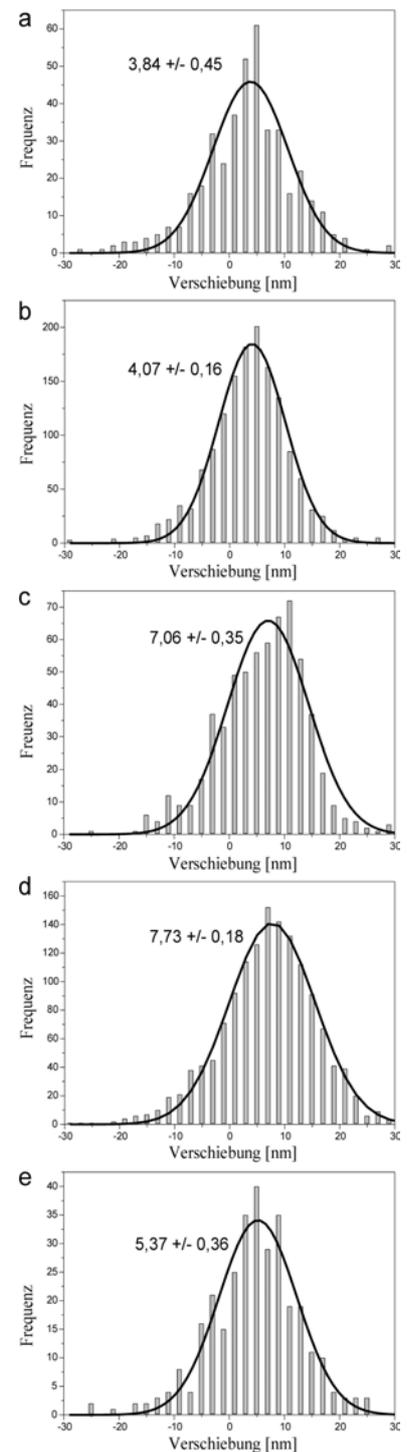


Abb. 5.5.: Resultierende Verteilungen aus den Messungen mit unterschiedlichen Konstrukten, es wurden Ergebnisse aus mehreren Filamenten (M) orientiert und gepoolt (a) M761-1R, M = 3, N = 414; (b) M765-1R, M = 5, N = 1466; (c) M761-2R, M = 5, N = 616; (d) M765-2R, M = 4, N = 1413; (e) M864, M = 7, N = 701.

Um diesen Angelpunkt möglichst genau bestimmen zu können, wurde ein weiteres Myosinkonstrukt in *Dictyostelium* exprimiert, das einen sehr kurzen Halsbereich aufweist (~ 0.6 nm entfernt von der Verbindung zwischen Kopf und Hals). Dieses Konstrukt (M765) generiert Schrittgrößen von immerhin noch ~ 1.5 nm, ein weiterer Hinweis darauf, daß der Angelpunkt des Hebelarms innerhalb der Kopfdomäne lokalisiert sein muß.

Alle hier untersuchten *Dictyostelium* Mutanten waren mit einem C-terminalen HisTag ausgestattet, der zum einen die Aufreinigung erleichtert und zum anderen eine spezifische Anbindung ans Substrat über einen Antikörper ermöglicht (vgl. Methoden). Wie in Kapitel 3 bereits diskutiert, hat die Anbindung ans Substrat keinen wesentlich verändernden Einfluß auf die Schrittgröße. Da dem Ergebnis für die Schrittgröße des kürzesten Konstrukt für die Bestimmung des Drehpunktes relativ viel Bedeutung beigemessen wird (lineare Regression mit Fehler gewichtet), wurde unabhängig noch einmal die Verschiebung von M765 bestimmt,

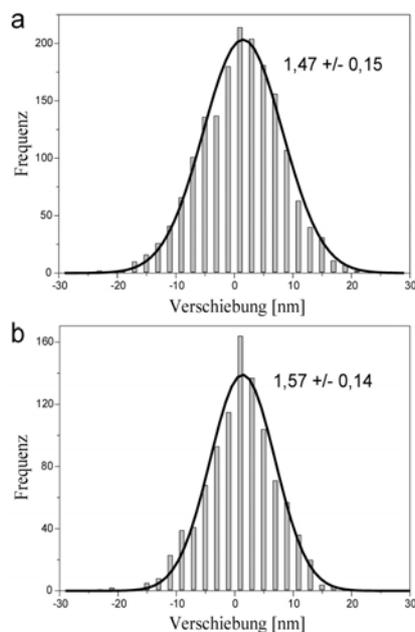


Abb. 5.6.: Resultierende Verteilungen aus den Messungen mit M765, es wurden Ergebnisse aus mehreren Filamenten (M) orientiert und gepoolt (a) M765 direkt adsorbiert, $M = 5$, 3 Fil. Polarisationsmarkiert, $N = 1735$; (b) M765 via Antikörper adsorbiert, $M =$

ohne daß eine spezifische Anbindung über einen Antikörper stattfand. Statt dessen wurde der Motor analog zu den Messungen mit den Myosinkonstrukten S1 und HMM direkt auf Nitrozellulose adsorbiert. Auch bei direkter Adsorption der einzelnen Moleküle auf Nitrocellulose kann der Motor mit dem Aktinfilament wechselwirken und auch hierbei beträgt die Schrittgröße annähernd 1.5 nm (Abb. 5.6.). Auch hier wurde an mehreren einzelnen Filamenten gemessen und deren Ergebnis orientiert und anschließend addiert. Die Einzelergebnisse sind ebenfalls im Anhang aufgeführt. Die Abweichung der Einzelmessungen lag typisch bei $0,1 - 0,3$ nm, so daß mit einer Schrittgröße von $\sim 1,5$ nm eine Orientierung zweifelsfrei möglich war. In die folgende Analyse gehen beide Ergebnisse für M765 ein.

(2) Die Schrittgröße ist proportional zur Länge des Hebelarms

Konstrukt	Halslänge	Schrittgröße	# der Fil.	N
M765 ^{HisTag}	0.6 nm	1.56 ± 0.14 nm	4	993
M765	0.6 nm	1.47 ± 0.15 nm	5	1735
M761-1R	6 nm	3.84 ± 0.45nm	3	414
M765-1R	6.6 nm	4.07 ± 0.16 nm	5	1466
M864	7.5 nm	5.40 ± 0.38 nm	6	635
M761-2R	12 nm	7.06 ± 0.35 nm	5	606
M765-2R	12.6 nm	7.73 ± 0.18 nm	4	1413
HMM-2R	12.6 nm	7.47 ± 0.26 nm	6	790
HMM _{Rabbit}	7.5 nm	5.54 ± 0.13 nm	6	1195

Tabelle 5.1.: Übersicht über verwandte Konstrukte, die Länge deren Halsregion, Schrittgröße und Anzahl der addierten Filamente.

Um die Länge der Halsregion zu definieren, wurde als Bezugspunkt ab dem Ende der Motordomäne (Aminosäure 761) gemessen. Für ein α -Aktininmotiv wird eine Länge von 6 nm (aus strukturellen Daten und theoretischen Modellen (Yan *et al.*, 1993, Grum *et al.*, 1999)) berücksichtigt, entsprechend 12 nm für 2 α -Aktininmotive. Für den Abstand zwischen 761 und 765 werden 0.6 nm angenommen (aus kristallographischen Daten (Rayment *et al.*, 1993a)),

dies ergibt sich auch, wenn man für jede der 4 Windungen der α -Helix zwischen M761 und M765 0,15 nm berücksichtigt. Die Abmessung des natürlichen Hebelarms (~ 7.5 nm) läßt sich ebenfalls aus der S1 Struktur (Rayment *et al.*, 1993a) bestimmen. Die direkte Bestimmung der Länge der Halsregion aus der Struktur der Konstrukte M761-1R und M761-2R (Kliche & Kull, persönliche Aussagen) bestätigt die theoretischen Überlegungen und zeigt gleichzeitig, daß die α -Aktininmotive in einem ähnlichen Winkel wie die natürliche leichte Ketten Binde-region an die Kopfdomäne anschließt.

Tabelle 5.1. gibt eine Übersicht aller verwandten Konstrukte mit deren jeweiligen Halslänge und den Ergebnissen aus den Schrittmessungen. Als Ergänzung wurde das zweiköpfige Konstrukt HMM-2R ebenfalls mit berücksichtigt, eine Skizze des Aufbaus, die dazu gehörige Verteilung und deren Verschiebung findet sich in Kapitel 3. Außerdem wurde zum Vergleich der Konstrukte mit künstlichem Hebelarm noch ein (ebenfalls zweiköpfiges) Fragment (HMM) aus nativen Myosin mit in die folgende Auswertung einbezogen. Trägt man alle erhaltenen Schrittgrößen in Abhängigkeit der Halslänge auf, so ergibt sich ein linearer

Zusammenhang (Abb. 5.7.). Wie der relativ große Korrelationskoeffizient ($r^2 = 0,99$) anzeigt, gibt es keine signifikante Abweichung von dieser linearen Beziehung.

Die Gerade schneidet die x-Achse bei $-2,45$ nm und die Steigung beträgt $0,49$. Die Myosinkonstrukte mit künstlichem Hebelarm (M765, M761-1R, M765-1R, M761-2R, M765-2R, HMM-2R) werden durch dieselbe Regression wie Myosin mit natürlichem Hebelarm (HMM, M864) beschrieben. Es hat ebenfalls keinen Einfluß auf die Funktionalität und damit auf die Schritt-

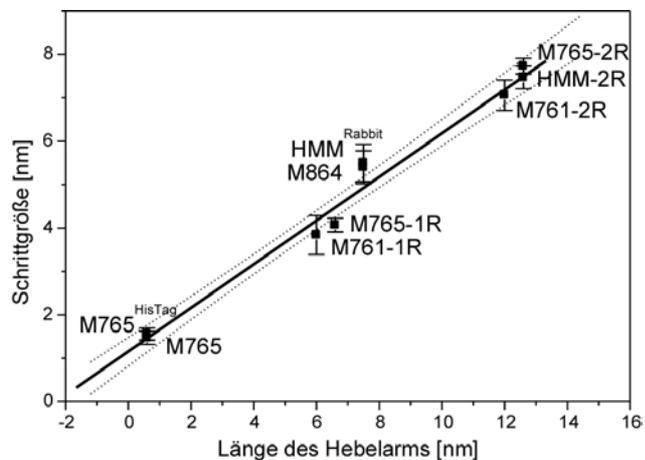


Abb. 5.7.: Zwischen der Schrittgrößen der einzelnen Konstrukte und der Länge deren jeweiliger Halsdomäne besteht ein linearer Zusammenhang.

größe, ob die α -Aktininmotive an die Aminosäure 761 oder 765 angebracht sind, in beiden Fällen beträgt die Steigung der resultierenden Geraden $\sim 0,5$, der geringe Unterschied in den Schrittgrößen beruht damit lediglich auf den $0,6$ nm längeren Hebelarmen der M765 Konstrukte.

Wie schon im Kapitel 3 beschrieben, generieren ein- und zweiköpfige Konstrukte mit identischer Hebelarmlänge (hier: M765-2R und HMM-2R bzw. HMM und M864) gleich große Schritte. Das „lever arm“ Modell, wonach einzig die funktionelle Länge des Hebelarms die Schrittgröße bestimmt, beschreibt damit den hier vorgestellten Daten an Konstrukten mit unterschiedlich langer Halsdomäne und unterschiedlicher Anzahl an Myosinköpfen vollständig.

(3) Der Drehpunkt des Hebelarmes liegt innerhalb der Motordomäne

Zunächst wurde angenommen, daß alle verwandten Konstrukte wie natives Myosin zum Plusende des Aktinfilamentes laufen, per Definition sind also alle Schrittgrößen positiv. Allerdings wäre denkbar, daß es sich bei der gemessenen Schrittdistanz um ein Resultat aus mehreren, entgegengesetzt gerichteten Vorgängen handelt, beispielsweise hätte eine erste „Umlagerung“ mit einer negativen Schrittrichtung von 2 nm und ein anschließender „power

stroke“ von 7 nm ebenfalls eine Nettoschrittdistanz von 5 nm zur Folge (siehe Abb. 5.7.). Bei einem sehr kurzen Hebelarm könnte diese Nettoschrittdistanz dann negative Werte annehmen.

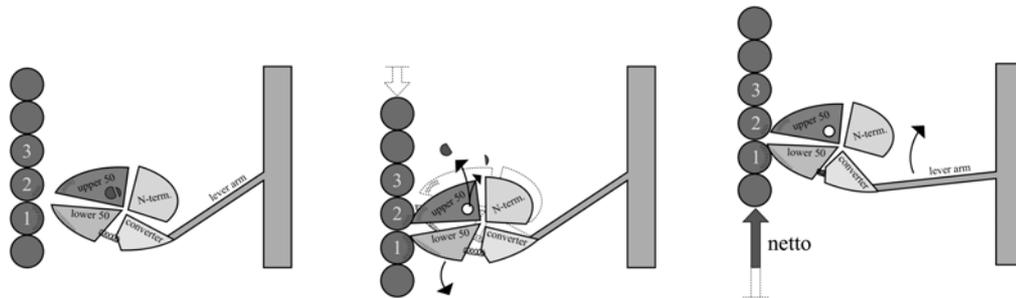


Abb. 5.8.: Skizze der Hypothese, daß die Schrittdistanz das Ergebnis aus mehreren, entgegengesetzten Vorgängen darstellt. Bei der Anbindung des Myosinkopfes ans Aktinfilament (Mitte) kommt es zu einer Umlagerung der Kopfdomäne, die eine geringe Verschiebung des Aktinfilaments zur Folge hat. Der sich anschließende Kraftschlag erfolgt in die entgegengesetzte Richtung (links), die detektierte Nettoverschiebung des Aktinfilaments ist damit geringer als der Kraftschlag.

Nimmt man eine negative Schrittdistanz für das kürzeste Konstrukt an, ergibt sich immer noch ein linearer Zusammenhang zwischen Schrittgröße und Hebelarmlänge, dargestellt in Abb. 5.9. ($R = 0,981$). Um diese Möglichkeit ausschließen zu können, daß das kürzeste Konstrukt M765 in die Minus Richtung des Aktinfilaments läuft, wurden mehrere Messungen mit polarisationsmarkierten Aktinfilamenten durchgeführt (siehe Methoden zu Kapitel 5). Mittels der im Fluoreszenzmikroskop sichtbaren Polarität kombiniert mit der sich ergebenden Verschiebung der resultierenden Verteilungen kann die Laufrichtung bestimmt werden. Insgesamt wurde an 3 polaritätsmarkierten Filamenten gemessen, und die Laufrichtung von M765 war in allen 3 Fällen positiv. Damit scheidet die in den Abbildungen 5.7. und 5.8. dargestellte Hypothese aus.

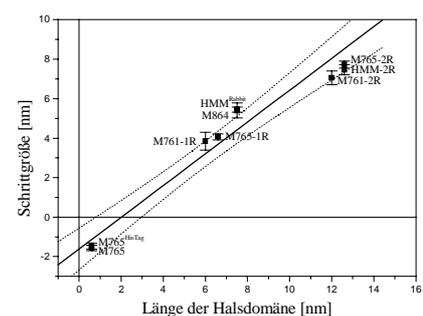


Abb. 5.9.: Hypothetischer Zusammenhang zwischen Schrittgröße und Hebelarmlänge für M765 mit negativer Schrittrichtung.

Mit der Schrittgröße des kurzen Konstruktes läßt sich somit der Drehpunkt des Hebelarms aus der linearen Regression genauer bestimmen. Zu diesem Zweck werden die experimentellen Daten zu einer Schrittgröße von 0 nm extrapoliert. Der Schnittpunkt mit der X-Achse liegt bei -2.45 nm, was (unter Einbeziehung der zur α -Helix der *converter* Domäne

leicht abgeknickten Halsdomäne) einem Abstand zu der Aminosäure 761 von ~ 2.8 nm entspricht. Dieser Wert befindet sich damit in der SH1-SH2 Region (also innerhalb der Motor-domäne). Damit ergibt sich beispielsweise für natives Myosin eine Länge des Hebelarmes von ~ 10 nm.

(4) Der Hebelarm bewegt sich durch den „*power stroke*“ um $\sim 30^\circ$

Wenn man ein Modell annimmt, wonach der Hebelarm eine relativ feste Struktur darstellt und sich senkrecht zu der vom Aktinfilament vorgegebenen Achse um einen bestimmten Punkt rotiert, so läßt sich aus der Steigung der resultierenden linearen Regression von 0.50 auf eine Drehung des Hebelarmes um 30° schließen.

5.3. Diskussion

(1) Myosinkonstrukte mit künstlichem Hebelarm sind funktionelle Motormoleküle

Grundsätzlich verfügen die verschiedenen Moleküle aus der Familie der Myosine über eine homologe Motordomäne und unterscheiden sich in Art und Anzahl der leichten Ketten und Schwanzregion (Goldman, 1998). Die Variation in der Anzahl der Binderegionen der leichten Ketten generierte einen Satz funktioneller Motormoleküle, die unterschiedliche Gleitgeschwindigkeiten aufweisen (Uyeda *et al.*, 1996). Aber auch die Substitution dieser Binderegionen der leichten Ketten durch einen künstlichen Hebelarm ändert nichts an der Fähigkeit des resultierenden Motormoleküls, Schritte zu erzeugen. Die im Rahmen dieser Arbeit erstmals auf Einzelmolekülebene charakterisierten Konstrukte mit einem künstlichen Hebelarm aus α -Aktinin wurden von Mike Anson und Kollegen (Anson *et al.*, 1996) zum Teil (M761-1R und M761-2R) in der *in vitro* Motilität charakterisiert. Ihre Gleitgeschwindigkeit wurde wesentlich durch die Art der Ankopplung ans Substrat bestimmt, bei Verwendung eines Antikörpers zur spezifischen Anbindung war diese vergleichbar mit der für natives *Dicystostelium* Myosin ($2.5 - 3.3 \mu\text{m/s}$). In ihrer Kinetik weichen sie nicht signifikant vom Verhalten des Wildtyps ab (Anson *et al.*, 1996; Kurzawa *et al.*, 1997; Ritchie *et al.*, 1993).

Die Entfernung der essentiellen leichten Kette reduziert die Gleitgeschwindigkeit und hat eine Abnahme der isometrischen Kraft um $>50\%$ zur Folge (VanBuren *et al.*, 1994), weil

mit der leichten Kette vermutlich der α -helikale native Hebelarm stabilisiert wird. Eine Ersetzung des nativen Hebelarms durch eine andere Struktur ähnlicher Rigidität (wie α -Aktinin) hat dagegen keinen Einfluß auf die Fähigkeit des Myosinmoleküls, mit Aktin zu wechselwirken und Schritte zu generieren. Im Gleitsassay und auf Einzelmolekülebene ist das Verhalten der hier untersuchten Myosinkonstrukte dem von nativen Myosin vergleichbar. Damit scheinen unter nicht-isometrischen Bedingungen die Binderegion der leichten Ketten kein notwendiger Bestandteil des Myosins für die Wechselwirkung mit Aktin darzustellen. Es bleibt zu klären, in wieweit die Konstrukte in der Lage sind, auch Kräfte zu generieren. Die hier vorgestellten Messungen sind auf geringe Kräfte reduziert, je nach Steifheit der verwandten Nadel wurden maximal Kräfte von ~ 1 pN gemessen.

(2) Die Schrittgröße ist proportional zur Länge des Hebelarms

Die Ergebnisse der Messungen an Konstrukten mit unterschiedlich langem Hebelarm bestätigen die „lever arm Hypothese“ direkt auf Einzelmolekülebene. Ergänzt durch die Messungen an doppelköpfigen Motoren (HMM, HMM-2R) und den Vergleich von Konstrukten mit nativem und künstlichem Hebelarm wurde bewiesen, daß die gemessenen Schrittgrößen nur von der Hebelarmlänge abhängen. Damit wird das Modell unterstützt, wonach kleine strukturelle Umlagerungen in der katalytischen Domäne durch den Halsbereich in seiner Funktion als Hebelarm in Verschiebungen im nm-Bereich umgesetzt werden.

In der Literatur gibt es immer noch Uneinigkeit über die tatsächliche Schrittgröße von Myosin II (Finer *et al.* 1994; Molloy *et al.*, 1995; Guilford *et al.*, 1997; Tyska *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 1998). Wie im 2. Und 3. Kapitel dieser Arbeit ausführlich gezeigt, beträgt die Schrittgröße ~ 5 nm. Die bemerkenswerte Konsistenz der hier vorgestellten Meßergebnisse stützt die Genauigkeit der verwandten Meß- und Analysemethoden. Aus der Verschiebung der Verteilung einiger 100 Wechselwirkungen läßt sich die Schrittgröße mittels der Histogrammmethode (Molloy *et al.*, 1995) auf $<0,5$ nm genau bestimmen.

(3) Der Drehpunkt des Hebelarmes liegt innerhalb der Motordomäne

Mittels der Regressionsanalyse läßt sich extrapolieren, daß sich der Hebelarm um ca. 2,8 nm von dem Beginn der Halsdomäne (Aminosäure 761[780 in Huhn]) in die Motordomäne hinein erstreckt. Aus den strukturellen Beobachtungen (Dominguez *et al.*, 1998; Kinose *et al.*, 1996) sind in diesem Bereich zwei Glyzine als möglicher Drehpunkt vorgeschlagen

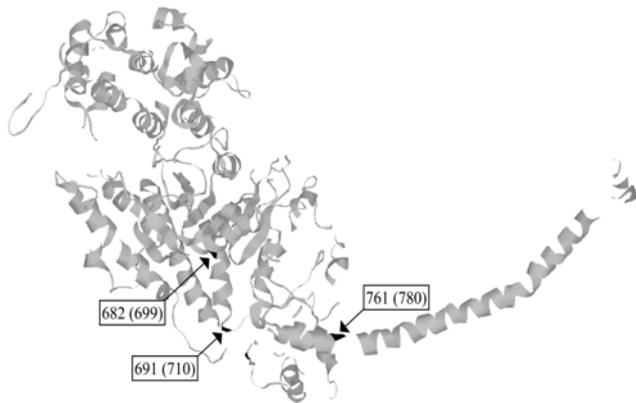


Abb. 5.10.:Huhn S1 (nach Rayment *et al.*,1993a), die Aminosäuren 691[710], 682[699] (potentielle Angelpunkte) und 761[780] (Beginn der Halsdomäne) sind schwarz markiert.

worden. In der direkten Verlängerung der α -Helix des natürlichen Hebelarmes liegt zum einen Gly691 [710 in Huhn] als möglicher Kandidat. Die Entfernung zwischen den Aminosäuren ASP 761 [ASP 780] und GLY691 [GLY710] beträgt 2.66 nm. Daneben steht aber auch Gly682 [Gly699 in Huhn] zur Diskussion, der Abstand zwischen diesem potentiellen Angelpunkt und dem Beginn der Halsdomäne ist 3.43 nm. Mit der hier vorgestellten Analyse kann zwischen ihnen nicht unterschieden werden, da der zweite mögliche Angelpunkt (680[699]) in relativ geringem Abstand (1.88 nm) und in einem fast senkrechten Winkel (110°) relativ zur Achse des Hebelarmes zum potentiellen Drehpunkt 691[710] liegt, miteinander verbunden durch eine rigide α -Helix. Verschiedene Arbeitsgruppen haben Mutanten charakterisiert, bei denen eines der beiden Glyzine ausgetauscht wurde. Im Gleitassay erreichten diese Konstrukte Geschwindigkeiten, die lediglich 10% der nativen Myosins betragen (Patterson *et al.*, 1997). Außerdem wiesen sie eine veränderte Affinität für Nukleotide und längere Aktinbindezeiten auf (Patterson *et al.*, 1998). Eine Charakterisierung der unterschiedlichen Moleküle auf Einzelmolekülebene bezüglich deren Schrittgröße könnte helfen, den tatsächlichen Hebelarmansatz zu bestimmen. Daneben bietet sich der Vergleich mit unkonventionellen Myosinen an. Bei Myosin V (Mehta *et al.*, 1999) führt der verlängerte Hebelarm (6 leichte Ketten, Länge ~ 23 nm) zu einer deutlich größeren Schrittgröße von 36 nm. Dies erfordert eine Drehung des Hebelarmes um 100° . Ein weiterer

Hinweis darauf, daß verschiedene Drehwinkel bei unkonventionellen Myosinen gefunden werden, sind die Messungen der Schrittgrößen von *Brushborder* Myosin I und Myr1 (Veigel *et al.*, 1999). Beide haben eine Schrittlänge von ~12 nm, aber BBMI verfügt über 3 leichte Ketten, während Myr1 mit 6 leichten Ketten einen fast doppelt so langen Hebelarm aufweist. Alternativ könnten aber auch noch andere Mechanismen involviert sein, ein zu der hier vorgestellten Untersuchung von Myosin II Konstrukten mit unterschiedlich langer Halsdomäne vergleichbarer Ansatz könnte dies klären.

(4) Der Hebelarm bewegt sich durch den „*power stroke*“ um ~30

Um die Größe der Rotation der Halsdomäne während des Kraftschlags zu bestimmen, wurden unterschiedliche Techniken angewandt. An Kammuschel-Muskelfasern beobachteten Baker *et al.* (1998) mittels EPR Techniken (*electron paramagnetic resonance*) eine deutliche (mind. 30°) axiale Rotation der leichten Kette des Myosins, allerdings gelang ihnen dies nicht bei Muskelfasern aus Kaninchen. Aus cryoelektronenmikroskopischen Beobachtungen von mit S1 dekoriertem F-Aktin in An- und Abwesenheit von MgADP schlossen Whittaker *et al.* (1995) auf eine 23° Drehung der Halsdomäne infolge der Dissoziation von ADP für glatten Muskel, und auch Jontes *et al.* fanden mit der gleichen Methode eine 32° Drehung bei BBMI (brush border Myosin I) nach der Freisetzung von ADP. Indem das atomare Modell von S1 in die aus Fluoreszenzpolarisation und Röntgenstreuung bestimmte Struktur der aktiven Querbrücken von Muskel aus Insektenflügel eingepaßt wurde, beobachtete Taylor *et al.* (1999) einen in zwei Abschnitte unterteilten Kraftschlag, bei dem die Motordomäne zunächst beim Übergang von schwacher zu starker Anbindung über dem Aktinfilament abrollte und anschließend einen 5-6 nm großen Kraftschlag ausführte (entsprechend ~35°).

Mit spektroskopischen Methoden (fluoreszente Probe an der leichten Kette) gelang Irving und Kollegen der Nachweis, daß sich die regulatorische leichte Kette um 2-3° bewegt, wenn der kontraktierende Muskel verkürzt oder verlängert wird (Corrie *et al.*, 1999; Hopkins *et al.*, 1998; Irving *et al.*, 1995). Unter der Annahme, daß nur ein geringer Anteil der Köpfe zu dieser Winkeländerung beiträgt, errechneten sie einen Drehwinkel von ~30°. Palm *et al.* (1999) bestimmten die maximale axiale Bewegung der Halsdomäne von Myosin zu 8,5 nm,

indem sie ein Modell erstellten, das auf den Ergebnissen ihrer FRET Messungen beruht. Mit Lumineszenz Resonanz Energie Transfer gelangten Xiao *et al.* (1998) zu dem Ergebnis, daß in einem Modell mit rigidem Hebelarm und festem Drehpunkt eine Rotation von 30° erfolgt. Die hier angeführten Ergebnisse wurden allerdings alle an einem Ensemble einer unbekannt Anzahl von Myosinen oder unter nicht physiologischen Bedingungen durchgeführt. Mit dem im Rahmen dieser Arbeit aus der Schrittweite erhaltenen Ergebnis wird eine solche Drehung der Halsdomäne um $\sim 30^\circ$ erstmals direkt auf Einzelmolekülebene bestätigt.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Motormolekül Myosin II auf Einzelmolekülebene mit einer neuartigen Meßmethode, basierend auf einer Kombination aus Mikronadel und Laserfalle, mechanisch charakterisiert werden. Im Vordergrund stand zunächst die Bestimmung der tatsächlichen Schrittgröße von Myosin II. Aufgrund der geringen Kräfte (pN), die bei der Wechselwirkung eines einzelnen Myosinmoleküls mit einem Aktinfilament auftreten, muß mit einem Instrument geeigneter Sensitivität gemessen werden. Ein entsprechend weicher Sensor unterliegt thermischer Bewegung, die deutlich größer als die zu messenden Distanzen (wenige nm) ausfällt. Die Interpretation der Rohdaten bedarf daher einer geeigneten Analyse-methode. Zu diesem Zweck wurde die Histogramm-Methode (Molloy *et al.*, 1995) bezüglich der Kriterien für Wechselwirkungen weiterentwickelt und verfeinert, um die Analyse möglichst präzise durchführen zu können. Mit der Histogramm-Methode wird die Position des Sensors während vieler einzelner Wechselwirkungen gemessen und in einem Histogramm relativ zu der Position des freien Sensors in einer gaußförmigen Verteilung betrachtet, dessen Verschiebung als Schrittgröße des Einzelmoleküls interpretiert wird.

Aus der Analyse der Verteilungen mehrerer hundert mit dem kombinierten Mikronadel-Laserfallen-System registrierten Wechselwirkungen einzelner Moleküle konnte die Schrittgröße der aus enzymatischem Verdau stammenden Myosinfragmente S1 und HMM zu jeweils $5,5 \pm 0,5$ nm ermittelt werden.

Über die Messung der Schrittgröße im *in vitro assay* hinaus wurde durch eine systematische Variation der Art der Anbindung des Einzelmoleküls an das Substrat gezeigt, daß die mechanische Funktionalität von Myosin nicht davon beeinflußt wird, ob nur ein Motorfragment direkt oder über einen Antikörper auf der Glasoberfläche befestigt wird, oder das intakte Molekül ähnlich zur Situation im Muskel in ein dickes Filament eingebunden ist. Diese Untersuchungen zeigen, daß Ergebnisse aus *in vitro* Messungen an isolierten Molekülen auch repräsentativ für das Verhalten des Motors *in vivo* sind.

Myosin II liegt im Muskel als zweiköpfiges Molekül vor, so daß ein möglicher Einfluß des zweiten Kopfes die Schrittgröße und damit eine Bewegung relativ zum Aktinfilament

potentiell vergrößern könnte (Tyska *et al.*, 1999). Aus diesem Grund wurden mehrere vergleichende Untersuchungen an ein- und zweiköpfigen Myosinen durchgeführt. Die aus tryptischem Verdau von nativen Myosin stammenden Fragmente S1 (einköpfig) und HMM (zwei Köpfe) unterschieden sich genauso wenig in ihrer jeweiligen Schrittgröße von ~5 nm, wie dies für ein- und zweiköpfiges Vollängenmyosin innerhalb eines LMM-Myosin Copolymers der Fall war. Ein in *Dictyostelium discoideum* exprimiertes Konstrukt mit einem künstlichen Hebelarm schließlich generierte ebenfalls eine Konformationsänderung gleicher Größe wie das entsprechende doppelköpfige Pendant. Damit ist eindeutig gezeigt worden, daß bei der Wechselwirkung des einzelnen Motors mit einem Aktinfilament nur einer der beiden Köpfe mechanisch an der Erzeugung des Einzelschrittes beteiligt ist, ohne daß sich durch eine Anbindung des zweiten Kopfes sich die Schrittgröße verdoppelt, wie von Tyska *et al.* (1999) behauptet. Innerhalb des Sarkomers kann aber der zweite Kopf ebenfalls eine funktionelle Rolle spielen, da eine gleichzeitige Interaktion mit einem weiteren, benachbarten Aktinfilament denkbar ist.

Im *standard in vitro assay* sind die einzelnen Myosinmoleküle willkürlich zum Aktinfilament orientiert, anstatt wie im Muskel durch die Einbettung ins zum Aktinfilament parallele dicke Filament in einer fest definierten Richtung. Die resultierende Schrittgröße von 5 nm könnte bei Mittelung über mehrere einzelne Motoren der Durchschnitt aus 0 nm (für senkrecht zum Aktinfilament positionierte Moleküle) bis >10 nm (bei paralleler Positionierung) sein (Tanaka *et al.*, 1998). Diese Hypothese widersprach eigenen Beobachtungen, wonach die Myosinschrittgröße nie signifikant von 5 nm abweicht, auch wenn man nur Wechselwirkungen aus einem kurzen Teilstück analysiert. Diese stammen mit hoher Wahrscheinlichkeit nur von einem einzelnen Motor, ohne daß das Aktinfilament schon zu mehreren weiteren, anders orientierten Motoren diffundiert war. Deshalb sollte untersucht werden, inwieweit die Fähigkeit zur Erzeugung einer Verschiebung relativ zum Aktinfilament und deren Größe bei physiologisch nicht korrekter Orientierung tatsächlich beeinträchtigt wird. Um die Orientierung des Myosinkopfes definieren zu können, wurden fluoreszenzmarkierte LMM-Myosin Cofilamente mit einem geringen (<1%) Anteil an nativem Myosin aggregiert. Auch bei senkrechter Orientierung eines LMM Cofilaments

relativ zum Aktinfilament kam es zu transienten Interaktionen mit dem inkorporierten Myosin, und unabhängig vom eingeschlossenen Winkel zwischen den Filamenten betrug die Schrittgröße immer 5 nm. Die Funktionsfähigkeit des Myosinkopfes ist damit unabhängig von dessen Orientierung zum Aktinfilament. Diese Anpassungsfähigkeit des Myosins setzt ein flexibles Teilstück zwischen der Motordomäne und der im dicken Filament inkorporierten Schwanzdomäne voraus. Die Richtung der Bewegung wird ausschließlich von der Anordnung des Aktinfilaments vorgegeben, und nach korrekter Ausrichtung der Motordomäne durch stereospezifische Anbindung ans Aktin wird demnach jeweils eine konstante Verschiebung generiert.

Die hier durchgeführten systematischen Untersuchungen haben nicht nur Einsicht in die detaillierte Funktionsweise des einzelnen Myosinmoleküls geliefert, sondern zeigen auch, daß die unterschiedlichen Messungen aus anderen Laboren untereinander und mit dem Verhalten des Moleküls *in vivo* vergleichbar sind. Unabhängig von der Art der Anbindung des Myosins oder einem seiner Fragmente, unabhängig von der Anzahl der Köpfe des einzelnen Moleküls und unabhängig von der Orientierung des Myosinkopfes relativ zum Aktinfilament, beträgt die Schrittgröße von Myosin II 5 nm. Damit konnte belegt werden, daß dem widersprechende Ergebnisse anderer Untersuchungen nicht, wie häufig behauptet (Guilford *et al.*, 1997; Tyska *et al.*, 1999; Yanagida *et al.*, 2000), auf Unterschiede innerhalb der *in vitro assays* (Anbindung, Orientierung etc.) zurückzuführen sind, sondern vermutlich aus einer ungenauen Analyse (durch Selektion der Daten oder die Einbeziehung einer zu geringen Anzahl an Wechselwirkungen) der Rohdaten resultieren. Keine einzige der beobachteten Wechselwirkungen bestand aus mehr als einem Schritt infolge der Hydrolyse eines ATP Moleküls, konsistent mit den Beobachtungen anderer Labors (Mehta *et al.*, Warshaw *et al.*, Molloy *et al.*), aber im Widerspruch zu den Beobachtungen von Kitamura *et al.* (1999).

Der Zyklus der chemomechanischen Transduktion verläuft in mehreren Teilschritten, so gehen dem kraftgenerierenden *power stroke* elektrostatische, schwache Wechselwirkungen voraus. Diese sind nur sehr kurz und werden in Anwesenheit von ATP durch die dominierenden starken Wechselwirkungen mit der damit verbundenen Erzeugung des Kraftschlags über-

deckt. Durch die Verwendung von Nukleotidanaloga ist es möglich, solche Zwischenschritte des Querbrückenzyklus isoliert zu untersuchen. Mittels hoher Konzentrationen des nur sehr langsam hydrolysierbaren Nukleotidanalogs ATP γ S konnten auf diese Weise erstmals auf Einzelmolekülebene schwache Wechselwirkungen direkt detektiert und charakterisiert werden. Sie führen im Gegensatz zur starken Wechselwirkung zu keiner meßbaren Konformationsänderung des Motors. Erst unterhalb einer ATP γ S-Konzentration von 1 μ M kommt es zu einer resultierenden Verschiebung, die möglicherweise aus einer reversiblen Konformationsänderung der zeitweise nukleotidfreien Motordomäne oder einer ADP-induzierten, starken Wechselwirkung des Myosinkopfes mit dem Aktinfilament resultiert. Bei einer ATP γ S-Konzentration von <1 nM entspricht diese der durch ATP Hydrolyse induzierten Schrittgröße.

Um zu erklären, wie Myosin Schritte von einigen nm ausführen kann, wurde basierend auf der Struktur von Myosin II postuliert (Rayment *et al.*, 1993), daß die Halsdomäne als Hebelarm fungiert und kleine Konformationsänderungen in der Kopfdomäne als Folge der ATP Hydrolyse durch eine Rotation des Hebelarms verstärkt werden. Mit der Struktur-Funktionsanalyse genetisch hergestellter Myosinmutanten mit künstlicher Halsregion unterschiedlicher Länge konnte diese Hebelarm Hypothese erstmals auf Einzelmolekülebene direkt überprüft werden. Dabei zeigte sich, daß der Ersatz des nativen Hebelarmes mit den beiden leichten Ketten durch eine künstliche Struktur ähnlicher Rigidität die Fähigkeit des Motors, Bewegung zu generieren, nicht beeinträchtigt. Aber auch bei ersatzloser Entfernung der nativen Halsdomäne ist das resultierende Konstrukt noch in der Lage, Schritte von 1-2 nm zu erzeugen. Die Funktion der leichten Ketten im Myosinmolekül scheint damit neben der Stabilisierung der α -Helix Hebelarmes lediglich regulativer Natur zu sein, sie sind aber kein notwendiger Bestandteil einer „minimalen Motoreinheit“, da Konstrukte sowohl mit künstlichem Hebelarm als auch ohne die native Halsdomäne fähig zur Generierung von Bewegung sind.

Die überraschend genaue, lineare Korrelation zwischen Länge des natürlichen oder künstlichen Hebelarmes mit der jeweiligen Schrittgröße zeigte, daß die Schrittgröße ausschließlich durch die Länge des Hebelarmes festgelegt wird. Über die Extrapolation der jeweiligen Schrittgrößen in Abhängigkeit von der Hebelarmlänge wurde belegt, daß der Dreh-

punkt des Hebelarmes in der Motordomäne liegen muß, der durch den errechneten Abstand zur Hebelarmlänge des kürzesten Konstrukts bestimmte Drehpunkt deckt sich bemerkenswert gut mit strukturellen Beobachtungen. Der Drehwinkel des Hebelarms konnte mittels der linearen Regression direkt ermittelt werden und beträgt ca. 30° .

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit wurden profunde Erkenntnisse über die Mechanik der verwandten Konstrukte und Myosin im allgemeinen erlangt: Die kleinen strukturellen Änderungen in der katalytischen Domäne des Motors, die durch die ATP-Hydrolyse induziert werden, werden über die Konverterdomäne auf die Halsregion übertragen, durch deren längliche Struktur können durch deren Drehung um 30° Verschiebungen in der Größe einiger nm generiert werden. Dabei ändert sich die Größe der Verschiebung lediglich proportional zur Hebelarmlänge, wenn die Halsregion durch eine künstliche Struktur ähnlicher Rigidität ersetzt wird. Für die Fähigkeit des Motors, den vollständigen Kraftschlag auszuführen, ist die Dimerisierung zu einem doppelköpfigen Molekül und die Inkorporierung der Schwanzdomäne in dicke Filamente (wie im Muskel) nicht relevant. Durch ein flexibles Element (vermutlich zwischen S1 und S2 Domäne) ist der Motor in der Lage, sich im Vorfeld der Anbindung in die vom Aktinfilament vorgegebene Richtung zu orientieren.

Neben der Schrittgröße ist die Kraft, die ein Motormolekül generieren kann, ein weiterer wichtiger Parameter, um dessen mechanische Eigenschaften zu charakterisieren. Zukünftige Messungen der von Myosinen mit unterschiedlicher Hebelarmlänge erzeugten Kräfte würden Rückschlüsse auf die Rigidität des Hebelarmes zulassen: Im Falle eines rigiden Hebelarmes und einer konstanten Drehung um einen Angelpunkt wären die resultierenden Kräfte umgekehrt proportional zur jeweiligen Länge des Hebelarmes. Wenn dieser aber eine für die vorliegende α -Helix typische Flexibilität aufweisen würde, müßten die Kräfte umgekehrt zum Quadrat der Hebelarmlänge proportional sein (Howard & Spudich, Anhang zu: Uyeda *et al.*, 1996). Damit könnte der stabilisierende Einfluß der leichten Ketten auf den nativen, α -helikalen Hebelarm bewiesen werden, möglicherweise wird dadurch die Fähigkeit zur Kraftzeugung bestimmter Myosine reguliert. Für Moleküle mit künstlichem Hebelarm, wie sie hier bezüglich ihrer Schrittgrößen untersucht wurden, wäre ein Nachweis ihrer Fähigkeit,

Kräfte zu generieren, ein weiterer Beweis für ihre Leistungsfähigkeit als Motormolekül. Durch Ersetzen der für Schrittmessungen verwandten Nadeln durch solche höherer Steifheit könnten Kraftmessungen auch mit dem hier vorgestellten Meßaufbau erfolgen, ohne daß, wie bei Messungen mit der Doppellaserfalle, ein *Feedback* System etabliert werden müßte, zumal die mechanische Komplianz der Verbindung von Sensor und vorgespanntem Aktinfilament bei Messungen mit der Mikronadel vergleichsweise gering ist.

Wenn Myosin II auf Einzelmolekülebene mechanisch komplett verstanden ist, könnte eine Erweiterung der experimentellen Untersuchungen auf Wechselwirkungen multipler Motoren erfolgen. Mit dem hier vorgestellten kombinierten Mikronadel-Laserfallen System besteht die Möglichkeit, direkt mit Nadeln höherer Steifigkeit zu messen, wie mehrere Motoren gleichzeitig mit dem Aktinfilament wechselwirken und welche Kräfte und Geschwindigkeiten dabei auftreten. Dabei könnte untersucht werden, ob es eine wechselseitige Beeinflussung gibt. Mit Messungen an dicken Filamenten parallel zum Aktinfilament könnte das Verhalten von Myosin im Muskelverband simuliert werden.

Die mit dem kombinierten Mikronadel-Laserfallen *Transducer* gemessenen und der hier vorgestellten Analysemethode erlangten Ergebnisse zeichnen sich durch eine bemerkenswerte Konsistenz aus. Auf diese Weise ist es folglich möglich, die Schrittgröße eines Motormoleküls mit einer Genauigkeit von besser 1 nm zu bestimmen, wenn die Position einiger hundert einzelner Wechselwirkungen analysiert wird. Da die Schrittgröße ein geeigneter Parameter ist, um ein Molekül mechanisch zu charakterisieren, birgt diese Methode ein beträchtliches Potential für Funktionsanalysen diverser Motoren. Bislang erfolgte eine Einteilung gentechnisch erzeugter Mutanten in im Gleitassay voll/teilweise/nicht funktionsfähige mutierte Motoren (Ruppel *et al.*, 1994). Über die individuelle Analyse ihrer Fähigkeit zur Generierung von Verschiebungen auf Einzelmolekülebene ist eine präzisere Charakterisierung möglich. Durch gezielte Mutationen, z.B. am vermuteten Angelpunkt des Hebelarmes oder an der Nukleotid- oder Aktinbindestelle können durch eine Kombination molekularbiologischer Methoden mit der Analyse auf Einzelmolekülebene Struktur-Funktionsbeziehung in allen Einzelheiten analysiert werden.

Mit der Möglichkeit, mutierte Motormoleküle auf Einzelmolekülebene zu charakterisieren, werden auch Anwendungen im medizinischen Bereich denkbar, z.B. bei klinisch auffälligen Funktionsstörungen als Folge von Mutationen von Myosin, wie es bei familiärer hypertropher Kardiomyopathie oder dem Usher's Syndrom (erbliche Taub- und Blindheit) der Fall ist. Myosin mit der entsprechenden Mutation kann gentechnisch exprimiert und *in vitro* durch direkte Vergleiche mit dem Wildtyp studiert werden, um die Folgen der Mutation für die mechanische Funktionsfähigkeit des Moleküls zu bestimmen und daraus therapeutische Ansätze zu entwickeln.

Der Vergleich der mechanischen Eigenschaften (z.B. Laufrichtung, Schrittgröße, Prozessivität) diverser unkonventioneller Myosine und die Korrelation mit deren spezifischen Aufgaben und gleichzeitig mit der jeweiligen Struktur eröffnet eine weitere Möglichkeit zum umfassenden Verständnis der Funktionalität molekularer Motoren. Wenn die einzelnen Struktur-Funktionsbeziehungen geklärt sind, könnten Mutanten gentechnisch erzeugt werden, deren Eigenschaften gezielt verändert wurden. So wie durch Ersetzung des nativen Hebelarmes mit einer künstlichen Struktur unterschiedlicher Länge die Gleitgeschwindigkeit und Schrittgröße direkt variiert werden kann, könnte man eventuell einen Motor mit veränderter Laufrichtung oder Prozessivität klonieren.

Neben den beschriebenen Struktur-Funktionsanalysen an unkonventionellem oder gezielt verändertem Myosin bietet sich ein Vergleich mit der Familie der Kinesine an. Wie bei Myosin sind auch beim Kinesin die mechanischen Konformationsänderung direkt mit dem ATPase Zyklus gekoppelt, d.h. in beiden Molekülen findet eine Kommunikation zwischen der jeweiligen Bindestelle für ATP, für Aktin bzw. für Mikrotubuli und zwischen den mechanischen Elementen statt. Vor allem die Bindestelle für ATP ist bei Myosin und Kinesin strukturell sehr ähnlich (Kull *et al.*, 1996), 2 *loops* fungieren als „Schalter“, um die An- oder Abwesenheit des hydrolysierten γ -Phosphats als Auslöser von Konformationsänderungen weiterzugeben. Diese Weiterleitung erfolgt mechanisch mittels einer Helix, die gewissermaßen als Kolben fungiert. Die Bindungsstellen für die Polymere (Aktin oder Tubulin) und die mechanischen molekularen Bestandteile sind mit dieser Helix verbunden, allerdings weisen Kinesin und Myosin dabei grundlegende Unterschiede auf. Kinesin bindet hauptsächlich über einen 12

Aminosäuren langen *loop* an den Mikrotubulus, bei Myosin sind dagegen ~140 Aminosäuren in die Aktinbindung involviert (Woehlke *et al.*, 1997). Konventionelles Kinesin legt auf einem Mikrotubulus Schritte von 8 nm Länge zurück (Svoboda *et al.*, 1993), ohne daß eine dem Hebelarm in Myosin ähnliche Struktur offensichtlich ist. Stattdessen wird die Fortbewegung als Folge einer kleinen Konformationsänderung des *neck linker peptids* über die Bindung eines zweiten Kopfes an die nächste Tubulin-Bindungsstelle bewerkstelligt (Rice *et al.*, 1999).

Auch in der Familie der Kinesine gibt es Motoren, die sich in unterschiedlichen Richtungen auf dem Mikrotubulus bewegen (Kinesin, *ncd*) und einen unterschiedlichen Grad an Prozessivität aufweisen. Die Erforschung der Struktur und der damit verbundenen mechanischen Eigenschaften der verschiedenen Kinesine und die Korrelation mit den entsprechenden Struktur-Funktionsbeziehungen der Myosinmotoren wird weitere Einblicke in die Mechanismen der Motormoleküle und deren Phylogenese ermöglichen.

Mit der Möglichkeit der Expression veränderter Motormoleküle kombiniert mit der Analyse ihrer Funktion auf Einzelmolekülebene, wie sie mit dem hier vorgestellten Meß- und Analysesystem auf nm-Genauigkeit erfolgen kann, könnten in Zukunft gezielt Motormoleküle generiert werden, um diese nutzbringend einzusetzen. Besonders interessant scheint im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz die Klärung der Frage, wie molekulare Motoren für den Transport kleiner Lasten eingesetzt werden können. Damit wäre es beispielsweise möglich, Wirkstoffe in bestimmte Regionen der Zelle zu transportieren und lokal zu konzentrieren, um deren Wirksamkeit zu verbessern. Wenn ein Motormolekül strukturell soweit angepaßt werden kann, daß es auch extrazellulär zu kontrollierbarer Bewegung auf einem künstlichen Substrat und zum Transport künstlicher Frachten fähig ist, ist auch ein Einsatz in der Nanotechnologie denkbar. Die Existenz von solchen Motoren minimaler Größe (wenige nm), die angetrieben über ATP gezielt kleine Lasten transportieren, würde diverse Anwendungen finden. Durch die Fortschritte im Verständnis der Wirkungsweise molekularer Motoren, die durch Untersuchungen auf Einzelmolekülebene korreliert mit strukturellen und molekularbiologischen Techniken in den letzten Jahren stattgefunden haben, ist man der Vorstellung biologischer Miniroboter ein entscheidendes Stück näher gekommen.

Methoden

Die Detektion der Wechselwirkung einzelner Myosinmotoren mit einem vorgespannten Aktinfilament erfolgte mittels der kombinierten Mikronadel/Laserfallentechnik. Die Meß- und Analysemethoden waren in allen durchgeführten Experimenten einheitlich und wurden grundsätzlich im zweiten und dritten Kapitel dieser Arbeit vorgestellt und diskutiert. Der detaillierte Meßaufbau und die Bestandteile des *in vitro motility assays* werden im Folgenden beschrieben. Je nach Experiment unterschieden sich die einzelnen Komponenten des *in vitro motility assays* teilweise, beispielsweise durch Verwendung anderer Formen des Myosins oder eines anderen Substrats. Diese veränderten Bestandteile werden im Anschluß an den allgemeinen Methodenteil (experimenteller Aufbau, *motility assays*, Analyse) dargestellt.

1. Experimenteller Aufbau

In der Abbildung M1 ist der experimentelle Aufbau des kombinierten Mikronadel-Laserfallen Meßsystem dargestellt. Die physiologische Lösung mit einzelnen Aktinfilamenten und kleinen Latexkugeln ($d = 1 \mu\text{m}$) befindet sich in einer kleinen Kammer (vgl. Abb. M.2.) aus 2 Deckgläsern und einem Teflonabstandshalter (Dicke 1 mm). Auf dem unteren Deckglas wurden einzelne Myosinmoleküle adsorbiert. Seitlich kann eine Mikronadel leicht geneigt in die Kammer eingeführt werden. Die Mikronadel kann mittels eines Mikromanipulators manuell oder elektronisch (3D Positionsregelung, M462, Newport) bewegt werden. Die ganze Kammer kann ebenfalls manuell oder über einen Piezotisch (P730-20, Physik Instrumente) bewegt werden. Der gesamte Aufbau befindet sich auf einem Epifluoreszenz Mikroskop (Axiovert, Zeiss), welches auf einem schwingungsgedämpften Tisch steht.

Mittels einer Laserfalle kann eine sich in der Lösung befindliche Latexperle festgehalten und manipuliert werden. Die Laserfalle entsteht durch die Kombination eines IR-Diodenlasers (SK9648 Schäfer & Kirchhoff) mit einem Objektiv hoher numerischer Apertur (Achroplan 100x, Zeiss) und kann mittels eines Goniometers in der Ebene verfahren werden,

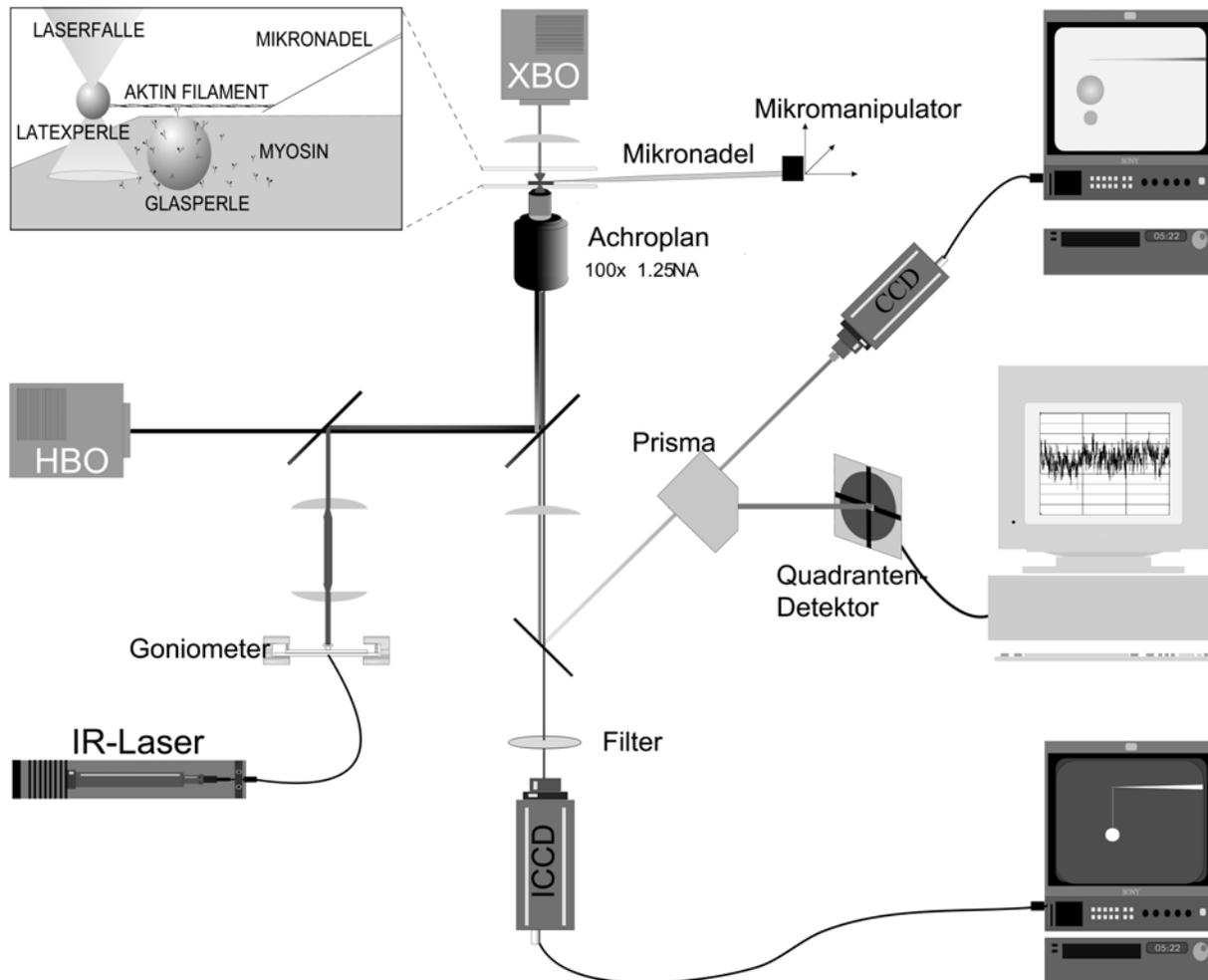


Abb. M1: Schematischer Aufbau der Apparatur zur Detektion des mechanischen Verhaltens einzelner Motor-moleküle. In der ovalen Skizze ein vergrößertes Bild des Inneren der Kammer (Größenverhältnisse stimmen nicht). Eine detaillierte Erklärung zu der Abbildung findet sich im Text.

die Steuerung in z-Richtung erfolgt über den Fokus des Objektivs. Der maximale Arbeitsabstand zum Substrat, der mit diesem Objektiv möglich ist, beträgt $\sim 25 \mu\text{m}$.

Die Objekte werden gleichzeitig im Hellfeld (Mikronadel, Latexperlen und Silicaperlen) und in Epifluoreszenz (fluoreszenzmarkierte Aktinfilamente, Latexperlen und Mikronadel) über Videokameras (CCD Kamera Hamamatsu C3077; ICCD Kamera, Hamamatsu, C2400-87) beobachtet, die Beleuchtung/Anregung erfolgt über eine Xenon-(XBO)/Quecksilber-Bogenlampe (HBO). Über dichroitische Spiegel werden Laserlicht, Hellfeldbeleuchtung und Epifluoreszenz getrennt.

Die Position der Nadelspitze, die als Sensor dient wird über Vergrößerung des Hellfeldbildes auf eine Quadrantendiode (S1557, Hamamatsu) projiziert aus und aus der Differenz

der Quadrantenströme mit einer Auflösung < 1 nm bestimmt. Die Bandbreite des Detektors beträgt > 8 kHz.

Die Glasnadeln werden zunächst mit einem Puller (Sutter) aus 1 mm dicken BK-7 Glasstäben ausgezogen. In einem zweiten Schritt wird mittels eines erhitzten Platindrahtes die Spitze noch feiner ausgezogen. Bei Bedarf kann die Spitze unter einem Mikroskop noch geschnitten werden. Die flexible Nadelspitze verfügt über eine Länge von 50–100 μm und eine Dicke von < 1 μm (vgl. 2. Kapitel, Abb. 2.2.).

Die Kammer für das *motility assay* besteht aus einem Abstandhalter aus Teflon und zwei Deckgläsern. Sie ist in Abb. M2. skizziert. Auf dem unteren Deckglas sind Silicagasperlen des Durchmessers 2,5 μm (Bangs) festgeklebt, die als Podeste für die

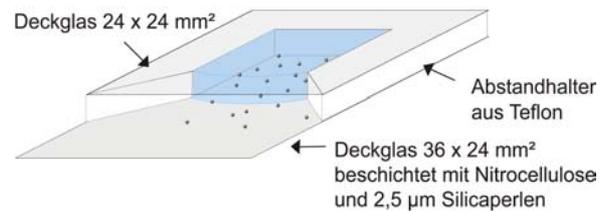


Abb. M2: Skizze der Kammer für das *motility assay*.

Myosinmoleküle dienen und ihnen eine Wechselwirkung mit dem darüber aufgespannten Aktinfilament ermöglichen. Das Fassungsvermögen der Kammer beträgt 300 μl . Von einer Seite kann die Kammer befüllt werden, hier wird auch die Mikronadel eingeführt.

Vor dem Einbringen in die Kammer wird die Nadelspitze für kurze Zeit (1 min) in eine Lösung eingetaucht, die NEM-modifiziertes Myosin (~ 20 $\mu\text{g/ml}$) und fluoreszenzmarkiertes BSA (0,2 $\mu\text{g/ml}$) enthält, um die Nadel für die Aktinfilamente haftend und im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Die biochemische Zusammensetzung der Lösungen wird im nächsten Abschnitt aufgeführt.

2. *In vitro motility assay*

2.1. Puffer und Lösungen

2.1.1. Puffer für den Standard *in vitro motility assay*

Alle Standard-Experimente werden in AB-Puffer (25 mM Imidazolhydrochlorid pH 7,4; 25 mM KCl; 4 mM MgCl_2 ; 1 mM EGTA; 3 mg/ml D-Glucose; *Anti-Bleach*: 10 mM DTT;

18 µg/ml Catalase; 0,1 mg/ml Glucoseoxidase) durchgeführt, wenn nicht anders angegeben, beträgt die ATP-Konzentration 1 µM. Für Messungen an nativen Myosin werden dem Puffer zusätzlich 0,3 M KCl beigegeben, um ein Aggregieren des Myosins zu verhindern.

2.1.2. Puffer für die Messungen mit ATP[γS]

Für die Messungen mit ATP[γS] (4. Kapitel) wird mit einem modifizierten Puffer gemessen, um durch die Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen an KCl, EGTA, Imidazol und MgCl₂ die Ionenstärke aller Lösungen anzupassen. Im Folgenden sind die Endkonzentrationen dieser Bestandteile für die jeweiligen 10 mM ATP[γS]-Konzentrationen angegeben:

10 mM ATP[γS]	10 mM KCl, 1 mM EGTA, 10 mM Imidazol, 13 mM MgCl ₂
1 mM ATP[γS]	45 mM KCl, 1 mM EGTA, 10 mM Imidazol, 4 mM MgCl ₂
0,1 mM ATP[γS]	49,5 mM KCl, 1 mM EGTA, 10 mM Imidazol, 3,1 mM MgCl ₂
10 µM ATP[γS]	50 mM KCl, 1 mM EGTA, 10 mM Imidazol, 3 mM MgCl ₂
1 µM ATP[γS]	50 mM KCl, 1 mM EGTA, 10 mM Imidazol, 3 mM MgCl ₂
0,1 µM ATP[γS]	50 mM KCl, 1 mM EGTA, 10 mM Imidazol, 3 mM MgCl ₂

Der pH-Wert aller Lösungen beträgt 7,4. In Abhängigkeit von der ATP[γS]-Konzentration wird der Lösung außerdem Hexokinase und Glucose beigegeben. Für 10 mM ATP[γS] werden 0,05 u/ml Hexokinase und 200 mM Glucose beigegeben, mit der Verdünnung von ATP[γS] werden auch Hexokinase und Glucose proportional dazu verdünnt. Zusätzlich wird allen Lösungen noch Anti Bleach beigegeben (10 mM DTT; 18 µg/ml Catalase; 0,1 mg/ml Glucoseoxidase).

2.2. Substrat

2.2.1. Beschichtung des Substrats für Messungen an Myosinfragmenten

Für die Messungen an Myosinfragmenten werden Deckgläser mit 0,1% Nitrozellulose in Amylacetat (Fullam) beschichtet, darin gelöst sind Silikaperlen (Durchmesser 2,5 µm, Bangs).

Mittels einer Pipettenspitze werden 2 µl des Gemisches auf ein gereinigtes Deckglas gegeben, gleichmäßig verteilt und luftgetrocknet.

2.2.2. Beschichtung des Substrats für Messungen an LMM Copolymeren

Für Messungen an LMM Copolymeren wird die Oberfläche nicht mit Nitrozellulose beschichtet, die Silikaperlen sind in diesem Fall in destilliertem Wasser gelöst, oder aber geätzte Deckgläser werden verwendet (siehe Methoden/4. Abschnitt).

2.2.3. Beschichtung des Substrats für Messungen an Myosinkonstrukten aus *Dictyostelium discoideum* (Kapitel 5)

Für die Messungen an Myosinkonstrukten aus *Dictyostelium discoideum* wird das gereinigte Deckglas zunächst wie in 2.2.1. beschrieben mit einem Gemisch aus in Amylacetat gelöster Nitrozellulose und Silikaperlen beschichtet. Für die mit einem HisTag versehenen Konstrukte wird zusätzlich mit einem entsprechenden Antikörper beschichtet, um eine spezifische Anbindung des Motors zu bewirken. Dieser Vorgang ist im 5. Abschnitt des Methodenteils näher beschrieben.

2.3. Proteine

2.3.1. Myosin

Myosin stammt von Kaninchen und wird mit Standardmethoden präpariert (Kielley & Harrington, 1960; Pardee & Spudich, 1982). Zunächst erfolgt nach Entnahme und Zerkleinerung für 10' die Extraktion in 0,5 M KCl; 10 mM Hepes pH 7; 5 mM MgCl₂; 2,5 mM Mg-ATP. Nach zweimaliger Zentrifugation (Kontron A8.24, 9 000 rpm, 45', 4°C; 20 000 rpm, 60', 4°C) wird das sich im Überstand befindliche Myosin durch Zugabe von 10 vol an kaltem, destillierten a. dest. gefällt. Das ausgefällte Myosin wird nach Inkubation (über Nacht bei 4°C) wieder zentrifugiert (Kontron A6.9, 9 000 rpm, 60', 4°C). Das Pellet wird in 0,5 M KCl gelöst und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.3.2. HMM (nach Margossian and Lowey, 1978)

Myosin wird über Nacht in 0,6 M NaCl; 2 mM MgCl₂; 20 mM NaH₂PO₄ pH 7.0; 1 mM DTT dialysiert. Die Myosinkonzentration wird auf 15 mg/ml eingestellt und die Lösung auf 25°C temperiert. α-Chymotrypsin (0,5 mg/ml) wird mit 0,5 mg Enzym auf 1 ml Myosinlösung zugegeben, nach 3' werden 0,02 vol einer 34 mg/ml PMSF-Lösung in Äthanol zugegeben (0°C). Über Nacht erfolgt ein weiterer Dialyseschritt in 30 mM NaCl; 5 mM NaH₂PO₄ pH 7.0; 1 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF. Am nächsten Tag erfolgt eine Zentrifugation (ZU Kontron TFT 70.38, 45 000 rpm, 60', 4°C), der Überstand enthält HMM und wird in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.3.4. S1 (nach Margossian and Lowey, 1978)

Myosin wird in einem Verhältnis 1:9 in AB-Puffer gelöst und für 15' auf Eis inkubiert. Das filamentöse Myosin wird zentrifugiert (ZU Kontron TFT 70.38, 13 000 rpm, 20', 4°C) und das Pellet in AB-Puffer resuspendiert. Die Myosinlösung wird auf 25°C erwärmt und 0,3 u/ml Papain zugegeben. Nach 8' werden 4 µl E64 (auf 5 ml gesamt) zugegeben und die Lösung auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation (ZU Kontron TFT 70.38, 22 000 rpm, 60', 4°C) wird der Überstand durch Amicon Filtration konzentriert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.3.5. NEM-Myosin (Meeusen and Cande, 1979)

Myosin wird über Nacht in 0,5 M KCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,9 bei 4°C dialysiert. Am folgenden Tag wird die Proteinkonzentration auf 10 mg/ml eingestellt und 20 mM NEM (Sigma, gelöst in 1% Äthanol) zugesetzt. Durch weitere Zugabe von NEM (2 mM Endkonzentration) wird das Myosin für 40' bei 25°C modifiziert. Anschließend erfolgt die Zugabe von DTT (4 mM Endkonzentration) und Dialyse in 0,5 M KCl und 50 mM Tris-HCl pH 7,9 bei 4°C über Nacht. Nach Klärung durch Zentrifugation (ZU Kontron TFT 70.38, 40 000 rpm, 60', 4°C) wird der Überstand in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.3.6. LMM

Aus der HMM Präparation liegt LMM im Pellet nach dem letzten Zentrifugationsschritt als verunreinigtes Aggregat bei niedriger Ionenstärke vor. Das Pellet wird in 0,6 M KCl und 50 mM Kalium Phosphatpuffer, pH 7.0 gelöst und 3 vol von 95% Äthanol werden hinzugegeben und für 2 h bei 4°C gerührt. Das ausgefällte Material wird zentrifugiert (10 000 rpm, 30'). Das Pellet wird resuspendiert in 0,6 M KCl und 50 mM Kalium Phosphatpuffer, pH 7.0 und dann mehrfach gegen mehrere Wechsel von Puffer dialysiert. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt (30 000 rpm, 90') und der Präzipitationsschritt mit Äthanol wird wiederholt. Über Nacht wird LMM gegen 0,03 M KCl und 10 mM Kalium Phosphatpuffer, pH 7.0 dialysiert, anschließend durch erneute Zentrifugation gesammelt und in einem minimalen Volumen von 0,6 M KCl und 50 mM Kalium Phosphatpuffer, pH 7.0 aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zur Fluoreszenzmarkierung von LMM werden 10 mg LMM mit 2 ml Puffer (0,6 M KCl; 10 mM Hepes pH 7.0) gelöst und mit Rhodamin (800 µl, gelöst in 50 µl DMSO) für 2 h auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt eine Aufreinigung über eine Gelfiltrationssäule. Die ersten Fraktionen (enthalten das markierte LMM) werden in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.3.7. Aktin (modifiziert nach Pardee und Spudich, 1982)

Nach Entnahme und Zerkleinerung der Rückenmuskulatur von Kaninchen wird für 12' in 0,5 M KCl; 0,1 M K_2HPO_4 ; 0,01 M PMSF extrahiert. Daran schließt sich ein Zentrifugationsschritt an (Kontron A6.9, 8000 rpm, 20', 4°C), das Pellet wird weitere zweimal für 10' mit 0,5 M KCl und 0,13 M $KHCO_3$ extrahiert und jeweils zentrifugiert (Kontron A6.9, 4000 rpm, 15', 4°C). Das Pellet wird in a.d. gelöst und der pH-Wert auf 8.6 eingestellt. Über 2-3 weitere Zentrifugationsschritte (Kontron A6.9, 8000 rpm, 15', 4°C) wird das Pellet mehrfach gewaschen und schließlich in kaltem Aceton aufgenommen und wiederum mehrfach gewaschen. Am nächsten Tag wird das Aktin-Acetonpulver bei -20°C eingefroren. Für die Präparation von G-Aktin wird das Aktin-Acetonpulver in 2 mM Tris-HCl pH 8; 0,2 mM Na_2ATP ; 0,2 mM $CaCl_2$; 0,005 % NaN_3 und 0,5 mM DTT extrahiert. Nach Zentrifugation (Kontron A8.24, 20 000 rpm, 20', 4°C) wird der Überstand durch Glaswolle filtriert. Für die Polymerisation zu F-

Aktin wird das Filtrat auf 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 1 mM Na₂ATP eingestellt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wird die KCl Konzentration auf 0,6 M erhöht und nach 30' zentrifugiert (Kontron TFT 70.38, 45 000 rpm, 60', 4°C). Das Pellet wird resuspendiert in 2 mM Tris-HCl pH 8, 0,2 mM Na₂ATP; 0,2 mM CaCl₂; 0,005 % NaN₃; 0,5 mM DTT und über Nacht dialysiert. Der Dialyseschritt und die Zentrifugation werden noch zweimal wiederholt (jeweils über Nacht). Schließlich befindet sich das G-Aktin im Überstand und wird in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.4. Markierung und Polymerisation der Aktinfilamente:

G-Aktin (2,9 mg/ml) wird in einer Lösung aus 100 mM KCl und 10 mM Hepes (pH 7,0) mit 10 µM TRITC-Phalloidin (Sigma, gelöst in Äthanol) bei 4°C für mindestens 1h versetzt. Für das *motility assay* wird die Lösung mit den Filamenten nochmals 1:10 000 mit AB-Puffer verdünnt.

2.5. Beschichtung der Latexperlen:

Latexperlen (Sigma Labs) werden 1:100 in AB-Puffer verdünnt und bei 0,5 M KCl mit 0,37 mg/ml NEM-Myosin und 0,25 µg/ml BSA-TMR beschichtet. Anschließend werden sie in 0,5 M KCl mit AB-Puffer gewaschen und im Ultraschallbad für 5' behandelt, um zu verhindern, daß sich Cluster bilden. Für die Verwendung im *motility assay* werden sie nochmals 1:100 verdünnt.

2.6. Durchführung des *motility assays*

Die Motorproteine werden in geringer Konzentration (< 1 µg/ml, Fragmente verdünnt in AB-Puffer, natives Myosin verdünnt in AB-Puffer mit 0,5 M KCl) für 10' in die Kammer gegeben, anschließend wird mehrmals mit AB-Puffer gespült, bevor die Lösung mit den Aktinfilamenten und Latexperlen eingespült wird. Anschließend wird die Kammer auf den Objektisch des Mikroskops befestigt und die mit NEM-Myosin und BSA-TMR beschichtete Mikronadel seitlich eingeführt. Nach Kalibrierung der Nadel (vgl. Kapitel 2) wird ein einzelnes Aktinfilament aus der Lösung an die Spitze der Nadel angeheftet, kontrolliert im Fluoreszenzbild

des Mikroskops. Mit der Laserfalle wird eine Latexperle eingefangen und am freien Ende des Aktinfilaments positioniert. Durch manuelles Verfahren des Objektives mit der damit verbundenen Strömung der Lösung wird das Aktinfilament auf der Latexperle festgeklebt. Das komplette Arrangement aus Mikronadel, Aktinfilament und Latexperle wird über einer auf dem Substrat festgeklebten Silikaperle abgesenkt und mittels Verfahren der Laserfalle vorgespannt. Dieses Vorgehen ist auch in Abb. M3. skizziert.

3. Analyse der Daten

Die Rohdaten werden in Abschnitten von ~ 1 min. aufgenommen und gespeichert (PC). Die Aufnahme und Auswertung erfolgt mit speziell geschriebenen C-Programmen. Dabei wird zunächst mittels einer definierten Sinusbewegung des Detektors die Fluktuation der Nadel kalibriert und die zugehörige Varianz in einem 10 ms langen Fenster berechnet. Die Identifi-

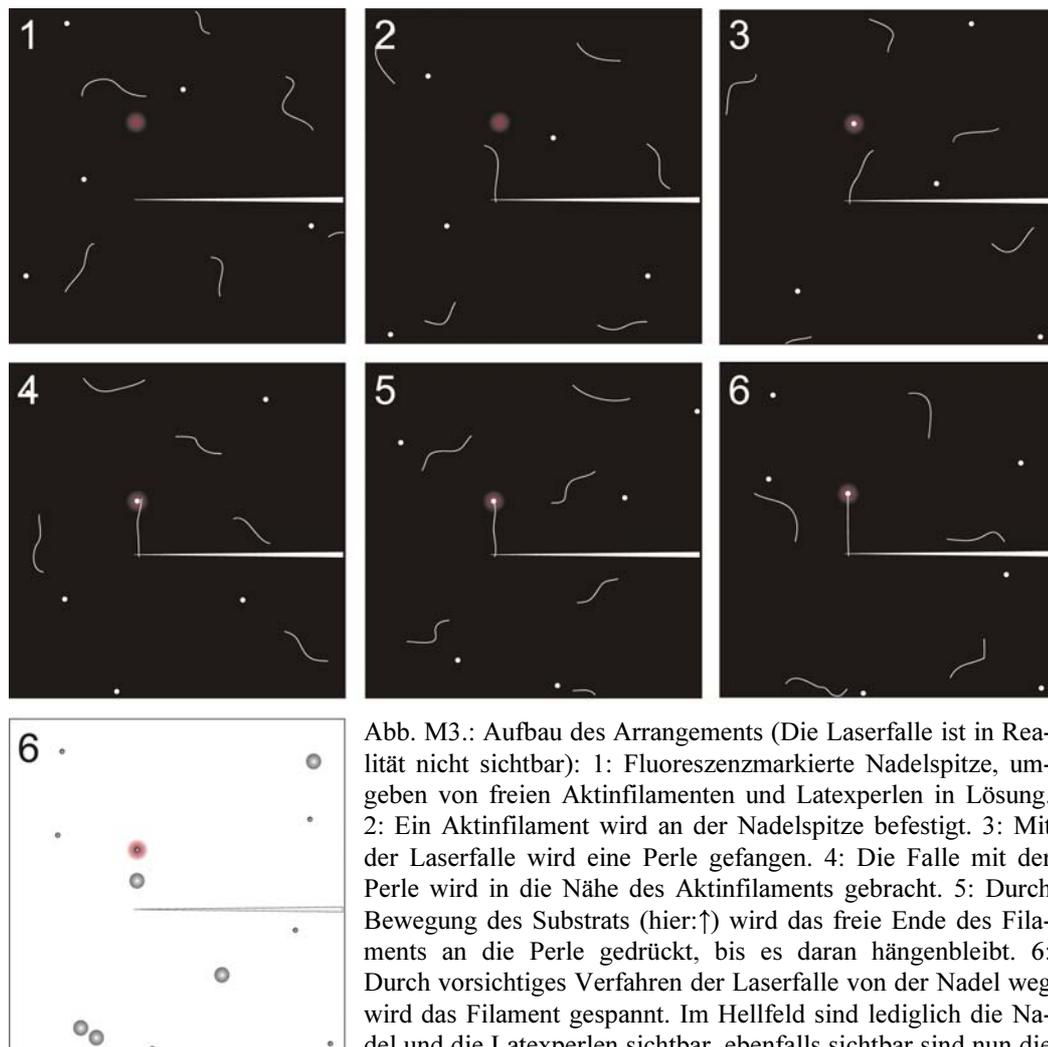


Abb. M3.: Aufbau des Arrangements (Die Laserfalle ist in Realität nicht sichtbar): 1: Fluoreszenzmarkierte Nadelspitze, umgeben von freien Aktinfilamenten und Latexperlen in Lösung. 2: Ein Aktinfilament wird an der Nadelspitze befestigt. 3: Mit der Laserfalle wird eine Perle gefangen. 4: Die Falle mit der Perle wird in die Nähe des Aktinfilaments gebracht. 5: Durch Bewegung des Substrats (hier: ↑) wird das freie Ende des Filaments an die Perle gedrückt, bis es daran hängenbleibt. 6: Durch vorsichtiges Verfahren der Laserfalle von der Nadel weg wird das Filament gespannt. Im Hellfeld sind lediglich die Nadel und die Latexperlen sichtbar, ebenfalls sichtbar sind nun die Silikaperlen auf dem Substratboden, auf denen einzelne Myosine sitzen.

kation der einzelnen Wechselwirkungen erfolgte über die damit verbundene Reduktion der Varianz (vgl. Kapitel 2). Die Position der Nadel wird mit einer gaußförmigen Verteilung beschrieben, daraus wird die Nullposition der freien Nadel bestimmt und anhand der Breite der Verteilung die Steifheit der Nadel bzw. des gesamten Ensembles kontrolliert. Die mittlere Position der detektierten Ereignisse wird relativ zur Position der freien Nadel in einem Histogramm aufgetragen. Um die Nullposition der Nadel möglichst genau bestimmen zu können, werden die Daten meist in kürzeren Abschnitten (10 s) analysiert und die Ereignisse anschließend zusammengefaßt. Die Summe der detektierten Ereignisse wird in Origin weiter analysiert, indem an deren Positionsverteilung eine gaußförmige Verteilung angepaßt wird und deren Verschiebung bestimmt wird. Zu der Verschiebung wird die jeweilige Standardabweichung angegeben, die beschreibt, wie gut die Daten durch die gaußförmige Verteilung beschrieben werden. Die erhaltene Verschiebung wird als die Schrittgröße des einzelnen Moleküls interpretiert. Je nach Steifheit der verwandten Nadel und nach Steifheit der Anbindung des Aktinfilaments muß die Schrittgröße noch um 5-10% nach oben korrigiert werden (vgl. Kapitel 2).

4. Zur Messung der Orientierungsabhängigkeit (3. Kapitel)

4.1. Einköpfiges Myosin

Einköpfiges Myosin stammt aus enzymatischem Verdau von nativem Myosin mit Papain. Zunächst wird filamentöses Myosin gebildet, indem natives Myosin 1:9 mit Puffer A (25 mM Imidazolhydrochlorid pH 7,4; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂ und 1 mM DTT) für 15' auf Eis inkubiert wird. Anschließend erfolgt Zentrifugation (Kontron A24.24, 20 000 rpm, 30', 4°C) und das Pellet wird in 5 ml Puffer A resuspendiert. Die Myosinlösung wird auf 25°C erwärmt 3 u/ml Papain (Sigma) zugegeben, nach 15' wird der Verdau durch Zugabe von 5 µl E64 (auf 5 ml insgesamt) gestoppt. Nach erneuter Zentrifugation (Kontron A24.24, 20 000 rpm, 60', 4°C) wird das Pellet in Puffer B (1,6 M (NH₄)₂SO₄; 20 mM Imidazol pH 6,8; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA; 3 mM NaN₃) resuspendiert und für 30' auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation (Kontron T₁70, 45 000 rpm, 60', 4°C) wird der Überstand über hydrophobe Wech-

selwirkungschromatografie (Toyopearl Ether 650S) aufgereinigt und durch AMICON-Filtration konzentriert. Anschließend wird mit nativer PPI-Gelelektrophorese überprüft, ob noch zweiköpfiges Myosin vorhanden ist. Es kann nicht mehr nachgewiesen werden (siehe markierte Reihe in Abb. M4.).

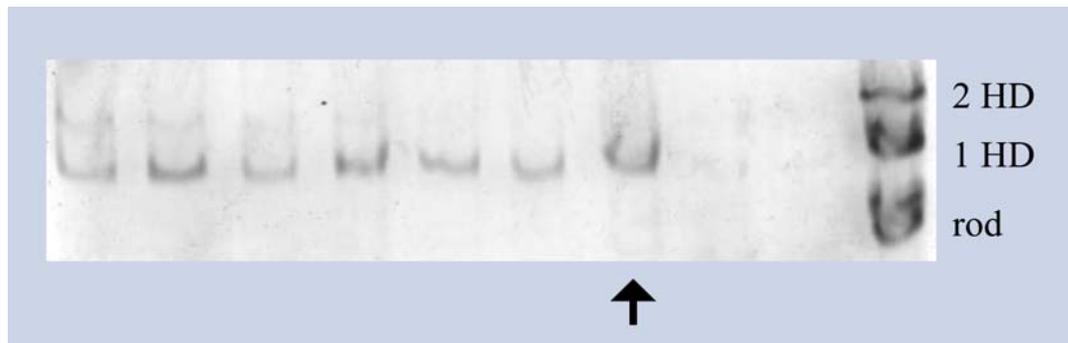


Abb. M4.: Native PPI-Gelelektrophorese des einköpfigen Myosins (1HD), zweiköpfigen Myosins (2 HD) und der Myosinrods. Die markierte Spalte zeigt die verwandte Fraktion (nach Säulenlauf und Amicon-Filtration), zweiköpfiges Myosin ist nicht mehr nachweisbar.

4.2.LMM Myosin Cofilamente

Um LMM Cofilamente künstlich zu polymerisieren, wird LMM (vgl. 2.3.6.), teilweise fluoreszenzmarkiert mit Rhodamin), in einer Lösung mit hoher Ionenstärke (Puffer A: 0.5 M KCl; 20 mM Imidazol pH 6.8; 2 mM MgCl₂; 0.5 mM DTT) über Nacht bei 4°C gegen ein Medium mit niedriger Ionenstärke (Puffer B: 0.08 M KCl; 20 mM Imidazol pH 6.8; 2 mM MgCl₂; 0.5 mM DTT) dialysiert. Die Proteinkonzentration beträgt dabei insgesamt 1.2 μM und setzt sich aus markiertem und unmarkiertem LMM (Ratio 1 : 1 oder 1 : 10) und einem geringen Anteil an nativen Myosin oder einköpfigem Myosin (molares Verhältnis 1 : 500 - 1 : 2000) zusammen. Damit soll gewährleistet werden, daß immer nur ein Myosinkopf mit dem Aktinfilament wechselwirken kann. Die Aggregation ist in Abbildung M5. dargestellt. Die Länge der so erhaltenen LMM Cofilamente beträgt einige 10 μm. Je nach Markierungsgrad sind sie etwas heller (Ratio 1 : 1) oder dunkler (Ratio 1 : 10) als die fluoreszenzmarkierten Aktinfilamente.

4.3. Ätzen der Deckgläser

Um bei der Messung der Orientierungsabhängigkeit den Winkel zwischen LMM Cofilament und Aktinfilament möglichst genau bestimmen zu können, wurden kleine Podeste in das verwandte Deckglas geätzt (als Ersatz für die 2,5 µm großen Silicaperlen). Zur Veranschauli-

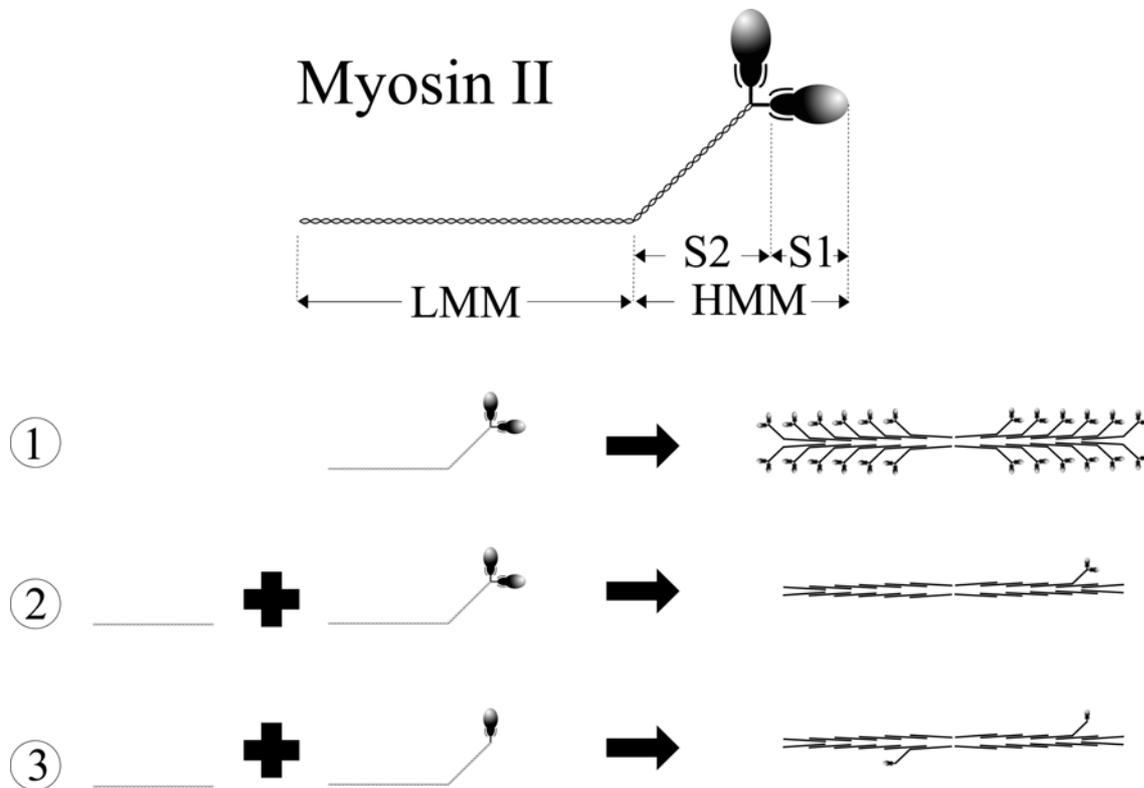


Abb. M5.: Skizze von Myosin II und den durch tryptischen Verdau entstehenden Fragmenten. 1.: Mehrere Myosinmoleküle aggregieren zu einem dicken Filament. 2.: LMM mit einem geringen Anteil an nativem Myosin aggregiert zu LMM Myosin Cofilamenten mit wenigen Doppelköpfen. 3.: LMM mit einem geringen Anteil an einköpfigen Myosin aggregiert zu LMM Myosin Cofilamenten mit wenigen Einzelköpfen.

chung sind die im Folgenden beschriebenen notwendigen Arbeitsschritte zur Herstellung der geätzten Deckgläser in Abb. M6. skizziert.

Unter Evaporation werden zunächst die gereinigten Deckgläser gleichmäßig mit Chrom bedampft (Siemens Bedampfungseinheit). Diese Zwischenschicht verhindert beim eigentlichen Ätzprozeß, daß der Photoresist an den Rändern angehoben wird. Eine Vorbehandlung mit Haftvermittler (AR 300-80) verbessert ebenfalls die Haftung des Photoresists auf dem Substrat. Der Auftrag erfolgt durch Schleuderbeschichtung im Bereich zwischen 1000 - 6000 rpm (möglichst hoch), anschliessend zur Stabilisation Temperatur auf der hot plate (90°) für mindestens 2 Minuten, dabei bildet sich eine gleichmässige, extrem dünne Haftvermittlerschicht auf dem Substrat aus.

Die Aufbringung des Photoresists (X AR-P 3100/10) erfolgt ebenfalls mittels Schleuderbe-

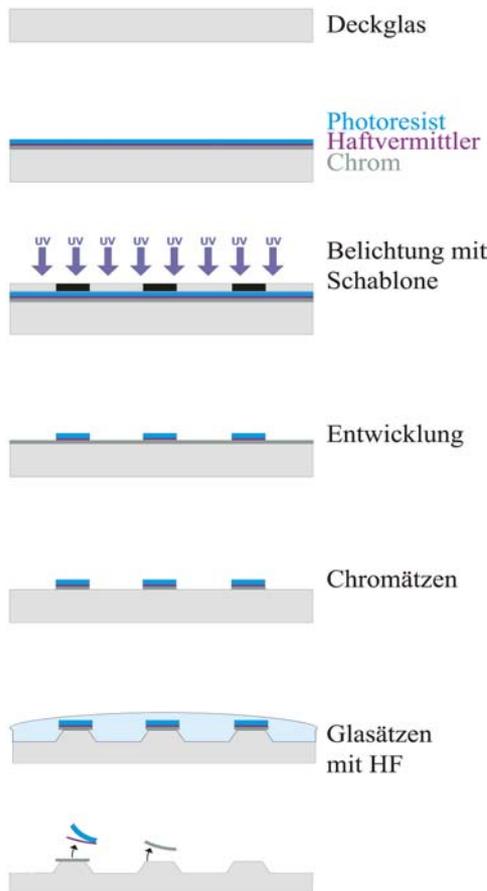


Abb. M6.: Schema zur Herstellung geätzter Deckgläser, ausführliche Beschreibung im Text.

schichtung, dabei wird ein Tropfen in die Mitte des Deckglases gegeben und für > 1 Minute abgeschleudert, um eine gleichmäßig dünne Beschichtung zu erhalten. Anschließend findet wiederum Temperung auf der *hot plate* (90°) für genau 2 Minuten statt, bei längerer Temperung härtet der Resist zu stark aus und läßt sich nicht mehr belichten. Anschließend wird die Photoresistschicht mit einer UV-Lampe belichtet, eine Glasplatte mit eingelassenem Muster in der entsprechenden Größe dient dabei als Negativschablone. Die Belichtungsdauer muß auf die Entwicklungsdauer abgestimmt sein, sie beträgt jeweils ~ 30 s. Das Deckglas wird in destilliertem Wasser gewaschen und die Chromschicht an den belichteten Teilstücken entfernt (Chromätzlösung: 7.5 wt% HClO₄, 12.1 wt% (NH₄)₂Ce(NO₃)₆, H₂O). Nach ca. 1 Minute löst sich das Chrom, das nicht mit Photoresist bedeckt ist. Reine Flußsäure (20%) wird für das Ätzen des Glases in einem Tropfen aufgebracht und

nach 1' unter fließendem Wasser gründlich abgespült. Anschließend erfolgt die Entfernung der Resistreste bzw. der Chromschicht und nochmals gründliches Waschen im Ultraschallbad in destilliertem Wasser. Die verbleibenden Podeste sind 2-3 µm hoch und von ähnlicher Breite.

5. Motility assays mit Konstrukten aus *Dictyostelium discoideum*

5.1. Konstrukte mit künstlichem Hebelarm

Alle Myosinkonstrukte aus *Dictyostelium discoideum* wurden in der Arbeitsgruppe von Dietmar Manstein am MPI für medizinische Forschung, Heidelberg kloniert und aufgereinigt. Die

Plasmide stammen von dem extrachromosalen Vektor pDXA-3H (Manstein *et al.*, 1995), für die Konstrukte M765, M761-1R, M761-2R und M864 sind die Expressionsvektoren beschrieben worden (Kurzawa *et al.*, 1997; Furch *et al.*, 1998; Ritchie *et al.*, 1993). Für die M761 bzw. M765 Konstrukte mit künstlicher Halsdomäne wurden die ersten 761 (bzw. 765) Aminosäuren des *Dictyostelium mhca* Gens mit den Aminosäuren 264-387 („-1R“) oder 264-505 („-2R“) des *Dictyostelium* α -Aktinin Gens verknüpft und ein (His)₈-Tag am C-Terminus angebracht, der zur Aufreinigung der Proteine verwandt wurde, aber auch im *motility assay* zur spezifischen Anbringung des Motors ans Substrat über einen Antikörper (Qiagen) diente. Das Plasmid pSA10 für HMM-2R stammte von dem extrachromosalen Vektor pDH12-2R (Anson *et al.*, 1996). Die Konstrukte wurden in *Dictyostelium discoideum* exprimiert und anschließend aufgereinigt (Furch *et al.*, 1998; Manstein *et al.* 1995). Die Konstrukte wurden bei –80°C gelagert.

5.2. Protokoll der Einzelmolekülassays

Um inaktives Protein zu entfernen, wurde vor dem *motility assay* mit 0,2 mM ATP ein Aktinbindungsschritt (30‘ bei 4°C) mit anschließender Abzentrifugation (Airfuge: Beckmann) durchgeführt. Für alle Konstrukte mit N-terminalem (His)₈-Tag wurden vor der Messung 300 μ l Anti-His (Qiagen, 1:100 verdünnt) für 10‘ in die bereits mit Nitrocellulose und Silicaperlen beschichtete Kammer gegeben, anschließend wurde mehrfach mit AB-Puffer gespült. Die Motormoleküle wurden in für Einzelmoleküluntersuchungen geeigneter Konzentration (~0,1 μ g/ml) für 10‘ in der Kammer inkubiert, nach weiteren Spülvorgängen mit AB-Puffer wurde eine Mischung aus AB-Puffer mit Latexperlen, Aktinfilamenten, 1 μ M ATP und *Anti-Bleach* in die Kammer gegeben und mit den Aufzeichnungen begonnen.

5.3. Polarisationsmarkierte Aktinfilamente (modifiziert nach Wells *et al.*, 1999)

Zunächst wird F-Aktin 3h bei 4°C polymerisiert (Stabilisation mit Phalloidin) und zentrifugiert (Beckmann Airfuge). Das Pellet wird in 50 μ l Puffer A (0.1 M KCl, 0.1 mM MgCl₂, 2.5 mM Na₂B₄O₇, 0.2 mM ATP) resuspendiert. Außerdem wird 12.8 μ M p-Phenylendimaleimid zugegeben (1 h bei 25°C) und anschließend mit 64 μ M TMR Isothiocyanat (Sigma) markiert

(2 h bei 4°C). Die Polymerisation der Filamente erfolgt über Nacht bei 4°C mit einer Aktinkonzentration von 0.1 µM - 0.2 µM. Ungefähr 1 h vor Gebrauch werden die Filamente mit 0.5 µM Rhodamin-Phalloidin (Sigma) stabilisiert.

Literatur

- Adhikari B, Hideg K, Fajer PG (1997)
Independent mobility of catalytic and regulatory domains of myosin heads.
Proc Natl Acad Sci U S A **94** (18): 9643-7
- Ajtai K, French AR, Burghardt TP. (1989)
Myosin cross-bridge orientation in rigor and in the presence of nucleotide studied by electron spin resonance.
Biophys J **56** (3): 535-41
- Anson M, Geeves MA, Kurzawa SE, Manstein DJ. (1996)
Myosin motors with artificial lever arms.
EMBO J. **15** (22): 6069-74
- Ashkin A. (1998)
Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime.
Methods Cell Biol. **55**: 1-27
- Bagshaw, CR (1993)
Muscle contraction
Chapman & Hall, London, 2nd ed.
- Baker JE, Brust-Mascher I, Ramachandran S, LaConte LE, Thomas DD. (1998)
A large and distinct rotation of the myosin light chain domain occurs upon muscle contraction.
Proc Natl Acad Sci U S A. **95** (6): 2944-9
- Balint M, Wolf I, Tarcsafalvi A, Gergely J, Sreter FA. (1978)
Location of SH-1 and SH-2 in the heavy chain segment of heavy meromyosin.
Arch Biochem Biophys. **190** (2): 793-9
- Block SM, Goldstein LS, Schnapp BJ. (1990)
Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers.
Nature. **348** (6299): 348-52
- Brenner B, Schoenberg M, Chalovich JM, Greene LE, Eisenberg E. (1982)
Evidence for cross-bridge attachment in relaxed muscle at low ionic strength.
Proc Natl Acad Sci U S A. **79** (23): 7288-91
- Brenner B, Eisenberg E. (1987)
The mechanism of muscle contraction. Biochemical, mechanical, and structural approaches to elucidate cross-bridge action in muscle.
Basic Res Cardiol. **82** Suppl 2: 3-16
- Brenner B, Yu LC, Chalovich JM. (1991)
Parallel inhibition of active force and relaxed fiber stiffness in skeletal muscle by caldesmon: implications for the pathway to force generation.
Proc Natl Acad Sci U S A. **88** (13): 5739-43
- Burgess SA, Walker ML, White HD, Trinick J. (1997)
Flexibility within myosin heads revealed by negative stain and single-particle analysis.
J Cell Biol. **139** (3): 675-81

- Chaen S, Oiwa K, Shimmen T, Iwamoto H, Sugi H. (1989)
Simultaneous recordings of force and sliding movement between a myosin-coated glass microneedle and actin cables in vitro.
Proc Natl Acad Sci U S A. **86** (5): 1510-4
- Chalovich JM, Chock PB, Eisenberg E. (1981)
Mechanism of action of troponin . tropomyosin. Inhibition of actomyosin ATPase activity without inhibition of myosin binding to actin.
J Biol Chem. **256** (2): 575-8
- Cheney RE, O'Shea MK, Heuser JE, Coelho MV, Wolenski JS, Espreafico EM, Forscher P, Larson RE, Moosker MS. (1993)
Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity.
Cell. **75** (1): 13-23
- Conibear PB, Geeves MA. (1998)
Cooperativity between the two heads of rabbit skeletal muscle heavy meromyosin in binding to actin.
Biophys J. **75** (2): 926-37
- Cooke R. (1997)
Actomyosin interaction in striated muscle.
Physiol Rev. **77** (3): 671-97
- Cope MJT, Whisstock J, Rayment I, Kendrick-Jones J. (1996)
Conservation within the myosin motor domain: implications for structure and function.
Structure. **4** (8): 969-87
- Corrie JE, Brandmeier BD, Ferguson RE, Trentham DR, Kendrick-Jones J, Hopkins SC, van der Heide UA, Goldman YE, Sabido-David C, Dale RE, Criddle S, Irving M. (1999)
Dynamic measurement of myosin light-chain-domain tilt and twist in muscle contraction.
Nature. **400** (6743): 425-30
- Dominguez R, Freyzon Y, Trybus KM, Cohen C. (1998)
Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain: visualization of the pre-power stroke state
Cell. **94** (5): 559-71
- Eisenberg E, Greene LE. (1980)
The relation of muscle biochemistry to muscle physiology.
Annu Rev Physiol. **42**: 293-309
- Finer JT, Simmons RM, Spudich JA. (1994)
Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps.
Nature. **368** (6467): 113-9
- Fisher AJ, Smith CA, Thoden JB, Smith R, Sutoh K, Holden HM, Rayment I. (1995)
X-ray structures of the myosin motor domain of *Dictyostelium discoideum* complexed with MgADP.BeFx and MgADP.AlF₄⁻.
Biochemistry. **34** (28): 8960-72
- Furch M, Geeves MA, Manstein DJ. (1998)
Modulation of actin affinity and actomyosin adenosine triphosphatase by charge changes in the myosin motor domain.
Biochemistry. **37** (18): 6317-26

- Geeves MA, Goody RS, Gutfreund H. (1984)
Kinetics of acto-S1 interaction as a guide to a model for the crossbridge cycle.
J Muscle Res Cell Motil. **5** (4): 351-61
- Geeves MA. (1991)
The dynamics of actin and myosin association and the crossbridge model of muscle contraction.
Biochem J. **274** (Pt 1): 1-14
- Geeves MA, Holmes KC. (1999)
Structural mechanism of muscle contraction.
Annu Rev Biochem. **68**: 687-728
- Goldman YE. (1998)
Wag the tail: structural dynamics of actomyosin.
Cell. **93** (1): 1-4
- Goody RS, Holmes KC, Mannherz HG, Leigh JB, Rosenbaum G. (1975)
Cross-bridge conformation as revealed by x-ray diffraction studies on insect flight muscles with ATP analogues.
Biophys J. **15** (7): 687-705
- Goody RS, Holmes KC. (1983)
Cross-bridges and the mechanism of muscle contraction.
Biochim Biophys Acta. **726** (1): 13-39
- Greene LE, Eisenberg E. (1980)
The binding of heavy meromyosin to F-actin.
J Biol Chem. **255** (2): 549-54
- Greene LE. (1981)
Comparison of the binding of heavy meromyosin and myosin subfragment 1 in F-actin.
Biochemistry. **20** (8): 2120-6
- Grum VL, Li D, MacDonald RI, Mondragon A. (1999)
Structures of two repeats of spectrin suggest models of flexibility.
Cell. **98** (4): 523-35
- Guilford WH, Dupuis DE, Kennedy G, Wu J, Patlak JB, Warshaw DM. (1997)
Smooth muscle and skeletal muscle myosins produce similar unitary forces and displacements in the laser trap.
Biophys J. **72** (3): 1006-21
- Hansma HG, Pietrasanta L. (1998)
Atomic force microscopy and other scanning probe microscopies.
Curr Opin Chem Biol. **2** (5): 579-84
- Harada Y, Noguchi A, Kishino A, Yanagida T (1987)
Sliding movement of single actin filaments on one-headed myosin filaments.
Nature. **326** (6115): 805-8
- Harada Y, Sakurada K, Aoki T, Thomas DD, Yanagida T. (1990)
Mechanochemical coupling in actomyosin energy transduction studied by in vitro movement assay.
J Mol Biol. **216** (1): 49-68
- Hopkins SC, Sabido-David C, Corrie JE, Irving M, Goldman YE. (1998)
Fluorescence polarization transients from rhodamine isomers on the myosin regulatory light chain in skeletal muscle fibers.
Biophys J. **74** (6): 3093-110

- Houdusse A, Kalabokis VN, Himmel D, Szent-Gyorgyi AG, Cohen C. (1999)
Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: a novel conformation of the myosin head.
Cell. **97** (4): 459-70
- Hoyt MA, Hyman AA, Bahler M. (1997)
Motor proteins of the eukaryotic cytoskeleton.
Proc Natl Acad Sci U S A. **94** (24): 12747-8
- A.F. Huxley und Nieddergehrke (1954)
Interference microscopy of living muscle fibers
Nature. **173** : 971-3
- Huxley HE. (1969)
The mechanism of muscular contraction.
Science. **164** (886): 1356-65
- Huxley AF, Simmons RM. (1971)
Proposed mechanism of force generation in striated muscle.
Nature. **233** (5321): 533-8
- Irving M, St Claire Allen T, Sabido-David C, Craik JS, Brandmeier B, Kendrick-Jones J, Corrie JE, Trentham DR, Goldman YE. (1995)
Tilting of the light-chain region of myosin during step length changes and active force generation in skeletal muscle.
Nature. **375** (6533):688-91
- Ishijima A, Doi T, Sakurada K, Yanagida T. (1991)
Sub-piconewton force fluctuations of actomyosin in vitro.
Nature. **352** (6333): 301-6
- Ishijima A, Harada Y, Kojima H, Funatsu T, Higuchi H, Yanagida T. (1994)
Single-molecule analysis of the actomyosin motor using nano-manipulation.
Biochem Biophys Res Commun. **199** (2): 1057-63
- Ishijima A, Kojima H, Higuchi H, Harada Y, Funatsu T, Yanagida T. (1996)
Multiple- and single-molecule analysis of the actomyosin motor by nanometer-piconewton manipulation with a microneedle: unitary steps and forces.
Biophys J. **70** (1): 383-400
- Ishijima A, Kojima H, Funatsu T, Tokunaga M, Higuchi H, Tanaka H, Yanagida T. (1998)
Simultaneous observation of individual ATPase and mechanical events by a single myosin molecule during interaction with actin.
Cell. **92** (2): 161-71
- Ito K, Liu X, Katayama E, Uyeda TQ. (1999)
Cooperativity between two heads of dictyostelium myosin II in in vitro motility and ATP hydrolysis.
Biophys J. **76** (2): 985-92
- Iwane AH, Kitamura K, Tokunaga M, Yanagida T. (1997)
Myosin subfragment-1 is fully equipped with factors essential for motor function.
Biochem Biophys Res Commun. **230** (1): 76-80
- Jontes JD, Wilson-Kubalek EM, Milligan RA. (1995)
A 32 degree tail swing in brush border myosin I on ADP release.
Nature. **378** (6558): 751-3

- Katayama E. (1998)
Quick-freeze deep-etch electron microscopy of the actin-heavy meromyosin complex during the in vitro motility assay.
J Mol Biol. **278** (2): 349-67
- Kielley WW, Harrington WF. (1960)
A model for the myosin molecule
Biochem Biophys Acta. **41**: 401-21
- Kim DS, Takezawa Y, Ogino M, Kobayashi T, Arata T, Wakabayashi K. (1998)
X-ray diffraction studies on the structural changes of rigor muscles induced by binding of phosphate analogs in the presence of MgADP.
Biophys Chem. **74** (1): 71-82
- Kinose F, Wang SX, Kidambi US, Moncman CL, Winkelmann DA. (1996)
Glycine 699 is pivotal for the motor activity of skeletal muscle myosin.
J Cell Biol. **134** (4): 895-909
- Kishino A, Yanagida T. (1988)
Force measurements by micromanipulation of a single actin filament by glass needles.
Nature. **334** (6177): 74-6
- Kitamura K, Tokunaga M, Iwane AH, Yanagida T. (1999)
A single myosin head moves along an actin filament with regular steps of 5.3 nanometres.
Nature. **397** (6715): 129-34
- Kraft T, Yu LC, Kuhn HJ, Brenner B. (1992)
Effect of Ca²⁺ on weak cross-bridge interaction with actin in the presence of adenosine 5'-[gamma-thio]triphosphate).
Proc Natl Acad Sci U S A. **89** (23): 11362-6
- Kraft T, Chalovich JM, Yu LC, Brenner B. (1995)
Parallel inhibition of active force and relaxed fiber stiffness by caldesmon fragments at physiological ionic strength and temperature conditions: additional evidence that weak cross-bridge binding to actin is an essential intermediate for force generation.
Biophys J. **68** (6): 2404-18
- Kron SJ, Spudich JA. (1986)
Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface.
Proc Natl Acad Sci U S A. **83** (17): 6272-6
- Kurzawa SE, Manstein DJ, Geeves MA. (1997)
Dictyostelium discoideum myosin II: characterization of functional myosin motor fragments.
Biochemistry. **36** (2): 317-23
- Lymn RW, Taylor EW. (1971)
Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin.
Biochemistry. **10** (25): 4617-24
- Ma YZ, Taylor EW. (1994)
Kinetic mechanism of myofibril ATPase.
Biophys J. **66** (5): 1542-53
- Manstein DJ, Schuster HP, Morandini P, Hunt DM (1995)
Cloning vectors for the production of proteins in Dictyostelium discoideum.
Gene. **162** (1): 129-34

- Margossian SS, Lowey S. (1978)
Interaction of myosin subfragments with F-actin.
Biochemistry. **17** (25): 5431-9
- Meeusen RL, Cande WZ. (1979)
N-ethylmaleimide-modified heavy meromyosin. A probe for actomyosin interactions.
J Cell Biol. **82** (1): 57-65
- Mehta AD, Finer JT, Spudich JA. (1997)
Detection of single-molecule interactions using correlated thermal diffusion.
Proc Natl Acad Sci U S A. **94** (15): 7927-31
- Mehta AD, Rock RS, Rief M, Spudich JA, Mooseker MS, Cheney RE. (1999a)
Myosin-V is a processive actin-based motor.
Nature. **400** (6744): 590-3
- Mehta AD, Rief M, Spudich JA, Smith DA, Simmons RM. (1999b)
Single-molecule biomechanics with optical methods.
Science. **283** (5408): 1689-95
- Mermall V, Post PL, Mooseker MS. (1998)
Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction.
Science. **279** (5350): 527-33
- Miyata H, Hakozaki H, Yoshikawa H, Suzuki N, Kinoshita K Jr, Nishizaka T, Ishiwata S. (1994)
Stepwise motion of an actin filament over a small number of heavy meromyosin molecules is revealed in an in vitro motility assay.
J Biochem (Tokyo). **115** (4): 644-7
- Molloy JE, Burns JE, Kendrick-Jones J, Tregear RT, White DC. (1995)
Movement and force produced by a single myosin head.
Nature. **378** (6553): 209-12
- Mooseker MS, Cheney RE. (1995)
Unconventional myosins.
Annu Rev Cell Dev Biol. **11** : 633-75
- Mornet D, Pantel P, Audemard E, Kassab R. (1979)
The limited tryptic cleavage of chymotryptic S-1: an approach to the characterization of the actin site in myosin heads.
Biochem Biophys Res Commun. **89** (3): 925-32
- Nakajima H, Kunioka Y, Nakano K, Shimizu K, Seto M, Ando T. (1997)
Scanning force microscopy of the interaction events between a single molecule of heavy meromyosin and actin.
Biochem Biophys Res Commun. **234** (1): 178-82
- Nishizaka T, Seo R, Tadakuma H, Kinoshita K Jr., Ishiwata S (2000)
Characterization of Single Actomyosin Rigor Bonds: Load Dependence of Lifetime and Mechanical Properties
Biophys. J. **79**: 962-974
- Palm T, Sale K, Brown L, Li H, Hambly B, Fajer PG. (1999)
Intradomain distances in the regulatory domain of the myosin head in prepower and postpower stroke states: fluorescence energy transfer
Biochemistry. **38** (40): 13026-34

- Pardee JD, Spudich JA. (1982)
Purification of muscle actin.
Methods Enzymol. **85** Pt B: 164-81
- Patlak JB. (1993)
Measuring kinetics of complex single ion channel data using mean-variance histograms.
Biophys J. **65** (1): 29-42
- Patterson B, Ruppel KM, Wu Y, Spudich JA. (1997)
Cold-sensitive mutants G680V and G691C of Dictyostelium myosin II confer dramatically different biochemical defects.
J Biol Chem. **272** (44): 27612-7
- Patterson B. (1998)
Intragenic suppressors of Dictyostelium myosin G680 mutants demarcate discrete structural elements. Implications for conformational states of the motor.
Genetics. **149** (4): 1799-807
- Raucher D, Sar CP, Hideg K, Fajer PG. (1994)
Myosin catalytic domain flexibility in MgADP.
Biochemistry. **33** (47): 14317-23
- Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Base K, Smith R, Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Wesenberg G, Holden HM. (1993a)
Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor.
Science. **261** (5117): 50-8
- Rayment I, Holden HM, Whittaker M, Yohn CB, Lorenz M, Holmes KC, Milligan RA. (1993b)
Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction.
Science. **261** (5117): 58-65
- Rayment H, Holden HM (1994)
The three-dimensional structure of a molecular motor
TIBS **19**: 129-34
- Reck-Peterson SL, Provance DW Jr, Mooseker MS, Mercer JA. (2000)
Class V myosins.
Biochim Biophys Acta. **1496** (1): 36-51
- Resetar AM, Chalovich JM. (1995)
Adenosine 5^γ-thiotriphosphate: an ATP analog that should be used with caution in muscle contraction studies.
Biochemistry. **34** (49): 16039-45
- Rice S, Lin AW, Safer D, Hart CL, Naber N, Carragher BO, Cain SM, Pechatnikova E, Wilson-Kubalek EM, Whittaker M, Pate E, Cooke R, Taylor EW, Milligan RA, Vale RD. (1999)
A structural change in the kinesin motor protein that drives motility.
Nature. **402** (6763): 778-84
- Ritchie MD, Geeves MA, Woodward SK, Manstein DJ. (1993)
Kinetic characterization of a cytoplasmic myosin motor domain expressed in Dictyostelium discoideum.
Proc Natl Acad Sci U S A. **90** (18): 8619-23
- Ruppel KM, Spudich JA. (1996)
Structure-function analysis of the motor domain of myosin.
Annu Rev Cell Dev Biol. **12** : 543-73

- Schoenberg M, Eisenberg E. (1987)
ADP binding to myosin cross-bridges and its effect on the cross-bridge detachment rate constants.
J Gen Physiol. **89** (6): 905-20
- Schroder RR, Manstein DJ, Jahn W, Holden H, Rayment I, Holmes KC, Spudich JA. (1993)
Three-dimensional atomic model of F-actin decorated with Dictyostelium myosin S1.
Nature. **364** (6433): 171-4
- Sellers JR, Kachar B. (1990)
Polarity and velocity of sliding filaments: control of direction by actin and of speed by myosin.
Science. **249** (4967): 406-8
- Sellers JR. (1996)
Kinesin and NCD, two structural cousins of myosin.
J Muscle Res Cell Motil. **17** (2): 173-5
- Sellers JR. (2000)
Myosins: a diverse superfamily.
Biochim Biophys Acta. **1496** (1): 3-22
- Smith CA, Rayment I. (1995)
X-ray structure of the magnesium(II)-pyrophosphate complex of the truncated head of Dictyostelium discoideum myosin to 2.7 Å resolution.
Biochemistry. **34** (28): 8973-81
- Smith CA, Rayment I. (1996)
X-ray structure of the magnesium(II).ADP.vanadate complex of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain to 1.9 Å resolution.
Biochemistry. **35** (17): 5404-17
- Spudich JA, Kron SJ, Sheetz MP. (1985)
Movement of myosin-coated beads on oriented filaments reconstituted from purified actin.
Nature. **315** (6020): 584-6
- Stein LA, Schwarz RP Jr, Chock PB, Eisenberg E. (1979)
Mechanism of actomyosin adenosine triphosphatase. Evidence that adenosine 5'-triphosphate hydrolysis can occur without dissociation of the actomyosin complex.
Biochemistry. **18** (18): 3895-909
- Svoboda K, Schmidt CF, Schnapp BJ, Block SM. (1993)
Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry.
Nature. **365** (6448): 721-7
- Svoboda K, Block SM. (1994)
Force and velocity measured for single kinesin molecules.
Cell. **77** (5): 773-84
- Takemori S, Yamaguchi M, Yagi N. (1995)
Effects of adenosine diphosphate on the structure of myosin cross-bridges: an X-ray diffraction study on a single skinned frog muscle fibre.
J Muscle Res Cell Motil **16** (6): 571-7
- Takezawa Y, Kim DS, Ogino M, Sugimoto Y, Kobayashi T, Arata T, Wakabayashi K. (1999)
Backward movements of cross-bridges by application of stretch and by binding of MgADP to skeletal muscle fibers in the rigor state as studied by x-ray diffraction.
Biophys J. **76** (4): 1770-83

- Tanaka H, Ishijima A, Honda M, Saito K, Yanagida T. (1998)
Orientation dependence of displacements by a single one-headed myosin relative to the actin filament.
Biophys J. **75** (4): 1886-94
- Taylor EW. (1989)
Actomyosin ATPase mechanism and muscle contraction.
Prog Clin Biol Res. **315**: 9-14
- Taylor KA, Reedy MC, Cordova L, Reedy MK. (1984)
Three-dimensional reconstruction of rigor insect flight muscle from tilted thin sections.
Nature. **310** (5975): 285-91
- Taylor KA, Schmitz H, Reedy MC, Goldman YE, Franzini-Armstrong C, Sasaki H, Tregear RT, Poole K, Luca-veche C, Edwards RJ, Chen LF, Winkler H, Reedy MK. (1999)
Tomographic 3D reconstruction of quick-frozen, Ca²⁺-activated contracting insect flight muscle.
Cell. **99** (4): 421-31
- Tokunaga M, Sutoh K, Wakabayashi T. (1991)
Structure and structural change of the myosin head.
Adv Biophys. **27**: 157-67
- Toyoshima YY, Kron SJ, McNally EM, Niebling KR, Toyoshima C, Spudich JA. (1987)
Myosin subfragment-1 is sufficient to move actin filaments in vitro.
Nature. **328** (6130): 536-9
- Toyoshima YY. (1991)
Flexibility in actin-myosin motility system revealed by in vitro motility assay.
Adv Biophys. **27**: 213-20
- Trybus KM. (1994)
Role of myosin light chains.
J Muscle Res Cell Motil. **15** (6): 587-94
- Tyska MJ, Dupuis DE, Guilford WH, Patlak JB, Waller GS, Trybus KM, Warshaw DM, Lowey S. (1999)
Two heads of myosin are better than one for generating force and motion
Proc Natl Acad Sci U S A. **96** (8): 4402-7
- Uyeda TQ, Warrick HM, Kron SJ, Spudich JA. (1991)
Quantized velocities at low myosin densities in an in vitro motility assay.
Nature. **352** (6333): 307-11
- Uyeda TQ, Abramson PD, Spudich JA. (1996)
The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement.
Proc Natl Acad Sci U S A. **93** (9): 4459-64
- Vale RD, Funatsu T, Pierce DW, Romberg L, Harada Y, Yanagida T. (1996)
Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules.
Nature. **380** (6573): 451-3
- Vale RD, Milligan RA. (2000)
The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins.
Science. **288** (5463): 88-95
- VanBuren P, Waller GS, Harris DE, Trybus KM, Warshaw DM, Lowey S. (1994)
The essential light chain is required for full force production by skeletal muscle myosin.
Proc Natl Acad Sci U S A. **91** (26): 12403-7

- Veigel C, Bartoo ML, White DC, Sparrow JC, Molloy JE. (1998)
The stiffness of rabbit skeletal actomyosin cross-bridges determined with an optical tweezers transducer.
Biophys J. **75** (3): 1424-38
- Veigel C, Coluccio LM, Jontes JD, Sparrow JC, Milligan RA, Molloy JE. (1999)
The motor protein myosin-I produces its working stroke in two steps.
Nature. **398** (6727): 530-3
- Waller GS, Ouyang G, Swafford J, Vibert P, Lowey S. (1995)
A minimal motor domain from chicken skeletal muscle myosin.
J Biol Chem. **270** (25): 15348-52
- Wang MD. (1999)
Manipulation of single molecules in biology.
Curr Opin Biotechnol. **10** (1): 81-6
- Wells AL, Lin AW, Chen LQ, Safer D, Cain SM, Hasson T, Carragher BO, Milligan RA, Sweeney HL. (1999)
Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards.
Nature. **401** (6752): 505-8
- Whittaker M, Wilson-Kubalek EM, Smith JE, Faust L, Milligan RA, Sweeney HL. (1995)
A 35-A movement of smooth muscle myosin on ADP release.
Nature. **378** (6558): 748-51
- Winkelmann DA, Bourdieu L, Ott A, Kinoshita F, Libchaber A. (1995)
Flexibility of myosin attachment to surfaces influences F-actin motion.
Biophys J. **68** (6): 2444-53
- Woehlke G, Ruby AK, Hart CL, Ly B, Hom-Booher N, Vale RD. (1997)
Microtubule interaction site of the kinesin motor.
Cell. **90** (2): 207-16
- Wolenski JS, Cheney RE, Forscher P, Mooseker MS. (1993)
In vitro motilities of the unconventional myosins, brush border myosin-I, and chick brain myosin-V exhibit assay-dependent differences in velocity.
J Exp Zool. **267** (1): 33-9
- Wu X, Jung G, Hammer JA 3rd. (2000)
Functions of unconventional myosins.
Curr Opin Cell Biol. (1): 42-51
- Xiao M, Li H, Snyder GE, Cooke R, Yount RG, Selvin PR. (1998)
Conformational changes between the active-site and regulatory light chain of myosin as determined by luminescence resonance energy transfer: the effect of nucleotides and actin.
Proc Natl Acad Sci U S A. **95** (26): 15309-14
- Yan Y, Winograd E, Viel A, Cronin T, Harrison SC, Branton D. (1993)
Crystal structure of the repetitive segments of spectrin.
Science. **262** (5142): 2027-30
- Yanagida T, Nakase M, Nishiyama K, Oosawa F. (1984)
Direct observation of motion of single F-actin filaments in the presence of myosin.
Nature. **307** (5946): 58-60
- Yanagida T, Arata T, Oosawa F. (1985)
Sliding distance of actin filament induced by a myosin crossbridge during one ATP hydrolysis cycle.
Nature. **316** (6026): 366-9

- Yanagida T, Ishijima A, Saito K, Harada Y. (1993a)
Coupling between ATPase and force-generating attachment-detachment cycles of actomyosin in vitro.
Adv Exp Med Biol. **332**: 339-47
- Yanagida T, Harada Y, Ishijima A. (1993b)
Nano-manipulation of actomyosin molecular motors in vitro: a new working principle.
Trends Biochem Sci. **18** (9): 319-24
- Yanagida T, Kitamura K, Tanaka H, Hikikoshi Iwane A, Esaki S. (2000)
Single molecule analysis of the actomyosin motor.
Curr Opin Cell Biol. **12** (1): 20-5

Verzeichnis der Abkürzungen

1HD	einköpfig
2HD	zweiköpfig
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
ATP[γ S]	Adenosin-5'- γ Triphosphat
BBMI	<i>Brushborder Myosin I</i>
BSA	Rinderserumalbumin
DTT	DL-Dithiothreitol
EGTA	Bis-(aminoethyl)-glycoether-N,N,N',N'-tetraacetat
ELC	essential light chain (essentielle leichte Kette)
EPR	<i>electron parametric resonance</i>
F-Aktin	filamentöses Aktin
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
G-Aktin	globuläres Aktin
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethansulfonsäure]
HMM	heavy meromyosin (schweres Meromyosin)
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LC	light chain (leichte Kette)
LMM	light meromyosin (leichtes Meromyosin)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NEM	N-Ethylmaleimid
P _i	anorganisches Phosphat
RLC	regulatory light chain (regulatorische leichte Kette)
S1	Subfragment 1 (des Myosins)
S2	Subfragment 2 (des Myosins)
TRITC	Tetramethylrhodamin B isothiocyanat
TMR	Tetramethylrhodamin

Verzeichnis der Abbildungen

- Abb. 1.1.: Schematischer Aufbau unterschiedlicher Myosine
- Abb. 1.2.: Darstellung des *sliding filament* Modells und der *swinging myosin crossbridges hypothesis*
- Abb. 1.3.: Struktur des Myosinfragments S1 (nach Rayment, 1993)
- Abb. 1.4.: Experimentelle Aufbauten zur Messung von Einzelwechselwirkungen
- Abb. 2.1.: (a) „3 bead geometry“, (b) Laserfalle und Mikronadel, (c) „whisker tip“ (d) Perlenassay
- Abb. 2.2.: Skizze/Abmessungen einer Mikronadel
- Abb. 2.3.: Spektrum einer freien Nadel
- Abb. 2.4.: a) Zeitserie (jeweils 10 s) einer sehr steifen Nadel, b) Zeitserie einer Nadel geringer Steifheit c) zugehörige Varianz
- Abb. 2.5.: Zeitserie einer (vorgespannten) Nadel mit transienten Wechselwirkungen
- Abb. 2.6.: Anzahl an „Events“ bei fester Zeit (10 ms) für eine Zeitserie mit Wechselwirkung und die einer freien Nadel
- Abb. 2.7.: Zeitserie der Wechselwirkung multipler HMM-Moleküle mit einem Aktinfilament
- Abb. 2.8.: Zeitserie und zugehörige Varianz der Wechselwirkung eines S1 Moleküls mit dem Aktinfilament
- Abb. 2.9.: Verteilung mehrerer Wechselwirkungen von S1 mit 1 μM ATP
- Abb. 2.10.: Verteilung mehrerer Wechselwirkungen von Wildtyp Myosin mit 1 μM ATP
- Abb. 2.11.: Anzahl der Wechselwirkungen in einem Datensatz je nach Varianz
- Abb. 3.1.: Skizze zum Aufbau von Myosin II und den Fragmenten S1 und HMM
- Abb. 3.2.: Verteilung aus S1-Wechselwirkungen mit 1 μM ATP
- Abb. 3.3.: Verteilung aus HMM-Wechselwirkungen mit 1 μM ATP
- Abb. 3.4.: Verteilung von 1HD Wechselwirkungen und Skizze des einköpfigen Myosins
- Abb. 3.5.: Verteilung von 2HD Wechselwirkungen und Skizze des doppelköpfigen Myosins
- Abb. 3.6.: Verteilung von M765-2R-Wechselwirkungen und Skizze des Konstrukts

- Abb. 3.7.: Verteilung von HMM-2R-Wechselwirkungen und Skizze des Konstrukts
- Abb. 3.8.: Verteilung von S1-Wechselwirkungen und Skizze des S1 Moleküls
- Abb. 3.9.: Verteilung von M864-Wechselwirkungen und Skizze des Konstrukts mit Antikörper
- Abb. 3.10.: Verteilung von 1HD-Wechselwirkungen, Winkel 0° und Skizze der Anordnung
- Abb. 3.11.: Verteilung von 1HD-Wechselwirkungen, Winkel 40° und Skizze der Anordnung
- Abb. 3.12.: Verteilung von 1HD-Wechselwirkungen, Winkel 90° und Skizze der Anordnung
- Abb. 3.13.: Verteilung von 2HD-Wechselwirkungen, Winkel 0° und Skizze der Anordnung
- Abb. 3.14.: Verteilung von 2HD-Wechselwirkungen, Winkel 42° und Skizze der Anordnung
- Abb. 3.15.: Verteilung von 2HD-Wechselwirkungen, Winkel 85° und Skizze der Anordnung
- Abb. 3.16.: Zusammenfassung aller an einköpfigen („1HD“) und zweiköpfigen („2HD“) Myosin gemessenen Verschiebungen in Abhängigkeit des Winkels zwischen Aktin- und Cofilament
- Abb. 4.1.: Modell nach Lymn/Taylor zum Querbrückenzyklus
- Abb. 4.2.: Die Anbindung des Myosinkopfes an Aktin erfolgt in mehreren Schritten
- Abb. 4.3.: Verteilung von kurzen (10 ms) HMM Wechselwirkungen
- Abb. 4.4.: Histogramm-Analyse von HMM-Wechselwirkungen unterschiedlicher Mindestlänge (10–40 ms) und Zusammenfassung der Ergebnisse
- Abb. 4.5.: Rohdaten mit der zugehörigen Varianz aus einer Messung an S1 bei 10 mM ATP- γ S Konzentration
- Abb. 4.6.: Mittlere Dauer der Wechselwirkungen bei 10 mM ATP γ S
- Abb. 4.7.: Verteilung S1 mit 10 mM ATP γ S
- Abb. 4.8.: Verteilung S1 mit 1 mM ATP γ S
- Abb. 4.9.: Verteilung S1 mit 0,1 mM ATP γ S
- Abb. 4.10.: Verteilung S1 mit 10 μ M ATP γ S

- Abb. 4.11.: Verteilung S1 mit 1 μM ATP γ S
- Abb. 4.12.: Verteilung S1 mit 0,1 μM ATP γ S
- Abb. 4.13.: Schrittgrößen von S1 mit 0,1 μM - 10 mM ATP γ S Konzentration
- Abb. 4.14.: Die resultierende Verteilung mehrerer Wechselwirkungen bei 0,1 mM ATP γ S wird durch die Summe zweier Gaußverteilungen beschrieben
- Abb. 4.15.: Bei sehr geringer ATP γ S Konzentration überwiegen Wechselwirkungen, die mit einer Konformationsänderung verbunden sind
- Abb. 4.16.: Arbeitshypothese zu den ATP γ S Experimenten
- Abb. 5.1.: Huhn S1 Struktur nach (Rayment et al., 1993)
- Abb. 5.2.: Test der Hebelarm Hypothese: Ein verkürzter bzw. verlängerter Hebelarm sollte zu einer kleineren bzw. größeren Schrittdistanz führen
- Abb. 5.3.: Skizze aller verwandten Konstrukte
- Abb. 5.4.: je 4 s einer Registrierung der Position der Nadel mit der zugehörigen Varianz für (a) M765, (b) M765-1R, (c) M765-2R
- Abb. 5.5.: Resultierende Verteilungen aus den Messungen mit unterschiedlichen Konstrukten
- Abb. 5.6.: Resultierende Verteilungen aus den Messungen mit M765
- Abb. 5.7.: Zusammenhang zwischen der Schrittgrößen der einzelnen Konstrukte und der Länge deren jeweiliger Halsdomäne
- Abb. 5.8.: Skizze für hypothetisch negative Schrittrichtung von M765
- Abb. 5.9.: Hypothetischer Zusammenhang zwischen Schrittgröße und Hebelarmlänge für M765 mit neg. Schrittrichtung
- Abb. 5.10.: Huhn S1 (nach Rayment *et al.*, 1993)
- Abb. M1: Experimenteller Aufbau
- Abb. M2: Skizze der Meßkammer für das *motility assay*
- Abb. M3: Zusammenfügen des Arrangements aus Nadel, Aktinfilament und Latexperle
- Abb. M4: Gelelektrophorese des einköpfigen Myosins
- Abb. M5: Schematischer Aufbau von Myosin II, Aggregation der LMM Copolymere
- Abb. M6: Ätzen von Deckgläsern

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name Charlotte Christine Ruff
Geboren 09.09.1969 in Stuttgart
Eltern: Dipl. Ing. Gottfried Ruff
Catharina Ruff, geb. Reichardt
Familienstand Ledig

SCHULBILDUNG

1976 – 1980 Grundschule in 73650 Winterbach
1980 – 1989 Burg-Gymnasium Schorndorf
Abitur

STUDIUM

1989 – 1990 Kulturpädagogik, Universität Hildesheim
1989 – 1990 Kunstgeschichte, Institut für Fernstudien, Tübingen
1990 – 1996 Physik, Universität Hannover
1995 – 1996 Diplomarbeit am Institut für Quantenoptik, Universität Hannover: Charakterisierung laserinduzierter thermoelastischer Drucktransienten zur Bestimmung der optischen Eigenschaften biologischer Gewebe.
seit April 1997 Promotion an der Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung Molekular- und Zellphysiologie.

Wissenschaftliche Veröffentlichungen/Abstracts:

Lohmann S., Ruff C., Schmitz C., Lubatschowski H., Ertmer W.: Photo-acoustic determination of optical parameters of tissue-like media with reference to opto-acoustic diffraction. *Lasers in Medical Science*, 12:357-363 (1997).

Ruff C., Lohmann S., Lubatschowski H., Ertmer W.: Photoacoustic determination of optical parameters of biological tissues. *Digest CLEO EUROPE, EQEC 1996*; 325 (1996).

Ruff C.C., Brenner B. & Meyhöfer E.: Single and multiple Myosin motor events recorded with a microneedle lasertrap transducer. *Biophys. J.*, Vol. 74/2, A259 (1998).

Ruff C.C., Furch M., Brenner B., Manstein D.J. & Meyhöfer E.: The step size of Myosin motors with elongated lever arms is increased. *Biophys. J.*, Vol. 76/1, A37 (1999).

Ruff C.C., Meyhöfer E. & Brenner B.: Actomyosin interactions in the presence of the nucleotide analogue ATP[- γ S] at the single molecule level. *Biophys. J.*, Vol. 76/1, A37 (1999).

Ruff C.C., Brenner B. & Meyhöfer E.: Single- and double-headed motor fragments of Myosin generate similar unitary displacements. *Biophys. J.*, Vol. 78/1, 234A (2000).

Ruff C.C., Furch M., Brenner B., Manstein D.J. & Meyhöfer E.: The step size of myosin is directly determined by the length of the motor's neck domain. *New Trends in Physics, Chemistry, and Biology with Single Molecules suppl 1999*: 12.

Ruff C., Furch M., Brenner B., Manstein D.J. and Meyhöfer E.: The step size of myosin is directly determined by the length of the motor's neck domain. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 20 (1999).

Ruff C.C., Furch M., Brenner B., Manstein D.J. & Meyhöfer E.: Single molecule tracking of myosins with genetically engineered amplifier domains. *Nature Structural Biology* 8/3 (2001)

Dankeschön!

Zum Gelingen des experimentellen Teils meiner Doktorarbeit und dem vorliegenden Schriftstück haben viele nette Menschen beigetragen:

Herrn Professor Wolfgang Ertmer vom Institut für Quantenoptik der Universität Hannover verdanke ich nicht nur die Möglichkeit zur Durchführung meiner Diplomarbeit innerhalb seiner Arbeitsgruppe, sondern er hat darüber hinaus die externe Betreuung meiner Promotion übernommen. In den vergangenen Jahren war er für mich fachlich und auch menschlich ein wertvoller Ansprechpartner.

Herr Professor Manfred Schliwa hat sich freundlicherweise bereit erklärt, das Koreferat dieser Arbeit zu übernehmen.

Herr Professor Brenner von der Abteilung Molekular- und Zellphysiologie hat mir ermöglicht, diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen und mir beim Verfassen dieser Arbeit mit vielen Diskussionen und Ratschlägen geholfen.

Herr Dr. Edgar Meyhöfer wurde von seinem jüngeren Sohn mit den Worten „*so wise in the ways of science*“ sehr zutreffend beschrieben. Die Arbeit mit ihm hat durch die angenehme und motivierende Atmosphäre sehr viel Spaß gemacht.

Mit Stefan Lakämper war es ebenfalls eine große Freude, gemeinsam unter Tage zu arbeiten.

Bei der Abteilungsmitgliedern für Molekular und Zellphysiologie bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme und die kollegiale Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank gebührt Frau Petra Uta u.a. für ihre unermüdlichen Versuche, klebendes NEM Myosin zu präparieren. Herr Dr. Udo Tutschke war mir in der Zeit des Zusammenschreibens ein sehr angenehmer Nachbar und Diskussionspartner. Vor allem Dank der Damen und Herren Claudia Tasche, Heike

Uphoff, Eva Harder, Thomas Mattai und Michael August kam auch das Vergnügen nicht zu kurz.

Die Herren der Mechanik- und Elektronikwerkstatt der Medizinischen Hochschule haben exzellente Arbeit beim Aufbau des Meßsystems geleistet. Darüber hinaus waren sie ihrer netten und hilfsbereiten Art wegen immer gern gesehene Gäste in unserem Labor.

Bei der Herstellung der geätzten Deckgläser erhielt ich Unterstützung von mehreren Seiten, so hat Herr Preiß aus der Abteilung Elektronenmikroskopie mir bei der Bedampfung mit Chrom netterweise Hilfe geleistet und die Glasbläserei eine UV-Lampe zur Verfügung gestellt. Den Ätzprozeß durfte ich schließlich freundlicherweise in Räumen der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Groß durchführen.

Im Rahmen meiner Promotion hatte ich die Möglichkeit, mit verschiedenen Arbeitsgruppen zusammenarbeiten zu können. Aus der Arbeitsgruppe von Dietmar Manstein (MPI für medizinische Forschung, Heidelberg) möchte ich ganz besonders Herrn Menno Knetsch für fachliche und moralische Unterstützung danken. Frau Setsuko Fujita-Becker und Frau Angelika Herm (Universität Heidelberg) danke ich für die gemeinsamen und unermüdlichen Versuche, TgM-A „zum Laufen zu bringen“. Auch bei Herrn Professor Martin Bähler möchte ich mich für die Zusammenarbeit an Myosin I bedanken.

Von meinen Freunden (und vor allem von meinem Lieblingsjungen) habe ich sehr viel Verständnis und Unterstützung in den arbeitsreicheren Phasen erfahren. Speziell meinen Freundinnen bin ich zudem äußerst dankbar für alle Gespräche zu den typischen Frauenthemen abseits der Forschung.

Meine Eltern haben mich während des Physikstudiums stets unterstützt (auch wenn sie ein anderes Studienfach vielleicht lieber gesehen hätten), Ihnen gebührt mein größter Dank!

