

**Registrierung von Röntgenstrukturbildern des
Kaninchenskelettmuskels (*M. psoas*)
und Entwicklung eines Modells
zur Simulation der Aktinschichtlinien
unter Berücksichtigung
verschiedener Typen von Disorder**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von

Dipl. - Biol. Claudia von Grumbkow

geboren am 12.11.1972 in Sulingen

Hannover 2004

Referent: Prof. Dr. W. Müller

Koreferent: Prof. Dr. B. Brenner

Tag der Promotion: 03. Juni 2004

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Obwohl inzwischen viele Kenntnisse zur Struktur des Aktinfilaments im Skelettmuskel von Vertebraten vorliegen, fehlen immer noch wichtige Aspekte, welche die Regulation der Muskelkontraktion betreffen. Am Aktinfilament selbst dienen Tropomyosin und Troponin zur An- und Abschaltung des Filaments, was durch eine Änderung der Calciumkonzentration induziert wird. Bei diesem Vorgang kommt es zur strukturellen Umlagerung einiger Proteine des dünnen Filaments, wobei allgemein von einer Änderung der azimuthalen Position von Tropomyosin ausgegangen wird. Uneinigkeit besteht darüber, wie groß diese Änderung ist. Auch gibt es bisher nur wenige Untersuchungen dazu, wie sich Troponin dabei verhält. Aufgrund der regelmäßigen Querstreifung der Skelettmuskeln eignen sich diese sehr gut zur Untersuchung mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse. Deshalb wurden Röntgendiffraktionsexperimente an Einzelmuskelfaserarrays durchgeführt und die Intensitätsverteilungen auf den Aktinschichtlinien der registrierten Pattern analysiert. Zur Interpretation der gewonnenen Daten wurde ein Computermodell erstellt.

Zunächst wurden zweidimensionale Diffraktionspattern von Faserarrays unter relaxierenden Bedingungen mit niedriger Calciumkonzentration registriert. Die Aktinfilamente befanden sich dabei im off-Zustand. Basierend auf den Aktin- und Tropomyosinstrukturen von Lorenz *et al.* und einer selbst aufgebauten Troponinstruktur wurde ein Modell erstellt. Zur Optimierung wurde es mit Parametern, welche bestimmte Typen von Disorder simulieren, erweitert und den experimentellen Daten angepaßt. Dieses Modell wurde dann zur Interpretation von Röntgenstrukturaufnahmen herangezogen, die bei niedriger bzw. hoher Calciumkonzentration registriert worden waren (off- bzw. on-Zustand des Filaments). Eine Anheftung von Myosinköpfen wurde bei diesen Versuchen vermieden, indem die Überlappung von Aktin- und Myosinfilamenten durch eine Überdehnung der Fasern verhindert wurde. Die stereospezifische Anheftung von S1-Köpfen aufgrund einer möglichen Restüberlappung wurde durch die Verwendung von ATP γ S-haltigem Medium ausgeschlossen. Dies war notwendig, weil die Intensitätsverteilungen der analysierten Aktinschichtlinien empfindlich auf die stereospezifische Anheftung von Myosinmolekülen reagieren. Auf der erhaltenen Datengrundlage wurde das Modell um den on-Zustand des Filaments erweitert. Während die Simulation der Intensitätsänderungen auf den Aktinschichtlinien eins, zwei und sechs beim Übergang vom off- in den on-Zustand gut gelang, konnten die Änderungen der Troponinreflexe nur durch eine zusätzliche Variation der Troponinposition entlang des Filaments in der off-Position simuliert werden.

Aus dem Modell leitet sich eine Änderung der azimuthalen Position des Tropomyosins ab, welche im Bereich von 10° beim Übergang des Filaments vom off- in den on-Zustand liegt. Die damit einhergehende Positionsänderung des Troponins entspricht im wesentlichen der des Tropomyosins, wobei zusätzlich eine azimuthale Drehung relativ zum Tropomyosin angenommen wird. Die Simulation von Disorder war zur Modellierung der relativen Intensitäten der Aktinschichtlinien unerlässlich. Die mit dem Modell simulierten Strukturänderungen im Aktinfilament zeigen eine Möglichkeit zur Beschreibung der realen Situation im Muskel auf. Unterschiede zwischen Experiment und Modell lassen sich auf verschiedene Faktoren zurückführen. Dazu gehören im wesentlichen die große Anzahl von Möglichkeiten bei Anwendung der verschiedenen Disordertypen, das Fehlen einer vollständig aufgeklärten Troponinstruktur und die Reduktion des Modells auf die Darstellung nur eines Aktinfilaments.

Summary (Abstract)

Although we already have a good knowledge about the structure of actin filaments in vertebrate skeletal muscle there are many unknown aspects concerning the regulation of muscle contraction. Tropomyosin and troponin are responsible for the activation of the actin filament, which is induced by a change of calcium concentration. Within this process several proteins of the thin filament undergo a structural change. In general this is thought to be an azimuthal positional change of tropomyosin. Disagreement exists about the extent of this change. Yet only little is known about the structural change of troponin. Because of the regular striation pattern of vertebrate muscle they are best suited for an examination by x-ray diffraction. Therefore x-ray diffraction studies on arrays of single muscle fibers were carried out and the intensity distribution on the actin layer lines of the diffraction patterns was analyzed. For interpretation of the data a computer model was created.

At first, experiments with fiber arrays under relaxing conditions with low calcium concentration were performed. Hence actin filaments were in off-position. A model was created, based on the structures of actin and tropomyosin from Lorenz and coworkers, together with a structure of troponin which was built using adequate sources. The model was then optimized by the introduction of several parameters for the simulation of disorder. This model was finally used for the interpretation of x-ray diffraction patterns recorded at low and high calcium concentration, respectively 'off' and 'on' state of the filament. The attachment of myosin heads was prevented by stretching the fibers to a sarcomere length out of overlap. The stereospecific binding of myosin heads, caused by a possible remaining overlap was prevented by the use of ATP γ S. This was necessary because actin layer lines are sensitive to the stereospecific attachment of myosin molecules. On the basis of the experimental data the model was extended for the simulation of the 'on' state. The simulation of the intensity changes on actin layer line one, two and six during transition from the 'off' to the 'on' state was adequate. For modelling the changes on the troponin reflections an additional randomized function for the position along the filament in the 'off' state was necessary.

The model showed that the change of the azimuthal tropomyosin position while going from the 'off' to the 'on' state is in the range of 10° . The corresponding change of the troponin position is similar, but with an additional azimuthal rotation around tropomyosin. The simulation of disorder was absolutely necessary for modelling the relative intensities on the actin layer lines. The structural changes of the actin filament simulated by the final model are a reasonable description of the processes occurring in muscles. Differences between experimental data and model originate from various factors, in particular the large number of possibilities a particular type of disorder can be applied, the lack of a crystal structure for the complete troponin molecule, and the reduction of the model to only one actin filament.

Schlagwörter

Aktinfilament, Röntgendiffraktion, Computermodell, Unordnung

Keywords

Actin filament, X-ray diffraction, Computer model, Disorder

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	8
1 Einleitung	10
1.1 Struktur und Funktion des quergestreiften Muskels	10
1.1.1 Das Myosinfilament	11
1.1.2 Das Aktinfilament	13
1.1.3 Die Muskelbewegung und ihre Regulation.....	15
1.2 Prinzip der Röntgendiffraktion	16
1.2.1 Myosinreflexe und -schichtlinien.....	19
1.2.2 Reflexe und Schichtlinien des Aktinfilaments.....	22
1.2.3 Reflexe und Schichtlinien auf Röntgendiffraktionsbildern des Kaninchenskelettmuskels	26
1.3 Disorder	29
1.4 Fragestellung.....	30
2 Material und Methoden	32
2.1 Experimentbeschreibung	32
2.1.1 Vorbereitung der Proben	32
2.1.2 Lösungen	33
2.1.3 Aufnahme der Röntgendiffraktionsbilder	35
2.1.4 Datenverarbeitung	36
2.2 Modellbeschreibung.....	39
2.2.1 Aufbau eines Modells, bestehend aus Aktin und Tropomyosin	40
2.2.2 Erzeugung und Einbau von Troponin ins Modell.....	41
2.2.3 Unordnung (Disorder).....	43
2.2.3.1 Variabler Aktintwist	43
2.2.3.2 Variabler Tropomyosintwist.....	45
2.2.3.3 Dreidimensionaler Verlauf der Aktinfilamente, Myofibrillen und Einzelfasern	46
2.2.4 Fourier-Transformation.....	47
3 Ergebnisse.....	50
3.1 Intensitätsverteilungen auf den Aktinschichtlinien unter Relaxationsbedingungen.....	50
3.1.1 Experimentelle Ergebnisse.....	50
3.1.2 Aufbau des Modells zur Modellierung der Aktinschichtlinien.....	55
3.1.2.1 Azimuthale Tropomyosinposition	56
3.1.2.2 Vervollständigung des Modells mit Troponin.....	57
3.1.2.3 Variabler Aktintwist	59
3.1.2.4 Variabler Tropomyosintwist.....	62
3.1.2.5 Dreidimensionaler Verlauf der Aktinfilamente, Myofibrillen und Einzelfasern	65
3.1.2.6 Ergebnisse des Modells mit Disorder.....	71
3.1.3 Vergleich von Experiment und Modell.....	72
3.2 Änderungen der Intensitäten auf den Aktinschichtlinien in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration	78
3.2.1 Experimentelle Ergebnisse.....	78

3.2.2 Erweiterung des Modells mit dem on-Zustand	79
3.2.3 Vergleich von Experiment und Modell	81
3.3 Versuche zur Optimierung des Modells	86
4 Diskussion	89
4.1 Erstellung des Modells.....	90
4.2 Disorder	93
4.2.1 Variabler Aktintwist.....	96
4.2.2 Variabler Tropomyosintwist	98
4.2.3 Fanning.....	99
4.3 Unterschiede in den Diffraktionspattern von Experiment und Modell.....	101
4.4 Einordnung der Ergebnisse in gängige Modellvorstellungen.....	104
4.4.1 Positionsänderung von Tropomyosin und Troponin.....	105
4.5 Ausblick	107
Literatur.....	108
Lebenslauf.....	117
Danksagung.....	118

Abkürzungen

ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzylsulfonylefluorid
ALL	Aktinschichtlinie (Actin Layer Line)
Ap ₅ A	P1, P5-(Di-Adenosin 5')-Pentaphosphat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
ATPase	Adenosin-5'-Triphosphatase, ATP-spaltendes Enzym
ATPγS	Adenosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)
Å	Ångström (1 Å = 10 ⁻¹⁰ m = 0,1 nm)
CCD	ladungsgekoppeltes Bauelement (Charge Coupled Device)
CrP	Kreatinphosphat
CYS	Cystein
DESY	Deutsches Elektronen-Synchrotron
DTT	DL-Dithiothreitol
E64	N-(trans-Epoxy succinyl-L-Leucin-4-guanidinobutylamid)
EGTA	Ethylenglykol-bis(β-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
FFT	Schnelle Fourier-Transformation (Fast Fourier Transform)
FWHM	Breite einer Gausskurve auf halber Höhe (Full Width at Half Maximum)
GeV	Gigaelektronenvolt
HMM	schweres Meromyosin (Heavy Meromyosin)
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid, Kalilauge
λ	Wellenlänge (lambda)
LMM	leichtes Meromyosin (Light Meromyosin)
M	Myosinreflex
mA	Milliampere
ml	Milliliter
mM	Millimol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MLL	Myosinschichtlinie (Myosin Layer Line)
μ	Ionenstärke
μm	Mikrometer (1 μm = 10 ⁻⁶ m)
Na ₂ (ATP)	ATP-Dinatriumsalz
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge
nm	Nanometer (1 nm = 10 ⁻⁹ m)
pCa	negativer dekadischer Logarithmus der Ca ²⁺ -Ionenkonzentration
PDB	Proteindatenbank (Protein Data Bank)

pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Ionenkonzentration
S1	Subfragment 1
S2	Subfragment 2
SAXS	Kleinwinkelstreuung (Small Angle X-ray Scattering)
SL	Sarkomerenlänge
SRS	Synchrotron Radiation Source
Tn	Troponinreflex
Triton X-100	Oktylphenolpoly(ethylenglykolether) _x
U	Einheit (Unit)

1 Einleitung

In der belebten Natur gibt es viele Prozesse, bei denen Dinge bewegt werden. Dabei handelt es sich oft um für den Menschen ohne Hilfsmittel nicht wahrnehmbare Bewegungen, wie z. B. den Geißelschlag eines Bakteriums oder den Transport von Vesikeln innerhalb von Zellen. Solche Vorgänge sind zu klein, um sie mit dem bloßen Auge registrieren zu können. Soll sich etwas im großen Stil bewegen, müssen mehrere Zellen gleichzeitig angesprochen und zu einer konzertierten Aktion gebracht werden. Alle makroskopischen Bewegungsprozesse sind deshalb auf größere, gemeinsam agierende Zellverbände zurückzuführen. Bei den Wirbeltieren handelt es sich dabei um glatte oder quergestreifte Muskeln. Die glatte Muskulatur ist nicht dem Willen unterworfen. Zu ihr gehören die Muskeln des Intestinaltrakts, der Blut- und der Lymphgefäße. Quergestreifte Muskeln, deren Bezeichnung von ihrer streifenartigen Erscheinung im Lichtmikroskop herrührt, werden weiter in skeletal und kardial unterschieden. Während die Skelettmuskeln willkürlich bewegt werden können, arbeitet der Herzmuskel unwillkürlich.

Die quergestreifte Skelettmuskulatur ist wegen ihrer sehr regelmäßigen Struktur, die fast an die eines Kristalls heranreicht, dazu prädestiniert, röntgenstrukturanalytisch untersucht zu werden. Während die Elektronenmikroskopie z. T. sehr hoch auflösende Bilder vom Muskelaufbau liefern kann, ist sie nicht in der Lage, den Muskel bei seiner Bewegung zu beobachten. Untersuchungen an isolierten Aktinfilamenten können zum besseren Verständnis deren Feinstruktur beitragen, jedoch fehlt hier die Interaktion mit Myosin. So sind besonders der Mechanismus der Krafterzeugung und die dafür notwendigen strukturellen Änderungen der Muskelproteine noch nicht vollständig aufgeklärt.

Diese Arbeit soll dazu beitragen, die strukturellen Änderungen, welche zu Beginn der Kraftentwicklung im Wirbeltierskelettmuskel stattfinden, besser zu verstehen. Als Werkzeug wurde die Röntgenstrukturanalyse eingesetzt. Mit ihrer Hilfe lassen sich Masseumlagerungen auf Proteinebene im nativen Muskel erkennen. Zur besseren Interpretation der mit diesem Verfahren registrierten Röntgendiffraktionspattern wurde ein Computermodell der Anordnung bestimmter Muskelproteine entworfen.

1.1 Struktur und Funktion des quergestreiften Muskels

Der quergestreifte Skelettmuskel der Wirbeltiere besteht aus mehreren Muskelfaserbündeln. Jede einzelne Faser ist eine mehrkernige Zelle mit einem Durchmesser von ca. 50 - 100 μm und einer Länge von 2 - 30 cm. Eine Faser besteht aus mehreren Myofibrillen, deren Durchmesser etwa 1 - 2 μm beträgt. Die Zellkerne sind außen an der Faser lokalisiert und die Mitochondrien liegen verstreut zwischen den Myofibrillen. Unter dem Lichtmikroskop zeigen die Myofibrillen eine deutliche Querstreifung. Sie entsteht durch die Unterteilung in Sarkomere, wiederkehrende Untereinheiten von etwa 2 - 3 μm Länge, abhängig vom Funktionszustand des Muskels (Squire, 1981). In Abbildung 1.1 a ist der Muskelaufbau schematisiert dargestellt, Abbildung 1.1 b zeigt den Ausschnitt aus einem Sarkomer.

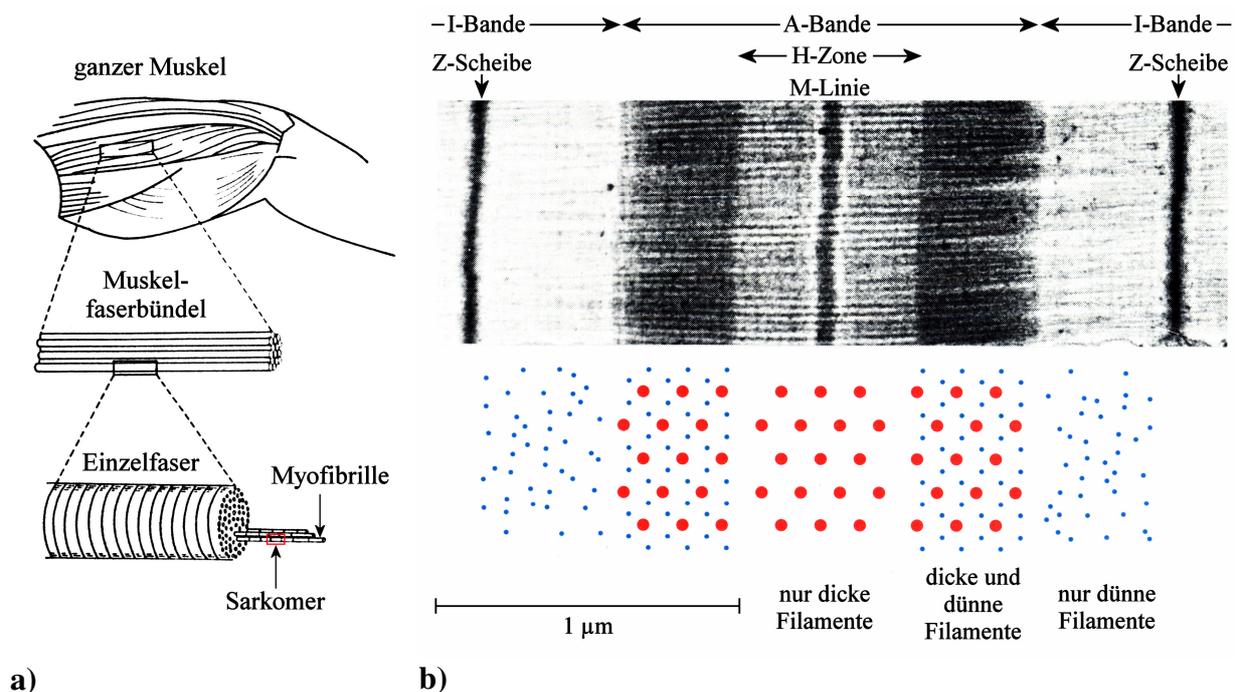


Abbildung 1.1: Aufbau des quergestreiften Wirbeltierskelettmuskels

a) Der quergestreifte Skelettmuskel der Vertebraten besteht aus mehreren Muskelfaserbündeln, die einzelnen Fasern wiederum aus mehreren Myofibrillen. Die Untereinheiten der Myofibrillen sind die Sarkomere. b) Ausschnitt aus einem Sarkomer, dem Bereich zwischen zwei Z-Scheiben. Beschreibung s. Text. a) verändert nach Wakabayashi, K. und Amemiya (1991), b) aus Stryer (1995, nach H. E. Huxley).

Die Namen gebende Querstreifung des Skelettmuskels im Lichtmikroskop rührt von der regelmäßigen Anordnung der Aktin- und Myosinfilamente her. Wegen ihres jeweiligen Durchmessers werden sie auch als dünnes bzw. dickes Filament bezeichnet. Im Zentrum des Sarkomers liegen die Myosinfilamente. Sie sind an der M-Linie nebeneinander im hexagonalen Gitter aufgehängt und überlappen zum Teil mit den Aktinfilamenten, welche an den Z-Scheiben tetragonal nebeneinander aufgehängt sind. Der mit Licht gut zu durchleuchtende Bereich um die Z-Scheiben herum wird auch als I-Bande (isotrop) bezeichnet, wohingegen der dunkler erscheinende Bereich, in dem die Myosinfilamente liegen, doppelbrechend ist und entsprechend A-Bande (anisotrop) genannt wird. Die H-Zone liegt innerhalb der A-Bande, hier findet keine Überlappung der dicken mit den dünnen Filamenten statt.

Neben den beiden Hauptbestandteilen Aktin und Myosin sind noch andere Moleküle im Sarkomer vorhanden. Dazu gehören das C-Protein, gebunden ans dicke Filament, Nebulin, gebunden ans dünne Filament und Titin. Im folgenden wird nur noch auf den Aufbau von Aktin- und Myosinfilament näher eingegangen, da dies für das Verständnis der Muskelfunktion von grundlegender Bedeutung ist.

1.1.1 Das Myosinfilament

Ein Myosinfilament im Sarkomer eines Wirbeltierskelettmuskels hat eine Länge von etwa $1,6 \mu\text{m}$, der Durchmesser beträgt ca. 15 nm (Squire, 1981). Es besteht aus einer Vielzahl von Myosinmolekülen, die in den beiden Hälften des Sarkomers entgegengesetzt zueinander ausgerichtet sind. Ein einzelnes Myosinmolekül, dargestellt in Abbildung 1.2 b, hat eine Länge

von ca. 180 nm (Elliott und Offer, 1978) und ein Molekulargewicht von etwa 500 kDa (Lowey *et al.*, 1969). Es kann enzymatisch in kleinere Untereinheiten zerlegt werden. Die beiden, am einen Ende liegenden globulären Domänen, die Myosinköpfe, werden demzufolge auch als S1 (Subfragment 1) bezeichnet. Die daran anschließenden Ketten, zwei superspiralisierte α -Helices, sind unterteilt in S2 (Subfragment 2) und LMM (leichtes Meromyosin). Im Gegensatz zum LMM werden S1 und S2 auch als HMM (schweres Meromyosin) bezeichnet (Lowey und Cohen, 1962, Lowey *et al.*, 1969).

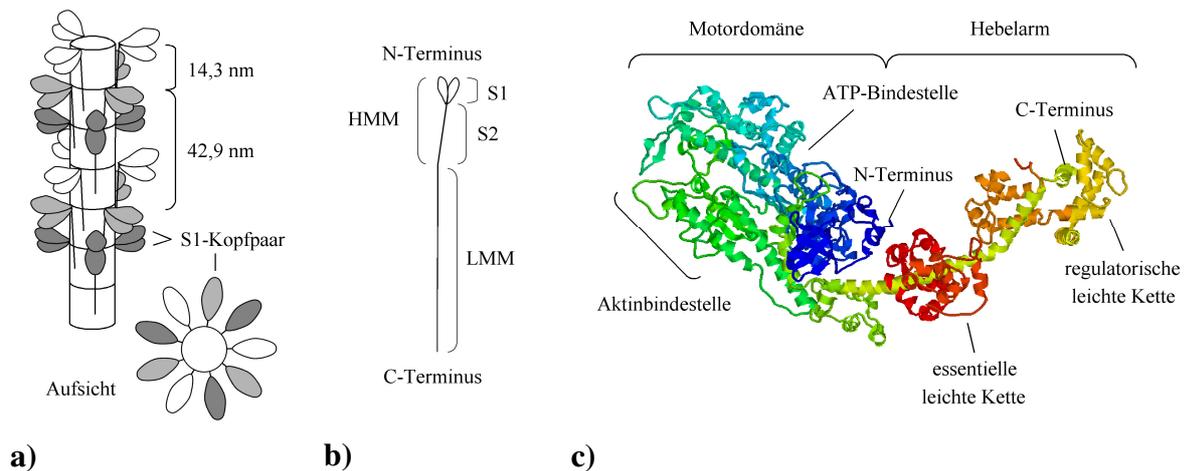


Abbildung 1.2: Aufbau des Myosinfilaments

a) Ausschnitt aus einem Myosinfilament, b) einzelnes Myosinmolekül, c) S1-Kopf. Graphik c) wurde mit dem Programm RASMOL (Sayle und Milner-White, 1995) erzeugt. Die Molekülstruktur wurde von M. Lorenz übernommen, sie basiert auf den Daten von Rayment *et al.* (1993b). Erläuterungen s. Text.

In der Abbildung 1.2 a ist ein schematisierter Ausschnitt aus einem Myosinfilament zu sehen. Es besteht aus vielen zusammengelagerten Myosinmolekülen, deren leichte Ketten das zylinderförmige Rückgrat („backbone“) bilden. Durch die Anordnung der Myosinmoleküle gruppieren sich auf der Oberfläche des Filaments Ebenen mit jeweils drei Kopfpaares im Winkel von 120° zueinander. Sie haben einen Abstand von jeweils 14,3 nm in axialer Richtung. Da die Myosinköpfe jeder Ebene zur vorhergehenden um 40° verdreht sind, kommen sie nur in jeder dritten Ebene zur Deckung.

Die S1-Moleküle oder Myosinköpfe (s. Abbildung 1.2 c) fungieren als aktiver Part in der Muskelbewegung. Sie können mit einem Teil der Motordomäne ans Aktinfilament binden und es durch eine Kraft erzeugende Konformationsänderung relativ zum Myosinfilament verschieben. Die Loslösung vom Aktinfilament geschieht unter ATP-Spaltung. Das S1-Molekül hat eine Länge von ca. 19 nm und ist an der dicksten Stelle etwa 5 nm breit (Elliott und Offer, 1978). Es besteht aus einer schweren und zwei leichten Ketten, die nicht kovalent an die schwere Kette gebunden sind. Die schwere Kette läßt sich strukturell in Motordomäne und Hebelarm unterteilen. Das Molekulargewicht des gesamten Kopfs liegt bei 130 kDa, wovon jeweils 15 bis 20 kDa auf die regulatorische und die essentielle leichte Kette entfallen (Margossian *et al.*, 1981, Weeds und Lowey, 1971). Obwohl die leichten Ketten nicht direkt an der ATP-Spaltung beteiligt sind, sind sie zur Stabilisierung der Myosinkonfiguration wesentlich, insbesondere zur Stabilisierung der langen α -Helix im Hebelarm (Wagner und Gini-ger, 1981).

1.1.2 Das Aktinfilament

Die Länge eines Aktinfilaments im Sarkomer eines Säugetierskelettmuskels beträgt etwa 1,1 μm , der Durchmesser liegt bei 10 nm (Egelman und Padron, 1984). Seine Struktur wurde mit Hilfe von Elektronenmikroskopie und Röntgenkristallographie untersucht und bestimmt (z. B. Egelman, 1985, Holmes *et al.*, 1990, Mendelson und Morris, 1994). Das Aktinfilament (s. Abbildung 1.3 a) besteht aus globulären Untereinheiten, den Aktinmonomeren oder G-Aktinen (s. Abbildung 1.3 b), die bei physiologischer Ionenstärke durch ATP-Spaltung zum filamentösen F-Aktin mit helikaler Struktur aggregieren. An den beiden Seiten dieser Helix verlaufen die Doppelstränge der fadenförmigen Tropomyosinmoleküle (s. Abbildung 1.3 c). Sie werden begleitet von den globulären Troponinmolekülen (s. Abbildung 1.3 d), welche in bestimmten Abständen an das Filament gebunden sind.

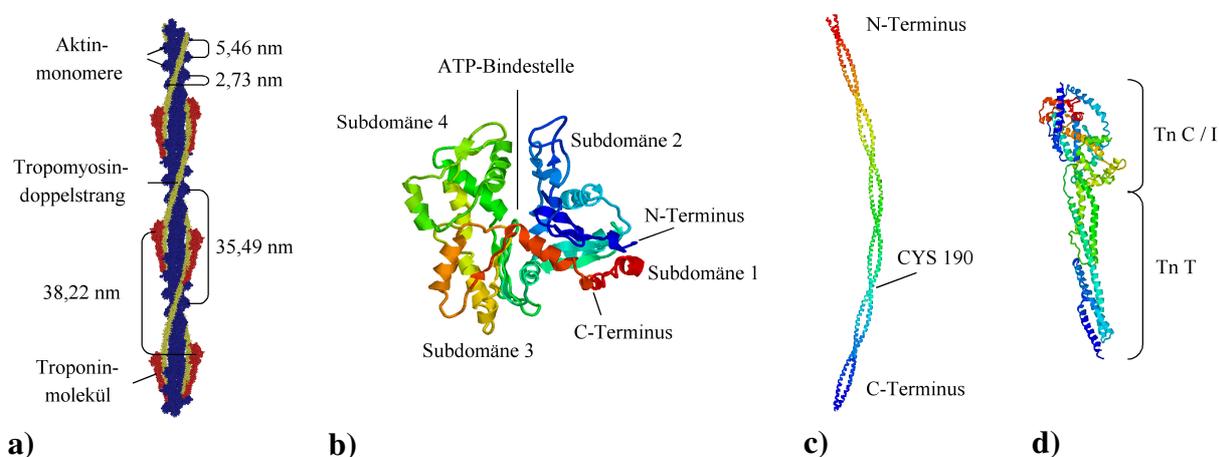


Abbildung 1.3: Aufbau des Aktinfilaments

a) Ausschnitt aus einem Aktinfilament (Aktinmonomere blau, Tropomyosindoppelstrang gelb, Troponin rot). b) Aktinmonomer, c) Tropomyosindoppelstrang ohne Überlappungsregion, d) Troponinmolekül, die Struktur wurde erstellt aus Fragmenten von Troponin C und I, sowie α -Aktinin. Alle Graphiken wurden mit dem Programm RASMOL (Sayle und Milner-White, 1995) erzeugt. Die Strukturdaten von Aktinmonomer und Tropomyosindoppelstrang wurden von Lorenz *et al.* (1993, 1995) übernommen. Erläuterungen s. Text.

In der einzelsträngigen Aktinhelix beträgt der Winkel zwischen zwei aufeinander folgenden Monomeren $166,154^\circ$. Der Abstand in axialer Richtung liegt bei 2,73 nm (Huxley, H. E. und Brown, 1967). Aus diesem Aufbau resultiert das doppelsträngige Aussehen der Aktinhelix.

Da zwei aufeinander folgende Monomere um einen Winkel von $-166,154^\circ$, bzw. $+193,846^\circ$ gegeneinander versetzt sind, befindet sich nach einer vollen Umdrehung nur ein Teil der Masse zweier Monomere direkt übereinander. Als Steigung der Helix, also der Länge in axialer Richtung, die einer vollen Umdrehung von 360° entspricht, erhält man zwei unterschiedliche Werte. Dies ist abhängig davon, ob die Helix als links- oder rechtshändig angesehen wird (Vgl. Abschnitt 1.2.2 und 1.2.3, Abbildung 1.15 d). Im Falle der linkshändigen Helix mit dem Drehwinkel von $-166,154^\circ$, wobei in axialer Richtung 2,73 nm zurückgelegt werden, ergibt sich für eine volle Drehung um 360° ein Wert von 5,91 nm für die Steigung. Unter der Annahme einer rechtshändigen Helix mit dem Drehwinkel von $+193,846^\circ$, beträgt die Steigung 5,07 nm.

Da erst nach sechs vollen Umdrehungen dieser Helix zwei Monomere direkt übereinander zu liegen kommen, was dem 13fachen des Winkels zwischen zwei Monomeren entspricht, wird

die Aktinhelix auch als 13/6-Helix bezeichnet. Die Steigung („true repeat“) dieser langen Helix („long-pitch helix“) ergibt rein rechnerisch einen Wert von 35,49 nm. Im realen Sarkomer weichen die Steigungen einzelner Abschnitte der Aktinhelices allerdings in unterschiedlich starkem Maße vom Idealwert ab. Es ergeben sich Über- oder Unterdrehungen („over-“, oder „undertwists“), die zu einer Streuung der Steigungswerte („Crossoverlängen“) der Long-Pitch Helix im Bereich von 30 nm bis 45 nm führen (Hanson, 1967).

Die Struktur des Aktinmonomers wurde von Kabsch *et al.* (Kabsch *et al.*, 1985, Kabsch *et al.*, 1990, Kabsch und Vandekerckhove, 1992) röntgenkristallographisch aus Kristallen des Aktin-DNAse I-Komplexes determiniert (Proteindatenbank-Code 1ATN) und später von Lorenz *et al.* mit Hilfe von Modellierungsergebnissen verbessert (Lorenz *et al.*, 1993). Bestehend aus 375 Aminosäuren, besitzt es ein Molekulargewicht von 42 kDa und hat eine Größe von ca. $6 \times 4 \times 4$ nm (Milligan und Flicker, 1987). In Abbildung 1.3 b ist die Einteilung der Molekülstruktur in die vier Untereinheiten (Subdomänen) gezeigt. In der Nukleotidbindetasche kann neben ATP noch ein zweifach geladenes Metallion binden. Die Bindestellen für den Myosinkopf liegen über mehrere Subdomänen verteilt (Rayment *et al.*, 1993a, Vibert *et al.*, 1997, Lehman *et al.*, 2000, s. Abbildung 3.31).

Das der Long-Pitch Helix des Aktins folgende Tropomyosin dient der Regulation der Muskel-funktion. Seine Struktur wurde zuerst von Phillips *et al.* bestimmt (Phillips *et al.*, 1986, Whitby *et al.*, 1992, Whitby und Phillips, 2000). Es besteht aus zwei superspiralisierten α -Helices. Beide Ketten haben ein Molekulargewicht von jeweils etwa 34 kDa (Holtzer *et al.*, 1965, Woods, 1967), sind etwa 40 nm lang (Rowe, 1964, Ooi und Fujime-Higashi, 1971) und bestehen aus je 284 Aminosäuren (Sodek *et al.*, 1972, Stone und Smillie, 1978). Entlang der Aktinhelix überlappen aufeinander folgende Tropomyosinmoleküle mit ca. 8 - 10 Aminosäuren (McLachlan und Stewart, 1975). Der Binderadius des Tropomyosins am Aktin beträgt 3,9 nm, wobei von einem Doppelstrang 7 Aktinmonomere überspannt werden (Lorenz *et al.*, 1995). Die Struktur ohne Überlappungsregion ist in Abbildung 1.3 c zu sehen. Im Bereich der Position der Aminosäure Cystein 190 bindet Troponin ans Tropomyosin (Nonomura *et al.*, 1968, Stewart, 1975).

Jedem Tropomyosinmolekül ist ein Troponinmolekül zugeordnet (Ebashi und Endo, 1968). Es besteht aus drei Untereinheiten, dem Calcium bindenden Troponin C, dem inhibitorischen Troponin I und dem Tropomyosin bindenden Troponin T. Sie besitzen zusammen ein Molekulargewicht von etwa 80 kDa, wobei auf Troponin C 18 kDa, auf I 23 kDa und auf T 37 - 39 kDa entfallen (Ebashi und Endo, 1968, Greaser und Gergely, 1971, Greaser und Gergely, 1973). Die exakte Molekülstruktur aller drei Untereinheiten ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Es existieren lediglich Teilstrukturen von Troponin C allein (Satyshur *et al.*, 1988, Sundaralingam *et al.*, 1985, PDB-Code 1TOP), oder Troponin C in Komplex mit Fragmenten von Troponin I (Vassilyev *et al.*, 1998, Saijo *et al.*, 1997, PDB-Code 1A2X; Tung *et al.*, 2000, PDB-Code 1EW7). Erst kürzlich wurden zwei Strukturen der Kerndomäne des humanen kardialen Troponins veröffentlicht (Takeda *et al.*, 2003, PDB-Code 1J1D bzw. 1J1E). Sie haben ein Molekulargewicht von 46 kDa bzw. 52 kDa. Somit fehlen immer noch etwa 50 - 60 Prozent der Masse für eine vollständige Proteinstruktur. Aus diesem Grund ist das in Abbildung 1.3 d dargestellte Troponinmolekül eine Annäherung der Gesamtstruktur mit einer Kombination von Teilen eines Fragments von Troponin C und I (PDB-Code 1EW7) mit ei-

nem Fragment des humanen skelettmuskulären α -Aktinins (Djinovic-Carugo *et al.*, 1999, PDB-Code 1QUU). Es entspricht keiner tatsächlich ermittelten Molekülstruktur und darf daher nur als Modell angesehen werden. Die Funktion von Troponin besteht, zusammen mit Tropomyosin, in der Regulation der Muskelbewegung, die im nächsten Kapitel beschrieben wird.

1.1.3 Die Muskelbewegung und ihre Regulation

Da sich die Länge der A-Bande bei der Verkürzung des Muskels nicht verändert, jedoch die Ausdehnungen von I-Bande und H-Zone abnehmen (Vgl. Abbildung 1.1 b), schloß man daraus, daß die Muskelkontraktion auf einem Gleiten der Aktin- und Myosinfilamente aneinander entlang beruht („sliding filament model of contraction“, Huxley, A. F. und Niedergerke, 1954, Huxley, H. E. und Hanson, 1954). Abbildung 1.4 a zeigt das Filamentgleiten und die damit einhergehende Verkürzung des Sarkomers im Schema. Angetrieben wird dieser Prozeß durch den Querbrückenzyklus, einem zyklischen Anheften und Ablösen der Myosinköpfe ans Aktinfilament unter ATP-Spaltung durch die Myosinköpfe („cross-bridge cycle“, Huxley, A. F., 1957a, Huxley, H. E., 1957b). Der vereinfachte Zyklus (nach Lymn und Taylor, 1971) ist in Abbildung 1.4 b graphisch dargestellt.

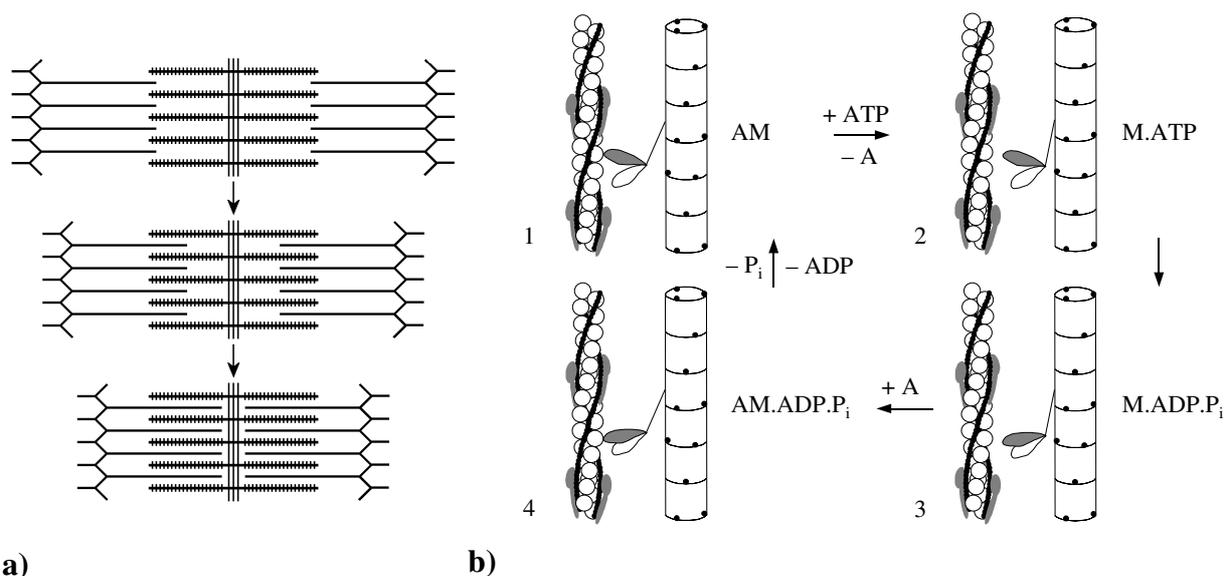


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung von Gleitfilamenttheorie und Querbrückenzyklus

a) Innerhalb eines Sarkomers gleiten dicke und dünne Filamente aneinander entlang („sliding filaments“), es kommt zur Verkürzung des Sarkomers. b) Querbrückenzyklus, A: Aktin, M: Myosin, P_i : anorganisches Phosphat. Ein S1-Kopf (grau) ist ans Aktinfilament gebunden (1); ATP bindet ans S1, dieses löst sich vom Aktin ab (2); das ATP wird gespalten in ADP und P_i , dabei geht die S1-Konformation in den Ausgangszustand zurück (3); S1 bindet erneut ans Aktinfilament (4); der kraft erzeugende Ruderschlag des Kopfs wird ausgeführt, dabei werden die Spaltprodukte ADP und P_i abgegeben, der Zyklus kann von neuem beginnen (1). a) nach H. E. Huxley (1956), b) nach Lymn und Taylor (1971).

Dieses sehr einfache Modell wurde inzwischen ständig erweitert. Mit der Entdeckung weiterer Zwischenzustände (Stein *et al.*, 1979, Eisenberg und Greene, 1980, Geeves *et al.*, 1984, Eisenberg und Hill, 1985) entstand die Vorstellung, daß Myosinköpfe unterschiedlich stark

ans Aktin binden können („weak und strong binding states“, Stein *et al.*, 1979, Eisenberg und Greene, 1980, Brenner *et al.*, 1982, Brenner *et al.*, 1986). Außerdem wird davon ausgegangen, daß die Phosphatfreisetzung durch die Bindung des S1-Kopfs ans Aktin induziert wird, während die ADP-Abgabe nach dem Kraft erzeugenden Ruderschlag stattfindet.

Damit der Querbrückenzyklus überhaupt durchlaufen werden kann, muß das Aktinfilament angeschaltet sein. Dies geschieht, indem ein Nervenimpuls die Muskelfaser dazu veranlaßt, Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum ins Zytoplasma auszuschütten. Die hohe Konzentration von Calciumionen führt dazu, daß die Calciumbindestellen am Troponin (Tn C) besetzt werden. Das Troponinmolekül, welches bei niedriger Calciumkonzentration die Anheftung des Tropomyosinmoleküls am Aktin vermittelt, ändert daraufhin seine Konformation und entläßt Tropomyosin (Hitchcock *et al.*, 1973, Potter und Gergely, 1974, Hitchcock, 1975). Dieses bewegt sich zur Seite und gibt die vorher verdeckten Bindestellen für die hochaffine Bindung des S1-Kopfs frei, das Aktinfilament ist angeschaltet („steric blocking mechanism“, Haselgrove, 1972, Huxley, H. E., 1972, Parry und Squire, 1973). Es wird davon ausgegangen, daß bei niedriger Calciumkonzentration Tropomyosin nur die Bindestellen für die starke S1-Bindung überdeckt, die für die schwache Bindung sind für den Myosinkopf zugänglich (Vgl. Abbildung 3.31). Eine stereospezifische Bindung kann jedoch erst bei hoher Calciumkonzentration zustande kommen, wobei das Tropomyosin vom bindenden S1-Kopf noch um ein weiteres Stück zur Seite geschoben wird („kooperativer Effekt“, Lehrer und Morris, 1982). So werden drei verschiedene azimuthale Tropomyosinpositionen angenommen, die von der vorhandenen Calciumkonzentration und der An- oder Abwesenheit der Myosinköpfe abhängig sind (Phillips *et al.*, 1986, McKillop und Geeves, 1993, Vibert *et al.*, 1997). Wie sich Troponin in Bezug auf Position und Konformation dabei verhält, ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Es existieren nur wenige Daten, die über strukturelle Änderungen von Troponin während der Aktivierung Auskunft geben (Narita *et al.*, 2001).

1.2 Prinzip der Röntgendiffraktion

Aufgrund der quasi-kristallinen Struktur des quergestreiften Wirbeltiermuskels ist die Strukturanalyse mit Hilfe von kohärenten Röntgenstrahlen möglich. Da herkömmliche Röntgenquellen nur eine geringe Strahlintensität bieten, liegt es nahe, hochenergetische Synchrotronstrahlung für die Versuche zu verwenden. So können je nach Anforderung Aufnahmen im Bereich von wenigen Sekunden bis herunter zu einigen hundertstel Sekunden gemacht werden.

Das Prinzip zur Nutzung der hochenergetischen Röntgenstrahlung für die Versuche ist an den verschiedenen Einrichtungen, wie dem ESRF in Grenoble, dem SRS in Daresbury oder dem DESY in Hamburg, das gleiche. Die in einem Beschleunigerring durch den Umlauf von elektrisch geladenen Teilchen, wie z. B. Elektronen, entstehende Bremsstrahlung (Synchrotronstrahlung) tritt tangential aus dem Ring aus. Sie wird mit Hilfe von Monochromatoren und nachgeschalteten Blenden auf einen bestimmten Wellenlängenbereich eingengt und durch Toroidalspiegel fokussiert. So gebündelt gelangt der Strahl in einen nach außen abgeschirmten Raum („hutch“), und trifft dort, wie in Abbildung 1.5 gezeigt, auf die Probe. Zum Schutz des Detektors vor der hohen Intensität des Hauptstrahls wird dieser durch ein in der evaku-

ierten Röhre aufgehängtes Stück Metall („beamstop“) absorbiert. Die viel schwächere Streustrahlung wird mit Hilfe des Detektors am Kameraende registriert. Die Aufnahme der Intensitätsverteilung findet dabei unter einem kleinen Winkel ($< 2^\circ$) zum Strahl statt („Kleinwinkelstreuung“, „SAXS“).

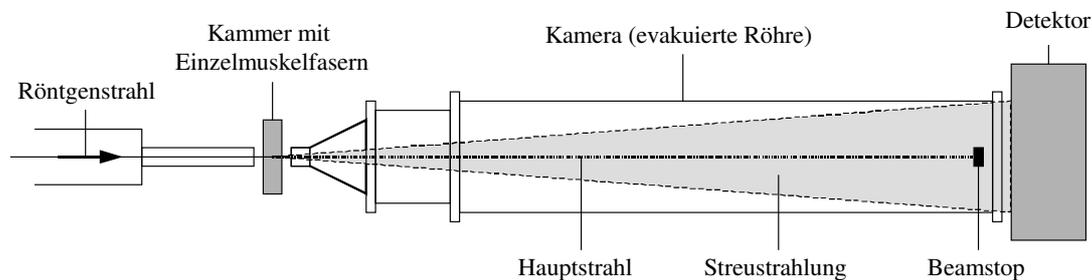
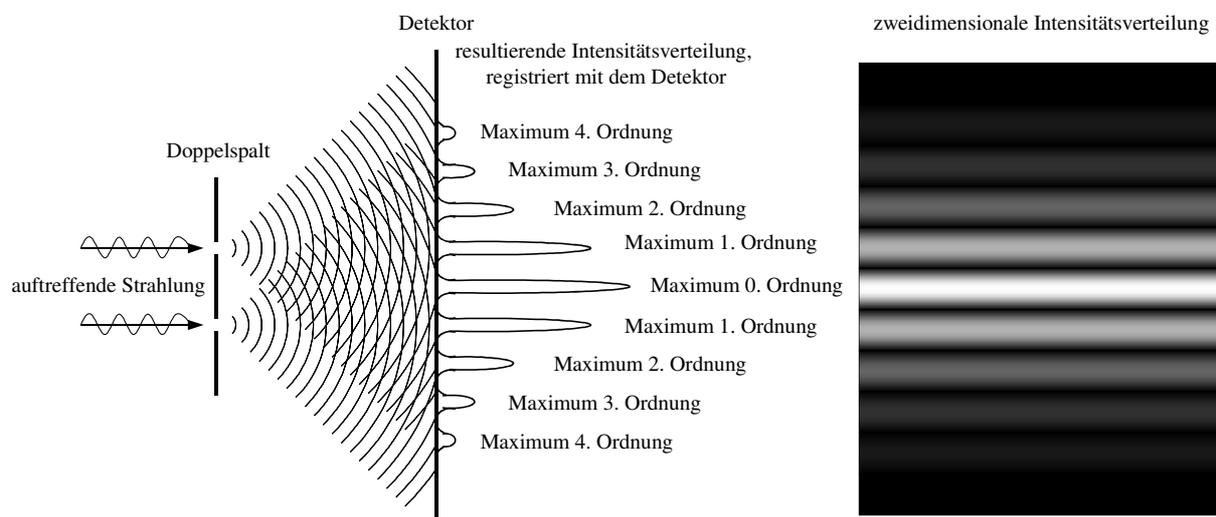


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Kameraaufbaus zur Registrierung von Röntgendiffraktionsmustern

Der fokussierte Strahl trifft von links kommend auf die Probe. Der Hauptstrahl und die entstandene Streustrahlung erreichen nach Durchqueren einer evakuierten Röhre den Detektor.

Der Röntgenstrahl ist nach dem Durchgang durch die Monochromatoren und Blenden auf ein schmales Wellenlängenband hoher Kohärenz eingengt. An den im Skelettmuskel regelmäßig angeordneten Strukturen wird der Strahl wie an einem Kristallgitter gebeugt. Abbildung 1.6 a zeigt das Prinzip der Beugung („Diffraction“, s. Squire, 1981, Holmes und Blow, 1966) von Wellen an Objekten, die senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Strahls nebeneinander angeordnet sind.



a)

b)

Abbildung 1.6: Prinzip der Diffraction

a) Treten kohärente elektromagnetische Strahlen durch einen Doppelspalt, dann führt die Überlagerung der Wellen zu einem Interferenzmuster. Die resultierende Intensitätsverteilung kann mit Hilfe eines Detektors registriert werden. Auf einem zweidimensionalen Detektor ergeben sich so waagerechte Streifen höherer Intensität (helle Streifen in b). Erläuterungen s. Text.

Beim Auftreffen kohärenter Strahlen auf einen Doppelspalt, entstehen nach dem Austritt auf der anderen Seite neue Elementarwellen (HUYGENSSCHES PRINZIP). Zur Vereinfachung ist in der Abbildung jeweils nur eine Wellenfront pro Spalt eingezeichnet, eigentlich ist jede Kante als Quelle einer neuen Wellenfront anzusehen. Bei einer Überlagerung der Wellen aus einem Strahl kommt es zur Interferenz. Dabei verstärken sich die Intensitäten der Wellen an den Stellen, an denen sie mit gleicher Phase schwingen, in den Bereichen mit entgegengesetzten Phasen löschen sie sich aus. Zwischen diesen beiden Extrema kommt es zu einer anteiligen Auslöschung bzw. Verstärkung der Intensitäten. So entsteht die mit Hilfe des Detektors registrierte Intensitätsverteilung (Abbildung 1.6 b). Aufgrund der unterschiedlichen Weglängen, die von zwei interferierenden Wellen zurückgelegt werden können, kommt es an unterschiedlichen Stellen auf dem Detektor zur Verstärkung, bzw. Auslöschung der Strahlen. Haben zwei Wellen die gleiche Strecke zurückgelegt, dann tragen sie zur Intensität des Maximums 0. Ordnung bei. Bei einem Gangunterschied zweier interferierender Wellen von einer Wellenlänge entsteht das Maximum 1. Ordnung, beim Gangunterschied von zwei Wellenlängen das 2. Ordnung usw. Der gleiche Effekt entsteht beim Auftreffen eines kohärenten Strahls auf ein Gitter.

Zur Entstehung von Interferenzbildern (Beugungsmustern, Diffraktionspattern) müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein. Die Intensitätsverteilung auf einem registrierten Bild ist abhängig von der Wellenlänge des Strahls, von der Entfernung zwischen Gitter und Detektor (Kameralänge) und vom Abstand und der Anzahl der einzelnen Gitterelemente. Für eine im Verhältnis zum Gitterabstand sehr lange Kamera läßt sich die Beziehung zwischen Gitterabstand, Wellenlänge und Intensitätsmuster vereinfacht wiedergeben (s. Abbildung 1.7).

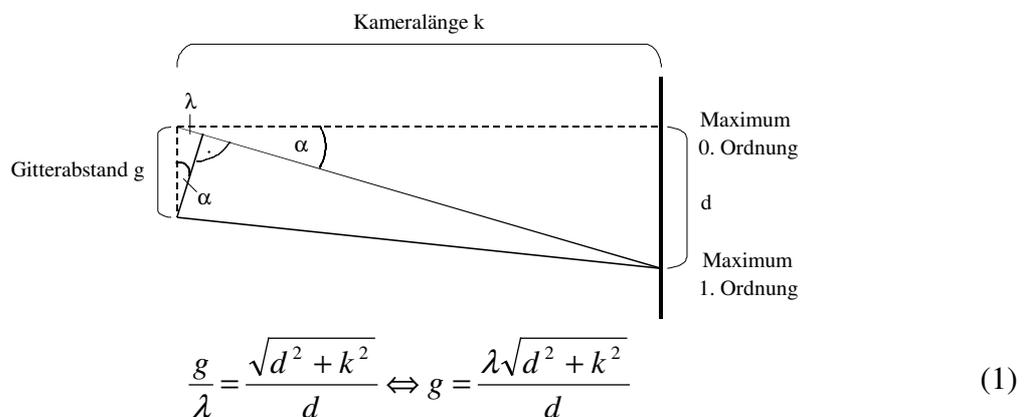


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Beugung am Gitter

Ist die Kameralänge um mehrere Zehnerpotenzen größer als der Gitterabstand (bei den für diese Arbeit verwendeten Kameralängen und den hier untersuchten Strukturen betrug das Verhältnis ca. $10^8 : 1$), dann ergibt sich nach dem Strahlensatz für ähnliche Dreiecke Gleichung (1). So kann bei bekannter Wellen- und Kameralänge der Gitterabstand einer Struktur anhand der Positionen der Maxima auf dem Diffraktionsbild errechnet werden.

Mit Hilfe der Zeichnung wird deutlich, daß bei kleiner werdendem Gitterabstand g und gleich bleibender Wellenlänge λ der Abstand zwischen den Maxima d größer werden muß. Nimmt g den Wert von λ an, dann ist $\alpha = 90^\circ$ und die Detektion des Maximums 1. Ordnung ist nicht mehr möglich. Ist g im Verhältnis zur Wellenlänge sehr groß, dann liegt das Maximum 1. Ordnung sehr nah an dem 0. Ordnung. Zur Auflösung der einzelnen Maxima muß dann eine entsprechend große Kameralänge verwendet werden. Von der Anzahl der Elemente im Gitter

hängt ab, wie hoch die Intensität und wie groß die Breite eines Maximums ist. Je mehr Elemente das Gitter besitzt, desto höher wird die Intensität der Maxima. Dies geschieht, weil aufgrund der größeren Anzahl von Gitterelementen („Diffraktoren“) mehr Strahlen gebeugt werden und dementsprechend zum Diffraktionsbild beitragen. Gleichzeitig nimmt mit steigender Anzahl der Gitterelemente die Breite der Maxima ab, denn abhängig von der Anzahl der Diffraktoren löschen sich Teilstrahlen im Randbereich der Maxima aus oder verstärken sich gegenseitig. So entstehen Nebenmaxima mit geringerer Intensität als die Hauptmaxima, letztere werden entsprechend schmaler (Vgl. Abbildung 2.9 c).

Aufgrund der strukturellen Eigenschaften des Skelettmuskels von Vertebraten entsteht auf einem davon registrierten Röntgendiffraktionspattern eine typische Intensitätsverteilung. Alle regelmäßig angeordneten Moleküle sind an der Entstehung von Bereichen höherer Intensität, den „Reflexen“ und „Schichtlinien“, auf dem Diffraktionsbild beteiligt. Unregelmäßig angeordnete Moleküle oder Molekülteile führen zu einer diffusen Streuung der Röntgenstrahlung. Dadurch entstehen keine Reflexe oder Schichtlinien, sondern eine charakteristische Intensitätsverteilung über das ganze Bild („Hintergrundstreuung“). Diese fällt von der Bildmitte nach außen ab.

1.2.1 Myosinreflexe und -schichtlinien

Durch die Anordnung der S1-Köpfe am Myosinfilament (Vgl. Abbildung 1.2 a) werden auf einem Röntgendiffraktionsbild bestimmte Reflexe und Schichtlinien erzeugt. Um dies zu illustrieren, zeigt Abbildung 1.8 a modellhaft die Anordnung der Myosinköpfe eines Filaments anhand einer Massenprojektion (s. Abschnitt 2.2).

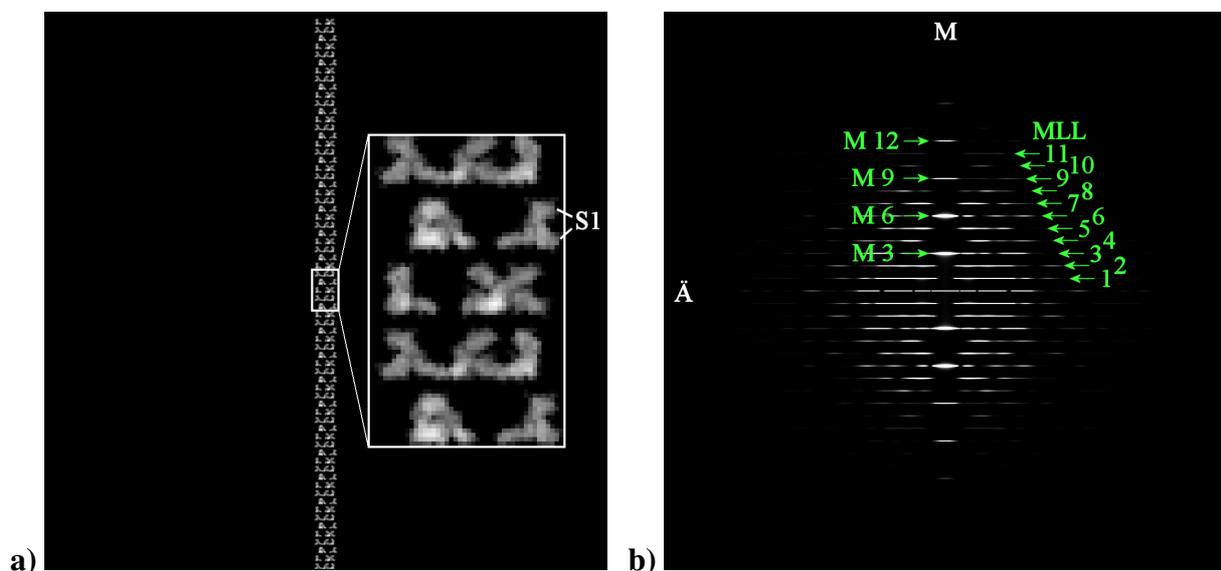


Abbildung 1.8: Massenprojektion der S1-Köpfe eines Myosinfilaments und resultierendes Diffraktionsbild

a) Massenprojektion von 408 Myosinköpfen in 68 Austrittsebenen („crowns“) auf ein Bild mit 1024×1024 Bildpunkten (Pixel). Um die Struktur deutlicher zu zeigen, ist ein Ausschnitt aus dem Filament herausvergrößert. b) Diffraktionsbild der Projektion in linearer Darstellung der Helligkeitswerte mit gleicher Bildgröße wie die Massenprojektion (Minimum: 0, Maximum: 5000000). Ä: Äquator, M (weiß): Meridian, MLL: Myosinschichtlinie („myosin layer line“), M (grün mit Zahl): Myosinreflex. Zur Erzeugung der Abbildungen s. Abschnitt 2.2.

Bei dieser Darstellung wurde das Filamentrückgrat zur Vereinfachung nicht berücksichtigt. In Abbildung 1.8 b ist das aus der Projektion berechnete Diffraktionsbild zu sehen. Die Bezeichnungen „Äquator“ und „Meridian“, auf der Abbildung 1.8 b mit weißem „Ä“ bzw. „M“ gekennzeichnet, beziehen sich auf die beiden Hauptachsen des Diffraktionsbilds. Die Bildachse, die bei der Aufnahme eines Röntgendiffraktionsbilds parallel zum Verlauf der Muskelfasern liegt, nennt sich „Meridian“, die dazu senkrecht stehende Achse „Äquator“. In der Abbildung 1.8 b sind parallel zum Äquator mehrere Linien zu sehen, die „Myosinschichtlinien“. Sie sind teilweise unterbrochen und haben gleiche Abstände voneinander. Die hellen Reflexe auf dem Meridian sind die „Meridionalreflexe“ des Myosins. Ihre Abstände voneinander sind dreimal so groß wie die zwischen den Myosinschichtlinien. Sie entstehen aufgrund der Anordnung der Myosinköpfe entlang des Filaments in übereinander liegenden Ebenen. Der Abstand zwischen zwei aufeinander folgenden Ebenen im Filament beträgt 14,3 nm (Vgl. Abbildung 1.2 a). Da die Reflexe auf dem Diffraktionsbild mit reziprokem Abstand vom Mittelpunkt angeordnet sind (Vgl. Abschnitt 2.2.4), liegt der erste Meridionalreflex (M 3) bei einem reziproken Abstand („spacing“) von $1 / 14,3 \text{ nm}^{-1}$. Wie bei der Beugung am Gitter entstehen neben diesem Maximum 1. Ordnung auch Maxima höherer Ordnung mit niedrigerer Intensität. In Abbildung 1.8 b sind aufgrund des gewählten Bildkontrasts die Maxima zweiter, dritter und vierter Ordnung mit doppeltem, dreifachem und vierfachem Abstand zum Äquator zu erkennen (M 6 bei $1 / 7,2 \text{ nm}^{-1}$, M 9 bei $4,8 \text{ nm}^{-1}$ und M 12 bei $3,6 \text{ nm}^{-1}$, Vgl. Abbildung 1.6 a und b).

Die Entstehung der Myosinschichtlinien läßt sich mit Hilfe des Konvolutionstheorems erklären. Das Theorem besagt, daß, wenn ein Objekt C als Konvolution („Faltung“) zweier einfacherer Objekte A und B (geschrieben als $A \sim B$) beschrieben werden kann, das Diffraktionsbild von C das Produkt der Diffraktionsbilder von A und B ist. Weiterhin gilt, wenn ein Objekt C das Produkt zweier einfacherer Objekte A und B ist, dann ist das Diffraktionsbild von C die Konvolution der Diffraktionsbilder von A und B.

Da die Anordnung der S1-Köpfe am Myosinfilament in Form einer regelmäßigen Helix vorliegt, kann mit Hilfe des Konvolutionstheorems das resultierende Diffraktionsbild abgeleitet werden. Aufgrund der sich wiederholenden Struktur der Helix kann diese in eine Reihe von einzelnen, aneinander grenzenden Helixumdrehungen zerlegt werden. Ist das Diffraktionsbild einer einzelnen Helixumdrehung bekannt, dann kann auf das Diffraktionsbild der gesamten Helix geschlossen werden. In Abbildung 1.9 wird das Konvolutionstheorem anhand der Erzeugung des Diffraktionsbildes einer kontinuierlichen Helix erläutert. Danach ergibt sich das Diffraktionsbild der gesamten Helix (f) aus der Multiplikation des Diffraktionsbildes (d) einer einzelnen Helixumdrehung (a) mit dem Diffraktionsbild (e) einer Reihe von jeweils im Abstand der Helixumdrehung übereinander angeordneten Gitterpunkten (b). Das Diffraktionsbild (d) einer einzelnen Helixumdrehung einer kontinuierlichen Helix (a) zeigt, in Abhängigkeit von der Helixsteigung, eine Intensitätsverteilung in Form eines Kreuzes (d). Das Diffraktionsbild (e) der Gitterpunkte (b) besteht aus mehreren horizontal verlaufenden, parallelen Linien mit dem reziproken Abstand der Länge einer Helixumdrehung voneinander. Die Multiplikation des aus der Helix resultierenden Kreuzes in (d) mit der Reihe horizontal verlaufender Linien in (e) ergibt ein Diffraktionsbild mit einem Helixkreuz (f), welches aus unterbrochenen horizontalen Linien besteht und seinen Mittelpunkt in der Mitte des Bildes hat. Diese

Linien, die Schichtlinien, werden von der Bildmitte ausgehend durchnummeriert, wobei mit $n = 0$ der Äquator bezeichnet wird. Zur Interpretation des Diffraktionsbildes der einzelnen Helixumdrehung s. Abschnitt 2.2.4.

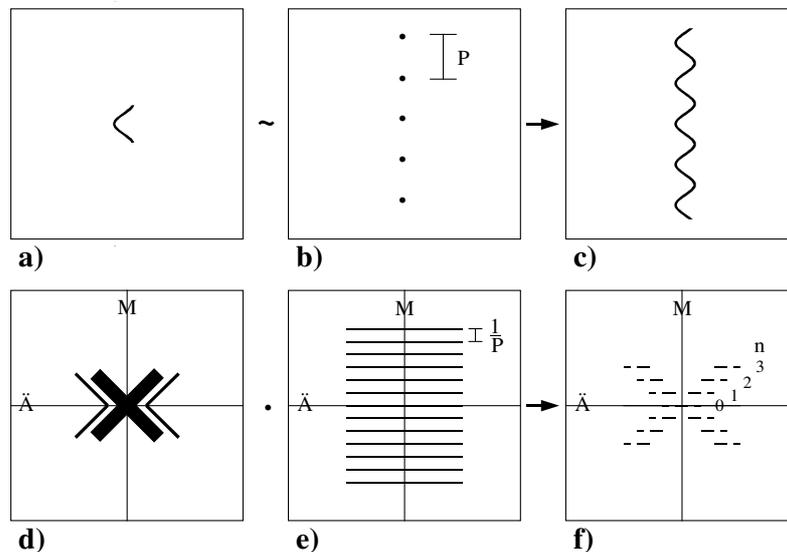


Abbildung 1.9: Entstehung des Diffraktionsbilds einer kontinuierlichen Helix (Schema)

a) Abbildung einer Umdrehung einer kontinuierlichen Helix, b) Abbildung einer Reihe von Punkten, die jeweils den Abstand einer Helixumdrehung voneinander haben. c) Konvolution von a) und b). c) entsteht, indem an jede Position der Punkte aus b) die Helix aus a) gesetzt wird. d) Diffraktionsbild von a), e) Diffraktionsbild von b). f) Diffraktionsbild von c) bzw. Produkt aus d) und e). Ä: Äquator, M: Meridian, n: Index der Schichtlinien (Zahlen von 0 bis 3). Abbildungen nach Squire (1981).

Obwohl die S1-Köpfe am Myosinfilament in Form einer Helix angeordnet sind, entspricht ein unterbrochenes Helixkreuz nicht dem Diffraktionsbild der Myosinköpfe in Abbildung 1.8 b.

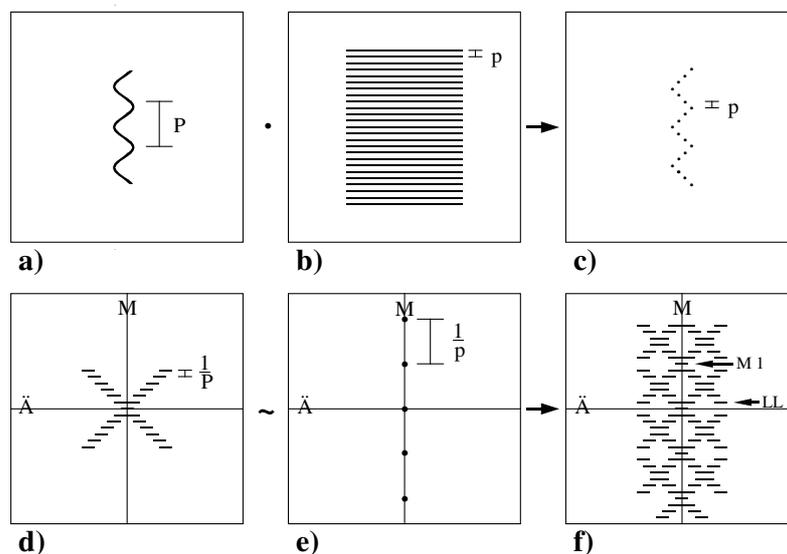


Abbildung 1.10: Entstehung des Diffraktionsbilds einer diskontinuierlichen Helix (Schema)

a) Abbildung einer kontinuierlichen Helix mit Steigung P , b) Abbildung mehrerer Linien, die jeweils den Abstand p zwischen zwei Untereinheiten der diskontinuierlichen Helix voneinander haben. c) Produkt aus a) und b). d) Diffraktionsbild von a), e) Diffraktionsbild von b). f) Diffraktionsbild von c) bzw. Konvolution aus d) und e), an jede Position der Punkte aus e) wird die unterbrochene Helix aus d) gesetzt. Ä: Äquator, M: Meridian, M 1: 1. Meridionalreflex (bei $1/p$), LL 1: 1. Schichtlinie (bei $1/P$). Abbildungen nach Squire (1981).

Dies läßt sich damit erklären, daß es sich bei der Myosinhelix nicht um eine kontinuierliche Helix handelt. Sie ist aus einzelnen, voneinander getrennten Myosinköpfen aufgebaut und daher diskontinuierlich. Das Diffraktionsbild einer diskontinuierlichen Helix kann wiederum mit Hilfe des Konvolutionstheorems hergeleitet werden (s. Abbildung 1.10). So kann eine diskontinuierliche Helix (c) mit der Steigung P auch als Produkt der Abbildungen einer kontinuierlichen Helix (a) mit der einer Anzahl senkrecht zur Helixachse verlaufenden Linien (b), jeweils mit dem Abstand p zweier Untereinheiten der diskontinuierlichen Helix voneinander („subunit axial translation“), betrachtet werden. Aus der Konvolution des Diffraktionsbildes der kontinuierlichen Helix (d) mit dem Diffraktionsbild der Linien (e) ergibt sich dann das Diffraktionsbild der diskontinuierlichen Helix (f). Dieses besteht aus einer Reihe von unterbrochenen Helixkreuzen, wobei der Abstand zwischen den einzelnen Schichtlinien, wie bei der kontinuierlichen Helix, dem reziproken Abstand einer ganzen Helixumdrehung ($1/P$) entspricht. Die Abstände der einzelnen Helixkreuze in axialer Richtung auf dem Diffraktionsbild entsprechen dem reziproken Abstand zweier Untereinheiten der Helix in axialer Richtung ($1/p$).

Daraus ergibt sich für die helikale Anordnung der Myosinköpfe in einem Filament ein Diffraktionsbild wie in Abbildung 1.8 b. Die einzelnen Helixkreuze sind aufgrund der großen Steigung der Helix entsprechend flach. Der Schnittpunkt von Äquator und Meridian, sowie die Meridionalreflexe (M 3, M 6, usw.) markieren die Positionen der einzelnen Helixkreuze, während die neben dem Meridian liegenden Schichtlinien die Arme der Helixkreuze darstellen. Das reziproke Spacing der ersten Myosinschichtlinie ($1/42,9 \text{ nm}^{-1}$) gibt die Größe der Helixsteigung an ($P = 42,9 \text{ nm}$), während der reziproke Abstand des ersten Meridionalreflexes vom Äquator ($1/14,3 \text{ nm}^{-1}$) den Rückschluß auf den Abstand der einzelnen Untereinheiten ($p = 14,3 \text{ nm}$) der diskontinuierlichen Helix zuläßt.

1.2.2 Reflexe und Schichtlinien des Aktinfilaments

Wie die S1-Köpfe im Myosinfilament sind auch die Aktinmonomere in Form einer diskontinuierlichen Helix angeordnet (s. Abbildung 1.11 a). Der Abstand zweier benachbarter Monomere in axialer Richtung beträgt $2,73 \text{ nm}$ (Vgl. Abschnitt 1.1.2 und Abbildung 1.3 a). Somit befindet sich der erste Meridionalreflex bei einem reziproken Spacing von $1/2,73 \text{ nm}^{-1}$. Dies ist auf dem Diffraktionsbild der Aktinhelix gut zu erkennen (s. Abbildung 1.11 b).

Anders als bei der Myosinhelix handelt es sich bei der Aktinhelix aber um eine nonintegrale Helix, das heißt, daß eine volle Helixumdrehung nicht durch eine ganzzahlige Anzahl von Monomeren repräsentiert wird. Die Steigung der einzelsträngigen, linkshändigen Helix entspricht einer Länge von $5,91 \text{ nm}$ und somit etwa $2,2$ Monomeren (Vgl. Abschnitt 1.1.2).

Um die Lage der Aktinschichtlinien auf dem Diffraktionsbild zu bestimmen, muß zusätzlich die echte Wiederholung R (True Repeat) der Helix berücksichtigt werden. Damit ist die Länge des Helixabschnitts in axialer Richtung gemeint, nach der zwei Monomere direkt übereinander zu liegen kommen. Das ist jeweils etwa nach 13 Monomeren und entsprechend sechs Umdrehungen der Fall. Die Steigung besitzt somit rein rechnerisch einen Wert von $35,49 \text{ nm}$. Aufgrund von Abweichungen in der helikalen Struktur, ergibt sich jedoch ein Mittelwert von

etwa $1 / 38 \text{ nm}^{-1}$ („variabler Aktintwist“, s. Abschnitte 2.2.3.1, 3.1.2.3 und 4.2.1), der an dieser Stelle zur Vereinfachung vernachlässigt wird.

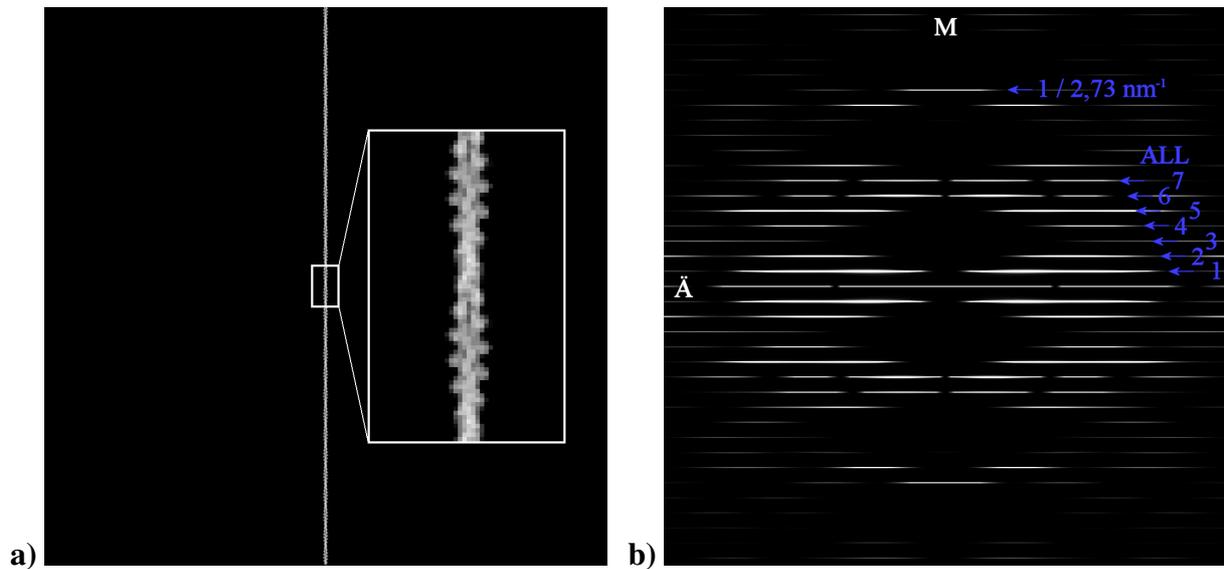


Abbildung 1.11: Massenprojektion der Aktinhelix und resultierendes Diffraktionsbild

a) Massenprojektion einer Aktinhelix, bestehend aus 360 Aktinmonomeren, auf ein Bild mit 1024×1024 Pixeln. Um die Struktur deutlicher zu zeigen, ist aus der Helix ein Ausschnitt herausvergrößert. b) Diffraktionsbild der Projektion in linearer Darstellung mit gleicher Bildgröße wie die Massenprojektion (Minimum: 0, Maximum: 50000). M: Meridian, Ä: Äquator, ALL: Aktinschichtlinie („actin layer line“). Im Bild sind nur die Positionen von ALL 1 - 7 markiert. Bei $1 / 2,73 \text{ nm}^{-1}$ liegt der erste Meridionalreflex. Zur Erzeugung der Abbildungen s. Abschnitt 2.2.

Die Schichtlinien des Helixkreuzes, welches sein Zentrum z. B. auf dem ersten Meridionalreflex hat, fallen bei der nonintegralen Helix nicht mit den Schichtlinien des Helixkreuzes, welches im Bildmittelpunkt liegt, zusammen. Eine Schichtlinie tritt generell in einem Abstand Z parallel zum Äquator auf, für den gilt (Vgl. Squire, 1981)

$$Z = \frac{m}{p} + \frac{n}{P} \quad (2)$$

wobei P die Steigung der Helix, p der Abstand zweier Monomere in axialer Richtung und m und n ganze Zahlen sind. Der True Repeat R der Helix erscheint nach t Helixumdrehungen, wenn $u = Pt/p$ ganzzahlig ist. u ist dann die Anzahl von Monomeren in t Umdrehungen einer Helix mit dem Repeat R . Somit gilt

$$R = Pt = pu \quad (3)$$

Das Diffraktionsbild ergibt sich dann als eine Serie von Schichtlinien mit Abständen Z , so daß gilt

$$Z = \frac{l}{R} \quad (4)$$

wobei l Nummer oder Index der Schichtlinie genannt wird. Die Kombination von (2) und (4) ergibt

$$Z = \frac{l}{R} = \frac{m}{p} + \frac{n}{P} \quad (5)$$

woraus mit (3)

$$l = ZR = \frac{mR}{p} + \frac{nR}{P} = \frac{m(pu)}{p} + \frac{n(Pt)}{P} = um + tn \quad (6)$$

folgt. Mit (6) lassen sich die Werte von n berechnen, die auf einer bestimmten Schichtlinie mit Index l möglich sind, wenn die Anzahl der Untereinheiten u in t Umdrehungen bekannt ist. n gibt die Ordnung der zugehörigen Besselfunktion einer Schichtlinie an. Damit läßt sich die Position des Maximums auf einer Schichtlinie bestimmen (Harford, J. und Squire, 1997). Mit Hilfe des Konvolutionstheorems kann das Diffraktionsbild der Aktinhelix anschaulich konstruiert werden (s. Abbildung 1.12).

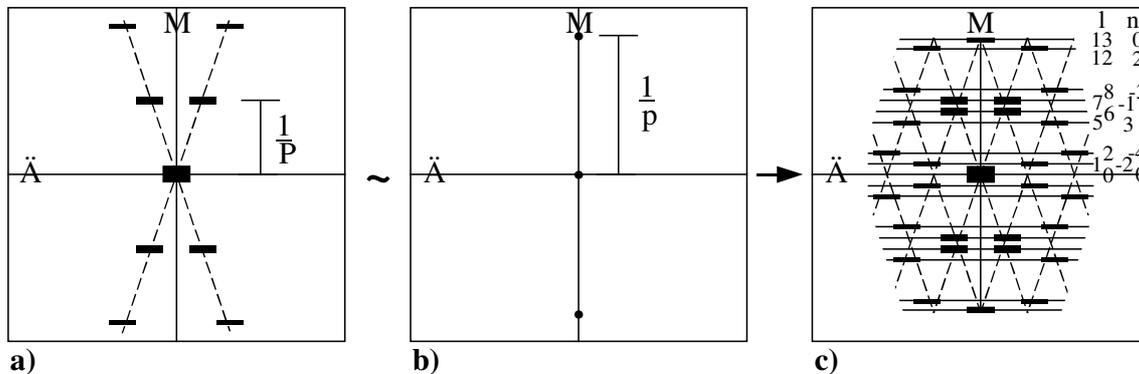


Abbildung 1.12: Entstehung des Diffraktionsbilds einer nonintegralen diskontinuierlichen Helix (Schema)

a) Diffraktionsbild einer kontinuierlichen Helix mit der Steigung P , die gestrichelten Linien dienen zur Orientierung für die Anordnung in c). b) Diffraktionsbild einer Reihe von Linien mit dem Abstand p . c) Konvolution aus a) und b). An jede Position der Punkte aus b) wird die unterbrochene Helix aus a) gesetzt. Die dünnen horizontalen Linien deuten die Positionen der Schichtlinien an. \ddot{A} : Äquator, M : Meridian, l : Schichtlinienindex, n : Ordnung der zugehörigen Besselfunktion. Abbildungen nach Squire (1981).

Aus dem Diffraktionsbild einer kontinuierlichen Helix (a) mit der Steigung $P = 5,91 \text{ nm}$ und dem Diffraktionsbild einer Reihe von Ebenen (b) mit dem Abstand $p = 2,73 \text{ nm}$, ergibt sich durch eine Konvolution das Diffraktionsbild (c) einer diskontinuierlichen und nonintegralen Helix, da P/p keine ganze Zahl ergibt. Das Auftreten der Schichtlinien kann mit Hilfe von Gleichung (5) berechnet werden:

$$Z = \frac{l}{35,49 \text{ nm}} = \frac{m}{2,73 \text{ nm}} + \frac{n}{5,91 \text{ nm}}$$

Die erste Aktinschichtlinie liegt demnach bei $Z = 1/R = 1/35,49 \text{ nm}^{-1}$ ($m = 1, n = -2$), die zweite bei $Z = 2/R = 1/17,75 \text{ nm}^{-1}$ ($m = 2, n = -4$), usw. Durch die Anordnung der unterbrochenen Helixkreuze (s. Abbildung 1.12 c), entstehen die neben dem ersten Meridionalreflex (bei $1/2,73 \text{ nm}^{-1}$) am deutlichsten hervortretenden Schichtlinien erst bei einem reziproken Spacing von $1/5,91 \text{ nm}^{-1}$ ($m = 0, n = 1$) und $1/5,07 \text{ nm}^{-1}$ ($m = 1, n = -1$).

Anders als die Monomere der Aktinhelix verlaufen die Tropomyosinmoleküle in einer Doppelhelix (s. Abbildung 1.13 a). Bei der hier verwendeten Auflösung erscheint das Tropomyosin als kontinuierliche Helix. Wegen des Verlaufs entlang der Long-Pitch Helix des F-Aktins besitzt die Tropomyosindoppelhelix eine Steigung, die im Bereich derjenigen der langen Aktinhelix liegt. Demzufolge ergibt sich für das Diffraktionsbild des Tropomyosins ein einfaches Helixkreuz in der Bildmitte, wobei die erste Tropomyosinschichtlinie bei einem reziproken Spacing von etwa $1 / 38 \text{ nm}^{-1}$ liegt (s. Abbildung 1.13 b).

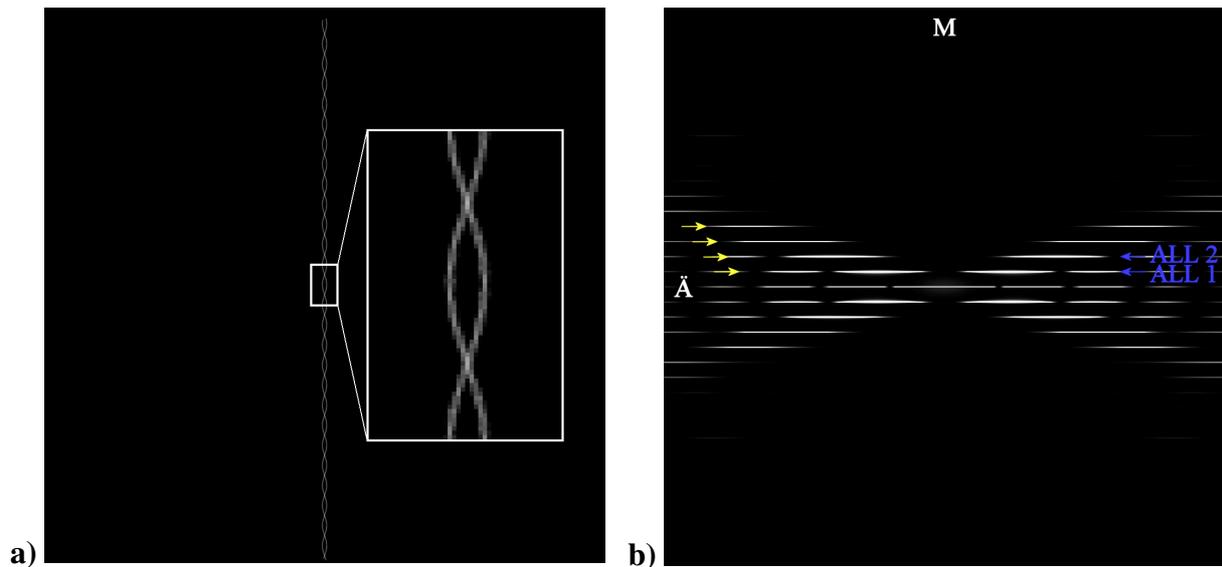


Abbildung 1.13: Massenprojektion aneinander gereihter Tropomyosinmoleküle und resultierendes Diffraktionsbild

a) Massenprojektion einer Doppelhelix aus insgesamt 50 aneinander gereihten Tropomyosindoppelsträngen auf ein Bild mit 1024×1024 Pixeln. Die Tropomyosinmoleküle folgen dem Verlauf der Long-Pitch Aktinhelix aus Abbildung 1.11 a. Um die Struktur deutlicher zu zeigen, ist aus der Helix ein Ausschnitt herausvergrößert. b) Diffraktionsbild der Projektion in linearer Darstellung mit gleicher Bildgröße wie die Massenprojektion (Minimum: 0, Maximum: 50000). Die gelben Pfeile deuten auf die Positionen der Tropomyosinschichtlinien. M: Meridian, Ä: Äquator, ALL 1, ALL 2: relative Positionen der Aktinschichtlinien eins und zwei. Zur Erzeugung der Abbildungen s. Abschnitt 2.2.

Anhand der Lage der Tropomyosinschichtlinien (gelbe Pfeile in Abbildung 1.13 b) wird deutlich, daß die azimuthale Tropomyosinposition einen Einfluß auf die Intensitätsverteilung von ALL 1 und 2 (blaue Pfeile) haben kann, da diese das gleiche reziproke Spacing wie die Tropomyosinschichtlinien besitzen.

Die Anordnung des Troponins am Aktinfilament entspricht einer diskontinuierlichen Doppelhelix mit einer sehr großen Steigung (s. Abbildung 1.14 a). Der erste Meridionalreflex (Tn 1) liegt aufgrund des Abstands zwischen zwei Troponinmolekülen in axialer Richtung bei etwa $1 / 38 \text{ nm}^{-1}$ (s. Abbildung 1.14 b). Die diskontinuierliche Helix führt zur Überlagerung mehrerer Helixkreuze, wobei durch den gewählten Kontrast in der Abbildung insgesamt fünf Meridionalreflexe zu sehen sind (Tn 1 - 5). Die Lage der Schichtlinien läßt sich wegen der großen Steigung der Helix, die im Bereich von etwa 500 nm liegt, in der Abbildung nur noch schwer erkennen. Die Intensitäten auf dem Diffraktionsbild des Troponins sind so verteilt, daß dadurch eine Beeinflussung der Intensitäten der Aktinschichtlinien bis zu einem Spacing, bei dem ALL 6 liegt, zu erwarten ist.

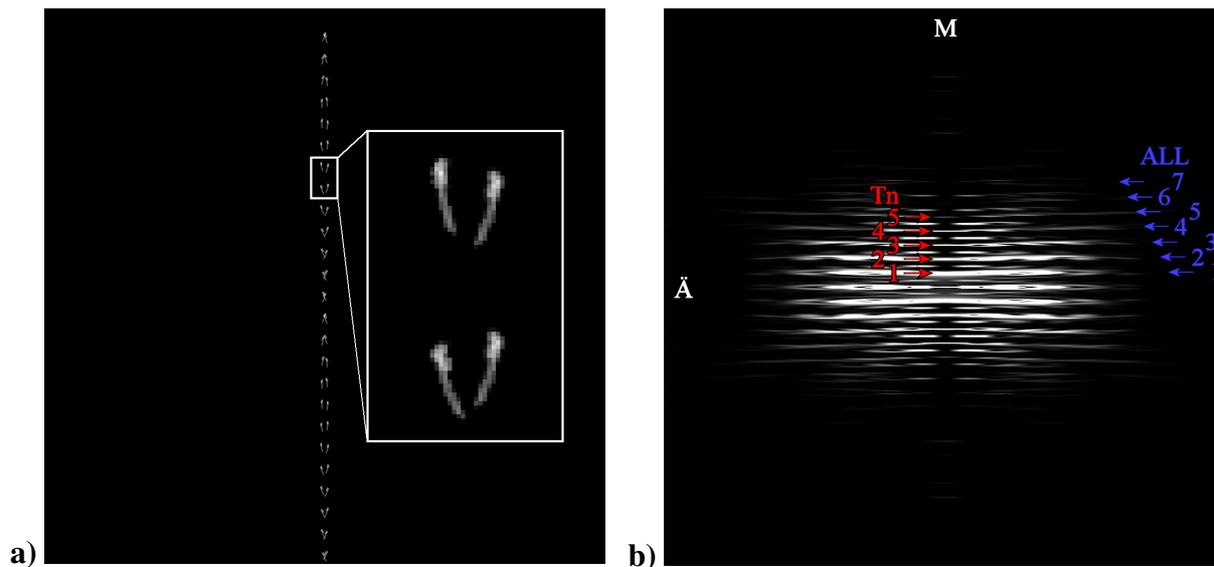


Abbildung 1.14: Massenprojektion von helikal angeordneten Troponinmolekülen und resultierendes Diffraktionsbild

a) Massenprojektion von insgesamt 50 einzelnen Troponinmolekülen auf ein Bild mit 1024×1024 Pixeln. Die Troponinmoleküle folgen dem Verlauf der Aktinhelix aus Abbildung 1.11 a. Um die einzelnen Moleküle deutlicher zu zeigen, ist ein Ausschnitt herausvergrößert. b) Diffraktionsbild der Projektion in linearer Darstellung mit gleicher Bildgröße wie die Massenprojektion (Minimum: 0, Maximum: 50000). M: Meridian, Ä: Äquator, ALL 1 - ALL 7: relative Positionen der Aktinschichtlinien eins bis sieben, Tn: Troponinreflex. Zur Erzeugung der Abbildungen s. Abschnitt 2.2.

1.2.3 Reflexe und Schichtlinien auf Röntgendiffraktionsbildern des Kaninchenskelettmuskels

Die Positionen der Schichtlinien und Reflexe, die von den Myosinköpfen, der Aktinhelix und der helikalen Anordnung der Tropomyosin- und Troponinmoleküle am Aktinfilament stammen, wurden in den Abschnitten 1.2.1 und 1.2.2 ausführlich beschrieben. Zum Vergleich mit den Diffraktionspattern realer Muskelfasern, zeigt Abbildung 1.15 a die Hälften zweier typischer Röntgendiffraktionsbilder, die unter verschiedenen Bedingungen registriert wurden.

In der oberen Bildhälfte ist eine Aufnahme, die unter Relaxationsbedingungen (niedrige Calciumkonzentration) gemacht wurde, dargestellt. In diesem Zustand sind die Myosinköpfe nicht stereospezifisch ans Aktinfilament gebunden, sondern zeigen eine Anordnung die mit der aus Abbildung 1.8 a vergleichbar ist. Aufgrund dessen sind in der Abbildung 1.15 a die drei Meridionalreflexe M 3, M 6 und M 9 zu sehen, sowie die Myosinschichtlinien MLL 1 - 6 (Vgl. Abbildung 1.8 b). Die jenseits von MLL 6 liegenden Myosinschichtlinien sind wegen ihrer schwachen Intensität auf dem Bild nicht mehr sichtbar. Der Bereich jenseits von M 9 liegt aufgrund der verwendeten Einstellungen von Kamera und Detektor außerhalb des Aufnahmebereiches. Von den Aktinschichtlinien sind unter Relaxationsbedingungen praktisch nur ALL 1, 6 und 7 zu sehen (Vgl. Abbildung 1.11 b). Der erste Meridionalreflex des Aktins bei $1 / 2,73 \text{ nm}^{-1}$ liegt außerhalb des detektierten Bereichs. Der Beitrag des Tropomyosins ist wegen der im Vergleich zu Aktin geringeren Masse relativ klein und liegt im äußeren Bereich von ALL 1 und 2 (Vgl. Abbildung 1.13 b). Vom Troponin sind die Meridionalreflexe Tn 1 - 3

erkennbar. Sie besitzen im Vergleich zu den Meridionalreflexen des Myosins nur eine schwache Intensität aufgrund der relativ zu den Myosinköpfen geringeren Masse, sowie der größeren axialen Abstände des Troponins entlang des Filaments.

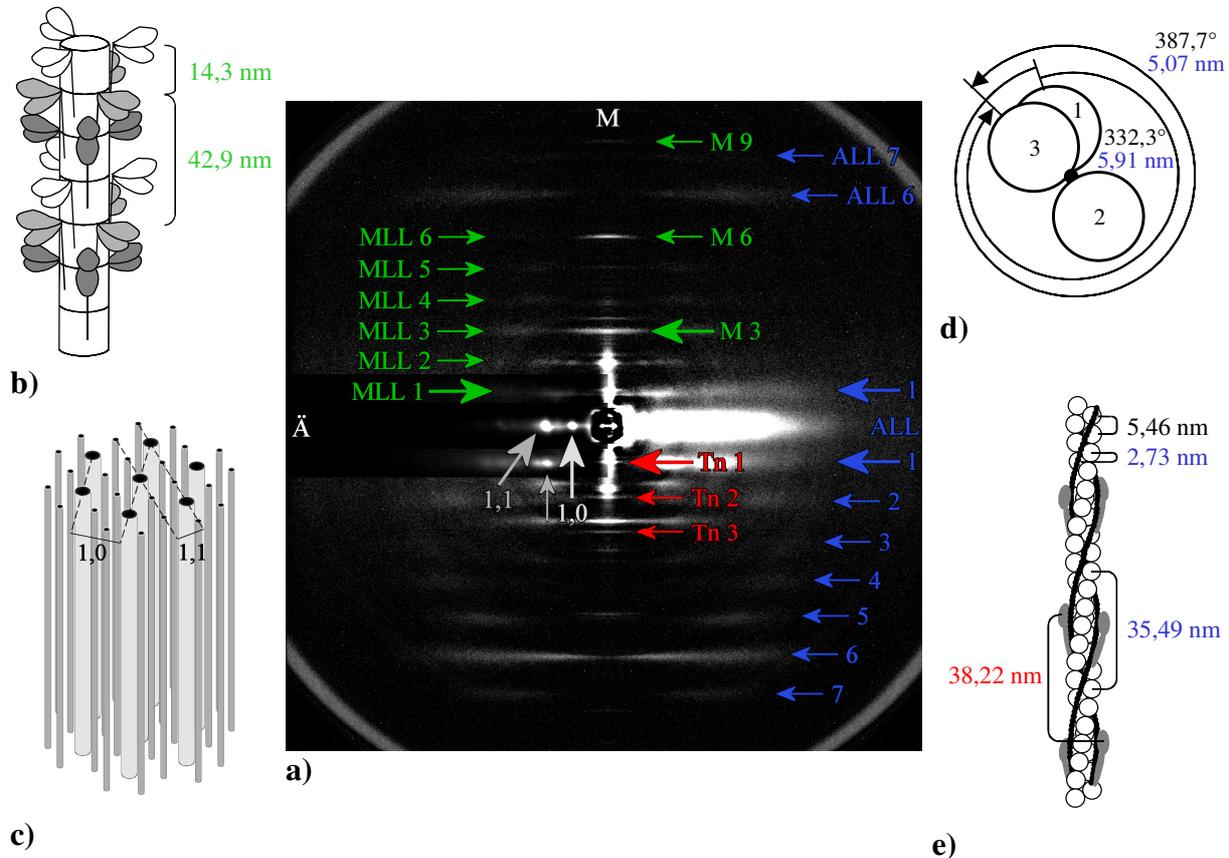


Abbildung 1.15: Röntgendiffraktionsbild des Kaninchenskelettmuskels unter Relaxationsbedingungen und im Rigor

a) Röntgendiffraktionsbild des Kaninchenskelettmuskels (*M. psoas*), registriert unter Relaxationsbedingungen (obere Bildhälfte), bzw. unter Rigorbedingungen (untere Bildhälfte). Der Bereich um die linke Hälfte um Äquator und ALL 1 bzw. MLL 1 wurde mit niedrigerem Kontrast dargestellt. Ä: Äquator, M (weiß): Meridian. b) Schematische Darstellung eines Myosinfilamentschnitts, aus dem Abstand zwischen zwei Austrittsebenen ergibt sich das Spacing von M 3 ($1 / 14,3 \text{ nm}^{-1}$), im Abstand von drei Ebenen liegen zwei Kopfpaare direkt übereinander. Das entspricht dem Spacing von MLL 1 ($1 / 42,9 \text{ nm}^{-1}$). c) Schematische Darstellung der Anordnung von Aktin- (mittelgrau) und Myosinfilamenten (hellgrau) im Überlappungsbereich. d) Schematische Darstellung der Aufsicht auf einen Aktinfilamentquerschnitt. Von einem Monomer (1) zum übernächsten (3) beträgt der Winkel beim Umlauf links herum $332,3^\circ$, beim Umlauf rechts herum $387,7^\circ$. Daraus ergeben sich für die Ganghöhe der Helix für 360° zwei unterschiedliche Werte ($5,91 \text{ nm}$, reziprok zu ALL 6 bzw. $5,07 \text{ nm}$, reziprok zu ALL 7). e) Schematische Darstellung eines Ausschnitts aus einem Aktinfilament. Der axiale Abstand von einem Monomer zum nächsten ergibt das Spacing des ersten Meridionalreflexes ($1 / 2,73 \text{ nm}^{-1}$, außerhalb des detektierten Bereichs). Aus der Steigung der Long-Pitch Helix folgt das Spacing für die erste Aktinschichtlinie ($\sim 1 / 35,49 \text{ nm}^{-1}$). Der erste Meridionalreflex des Troponins liegt bei $1 / 38,22 \text{ nm}^{-1}$. Die Aufnahmen wurden in Hamburg am DESY registriert. Weitere Erklärungen s. Text.

Die untere Hälfte von Abbildung 1.15 a wurde unter Rigorbedingungen registriert. Hier liegt bei einer niedrigen Calciumkonzentration zusätzlich eine niedrige ATP-Konzentration vor. Dabei können die Myosinköpfe ans Aktin binden und Querbrücken ausbilden. Diese lassen sich jedoch aufgrund der ATP-Verarmung nicht mehr lösen („Rigor mortis“, „Totenstarre“). Im Rigor sind demzufolge praktisch alle Myosinköpfe stereospezifisch ans Aktinfilament gebunden (Cooke und Franks, 1980, Lovell und Harrington, 1981). Dadurch, daß die Anordnung der S1-Köpfe am Myosinfilament nicht mit der der Aktinmonomere in der Aktinhelix

korrespondiert („mismatch“), wird bei der Anheftung der S1-Köpfe die helikale Anordnung am Myosinfilament in Unordnung gebracht. Als Folge davon nehmen die Schichtlinienintensitäten und die Intensitäten der Meridionalreflexe des Myosins im Vergleich zu denen unter Relaxationsbedingungen ab. Gleichzeitig nehmen die Intensitäten der Aktinschichtlinien durch die Ausbildung stereospezifischer Bindungen der Myosinköpfe ans Aktinfilament zu. In der Abbildung sind neben ALL 1, 6 und 7 auch ALL 2 bis 5 zu sehen. Wie die Abbildung 1.12 c erwarten ließ, sind ALL 6 und 7 besonders deutlich zu erkennen. Da das Verhältnis dieser Schichtlinien hauptsächlich durch die Form der Aktinmonomere bestimmt wird (O'Brien *et al.*, 1971), ist die Intensität von ALL 7 im Verhältnis zu ALL 6 geringer, als dies die schematische Abbildung erwarten ließ. Diese Tendenz läßt sich auch auf dem modellierten Diffraktionsbild in Abbildung 1.11 b erkennen. Dort liegt die Intensität von ALL 7 ebenfalls deutlich unter der von ALL 6. Der Beitrag des Tropomyosins überlagert sich im äußeren Bildbereich mit ALL 1 und 2. Die Troponinreflexe sind wie unter Relaxationsbedingungen auch auf dem Diffraktionsbild unter Rigorbedingungen zu erkennen.

Anders als die Diffraktionsbilder von einzelnen Myosin- oder Aktinfilamenten (Vgl. Abschnitte 1.2.1 und 1.2.2), gibt das experimentell ermittelte Diffraktionsbild das Beugungsmuster aller in der Muskelprobe vorhandenen, gitterartig angeordneten Myosin- und Aktinfilamente wieder. Das hexagonale Gitter der Myosin- und Aktinfilamente in der Überlappungsregion ist schematisch in Abbildung 1.15 c dargestellt. So, wie die Anordnung einzelner Untereinheiten der Myosin- und Aktinfilamente in axialer Richtung zu den Meridionalreflexen führen, entstehen durch die Beugung am Filamentgitter senkrecht dazu die Äquatorialreflexe. Sie sind in der Abbildung 1.15 a jeweils auf den linken Quadranten der beiden Bildhälften bei niedrigem Kontrast zu sehen. Sowohl unter Relaxations- als auch unter Rigorbedingungen sind jeweils zwei Reflexe besonders gut zu erkennen. Sie entstehen durch die Beugung an den beiden Hauptgittern in denen die Filamente angeordnet sind. Nach einer aus der klassischen Kristallographie stammenden Nomenklatur werden sie als 1,0- und 1,1-Reflex bezeichnet (MILLERSCHE INDIZES, s. Abbildung 1.15 c). Daneben liegen noch weitere Reflexe mit niedrigerer Intensität, die z. T. auf andere, seltener vorkommende Gitterabstände zurückzuführen sind. Anhand der Äquatorialreflexe ist auch ein größerer Gitterabstand der Filamente im Rigor, verglichen mit der Aufnahme unter Relaxationsbedingungen, zu beobachten. Die Reflexe auf dem Bild liegen reziprok dazu im Rigor enger nebeneinander.

Nach dem Konvolutionstheorem würde ein Gitter aus horizontal nebeneinander angeordneten Aktin- und Myosinfilamenten zu Unterbrechungen auf den ebenfalls horizontal verlaufenden Schichtlinien führen („sampling“). Dieser Effekt kann wegen der Unregelmäßigkeiten des Filamentgitters im Kaninchenmuskel nur auf dem Äquator bzw. unter Rigorbedingungen auch auf der ersten Aktinschichtlinie beobachtet werden (s. Abbildung 1.15 a, graue Pfeile). Beim höher geordneten Filamentgitter des Knochenfischs ist das Sampling auch unter Relaxationsbedingungen auf den Myosinschichtlinien zu sehen (z. B. Harford, J. und Squire, 1986, Squire *et al.*, 1998).

1.3 Disorder

Die Struktur des quergestreiften Wirbeltierskelettmuskels weist bei näherer Betrachtung deutliche Unterschiede zu einem echten Kristall auf, deshalb wird sie auch als quasi-kristallin bezeichnet. So zeigen Aktin- und Myosinfilamente Unregelmäßigkeiten in ihrer helikalen Struktur und Abweichungen von ihrer Position im hexagonalen Gitter. Eine solche Unordnung („disorder“) führt zur Abschwächung, ggf. auch zur Verbreiterung der Schichtlinien und Reflexe. Dies kann ihre gegenseitige Überlappung zur Folge haben. Von Vainshtein wurde das Disorder kettenförmiger Moleküle, die in einem Gitter angeordnet sind (wie z. B. Aktin- und Myosinfilamente) anhand seiner Auswirkungen auf das Diffraktionsbild in zwei Typen eingeteilt und als Verformung erster und zweiter Art bezeichnet („distortion of the first and second kind“, Vainshtein, 1966).

Unter der Verformung erster Art versteht man Abweichungen der Punkte eines Gitters von ihrer absoluten Position. Insgesamt behält das Gitter dabei seine Struktur und die Abstandsbeziehungen weit auseinander liegender Gitterpunkte („long-range order“) bleiben erhalten. Im Diffraktionsbild führt diese Art von Disorder, die z. B. durch thermische Fluktuation entsteht, zu einer Intensitätsabnahme von Reflexen, die mit steigendem Abstand vom Bildmittelpunkt zunimmt.

Die Verformung zweiter Art bezieht die Abhängigkeiten zwischen benachbarten Gitterpunkten mit ein. Die Abstände benachbarter Gitterpunkte werden dabei variiert. Ausgehend von einem beliebig wählbaren Referenzpunkt wächst somit die absolute Positionsabweichung mit der Wurzel des Abstands. Die Abstandsbeziehungen weit auseinander liegender Gitterpunkte gehen also verloren. Dies führt, anders als bei der Verformung erster Art, zu einer Verbreiterung der Reflexe im Diffraktionsbild, die mit steigender Entfernung vom Äquator zunimmt.

Bei der Modellierung der relativen Intensitäten der Aktinschichtlinien zeigte sich, daß die auf dem Diffraktionsbild innen liegenden Aktinschichtlinien eins und zwei im Verhältnis zu den weiter außen liegenden sechs und sieben stets eine zu hohe Intensität besaßen. Um das Modell realistischer zu gestalten und so der experimentell beobachteten Intensitätsverteilung anzunähern, wurden ihm einige der in der Realität vorkommenden Abweichungen von der Kristallstruktur hinzugefügt. Da die gleichmäßig verteilte Positionsabweichung durch thermische Fluktuation der einzelnen Atome zur Verformung erster Art gehört, beeinflußt sie die weiter außen liegenden Aktinschichtlinien stärker, als die innen liegenden, was nicht zur Verbesserung der Intensitätsverhältnisse auf den Aktinschichtlinien führen würde. Hinzu kommt, daß dieser Effekt aufgrund der minimalen Positionsänderungen der Atome im Modell vernachlässigbar ist. Aus diesen Gründen wurde er nicht berücksichtigt.

Im Modell wurden vier Disordertypen verwendet. Sie wurden ausgewählt, weil sie real vorkommende Effekte simulieren und gleichzeitig unterschiedliche Auswirkungen auf die Aktinschichtlinien zeigen.

Der variable Aktintwist besteht in der zufälligen Variation des Drehwinkels zwischen zwei aufeinander folgenden Aktinmonomeren in der Aktinhelix. Er wurde von Hanson anhand der Messung unterschiedlich langer Crossoverlängen (Vgl. Abschnitt 1.1.2) in EM-Aufnahmen entdeckt (Hanson, 1967) und später von Egelman *et al.* mit einem Modell beschrieben (Egelman *et al.*, 1982). Aufgrund der unterschiedlichen Crossoverlängen (Steigungen der

Long-Pitch Helix) ändert sich das Spacing für die Schichtlinien in unterschiedlichem Maße. Da die mittlere Winkelabweichung der Long-Pitch Helix größer ist als die der aufeinander folgenden Aktinmonomere, werden die Intensitäten von ALL 1 und 2 stärker betroffen, als die von ALL 6 und 7 (Vgl. Abschnitte 1.1.2 und 1.2.2).

Neben dem variablen Aktintwist wurde der unregelmäßige Verlauf des Tropomyosins entlang des Aktinfilaments im Modell berücksichtigt (Squire, 1975). Dem liegt die Beobachtung zugrunde, daß das Tropomyosinmolekül eine relativ große Beweglichkeit aufweist (Phillips *et al.*, 1986, Narita *et al.*, 2001). Es existieren jedoch kaum quantitative Daten zum Ausmaß der Abweichung, im folgenden als variabler Tropomyosintwist bezeichnet, so daß der Effekt mit unterschiedlich großen Auslenkungen getestet wurde. Aufgrund des kontinuierlichen Verlaufs der Tropomyosinhelices konnte erwartet werden, daß der variable Tropomyosintwist hauptsächlich die Intensitätsverteilung auf ALL 1 und 2 beeinflusst, während ALL 6 und 7 nicht beeinträchtigt werden (Vgl. Abschnitt 1.2.2, Abbildung 1.13).

Des Weiteren wurde der Verlauf von Aktinfilamenten entlang ihrer Achsen im Modell berücksichtigt. Im Sarkomer zeigen die Filamente einen gekrümmten Verlauf (Vgl. Abbildung 3.17 a). Dieser wurde im Modell durch einen entsprechend kurvenförmigen Verlauf der simulierten Aktinfilamente realisiert. Er resultiert in einer Verbreiterung der Aktinschichtlinien, die mit zunehmendem Abstand vom Meridian größer wird („Fanning“, s. Abbildung 1.15 a, z. B. auf ALL 6). Die dadurch erzeugte Überlappung benachbarter Schichtlinien führt zur Entstehung einer Art von Hintergrund, insbesondere mit zunehmendem Abstand zum Meridian. Dieser Hintergrund ist aufgrund des benachbarten Äquators im Bereich von ALL 1 und 2 besonders stark, im Bereich von ALL 6 und 7 hingegen entsprechend schwächer. Subtrahiert man ihn von den Aktinschichtlinien, wie dies mit dem Hintergrund im experimentell ermittelten Diffraktionsbild üblich ist, dann werden die Intensitäten von ALL 1 und 2 stärker betroffen, als die von ALL 6 und 7.

Ebenso wie die Aktinfilamente zeigen auch die Myofibrillen in der Faser und die Fasern im Muskel oder im Faserarray einen gekrümmten Verlauf (Vgl. Abbildung 3.17 b, c, d). Dies wirkt sich auf die einzelnen Filamente in Form einer Rotation oder Verkippung aus. Zur Simulation dieses Effekts wurde deshalb die Struktur der Filamente im Modell nicht verändert. Vielmehr wurde die Auswirkung des gekrümmten Verlaufs von Myofibrillen und Fasern durch eine Verkippung des modellierten Diffraktionsbilds simuliert. Sie führte ebenfalls zum Fanning und damit zur unterschiedlichen Beeinflussung von ALL 1 und 2 bzw. ALL 6 und 7. Obwohl quantitative Abschätzungen zum Ausmaß des Fannings auf Diffraktionsbildern vorliegen (Kress *et al.*, 1986), ist nicht klar, wie groß der Anteil ist, der auf den Verlauf der einzelnen Aktinfilamente entfällt, bzw. durch die unterschiedliche Auslenkung von Myofibrillen und Fasern entsteht. Aus diesem Grund wurden die gezeigten EM-Aufnahmen zur quantitativen Einschätzung der beiden Effekte herangezogen (s. Abbildung 3.17).

1.4 Fragestellung

Die Anordnung der Proteine im Skelettmuskel von Wirbeltieren, sowie deren strukturelle Änderungen können mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse untersucht werden. Dabei ist z. B. der Einfluß, den eine Änderung von Temperatur oder Zusammensetzung des Mediums auf die

Muskelstruktur haben können, von Interesse. Aufgrund des sogenannten Phasenproblems ist die genaue Ermittlung der Struktur aus dem Diffraktionsbild jedoch nicht ohne weiteres möglich. Das mittels eines Detektors registrierte Diffraktionsbild enthält nur die Intensitätsverteilung der an der Muskelstruktur gebeugten Strahlung. Die zugehörige Phaseninformation kann nicht detektiert werden und geht verloren (s. Squire, 1981). Bei der Proteinkristallographie kann die Phase durch die gezielte Verunreinigung des Kristalls mit Schwermetallatomen, die sich an bestimmten Gitterplätzen einlagern und dadurch die Elektronendichte auf charakteristische Weise verändern, bestimmt werden. Dieses Verfahren läßt sich jedoch nur zur Bestimmung sehr einfacher Strukturen anwenden und ist daher zur Analyse der komplexen Struktur des Muskels nicht praktikabel. Aus diesem Grund werden zur Aufklärung der Muskelstruktur und ihrer Änderungen häufig im Computer simulierte Diffraktionsbilder eingesetzt. Sie können mit den experimentell ermittelten Diffraktionsbildern verglichen werden und lassen so Rückschlüsse auf die zugrunde liegende Struktur zu. In fast allen, bisher in der Literatur zu findenden Modellen, fehlt dabei die Betrachtung der Aktinschichtlinien unter Einbeziehung des Troponinmoleküls ins Modell. Ebenso wurde der Einfluß verschiedener Typen von Disorder auf das Diffraktionsbild aus Gründen der Vereinfachung häufig vernachlässigt. Es bestehen also Unklarheiten über die Auswirkungen von Troponin und Disorder auf die Intensitäten insbesondere der Aktinschichtlinien im Röntgendiffraktionsbild.

Ziel dieser Arbeit war es, ein Modell im Computer zu entwickeln, welches die Intensitätsverteilung auf den Aktinschichtlinien eins bis sieben simulieren kann. Bei der Realisierung sollten außer Aktin und Tropomyosin auch das Troponinmolekül und verschiedene Typen von Disorder berücksichtigt werden. Zur Analyse der Intensitätsverteilung auf den Aktinschichtlinien wurden Aufnahmen bei nativer Sarkomerenlänge (SL) von ca. 2,4 μm unter Relaxationsbedingungen gemacht. Hierbei liegt eine sehr niedrige Calciumkonzentration (10^{-8} M) im Medium vor. Gleichzeitig liegt die ATP-Konzentration im Millimolbereich, so daß die Myosinköpfe nicht stereospezifisch am Aktin gebunden sind und die Aktinschichtlinien nicht durch die S1-Köpfe beeinflußt werden.

Bereits früher wurde gezeigt, daß sich im Experiment die Intensitäten der Aktinschichtlinien eins, zwei und sechs in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration des die Probe umgebenden Mediums ändern (Kress *et al.*, 1986, Yagi und Matsubara, 1989, Kraft *et al.*, 1999). Mit Hilfe des Modells sollte untersucht werden, welche strukturellen Änderungen des Aktinfilaments dem zugrunde liegen können. Aus diesem Grund wurden Messungen bei einer Sarkomerenlänge von etwa 4 μm bei niedriger (10^{-8} M) und hoher ($10^{-4,5}$ M) Calciumkonzentration durchgeführt. Die Dehnung der Fasern „out of overlap“ diente dazu, die Überlappung von Aktin- und Myosinfilamenten zu verhindern und dadurch die Anheftung der Myosinköpfe ans Aktinfilament zu unterbinden. Somit konnten die Veränderungen auf den Aktinschichtlinien beim Übergang von der niedrigen zur hohen Calciumkonzentration registriert werden, ohne störende Einflüsse von gebundenen Myosinköpfen zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Experimentbeschreibung

Die Röntgendiffraktionsversuche wurden an den Elektronensynchrotronen in Grenoble, Frankreich (ESRF, Beamline ID02) und Daresbury, England (SRS, Station 2.1), durchgeführt. Zur Registrierung der Intensitätsverteilungen auf den Aktinschichtlinien wurden zweidimensionale Diffraktionspattern aufgenommen.

Für alle Versuche wurden Fasern des *Musculus psoas major* vom Kaninchen verwendet. Die Aufnahmen, die unter Relaxationsbedingungen durchgeführt wurden, fanden am ESRF statt. Hierfür wurden die Fasern von etwa 4 kg schweren Neuseeländer-Kaninchen verwendet. Die Versuche mit unterschiedlichen Calciumkonzentrationen und langer Sarkomerenlänge wurden am SRS durchgeführt. Dazu wurden Fasern von ca. 2 Jahre alten und etwa 5 kg schweren Kaninchen der Rasse „Kalifornische Riesen“ aus dem Keele Animal House verwendet. Für alle Versuche wurden die Muskelfasern ausgewachsener Tiere eingesetzt, da die Faserbündel nur wenige konisch zulaufende und damit unbrauchbare Muskelfasern enthalten. Außerdem besitzen die einzelnen Muskelfasern einen relativ großen Durchmesser. Dies ist von Vorteil, da eine größere Muskelmasse im Röntgenstrahl eine höhere Intensität im Diffraktionsbild erzeugt.

2.1.1 Vorbereitung der Proben

Die Präparation der Einzelfasern erfolgte nach dem von Brenner (1983), Yu und Brenner (1989) und Kraft *et al.* (1995) beschriebenen Verfahren. Die Kaninchen wurden mit einer Injektion von 3 ml Dolethal (Vétoquinol, Lure Cedex, Frankreich) euthanasiert und durch Eröffnen der *Arteria carotis* ausgeblutet. Nach dem Öffnen des Bauchraums durch einen Medianschnitt wurde der *M. psoas major* freigelegt und Fett und Bindegewebe entfernt. Ausgehend vom seitlichen Rand des Muskels wurden Faserbündel von 2 - 3 mm Durchmesser und 8 - 10 cm Länge entnommen. Sie wurden in eine Kammer mit einer 4°C kalten Permeabilisierungslösung („skinning solution“, s. Abschnitt 2.1.2) überführt und mit Hilfe von Edelstahlnadeln in ihrer nativen Länge auf dem Kammerboden, bedeckt mit Sylgard („RTV 615 A+B“, Dow Corning Corp., Midland, MI, USA), fixiert. Zur Entfernung der membranösen Strukturen, sowie der im Sarkoplasma enthaltenen Ionen und wasserlöslichen Proteine, wurden die Faserbündel nach der Entnahme in der Permeabilisierungslösung unter Zugabe von 0,5 % Triton X-100 (Roche 1332481) 30 - 60 min bei 4°C inkubiert. Für die Versuche konnten die Bündel einige Tage in der Permeabilisierungslösung bei 4°C unter Luftabschluß aufbewahrt werden. Um eine ATP-Verarmung zu verhindern, wurde die Lösung alle zwei Tage ausgetauscht.

Zur Präparation der durch die Skinning Solution „gehäuteten“ Fasern („skinned fibres“) wurden von den Bündeln etwa 3 cm lange Stücke abgeschnitten und am Boden einer mit Permeabilisierungslösung gefüllten Kammer festgeheftet. Mit einer feinen Pinzette (Dumont Swit-

zerland No. 5) wurden daraus in Längsrichtung Einzelfasern gezogen. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Fasern stets von Lösung bedeckt waren. Überdehnte oder konische Fasern wurden verworfen. Für die Messungen wurden die Fasern in Meßkammern aus Edelstahl (V4A, bzw. V2A), gefüllt mit Permeabilisierungslösung, überführt. Die Fasern wurden dann einzeln jeweils an beiden Enden mit Silikonkleber („RTV 3145“, Dow Corning, USA) und Histoacryl blau Nr. 1 (Braun, Melsungen) auf den Faserhaltern (V2A-Stahlplättchen) festgeklebt („single fiber array“, s. Abbildung 3.17 d). Für die Versuche bei langer Sarkomerenlänge wurden auf diese Weise etwa 30 Fasern in eine Kammer montiert. Aufgrund des relativ kleinen Durchmessers des Röntgenstrahls bei den Versuchen am ESRF wurden für die Versuche unter Relaxationsbedingungen nur 15 Fasern eingesetzt (Vgl. Tabelle 2.1).

Für das Experiment unter Relaxationsbedingungen wurde die Sarkomerenlänge auf 2,4 µm eingestellt. Die Experimente bei langer Sarkomerenlänge (~ 4,0 µm) erforderten eine Dehnung der Fasern, welche zu diesem Zweck in eine Kammer mit verschiebbaren Faserhaltern montiert wurden. Zum Auseinanderziehen der Sarkomere Out of Overlap, also so weit, daß sich Aktin- und Myosinfilamente nicht mehr überlappen, wurden die Fasern über einen Zeitraum von 2 - 3 Stunden in Abständen von ca. 30 min um jeweils 0,2 µm bis auf eine Länge von etwa 4 µm gedehnt. Die Vermessung der Sarkomerenlänge erfolgte während des Einstellens mittels Laserdiffraktion mit einem Helium-Neon-Laser (Polytec, Waldbronn; $\lambda = 633$ nm). Hier liegt das gleiche Prinzip zugrunde wie bei der Röntgendiffraktion (s. Abschnitt 1.2). Als „Gitter“ fungieren dabei die abwechselnd angeordneten und unterschiedlich gut lichtdurchlässigen A- und I-Banden des Sarkomers (Vgl. Abschnitt 1.1).

2.1.2 Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, stammen alle Chemikalien von der Firma Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen.

Permeabilisierungslösung (Skinning Solution) zur Aufbewahrung der Faserbündel:

5 mM KH_2PO_4 (Fluka, 60220)

5 mM Mg-Acetat (M-0631)

5 mM EGTA (E-4378)

3 mM (Na_2) ATP (Merck, 1432)

50 mM CrP (P-7936)

8 mM NaN_3 (Serva, 30175)

Zugabe von Proteasehemmern nach Kraft *et al.* (1995):

0,01 mM Leupeptin (L-0649)

0,01 mM Antipain (A-6191)

0,01 mM E64 (E-3132)

0,01 mM Pepstatin A (P-4265)

0,001 mg / ml Aprotinin (A-1153)

1 mM AEBSF (Applichem, A1421)

10 mM Glutathion (G-4251)

5 mM DTT (D-0632)

Der pH-Wert wurde mit 10 mM NaOH (Merck, 9137) bei 5°C auf 7,0 eingestellt. Die Ionenstärke lag bei $\mu = 125$ mM.

Relaxationslösung (Ionenstärke $\mu = 170$ mM):

10 mM Imidazol (I-0125)
2 mM MgCl₂ (M-1028)
1 mM EGTA (E-4378)
1 mM MgATP (A-3377)
141 mM Kaliumpropionat (P-1386, Merck 5033)
5 mM DTT (D-0632)
10 mM Glutathion (G-4251)
1000 U / ml Katalase (C-30)

Die Lösung wurde bei 5°C mit KOH auf pH 7,0 eingestellt. Die Ionenstärke betrug $\mu = 170$ mM.

Relaxationslösung ($\mu = 170$ mM) zur Faserdehnung auf eine Sarkomerenlänge von ca. 4 μ m:

Die Relaxationslösung zur Dehnung der Fasern auf lange Sarkomerenlänge entspricht der Relaxationslösung mit der Ionenstärke 170 mM, ohne Zugabe von Katalase.

ATP γ S-haltige Lösung mit niedriger Calciumkonzentration (pCa 8), für die Versuche bei langer SL:

10 mM Imidazol (I-0125)
2 mM MgCl₂ (M-1028)
3 mM EGTA (E-4378)
10 mM MgATP γ S (ohne Verunreinigung durch ADP oder ATP, Roche)
0,2 mM Ap₅A (D-4022)
0,5 U / ml Hexokinase (H-5375)
200 mM D-Glukose (Merck 1.08337)
5 mM DTT (D-0632)
10 mM Glutathion (G-4251)
1000 U / ml Katalase (C-30)

Die Lösung mit hoher Calciumkonzentration (pCa 4,5) wurde ebenso angesetzt, wobei das EGTA aus der Lösung mit niedriger Calciumkonzentration durch 1 mM CaEGTA (C-3881, E-4378) ersetzt wurde. Beide Lösungen wurden bei 1°C auf pH 7,0 eingestellt und mit Kaliumpropionat auf die Ionenstärke $\mu = 80$ mM gebracht.

Killing Solution, zur Zerstörung der Fasern und Aufnahme der Hintergrundbilder:

10 mM Imidazol (I-0125)
2 mM MgCl₂ (M-1028)
3 mM CaEGTA (C-3881, E-4378)
5 mM MgATP (A-3377, Merck 1432)
45 mM Kaliumpropionat (P-1386, Merck 5033)

200 mM D-Glukose (Merck, 1.08337)

5 mM DTT (D-0632)

10 mM Glutathion (G-4251)

1000 U / ml Katalase (C-30)

2.1.3 Aufnahme der Röntgendiffraktionsbilder

Die Kammer mit den darin senkrecht montierten Fasern wurde mit Hilfe einer Halterung zwischen austretendem Röntgenstrahl und Kamera arretiert (schematische Anordnung s. Abbildung 1.5). Die Detektion der Röntgendiffraktionspattern erfolgte sowohl am ESRF als auch am SRS mit Hilfe eines CCD-Detektors. Aufschluß über die Spezifikationen zur Registrierung der Pattern gibt Tabelle 2.1.

	ESRF, Grenoble, Frankreich	SRS, Daresbury, England
Beamline	ID02, High-Brilliance Beamline	Station 2.1
Photonenfluß durch die Probe	$8 \cdot 10^{12}$ Photonen / s bei 6 GeV und 200 mA	$\sim 10^{12}$ Photonen / s bei 2 GeV und 300 mA
Wellenlänge des Strahls	0,1 nm	0,154 nm
Durchmesser des Strahls an der Probenposition*	1 mm \times 0,5 mm	1,7 mm \times 0,5 mm
Kameralänge (Abstand Probe - Detektor)	400,0 cm	296,5 cm
Bildgröße	2048 \times 2048 Pixel	512 \times 512 Pixel
Farbtiefe	2 Bytes / Pixel	4 Bytes / Pixel
registrierte Quadranten	2**	4
registrierter Bildbereich	horizontal: 0 - 0,213 nm ⁻¹ vertikal: 0 - 0,308 nm ⁻¹	horizontal: 0 - 0,218 nm ⁻¹ vertikal: 0 - 0,218 nm ⁻¹
Auflösung	~ 4800 Pixel / nm ⁻¹	~ 1170 Pixel / nm ⁻¹
Registrierungsdauer pro Bild	30 s	240 s

Tabelle 2.1: Technische Daten zur Registrierung der Röntgendiffraktionspattern an den Beamlines in Daresbury und Grenoble

* Meist ist der Strahlquerschnitt nicht vollkommen kreisförmig, sondern elliptisch, wobei in der Richtung des kleineren Durchmessers (hier vertikal) eine höhere Auflösung bzw. Trennung benachbarter Reflexe erreicht wird. ** Aufgrund der verwendeten Kamera- und Detektoreinstellungen wurde nur von den beiden Quadranten oberhalb des Äquators der angegebene Bildbereich in vertikaler Richtung vollständig registriert. Bei der Auswertung wurden deshalb nur diese beiden Quadranten berücksichtigt.

Die Versuche unter Relaxationsbedingungen wurden in der ATP-haltigen, Calcium-freien Relaxationslösung mit der Ionenstärke von $\mu = 170$ mM (s. Abschnitt 2.1.2) bei einer Temperatur von 5°C durchgeführt.

Für die Versuche mit der langen Sarkomerenlänge wurden die beiden Lösungen mit unterschiedlicher Calciumkonzentration (s. Abschnitt 2.1.2) mit 10 mM $\text{MgATP}\gamma\text{S}$ und einer Ionenstärke von $\mu = 80$ mM, bei einer Temperatur von 1°C eingesetzt. $\text{ATP}\gamma\text{S}$ verhindert als Nukleotidanalogen für die schwache Bindung der Myosinköpfe auch bei einer hohen Calciumkonzentration die stereospezifische Bindung der S1-Köpfe ans Aktin (Kraft *et al.*, 1992), welche die Intensität auf den Aktinschichtlinien beeinflussen kann. Die niedrige Temperatur von 1°C wurde gewählt, um die Kraftentwicklung per se möglichst gering zu halten. Die in den Medien enthaltene Katalase und das Glutathion gewährleisteten als Radikalfänger einen Schutz der Muskelfasern vor der ionisierenden Röntgenstrahlung. Als Schutz der SH-Gruppen der Proteine in den Proben war DTT in den Meßlösungen vorhanden. Ein Auf- und Abfahren der Meßkammern im Strahl während der Registrierung der Pattern diente dazu, eine zu starke punktuelle Bestrahlung der Fasern zu vermeiden. Die Temperatur der Meßkammern wurde durch Peltierelemente (AMS Thermotech, Martinsried) reguliert. Ein zusätzliches Umpumpen der Lösung hielt mögliche Temperaturgradienten der Lösung gering.

Durch die an Monochromator, Blenden und Toroidalspiegel, sowie an der Meßkammer und den Molekülen in der Versuchslösung gestreuten Röntgenstrahlen entsteht ein zusätzlicher Streuungshintergrund („background“) auf den Diffraktionsbildern. Um diesen später von den Pattern subtrahieren zu können, wurden Aufnahmen der Kammern mit Medium gemacht (Vgl. Abschnitt 2.1.4). Um eine gute Vergleichbarkeit des Hintergrundbilds mit dem eigentlichen Diffraktionspattern zu gewährleisten, wurde für beide Aufnahmen jeweils die selbe Kammer verwendet. Zur Registrierung der Hintergrundbilder mußten dann lediglich die Fasern zunächst zerstört werden, damit keine Interferenzmuster, die von den Molekülstrukturen im Sarkomer herrühren, mehr entstehen konnten. Dies wurde mit dem Austausch des Mediums gegen die „killing solution“ erreicht (s. Abschnitt 2.1.2). Diese Lösung bewirkt eine Aktivierung der Muskelfasern, was dazu führt, daß sie durch Dehnung während langanhaltender aktiver Kraftentwicklung zerstört werden konnten. Die Hintergrundpattern oder Maschinenhintergrundbilder wurden jeweils unter gleichen Temperaturbedingungen und mit gleicher Bestrahlungsdauer registriert, wie die Aufnahmen mit den intakten Fasern.

2.1.4 Datenverarbeitung

Die mit der CCD-Kamera registrierten Röntgendiffraktionspattern wurden zunächst normiert. Dazu wurden die Helligkeitswerte aller Bildpunkte (Pixel), welche die Intensitätswerte repräsentieren, durch die Ionisationskammerwerte dividiert. Die Ionisationskammer mißt die Intensität des Strahls während der gesamten Registrierungszeit eines Patterns. Um eine Verbesserung des Signal / Rausch-Verhältnisses zu erhalten, wurden alle detektierten Quadranten eines Patterns aufeinander abgebildet und gemittelt („Falten“ der Bilder). Zur Analyse der Schichtlinienintensitäten unter Relaxationsbedingungen wurde ein einzelnes registriertes Pattern herangezogen. Das Signal / Rausch-Verhältnis war aufgrund der hohen Intensität bei der Registrierung einer Aufnahme ausreichend. Bei den Aufnahmen mit langer Sarkomerenlänge

wurden jeweils sieben nacheinander registrierte Diffraktionsbilder addiert und gemittelt, um die Signalstärke zu verbessern. Aufgrund leicht unterschiedlicher Ausrichtung der verschiedenen Faserarrays in der Meßkammer mußten die Pattern vor dem Falten bzw. Aufaddieren zentriert werden.

Um die Hintergrundstreuung von den Bildern zu subtrahieren, wurden die registrierten Maschinenhintergrundbilder ebenso behandelt, wie die Diffraktionspattern mit den Interferenzmustern. So konnten sie im Anschluß einfach von den Pattern abgezogen werden.

Ausschließlich zur Darstellung der Diffraktionsbilder in gängigen Bildformaten wurde die Farbtiefe auf 1 Byte / Pixel (256 Graustufen) reduziert. Die Graustufenwerte wurden dabei auf eine lineare Skala abgebildet. Durch die geeignete Wahl des Minimums, unterhalb dessen alle Werte auf 0 (schwarz) abgebildet wurden, bzw. des Maximums, oberhalb dessen alle Werte auf 255 (weiß) abgebildet wurden, konnten schwächere Intensitätsmaxima deutlicher hervorgehoben werden. Die weitere Analyse erfolgte an den Bildern mit der vollen Farbtiefe (Vgl. Tabelle 2.1).

Mit der Subtraktion des Maschinenhintergrundbilds läßt sich nicht die gesamte Hintergrundstrahlung aus dem Diffraktionspattern entfernen. Dies ist darauf zurückzuführen, daß ein Teil des Streuungshintergrunds durch nicht geordnete Strukturen in den Muskelfasern entsteht. Zur Hervorhebung von Schichtlinien mit sehr schwacher Intensität wurde die im Diffraktionsbild verbliebene Hintergrundstreuung mit Hilfe der in Abbildung 2.1 beschriebenen Methode ermittelt und vom Pattern subtrahiert.

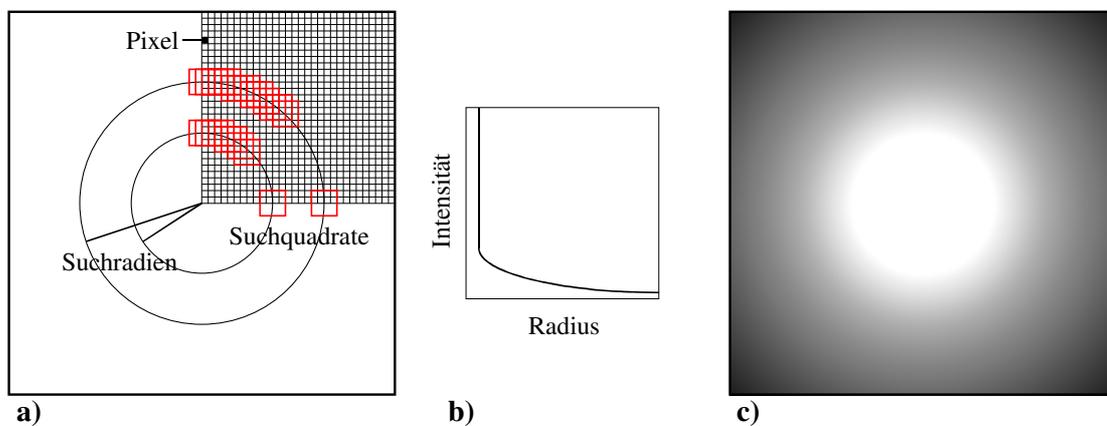


Abbildung 2.1: Bestimmung des verbliebenen Hintergrundverlaufs eines Diffraktionsbildes nach Subtraktion des Maschinenhintergrunds (Schema)

a) Gefaltetes Diffraktionsbild nach Subtraktion des Maschinenhintergrunds (schematisch, Intensitätsverteilung nicht dargestellt). Wie hier exemplarisch anhand von zwei verschiedenen Radien gezeigt, wurde für jeden ganzzahligen Radius (Einheit: Pixel) innerhalb eines Quadranten der Hintergrundverlauf anhand von Suchquadraten mit der Größe 21×21 Pixel (rot umrandet, im Schema 4×4 Pixel) ermittelt. Dabei wurden die Pixelwerte in jedem Suchquadrat aufsummiert und gemittelt und der jeweils niedrigste Mittelwert für einen Radius gespeichert. b) Ermittelter eindimensionaler Hintergrundverlauf, zu jedem Radius gibt es einen minimalen Intensitätsmittelwert. c) Aus b) durch Rotation expandierter zweidimensionaler Hintergrundverlauf. Dieser wird anschließend vom ursprünglichen Pattern (a) subtrahiert.

Das Verfahren wurde in der Einleitung auf Abbildung 1.15, sowie im Ergebnisteil auf die rechten Bildhälften der Pattern in Abbildung 3.1 und Abbildung 3.30 und auf die linken Bildhälften der Pattern in Abbildung 3.33 und Abbildung 3.39 angewendet. Eine ähnliche Methode wurde auch von Iwamoto *et al.* (Iwamoto *et al.*, 2003) beschrieben.

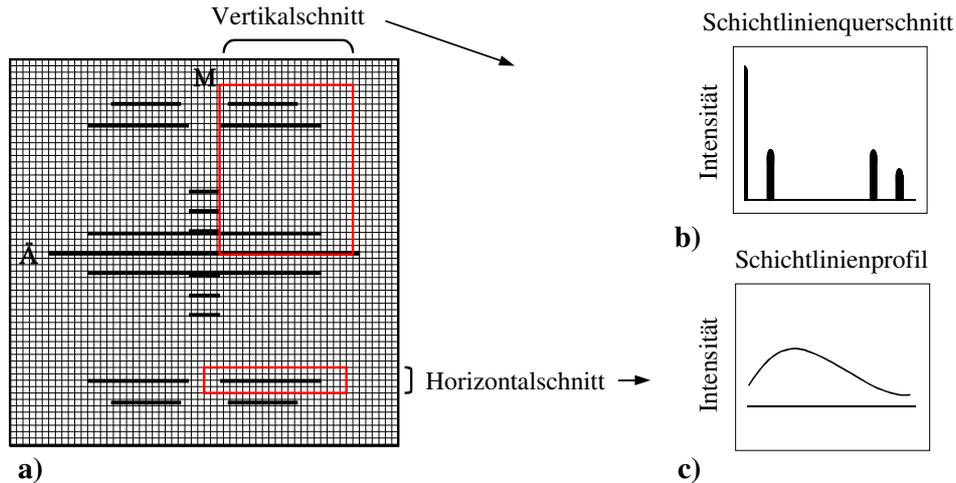


Abbildung 2.2: Horizontal- und Vertikalschnitt im Diffraktionsbild (Schema)

a) Schematisiertes Diffraktionsbild (Schichtlinien schwarz). Beim Vertikalschnitt über den Bereich im großen roten Kasten werden die Pixelwerte (kleine schwarz umrandete Quadrate) innerhalb der einzelnen Zeilen aufaddiert, also auf eine Spalte reduziert. Dadurch entsteht ein zweidimensionaler Verlauf, der die integrierte Intensitätsverteilung quer zu den Schichtlinienverläufen wiedergibt (b). Beim Horizontalschnitt entlang einer Schichtlinie (kleinerer roter Kasten in a) werden die Pixelwerte innerhalb der einzelnen Spalten aufaddiert, also auf eine Zeile reduziert. Er gibt den Intensitätsverlauf entlang der Schichtlinie wieder (c, „Schichtlinienprofil“).

Die quantitativen Analysen der Schichtlinienintensitäten wurden ausnahmslos an den Diffraktionspattern durchgeführt, von denen lediglich der Maschinenhintergrund subtrahiert worden war. Zur Bestimmung der Intensitätsverteilungen auf den Aktinschichtlinien wurden mit Hilfe von horizontalen bzw. vertikalen „Schnitten“ bestimmte Bereiche des zweidimensionalen Bilds auf eine Dimension reduziert (s. Abbildung 2.2).

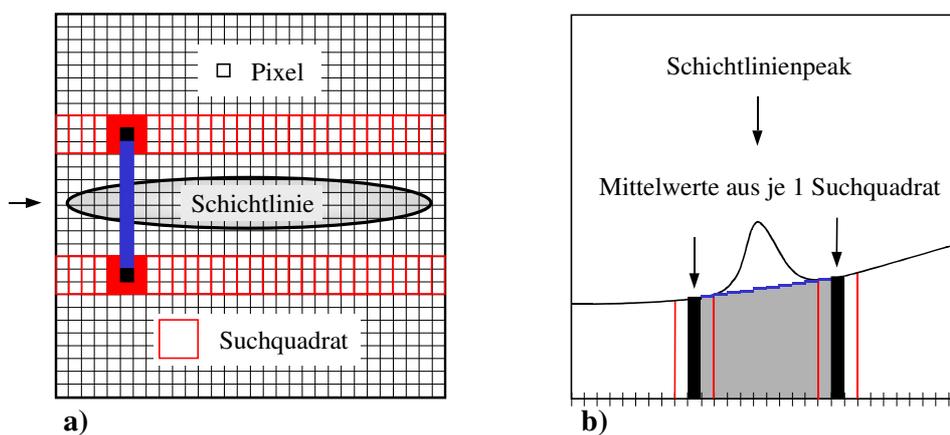


Abbildung 2.3: Hintergrundsubtraktion entlang einer Schichtlinie (Schema)

a) Ausschnitt aus einem Diffraktionsbild im Schema. Die horizontal verlaufende Schichtlinie ist als schwarz umrandetes Oval dargestellt. Zunächst wurden die Bereiche zu beiden Seiten entlang der Schichtlinie mit Suchquadraten der Größe 5×5 Pixel (rot umrandet, hier 3×3 Pixel) durchlaufen. Dabei wurden die Pixelwerte in jedem Suchquadrat aufsummiert und gemittelt. Wie hier anhand von zwei gegenüberliegenden Suchquadraten (rote ausgefüllte Quadrate) gezeigt, wurden anschließend die Zentren aller Suchquadraten (schwarze ausgefüllte Quadrate) in Pixelschritten durchlaufen. Dabei wurden die Zentren als Nulllinie betrachtet und der Bereich dazwischen (blauer Balken) entsprechend angepaßt. b) Die Blickrichtung folgt dem Pfeil aus a). Die Schichtlinie ist wie im Vertikalschnitt als Bergspitze („peak“) von der Seite zu sehen. Der Hintergrund unter der Schichtlinie (grau) wird durch die Verbindungslinie (blau) zwischen den Zentren der Suchquadraten festgelegt und subtrahiert. Übrig bleibt die Intensität der Schichtlinie, wobei die blaue Linie der Nulllinie entspricht.

Die integrierten Intensitäten des Vertikalschnitts geben Aufschluß über die Position und Breite der Schichtlinien (Vgl. Abbildung 3.2), während die Intensitätsverteilung entlang einer Schichtlinie mit Hilfe des Horizontalschnitts dargestellt werden kann (s. Abbildung 3.6).

Während der nach der Subtraktion des Hintergrundpatterns verbliebene Streuungshintergrund auf den Horizontalschnitten gut abgeschätzt und subtrahiert werden kann, muß er zur Integration entlang einer Schichtlinie vorher entfernt werden, da er sonst deren Intensitätsverlauf verfälscht. Deshalb wurde für die Horizontalschnitte über ALL 6 und 7 die verbliebene Hintergrundstreuung des Diffraktionsbilds, welches unter Relaxationsbedingungen registriert wurde (s. Abschnitt 3.1.1), zunächst minimiert (s. Abbildung 2.3).

Der so von der Hintergrundstreuung befreite Bereich konnte anschließend horizontal integriert werden. Ein ähnliches Verfahren wurde auch von Koubassova und Tsururyan beschrieben (Koubassova und Tsururyan, 2002).

Alle bildverarbeitenden Operationen wurden mit dem Programm „PIC“¹ durchgeführt. Zur graphischen Darstellung der Schnitte über die Diffraktionspattern wurde das Programm „Origin“ (Origin 7G SR2, OriginLab Corporation) verwendet.

2.2 Modellbeschreibung

Zur Simulation der Röntgendiffraktionspattern wurde eine Programmfunktion entwickelt, mit deren Hilfe dreidimensionale Strukturen aufgebaut und unter Berücksichtigung der Massenverteilung auf zweidimensionale Bilder projiziert werden können. Im Anschluß daran kann aus solch einer Massenprojektion, durch Anwendung einer zweidimensionalen Fourier-Transformation, eine Intensitätsverteilung berechnet werden, die dem experimentell ermittelten Röntgendiffraktionsbild der Modellstruktur entspricht (s. Abbildung 2.4).

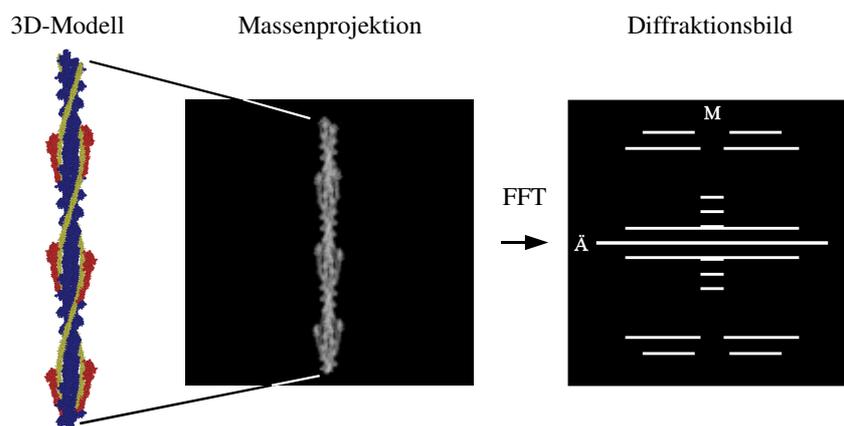


Abbildung 2.4: Modellierung von Röntgendiffraktionsbildern (Schema)

Das im Computer erzeugte, dreidimensionale Modell wird mittels einer Massenprojektion auf ein zweidimensionales Bild projiziert. Es wird dazu in Pixel zerlegt, deren Helligkeitswerte proportional zur darauf projizierten Masse sind. Aus der Massenprojektion wird mit Hilfe der Schnellen Fourier-Transformation (FFT, s. Abschnitt 2.2.4) ein Amplitudenbild berechnet, woraus durch Quadrierung aller Werte das Diffraktionsbild errechnet wird.

¹ Programm zur Modellierung und Bearbeitung von Röntgendiffraktionsbildern, entwickelt von Claudia von Grumbkow im Zeitraum von 08/99 bis 08/03 an der Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung für Molekular- und Zellphysiologie.

Um das zweidimensionale Diffraktionsbild der im Computer modellierten Struktur zu erhalten, kann die FFT ebenso mit dem dreidimensionalen Modell berechnet werden. Zum Vergleich mit den Daten ist dann eine Projektion des dreidimensionalen Diffraktionsbildes notwendig, um ein zweidimensionales zu erhalten. Die Berechnung der FFT einer dreidimensionalen Struktur mit der gleichen Auflösung, die hier verwendet wurde, erhöht jedoch sowohl den Speicherbedarf, als auch die Rechenzeit um den Faktor 1024. Bei der dreidimensionalen FFT kommen zwar Informationen über die Tiefe des betrachteten Objekts hinzu, dies spielt aber bei den hier verwendeten Projektionen einzelner Filamente nur eine untergeordnete Rolle. Deshalb wurde zuerst die Massenprojektion durchgeführt und dann die zweidimensionale FFT berechnet.

Nach der Berechnung der FFT einer Projektion wurden alle Helligkeitswerte quadriert, um die Intensitäten zu erhalten. Die Intensitätsbilder besaßen eine Auflösung von ca. 980 Pixeln / nm⁻¹ (Vgl. Tabelle 2.1). Wie die experimentell ermittelten Röntgendiffraktionsbilder, wurden auch die modellierten Intensitätsbilder gefaltet, also alle vier Quadranten in gleicher Orientierung aufeinander abgebildet und gemittelt. Da im Modell keine Maschinenhintergrundstreuung vorhanden ist, konnten ohne weitere Bearbeitung Vertikal- bzw. Horizontalschnitte über die Bilder gemacht werden (Vgl. Abschnitt 2.1.4).

Zur Darstellung der Massenprojektionen bzw. Intensitätsbilder wurde die Farbtiefe auf 1 Byte / Pixel (256 Graustufen) reduziert. Die Wiedergabe der Projektionen erfolgte in logarithmischer Darstellung, während die Graustufenwerte zur Wiedergabe der Intensitätsbilder auf eine lineare Skala abgebildet wurden (Vgl. Abschnitt 2.1.4).

Die gesamte Erstellung des Modells, die Massenprojektion, die FFT, sowie alle bildverarbeitenden Operationen wurden mit dem Programm „PIC“ (s. Fußnote S. 39) durchgeführt. Zur graphischen Darstellung der Schnitte über die Diffraktionspattern wurde das Programm „Origin“ (Origin 7G SR2, OriginLab Corporation) verwendet.

2.2.1 Aufbau eines Modells, bestehend aus Aktin und Tropomyosin

Mit Hilfe der experimentell ermittelten Daten, sowie zusätzlichen Angaben aus der Literatur, wurde eine Modellstruktur der Aktinhelix im Computer nachgebaut. Dem Modell liegt die von Lorenz *et al.* (1993) veränderte Struktur des Aktinmonomers zugrunde, welche auf der Struktur des G-Aktins von Kabsch *et al.* (1990, PDB-Code 1ATN) basiert und von Holmes *et al.* (1990) bereits teilweise verändert wurde. Außerdem wurde das von Lorenz *et al.* (1995) generierte Modell des Tropomyosins verwendet, welches auf der Kristallstruktur von Phillips *et al.* (1986) basiert. Für die Verwendung in dieser Arbeit wurde von der Struktur des Aktins das Phalloidin entfernt. Das Tropomyosin wurde unverändert eingesetzt, also ohne Überlappungsregion und bestehend aus zwei α -Helices mit je 277 Aminosäuren. Somit bestand das Aktinmolekül aus 376 Aminosäuren und einem Magnesiumatom (insgesamt 2962 Atome, Masse: 39,335 kDa, s. Abbildung 1.3 b), der Tropomyosindoppelstrang aus zweimal 277 Aminosäuren (zusammen 4460 Atome, Masse: 59,175 kDa, s. Abbildung 1.3 c). Bei der Angabe der Anzahl der Atome ist zu beachten, daß Wasserstoffatome in den Strukturdaten nicht berücksichtigt werden.

Aus den Strukturdaten der beiden Moleküle wurde ein Filament aufgebaut, räumlich entlang der z-Achse orientiert. Bei der anschließenden Massenprojektion wurde jedes einzelne Atom als Kugel mit einem Radius proportional zum Atomradius auf die yz-Ebene projiziert. Der Helligkeitswert jedes einzelnen der „überdeckten“ Pixel war dabei proportional zur Masse, die auf den Pixel entfiel. Zur Erstellung der Aktinhelix wurde von einem Winkel von $-166,154^\circ$ zwischen zwei aufeinander folgenden Aktinmonomeren ausgegangen. Dieser gerundete Wert ergibt sich, wenn man eine 13/6-Helix zugrunde legt (Hanson, 1967) und den daraus folgenden Gesamtwinkel von 2160° ($6 \cdot 360^\circ$) durch 13 dividiert. Der Abstand zwischen zwei Monomeren entlang des Filaments betrug 2,73 nm (Huxley, H. E. und Brown, 1967, Vgl. Abschnitt 1.1.2). Der Tropomyosindoppelstrang wurde zu Beginn in eine azimuthale Ausgangsposition gebracht, die der bei Lorenz *et al.* (1995) im unregulierten Filament, also in Abwesenheit von Troponin, entsprach. Das gegenüberliegende Tropomyosinmolekül wurde ergänzt, indem es dem Aktinfilament folgend um 2,73 nm in z-Richtung verschoben und um $-166,154^\circ$ um die z-Achse gedreht wurde (Lorenz *et al.*, 1995). Alle weiteren Tropomyosinpaare wurden ebenso generiert, wobei der Abstand in z-Richtung von einem Paar zum nächsten jeweils 38,22 nm ($= 14 \cdot 2,73$ nm) betrug (Vgl. Lorenz *et al.*, 1995). Der Winkel zwischen zwei axial aufeinander folgenden Tropomyosinpaaren betrug entsprechend $-166,154^\circ$ ($14 \cdot -166,154^\circ \triangleq 6 \cdot 360^\circ - 166,154^\circ$).

Für eine Modellrechnung wurde ein Aktinfilament, bestehend aus 360 Aktinmonomeren sowie 50 Tropomyosinmolekülen, auf ein Bild von 1024×1024 Pixel massenprojiziert (Vgl. Abbildung 3.7 a); das entspricht einer Auflösung von etwa 1 nm / Pixel. Die Länge des Aktinfilaments entsprach damit etwa 1 μm , der ungefähren Länge der Aktinfilamente im Sarkomer des Wirbeltierskelettmuskels (Vgl. Abschnitt 1.1.2).

2.2.2 Erzeugung und Einbau von Troponin ins Modell

Die im Modell verwendete Struktur des Troponins wurde auf der Grundlage der Struktur des Troponin I vom Kaninchen im Komplex mit Troponin C vom Huhn (PDB-Code 1EW7) geschaffen. Ein teilweise verdoppeltes Fragment zweier zentraler Spektrin-ähnlicher Repeats des humanen α -Aktinins (PDB-Code 1QUU) diente zur Darstellung von Troponin T (Troponinschwanz, „tail“, s. Abschnitt 1.1.2 und Abbildung 1.3 d). Das so erzeugte Troponin wurde in zwei verschiedenen Konfigurationen für die Modellrechnungen verwendet, um die beiden von der Calciumkonzentration abhängigen Positionen des Tropomyosin-Troponin-Komplexes simulieren zu können (Vgl. Narita *et al.*, 2001). Die on-Position, welche zur Simulation der hohen Calciumkonzentration verwendet wurde, unterschied sich von der off-Position zur Modellierung der niedrigen Calciumkonzentration in der azimuthalen Lage des Troponins relativ zum Tropomyosin. Ebenso war die Kopfreion („head“) des Troponins unterschiedlich orientiert (s. Abbildung 2.5).

Beim Übergang von der einen Position zur anderen wurde demzufolge nicht nur der relative azimuthale Winkel von Tropomyosin zu Aktin verändert; zusätzlich nahm das Troponinmolekül eine andere azimuthale Position an der Längsachse des Tropomyosins ein, ähnlich wie von Narita *et al.* (2001) beschrieben. Das Troponinmodell besaß eine Länge in z-Richtung von ca. 17 nm (off-Zustand, s. a. Abbildung 1.3 d) bzw. 18 nm (on-Zustand) und bestand aus

616 Aminosäuren mit 4939 Atomen und einer Masse von 65,585 kDa. Im Modell haben ein einzelnes Aktinmonomer, ein Tropomyosindoppelstrang und ein vollständiges Troponinmolekül untereinander ein Masseverhältnis von 1 : 1,5 : 1,7. Dies ist in etwa vergleichbar mit den in Abschnitt 1.1.2 angegebenen Molekulargewichten von Aktin, Tropomyosin und Troponin, die ein Verhältnis von 1 : 1,6 : 1,9 zueinander besitzen.

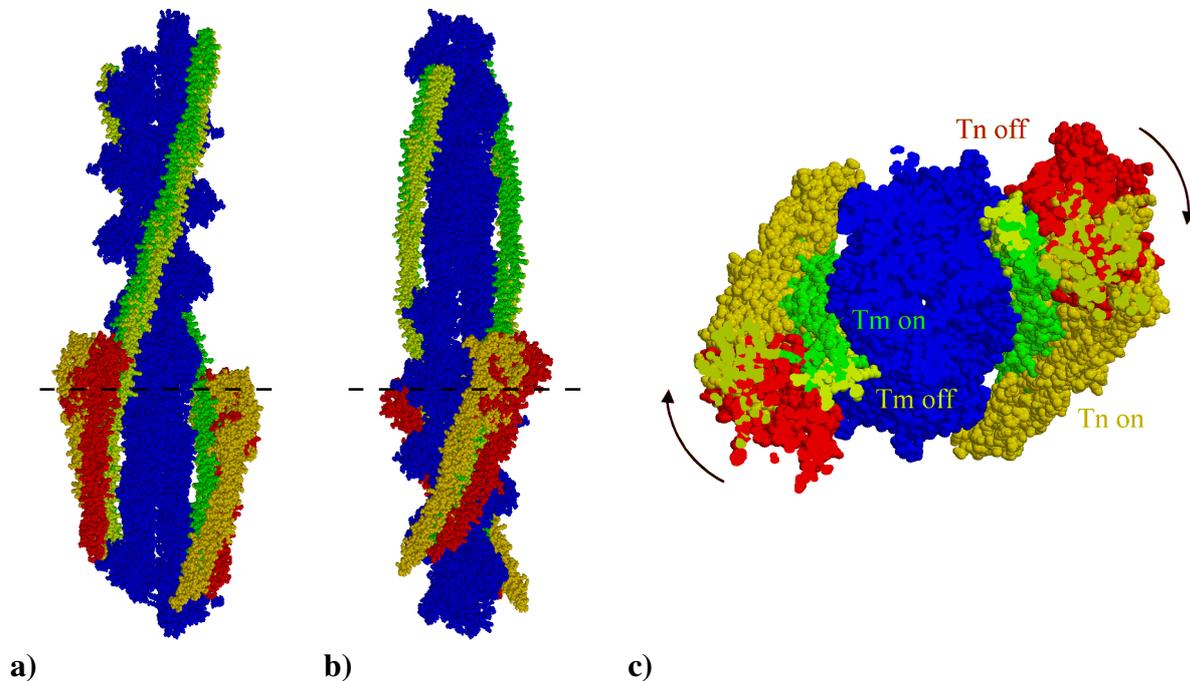


Abbildung 2.5: Positionierung von Tropomyosin und Troponin im off- und on-Zustand am Aktinfilament (Modellvorstellung)

a) Aktinfilament mit Tropomyosin und Troponin im off- und on-Zustand, b) wie a), das Filament wurde um 90° nach rechts gedreht, um die Unterschiede zwischen off- und on-Struktur des Troponins besser zu zeigen. Es sind jeweils 16 Aktinmonomere dargestellt (blau). Die oberen Filamentenden zeigen zur Z-Scheibe, die unteren zur M-Linie. Tropomyosindoppelstränge: gelb (off-Zustand), bzw. grün (on-Zustand), Troponinmoleküle: rot (off-Zustand), bzw. orange (on-Zustand). c) Querschnitt durch das Filament aus a) bzw. b). Der Blick fällt auf die Schnittstelle, wobei nur der untere Teil des Filaments sichtbar ist. Die Schnittstelle ist durch die gestrichelte Linie in a) bzw. b) markiert. Die Pfeile zeigen die Positionsänderungen von Tropomyosin (von gelb nach grün) bzw. Troponin (von rot nach orange) beim Übergang vom off- in den on-Zustand an. Die Abbildungen wurden mit dem Programm RASMOL erzeugt (Sayle und Milner-White, 1995).

Die Troponinmoleküle wurden beim Aufbau des simulierten Aktinfilaments in der gleichen Weise wie die Tropomyosinmoleküle angeordnet (Vgl. Abschnitt 2.2.1), es wurde jeweils ein Troponin pro Tropomyosin eingesetzt.

Die Positionierung des Troponins am Tropomyosin wurde so vorgenommen, daß das Ergebnis die experimentellen Daten möglichst gut wiedergab, wobei als Ausgangspunkt die Beschreibung von Narita *et al.* (2001) herangezogen wurde. Variiert wurde der Abstand des Troponins von der Filamentachse, die Position des Troponins in z-Richtung relativ zu Tropomyosin, sowie die azimuthale Position des Troponins relativ zum Tropomyosin (Abbildung 2.6).

Zur Bestimmung der azimuthalen Position des gesamten Komplexes aus Tropomyosin und Troponin im off-Zustand wurde zunächst auf Werte aus der Literatur zurückgegriffen. Aufgrund der vielen teilweise erheblich voneinander abweichenden Angaben (Vgl. Abschnitt 4.4.1), wurden verschiedene Positionen simuliert, wobei die Ergebnisse mit den experimentell

ermittelten Daten dieser Arbeit abgeglichen wurden. Ebenso wurde zur Bestimmung der azimuthalen Positionsänderung des Tropomyosin-Troponin-Komplexes beim Wechsel vom off- in den on-Zustand vorgegangen.

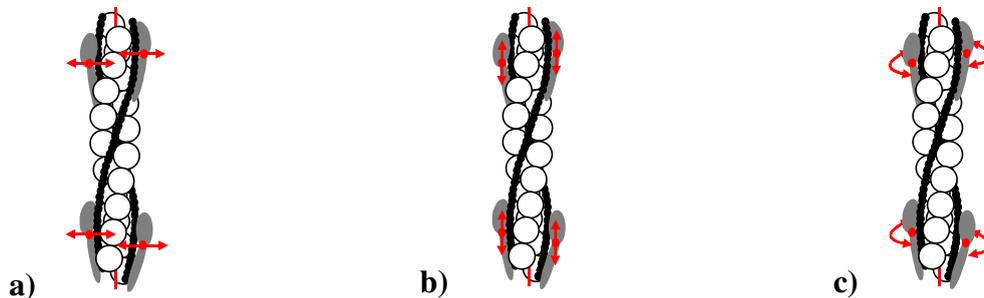


Abbildung 2.6: Variation der Troponinposition im Modell

Schematische Darstellung der Parameter, mit denen die Troponinposition im Modell variiert wurde. Aktinhelix (weiße Kugeln) mit Tropomyosin (schwarz) und Troponin (grau). Die z-Achse ist jeweils mit den senkrechten roten Strichen angedeutet. Die roten Pfeile geben Auskunft über die Art der Abweichung. a) Variation des Abstands von Troponin zur Filamentachse (Radius), b) Variation der Position entlang des Filaments, c) Variation der azimuthalen Position von Troponin relativ zu Tropomyosin.

2.2.3 Unordnung (Disorder)

Um die Verteilung der Schichtlinienintensitäten mit der Simulation möglichst wirklichkeitsnah wiedergeben zu können, mußten verschiedene Typen von Disorder in die Simulation integriert werden. Unter den getesteten Möglichkeiten, Unordnung in die Darstellung der Aktinfilamentstruktur zu bringen, zeigten sich die in den folgenden drei Kapiteln erläuterten Disorderarten als absolut notwendig für eine annähernd realistische Darstellung der Verbreiterung der Aktinschichtlinien bzw. den damit einhergehenden Anstieg der Hintergrundstreuung und somit der Intensitätsverteilung der Aktinschichtlinien untereinander.

2.2.3.1 Variabler Aktintwist

Zur Modellierung des variablen Aktintwists, also der Variation des Drehwinkels zwischen zwei aufeinander folgenden Aktinmonomeren (Vgl. Abschnitte 1.2 und 1.3), finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben (Vgl. Egelman *et al.*, 1982, Bremer *et al.*, 1991, Egelman und DeRosier, 1992, Mu *et al.*, 1997). In dieser Arbeit wurden die anhand von EM-Aufnahmen ermittelten Daten von Hanson (1967) als Grundlage für das Modell verwendet. Sie beschreiben eine Streubreite der Crossoverlängen in der Aktinhelix im Bereich von 30 bis 45 nm (s. Abschnitt 1.2). Da nicht nur eine Aktinhelix aufgebaut werden sollte, sondern ein Aktinfilament mit Tropomyosin und Troponin, mußte die Anordnung dieser Moleküle bei der Vertwistung im Modell berücksichtigt werden. Während zum Aufbau einer Aktinhelix ein Abweichungswinkel pro Monomer zur Simulation des variablen Aktintwists ausreicht, würde das gleiche Vorgehen beim Tropomyosin zu einem Versatz an den Übergängen zwischen zwei aufeinander folgenden Doppelsträngen führen. Ein Tropomyosinmolekül überspannt etwa sieben Aktinmonomere (s. Abschnitt 1.1.2). Besitzt das Tropomyosinmolekül eine starre

Form, dann kann es innerhalb dieses Bereichs dem Twist der Aktinmonomere nicht folgen und verläuft an jedem Monomer mit einem anderen azimuthalen Winkel. Aus diesen Gründen wurde ein kontinuierlicher Verlauf der Aktinhelix mit Tropomyosin und Troponin modelliert, was den Einsatz einer stetigen Funktion bedingte.

Um einen möglichst natürlichen Verlauf der Aktinhelix mit Abweichungen in unterschiedliche Drehrichtungen zu modellieren, mußte eine Funktion generiert werden, welche durch eine adäquate Anzahl von Punkten laufen konnte. Die Funktion durfte nicht zu komplex sein, um lange Rechenzeiten zu vermeiden und sie mußte numerisch stabil berechenbar sein, da Zahlen im Computer nur in sehr begrenzter Genauigkeit gespeichert werden können. Diese Vorgaben ließen sich durch den Einsatz einer eindimensionalen kubischen Splinefunktion erfüllen, die aus abschnittsweise definierten Polynomen dritten Grades besteht (s. Hoschek und Lasser, 1992).

Zur Erstellung einer solchen Splinefunktion wurden jeweils 28 Werte zufällig Gauss-verteilt erzeugt. Der erste Wert wurde mit dem Beginn der Aktinhelix assoziiert, der letzte mit dem Helixende. Anschließend durchlief die so generierte Splinefunktion nacheinander jeden erzeugten Zufallswert (Interpolationspunkt). Zur Bestimmung der veränderten Koordinaten für jedes einzelne Atom der Aktinhelix wurde anhand des z-Werts, also der Position des Atoms in Längsrichtung des Aktinfilaments, der Funktionswert der Splinefunktion als zusätzlicher Drehwinkel verwendet.

Die Anzahl der Interpolationspunkte (28 Werte) wurde aufgrund der in der Simulation verwendeten Helixlänge von etwa 1 μm (360 Aktinmonomere) gewählt. Innerhalb dieser Filamentlänge finden etwa 27 lange Helixumdrehungen Platz, wenn man von einer durchschnittlichen Crossoverlänge von etwa 36 nm ausgeht. Um die Drehrichtung der einzelnen Monomere nicht zu häufig oder zu selten innerhalb einer Crossoverlänge zu ändern, wurde die Anzahl der Drehrichtungsänderungen in den Größenordnungsbereich der Crossoverlängen gelegt. So konnte sich die Drehrichtung des Aktintwists durchschnittlich einmal pro Crossover ändern. Dies erschien unter Berücksichtigung der erhaltenen Ergebnisse als sinnvoll.

Der für die Auslenkung der Splinekurven einzusetzende Wert wurde anhand der resultierenden Crossoverlängen ermittelt. Bei Verwendung von Winkelabweichungen im Wertebereich zwischen $\pm 50^\circ$ lag die durchschnittliche Crossoverlänge bei 35,4 nm (Minimum: 29,2 nm, Maximum: 43,0 nm) und die zugehörige Standardabweichung bei 3,0 nm. Diese Werte decken sich mit denen, die von Hanson (1967) und Egelman *et al.* (1982) beschrieben wurden. Die Standardabweichung der Winkelabweichungen von Monomer zu Monomer lag bei $1,5^\circ$. Damit unterschreitet sie deutlich den Wert, den Egelman *et al.* (1982) in seinem Modell mit kumulativem Aktintwist annimmt. Auf diesen Sachverhalt wird ausführlich in der Diskussion eingegangen (s. Abschnitt 4.2.1).

Bei der Simulation des gesamten Aktinfilaments wurden die Drehwinkel der Atome von Tropomyosin und Troponin anhand der gleichen Splinefunktion, die für das Aktinfilament generiert worden war, errechnet. Auf diese Weise konnten Tropomyosin und Troponin kontinuierlich mit dem Twist der Aktinhelix mitgeführt werden.

Um eine ausreichende Zahl verschiedener Monomerdrehwinkel zu erhalten, wurden bei der Verwendung des variablen Aktintwists jeweils die Intensitäten von zehn Einzelbildern, die mit randomisierten Splinekurven generiert worden waren, gemittelt.

2.2.3.2 Variabler Tropomyosintwist

Die Abweichung des Tropomyosins vom idealen Helixverlauf wurde wie der variable Aktintwist (s. Abschnitt 2.2.3.1) mit Hilfe von eindimensionalen kubischen Splinekurven modelliert (Hoschek und Lasser, 1992). Um den Verlauf von Aktin- und Tropomyosinhelix nicht in völlig unterschiedliche Richtungen zu lenken, wurden jeweils die beiden Enden jeder Tropomyosindoppelhelix als Fixpunkte an der Aktinhelix festgelegt. So konnten sich die beiden Helices nur in einem vorgegebenen Rahmen relativ zueinander bewegen. Dies entspricht der Annahme, daß Tropomyosin über die Bindung an Troponin am C-terminalen Ende des Aktinfilaments fixiert wird (Vgl. Abschnitt 1.3). Obwohl dies nur bei niedriger Calciumkonzentration der Fall sein soll, wurden die Fixpunkte bei der Modellierung des on-Zustands (hohe Calciumkonzentration) der Einfachheit halber beibehalten.

Der Bereich zwischen den Fixpunkten wurde zufällig in die eine oder andere Richtung ausgelenkt (s. Abbildung 2.7).

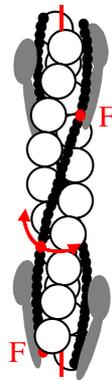


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung des variablen Tropomyosintwists

Schematische Darstellung der Aktinhelix (weiße Kugeln) mit Tropomyosin (schwarz) und Troponin (grau). Die z-Achse ist jeweils mit den senkrechten roten Strichen angedeutet. Jeder Tropomyosindoppelstrang wurde im Bereich zwischen zwei Fixpunkten (rote Punkte, mit „F“ gekennzeichnet, entsprechen den Enden der Moleküle) in seiner azimuthalen Position an der Aktinhelix zur einen oder anderen Seite ausgelenkt (roter Doppelpfeil).

Hierzu wurde bei beiden Doppelsträngen für jeden Bereich zwischen zwei Fixpunkten eine Gauss-verteilte Zufallszahl innerhalb einer vorgegebenen Maximalauslenkung erzeugt. Da sich in der Literatur praktisch keine Angaben zur Auslenkung von Tropomyosinmolekülen finden (Vgl. Abschnitt 4.2.2), wurden verschiedene Wertebereiche getestet. In den drei in Abschnitt 3.1.2.4 gezeigten Simulationen lagen sie zwischen $\pm 30^\circ$ bzw. $\pm 60^\circ$ bzw. $\pm 90^\circ$ (Standardabweichungen entsprechend $7,7^\circ$ bzw. $15,3^\circ$, bzw. $22,2^\circ$, s. Tabelle 3.2).

Aus den Fixpunkten wurden unter Berücksichtigung der randomisiert erzeugten Auslenkungen für jedes Filament zwei voneinander unabhängige Splinekurven generiert. So konnten die beiden Tropomyosindoppelstränge an den gegenüberliegenden Seiten der Aktinhelix jeweils mit unterschiedlichem Verlauf generiert werden.

Bei der gleichzeitigen Simulation von variablem Aktin- und Tropomyosintwist wurden Tropomyosin und Troponin anhand der Splinekurven für den Aktintwist entlang der Aktinhelix mitgeführt. Auf den Abweichungswinkel jedes einzelnen Atoms der Tropomyosin- und Troponinmoleküle wurde dann der für den Tropomyosintwist zusätzliche Abweichungswinkel aufaddiert.

Zum Erhalt einer ausreichenden Zahl verschiedener Tropomyosinverläufe wurden jeweils die Intensitäten von zehn Einzelbildern, die mit randomisierten Splinekurven erzeugt worden waren, gemittelt.

Die unterschiedliche Beweglichkeit der N- und C-terminalen Regionen der Moleküle (Vgl. Abschnitt 4.2.2) wurde im Modell nicht berücksichtigt, da für eine genaue Simulation noch zu wenig Daten vorliegen.

2.2.3.3 Dreidimensionaler Verlauf der Aktinfilamente, Myofibrillen und Einzelfasern

Der gekrümmte Verlauf der Aktinfilamente wurde in seiner Größenordnung anhand von EM-Aufnahmen von Sarkomeren des Wirbeltierskelettmuskels abgeschätzt, da sich in der Literatur praktisch keine quantitativen Beschreibungen dieses Effekts fanden (s. Abbildung 3.17 a). Zur Simulation des Filamentverlaufs wurden dreidimensionale kubische Splinefunktionen verwendet (s. Hoschek und Lasser, 1992). Mit Hilfe dieser Funktionen kann der Verlauf eines Filaments relativ einfach verändert werden (s. Abschnitt 2.2.3.1).

Bei Tests mit verschiedenen Anzahlen von Interpolationspunkten stellte sich heraus, daß sich Kurvenverläufe, die nur anhand von zwei Punkten generiert wurden, die Daten am besten wiedergeben konnten. Deshalb wurden die Aktinhelices entlang von Kurven geführt, welche als einen Interpolationspunkt die Koordinaten (0, 0, 0) hatten. Der zweite Punkt besaß als z-Koordinate stets die Filamentlänge, x- und y-Werte wurden jeweils Gauss-verteilt randomisiert erzeugt (Standardabweichung der Auslenkung am Filamentende: 39 nm, Vgl. Abschnitt 3.1.2.5, Abbildung 3.18). Zur Simulation ausreichend vieler verschiedener Filamentauslenkungen wurden jeweils 50 Intensitätsbilder, die mit randomisierten Splinekurven erzeugt worden waren, gemittelt.

Die Myofibrillen in einer Faser, ebenso wie die Fasern im Muskel bzw. in den Experimenten im Faserarray, laufen nicht exakt parallel zur Längsachse des Muskels, sondern weichen unter verschiedenen Winkeln davon ab (s. Abbildung 3.17 b, c, d). Diese Art der Abweichung ließ sich, innerhalb der Länge eines Sarkomers, am einfachsten mit einer leicht verkippten Projektion des Aktinfilaments modellieren. Um eine ausreichende Zahl verschiedener Verkippwinkel zu erhalten, mußten dabei wie bei der Simulation des dreidimensionalen Aktinfilamentverlaufs sehr viele Filamente unter unterschiedlichen Winkeln verkippt werden. Die gemittelten Intensitäten verkippter Filamente bzw. ihrer Projektionen sind jedoch identisch mit den gemittelten Intensitäten von auf die gleiche Weise verkippten Intensitätsbildern. Zur einfacheren Berechnung wurde deshalb die Verkipfung nur auf das aus der Simulation erhaltene Intensitätsbild angewendet. Die Streuung der verschiedenen Verkippwinkel wurde erreicht, indem das Intensitätsbild nacheinander um bestimmte Winkel innerhalb eines bestimmten Bereichs verkippt wurde. Zur Gewichtung der einzelnen Verkippwinkel wurde eine Gauss-Verteilung über dem Auslenkungswinkel benutzt. Dadurch wurden kleinere Winkel entsprechend stärker berücksichtigt als größere. Anschließend wurden alle unterschiedlich verkippten Intensitätsbilder aufsummiert und gemittelt. Die Schrittweite beim Durchlaufen der einzelnen Winkel betrug $0,1^\circ$. Dieser Wert war ausreichend um einen kontinuierlichen Intensitätsverlauf zu garantieren. Es wurden zwei unterschiedliche Verkipfungsverteilungen modelliert. Die

dafür verwendeten Gauss-Kurven hatten ein FWHM (Breite auf halber Kurvenhöhe) von $5,3^\circ$ bzw. $10,5^\circ$ (Vgl. Abschnitt 3.1.2.5, s. Abbildung 3.21).

Den durch die Verkippung erhaltenen Fanningeffekt, die Verbreiterung der Schichtlinien mit zunehmender Entfernung vom Meridian, demonstriert Abbildung 2.8.

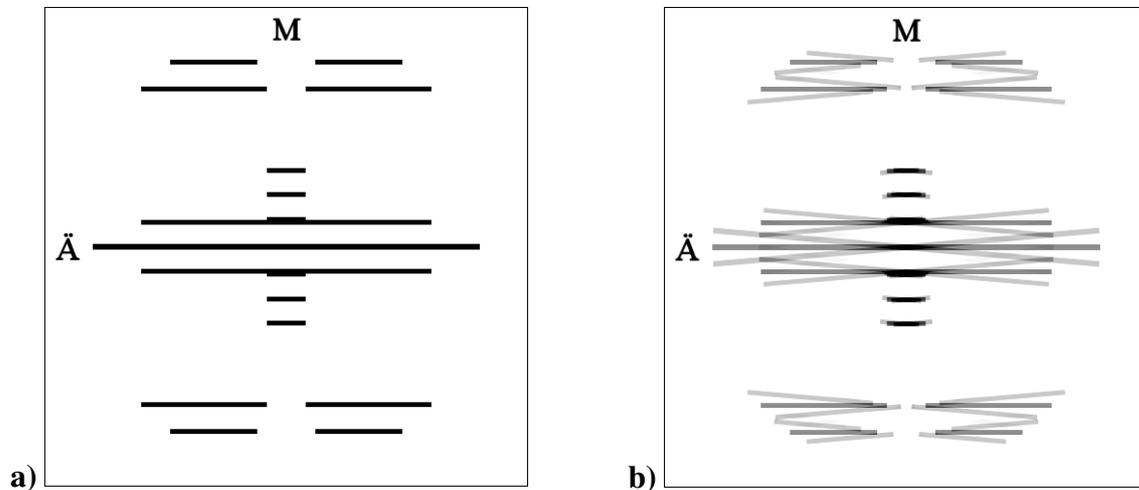


Abbildung 2.8: Durch Verkippung simulierter Fanningeffekt

a) Die schwarzen Linien deuten die Lage einiger Schichtlinien und Reflexe auf einem Diffractionsbild an (Ä: Äquator, M: Meridian). b) Das Bild aus a) wurde einmal nach links und einmal nach rechts rotiert (Verkippung). Anschließend wurden die beiden verkipperten Bilder und das Original anhand einer Gauss-Kurve gewichtet, aufaddiert und die Intensitäten gemittelt.

Die Abbildung macht deutlich, daß die Verkippung durch das resultierende Fanning zu einem Ineinanderlaufen der Schichtlinien im äußeren Bildbereich führt (Vgl. Abschnitte 3.1.2.6 und 3.1.3).

2.2.4 Fourier-Transformation

Mit Hilfe der Fourier-Transformation (FT) können Funktionen in das Spektrum ihrer anteilig enthaltenen Sinusschwingungen mit unterschiedlichen Frequenzen zerlegt werden. Das Verfahren wird z. B. angewendet, um akustische Signale anhand ihrer Frequenzen digital zu speichern. Die Fourier-Transformation ist umkehrbar, d. h. eine transformierte Funktion kann durch eine erneute FT zurückgewonnen werden. Zur Berechnung wird im Computer die Schnelle Fourier-Transformation (Fast Fourier Transform, FFT) verwendet (Cooley und Tukey, 1965).

Aufgrund der Vorgehensweise des Algorithmus für die FFT, der hier nicht weiter besprochen werden soll, ist es notwendig, daß die Länge der Zeilen und Spalten und damit die Bildgröße Zweierpotenzen entspricht. Ergebnis der Transformation ist ein Bild komplexer Zahlen. Jeder komplexe Bildpunkt wird in seine Polarkoordinaten aufgeteilt, wodurch ein Amplitudenbild (Radius) und ein Phasenbild (Winkel) entstehen. Auf beiden Bildern entspricht die Lage eines Bildpunktes relativ zum Bildmittelpunkt der Frequenz und der Richtung (Winkel) der zugehörigen Sinusschwingung. Der Abstand zwischen Bildpunkt und Bildmittelpunkt ist dabei proportional zur Frequenz. Die Helligkeit eines Punktes im Amplitudenbild entspricht der Amplitude der zugehörigen Sinusfunktion. Durch eine Quadrierung der Helligkeitswerte ergibt

sich die Intensität. Die Helligkeit eines Punktes im Phasenbild entspricht der Phase der zugehörigen Sinusfunktion. Die Phaseninformation wurde hier nicht betrachtet, da sie experimentell nicht ermittelt werden kann. In Abbildung 2.9 ist die Projektion von zehn Kugeln (a), das resultierende Amplitudenbild der FFT (b) und zwei Vertikalschnitte über jeweils einen zentralen Kanal von Projektion und Amplitudenbild zu sehen (c).

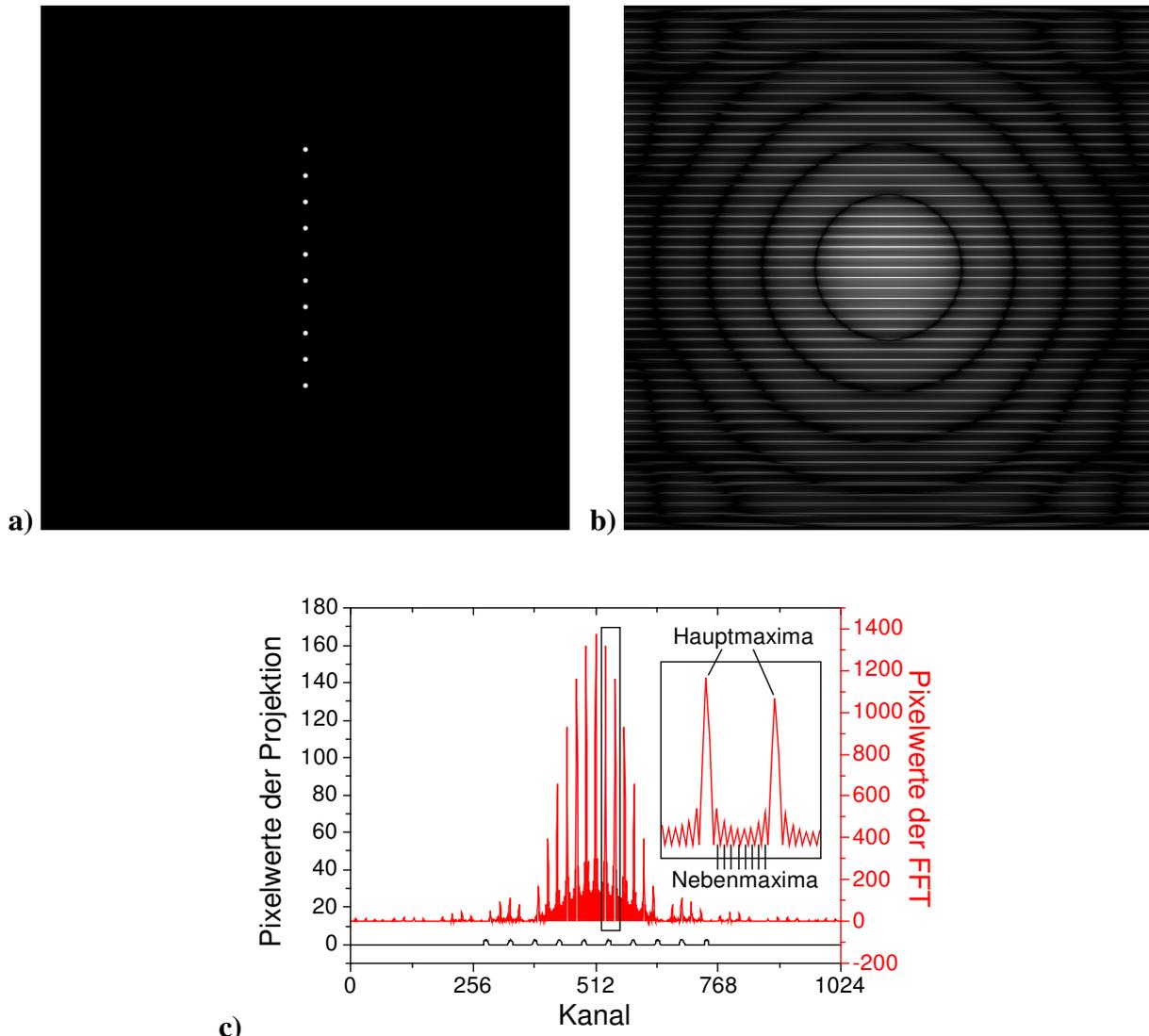


Abbildung 2.9: Kugelprojektion und resultierendes Amplitudenbild der FFT

a) Massenprojektion von zehn Kugeln mit einem Durchmesser von jeweils 10 Pixeln (Abstand 50 Pixel) auf 1024×1024 Pixel. b) Fourier-transformiertes Amplitudenbild der Massenprojektion (gleiche Bildgröße wie in a). Die konzentrischen Kreise geben das Spektrum einer einzelnen Kugel wieder. Die horizontalen Linien ergeben sich durch Auslöschung bzw. Verstärkung aufgrund der regelmäßigen Anordnung mehrerer Kugeln übereinander. c) Längsschnitt über einen Kanal (eine Pixelreihe) durch Projektion (schwarz) und FT (rot). Der schwarz umrandete Kasten (rechts) zeigt eine Ausschnittsvergrößerung des schwarz umrandeten Bereichs innerhalb des Schnitts über das Amplitudenbild. Im Bereich zwischen zwei Hauptmaxima sind mehrere Nebenmaxima zu erkennen.

Die mit Hilfe der FFT ermittelte Intensitätsverteilung einer Projektion entspricht einem Röntgenbeugungsbild, was durch Diffraktion von Wellen an einer zur Projektion äquivalenten Struktur entsteht. In beiden Bildern zeigen sich Abstände von sich wiederholenden Strukturen, in Abhängigkeit von ihrer Anordnung, ihrer Größe und Häufigkeit. Während aus dem

Intensitätsbild im Computer mit Hilfe der Phasenverteilung die Ausgangsstruktur (Projektion des 3D-Modells) exakt zurückgerechnet werden kann, ist dies mit dem experimentell ermittelten Diffraktionsbild nicht möglich, da die Phaseninformation fehlt. Aus diesem Grund werden, wie in dieser Arbeit gezeigt, Röntgendiffraktionsbilder häufig mit Hilfe von Computermodellen interpretiert. Sie können zu einer Molekülstruktur die entsprechende Intensitätsverteilung errechnen, die dann mit der experimentell ermittelten verglichen werden kann.

3 Ergebnisse

Zur Aufklärung des strukturellen Aufbaus des Aktinfilaments wurden die Intensitäten der Aktinschichtlinien zunächst unter Relaxationsbedingungen registriert. Nach Aufbau des Modells wurde dieses mit den gewonnenen Daten verglichen. Aufgrund der experimentell ermittelten Änderungen in den Intensitäten der Aktinschichtlinien in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration, wurde das Modell zur Interpretation erweitert und abschließend mit den experimentellen Daten verglichen.

3.1 Intensitätsverteilungen auf den Aktinschichtlinien unter Relaxationsbedingungen

Um in einem Diffraktionsbild die Intensitäten der Schichtlinien zu ermitteln, welche von der Verteilung der Masse im Aktinfilament herrühren, muß gewährleistet sein, daß die Myosinköpfe nicht stereospezifisch am Aktin gebunden sind. Jeder stereospezifisch gebundene Myosinkopf verändert die Masseerscheinung des Aktinfilaments, so daß die Intensitäten der registrierten Aktinschichtlinien nicht mehr nur dem Aktin zugeschrieben werden können. Das Ermitteln der Masseverteilung im Aktinfilament über die Intensitätsverteilung auf dem Diffraktionsbild würde somit verfälscht werden.

Aus diesem Grund wurden Experimente unter Relaxationsbedingungen gemacht, da die Myosinköpfe unter diesen Bedingungen nicht stereospezifisch gebunden sind. Die Aktinschichtlinien entsprechen somit praktisch der Masseverteilung, die auf die Aktinfilamente ohne gebundene S1-Köpfe zurückzuführen ist.

3.1.1 Experimentelle Ergebnisse

Am ESRF in Grenoble wurden zweidimensionale Röntgendiffraktionsbilder von Einzelfaserarrays des *M. psoas major* vom Kaninchen registriert. Abbildung 3.1 zeigt ein typisches Diffraktionsbild, aufgenommen von einem Array aus 15 Einzelmuskelfasern unter Relaxationsbedingungen.

Gut sichtbar in Abbildung 3.1 ist vor allem die sechste Aktinschichtlinie (ALL 6, bei $1 / 5,9 \text{ nm}^{-1}$ bzw. $1 / 59 \text{ \AA}^{-1}$). Auch die siebte Aktinschichtlinie ist noch zu erkennen (ALL 7, bei $1 / 5,1 \text{ nm}^{-1}$ bzw. $1 / 51 \text{ \AA}^{-1}$). ALL 1, die erste Aktinschichtlinie (bei $1 / 37,0 \text{ nm}^{-1}$ bzw. $1 / 370 \text{ \AA}^{-1}$) überlappt auf ihrer gesamten Länge mit der zu ihr parallel verlaufenden ersten Myosinschichtlinie (MLL 1, bei $1 / 42,9 \text{ nm}^{-1}$ bzw. $1 / 429 \text{ \AA}^{-1}$). Deshalb läßt sich ihre tatsächliche Intensität auf der hier gezeigten Abbildung nicht erkennen. Alle anderen Aktinschichtlinien, die im Bereich des Diffraktionsbilds liegen (ALL 2 - 5), sind unter diesen Versuchsbedingungen so schwach ausgeprägt, daß sie im Rauschen verschwinden. Die Lage der Myosinreflexe (M 3, M 6 und M 9) ist zur Orientierung mit angegeben. Sie können leicht mit den ebenfalls auf dem Meridian liegenden Troponinreflexen verwechselt werden. Im Bild sind Tn 2 und 3 deutlich zu erkennen, während Tn 1 mit der ersten Aktomyosinschichtlinie verschwimmt (schwarzer Pfeil). Im folgenden wird zunächst nur auf die Intensitätsverteilung der Aktin-

schichtlinien eingegangen. Die Troponinreflexe werden erst in den abschließenden Vergleich zwischen experimentell ermittelten Daten und Modell mit einbezogen (s. Abschnitt 3.2.3).

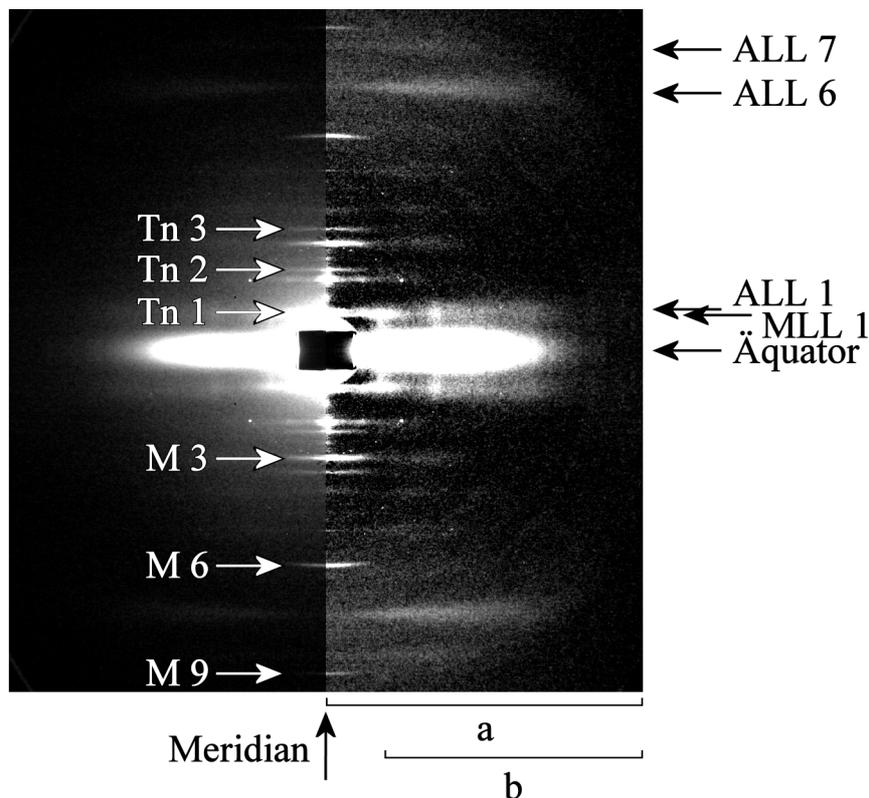


Abbildung 3.1: Röntgendiffraktionspattern unter Relaxationsbedingungen

Aufnahme von 15 Einzelmuskelfasern, registriert unter Relaxationsbedingungen am ESRF in Grenoble. Die linke Bildhälfte zeigt das normierte, zentrierte und über zwei Quadranten gefaltete Pattern nach Abzug des Maschinenhintergrunds in linearer Darstellung (Minimum: 0, Maximum: 20). In der rechten Bildhälfte wurde der Hintergrundverlauf anhand der Minimalwerte für jeden Radius ermittelt und subtrahiert (Vgl. Abbildung 2.1). So sind die relativ schwachen Aktinschichtlinien besser zu erkennen. ALL: Aktinschichtlinie, M: Myosinreflex, MLL: Myosinschichtlinie, Tn: Troponinreflex. a und b geben die Breite zweier Bereiche an, über die vertikale Schnitte gemacht wurden (a: $0 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$, b: $0,038 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$).

Zur quantitativen Abschätzung der integrierten Intensitäten der Aktinschichtlinien wurde ein Vertikalschnitt über einen gesamten Quadranten, quer zum Schichtlinienverlauf, durchgeführt (Abbildung 3.2, blaue Linie). Die Schnittbreite entspricht der Region a in Abbildung 3.1 ($0 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$). Zur Integration der Schichtlinienintensitäten wurde der im Bild verbliebene Streuungshintergrund von Hand abgeschätzt (rote Linie in Abbildung 3.2) und abgezogen. Der Verlauf der schwarzen Linie in Abbildung 3.2 zeigt den integrierten Vertikalschnitt nach Abzug des Streuungshintergrunds.

Wie oben erwähnt, überlappen erste Aktin- und erste Myosinschichtlinie (ALL 1, bzw. MLL 1) teilweise. Auf dem Meridian liegt zusätzlich noch der Troponinreflex Tn 1 im gleichen Bereich. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Vertikalschnitt ohne Berücksichtigung des Meridians mit geringerer Breite durchgeführt. Er entspricht dem Bereich b in Abbildung 3.1 ($0,038 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$). In Abbildung 3.3 ist der Verlauf des integrierten Vertikalschnitts nach Abzug des Maschinenhintergrunds zu sehen (blaue Linie). Die schwarze Linie entspricht dem Verlauf nach Abzug des Streuungshintergrunds (rot).

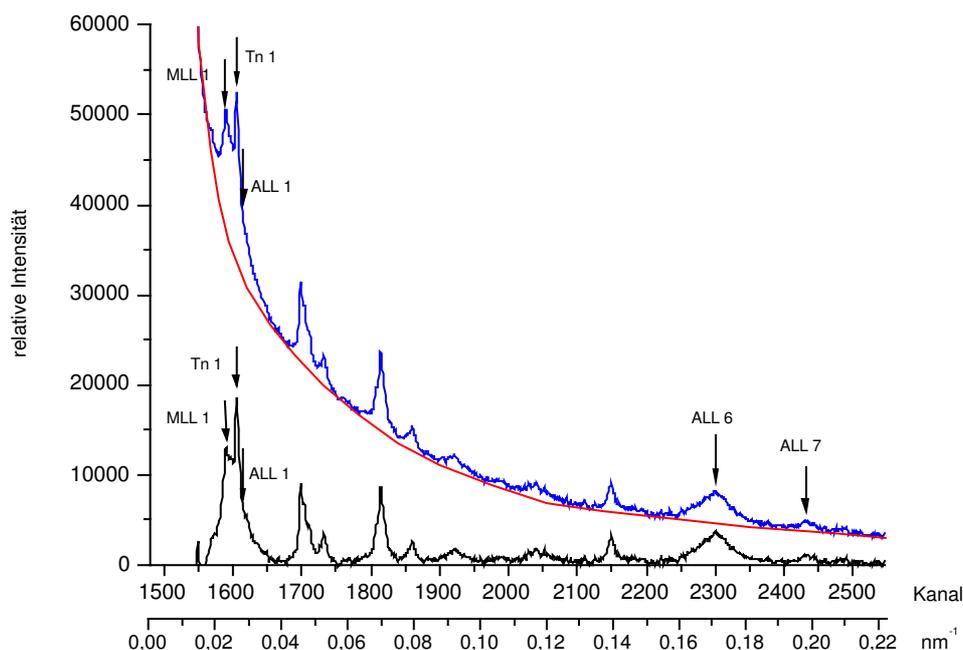


Abbildung 3.2: Vertikalschnitt über einen Quadranten des Röntgendiffraktionspatterns unter Relaxationsbedingungen

Blau: Verlauf des Vertikalschnitts ($0 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$) nach Abzug des Maschinenhintergrunds, rot: von Hand angelegter Hintergrundverlauf, schwarz: Verlauf nach Abzug des verbliebenen Streuungshintergrunds. Die Positionen von MLL 1, Tn 1, sowie ALL 1, 6 und 7 sind durch die Pfeile angegeben.

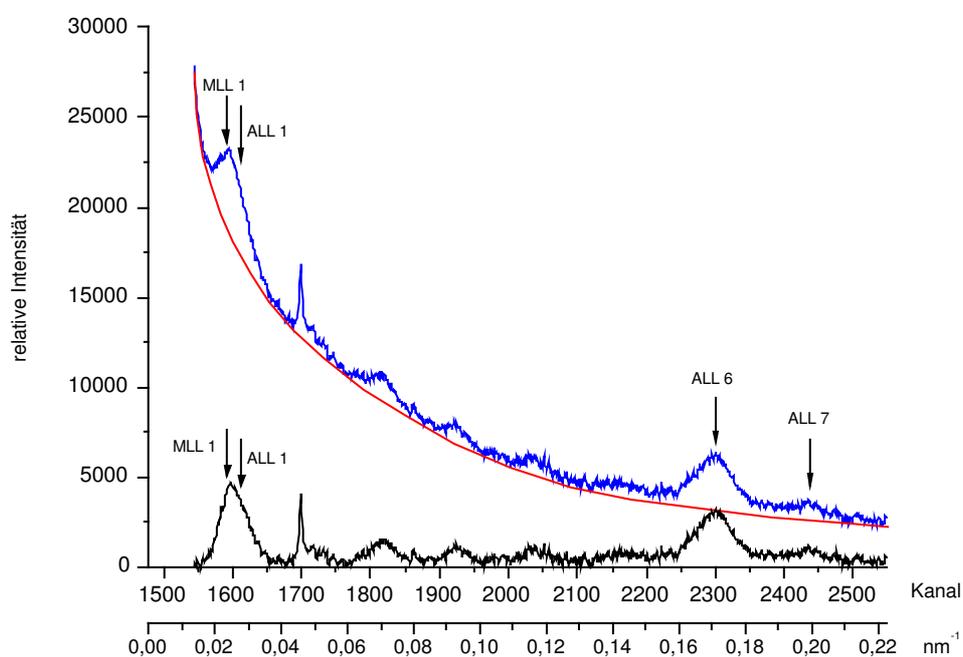


Abbildung 3.3: Vertikalschnitt über den extrameridionalen Bereich des Röntgendiffraktionspatterns unter Relaxationsbedingungen

Blau: Verlauf des Vertikalschnitts ($0,038 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$) nach Abzug des Maschinenhintergrunds. Rot: von Hand angelegter Hintergrundverlauf, schwarz: Verlauf nach Abzug des verbliebenen Streuungshintergrunds. Die Positionen von MLL 1, ALL 1, 6 und 7 sind durch die Pfeile angegeben. Der steile Peak bei Kanal 1700 (um $0,05 \text{ nm}^{-1}$) ist ein Artefakt, das von einem auskristallisierten Bestandteil der Lösung herrührt (Katalase). Er hat nichts mit der Streuung durch die Muskelstruktur zu tun.

Man beachte bei Vergleich der Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3 die unterschiedlichen Skalen der y-Achsen.

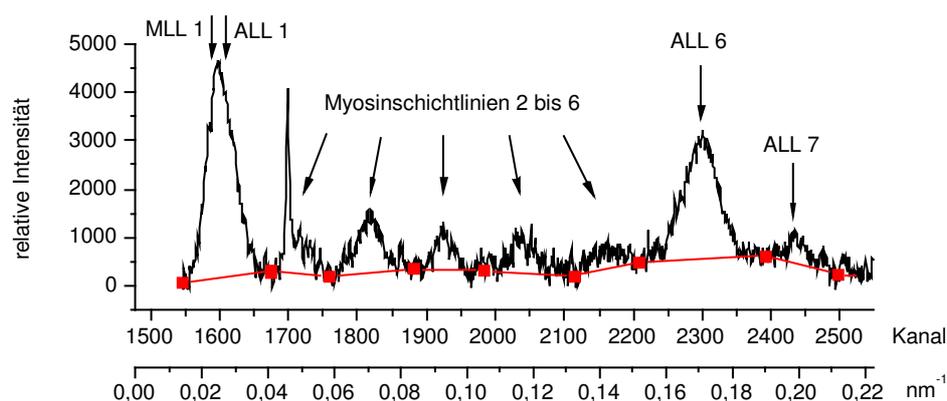


Abbildung 3.4: Vertikalschnitt über den extrameridionalen Bereich, Subtraktion des verbliebenen Hintergrunds

Der Verlauf des Vertikalschnitts entspricht dem aus Abbildung 3.3 (schwarze Linie). Um die Intensitäten der Peaks von ALL 1, 6 und 7 integrieren zu können, wurde der restliche verbliebene Hintergrund abgezogen. Zu diesem Zweck wurde eine Basislinie verwendet, wobei die einzelnen Punkte auf die Minima der Aktin- bzw. Myosinpeaks gesetzt wurden (rot). Den daraus resultierenden Intensitätsverlauf zeigen Abbildung 3.5 und Abbildung 3.26.

Die Peaks von ALL 6 und 7 reichen trotz Abzug des Streuungshintergrunds noch nicht bis zur Nulllinie herunter. Aus diesem Grund wurde zur Integration der Flächen anhand der Regionen neben den Peaks erneut eine Basislinie gezogen und der Bereich darunter von den Peaks subtrahiert (s. Abbildung 3.4).

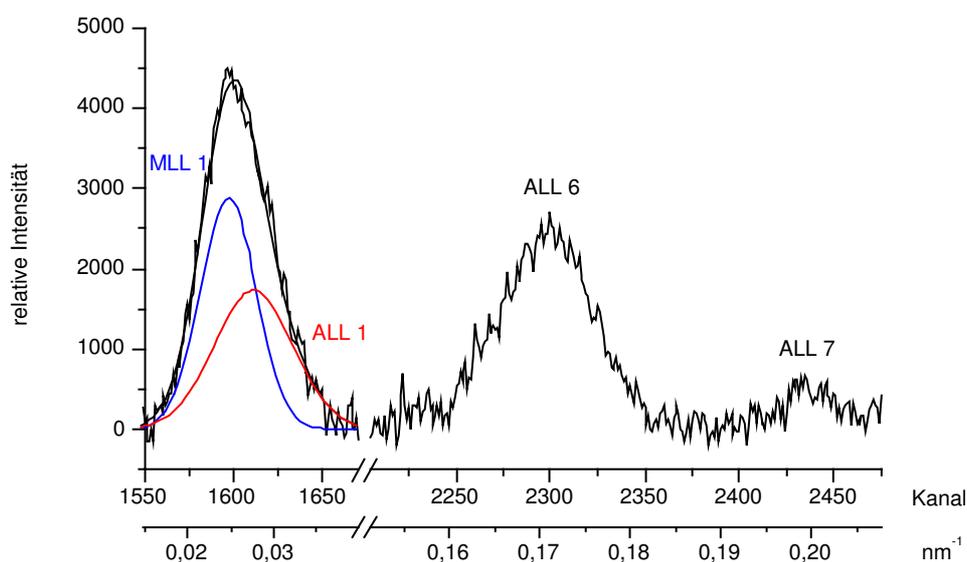


Abbildung 3.5: Vertikalschnitt über den extrameridionalen Bereich von ALL 1, 6 und 7

Die erste Aktomyosinschichtlinie, sowie die Aktinschichtlinien sechs und sieben sind nebeneinander mit unterbrochener Skalierung dargestellt. Die Hintergrundstreuung wurde vollständig subtrahiert. Die Position von ALL 1 wurde unter Zuhilfenahme eines Rigorpatterns ermittelt. Im Rigor sind praktisch alle Myosinköpfe am Aktinfilament gebunden (Cooke und Franks, 1980, Lovell und Harrington, 1981), so daß ALL 1 maximale Intensität erreicht, während die Intensität von MLL 1 sehr klein ist. Auf diese Weise konnte die Position von ALL 1 bestimmt werden und dann die Intensitätsanteile von ALL 1 und MLL 1 mit Hilfe eines Peakfits für überlagerte Impulse errechnet werden.

Nach der vollständigen Eliminierung der Hintergrundstreuung wurden die Flächen der Peaks von ALL 6 und 7 integriert. Um die Intensität von ALL 1 ermitteln zu können, wurden mit Hilfe eines Peakfits für überlagerte Impulse die jeweiligen Anteile von MLL 1 und ALL 1 am Aktomyosinpeak berechnet. Eine Darstellung von ALL 1, 6 und 7 nebeneinander zeigt Abbildung 3.5.

Die integrierten Intensitäten der Aktinschichtlinien eins, sechs und sieben gibt Tabelle 3.1 wieder. Für ALL 6 und 7 wurden die Intensitäten in gleicher Weise auch auf dem Vertikalschnitt über den gesamten Quadranten bestimmt.

Aktinschichtlinie (ALL)	ganzer Quadrant (Region a)	extrameridional (Region b)
1	nicht bestimmt	52
6	100	84
7	10	8

Tabelle 3.1: Relative Intensitäten der Aktinschichtlinien unter Relaxationsbedingungen ($\mu = 170$ mM) im Experiment

Die Werte geben die relativen integrierten Intensitäten der Peaks von ALL 1, 6 und 7 aus Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3 wieder. Die Intensität von ALL 6 auf dem gesamten Quadranten wurde gleich 100 gesetzt.

Betrachtet man den horizontalen Verlauf der Schichtlinien, so kann man erkennen, daß sich ihre Maxima an verschiedenen Positionen befinden. Zur Demonstration zeigt Abbildung 3.6 den horizontal integrierten Verlauf der Aktinschichtlinien sechs und sieben.

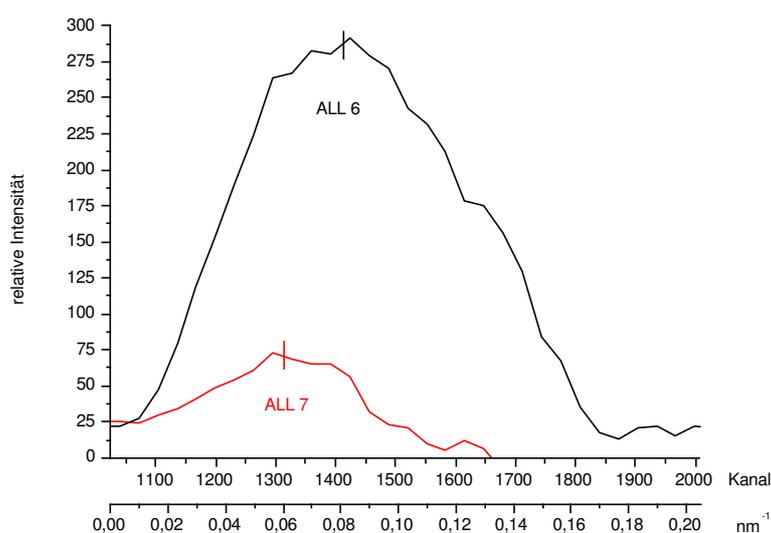


Abbildung 3.6: Horizontaler Verlauf von ALL 6 und 7 unter Relaxationsbedingungen

Integration der Intensitätsverläufe von ALL 6 und 7 in horizontaler Richtung (Verfahren s. Abschnitt 2.1.4). Schnittbreiten: ALL 6: Kanäle 2238 - 2364, ALL 7: Kanäle 2383 - 2467, Vgl. Abbildung 3.5. Die erhaltenen Datenpunkte wurden über 32 Kanäle zusammengefaßt und anschließend über 5 Werte geglättet. Die ungefähren Positionen der Maxima sind jeweils durch einen senkrechten Strich angedeutet.

Sie liegen in einem Bereich mit niedrigem Streuungshintergrund und können somit relativ einfach horizontal integriert werden (s. Abschnitt 2.1.4). Das Maximum des Verlaufs von ALL 6 liegt etwa bei $0,08 \text{ nm}^{-1}$, das von ALL 7 bei ungefähr $0,06 \text{ nm}^{-1}$. Die Integration der so ermittelten Intensitäten ergibt ein Verhältnis von 17 % für ALL 7, wenn ALL 6 als 100 % angenommen wird. Dieser Wert liegt etwa im Größenordnungsbereich des Werts aus dem Vertikalschnitt (10 %, s. Tabelle 3.1). Die Abweichung erklärt sich durch die unterschiedliche Art der Auswertung. Eine horizontale Integration von ALL 1 ist in dieser Weise nicht möglich, da die Überlappung mit MLL 1 dem im Wege steht. Aufgrund der relativ schwierigen Bestimmung der Peakposition von ALL 1 wurden bereits veröffentlichte Daten herangezogen (Kraft *et al.*, 2002). Demzufolge liegt die horizontale Peakposition der ersten Aktinschichtlinie im Bereich von etwa $0,1 \text{ nm}^{-1}$.

3.1.2 Aufbau des Modells zur Modellierung der Aktinschichtlinien

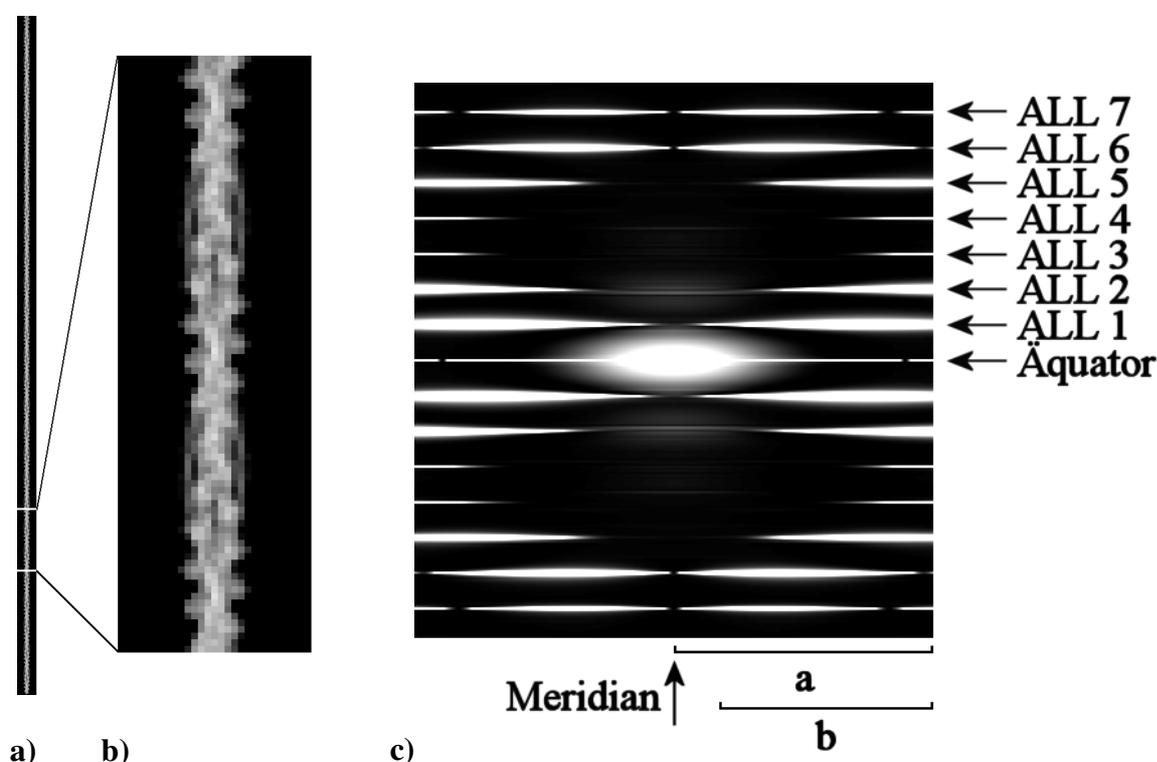


Abbildung 3.7: Projektion und Diffraktionsbild eines modellierten Aktinfilaments, bestehend aus Aktin und Tropomyosin

a) Projektion eines Aktinfilaments, bestehend aus 360 Aktinmonomeren und je 25 Tropomyosinmolekülen auf jeder Seite. Zur Projektion wurde ein Bild mit 1024×1024 Pixeln verwendet. Aus Platzgründen ist nur der relevante Bereich abgebildet. Der herausvergrößerte Bereich daneben (b) läßt eine Einschätzung der erhaltenen Auflösung zu (ein Pixel entspricht ungefähr einem Nanometer). c) Diffraktionsbild der Projektion in linearer Darstellung (Minimum: 0, Maximum: 10000). Nach der Berechnung der FFT wurden die Amplitudenwerte quadriert, um die Intensitäten zu erhalten. Zum Vergleich mit den experimentell erhaltenen Bildern wurde das Bild gefaltet. Zur besseren Vergleichbarkeit von Experiment und Modell wurde der gleiche Bildausschnitt verwendet wie in Abbildung 3.1. Die mit a bzw. b gekennzeichneten Bereiche entsprechen denen aus Abbildung 3.1 (a: $0 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$, b: $0,038 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$).

Aus den Strukturdaten von Aktin und Tropomyosin wurde, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, ein Filament aufgebaut und projiziert. Anschließend wurden mit Hilfe der FFT die Inten-

sitäten berechnet (s. Abschnitt 2.2.4). In Abbildung 3.7 sind die Projektion und das daraus resultierende Diffraktionsbild eines Aktinfilaments, bestehend aus 360 Aktinmonomeren und 50 Tropomyosindoppelsträngen, zu sehen. Alle in diesem Bildausschnitt vorhandenen Aktinschichtlinien (ALL 1 - 7) sind gut zu erkennen.

Zunächst mußte eine sinnvolle Position des Tropomyosins am Aktinfilament festgelegt werden.

3.1.2.1 Azimuthale Tropomyosinposition

Im Falle eines unregulierten Filaments, also in Abwesenheit von Troponin, wird die Tropomyosinposition von der Calciumkonzentration praktisch nicht beeinflusst. Ein natives Aktinfilament enthält jedoch Troponin, welches, abhängig von der vorliegenden Calciumkonzentration dazu führt, daß das Tropomyosin verschiedene azimuthale Positionen am Aktinfilament einnehmen kann (Haselgrove, 1972, Huxley, H. E., 1972, Parry und Squire, 1973). Abhängig davon verändern sich die Intensitäten bzw. Peakpositionen der Aktinschichtlinien (Huxley, H. E., 1971, Huxley, H. E., 1972). Dies geschieht im Modell auch, ohne daß Troponin vorliegt. Abbildung 3.8 zeigt die horizontalen Schichtlinienverläufe von ALL 1, 2 und 6 in Abhängigkeit von der Tropomyosinposition. Die Intensitäten bei einer azimuthalen Position von 0° entsprechen der Position am unregulierten Filament wie sie bei Lorenz *et al.* (1995) beschrieben wird.

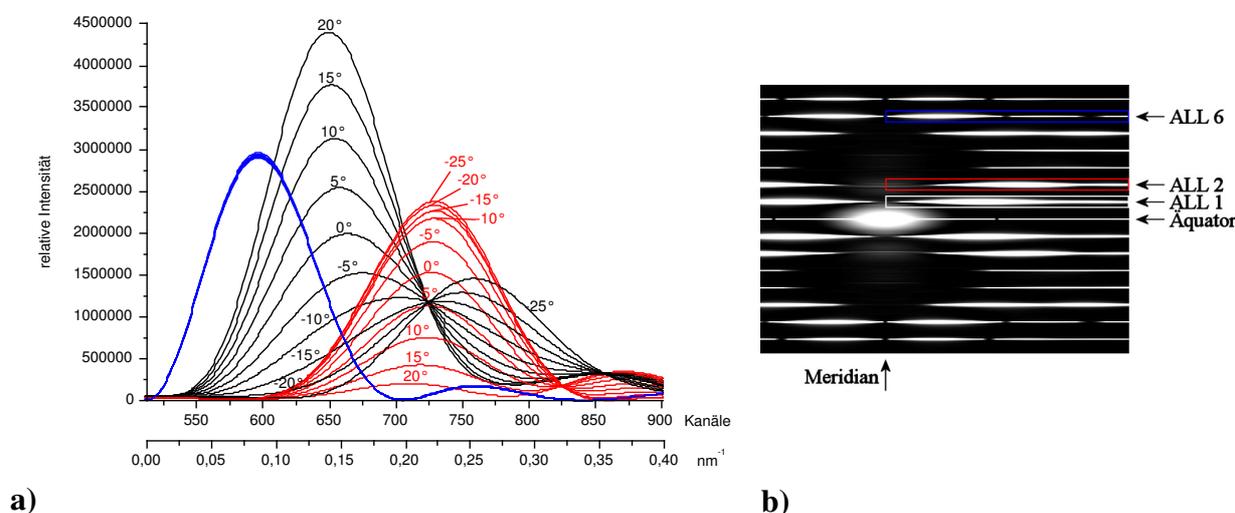


Abbildung 3.8: Modellerte Intensitätsverteilungen entlang ALL 1, 2 und 6 bei unterschiedlichen azimuthalen Tropomyosinpositionen

a) Horizontale Schnitte über die Aktinschichtlinien eins, zwei und sechs. Die Schichtlinienintensitäten von ALL 1 (schwarz) und ALL 2 (rot) werden stark von der azimuthalen Position des Tropomyosins am Aktinfilament beeinflusst. ALL 6 (blau) ist praktisch unabhängig von der Tropomyosinposition. Die Intensitäten von ALL 1 und 2 bei 0° entsprechen der Position am unregulierten Filament, wie sie bei Lorenz *et al.* (1995) beschrieben wird. Die Gradzahlen geben relativ dazu die azimuthalen Winkel der Tropomyosinpositionen am Aktinfilament an. b) Lage und Breite der Schnitte auf dem Diffraktionsbild. Das Pattern entspricht dem aus Abbildung 3.7, wobei die beiden rechten Quadranten in der vollen Breite dargestellt sind, die für die Schnitte berücksichtigt wurde.

Bei der Betrachtung von Abbildung 3.8 wird deutlich, daß sich die Intensitätsverteilungen der ersten und zweiten Aktinschichtlinie, abhängig von der azimuthalen Tropomyosinposition,

stark verändern. Dabei verhalten sich diese beiden Schichtlinien entgegengesetzt zueinander. Eine hohe erste Aktinschichtlinie ist von einer niedrigen zweiten begleitet und umgekehrt. Außerdem verändern beide Schichtlinien ihre Peakposition. Das Maximum der ersten wandert nach außen, je mehr das Tropomyosin von den S1-Bindestellen frei gibt. Das Maximum der zweiten Aktinschichtlinie bewegt sich entgegengesetzt. Das Intensitätsprofil von ALL 6 ist von der Tropomyosinposition praktisch unabhängig und ihre Peakposition bleibt ebenfalls unverändert. Anhand der relativen Intensitäten von ALL 1 und 2 zueinander wurde die off-Position des Tropomyosins, also im regulierten Filament bei niedriger Calciumkonzentration, bestimmt. Sie wurde als $+10^\circ$, relativ zum Modell von Lorenz *et al.* (1995), angenommen. Ein größerer Wert hätte eine zu hohe erste Aktinschichtlinie zur Folge, ein kleinerer ließe nicht mehr viel Raum für einen Anstieg von ALL 2 beim Wechsel in die on-Position. Ein in diesem Bereich liegender Wert wurde außerdem mehrfach in der Literatur beschrieben (s. Abschnitt 4.4.1).

3.1.2.2 Vervollständigung des Modells mit Troponin

Bislang wurde in der Literatur keine vollständige Troponinstruktur beschrieben. Aus diesem Grund wurde für das Modell ein Troponinmolekül, in Anlehnung an bekannte Teilstrukturen, selbst entworfen (s. Abschnitt 2.2.2). Es orientiert sich an den Angaben zu Masse, äußerer Form und Lage aus der Literatur.

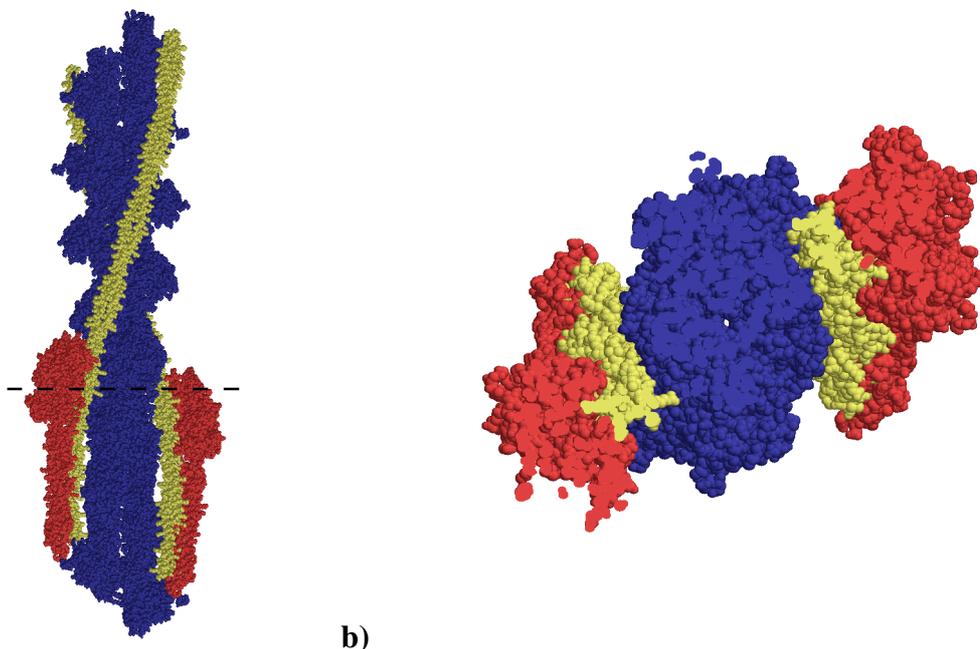


Abbildung 3.9: Ausschnitt aus einem modellierten Aktinfilament im off-Zustand

a) Ausschnitt eines Aktinfilaments, bestehend aus 16 Aktinmonomeren (blau), zwei Tropomyosindoppelsträngen (gelb) und zwei Troponinmolekülen in off-Position (rot). Der azimuthale Winkel des Tropomyosins beträgt relativ zum Modell von Lorenz *et al.* (1995) $+10^\circ$. Das obere Filamentende zeigt zur Z-Scheibe, das untere zur M-Linie. b) Querschnitt durch das Filament mit Beginn an der gestrichelten Linie aus a). Der Blick fällt auf die Schnittstelle, wobei nur der untere Teil des Filaments sichtbar ist. Beide Graphiken wurden mit dem Programm RASMOL (Sayle und Milner-White, 1995) erzeugt.

Da sich die Intensitäten von ALL 1 und 2 in Abhängigkeit von der azimuthalen Tropomyosinposition ändern (Abbildung 3.8), wurde anhand der relativen Intensitäten von ALL 1 und 2 zueinander die off-Position des Tropomyosins bestimmt (Abschnitt 3.1.2.1). Die off-Position des Tm-Tn-Komplexes mit niedriger Calciumkonzentration wurde dementsprechend als $+10^\circ$, relativ zum Modell von Lorenz *et al.* (1995), angenommen. Einen Ausschnitt aus der im Modell verwendeten Aktinfilamentstruktur zeigt Abbildung 3.9. Dabei wurde sichergestellt, daß die Parameter dieser Simulation in sinnvollen Bereichen liegen und sich mit Angaben aus der Literatur decken. Das auf diese Weise erstellte Modell wurde projiziert und die Intensitäten bestimmt. Das Resultat ist in Abbildung 3.10 zu sehen.

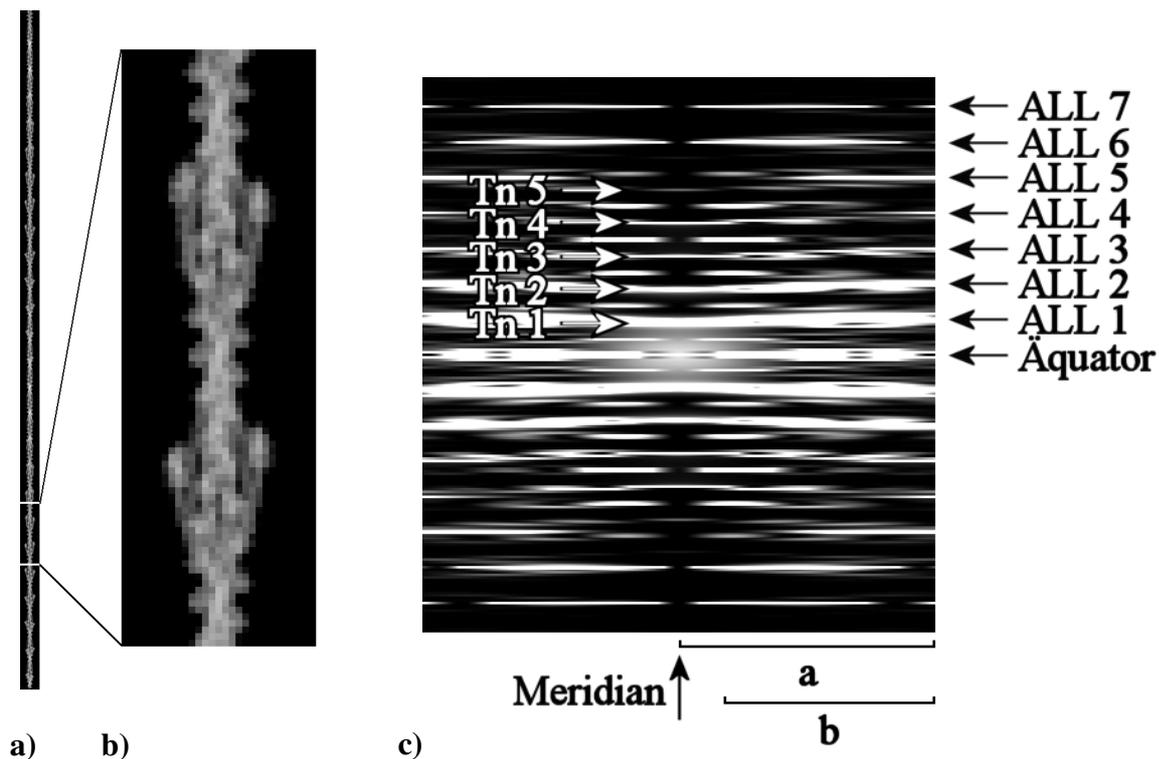


Abbildung 3.10: Projektion und Diffraktionsbild eines modellierten Aktinfilaments, bestehend aus Aktin, Tropomyosin und Troponin

a) Projektion eines Aktinfilaments, bestehend aus 360 Aktinmonomeren und zwei, einander gegenüber verlaufenden Sätzen von je 25 Tropomyosin- und Troponinmolekülen. Die ursprüngliche Bildgröße betrug 1024×1024 Pixel. In der Ausschnittsvergrößerung (b) läßt sich die Lage der Troponinmoleküle gut erkennen.
 c) Diffraktionsbild der Projektion in linearer Darstellung (Minimum: 0, Maximum: 50000). Die mit a bzw. b gekennzeichneten Bereiche entsprechen denen aus Abbildung 3.1 (a: $0 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$, b: $0,038 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$).

Schon beim flüchtigen Vergleich dieses modellierten Diffraktionsbilds mit dem im Experiment unter Relaxationsbedingungen aufgenommenen Pattern aus Abbildung 3.1 fallen deutliche Unterschiede auf. Während im Modell praktisch alle Aktinschichtlinien im gezeigten Bereich sowie die Troponinreflexe eins bis fünf gut zu erkennen sind und die Schichtlinien mit zunehmender Entfernung vom Meridian etwa gleich breit bleiben, zeigt das experimentell ermittelte Intensitätsbild nur ALL 1, 6 und 7. Dabei ist eine zunehmende Verbreiterung der Schichtlinien mit dem Abstand vom Meridian zu beobachten, außerdem sind nur die Troponinreflexe eins bis drei sichtbar. Eine quantitative Übereinstimmung der Schichtlinienintensitäten und der Schichtlinienbreiten zu modellieren, welche den experimentellen Daten entspre-

chen, war ohne Berücksichtigung weiterer Parameter nicht möglich. Es fehlten Effekte, welche zur Verbreiterung der Schichtlinien und zur Intensitätsabnahme der im Experiment nur schwach oder gar nicht ausgeprägten Aktinschichtlinien bzw. Troponinreflexe führen. Zur Simulation dieser Charakteristika im Experiment wurden bestimmte Typen von Disorder im Modell berücksichtigt. In der folgenden Auflistung sind einige der real vorkommenden Disordereffekte beschrieben. Sie wurden als Ansatzstellen für die Simulation von Disorder verwendet:

1. Das Aktinfilament liegt nicht gleichmäßig gedreht vor (Hanson, 1967, Egelman *et al.*, 1982) und
2. es folgt in sich selbst keinem vollständig geradlinigen Verlauf (Abbildung 3.17 a).
3. Das Tropomyosin folgt dem Verlauf der Aktinhelix nicht exakt (Squire, 1975, s. Abschnitt 4.2.2).
4. Die Myofibrillen innerhalb einer Faser verlaufen nicht genau parallel nebeneinander (Abbildung 3.17 a, b).
5. Die Fasern im natürlichen Muskel sind nicht exakt parallel nebeneinander angeordnet (Abbildung 3.17 c). Dies gilt ebenso für das Faserarray, zu welchem die Fasern für die Experimente montiert wurden (Abbildung 3.17 d). Dabei kann der Effekt *in vivo* noch stärker ausgeprägt sein.

Die Punkte eins bis drei betreffen in direkter Weise die Darstellung der Moleküle im Modell. Diese Parameter mußten beim Aufbau der Aktinhelix berücksichtigt werden. Punkt vier und fünf wurden durch eine nachträgliche Bearbeitung der modellierten Diffraktionsbilder realisiert („Verkipfung“, s. Abschnitt 2.2.3.3). Die nächsten drei Kapitel beschreiben die Auswirkungen der Simulation dieser Disordertypen auf die Intensitätsverteilung der erzeugten Diffraktionsbilder.

3.1.2.3 Variabler Aktintwist

Der variable Aktintwist, d. h. die Variation des Drehwinkels zwischen zwei aufeinander folgenden Aktinmonomeren, wurde unter Berücksichtigung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Hanson (1967) und in Anlehnung an das Modell von Egelman *et al.* (1982) simuliert. Um das Tropomyosin kontinuierlich mit dem Verlauf der Aktinhelix mitzuführen zu können, wurde der variable Aktintwist in dieser Arbeit, anders als bei Egelman *et al.* (1982) beschrieben, mit Hilfe von eindimensionalen Splinekurven realisiert (Vgl. 2.2.3.1). Auch wenn mit beiden Verfahren eine Verteilung der Crossoverlängen mit der gleichen Standardabweichung simuliert wird, unterscheiden sich die resultierenden Diffraktionsbilder in der Intensitätsverteilung auf den Aktinschichtlinien deutlich voneinander. Um eine möglichst große Variationsbreite verschiedener Twistwinkel zu erhalten, wurde dazu übergegangen, nicht nur ein Filament zu modellieren. Für die Berechnung eines Modellbilds wurden zehn Einzelfilamente mit jeweils randomisierten Twistwinkeln erzeugt, von jedem Bild einzeln die Intensitäten berechnet und diese dann aufaddiert und gemittelt. Abbildung 3.11 zeigt die unterschiedliche Auswirkung des variablen Aktintwists, simuliert mit Splinekurven, bzw. mit

kumulativem Disorder (Egelman *et al.*, 1982) auf die Intensitäten der Aktinschichtlinien. Als Referenz dient ein einzelnes Filament ohne Disorder. Aufgrund der Schwierigkeiten mit der Anpassung von Tropomyosin und Troponin beim kumulativen Disorder, wurden jeweils nur Aktinhelices ohne regulatorische Proteine generiert.

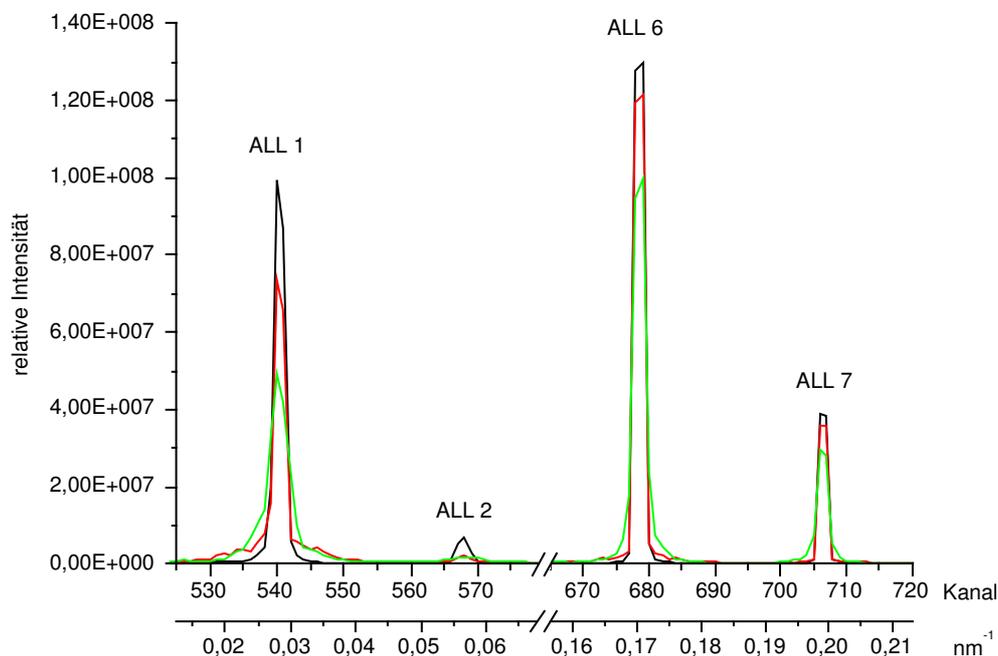


Abbildung 3.11: Vertikalschnitt über einen Quadranten modellierter Diffraktionspatern mit unterschiedlich simuliertem variablen Aktintwist

Schwarz: Vertikalschnitt über das modellierte Diffraktionsbild einer einzigen Aktinhelix ohne Disorder. Rot: Gemittelt aus den Intensitäten von zehn einzelnen Helices, bei denen der variable Aktintwist mit Splinekurven modelliert wurde (Vgl. Abschnitt 2.2.3.1). Grün: Gemittelt aus den Intensitäten von zehn einzelnen Helices, bei denen der variable Aktintwist mit kumulativem Disorder modelliert wurde. Die Standardabweichung der Cross-overlängen, jeweils bestimmt über alle zehn Einzelfilamente die mit Splinefunktionen bzw. kumulativem Disorder simuliert wurden, beträgt in diesem Beispiel jeweils 3,8 nm. Die Schnittbreite entspricht dem Bereich a aus der Abbildung 3.1 ($0 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$). Der Bereich, in dem ALL 3 bis 5 lagen, wurde hier zugunsten einer deutlicheren Darstellung von ALL 1, 2, 6 und 7 nicht berücksichtigt.

Sowohl der mit variablen Splinekurven, als auch der mit kumulativem Disorder simulierte variable Aktintwist bewirken einen Intensitätsabfall auf allen in der Abbildung 3.11 gezeigten Aktinschichtlinien. In beiden Fällen ist der Rückgang auf ALL 1 und 2 stärker, als auf ALL 6 und 7. Allerdings wirkt sich das kumulative Disorder (grüne Linie) deutlich stärker aus, als der mit den Splinekurven modellierte variable Aktintwist (rote Linie). Ein Vergleich der beiden vorgestellten Methoden findet in der Diskussion statt (s. Abschnitt 4.2.1).

Zur Simulation des variablen Aktintwists eines vollständigen Aktinfilaments mit Tropomyosin und Troponin wurden im Modell die Splinekurven verwendet. Der Twist führte zwar zu einer leichten Verbreiterung der Reflexe, die Stärke dieses Effekts war jedoch vergleichsweise gering. Abbildung 3.12 zeigt die Projektion von zehn Aktinfilamenten mit unterschiedlichem Twist, sowie das aus den gemittelten Intensitäten resultierende Diffraktionsbild.

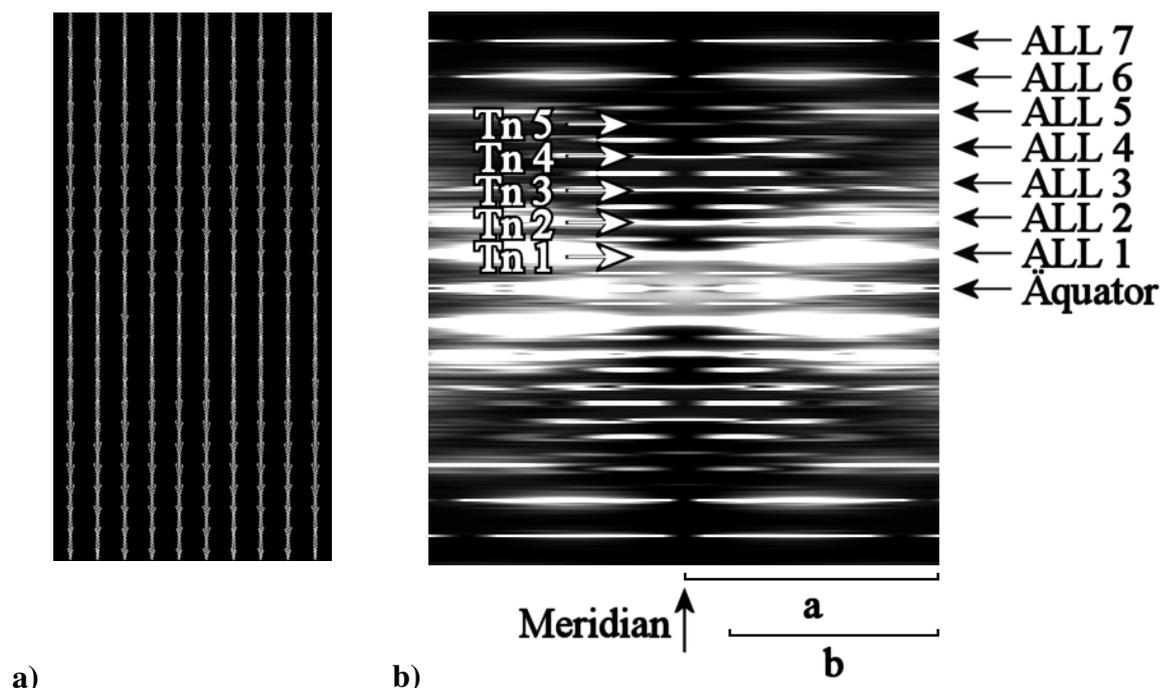


Abbildung 3.12: Projektion und Diffraktionsbild modellierter Aktinfilamente mit variablem Aktintwist

a) Projektion von zehn Aktinfilamenten mit variablem Aktintwist. Jedes Filament wurde einzeln auf 1024×1024 Pixel projiziert und die Intensität berechnet. b) Gemittelte Intensitäten aus den Diffraktionsbildern der zehn Projektionen in linearer Darstellung (Minimum: 0, Maximum: 50000). Die mit a bzw. b gekennzeichneten Bereiche entsprechen denen aus Abbildung 3.1 (a: $0 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$, b: $0,038 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$).

Die Aktinschichtlinien eins bis sieben sind zu erkennen, wobei ALL 4 sehr schwach ist. Die Troponinreflexe Tn 1 bis 5 sind gut sichtbar. Der Aktintwist führt zu einer Verbreiterung insbesondere der Aktinschichtlinien eins und zwei. In Abbildung 3.13 sind die Intensitäten der Aktinschichtlinien aus dem gemittelten Diffraktionsbild im Vertikalschnitt dargestellt.

Durch den variablen Aktintwist sinken die Intensitäten aller hier betrachteten Aktinschichtlinien. Allerdings ist dieser Abfall nicht gleichmäßig. ALL 1 und 2 sind stärker von diesem Effekt betroffen als ALL 6 und 7. Gleichzeitig mit dem Intensitätsabfall verbreitern sich die Schichtlinien. Auch die Verbreiterung wirkt sich bei ALL 1 und 2 stärker aus als bei ALL 6 und 7. Da die absolute Intensität des gesamten Bilds gleich bleiben muß, schließlich verschwindet mit dem Twist keine Masse aus dem Modell, kommt es nur zu einer Verlagerung der Intensitäten an eine andere Position. Diese erklärt sich relativ einfach, wenn man berücksichtigt, daß durch den Twist die Abschnitte einzelner Umdrehungen (Crossover) der Long-Pitch Helix (36 nm) unterschiedlich lang werden. Somit ändert sich das Spacing für die Schichtlinien, viele Umdrehungen sind noch so lang wie vorher, aber einige sind kürzer und andere länger. Die Auswirkungen auf ALL 1 und 2 sind stärker als auf ALL 6. Sie nehmen generell von innen nach außen hin ab. Dies geschieht deshalb, weil die mittlere Winkelabweichung der Long-Pitch Helix, welche ALL 1 direkt betrifft, größer ist als die der Monomere in der einzelsträngigen Helix, welche ALL 6 direkt betrifft (Vgl. Abschnitte 1.1.2 und 1.2.2).

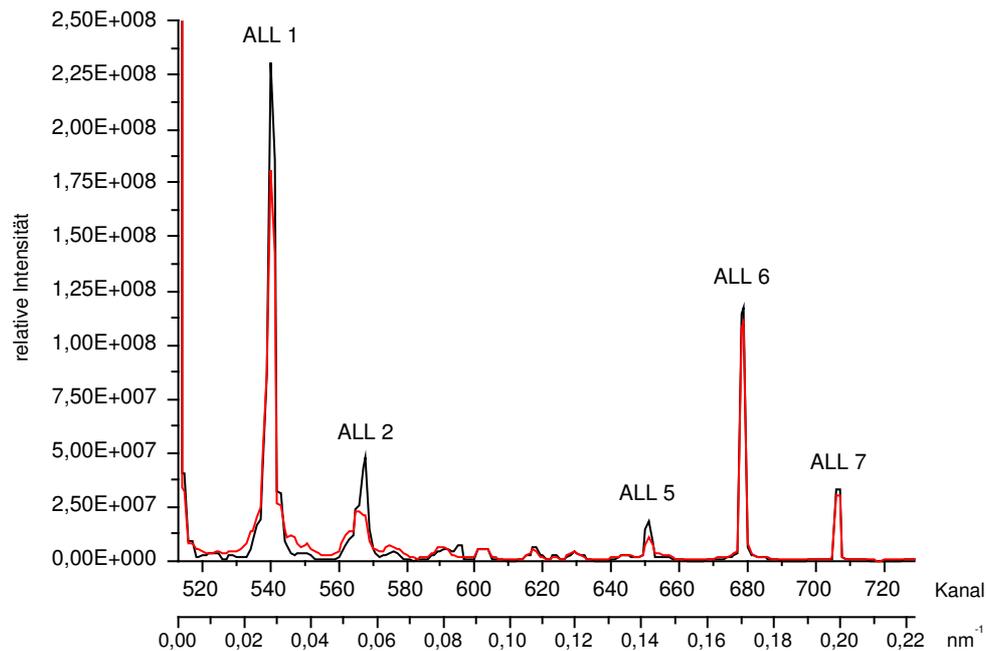


Abbildung 3.13: Vertikalschnitt über den extrameridionalen Bereich des modellierten Diffraktionspatterns mit und ohne variablen Aktintwist

Schwarz: Vertikalschnitt über das modellierte Diffraktionsbild eines einzigen Aktinfilaments ohne variablen Aktintwist (Abbildung 3.10), rot: Vertikalschnitt über das Diffraktionsbild, gemittelt aus den Intensitäten von zehn Einzelfilamenten, projiziert mit variablem Aktintwist (Abbildung 3.12). Die Schnittbreite entspricht dem Bereich b aus den beiden Abbildungen.

3.1.2.4 Variabler Tropomyosintwist

Neben dem Aktintwist wurde berücksichtigt, daß das Tropomyosin per se nicht in präziser Weise der Aktinhelix folgen muß. Leider ist wenig darüber bekannt, wie beweglich Tropomyosin tatsächlich ist. Aus diesem Grund wurde der Effekt auf die Schichtlinienintensitäten mit verschiedenen Stärken der Abweichung getestet. In Anlehnung an den variablen Aktintwist, der für die vom Normalwinkel abweichenden Drehwinkel der Aktinmonomere steht, wird der von der Normalposition abweichende Verlauf des Tropomyosins hier als variabler Tropomyosintwist bezeichnet.

Um den kontinuierlichen Verlauf der Tropomyosinmoleküle zu gewährleisten, wurden auch hier wieder Splinefunktionen zum Erzeugen der Abweichungswinkel verwendet (s. Abschnitt 2.2.3.2). Da es Hinweise darauf gibt, daß Troponin das Tropomyosin am Aktinfilament verankert (Hitchcock *et al.*, 1973, Potter und Gergely, 1974, Hitchcock, 1975, Ohtsuki und Shiraishi, 2002), wurden die Enden der Tropomyosinmoleküle, an denen sich auch das Troponin befindet, fix gelassen. Der Verlauf zwischen zwei Fixpunkten wurde unterschiedlich stark variiert. In Abbildung 3.14 sind die Projektionen von zehn Aktinfilamenten mit schwach ausgeprägtem variablem Tropomyosintwist, sowie das aus den gemittelten Intensitäten resultierende Diffraktionsbild dargestellt.

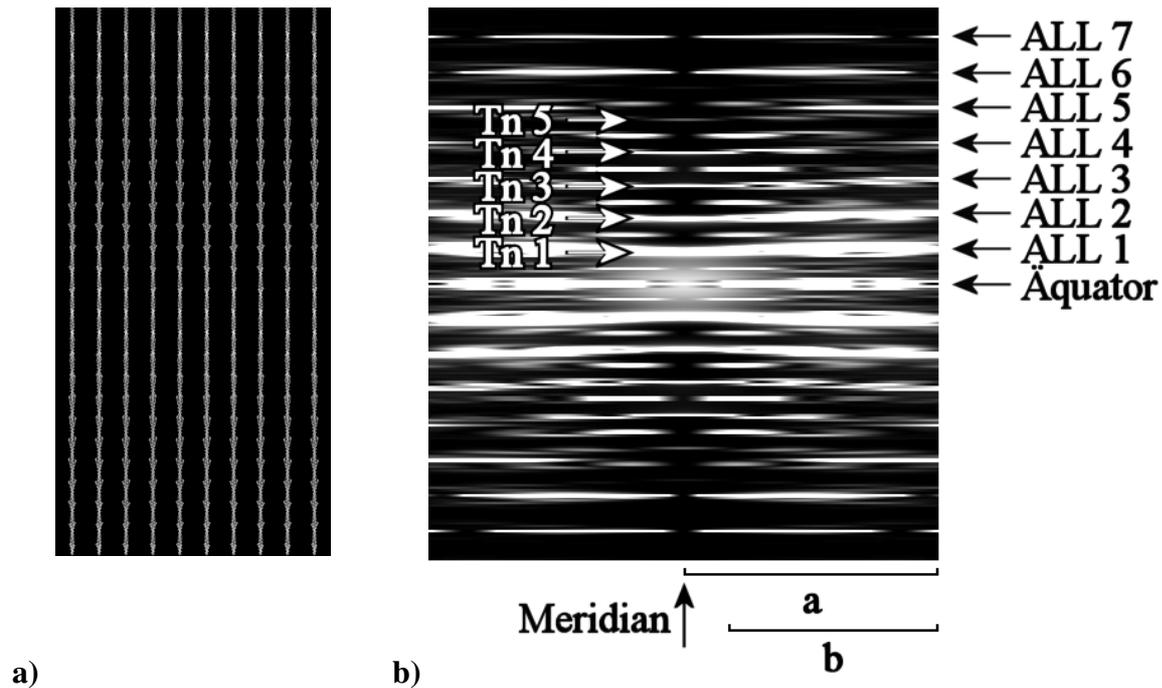


Abbildung 3.14: Projektion und Diffraktionsbild modellierter Aktinfilamente mit variablem Tropomyosintwist

a) Projektion von zehn Aktinfilamenten mit schwachem variablem Tropomyosintwist. Jedes Filament wurde einzeln auf 1024×1024 Pixel projiziert und die Intensität berechnet. b) Gemittelte Intensitäten aus den Diffraktionsbildern der zehn Projektionen in linearer Darstellung (Minimum: 0, Maximum: 50000). Die mit a bzw. b gekennzeichneten Bereiche entsprechen denen aus Abbildung 3.1 (a: $0 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$, b: $0,038 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$).

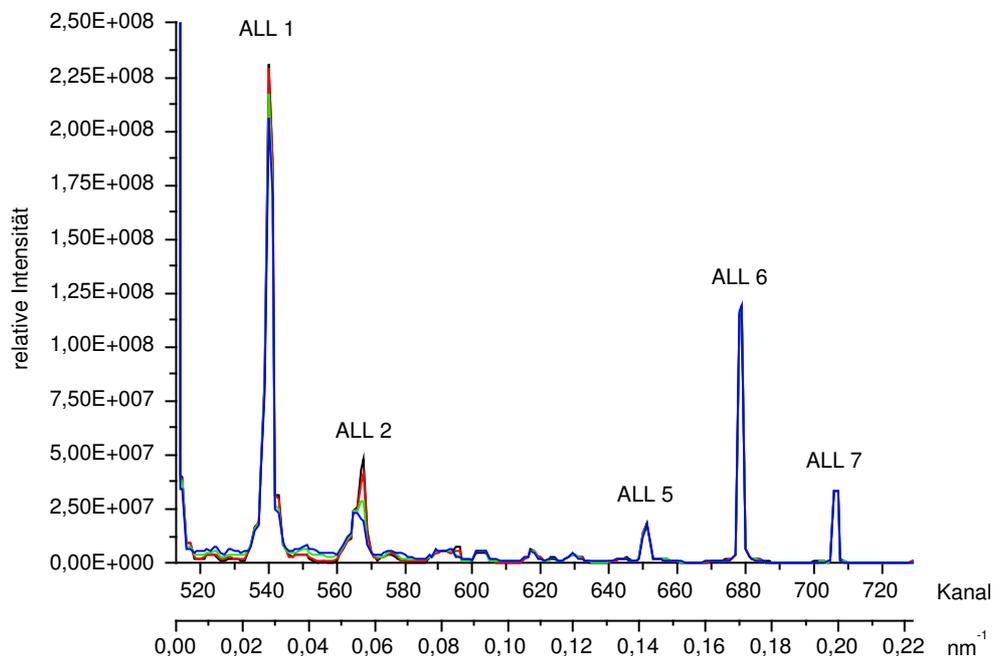


Abbildung 3.15: Vertikalschnitt über den extrameridionalen Bereich des modellierten Diffraktionspattern mit und ohne variablem Tropomyosintwist

Schwarz: Vertikalschnitt über das modellierte Diffraktionsbild eines einzigen Aktinfilaments ohne variablem Tropomyosintwist (Abbildung 3.10), rot: Vertikalschnitt über das Diffraktionsbild, gemittelt aus den Intensitäten von zehn Einzelfilamenten, projiziert mit schwachem variablem Tropomyosintwist (Abbildung 3.14). Grün: mittlerer variabler Tropomyosintwist, blau: starker variabler Tropomyosintwist. Die Schnittbreite entspricht dem Bereich b aus den beiden Abbildungen.

Die Aktinschichtlinien eins bis sieben sind gut zu erkennen, Tn 1 - 5 sind ebenfalls gut sichtbar. Die Auswirkung des Tropomyosintwists ist in dieser Darstellung praktisch nicht zu sehen (Vgl. Abbildung 3.10, ohne Twist).

Abbildung 3.15 zeigt die Intensitäten dreier gemittelter Diffraktionsbilder mit unterschiedlich starkem variablen Tropomyosintwist im Vertikalschnitt. Der variable Tropomyosintwist wirkt sich praktisch nur auf die Intensitäten der ersten und zweiten Aktinschichtlinien aus (Vgl. Abschnitt 1.2.2). Die Peakhöhen dieser beiden Reflexe sinken, gleichzeitig steigt der Bereich vor allem um ALL 1 herum leicht an. Insgesamt ist der Effekt unter den hier getesteten Bedingungen jedoch eher schwach ausgeprägt, so daß er in der gewählten Darstellung auf dem Diffraktionsbild in Abbildung 3.14 praktisch nicht zu erkennen ist. In Tabelle 3.2 sind die Maximalauslenkungen der Kurvenstützpunkte, sowie die Standardabweichungen aller Winkel zu finden, welche für die Erzeugung der Modellbilder, die Abbildung 3.15 zugrunde liegen, verwendet wurden (Vgl. Abschnitt 2.2.3.2).

Auslenkung	schwach	mittel	stark
Maximalauslenkung [°]	-21,4 bis 21,7	-47,7 bis 42,4	-53,8 bis 79,7
Standardabweichung [°]	7,7	15,3	22,2

Tabelle 3.2: Statistik der Kurvenstützpunkte des variablen Tropomyosintwists

Angegeben sind die Maximalauslenkungen der Kurvenstützpunkte sowie ihre Standardabweichungen. Sie wurden zur Generierung des variablen Tropomyosintwists der Aktinfilamente verwendet, die auch Abbildung 3.15 zugrunde liegen. Für jede Auslenkungsstärke wurden zehn Filamente eingesetzt. Die starke, aber auch die mittlere Auslenkung scheinen aufgrund ihrer großen Maximalauslenkungen unrealistisch.

In Abbildung 3.16 sind die Auslenkungen der Kurvenstützpunkte, die zur Berechnung der Auslenkungswinkel verwendet wurden, graphisch dargestellt.

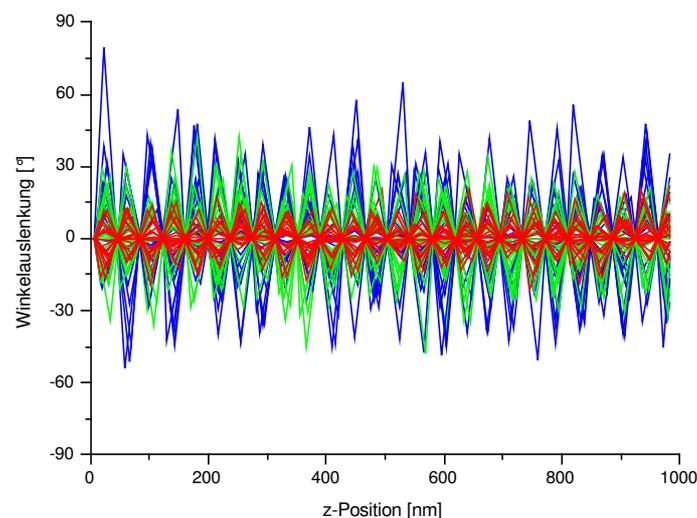


Abbildung 3.16: Graphische Darstellung der Auslenkungswinkel des variablen Tropomyosintwists

Abgebildet sind die Auslenkungswinkel aller Stützpunkte für die jeweils zehn Filamente mit schwacher (rot), mittlerer (grün) und starker Abweichung (blau), entsprechend Tabelle 3.2. Die Stützpunkte der Fixpunkte haben die Winkelabweichung 0°, dadurch kommt der zackenförmige Verlauf zustande.

Wie man in der Abbildung sehen kann, liegen die Auslenkungsmaxima bei der starken Auslenkung (blau) im Bereich zwischen 30° und 60° . Auch bei der mittleren Auslenkung (grün) wird ein Winkel von 30° noch teilweise überschritten. Aus diesem Grund scheinen die starke, aber auch die mittlere Auslenkung eher unrealistisch zu sein. Im folgenden wurde deshalb der schwache variable Tropomyosintwist für das Modell verwendet.

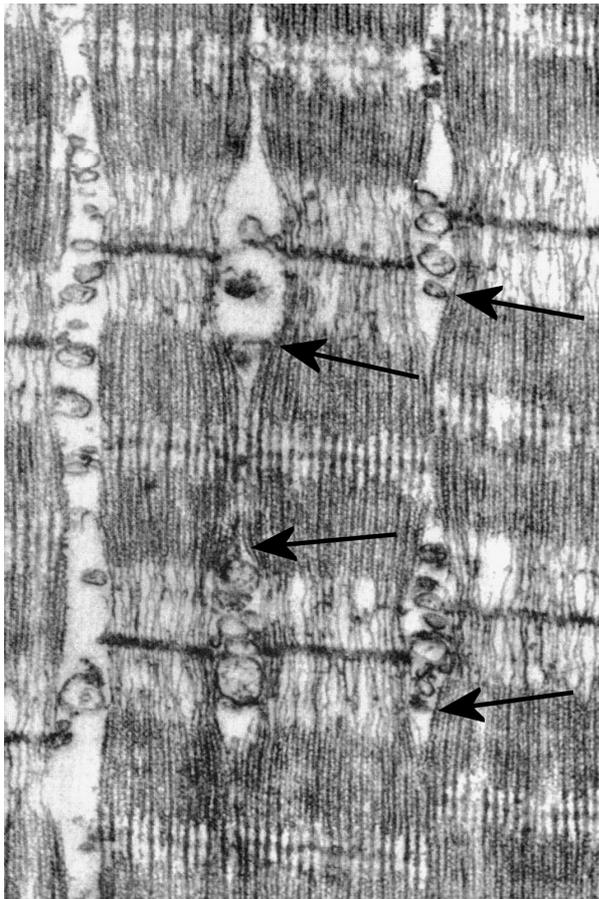
3.1.2.5 Dreidimensionaler Verlauf der Aktinfilamente, Myofibrillen und Einzelfasern

Neben der Vertwistung des Aktinfilaments und einer gewissen Streuung der Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Tropomyosins gibt es noch eine andere Art von Disordertypen, die sich aber alle in einer ähnlichen Weise äußern. Zum einen folgen Aktin- und Myosinfilamente keinem geradlinigen Verlauf. Vielmehr werden sie durch angrenzende Zellkerne oder Mitochondrien in kurvige Verläufe gebogen (s. Abbildung 3.17 a, b). Diese Auslenkung beträgt in der Abbildung 3.17 a bis zu einem Fünftel der Länge der Aktinfilamente. Neben solch starken Abweichungen sind viele, weniger stark gebogene Filamente vorhanden. Natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, daß durch die Vorbehandlung des Präparats für die EM-Aufnahme ein Schrumpfungseffekt eintrat, und daß die Myofibrillen unter nativen Bedingungen enger zusammen liegen. Dennoch ist schon aufgrund der Verteilung der Mitochondrien und Zellkerne ein vollständig paralleler Verlauf aller Filamente ausgeschlossen. Die Frage ist lediglich, wie groß die Abweichung ist, bzw. wie die Verteilung der unterschiedlich starken Auslenkungen aussieht.

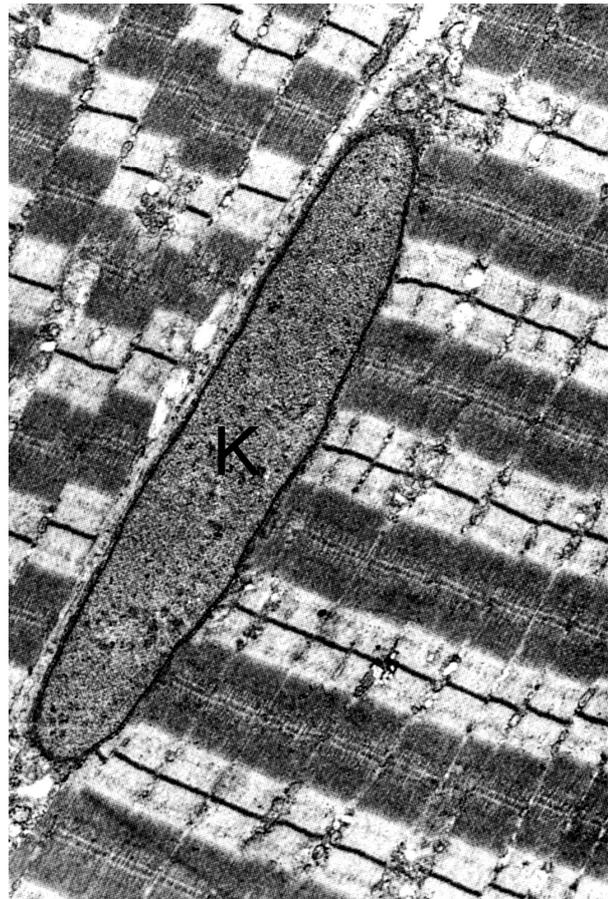
Zu diesem Effekt, der sich direkt auf die Struktur einzelner Aktinfilamente bezieht, kommen noch zwei weitere, die sich in ihrer Auswirkung auf das Röntgendiffraktionsbild ähnlich verhalten. Zum einen verlaufen die Myofibrillen innerhalb einer Faser nicht exakt parallel zueinander. Dies ist in Abbildung 3.17 b zu sehen, in der die einzelnen Myofibrillen, getrennt durch Mitochondrien, gut zu erkennen sind. Hier beträgt die Abweichung vom geradlinigen Verlauf bis zu 10° . Zum anderen sind die Fasern im natürlichen Muskel, wie im montierten Einzelfaserarray, nicht vollständig parallel ausgerichtet (Abbildung 3.17 c, d).

Abbildung 3.17: EM-Aufnahmen von Skelettmuskelfasern und montierte Fasern in einer Meßkammer (folgende Seite)

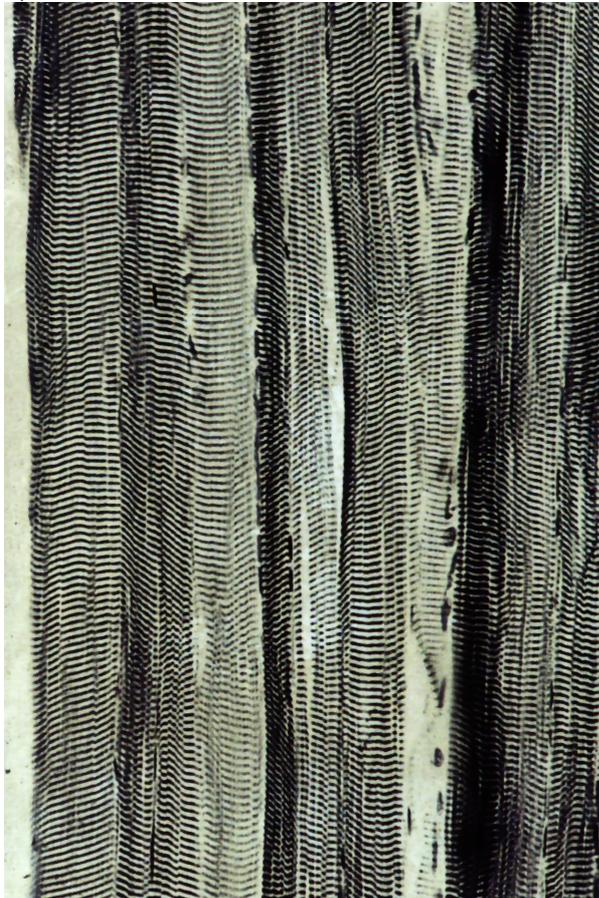
a) aus Huxley, H. E. (1957b), Ausschnitt aus Plate 206, *M. psoas*, Vergrößerung 60000fach. Die Pfeile deuten auf besonders stark gekrümmt verlaufende Aktinfilamentabschnitte im Randbereich der Myofibrillen. b) aus Voet und Voet (1992), Ausschnitt aus Abb. 34-42, Skelettmuskel; K: Zellkern, der am Rand einer Faser liegt. Die Filamente in den Sarkomeren verlaufen entlang des Zellkerns leicht gekrümmt. Die nebeneinander liegenden Myofibrillen verlaufen mehr oder weniger schräg zueinander (der Versatz links oben ist vermutlich ein Präparationsartefakt). c) aus Welsch (2003), Abb. 3.3-6, humane Skelettmuskelzellen nach Eisenhämatoxylinfärbung; Vergrößerung 140fach. Die Muskelfasern verlaufen nicht vollständig parallel zueinander. d) Aufnahme von 30 zu einem Array montierten Einzelmuskelfasern in einer Meßkammer. Die Länge der Fasern beträgt etwa 3 cm. Der obere und untere Pfeil deuten auf die zur Befestigung verwendeten Tröpfchen aus Histoacryl und Silikon, der Pfeil in der Mitte zeigt auf die senkrecht verlaufenden Einzelmuskelfasern. Durch die Bündelung von Hand wird keine absolut präzise Anordnung erreicht, das Array zeigt eine leicht konische Form. Das Farbenspiel kommt durch Interferenz bei der Lichtbeugung an der Sarkomerenstruktur zustande.



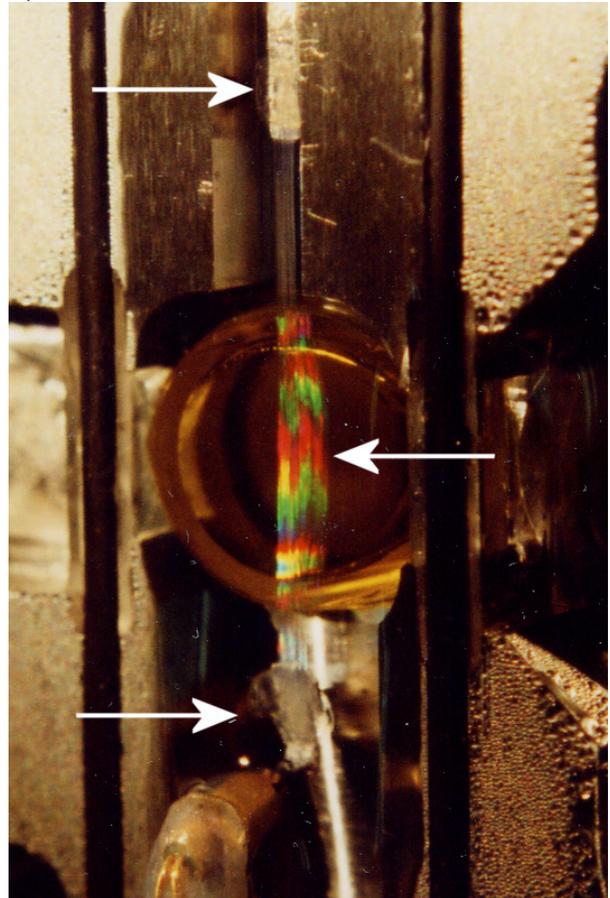
a)



b)



c)



d)

Selbst bei einer guten Montage kommen noch geringfügige Abweichungen zustande. Sie bewegen sich im Rahmen von wenigen Grad. Diese beiden Effekte, der nicht vollständig parallele Verlauf von Myofibrillen und Einzelfasern, beziehen sich auf den Zusammenschluß mehrerer Sarkomere, betreffen also nicht direkt das Einzelfilament.

Zur Simulation des gebogenen Verlaufs der Aktinfilamente bzw. der Abweichungen von Myofibrillen und Einzelfasern vom parallelen Verlauf, wurden zwei unterschiedliche Verfahren eingesetzt. Der Verlauf einzelner Aktinfilamente wurde mit Hilfe von dreidimensionalen kubischen Splinekurven modelliert (s. Abschnitt 2.2.3.3). Je nach Auslenkung der Kurvenstützpunkte entstehen dabei mehr oder weniger stark ausgelenkte Aktinfilamente. Abbildung 3.18 zeigt den Verlauf von 50 Einzelfilamenten, wobei zur Modellierung unterschiedliche Auslenkungen der Splinekurven eingesetzt wurden. Die Maximalauslenkung der Kurvenpunkte entspricht der der Filamente aus Abbildung 3.17 a. Da keine Daten zur tatsächlichen statistischen Verteilung der Auslenkungen einzelner Filamente in einer Faser vorliegen, wurde zur Vereinfachung eine Gauss-verteilte Abweichung der für die Kurvenerzeugung verwendeten Kurvenpunkte angenommen.

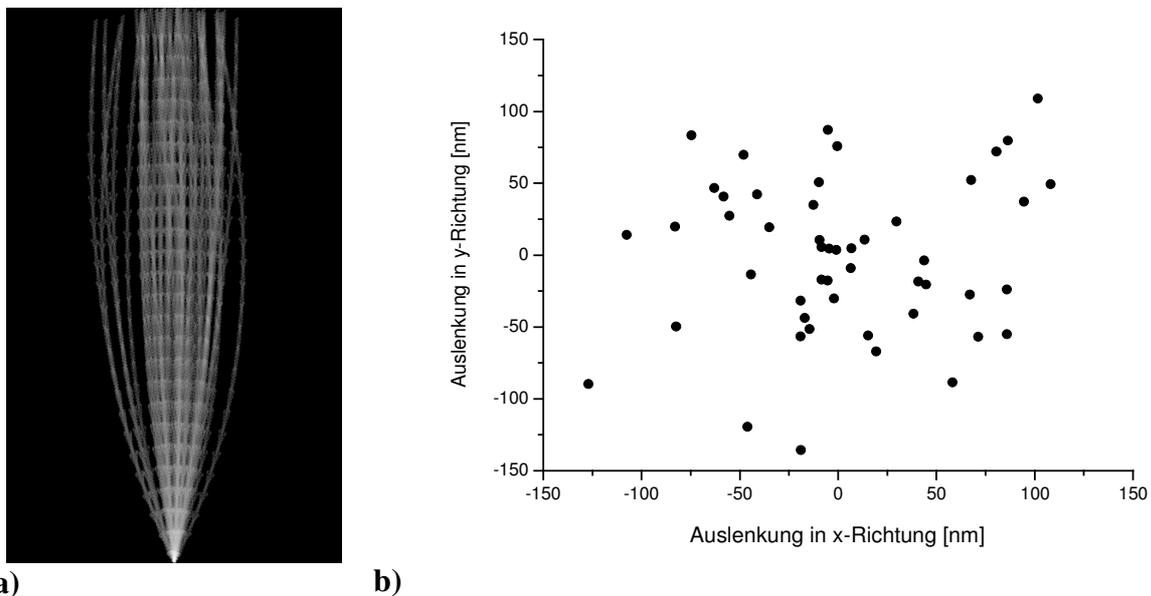


Abbildung 3.18: Mit dreidimensionalen Splinekurven simulierter Kurvenverlauf der Aktinfilamente

a) Projektion von 50 Aktinfilamenten mit zufällig unterschiedlicher Auslenkung. b) graphische Darstellung der verwendeten Kurvenpunkte an den Filamentenden auf der xy-Ebene. Die Standardabweichung der Abstände aller Kurvenpunkte vom Mittelpunkt (Koordinaten 0, 0) beträgt 39 nm. Die Anfangspunkte aller Filamente liegen im Mittelpunkt der xy-Ebene.

An dieser Stelle sei erwähnt, daß jeder Kurvenpunkt zwar durchlaufen werden muß, jedoch kann die Auslenkung eines Filaments im Bereich zwischen zwei Kurvenpunkten größer sein, als die eines der beiden Punkte. Demzufolge handelt es sich bei den in Abbildung 3.18 dargestellten Auslenkungen nicht um die Maximalauslenkungen der Kurvenverläufe. Diese können geringfügig stärker ausfallen, als die Maximalauslenkungen der Kurvenpunkte.

In Abbildung 3.19 ist das aus der Projektion aus Abbildung 3.18 berechnete Diffraktionsbild zu sehen.

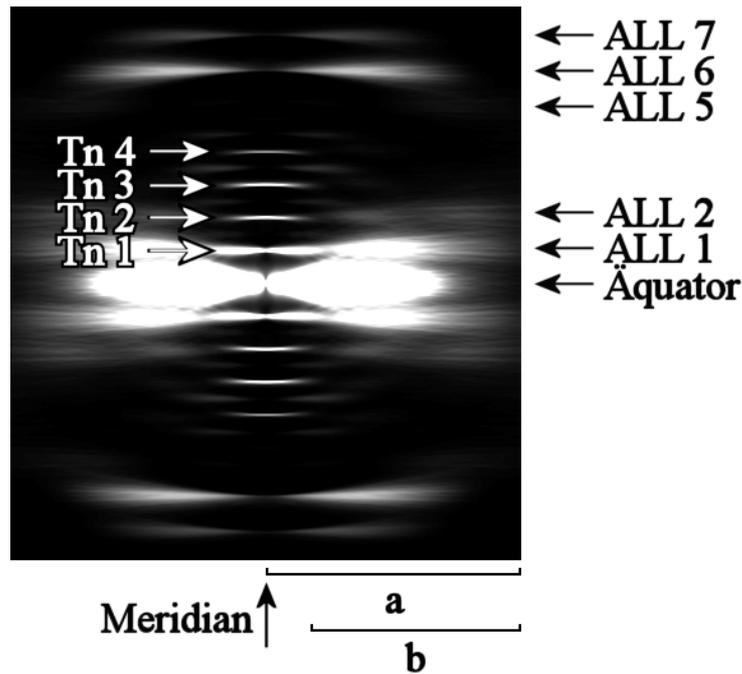


Abbildung 3.19: Diffractionsbild von 50 mit kurvigem Verlauf modellierten Aktinfilamenten

Gemittelte Intensitäten aus den Diffractionsbildern der 50 Projektionen aus Abbildung 3.18 in linearer Darstellung (Minimum: 0, Maximum: 300000). Jedes Filament wurde vorher einzeln auf 1024×1024 Pixel projiziert und die Intensität berechnet. Die mit a bzw. b gekennzeichneten Bereiche entsprechen denen aus Abbildung 3.1 (a: $0 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$, b: $0,038 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$).

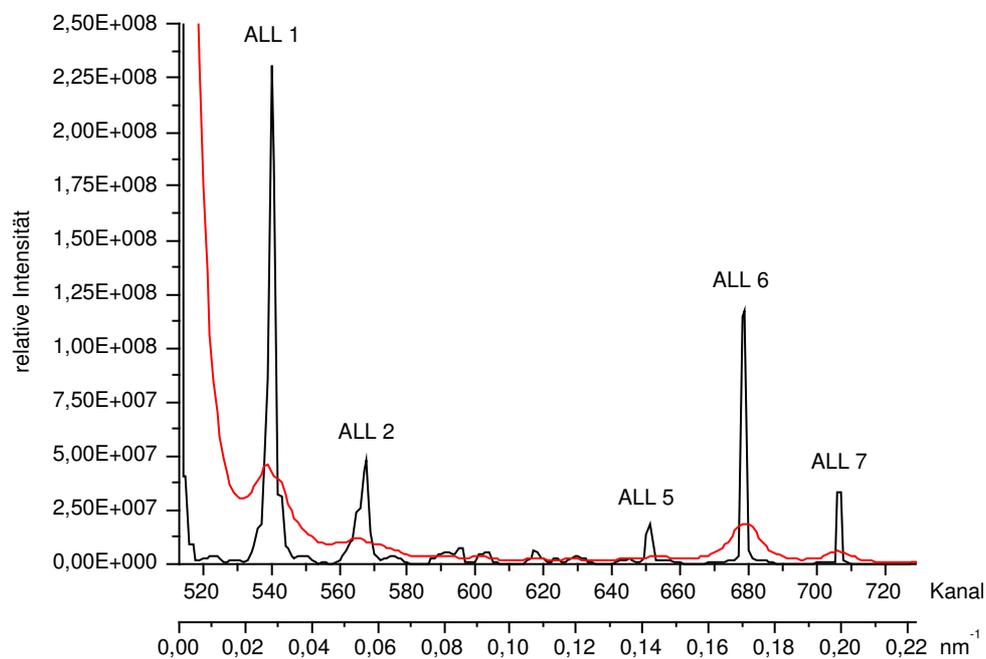


Abbildung 3.20: Vertikalschnitt über den extrameridionalen Bereich des modellierten Diffractionspatterns mit und ohne dreidimensionale Splinekurven

Schwarz: Vertikalschnitt über das modellierte Diffractionsbild eines einzigen Aktinfilaments ohne Verbiegung (Abbildung 3.10), rot: Vertikalschnitt über das Diffractionsbild, gemittelt aus den Intensitäten von 50 Einzelfilamenten, projiziert mit zufällig unterschiedlichem Verlauf der dreidimensionalen Splinekurven (Abbildung 3.18). Die Schnittbreite entspricht dem Bereich b aus den beiden Abbildungen.

Die Aktinschichtlinien verbreitern sich in ihrem Verlauf vom Meridian nach außen hin (Fanning). Da durch die Verbreiterung die Intensitätsmaxima der Schichtlinien gleichzeitig abnehmen, sind einige Aktinschichtlinien in dieser Darstellung nur noch schwach (ALL 5) oder gar nicht mehr sichtbar (ALL 3 und 4). Auch Tn 5 ist nicht mehr zu sehen (Vgl. Abbildung 3.10, ohne Kurvenverlauf der Filamente).

Die waagrecht „streifige“ Struktur der Aktinschichtlinien rührt daher, daß dem Bild nur 50 Aktinfilamente zugrunde liegen. Diese Zahl ist offensichtlich nicht ausreichend, um eine völlig gleichmäßige Verteilung der Intensitäten zu gewährleisten. Dies beeinflußt zwar die Darstellung des Patterns, ändert jedoch nichts wesentliches am Ergebnis.

Abbildung 3.20 zeigt die Intensitäten der Aktinschichtlinien des Diffraktionsbilds aus Abbildung 3.19 im Vertikalschnitt. Durch das Ineinanderlaufen der Intensitäten nebeneinander liegender Schichtlinien entsteht als interessanter Nebeneffekt etwas, das dem Hintergrund eines realen Diffraktionsbilds ähnelt. Nimmt man diesen von der Integration der Schichtlinienintensitäten aus, so liegen die Intensitäten von ALL 1 und 6 in einer ähnlichen Größenordnung.

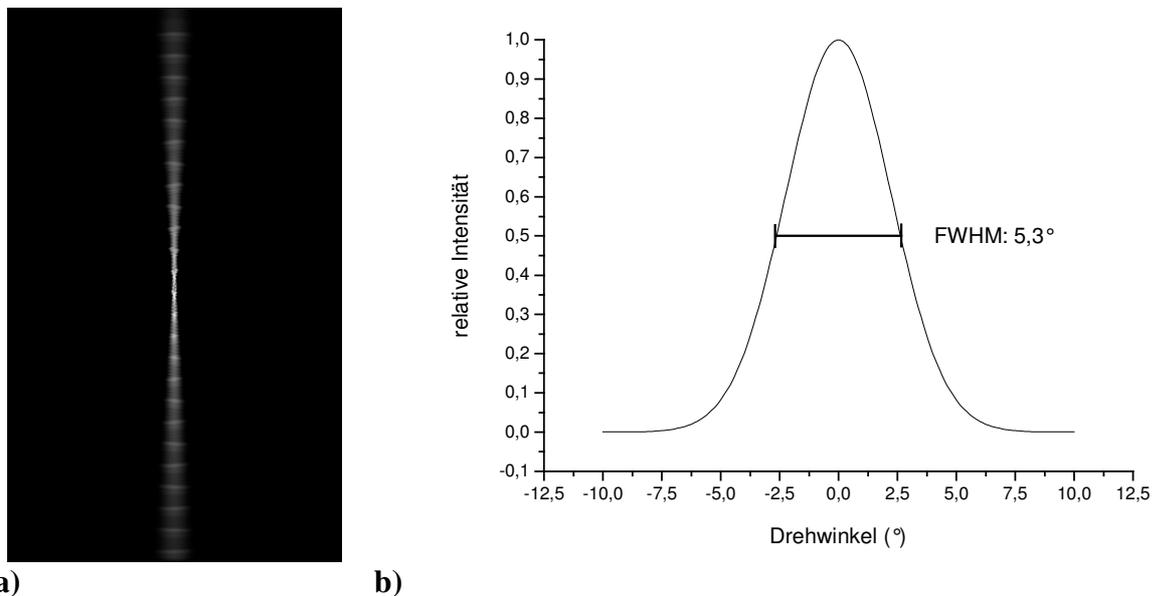


Abbildung 3.21: Durch Verkipfung simulierter nicht paralleler Verlauf der Fasern und Myofibrillen

a) Projektion eines verkippten Aktinfilaments, b) Gaußkurve, welche die Stärke der Intensität in Abhängigkeit vom verwendeten Dreh-, (Verkipf-)winkel angibt. Die Parameter zur Erzeugung der Gaußkurve wurden so gewählt, daß die Öffnung im Bereich von $\pm 5^\circ$ liegt. Daraus ergibt sich für die Breite auf halber Höhe (FWHM) ein Wert von $5,3^\circ$. Wie hier für die Projektion demonstriert, wurde zur Erstellung von Abbildung 3.22 das Intensitätsbild einer Projektion eines einzelnen Aktinfilaments mit einer Schrittweite von $0,1^\circ$ jeweils einmal um jeden Winkel zwischen $\pm 10^\circ$ gedreht und mit dem entsprechenden Funktionswert der Gaußkurve aus b) multipliziert. Anschließend wurden alle auf diese Weise gedrehten Einzelbilder aufsummiert und gemittelt.

Der nicht ganz parallele Verlauf der Myofibrillen bzw. Fasern nebeneinander kann durch eine Verkipfung des Intensitätsbilds simuliert werden (Vgl. Abschnitt 2.2.3.3). Anhand der Verläufe der Myofibrillen aus Abbildung 3.17 b und unter Berücksichtigung einer möglichen Schiefelage der montierten Fasern (Abbildung 3.17 d) wurde ein Wert von effektiv ca. $\pm 5^\circ$ für die Verkipfung angenommen. Abbildung 3.21 zeigt diesen Effekt zur Veranschaulichung anhand der Projektion eines Aktinfilaments.

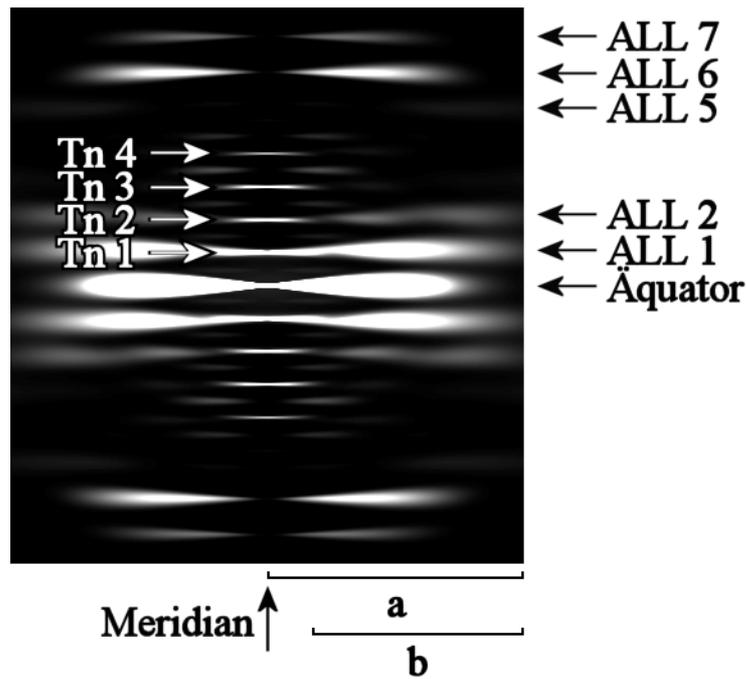


Abbildung 3.22: Diffractionsbild eines Aktinfilaments nach Verkippung um ca. $\pm 5^\circ$

Diffractionsbild eines projizierten Aktinfilaments ohne Disorder (Abbildung 3.10) nach Verkippung im Bereich zwischen ca. $\pm 5^\circ$ (FWHM der Gausskurve: $5,3^\circ$) in linearer Darstellung (Minimum: 0, Maximum: 300000). Die mit a bzw. b gekennzeichneten Bereiche entsprechen denen aus Abbildung 3.1 (a: $0 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$, b: $0,038 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$).

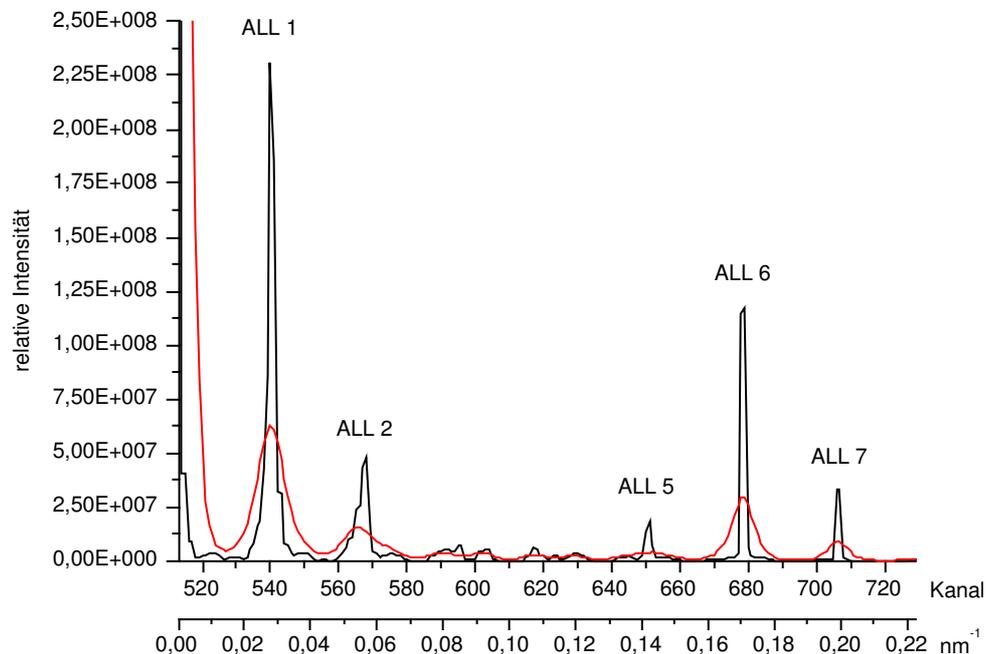


Abbildung 3.23: Vertikalschnitt über den extrameridionalen Bereich der modellierten Diffractionspattern mit und ohne Verkippung

Schwarz: Vertikalschnitt über das modellierte Diffractionsbild eines einzigen Aktinfilaments ohne Verkippung (Abbildung 3.10). Rot: Vertikalschnitt über das Diffractionsbild aus Abbildung 3.22 mit einer Verkippung um ca. $\pm 5^\circ$. Die Schnittbreiten entsprechen jeweils dem Bereich b aus den beiden Abbildungen.

Zur Erstellung der Diffraktionsbilder mit Verkippung wurden jedoch nicht die modellierten Projektionen, sondern direkt die Intensitätsbilder verkippt (s. Abschnitt 2.2.3.3).

Das Intensitätsbild ist in Abbildung 3.22 zu sehen. Der Fanningeffekt nach der Verkippung ist etwas schwächer, als bei der Darstellung der Intensitäten aus den Filamenten mit kurvigem Verlauf (Vgl. Abbildung 3.19). Die Schichtlinien liegen deutlich voneinander getrennt vor und der Äquator ist auf diesem Bild im Außenbereich erheblich schmaler. ALL 3 und 4 sind, wie Tn 5, nicht mehr sichtbar und ALL 5 ist nur noch schwach zu erkennen.

Die Intensitäten der Aktinschichtlinien des Diffraktionsbilds im Vertikalschnitt sind in Abbildung 3.23 dargestellt. Auch hier ist der Fanningeffekt gut zu erkennen. Die Verbreiterung der Schichtlinien ist allerdings so schwach, daß sie sich nur in geringem Maße überlappen, so daß nur wenig Hintergrund entsteht.

3.1.2.6 Ergebnisse des Modells mit Disorder

Durch das Einbringen von Disorder ins Modell ist es gelungen, auch das experimentell beobachtete „Fanning“ der Schichtlinien im Modell zu reproduzieren. Die Verbreiterung der Schichtlinien hat zur Folge, daß sich diese mit zunehmendem Abstand vom Meridian nach und nach überlagern und dadurch einen zunehmenden „Hintergrund“ produzieren.

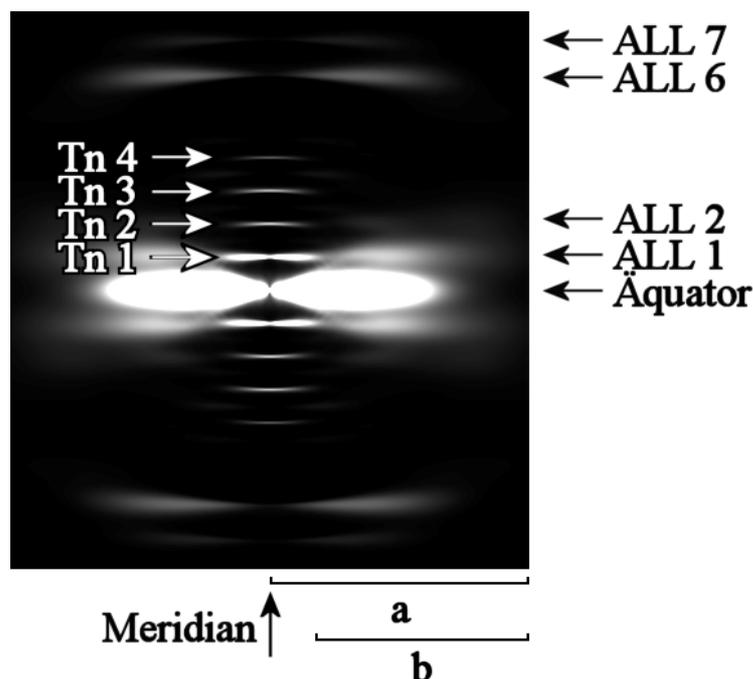


Abbildung 3.24: Diffraktionsbild von 50 Aktinfilamenten mit Disorder

Gemittelte Intensitäten aus den Diffraktionsbildern von 50 Projektionen mit den in den Abschnitten 3.1.2.3 bis 3.1.2.5 besprochenen Disordertypen variabler Aktin- und Tropomyosintwist, Verlauf entlang von dreidimensionalen Kurven und Verkippung in linearer Darstellung (Minimum: 0, Maximum: 500000). Jedes Filament wurde einzeln auf 1024×1024 Pixel projiziert und anschließend die Intensität berechnet. Erst nach der Aufsummierung und Mittelung aller Einzelbilder wurde die Verkippung durchgeführt. Die mit a bzw. b gekennzeichneten Bereiche entsprechen denen aus Abbildung 3.1 (a: $0 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$, b: $0,038 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$).

Abbildung 3.24 zeigt das modellierte Diffraktionsbild der gemittelten Intensitäten von 50 Aktinfilamenten mit allen in den Abschnitten 3.1.2.3 bis 3.1.2.5 beschriebenen Disordertypen

variabler Aktin- und Tropomyosintwist, sowie dem Verlauf entlang von dreidimensionalen Kurven und der Verkipfung. ALL 3 bis 5 sind im Hintergrund verschwunden, von den Troponinreflexen sind noch Tn 1 bis 4 sichtbar. Der Vergleich mit dem experimentell ermittelten Diffraktionsmuster aus Abbildung 3.1 zeigt eine gute Übereinstimmung mit dem modellierten Diffraktionsbild. Allerdings ist die Intensität von ALL 2 im Modell höher als im Experiment, zudem ist Tn 4 im Modell sichtbar, anders als es die experimentellen Daten zeigen. Die Intensitäten der Aktinschichtlinien des modellierten Diffraktionsbilds im Vertikalschnitt sind Abbildung 3.25 dargestellt.

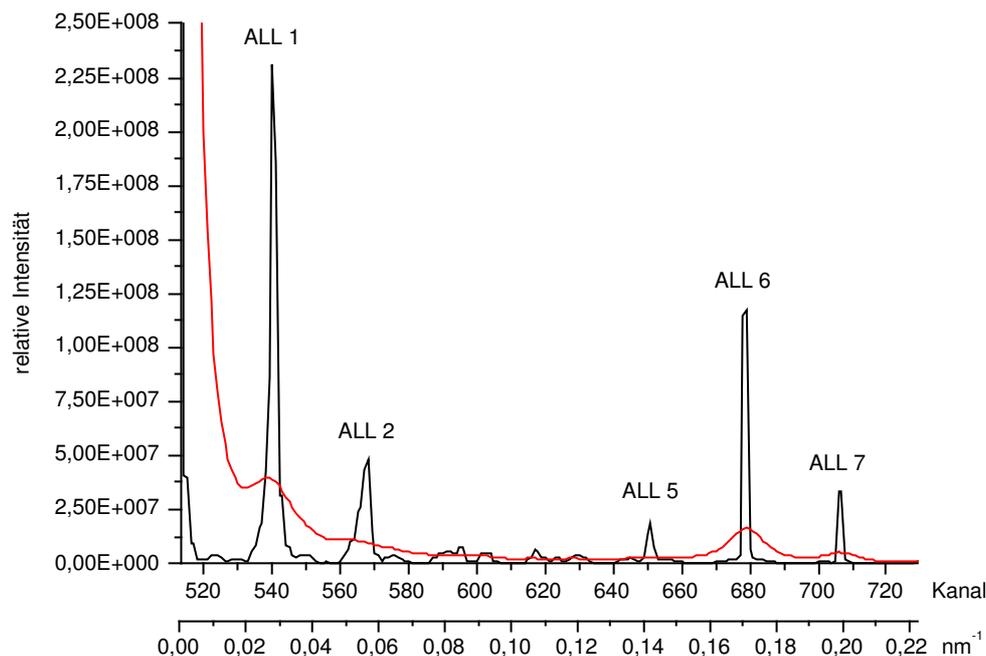


Abbildung 3.25: Vertikalschnitt über den extrameridionalen Bereich des modellierten Diffraktionspatterns mit und ohne Disorder

Schwarz: Vertikalschnitt über das modellierte Diffraktionsbild eines einzigen Aktinfilaments ohne Disorder (Abbildung 3.10). Rot: Vertikalschnitt über das Diffraktionsbild aus Abbildung 3.24. Die zugrunde liegenden Diffraktionsbilder wurden gemittelt aus den Intensitäten von 50 Einzelfilamenten, projiziert mit den in den Abschnitten 3.1.2.3 bis 3.1.2.5 besprochenen Disordertypen variabler Aktin- und Tropomyosintwist, Verlauf entlang von dreidimensionalen Kurven und Verkipfung. Die Schnittbreiten entsprechen dem Bereich b aus den beiden Abbildungen.

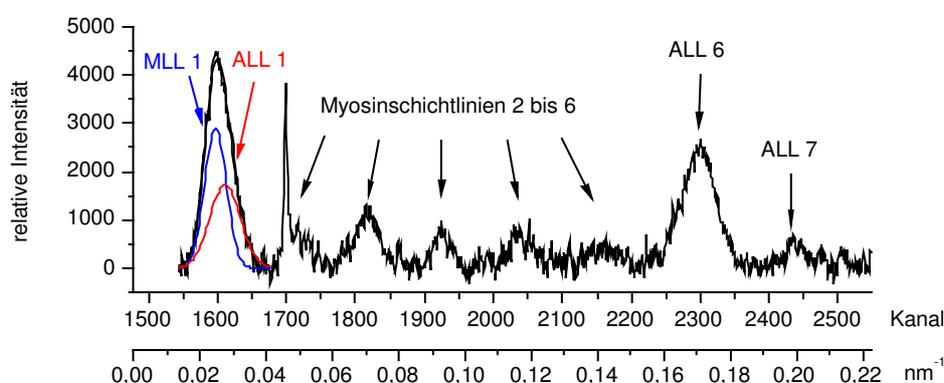
Hier ist zu erkennen, daß im Modell mit Disorder durch den entstandenen Hintergrund die Intensität des Schichtlinienpeaks von ALL 1 mit dem von ALL 6 vergleichbar ist. Der Vergleich des Modells mit den experimentellen Daten läßt sich besser durchführen, wenn der Hintergrundverlauf von den simulierten Schichtlinienintensitäten abgezogen wird (s. Abschnitt 3.1.3).

3.1.3 Vergleich von Experiment und Modell

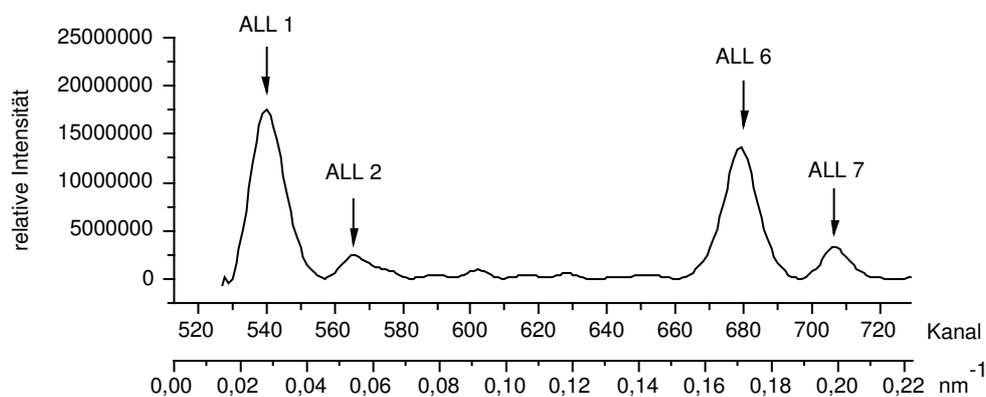
In diesem Kapitel soll ein direkter Vergleich des erstellten Modells mit den anfangs gezeigten experimentellen Daten erfolgen. Zur Analyse der Aktinschichtlinienintensitäten wurden die vertikalen Schnitte über die extrameridionale Region der Diffraktionsbilder aus Experiment

und Modell herangezogen. Da es bei der Analyse von Schichtlinienintensitäten in experimentell registrierten Diffraktionsbildern üblich ist, den Hintergrund zu subtrahieren, wurde dies bei beiden Schnitten durchgeführt. Dabei setzt sich der Hintergrund im experimentell ermittelten Diffraktionsbild aus dem Maschinenhintergrund und dem Hintergrund der Muskelfasern, der sich aus diffuser Streuung und Überlappung von benachbarten Reflexen und Schichtlinien ergibt, zusammen (Vgl. Abschnitt 3.1.1). Hingegen entsteht der Bereich, der im modellierten Diffraktionsbild als Hintergrund abgezogen wurde, durch die Überlappung der Schichtlinien, welche sich durch das ins Modell eingeführte Disorder mit zunehmendem Abstand vom Meridian verbreitern und ineinander laufen (Vgl. Abschnitt 3.1.2.6).

In Abbildung 3.26 sind die vertikalen Schnitte über die extrameridionale Region der Diffraktionsbilder von Experiment und Modell nach Subtraktion des jeweils im Bild vorhandenen Hintergrunds dargestellt.



a)



b)

Abbildung 3.26: Vertikalschnitte über den extrameridionalen Bereich der Diffraktionsbilder von Experiment und Modell

a) Vertikalschnitt über das Röntgendiffraktionsbild unter Relaxationsbedingungen aus Abbildung 3.3, nach Abzug des gesamten Hintergrunds, entsprechend Abbildung 3.5. Rot: gefitteter ALL 1-Anteil der ersten Aktomyosinschichtlinie, blau: MLL 1-Anteil. Der Gesamtpack ist in schwarz mit dem Schnitt überlagert (deutlicher zu sehen in Abbildung 3.5). b) Vertikalschnitt über das modellierte Diffraktionsbild mit Disorder, entsprechend der roten Linie aus Abbildung 3.25, aber nach Abzug des gesamten Hintergrunds, wie für die experimentellen Daten in Abschnitt 3.1.1 gezeigt. Die Bereiche auf den x-Achsen entsprechen einander, die y-Achsenabschnitte wurden per Augenschein anhand der Peaks auf eine ähnliche Höhe gebracht, um eine gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Die Abbildung zeigt, daß die modellierten Schichtlinienintensitäten von ALL 6 und 7 sehr gut zu denen des Experiments passen. Form und Breite der Peaks zeigen eine gute Übereinstimmung. Anders ist dies beim Vergleich der Peaks von ALL 1. Relativ zu denen von ALL 6 und 7 ist der Peak von ALL 1 im Modell deutlich zu hoch. ALL 2 kann in dieser Darstellung nicht verglichen werden, da auf dem experimentell ermittelten Diffraktionsbild im Bereich zwischen ALL 1 und 6 die Myosinschichtlinien liegen. Die zweite Aktinschichtlinie ist aufgrund ihrer schwachen Intensität davon nicht zu trennen. Dennoch scheint die Intensität von ALL 2 im Modell höher zu sein, als im Experiment registriert wurde, da die Schichtlinie auf dem registrierten Diffraktionsbild nicht zu erkennen ist (s. Abbildung 3.1), wohl aber auf dem modellierten (s. Abbildung 3.24).

Abbildung 3.26 macht deutlich, daß die verwendeten Disorderparameter nicht dazu ausreichen, die erste Aktinschichtlinie so stark zu verbreitern, daß ihre Intensität nach Abzug des Hintergrunds unter der von ALL 6 liegt. Die Verstärkung des Fanningeffekts, am einfachsten durch eine größere Verkippung des Intensitätsbildes zu erreichen, führt zu einem größeren Anstieg des Hintergrunds im Modell. Da der Hintergrund im Bereich von ALL 1 dabei stärker ansteigt als im Bereich von ALL 6, wird durch den Abzug des Hintergrunds eine weitere Intensitätsabnahme von ALL 1 relativ zu ALL 6 erreicht. In Abbildung 3.27 ist dies anhand des Vertikalschnitts über ein modelliertes Diffraktionsbild mit einer stärkeren Verkippung nach Abzug des Hintergrunds demonstriert.

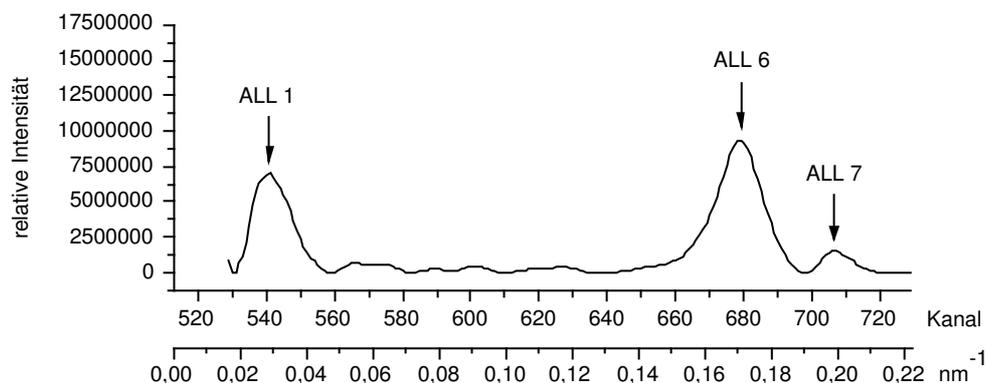


Abbildung 3.27: Vertikalschnitt über den extrameridionalen Bereich eines modellierten Diffraktionsbilds mit stärkerer Verkippung

Die zugrunde liegenden Diffraktionsbilder wurden gemittelt aus den Intensitäten von 50 Einzelfilamenten, projiziert mit den in den Abschnitten 3.1.2.3 bis 3.1.2.5 besprochenen Disordertypen variabler Aktin- und Tropomyosinverlauf entlang von dreidimensionalen Kurven und Verkippung. Die Verkippung wurde anhand einer Gaußkurve mit einem FWHM von $10,5^\circ$ durchgeführt (Vgl. Abbildung 3.21 b). Alle anderen Disorderparameter entsprechen denen, die Abbildung 3.26 b zugrunde liegen, ebenso die Schnittbreite.

Durch die stärkere Verkippung wird wie erwartet der Hintergrund so stark erhöht, daß nach seiner Subtraktion die Intensitäten von ALL 1 und 2 relativ zu denen von ALL 6 und 7 stärker abgenommen haben. Dadurch entsprechen die Intensitätsverhältnisse der Aktinschichtlinien in der Simulation praktisch denen des real aufgenommenen Röntgendiffraktionsbilds (Vgl. Abbildung 3.26 a). Dort liegt die Intensität von ALL 1 unter der von ALL 6 und ALL 2 ist auf dem zugehörigen Diffraktionsmuster nicht sichtbar (s. Abbildung 3.1).

Mit dem durch die stärkere Verkipfung erzielten Fanningeffekt ist es möglich, das Intensitätsverhältnis von ALL 1, 2, 6 und 7 zu modellieren (FWHM der Gausskurve von $10,5^\circ$). Ein Blick auf das zugehörige Diffraktionsbild zeigt jedoch, daß dadurch ein im Vergleich mit dem registrierten Diffraktionspattern zu starker Fanningeffekt hervorgerufen wird (s. Abbildung 3.28, Vgl. Abbildung 3.1).

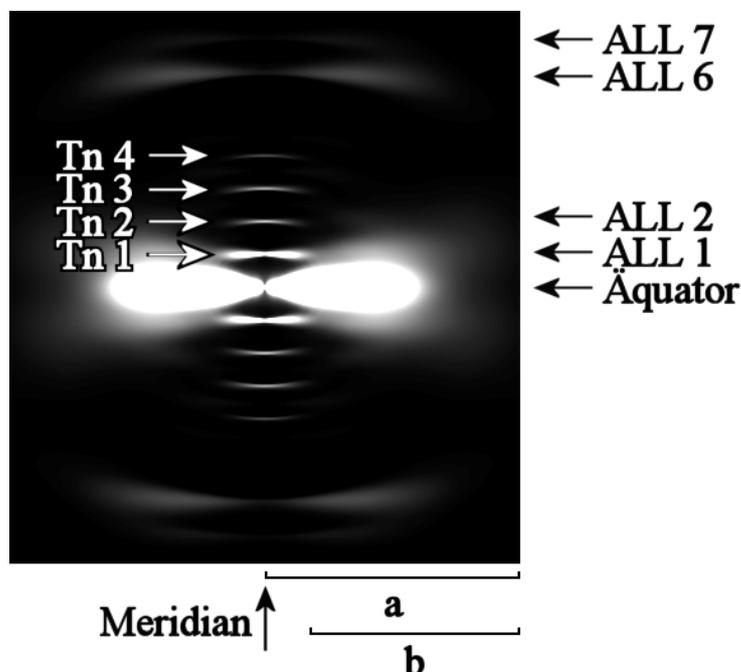
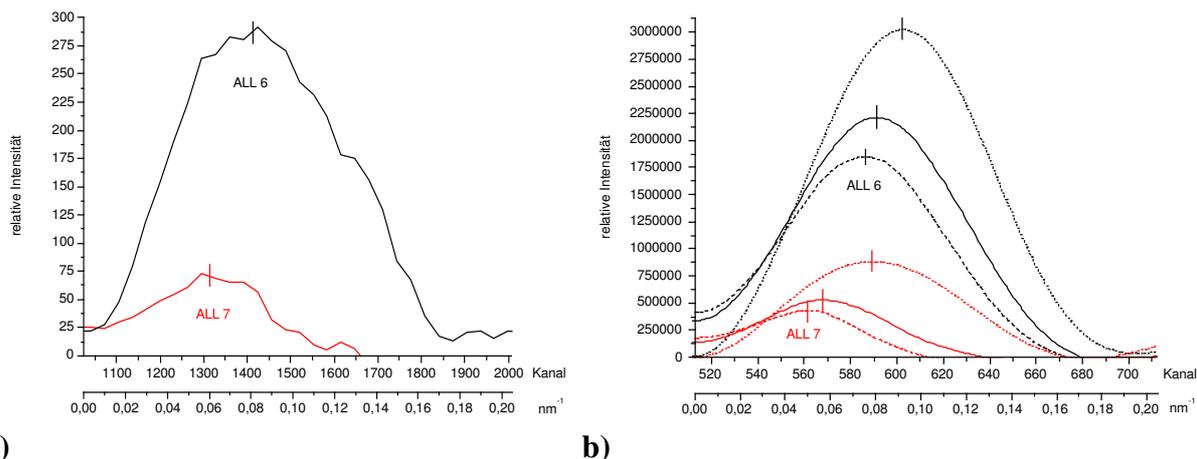


Abbildung 3.28: Diffraktionsbild von 50 Aktinfilamenten mit Disorder (starke Verkipfung)

Gemittelte Intensitäten aus den Diffraktionsbildern von 50 Projektionen mit den in den Abschnitten 3.1.2.3 bis 3.1.2.5 besprochenen Disordertypen variabler Aktin- und Tropomyosintwist, Verlauf entlang von dreidimensionalen Kurven und Verkipfung in linearer Darstellung (Minimum: 0, Maximum: 500000). Jedes Filament wurde einzeln auf 1024×1024 Pixel projiziert und anschließend die Intensität berechnet. Erst nach der Aufsummierung und Mittelung aller Einzelbilder wurde die Verkipfung durchgeführt (FWHM: $10,5^\circ$). Die mit a bzw. b gekennzeichneten Bereiche entsprechen denen aus Abbildung 3.1 (a: $0 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$, b: $0,038 - 0,205 \text{ nm}^{-1}$).

In der Abbildung ist der mit steigendem Abstand vom Meridian deutlich breiter werdende Verlauf der Aktinschichtlinien zu sehen. Besonders gut zeigt dies ALL 6. Der Äquator und ALL 1 und 2 überlappen sehr stark miteinander. Außerdem nimmt der Äquator eine zum Bildrand stark abgerundete Form an und die Troponinreflexe, von denen Tn 1 bis 4 sichtbar sind, erhalten einen stark gebogenen Verlauf. Dies ist im experimentell ermittelten Pattern nicht zu sehen (Vgl. Abbildung 3.1).

Der Vergleich der horizontalen Peakpositionen von ALL 6 und 7 in Experiment und Modell zeigt, daß durch die stärkere Verkipfung gleichzeitig die Peakpositionen negativ beeinflusst werden. In Abbildung 3.29 sind die Horizontalschnitte des Experiments im Vergleich mit dem Modell mit den beiden unterschiedlich starken Verkipfungen zu sehen. Zur Orientierung sind die Peaks des Modells ohne Disorder mit angegeben.



a)

b)

Abbildung 3.29: Horizontaler Verlauf von ALL 6 und 7 in Experiment und Modell

a) Experiment (entspricht Abbildung 3.6), b) Modell, zur Erzeugung der horizontalen Schnitte wurde das gleiche Verfahren eingesetzt, wie bei den experimentellen Daten (Vgl. Abschnitt 2.1.4). Durchgezogene Linien: Integrierte Intensitäten des Modells mit Disorder wie unter Abschnitt 3.1.2.6 beschrieben, gestrichelte Linien: ebenso, wobei die stärkere Verkippung (FWHM der Gausskurve: $10,5^\circ$) verwendet wurde. Gepunktete Linien: Modell ohne Disorder. Schnittbreiten: a) ALL 6: Kanäle 2238 - 2364, ALL 7: Kanäle 2383 - 2467, Vgl. Abbildung 3.26 a. b) ALL 6: Kanäle 661 - 696, ALL 7: Kanäle 698 - 721, Vgl. Abbildung 3.26 b bzw. Abbildung 3.27. Die ungefähren Positionen der Maxima sind jeweils durch einen senkrechten Strich angedeutet.

Während im Modell ohne Disorder die Peakpositionen von ALL 6 und 7 viel zu weit vom Meridian entfernt liegen (Abbildung 3.29 b, gepunktete Linien), wird durch die schwächere Verkippung (Abbildung 3.29 b, durchgezogene Linien) eine gute Übereinstimmung mit den Positionen im Experiment erreicht (Abbildung 3.29 a). Die stärkere Verkippung führt durch den steigenden Hintergrund nicht nur dazu, daß die integrierte Intensität der Schichtlinien abnimmt. Aufgrund des dadurch eingeführten, zu starken Fanningeffekts (s. Abbildung 3.28), verlagern sich auch die Maxima der Peaks noch weiter in Richtung Meridian (Abbildung 3.29 b, gestrichelte Linien). Dies geschieht, da der Bereich, über den sich die Intensitäten verteilen, mit zunehmender Verkippung größer wird. Dadurch nimmt bei stärkerer Verkippung die Intensitätsverteilung mit steigender Entfernung vom Meridian stärker ab, die Maxima der Schichtlinien liegen näher am Meridian.

Zum abschließenden Vergleich des Modells mit den experimentell unter Relaxationsbedingungen ermittelten Daten sind die integrierten Intensitäten der Aktinschichtlinien eins, sechs und sieben, sowie die Peakpositionen in Tabelle 3.3 zusammengefaßt dargestellt. Die Ergebnisse des Modells sind aufgrund der beiden unterschiedlich starken Verkippungen, die verwendet wurden, in zwei Spalten aufgeführt. Anhand der Werte in der Tabelle wird deutlich, daß die simulierten Schichtlinienintensitäten des Modells mit der stärkeren Verkippung die experimentellen Daten sehr gut wiedergeben. Anders sieht dies beim Vergleich der Peakpositionen aus. Hier schneidet das Modell mit der schwächeren Verkippung besser ab. Dies zeigt auch der Vergleich des registrierten Diffraktionsbildes mit den beiden modellierten Pattern mit unterschiedlich starker Verkippung (Vgl. Abbildung 3.1 mit Abbildung 3.24 und Abbildung 3.28).

Aktinschichtlinie, ALL	Experiment	Modell mit Disorder, Verkippung (FWHM): 5,3°	Modell mit Disorder, Verkippung (FWHM): 10,5°
relative Schichtlinienintensität im ganzen Quadranten (Region a)			
6	100, 100*	100, 100*	100, 100*
7	10, 17*	18, 19*	15, 16*
relative Schichtlinienintensität im extrameridionalen Bereich (Region b)			
1	52	94	48
6	84	78	84
7	8	15	8
Peakposition (nm⁻¹)			
1	0,10**	0,09***	0,09***
6	0,08	0,08	0,075
7	0,06	0,055	0,05

Tabelle 3.3: Relative Intensitäten der Aktinschichtlinien und Peakpositionen aus Experiment und Modell im Vergleich

Dem Modell liegen die in den Abschnitten 3.1.2.3 bis 3.1.2.5 besprochenen Disordertypen zugrunde. Unterschieden wird nur die Stärke der verwendeten Verkippung. Die Intensität von ALL 1 wurde jeweils nur für den extrameridionalen Bereich bestimmt. Zum besseren Vergleich der Intensitäten untereinander wurde die Schichtlinienintensität von ALL 6 gleich 100 gesetzt. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Intensitätswerte mit Hilfe der Vertikalschnitte über Region a bzw. b ermittelt. * Wert aus dem Horizontalschnitt. ** Wert übernommen aus Kraft *et al.* (2002), $\mu = 80$ mM. *** Wert ermittelt mit Hilfe eines Horizontalschnitts über einen Kanal (540) in der Mitte von ALL 1.

Der Fanningeffekt wird durch die schwache Verkippung im Modell weitaus besser simuliert. Daraus folgt, daß die stärkere Verkippung keine ideale Lösung bietet, um die Schichtlinienintensitäten des Modells denen des Experiments anzugleichen. Die Verstärkung des Effekts eines der anderen in dieser Arbeit gezeigten Disordertypen brachte in bisherigen Untersuchungen ebenfalls keine Verbesserung. Daher ist anzunehmen, daß es noch weitere Faktoren gibt, welche die Schichtlinienintensitäten und Peakpositionen in anderer Weise beeinflussen als das bei den hier gezeigten Disordertypen der Fall ist (s. Abschnitt 4.3).

Obwohl keine vollständige Übereinstimmung des Modells mit den experimentellen Daten erzielt wurde, ist es möglich, relative Änderungen der Schichtlinienintensitäten zu simulieren. Dies wird in den folgenden Abschnitten gezeigt.

3.2 Änderungen der Intensitäten auf den Aktinschichtlinien in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration

Ein vollständiges Aktinfilament mit regulatorischen Eigenschaften zeigt, anders als das unregulierte, in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration des umgebenden Mediums, unterschiedliche Intensitäten auf den Diffraktionsbildern (Huxley, H. E., 1971, Huxley, H. E., 1972, Kress *et al.*, 1986, Yagi und Matsubara, 1989). Dafür verantwortlich ist in erster Linie eine Positionsänderung von Tropomyosin (Haselgrove, 1972, Huxley, H. E., 1972, Parry und Squire, 1973), welche auf eine Konformationsänderung von Troponin bei der Bindung von Calcium zurückzuführen ist (Hitchcock *et al.*, 1973, Potter und Gergely, 1974, Hitchcock, 1975, Ohtsuki und Shiraishi, 2002). Aufgrund der Sensitivität der Diffraktionsbilder des regulierten Aktinfilaments auf unterschiedliche Calciumkonzentrationen, können die zugrunde liegenden Strukturänderungen anhand von Positions- und Konformationsänderungen im Modell simuliert werden.

Um sicherzugehen, daß auch bei hoher Calciumkonzentration keine angehefteten S1-Köpfe die Intensitäten der Aktinschichtlinien verfälschen, wurden Daten herangezogen, welche bei langer Sarkomerenlänge, also ohne Überlappung von Aktin- und Myosinfilamenten (Out of Overlap), aufgenommen wurden.

3.2.1 Experimentelle Ergebnisse

Für die Versuche wurden die Diffraktionsbilder von sieben Einzelfaserarrays registriert, jeweils bei niedriger ($pCa\ 8$) und bei hoher Calciumkonzentration ($pCa\ 4,5$) mit langer Sarkomerenlänge. In Abbildung 3.30 sind die Ausschnitte der gemittelten Röntgendiffraktionsbilder mit unterschiedlichem Kontrast dargestellt. Unter diesen Versuchsbedingungen ist bei hoher Calciumkonzentration und hohem Kontrast neben der ersten und sechsten auch die zweite Aktinschichtlinie im äußeren Bereich schwach zu erkennen (unterer rechter Quadrant). Die Änderungen der Aktinschichtlinien eins, zwei und sechs in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration sind jedoch insgesamt so schwach, daß sie auf diesem Bild kaum sichtbar sind. Die siebte Aktinschichtlinie liegt außerhalb des Detektorbereichs, ist aber von der Calciumkonzentration unabhängig (Yagi und Matsubara, 1989). Die Troponinreflexe eins bis drei sind, wenn auch teilweise schwach, unter beiden Bedingungen zu erkennen.

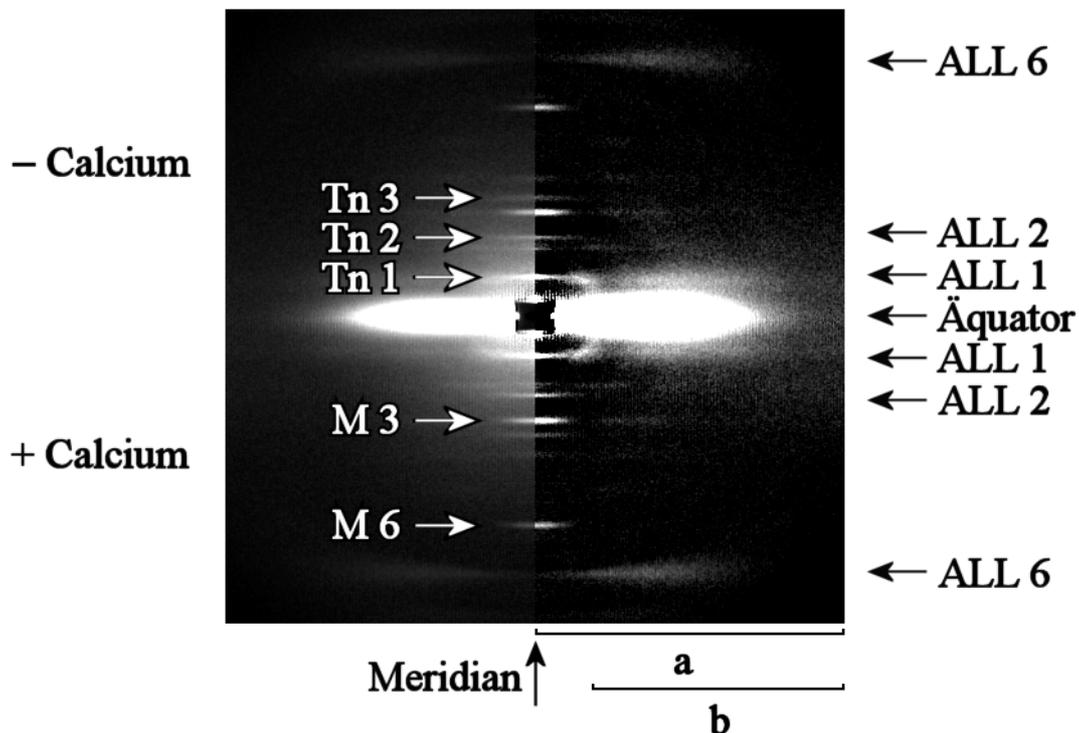


Abbildung 3.30: Röntgendiffraktionsbild, aufgenommen von einem Bündel aus Einzelmuskelfasern mit langer Sarkomerenlänge, bei niedriger bzw. hoher Calciumkonzentration

Die Aufnahmen wurden am SRS in Daresbury registriert. Jeweils sieben Bilder für die niedrige und hohe Calciumkonzentration wurden gemittelt. Die obere Bildhälfte zeigt das normierte, zentrierte und über vier Quadranten gefaltete Pattern in linearer Darstellung. Es wurde bei einer niedrigen Calciumkonzentration registriert (pCa 8). Die untere Bildhälfte ist entsprechend, wurde aber bei hoher Calciumkonzentration (pCa 4,5) aufgenommen. In der linken Bildhälfte wurde nur der Maschinenhintergrund abgezogen (Minimum: 0, Maximum: 0,002), auf der rechten Seite wurde zusätzlich der verbliebene Hintergrundverlauf anhand der Minimalwerte für jeden Radius ermittelt und subtrahiert (Vgl. Abbildung 2.1; Minimum: 0, Maximum: 0,0005). So sind die schwachen Aktinschichtlinien besser zu erkennen. Die Position der Myosinreflexe M 3 und M 6 ist zur Orientierung mit Pfeilen markiert. a und b geben die Breite der Bereiche an, über die vertikale Schnitte gemacht wurden (a: 0 - 0,205 nm⁻¹, b: 0,038 - 0,205 nm⁻¹, entsprechend Abbildung 3.1).

3.2.2 Erweiterung des Modells mit dem on-Zustand

In Abschnitt 3.1.2 wurde beschrieben, wie das Modell zur Simulation der Aktinschichtlinien unter relaxierenden Bedingungen erstellt wurde. Das Aktinfilament befindet sich unter diesen Bedingungen bei einer niedrigen Calciumkonzentration im sogenannten off-Zustand („blocked“, McKillop und Geeves, 1993, Lehrer und Geeves, 1998 oder „B-state“, Lehman *et al.*, 2000). Als on-Zustand („closed“, McKillop und Geeves, 1993, Lehrer und Geeves, 1998 oder „C-state“, Lehman *et al.*, 2000) wird die strukturelle Anordnung der Proteine im Aktinfilament bei hoher Calciumkonzentration bezeichnet. Zur Simulation des on-Zustands wurde die azimuthale Position des Tropomyosins verändert, wobei das Troponin entsprechend mitgedreht wurde. Zusätzlich wurde die azimuthale Position des Troponins relativ zum Tropomyosin leicht modifiziert, ebenso wie die Ausrichtung der Kopfdomäne des Troponins am Aktinfilament (s. Abschnitt 2.2.2, Vgl. Narita *et al.*, 2001).

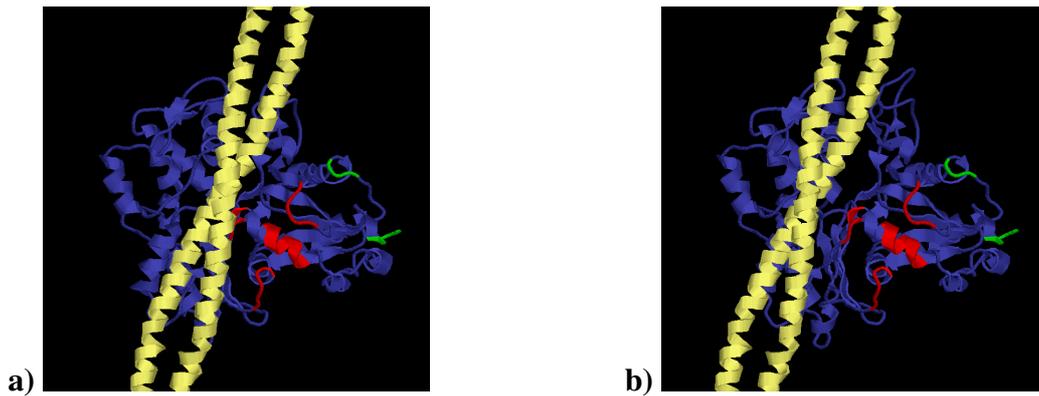


Abbildung 3.31: Azimutale Tropomyosinposition bei off- und on-Zustand im Modell

Gelb: Tropomyosindoppelstrang, blau: Aktinmonomer, die starken und schwachen Bindestellen für den Myosinkopf sind rot bzw. grün markiert (Vgl. Rayment *et al.*, 1993a, Vibert *et al.*, 1997). a) Tropomyosin in der off-Position ($+10^\circ$), b) Tropomyosin in der on-Position, sie entspricht der Position, die von Lorenz *et al.*, 1995 für das unregulierte Filament angenommen wurde (0°). Die Winkeländerung von Tropomyosin zwischen den beiden Bildern beträgt 10° . Die Abbildungen wurden erzeugt mit dem Programm RASMOL (Sayle und Milner-White, 1995).

In Abbildung 3.31 ist zunächst die azimutale Position von Tropomyosin in den beiden Zuständen am Aktin graphisch dargestellt.

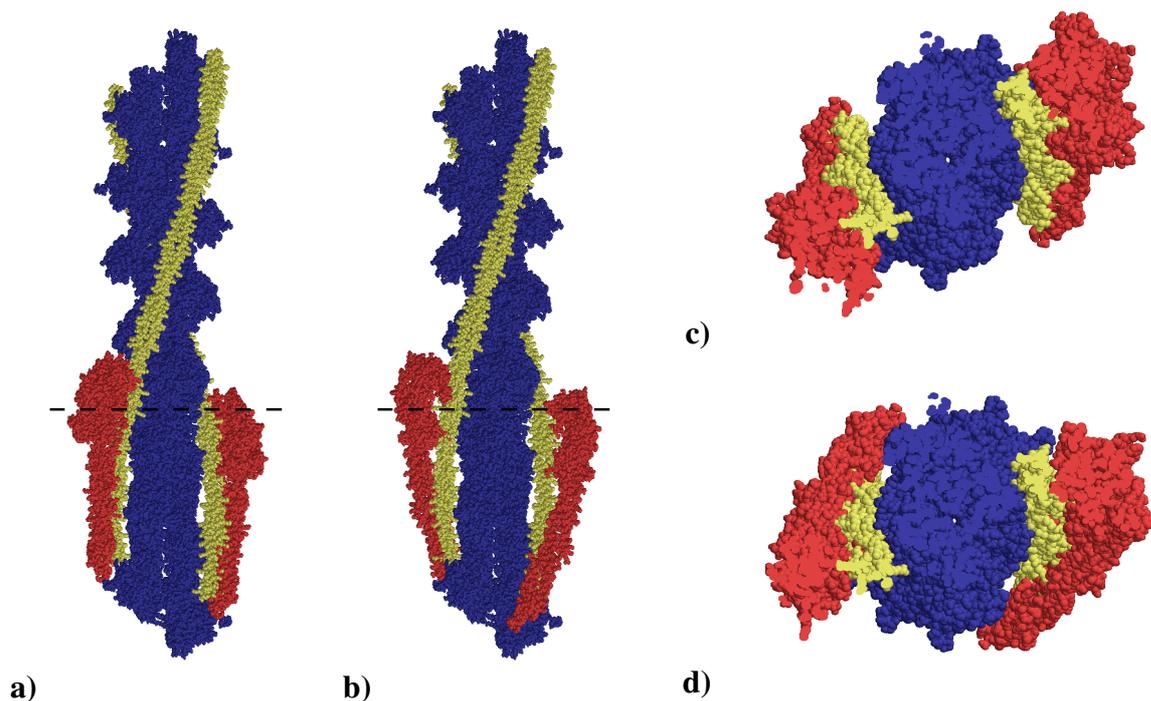


Abbildung 3.32: Modellierte azimutale Position von Tropomyosin und Troponin im off- und on-Zustand

a) Aktinfilament im off-Zustand, b) im on-Zustand. Es sind jeweils 16 Aktinmonomere dargestellt (blau). Die oberen Filamentenden zeigen zur Z-Scheibe, die unteren zur M-Linie. Gelb: Tropomyosindoppelstränge, rot: Troponinmoleküle. c) und d) Querschnitte durch die Filamente aus a) bzw. b). Der Blick fällt jeweils auf die Schnittstelle, wobei nur der untere Teil des Filaments sichtbar ist. Die Schnittstellen sind durch die gestrichelten Linien in a) bzw. b) markiert. Die Abbildungen wurden mit dem Programm RASMOL erzeugt (Sayle und Milner-White, 1995).

Zur Simulation des on-Zustands wurde die Position des Tropomyosins verwendet, welche der von Lorenz *et al.* (1995) am unregulierten Filament, also ohne Troponin, entspricht (0° , Vgl. Abschnitt 3.1.2.1, Abbildung 3.8 a). In der off-Position ($+10^\circ$, Vgl. Abschnitt 3.1.2.1, Abbildung 3.8 a) liegt das Tropomyosin somit um 10° näher an den Myosinbindestellen als in der on-Position. Diese relativ kleine Winkeländerung wurde durch die zusätzliche Positionsänderung des Troponins ermöglicht (Vgl. Narita *et al.*, 2001). Die Gesamtmasse des Tropomyosin-Troponin-Komplexes im on-Zustand liegt damit weiter von den Myosinbindestellen entfernt, als die Masse von Tropomyosin allein. So konnte zur Simulation der beobachteten Intensitätsänderungen die Positionsänderung von Tropomyosin kleiner ausfallen, als dies ohne zusätzliche Positionsänderung des Troponinmoleküls relativ zum Tropomyosin der Fall gewesen wäre. Abbildung 3.32 gibt Auskunft über die Lage von Tropomyosin und Troponin am Aktinfilament in off- und on-Zustand (Vgl. Abbildung 2.5).

In der Abbildung ist deutlich zu sehen, wie das Troponin beim Übergang von der off- in die on-Position seine Lage relativ zum Tropomyosin verändert. Die Rotation von Tropomyosin um das Aktinfilament herum fällt vergleichsweise klein aus.

3.2.3 Vergleich von Experiment und Modell

Zum Vergleich der experimentellen Ergebnisse der Röntgendiffraktion bei niedriger und hoher Calciumkonzentration Out of Overlap mit dem Modell sind in Abbildung 3.33 die Diffraktionsbilder von Experiment und Simulation gegenüber gestellt. Zur Simulation des on-Zustands wurden die veränderten Positionen von Tropomyosin und Troponin verwendet (Vgl. Abschnitt 3.2.2). Die Parameter des verwendeten Disorders entsprechen denen des off-Zustands, beschrieben in den Abschnitten 3.1.2.3 bis 3.1.2.5.

Die Veränderungen auf den Aktinschichtlinien beim Übergang von niedriger zu hoher Calciumkonzentration sind relativ schwach, aber im Modell etwas besser zu erkennen, als auf den experimentell ermittelten Diffraktionspattern. ALL 1 zeigt im Innenbereich einen Intensitätsabfall, ALL 2 und ALL 6 steigen im Außen- bzw. Innenbereich leicht an. Bei Betrachtung der Troponinreflexe fällt auf, daß im Experiment bei niedriger und hoher Calciumkonzentration nur Tn 1 bis 3 zu sehen sind, während im Modell auch Tn 4 deutlich hervortritt. Insgesamt erscheinen die Intensitäten der Troponinreflexe, besonders bei der niedrigen Calciumkonzentration, im Experiment niedriger als in der Simulation. Aufgrund der Anwesenheit von Myosin während der Aufnahme der Röntgendiffraktionsbilder zeigen die experimentellen Daten auch die Meridionalreflexe M 3 und M 6. Da im Modell kein Myosin verwendet wurde, sind sie im simulierten Bild nicht vorhanden. Obwohl der Äquator aufgrund des fehlenden Myosins im Modell nicht direkt mit den experimentellen Werten vergleichbar ist, stimmt seine Form in der Simulation mit der im Experiment gut überein. Wegen der hohen Intensität des Äquators ist das Fehlen von Reflexen in diesem Bereich bei dem in der Abbildung gewählten Kontrast nicht zu erkennen.

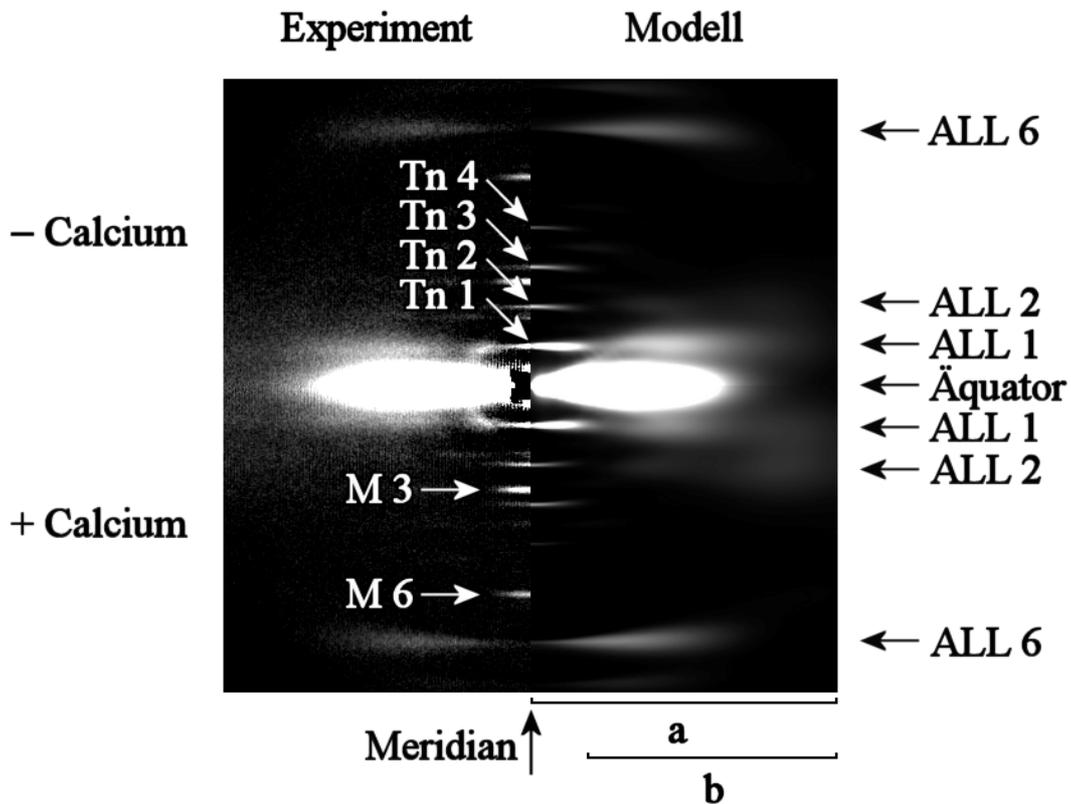


Abbildung 3.33: Diffractionsbild von Experiment und Modell bei niedriger und hoher Calciumkonzentration im Vergleich

Linke Bildhälfte: experimentelle Daten (entsprechend der rechten Bildhälfte aus Abbildung 3.30), rechte Bildhälfte: modelliertes Diffractionsbild. Der obere rechte Quadrant entspricht Abbildung 3.24, der untere rechte wurde ebenso modelliert, wobei sich Tropomyosin und Troponin in der on-Position befanden. Obere Bildhälfte: niedrige Calciumkonzentration, (off-Zustand der Aktinfilamente), untere Bildhälfte: hohe Calciumkonzentration (on-Zustand).

Um die Änderungen auf den Aktinschichtlinien zwischen experimentell ermittelten Daten und Simulation vergleichen zu können, wurden jeweils Vertikalschnitte über die Pattern mit niedriger und hoher Calciumkonzentration bzw. deren Simulation gemacht. Wie in Abschnitt 3.1.1 wurde dabei aufgrund der Überlagerung der ersten Aktomyosinschichtlinie durch Tn 1 nur der extrameridionale Bereich berücksichtigt. In Abbildung 3.34 sind die resultierenden Intensitätsverläufe nach Abzug der Hintergründe (Vgl. Abschnitt 3.1.3) dargestellt.

Beim Vergleich der Intensitäten von Experiment und Modell liegt ALL 1 im Verhältnis zu ALL 6 im Modell sehr viel höher als im Experiment. Dies gilt sowohl für den off- als auch für den on-Zustand. Die relativen Intensitätsänderungen hingegen bewegen sich für ALL 6 und 1 in einem ähnlichen Bereich. Der Intensitätsanstieg von ALL 6 beim Übergang von der niedrigen zur hohen Calciumkonzentration liegt bei 24 % im Experiment bzw. 11 % im Modell. Die Intensität von ALL 1 fällt in den experimentellen Daten auf 59 %, im Modell auf 42 %. Der Vergleich der Veränderung von ALL 2 fällt schwer, aufgrund der Überlagerung der Schichtlinie mit MLL 2 und 3 im Experiment. Zwar verdoppelt sich mit dem Anstieg der Calciumkonzentration die Intensität von ALL 2 in Experiment und Modell. Dabei ist jedoch noch nicht der Anteil der überlappenden Myosinschichtlinien berücksichtigt. Nach Subtraktion der Anteile von MLL 2 und 3 würde der relative Anstieg von ALL 2 im Experiment noch wesentlich

größer ausfallen. In Tabelle 3.4 sind die Änderungen der Schichtlinienintensitäten zusammengefaßt.

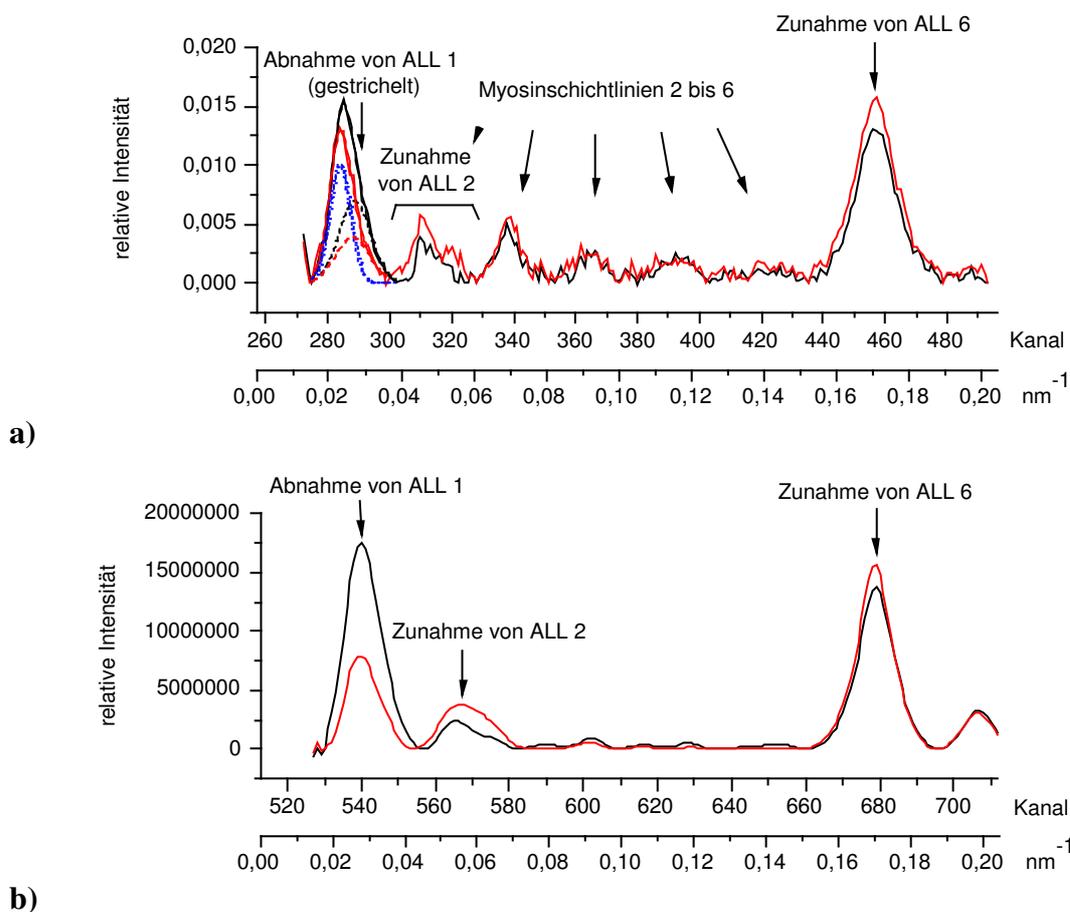


Abbildung 3.34: Vertikalschnitte über den extrameridionalen Bereich der Diffraktionsbilder von Experiment und Modell bei niedriger und hoher Calciumkonzentration

Verläufe der Vertikalschnitte über die Bilder mit niedriger (schwarz) und hoher Calciumkonzentration (rot) über den Bereich von $0,038 \text{ nm}^{-1}$ bis $0,205 \text{ nm}^{-1}$ (Region b aus Abbildung 3.30 bzw. Abbildung 3.33). a) Schnitte über die registrierten Röntgendiffraktionsmuster nach Abzug von Maschinen- und Streuungshintergrund. Schwarz und rot gestrichelt: Gefittete Aktinschichtlinien; blau gepunktet: gefittete Myosinschichtlinien. Die beiden Gesamtpeaks sind in schwarz bzw. rot mit den Aktomyosinschichtlinien überlagert. b) Schnitte über die modellierten Diffraktionsbilder, jeweils gemittelt aus den Intensitäten von 50 Einzelfilamenten mit Disorder, nach Abzug des durch das Disorder entstandenen Hintergrunds. Die Änderungen von ALL 1, 2 und 6 beim Übergang von der niedrigen zur hohen Calciumkonzentration sind jeweils angegeben. Die Bereiche auf den x-Achsen der beiden Abbildungen entsprechen einander, die y-Achsenabschnitte wurden anhand der Peakhöhe von ALL 6 aneinander angepaßt.

Um die Intensitätsänderungen anhand ihrer Lage entlang der Aktinschichtlinien besser bestimmen zu können, wurden Differenzmuster erstellt. Abbildung 3.35 zeigt die Intensitätsmuster von Experiment und Modell, wobei jeweils die Diffraktionsbilder mit der hohen Calciumkonzentration von denen der niedrigen subtrahiert wurden. Eine Intensitätsabnahme bei Anstieg der Calciumkonzentration liegt dementsprechend in den weißen Regionen vor, während eine Zunahme der Intensität als schwarzer Bereich zu erkennen ist.

Schichtlinie	ALL 1	ALL 2	ALL 6
Experiment	0,036 (auf 59 %)	0,036*	0,055 (auf 124 %)
Modell	0,121 (auf 42 %)	0,031 (auf 206 %)	0,019 (auf 111 %)

Tabelle 3.4: Absolute und relative Änderungen der integrierten Schichtlinienintensitäten von Experiment und Modell im Vergleich

Die absoluten Intensitäten von ALL 1, 2 und 6 wurden mit Hilfe der Vertikalschnitte aus Abbildung 3.34 bestimmt. Die Tabelle gibt die absoluten Intensitätsänderungen beim Übergang von der niedrigen zur hohen Calciumkonzentration an. In Klammern stehen die daraus berechneten relativen Intensitätsänderungen. Bei den Absolutwerten des Modells wurde der Exponent 10^9 der Übersichtlichkeit halber weggelassen. * Die Bestimmung der relativen Intensitätsänderung von ALL 2 im Experiment war aufgrund der Überlagerung der Schichtlinie mit den Myosinschichtlinien nicht möglich (Anstieg von 0,032 auf 0,068).

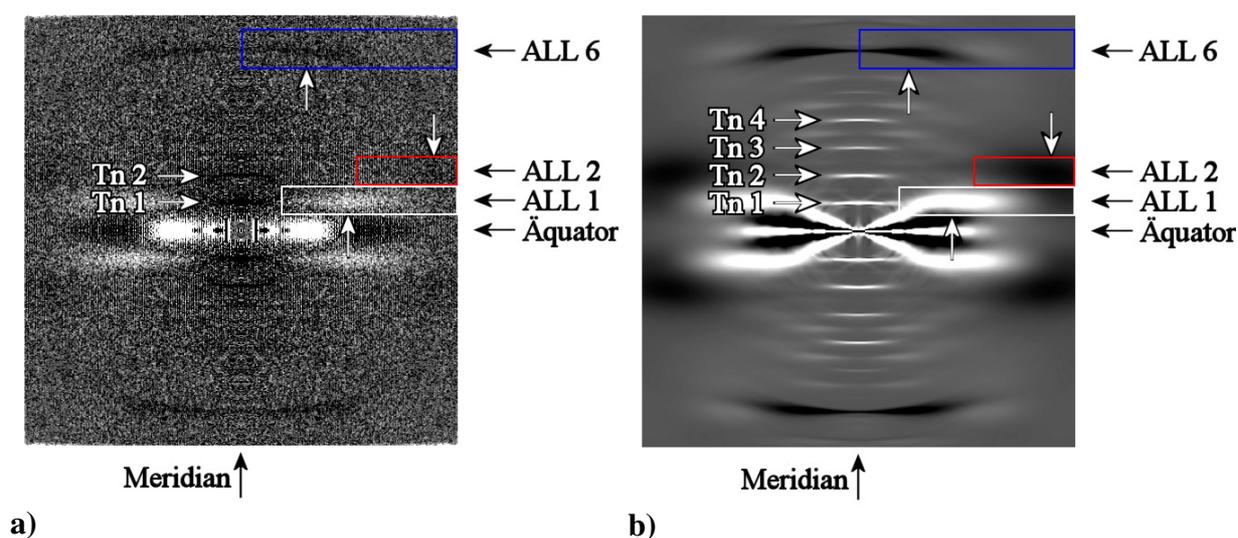


Abbildung 3.35: Differenzpattern der Diffraktionsbilder mit hoher und niedriger Calciumkonzentration aus Experiment und Modell

Differenzpattern von Experiment (a) und Modell (b). Die Intensitäten der Pattern mit hoher und niedriger Calciumkonzentration wurden voneinander subtrahiert und die resultierenden Intensitätsverteilungen negativ dargestellt. Die Kästen geben die Bereiche an, die horizontal integriert wurden (s. Abbildung 3.36), die Pfeile zeigen die Positionen der größten Intensitätsänderungen an.

Der Intensitätsabfall von ALL 1 ist im Experiment deutlich zu erkennen (weißer Bereich). Im modellierten Differenzbild dehnt sich dieser Bereich zur Mitte des Bildes aus. Dies resultiert aus der Verwendung von 50 unterschiedlich gekrümmten Einzelfilamenten. Diese Anzahl ist zu gering, um individuelle Schwankungen in der Intensitätsverteilung der aufaddierten Pattern zu kompensieren. So kommt es in Bildbereichen mit hoher Intensität (Äquator) zu Unterschieden in der Intensitätsverteilung, welche jedoch nicht auf strukturelle Änderungen der zugrunde liegenden modellierten Aktinfilamente zurückzuführen sind. Differenzpattern, denen Modellrechnungen ohne dreidimensionale Kurvenverläufe zugrunde lagen, zeigten eine Intensitätsabnahme von ALL 1 in dem Bereich, der dem des Experiments entsprach (Vgl. Abbildung 3.38 a). Die Zunahme von ALL 2 (schwarz) liegt jeweils im Randbereich der Pattern. Sie ist im Modell etwas deutlicher zu erkennen als im Experiment. Der Intensitätsanstieg von ALL 6 (schwarz) ist in Experiment und Modell von Intensität und Position her gut ver-

gleichbar. In den experimentellen Daten ist eine Zunahme der Troponinreflexe eins und zwei zu erkennen (schwarz). Hier weicht das Modell vom Experiment ab, Tn 1 bis 4 zeigen eine deutliche Intensitätsabnahme (weiß).

Zur Bestimmung der quantitativen Änderungen entlang der Aktinschichtlinien sind die Differenzen der horizontal integrierten Schnitte über die Aktinschichtlinien eins, zwei und sechs in Abbildung 3.36 dargestellt. ALL 6 wurde über den gesamten Quadranten integriert, außerdem wurde eine größere Schnittbreite als bei ALL 1 und 2 verwendet, um den gesamten Bereich der durch das Fanning relativ breit auslaufenden Schichtlinie berücksichtigen zu können. Bei ALL 1 wurde wie bisher nur der extrameridionale Bereich integriert. Da die Intensitätsänderung von ALL 2 nur ganz außen in den Bildern vorliegt, wurde der gesamte Innenbereich nicht berücksichtigt (Vgl. Kästen in Abbildung 3.35).

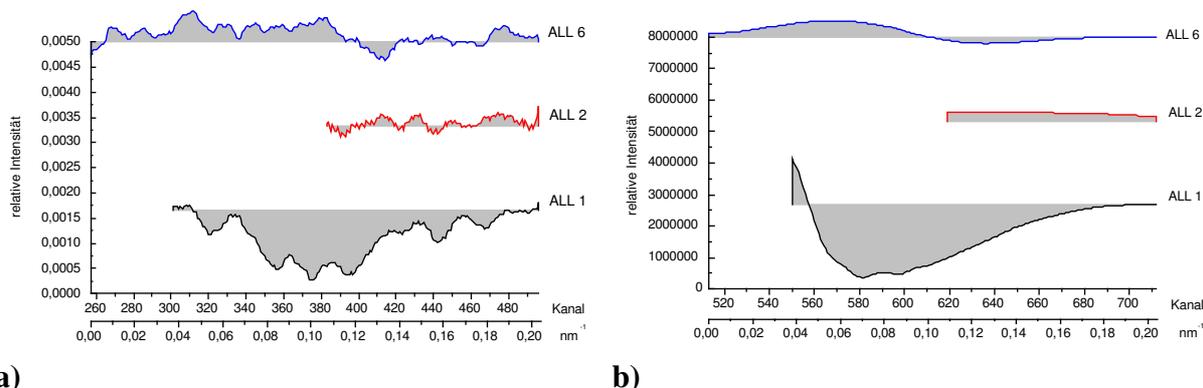


Abbildung 3.36: Intensitäten der Horizontalschnitte über die Differenzpattern von Experiment und Modell

Horizontalschnitte über die Differenzen der Aktinschichtlinien eins, zwei und sechs in Experiment (a) und Modell (b). Die Skalen der y-Achsen sind so gewählt, daß die Änderungen der Schichtlinienintensitäten im ähnlichen Größenordnungsbereich liegen. Die Intensitätsverläufe wurden jeweils auf beiden Ausgangsbildern von Experiment und Modell in horizontaler Richtung integriert (Verfahren s. Abschnitt 2.1.4), nachdem der Hintergrund von den Einzelbildern subtrahiert worden war (Vgl. Abbildung 2.3). Anschließend wurden die Schnitte der Bilder mit der niedrigen Calciumkonzentration von denen mit der hohen subtrahiert. a) Schnittbreiten: ALL 1: Kanäle 273 - 305, ALL 2: Kanäle 306 - 338, ALL 6: Kanäle 436 - 480. Die erhaltenen Datenpunkte wurden über 10 Werte geglättet. b) Schnittbreiten: ALL 1: Kanäle 526 - 553, ALL 2: Kanäle 554 - 581, ALL 6: Kanäle 662 - 699.

Beim Vergleich der Differenzen der Horizontalschnitte zeigt sich, daß die Intensitätsveränderungen in ihrem Verlauf entlang der Schichtlinien in Experiment und Modell durchaus vergleichbar sind. Aufgrund der unterschiedlichen Intensitätsverteilungen der modellierten Ausgangsbilder im Bereich des Äquators, liegt die größte Intensitätsänderung von ALL 1 im Modell etwas näher am Meridian als im Experiment. Die relativen Änderungen der Schichtlinienintensitäten untereinander sind im wesentlichen mit den Werten, die mit Hilfe der Vertikalschnitte ermittelt wurden, vergleichbar (Tabelle 3.4). Danach zeigt ALL 1 im Modell, relativ zu ALL 6, eine etwas stärkere Abnahme als im Experiment. Umgekehrt nimmt ALL 6 im Modell, relativ zu ALL 1, weniger stark zu als im Experiment.

3.3 Versuche zur Optimierung des Modells

Während die Änderungen auf den Aktinschichtlinien mit dem Modell qualitativ sehr gut angenähert werden konnten, steht die Zunahme der Intensitäten der Troponinreflexe im modellierten Differenzpattern im Gegensatz zur Abnahme der Intensitäten im Experiment (s. Abbildung 3.35). Um eine Abnahme der Troponinreflexe zu erreichen, wurde die off-Position des Troponins in axialer Richtung entlang des Tropomyosinmoleküls variabel gemacht. Daraus resultierte eine Verbreiterung der Troponinreflexe und damit ein Rückgang der Intensitätsmaxima. Im Vergleich mit den Intensitätsmaxima des modellierten on-Zustands ohne variable Troponinposition, lagen die Maxima im off-Zustand nun deutlich darunter. Im Differenzbild wird der auf diese Weise simulierte Intensitätsanstieg beim Übergang vom modellierten off- in den on-Zustand deutlich (Abbildung 3.37 a).

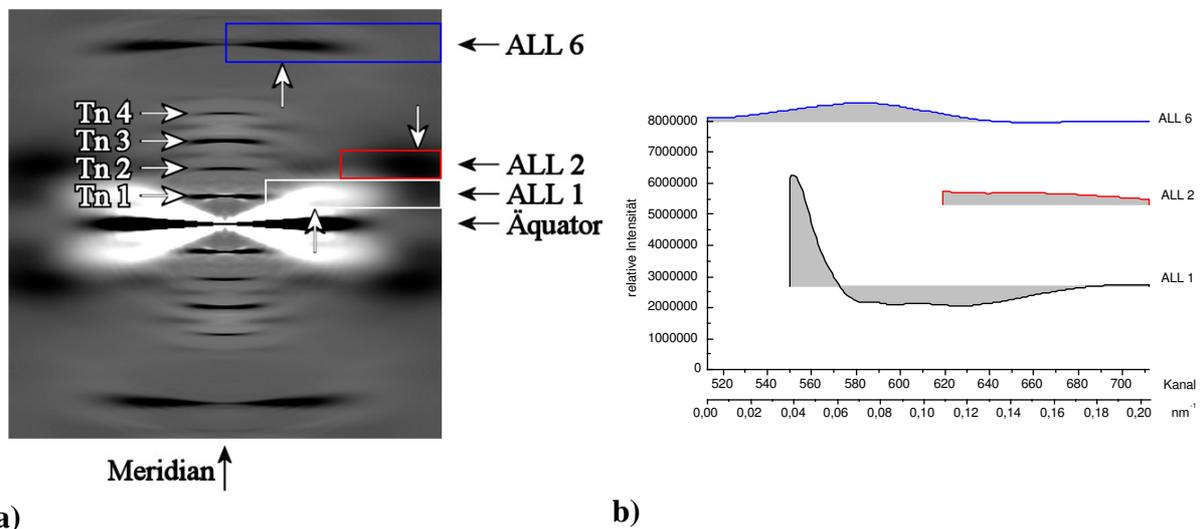


Abbildung 3.37: Modelliertes Differenzpattern und Differenzen der Horizontalschnitte über ALL 1, 2 und 6

a) Modelliertes Differenzpattern. Das zugrunde liegende Modell entspricht dem aus Abbildung 3.35, wobei hier für die Simulation des off-Zustands die Position des Troponins in axialer Richtung randomisiert wurde (Standardabweichung ca. 2,5 nm). Die azimuthale Position des Troponins am Tropomyosin wurde dabei beibehalten. Die Kästen geben die Bereiche an, die horizontal integriert wurden, die Pfeile zeigen die Positionen der größten Intensitätsänderungen an. b) Horizontalschnitte über die Differenzen der Aktinschichtlinien eins, zwei und sechs, ermittelt entsprechend den Schnitten in Abbildung 3.36 b.

Beim Übergang von der niedrigen zur hohen Calciumkonzentration zeigen die Troponinreflexe nun einen deutlichen Anstieg (schwarz). Die Randomisierung der Troponinposition führt aber zu Veränderungen der Intensitätsverteilung auf dem gesamten daraus resultierenden Diffraktionsbild. Die Auswirkungen auf die Aktinschichtlinien sind anhand der voneinander subtrahierten Schnitte über die dem Differenzpattern zugrunde liegenden Diffraktionsbilder in Abbildung 3.37 b zu sehen. Da zur Modellierung der Ausgangspattern jeweils nur 50 einzelne Aktinfilamente mit kurvenförmigem Verlauf eingesetzt wurden (s. Abschnitt 3.1.2.5), ist die Intensitätsverteilung im Bereich des Äquators einer relativ großen Variabilität unterworfen. Wegen dessen hoher Intensität ist dadurch auch die benachbarte erste Aktinschichtlinie betroffen. In Abbildung 3.37 b fällt die Intensitätsabnahme auf ALL 1 relativ zu den Zunahmen

auf ALL 2 und 6 verhältnismäßig klein aus. Zur Verbesserung der statistischen Aussagekraft, müßte eine viel größere Zahl einzelner Diffraktionsbilder gemittelt werden. Um zu zeigen, wie sich eine gleichmäßige Verteilung der Einzelfilamente prinzipiell auswirken würde, ist in Abbildung 3.38 a das Differenzbild aus jeweils zehn Einzelbildern mit variablem Aktin- und Tropomyosintwist, sowie einer starken Verkippung dargestellt.

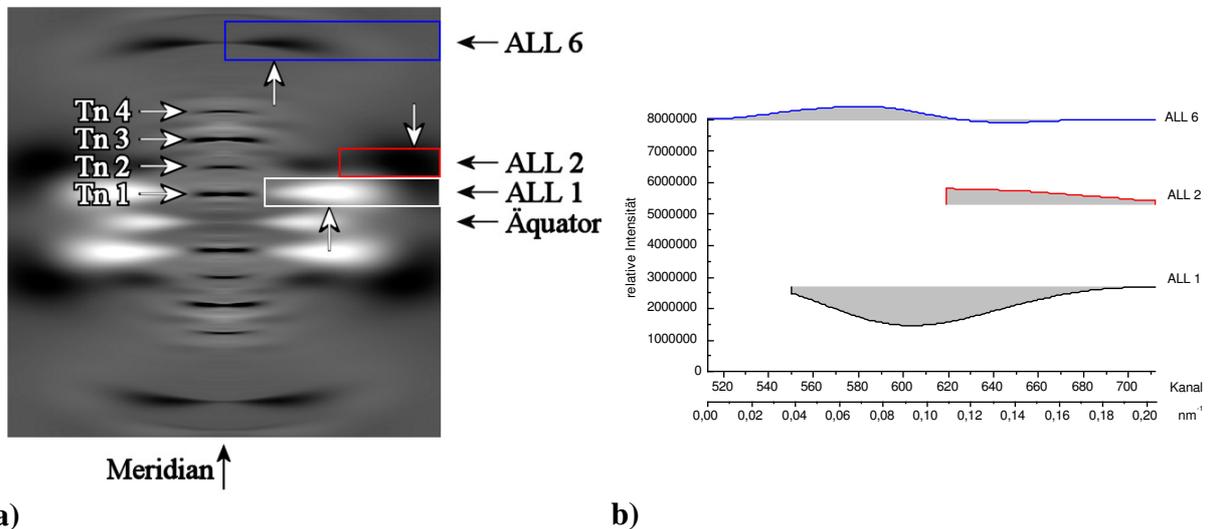


Abbildung 3.38: Modelliertes Differenzmuster und Differenzen der Horizontalschnitte über ALL 1, 2 und 6

a) Modelliertes Differenzmuster. Das zugrunde liegende Modell entspricht dem aus Abbildung 3.37 a, wobei hier jeweils zehn Einzelbilder mit variablem Aktin- und Tropomyosintwist verwendet wurden. Der dreidimensionale Verlauf der Filamente wurde nicht berücksichtigt. Anstatt dessen wurde die stärkere Verkippung (Vgl. Abschnitt 3.1.3, bzw. Abbildung 3.27) eingesetzt. Die Kästen geben die Bereiche an, die horizontal integriert wurden, die Pfeile zeigen die Positionen der größten Intensitätsänderungen an. b) Horizontalschnitte über die Differenzen der Aktinschichtlinien eins, zwei und sechs, ermittelt entsprechend den Schnitten in Abbildung 3.36 b.

Durch die regelmäßige Verkippung entsprechen sich die beiden Ausgangsbilder auch im Bereich des Äquators. Das hat zur Folge, daß der Verlauf von ALL 1 auf dem Differenzmuster viel besser mit dem experimentell ermittelten übereinstimmt (Vgl. Abbildung 3.35 a). Dadurch paßt auch das Verhältnis der Intensitätsänderungen auf ALL 1 und 6, dargestellt in Abbildung 3.38 b, besser zu den experimentellen Daten (Vgl. Abbildung 3.36 a). Die Zunahme von ALL 2, relativ zu der von ALL 6 fällt etwas größer aus, als im Experiment.

Da im Modell neben dem Anstieg von Tn 1 und 2 auch eine Intensitätserhöhung von Tn 3 und 4 zu sehen ist, sind die Intensitäten der Troponinreflexe im on-Zustand offensichtlich zu hoch. Dies war schon auf dem modellierten Diffraktionsbild in Abbildung 3.33 zu erkennen. Durch eine Randomisierung der Troponinposition im on-Zustand konnten die Troponinreflexe des Modells an die Intensitätsverteilung auf dem experimentell ermittelten Diffraktionsbild angeglichen werden. Abbildung 3.39 zeigt die modellierten Diffraktionsbilder im off- und on-Zustand, wobei die Troponinposition in axialer Richtung randomisiert wurde, im Vergleich mit den experimentell ermittelten Pattern.

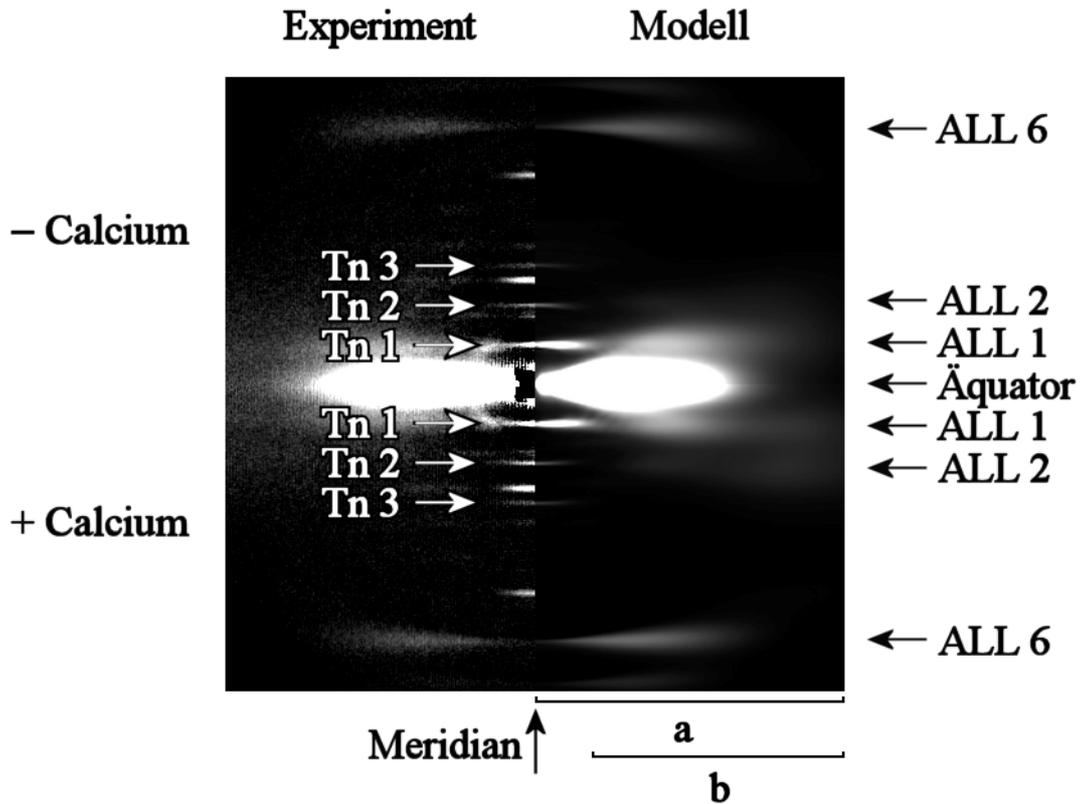


Abbildung 3.39: Diffractionsbild von Experiment und Modell bei niedriger und hoher Calciumkonzentration

Linke Bildhälfte: experimentelle Daten (entsprechend Abbildung 3.33), rechte Bildhälfte: modelliertes Diffractionsbild. Obere Bildhälfte: niedrige Calciumkonzentration, (off-Zustand der Aktinfilamente), untere Bildhälfte: hohe Calciumkonzentration (on-Zustand). Es wurden die gleichen Modellparameter wie für die rechte Bildhälfte in Abbildung 3.33 verwendet, wobei die Troponinposition in axialer Richtung randomisiert wurde. Die azimuthale Position des Troponins am Tropomyosin wurde dabei beibehalten. Die Standardabweichung des Troponins von der regelmäßigen Anordnung betrug ca. 2,5 nm im off-Zustand (Vgl. Abbildung 3.37 a) und ca. 2 nm bei der Modellierung des on-Zustands.

Im Vergleich mit dem Modell ohne randomisierte Troponinposition besitzen die modellierten Troponinreflexe eine niedrigere Intensität (Vgl. Abbildung 3.33, rechte Bildhälfte). In diesem Punkt stimmen sie besser mit den experimentellen Daten überein.

4 Diskussion

Zur Übersicht folgt eine kurze Zusammenstellung der Ergebnisse dieser Arbeit:

- Zur Aufklärung der Struktur des Aktinfilaments und der strukturellen Änderungen bei der Aktivierung des Aktinfilaments im Skelettmuskel der Wirbeltiere wurden zweidimensionale Röntgendiffraktionsbilder registriert. Es wurden Aufnahmen unter relaxierenden Bedingungen (niedrige Calciumkonzentration) bei normaler Sarkomerenlänge sowie mit niedriger und hoher Calciumkonzentration (Aktivierung der Aktinfilamente) bei langer Sarkomerenlänge gemacht.
- Zur Interpretation der Ergebnisse wurde ein Modell generiert, bestehend aus Aktin, Tropomyosin und Troponin.
- Die Intensitätsverhältnisse von ALL 1, 6 und 7 untereinander, sowie die Peakpositionen unter Relaxationsbedingungen konnten mit dem Modell angenähert werden. Die Berücksichtigung von Disorder im Modell war dazu unabdingbar.
- Die Intensitätsänderungen von ALL 1 und 2 bei Anstieg der Calciumkonzentration im Experiment konnten mit einem einfachen Modell, bestehend aus Aktin und Tropomyosin simuliert werden. Eine im Experiment beobachtete Änderung der Intensität von ALL 6 bei Anstieg der Calciumkonzentration hingegen war nur unter Verwendung eines Troponinmoleküls in der Simulation modellierbar.

Auf den modellierten Diffraktionspattern zeigten sich, im Vergleich zu den experimentellen Daten, folgende Unterschiede:

- Unter Relaxationsbedingungen lag die integrierte Intensität von ALL 1 im Modell über der von ALL 6, im Experiment war es umgekehrt.
- Die Änderungen auf ALL 1, 2 und 6 beim Übergang von der niedrigen zur hohen Calciumkonzentration konnten, zusammen mit einer Intensitätszunahme der Troponinreflexe, mit dem Modell nur qualitativ simuliert werden, eine quantitative Modellierung wurde nicht erreicht.

Nach einer allgemeinen Betrachtung des Modells sollen folgende Schwerpunkte eingehender diskutiert werden:

1. Inwieweit ist das ins Modell integrierte Disorder realistisch?
2. Wodurch lassen sich die Unterschiede auf den Diffraktionspattern von Experiment und Modell erklären und wie lassen sie sich ggf. beseitigen?
3. Wie gut fügen sich experimentelle Daten und Interpretation durch das Modell bei Vergleich mit bisher bestehenden Ergebnissen in gängige Modellvorstellungen zur Muskelkontraktion ein?

4.1 Erstellung des Modells

Ziel dieser Arbeit war es, die Intensitätsverteilungen auf den Aktinschichtlinien unter verschiedenen Bedingungen zu simulieren. Beim Aufbau des Modells wurde zunächst von einem Aktinfilament ausgegangen, welches aus 360 Aktinmonomeren und 50 Tropomyosindoppelsträngen, sowie 50 Troponinmolekülen bestand (s. Abschnitte 2.2.1 und 2.2.2). Das Troponinmolekül wurde dabei unter Zuhilfenahme von Angaben aus der Literatur modelliert, da bisher keine vollständige Beschreibung der gesamten Struktur vorliegt (s. Abschnitt 2.2.2). Das dreidimensionale Modell wurde auf ein zweidimensionales Bild mit der Größe 1024×1024 Pixel massenprojiziert (s. Abschnitt 2.2.1). Während im Experiment die Auflösung durch die Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlung limitiert ist, muß bei der Berechnung im Computer zwischen ausreichender Auflösung und akzeptabler Rechenzeit abgewogen werden. Bei Versuchen mit höheren Auflösungen im Modell (Projektion eines Filaments auf 2048×2048 oder 4096×4096 Pixel) ergaben sich so geringe Unterschiede im Vergleich zu der hier verwendeten Bildgröße von 1024×1024 Pixeln, daß zugunsten der Rechenzeit darauf verzichtet wurde.

Auf der Massenprojektion wurde zur Berechnung der aus der angenommenen Struktur resultierenden Diffraktionsbilder eine Fourier-Transformation durchgeführt (s. Abschnitt 2.2.4). Die daraus erhaltenen Amplitudenwerte wurden quadriert, um die entsprechenden Intensitätswerte zu erhalten. Dann wurde das Bild gefaltet, um die Vergleichbarkeit mit den experimentell registrierten Pattern zu gewährleisten (Vgl. Abschnitte 2.1.4 und 2.2.4).

Zur Berechnung eines Intensitätsbildes wurden jeweils nur einzelne Filamente modelliert. So konnte die aufwendige Berechnung eines Filamentgitters und der dabei durch die Interferenz an den Filamenten untereinander entstehende Gittereffekt („lattice sampling“) umgangen werden. Dieses Vorgehen war zur Simulation der Aktinschichtlinien unter den hier gewählten Bedingungen durchaus gerechtfertigt, da in den Röntgendiffraktionsbildern des Kaninchen-skelettmuskels ein Gittereffekt nur auf dem Äquator und unter Rigorbedingungen auch auf ALL 1 zu beobachten ist (Vgl. Abbildung 1.15 a). Da weder der Äquator noch die erste Aktinschichtlinie unter Rigorbedingungen Gegenstand der Analyse in dieser Arbeit waren, entsprachen die dieser Arbeit zugrunde liegenden experimentell registrierten Pattern, mit Ausnahme des Äquators, den für einzelne Filamente berechneten Diffraktionsbildern. Aus diesem Grund ist es ebenso möglich, die Intensitätsbilder einzeln modellierter Filamente aufzusummieren und zu mitteln, um Unterschiede zwischen individuellen Aktinfilamenten berücksichtigen zu können.

Mit dem auf diese Weise erstellten Modell war es zunächst nicht möglich, die relativen Intensitäten von ALL 1, 6 und 7 und die horizontalen Peakpositionen adäquat zu modellieren. Die Intensität von ALL 1 war im Vergleich zu der von ALL 6 und 7 deutlich zu hoch (Vgl. Abbildung 3.5 und Abbildung 3.13, schwarze Linie). Weder eine Positions- oder Strukturänderung des Troponinmoleküls noch die Änderung anderer Parameter, wie Drehwinkel der Aktinmonomere oder Abstand des Tropomyosinmoleküls von der Filamentachse, führten zu einer Annäherung der modellierten Intensitäten an die experimentell ermittelten. Erst durch das Einfügen verschiedener Disordertypen konnten die Verhältnisse der Schichtlinienintensitäten von ALL 1, 6 und 7 im Modell an die des Experiments angenähert werden. Das Disorder

wurde in dieser Arbeit durch den variablen Aktin- und Tropomyosintwist, den Verlauf der Filamente entlang dreidimensionaler Kurven und durch den nicht ideal-parallelen Verlauf von Myofibrillen bzw. Muskelfasern und der daraus resultierenden Verkippung der errechneten Diffraktionsbilder realisiert (s. Abschnitt 2.2.3). Da die ersten drei dieser Disordertypen Zufallszahlen verwenden, unterscheiden sich damit durchgeführte, einzelne Modellrechnungen trotz gleicher Parameterwerte mehr oder weniger stark voneinander. Um die dadurch entstehende Variabilität besser wiedergeben zu können, wurden mehrere Diffraktionsbilder, die mit den gleichen Parameterwerten modelliert wurden, aufsummiert und gemittelt (s. Abschnitte 2.2.3.1, 2.2.3.2 und 2.2.3.3).

Der variable Aktintwist (s. Abschnitt 3.1.2.3) hatte eine Intensitätsabnahme aller Aktinschichtlinien zur Folge. Dabei waren ALL 1 und 2 von dem Intensitätsabfall und der damit einhergehenden Verbreiterung stärker betroffen als ALL 5, 6 und 7 (Vgl. Abbildung 3.13 schwarze bzw. rote Linie). Dies ist darauf zurückzuführen, daß kürzere Abstände im Filament, welche die Intensitätsverteilungen auf ALL 5, 6 und 7 betreffen, durch den Twist weniger stark beeinflußt werden, als längere Abstände, welche ALL 1 und 2 betreffen.

Der variable Tropomyosintwist wirkte sich hauptsächlich auf die Intensitäten von ALL 1 und 2 aus (s. Abschnitt 3.1.2.4, Vgl. Abbildung 3.15 schwarze bzw. rote Linie). Während die Intensitäten dieser Schichtlinien abnahmen, blieben ALL 5, 6 und 7 praktisch unbeeinflußt. Da Tropomyosin als kontinuierliche Helix vorliegt, liegen seine Schichtlinien auf dem Diffraktionsbild im Bereich von ALL 1 und 2 (Vgl. Abbildung 1.13 b). Die Aktinschichtlinien höherer Ordnung werden somit durch eine ungeordnete azimuthale Position von Tropomyosin nicht beeinflußt.

Der Verlauf der modellierten Filamente entlang von dreidimensionalen Kurven (s. Abbildung 3.18 a), führte zur Intensitätsabnahme und Verbreiterung aller betrachteten Aktinschichtlinien, welche mit zunehmendem Abstand vom Meridian stärker wurde (Fanning, s. Abschnitt 3.1.2.5, Vgl. Abbildung 3.20 schwarze bzw. rote Linie). Die dadurch mit zunehmendem Abstand vom Meridian stärker werdende Überlagerung eng benachbarter Aktinschichtlinien erzeugte eine Art von Hintergrund im Bild. Da sich ALL 1 mit ALL 2 und dem Äquator mit seiner hohen Intensität überlagert, ist ALL 1 besonders durch die Subtraktion des Hintergrunds, welcher äquivalent zur Subtraktion des Hintergrunds im experimentell registrierten Pattern durchgeführt wurde, betroffen. Ihre Intensität nimmt dadurch relativ zu ALL 6 und 7 stärker ab. Auch die Intensität von ALL 2 sinkt durch den Abzug des Hintergrunds stärker als die von ALL 6 und 7. Dies ist auf das weiter vom Meridian entfernte Maximum der Schichtlinie zurückzuführen (Vgl. Abbildung 1.12 c). Hierdurch wird ALL 2 im Verhältnis zu ALL 1 sogar noch stärker verbreitert.

Die Simulation des nicht exakt parallelen Verlaufs von Myofibrillen und Fasern durch unterschiedliches Verkippen der errechneten Diffraktionsbilder einzelner Filamente hatte wie der angenommene gekrümmte Verlauf einzelner Aktinfilamente eine Intensitätsabnahme aller betrachteten Aktinschichtlinien bei gleichzeitiger Verbreiterung zur Folge (s. Abschnitt 3.1.2.5, Vgl. Abbildung 3.23 schwarze bzw. rote Linie).

Der Einsatz aller besprochenen Disordertypen zusammen führte zu einer starken Überlagerung benachbarter Schichtlinien, wobei durch den Abzug des entstandenen Hintergrunds ins-

gesamt eine relativ große Intensitätsabnahme von ALL 1 und 2 im Verhältnis zu ALL 6 und 7 erzielt wurde (Vgl. Abbildung 3.25 schwarze bzw. rote Linie und Abbildung 3.26 b).

Durch die Subtraktion des Hintergrunds konnte die Intensität von ALL 1 und 2 relativ zu ALL 6 und 7 stärker gesenkt werden. So war es möglich, die relativen Intensitätsverteilungen auf den Aktinschichtlinien eins, zwei, sechs und sieben, sowie die Peakpositionen dieser Schichtlinien unter Relaxationsbedingungen anzunähern (s. Abschnitt 3.1.3, Vgl. Abbildung 3.26 a und b). Obwohl eine vollständige Übereinstimmung des Modells mit den experimentellen Daten nicht erreicht wurde, konnten die im Experiment beobachteten Intensitätsänderungen der Aktinschichtlinien eins, zwei und sechs beim Übergang von der niedrigen zur hohen Calciumkonzentration qualitativ simuliert werden. Das Modell zeigte eine Intensitätsabnahme von ALL 1, sowie eine Zunahme der Intensitäten von ALL 2 und 6. Die quantitative Auswertung der Intensitätsänderungen ergab, relativ zum Anstieg von ALL 2, einen zu großen Abfall von ALL 1 bzw. eine geringere Zunahme von ALL 6 im Modell (s. Tabelle 3.4 und Abbildung 3.36). Die Intensitätsänderungen der Troponinreflexe im Modell stimmten zunächst nicht mit den im Experiment beobachteten überein. Im Modell nahmen die Reflexe an Intensität ab, im Experiment zeigten sie eine Intensitätszunahme (Vgl. Abbildung 3.35 a, b). Durch eine Randomisierung der Troponinposition in axialer Richtung entlang des Filaments für den off-Zustand des Modells konnte das Modell an die experimentellen Daten angeglichen werden (s. Abschnitt 3.3).

Das Bindegewebe, welches bei der Untersuchung ganzer Muskeln den Röntgenstrahl abschwächt und streut, spielte bei den Versuchen wegen der Verwendung einzelner aus einem Muskelfaserbündel gezogener Fasern keine Rolle. Außerdem entstand durch die Verwendung gehäuteter Einzelmuskelfasern („skinned fibres“, s. Abschnitt 2.1.1) eine im Vergleich mit Versuchen an unbehandelten Muskelfasern geringere Streustrahlung, da die im Sarkoplasma vorhandenen wasserlöslichen Proteine entfernt wurden. Durch die Streuung an optischen Elementen (Spiegel, Monochromator, Blenden), sowie an Kammer und Medium entsteht jedoch ein nicht unerheblicher Hintergrund auf den experimentellen Diffraktionsbildern. Dieser „Maschinenhintergrund“ wurde durch eine zusätzliche Registrierung einer mit Medium gefüllten Kammer erfaßt und später vom aufgenommenen Pattern abgezogen (s. Abschnitte 2.1.3 und 2.1.4). Aufgrund dessen mußte er bei der Erstellung des Modells nicht berücksichtigt werden.

Die Ausdehnung der Reflexe und die Breite der Schichtlinien wird außerdem von der Geometrie des Röntgenstrahls beeinflusst. Der Querschnitt des Strahls ist nicht unendlich klein und er kann, abhängig von der verwendeten Röntgenquelle, bzw. der nachgeschalteten Optik, kreisförmig oder elliptisch sein. Je größer die Strahlhöhe ist, desto breiter werden durch die Faltung mit dem Strahlprofil die Schichtlinien auf dem Diffraktionsbild und desto schlechter ist die Auflösung und damit die Trennung eng nebeneinander liegender Schichtlinien. Ist der Strahl in horizontaler und vertikaler Richtung unterschiedlich breit, so resultiert daraus eine unterschiedliche Verbreiterung der Reflexe in horizontaler und vertikaler Richtung. Im Modell wurde die Strahlgeometrie nicht berücksichtigt, da die Schichtlinienintensitäten zur Auswertung integriert werden und die Intensitätsprofile entlang der hier relevanten Schichtlinien kein Sampling aufweisen. Eine Realisierung des Effekts der Strahlgeometrie im Modell findet sich bei Holmes *et al.* (1990).

4.2 Disorder

Der variable Aktintwist verbreitert die Aktinschichtlinien unterschiedlich stark. ALL 1 und 2 sind dabei stärker betroffen, als ALL 6 und 7. Die Vertwüstung der Tropomyosinmoleküle zur Simulation einer variablen Tropomyosinposition führt zu einer Verbreiterung von ALL 1 und 2, wobei ALL 6 und 7 praktisch nicht verändert werden. Das Fanning, verursacht durch den kurvigen Verlauf von Aktinfilamenten bzw. Verkippung der Intensitätsbilder, kann durch eine Verbreiterung der Schichtlinienverläufe zu einem Überlappen eng beieinander liegender Schichtlinien führen. Hierdurch entsteht eine Art von Hintergrund im Bild, welcher im Bereich der horizontalen Bildachse am höchsten ist, da dort der Äquator mit seiner hohen Intensität liegt. Subtrahiert man den so entstandenen Hintergrund von den Intensitäten der Schichtlinien, dann sind besonders ALL 1 und 2 davon betroffen. Sie nehmen im Vergleich zu ALL 6 und 7 stärker in ihren Intensitäten ab. In der Abbildung 4.1 sind die Vertikalschnitte über die modellierten Diffraktionsbilder mit allen in dieser Arbeit gezeigten Disordertypen zusammen dargestellt.

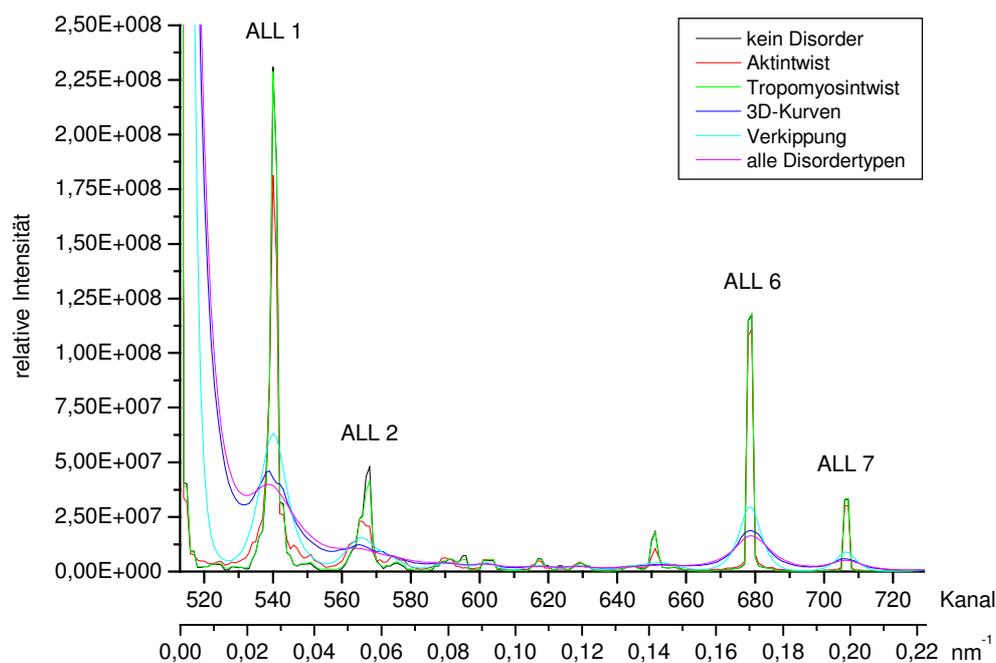


Abbildung 4.1: Vertikalschnitt über den extrameridionalen Bereich modellierter Diffraktionspattern

Darstellung aller Vertikalschnitte aus den Abbildungen in den Abschnitten 3.1.2.3 bis 3.1.2.6.

Die integrierten Intensitäten von ALL 1, 2, 6 und 7, ermittelt aus den Vertikalschnitten in der Abbildung 4.1, faßt Tabelle 4.1 zusammen. Der Einfachheit halber wurde auch für ALL 2, 6 und 7 diese Schnittbreite beibehalten, obwohl hier keine störenden Troponinreflexe auf dem Meridian liegen (Vgl. 3.1.1). Die Integration der Intensitäten erfolgte einmal vor und einmal nach der Subtraktion des Hintergrunds.

Schichtlinie	±bg	ALL 1	ALL 2	ALL 6	ALL 7
kein Disorder	+bg	7,071 (100)	1,984 (100)	2,639 (100)	0,749 (100)
	-bg	6,989 (100)	1,883 (100)	2,610 (100)	0,729 (100)
variabler Aktintwist	+bg	7,113 (> 100)	1,710 (86)	2,657 (> 100)	0,740 (99)
	-bg	6,384 (91)	1,198 (64)	2,565 (98)	0,689 (95)
variabler Tropomyosintwist	+bg	7,102 (> 100)	1,886 (95)	2,651 (> 100)	0,757 (> 100)
	-bg	6,820 (98)	1,660 (88)	2,598 (99)	0,718 (98)
3D-Kurven	+bg	7,538 (> 100)	2,257 (> 100)	2,656 (> 100)	0,767 (> 100)
	-bg	2,955 (42)	0,603 (32)	1,842 (71)	0,404 (55)
Verkipfung	+bg	7,030 (99)	2,146 (> 100)	2,629 (99)	0,742 (99)
	-bg	5,852 (84)	1,462 (78)	2,425 (93)	0,652 (89)
alle Disorder-typen	+bg	7,531 (> 100)	2,172 (> 100)	2,679 (> 100)	0,775 (> 100)
	-bg	2,086 (30)	0,293 (16)	1,737 (67)	0,335 (46)

Tabelle 4.1: Absolute Intensitäten von ALL 1, 2, 6 und 7 im Modell mit und ohne Disorder

Die Tabelle gibt die absoluten integrierten Intensitäten der Aktinschichtlinien eins, zwei, sechs und sieben im Modell wieder. Dabei wurde das Modell ohne Disorder, jeder Disordertyp einzeln und alle zusammen berücksichtigt. Tropomyosin und Troponin befanden sich in der Konfiguration des off-Zustands. Die Werte wurden jeweils anhand eines vertikalen Schnitts über den extrameridionalen Bereich ermittelt (Bereich b in den Abbildungen des Ergebnisteils). Dabei wurden die Intensitäten der Peaks über die jeweils gleichen Bereiche einmal vor („+bg“, schwarze Zahlen) und einmal nach Abzug des Hintergrunds ermittelt („-bg“, rote Zahlen). Die Subtraktion des Hintergrunds wurde entsprechend der Beschreibung im Ergebnisteil (Vgl. Abbildung 3.3 und Abbildung 3.4) durchgeführt. Die Zahlen in Klammern geben jeweils die relativen Intensitäten, ausgehend von den Schichtlinien des Modells ohne Disorder wieder. Sie wurden für die Intensitätsverteilungen der Schnitte mit bzw. ohne Hintergrund separat berechnet. Der Übersichtlichkeit halber wurde bei den Absolutwerten der Exponent 10^8 weggelassen.

Die schwarz gedruckten Zahlenwerte geben die integrierten Intensitäten der einzelnen Schichtlinien vor dem Abzug des Hintergrunds wieder. Beim Vergleich der relativen Werte in Klammern fällt auf, daß die Gesamtintensität der einzelnen Schichtlinien aus den Rechnungen mit Disorder im Vergleich zum Modell ohne Disorder fast durchweg gleich bleibt oder sogar leicht ansteigt (> 100). Eine Ausnahme bilden die durch variablen Aktin- und Tropomyosintwist verursachten Intensitätsrückgänge auf ALL 2. Zwar führen alle betrachteten Disordertypen zu einer mehr oder weniger starken Abnahme der Peakhöhe (Vgl. Abbildung 4.1), gleichzeitig verbreitern sich dabei die Schichtlinien, so daß ihre integrierte Intensität praktisch gleich bleibt. Werte von über 100 % kommen zum einen dadurch zustande, daß durch das Disorder eine Umverteilung der Intensitäten stattfindet. Obwohl die Gesamtintensität eines Diffraktionsbildes dabei gleich bleibt, können bestimmte Bereiche im Bild an Intensität zunehmen, andere abnehmen. Des weiteren stimmten die Gesamtintensitäten der einzelnen Mas-

senprojektionen durch das eingeführte Disorder nicht exakt überein, was zu leichten Unterschieden in der Gesamtintensität auf den Diffraktionsbildern führt.

Aufgrund der Koppelung benachbarter Elemente durch die hier verwendeten Splinekurven gehören der variable Aktin- und Tropomyosintwist, sowie der kurvenförmige Verlauf der Filamente nicht in die Kategorie der Verformung erster Art (Vgl. Vainshtein, 1966, s. Abschnitt 1.3).

Beim variablen Aktin- und Tropomyosintwist treten durch den hier gewählten Abstand aufeinander folgender Interpolationspunkte der Splinekurven nicht unerhebliche Winkelabweichungen zwischen benachbarten Untereinheiten auf. Da die benachbarten Untereinheiten durch die Kurven gekoppelt sind, gehören variabler Aktin- und Tropomyosintwist in die Kategorie der Verformung zweiter Art. Die Interpolationspunkte der für diese beiden Disorder-typen eingesetzten Splinekurven wurden jeweils unabhängig voneinander erzeugt. Somit ist das modellierte Disorder nicht kumulativ, sondern kompensatorisch. Das heißt, daß die Auslenkungen, die mit den Kurven produziert wurden, nicht beliebig wachsen können. Also bleiben sowohl die Abstandsbeziehungen benachbarter als auch weit auseinander liegender Strukturelemente grundsätzlich erhalten (Short-Range Order bzw. Long-Range Order, Vgl. Abschnitt 1.3).

Beim Kurvenverlauf der Filamente entlang dreidimensionaler Splinekurven liegen die einzelnen Monomere zwar auch gekoppelt vor, dies wirkt sich aber durch den großen Abstand, welchen die Interpolationspunkte voneinander haben, anders aus, als beim variablen Aktin- bzw. Tropomyosintwist (Vgl. Abschnitt 2.2.3.3). Durch den gekrümmten Filamentverlauf besitzen die einzelnen Abschnitte des Filaments unterschiedliche Winkel, unter denen sie verlaufen. Je nach Stärke der Krümmung ergibt sich eine andere Winkelverteilung. Das resultierende Diffraktionsbild besteht somit aus einer Summation vieler, unter verschiedenen Winkeln ausgerichteter Filamentabschnitte, ähnlich wie dies in einem Röntgen-Pulver-Diffraktionsbild der Fall ist. Es führt dadurch kaum zu einer Veränderung im Interferenzmuster und wird so mit der Erzeugung von Disorder durch die Verkippung vergleichbar. Bei der Verkippung werden die Intensitätsverteilungen der Schichtlinien durch die Mittelung der Diffraktionsbilder eines Filaments, das unter verschiedenen Winkeln ausgerichtet wird, verändert. Dabei kommen die Intensitätsverteilungen der einzelnen Diffraktionsbilder untereinander nicht durch Interferenz zustande. Aus den angegebenen Gründen ist eine Einordnung des Disorders, welches aus dem Filamentverlauf entlang dreidimensionaler Kurven und der Verkippung resultiert, in eine der zwei beschriebenen Kategorien (Verformung erster oder zweiter Art), nicht möglich.

Der Abzug des im Modell durch Disorder entstandenen Hintergrunds kann die integrierten Intensitäten der Schichtlinien relativ zueinander stark beeinflussen (Tabelle 4.1, rot gedruckte Zahlenwerte). Unabhängig von der Art des Disorders, sind die integrierten Schichtlinienintensitäten mit Disorder nach Abzug des Hintergrunds geringer als in der Simulation ohne Disorder (relative Werte in Klammern). Dabei nehmen die Intensitäten von ALL 1 und 2 jeweils stärker ab, als die von ALL 6 und 7 (Vgl. Abschnitt 4.1). Insgesamt wirken sich die verschiedenen Disorder-typen unterschiedlich stark auf die integrierten Intensitäten der einzelnen Aktinschichtlinien aus (s. Tabelle 4.1, rot gedruckte Zahlenwerte). Dadurch lassen sich Rückschlüsse auf die jeweiligen Anteile der einzelnen Disorder-typen in einem registrierten Diffraktionsmuster ziehen.

Durch das Einführen von Disorder ins Modell und die Subtraktion des dadurch entstandenen Hintergrunds konnte das Intensitätsverhältnis von ALL 1 und 6 im Modell von 2,7 : 1 ohne Disorder auf 1,2 : 1 verbessert werden (Vgl. Tabelle 4.1). Das experimentell ermittelte Intensitätsverhältnis liegt bei etwa 0,6 : 1 (Vgl. Tabelle 3.1). Daher muß es noch weitere Faktoren geben, welche die Verteilung der Schichtlinienintensitäten auf einem Diffraktionsbild beeinflussen und im Modell nicht berücksichtigt wurden (s. Abschnitt 4.3).

Da Disorder auch in der realen Muskelstruktur vorhanden ist, wirkt es sich im registrierten Röntgendiffraktionspattern auf eine ähnliche Weise wie im modellierten Bild aus. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob es überhaupt sinnvoll ist, den Hintergrund bei der Analyse von Schichtlinienintensitäten von diesen zu subtrahieren. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse machen deutlich, daß dabei ein nicht unerheblicher Teil der Bildinformation verloren geht.

Aufgrund welcher Überlegungen und Belege die Parameterwerte der einzelnen Disordertypen gewählt wurden, soll in den nächsten drei Kapiteln geklärt werden.

4.2.1 Variabler Aktintwist

Die unterschiedliche Länge aufeinander folgender, vollständiger Umdrehungen der Aktinhelix wurde zuerst von Hanson und Lowy (Hanson und Lowy, 1963, Hanson, 1967) anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen beschrieben und später von Egelman *et al.* (1982) als „random variable twist“ bezeichnet. Demzufolge variieren die Abstände zwischen zwei „Überkreuzungsstellen“, den Crossovers der Helix, zufällig. Da eine Abweichung vom regelmäßigen Helixverlauf in der Realität offensichtlich vorhanden ist, lag es nahe, sie in das Modell zu integrieren, um eine bessere Grundlage für die zu untersuchenden experimentellen Daten zu erhalten.

In der Literatur bestehen unterschiedliche Ansichten darüber, welche Bedingungen für die zu verwendenden Abweichungswinkel der einzelnen Monomere gelten. Hierbei steht auf der einen Seite das Modell des kumulativen Disorders (Egelman *et al.*, 1982). Dabei wird für jedes Monomer n auf einen konstanten Rotationswinkel φ ein bestimmter Abweichungswinkel δ aufaddiert. Damit ein kumulativer Verlauf entsteht, wird für jedes Monomer der tatsächliche Gesamtwinkel des vorangegangenen berücksichtigt:

$$\text{Drehwinkel}(n) = (n - 1) \cdot \varphi + \sum_{i=1}^n \delta_i \quad (7)$$

Bremer *et al.* (1991) meinten, für aufeinander folgende Längen vollständiger Umdrehungen des Aktinfilaments häufig abwechselnd größere und kleinere Werte zu beobachten. Das hieße, nach einem Overtwist folgte häufiger ein Undertwist als ein weiterer Overtwist und umgekehrt („kompensatorischer Effekt“). Egelman und DeRosier (1992) wiesen nach, daß aus den Daten ein streng kompensatorischer Verlauf, also die höhere Wahrscheinlichkeit dafür, daß nach einer kurzen Crossoverlänge eine lange auftritt und umgekehrt, nicht hervorgeht. Das beweist allerdings nicht zwangsläufig, daß ein rein kumulativer Verlauf vorliegt. Versuche zur Messung der Rotationswinkeländerung durch thermische Fluktuation legen nahe, daß sich kompensatorische Effekte finden, jedoch nicht streng kompensatorische, und daß die Auslen-

kungen der einzelnen Monomere weitaus geringer sein können, als von Egelman im Modell angenommen (Tsuda *et al.*, 1996). Die theoretischen Betrachtungen von Erickson (1989) unterstützen dies.

Eine weitere Schwierigkeit bei der Modellierung des variablen Aktintwists ergab sich aus der Tatsache, daß ein kontinuierlicher Helixverlauf simuliert werden mußte. Die Verwendung diskreter Abweichungswinkel, je einer pro Monomer, mag für die Simulation einer reinen Aktinhelix ausreichend sein, obwohl dabei die Monomere als rigide angesehen werden und keinerlei Verformung berücksichtigt wird. Mit dem Modell sollte jedoch ein vollständiges Aktinfilament, inklusive Tropomyosin und Troponin, simuliert werden. Da sich ein Tropomyosinmolekül jedoch über mehrere Aktinmonomere erstreckt, mußte für das Mitdrehen von Tropomyosin mit der vertwisteten Aktinhelix eine andere Möglichkeit gefunden werden. Anderenfalls hätte das Tropomyosin nur in Teilstücken mit den jeweiligen Aktinmonomeren mitgedreht werden können oder es wäre zum Versatz an den aufeinander folgenden Enden zweier Tropomyosinmoleküle gekommen. Aus diesem Grund wurden kubische Splinefunktionen zur Erzeugung der Abweichungswinkel verwendet. Mit Hilfe dieser Funktionen konnte für jedes einzelne Atom ein eigener Abweichungswinkel berechnet werden, mit welchem die axiale Position entlang des Filaments bestimmt wurde. Damit konnten alle Atome eines Aktinmonomers der Drehung entsprechend angepaßt und das Monomer somit elastisch verformt werden.

Um ein Maß für die zur Berechnung der Splinefunktion generierten Abweichungswinkel zu erhalten, wurden die von Hanson (1967), Egelman *et al.* (1982) und Bremer *et al.* (1991) gemessenen Crossoverlängen herangezogen. Die Splines wurden so erzeugt, daß die Verteilung der resultierenden Crossoverlängen eines modellierten Filaments damit vergleichbar war. Abbildung 4.2 zeigt die Verteilung der Crossoverlängen von zehn modellierten Einzelfilamenten, wie sie in dieser Arbeit zur Simulation des Aktintwists verwendet wurden.

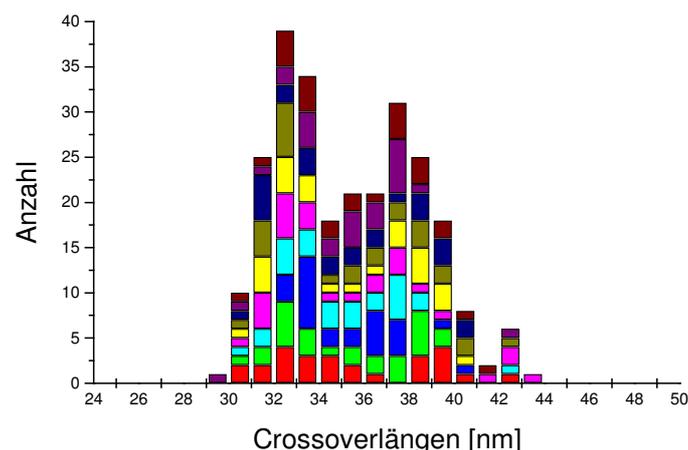


Abbildung 4.2: Verteilung der Crossoverlängen bei variablem Aktintwist, simuliert mit eindimensionalen Splinefunktionen

Die Standardabweichung der Crossoverlängen aus allen zehn Einzelfilamenten, modelliert mit eindimensionalen kubischen Splinefunktionen, beträgt 3,0 nm. Jede Farbe gibt die Crossoverlängen jeweils eines Filaments wieder.

Da aber die Abweichungswinkel aufeinander folgender Monomere durch die Verwendung der Splinekurven eine viel kleinere Standardabweichung hatten, als beim kumulativen Disorder von Egelman *et al.* (1982), ergeben sich beim Vergleich zu den hier gezeigten Ergebnissen deutliche Unterschiede in der Intensitätsverteilung eines mit kumulativem Disorder erzeugten Diffraktionsbilds (s. Abbildung 3.11). Die Intensitätsabnahme von ALL 1, 2 und 6 im Modell mit kumulativem Disorder ist größer als bei der Verwendung der Splinefunktionen. Das ist dadurch zu erklären, daß der Winkel zwischen zwei aufeinander folgenden Monomeren bei kumulativem Disorder stark in die eine oder andere Richtung abweichen kann. Dies hat eine starke Intensitätsabnahme und, wegen der gekoppelten Abweichung, eine Verbreiterung der Aktinschichtlinien zur Folge (Verformung zweiter Art). Hingegen ändern sich bei der hier verwendeten Splinefunktion die Winkel zwischen aufeinander folgenden Monomeren nur wenig und die Abweichungswinkel behalten über mehrere Monomere ihre Richtung bei. Obwohl in beiden Fällen die gleiche Verteilung der Crossoverlängen resultiert, entstehen auf den Diffraktionsbildern deutliche Unterschiede in der Intensitätsverteilung auf den Aktinschichtlinien.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die Stärke der Effekte auf einem modellierten Diffraktionsbild abhängig ist von der Methode zur Erzeugung der Unordnung in den Monomerpositionen. Anhand experimentell ermittelter Crossoverlängen können die beiden Disorderkonzepte nicht differenziert werden. Die Untersuchungen von Tsuda *et al.* (1996) und Erickson (1989) legen jedoch nahe, daß eine relativ geringe Standardabweichung der Abweichungswinkel, etwa in der hier verwendeten Größenordnung, wahrscheinlich ist.

4.2.2 Variabler Tropomyosintwist

Obwohl die verschiedenen Positionen von Tropomyosin in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration inzwischen relativ gut bestimmt worden sind (Wakabayashi, T. *et al.*, 1975, Lehman *et al.*, 1994, Xu, C. *et al.*, 1999, Lehman *et al.*, 2000), gilt das Molekül als besonders flexibel. Untersuchungen von Einzelfilamenten bei niedriger Calciumkonzentration (Narita *et al.*, 2001), sowie von Tropomyosinmolekülen im Kristall (Phillips *et al.*, 1986) ergaben, daß die C-terminale Hälfte des Moleküls am beweglichsten ist, wohingegen die Enden im Bereich der Überlappungsregion, sowie die N-terminale Hälfte rigider sind.

Änderungen des Tropomyosinverlaufs wirken sich auf dem Diffraktionsbild besonders auf die erste und zweite Aktinschichtlinie aus (Haselgrove, 1972, Huxley, H. E., 1972). Wird der azimuthale Winkel aller Tropomyosinmoleküle im Modell um den gleichen Wert verändert, führt dies in einem bestimmten Wertebereich zur entgegengesetzten Ab- bzw. Zunahme der Intensitäten von ALL 1 und 2 (s. Abschnitt 3.1.2.1). Anders ist dies beim unregelmäßigen Verlauf von Tropomyosin, welcher mit unterschiedlichen azimuthalen Winkeln entlang des Filaments einhergeht. Er führt zu einer Verbreiterung der ersten beiden Aktinschichtlinien und verringert somit ihre Peakhöhe (s. Abbildung 3.15). Genau dieser Effekt sollte im Modell erzielt werden, da die Intensitäten von ALL 1 und 2 im Vergleich zu der von ALL 6 anderenfalls deutlich zu hoch waren. Zur Vereinfachung der Simulation wurden nur die beiden Enden des Tropomyosins als Fixpunkte betrachtet, während die unterschiedliche Beweglichkeit der N- und C-terminalen Regionen nicht berücksichtigt wurde, um das Modell nicht zu kompli-

ziert werden zu lassen. Der Bereich zwischen zwei Fixpunkten wurde Gauss-verteilt zufällig in die eine oder andere Richtung ausgelenkt (s. Abschnitt 2.2.3.2).

Obwohl die im Modell verwendete Vertwistung nur klein ist, zeigt sie durchaus eine Wirkung auf die Aktinschichtlinien. Besonders ALL 2 ist davon betroffen. Ihre integrierte Intensität fällt mit dem hier verwendeten, schwachen variablen Tropomyosintwist (Vgl. Abschnitte 2.2.3.2 und 3.1.2.4) auf 95 % bzw. nach Abzug des Hintergrunds auf 88 % der integrierten Intensität ohne Twist (s. Tabelle 4.1). Quantitative Abschätzungen realer Daten sind in der Literatur bisher kaum zu finden. Squire (1975) beschreibt die Modellierung einer Tropomyosinposition, die von der Idealposition abweicht. Der Bereich für die Abweichung wird dort mit $\pm 5^\circ$ angegeben (Standardabweichung hier: $7,7^\circ$). Sehr viel größere Auslenkungen sind vermutlich nicht zu erwarten. Anderenfalls wäre die Überlappung an den Übergangsstellen von einem Molekül zum nächsten nicht mehr gewährleistet, denn je größer die Auslenkung ist, desto kleiner wird der Bereich in axialer Richtung, den das Molekül überdecken kann.

Für eine echte Abschätzung des variablen Tropomyosintwists müßte mehr über die Flexibilität des Tropomyosins bekannt sein. Zur genaueren Simulation des Verhaltens von Tropomyosin müßte außerdem die unterschiedliche Variabilität der N- bzw. C-terminalen Region des Moleküls berücksichtigt werden. Im Modell würde eine größere Variabilität der azimuthalen Position eines Moleküls oder Molekülteils am Aktinfilament, wie sie für die C-terminale Region des Tropomyosinmoleküls angenommen wird (Phillips *et al.*, 1986, Narita *et al.*, 2001), zu Intensitätsänderungen auf ALL 1 und 2 führen (Vgl. Abschnitt 1.2.2 und Abbildung 1.13). Da der Beitrag, den das Tropomyosinmolekül zur Intensitätsverteilung dieser beiden Aktinschichtlinien leistet, durch eine größere Variabilität der azimuthalen Position abnimmt, kann es sogar zu einem Intensitätsrückgang von beiden Aktinschichtlinien kommen. Dies ist abhängig davon, welche azimuthale Position das Tropomyosin am Aktinfilament einnimmt.

4.2.3 Fanning

Als Ursache für die nach außen zunehmende Breite der Schichtlinien auf dem Diffraktionsbild lassen sich Fasern, die bei der Aufnahme des Diffraktionsbilds schräg standen, identifizieren. Daß auch Myofibrillen und Aktinfilamente in gewisser Weise ungeordnet vorliegen, zeigt die Betrachtung von hochauflösenden EM-Bildern (s. Abbildung 3.17 a, b, Huxley, H. E., 1957b, Craig *et al.*, 1992, Lenart *et al.*, 1996). Kress *et al.* (1986) beschreiben für die zweite Aktinschichtlinie im kontrahierten Froschmuskel ein Fanning von 6° (FWHM).

Bei der Durchführung von Simulationen wurde das Fanning bisher kaum berücksichtigt. Eine Ausnahme bildet das Modell von Lorenz *et al.* (1993, 1995), bei dem zur Modellierung der Verbreiterung der Aktinschichtlinien auf die Erkenntnisse von Holmes und Barrington-Leigh (1974) zurückgegriffen wurde.

Da sich die Beiträge von Fasern, Myofibrillen und Aktinfilamenten nicht voneinander trennen lassen, ist nicht klar, wie groß der Anteil ist, der jeweils mit dem kurvenförmigen Filamentverlauf bzw. durch die Verkippung modelliert werden müßte. Zur Annäherung der Simulation an die experimentell ermittelten Diffraktionsbilder wurde deshalb die Krümmung der Aktinfilamente und das Schrägstehen der Myofibrillen bzw. Fasern anhand von Beispielen abgeschätzt und entsprechend simuliert (Vgl. Abbildung 3.17 a bis d). Die Parameterwerte der zur

Simulation des Fannings eingesetzten Disordertypen wurden auch anhand der resultierenden horizontalen Peakpositionen von ALL 1, 6 und 7 abgeschätzt. Da variabler Aktin- und Tropomyosintwist nicht imstande sind, die Peakpositionen zu beeinflussen (Egelman und DeRosier, 1982), geschieht dies durch die beiden anderen Disordertypen, den kurvenförmigen Verlauf der Aktinfilamente und die Verkippung, welche gleichzeitig für das Fanning verantwortlich sind. Ohne Fanning lag die Peakposition von ALL 6 im Modell ohne Disorder bei etwa $0,09 \text{ nm}^{-1}$, die von ALL 7 bei etwa $0,08 \text{ nm}^{-1}$. Beide Positionen sind damit weiter vom Meridian entfernt als die Peaks im registrierten Pattern (ALL 6: $0,08 \text{ nm}^{-1}$ bzw. ALL 7: $0,06 \text{ nm}^{-1}$, Vgl. Abbildung 3.29 a und gepunktete Linien in b). Der Wert für ALL 1 wurde mit Hilfe eines Horizontalschnitts über einen Kanal in der Mitte der Schichtlinie ermittelt. Er lag bei einem reziproken Spacing von $0,1 \text{ nm}^{-1}$ und entspricht damit den experimentellen Daten (Vgl. Tabelle 3.3). Dabei muß berücksichtigt werden, daß die Bestimmung der Peakposition von ALL 1 im Experiment aufgrund der starken Überlappung der Schichtlinie mit MLL 1 schwierig ist und deshalb nicht so genau wie die von ALL 6 und 7 sein kann. Aus diesem Grund ist der Vergleich der Peakpositionen von ALL 6 und 7 in Experiment und Modell aussagekräftiger. Durch das Fanning wurde die Intensität mit steigendem Abstand vom Meridian breiter verteilt, so daß die horizontalen Peakpositionen näher am Meridian lagen (ALL 6: $0,08 \text{ nm}^{-1}$ bzw. ALL 7: $0,055 \text{ nm}^{-1}$, Vgl. Abbildung 3.29 b, durchgezogene Linien). Der starke Fanningeffekt, hier modelliert durch eine stärkere Verkippung, führte dazu, daß die Peakpositionen näher am Meridian lagen, als das im Experiment der Fall war (ALL 6: $0,075 \text{ nm}^{-1}$ bzw. ALL 7: $0,05 \text{ nm}^{-1}$, Vgl. Abbildung 3.29 b, gestrichelte Linien).

Aufgrund der gewählten Parameterwerte führte die Verkippung allein nur zu einer schwachen Überlagerung benachbarter Schichtlinien (Vgl. Abbildung 3.23, rote Linie). Eine stärkere Verkippung war in ihrer Auswirkung auf das Diffraktionsbild mit der des simulierten Kurvenverlaufs einzelner Aktinfilamente vergleichbar (s. Abbildung 4.3). Aus diesem Grund müßte es auch möglich sein, das gesamte Fanning nur mit der Verkippung zu simulieren. Dies hätte neben einer erheblichen Verkürzung der Rechenzeit den Vorteil, daß sich Diffraktionsbilder nur noch aufgrund struktureller Unterschiede der zugrunde liegenden Aktinfilamente unterscheiden, nicht wegen des unterschiedlichen Kurvenverlaufs einzelner Aktinfilamente (Vgl. Abschnitt 3.3, s. Abbildung 3.38). Allerdings fehlt dazu eine korrekte Ermittlung der Verteilung der einzelnen Verkippwinkel. Zunächst müßte untersucht werden, ob die hier angenommene Gewichtung der Winkel, die mit Hilfe einer Gauss-Funktion vorgenommen wurde (Vgl. Abschnitte 2.2.3.3 und 3.1.2.5), die Verteilung der Winkel einzelner Myofibrillen oder Fasern korrekt wiedergibt. Außerdem müßte ermittelt werden, inwieweit die Verteilung der Winkel einzelner Abschnitte von gekrümmt verlaufenden Aktinfilamenten durch eine Gauss-Funktion abgebildet werden kann. Die quantitative Auswertung einer repräsentativen Anzahl von geeigneten elektronenmikroskopischen Aufnahmen könnte dazu dienen, einen Überblick über die tatsächlichen Krümmungen der Aktinfilamente zu erhalten, welche dann mit entsprechend simulierten Kurvenverläufen bzw. mit der Verkippung modelliert werden können.

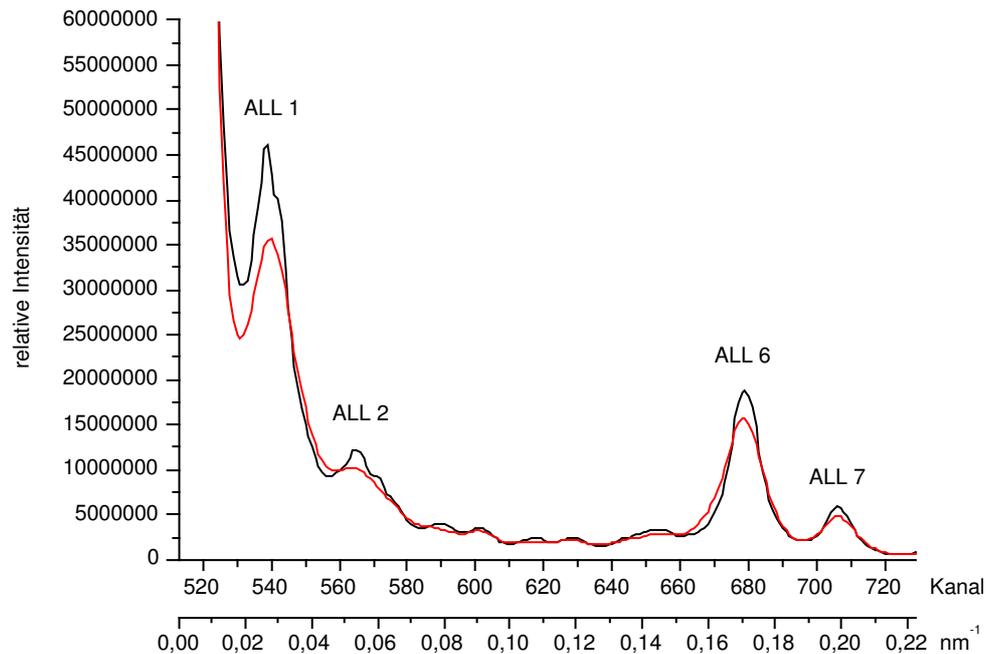


Abbildung 4.3: Vertikalschnitt über den extrameridionalen Bereich der modellierten Diffraktionspattern mit dreidimensionalen Splinekurven bzw. starker Verkippung

Schwarz: Vertikalschnitt über ein Diffraktionsbild, gemittelt aus den Intensitäten von 50 Einzelfilamenten, projiziert mit zufällig unterschiedlichem Verlauf der dreidimensionalen Splinekurven (Verlauf der roten Linie aus Abbildung 3.20). Rot: Vertikalschnitt über ein Diffraktionsbild mit einer Verkippung um ca. $\pm 10^\circ$, entsprechend der Verkippung, die bei der Erzeugung der Abbildung 3.27 eingesetzt wurde. Die Schnittbreiten entsprechen jeweils dem Bereich b aus den Abbildungen im Ergebnisteil.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, verändert sich durch das Auftreten des Fanningeffekts die Intensitätsverteilung auf dem gesamten Diffraktionsbild. Die Verbreiterung eng benachbarter Schichtlinien führt zu deren Überlappung und damit zur Entstehung eines Hintergrunds. Da zur Integration der Schichtlinienintensitäten auf experimentell ermittelten Diffraktionsbildern der Hintergrund von den Schichtlinien subtrahiert wird, muß dies beim Vergleich mit modellierten Daten dort ebenso erfolgen. Die Intensitätsverteilung des Hintergrunds hängt jedoch stark vom Ausmaß des im Modell simulierten Fannings ab, so daß das Fanning die integrierten Intensitäten der Schichtlinien stark beeinflussen kann. Aus diesem Grund ist für einen sinnvollen quantitativen Vergleich der Schichtlinienintensitäten in Experiment und Modell eine Berücksichtigung des Fannings unbedingt notwendig, unabhängig davon, ob es durch den gekrümmten Verlauf einzelner Aktinfilamente oder durch schräg angeordnete Myofibrillen oder Muskelfasern entsteht.

4.3 Unterschiede in den Diffraktionspattern von Experiment und Modell

Obwohl das Modell durch den Einsatz von Disorder den experimentellen Daten angenähert werden konnte, blieben einige Unterschiede bestehen. So konnten die integrierten Intensitäten der Aktinschichtlinien unter Relaxationsbedingungen mit dem Modell nicht exakt simuliert werden. Die integrierte Intensität von ALL 1 lag im Modell über der von ALL 6, im Experi-

ment war es umgekehrt (Vgl. Abschnitt 4.2). Um die Intensitätsverhältnisse der Aktinschichtlinien im Modell den experimentellen Daten weiter anzunähern, könnte z. B. die Gewichtung der Disordertypen, insbesondere des Fannings verändert werden (Vgl. Abschnitt 4.2.3). Dem sind jedoch durch das Abmessen des experimentell beobachteten Fannings Grenzen gesetzt. Ebenso könnte eine größere Variabilität der C-terminalen Region des Tropomyosins zu einem Intensitätsrückgang von ALL 1 und 2 führen (Vgl. Abschnitt 4.2.2). Ein starker Rückgang ist dabei jedoch nicht zu erwarten, da der variable Tropomyosintwist, der eine variable azimuthale Position des Tropomyosinmoleküls simuliert, nur einen kleinen Intensitätsabfall von ALL 1 und 2 gezeigt hat (Vgl. Abschnitt 3.1.2.4). Das Hinzufügen von Myosinköpfen ins Modell würde nicht nur zur Entstehung von Myosinschichtlinien und -reflexen führen, sondern, abhängig von der Anordnung der Myosinköpfe, auch die Intensitätsverteilung auf dem übrigen Diffraktionsbild beeinflussen. Die dabei entstehende Hintergrundstreuung könnte, wenn sie sich in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration ändert, zu einer Änderung der integrierten Intensitäten der Aktinschichtlinien führen. Aufgrund der Überlappung von ALL 1 mit MLL 1, wäre ALL 1 besonders stark davon betroffen. Dadurch, daß bei der Auswertung der Intensitätsverteilung auf den Aktinschichtlinien jeweils die integrierte Intensität nach Abzug des Hintergrunds verwendet wird, kann praktisch jede Änderung der Intensitätsverteilung auf dem Hintergrund zu einer Änderung der integrierten Intensitäten der Aktinschichtlinien führen. Hierbei spielen besonders die Fehler eine Rolle, die bei der Subtraktion des Hintergrunds gemacht werden. Beim Abschätzen des Hintergrundverlaufs wird der Fehler besonders groß, wenn die Schichtlinie, wie z. B. ALL 1, nah am Äquator liegt. Die exakte Überlappung des Äquators mit angrenzenden Schichtlinien ist oft nicht genau zu bestimmen. Wird dann der Hintergrund unter ALL 1 als lineare Verbindung vom Minimum innen zum Minimum außen angenommen, könnten Fehler bei der Bestimmung der Intensität von ALL 1 auftreten (Vgl. Abbildung 3.2). Außerdem ist die Troponinstruktur, die im Modell verwendet wurde, wegen des Fehlens einer exakten Kristallstruktur nur eine Näherung. Wenn die Molekülstruktur des Troponins vollständig geklärt ist, könnte dies im Modell zu einer Veränderung der Intensitätsverhältnisse führen, welche evtl. besser zu den experimentellen Daten paßt.

Ein weiterer Unterschied des Modells im Vergleich mit den experimentellen Daten wurde bei der Modellierung der Intensitätsänderungen beim Übergang von der niedrigen zur hohen Calciumkonzentration deutlich. Während die Simulation der Änderungen auf den Aktinschichtlinien qualitativ sehr gut gelang (s. Tabelle 3.4), war beim Vergleich der Differenzpattern von Experiment und Modell ein deutlicher Unterschied bei der Intensitätsänderung der Troponinreflexe zu sehen (Vgl. Abbildung 3.35 a und b). Sie zeigten im Experiment mit dem Wechsel von niedriger zu hoher Calciumkonzentration eine Intensitätszunahme, im Modell hingegen eine Intensitätsabnahme. Des weiteren waren Unterschiede im Bereich des Äquators zu sehen, welche sich auch auf die erste Aktinschichtlinie auswirkten.

In Abschnitt 3.3 wurde gezeigt, wie sich im Modell ein Anstieg der Intensitäten der Troponinreflexe simulieren läßt (s. Abbildung 3.37). Dem lag die Überlegung zugrunde, daß das mit Tropomyosin assoziierte Troponin, ebenso wie Tropomyosin (Milligan *et al.*, 1990, Lehman *et al.*, 1994, Lehman *et al.*, 1995) bei niedriger Calciumkonzentration eine ungeordnete Position einnehmen könnte. Eine größere Variabilität der Position von Troponin hat aufgrund der weniger geordneten Position einen Intensitätsabfall der Troponinreflexe zur Folge (Verfor-

mung erster Art). Das führt bei geeigneter Wahl der Parameterwerte dazu, daß die Troponinreflexe des Patterns mit der modellierten off-Position in ihrer Intensität unter die der modellierten on-Position fallen. Auf diese Weise konnte die Intensitätszunahme der Troponinreflexe beim Übergang von der niedrigen zur hohen Calciumkonzentration im Modell simuliert werden (s. Abbildung 3.37). Dem gezeigten Ansatz mit der variablen Troponinposition im off-Zustand scheint die Vorstellung, daß Troponin bei niedriger Calciumkonzentration das Tropomyosinmolekül ans Aktin bindet, es aber bei hoher Calciumkonzentration entläßt (Hitchcock *et al.*, 1973, Lehman *et al.*, 2001), zu widersprechen. Zwar ist nicht sicher, ob das Troponin tatsächlich eine höher geordnete Position einnimmt, wenn es im off-Zustand ans Tropomyosin gebunden ist. Li und Fajer (1994) berichten jedoch von einem stärkeren Disorder für die Position von Troponin C bei hoher Calciumkonzentration. Je nachdem, wie sich die anderen Untereinheiten des Troponins (Tn I und T) in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration verhalten, ist es trotzdem möglich, daß die Position des Troponinmoleküls im off-Zustand, insbesondere durch die Bindung an das unter diesen Bedingungen stärker randomisiert vorliegende Tropomyosin, insgesamt weniger geordnet ist, als im on-Zustand. Dadurch wäre die Intensität der Troponinreflexe im off-Zustand niedriger als im on-Zustand, wodurch der Intensitätsanstieg mit steigender Calciumkonzentration, so wie hier gezeigt, modelliert werden könnte.

Die mit der Randomisierung der Troponinposition einhergehende Verminderung der Abnahme von ALL 1 (s. Abbildung 3.37 b) stellte sich als Ungenauigkeit in der Intensitätsverteilung im Bereich des Äquators heraus. Dadurch, daß jeweils mehrere Einzelbilder mit unterschiedlichen Kurvenverläufen verwendet wurden, ergaben sich Unterschiede in den Diffraktionsbildern des modellierten off- bzw. on-Zustands. Diese waren jedoch nicht auf strukturelle Unterschiede der einzelnen, den Bildern zugrunde liegenden Aktinfilamente zurückzuführen, sondern vermutlich auf die zu geringe Anzahl gemittelter Einzelbilder. Es zeigte sich, daß mit modellierten Diffraktionsbildern ohne gekrümmten Verlauf der Aktinfilamente, aber unter Berücksichtigung der übrigen Disordertypen, der Bereich um den Äquator und die Änderung von ALL 1 deutlich besser simuliert (s. Abbildung 3.38 a und b) und damit den experimentellen Daten angenähert werden konnten (Vgl. Abbildung 3.35 a bzw. Abbildung 3.36 a).

In modellierten Differenzpattern von Abbildung 3.38 a ist, anders als im Experiment, beim Übergang vom off- in den on-Zustand neben der Zunahme von Tn 1 und 2 auch ein Intensitätsanstieg auf Tn 3 und 4 zu sehen. Schon auf den modellierten Diffraktionsbildern des off- und on-Zustands (Vgl. Abbildung 3.33, rechte Bildhälfte) waren die Troponinreflexe eins bis vier zu erkennen. Im Experiment zeigten sich aber jeweils nur Tn 1 - 3 (Vgl. Abbildung 3.33, linke Bildhälfte). Eine Variation der Troponinposition in axialer Richtung, wie sie bei der Erstellung des Differenzpatterns in Abbildung 3.37 a bzw. Abbildung 3.38 a für den off-Zustand verwendet wurde, konnte die Intensität von Tn 4 im Modell vermindern, womit eine bessere Übereinstimmung des Modells mit den experimentellen Daten erreicht wurde (s. Abbildung 3.39). Durch die Variation der Troponinposition entlang des Filaments wurde aber auch die Intensitätsverteilung auf dem übrigen Diffraktionsbild verändert. Dies führt dazu, daß die Intensitätsänderungen der Aktinschichtlinien beim Übergang von der niedrigen zur hohen Calciumkonzentration insgesamt geringer ausfallen. Die Intensitätszunahme von

ALL 6 wird dabei so klein, daß sie auf dem modellierten Differenzbild nicht mehr zu sehen ist.

Es ist bisher nicht gelungen, mit Hilfe einer Randomisierung der Troponinposition einen Anstieg der Troponinreflexe beim Übergang vom off- in den on-Zustand zu modellieren, der gleichzeitig die quantitativen Änderungen auf den Aktinschichtlinien entsprechend den experimentellen Daten wiedergeben kann. Da die Intensitätsverteilung auf einem Diffraktionsbild nicht nur durch die strukturellen Eigenschaften der modellierten Moleküle beeinflusst wird, sondern auch durch die Position und deren Variabilität, gibt es eine große Anzahl verschiedener Parameter, die zur Verbesserung des Modells variiert werden können.

4.4 Einordnung der Ergebnisse in gängige Modellvorstellungen

Quantitative Angaben zu den Intensitäten der Aktinschichtlinien unter Relaxationsbedingungen sind selten und meist ohne zahlenmäßige Auswertung der Intensitäten zu finden (Xu, S. *et al.*, 2002). Um einen Überblick über die relativen Intensitäten zu gewinnen, wurden in dieser Arbeit die Aktinschichtlinienintensitäten im Relaxationspattern bei einer Ionenstärke von $\mu = 170$ mM ermittelt. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit bereits früher ermittelten Werten, die bei einer Ionenstärke von $\mu = 80$ mM gemessen worden waren (Kraft *et al.*, 2002). Xu *et al.* (Xu, S. *et al.*, 2002) zeigen zwar den Verlauf von MLL 1, ALL 1 und ALL 6, die quantitative Auswertung geht jedoch nicht auf die Intensitäten der einzelnen Schichtlinien ein. Eine grobe Abschätzung läßt vermuten, daß dort die Intensität von ALL 1 im Größenordnungsbe- reich der von ALL 6 liegt ($\mu = 27$ mM).

Das generierte Modell stellt insofern eine Neuerung dar, als versucht wurde, die relativen Intensitäten der Aktinschichtlinien auf einem Pattern unter Hinzunahme eines Troponinmoleküls zu simulieren. Bisher wurden die Auswirkungen des Troponinmoleküls auf die Aktinschichtlinien bei der Erstellung von Modellen kaum berücksichtigt (Vgl. Haselgrove, 1972, Egelman, 1985, Wakabayashi, K. *et al.*, 1988, Yagi und Matsubara, 1988, Yagi und Matsubara, 1989, Squire *et al.*, 1993, al-Khayat *et al.*, 1995).

In dieser Arbeit wurden Intensitätsänderungen der Aktinschichtlinien eins, zwei und sechs beim Anstieg der Calciumkonzentration Out of Overlap im Experiment ermittelt. Die Abnahme von ALL 1 und die Zunahme von ALL 2 wird allgemein bestätigt (Huxley, H. E., 1972, Kress *et al.*, 1986, Yagi und Matsubara, 1989). Dagegen ist eine Intensitätszunahme von ALL 6 nicht unumstritten. Von Wakabayashi *et al.* (Wakabayashi, K. *et al.*, 1988, Wakabayashi, K. *et al.*, 1991) wurde keine Änderung der Intensität von ALL 6 bei steigender Calciumkonzentration gefunden. Dem stehen die Ergebnisse von Kress *et al.* und Yagi und Matsubara (Kress *et al.*, 1986, Yagi und Matsubara, 1989) gegenüber, welche zeigen, daß die Intensität der sechsten Aktinschichtlinie mit Erhöhung der Calciumkonzentration zunimmt. Hinsichtlich der Ursache für die Intensitätszunahme gibt es unterschiedliche Meinungen. Häufig wird angeführt, die stereospezifische Bindung von S1-Köpfen verursache den Anstieg auf ALL 6, da trotz Überdehnung ein kleiner Rest von Myosinköpfen mit dem Aktinfilament überlappe und so für den Anstieg Sorge (Parry und Squire, 1973, Wakabayashi, K. *et al.*, 1988). Da bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zur Registrierung der Pattern Out of Overlap ein ATP γ S-haltiges Medium verwendet wurde (Vgl. Abschnitt 2.1.2), konnte

selbst im Falle einer Restüberlappung die stereospezifische Bindung von S1-Köpfen ausgeschlossen werden. Als Nukleotidanalogen für die schwache Bindung verhindert ATP γ S auch bei einer hohen Calciumkonzentration die stereospezifische Bindung der S1-Köpfe ans Aktin (Kraft *et al.*, 1992). Bei Experimenten mit rekonstituierten Aktinfilamenten kann eine Bindung von Myosinköpfen völlig ausgeschlossen werden. Solche Daten erhält man z. B. durch Diffraktionsbilder von dreidimensionalen Rekonstruktionen, denen EM-Aufnahmen mit negativem Kontrast (Lehman *et al.*, 1994) oder kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen (Xu, C. *et al.*, 1999) einzelner Filamente zugrunde lagen. Aber auch hier zeigen sich Unterschiede. Bei Lehman *et al.* (Lehman *et al.*, 1994) nimmt die Intensität von ALL 6 mit Erhöhung der Calciumkonzentration zu, bei Xu *et al.* (Xu, C. *et al.*, 1999) fällt sie leicht ab. Die auf solche Weise ermittelten Schichtlinienintensitäten sind jedoch nicht direkt mit denen in dieser Arbeit vergleichbar. Häufig werden für die Auswertung Parakristalle eingesetzt, oder es werden nur Bildausschnitte von geraden Filamentabschnitten verwendet, bzw. der Helixverlauf wird rechnerisch korrigiert (Bremer *et al.*, 1991, Xu, C. *et al.*, 1999). Er wird dabei z. B. durch Splinefunktionen angenähert und die Krümmung entsprechend zurückgerechnet, so daß ein gerader Verlauf des Filaments entsteht (DeRosier und Moore, 1970, Moore *et al.*, 1970, Egelman, 1986). Dies ist zwar für die Berechnung der Massenverteilung im Filament von Vorteil, verhindert jedoch gleichzeitig einen sinnvollen Vergleich mit Diffraktionsdaten die von vollständigen Fasern mit teilweise gekrümmten Verläufen gewonnen wurden.

Als eine weitere Möglichkeit, den in dieser Arbeit gezeigten Intensitätsanstieg von ALL 6 beim Übergang von der niedrigen zur hohen Calciumkonzentration Out of Overlap zu modellieren, wurde auch eine Positionsänderung einzelner Untereinheiten des Aktins („actin subdomain movements“), zusammen mit einer azimuthalen Verschiebung von Tropomyosin postuliert (Wakabayashi, K. *et al.*, 1988, Squire *et al.*, 1993, al-Khayat *et al.*, 1995). Dabei wurde jedoch ein möglicher Beitrag des Troponinmoleküls nicht berücksichtigt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß ein Anstieg von ALL 6 auch durch eine azimuthale Verschiebung von Tropomyosin, zusammen mit einer Umlagerung von Troponin simuliert werden kann. Eine strukturelle Änderung der Aktinmonomere war dazu nicht notwendig, kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden.

4.4.1 Positionsänderung von Tropomyosin und Troponin

Es ist allgemein akzeptiert, daß das Tropomyosinmolekül während der Aktivierung des Muskels eine azimuthale Positionsänderung durchläuft. Die publizierte Anfangs- und Endposition, sowie das Ausmaß der Winkeländerung weichen hingegen teilweise erheblich voneinander ab, wahrscheinlich aufgrund der jeweils verwendeten, unterschiedlichen Untersuchungsmethoden (Vgl. Holmes *et al.*, 1993, Lehman *et al.*, 1994, Poole *et al.*, 1994, Poole *et al.*, 1995, Vibert *et al.*, 1997, Lehman *et al.*, 2000, Narita *et al.*, 2001, Bacchicchi und Lehrer, 2002). In einigen Untersuchungen werden dem Tropomyosinmolekül relativ große azimuthale Winkeländerungen zugeschrieben (z. B. Poole *et al.*, 1994: 25°, Poole *et al.*, 1995: 30°), während in anderen viel kleinere Verschiebungen in Betracht gezogen werden, die mit der in dieser Arbeit gezeigten Winkeländerung von Tropomyosin besser übereinstimmen (z. B. Narita *et al.*, 2001: ca. 16° am N-terminalen Ende, Bacchicchi und Lehrer, 2002: 17°). Allgemein gilt

die Vorstellung, daß die S1-Bindestellen bei niedriger Calciumkonzentration von Tropomyosin verdeckt sind und bei einer Konzentrationserhöhung freigegeben werden (Haselgrove, 1972, Huxley, H. E., 1972, Parry und Squire, 1973). In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß eine relativ kleine Änderung des azimuthalen Winkels von Tropomyosin (10°), zusammen mit einer Positions- und Strukturänderung von Troponin ausreicht, um die Änderungen auf den Schichtlinien beim Übergang von der niedrigen zur hohen Calciumkonzentration qualitativ zu simulieren. Die weiter außen am Aktin liegenden Bindestellen für die schwache Interaktion mit dem Myosinkopf („weak binding sites“) sind bereits im off-Zustand für das S1 zugänglich, während die Bindestellen für die starken Interaktionen („strong binding sites“) noch durch das Tropomyosin verdeckt sind (Lehman *et al.*, 1995). Beim Übergang vom off- in den on-Zustand wird dann Tropomyosin durch Troponin von seiner Position am Aktinfilament entlassen, bewegt sich zur Seite und gibt einen Teil der Strong Binding Sites frei (Lehman *et al.*, 1995), wie in Abbildung 4.4 dargestellt (Vgl. Abbildung 3.31, Position der Bindestellen, s. Vibert *et al.*, 1997).

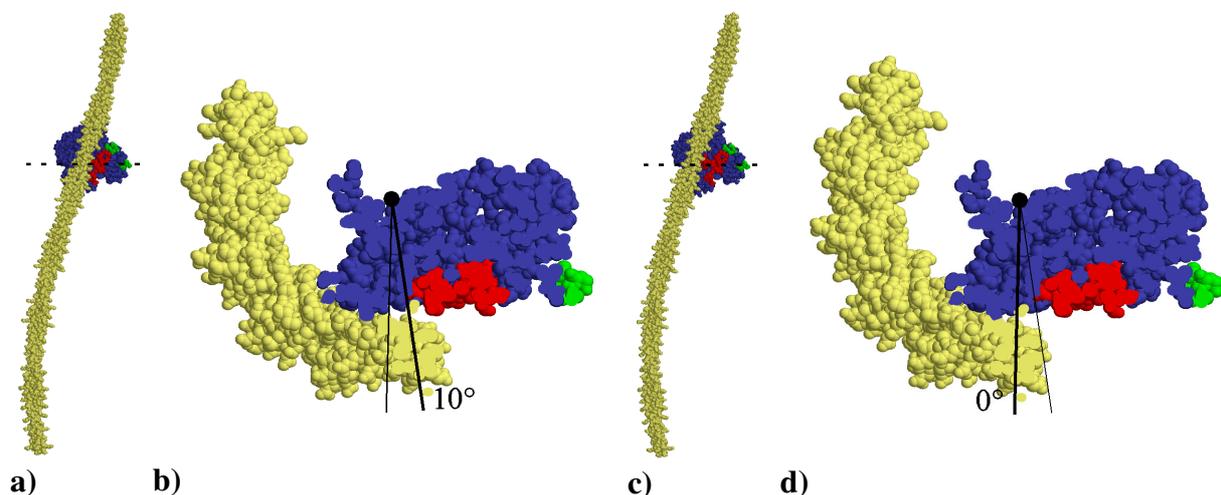


Abbildung 4.4: Tropomyosinposition am Aktinmonomer im on- und off-Zustand

a) und b) Aktinmonomer mit Tropomyosin im off-Zustand, c) und d) im on-Zustand. Zur besseren Übersicht wurde jeweils nur ein Aktinmonomer (blau) und ein Tropomyosindoppelstrang (gelb) abgebildet. Die oberen Tropomyosinenden in a) und c) zeigen zur Z-Scheibe, die unteren zur M-Linie. b) und d) Querschnitte durch die Aktinmonomere aus a) bzw. c). Der Blick fällt jeweils auf die Schnittstelle, wobei nur der untere Teil des Tropomyosinmoleküls sichtbar ist. Die Schnittstellen sind durch die gestrichelten Linien in a) bzw. c) markiert. Grün: Bindestellen für die schwachen Interaktionen des S1-Kopfs am Aktin, rot: Bindestellen für die starken Interaktionen. Die schwarzen Punkte in b) und d) geben die Position der z-Achse an. Der azimuthale Winkel des Tropomyosins beträgt relativ zum Modell von Lorenz *et al.* (1995) 10° in der off-Position, bzw. 0° in der on-Position. Die Winkelunterschiede des Tropomyosins sind in b) und d) anhand der schwarzen Linien zu erkennen. Dabei entspricht die dickere Linie in b) der dünneren in d) und umgekehrt. Die Graphiken wurden mit dem Programm RASMOL (Sayle und Milner-White, 1995) erzeugt.

Die Abbildung zeigt, daß die Weak Binding Sites (grün) frei sind, wenn sich das Tropomyosin in der hier modellierten off-Position befindet (a, b). Nach dem Übergang in den modellierten on-Zustand (c, d) liegen die Strong Binding Sites (rot) zwar schon frei, sie können aber aufgrund sterischer Hinderung noch nicht vollständig vom S1-Kopf erreicht werden. Erst eine weitere azimuthale Positionsänderung von Tropomyosin läßt die stereospezifische, hochaffine Bindung des Myosinkopfs ans Aktin zu (Phillips *et al.*, 1986, McKillop und Geeves, 1993, Vibert *et al.*, 1997).

4.5 Ausblick

Außer der genaueren Darstellung des Troponinmoleküls und der exakteren Bestimmung der Anteile der einzelnen Disordertypen an der Simulation, gibt es noch andere Möglichkeiten, das Modell für den Vergleich mit experimentellen Daten realistischer zu gestalten.

Um Daten interpretieren zu können, welche bei nativer Sarkomerenlänge (ca. 2,4 μm), also mit evtl. gebundenen Myosinköpfen aufgenommen wurden, ist zur Analyse der Aktinschichtlinien die Simulation der S1-Köpfe notwendig. Diese verändern durch ihre Bindung ans Aktinfilament die Intensitäten der Aktinschichtlinien auf dem Diffraktionsbild. Außerdem entstehen so die Beiträge zu den Meridionalreflexen des Myosins und die Myosinschichtlinien (Vgl. Abbildung 1.8 b). Beide zusammen geben Aufschluß über die Anordnung und Form der Myosinköpfe. Im Programm, welches im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurde (s. Fußnote S. 39), ist die Möglichkeit der Integration von S1-Köpfen bereits vorgesehen. Der Vergleich des Modells mit experimentell unter Rigorbedingungen ermittelten Röntgendiffraktionsbildern könnte klären, welche azimuthale Position das Tropomyosin bei angeheftetem S1-Kopf einnimmt.

Eine realistische Simulation des Äquators kann nur durch Hinzufügen eines Myosinrückgrats zum Modell entstehen. Zusammen mit den Aktinfilamenten könnte durch die Anordnung von dicken und dünnen Filamenten im hexagonalen Gitter die Modulation auf dem Äquator simuliert werden. Die starre Anordnung einzelner Filamente führt jedoch zu einer starken Modulation der Schichtlinien in horizontaler Richtung, wodurch ein Gittereffekt entsteht. Er kommt auf den experimentell ermittelten Röntgendiffraktionsbildern wegen der Variabilität der Positionen von Myosin- und Aktinfilamenten (Vgl. Abbildung 3.17 a) nicht vor und ist daher in der Simulation unerwünscht. Durch die Modellierung unterschiedlich gekrümmter Filamente, wie sie in dieser Arbeit mit dem Verlauf der Aktinfilamente entlang von dreidimensionalen Splinekurven gezeigt wurde, zusammen mit einer variablen Gitterposition, könnte dieser „unnatürlich“ erworbene Gittereffekt jedoch zum Verschwinden gebracht werden. Damit ließe sich gleichzeitig das Ausmaß der Unordnung im realen Muskel abschätzen.

Literatur

- al-Khayat, H. A., Yagi, N. und Squire, J. M. (1995). "Structural changes in actin-tropomyosin during muscle regulation: computer modelling of low-angle X-ray diffraction data." *J Mol Biol* 252(5): 611-32.
- Bacchiocchi, C. und Lehrer, S. S. (2002). "Ca(2+)-induced movement of tropomyosin in skeletal muscle thin filaments observed by multi-site FRET." *Biophys J* 82(3): 1524-36.
- Bremer, A., Millonig, R. C., Sutterlin, R., Engel, A., Pollard, T. D. und Aebi, U. (1991). "The structural basis for the intrinsic disorder of the actin filament: the "lateral slipping" model." *J Cell Biol* 115(3): 689-703.
- Brenner, B. (1983). "Technique for stabilizing the striation pattern in maximally calcium-activated skinned rabbit psoas fibers." *Biophys J* 41(1): 99-102.
- Brenner, B., Chalovich, J. M., Greene, L. E., Eisenberg, E. und Schoenberg, M. (1986). "Stiffness of skinned rabbit psoas fibers in MgATP and MgPPi solution." *Biophys J* 50(4): 685-91.
- Brenner, B., Schoenberg, M., Chalovich, J. M., Greene, L. E. und 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.
- Cooke, R. und Franks, K. (1980). "All myosin heads form bonds with actin in rigor rabbit skeletal muscle." *Biochemistry* 19(10): 2265-9.
- Cooley, J. und Tukey, J. (1965). "An algorithm for machine calculation of complex Fourier series." *Math. Comput.* 19: 297-301.
- Craig, R., Alamo, L. und Padron, R. (1992). "Structure of the myosin filaments of relaxed and rigor vertebrate striated muscle studied by rapid freezing electron microscopy." *J Mol Biol* 228(2): 474-87.
- DeRosier, D. J. und Moore, P. B. (1970). "Reconstruction of three-dimensional images from electron micrographs of structures with helical symmetry." *J Mol Biol* 52(2): 355-69.
- Djinovic-Carugo, K., Young, P., Gautel, M. und Saraste, M. (1999). "Structure of the alpha-actinin rod: molecular basis for cross-linking of actin filaments." *Cell* 98(4): 537-46.
- Ebashi, S. und Endo, M. (1968). "Calcium ion and muscle contraction." *Prog Biophys Mol Biol* 18: 123-83.
- Egelman, E. H. (1985). "The structure of F-actin." *J Muscle Res Cell Motil* 6(2): 129-51.
- Egelman, E. H. (1986). "An algorithm for straightening images of curved filamentous structures." *Ultramicroscopy* 19(4): 367-73.
- Egelman, E. H. und DeRosier, D. J. (1982). "The Fourier Transform of Actin and Other Helical Systems With Cumulative Random Angular Disorder." *Acta Crystallogr A* 38: 796-799.
- Egelman, E. H. und DeRosier, D. J. (1992). "Image analysis shows that variations in actin crossover spacings are random, not compensatory." *Biophys J* 63(5): 1299-305.
- Egelman, E. H., Francis, N. und DeRosier, D. J. (1982). "F-actin is a helix with a random variable twist." *Nature* 298(5870): 131-5.

- Egelman, E. H. und Padron, R. (1984). "X-ray diffraction evidence that actin is a 100 Å filament." *Nature* 307(5): 56-58.
- Eisenberg, E. und Greene, L. E. (1980). "The relation of muscle biochemistry to muscle physiology." *Annu Rev Physiol* 42: 293-309.
- Eisenberg, E. und Hill, T. L. (1985). "Muscle contraction and free energy transduction in biological systems." *Science* 227(4690): 999-1006.
- Elliott, A. und Offer, G. (1978). "Shape and flexibility of the myosin molecule." *J Mol Biol* 123(4): 505-19.
- Erickson, H. P. (1989). "Co-operativity in protein-protein association. The structure and stability of the actin filament." *J Mol Biol* 206(3): 465-74.
- Geeves, M. A., Goody, R. S. und 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.
- Greaser, M. L. und Gergely, J. (1971). "Reconstitution of troponin activity from three protein components." *J Biol Chem* 246(13): 4226-33.
- Greaser, M. L. und Gergely, J. (1973). "Purification and properties of the components from troponin." *J Biol Chem* 248(6): 2125-33.
- Hanson, J. (1967). "Axial period of actin filaments." *Nature* 213: 353-56.
- Hanson, J. und Lowy, J. (1963). "The structure of f-actin and of actin filaments isolated from muscle." *J Mol Biol* 6: 46-60.
- Harford, J. und Squire, J. (1986). "'Crystalline' myosin cross-bridge array in relaxed bony fish muscle. Low-angle x-ray diffraction from plaice fin muscle and its interpretation." *Biophys J* 50(1): 145-55.
- Harford, J. und Squire, J. (1997). "Time-resolved diffraction studies of muscle using synchrotron radiation." *Rep. Prog. Phys.*: 1723-1787.
- Haselgrove, J. C. (1972). "X-ray evidence for a conformational change in the actin-containing filaments of vertebrate striated muscle." *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37: 341-352.
- Hitchcock, S. E. (1975). "Regulation of muscle contraction: bindings of troponin and its components to actin and tropomyosin." *Eur J Biochem* 52(2): 255-63.
- Hitchcock, S. E., Huxley, H. E. und Szent-Gyorgyi, A. G. (1973). "Calcium sensitive binding of troponin to actin-tropomyosin: a two-site model for troponin action." *J Mol Biol* 80(4): 825-36.
- Holmes, K. C. und Barrington-Leigh, J. (1974). "The effect of disorientation on the intensity distribution of non-crystalline fibres. I. theory." *Acta Crystallogr A* 30: 635-638.
- Holmes, K. C. und Blow, D. M. (1966). The use of x-ray diffraction in the study of protein and nucleic acid structure. *Methods of biochemical analysis*. Glick, D. New York, London, Sydney, Interscience Publishers a division of John Wiley & Sons. XIII: 113 - 235.
- Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W. und Kabsch, W. (1990). "Atomic model of the actin filament." *Nature* 347(6288): 44-9.
- Holmes, K. C., Tirion, M., Popp, D., Lorenz, M., Kabsch, W. und Milligan, R. A. (1993). "A comparison of the atomic model of F-actin with cryo-electron micrographs of actin and decorated actin." *Adv Exp Med Biol* 332: 15-22; discussion 22-4.

- Holtzer, A., Clark, R. und Lowey, S. (1965). "The conformation of native and denatured tropomyosin B." *Biochemistry* 4: 2401-2411.
- Hoschek, J. und Lasser, D. (1992). *Grundlagen der geometrischen Datenverarbeitung*. Stuttgart, B. G. Teubner.
- Huxley, A. F. (1957a). "Muscle structure and theories of contraction." *Prog Biophys Biophys Chem* 7: 255-318.
- Huxley, A. F. und Niedergerke, R. (1954). "Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres." *Nature* 173(4412): 971-3.
- Huxley, H. E. (1956). "Die Muskelkontraktion." *Endeavour* 15: 177-188.
- Huxley, H. E. (1957b). "The double array of filaments in cross-striated muscle." *J Biophys Biochem Cytol* 3(5): 631-48.
- Huxley, H. E. (1971). "Structural changes during muscle contraction." *Biochem J* 125(4): 85P.
- Huxley, H. E. (1972). "Structural changes in the actin- and myosin-containing filaments during contraction." *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37: 361-376.
- Huxley, H. E. und Brown, W. (1967). "The low-angle x-ray diagram of vertebrate striated muscle and its behaviour during contraction and rigor." *J Mol Biol* 30(2): 383-434.
- Huxley, H. E. und Hanson, J. (1954). "Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation." *Nature* 173: 973-976.
- Iwamoto, H., Wakayama, J., Fujisawa, T. und Yagi, N. (2003). "Static and dynamic x-ray diffraction recordings from living Mammalian and amphibian skeletal muscles." *Biophys J* 85(4): 2492-506.
- Kabsch, W., Mannherz, H. G. und Suck, D. (1985). "Three-dimensional structure of the complex of actin and DNase I at 4.5 Å resolution." *Embo J* 4(8): 2113-8.
- Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F. und Holmes, K. C. (1990). "Atomic structure of the actin:DNase I complex." *Nature* 347(6288): 37-44.
- Kabsch, W. und Vandekerckhove, J. (1992). "Structure and function of actin." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 21: 49-76.
- Koubassova, N. A. und Tsaturyan, A. K. (2002). "Direct modeling of x-ray diffraction pattern from skeletal muscle in rigor." *Biophys J* 83(2): 1082-97.
- Kraft, T., Chalovich, J. M., Yu, L. C. und 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.
- Kraft, T., Mattei, T., Radocaj, A., Piep, B., Nocola, C., Furch, M. und Brenner, B. (2002). "Structural features of cross-bridges in isometrically contracting skeletal muscle." *Biophys J* 82(5): 2536-47.
- Kraft, T., Xu, S., Brenner, B. und Yu, L. C. (1999). "The effect of thin filament activation on the attachment of weak binding cross-bridges: A two-dimensional x-ray diffraction study on single muscle fibers." *Biophys J* 76(3): 1494-513.

- Kraft, T., Yu, L. C., Kuhn, H. J. und Brenner, B. (1992). "Effect of Ca^{2+} 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.
- Kress, M., Huxley, H. E., Faruqi, A. R. und Hendrix, J. (1986). "Structural changes during activation of frog muscle studied by time-resolved X-ray diffraction." *J Mol Biol* 188(3): 325-42.
- Lehman, W., Craig, R. und Vibert, P. (1994). " Ca^{2+} -induced tropomyosin movement in Limulus thin filaments revealed by three-dimensional reconstruction." *Nature* 368(6466): 65-7.
- Lehman, W., Hatch, V., Korman, V., Rosol, M., Thomas, L., Maytum, R., Geeves, M. A., Van Eyk, J. E., Tobacman, L. S. und Craig, R. (2000). "Tropomyosin and actin isoforms modulate the localization of tropomyosin strands on actin filaments." *J Mol Biol* 302(3): 593-606.
- Lehman, W., Rosol, M., Tobacman, L. S. und Craig, R. (2001). "Troponin organization on relaxed and activated thin filaments revealed by electron microscopy and three-dimensional reconstruction." *J Mol Biol* 307(3): 739-44.
- Lehman, W., Vibert, P., Uman, P. und Craig, R. (1995). "Steric-blocking by tropomyosin visualized in relaxed vertebrate muscle thin filaments." *J Mol Biol* 251(2): 191-6.
- Lehrer, S. S. und Geeves, M. A. (1998). "The muscle thin filament as a classical cooperative/allosteric regulatory system." *J Mol Biol* 277(5): 1081-9.
- Lehrer, S. S. und Morris, E. P. (1982). "Dual effects of tropomyosin and troponin-tropomyosin on actomyosin subfragment 1 ATPase." *J Biol Chem* 257(14): 8073-80.
- Lenart, T. D., Murray, J. M., Franzini-Armstrong, C. und Goldman, Y. E. (1996). "Structure and periodicities of cross-bridges in relaxation, in rigor, and during contractions initiated by photolysis of caged Ca^{2+} ." *Biophys J* 71(5): 2289-306.
- Li, H. C. und Fajer, P. G. (1994). "Orientational changes of troponin C associated with thin filament activation." *Biochemistry* 33(47): 14324-32.
- Lorenz, M., Poole, K. J., Popp, D., Rosenbaum, G. und Holmes, K. C. (1995). "An atomic model of the unregulated thin filament obtained by X-ray fiber diffraction on oriented actin-tropomyosin gels [published erratum appears in J Mol Biol 1995 Jun 2;249(2):509]." *J Mol Biol* 246(1): 108-19.
- Lorenz, M., Popp, D. und Holmes, K. C. (1993). "Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm." *J Mol Biol* 234(3): 826-36.
- Lovell, S. J. und Harrington, W. F. (1981). "Measurement of the fraction of myosin heads bound to actin in rabbit skeletal myofibrils in rigor." *J Mol Biol* 149(4): 659-74.
- Lowey, S. und Cohen, C. (1962). "Studies on the structure of myosin." *J Mol Biol* 4: 293-308.
- Lowey, S., Slayter, H. S., Weeds, A. G. und Baker, H. (1969). "Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation." *J Mol Biol* 42(1): 1-29.
- Lymn, R. W. und Taylor, E. W. (1971). "Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin." *Biochemistry* 10(25): 4617-24.

- Margossian, S. S., Stafford, W. F., 3rd und Lowey, S. (1981). "Homogeneity of myosin subfragments by equilibrium centrifugation." *Biochemistry* 20(8): 2151-5.
- McKillop, D. F. und Geeves, M. A. (1993). "Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament." *Biophys J* 65(2): 693-701.
- McLachlan, A. D. und Stewart, M. (1975). "Tropomyosin coiled-coil interactions: evidence for an unstaggered structure." *J Mol Biol* 98(2): 293-304.
- Mendelson, R. A. und Morris, E. (1994). "The structure of F-actin. Results of global searches using data from electron microscopy and X-ray crystallography." *J Mol Biol* 240(2): 138-54.
- Milligan, R. A. und Flicker, P. F. (1987). "Structural relationships of actin, myosin, and tropomyosin revealed by cryo-electron microscopy." *J Cell Biol* 105(1): 29-39.
- Milligan, R. A., Whittaker, M. und Safer, D. (1990). "Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites." *Nature* 348(6298): 217-21.
- Moore, P. B., Huxley, H. E. und DeRosier, D. J. (1970). "Three-dimensional reconstruction of F-actin, thin filaments and decorated thin filaments." *J Mol Biol* 50(2): 279-95.
- Mu, X. Q., Makowski, L. und Fairchild, B. M. (1997). "X-ray diffraction from a helix of any length that displays cumulative azimuthal disorder." *Acta Crystallogr A* 53(Pt 1): 55-62.
- Narita, A., Yasunaga, T., Ishikawa, T., Mayanagi, K. und Wakabayashi, T. (2001). "Ca(2+)-induced switching of troponin and tropomyosin on actin filaments as revealed by electron cryo-microscopy." *J Mol Biol* 308(2): 241-61.
- Nonomura, Y., Drabikowski, W. und Ebashi, S. (1968). "The localization of troponin in tropomyosin paracrystals." *J Biochem (Tokyo)* 64(3): 419-22.
- O'Brien, E. J., Bennett, P. M. und Hanson, J. (1971). "Optical diffraction studies of myofibrillar structure." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 261(837): 201-8.
- Ohtsuki, I. und Shiraishi, F. (2002). "Periodic binding of troponin C.I and troponin I to tropomyosin-actin filaments." *J Biochem (Tokyo)* 131(5): 739-43.
- Ooi, T. und Fujime-Higashi, S. (1971). "Structure of tropomyosin and its crystal." *Adv Biophys* 2: 113-53.
- Parry, D. A. und Squire, J. M. (1973). "Structural role of tropomyosin in muscle regulation: analysis of the x-ray diffraction patterns from relaxed and contracting muscles." *J Mol Biol* 75(1): 33-55.
- Phillips, G. N., Jr., Fillers, J. P. und Cohen, C. (1986). "Tropomyosin crystal structure and muscle regulation." *J Mol Biol* 192(1): 111-31.
- Poole, K. J. V., Holmes, K. C., Evans, G., Rosenbaum, G., Rayment, I. und Lorenz, M. (1995). "Control of the Actomyosin Interaction." *Biophys. J.* 68: 348s.
- Poole, K. J. V., Lorenz, M., Evans, G., Rosenbaum, G. und Holmes, K. C. (1994). "The effect of calcium on the regulated thin filament structure." *Biophys J* A 347.
- Potter, J. D. und Gergely, J. (1974). "Troponin, tropomyosin, and actin interactions in the Ca²⁺ regulation of muscle contraction." *Biochemistry* 13(13): 2697-703.

- Rayment, I., Holden, H. M., Whittaker, M., Yohn, C. B., Lorenz, M., Holmes, K. C. und Milligan, R. A. (1993a). "Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction." *Science* 261(5117): 58-65.
- Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D. R., Benning, M. M., Winkelmann, D. A., Wesenberg, G. und Holden, H. M. (1993b). "Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor." *Science* 261(5117): 50-8.
- Rowe, A. J. (1964). "The Contractile Proteins of Skeletal Muscle." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 160: 437-41.
- Saijo, Y., Takeda, S., Scherer, A., Kobayashi, T., Maeda, Y., Taniguchi, H., Yao, M. und Wakatsuki, S. (1997). "Production, crystallization, and preliminary X-ray analysis of rabbit skeletal muscle troponin complex consisting of troponin C and fragment (1-47) of troponin I." *Protein Sci* 6(4): 916-8.
- Satyshur, K. A., Rao, S. T., Pyzalska, D., Drendel, W., Greaser, M. und Sundaralingam, M. (1988). "Refined structure of chicken skeletal muscle troponin C in the two-calcium state at 2-Å resolution." *J Biol Chem* 263(4): 1628-47.
- Sayle, R. A. und Milner-White, E. J. (1995). "RASMOL: biomolecular graphics for all." *Trends Biochem Sci* 20(9): 374.
- Sodek, J., Hodges, R. S., Smillie, L. B. und Jurasek, L. (1972). "Amino-acid sequence of rabbit skeletal tropomyosin and its coiled-coil structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* 69(12): 3800-4.
- Squire, J. (1981). *The structural basis of muscular contraction*. New York and London, Plenum Press.
- Squire, J., Cantino, M., Chew, M., Denny, R., Harford, J., Hudson, L. und Luther, P. (1998). "Myosin rod-packing schemes in vertebrate muscle thick filaments." *J Struct Biol* 122(1-2): 128-38.
- Squire, J. M. (1975). "Muscle filament structure and muscle contraction." *Annu Rev Biophys Bioeng* 4(00): 137-63.
- Squire, J. M., Al-Khayat, H. A. und Yagi, N. (1993). "Muscle thin-filament structure and regulation: Actin sub-domain movements and the tropomyosin shift modelled from low-angle x-ray diffraction." *J Chem Soc Faraday Trans* 89(15): 2717-2726.
- Stein, L. A., Schwarz, R. P., Jr., Chock, P. B. und 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.
- Stewart, M. (1975). "The location of the troponin binding site on tropomyosin." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 190(1099): 257-66.
- Stone, D. und Smillie, L. B. (1978). "The amino acid sequence of rabbit skeletal alpha-tropomyosin. The NH₂-terminal half and complete sequence." *J Biol Chem* 253(4): 1137-48.
- Stryer, L. (1995). *Biochemie*. Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

- Sundaralingam, M., Bergstrom, R., Strasburg, G., Rao, S. T., Roychowdhury, P., Greaser, M. und Wang, B. C. (1985). "Molecular structure of troponin C from chicken skeletal muscle at 3-angstrom resolution." *Science* 227(4689): 945-8.
- Takeda, S., Yamashita, A., Maeda, K. und Maeda, Y. (2003). "Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca(2+)-saturated form." *Nature* 424(6944): 35-41.
- Tsuda, Y., Yasutake, H., Ishijima, A. und Yanagida, T. (1996). "Torsional rigidity of single actin filaments and actin-actin bond breaking force under torsion measured directly by in vitro micromanipulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(23): 12937-42.
- Tung, C. S., Wall, M. E., Gallagher, S. C. und Trewthella, J. (2000). "A model of troponin-I in complex with troponin-C using hybrid experimental data: the inhibitory region is a beta-hairpin." *Protein Sci* 9(7): 1312-26.
- Vainshtein, B. K. (1966). *Diffraction of x-rays by chain molecules*. Amsterdam, London, New York, Elsevier Publishing Company.
- Vassilyev, D. G., Takeda, S., Wakatsuki, S., Maeda, K. und Maeda, Y. (1998). "Crystal structure of troponin C in complex with troponin I fragment at 2.3-A resolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(9): 4847-52.
- Vibert, P., Craig, R. und Lehman, W. (1997). "Steric-model for activation of muscle thin filaments." *J Mol Biol* 266(1): 8-14.
- Voet, D. und Voet, J. G. (1992). *Biochemie*. Weinheim (Bundesrepublik Deutschland), VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Wagner, P. D. und Giniger, E. (1981). "Hydrolysis of ATP and reversible binding to F-actin by myosin heavy chains free of all light chains." *Nature* 292(5823): 560-2.
- Wakabayashi, K. und Amemiya, Y. (1991). Progress in x-ray synchrotron diffraction studies of muscle contraction. *Handbook on synchrotron radiation*. Ebashi, S., Koch, M. und Rubenstein, E. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, North-Holland. 4: 597-678.
- Wakabayashi, K., Tanaka, H., Saito, H., Moriwaki, N., Ueno, Y. und Amemiya, Y. (1991). "Dynamic X-ray diffraction of skeletal muscle contraction: structural change of actin filaments." *Adv Biophys* 27: 3-13.
- Wakabayashi, K., Ueno, Y., Amemiya, Y. und Tanaka, H. (1988). "Intensity changes of actin-based layer lines from frog skeletal muscles during an isometric contraction." *Adv Exp Med Biol* 226: 353-67.
- Wakabayashi, T., Huxley, H. E., Amos, L. A. und Klug, A. (1975). "Three-dimensional image reconstruction of actin-tropomyosin complex and actin-tropomyosin-troponin T-troponin I complex." *J Mol Biol* 93(4): 477-97.
- Weeds, A. G. und Lowey, S. (1971). "Substructure of the myosin molecule. II. The light chains of myosin." *J Mol Biol* 61(3): 701-25.
- Welsch, U. (2003). *Sobotta Lehrbuch Histologie*. München, Jena, Urban & Fischer Verlag.
- Whitby, F. G., Kent, H., Stewart, F., Stewart, M., Xie, X., Hatch, V., Cohen, C. und Phillips, G. N., Jr. (1992). "Structure of tropomyosin at 9 angstroms resolution." *J Mol Biol* 227(2): 441-52.
- Whitby, F. G. und Phillips, G. N., Jr. (2000). "Crystal structure of tropomyosin at 7 Angstroms resolution." *Proteins* 38(1): 49-59.

-
- Woods, E. F. (1967). "Molecular weight and subunit structure of tropomyosin B." *J Biol Chem* 242(12): 2859-71.
- Xu, C., Craig, R., Tobacman, L., Horowitz, R. und Lehman, W. (1999). "Tropomyosin positions in regulated thin filaments revealed by cryoelectron microscopy." *Biophys J* 77(2): 985-92.
- Xu, S., Gu, J., Melvin, G. und Yu, L. C. (2002). "Structural Characterization of Weakly Attached Cross-Bridges in the A.M.ATP State in Permeabilized Rabbit Psoas Muscle." *Biophys J* 82(4): 2111-22.
- Yagi, N. und Matsubara, I. (1988). "Changes in the 5.9 nm actin layer-line on activation of frog skeletal muscles." *Adv Exp Med Biol* 226: 369-80.
- Yagi, N. und Matsubara, I. (1989). "Structural changes in the thin filament during activation studied by X-ray diffraction of highly stretched skeletal muscle." *J Mol Biol* 208(2): 359-63.
- Yu, L. C. und Brenner, B. (1989). "Structures of actomyosin crossbridges in relaxed and rigor muscle fibers." *Biophys J* 55(3): 441-53.

Eigene Veröffentlichung

- Dulat, H. J., von Grumbkow, C., Baars, W., Schroder, N., Wonigeit, K. und Schwinzer, R. (2001). „Down-regulation of human alloimmune responses by genetically engineered expression of CD95 ligand on stimulatory and target cells.“ *Eur J Immunol* 31(7): 2217-26.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Claudia von Grumbkow, geb. Stöckmann
Geburtstag	12.11.1972
Geburtsort	Sulingen
Staatsangehörigkeit	Deutsche
Familienstand	verheiratet
Vater	Helmut Stöckmann
Mutter	Ilse Stöckmann, geb. Hoffmann
Geschwister	keine

Schulbildung

1979 - 1983	Grundschule Sulingen
1983 - 1985	Orientierungsstufe Sulingen
1985 - 1989	Realschule Sulingen
1989 - 1992	Gymnasium Sulingen
14.05.1992	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

Universitätsausbildung

10 / 1992 - 03 / 1994	Studium der Mathematik mit der Studienrichtung Informatik, Universität Hannover
10 / 1994 - 04 / 1999	Studium der Biologie, Universität Hannover
22.07.1996	Erlangung des Vordiploms im Fach Biologie
07 / 1998	Diplomprüfungen, Hauptfach Genetik, erstes Nebenfach Biochemie, zweites Nebenfach Immunologie
08 / 1998 - 04 / 1999	Diplomarbeit, Thema: „Induktion von apoptotischem Zelltod durch die membranständige und lösliche Form des humanen CD95-Liganden“

Beruf

ab 08 / 1999	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Molekular- und Zellphysiologie, Medizinische Hochschule Hannover
--------------	---

Danksagung

Besonders danken möchte ich Frau PD Dr. Theresia Kraft, für ihre Betreuung meiner Arbeit und die Unterstützung bei der Durchführung der Röntgendiffraktionsversuche.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Brenner danke ich für die Möglichkeit, an dieser interessanten Aufgabenstellung zu arbeiten, für die Unterstützung bei der Durchführung der Röntgendiffraktionsversuche und für die Übernahme des Koreferats.

Danken möchte ich Prof. Dr. Walter Müller für die freundliche Betreuung meiner Arbeit als Doktorvater.

Großer Dank geht an Frau Birgit Piep für ihre Unterstützung bei den Röntgendiffraktionsexperimenten.

Vielen Dank an die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Joan Bordas, allen voran Frau Dr. Agneta Svensson, für ihre Anregungen bezüglich meiner Arbeit an der Simulation.

Herzlichen Dank an alle Mitarbeiter der Abteilung für die vielen netten und anregenden Gespräche.

Mein persönlicher Dank gilt meinem Mann Peter für seinen Beistand in allen Lebenslagen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Claudia von Grumbkow, an Eides statt, die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Registrierung von Röntgenstrukturbildern des Kaninchenskelettmuskels (M. psoas) und Entwicklung eines Modells zur Simulation der Aktinschichtlinien unter Berücksichtigung verschiedener Typen von Disorder“

selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben. Ich versichere an Eides statt, daß diese Dissertation bisher weder als Diplomarbeit, noch als eine ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, 25.04.2004