

**Funktionelle Charakterisierung von
AM.ADP.P_i-Zuständen des Aktin-Myosin-Komplexes
im Kaninchenskelettmuskel**

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

Apothekerin Enke Mählmann
geboren am 19.12.1974 in Dinklage
Hannover 2004

Referent: Prof. Dr. W. Müller

Korreferentin: PD Dr. T. Kraft

Tag der Promotion: 03. August 2004

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Zusammenfassung	3
Summary	5
1 Einleitung	7
1.1 Allgemeine Einführung und Fragestellung	7
1.2 Experimenteller Ansatz der Arbeit	12
1.3 Methoden zur Charakterisierung der Aktinbindungskinetik, Aktinaffinität und strukturellen Eigenschaften der Querbrücken-Zustände	13
1.3.1 Messungen der Fasersteifheit	13
1.3.2 Röntgenstrukturanalytische Methoden	18
2 Material und Methoden	21
2.1 Präparation und Montage der Einzelfasern	21
2.2 Lösungen	25
2.3 Versuchsdurchführung	29
2.4 Mechanische Untersuchungen	32
2.5 Röntgenstrukturanalytische Untersuchungen	38
2.6 Allgemeine Datenanalyse	41
2.7 Zusammenfassung der Daten	45
2.8 Tabelle zur Zusammensetzung der Standardlösungen	47
3 Ergebnisse	48
3.1 Etablierung der notwendigen experimentellen Bedingungen	48
3.1.1 Ermittlung der notwendigen Konzentrationen und Inkubationszeiten für BDM bzw. ADP.AIF ₄	48
3.2 Nachweis der festen Bindung von ADP.AIF ₄ an den Myosinkopf („Trapping“) unter den verschiedenen Bedingungen	52
3.2.1 „Auswaschexperimente“ mit BDM und ADP.AIF ₄	52
3.3 Effekte höherer ADP- und AIF ₄ -Konzentration auf den AIF _{Rigor} -Zustand	57
3.4 Charakterisierung der verschiedenen Analogzustände	59

3.4.1	Charakterisierung der Querbrückenzustände in Gegenwart von BDM und der AIF _{Aktiv} -Zustände	60
3.4.2	Charakterisierung der Querbrückenzustände in Gegenwart von AIF ₄ , das während aktivem „Turnover“ an Myosin gebunden hat (AIF _{Aktiv} -Zustand)	66
3.4.3	Charakterisierung der Querbrückenzustände in Gegenwart von MgADP und AIF ₄ , welche unter Rigorbedingungen an die Myosinköpfe gebunden haben (AIF _{Rigor} -Zustand)	70
3.5	Vergleich struktureller Eigenschaften des AIF _{Aktiv} - und des AIF _{Rigor} -Zustandes durch Kompressionsexperimente mit Dextran	75
3.5.1	Die radiale Gleichgewichtslänge des AIF _{Aktiv} -Zustandes	76
3.5.2	Die radiale Gleichgewichtslänge des AIF _{Rigor} -Zustandes	78
3.6	Berechnungen zum Einfluß von Calcium auf die Fraktion (F) angehefteter Querbrücken bzw. auf die Bindungskonstante (K _B)	80
4	Diskussion	81
4.1	Bewertung der Methoden im Hinblick auf die Fragestellung	81
4.1.1	Überblick über die Fragestellung und die verwendeten Methoden	81
4.1.2	Messungen an permeabilisierten Einzelfasern	83
4.1.3	Besonderheiten der verwendeten Lösungen und der Meßmethode	84
4.1.4	Nachweis der festen Bindung von ADP.AIF ₄ am Myosinkopf	86
4.2	Wie läßt sich der AIF _{Aktiv} -Zustand im Querbrückenzyklus einordnen?	88
4.3	Die Querbrückeneigenschaften in Gegenwart von BDM – auch ein Zustand geringer Aktinaffinität?	93
4.4	Der MgADP.AIF ₄ -Zustand nach Bindung von ADP und AIF ₄ an nukleotidfreie Myosinköpfe (AIF _{Rigor} -Zustand) – ein vom AIF _{Aktiv} -Zustand verschiedener Akto-Myosin-Komplex?	97
4.4.1	Der AIF _{Rigor} -Zustand bei hoher Ca ²⁺ -Konzentration und seine Einordnung im Querbrückenzyklus	98
4.4.2	Der AIF _{Rigor} -Zustand in der Literatur	101
4.4.3	Zusammenfassende Einordnung des AIF _{Rigor} -Zustandes im Querbrückenzyklus	102
4.5	Zwei verschiedene Querbrückenzustände mit MgADP.AIF ₄	102
4.6	Ausblick	104

5	Literaturverzeichnis	106
	Publizierte Abstracts	113
	Eidesstattliche Erklärung	114
	Danksagung	115
	Lebenslauf	116

Abkürzungsverzeichnis

A	Aktin
ADP	Adenosin-5` diphosphat
Abb.	Abbildung
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-hydrochlorid
AlCl ₃	Aluminiumchlorid
AlF ₄	Aluminiumfluorid
Al(NO) ₃	Aluminiumnitrat
AM	Akto-Myosin-Komplex
A _{off}	inaktiviertes Aktinfilament
A _{on}	aktiviertes Aktinfilament
Ap ₅ A	P ¹ ,P ⁵ -Di(Adenosin-5`)Pentaphosphat
ATP	Adenosin-5` triphosphat
ATPγS	Adenosin-5`-O-(3-thiotriphosphat)
BDM	2,3-Butandionmonoxim
Ca ²⁺	Calcium
CPK	Kreatinphosphokinase
CrP	Kreatinphosphat
D	im Zusammenhang mit (Akto)Myosin (Abk. (A)M): ADP
d ₁₀	Abstand zweier benachbarter Myosin-Gitterebenen
DTT	DL-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
F	Fraktion angehefteter Querbrücken
HS	Halbsarkomer
I	Intensität
I _{1,1} /I _{1,0}	Verhältnis der Intensität der 1,1-Reflexe zur Intensität der 1,0-Reflexe
k ⁻	Geschwindigkeitskonstante für reversible Querbrückenablösung
k ⁺	Geschwindigkeitskonstante für reversible Querbrückenanheftung
K _B	Gleichgewichtskonstante der Querbrückenbindung an Aktin (Bindungskonstante)
M	Myosin
NaF	Natriumfluorid

nm	Nanometer
pCa	negativ dekadischer logarithmischer Wert der Calciumkonzentration
pH	negativ dekadischer logarithmischer Wert der Protonenkonzentration
P _i	anorganisches Phosphat
Relax80	Relaxationslösung der Ionenstärke 80 mM
SD	Standardabweichung der Messwerte
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler der Mittelwerte (<i>Standard Error of the Mean</i>)
T	im Zusammenhang mit (Akto)Myosin (Abk. (A)M): ATP
T	Versuchstemperatur (°C)
U/ml	Units/ml (Enzymaktivität)
V _i	Orthovanadat

Zusammenfassung

Schlagworte: Kraftgenerierung, Akto-Myosin, Steifheit, Aktinbindungskinetik und -affinität

Die aktive Verkürzung und Krafterzeugung des Muskels beruht auf einer zyklischen Interaktion von Myosinköpfen, den sogenannten Querbrücken, mit Aktin, wobei ATP hydrolysiert wird. Die bei der damit verbundenen Kraftgenerierung zu durchlaufenden Intermediärzustände werden in zwei Gruppen eingeteilt: Eine Gruppe von nicht-kraftgenerierenden Zuständen („weak-binding states“, geringe Aktinaffinität) und eine Gruppe von kraftgenerierenden Zuständen („strong-binding states“, hohe Aktinaffinität).

Ziel der Arbeit war es, in einzelnen, chemisch permeabilisierten Fasern des *M. psoas* von Kaninchen, die Querbrückenzustände des Akto-Myosin-Komplexes, die der aktiven Kraftgenerierung des Muskels unmittelbar vorausgehen oder daran beteiligt sind, funktionell und strukturell zu charakterisieren. Mit dem Freisetzen des anorganischen Phosphatrestes (P_i) aus dem Myosinkopf gehen die Querbrücken aus den Zuständen geringer in die Zustände mit hoher Aktinaffinität über. Die damit verbundene Konformationsänderung des Akto-Myosin-Komplexes wird von Vielen als der erste kraftgenerierende Schritt betrachtet. Es ist jedoch unklar, ob bereits vor P_i -Abgabe ein hochaffin bindender Querbrückenzustand existiert. In früheren Untersuchungen wurden zwei (A)M.ADP. P_i -Zustände im Querbrückenzyklus postuliert, (A)M.ADP. P_i^I und (A)M.ADP. P_i^{II} . In der Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob tatsächlich zwei (A)M.ADP. P_i -Zustände nachweisbar sind, die sich deutlich in ihrer Aktinaffinität unterscheiden und so den weak- bzw. strong-binding states zuzuordnen sind.

Um (A)M.ADP. P_i -Querbrückenzustände bei niedriger und hoher Ca^{2+} -Konzentration akkumulieren und untersuchen zu können, wurden die Experimente in Gegenwart von BDM (2,3-Butandionmonoxim) bzw. unter Verwendung des P_i -Analogons AlF_4 durchgeführt. Der allosterische Inhibitor BDM arretiert die Querbrücken in einem physiologischen, nicht-kraftgenerierenden MgADP. P_i -Zustand, indem es in Gegenwart von MgATP trotz maximaler Aktivierung der Aktinfilamente die aktive Kraftentwicklung der permeabilisierten Fasern durch Zurückdrängung der Phosphat-Abgabe vom Myosinkopf verhindert. AlF_4 wird während aktivem Querbrücken-Zyklus in Muskelfasern anstelle des anorganischen P_i fest in der Nukleotidbindungstasche des Myosinkopfes gebunden (der „ AlF_{Aktiv} -Zustand“), was zu einer fast vollständigen Hemmung der Kraftentwicklung führt. Die Querbrücken akkumulieren in einem MgADP. P_i -analogen Zustand. Werden die Muskelfasern unter Rigorbedingung, d.h. im nukleotidfreien Zustand, mit MgADP und AlF_4 inkubiert, so bindet zunächst ADP und nachfolgend das Phosphat-Analogon und es resultiert ebenfalls ein MgADP. P_i -analoger-Zustand (der „ AlF_{Rigor} -Zustand“).

Die mit diesen drei experimentellen Ansätzen akkumulierbaren Akto-Myosin-Komplexe wurden durch Messungen der Fasersteifheit sowie durch Registrierung der ersten beiden äquatorialen Reflexe in Röntgendiffraktionsbildern charakterisiert. Es zeigte sich, daß der mit BDM erreichte Zustand und der $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand folgende Eigenschaften haben:

- Aktinbindungskinetik mit und ohne Calcium wie Querbrücken in den weak-binding states, d.h. schnelle Anheftungs- und Ablösekinetik ohne Calcium, reduzierte Ablösewahrscheinlichkeit mit Calcium.
- Zunahme der Aktinaffinität bei Bindung an das aktivierte Aktinfilament (mit Ca^{2+}) um maximal das 2fache, typisch für weak-binding states.
- Widerstand gegen elastische Verformung des $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustandes bei zunehmender osmotischer Kompression wie Querbrücken in den weak-binding states.

Der $\text{AIF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand ist folgendermaßen charakterisiert:

- Mit Calcium ist die Aktinbindungskinetik deutlich langsamer, insbesondere die Ablöserate der Querbrücken vom Aktin ist mehr reduziert, als für weak-binding states typisch ist.
- Die Aktinaffinität nimmt bei Bindung der $\text{ADP}\cdot\text{AIF}_4$ -Querbrücken an das aktivierte Aktinfilament (A_{on}) ca. 70fach zu, ein Hinweis auf einen strong-binding state.
- größerer Widerstand der an A_{on} gebundenen Querbrücken gegen osmotische Kompression als für weak-binding states typisch, was auf eine veränderte Konformation des Myosinkopfes hindeutet.

Die Ergebnisse zeigen, daß in Gegenwart von BDM bzw. im $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand Querbrücken vorliegen, die der Gruppe von Zuständen geringer Aktinaffinität entsprechen, und die den unter Relaxation vorhandenen Zwischenzuständen ($(\text{A})\text{M}\cdot\text{ATP}$; $(\text{A})\text{M}\cdot\text{ADP}\cdot\text{P}_i^{\text{I}}$) sehr ähnlich sind. Der $\text{AIF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand dagegen weist typische Eigenschaften eines mit hoher Affinität an Aktin bindenden Zustandes auf. Das bedeutet, der Myosinkopf kann zwei Konformationen einnehmen, die beide noch AIF_4 als P_i -Analogon gebunden haben, wobei ein Zustand geringe und der andere hohe Aktinaffinität besitzt. Daraus ergibt sich, daß der $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand möglicherweise ein Analogzustand für den mit geringer Affinität an Aktin bindenden $\text{AM}\cdot\text{ADP}\cdot\text{P}_i^{\text{I}}$ -Zustand ist und mit dem $\text{AIF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand hier erstmals ein Analogon für den mit hoher Affinität an A_{on} bindenden $\text{AM}\cdot\text{ADP}\cdot\text{P}_i^{\text{II}}$ -Zustand identifiziert wurde. Die mit dem Übergang von geringer zu hoher Aktinaffinität an dieser Stelle des Querbrückenzyklus verbundenen Umlagerungen des Akto-Myosin-Komplexes könnten durchaus die Umlagerungen darstellen, die zur Kraftentwicklung und Filamentverschiebung beitragen, aber bereits vor P_i -Abgabe erfolgen.

Summary

Keywords: Force generation, acto-myosin, stiffness, actin binding kinetics and actin affinity

The active shortening and force generation of muscle are based on a cyclic interaction of myosin heads, the so-called cross-bridges, with actin while ATP is being hydrolyzed. The intermediate cross-bridge states which are associated with force generation are divided into two groups: a group of non-force generating states („weak-binding states“, low actin affinity) and a group of force generating states („strong-binding states“, high actin affinity).

The goal of the project was to characterize in single, chemically skinned muscle fibers of the *M. psoas* from rabbits functional and structural properties of those cross-bridges of the acto-myosin complex that directly precede or are closely associated with active force generation of the muscle. Cross-bridges with low actin affinity change into states with high actin affinity by release of inorganic phosphate (P_i) from the myosin head. The associated conformational change of the acto-myosin complex is widely regarded as the first force generating step. It is unclear though, whether there exists a cross-bridge state with high actin affinity before P_i release. Previously two (A)M.ADP. P_i -states in the cross-bridge cycle were postulated, (A)M.ADP. P_i^I and (A)M.ADP. P_i^{II} . Therefore, a key question in the present work was to clarify whether indeed two (A)M.ADP. P_i -cross-bridge states are detectable with properties (e.g. actin affinity) typical for either weak-binding states or strong-binding states.

To be able to accumulate and examine (A)M.ADP. P_i -cross-bridge states at low and high Ca^{2+} -concentrations, the experiments were carried out in the presence of BDM (2,3-butanedione monoxime) or by using the P_i -analogue AlF_4 . (i) The allosteric inhibitor BDM arrests the cross-bridges in a physiological, non-force generating MgADP. P_i -state by preventing active force development of the skinned fibers. Inhibition of force generation is caused by suppression of phosphate release in spite of a fully activated contractile system. (ii) The P_i -analogue AlF_4 binds tightly into the nucleotide binding pocket of the myosin head instead of the inorganic P_i during active cross-bridge turnover (the „ AlF_{Active} -state“), which leads to a nearly complete inhibition of force development. The cross-bridges accumulate in a MgADP. P_i -analog state. (iii) When muscle fibers are successively incubated with MgADP and AlF_4 under rigor conditions, i.e. in the nucleotide-free state, first ADP binds to the cross-bridges and then the P_i -analogue, resulting in another MgADP. P_i -analog state (the „ AlF_{Rigor} -state“).

The acto-myosin complexes resulting from these three experimental protocols were characterized by measurement of fiber stiffness as well as by recording of the equatorial

reflections in x-ray diffraction patterns. It was observed that both, the state reached with BDM and the AIF_{Active}-state, have the following characteristics:

- Actin binding kinetics with and without calcium are very similar to those of cross-bridges in the weak-binding states, i.e. fast attachment and detachment kinetics without calcium, reduced probability of detachment with calcium.
- At most 2fold increase of actin affinity upon binding to the activated actin filament (with Ca²⁺) which is typical for weak-binding states.
- Resistance against elastic distortion of the AIF_{Active}-state with increasing osmotic compression similar to cross-bridges in the weak-binding states.

The AIF_{Rigor}-state is characterized as follows:

- The actin binding kinetics are much slower at high Ca²⁺- compared to low Ca²⁺- concentrations. Particularly the reduction of the detachment rate of the cross-bridges from actin is more pronounced than what was observed for weak-binding states.
- The actin affinity increases approximately 70fold when ADP.AIF_{Rigor}-cross-bridges bind to the activated actin filament (A_{on}), which is characteristic for a strong-binding state.
- Larger resistance of the AIF_{Rigor}-cross-bridges bound to A_{on} against osmotic compression than what is typical for weak-binding states, which indicates a different conformation of the myosin head.

The results show that in the presence of BDM or in the AIF_{Active}-state cross-bridges accumulate, which correspond to the group of states with low actin affinity and which are very similar to the cross-bridge states under relaxing conditions ((A)M.ATP; (A)M.ADP.P_i^I). On the other hand, the AIF_{Rigor}-state exhibits typical characteristics of a state which binds to actin with high affinity. This indicates, that the myosin head can adopt two conformations, which both have AIF₄ still bound as a P_i-analogue, whereby one state has low and the other high actin affinity. The weak-binding AIF_{Active}-state is possibly an analog state for the AM.ADP.P_i^I-state, which binds with low affinity to actin. For the first time the AIF_{Rigor}-state was described here which most likely is an analog for the AM.ADP.P_i^{II}-state and binds with high affinity to A_{on}. The conformational changes of the acto-myosin complex, associated with the transition from low to high actin affinity at this stage of the cross-bridge cycle, could well represent the first structural changes which contribute to force generation and filament sliding, however, before P_i is released.

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung und Fragestellung

Aktive Bewegung und Kraftentwicklung sind ubiquitäre biologische Erscheinungen mit einem weit reichenden Spektrum, welches sich vom intrazellulären Transportmechanismus über die Motilität von Prokaryonten bis hin zur koordinierten, aktiven Bewegung der Eukaryonten erstreckt. Diese aktiven Bewegungsprozesse beruhen auf dem Zusammenwirken von Motorproteinen aus Proteinfamilien wie den Myosinen, Kinesinen und Dyneinen mit Strukturproteinen wie dem Aktin oder Tubulin. Die Motorproteine stellen biochemisch ATPasen dar, deren Aktivität von den Strukturproteinen katalysiert wird. Für die aktive Kraftentwicklung und Bewegung im Muskel stehen hierfür das Aktin, dem die Regulatorproteine Troponin und Tropomyosin angelagert sind, und das Myosin, die durch die intrazelluläre Calcium-Konzentration kontrolliert werden, im Vordergrund. Die Kopfdomänen der Myosinmoleküle bilden die sogenannten Querbrücken und besitzen eine ATP- und eine Aktin-Bindungsstelle (Szent-Györgyi, 1953).

Obwohl Wissenschaft und Technik sich seit Jahrzehnten mit der Fähigkeit von biologischen Material aus chemischer Energie direkt Kontraktilität und Motilität zu erzeugen beschäftigt (Huxley, 1957), konnten die eigentlichen molekularen Mechanismen von Kraftgenerierung und Bewegung noch nicht geklärt werden. Für die Krafterzeugung und Bewegung sind im Verlauf der ATP-Hydrolyse Umlagerungen im Aktin-Myosin-Komplex und Strukturänderungen im Myosinkopf verantwortlich. Um ein besseres Verständnis der Vorgänge im Muskel zu erhalten, ist die Charakterisierung der funktionellen und strukturellen Eigenschaften der Intermediärzustände der Aktin-Myosin-Wechselwirkung sowie die Aufklärung der bindungskinetischen Eigenschaften der Myosinköpfe zum Strukturprotein Aktin erforderlich. Zudem muß der Mechanismus der Regulation des Querbrückenzyklus durch Calcium, ohne den es keine koordinierte Querbrückentätigkeit gibt, geklärt werden.

Anerkannt ist, daß im Muskel die Querbrücken (Myosinköpfe) eine Reihe von Querbrücken-Zuständen durchlaufen, wobei ATP hydrolysiert wird und isometrische Kraftentwicklung, verursacht durch elastische Deformation des Myosinkopfes bei konstanter Muskellänge, oder Filamentverschiebung, also die Verkürzung des Muskels unter isotonischen Bedingungen, folgen. Die mit geringer Affinität an das aktivierte Aktinfilament angehefteten Querbrücken, die das ATP hydrolysiert haben, sog. „weak-binding states“ gehen unter Abgabe von Phosphat (P_i) aus der Nukleotidbindungstasche des Myosinkopfes und einer damit verbundenen Strukturänderung des Kopfes in die Zustände hoher Aktinaffinität, sog. „strong-

binding states“ über. Nach abgeschlossenem „Ruderschlag“ bzw. Deformation der Myosinköpfe unter isometrischen Bedingungen gehen die Querbrücken durch Neubindung von ATP wieder in die Zustände geringer Aktinaffinität über und beginnen einen erneuten Zyklusdurchlauf.

Aktuelle Konzepte zum kraftgenerierenden Mechanismus

Bei der Erforschung der strukturellen Umlagerungen des Akto-Myosin-Komplexes, die der Kraftgenerierung und Verkürzung zugrunde liegen, treten zwei Konzepte in den Vordergrund:

(1) Eine von einigen Gruppen aufgestellte Hypothese ist, daß der kraftproduzierende Schritt bei Umlagerungen innerhalb der mit hoher Affinität an Aktin gebundenen Querbrückenzustände („strong-binding states“, kraftgenerierend) erfolgt (Huxley und Simmons, 1971; 1973; Huxley, 1980; Geeves und Holmes, 1999). Der eigentliche kraftgenerierende Schritt entspricht dabei dem sogenannten „quick tension recovery“, einem schnellen Kraftanstieg nach kleinen, stufenförmigen Längenänderungen des aktivierten Muskels (Huxley und Simmons, 1971).

(2) In alternativen Modellen, die auch die Grundlage meiner eigenen Arbeit bilden, wird davon ausgegangen, daß der dem „quick tension recovery“ zugrunde liegende Querbrückenmechanismus einen Beitrag zur Filamentverschiebung bei isotonischer Verkürzung leistet, daß aber bereits beim Übergang der Querbrücken von Zuständen geringer Aktinaffinität („weak-binding states“, nicht-kraftgenerierend) in Zustände hoher Aktinaffinität ein Teil der Kraftentwicklung stattfindet (Brenner et al., 1991; 1995), wobei die weak-binding states die direkten Vorstufen der kraftgenerierenden Zustände sind. Hier ermöglicht die Phosphat-Abgabe den Übergang des Myosinkopfes von einem nicht-stereospezifisch gebundenen Zustand geringer Aktinaffinität in einen stereospezifisch gebundenen Zustand mit hoher Aktinaffinität. Unklar ist derzeit, ob möglicherweise ein Zwischenzustand existiert, bei dem das γ -Phosphat lediglich delokalisiert ist, der aber bereits trotzdem mit hoher Affinität binden und bereits vor P_i -Abgabe Kraft erzeugen kann. Vorstellbar ist nach neueren Untersuchungen eine durch die Aktin-Bindung induzierte Strukturänderung im Bereich der Nukleotidbindungstasche, die zu einer Delokalisierung und schließlich zur Abgabe des vom ATP abgespaltenen Phosphates führt (Kraft und Brenner, Abstract 2001; Holmes et al., 2003). Das Bestreben des Myosinkopfes, stereospezifisch an das Calcium-aktivierte Aktinfilament zu binden, wird durch das γ -Phosphat behindert. Erst die Phosphat-Delokalisation ermöglicht die für das stereospezifische, feste Andocken des Kopfes an das Aktinfilament notwendige Konformationsänderung.

Aktuelle Konzepte zur Regulation des Querbrückenzyklus im Skelettmuskel

Bei der Regulation der Muskelkontraktion werden einzelne Reaktionsschritte des Akto-Myosin-ATPase-Zyklus und infolgedessen auch die strukturellen Umlagerungen regulatorisch beeinflusst, d.h. über die Calcium-abhängigen Veränderungen im Aktinfilament kontrolliert.

Das Modell der „sterischen Blockierung“ (Alles-oder-nichts Prinzip) geht davon aus, daß erst durch Anbindung von Calcium an Troponin über eine Verschiebung des Tropomyosin-Moleküls, welches die Myosinanbindungsstelle am Aktinfilament blockiert, eine Anheftung der Querbrücken an Aktin ermöglicht wird (Haselgrove und Huxley, 1973; HE Huxley, 1973; Parry und Squire, 1973). Biochemische Untersuchungen von Chalovich et al. (1981) an isolierten Proteinen in Lösung und von Brenner et al. (1982) an intakten Skelettmuskelfasern zeigten jedoch, daß Myosin auch bei sehr geringer Ca^{2+} -Konzentration, also unter Relaxationsbedingungen, an das dünne Filament binden kann und daß Calcium die Wahrscheinlichkeit für den Übergang der Querbrücken in die kraftgenerierenden Zustände kontrolliert (Brenner, 1988).

Fragestellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Intermediärzustände des Akto-Myosin-Komplexes im Querbrückenzyklus, die am Übergang von den nicht-kraftgenerierenden in die kraftgenerierenden Zustände existieren bzw. postuliert werden, funktionell und strukturell zu charakterisieren. Die im Zentrum dieser Untersuchung stehenden Zwischenzustände sind in einem von Brenner und Chalovich (1999) entwickelten kinetischen Schema des Querbrückenzyklus in Abb.1.1 dargestellt. Wie bereits erwähnt, gehen wir davon aus, daß zumindest der erste Schritt der Kraftgenerierung am Übergang von weak-binding states zu strong-binding states stattfindet. Daher galt es in dieser Arbeit die (A)M.ADP. P_i -Zwischenzustände im Zyklus zu charakterisieren. Nach Millar und Homsher (1990) lassen sich diese aufgrund einer zweistufigen P_i -Freisetzung-Hypothese in zwei Gruppen, die (A)M.ADP. P_i^I - und die (A)M.ADP. P_i^{II} -Zustände, aufteilen, wobei der (A)M.ADP. P_i^{II} -Zustand nur minimal besetzt sein soll. Bisher wurde dieser Zustand weder funktionell noch strukturell bzw. hinsichtlich seiner Eigenschaften als weak- oder strong-binding state charakterisiert. Wird in Abb.1.1 also der (A)M.ADP. P_i^{II} -Zustand den hochaffin gebundenen Zwischenzuständen zugeordnet, dann wäre dieser Zustand nach dem oben genannten Konzept der erste kraftgenerierende Zustand, d.h. die Strukturumlagerung aus dem Querbrückenzustand geringer Aktinaffinität ((A)M.ADP. P_i^I) in den Querbrückenzustand hoher Aktinaffinität ((A)M.ADP. P_i^{II}) könnte der erste kraftproduzierende Schritt bereits vor P_i -Abgabe sein. Ein

wichtiges Ziel dieser Arbeit war also, zu untersuchen, ob ein Querbrückenzustand existiert, bei dem das γ -Phosphat noch am Myosinkopf gebunden ist, der aber bereits mit hoher Affinität an das aktivierte Aktinfilament binden kann, entsprechend dem postulierten (A)M.ADP.P_i^{II}-Zustand.

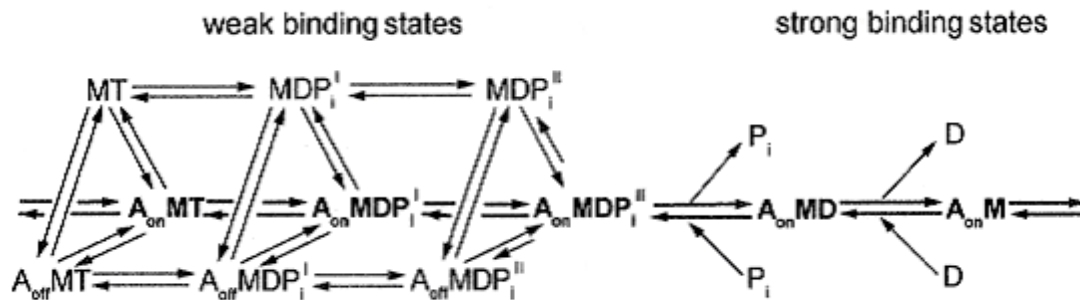


Abb.1.1: Kinetisches Schema des Querbrückenzyklus mit den hauptsächlich besetzten Querbrückenzuständen während ATP-Hydrolyse (modifiziert nach Brenner und Chalovich, 1999).
A = Aktin, M = Myosin, T = MgATP, D = MgADP, P_i = Phosphat, A_{on} = Calcium aktiviertes Aktinfilament, A_{off} = inaktiviertes Aktinfilament (ohne Calcium).

Die Querbrücken Zustände im Einzelnen

Bei eingehender Betrachtung des Modells (Abb.1.1), das auch die strukturellen Eigenschaften der verschiedenen Zustände, bedingt durch die unterschiedlich gebundenen Nukleotidformen vor und nach der Hydrolyse, beinhaltet, ist zu erkennen, daß die Myosinköpfe (M) sowohl an das Aktin (A) angebunden (z.B. AMT; AMDP_i) als auch davon abgelöst sein können (z.B. MT; MDP_i). Desweiteren ist zu erkennen, daß das regulierte Aktinfilament in Abhängigkeit von der umgebenden Calcium-Konzentration in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen kann, die reversibel ineinander übergehen (A_{off} ⇌ A_{on}). Liegt das Aktinfilament in der „on“-Konfiguration (aktiviertes Aktin, bei hoher Calcium-Konzentration) vor, so katalysiert es die ATP-Hydrolyse von Myosin besser als das Aktinfilament in der „off“-Konfiguration (inaktives Aktin, niedrige Calcium-Konzentration). P_i- und ADP-Abgabe erfolgen im Wesentlichen nur, wenn der Myosinkopf an A_{on} bindet, daher wurde hier auf die übrigen Zustände (A_{off}-Zustände, M alleine) verzichtet.

Für eine Charakterisierung der Zustände vor bzw. während Kraftgenerierung und ihre Einordnung in die Gruppen der weak- bzw. strong-binding states war es also notwendig, die Zustände nicht nur bei geringer Ca²⁺-Konzentration, sondern auch bei hoher Ca²⁺-Konzentration, d.h. wenn sie an das aktivierte Aktinfilament (A_{on}) binden, in Bezug auf die Affinität, Aktinbindungskinetik und Struktur der Querbrücken zu untersuchen.

Einleitung

Die bei der zyklischen Hydrolyse des MgATP zu durchlaufenden Intermediärzustände teilen sich aufgrund von Struktur, Affinität und Aktinbindungskinetik der Querbrücken in zwei Zustandsgruppen, bestehend aus mehreren Subpopulationen, die sich primär im gebundenen Nukleotid unterscheiden, auf. Die erste Gruppe, die sog. *weak-binding states* sind durch folgende Merkmale gekennzeichnet:

- geringe Aktinaffinität der Myosinköpfe, sowohl bei Bindung an A_{off} (niedrige Ca^{2+} -Konzentration) als auch an A_{on} (hohe Ca^{2+} -Konzentration),
- hohe Geschwindigkeitskonstanten für Querbrückenanheftung (k^+) ans Aktin und Querbrückenablösung (k^-) vom Aktin (White und Taylor, 1976; Stein et al., 1979; Chalovich et al., 1981), wobei die Länge der Pfeile in Abb.1.1 die Geschwindigkeitskonstanten repräsentiert,
- sind unfähig das kontraktile System „anzuschalten“, d.h. die Myosinköpfe sind nicht in der Lage ohne Calcium das Aktinfilament zu aktivieren (A_{on}), d.h. sie können das System nicht so beeinflussen, daß die Querbrücken in Gegenwart von MgATP auch ohne Calcium den aktiven Querbrückenzyklus durchlaufen können,
- nicht-stereospezifische Bindung an Aktin (keine Verstärkung der Aktinschichtlinien im 2D-Röntgendiffraktionsbild).

Demgegenüber steht die zweite Gruppe der Querbrücken Zustände, die sog. *strong-binding states*. Für sie charakteristische Eigenschaften sind:

- eine Aktinaffinität, die sehr stark zunimmt, wenn die Myosinköpfe an A_{on} binden (bei hoher Ca^{2+} -Konzentration). Es gibt auch strong-binding states, die bereits mit 10^2 - 10^4 mal höherer Affinität als die schwach Aktin bindenden Zustände (Greene und Eisenberg, 1980a; Highsmith, 1977) an A_{off} binden können, wie z.B. die nukleotid-freien AM-Zustände.
- Gleichgewicht zwischen Anheftung und Ablösung der Querbrücken, aber mit einer erheblich geringeren Geschwindigkeitskonstanten für Querbrückenablösung (k^-) vom aktivierten Aktinfilament (A_{on}) als für die –anheftung (k^+) (Greene und Eisenberg, 1980a; Lymn und Taylor, 1971; Marston 1982; Brenner et al., 1986a),
- besitzen bei genügend hoher Affinität die Fähigkeit das kontraktile System „anzuschalten“. Das heißt, solche Querbrücken können das System so verändern, daß das Aktinfilament auch ohne Calcium durch hochaffine Anheftung der Querbrücken aktiviert wird und die Querbrücken mit ATP den aktiven ATPase-Zyklus durchlaufen

können. Beispielsweise können nukleotidfreie Querbrücken (AM in Abb.1.1) durch ihre feste Bindung das Aktinfilament „anschalten“.

- stereospezifische Bindung an Aktin, was beispielsweise zu einer Verstärkung der Aktinschichtlinien im Diffraktionsbild führt.

Es war hier also zu untersuchen, ob die (A)M.ADP.P_i-Zustände am Übergang von nicht-kraftgenerierenden weak-binding states in kraftgenerierende strong-binding states der einen oder anderen Gruppe zuzuordnen sind, d.h. ob sie hinsichtlich Aktinbindungskinetik, Aktinaffinität und Struktur den weak-binding oder strong-binding Zuständen zuzuordnen sind.

1.2 Experimenteller Ansatz der Arbeit

Da diese Charakterisierung sowohl bei geringer als auch hoher Ca²⁺-Konzentration erfolgen mußte, die Querbrücken aber in Gegenwart von ATP und Calcium kontinuierlich den Querbrücken-Zyklus durchlaufen und jeweils eine Mischung verschiedener Zustände vorliegt, war das Ziel, Analog-Zustände der (A)M.ADP.P_i-Zustände zu finden, die den Querbrücken-Zyklus in einen der relevanten Zustände „einfriert“. Um die Querbrücken in den jeweiligen Zuständen zu akkumulieren, werden folgende Interventionen durchgeführt:

- (1) Zugabe von BDM (2,3-Butandionmonoxim) in Gegenwart von MgATP und sättigender Calcium-Konzentration verhindert eine aktive Kraftentwicklung der Muskelfasern durch Zurückdrängung der Phosphat-Abgabe des Myosinkopfes. Der aktive Querbrückenzyklus wird unterdrückt und die Querbrücken arretieren in einem nicht-kraftgenerierenden MgADP.P_i-Zustand (Regnier et al., 1995).
- (2) Während aktivem Querbrücken-Zyklus, also bei hoher Ca²⁺-Konzentration in Gegenwart von MgATP, binden Muskelfasern das Phosphat-Analogon Aluminiumfluorid anstelle des anorganischen Phosphates in der Nukleotidbindungstasche des Myosinkopfes (Chase et al., 1993). Der resultierende festgebundene MgADP.AIF₄-Komplex (hier „AIF_{Aktiv}“ genannt) stellt ein MgADP.P_i-Analogon dar (Regnier et al., 1995) und führt zu einer Hemmung der Kraftentwicklung.
- (3) Eine Zugabe von MgADP und AIF₄ unter Rigorbedingungen, also im nukleotidfreien Zustand, wurde hier zusätzlich als neuer Ansatz gewählt. Dabei gehen die Querbrücken sozusagen ein Stück rückwärts durch den Querbrückenzyklus (Abb.1.1) zunächst zum AM.ADP_i-Zustand und nach AIF₄-Zugabe bis zu einem MgADP.P_i-Analog-Zustand (hier

„AlF_{Rigor}“ genannt), dessen strukturelle und funktionelle Eigenschaften ebenfalls geklärt werden sollten.

1.3 Methoden zur Charakterisierung der Aktinbindungskinetik, Aktinaffinität und strukturellen Eigenschaften der Querbrücken-Zustände

Zur Charakterisierung der Affinität der Querbrücken Zustände in Gegenwart von BDM oder dem Phosphat-Analogon AlF₄ am isolierten, jedoch strukturell intakten kontraktile System von Einzelfasern des Kaninchenpsoas sind Methoden erforderlich, die erlauben, die Fraktion angehefteter Querbrücken (F) bzw. die daraus resultierende Gleichgewichtskonstante, auch Bindungskonstante K_B genannt, zu bestimmen. Zur Ermittlung der Aktinbindungskinetik für die reversible Querbrückenbindung an die Aktinfilamente (und der Aktinaffinität) sind experimentelle Untersuchungen zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für Querbrückenanheftung (k^+) und Querbrückenablösung (k^-) nötig. Anhand von mechanischen Messungen der Fasersteifheit und röntgenstrukturanalytischen Untersuchungen können Erkenntnisse über Affinität und Aktinbindungskinetik der Querbrücken gewonnen werden. Ferner sind röntgenstrukturanalytische Methoden geeignet, strukturelle Charakteristika der Analogzustände zu ermitteln.

1.3.1 Messungen der Fasersteifheit

Die Steifheit einer Muskelfaser wird durch Dehnungen oder Entdehnungen bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten und bei gleichzeitiger Registrierung der Kraftantwort in Abhängigkeit von der auftretenden Sarkomerenlängenänderung ermittelt (Abb.1.2). Sie ist definiert als der Quotient aus beobachteter Kraftänderung durch aufgezwungene Längenänderung:

$$\text{Steifheit} = \text{Kraftänderung} / \text{Längenänderung}$$

Die gemessene Kraftantwort und somit auch die Fasersteifheit sind proportional zur Gesamtzahl der an Aktin angehefteten Querbrücken und infolgedessen kann die Steifheit einer Muskelfaser als ein Maß für Querbrückenanheftung an Aktin benutzt werden (Huxley und Simmons, 1971; 1973; Ford et al., 1981). Grundsätzlich bedeutet dies, daß durch Dehnung einer Faser mit einer bestimmten Längenänderung ein Kraftanstieg erfolgt, welcher proportional zur Anzahl der beteiligten, parallel angeordneten Querbrücken ist. Da aber die

Anbindung von Querbrücken an Aktin reversibel ist, lösen sich während der Steifheitsmessung die gedehnten Querbrücken vom Aktinfilament ab, um sich im entdehnten Zustand an einer anderen benachbarten Aktinbindungsstelle wieder anheften zu können (Brenner et al., 1982; 1986). Diese Ablösung und Wiederanheftung der Querbrücken während der Messung ist abhängig von der Dehnungsgeschwindigkeit. Je schneller die Geschwindigkeit der applizierten Dehnung ist, desto weniger Ablösungs- und Wiederanbindungsprozesse finden während der Steifheitsmessung statt und desto mehr der zu Beginn der Längenänderung angehefteten Myosinköpfe erfahren die Dehnung. Die beobachtete Fasersteifheit bzw. Kraftantwort nimmt mit zunehmender Dehnungsgeschwindigkeit zu. Diese ausgeprägte Abhängigkeit trifft unter den meisten Bedingungen, wie z.B. im aktivierten oder relaxierten Muskel zu. Unter Relaxationsbedingungen ist es nicht möglich einen Bereich von Dehnungsgeschwindigkeiten zu erreichen, in dem die beobachtete Steifheit von der Dehnungsgeschwindigkeit unbeeinflusst ist und somit mit der Steifheitsmessung alle unter diesen Bedingungen an Aktin angehefteten Querbrücken erfaßt werden. In Abb.1.2.a) ist der Effekt der Dehnungsgeschwindigkeit auf die Beziehung zwischen Kraft und Sarkomerenlängenänderung an einer Einzelfaser unter Relaxationsbedingungen und im Rigor bei verschiedenen Dehnungsgeschwindigkeiten dargestellt. Für Querbrücken unter Rigorbedingungen finden während der Steifheitsmessung aufgrund ihrer hohen Aktinaffinität keine bzw. kaum Ablösungs- und Wiederanbindungsprozesse ans dünne Filament statt. Somit sind praktisch alle Myosinköpfe an Aktin angeheftet und die Kraft steigt linear mit der Sarkomerenlänge an. Die Fasersteifheit verhält sich über einen weiten Bereich nahezu unabhängig von der Dehnungsgeschwindigkeit, was sich in der gleichen Steigung der Rigor-Kurve in Abb.1.2.a) bei verschiedenen Dehnungsgeschwindigkeiten zeigt und beispielsweise in Abb.3.12 (Ergebnisteil) erkennbar ist.

Die Fasersteifheit wurde in der vorliegenden Arbeit anhand der Sehnensteifheit oder sog. *chord stiffness* (Abb.1.2.b), die als der Quotient aus resultierender Kraftänderung durch aufgezwungener Dehnungsamplitude bei einer Dehnung der Sarkomere um 2-3 nm/ Halbsarkomer definiert ist, ermittelt.

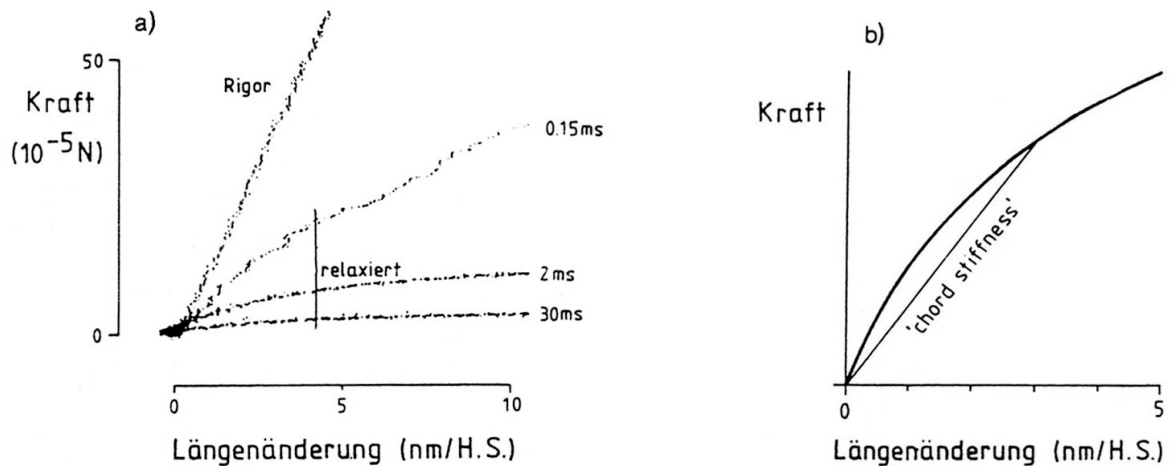


Abb.1.2: a.) Registrierung der Fasersteifheit einzelner Skelettmuskelfasern als Funktion von Kraft und Längenänderung. Die Messungen erfolgten während rampenförmigen Dehnungen unterschiedlicher Geschwindigkeit im Rigor und unter Relaxationsbedingungen (Ionenstärke = 20 mM, $T = 5^\circ\text{C}$). Jeder Registrierung ist die für eine Dehnung um 0.5 nm/Halbsarkomer benötigte Zeit zugeordnet.

(Aus Brenner, 1986a)

b.) Schematische Darstellung einer Steifheitsmessung zur Definition der „chord-stiffness“.

(Aus Kraft, 1990)

Zur geeigneten Darstellung der Abhängigkeit wird die Steifheit gegen den dekadischen Logarithmus der Dehnungsgeschwindigkeiten aufgetragen. Die Geschwindigkeitskonstanten für Querbrückenablösung (k^-) und Querbrückenanheftung (k^+) lassen sich aus der Form und der Lage der resultierenden Beziehung ablesen. Um experimentell ermittelte Kurven interpretieren zu können, werden von Brenner (1986a) berechnete Steifheits-Dehnungsgeschwindigkeits-Beziehungen unter Annahme verschiedener Geschwindigkeitskonstanten für Anheftung (k^+) und Ablösung (k^-) zur Hilfe genommen.

Die Geschwindigkeitskonstante für Querbrückenanheftung (k^+) hat einen Einfluß auf die maximal erreichte Fasersteifheit, da sich mit der Änderung von k^+ auch die Bindungskonstante, also der Quotient aus k^+/k^- ändert. Dagegen wird die Lage der Beziehungen entlang der Abszisse durch eine Variation von k^+ nicht beeinflusst, d.h. 50% der maximalen Steifheit werden immer bei derselben Dehnungsgeschwindigkeit beobachtet (Abb.1.3.a).

Einleitung

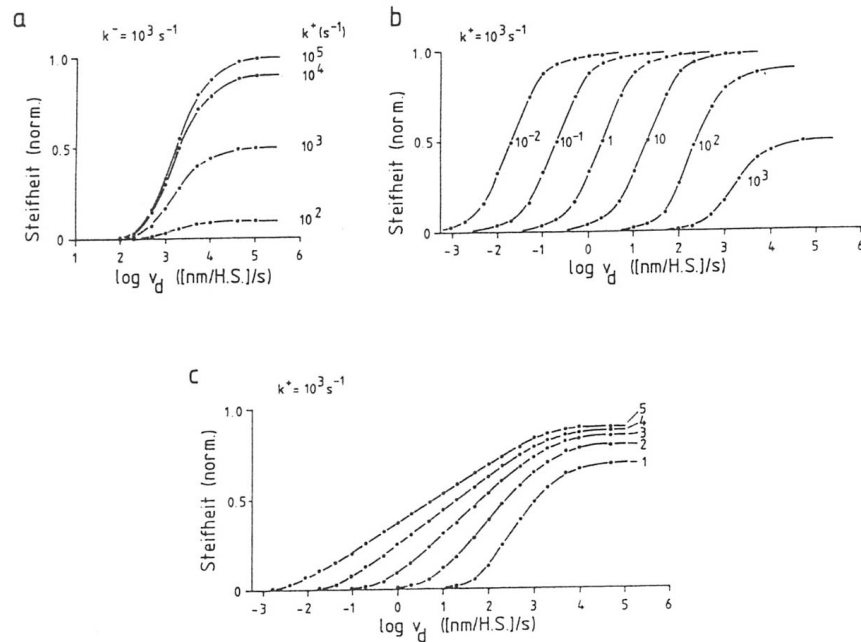


Abb.1.3: Berechnete Beziehungen zwischen Steifheit und Dehnungsgeschwindigkeit

Alle Steifheitswerte sind auf 100%iger Querbrückenanheftung (Rigorsteifheit) normiert.

a.) Variation von k^+ bei konstantem k^- von 10^3 s^{-1} . Die zugeordnete Zahl neben jeder Kennlinie gibt den angenommenen Wert von k^+ wieder. Die Lage der Kennlinien entlang der x-Achse ist unbeeinflusst von k^+ .

b.) Variation von k^- bei konstantem k^+ von 10^3 s^{-1} . Die zugeordnete Zahl neben jeder Kennlinie ist der zur Berechnung angenommene Wert von k^- .

c.) Auswirkungen der Koexistenz von Querbrückenpopulationen gleicher Größe, die sich bei gleichem k^+ (10^3 s^{-1}) in ihrem Wert für k^- unterscheiden: (1) Zwei Populationen mit $k^- = 10^3$ und 10^2 s^{-1} . (2) Wie (1), jedoch zusätzliche Population mit $k^- = 10 \text{ s}^{-1}$. (3) Wie (2), jedoch zusätzliche Population mit $k^- = 1 \text{ s}^{-1}$. (4) Wie (3), zusätzliche Population mit $k^- = 10^{-1} \text{ s}^{-1}$. (5) Wie (4), weitere Population mit $k^- = 10^{-2} \text{ s}^{-1}$.

(Nach Brenner, 1986a)

Anders sieht es aus bei Änderungen der Geschwindigkeitskonstanten für Querbrückenablösung (k^-). Eine Variation der Ablösewahrscheinlichkeit k^- bewirkt über einen Bereich von mehreren Größenordnungen eine deutliche Verschiebung der Beziehung entlang der Geschwindigkeitsachse und zwar mit steigendem k^- zu höheren Dehnungsgeschwindigkeiten. Damit kann eine Verschiebung der Steifheitskurve nach links als Hinweis für eine langsamere Querbrückenablösung gewertet werden. Die Dehnungsgeschwindigkeit für 50% der maximal erreichten Fasersteifheit ändert sich dabei proportional zu k^- (Abb.1.3.b).

Weder eine Änderung von k^+ , noch eine Änderung von k^- führen zu einer Veränderung der Form bzw. der Breite der Beziehung zwischen Steifheit und Dehnungsgeschwindigkeit. Im Gegensatz zu den berechneten Beziehungen, erstrecken sich die experimentell beobachteten Beziehungen über einen breiteren Geschwindigkeitsbereich (Abb.1.3.c). Es ergibt sich eine Verbreiterung der Beziehung, da angenommen wird, daß Querbrücken in Muskelfasern keine einheitliche Gruppe darstellen, sondern daß mehrere Gruppen mit unterschiedlichem k^- koexistieren. Der Grund dafür liegt in der Tatsache, daß die Querbrücken in der quergestreiften Muskulatur entlang den Myosinfilamenten in Abständen von 143 \AA

angeordnet sind, während die Anordnung der Aktinuntereinheiten und infolgedessen der Bindungsstellen für die Myosinköpfe am dünnen Filament in Abständen von 55 \AA ist. Dieser sog. „miss-match“ führt zu einem Spektrum von unterschiedlichen Dehnungsgraden der angehefteten Querbrücken, die zu einem weitreichenden Spektrum von k^- -Werten führen können (Brenner, 1986a; Hill, 1974).

Diese Berechnungen zeigen, daß durch das Verhältnis von k^+ und k^- das Ausmaß der Querbrückenanheftung bestimmt wird und daß anhand der Steifheitsmessung eine eindeutige Aussage in Bezug auf k^- getroffen werden kann. Um aber den Wert für k^+ abschätzen zu können, muß die gemessene Steifheit alle angehefteten Querbrücken erfassen. Die Messungen müssen so schnell erfolgen, daß sich während des Meßvorgangs keine Querbrücken ablösen und wieder anheften können. Die Messungen müssen also in dem Bereich stattfinden, indem die Fasersteifheit unabhängig von der Dehnungsgeschwindigkeit ist. Unter diesen Bedingungen ist es dann auch möglich die Bindungskonstante $K_B (= k^+/k^-)$ und die Fraktion angehefteter Querbrücken ($F = k^+/(k^+ + k^-)$) abzuleiten. Nach Cooke und Franks (1980), Cooke und Thomas (1980) und Lovell und Harrington (1981) sind im Kaninchenpsoas im Rigor praktisch alle Querbrücken aufgrund ihrer hohen Affinität am Aktin angeheftet. Unter der Voraussetzung, daß die Steifheit der einzelnen Myosinköpfe unter allen Bedingungen gleich ist, ergibt sich, daß der Quotient aus gemessener Steifheit durch Rigorsteifheit proportional zu der jeweiligen Fraktion angehefteter Querbrücken ist. Allerdings muß die Dehnung der Faser so schnell erfolgen, daß ein Bereich erreicht wird, indem die Steifheit unabhängig von der Dehnungsgeschwindigkeit wird und somit praktisch alle an Aktin gebundenen Querbrücken erfaßt werden. Erst dann ist es möglich die Fraktion angehefteter Querbrücken unter oben genannter Voraussetzung abzuschätzen.

Mit den gegenwärtig verfügbaren Apparaturen ist es jedoch unter den meisten Bedingungen nur möglich einen eingeschränkten Bereich, den Anfangsbereich, der kompletten Beziehung experimentell zu bestimmen, da aus technischen Gründen keine so hohen Dehnungsgeschwindigkeiten erzeugt werden können, bei der die Fasersteifheit praktisch unabhängig von der Dehnungsgeschwindigkeit wird.

Um dennoch die Fraktion angehefteter Querbrücken am Aktinfilament und somit die zugehörige Bindungskonstante K_B zu ermitteln, werden Röntgenbeugungsspektren von Muskelfasern zur Ermittlung der Massenverteilung zwischen den Aktin- und Myosinfilamenten (Ermittlung der ersten beiden äquatorialen Reflexe) registriert.

1.3.2 Röntgenstrukturanalytische Methoden

Die kontraktilen Proteine Aktin und Myosin führen aufgrund ihrer regelmäßigen und helikalen Anordnung, sozusagen als Gitter mit nahezu kristallinen Eigenschaften zu einer Beugung des auf die Muskelfasern projizierten Röntgenstrahls. Das zu registrierende Röntgenbeugungsbild, auch Diffraktionsmuster genannt, gibt Auskunft über die strukturelle Anordnung und Orientierung der kontraktilen Proteine in intakten Muskelfasern. Veränderungen dieser Feinstruktur, bedingt durch variierbare physiologische Bedingungen, führen zu Unterschieden in den Reflexen der Diffraktionsbilder.

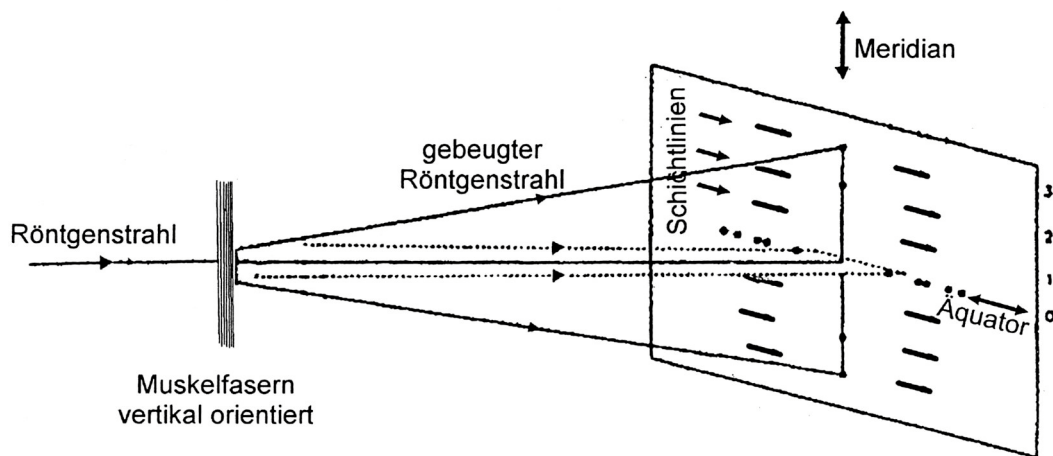


Abb.1.4: Schematische Darstellung der Diffraktionsbereiche, zu sehen sind äquatoriale- und meridionale Reflexe, sowie die Schichtlinien. (Nach Squire, 1981)

Der Ursprung der äquatorialen Reflexe liegt in der hexagonalen Anordnung der Filamente im Faserquerschnitt (Abb.1.5). Ihre Intensität spiegelt die Massenverteilung zwischen dünnem und dickem Filament, praktisch wie in einem Muskelfaserquerschnitt betrachtet, wieder. Stattfindende Massenumverteilungen zwischen den Gitterebenen, also zwischen Aktin- und Myosinfilamenten, verursachen eine Änderung in der Intensität der ersten beiden äquatorialen Reflexe ($I_{1,0}$ und $I_{1,1}$) von Röntgenbeugungsspektren und lassen Rückschlüsse auf die Position der Querbrücken ziehen.

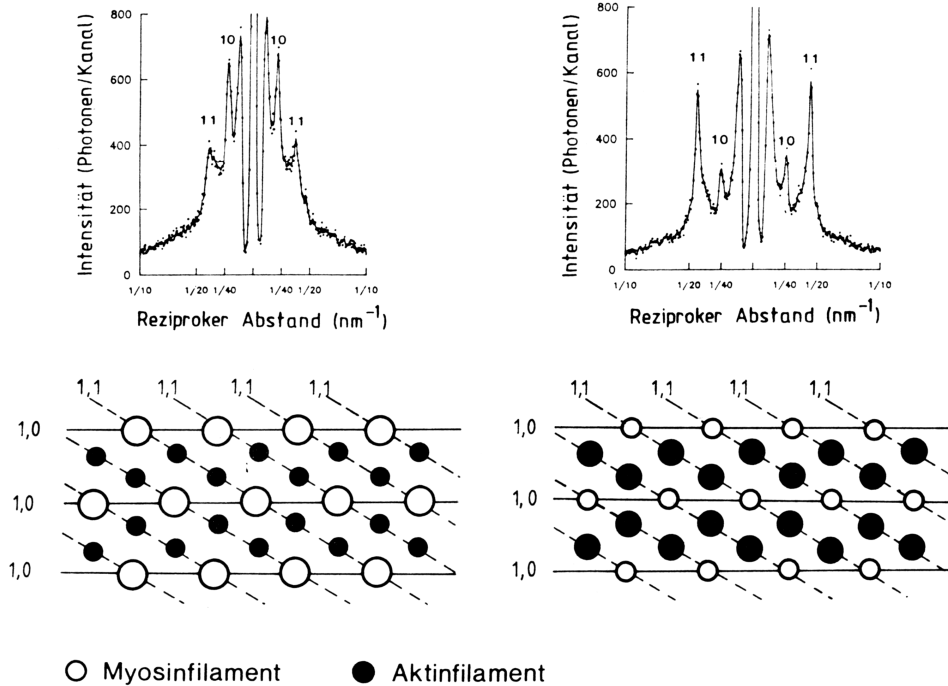


Abb.1.5: Einfluß der Massenverteilung zwischen Myosin- und Aktinfilamenten auf die beiden ersten äquatorialen Reflexe (schematisch).

Die [1,0]-Gitterebenen enthalten nur Myosinfilamente, die [1,1]-Gitterebenen enthalten Myosin- und Aktinfilamente. Die Kennzeichnung der Reflexe erfolgt mit den Indizes der zugrunde liegenden Gitterebenen. Eine Massenumverteilung von den Myosin- zu den Aktinfilamenten führt zu einer Zunahme des [1,1]-Reflexes bei gleichzeitiger Abnahme des [1,0]-Reflexes.

(Aus Brenner, 1986a)

Aus der Abb.1.5 ist zu erkennen, daß die [1,1]-Gitterebene Beiträge sowohl vom Aktin- als auch vom Myosinfilament enthält, die [1,0]-Gitterebene und der damit korrespondierende äquatoriale Reflex 1,0 hauptsächlich vom Myosin bestimmt wird. Eine Anheftung von Querbrücken an Aktin ist mit einer Zunahme der Intensität des 1,1-Reflexes, bei gleichzeitiger Abnahme des 1,0-Reflexes verbunden, es erfolgt eine Massenumverteilung fort vom Myosin- hin zum Aktinfilament. Demzufolge kann aus einer reziproken Änderung der Intensität der 1,0- und 1,1-Reflexe eine Ablösung bzw. Anheftung von Querbrücken abgeleitet werden (Brenner und Yu, 1985; Haselgrove und Huxley, 1973; Huxley, 1968). Die relative Intensität, ausgedrückt durch den Quotienten $I_{1,1}/I_{1,0}$, gibt Auskunft über die Fraktion angehefteter Querbrücken (F). Dies ist jedoch nur unter dem Vorbehalt möglich, daß der Grad der Gitterunordnung (Xu et al., 1987) und die Konfiguration der angehefteten Myosinköpfe (Yu und Brenner, 1986) ebenfalls die Intensitäten der ersten beiden äquatorialen Reflexe beeinflussen können und somit Massenumverteilungen vortäuschen können. Dennoch wird bei sehr dynamischem Verhalten der Querbrücken, wenn die Geschwindigkeitskonstante für die Querbrückenablösung extrem hoch ist, daß heißt, wenn bei mechanischen Steifheitsmessungen keine von der Dehnungsgeschwindigkeit unabhängige Steifheit (vgl. 1.3.1)

gemessen werden kann, die Röntgenstrukturanalyse dazu verwendet zumindest die Fraktion angehefteter Querbrücken unter steady-state-Bedingungen abzuschätzen. Die dazugehörige Bindungskonstante kann aus der Fraktion abgeleitet werden, für die gilt: $K_B = F/(1-F)$.

Die Position der äquatorialen Reflexe im Röntgenbeugungsbild, die umgekehrt proportional zum Abstand zwischen den zugehörigen Gitterebenen ist, erlaubt Aussagen über die Abstände zwischen den Filamenten. Der Filamentabstand $d_{1,0}$ wird als der Abstand zweier benachbarter Myosin-Gitterebenen angegeben (s. Abb.2.7, Material und Methodenteil). Aus diesem Abstand läßt sich dann mit Hilfe einer mathematischen Gleichung (s. 2.6) der Oberflächen- zu Oberflächenabstand $D_{(\text{Aktin-Myosin})}$ zwischen dem dicken Myosinfilament und dem dünnen Aktinfilament bestimmen (Brenner et al., 1996).

Um die in zwei verschiedenen Ansätzen mit dem Phosphat-Analogen AlF_4 akkumulierten Zustände auch strukturell charakterisieren zu können, kann der Vergleich mit den strukturellen Eigenschaften von Querbrücken bei Bindung an das nicht aktivierte Aktinfilament (Relaxationsbedingung), während isometrischer Kontraktion und im Rigor genutzt werden. Zur Erfassung struktureller Eigenschaften dieser verschiedenen Querbrückenzustände bzw. ihrer radialen Elastizität oder Komprimierbarkeit wurden die Muskelfasern in Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen von hochmolekularem Dextran T_{500} inkubiert. Durch die von Dextran hervorgerufene osmotische Komprimierung der Fasern, es ändert sich der Filamentabstand und demzufolge auch der Oberflächen- zu Oberflächenabstand $D_{(\text{Aktin-Myosin})}$, kann auf strukturelle Eigenschaften der angehefteten Querbrücken geschlossen werden, da diese je nach Zustand der Myosinköpfe der Kompression mit einer bestimmten effektiven radialen Kraft entgegen wirken.

Zur Klärung der dieser Arbeit zugrundeliegenden Frage nach der funktionellen und strukturellen Charakterisierung von ADP.P_i -Intermediärzuständen des Akto-Myosin-Komplexes im Querbrücken-ATPase-Zyklus eignen sich sowohl Steifheitsmessungen als auch röntgenstrukturanalytische Untersuchungen.

2 Material und Methoden

2.1 Präparation und Montage der Einzelfasern

Herkunft der Versuchstiere

Die Mehrzahl der Experimente wurde an chemisch gehäuteten Einzelfasern des *Musculus psoas major* von Kaninchen der Rasse „Deutscher Riese“ durchgeführt. Psoaseinzelfasern, die von Kaninchen der Kreuzung Neuseeländer mit „Deutschem Riesen“ isoliert wurden, zeigten in den untersuchten Parametern keine systematischen Abweichungen. Um Muskelfasern mit einem Durchmesser von mindestens 80-120 µm für die mechanischen und röntgenstrukturanalytischen Versuche zu erhalten, wurden 2-3 Jahre alte Kaninchen mit einem Körpergewicht von etwa 3-5 kg verwendet. Die Tiere wurden direkt von einem Tierlaboratorium (Tiertötungsnummer: 462) bezogen.

Faserpräparation

Bei der Präparation der Fasern wurde nach der von Yu und Brenner (1989) beschriebenen Methode, modifiziert nach Kraft et al. (1995), vorgegangen.

Die Kaninchen wurden durch einen Bolzenschlag getötet und durch sofortiges Durchtrennen der *Arteria carotis* ausgeblutet, um die Wirkung der Serumproteasen auf die späteren Präparate zu vermindern. Der Bauchraum wurde durch einen Medianschnitt eröffnet, der durch Schnitte entlang beider Rippenbögen erweitert wurde, um den *Musculus psoas major* beidseitig der Wirbelsäule frei zu legen. Das den Muskel umgebene Fett- und Bindegewebe wurde, ohne den Muskel zu verletzen, möglichst weitgehend entfernt. Anschließend wurden mittels einer gewinkelten Schere entlang dem freien distalen Rand des Muskels mehrere Faserbündel von 2-3 mm Durchmesser und 8-12 cm Länge abgetrennt. Die isolierten Faserbündel wurden dann sofort in ihrer ursprünglichen Länge, d.h. ohne sie zu dehnen, in eine 30 ml Volumen fassende Plexiglaskammer überführt und auf einer Sylgardoberfläche (Silikongel, RTV 615 A+B, Dow Corning Corp., Midland, Mi, USA) mit rostfreien Stahlnadeln festgesteckt. Faserbündel, die sich beim Eintauchen in *Skinning solution* kontrahierten, was gelegentlich vorkam, wurden verworfen. Die Bündel wurden für 30 min bei 0-4°C mit kalter *Skinning solution* (Permeabilisierungslösung, s. 2.2), die zusätzlich 0,5 vol. % Triton X-100 als Detergenz beinhaltet, versetzt und in der Plexiglaskammer unter Luftausschluß inkubiert.

Durch die Einwirkung des Detergenz kam es zur Auflösung und somit zur weitgehenden Entfernung der Zytoplasmamembran und der im Sarkoplasma enthaltenen wasserlöslichen Enzyme und Ionen. Das verbleibende intakte kontraktile System konnte so gezielt durch extern zugegebene Substanzen beeinflusst werden. Nach Abschluß des Permeabilisierungsprozesses wurde die Lösung durch eine *Skinning solution* ohne Tritonzusatz ausgetauscht, in der die Bündel dann ca. 2-3 h bei 4°C aufbewahrt wurden, bevor die eigentliche Präparation der Einzelfasern erfolgen konnte. Von den Faserbündeln wurde, je nach Experiment, ein unterschiedlich langes Stück abgeschnitten (Mechanik: ca. 8-12 mm Länge; Röntgendiffraktion: ca. 20-25 mm Länge) und mittels feiner Stahlnadeln auf dem mit Sylgard bedeckten Boden einer Plexiglaskammer (Faserziehkammer), die mit *Skinning solution* ohne Triton gefüllt war, festgesteckt. Unter einem Präparationsmikroskop (Wild, Heerbrugg, Schweiz) wurden dann aus diesem Faserverband am abgeschnittenen Ende mit einer spitzen Pinzette (Modell N° 5, Dumont & Fils, Schweiz) mehrere Einzelfasern vorsichtig, möglichst ohne Überdehnung, in Längsrichtung herausgezogen. In ihrer Struktur beschädigte, konische, inhomogene oder überdehnte Fasern wurden verworfen. Nur die unversehrten und frei von Bindegewebe isolierten Fasern waren für die mechanischen und röntgenstrukturanalytischen Experimente geeignet. Die einzelnen Fasern wurden anschließend, ohne sie zu dehnen, über einer im Sylgardboden der Kammer eingeschnittenen Vertiefung befestigt. Je nach Präparat bewegte sich die Sarkomerenlänge dieser Fasern zwischen 2,3-2,4 µm, gemessen mittels Laserdiffraktion, und ihr Durchmesser belief sich auf 60-150 µm (gemessen über das Lichtmikroskop).

In diesem Zustand konnten die isolierten Psoas-Fasern unter Luftausschluß bei 4-5°C über 3-5 Tage aufbewahrt werden, wobei alle 2 Tage die Permeabilisierungslösung ohne Triton erneuert wurde, um eine ATP-Verarmung zu verhindern. Während dieses Zeitraumes zeigten die aus den Bündeln isolierten Einzelfasern keine meßbaren Veränderungen der kontraktilen Eigenschaften und des passiven elastischen Verhaltens.

Einfrieren der Faserbündel

Zur Minimierung der Anzahl der Versuchstiere und des Materialverbrauchs wurde eine Methode zur Konservierung der Muskelbündel entwickelt (Kraft et al., 1995). Hierbei wurden die Muskelbündel nach der Isolierung aus dem Kaninchen in flüssigen Stickstoff eingefroren. Nach der Entnahme der Muskelbündel aus dem Kaninchen, verweilten, wie oben beschrieben, die Bündel für eine halbe Stunde in *Skinning solution* mit Tritonzusatz. Im Anschluß daran wurden die Bündel in Lösungen mit aufsteigender Sucrosekonzentration inkubiert. Hierbei

handelte es sich um verschiedene Permeabilisierungslösungen, denen Proteaseinhibitoren und 0,5 M, 1 M, 1,5 M und 2 M Sucrose (Sigma-Aldrich, München), als Schutz gegen Schäden durch Eiskristallbildung, zugesetzt wurden. Die Bündel in den Kammern wurden in diesen Lösungen in aufsteigender Reihe unter Luftausschluß für jeweils mindestens eine Stunde bei 4°C äquibriert.

Anschließend wurden die Bündel in 15-20 mm lange Stücke geschnitten und in flüssigem Propan, welches sich in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Messingblock befand, „Schock“ gefroren. Als letztes wurden sie dann in Cryocups überführt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Muskelbündel in absteigender Reihenfolge durch die sucrosehaltigen *Skinning solutions* mit Inhibitorenzusatz, beginnend mit einer 1,5 M Sucroslösung, geführt. Die Inkubationszeit betrug für jede Sucrosekonzentration mindestens 30 min. Anschließend wurde das Bündel für weitere 30 min in eine Permeabilisierungslösung mit Inhibitoren überführt. Im Anschluß daran konnten dann die Einzelfasern, wie oben beschrieben, isoliert werden. Die aufgetauten Fasern konnten für alle mechanischen Experimente verwendet werden, da sie im Vergleich zu den frisch präparierten Einzelfasern keine nachweisbaren Unterschiede aufwiesen (Kraft et al., 1995).

Montieren von Einzelfasern in die Versuchsapparatur

Um eine einzelne Faser an den Längengeber (Hebel) und den Kraftaufnehmer der Versuchsapparatur zu montieren (siehe Abschnitt 2.4), wurde die Plexiglaskammer mit den Einzelfasern am Kammerblock der mechanischen Apparatur befestigt. Der Kammerblock konnte zusammen mit der Plexiglaskammer mit Hilfe eines Mikromanipulators (Fa. Bachhofer, Reutlingen) bewegt werden. Unter Zuhilfenahme eines Präparationsmikroskops wurde vorsichtig eine einzelne Faser mittels einer Pinzette (Dumont N° 5) aus dem Sylgardboden der Kammer herausgelöst und in die Nähe der Spitzen von Hebel und Kraftaufnehmer, die in die *Skinning solution* eingetaucht waren, geführt. Unter Vermeidung von Verdrehung und Überdehnung wurde die Faser mit ihren Enden unter der Lösungsoberfläche an den jeweiligen Spitzen sehr vorsichtig angedrückt. Um die Faser an beiden Seiten fest zu kleben, wurden Kraftaufnehmer und Hebel mit der Faser für kurze Zeit (ca. 2 sec) aus der Lösung heraus gefahren und mittels einer fein ausgezogenen Glaskapillare (Single Capillary, 4“, 1,2 mm, World Precision Instruments) wurde ein Tropfen Gewebekleber (Histoacryl; Braun, Melsungen) an die Enden der Faserspitzen von Hebel und Kraftaufnehmer angebracht. Beim Wiedereintauchen der Faser in die Lösung kam es zur sofortigen

Polymerisation des Gewebeklebers, so daß die Faser am Kraftaufnehmer und Hebel festgeklebt war.

Um zu vermeiden, daß die Faserenden nachgaben, besonders bei Experimenten, die mit einer kurzzeitigen aktiven Kraftentwicklung verbunden waren, wurde für alle Experimente die Faser noch zusätzlich an beiden Seiten mit Glutaraldehyd (Serva, Heidelberg) fixiert (modifiziert nach Chase und Kushmerick, 1988). Hierzu wurde die angeklebte Faser mit Hilfe des Mikromanipulators von der *Skinning solution* in Vorrigor-Lösung (s. 2.2) überführt. Auf beide Enden der Faser wurden mittels einer fein ausgezogenen Kapillare die Fixierlösung, bestehend aus 5% Glutaraldehyd und 10% Toluidinblau, gegeben. Dies erfolgte unter sorgfältiger Beobachtung, damit nur die äußersten, geklebten Faserenden und nicht die Fasermittel mit der Fixierlösung in Berührung kamen. Der Farbstoff diente als optische Kontrolle, um sicher zu stellen, in welchem Bereich die Faser fixiert wurde. Aufgrund der geringen Dichte der Vorrigor-Lösung sank die Fixierlösung ab und überströmte gewissermaßen die Faserenden. Durch das Fixieren wurden die Faserenden durch und durch vernetzt, so daß sie auch beim Auftreten größerer Kräfte sehr stabil waren.

Sofort nach Zugabe des Fixans auf die Faserenden wurde die fixierte Faser in die eigentliche Meßkammer, in der sich zunächst Relaxierungslösung (Ionenstärke 170 mM) befand, überführt. Hier wurden die Faserenden nochmals mit Gewebekleber nachgeklebt. Durch diese Maßnahme konnte auch bei späterer Aktivierung der Faser über einen längeren Zeitraum die Erhaltung der Querstreifung und der Filamentanordnung gewährleistet werden.

Schließlich wurde die Faser unter Zuhilfenahme eines invertierten Mikroskops (Zeiss, Oberkochen) über die mechanische dreidimensionale Feinverstellung der Kraftaufnehmer-spitze in ihre endgültige horizontale Position gebracht.

2.2 Lösungen

Herkunft der Chemikalien

Adenosin-5`-O-(3-thiotriphosphat) (ATP γ S, Tetralithiumsalz)	Boehringer, Mannheim
Adenosin-5`-triphosphat (ATP, Dinatriumsalz)	Merck, Darmstadt
Adenosin-5`-diphosphat (ADP, Dinatriumsalz)	Sigma-Aldrich, München
P ¹ ,P ⁵ -Di(Adenosin-5`)Pentaphosphat (Ap ₅ A, Natriumsalz)	Sigma-Aldrich, München
Aluminiumnitrat (Al(NO ₃) ₃)	Merck, Darmstadt
2,3-Butanedionmonoxime (BDM)	Sigma-Aldrich, München
Calciumcarbonat (CaCO ₃ , als gefällte Ursubstanz; p.a. > 99,95%)	Merck, Darmstadt
Dextran T ₅₀₀	Pharm. Biotech, Schweden
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamin-N,N,N',N`-tetraessigsäure (EDTA, Dinatriumsalz)	Merck, Darmstadt
Ethylenglykol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N`-tetra- essigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, München
Glutathion (reduzierte Form, Tripeptid: Glu-Cys-Gly)	Sigma-Aldrich, München
Hexokinase (aus Hefe, lyophilisiert, Aktivität: 60-110 U/mg)	Sigma-Aldrich, München
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Fluka Chemica, Schweiz
Kreatinphosphat (CrP) (Dinatriumsalz, synthetisch)	Sigma-Aldrich, München
Natriumfluorid (NaF)	Fluka Chemica, Schweiz
Propionsäure (Prop)	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ , 1 M Stocklösung)	Sigma-Aldrich, München

Alle übrigen Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p.A.-Reinheit von Merck oder Sigma-Aldrich bezogen.

Enzyme, Inhibitoren und andere wirksame Substanzen

Um einer Zerstörung der Strukturproteine durch Serumproteasen, die sich noch in dem Präparat befanden, vorzubeugen, wurden der *Skinning solution* folgende Proteaseinhibitoren zugesetzt:

- AEBSF (4-(2-Aminoethyl)-benzylsulfonylfluorid), deaktiviert Serin-Proteasen durch irre-

versible Bindung

- Antipain, Proteinaseinhibitor (Papain und Trypsin)
- Aprotinin, hemmt Serin-Proteinasen (Trypsin, Chymotrypsin u.a.)
- E-64 (Trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamido(4-Guanidino)Butane), hemmt irreversibel Papain und andere Thiol-Proteinasen
- Leupeptin, Inhibitor für Serin- und Thiol-Proteinasen
- Pepstatin A, hemmt Aspartat-Proteasen

Mit Ausnahme von AEBSF, bezogen von Boehringer, Mannheim, stammen alle Inhibitoren von Sigma-Aldrich, München.

Zusätzlich wurden den Versuchslösungen je nach Zusammensetzung eine oder mehrere der folgenden Substanzen zugegeben:

- NaN_3 (Natriumazid), inhibiert die mitochondriale ATPase, um so das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern
- Ap_5A (P^1 , P^5 -Di(Adenosin-5')Pentaphosphat), Zugabe als kompetitiver Inhibitor zu einigen Analogon-haltigen Lösungen, um die Rephosphorylierung von MgADP-Verunreinigungen zu MgATP und MgAMP durch faser-eigene Myosinkinase zu unterbinden (Lienhard und Secemski, 1973).
- Coffein, verhindert die Anreicherung von Calcium im sarkoplasmatischen Retikulum. So wird einer Ca^{2+} -induzierten Calcium-Ausschüttung aus Membranvesikeln, die den Enthäutungsprozeß überstanden haben, vorgebeugt.
- DTT (DL-Dithiothreitol), reduziert Disulfidbrücken und schützt SH-Gruppen vor Oxidation
- Glutathion (endogenes Tripeptid), schützt SH-Gruppen der Proteine vor Oxidation und reduziert die in Röntgenbeugungsexperimenten entstehenden Wasserstoffperoxide und organische Peroxide
- Hexokinase, Zugabe zu D-Glucose-haltigen Lösungen ($\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Experimente mit MgADP) um mögliche MgATP-Reste zu entfernen. Durch das Enzym kommt es zu einer Übertragung der Phosphorylgruppe von ATP auf D-Glucose und somit zur Bildung der Produkte ADP und D-Glucose-6-phosphat.
- Katalase, Zugabe zu Röntgenbeugungsexperimenten um entstehendes Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff zu zersetzen
- CPK (Kreatinphosphokinase), Zugabe zu Relaxations- (pCa 8,0) und Aktivierungslösungen (pCa 4,5) als ATP-Regenerierungssystem („Back up“-System). Das Enzym überträgt die energiereiche Phosphorylgruppe von Kreatinphosphat (CrP) auf ADP und führt so zur Bil-

dung von Cr und ATP. Es wirkt einer ATP-Verarmung und einer Anreicherung von ADP in der Faser bei aktiver Kraftentwicklung entgegen.

Herstellung der Stocklösungen

Folgende Stocklösungen wurden hergestellt:

1. Ca^{2+} -EGTA, 100 mM: Herstellung der Stocklösung aus EGTA und CaCl_2 (beide Sigma-Aldrich) unter Titration mit KOH oder NaOH
2. EDTA, 100 mM: Hergestellt wie 100 mM EGTA-Stocklösung
3. EGTA, 100 mM: EGTA-Stocklösung (Sigma-Aldrich) wurde mit KOH oder NaOH auf pH 7,00 eingestellt
4. Imidazol, 500 mM: Abgleich des Imidazols (Sigma-Aldrich) mit HCl-Lösung
5. KProp bzw. NaProp, 1 M: Hergestellt durch langsames Mischen von KOH- bzw. NaOH-Plätzchen (Merck) mit 1 Äquivalent Propionsäure (Sigma-Aldrich)
6. MgATP bzw. MgADP, 50 mM: Wurde aus NaATP (Merck) bzw. NaADP (Sigma-Aldrich) unter Zugabe von einem Äquivalent MgCl_2 (Sigma-Aldrich) und Titration mit KOH oder NaOH hergestellt.
7. Dextran T₅₀₀, 30%: Hergestellt durch langsames Rühren über Nacht von Dextran T₅₀₀ (Pharm. Biotech) mit Wasser
8. $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, 100 mM: Lösen in Wasser und einstellen des pH-Wertes auf 3,00 bei 5°C
9. NaF, 500 mM: Hergestellt wie $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ und einstellen des pH-Wertes auf 10,00 bei 5°C

Alle Stocklösungen wurden auf pH 7,00 (+/-0,05) bei 5°C (mit Ausnahme von $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ und NaF) eingestellt.

Zusammensetzung der Versuchslösungen

Die genaue Zusammensetzung der verschiedenen Lösungen ist der Tabelle 1 (s. 2.8) zu entnehmen.

Ap₅A und Hexokinase wurden jeden Tag, DTT und Glutathion (GSH) jeden zweiten Tag aufgrund ihrer kurzen Haltbarkeit in Lösung frisch zu den jeweiligen Versuchslösungen zugegeben. Die Einstellung der Ionenstärke erfolgte durch die entsprechende Zugabe von Kalium- bzw. Natriumpropionat. Alle Lösungen hatten bei der Versuchstemperatur von 2°C einen pH-Wert von 7,00 (+/-0,05).

$\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ und NaF wurden ebenfalls am Versuchstag kurz vor Versuchsbeginn den jeweiligen Lösungen frisch zugesetzt und der pH-Wert kontrolliert, da eine eventuelle Präzipitation dieser beiden Reaktionspartner nicht ausgeschlossen werden konnte. Zudem wurde in Vorversuchen festgestellt, daß, um mögliche Präzipitationen und Trübungen der Lösungen vorzubeugen, für die Bildung des Phosphat-Analogons AlF_4 nur $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ (Chase et al., 1993) anstatt AlCl_3 (Raucher und Fajer, 1994) geeignet war und daß den Lösungen zuerst $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ und dann als zweites NaF zugegeben werden mußte. Außerdem wurde für die Einstellung der Ionenstärke Natrium- statt Kaliumpropionat (für Experimente mit BDM) und für die Einstellung des pH-Wertes NaOH statt KOH verwendet.

Den Lösungen mit MgADP wurden 0,1 U/ml Hexokinase zugefügt und für einige Zeit stehen gelassen, um dem Enzym die Möglichkeit zu geben eventuell vorhandene ATP-Reste in ADP umzusetzen. Erst kurz vor Versuchsbeginn (nur wenige Minuten) wurden diesen Lösungen dann $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ und NaF zugegeben, da AlF_4 eventuell die Hexokinase hemmt.

Bei den röntgenstrukturanalytischen Kompressionsexperimenten, bei denen MgADP und AlF_4 sowohl an die Myosinköpfe im aktivierten Akto-Myosin-Komplex als auch an die nukleotidfreien Myosinköpfe unter Rigorbedingung binden, wurden den Lösungen kurz vor Versuchsbeginn Dextran T₅₀₀ in aufsteigender Konzentration (0, 2, 4, 6 & 8 %) zugegeben, wobei unter Rigorbedingungen bei Zugabe von 8% Dextran T₅₀₀ die Lösung aufgrund des sonst zu großen Volumens kein AlF_4 enthielt (s. 3.5.2, Ergebnisse).

Allen Aktivierungs- und Relaxationslösungen wurden unmittelbar vor der Messung 100 Units CPK pro ml zugesetzt um während der Aktivierung eine ATP-Verarmung zu vermeiden. Zusätzlich wurden allen Lösungen, die bei Röntgenbeugungsexperimenten verwendet wurden, 1000 U/ml Catalase zugegeben.

Skinning solution (ohne Triton):

5 mM KH_2PO_4 , 3 mM MgAcetat, 47 mM CrP, 5 mM K_2EGTA , 5 mM NaN_3 , 3 mM NaATP
Proteaseinhibitoren: 1 mM AEBSF, 10 μM Antipain, 0,001 mg/ml Aprotinin, 5 mM DTT, 10 μM E64, 10 mM Glutathion, 10 μM Leupeptin und 10 μM Pepstatin A (nach Kraft et al., 1995)

pH 7,00 bei 5°C

Skinning solution mit Triton X-100:

Zugabe von 0,5% des Detergenz zur Permeabilisierungslösung

2.3 Versuchsdurchführung

Mechanische Experimente

Zu Beginn der Experimente wurde die Muskelfaser aus der Relaxationslösung (Ionenstärke 170 mM) in die zu vermessende Relaxationslösung (pCa 8,0) mit einer Ionenstärke von 80 mM überführt und die Steifheit der Faser bestimmt. Die Ermittlung der maximalen isometrischen Kraft der zu vermessenden Faser erfolgte in Aktivierungslösung (pCa 4,5). Beim Lösungswechsel, der durch Austausch des gesamten Kammervolumens stattfand, wurde die Faser in eine benachbarte kleinere Kammer überführt. Hierbei wurde die Faser 1-2 Sekunden der Luft ausgesetzt. Selbst eine häufige Wiederholung dieses Lösungswechsels beeinträchtigte weder die Struktur noch die Eigenschaften der Faser. Zur Temperatur- und Sättigungseinstellung verweilte die Faser für einige Minuten in der kleineren Kammer mit der jeweiligen Meßlösung, bevor sie in die Meßkammer transferiert wurde. Die Meßtemperatur wurde während aller Registrierungen auf 2-3°C geregelt.

Der Eintritt in den Rigorzustand (nukleotidfrei) erfolgte durch Überführen der Faser aus Relaxationslösung in eine Vorrigorlösung und dann in die Rigorlösung. Die Vorrigorlösung (s. Tabelle 1) mit ihrem hohen EDTA-Gehalt komplexiert aus der vorherigen Relaxationslösung freie Magnesiumionen, so daß vorhandene ATP-Moleküle nicht mehr am Myosinkopf binden können. Um sicherzustellen, daß keinerlei MgATP-Reste beim Übergang zu einer Lösung mit MgADP·AlF₄ mehr vorhanden waren, wurde die Rigorlösung mindestens 2-3 Mal innerhalb einer halben Stunde ausgetauscht.

Die Inkubationszeit für die AlF_{Rigor}-Versuche, d.h. die Zeit, die das Phosphat-Analogen benötigt, um an die nukleotidfreien Myosinköpfe zu binden, betrug bei geringer Ca²⁺-Konzentration (pCa 8,0) 1 Stunde und in Gegenwart einer hohen Ca²⁺-Konzentration (pCa 4,5) eine halbe Stunde (s. Abb.3.3a+b, Ergebnisse).

Die Meßdaten wurden von Faser zu Faser in zufälliger Abfolge der Lösungen mit verschiedenen Nukleotidanaloga und mit unterschiedlicher Ionenstärke erhalten, ebenso wurde in der Aufeinanderfolge von Lösungen mit niedriger und hoher Ca²⁺-Konzentration abgewechselt. Um systematische Fehler auszuschließen, wurde innerhalb einer Versuchsbedingung die Reihenfolge der nacheinander applizierten Dehnungsgeschwindigkeiten zur Messung der Fasersteifheit zufällig gewählt.

Ein Entfernen der untersuchten Nukleotidanaloga sollte weitestgehend den Ausgangszustand wieder herstellen, d.h. alle Effekte sollten nach Möglichkeit reversibel sein. Die Reversibilität

eines Effektes wurde jeweils am Ende eines Versuches überprüft. Dabei wurde vor und nach den Messungen mit dem jeweils zu untersuchenden Analogon die Faser in einer Aktivierungslösung inkubiert und die resultierende isometrische Kraft gemessen. Alle Effekte sind prinzipiell voll reversibel. Allerdings können einige Experimente, z.B. durch lang anhaltende Aktivierung eine Schädigung oder ein Zerreißen einzelner Myofibrillen verursachen, so daß am Ende eines Versuches nicht immer 100% der Anfangskräfte gemessen wurde. Dies ist jedoch dann kein Effekt der Nukleotidanaloga BDM oder AIF₄.

Während aller Experimente wurde die Homogenität der Querstreifung entlang des gesamten Faserabschnittes lichtmikroskopisch kontrolliert, um bei zu großer Beeinträchtigung der Sarkomerenordnung den Versuch vorzeitig abubrechen.

Röntgenstrukturanalytische Experimente

Die für die mechanischen Experimente erläuterten Maßnahmen zur Temperatur- und Sättigungseinstellung sowie zur Inkubationszeit für die AIF_{Rigor}-Versuche wurden ebenfalls bei den Messungen der Intensitäten der äquatorialen Reflexe und bei den Kompressionsexperimenten mit Dextran T₅₀₀ durchgeführt.

Während der Registrierung der Röntgendiffraktionsbilder für die Bestimmung der Intensitäten und Positionen der äquatorialen Reflexe konnte der Röntgenstrahl auf verschiedene Abschnitte der Faser gerichtet werden. Dies wurde durch eine auf- und abfahrende Meßkammer mit den enthaltenen, senkrecht angeordneten Muskelfasern bei konstantem Röntgenstrahl ermöglicht, um bei sehr intensiver Bestrahlung unnötige Strahlungsschäden am Präparat zu vermeiden. Die Zufuhr neuer Inkubationslösung erfolgte mit einer Spritze über einen Zulaufschlauch in die Kammer, während die schon vermessende Lösung über einen Ablaufschlauch abgesaugt werden konnte. Diese Anordnung der Zu- und Ableitungen gewährleistete kleinstmögliche Toträume bei Lösungswechseln. Um Konzentrations- und Temperaturgradienten zu minimieren, wurde die Lösung während der Messungen in der Kammer auf- und abgepumpt.

Am Ende einer Meßserie wurde zur Kontrolle der Reversibilität auch nach einer Versuchsdauer von mehreren Stunden nochmals das Bezugsspektrum unter Relaxation (Spektrum in Relaxationslösung, pCa 8,0) registriert. Im Anschluß daran wurden die Fasern durch Aktivierung und Überdehnung zerstört und Einzelaufnahmen des gesamten, nicht von den Muskelfasern stammenden Hintergrundes aufgenommen. Diese Aufnahmen dienten der späteren Subtraktion der apparativen Hintergrundstreuung von dem Faserspektrum. Diese

Material und Methoden

Subtraktion war vor allem notwendig bei den Experimenten, in denen MgADP und AlF_4 an die nukleotidfreien Myosinköpfe (Rigorbedingung) in den aktivierten Muskelfasern binden und bei den Versuchen zur Bestimmung der Position der Reflexe und des Kompressionsverhaltens der Fasern mit Dextran T_{500} , da bei diesen Ansätzen der Beitrag zur diffusen Hintergrundstreuung enorm war.

2.4 Mechanische Untersuchungen

Aufbau zur Durchführung mechanischer Messungen

Die mechanischen Experimente wurden an der von Brenner (1986a), weiter entwickelt von Stehle (1995), entworfenen Apparatur durchgeführt. In Abb.2.1 ist ein Schema des mechanischen, elektronischen und optischen Teils der Meßanlage dargestellt.

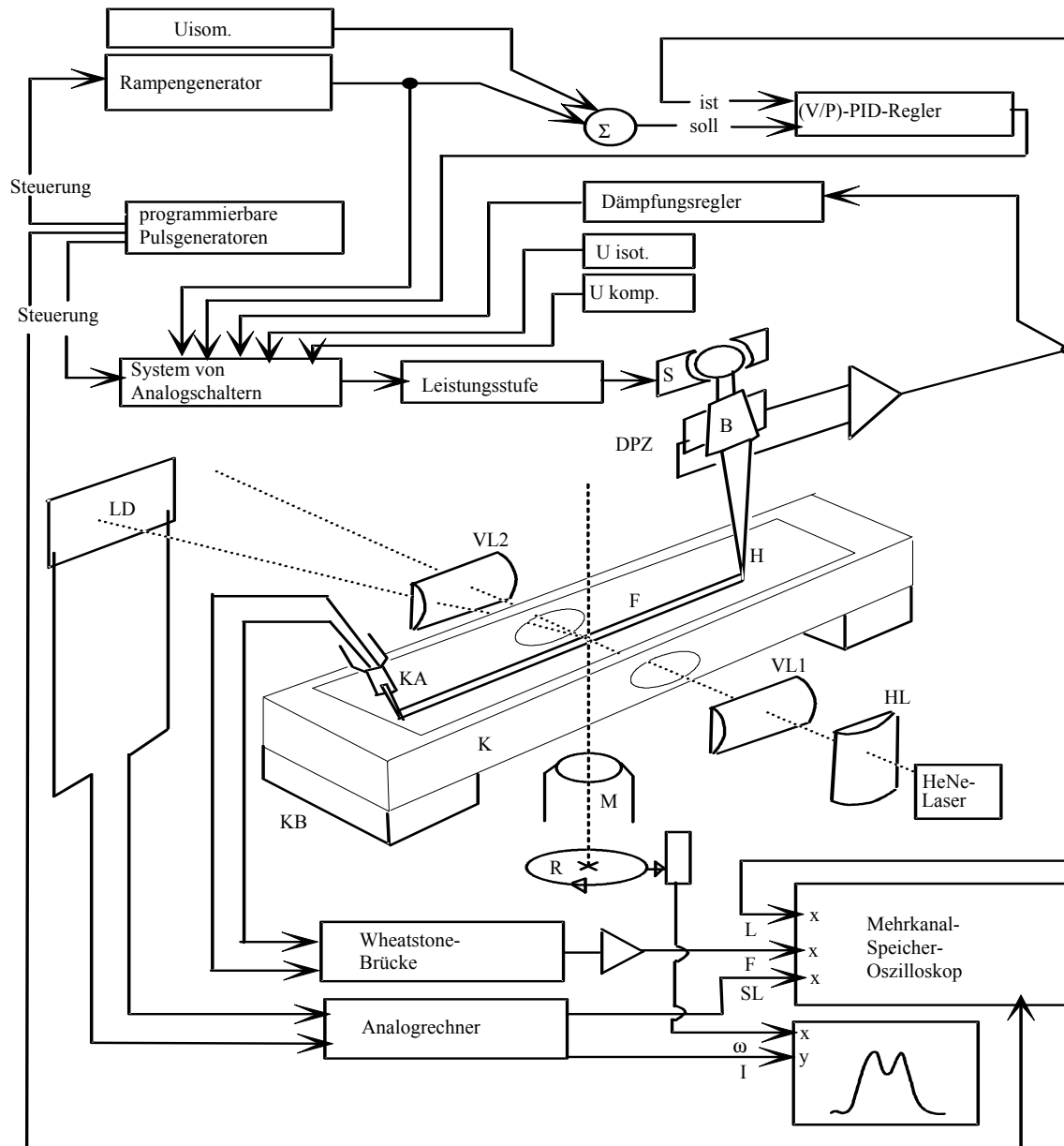


Abb.2.1: Schematischer Aufbau der mechanischen Apparatur

S: Spule; B: Blende; DPZ: Differenzphotozelle; H: Hebel; F: Muskelfaser; KA: Kraftaufnehmer; K: Kammer; KB: Kühlblöcke; M: Objektiv des invertierten Mikroskops; R: Rotationstisch; HL, bzw. VL1, VL2: Zylinderlinsen zur horizontalen bzw. vertikalen Fokussierung des Laserstrahles; LD: Detektor für Laserdiffraction. L: Gesamtlängensignal, F: Kraftsignal, SL: Sarkomerenlängensignal, ω : Signal des Einfallswinkels des Laserstrahles zur Faserachse; I: Signal der Intensität des 1. Diffraktionsmaximums. (Abbildung nach Stehle 1995)

Meßkammer

Die zwischen Kraftaufnehmer und Hebel (Längengeber) eingespannte Faser (s. 2.1) befand sich während sämtlicher Messungen in einer mit Lösung gefüllten rechteckigen, durchflußgekühlten Kammer aus eloxiertem Aluminium. Im Boden und in den beiden Längsseiten der Meßkammer waren Fenster aus dickem Deckglas (Haemacytometer, Stärke 0,4 mm, Menzel) eingesetzt, so daß die horizontal orientierte Muskelfaser mit Hilfe eines invertierten Mikroskops (Zeiss, Oberkochen) während der Messungen beobachtet werden konnte. Die seitlichen Fenster ermöglichten den Durchtritt des Laserstrahls. Zusätzlich befanden sich im Kammerblock zwei kleinere Kammern ohne Fenster. In eine von beiden wurde die Faser zum Wechseln der Meßlösung überführt. Die Kammer und somit auch die Versuchslösung konnten durch zwei Peltierelemente und Durchflußkühlung auf jede beliebige Temperatur zwischen 0-40°C eingestellt werden. Somit war es möglich, die Muskelfaser unterschiedlichen Lösungen und Temperaturen auszusetzen.

Kraftaufnehmer

Mittels eines Kraftaufnehmers wurde die von der Faser produzierte Kraft gemessen. Als Kraftaufnehmer diente ein Halbleiterdehnungsmeßstreifen (Modell AE 801; Fa. SensoNor a.s., Friedberg), dessen Siliziumplättchen durch eine mit Histoacryl angeklebte Spitze aus Epoxid-Karbonfaser-Material verlängert wurde. Dieses Material zeichnet sich durch eine hohe Steifigkeit und ein geringes Gewicht aus, was zu einer höheren Eigenfrequenz des Dehnungsmeßstreifens führte. Um Kurzschlüsse der Metallzuleitungen und um einen Kontakt mit den Meßlösungen zu verhindern, wurden alle Metallteile des Kraftaufnehmers mit Silikonkautschuk (RTV 3140, Dow Corning Corp., Midland, Mi, USA) überzogen. Zwei dehnungsempfindliche Widerstände, eingegliedert in eine Wheatstone-Brücke, waren in das Siliziumplättchen eindiffundiert. Über diese Brücke konnte die der Kraft proportionalen Verbiegung des Siliziumplättchens bzw. die daraus resultierende Widerstandsänderung gemessen werden.

Die Kalibrierung des Ausgangssignals vom Kraftaufnehmer erfolgte mittels Eichgewichten, die an die Karbonspitze angehängt wurden (Kalibrierungsfaktor: ca. 10-12 $\mu\text{N/mV}$).

Längengeber, Kontrolle der Gesamtlänge und Steuerung der Apparatur

Als Längengeber diente ein modifiziertes Drehspulinstrument (Modell SD-830; Shinohara, Japan), dessen Zeiger durch einen konisch zugeschnittenen Hebel aus Epoxid-Karbonfaser-Material ersetzt war (Brenner, 1986a), um so das Trägheitsmoment des Längengebers zu verringern. Die Position des Hebels, und somit das Gesamtlängensignal, wurde mit Hilfe einer ausgeleuchteten Differenzphotozelle (Gülch, 1974) bestimmt. Auf eine am Hebel befestigte Blende wurde Licht einer Niedervoltlampe (12V, 50W) eingespiegelt, so daß die Beleuchtung und somit die davon abhängigen Veränderungen der erzeugten Photoströme der beiden Hälften der Differenzphotozelle von der Hebelposition abhängig waren.

Zur Erzeugung von Längenänderungen der Faser wurde die Hebelposition über eine negative Rückkopplung geregelt. Das Ausgangssignal der Photozelle, das sogenannte Gesamtlängensignal, wurde als Ist-Wert registriert. Das Sollsignal definierte dann die Ausgangsposition des Hebels. Diesem Sollsignal konnten rechteck- und rampenförmige Signale variabler Abfolge, Zeitdauer und Amplitude überlagert werden, um so die nötigen Längenänderungen der Faser für die Steifheitsmessungen und für die Messung der aktiven Kraftentwicklung zu erzeugen. Mit Hilfe des Hebels konnte die Faser also unterschiedlich schnell gedehnt und entdehnt werden.

Um die Abfolge der Längenänderungen zeitlich zu automatisieren, wurde ein System aus mehreren programmierbaren Pulsgeneratoren (Elektronikwerkstatt, Universität Ulm) verwendet. Eine übergeordnete Triggereinheit startete alle 4, 7 oder 13 sec ein vorgewähltes Pulsprogramm, so daß eine zyklische Wiederholung eines Versuchsprotokolls erfolgen konnte.

Sarkomerenlängenregistrierung durch Laserdiffraktion

Die Registrierung der Sarkomerenlänge der Faser erfolgte mittels Laserdiffraktion. Voraussetzung dafür ist, daß die Skelettmuskelfaser mit ihrer regelmäßigen Querstreifung, hervorgerufen durch die in Serie angeordneten A- und I-Bänder, ein optisches Gitter darstellt. Wird monochromatisches, kohärentes Licht mit der Wellenlänge λ auf diese Gitterstruktur projiziert, so erscheint ein Beugungsbild dieser Struktur, wenn die Bragg-Bedingung (Einfallswinkel des Hauptstrahls relativ zur Beugungsebene entspricht Ausfallswinkel des gebeugten Strahls) erfüllt ist (Bragg, 1913). Die Gitterkonstante entspricht der Sarkomerenlänge (S.L.), die sich aus dem Abstand der Faser zum Detektor (a) und dem Abstand des

Diffractionsmaximums 1. Ordnung zur Position des Hauptstrahls (x) mit nachfolgender Gleichung berechnen läßt:

$$S.L. = \lambda \cdot \frac{\sqrt{a^2 + x^2}}{x}$$

Experimentell wurde so verfahren, daß der Strahl eines He-Ne-Lasers (Spectra-Physics inc., Mt. View, CA, USA) mit Hilfe von zwei Zylinderlinsen durch die seitlichen Fenster der Meßkammer auf die horizontal eingespannte Faser gerichtet wurde (s. Abb.2.2). Die daraus resultierenden Beugungsmaxima wurden durch eine weitere Doppel-Linse so ausgerichtet, daß ein Beugungsmaximum 1. Ordnung in einem Abstand von $a = 5$ cm zur Faser auf einen Positions-Detektor traf. Als Detektor diente eine Lateraleffekt-Photodiode (PIN SC/10D; United Detector Technology, Santa Monica, CA, USA).

Aus den Signalen des Detektors konnte mit Hilfe einer Auswertungselektronik, einem System aus Analog-Bausteinen, die Position des 1. Beugungsmaximums und daraus die Sarkomerenlänge errechnet werden.

Das Intensitätssignal sowie ein Signal, welches proportional zur Position und zur Intensität des ersten Beugungsmaximums auf dem Detektor ist, wurden vor jeder Versuchsreihe auf die Hintergrundstreuung abgeglichen. Hierzu wurde die Faser vorübergehend aus dem Laserstrahl gefahren. Durch diese Maßnahme konnten infolge von diffuser Streuung des Laserstrahls und unterschiedlicher räumlicher Lichtverhältnisse Verfälschungen des Positionssignals des Beugungsmaximums auf dem Detektor verhindert werden.

Wie bereits angedeutet wurde, ist die Intensität des 1. Beugungsmaximums abhängig von der geometrischen Anordnung des optischen Gitters, hervorgerufen durch die Querstreifung der Faser, zum einfallenden Laserstrahl, also vom Winkel ω zwischen Laserstrahl und Faserachse. Die Intensität wäre (vgl. Bragg-Bedingung) am größten, wenn ω dem halben Beugungswinkel 1. Ordnung entspricht. Dies wäre der Fall (= nur 1 Maximum im ω -Scan), wenn für alle Myofibrillen einer Faser die Sarkomerenlänge gleich ist und die Orientierung der Z-Scheiben (z.B. rechtwinklig zur Faserachse) gleich ist. Hierbei muß jedoch berücksichtigt werden, daß sich jede einzelne Faser aus mehreren Bereichen, sogenannten „Domänen“, mit unterschiedlicher Orientierung der Querstreifung und Sarkomerenlänge zusammensetzt (Rüdel & Zite-Ferenczy, 1979; Brenner, 1985; Zite-Ferenczy et al., 1986). Mehrere Domänen (etwa 8/mm Faserlänge; Brenner, 1985) zusammen leisten also ihren Beitrag zur Erzeugung eines Diffractionsmaximums. Damit nun bei der Messung der Längenänderungen möglichst viele Domänen einer Faser erfaßt wurden, konnte der Winkel

zwischen Laserstrahl und Faserachse über einen weiten Bereich, dem sog. ω -Scan, schrittweise variiert werden. Dies erfolgte durch manuelle Betätigung eines Rotationstisches, so daß die Meßkammer mit der Faser bei unverändertem Laserstrahl gedreht wurde (vgl. Abb.2.2).

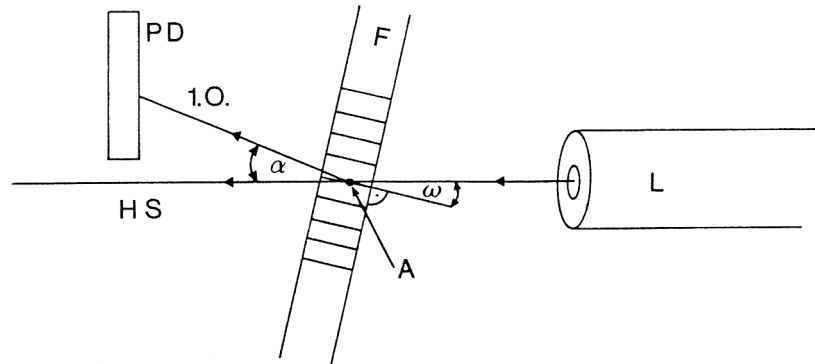


Abb.2.2: Schematische Darstellung zur Definition von ω , dem Winkel zwischen Laserstrahl und Faserachse. Es bedeutet: F: Faser; L: Laser; PD: Positionsdetektor; HS: Hauptstrahl; 1.O.: Diffraktionsmaximum 1. Ordnung; A: Drehachse der Faser im Muskelbad (Aus Kraft 1990)

Die Registrierung des ω -Scans erfolgte mittels eines Analogspeicheroszillographen (N5113; Tektronix, Portland, OR, USA). Da, wie oben erläutert, eine Einzelregistrierung der Sarkomerenlänge bei Steifheitsmessungen kein repräsentatives Signal der Sarkomerenlängenänderungen aller Domänen darstellt, wurde aus den bei jedem Winkel registrierten Sarkomerenlängenänderungen ein Mittelwert gebildet, welcher als repräsentatives mittleres Sarkomerenlängensignal gewertet werden konnte. Größere Domänen einer Faser wurden entsprechend stärker gewichtet, indem die Winkeländerungen im Bereich höherer Intensitäten in kleineren Schritten ausgeführt wurden als im Winkelbereich geringerer Intensitäten. Eine einzelne Steifheitsmessung bei einer bestimmten rampenförmigen Längenänderung (Dehnungsgeschwindigkeit) stellt also eine Mittelung von mehreren Einzelmessungen dar, die bei unterschiedlichem Winkel ω registriert wurden.

Um die Steifheit einer Faser zu ermitteln, wird die Kraftantwort in Abhängigkeit von der stattfindenden Sarkomerenlängenänderung bestimmt. Bei einer schnellen Längenänderung der Faser mittels des Hebels, also bei einer schnellen Dehnungsgeschwindigkeit, benötigt die Dehnung eine gewisse Zeit um sich von dem einen Faserende an das andere fortzubewegen. Um solche Laufzeiteffekte möglichst gering zu halten, ist es am sinnvollsten, daß nicht nur relativ kurze Fasern verwendet werden, sondern daß auch die Bestimmung der Kraft und der

Längenänderung möglichst nahe beieinander erfolgt. Zu diesem Zweck wurde der Laser auf einen nicht fixierten Faserabschnitt möglichst nah am Kraftaufnehmer fokussiert.

Registrierung und Speicherung der Meßdaten

Für die Registrierung der Kraft-, Sarkomeren- oder Gesamtlängensignale stand ein Digital-speicheroszillograph (4094/4562/XF-44; Nicolet, Madison, WI, USA) zur Verfügung, der die Signale als Funktion der Zeit darstellte (s. Abb.2.3). Jede Einzelregistrierung wurde auf 5¼-Disketten gespeichert. Die gewonnenen Daten wurden z.T. direkt während einer Messung an diesem Gerät entweder im X-Y-Betrieb (z.B. Steifheitsmessung mit X als Sarkomerenlängensignal und Y als Kraftsignal) oder im Y-T-Betrieb (Dehnungsgeschwindigkeit, isometrische Kraft, Sarkomerenlängenänderung pro Zeit usw.) ausgewertet, um eventuell auftretende Meßfehler (z.B. Austritt des Signals aus dem aufzunehmenden Bereich des Speicheroszillographen; Laserstrahl trifft fixierten Faserabschnitt) sofort zu erkennen und gegebenenfalls zu korrigieren. Für die eigentliche Auswertung wurden die Daten umformatiert und an einem Personalcomputer mit einem Auswertprogramm (APMD, Peter Schmidt, Kundenspezifische Software und Komplettlösung, Hannover), das speziell für diese Zwecke geschrieben wurde, analysiert (s. Abschnitt 2.6).

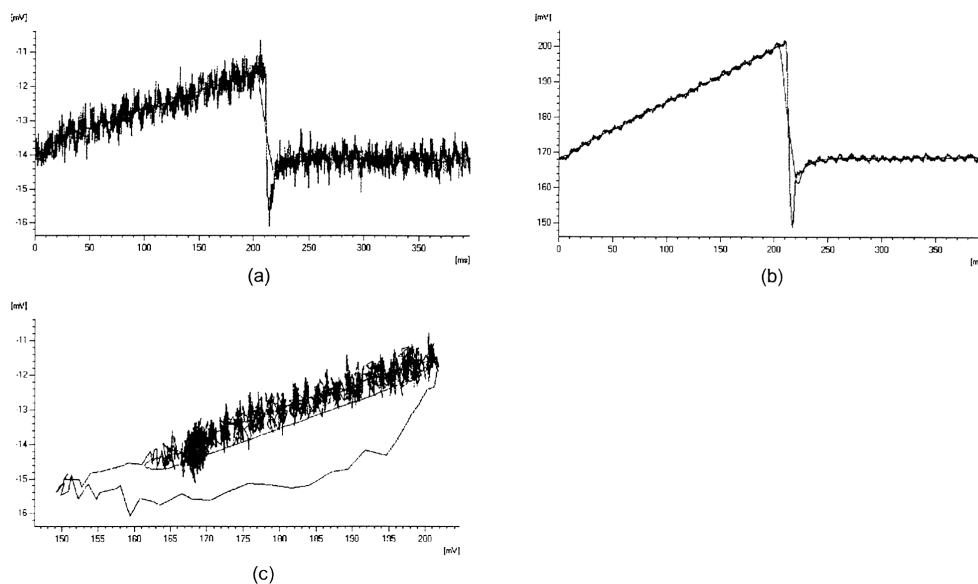


Abb.2.3: Originaldaten einer Registrierung

(a) Kraftsignal vom Kraftaufnehmer, (b) Längensignal von der Photodiode, (c) Darstellung der obigen Meßwerte als Kraft durch Länge zur Bestimmung der Steifheit

2.5 Röntgenstrukturanalytische Untersuchungen

Für die Röntgendiffraktionsexperimente wurden Fasern aus frisch entnommenen M. Psoas-Streifen isoliert. Die Faserpräparation erfolgte nach dem unter Abschnitt 2.1 beschriebenen Verfahren. Statt an Hebel und Kraftaufnehmer wurden 15 Einzelfasern parallel nebeneinander zwischen zwei Faserhaltern (V2A-Stahlplättchen) in der Meßkammer montiert und mit einem in Lösung aushärtenden Silikonkleber („3145 RTV“, Dow Corning, USA) und Histoacryl festgeklebt (Kraft et al., 1999). Diese, im Vergleich zu den mechanischen Untersuchungen, hohe Anzahl an Muskelfasern garantierte für die spätere Auswertung der Röntgenbeugungsbilder eine ausreichende Intensität der beiden ersten äquatorialen Reflexe [1,0] und [1,1], da die absolute Intensität von der Muskelmasse im Röntgenstrahl abhängt. Ein weiterer Unterschied zu den mechanischen Messungen bestand in der vertikalen Ausrichtung der Fasern im Röntgenstrahl für die Registrierung der Diffraktionsbilder, so daß der Äquator in den Beugungsbildern horizontal orientiert ist.

Die Sarkomerenlänge wurde wie in den mechanischen Untersuchungen (vgl. Abschnitt 2.4) mit einem He-Ne-Laser durch Laserdiffraktion vor Versuchsbeginn registriert. Dazu wurde ein Laserstrahl auf die Fasermittelpunkte in der noch offenen Kammer fokussiert. Auf einem über den Fasern angebrachten Schirm konnte dann anhand des Diffraktionsbildes die Sarkomerenlänge abgelesen und auf die physiologische Länge von 2,4 µm eingestellt werden. Auch im Aufbau für Röntgendiffraktion konnte die Sarkomerenlänge durch Laserdiffraktion während der Versuche kontrolliert werden.

Aufbau zur Durchführung der Röntgenbeugungsexperimente

Die röntgenstrukturanalytischen Experimente zur Registrierung äquatorialer Diffraktionsspektren wurden am Elektron-Positron Speicherring DORIS an der Beamline A2 des Deutschen Elektronen-Synchrotrons (DESY) in Hamburg durchgeführt.

Die elektronischen und mechanischen Komponenten entsprachen im Prinzip der mechanischen Meßapparatur, es konnte durch einen Längengeber die Faserlänge variiert werden und die Kraft durch einen Kraftaufnehmer ähnlich wie in der mechanischen Meßapparatur gemessen werden.

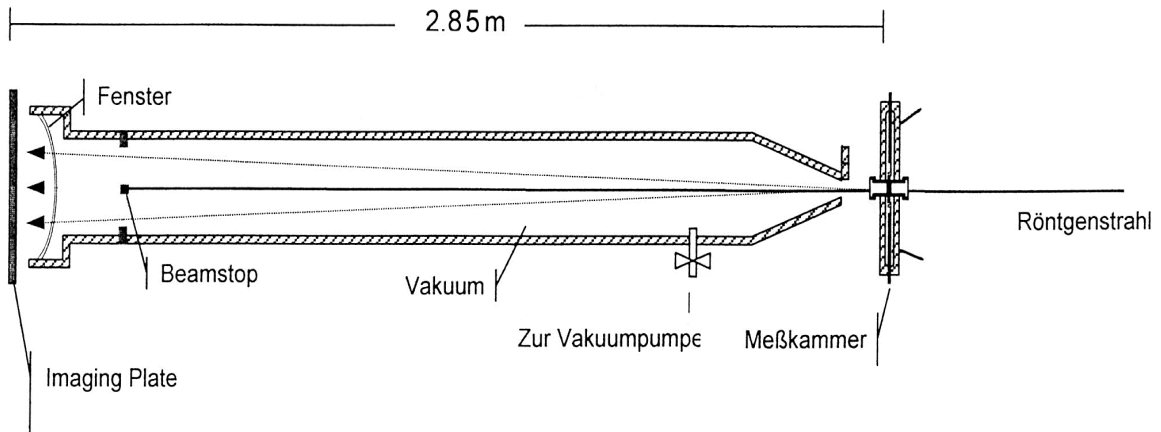


Abb.2.4: Aufbau der Röntgenkamera

Um den speziellen Anforderungen der röntgenstrukturanalytischen Untersuchungen zu entsprechen, wurde eine spezielle Meßkammer (s. Abb.2.5) aus V4A-Stahl verwendet, in der die Fasern vertikal orientiert waren. Die beiden in Längsrichtung befindlichen Glasfenster wurden durch Kaptonfolie (Dupont) ersetzt. Beide Fenster waren verstellbar, so daß sich der Abstand zwischen den Fenstern, in welchem sich die Fasern befanden, auf etwa 0,3-0,5 mm reduzierte und somit die Absorption des Röntgenstrahls durch Inkubationslösung minimierte (Kraft et al., 1999).

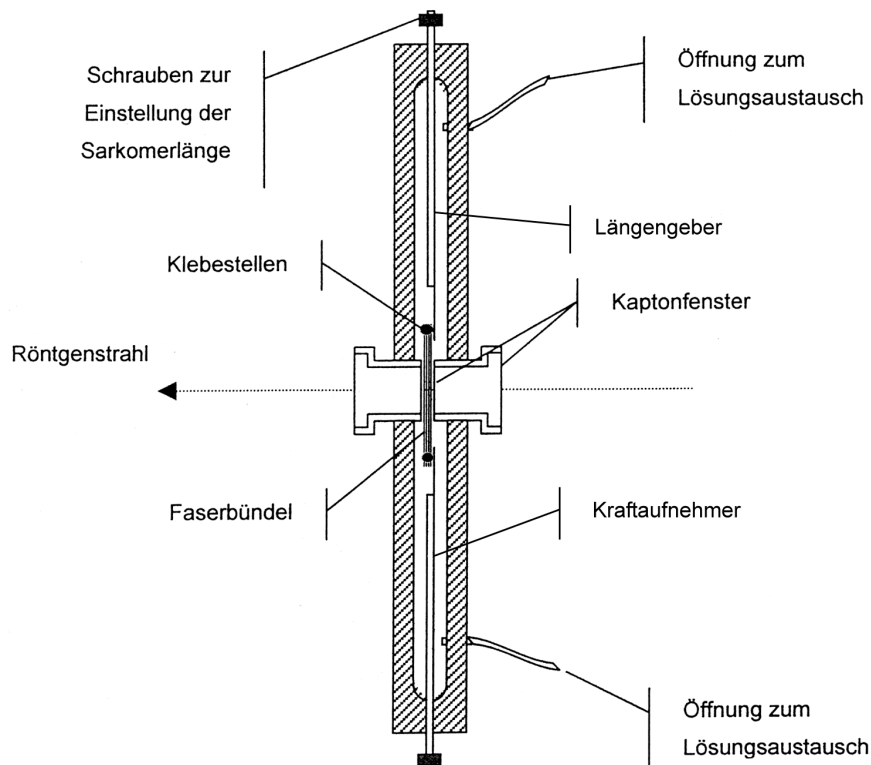


Abb.2.5: Aufbau (schematisch) der Meßkammer für Röntgendiffraktion

Der Röntgenstrahl wurde durch einen goldbeschichteten Glasspiegel durch sog. „äußere Totalreflexion“ als monochromatische Röntgenstrahlung auf eine Photoimaging-Plate (Typ: BAS-III, Fuji, Japan) oder auf einen CCD-Detektor (marresearch GmbH, Norderstedt) fokussiert. Durch die Anordnung mehrerer beweglicher Blenden wurde der Strahl am Ort des Präparates auf 50-80 μm in der Höhe und 1,5 mm in der Breite begrenzt.

Der Abstand zwischen Imaging plate (oder CCD-Detektor) und dem Faserpräparat, die sog. Kameralänge, war auf 2,85 m justiert. In der Nähe der Imaging-Plate befand sich eine genau im Zentrum des Stahlrohres mit Nylonfäden aufgehängte, teildurchlässige Blende (Beamstop, vgl. Abb.2.4), bestehend aus einem Bleiring mit aufgeklebter Nickelfolie (11,5 * 10 mm). Durch diese Nickelfolie wurde der Hauptstrahl soweit abgeschwächt, daß die verbleibende Intensität bei der Auswertung der Diffraktionsbilder (s. 2.6) verwendet werden konnte. Die aus dem „Aufprallen“ des Hauptstrahls auf die Nickelfolie resultierende Streustrahlung konnte mit dem Bleirahmen minimiert werden.

Zwischen Röntgenstrahlausgang und dem Faserpräparat wurde der Strahl durch eine Ionisationskammer geleitet, die die eingestrahelte Energie während einer Bildaufnahme integrierte, um so bei späterer Auswertung der Daten eine Normierung der aufgenommenen Bilder auf die jeweiligen Strahlintensitäten zu ermöglichen. Die Strahlungsintensität in einem Synchrotron ist im Verlauf eines Meßtages nicht konstant, sondern mit Energieverlusten, z.B. durch Kollision der Elektronen mit einem Gasmolekül, verbunden.

Für die Registrierung der Beugungsmuster standen je nach Experiment entweder eine Imaging-Plate mit einer Größe von 20 * 25 cm oder ein CCD-Detektor zur Verfügung. Die Aufzeichnung der Intensitäten der ersten beiden äquatorialen Reflexe [1,0] und [1,1] für die Bestimmung des daraus resultierenden Intensitätsquotienten $I_{1,1}/I_{1,0}$ in Gegenwart von BDM oder MgADP. AlF_4 sowohl unter Aktivierung als auch unter Rigorbedingung erfolgte mit der Imaging-Plate. Zur Bestimmung der Abstände zwischen den Filamenten bei den Messungen mit Dextran T_{500} wurden die Diffraktionsbilder mit dem CCD-Detektor registriert und daraus die Positionen der ersten beiden äquatorialen Reflexe bestimmt.

2.6 Allgemeine Datenanalyse

Mechanische Experimente

Die Auswertung von Messungen der isometrischen Kraft und der Fasersteifheit erfolgte mit dem Programm APMD (Peter Schmidt, Kundenspezifische Software und Komplettlösung, Hannover), wobei zunächst im Y-T-Betrieb in der Darstellung des Sarkomerenlängensignals die Zeit in sec für eine Längenänderung in mV abgelesen wurde. Die Dehnungsgeschwindigkeit (mV/sec) konnte dann durch den Quotienten aus Sarkomerenlängenänderung ($\Delta S.L.$) und der Zeit, in der die $\Delta S.L.$ stattfindet, ermittelt werden (s. Abb.2.3b). Aus diesem errechneten Wert (mV/sec) wurde später durch Division durch den für jeden Versuch typischen Kalibrierungsfaktors (mV/[nm/HS]) die tatsächliche Dehnungsgeschwindigkeit ([nm/HS]/sec) errechnet. Graphisch aufgetragen wurde der dekadische Logarithmus der Dehnungsgeschwindigkeiten, da sich die gemessenen Werte zwischen 0,01 und 10000 ([nm/HS]/sec) erstreckten. Zudem wurde im X-Y-Betrieb für eine Änderung der Sarkomerenlänge ($\Delta S.L.$) von etwa 2 nm/HS die zugehörige Änderung der Kraft (ΔF) in mV abgelesen. Durch Bildung des Quotienten aus ΔF und $\Delta S.L.$ wurde so die Fasersteifheit bestimmt (vgl. Abschnitt 1.3.1, Einleitung). Da im Rigor alle Querbrücken mit hoher Affinität an Aktin angeheftet sind und die Faser somit die höchste erreichbare Steifheit aufweist, wurden die unter verschiedenen experimentellen Bedingungen gemessenen Fasersteifheiten auf die Rigorsteifheit normiert. Diese normierte Steifheit wurde gegen die Dehnungsgeschwindigkeit aufgetragen (s. z.B. Abb.3.10).

Die Bestimmung der maximalen isometrischen Kraft der zu vermessenden Faser konnte im Y-T-Betrieb in der Darstellung des Kraftsignals in Abhängigkeit von der Zeit in sec erfolgen. Hierbei wurde die Differenz zwischen der isometrisch entwickelten Kraft und dem nach einer Phase der raschen lastfreien Verkürzung für kurze Zeit erreichten Wert (Kraft = 0) in mV als isometrische Kraft bestimmt. Die bei Zugabe von BDM oder dem Analogon Aluminiumfluorid zu messende Abnahme der isometrischen Kraftentwicklung wurde für jede Faser auf die maximale isometrische Kraft normiert dargestellt (vgl. z.B. Abb.3.2).

Röntgenstrukturanalytische Experimente

Die Imaging-Plates wurden mit einem Scanner (BAS 2000, Fuji, Japan, zur Verfügung gestellt vom MPI (Arbeitsgruppe Ribosomenstruktur)) ausgelesen und die Daten zur weiteren Verarbeitung gespeichert. Die Originaldaten wurden mit einem von C. v. Grumbkow (Abt. Molekular- und Zellphysiologie) entwickelten Programm zur Analyse weiter bearbeitet.

Zunächst wurden die Daten auf die jeweilige Intensität der Ionisationskammer normiert (s. Abschnitt 2.5). Bei den Versuchen, in denen MgADP und AlF_4 an die nukleotidfreien Myosinköpfe (Rigorbedingung) binden und bei den Experimenten zur Bestimmung der Filamentabstände und des Kompressionsverhaltens der Fasern mit Dextran T_{500} wurden von diesen normierten Bildern die jeweils zugehörigen, ebenfalls normierten Hintergrundbilder (Röntgenbeugungsbild ohne Muskelfasern) so subtrahiert, daß die Intensität des Hauptstrahls im resultierenden Bild gerade etwa auf Null reduziert wurde. Diese Subtraktion des Hintergrundes erleichterte die Intensitäts- und Positionsbestimmung der äquatorialen Reflexe bei der späteren Auswertung.

Um eventuelle Abweichungen des Meridians und des Äquators von der Senkrechten bzw. Waagerechten auszugleichen, mußten alle Bilder zentriert und rotiert werden. Die von dem CCD-Detektor und der Imaging-Plate registrierten Beugungsbilder haben eine Größe von $1024 * 1024$ Pixeln. Nach erfolgreicher Zentrierung und Rotation lag die Mitte des Diffraktionsbildes am Schnittpunkt der meridionalen- (vertikalen) und äquatorialen- (horizontalen) Reflexe bei Pixel $512 * 512$. Um schließlich die maximalen Intensitäten und Positionen der beiden innersten Reflexe des Äquators $[1,0]$ und $[1,1]$ erfassen zu können, wurde der gesamte Bereich der äquatorialen Reflexe im Diffraktionsbild ausgeschnitten und integriert, um so Intensitätsprofile der äquatorialen Reflexe zu erzeugen (vgl. Abb.2.6).

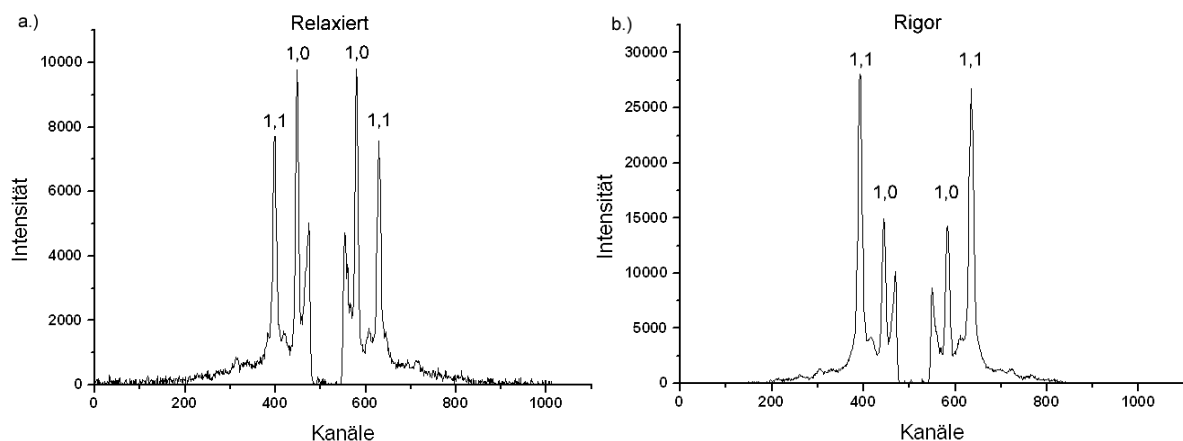


Abb.2.6a+b: Äquator der Röntgenbeugungsspektren von 15 Fasern des Kaninchenpsoas während Relaxation und im Rigor. Ionenstärke 80 mM; $T = 2^\circ\text{C}$; Standardrelaxations- und Standardrigorlösung.

Zur Bestimmung der Reflexparameter (Intensität und Position der einzelnen Reflexe) wurden zwei Wege benutzt. Im ersten Verfahren (zur Ermittlung der Intensitäten) wurden mit dem Datenerfassungs- und Verarbeitungsprogramm „PCA“ (Oxford Instruments, Oak Ridge, USA) unter Zuhilfenahme der Peak-Report-Funktion (bestimmt die Fläche unter den jeweiligen Reflexen) in den Profilen die individuellen Intensitäten der ersten beiden Reflexe bestimmt. Graphisch dargestellt wurde das Intensitätsverhältnis des 1,1- und 1,0-Reflexes, ausgedrückt durch den Quotienten $I_{1,1}/I_{1,0}$, in Abhängigkeit von der Ionenstärke der Versuchslösungen in Gegenwart des zu untersuchenden Nukleotidanalogs. Alle Intensitätsquotienten wurden auf den ermittelten Quotienten $I_{1,1}/I_{1,0}$ im relaxierten Zustand (pCa 8,0) bei niedriger Ionenstärke normiert.

Bei der Analyse der Positionen der beiden Reflexe in den Dextran-Experimenten kam ein zweites Verfahren zur Anwendung. Die Intensitätsprofile entlang des Äquators wurden mit dem Mathematik- und Statistikprogramm „ORIGIN“ (Microcal, USA) ausgewertet. In diesem Verfahren wurde durch Auswahl von je einem Punkt links und rechts eines Reflexes eine Gerade definiert, die den angenommenen linearen Hintergrund im Bereich dieser Reflexe beschrieb. Die oberhalb dieser Geraden gelegene Fläche, ihre Breite (FWHM = Full Width Half Maximum) und vor allem ihre mittlere Position wurden dann durch Anpassung einer Lorentz-Funktion an die jeweiligen Reflexe berechnet. Aus dieser Position konnte der Abstand zwischen dem 1,0-Reflex und dem Hauptstrahl bzw. Zentrum des Diffraktionsbildes und daraus wiederum der äquatoriale Gitterabstand $d_{1,0}$ in nm ($d_{1,0}$ ist proportional dem Kehrwert des Abstandes zwischen Hauptstrahl und 1,0-Reflex) ermittelt werden. Aus diesem Gitterabstand ließ sich dann mit nachfolgender Gleichung der Oberflächen- zu Oberflächenabstand $D_{(\text{Aktin-Myosin})}$ (s. Abb.2.7) zwischen dem dicken Myosinfilament (Radius = 8,0 nm) und dem dünnen Aktinfilament (Radius = 5,0 nm) bestimmen (Brenner et al., 1996).

$$D_{(\text{Aktin-Myosin})} = 2/3 \times d_{1,0} - 13.0$$

Das zu den Versuchslösungen zugesetzte Dextran mit hohem Molekulargewicht (Dextran T_{500} : MW = 500000) erzeugt durch osmotischen Druck eine Komprimierung der Fasern, die von der jeweiligen Dextrankonzentration abhängt. Mit Hilfe einer Tabelle von Xu et al. (1993) konnte jede zugesetzte Dextrankonzentration in osmotischen Druck (Pa) umgerechnet werden. Die Komprimierung, welche aus dem äquatorialen Gitterabstand ($d_{1,0}$) abgelesen werden kann, wird auch vom Zustand der Myosinköpfe bestimmt. Sind die Myosinköpfe beispielsweise im Rigorzustand an Aktin angeheftet, so ist die Faser weit weniger

komprimierbar als bei einer relaxierten Faser, wo die Myosinköpfe weniger starr und in geringerer Zahl an Aktin gebunden sind. Die je nach Zustand der Myosinköpfe resultierende radiale Kraft F_r , die von Fasern der osmotischen Kompression entgegengesetzt wird, kann nach $F_r = 2\sqrt{3}\pi d_{1,0}$ (Xu et al., 1993) abgeschätzt werden, mit π für den durch Dextran T_{500} ausgeübten osmotischen Druck und $d_{1,0}$ für den Abstand zwischen den 1,0-Reflexen. Die resultierende graphische Darstellung von $D_{(\text{Aktin-Myosin})}$ gegen die angewandte radiale oder transversale Kraft wird auch „Antwortkurve“ genannt. Die radiale Gleichgewichtslänge, d.h. die Länge ohne elastische Verformung des Myosinkopfes, wird abgeleitet von dem Punkt, an dem sich die Antwortkurve, die ohne angeheftete Myosinköpfe ermittelt wird (z.B. relaxierter Zustand bei Ionenstärke 80 mM) und die Kurve unter den jeweiligen Bedingungen (z.B. Rigor) sich überschneiden. Bei diesem Filamentabstand sind die Myosinköpfe (z.B. Rigorköpfe) in radialer Richtung nicht elastisch verformt. Diese radiale Gleichgewichtslänge ist charakteristisch für die Struktur des Myosinkopfes in verschiedenen Zuständen (z.B. Rigor, aktive Kraftentwicklung usw.; Brenner und Yu, 1991; Xu et al., 1993).

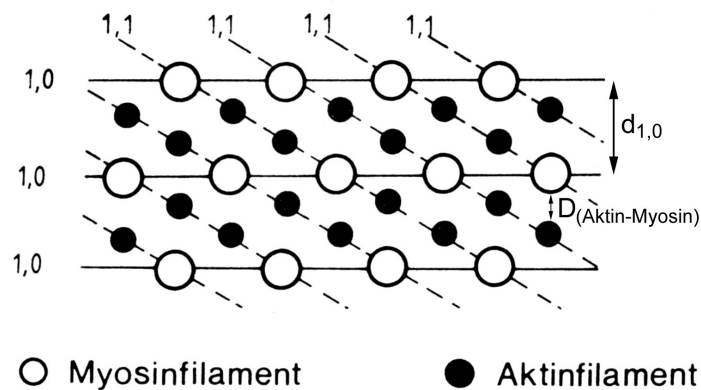


Abb.2.7: Schematische Darstellung zur Definition von $d_{1,0}$ und $D_{(\text{Aktin-Myosin})}$
 Der Filamentabstand $d_{1,0}$ ist der Abstand zwischen zwei benachbarten Myosin-Gitterlinien (1,0-Gitterebenen);
 der Oberflächen- zu Oberflächenabstand $D_{(\text{Aktin-Myosin})}$ ist der Abstand zwischen dem dicken Myosinfilament und
 dem dünnen Aktinfilament.
 (Abb. nach Brenner 1986a)

2.7 Zusammenfassung der Daten

Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurden die experimentellen Daten von mehreren Fasern aus einer Versuchsreihe zusammengefaßt, wobei die Meßwerte (z.B. Steifheit, Intensitätsquotient) zunächst auf eine Vergleichsmessung normiert wurden, die bei allen Einzelmessungen unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurde. Die zusammengefaßten Ergebnisse wurden angegeben als arithmetische Mittelwerte \pm SEM (Unsicherheit des Meßfehlers) für N unabhängige Experimente. Zur besseren Anschaulichkeit wurden teilweise Regressionsgeraden in die graphischen Darstellungen hineingefittet. Soweit ein echter (signifikanter) Unterschied zwischen den Meßwerten feststellbar war, wurde die statistische Sicherheit (Signifikanz) mit Hilfe des *t-Tests* nach Student berechnet:

$$\tau = \pm \frac{m_1 - m_2}{S_d} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$$

Für die Mittelwerte m_1 und m_2 sind eine bestimmte Anzahl von Einzelmessungen herangezogen worden, nämlich n_1 und n_2 , wobei S_d eine Abkürzung ist für:

$$S_d = \left(\frac{(n_1 - 1)\Delta m_1^2 + (n_2 - 1)\Delta m_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \right)^{1/2}$$

Dabei sind Δm_1 und Δm_2 die Standardabweichungen der beiden Meßreihen.

τ wurde mit Grenzwerten von t (Tabelle 2), die von der Zahl der Messungen ($n_1 + n_2$) abhängen, verglichen. Wenn $\tau < t$ (95%) ist, dann ist kein echter Unterschied aus den Messungen feststellbar. Hat dagegen t (95%) $\leq \tau \leq t$ (99%) Gültigkeit, so unterscheiden sich m_1 und m_2 mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit ($P < 0,05$; $P =$ Probabilitas, Wahrscheinlichkeit). Gilt dagegen t (99%) $\leq \tau$, so unterscheidet sich m_1 statistisch signifikant von m_2 ($P < 0,01$).

Material und Methoden

$(n_1+n_2 - 2)$	t (95%)	t (90%)
1	12,706	636,619
2	4,303	31,598
3	3,182	12,941
4	2,776	8,610
5	2,571	6,859
6	2,447	5,959
7	2,365	5,405
8	2,306	5,041
9	2,262	4,781
10	2,228	4,587

Tabelle 2: t-Werte für die statistischen Sicherheiten 95% und 99% in Abhängigkeit von der Anzahl der Messungen n_1 und n_2 .

Bei Messungen der Kraftentwicklung oder –hemmung in Gegenwart der zu untersuchenden Nukleotidanaloga wurde die Kraft auf die maximale isometrische Kraft der Faser bei Aktivierung mit MgATP bezogen.

Die zusammengefaßten Daten können das Resultat einer Einzelmessung nicht ersetzen, da die Strukturhaltung während einer Aktivierung von Faser zu Faser variierte. In einigen Fällen wurden daher repräsentative Einzelmessungen dargestellt.

Material und Methoden

2.8 Tabelle zur Zusammensetzung der Standardlösungen

	Imidazol	EDTA	EGTA	Ca-EGTA	CaCl ₂	Coffein	CrP	Mg ATP	MgCl ₂	DTT	Gln	Glucose	Ap ₅ A	Mg ADP	Hexokinase	Al(NO ₃) ₃	NaF	BDM
Vorrigor	10	7,5	2,5															
Rigor	10	2,5	2,5															
Relaxation	10		1					1	2									
Aktivierung pCa 4,5	10			3	0,1	10	10	2	2	5	10							
Relaxation+BDM pCa 8,0	10		3			10	10	2	2	5	10							50
Aktivierung+BDM pCa 4,5	10			3	0,1	10	10	2	2	5	10							50
Relaxation+AlF ₄ pCa 8,0	10		3			10	10	2	2	5	10					2	10	
Aktivierung+AlF ₄ pCa 4,5	10			3	0,1	10	10	2	2	5	10					2	10	
MgRigor pCa 8,0	10		3						2	5	10	200			0,1 U/ml			
MgRigor pCa 4,5	10			3	0,1				2	5	10	200			0,1 U/ml			
MgRigor +AlF ₄ pCa 8,0	10		3						2	5	10	200	0,25	2 oder 5	0,1 U/ml	2 oder 5	10 oder 25	
MgRigor +AlF ₄ pCa 4,5	10			3	0,1				2	5	10	200	0,25	2 oder 5	0,1 U/ml	2 oder 5	10 oder 25	

Tabelle 1: Zusammensetzung der Standardlösungen

Alle Angaben in mM; Ausnahme: Hexokinase in U/ml; K- bzw. Na-Propionat wurden entsprechend der gewünschten Ionenstärke zugegeben; 100 U/ml CPK wurden kurz vor Versuchsbeginn zu Relaxations- (pCa 8,0) oder Aktivierungslösung (pCa 4,5) zugesetzt; Zugabe von 1000 U/ml Catalase in allen Röntgenbeugungsexperimenten; Zugabe von Dextran (2, 4, 6 & 8%) für osmotische Kompressionsexperimente; MgRigorlösungen mit MgADP (pCa 8,0 und 4,5) wie MgRigor+AlF₄ (pCa 8,0 und 4,5), jedoch ohne Al(NO₃)₃ und NaF.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der notwendigen experimentellen Bedingungen

Der Versuchsablauf und die Versuchsbedingungen müssen so gewählt werden, daß nicht nur eine homogene Verteilung von BDM (2,3-Butandionmonoxim) oder AlF_4 (Aluminiumfluorid) in der strukturell intakten Muskelfaser gewährleistet ist, sondern auch eine vollständige Sättigung der Querbrücken mit der Substanz gegeben ist. Nur so kann ein Effekt, den BDM oder AlF_4 eventuell auf membranfreie Skelettmuskelfasern hat, eindeutig einer durch die Substanz verursachten Veränderung der Querbrückenfunktion zugeordnet werden.

3.1.1 Ermittlung der notwendigen Konzentrationen und Inkubationszeiten für BDM bzw. $\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4$

Hemmung der Kraftentwicklung in Abhängigkeit von der BDM-Konzentration

Ziel der Vorversuche mit BDM war es, möglichst alle Querbrücken auch bei hoher Ca^{2+} -Konzentration mit ATP in den „weak-binding states“, also ohne aktive Kraftentwicklung zu akkumulieren. Da unklar war, welche BDM-Konzentration für eine möglichst vollständige Unterdrückung der aktiven Kraftentwicklung notwendig ist, wurde bei steigender BDM-Konzentration die aktive Kraftentwicklung gemessen. Die Ionenstärke wurde auf 110 mM eingestellt (Abb.3.1).

Das Ausmaß der Inhibition ist von der BDM-Konzentration und der Versuchstemperatur abhängig. 5 mM BDM sind bei 5°C für eine 50%ige Inhibition der Kraft bei maximaler Aktivierung erforderlich. Eine fast vollständige Unterdrückung der aktiven Kraftentwicklung (Restkraft 3,5-7%) und ein konstanter Wert für die prozentuale Hemmung konnten nach einer Inkubationszeit von 2-3 Minuten mit einer Konzentration von 50 mM bei 5°C erreicht werden. Bei 20°C lag bei dieser Konzentration allerdings noch eine Restkraft von 0,3 +/- 0,04 (oder 30% +/- 4%) vor. Erst ab einer Konzentration von 150 oder 200 mM BDM war es möglich bei dieser höheren Temperatur von einer vollständigen Inhibition der Kraft zu sprechen.

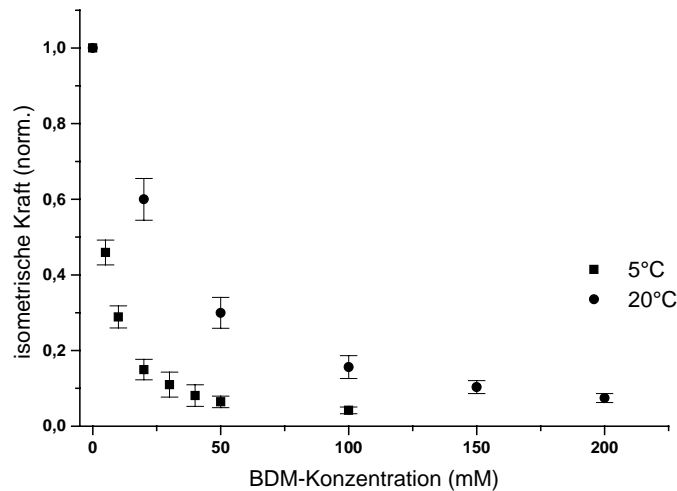


Abb.3.1: Einfluß der BDM-Konzentration auf die isometrische Kraftentwicklung bei voller Calciumaktivierung (pCa 4,5), Ionenstärke 110 mM, T = 5 & 20°C. Es sind die Daten von 10 Fasern +/- SD bei 5°C und von 4 Fasern +/- SD bei 20°C dargestellt; alle Werte sind auf maximale Aktivierung ohne BDM normiert.

Aufgrund dieser Befunde wurden für die Steifheits- und röntgenstrukturanalytischen Untersuchungen 50 mM des allosterischen Hemmstoffes bei einer Ionenstärke von 80 mM und einer Temperatur von 2-3°C verwendet.

Hemmung der Kraftentwicklung durch Inkubation der Fasern mit 2 mM ATP und 2 mM AlF₄

In den Vorversuchen mit ATP und AlF₄ sollte geklärt werden, wie lange es bis zur maximalen Hemmung der Kraftentwicklung durch Bindung von AlF₄ an den Myosinkopf dauert (Erreichen des AlF_{Aktiv}-Zustandes) und wie weit die Kraftentwicklung bei 5°C und 20°C zu unterdrücken ist. Ferner wurde auch die Reversibilität der AlF₄-Bindung überprüft.

Für diese Untersuchungen wurde das Phosphat-Analogon AlF₄ zu maximal Ca²⁺-aktivierten Fasern zugegeben. Eine kurze Inkubationszeit von 2-3 min wird für das Eindiffundieren und die Bindung von AlF₄ bei 5°C benötigt (Chase et al., 1993). Wie aus Abb.3.2 zu entnehmen ist, wurde die Kraftentwicklung der Fasern in einer Standard-Aktivierungslösung (pCa 4,5; Ionenstärke = 80 mM) durch Zugabe von 2 mM AlF₄ unter aktivem Turnover bis auf eine Restkraft von 5-7% unterdrückt. Diese sogenannte „Restkraft“ kann teilweise auf passive Eigenschaften der Querbrücken zurückzuführen sein, wird aber auch durch einzelne, den Querbrückenzyklus durchlaufende und kraftgenerierende Myosinköpfe verursacht. Vermutlich unter Zunahme des Anteils kraftgenerierender Querbrücken steigt die Restkraft bei Temperaturerhöhung bis auf ca. 20% an.

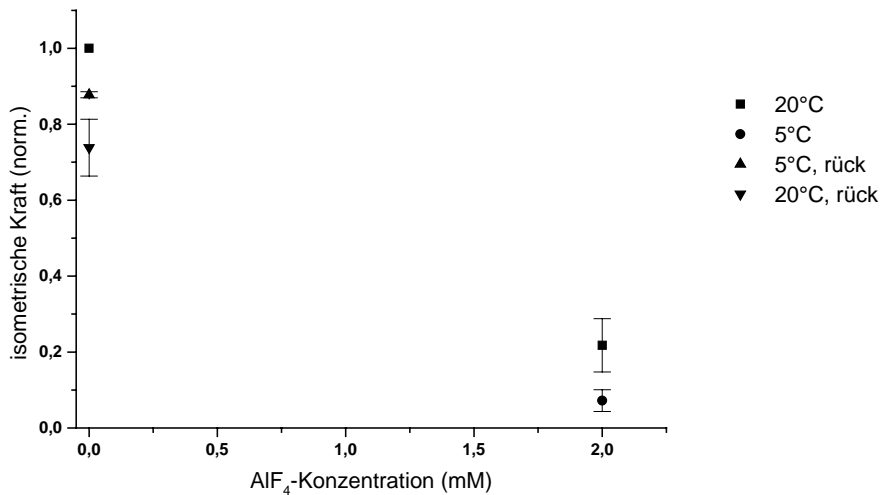


Abb.3.2: Kraftunterdrückung als Funktion der AIF₄-Konzentration bei voller Calciumaktivierung (pCa 4,5) und dessen Reversibilität, Ionenstärke 80 mM, T = 5 & 20°C. Es sind die Daten von 2 Fasern +/- SD dargestellt; alle Werte sind auf maximale Aktivierung ohne AIF₄ normiert.

Im Gegensatz zu den Experimenten mit BDM ist die Reversibilität mit Aluminiumfluorid eher ungenügend. Nur 88% der Anfangskraft werden bei 5°C und 75% bei 20°C erreicht. Dieses Problem ist aber nicht auf das Phosphat-Analogon zurückzuführen, sondern eher damit zu begründen, daß das System aufgrund der langen „Auswaschzeit“ leidet. Aufgrund der lang anhaltenden Aktivierung gehen einzelne Myofibrillen zugrunde, so daß zu Versuchsende nicht mehr die maximale Anfangskraft erreicht werden kann.

Ermittlung der Inkubationszeit für Bindung von ADP und AIF₄ an Muskelfasern unter Rigorbedingung

Für die ADP- und AIF₄-Zugabe im Rigor mußte die Inkubationszeit ermittelt werden, die das Nukleotid analogon benötigt, um an die nukleotidfreien Myosinköpfe im Rigor zu binden (Erreichen des AIF_{Rigor}-Zustandes). Da die Inkubationszeit u.a. abhängig ist vom Querschnitt der Muskelfasern, und dieser, selbst wenn sie demselben Muskelbündel entnommen wurden, sehr stark variiert, können die Inkubationszeiten nur Richtwerte sein, die niemals unterschritten werden sollten. Eine Zugabe von ADP.AIF₄ zu nukleotidfreien Muskelfasern ist jedoch nicht mit aktiver Kraftentwicklung verbunden, so daß hier eine andere Methode zur Ermittlung der Inkubationszeiten gewählt werden mußte. Eine Möglichkeit stellt hier die Analyse der Intensitäten der ersten beiden äquatorialen Reflexe I_{1,1} und I_{1,0} aus Röntgenbeugungsbildern der Muskelfasern dar. Zur Ermittlung der Inkubationszeiten wurden also in 10 bis 15 minütigen Abständen nach Beginn der Inkubation von nukleotidfreien Muskelfasern mit 2 mM MgADP und 2 mM AIF₄ entweder bei hoher (pCa 4,5) oder geringer

Ergebnisse

(pCa 8,0) Ca^{2+} -Konzentration Röntgendiffraktionsbilder registriert. Eine anschließende Bestimmung des Intensitätsquotienten $I_{1,1}/I_{1,0}$ ergab, daß sich der Quotient nach einer Inkubationszeit von einer halben Stunde bei hoher Ca^{2+} -Konzentration und nach einer Stunde bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration nicht mehr veränderte (Abb.3.3). Es wurde angenommen, daß das Phosphat-Analogon vollständig an die nukleotidfreien Myosinköpfe gebunden hatte, wenn sich die relative Intensität nicht mehr änderte.

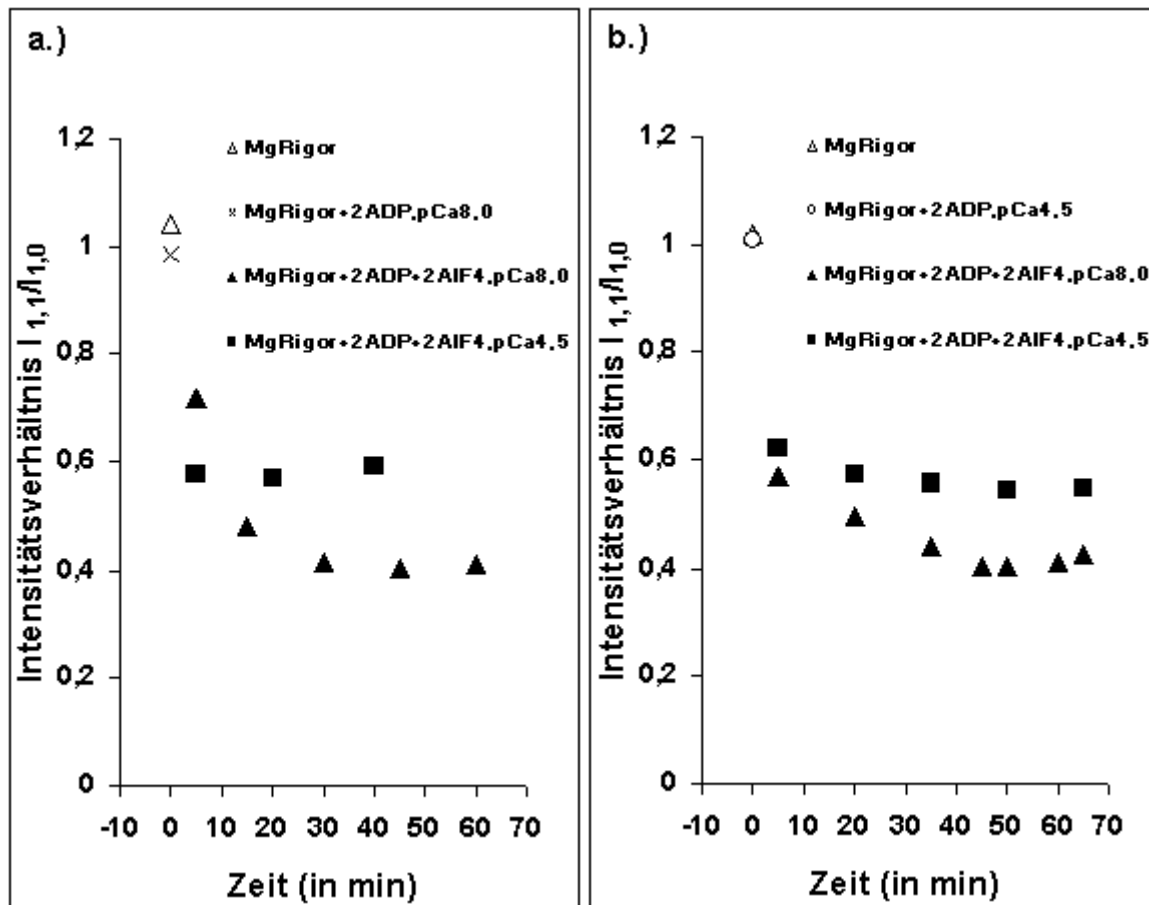


Abb.3.3: Analyse des zeitlichen Verlaufes des Intensitätsquotienten der ersten beiden äquatorialen Reflexe $I_{1,1}/I_{1,0}$ nach Zugabe von 2 mM MgADP und 2 mM AlF_4 zu nukleotidfreien Fasern. Dargestellt ist in a.) der Zeitverlauf der Inkubation mit MgADP. AlF_4 zuerst bei geringer (pCa 8,0) und dann bei hoher Ca^{2+} -Konzentration (pCa 4,5), in b.) zuerst bei hoher (pCa 4,5) und dann bei geringer Ca^{2+} -Konzentration (pCa 8,0). Das durch Calcium hervorgerufene höhere Intensitätsverhältnis kommt durch die stereospezifische Bindung der Querbrücken ans Aktinfilament zustande.

Die kontinuierliche Abnahme des Intensitätsquotienten wird durch eine zunehmend größer werdende Fraktion von Myosinköpfen mit MgADP. AlF_4 und die daraus resultierende strukturelle Änderung des Akto-Myosin-Komplexes verursacht. Die höhere Intensität des Quotienten bei hoher Ca^{2+} -Konzentration (pCa 4,5) kommt durch eine stereospezifische Bindung der Myosinquerbrücken am Aktin zustande.

In nachfolgenden Experimenten wurde aufgrund von Sättigungsproblemen der Myosinköpfe (s. 3.3) die Nukleotidkonzentration (ADP und AlF_4) auf 5 mM erhöht. Die Inkubationszeiten

mit MgADP.AIF₄ bei geringer und hoher Ca²⁺-Konzentration änderten sich dadurch aber nicht.

3.2 Nachweis der festen Bindung von ADP.AIF₄ an den Myosinkopf („Trapping“) unter den verschiedenen Bedingungen

Eine wesentliche Voraussetzung für die Charakterisierung der Querbrücken Zustände mit ADP.AIF₄ ist der Nachweis, daß das P_i-Analogon fest an den Myosinkopf gebunden ist. Eine Möglichkeit, dies zu überprüfen ist, den Zeitverlauf der Freisetzung von ADP.AIF₄ während aktiver Kraftentwicklung (Chase et al., 1993) zu verfolgen, im Nachfolgenden wird dieses Experiment als „Auswaschexperiment“ bezeichnet. Zum Vergleich wurde auch der Zeitverlauf nach Inkubation mit BDM registriert. BDM wirkt als allosterischer Inhibitor der Kraftentwicklung und bindet nicht direkt in die Nukleotidbindungstasche des Myosinkopfes.

3.2.1 „Auswaschexperimente“ mit BDM und ADP.AIF₄

Zeitverlauf der Kraftentwicklung durch Entfernung des Inhibitors (50 mM BDM)

Um den Zeitverlauf der BDM-Entfernung und die Reversibilität der Reduktion der aktiven Kraftentwicklung zu prüfen, wurde der zeitliche Verlauf der isometrischen Kraftentwicklung einer Muskelfaser in einer Aktivierungslösung (pCa 4,5) ohne BDM untersucht (Abb.3.4). Hierbei wurde so vorgegangen, daß zuerst die maximal mögliche isometrische Kraft einer Faser in einer Standard-Aktivierungslösung (pCa 4,5; Ionenstärke = 80 mM) ohne Hemmstoff bestimmt wurde. Dann wurde die Faser in eine Aktivierungslösung mit 50 mM BDM transferiert, in der sich die Kraftentwicklung der Faser innerhalb von 2-3 min auf fast Null (s. 3.1.1) reduzierte. Die Ausdiffusion von BDM aus der Faser wurde durch Überführung der Muskelfaser in die Ausgangsaktivierungslösung ermöglicht. Durch das allmähliche „Auswaschen“ (Ausdiffusion) von BDM entstehen immer mehr freie Querbrücken, die mit Aktin interagieren können und somit den Querbrückenzyklus unter zunehmender Kraftgenerierung durchlaufen können. Nach nur 20 bis 50 Sekunden hatte die Faser 97% der maximal möglichen isometrischen Kraftentwicklung erreicht. Die Zeitkonstante τ , die sich als der Zeitpunkt ablesen läßt, an dem die Amplitude auf 63% des Maximalwertes angestiegen ist, lag bei < 5 Sekunden. Somit entspricht der Zeitverlauf der Aktivierung nach BDM-Inkubation („Auswaschen“ von BDM) dem normalen Zeitverlauf der Aktivierung einer zuvor

relaxierten Faser. Dies kann auch erwartet werden, da BDM nur als allosterischer Effektor reversibel bindet.

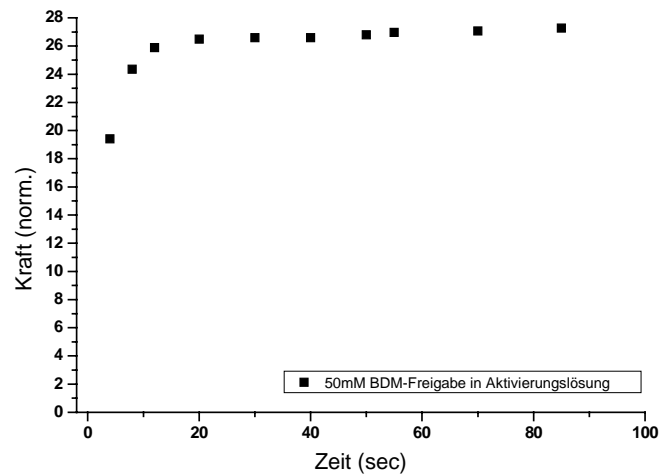


Abb.3.4: Analyse des Zeitverlaufes der isometrischen Kraftentwicklung einer mit BDM vorinkubierten Muskelfaser in einer Aktivierungslösung (pCa 4,5) ohne BDM; Ionenstärke 80 mM, T = 2-3°C. Es handelt sich hier um ein repräsentatives Einzelexperiment; die Kraft ist auf die zu Anfang gemessene Kraft normiert.

Zeitverlauf der Kraftentwicklung während Abdissoziation von AlF_4 , das unter Aktivierungsbedingungen gebunden hat

Bei den Experimenten mit AlF_4 über aktiven Turnover (nachfolgend auch $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ genannt) stellte sich die Frage, ob das Phosphat-Analogen in der Nukleotidbindungstasche des Myosinkopfes getrappt, also fest gebunden, oder eher lose verankert ist.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde zunächst eine Faser wie unter 3.1.1 beschrieben bis zur nahezu vollständigen Unterdrückung der aktiven Kraftentwicklung mit AlF_4 inkubiert und danach der zeitliche Verlauf der isometrischen Kraftentwicklung einer Faser in einer Standard-Aktivierungslösung (pCa 4,5) ohne AlF_4 verfolgt. Chase et al. (1993) berichteten, daß zur Entfernung von AlF_4 aus der Faser unbedingt ein aktiver Durchlauf des Querbrückenzyklus nötig ist. Nach etwa 15 bis 20 Minuten in Aktivierung ohne AlF_4 entwickelte die Faser etwa 92% der maximalen isometrischen Kraft. τ lag bei etwa 200 Sekunden. Die wesentlich längere „Auswaschzeit“ von AlF_4 verglichen mit dem Wiedererreichen maximaler Kraftentwicklung nach BDM oder aus Relaxation stimmt mit den Beobachtungen von Chase et al. (1993) überein und zeigt, daß AlF_4 tatsächlich fest im Myosinkopf gebunden war. Inkubiert man Muskelfasern mit AlF_4 in Relaxationsbedingungen, also ohne aktiven Turnover, so ist AlF_4 nicht getrappt. Wenn dann ein Lösungswechsel in Aktivierungslösung erfolgt, dann erreicht die Faser rasch ihre maximale isometrische Kraft, wie nach BDM oder normaler Relaxationslösung.

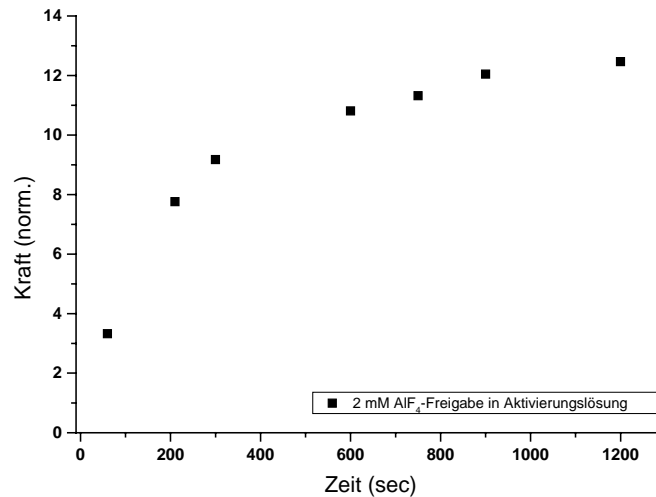


Abb.3.5: Analyse des Zeitverlaufes der isometrischen Kraftentwicklung in Standard-Aktivierungslösung zur Entfernung von AlF_4 ; Ionenstärke 80 mM, $T = 2-3^\circ\text{C}$. Daten entstammen einer repräsentativen Einzelfaser; die Kraft ist auf die zu Anfang gemessene Kraft normiert.

Zeitverlauf der Kraftentwicklung während Abdissoziation von AlF_4 , das unter Rigorbedingung an den Myosinkopf gebunden hatte

Um zu überprüfen, ob auch das an nukleotidfreie Querbrücken gebundene $\text{ADP}\cdot\text{AlF}_4$ (im nachfolgenden $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ genannt) fest in der Nukleotidbindungstasche des Myosinkopfes gebunden ist, wurde wiederum der zeitliche Verlauf der isometrischen Kraftentwicklung einer Muskelfaser, die zuvor wie unter 3.1.1 mit $\text{ADP}\cdot\text{AlF}_4$ inkubiert worden war, in einer Standard-Aktivierungslösung bestimmt (Abb.3.6). Nach etwa 12 bis 15 Minuten hatte die Faser ihre maximale isometrische Kraft erreicht, d.h. AlF_4 war aus der Faser abdissoziiert. Die Zeitkonstante τ lag bei etwa 170-180 Sekunden. Dieser Zeitverlauf ist sehr ähnlich dem Verlauf des Kraftanstiegs bei Abdissoziation von AlF_4 , daß während aktivem Turnover an die Myosinköpfe gebunden hat (vgl. Abb.3.5) und zeigt, daß auch hier das P_i -Analogon sehr fest in der Nukleotidbindungstasche des Myosinkopfes festgehalten wird (Fisher et al., 1995). Es kann also auch unter Rigorbedingung „getrappt“ werden.

Ergebnisse

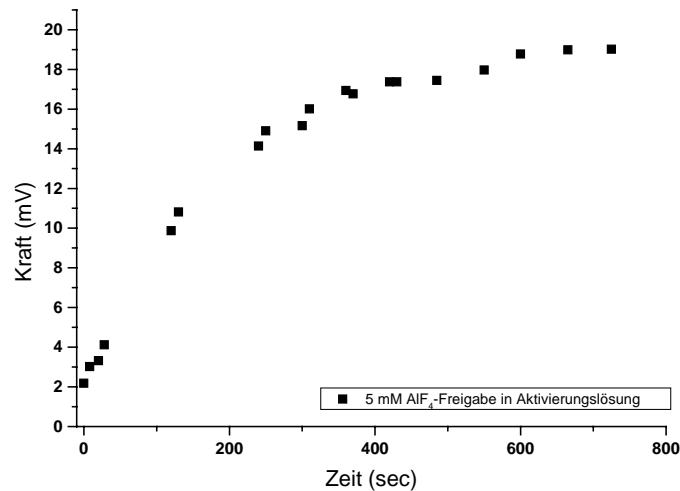


Abb.3.6: Analyse des Zeitverlaufes der isometrischen Kraftentwicklung in einer Aktivierungslösung nach Inkubation in einer Rigorlösung mit 5 mM ADP und 5 mM AlF_4 ; Ionenstärke 80 mM, $T = 2\text{-}3^\circ\text{C}$. Es handelt sich hier um ein Einzelexperiment. Es erfolgte keine Normierung, da kein Wert für maximale Kraftentwicklung vor $\text{ADP}.\text{AlF}_4$ -Inkubation bestimmt worden war.

Um zu überprüfen, ob AlF_4 , daß an nukleotidfreie Fasern gebunden hat, auch ohne aktiven Turnover wieder aus der Nukleotidbindungstasche freigesetzt werden kann, wurden in Röntgenbeugungsexperimenten nach Sättigung der Fasern mit $\text{ADP}.\text{AlF}_4$ (vgl. Abb.3.3) Zeitverläufe der Intensitätsänderung $I_{1,1}/I_{1,0}$ in MgRigor-Lösung mit ADP, aber ohne AlF_4 sowohl bei geringer als auch bei hoher Ca^{2+} -Konzentration registriert. Aus dem Diagramm 3.7.a ist ersichtlich, daß bei geringer Ca^{2+} -Konzentration selbst nach einer Inkubationszeit von 120 min kein nennenswerter Anstieg des Intensitätsquotienten zu verzeichnen ist. Auch bei hoher Ca^{2+} -Konzentration (Abb.3.7b) ist kaum ein Anstieg zu beobachten, im Verhältnis zum Quotienten in MgRigor-Lösung mit 5 mM ADP und Calcium vor Inkubation mit 5 mM AlF_4 ($I_{1,1}/I_{1,0} = 2,2$; nicht dargestellt).

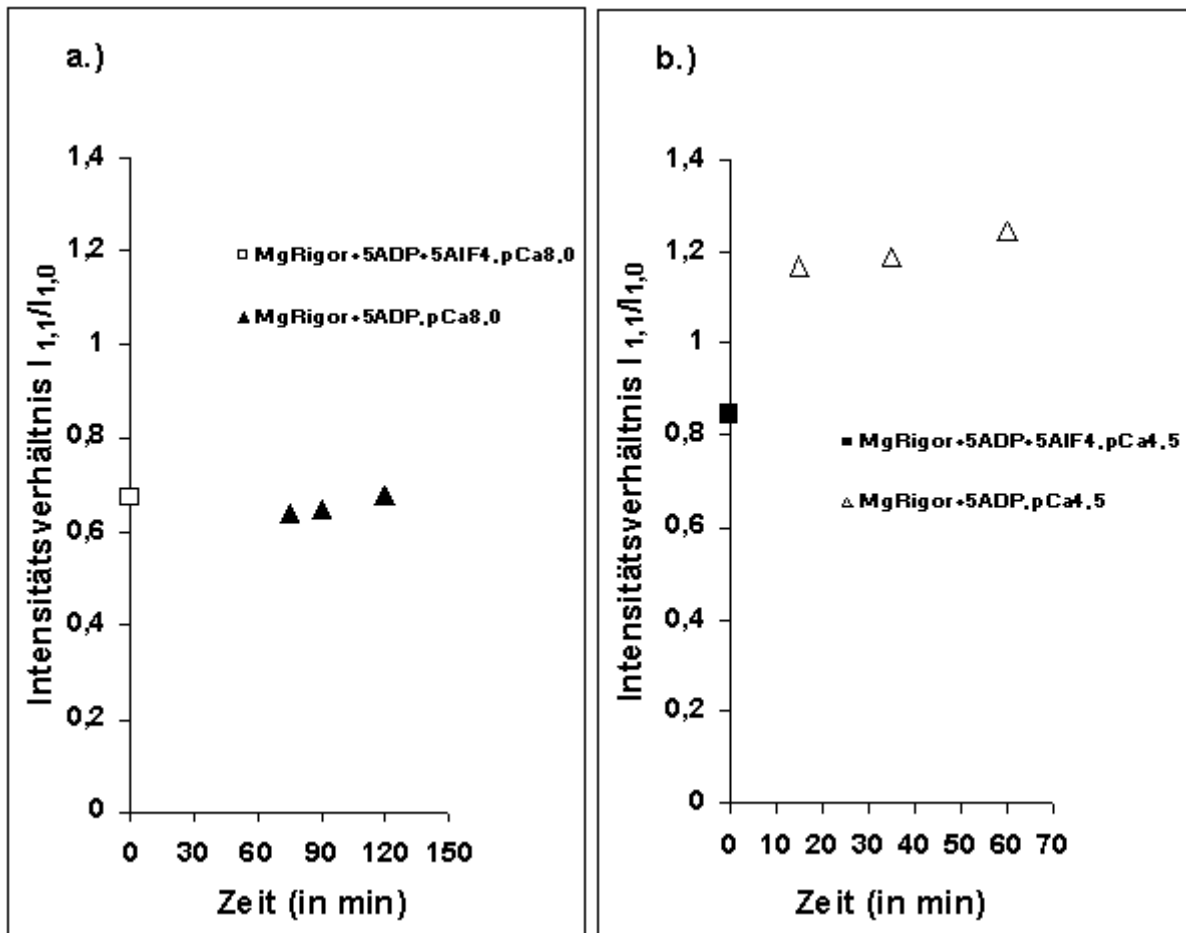


Abb.3.7: Analyse des Zeitverlaufes des äquatorialen Intensitätsquotienten $I_{1,1}/I_{1,0}$ zur Ausdiffusion von Aluminiumfluorid unter Rigor-Bedingungen. Gezeigt ist in a.) der Zeitverlauf während Inkubation in ADP-MgRigorlösung bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration (pCa 8,0), in b.) bei hoher Ca^{2+} -Konzentration (pCa 4,5).

Diese Experimente bestätigen, daß auch bei Bindung von ADP und AlF_4 an die Myosinköpfe ausgehend von nukleotidfreien Bedingungen die Abdissoziation des Phosphat-Analogons nur über einen aktiven „Turnover“ und nicht in ADP-MgRigorlösung mit oder ohne Calcium erfolgen kann.

Nachweis der festen Bindung auch bei Inkubation in Rigorlösung ohne ADP und AlF_4 durch Messung der Fasersteifheit

Ein weiteres Experiment um zu überprüfen, ob AlF_4 nach Bindung an nukleotidfreie Querbrücken in der Nukleotidbindungstasche des Myosinkopfes fest gebunden, also „getrappt“ ist, erfolgte anhand von Steifheitsmessungen in Abhängigkeit von der Dehnungsgeschwindigkeit (Abb.3.8).

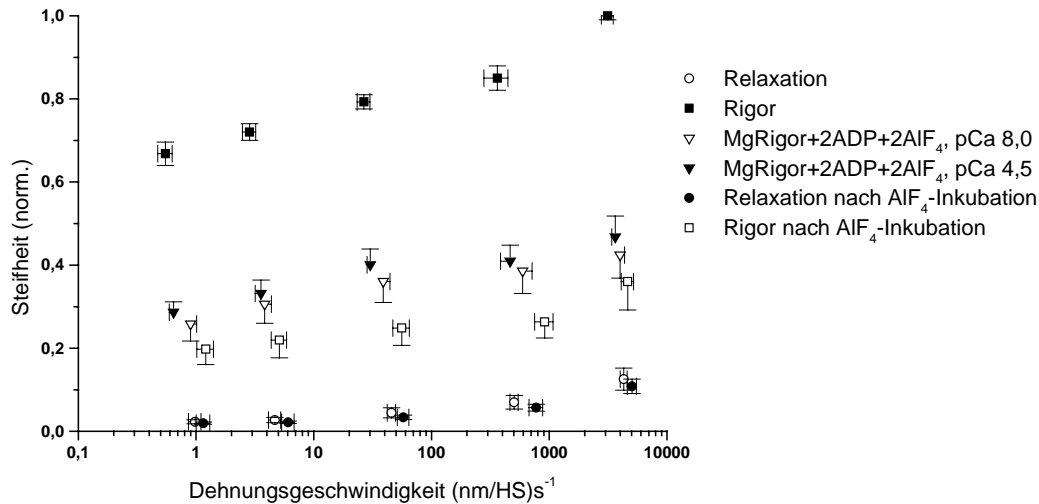


Abb.3.8: Fasersteifheit in Abhängigkeit von der Dehnungsgeschwindigkeit unter Rigorbedingungen in Gegenwart von 2 mM ADP und 2 mM AlF₄ bei hoher (pCa 4,5) und niedriger (pCa 8,0) Ca²⁺-Konzentration, Ionenstärke 80 mM, T = 2-3°C.

Es wurden die Daten von 6 Fasern +/- SEM zusammengefaßt, alle Werte sind auf die Rigorsteifheit normiert.

Zunächst wurde Rigorsteifheit gemessen, dann wurden die Fasern in 2 mM MgADP und 2 mM AlF₄ inkubiert und wiederum die Steifheit gemessen. Diese liegt, durch Bindung von AlF₄ im Myosinkopf, weit niedriger als die Rigorsteifheit. Schließlich wurde zur Überprüfung der Festigkeit der AlF₄-Bindung bzw. der Reversibilität wieder die Steifheit im Rigor gemessen. Abb.3.8 zeigt, daß die Steifheit unter Rigorbedingung nach AlF₄-Inkubation bei der schnellsten Dehnungsgeschwindigkeit um 64% erniedrigt ist. Die Messung erfolgte ca. 7-10 min nach Lösungswechsel in Rigorlösung ohne AlF₄ und ist ein Hinweis darauf, daß AlF₄ analog zu den Röntgenbeugungsexperimenten noch im Myosinkopf gebunden ist, und nicht bereits abdissoziiert ist. Wäre AlF₄ nur lose gebunden, dann müßte die Steifheit unter Rigorbedingung ohne AlF₄ nach einer kurzen Zeit wieder die Ausgangswerte erreichen.

3.3 Effekte höherer ADP- und AlF₄-Konzentration auf den AlF_{Rigor}-Zustand

Bei den oben beschriebenen Messungen fiel auf, wie aus Abb.3.8 ersichtlich, daß die Steifheitswerte von relaxierten Fasern nur maximal 12% der Rigorsteifheit ausmachen. Wohingegen die Querbrücken mit MgADP und AlF₄ bei niedriger Ca²⁺-Konzentration (pCa 8,0) eine deutlich höhere Steifheit aufweisen. Zudem war die Lage der Beziehungen zwischen Steifheit und Dehnungsgeschwindigkeit sowohl bei geringer als auch bei hoher Ca²⁺-Konzentration für Fasern nach Bindung von 2 mM MgADP und 2 mM AlF₄ an nukleotidfreie Myosinköpfe gleich. Dies deutet auf ein ähnliches Bindungsverhalten der Querbrücken an

Ergebnisse

Aktin bei beiden Ca^{2+} -Konzentrationen hin. Demgegenüber war aber aus röntgenstrukturanalytischen Untersuchungen ersichtlich, daß Querbrücken mit $\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$ im Rigor bei geringer Ca^{2+} -Konzentration Myosinschichtlinien besitzen, während bei hoher Ca^{2+} -Konzentration diese Schichtlinien verschwinden. Dies weist auf ein deutlich verschiedenes Bindungsverhalten der $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Querbrücken mit und ohne Calcium hin. Zudem deutete die Intensität der 1. Aktinschichtlinie bei hoher Ca^{2+} -Konzentration darauf hin, daß bei Inkubation mit 2 mM MgADP und 2 mM AlF_4 die Querbrücken eventuell nicht vollständig mit dem Nukleotid-Analogon gesättigt waren. Damit ließe sich auch die hohe Steifheit der Querbrücken mit AlF_4 ohne Calcium (Abb.3.8) erklären, die teilweise durch ungesättigte nukleotidfreie Querbrücken verursacht sein könnte. Diese Beobachtungen und um wirklich möglichst eine vollständige Sättigung der zunächst nukleotidfreien Querbrücken mit $\text{ADP}\cdot\text{AlF}_4$ zu gewährleisten, wurden für die weiteren (eigentlichen) Untersuchungen des $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Querbrücken-Zustandes 5 mM MgADP und 5 mM AlF_4 verwendet (Abb.3.9).

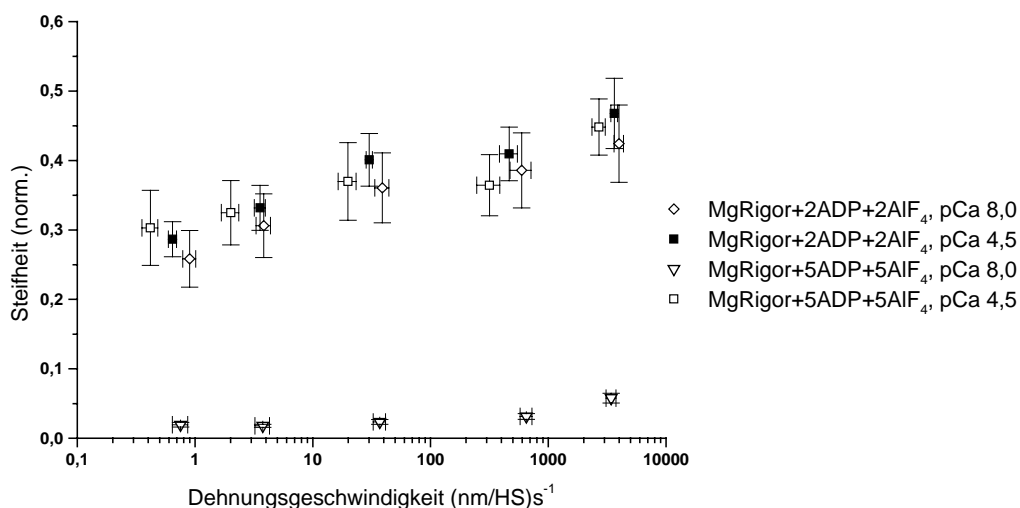


Abb.3.9: Einfluß der Dehnungsgeschwindigkeit auf die Fasersteifheit unter Rigorbedingungen bei unterschiedlichen $\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$ -Konzentrationen bei hoher (pCa 4,5) und niedriger (pCa 8,0) Ca^{2+} -Konzentration, Ionenstärke 80 mM, $T = 2-3^\circ\text{C}$.

Es wurden die Daten von 6 Fasern +/- SEM zusammengefaßt, wobei alle Werte auf die Rigorsteifheit normiert sind.

Eine Inkubation der nukleotidfreien Fasern in 5 mM MgADP und 5 mM AlF_4 bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration führt zu einem Abfall der Steifheit auf Werte, die vergleichbar sind mit denen relaxierter Fasern (Abb.3.9). Dies bestätigt die Vermutung, daß die relativ hohe Fasersteifheit bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration mit 2 mM MgADP und 2 mM AlF_4 durch unvollständige Sättigung der Querbrücken mit dem Nukleotid verursacht wurde. Genügend Querbrücken mit hoher Aktinaffinität liegen vor, so daß die Fasersteifheit zunimmt. Bei Erhöhung der Nukleotidkonzentration auf 5 mM nimmt die Fasersteifheit deutlich ab, unter

diesen Bedingungen scheint eine vollständige Sättigung der Querbrücken mit MgADP·AlF₄ bei niedriger Ca²⁺-Konzentration erreicht zu sein. Eine weitere Erhöhung der Nukleotidkonzentration war nicht möglich, denn bereits bei 5 mM AlF₄ war es gelegentlich, v.a. bei hohem Calcium-Gehalt, zur Präzipitation gekommen.

Im Gegensatz dazu bleibt bei hoher Ca²⁺-Konzentration und Zugabe von 5 mM MgADP und 5 mM AlF₄ die Steifheit nahezu unverändert hoch. Um sicherzustellen, daß aber auch bei hoher Ca²⁺-Konzentration eine Sättigung aller Querbrücken mit MgADP·AlF₄ erreicht war, wurden unter den gleichen Bedingungen auch 2D-Röntgenbeugungsspektren aufgenommen. Die für unvollständige Sättigung äußerst empfindliche Intensität der 1. Aktinschichtlinie zeigte bei 5 mM MgADP und 5 mM AlF₄ keinerlei Hinweise mehr auf unvollständige Sättigung. Damit zeigen die Steifheitsmessungen (Abb.3.9), daß die AlF_{Rigor}-Querbrücken bei hoher Ca²⁺-Konzentration deutlich von AlF_{Rigor}-Querbrücken bei niedriger Ca²⁺-Konzentration verschieden sind.

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß ausgehend von nukleotidfreien Fasern sowohl bei geringer als auch bei hoher Ca²⁺-Konzentration mit 5 mM MgADP und 5 mM AlF₄ eine möglichst vollständige Sättigung der Nukleotidbindungsstellen erreicht wird. Der Aspekt, daß keine nukleotidfreien Querbrücken mehr einen Beitrag zur Fasersteifheit leisten, ist Voraussetzung dafür, daß die AlF_{Rigor}-Zustände umfassend charakterisiert werden können.

3.4 Charakterisierung der verschiedenen Analogzustände

Ziel der Untersuchungen war es zu klären, welche Zustände im Querbrückenzyklus von den hier untersuchten Analoga repräsentiert werden. Hierfür wurden Experimente hinsichtlich der Aktinaffinität, der Anheftungs- (k^+) und Ablösekinetik (k^-) sowie der Struktur der Querbrücken durchgeführt. Die Ergebnisse der mechanischen und röntgenstrukturanalytischen Untersuchungen zur Charakterisierung der Querbrücken in Gegenwart von BDM (2,3-Butandionmonoxim), AlF₄ im AlF_{Aktiv}-Zustand und im AlF_{Rigor}-Zustand bei geringer und hoher Ca²⁺-Konzentration und die daraus gefolgerte Klassifizierung dieser Analoga in „weak- oder strong-binding“ Analoga bzw. ihre Einordnung in den Querbrückenzyklus werden unten aufgeführt.

3.4.1 Charakterisierung der Querbrückenzustände in Gegenwart von BDM und der $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustände

Querbrücken, die MgATP oder MgADP.P_i gebunden haben (s. Abb.1.1), stellen die Zustände niedriger Aktinaffinität, die sog. „weak-binding states“, dar (Brenner et al., 1982). Da für Querbrücken in Gegenwart von BDM und dem $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand postuliert worden war (Regnier et al., 1995), daß sie ebenfalls diesen Zuständen zuzuordnen sind, war zunächst zu überprüfen, ob die Fasereigenschaften in Gegenwart von MgATP (Relaxationsbedingung), nach Zugabe von BDM bzw. nach Bindung von ADP und AlF_4 unter Aktivierungsbedingung ($\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand) vergleichbare Eigenschaften aufweisen. Dazu wurden die Fasereigenschaften durch Steifheitsmessungen in Abhängigkeit von der Dehnungsgeschwindigkeit und Messungen der Intensitätsquotienten der ersten beiden äquatorialen Reflexe charakterisiert. Wichtig war dabei auch, zu ermitteln, ob die Querbrücken mit BDM oder AlF_4 die für weak-binding states typische Calciumsensitivität aufweisen.

Messungen der Fasersteifheit in Abhängigkeit von der Dehnungsgeschwindigkeit in Gegenwart von BDM bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration

Die Steifheit der Fasern wurde aus dem Quotienten aus gemessener Kraft und aufgezwungener Sarkomerenlängenänderung ermittelt. In Abb.3.10 ist die Fasersteifheit in Abhängigkeit von der Dehnungsgeschwindigkeit dargestellt, wobei die Meßwerte auf die Steifheit im Rigor bei der schnellsten Geschwindigkeit normiert sind. Diese Beziehungen erlauben Rückschlüsse auf die Aktinbindungskinetik der Querbrücken. Untersucht wurde auf diese Weise das Aktinbindungsverhalten der Querbrücken bei hohem (pCa 4,5) und geringem Calciumgehalt (pCa 8,0) in Gegenwart des allosterischen Inhibitors BDM.

Um eine möglichst große Fraktion angehefteter Querbrücken in den Zuständen niedriger Aktinaffinität zu erfassen, wurde eine geringstmögliche Ionenstärke gewählt (Brenner et al., 1982; Brenner, 1986b). Mit Erniedrigung der Ionenstärke nimmt die Steifheit einer relaxierten Muskelfaser zu, da die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Aktin und Myosin, die sogenannte „weak interaction“, verstärkt wird. Als Folge resultiert hieraus eine erhöhte Anzahl an angehefteten Querbrücken (Brenner et al., 1982). Die Experimente wurden bei der geringstmöglichen Ionenstärke von 80 mM durchgeführt. Typisch für Querbrückenzustände geringer Aktinaffinität, wie z.B. in Gegenwart von ATP, ist, daß die Steifheit sehr stark von der Dehnungsgeschwindigkeit abhängt, da die Querbrücken unter diesen Bedingungen einer sehr schnellen Anheftungs- (k^+) und Ablösungskinetik (k^-) unterliegen.

Ergebnisse

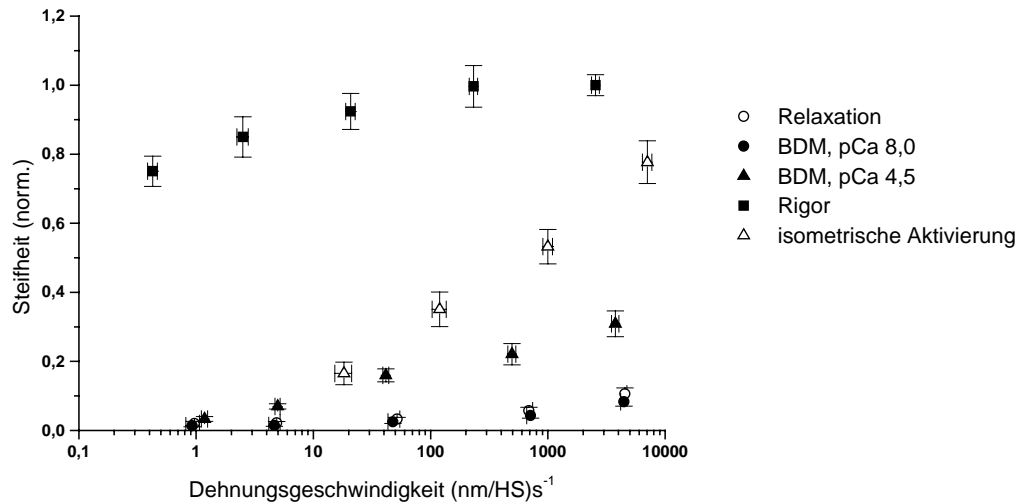


Abb.3.10: Fasersteifheit in Abhängigkeit von der Dehnungsgeschwindigkeit mit und ohne 50 mM BDM bei hoher (pCa 4,5) und niedriger (pCa 8,0) Ca²⁺-Konzentration, Ionenstärke 80 mM, T = 2-3°C. Dargestellt sind Ergebnisse von 7 Fasern +/- SEM, wobei alle Meßwerte auf die Steifheit im Rigor normiert sind.

Aus Abb.3.10 ist ersichtlich, daß die Abhängigkeit der Steifheit von der Dehnungsgeschwindigkeit unter Relaxationsbedingung und mit BDM bei pCa 8,0 annähernd gleich ist. Das heißt, daß die jeweils vorliegenden Querbrückenzustände vergleichbare Eigenschaften besitzen. Die Fasersteifheit erreicht unter diesen Bedingungen keine von der Dehnungsgeschwindigkeit unabhängigen Werte. Selbst bei der höchsten Dehnungsgeschwindigkeit beträgt die Fasersteifheit nur 10% der Rigorsteifheit, was auf die relativ niedrige Aktinaffinität der Querbrücken unter Relaxationsbedingung bzw. mit BDM hinweist.

Zum Vergleich ist in Abb.3.10 auch der Rigorzustand der Faser charakterisiert. Im Rigorzustand liegen die Querbrücken ohne gebundenes Nukleotid vor, sie entsprechen dem AM-Komplex, der eine sehr hohe Aktinaffinität besitzt (s. Abb.1.1). Das heißt, im Rigor sind in einer Muskelfaser alle Querbrücken mit hoher Affinität an Aktin gebunden (Cooke und Franks, 1980; Lovell und Harrington, 1981). Im Gegensatz zu Relaxationsbedingung ist die Fasersteifheit im Rigor maximal und über einen großen Bereich unabhängig von der Dehnungsgeschwindigkeit. Wie aus Abb.3.10 hervorgeht, ist selbst bei den langsamsten Dehnungsgeschwindigkeiten die Fasersteifheit um höchstens 15-20% geringer als die bei höchsten Dehnungsgeschwindigkeiten beobachtete Steifheit. Ein Teil dieses Abfalls läßt sich auf das Nachgeben der Faserenden zurückführen. Rigorquerbrücken sind in der Lage, das kontraktile System auch ohne Calcium „anzuschalten“. Auch aus diesem Grund ist der Rigorzustand den „strong-binding“ Zuständen zuzuordnen.

Aktiv kraftgenerierende Querbrücken (isometrische Bedingung; pCa 4,5) binden ebenfalls mit relativ hoher Affinität an Aktin und haben die Fähigkeit, das kontraktile System „anzuschalten“. Diese Querbrücken besitzen also im intakten kontraktile System eine höhere Aktinaffinität (Greene und Eisenberg, 1980a) als unter Relaxationsbedingungen. Desweiteren ist die Geschwindigkeitskonstante für die Ablösung (k^-) erheblich geringer als für Zustände geringer Aktinaffinität (Greene und Eisenberg, 1980a; Lynn und Taylor, 1971), was sich in der Linksverschiebung der Beziehung ausdrückt. Dies kommt durch die gegenüber Relaxationsbedingung deutlich erhöhte Fasersteifheit zum Ausdruck (Abb.3.10), die sich jedoch aufgrund der unterschiedlichen Aktinbindungskinetik der während isometrischer Kontraktion besetzten Querbrückenzustände auch deutlich von der Rigorsteifheit unterscheidet. Die Fasersteifheit unter Aktivierung, gemessen während Dehnungen mit der höchsten Dehnungsgeschwindigkeit, ist um 23% geringer als die Rigorsteifheit, während die unter denselben Bedingungen gemessene Steifheit relaxierter Fasern nur etwa 10% der Rigorsteifheit beträgt. Für eine eindeutige Beurteilung der Querbrückenzustände mit BDM bei hoher Ca^{2+} -Konzentration sind jedoch mögliche Unterschiede in der Kinetik der Querbrückenanheftung (k^+) und -ablösung (k^-) zu berücksichtigen.

Mechanische Untersuchungen zum Effekt von Calcium auf Querbrücken mit BDM

Durch Messung der Fasersteifheit kann auch der Einfluß von Calcium auf die Beziehung zwischen Steifheit und Dehnungsgeschwindigkeit und damit auf die Querbrückeneigenschaften mit BDM bestimmt werden. Wie sich die Geschwindigkeitskonstanten für Querbrückenanheftung (k^+) und – ablösung (k^-) mit Calcium, d.h. wenn die Myosinköpfe an das aktivierte Aktinfilament binden, verändern, ist anhand der Ermittlung von Lage und Form dieser Beziehung möglich.

Betrachtet man in Abb.3.10 die Eigenschaften der Muskelfasern in Gegenwart von BDM bei hoher Ca^{2+} -Konzentration, so fällt auf, daß die Steifheit gegenüber geringer Ca^{2+} -Konzentration bzw. Relaxation deutlich ansteigt. Bei maximaler Dehnungsgeschwindigkeit beträgt sie 30% der Rigorsteifheit. Die Zunahme der Fasersteifheit läßt vermuten, daß in Gegenwart von BDM bei hoher Ca^{2+} -Konzentration mehr Querbrücken am Aktin angeheftet sind als bei geringer Ca^{2+} -Konzentration oder unter Relaxationsbedingung. Außerdem unterscheiden sich diese Querbrücken auch deutlich von Querbrücken im Rigor oder unter isometrischer Kraftentwicklung.

Abb.3.10 zeigt, daß weder bei hoher noch bei geringer Ca^{2+} -Konzentration in Gegenwart von BDM ein Bereich erreicht wird, indem die Fasersteifheit einen Wert erreicht, der unabhängig

von der Dehnungsgeschwindigkeit ist. Demzufolge kann keine Aussage über die Fraktion der angehefteten Querbrücken gemacht werden. Eindeutig ist aber der Effekt, den Calcium auf die Geschwindigkeitskonstante für Querbrückenablösung (k^-) hat, zu sehen an der Verschiebung der Kurve bei hoher Ca^{2+} -Konzentration nach links in Richtung niedrigerer Dehnungsgeschwindigkeiten. Die Steifheits-Dehnungsgeschwindigkeits-Beziehung für Fasern mit BDM bei pCa 4,5 ist gegenüber der Kurve unter Relaxation entlang der Abszisse um mehr als zwei Größenordnungen nach links verschoben. Somit muß bei gleicher Aktinaffinität der Querbrücken k^- mit Calcium etwa 100-1000fach langsamer sein als ohne Calcium (vgl. Abschnitt 1.3.1; Einleitung).

Bei der Interpretation der mit BDM ermittelten Befunde muß jedoch berücksichtigt werden, daß mit BDM bei hohem Calcium immer auch eine kleine Fraktion ($< 5\%$) aktiv kraftgenerierender Querbrücken einen Beitrag zu den gemessenen Parametern leistet, denn mit 50 mM BDM war noch eine aktive Kraftentwicklung von 3-7% (steady-state Kraft) der maximal möglichen isometrischen Kraft zu beobachten. Diese Querbrücken könnten einen kleinen Teil der Linksverschiebung der Steifheits-Kurve mit BDM bei pCa 4,5 verursachen, wie sich durch Vergleich mit der Kurve für Steifheit bei maximaler isometrischer Kontraktion abschätzen läßt. Bei isometrischer Kontraktion sind ca. 50-70% der Querbrücken in den kraftgenerierenden Zuständen.

Leider waren apparativ keine schnelleren Dehnungen möglich, um den weiteren (sigmoidalen) Kurvenverlauf zu ermitteln und um daraus eventuelle Unterschiede zu Querbrücken unter Relaxationsbedingungen in der Anheftungskinetik k^+ und damit auch in der Bindungskonstante K_B , zu erkennen. Daher wurden röntgenstrukturanalytische Untersuchungen zur Bestimmung von k^+ und K_B durchgeführt.

Röntgenstrukturanalytische Untersuchungen zum Effekt von Calcium auf Querbrücken mit BDM und Berechnung von Fraktion (F) und Bindungskonstante (K_B)

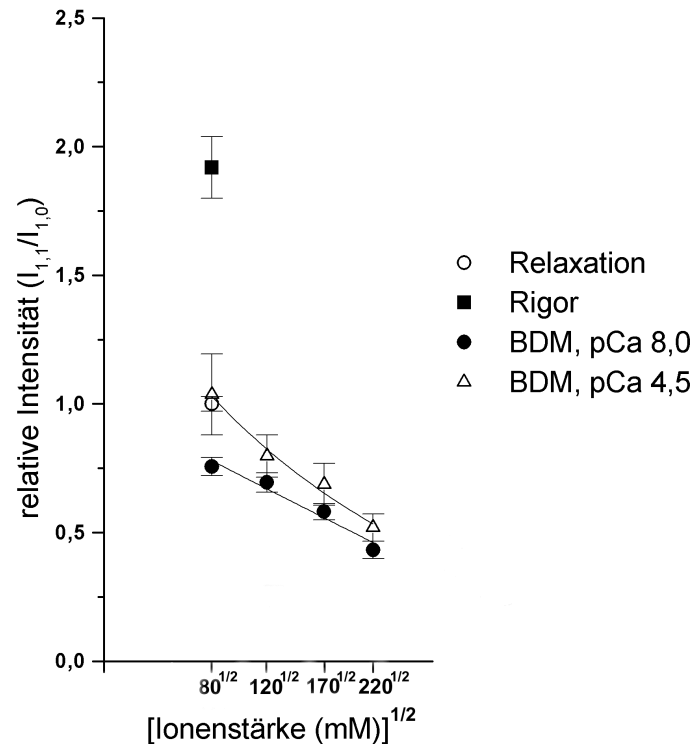


Abb.3.11: Einfluß der Ionenstärke auf das relative Intensitätsverhältnis $I_{1,1}/I_{1,0}$ der ersten beiden äquatorialen Reflexe in Gegenwart von 50 mM BDM bei hoher (pCa 4,5) und niedriger (pCa 8,0) Ca^{2+} -Konzentration ($P < 0,05$), $T = 1^\circ C$. Als Kontrolle wurde auch die relative Intensität unter Rigor- und unter Relaxationsbedingung, Ionenstärke 80 mM, $T = 1^\circ C$ registriert.

Dargestellt sind Ergebnisse von 5 Messungen \pm SEM, wobei alle Werte auf den relativen Intensitätsquotienten unter Relaxationsbedingung bei einer Ionenstärke von 80 mM normiert sind.

Aufgrund der Schwierigkeiten aus mechanischen Messungen Aussagen über das Ausmaß der Anheftung von Querbrücken am Aktin und somit über die Bindungskonstante K_B abzuleiten, wurde aus der Registrierung der äquatorialen Reflexe in Gegenwart von BDM der Effekt von Calcium auf die Zahl der angehefteten Querbrücken abgeleitet. Die Bestimmung der relativen Intensität der ersten beiden äquatorialen Reflexe ($I_{1,1}/I_{1,0}$) läßt auch bei hohen Ionenstärken eine Aussage über die Fraktion angehefteter Querbrücken und somit über die Berechnung der Bindungskonstanten zu. Auftretende Intensitätsänderungen der ersten beiden äquatorialen Reflexe beruhen auf einer Massenumverteilung der Querbrücken zwischen dicken und dünnen Filamenten (s. Abschnitt 1.3.2; Einleitung). Eine Abnahme in der Intensität des 1,1-Reflexes ($I_{1,1}$) und eine Zunahme in der Intensität des 1,0-Reflexes ($I_{1,0}$) – oft ausgedrückt als Abnahme des Quotienten ($I_{1,1}/I_{1,0}$) – gibt Hinweise auf eine Umverteilung von Querbrücken, fort vom Aktin- hin zum Myosinfilament. Die Abnahme des 1,1-Reflexes deutet auf eine Änderung der Elektronendichte im Bereich der Aktinfilamente hin und somit auf eine Verschiebung der Massen an den Filamenten vom Aktin zum Myosin. Durch eine Analyse

der äquatorialen Reflexe ist es auch möglich den Effekt von Calcium auf die Massenverteilung, daß heißt auf die Fraktion angehefteter Querbrücken zu untersuchen. Änderungen im Intensitätsverhältnis werden als Maß für Änderungen der Fraktion der angehefteten Querbrücken und damit indirekt als Maß für die Affinität der Querbrücken zum Aktin gewertet.

Im Experiment wurden in Gegenwart von 50 mM BDM bei niedriger und hoher Ca^{2+} -Konzentration die äquatorialen Beugungsspektren registriert und der Intensitätsquotient ($I_{1,1}/I_{1,0}$) bestimmt. Um die Fraktion der an Aktin gebundenen Querbrücken zu variieren, wurden verschiedene Ionenstärken zwischen 80 und 220 mM eingestellt.

In Abb.3.11 ist zu sehen, daß der Intensitätsquotient $I_{1,1}/I_{1,0}$ sowohl bei niedriger als auch bei hoher Ca^{2+} -Konzentration eine deutliche Abhängigkeit von der Ionenstärke der Lösung zeigt, was typisch für die schwache Bindung der Myosinköpfe ans Aktin ist („weak-binding“). Je höher die Ionenstärke, desto geringer wird der Quotient, daß heißt es erfolgt eine Massenumverteilung auf Kosten des [1,1]-Reflexes und zugunsten des [1,0]-Reflexes.

Bei hoher Ca^{2+} -Konzentration steigt der Quotient und dementsprechend die Fraktion angehefteter Querbrücken bei jeder Ionenstärke an. Bei niedriger Ionenstärke (80 mM) ist der größte Calcium-Effekt erkennbar. Mit zunehmender Ionenstärke verringert sich die Differenz zwischen der relativen Intensität bei niedriger und hoher Ca^{2+} -Konzentration (statistisch signifikant, $P < 0,05$).

Aus der Abbildung ist zu entnehmen, daß die relative Intensität bei einer Ionenstärke von 170 mM von 0,58 bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration auf 0,69 bei hoher Ca^{2+} -Konzentration ansteigt. Nahezu die gleiche Änderung von $I_{1,1}/I_{1,0}$ ist zu beobachten, wenn die Ionenstärke bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration von 170 mM auf 120 mM reduziert wird. Um den Faktor zu ermitteln, um den sich zwischen hoher und niedriger Ca^{2+} -Konzentration die Fraktion angehefteter Querbrücken (F) und demzufolge die Bindungskonstante (K_B) unterscheidet, ist es möglich, bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration F bei einer Ionenstärke von 170 mM mit F bei 120 mM zu vergleichen (Kraft, 1990; Kraft et al., 1992).

Bei dieser Berechnung (s. Abschnitt 3.6) wird die Änderung der an Aktin gebundenen Myosinköpfe in Abhängigkeit von der Ionenstärke (Greene et al., 1983) zur Hilfe genommen. Es ergibt sich eine Fraktion angehefteter Querbrücken bei einer Ionenstärke von 170 mM und geringer Ca^{2+} -Konzentration von etwa 0,017-0,019. Die dazugehörige Bindungskonstante liegt ebenfalls bei 0,017-0,019. Durch eine Verringerung der Ionenstärke (auf 120 mM) bei geringer Ca^{2+} -Konzentration und dementsprechend auch durch eine Erhöhung der Ca^{2+} -

Konzentration bei 170 mM erhöht sich die Fraktion der angehefteten Querbrücken auf 0,021-0,023. Die Bindungskonstante steigt auf 0,021-0,024 an. Das bedeutet, daß mit Calcium die Bindungskonstante und somit die Aktinaffinität der Querbrücken in Gegenwart von 50 mM BDM etwa um den Faktor 1,25 zunimmt.

Die mechanischen Messungen haben ergeben, daß die Geschwindigkeitskonstante für Querbrückenablösung (k^-) mit hoher Ca^{2+} -Konzentration um 100-1000fach verlangsamt wird. Wenn gilt $K_B = k^+/k^-$

und die Bindungskonstante um das 1,25fache größer wird, dann kann hieraus abgeleitet werden (vgl. Berechnung unter 3.6), daß k^+ , die Geschwindigkeitskonstante für die Anheftung von Querbrücken in Gegenwart von 50 mM BDM etwa 80-800fach kleiner wird.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß das Verhalten der angehefteten Querbrücken bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration in Gegenwart von BDM vergleichbar ist mit dem von Querbrücken in relaxierten Fasern in Gegenwart von MgATP (Brenner et al., 1984). Eine höhere Ca^{2+} -Konzentration führt nur zu einer sehr geringen Erhöhung der relativen Intensität der äquatorialen Reflexe und dementsprechend ist der Effekt auf die Fraktion angehefteter Querbrücken und somit auf die Bindungskonstante der Querbrücken mit BDM sehr gering. Das heißt, die Möglichkeit der Bindung der Querbrücken mit BDM an das aktivierte Aktinfilament hat nur wenig Einfluß auf Affinität und Bindungskonstante, was typisch für „weak-binding states“ ist.

Es ergibt sich, daß BDM durch den allosterischen Effekt trotz maximaler Aktivierung der Aktinfilamente (hohe Ca^{2+} -Konzentration) in Gegenwart von MgATP die Kraftentwicklung verhindert und die Querbrücken in MgADP. P_i -Zuständen („weak-binding states“) vermutlich entsprechend dem AM.ADP. P_i^1 -Zustand akkumuliert.

3.4.2 Charakterisierung der Querbrückenzustände in Gegenwart von AlF_4 , das während aktivem „Turnover“ an Myosin gebunden hat ($\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand)

Bereits in der Literatur (Chase et al., 1993; Regnier et al., 1995) waren Querbrücken, die während aktivem Turnover MgADP. AlF_4 statt MgADP. P_i binden, als vor dem kraftgenerierenden Übergang liegende Querbrücken beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit sollte nun dieser Querbrückenzustand eingehend charakterisiert werden mit dem Ziel einer Einordnung in die Gruppe der weak- oder der strong-binding Zustände. Zu diesem

Zweck werden, wie schon für BDM (3.4.1) beschrieben, hier ebenfalls sowohl bei geringer als auch bei hoher Ca^{2+} -Konzentration mit mechanischen und röntgenstrukturanalytischen Methoden die Eigenschaften von Muskelfasern untersucht, welche AlF_4 während aktivem Querbrückenzyklus gebunden hatten ($\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand).

Messungen der Fasersteifheit in Abhängigkeit von der Dehnungsgeschwindigkeit im $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand und der Einfluß von Calcium auf diese Querbrücken

Das Aktinbindungsverhalten der Querbrücken mit $\text{MgADP} \cdot \text{AlF}_4$ bei hoher (pCa 4,5) und geringer Ca^{2+} -Konzentration (pCa 8,0) wurde durch Messung der Fasersteifheit in Abhängigkeit von der Dehnungsgeschwindigkeit untersucht (Abb.3.12). Zum Vergleich wurde auch die Fasersteifheit im Rigor und unter Relaxationsbedingung gemessen.

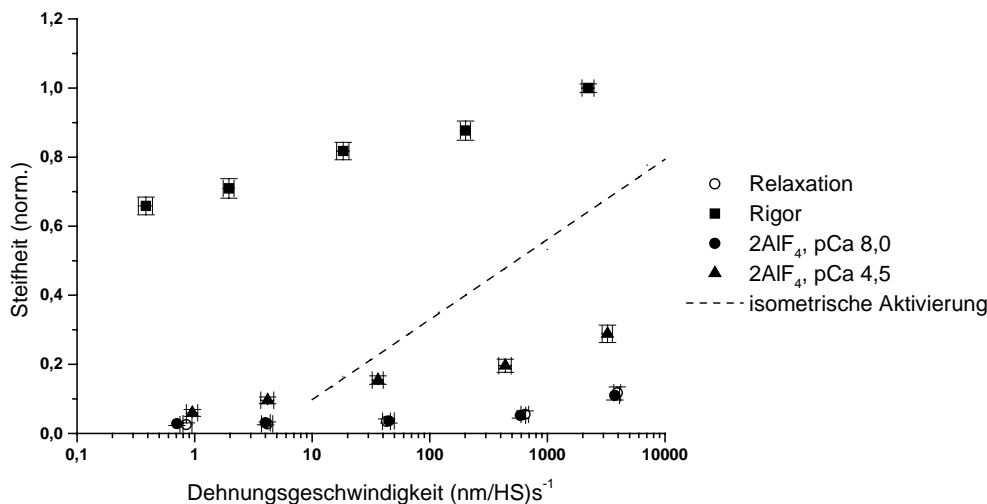


Abb.3.12: Fasersteifheit in Abhängigkeit von der Dehnungsgeschwindigkeit nachdem AlF_4 (2mM) unter Aktivierungsbedingung an die Myosinköpfe gebunden hat bei hoher (pCa 4,5) und niedriger (pCa 8,0) Ca^{2+} -Konzentration, sowie Fasersteifheit unter Relaxationsbedingung und im Rigor; Ionenstärke 80 mM, $T = 2-3^\circ\text{C}$. Dargestellt sind Ergebnisse von 10 Einzelfasern \pm SEM, wobei alle Werte auf die Rigorsteifheit normiert sind. Die gestrichelte Gerade repräsentiert die Fasersteifheit unter isometrischer Kraftentwicklung (pCa 4,5) und wurde als Referenz von Abb.3.10 übernommen.

Aus der Abbildung 3.12 geht klar hervor, daß die Fasersteifheit unter Relaxationsbedingung und mit 2 mM AlF_4 bei pCa 8,0 quasi identisch ist. Das bedeutet auch, daß die Aktinbindungskinetik bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration durch Bindung von AlF_4 an den Myosinkopf nicht beeinflußt wird.

Ähnlich wie bei BDM (Abb.3.10) zeigt sich hier, daß die Steifheits-Dehnungsgeschwindigkeits-Beziehung der Muskelfasern mit AlF_4 bei hoher Ca^{2+} -Konzentration eine Linksverschiebung zu 1000fach niedrigeren Werten erfährt. Das heißt, daß die Aktinbindungskinetik von AlF_4 -Querbrücken wie mit BDM und auch mit $\text{MgATP}\gamma\text{S}$

(Kraft et al., 1992) sich ändert, wenn die Querbrücken an das aktivierte Aktinfilament binden können. Das Ausmaß dieser Verschiebung bedeutet eine Verlangsamung der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Querbrückenablösung (k^-) um 1000fach. Ferner bewirkt eine Calcium-Zugabe eine relativ starke Zunahme der beobachteten Fasersteifheit in Gegenwart des Nukleotidanalogs, wobei nicht zu vergessen ist, daß auch hier eine kleine Fraktion (ca. 5%) kraftgenerierender Querbrücken zu der gemessenen Steifheit beitragen (vgl. Restkraft in Abb.3.2). Bei der schnellsten Dehnungsgeschwindigkeit ($\sim 3500 \text{ (nm/HS)s}^{-1}$) nimmt die Steifheit um den Faktor 2,6 zu. Jedoch ist die Fasersteifheit der Querbrücken mit AlF_4 ($\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand) deutlich von der Steifheit im Rigor und unter isometrischer Kraftentwicklung verschieden. Daraus läßt sich schließen, daß der $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand eine vom Rigor-Zustand und von kraftgenerierenden Querbrücken verschiedene (kleinere) Aktinaffinität besitzt. Ob der $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand jedoch den weak- oder den strong-binding states zuzurechnen ist, kann an dieser Stelle noch nicht mit Sicherheit gesagt werden.

Einfluß von Calcium auf die relative Intensität der ersten beiden äquatorialen Reflexe von Muskelfasern im $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand und Berechnung von K_B und F

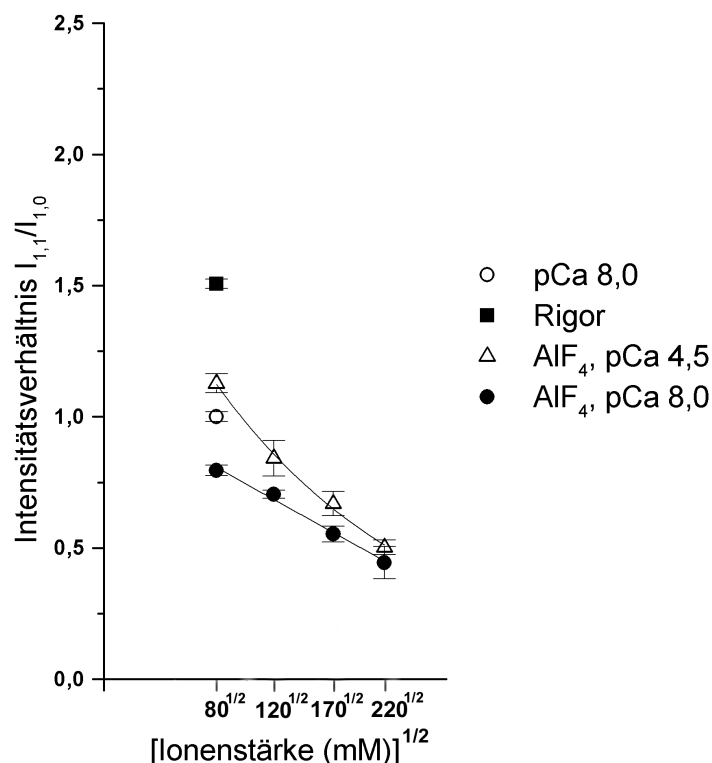


Abb.3.13: Effekt der Ionenstärke auf die relative Intensität der ersten beiden äquatorialen Reflexe ($I_{1,1}/I_{1,0}$) von Muskelfasern im $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand bei niedriger (pCa 8,0) und hoher (pCa 4,5) Ca^{2+} -Konzentration, $T = 2^\circ\text{C}$. Als Kontrolle wurde auch die relative Intensität im Rigor und unter Relaxationsbedingung mit 2 mM MgATP, Ionenstärke 80 mM, $T = 2^\circ\text{C}$ registriert. Dargestellt sind Ergebnisse von 4 Messungen \pm SEM, wobei alle Werte auf $I_{1,1}/I_{1,0}$ unter Relaxationsbedingung bei einer Ionenstärke von 80 mM normiert sind. Unterschiede zwischen niedriger und hoher Ca^{2+} -Konzentration sind für die Ionenstärken 80, 120 und 170 mM statistisch signifikant ($P < 0,05$).

Um auch in Muskelfasern nach Bindung von AlF_4 während Aktivierung den Effekt von Calcium auf die Zahl der angehefteten Querbrücken (F) und somit der Bindungskonstanten (K_B) und der Geschwindigkeitskonstante k^+ abschätzen zu können, erfolgte wiederum eine Registrierung der äquatorialen Reflexe bei verschiedenen Ionenstärken mit und ohne Calcium und eine Berechnung der relativen Intensität (vgl. 3.4.1).

Wie schon bei den Röntgenbeugungsexperimenten in Gegenwart von BDM beschrieben, ist auch für $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Querbrücken eine deutliche Abhängigkeit des Intensitätsquotienten von der Ionenstärke der Lösung zu erkennen (Abb.3.13) sowohl bei $\text{pCa } 8,0$ und bei $\text{pCa } 4,5$. Durch Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration steigt bei allen Ionenstärken der Intensitätsquotient an, wobei aber bei der niedrigsten Ionenstärke (80 mM) der Ca^{2+} -Effekt am stärksten ausgeprägt ist ($P < 0,05$). Die relative Intensität bei einer Ionenstärke von 170 mM von etwa 0,55 bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration steigt auf etwa 0,70 bei hoher Ca^{2+} -Konzentration an. Etwa das Gleiche ist zu beobachten, wenn die Ionenstärke bei geringer Ca^{2+} -Konzentration von 170 mM auf 120 mM reduziert wird.

Zur Berechnung des Faktors, um den sich die Fraktion angehefteter Querbrücken (F) und die Bindungskonstante (K_B) bei hoher und niedriger Ca^{2+} -Konzentration unterscheidet, kann wiederum, wie bereits für BDM gezeigt, F bei einer Ionenstärke von 170 mM mit F bei 120 mM und geringer Ca^{2+} -Konzentration verglichen werden. Bei einer Ionenstärke von 170 mM und geringer Ca^{2+} -Konzentration beträgt die Fraktion angehefteter Querbrücken ungefähr 0,14-0,44 und die Bindungskonstante 0,16-0,79. Durch eine Verringerung der Ionenstärke auf 120 mM bei geringer Ca^{2+} -Konzentration erhöht sich die Fraktion der angehefteten Querbrücken auf 0,17-0,58, die Bindungskonstante unter diesen Bedingungen liegt bei 0,21-1,4. Dementsprechend erhöht sich auch F und K_B durch Zugabe von Calcium bei 170 mM. Für die Bindungskonstante und somit auch für die Aktinaffinität der $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Querbrücken bedeutet dies, daß sie unter dem Einfluß von Calcium um einen Faktor von 1,31-1,77 größer werden, verglichen mit niedrigen Calciumbedingungen.

Auch hier läßt sich k^+ , die Geschwindigkeitskonstante für Querbrückenanheftung, aus der Beziehung $K_B = k^+/k^-$ abschätzen. Aus der Verschiebung von k^- zu 1000fach kleineren Werten und der Zunahme von K_B um einen Faktor von 1,31-1,77, ergibt sich für k^+ unter dem Einfluß von Calcium eine Verlangsamung um das 565-760fache. Calcium hat also, ähnlich wie mit BDM beobachtet, einen deutlichen Effekt auf die Anheftungs- und Ablösekinetik der Querbrücken.

Andererseits hat Calcium nur einen relativ kleinen Effekt auf die Bindungskonstante der Myosinköpfe im $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand und dementsprechend auf die Aktinaffinität der Querbrücken. Dieses Verhalten ist typisch für einen Querbrücken-Zustand mit niedriger Aktinaffinität (weak-binding states).

Da AlF_4 extrem langsam aus dem $\text{MgADP} \cdot \text{AlF}_4$ -Komplex des Myosinkopfes abdissoziiert, scheint $\text{MgADP} \cdot \text{AlF}_4$ als $\text{MgADP} \cdot \text{P}_i$ -Analogon auch bei $\text{pCa } 4,5$ zu einer Akkumulation von Querbrücken-Zuständen zu führen, die genau vor dem kraftgenerierenden Schritt liegen. Möglicherweise entspricht der $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand dem $\text{AM} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}_i^{\text{I}}$ -Zustand.

3.4.3 Charakterisierung der Querbrückenzustände in Gegenwart von MgADP und AlF_4 , welche unter Rigorbedingungen an die Myosinköpfe gebunden haben ($\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand)

Ein bisher nicht in der Literatur beschriebener Ansatz war der Versuch, MgADP und AlF_4 anstatt über aktiven Turnover durch Zugabe zu nukleotidfreien Muskelfasern an die Myosinköpfe binden zu lassen. Das bedeutet, man bewegt sich sozusagen rückwärts durchs biochemische Schema (Pyramidenmodell, s. Abb.1.1). Nachdem die erfolgreiche feste Bindung von ADP und AlF_4 an nukleotidfreie Fasern gezeigt werden konnte (vgl. Abschnitt 3.2) ging es nun darum, diesen neuen Querbrückenzustand zu charakterisieren.

Anhand von Steifheitsmessungen und röntgenstrukturanalytischen Untersuchungen der ersten beiden äquatorialen Reflexe sollte nun überprüft werden, ob der Akto-Myosin- $\text{MgADP} \cdot \text{AlF}_4$ -Komplex ($\text{AM} \cdot \text{MgADP} \cdot \text{AlF}_4$) ein Analog-Zustand mit hoher (rigor-ähnlicher) Aktinaffinität oder mit geringer Aktinaffinität ist.

Es wurde also auch für den $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand (5 mM MgADP und 5 mM AlF_4) die Steifheit in Abhängigkeit von der Dehnungsgeschwindigkeit bei einer Ionenstärke von 80 mM registriert und vergleichend dazu die Fasersteifheit im Rigor und unter Relaxationsbedingungen (Abb.3.14).

Messungen der Fasersteifheit in Abhängigkeit von der Dehnungsgeschwindigkeit im $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand und der Einfluß von Calcium auf diese Querbrücken

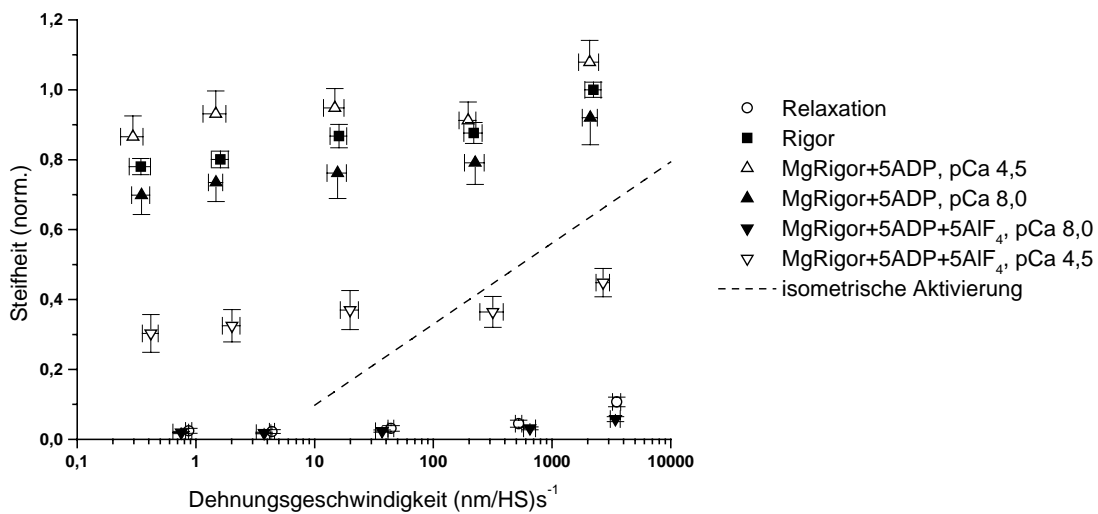


Abb.3.14: Abhängigkeit der Fasersteifheit von der Dehnungsgeschwindigkeit unter Rigorbedingungen in Gegenwart von 5 mM AlF_4 bei hoher (pCa 4,5) und niedriger (pCa 8,0) Ca^{2+} -Konzentration, Ionenstärke 80 mM, $T = 2\text{-}3^\circ\text{C}$.

Daten von 6 Fasern +/- SEM sind zusammengefaßt, wobei alle Werte auf die Rigorsteifheit normiert sind. Die gestrichelte Gerade repräsentiert die Fasersteifheit unter isometrischer Kraftentwicklung (pCa 4,5) und wurde als Referenz von Abb.3.10 übernommen.

Bevor das Phosphat-Analogon an die Myosinköpfe binden konnte, wurde die Faser unter Rigorbedingungen zuerst mit 5 mM MgADP inkubiert. Die resultierenden Querbrücken mit MgADP weisen sowohl bei hoher als auch bei geringer Ca^{2+} -Konzentration von der Dehnungsgeschwindigkeit nahezu unabhängige Steifheitswerte auf, die mit der Rigorsteifheit vergleichbar sind (Abb.3.14). Diese Akto-Myosin-Komplexe sind dementsprechend eindeutig den mit hoher Affinität bindenden Zuständen, den sog. „strongly-bound“ Zuständen, zuzuordnen.

Nach dieser Vorinkubation wurde die Muskelfaser in MgADP. AlF_4 -haltige, vollkommen MgATP-freie Lösung entweder mit niedriger oder mit hoher Ca^{2+} -Konzentration überführt. Nach einer Inkubationszeit von 30-60 Minuten (vgl. Abb.3.3) wurde die Fasersteifheit gemessen. Bindung von MgADP und AlF_4 an die Myosinköpfe resultiert in einer deutlichen Reduktion der Steifheit. Bei pCa 8,0 sinkt die Steifheit z.T. sogar auf Werte unter der relaxierten Steifheit ab. Bei maximaler Dehnungsgeschwindigkeit beträgt die Fasersteifheit in Gegenwart des Analogons und niedrigem Calciumgehalt weniger als 10% der Rigorsteifheit, wohingegen die Steifheit in hoher Ca^{2+} -Konzentration etwa 40% des Rigorwertes erreicht. Bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration ist die Steifheit stärker von der Dehnungsgeschwindigkeit abhängig als bei hoher Ca^{2+} -Konzentration. Die Lage der Beziehungen entlang der Geschwin-

digkeitsachse ist bei hoher Ca^{2+} -Konzentration deutlich nach links verschoben. Daraus läßt sich für die $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Querbrücken, wenn sie an das aktivierte Aktinfilament binden, ein stark reduziertes k^- ableiten, verglichen mit pCa 8,0 oder Relaxationsbedingung. Die Steifheit des $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustandes bei pCa 4,5 unterscheidet sich auch deutlich von den Steifheiten mit BDM (Abb.3.10) oder von $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ (Abb.3.12) bei pCa 4,5.

Vergleicht man die Fasersteifheit des $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustandes bei pCa 4,5 mit der Fasersteifheit unter maximaler Aktivierung, die als gestrichelte Linie in Abb.3.14 eingezeichnet ist, so fällt auf, daß die aktive Steifheit steil verläuft und die flach verlaufende Kurve des $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustandes kreuzt. Das bedeutet, daß sich $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Querbrücken in ihrem Aktinbindungsverhalten von kraftgenerierenden Querbrücken unterscheiden. Von den kraftgenerierenden Querbrücken ist bekannt, daß Calcium einen großen Effekt auf ihre Aktinaffinität hat, wie es für Querbrücken der strongly-bound states typisch ist. Auch für die $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Querbrücken zeigen die Steifheitsmessungen einen deutlichen Effekt von Calcium (Abb.3.14). Das heißt, auch dieser Querbrücken-Zustand könnte zur Gruppe der strongly-bound states gehören. Die hohe Steifheit des $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustandes könnte auf eine größere Fraktion und eine veränderte Aktinbindungskinetik der Querbrücken, die sich unter diesen Bedingungen mit hoher Affinität an das aktivierte Aktinfilament (A_{on}) binden, zurückzuführen sein. Aufgrund des flachen Verlaufs der Kurve, die auch bei langsamster Dehnungsgeschwindigkeit nicht stark abfällt, muß die Geschwindigkeitskonstante für Querbrückenablösung k^- (k_{off}) sehr langsam sein. Auch unterscheidet sich die $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Steifheitskurve stark von der $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Steifheitskurve, die das Aktinbindungsverhalten von weakly-bound states (AM.ADP. P_1^{I} -Zustand, vgl. 3.4.2) widerspiegelt. Eine andere Möglichkeit ist aber, daß die Zugabe von 5 mM MgADP und 5 mM AlF_4 bei pCa 4,5 nicht für eine vollständige Sättigung der Querbrücken ausreicht. Wie bereits unter 3.3 erläutert, spricht aber die Intensität der 1. Aktinschichtlinie in 2D-Röntgendiffraktionsbildern unter diesen Bedingungen gegen eine unvollständige Sättigung des $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustandes bei pCa 4,5.

Um den $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand eindeutig den mit geringer oder mit hoher Affinität an Aktin bindenden Querbrücken-Zuständen zuzuordnen, wurden auch die äquatorialen Reflexe bei verschiedenen Ionenstärken analysiert und F und K_{B} berechnet.

Einfluß von Calcium auf die relative Intensität der ersten beiden äquatorialen Reflexe des AIF_{Rigor}-Zustandes und Berechnung von K_B und F

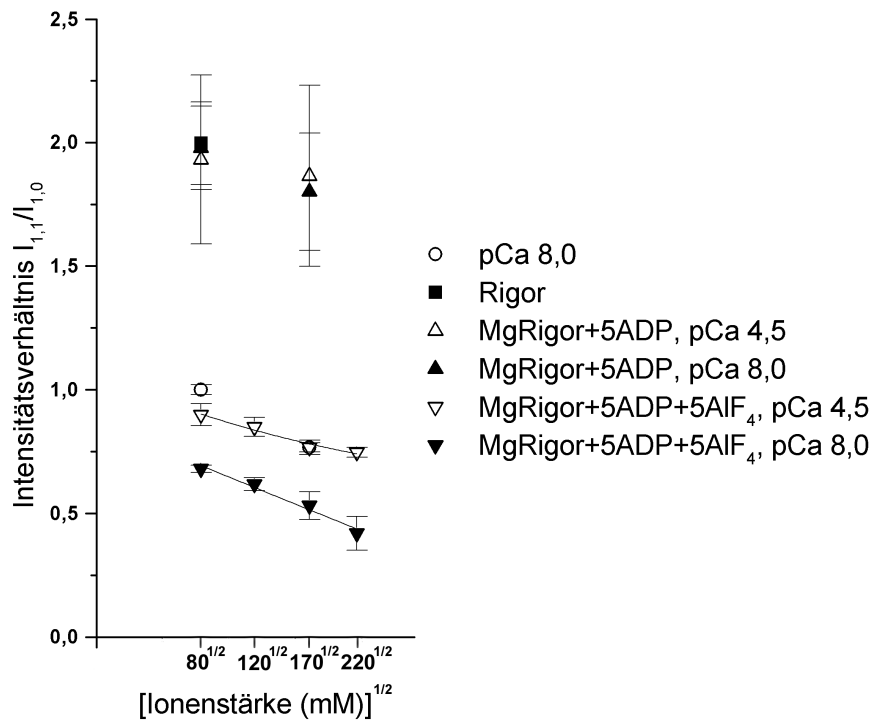


Abb.3.15: Einfluß der Ionenstärke auf den Intensitätsquotienten $I_{1,1}/I_{1,0}$ der ersten beiden äquatorialen Reflexe von Muskelfasern im AIF_{Rigor}-Zustand bei hoher (pCa 4,5) und niedriger (pCa 8,0) Ca²⁺-Konzentration, T = 2°C. Zum Vergleich wurde auch die relative Intensität im Rigor und unter Relaxationsbedingung sowie im Rigor mit 5 mM ADP, Ionenstärke 80 mM, T = 2°C registriert. Dargestellt sind Ergebnisse von 4 Messungen +/- SEM, wobei alle Werte auf den relativen Intensitätsquotienten unter Relaxationsbedingung bei einer Ionenstärke von 80 mM normiert sind. Unterschiede zwischen niedriger und hoher Ca²⁺-Konzentration sind statistisch signifikant (P < 0,001).

Abb.3.15 zeigt die Ergebnisse der röntgenstrukturanalytischen Untersuchungen zur Ermittlung der Intensität der ersten beiden äquatorialen Reflexe $I_{1,1}$ und $I_{1,0}$ von Muskelfasern im AIF_{Rigor}-Zustand bei verschiedenen Ionenstärken. Vergleichbar ist hier die ähnliche Ionenstärkeabhängigkeit des Intensitätsquotienten bei niedriger Ca²⁺-Konzentration in Gegenwart von 5 mM MgADP und 5 mM AlF₄ wie sie auch für die BDM- und AIF_{Aktiv}-Versuche (Abb.3.11 und 3.13) gezeigt wurde. Im Gegensatz zur Ionenstärkeabhängigkeit bei pCa 8,0 und auch im Vergleich zu den röntgenstrukturanalytischen Experimenten mit BDM und AIF_{Aktiv} bei pCa 4,5, ist aber hier der Intensitätsquotient bei hoher Ca²⁺-Konzentration nicht so stark von der Ionenstärke der Lösungen abhängig, was typisch für eine stärkere Anbindung der Myosinköpfe ans Aktin ist („strong-binding“). Verschieden von AIF_{Aktiv} und BDM ist außerdem, daß der Calcium-Effekt mit Zunahme der Ionenstärke deutlich größer wird. Ein Grund hierfür ist, daß einerseits die Fraktion angehefteter Querbrücken bei niedriger Ionenstärke, daß heißt bei zunehmender Bindungskonstante, mit und ohne Calcium bereits näher am Maximum ist, und dementsprechend der Calcium-Effekt geringer ausfällt. Bei

höherer Ionenstärke, daß heißt bei abnehmender Bindungskonstante, ist ein stärkerer Einfluß von Calcium zu beobachten, da die Fraktion der angehefteten Querbrücken bei pCa 8,0 relativ klein ist und Calcium-Bindung an Aktin offenbar die Aktinaffinität der AlF_{Rigor} -Querbrücken sehr stark erhöht.

Alle diese Befunde sprechen dafür, daß der AlF_{Rigor} -Zustand zu den strongly-bound states gehört. Um dies zu bestätigen, wurde wiederum der Einfluß von Calcium auf K_B und F der AlF_{Rigor} -Querbrücken berechnet.

Aus Abb.3.15 ist zu entnehmen, daß sich bei einer Ionenstärke von 220 mM und geringer Ca^{2+} -Konzentration die relative Intensität von etwa 0,42 auf etwa 0,68 bei hoher Ca^{2+} -Konzentration erhöht ($P < 0,001$). Durch Extrapolieren einer Geraden durch die Kurve mit niedriger Ca^{2+} -Konzentration bis auf den Wert von $I_{1,1}/I_{1,0}$ bei der Ionenstärke von 220 mM mit Calcium, ist ein ähnlicher Anstieg bei Reduzierung der Ionenstärke von 220 mM auf 55 mM bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration zu beobachten. Für die Fraktion angehefteter Querbrücken (F) ergibt sich nach der Berechnung in Abschnitt 3.6 bei einer Ionenstärke von 220 mM und geringer Ca^{2+} -Konzentration ein Wert von etwa 0,57, der durch Reduktion der Ionenstärke (auf 55 mM) bis auf 0,99 ansteigt. Das Gleiche ist dementsprechend zu beobachten, wenn man bei der Ionenstärke 220 mM von pCa 8,0 auf pCa 4,5 geht. Die dazugehörige Bindungskonstante (K_B) steigt von 1,33 auf etwa 99 an. Verglichen mit niedrigen Calciumbedingungen nimmt die Bindungskonstante und somit auch die Aktinaffinität des AlF_{Rigor} -Zustandes bei hoher Ca^{2+} -Konzentration etwa um den Faktor 74 zu.

Der Effekt von Calcium auf k^+ , die Geschwindigkeitskonstante für Querbrückenanheftung, läßt sich hier nur schwer abschätzen, da aus den Steifheitsmessungen (Abb.3.14) nicht eindeutig die Verschiebung der Kurve mit Calcium nach links und damit der Effekt von Calcium auf k^- ermittelt werden kann. Geht man von einer Reduktion von k^- um das 10^5 fache aus, so ergibt sich wenn K_B um das 74fache größer wird mit Calcium eine Reduktion von k^+ um das 1350fache.

Die Befunde der äquatorialen Reflexe und der Steifheitsmessungen zeigen, daß sich die AlF_{Rigor} -Querbrücken deutlich von den AlF_{Aktiv} -Querbrücken und den Querbrücken mit BDM unterscheiden. Binden die AlF_{Rigor} -Querbrücken an das aktivierte Aktinfilament (A_{on} ; pCa 4,5), dann ändert sich ihre Aktinbindungskinetik deutlich, k^- wird viel kleiner (und k^+ ebenfalls). Der Effekt von Calcium auf die Aktinaffinität des AlF_{Rigor} -Zustandes ist deutlich größer als auf die AlF_{Aktiv} -Querbrückenzustände und auf die Querbrücken mit BDM. Das bedeutet, der Myosinkopf des AlF_{Rigor} -Zustandes kann mit hoher Affinität an A_{on} binden, im

Gegensatz zum $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand und zu den Querbrücken mit BDM. Damit ist der $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand als hochaffin bindender MgADP.P_i -Analog-Zustand (strong-binding state) zu betrachten.

Um den $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ - und $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand weiter differenzieren und die strukturellen Eigenschaften dieser Querbrücken untersuchen zu können, wurden Röntgendiffraktionsbilder unter Kompression durch Dextran registriert.

3.5 Vergleich struktureller Eigenschaften des $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ - und des $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustandes durch Kompressionsexperimente mit Dextran

Werden Muskelfasern einer Lösung mit hochmolekularem Dextran T_{500} (MW = 500000) ausgesetzt, so kommt es zu einer osmotischen Komprimierung der Fasern (Brenner et al., 1984), da die Dextran T_{500} Moleküle aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes nicht in das intakte kontraktile System eindringen. Die Kompression der Fasern hängt von der jeweils der Versuchslösung zugesetzten Dextrankonzentration (0, 2, 4, 6 & 8%) ab. Durch diese Kompression ändern sich die Filamentabstände, was sich auf die Position der äquatorialen Reflexe (Abstände zwischen den Reflexen $d_{1,0}$ bzw. $d_{1,1}$) auswirkt. Es erfolgt eine systematische Änderung in der Distanz zwischen zwei benachbarten 1,0-Gitterebenen ($d_{1,0}$) und somit auch im Oberflächen- zu Oberflächenabstand $D_{(\text{Aktin-Myosin})}$ zwischen dem dicken Myosin- und dem dünnen Aktinfilament. Die Änderung der Filamentabstände hängt wiederum von der Struktur der angehefteten Querbrücken ab (z.B. Rigor, Relaxation, Aktivierung; s. 2.6). Die Myosinköpfe wirken der durch Dextran hervorgerufenen Komprimierung je nach Zustand der Myosinköpfe mit einer bestimmten effektiven radialen Kraft F_r entgegen, die graphisch gegen $D_{(\text{Aktin-Myosin})}$ aufgetragen werden kann. Aus diesem Grund lassen sich mit diesem Ansatz strukturelle Eigenschaften der angehefteten Querbrücken untersuchen.

Sowohl bei geringer als auch bei hoher Ca^{2+} -Konzentration wurde untersucht, welchen Einfluß unterschiedliche Dextran-Konzentrationen auf die mit röntgenstrukturanalytischen Methoden meßbaren Parameter, den äquatorialen Gitterabstand $d_{1,0}$ und demzufolge auf den Oberflächen- zu Oberflächenabstand $D_{(\text{Aktin-Myosin})}$ der Filamente haben (s. 2.6). So sollen der $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ - und der $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand strukturell differenziert werden.

Alle Dextran-Experimente wurden bei einer Temperatur von 2°C und einer Ionenstärke von 80 mM durchgeführt, da sich mit der Ionenstärke auch der Abstand zwischen den Filamenten ändert (Brenner et al., 1984).

In Vorversuchen war beobachtet worden, daß sich der Filamentabstand nach Zugabe von Dextran T₅₀₀ innerhalb von 5 min auf einen neuen Wert einstellt und sich dann kaum noch ändert. Die Wartezeit ist notwendig, da Dextran bei Verwendung der single fiber arrays zuerst in die Zwischenräume zwischen den Fasern eindiffundieren muß. Diese Zeit ist unbedingt einzuhalten, ansonsten sind bei Versuchsbeginn die Fasern nur zum Teil komprimiert. Die so ermittelten Filamentabstände und somit auch $D_{(\text{Aktin-Myosin})}$ repräsentieren daher das Verhalten der radialen Kraftkomponenten nach Einstellung des Kräftegleichgewichts.

3.5.1 Die radiale Gleichgewichtslänge des AIF_{Aktiv}-Zustandes

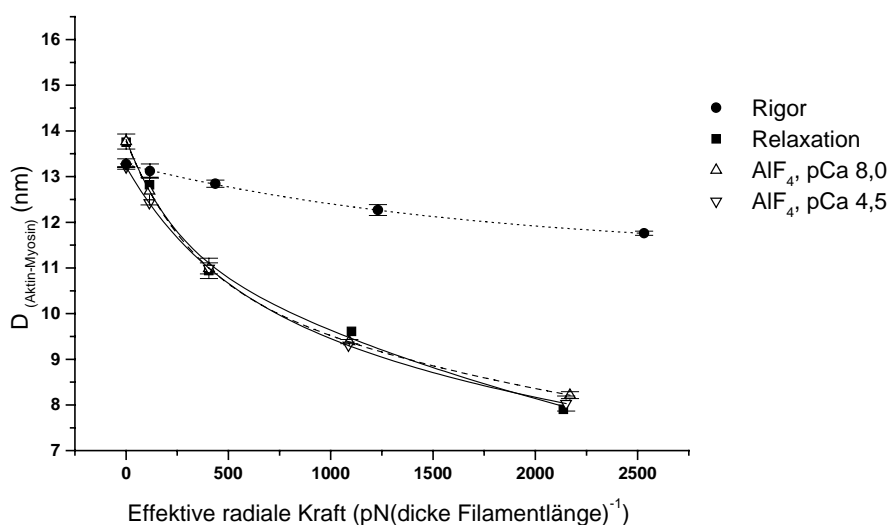


Abb.3.16: Einfluß der effektiven radialen Kraft (Dextrankompression) auf den Oberflächen- zu Oberflächenabstand $D_{(\text{Aktin-Myosin})}$ für AIF_{Aktiv} bei hoher und niedriger Ca^{2+} -Konzentration ($P < 0,05$), Ionenstärke 80 mM, $T = 2^\circ\text{C}$. Zum Vergleich wurde auch $D_{(\text{Aktin-Myosin})}$ für relaxierte Fasern und im Rigor bestimmt. Es wurden die Daten von 2 Faserbündeln +/- SEM zusammengefaßt.

Der Abb.3.16 ist allgemein zu entnehmen, daß der Oberflächen- zu Oberflächenabstand $D_{(\text{Aktin-Myosin})}$ mit zunehmender Dextrankonzentration (von 0 auf 8%) und somit mit zunehmender effektiver radialer Kraft abnimmt, wobei die Änderung von $D_{(\text{Aktin-Myosin})}$ im Rigor über einen wesentlich kleineren Bereich erfolgt als z.B. unter Relaxation (pCa 8,0). Im Rigorzustand sind nahezu alle Myosinköpfe relativ starr ans Aktin gebunden und dementsprechend sind die Fasern weit weniger komprimierbar als unter relaxierten Bedingungen, wo die Myosinköpfe in geringerer Zahl, mit anderer Struktur und weniger fest ans Aktin binden. Als Referenzkurve zur Bestimmung der radialen Gleichgewichtslänge des AIF_{Aktiv}-Zustandes, d.h. der Länge des Myosinkopfes ohne elastische Verformung, dient die Antwortkurve unter Relaxationsbedingung bei einer Ionenstärke von 80 mM (■, pCa 8,0). Die

radiale Gleichgewichtslänge, die charakteristisch für die Struktur des Myosinkopfes ist, wird an dem Filamentabstand abgelesen, an dem sich die relaxierte Antwortkurve mit einer anderen Antwortkurve, hier z.B. im Rigor bei 13,2 nm, überkreuzt. An diesem Punkt sind die angehefteten Myosinköpfe in radialer Richtung nicht elastisch verformt, d.h. die Rigorquerbrücken üben weder Druck noch Zug auf das dünne und das dicke Filament aus.

Ohne osmotische Kompression, also ohne Zufuhr von Dextran T₅₀₀, ist der Oberflächen- zu Oberflächenabstand $D_{(\text{Aktin-Myosin})}$ im Rigor im Verhältnis zur Relaxation von 13,8 auf 13,3 nm erniedrigt (Abb.3.16). Die im Rigor angehefteten Querbrücken neigen dazu die Filamente dichter zusammen zu ziehen, sie üben eine radiale Kraft in die sog. positive Richtung aus. Fügt man der Rigorlösung 2% Dextran T₅₀₀ zu (radiale Kraft = 115 pN), so schieben die Querbrücken die Filamente auseinander, $D_{(\text{Aktin-Myosin})}$ läßt sich nur auf ~ 13 nm komprimieren gegenüber 12,8 nm unter Relaxationsbedingung. Das heißt, die radiale Kraft geht in die negative Richtung.

Myosinköpfe im $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand zeigen sowohl bei niedriger (pCa 8,0) als auch bei hoher Ca^{2+} -Konzentration (pCa 4,5) ein ähnliches Verhalten mit Dextran wie relaxierte Fasern. Ohne Komprimierung ist der Oberflächen- zu Oberflächenabstand $D_{(\text{Aktin-Myosin})}$ bei den relaxierten Fasern mit gebundenem Aluminiumfluorid genauso groß wie unter Relaxierung ohne Phosphat-Analogon. Die Länge ohne elastische Verformung des Myosinkopfes, also die radiale Gleichgewichtslänge, liegt in etwa auch an diesem Punkt (13,7 nm). Erhöht man allerdings die Dextrankonzentration auf über 3% und komprimiert so den Oberflächenabstand $D_{(\text{Aktin-Myosin})}$ auf < 11,5 nm vor, so ziehen die AlF_4 -gebundenen Querbrücken die Filamente etwas dichter zusammen (positive Richtung), um sie bei einer Konzentration von ca. 7% wieder auseinander zu schieben (vgl. Überkreuzungspunkte der Kurven), verglichen mit Querbrücken unter Relaxationsbedingungen. Allerdings sind diese Effekte sehr klein, so daß man sagen kann, daß die Kurven für $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ bei pCa 8,0 und Relaxation aufeinander liegen. Bei hoher Ca^{2+} -Konzentration ohne Dextran liegen die Filamente dichter zusammen ($D_{(\text{Aktin-Myosin})} = 13,2 \text{ nm}$), da die $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Myosinköpfe etwas fester (Aktinaffinität um 1,5fach erhöht; s. 3.4.2) und vermutlich in einer anderen Konformation ans Aktin binden als ohne Calcium und somit die Filamente von vorne herein etwas stärker zusammen ziehen (positive Richtung) (statistisch signifikant, $P < 0,05$). Über die radiale Gleichgewichtslänge kann keine Aussage erfolgen, da die Antwortkurve die relaxierte Kurve erst bei sehr hoher Dextrankonzentration schneidet. Dies könnte eventuell von der geringen vorhandenen Restkraft (5-7%) herrühren (vgl. 3.1.1), so daß noch ein paar wenige aktiv gebundene Querbrücken vorliegen, die als strongly-bound states den Filamentabstand beeinflussen. Ohne

diese wenigen kraftgenerierenden Querbrücken würde die Antwortkurve eventuell flacher verlaufen und schon vorher die relaxierte Antwortkurve schneiden.

Insgesamt ergeben sich aber unter der Dextran-Komprimierung keine statistisch signifikanten Unterschiede in $D_{(\text{Aktin-Myosin})}$ zwischen der Kurve für relaxierte Fasern sowie den Kurven für $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ mit und ohne Calcium. Aufgrund der ähnlichen Lage der Kurven von $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ sowohl bei inaktivem (AlF_4 , pCa 8,0) als auch bei aktiviertem Aktinfilament (AlF_4 , pCa 4,5) mit der Kurve unter Relaxation (pCa 8,0) läßt vermuten, daß bei diesen zwei Bedingungen die Konfiguration der Myosinköpfe mit gebundenem Nukleotidanalogen ähnlich sein muß wie in relaxierten Fasern. Das bedeutet, daß $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Querbrücken ähnliche strukturelle Eigenschaften (Komprimierbarkeit) wie Querbrücken unter Relaxation aufweisen. Aufgrund ihrer Aktinaffinität und Aktinbindungskinetik können sie der Gruppe von Zuständen mit geringer Aktinaffinität, also den Zuständen vor der Kraftgenerierung zugeordnet werden.

3.5.2 Die radiale Gleichgewichtslänge des $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustandes

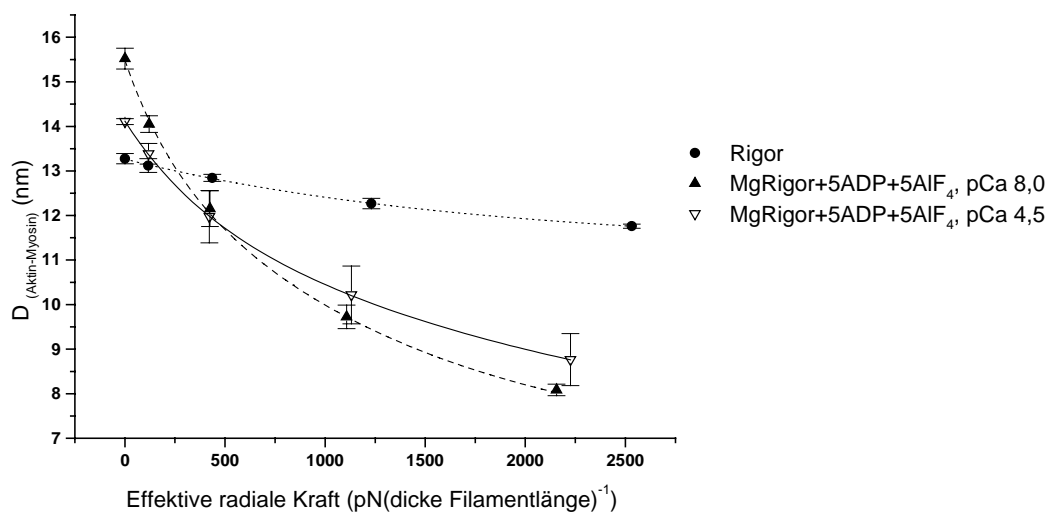


Abb.3.17: Einfluß der effektiven radialen Kraft auf den Oberflächen- zu Oberflächenabstand $D_{(\text{Aktin-Myosin})}$ im $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand bei hoher und niedriger Ca^{2+} -Konzentration, sowie im Rigor; Ionenstärke 80 mM, $T = 2^\circ\text{C}$. Es wurden die Daten von 3 Faserbündeln +/- SEM zusammengefaßt.

Um auch die $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustände strukturell charakterisieren zu können, wurde hier ebenfalls die Dextran-Kompression bei einer Ionenstärke von 80 mM durchgeführt. Hierbei diente die Antwortkurve der Myosinköpfe im $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration als Vergleichskurve, da nach vorangegangenen mechanischen und röntgenstrukturanalytischen Befunden (s. 3.4.3) festgestellt wurde, daß die Fasern unter diesen Bedingungen vergleichbare Eigenschaften aufweisen wie unter normaler Relaxation.

Die radiale Gleichgewichtslänge der Myosinköpfe im Rigor liegt in diesem Experiment (Abb.3.17) bei 13 nm, was in etwa dem im AlF_{Aktiv} -Versuch ermittelten Wert entspricht (Abb.3.16). Bei diesem Filamentabstand üben die stark bindenden Querbrücken keine radiale Kraft aus. Werden die Fasern im Rigor aber komprimiert auf einen Abstand $D_{(Aktin-Myosin)} < 13$ nm, so drückt die radiale Kraft der Querbrücken im Rigor das Filamentgitter auseinander, in die negative Richtung, dadurch lassen sich Fasern im Rigor auch mit hoher Dextrankonzentration wenig komprimieren.

Ohne Kompression durch Dextran T_{500} liegt der Abstand $D_{(Aktin-Myosin)}$ von AlF_{Rigor} -Querbrücken bei hoher Ca^{2+} -Konzentration zwischen dem von Rigor und dem der Referenzkurve (AlF_{Rigor} , pCa 8,0, $P < 0,001$). Die Querbrücken tendieren dazu die Filamente dichter zusammen zu ziehen als unter Relaxierung. Die niedrige radiale Gleichgewichtslänge von etwa 11,5 nm, die bei einer 4%igen Dextrankonzentration (radiale Kraft = 420 pN) erreicht ist, kann als Hinweis für einen mit hoher Affinität gebundenen Zustand dienen. Brenner et al. zeigten 1996, daß die radiale Gleichgewichtslänge von hochaffin gebundenen Querbrücken unter isometrischer Aktivierung (Ionenstärke 80 mM) bei etwa 10,5 nm liegt. Auch der weitere Kurvenverlauf bei Erhöhung der Dextrankonzentration, wo die AlF_{Rigor} -Querbrücken die Filamente auseinander schieben, entspricht in etwa dem von Fasern während isometrischer Kraftentwicklung. Es muß also eine erhebliche Formänderung im Akto-Myosin-Komplex gegenüber den AlF_{Rigor} -Querbrücken ohne Calcium oder gegenüber relaxierten Fasern stattfinden. Die relativ große Standardabweichung, verursacht durch die noch geringe Zahl an Messungen, läßt zwar keine endgültigen Aussagen zu, dennoch bestätigen diese Daten, daß der AlF_{Aktiv} - und der AlF_{Rigor} -Zustand sich strukturell unterscheiden müssen.

Die Kurve des AlF_{Rigor} -Zustandes bei geringer Ca^{2+} -Konzentration ($MgRigor+5ADP+5AlF_4$, pCa 8,0) verläuft fast gleich wie die Kurve unter Relaxation (Abb.3.16), nur der Oberflächenabstand $D_{(Aktin-Myosin)}$ ist hier etwas größer und die Kurve liegt demzufolge etwas höher. Dies ist aber damit zu begründen, daß die verwendete Konzentration von ADP und AlF_4 von 2 mM auf 5 mM erhöht wurde.

Bei hoher Ca^{2+} -Konzentration entspricht die Antwortkurve des AlF_{Rigor} -Zustandes der Kurve während isometrischer Kraftentwicklung, also den „strong-binding states“. Dies kann als Bestätigung des zuvor erhobenen Befundes genommen werden, daß der AlF_{Rigor} -Zustand zu den strong-binding states gehört.

3.6 Berechnungen zum Einfluß von Calcium auf die Fraktion (F) angehefteter Querbrücken bzw. auf die Bindungskonstante (K_B)

Unter der Annahme, daß bei Änderungen der Ionenstärke die Aktinaffinität der Querbrücken im intakten kontraktile System und die Aktinaffinität von isolierten Myosinköpfen in Lösungen (Greene et al., 1983) paralleles Verhalten zeigen, kann der Einfluß von Calcium auf die Fraktion (F) angehefteter Querbrücken und auf die Bindungskonstante (K_B) mit Hilfe der Daten aus den Röntgenbeugungsexperimenten errechnet werden. Für die quantitativen Abschätzungen von F und K_B können die an isolierten Proteinen des kontraktile Apparates in Lösung von Greene et al. ermittelten Bindungskonstanten in Abhängigkeit von der Ionenstärke verwendet werden.

Die Bindungskonstante K_B kann im Prinzip aus der Fraktion angehefteter Querbrücken abgeleitet werden, für die gilt:
$$K_B = F/(1-F) \quad (1)$$

Um den Faktor (x) zu errechnen, um den sich die Bindungskonstante mit der Ionenstärke ändert, wurde aus einer Abbildung von Greene et al. (1983) die Bindungskonstante bei einer niedrigen (K_{B120}) und bei einer hohen Ionenstärke (K_{B170}) abgelesen, unter der Annahme, daß sich die Bindungskonstante in Fasern entsprechend ändert:

$$K_{B120} = x * K_{B170} \quad (2)$$

Unter der Voraussetzung, daß sich die relative Intensität $I_{1,1}/I_{1,0}$ proportional mit der Fraktion (F) angehefteter Querbrücken ändert (Brenner, 1984), läßt sich aus den röntgenstrukturanalytischen Daten der Faktor (y) bestimmen, um den sich die Fraktion mit diesen Ionenstärken ändert:
$$F_{120} = y * F_{170} \quad (3a)$$

oder
$$F_{170} = F_{120}/y \quad (3b)$$

Aus (1) und (2) ergibt sich:
$$F_{120}/(1-F_{120}) = x * F_{170}/(1-F_{170}) \quad (4)$$

Durch Einsetzen von (3b) in (4) resultiert:
$$F_{120}/(1-F_{120}) = x * (F_{120}/y)/(1-F_{120}/y) \quad (5)$$

Aus einer Umformung von (5) ergibt sich:
$$F_{120} = (y-x)/(-x+1) \quad (6)$$

Berechnung von K_B mit der aus der Formel (6) bestimmten Fraktion angehefteter Querbrücken:
$$K_{B120} = F_{120}/(1-F_{120}) \quad (7)$$

Ein Einsetzen von (3a) in (4) hätte ergeben:
$$F_{170} = (y-x)/(-xy+y) \quad (8)$$

Und somit für $K_{B170} = F_{170}/(1-F_{170}) \quad (9)$

Anhand dieser Formeln lassen sich die Fraktionen und die Bindungskonstanten für die verschiedenen experimentellen Ansätze berechnen.

4 Diskussion

4.1 Bewertung der Methoden im Hinblick auf die Fragestellung

4.1.1 Überblick über die Fragestellung und die verwendeten Methoden

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob sich z.B. anhand von Analoga Zwischenzustände des Akto-Myosin-Komplexes im Querbrückenzyklus der Skelettmuskulatur darstellen lassen, die der Kraftentwicklung möglicherweise direkt vorausgehen oder daran beteiligt sind. Eine zentrale Frage in dem Konzept, daß der erste Schritt der isometrischen Kraftentwicklung im Skelettmuskel durch eine Strukturänderung am Übergang von einem niederaffin, nicht-stereospezifisch gebundenen Zwischenzustand in einen hochaffin, stereospezifisch gebundenen Zustand erfolgt ist, welche Querbrücken Zustände an diesem Übergang beteiligt sind (Brenner, 1991; Brenner und Yu, 1993). In diesem Konzept spielen also die mit niedriger Affinität gebundenen Zwischenzustände des Querbrückenzyklus, insbesondere die (A)M.ADP.P_i-Zustände (vgl. Schema in Abb.1.1), eine zentrale Rolle für den ersten kraftgenerierenden Schritt. Unklar ist, welcher Übergang (z.B. P_i-Abgabe) mit diesem Schritt verbunden ist. Es ging in der vorliegenden Arbeit darum, einen oder mehrere (A)M.ADP.P_i-Zustände des Akto-Myosin-Komplexes bei inaktivem Aktinfilament (A_{off}, ohne Calcium) und vor allem auch bei aktiviertem Aktinfilament (A_{on}, mit Calcium) zu charakterisieren. Insbesondere war zu untersuchen, ob es möglicherweise einen Querbrücken Zustand vor P_i-Abgabe gibt, der bereits mit hoher Affinität an A_{on} binden kann.

Um sowohl die mit niedriger als auch die mit hoher Affinität an Aktin gebundenen Querbrücken im aktivierten kontraktilem Apparat strukturell mit Hilfe der Röntgendiffraktion und funktionell über mechanische Messungen der Fasersteifheit charakterisieren zu können, mußten Bedingungen gewählt werden, unter denen Querbrücken auch bei aktiviertem Aktinfilament eindeutig in einzelnen Zuständen des Querbrückenzyklus akkumuliert werden. Denn Querbrücken mit ATP bzw. ADP.P_i gehen unter Aktivierungsbedingung (hohe Ca²⁺-Konzentration) bei Abgabe von Phosphat in die kraftgenerierenden Zustände über und die sich bildende Mischpopulation aus schwach gebundenen, nicht-kraftgenerierenden und mit hoher Aktinaffinität gebundenen, kraftgenerierenden Querbrücken Zuständen machen eine eindeutige Charakterisierung der einzelnen Zustände unmöglich.

Bekannt war, daß beispielsweise MgATPγS als kaum-hydrolysierbares MgATP-Analogon eingesetzt werden kann, um auch bei hoher Ca²⁺-Konzentration die Kraftentwicklung zu

blockieren. Querbrücken mit MgATP γ S weisen ohne und mit Calcium Eigenschaften auf, die für weak-binding states charakteristisch sind (Kraft, 1990; Kraft et al., 1992). Anzumerken ist allerdings, daß diese Myosinköpfe vermutlich den Querbrückenzuständen mit MgATP (Abb.1.1), also vor der eigentlichen Spaltung von MgATP in MgADP und P_i entsprechen (Goody et al., 1975) und somit nicht die Zustände mit MgADP.P_i repräsentieren. Xu et al. (2003) berichteten, daß MgATP γ S-gebundene Myosinköpfe vermehrt eine „offene“ („open“) Konformation einnehmen, die keine geordnete Myosin-Helix zulassen, wie sie auch beim MgATP-Zustand beobachtet wurde. In kristallographischen Untersuchungen von Gulick et al. (1997) wurden S1-Myosinkopf-Fragmente in Gegenwart von MgATP γ S kristallisiert, die resultierende Struktur entsprach einem Myosinkopf im nukleotidfreien Zustand (Rigor) und damit der Gruppe von Myosinkopf-Strukturen, bei denen noch kein „repriming“ des Kopfes (Umlagerung aus dem post-powerstroke zurück in die pre-powerstroke Konfiguration) stattgefunden hat (Geeves und Holmes, 1999). Es wurde postuliert, daß diese Form des Myosinkopfes der Struktur in Gegenwart von ATP, charakterisiert durch eine offene Bindungstasche für das γ -Phosphat des ATP, entsprechen soll.

Um aber die Funktion und die Struktur der Zwischenzustände unmittelbar vor bzw. beim kraftgenerierenden Schritt, d.h. beim Übergang in die strong-binding states aufzuklären, ist es notwendig, Querbrücken mit einem MgADP.P_i-Analogon bei calcium-aktiviertem Aktinfilament (A_{on}) sowie ohne Calcium (A_{off}) zu charakterisieren. In der vorliegenden Arbeit wurde daher 1. das Phosphat-Analogon Aluminiumfluorid (AlF₄) verwendet, von dem bekannt war (Chase et al., 1993), daß es während aktivem Querbrückenzyklus als Phosphat-Analogon fest an den Myosinkopf bindet („trapping“) und die Querbrücken in einem vor der Kraftgenerierung liegenden Zustand, dem (A)M.ADP.P_i-analogen Zustand, akkumuliert und 2. wurde der allosterische Inhibitor BDM (2,3-Butandionmonoxim) verwendet, der die Kraftentwicklung verhindert und die Querbrücken in einem physiologischen, nicht-kraftgenerierenden MgADP.P_i-Zwischenzustand arretieren soll (Regnier et al., 1995).

Die Querbrückenzustände wurden in drei experimentellen Ansätzen charakterisiert: Im ersten Ansatz erfolgte die Untersuchung der Eigenschaften von gehäuteten Einzelfasern bei niedriger und hoher Ca²⁺-Konzentration in Gegenwart von BDM, wobei die aktive Kraftentwicklung, die normalerweise unter diesen Bedingungen mit Calcium erfolgt, fast vollständig unterdrückt wird. In einem zweiten Versuchsansatz binden Muskelfasern während aktivem Querbrückenzyklus das Phosphat-Analogon AlF₄ anstelle des anorganischen Phosphates in der Nukleotidbindungstasche des Myosinkopfes („AlF₄Aktiv“) (Chase et al., 1993), welches nur extrem langsam aus dem MgADP.AlF₄-Komplex im Myosinkopf

abdissoziieren kann. Im letzten, dritten Ansatz wurden die chemisch permeabilisierten Fasern unter Rigorbedingung, d.h. im nukleotidfreien Zustand, mit MgADP und AlF_4 inkubiert („ $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ “). Dabei binden zunächst MgADP und nachfolgend das Phosphat-Analogon direkt an die Myosinköpfe. Zum Vergleich wurde zusätzlich der Aktin-Myosin-Komplex in Muskelfasern während isometrischer Kontraktion (hohe Ca^{2+} -Konzentration, aktiviertes Aktinfilament) und unter Relaxationsbedingungen (niedrige Ca^{2+} -Konzentration, inaktiviertes Aktinfilament), sowie auch im Rigor charakterisiert.

Mit den gewählten Methoden zur funktionellen Charakterisierung, Messung der Fasersteifheit und Analyse der ersten beiden äquatorialen Reflexe, sowie der osmotischen Kompressionsexperimente und der im Rahmen einer anderen Arbeit durchgeführten 2D-Röntgendiffraktions-Experimente (Mattei, 2004) zur strukturellen Aufklärung der akkumulierten Querbrückenzustände ließen sich die Zustände aus den drei experimentellen Ansätzen hinsichtlich Aktinaffinität, Aktinbindungskinetik und bestimmter struktureller Aspekte bei aktiviertem und inaktiviertem Aktinfilament charakterisieren und so eindeutig den „weak“- bzw. den „strong-binding states“ zuordnen. In Gegenwart von BDM bzw. im $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand bei hoher und niedriger Ca^{2+} -Konzentration akkumulieren Querbrückenzustände, die der Gruppe von Zuständen geringer Aktinaffinität, den sog. „weak-binding states“, entsprechen. Der $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand weist dagegen die Eigenschaften eines mit hoher Affinität an das aktivierte Aktinfilament bindenden Zustandes, eines sog. „strong-binding state“ auf. Das bedeutet, der $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand und der $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand stellen zwei verschiedene Myosinkopf-Zustände im Querbrückenzyklus dar.

4.1.2 Messungen an permeabilisierten Einzelfasern

Für die Einteilung und Charakterisierung der verschiedenen, durch die Nukleotidanaloga induzierten Querbrückenzustände bieten die hier verwendeten mechanischen und röntgenstrukturanalytischen Methoden am strukturell intakten kontraktile System von Fasern des Kaninchenpsoas gewisse Vorteile gegenüber Experimenten an isolierten Myosinköpfen oder am isolierten Aktin-Myosin-Komplex in Lösung. Im Gegensatz zur Cryo-Elektronenmikroskopie an isolierten Proteinkomplexen (Milligan und Flicker, 1987), bei denen die Myosinfragmente nicht in den Myosinfilamenten verankert sind, liefern Experimente am strukturierten System, also an intakten Muskelfasern, Informationen über die für die Kraftentwicklung und Verkürzung verantwortlichen elastisch verformten

Querbrücken-Zustände, da solche elastischen Deformationen von den strukturellen Gegebenheiten in den Muskelfasern mitbestimmt werden. Ebenso können mit kristallographischen Untersuchungen an isolierten, vom Aktinfilament abgelösten, Myosinköpfen (Fisher et al., 1995b) keine Aussagen bezüglich der elastischen Verformung des an Aktin gebundenen Myosinkopfes getroffen werden.

Um aber die relevanten, möglicherweise verformten Zwischenzustände der Aktin-Myosin-Wechselwirkung, hier induziert durch die Verwendung von Nukleotidanaloga, hinsichtlich ihrer mechanischen und strukturellen Eigenschaften zu identifizieren, sind mechanische und röntgenstrukturanalytische Messungen an Muskelfasern mit intaktem kontraktilen Apparat von großer Bedeutung. Im Gegensatz zu früheren klassischen Untersuchungen an nativen Froschmuskelpräparaten, die nur im relaxierten oder aktivierten Zustand untersucht werden können und in die Nukleotidanaloga nicht eindiffundieren können, wurden für die vorliegenden Untersuchungen chemisch permeabilisierte Muskelfasern, deren kontraktiler Apparat jedoch strukturell intakt ist, verwendet. Für die mechanischen Experimente zur Bestimmung der Steifheit und der Kräfte eignen sich einzelne chemisch gehäutete Skelettmuskelfasern, bei denen es kaum zu Diffusionsproblemen für Nukleotide und Produkte in der Faser und somit zu inhomogenen Verhältnissen kommt. Für die detaillierte Strukturanalyse mittels der Röntgenbeugungsdiffraktion waren größere Präparate von isolierten Fasern von Vorteil um eine genügend hohe Intensität in den Reflexen für die Analysierbarkeit beispielsweise der Äquatoren zu erreichen. Um einer Substratverarmung, Akkumulation von Stoffwechselabbauprodukten und Konzentrationsgradienten in größeren Präparaten bei der Verwendung der Nukleotidanaloga und der lang andauernden Meßzeit vorzubeugen, wurde die Methode der sogenannten „single fiber arrays“ entwickelt (Kraft, 1999), wo für die Registrierung der äquatorialen Reflexe und der Schichtlinien mit hoher Intensität 15 einzelne chemisch permeabilisierte Fasern nebeneinander in der Meßkammer montiert werden.

4.1.3 Besonderheiten der verwendeten Lösungen und der Meßmethode

Bei der Herstellung der Versuchslösungen zur Bildung des $\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$ -Komplexes für die $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ - und die $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Experimente war in Vorversuchen festgestellt worden, daß nur durch Reaktion von NaF mit $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ (Chase et al., 1993) anstatt mit AlCl_3 (Raucher und Fajer, 1994; Kim et al., 1998) die Myosinköpfe im $\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$ -Zustand arretiert werden konnten. Mit AlCl_3 war aufgrund teilweise auftretender Präzipitationen keine ausreichende

Hemmung der aktiven isometrischen Kraft möglich. Da sich zeigte, daß bei Herstellung der Lösung mit KOH bzw. Kaliumpropionat das Metallfluorid leicht auszufallen begann aufgrund Überschreitens des Löslichkeitsproduktes, wurde für alle AlF_4 -Lösungen zur Einstellung der Ionenstärke Natrium- statt Kaliumpropionat und zur Einstellung des pH-Wertes NaOH statt KOH verwendet.

Den mechanischen Experimenten, insbesondere bei der Registrierung der Fasersteifheit in Abhängigkeit von der Dehnungsgeschwindigkeit zur Bestimmung der Aktinbindungskinetik sind Grenzen gesetzt. Aufgrund einer verbleibenden aktiven Kraftentwicklung von im Mittel 5-7% (steady-state Kraft) der maximal möglichen isometrischen Kraft bei den $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ - und BDM-Versuchen bei hohem Ca^{2+} -Gehalt läßt sich die Geschwindigkeitskonstante für Querbrückenablösung k^- nur unter Vorbehalt bestimmen. Infolge des Auftretens einer kleinen Fraktion aktiv kraftgenerierender Querbrücken wird ein geringer Teil (2,5-3,5%) der Linksverschiebung der Steifheits-Dehnungsgeschwindigkeits-Beziehung durch diese Querbrücken verursacht.

Wichtig für die Interpretation der Steifheitsmessungen ist auch, daß es nicht ausreicht, nur bei einer einzigen Dehnungsgeschwindigkeit die Fasersteifheit zu bestimmen. Erst eine Variation der Dehnungsgeschwindigkeit über einen weiten Bereich läßt eine Verschiebung der Gesamtbeziehung erkennen und somit Rückschlüsse auf die Aktinbindungskinetik der Querbrücken zu. Ein eindrückliches Beispiel hierfür liefert die Steifheitsmessung von Fasern im $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand bei hoher Ca^{2+} -Konzentration (Abb.3.14). Bei hoher Dehnungsgeschwindigkeit liegt im Vergleich zu niedriger Geschwindigkeit keine allzu große Zunahme der Fasersteifheit vor, was zeigt, daß die Geschwindigkeitskonstante für Querbrückenablösung (k^-) vom Aktin sehr langsam ist. Die Fasersteifheit bei den Experimenten mit BDM und $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ ist bei hohen Dehnungsgeschwindigkeiten ähnlich wie für $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$, bei geringer Geschwindigkeit jedoch nimmt die Steifheit sehr stark ab, was zeigt, daß k^- für Zustände mit BDM oder $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ etwa 1000fach schneller ist. Dieser für die Zuordnung der BDM- und $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustände zu den weak-binding states wesentliche Befund wäre ohne Messungen bei submaximaler Dehnungsgeschwindigkeit entgangen.

Um die einzelnen Reaktionsschritte, die von den Querbrücken durchlaufen werden, zu verlangsamen und somit besser zu erfassen, wurde die Mehrzahl der Experimente an einzelnen Skelettmuskelfasern bei niedriger Temperatur, also zwischen 2°C und 5°C durchgeführt. Diese niedrige Versuchstemperatur war auch zur Inkubation der Fasern im Rigor mit ADP und AlF_4 nötig, da nur bei einer solchen niedrigen Temperatur das Phosphat-Analogon in

ausreichendem Maße im Myosinkopf festgebunden und vollständige Sättigung erreicht wird. Vergleichende Messungen mit Inkubation bei 12°C zeigten, daß bei dieser höheren Temperatur ADP·AlF₄ nicht ausreichend an die Myosinköpfe gebunden wird, zu erkennen beispielsweise an der sehr hohen Intensität und dem Intensitätsprofil der 1. Aktinschichtlinie in den Röntgendiffraktionsbildern. Daher erfolgte immer erst nach einer Inkubation bei niedriger Temperatur die für die Registrierung von 2D-Röntgendiffraktionsbildern nötige Temperaturerhöhung auf 12 und 20°C. Bei dieser Vorgehensweise konnten keine Hinweise auf eine unvollständige Sättigung der Querbrücken mit AlF₄ bei hoher Temperatur entdeckt werden.

4.1.4 Nachweis der festen Bindung von ADP·AlF₄ am Myosinkopf

Zur Überprüfung, ob die Myosinköpfe tatsächlich MgADP·AlF₄ in der Nukleotidbindungstasche fest gebunden haben, wurden auch Messungen der aktiven isometrischen Kraftentwicklung sowie verschiedene Kontrollinkubationen in Lösungen ohne AlF₄ durchgeführt. Nach Zugabe von 2 mM AlF₄ zu Fasern während isometrischer Kontraktion konnte eine Hemmung der Kraftentwicklung um 93-95% festgestellt werden, die durch die Inkorporation von MgADP·AlF₄ im Myosinkopf zustande kommt. Dieses Ergebnis stimmt mit Daten von Chase et al. (1993) überein, die an glycerinisierten Fasern des Kaninchenpsoas in Gegenwart von 500 µM Aluminium und 10 mM Fluorid eine Kraftreduktion auf 5,5% des Kontrollwertes bei maximaler Aktivierung beobachteten.

Chase und Kushmerick (1990) beobachteten, daß im AlF_{Aktiv}-Zustand unter Relaxationsbedingungen in Abwesenheit von Aluminium und Fluorid aufgrund der festen Bindung („trapping“) ADP und AlF₄ nicht vom Myosinkopf abdissoziieren, sondern daß erst ein aktiver Durchlauf des Querbrückenzyklus zur Entfernung von AlF₄ aus der Faser führt, mit einer Reversibilität der Kraft von 91 ± 7% (Chase et al., 1993). Diese Beobachtungen konnten durch eigene Versuche bestätigt werden, bei denen das inkorporierte Nukleotid ebenfalls während aktivem Turnover nur extrem langsam (15-20 min, s. Abb.3.5) und mit einer Reversibilität von 92% aus dem MgADP·AlF₄-Komplex des Myosinkopfes freigesetzt wird. Interessanterweise haben Versuche, bei denen Fasern im AlF_{Aktiv}-Zustand für 15 oder 30 min in Gegenwart von MgATP_γS bei hoher Ca²⁺-Konzentration inkubiert wurden (unter diesen Bedingungen ist keine aktive Kraftentwicklung möglich), gezeigt, daß bei anschließender Aktivierung der Kraftanstieg sehr rasch erfolgt, mit einem Zeitverlauf wie bei normaler Aktivierung. Daraus läßt sich schließen, daß das MgADP·AlF₄ durch die

Aktivierung des dünnen Filamentes bereits freigegeben wurde, obwohl noch kein aktiver Turnover wegen Anwesenheit von MgATP γ S stattfinden konnte. Der Myosinkopf im AlF₄-Zustand braucht also nur an das Ca²⁺-aktivierte Aktinfilament binden, damit das Nukleotidanalogen abdissoziieren kann. Ein Durchlauf des aktiven Querbrückenzyklus ist nicht zwingend notwendig (Kraft und Brenner, Abstract 2001).

Auch für den AlF_{Rigor}-Zustand wurde die feste Bindung von ADP und AlF₄ überprüft. Eine Abnahme des Intensitätsquotienten I_{1,1}/I_{1,0} mit andauernder Inkubationszeit (Abb.3.3) sowie die von Mattei (2004) in 2D-Röntgendiffraktionsbildern beobachtete Intensitätsabnahme der Aktinschichtlinie und die Zunahme der Myosinschichtlinien, wenn MgADP·AlF₄ in Muskelfasern im Rigor eindiffundiert, zeigt, daß das Phosphat-Analogon an die nukleotidfreien Myosinköpfe gebunden hat. Daß auch hier das Nukleotid wie im AlF_{Aktiv}-Versuch fest in der Bindungstasche verankert ist, konnte durch 1. eine anschließende Aktivierung der Fasern belegt werden, bei der die Abdissoziation vom Myosinkopf ebenfalls sehr langsam (12-15 min, s. Abb.3.6) erfolgt. Zweitens konnte durch Steifheitsmessungen (Abb.3.8) und Registrierungen des Intensitätsquotienten I_{1,1}/I_{1,0} (Abb.3.7a+b) gezeigt werden, daß ADP·AlF₄ in Rigorlösung und in MgRigorlösung mit ADP, aber ohne AlF₄, sowohl bei niedriger als auch bei hoher Ca²⁺-Konzentration nicht aus der Faser heraus kommt. Diese Experimente bestätigen neben 2D-Röntgenbeugungsexperimenten, in denen sich das Diffraktionsbild (z.B. Äquator, 1. Aktinschichtlinie) über mindestens 1 Stunde nicht in Richtung nukleotidfreier Zustand verändert, daß auch bei Bindung von ADP und AlF₄ an die Myosinköpfe ausgehend von nukleotidfreien Bedingungen die Abdissoziation des Phosphat-Analogons nur über einen aktiven „Turnover“ erfolgen kann. Dies stimmt mit Daten von Yamaguchi et al. (2001) überein, die ebenfalls an gehäuteten Muskelfasern des Kaninchenssoas zeigten, daß Myosinköpfe mit AlF₄ nach Inkubation in Relaxations-, Rigor-, ADP-Rigor- und Ca²⁺-Rigorlösung das Analogon nicht bzw. nur sehr schwer und unvollständig freigeben. In einer Aktivierungslösung allerdings erfolgt der Kraftwiederanstieg innerhalb von 10 min. Die Autoren zeigten weiterhin, daß nach Inkubation der Fasern mit AlF₄ in Ca²⁺-Rigorlösung (kein Kraftanstieg) und anschließender Aktivierung es zu einem raschen Kraftanstieg und demzufolge zu einer schnellen Abgabe (ca. 22 sec) von AlF₄ aus dem Myosinkopf kommt. Dies deutet darauf hin, daß es auch für den AlF_{Rigor}-Zustand möglich ist, durch Bindung an das aktivierte Aktinfilament ohne aktiven Turnover das P_i-Analogon zu destabilisieren und abzugeben.

4.2 Wie läßt sich der $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand im Querbrückenzyklus einordnen?

Zunächst sollen die Resultate der Versuche mit dem Phosphat-Analogon AlF_4 , das während aktivem Querbrückenzyklus in der Nukleotidbindungstasche des Myosinkopfes gebunden hat, ($\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand) betrachtet und diskutiert werden. Insbesondere soll der Effekt von Calcium (Aktivierung des dünnen Filamentes, A_{on} im Schema in Abb.1.1) auf den $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand im Hinblick auf die Aktinbindungskinetik, die Aktinaffinität und die strukturellen Eigenschaften des $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustandes analysiert werden. Hohe Ca^{2+} -Konzentration entspricht dabei Aktivierungs-Bedingungen, bei denen durch Bindung von Calcium an Troponin und Verschiebung von Tropomyosin zusätzliche Bindungsstellen am Aktin für Wechselwirkungen mit Myosin freigelegt werden (aktiviertes Aktinfilament, A_{on}), geringe Ca^{2+} -Konzentration entspricht Relaxations-Bedingungen, d.h. die Aktinfilamente sind nicht aktiviert (A_{off}).

Zwei Ziele wurden mit diesen Untersuchungen verfolgt: Die Charakterisierung der Eigenschaften des $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustandes auch im Vergleich zu bekannten Zwischenzuständen des Querbrückenzyklus und daraus die Zuordnung zu entweder den weak- oder den strong-binding states.

Vergleich des $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustandes mit Querbrücken unter Relaxationsbedingung, also bei geringer Ca^{2+} -Konzentration

Querbrücken in Gegenwart von MgATP (Brenner et al., 1982), also unter Relaxationsbedingung, sind den Zuständen geringer Aktinaffinität zuzuordnen und umfassen die ATP- und ADP. P_i -Zustände im Schema in Abb.1.1. Untersuchungen zur Fasersteifheit zeigen in Gegenwart von MgATP und für den $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand bei geringer Ca^{2+} -Konzentration eine nahezu identische Fasersteifheit, die maximal 15% der Rigorsteifheit erreicht und über einen weiten Bereich von der Dehnungsgeschwindigkeit abhängig ist. Dies ist ein Hinweis darauf, daß durch Bindung von AlF_4 statt P_i in der Nukleotidbindungstasche des Myosinkopfes die Aktinaffinität bzw. die Aktinbindungskinetik bei geringer Ca^{2+} -Konzentration nicht beeinflußt wird.

Zur weiteren Differenzierung des $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustandes und der Charakterisierung der strukturellen Eigenschaften dieses Zustandes erfolgte die Registrierung von Röntgendiffraktionsbildern unter Kompression mit hochmolekularem Dextran T_{500} (s. 3.5), wodurch die radialen Dimensionen der Myosinköpfe und ihre Komprimierbarkeit bzw. radiale Steifheit ermittelt werden können (Xu et al., 1993). Myosinköpfe im $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand bei geringer Ca^{2+} -Konzentration zeigen eine sehr ähnliche Abhängigkeit ihrer Komprimierbarkeit

von der Dextrankonzentration (Oberflächen- zu Oberflächenabstand $D_{(\text{Aktin-Myosin})}$) wie relaxierte Fasern mit MgATP. Brenner et al. (1996) zeigten für relaxierte Fasern, daß schwach gebundene Querbrücken, trotz ihrer geringen Affinität zum Aktin, eine elastische radiale Kraft entgegen der osmotischen Kompression ausüben und daß diese Querbrücken sich aufgrund ihrer unterschiedlichen radialen Gleichgewichtslänge von kraftgenerierenden Querbrücken und Querbrücken im Rigor unterscheiden. Es wurde angenommen, daß dieser Unterschied durch eine veränderte Form des Myosinkopfes oder durch ein verändertes Andocken von Myosin an Aktin bedingt ist. Aufgrund des sehr ähnlichen Kurvenverlaufs bei Dextrankomprimierung, der hier für relaxierte Fasern und für den $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand ermittelt wurde, kann angenommen werden, daß Querbrücken im $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration vergleichbare Eigenschaften bezüglich radialer Steifheit wie Querbrücken unter Relaxationsbedingungen aufweisen.

Der Effekt der Aktivierung der Aktinfilamente auf den $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand und die Einordnung dieses Zustandes im Querbrückenzyklus

Der Einfluß von Calcium auf den $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand wurde anhand von Änderungen in der Aktinbindungskinetik und der Aktinaffinität bei Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration ermittelt. Um zunächst Veränderungen der Geschwindigkeitskonstanten für Querbrückenablösung (k^-) und – anheftung (k^+) zu untersuchen, wurde der Einfluß von Calcium auf die Fasersteifheit in Abhängigkeit von der Dehnungsgeschwindigkeit sowie auf den Intensitätsquotienten $I_{1,1}/I_{1,0}$ der ersten beiden äquatorialen Reflexe registriert. Anhand theoretischer Berechnungen wurde in Abschnitt 1.3.1 gezeigt, wie die Geschwindigkeitskonstanten k^+ und k^- die Lage und die Form der Beziehung zwischen Fasersteifheit und Dehnungsgeschwindigkeit beeinflussen (Brenner et al., 1986a). Unter Berücksichtigung dieser Berechnungen und den Bindungsstudien (s. Abschnitt 3.6) an kontraktile Proteinen in Lösung (Greene et al., 1983) lassen sich folgende Aussagen über den $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand bei Aktivierung des Aktinfilamentes durch Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration (Übergang von A_{off} zu A_{on}) treffen:

1. Zunahme der Fasersteifheit bei hoher Ca^{2+} -Konzentration, die sich aber deutlich von der Steifheit im Rigor und unter isometrischer Kraftentwicklung unterscheidet.
2. In Gegenwart von Calcium resultiert eine deutliche Linksverschiebung der Kurve entlang der Abszisse. Das Ausmaß dieser Verschiebung bedeutet, daß die Geschwindigkeitskonstante für Querbrückenablösung k^- um etwa 1000fach kleiner wird als ohne Calcium.
3. Sowohl bei niedriger als auch bei hoher Ca^{2+} -Konzentration erreicht die Fasersteifheit keinen Wert, der unabhängig von der Dehnungsgeschwindigkeit ist. Somit kann auch keine

direkte Aussage über die Geschwindigkeitskonstante für Querbrückenanheftung k^+ und über den Einfluß von Calcium auf k^+ sowie über die Fraktion der angehefteten Myosinköpfe (F) getroffen werden.

4. Nach den röntgenstrukturanalytischen Untersuchungen läßt sich berechnen, daß die Bindungskonstante K_B mit Calcium um einen Faktor von etwa 1,5 zunimmt.

5. Aus der Beziehung $K_B = k^+/k^-$ und K_B kann abgeleitet werden, daß k^+ um Faktor 650 kleiner wird.

Calcium hat also in Gegenwart des Nukleotid-Analogons einen deutlichen Effekt auf die Anheftungs- und Ablösekinetik der Querbrücken, aber nur einen relativ kleinen Effekt auf die Aktinbindungskonstante und die Aktinaffinität der Myosinköpfe im AlF_{Aktiv} -Zustand. Diese Berechnungen unterliegen allerdings der Annahme, daß Calcium keinen durch Registrierung der äquatorialen Reflexe erfaßbaren Einfluß auf die Struktur der angehefteten Querbrücken hat. Dies konnte mit Einschränkungen durch die Dextranexperimente bestätigt werden.

Bereits in biochemischen Untersuchungen an isolierten Proteinen (Chalovich et al., 1981) wurde gezeigt, daß Calcium die Aktinaffinität von nicht-kraftgenerierenden Querbrücken nur geringfügig beeinflusst. Darüber hinaus konnte in Gegenwart des nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogons $MgATP\gamma S$ (Kraft, 1990; Kraft et al., 1992), welches den Querbrückenzyklus in Zuständen niedriger Aktinaffinität arretiert, an permeabilisierten Kaninchenmuskelfasern ebenfalls eine lediglich geringfügige Zunahme der Aktinaffinität der Querbrücken mit $MgATP\gamma S$ um das 2-4fache beobachtet werden. Die $MgATP\gamma S$ -gebundenen Myosinköpfe befinden sich somit auch bei aktivem Aktinfilament in einer Konformation, die nur mit geringer Affinität an Aktin binden kann. Zusätzlich wurde mit diesem Analogon gezeigt, daß sich die Aktinbindungskinetik der niederaffin gebundenen Querbrücken bei Bindung an A_{on} charakteristisch verändert, was sich in einer deutlichen Verlangsamung der Geschwindigkeitskonstanten für Querbrückenablösung (k^-) und – anheftung (k^+) (vertikale Reaktionen in Abb.1.1) ausdrückte und zu einer Erhöhung der beobachteten Fasersteifheit führte. Entsprechende Beobachtungen wurden auch mit anderen ATP-Analoga wie $MgAMP$ -PNP und $MgGTP$ gemacht (Frisbie et al., 1997; 1998; Heizmann et al., 1997). Damit ergibt sich, daß aufgrund der vergleichbaren Eigenschaften auch der AlF_{Aktiv} -Zustand der Gruppe der mit geringer Affinität an Aktin gebundenen Zustände zuzurechnen ist.

Wie schon unter 4.1.1 erläutert, repräsentieren Myosinköpfe mit gebundenem $MgATP\gamma S$ jedoch Querbrücken Zustände mit $MgATP$ und entsprechen somit nicht den durch die Phosphat-Analoga Aluminiumfluorid und Orthovanadat während aktivem Turnover

akkumulierten MgADP.P_i-Zuständen (Chase et al., 1993; 1994; Regnier et al., 1995). Die Ergebnisse der AIF_{Aktiv}-Versuche zeigen, daß der AIF_{Aktiv}-Zustand und die ATP γ S-Querbrücken und damit auch die ADP.P_i- und die ATP-Querbrückenzustände sich dennoch funktionell nicht wesentlich unterscheiden. Beide zeigen 1. die für weak-binding states (Chalovich et al., 1981) typische geringfügige Affinitätszunahme bei Bindung an das aktivierte Aktinfilament (hohe Ca²⁺-Konzentration) und 2. den Ca²⁺-Effekt auf die Aktinbindungskinetik, insbesondere auf k^- , ausgedrückt in einer vergleichbaren Linksverschiebung der Steifheits-Dehnungsgeschwindigkeits-Beziehung für beide Zustände. Schließlich läßt sich die funktionelle Ähnlichkeit von ADP.P_i- und ATP-Zuständen des Querbrückenzyklus auch durch mechanische Messungen während lastfreier isotonischer Verkürzung der Muskelfasern bestätigen (Stehle et al., 1993; Stehle und Brenner, 2000). Während lastfreier Verkürzung befinden sich trotz aktiviertem Aktinfilament aufgrund von massiven Umverteilungen nahezu alle Querbrücken (95%) in den Zuständen geringer Aktinaffinität. Sie akkumulieren aufgrund der schnellen Hydrolyse von ATP vorwiegend in den ADP.P_i-Zuständen. Diese nicht-kraftgenerierenden ADP.P_i-Querbrücken weisen eine ganz ähnliche Aktinbindungskinetik und Aktinaffinität wie der AIF_{Aktiv}-Zustand und wie Querbrücken mit ATP γ S bei hoher Ca²⁺-Konzentration auf.

Strukturell hingegen gibt es sehr wohl Unterschiede zwischen Querbrücken die MgATP und solchen, die MgADP.P_i gebunden haben. Aus röntgenkristallographischen Untersuchungen lassen sich zwei Gruppen von Strukturen ableiten (Geeves und Holmes, 1999): eine dem Myosinkopf mit ATP entsprechende hat eine offene Bindungstasche für das γ -Phosphat des ATP und den Halsteil in der „down“-Position (post-powerstroke). Die zweite Konformation soll den Myosinkopf mit hydrolysiertem Nukleotid jedoch vor Phosphat-Abgabe (ADP.P_i) repräsentieren. Diese Struktur, die auch mit ADP.AIF₄ beobachtet wurde (Fisher et al., 1995a; 1995b), ist durch eine geschlossene γ -Phosphat-Bindungstasche und den Halsteil in „up“-Position (pre-powerstroke) charakterisiert. Röntgenstrukturanalytische Untersuchungen des nicht-stereospezifisch und mit geringer Affinität an Aktin bindenden MgADP.P_i-Zustandes an Muskelfasern haben gezeigt, daß diese Myosinköpfe vermehrt eine „geschlossene“ („closed“) Konformation einnehmen, die eine geordnete Anordnung der Myosinköpfe an der Myosin-Helix zuläßt, im Unterschied zum MgATP-Zustand, der keine helikale Anordnung ermöglicht (Xu et al., 1997; Urbanke und Wray, 2001; Xu et al., 2003). Dies ist z.B. an den deutlichen Myosinschichtlinien in Röntgendiffraktionsbildern in Gegenwart von ADP.P_i zu erkennen, die mit ATP-Querbrücken nicht erscheinen. Eigene 2D-Röntgenstrukturanalytische Experimente (Mattei, 2004) haben gezeigt, daß auch AIF_{Aktiv}-Querbrücken deutliche

Myosinschichtlinien aufweisen, sowohl bei geringer als auch bei hoher Ca^{2+} -Konzentration, und somit wie die weak-binding ADP. P_i -Zustände eine „closed“-Konformation besitzen. Beachtenswert ist hier, daß auch bei hoher Ca^{2+} -Konzentration sehr deutliche Myosinschichtlinien erscheinen (Mattei, 2004; Abstract 2004). Dies ist in Einklang mit den Befunden der vorliegenden Arbeit, die den $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand als weak-binding Zustand, analog dem ADP. P_i -Zustand charakterisieren. Auch bei hoher Ca^{2+} -Konzentration zeigt er geringe Aktinaffinität und Myosinschichtlinien, beides typisch für einen Zustand geringer Aktinaffinität. Die Dextranskompressionsexperimente bestätigten zudem, daß die $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Myosinköpfe bei Aktivierung des Aktinfilamentes, d.h. beim Übergang von $\text{A}_{\text{off}}\text{MDP}.\text{P}_i$ -Zuständen zu $\text{A}_{\text{on}}\text{MDP}.\text{P}_i$ -Zuständen, nicht in einer anderen Konformation ans Aktin binden als ohne Calcium oder unter Relaxationsbedingung. Wie zuvor schon die Myosinschichtlinien in 2D-Röntgendiffraktionsexperimenten gibt auch die Dextranskompression keinen Hinweis auf große strukturelle Unterschiede zwischen Myosinköpfen im $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand wenn sie an A_{on} oder A_{off} gebunden sind und Myosinköpfen unter Relaxationsbedingung, die unter diesen Bedingungen vorwiegend als ADP. P_i -Zustände vorliegen. Es kann davon ausgegangen werden, daß Myosinköpfe im $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand somit nicht-stereospezifisch an das Aktinfilament binden und demzufolge in der so arretierten Form, d.h. ohne das P_i -Analogon abgeben zu können, nicht in einen stereospezifisch gebundenen Zustand übergehen können.

Entgegen den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten und Schlußfolgerungen, daß der $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand die Querbrücken in einem ADP. P_i -Zustand vor der Kraftgenerierung repräsentiert, zeigten Chase et al. (1993; 1994), daß die $\text{MgADP}.\text{AIF}_4$ -Querbrücken-Zustände in Gegenwart von Calcium nach Hemmung der Kraftentwicklung für eine erhöhte Steifheit der Fasern im Vergleich zu Relaxationsbedingungen verantwortlich sind. Daraus zogen sie den Schluß, daß diese Querbrücken-Zustände mit höherer Affinität ans dünne Filament binden und somit nicht die für weak-binding states üblichen Bedingungen erfüllen. EPR-Messungen (electron paramagnetic resonance) an gehäuteten Einzelfasern des Kaninchenpsoas (Raucher und Fajer, 1994) ließen weder eine Zuordnung zu den niederaffin noch zu den hochaffin bindenden Zuständen zu. Denn die mit AIF_4 getrappten Myosinköpfe wiesen zwar eine ähnliche ungeordnete („disordered“) Orientierung wie abgelöste Myosinköpfe unter Relaxationsbedingung auf, ihre Mobilität war aber eher begrenzt (rigorähnlich). Diese Diskrepanz zu den eigenen Daten legt die Vermutung nahe, daß die Autoren den mit dem $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand und auch schon früher (Kraft et al., 1992; Frisbie et al.,

1997; 1998; Heizmann et al., 1997) beobachteten Ca^{2+} -Effekt auf die Fasersteifheit bzw. Aktinbindungskinetik der Querbrückenzustände mit niedriger Aktinaffinität übersehen hatten.

Als Schlußfolgerung aus diesen Untersuchungen ergibt sich, daß Myosinköpfe im $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand alle Eigenschaften aufweisen, die für einen MgADP.P_i -Zustand mit geringer Aktinaffinität typisch sind. Im Schema der Querbrückenzustände, wie sie in Abb.1.1 dargestellt sind, entspricht dies dem $(\text{A})\text{M.ADP.P}_i^{\text{I}}$ -Zustand. Der in der Literatur mehrfach postulierte $(\text{A})\text{M.ADP.P}_i^{\text{II}}$ -Zustand (Millar und Homsher, 1990; Tesi et al., 2002) soll mit hoher Affinität an Aktin binden und kann daher nicht durch den $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand repräsentiert sein. Wir gehen daher davon aus, daß der $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand ein Analogon für den $(\text{A})\text{M.ADP.P}_i^{\text{I}}$ -Zustand darstellt.

4.2 Die Querbrückeneigenschaften in Gegenwart von BDM – auch ein Zustand geringer Aktinaffinität?

In einem anderen Ansatz wurde BDM (2,3-Butandionmonoxim) verwendet, um Querbrücken in Zuständen vor der Kraftgenerierung zu akkumulieren. Die Frage war, in welchen Zuständen im Querbrückenzyklus die Myosinköpfe durch die allosterische Hemmwirkung von BDM akkumulieren. Durch den Einsatz von BDM in Gegenwart von MgATP sowohl bei niedriger als auch bei hoher Ca^{2+} -Konzentration wird die aktive Krafterzeugung der Querbrücken, die normalerweise mit Calcium erfolgt, minimiert, indem die Phosphat-Abgabe des Myosinkopfes zurückgedrängt bzw. verlangsamt wird (Herrmann et al., 1992; McKillop et al., 1994) und damit der aktive Querbrückenzyklus unterdrückt wird. BDM bindet im Gegensatz zu dem Phosphat-Analogon AlF_4 nicht direkt in der Nukleotidbindungstasche des Myosinkopfes. Aus diesem Grund eignet sich BDM im Gegensatz zu Analogzuständen zur Untersuchung von Querbrücken, die Teil des normalen Querbrückenzyklus sind, die aber keine Kraft generieren können. Dementsprechend zeigten Regnier et al. (1995), daß der allosterische Inhibitor BDM in Gegenwart von MgATP bei voll aktiviertem kontraktilem Apparat die Querbrücken in einem nicht-kraftgenerierenden MgADP.P_i -Zustand akkumuliert. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Charakterisierung der Zustände mit BDM ebenfalls Experimente zur Aktinaffinität, zur Anheftungs- (k^+) und Ablösekinetik (k^-) sowie zur Struktur der Querbrücken durchgeführt. Betrachtet man die Ergebnisse der Experimente mit BDM, so läßt sich der mit BDM erreichte Zwischenzustand eher bei den „weak-binding states“ einordnen.

Ermittlung geeigneter Versuchsbedingungen

In der Literatur sind mehrere (Herrmann et al., 1992; McKillop et al., 1994; Regnier et al., 1995) Untersuchungen mit BDM in Gegenwart von Phosphat zur Reduktion der isometrischen Kraftentwicklung zu finden. Um aber die Querbrücken nur mit BDM allein in den weak-binding states zu akkumulieren, wurde zur Ermittlung der maximal nötigen BDM-Konzentration die Konzentrationsabhängigkeit der Kraftentwicklung bei geeigneter Temperatur und Ionenstärke an Einzelfasern bestimmt. Bei Zhao et al. (1995) reichten für eine 90%ige Reduktion der isometrischen Kraftentwicklung bei 24°C (Ionenstärke = 220 mM) 25 mM BDM aus. Im Gegensatz dazu benötigten wir bei geringerer Temperatur (5°C) und deutlich geringerer Ionenstärke (110 mM) 50 mM BDM um die aktive Kraft auf 3,5-7% der maximal möglichen isometrischen Kraft zu reduzieren. Der Grund für die höhere BDM-Konzentration in unseren Experimenten könnte in der niedrigeren Ionenstärke liegen. Bei niedrigerer Ionenstärke nimmt die Kraft und die Steifheit einer relaxierten Muskelfaser zu, da die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Aktin und Myosin, die sogenannte „weak interaction“, verstärkt wird (Brenner et al., 1982).

Da BDM als nicht-kompetitiver Inhibitor der Myosin-ATPase agiert und BDM seinen Effekt außerhalb der ADP- und P_i-Bindungsseite ausübt (Herrmann et al., 1992), erfolgt das Entfernen von BDM aus der Faser mit einer 97%igen Reversibilität in weniger als einer Minute. Dies entspricht dem normalen Zeitverlauf der Aktivierung einer zuvor relaxierten Faser.

Querbrücken in Gegenwart von BDM bei niedriger Ca²⁺-Konzentration

Die schon zuvor getroffenen Aussagen und Charakteristika für AIF_{Aktiv}-Querbrückenzustände, die an das inaktive Aktinfilament (A_{off}) binden, also bei geringer Ca²⁺-Konzentration, treffen auch für Querbrücken in Gegenwart von BDM zu. BDM unter Relaxationsbedingung beeinflusst ebenfalls nicht die Aktinaffinität bzw. Aktinbindungskinetik der Querbrücken. Die Fasersteifheit erreicht keine von der Dehnungsgeschwindigkeit unabhängigen Werte und der Intensitätsquotient ($I_{1,1}/I_{1,0}$) zeigt die für weak-binding Analoga typische starke Abhängigkeit von der Ionenstärke der Lösung. Das heißt, die mit dem Inhibitor akkumulierten Querbrückenzustände weisen vergleichbare Eigenschaften wie relaxierte Fasern oder Fasern im AIF_{Aktiv}-Zustand bei Bindung an A_{off} auf.

Untersuchungen zu Querbrückeneigenschaften in Gegenwart von BDM bei hoher Ca^{2+} -Konzentration und die Einordnung des Zustandes in den Querbrückenzyklus

Sowohl mechanische Messungen der Fasersteifheit als auch Registrierungen der äquatorialen Reflexe in Röntgendiffraktionsexperimenten wurden verwendet, um den Einfluß von Calcium auf die Aktinaffinität und die Aktinbindungskinetik der Querbrücken in Gegenwart von BDM zu untersuchen. Betrachtet man die Folgen einer Ca^{2+} -Aktivierung, durch die das Aktinfilament vom relaxierten (A_{off}) in den aktivierten Zustand (A_{on}) übergeht, für diese Querbrücken, so sind ähnliche Eigenschaften wie für die $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustände zu beobachten. Die Lage und Form der Steifheits-Dehnungsgeschwindigkeitsbeziehung entspricht in etwa der von $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zuständen. Die Aktivierung durch Calcium führt zu einer deutlichen Verlangsamung der Anheftungs- (80-800fach) und Ablösekinetik (100-1000fach) der Querbrücken. Die Bindungskonstante K_B der Myosinköpfe in Gegenwart von BDM an A_{on} bei hoher Ca^{2+} -Konzentration ist nur 1,25fach höher als an A_{off} und demzufolge ist die Aktinaffinität der Querbrücken auch bei hoher Ca^{2+} -Konzentration relativ klein.

Aufgrund der aufgeführten Ergebnisse weisen BDM-Querbrücken sowohl bei niedriger als auch bei hoher Ca^{2+} -Konzentration vergleichbare Eigenschaften wie Querbrücken im $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand auf und demzufolge auch wie Querbrücken, die durch das nicht-hydrolysierbare ATP-Analogon $\text{MgATP}\gamma\text{S}$ in den Zuständen mit niedriger Aktinaffinität akkumuliert wurden. Damit ergibt sich, daß die Zustände in Gegenwart von BDM Charakteristika aufweisen, die typisch für weak-binding states sind (Chalovich et al., 1981). Diese Zuordnung zu den niederaffinen Zuständen kann durch 2D-Röntgenstrukturanalytische Untersuchungen bestätigt werden. In Gegenwart von BDM unter Relaxationsbedingung (ohne Calcium) sind deutliche Myosinschichtlinien zu erkennen, die auch bei $\text{ADP}\cdot\text{P}_i$ -Zuständen ohne Calcium auftreten (Mattei, 2004). Diese Myosinschichtlinien resultieren aus einer vermehrten Akkumulation von Myosinköpfen in der sogenannten „closed“-Konformation (Urbanke und Wray, 2001; Xu et al., 2003). Das heißt, daß Querbrücken in Anwesenheit von BDM bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration in einem $\text{MgADP}\cdot\text{P}_i$ -Zustand akkumuliert werden, wie unter normaler Relaxation.

Es gibt aber Hinweise aus 2D-Röntgendiffraktionsexperimenten (Mattei, 2004), daß bei Aktivierung des Aktinfilamentes (hohe Ca^{2+} -Konzentration) in Anwesenheit von BDM die Intensität der Myosinschichtlinien etwas schwächer wird als bei $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ beobachtet wurde und die Intensität der 1. Aktinschichtlinie etwas zunimmt. Aufgrund dieser Ergebnisse könnten die durch BDM akkumulierten Querbrücken nicht ganz dem $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand und damit nicht ganz dem $\text{AM}\cdot\text{ADP}\cdot\text{P}_i^1$ -Zustand entsprechen. Es könnte sich somit zumindest ein

Teil der Querbrücken in Gegenwart von BDM in dem möglicherweise mit hoher Affinität gebundenen AM.ADP.P_i^{II}-Zustand (Millar und Homsher, 1990; Tesi et al., 2002) befinden und somit könnte eine Mischung aus AM.ADP.P_i^I- und AM.ADP.P_i^{II}-Zuständen vorliegen.

Da jedoch Steifheitsmessungen und Untersuchungen der äquatorialen Reflexe keinerlei Hinweise auf eine größere Population hochaffin gebundener Querbrücken bieten, ist es eher unwahrscheinlich, daß sich in Gegenwart von BDM bei hoher Ca²⁺-Konzentration eine große Anzahl Querbrücken in dem vermutlich hochaffin bindenden AM.ADP.P_i^{II}-Zustand befindet. Möglicherweise binden Querbrücken in Gegenwart von BDM zwar nach wie vor mit geringer Affinität, aber dennoch mit etwas veränderter Struktur (stereospezifisch) an das Ca²⁺-aktivierte Aktinfilament (A_{on}). Weitere Experimente sind nötig (z.B. Untersuchung der radialen Steifheit durch Dextrankompression), um die Diskrepanz zwischen Steifheitsmessungen und äquatorialen Reflexen einerseits und Myosin- und Aktinschichtlinien andererseits aufzuklären. Unsere Untersuchungen zu Querbrücken in Gegenwart von BDM könnten also auch mit Literaturergebnissen vergleichbar sein, die zeigen, daß BDM das Gleichgewicht zwischen AM.ADP.P^I und AM.ADP.P^{II} zu der nicht-kraftgenerierenden Form AM.ADP.P^I hin verschiebt bzw. den Übergang von dem einen in den anderen Zustand verlangsamt (Herrmann et al., 1992; McKillop et al., 1994; Regnier et al., 1995; 1999).

Betrachtet man hier nur die Ergebnisse der BDM-Versuche aus Steifheitsmessungen und Analyse der äquatorialen Reflexe unter Relaxation (A_{off}) und bei Aktivierung des Aktinfilamentes (A_{on}) durch Ca²⁺, so sehen diese Ergebnisse den Resultaten der AIF_{Aktiv}-Versuche sehr ähnlich, was für die Akkumulation eines vergleichbaren Zwischenzustandes (AM.ADP.P^I) im Querbrückenzyklus bei beiden Versuchsansätzen spricht.

4.4 Der MgADP.AIF₄-Zustand nach Bindung von ADP und AIF₄ an nukleotidfreie Myosinköpfe (AIF_{Rigor}-Zustand) – ein vom AIF_{Aktiv}-Zustand verschiedener Akto-Myosin-Komplex?

Der Querbrücken Zustand, der erreicht wird, wenn MgADP und AIF₄ nacheinander an nukleotidfreie Myosinköpfe gebunden haben, wurde hier ebenfalls bei niedriger (A_{off}) und hoher (A_{on}) Ca^{2+} -Konzentration untersucht mit der Frage, wie sich der auf diese Weise mit MgADP.AIF₄ erreichte Zwischenzustand im Querbrückenzyklus einordnen läßt. Bei diesem Experiment wird das kinetische Schema des ATPase-Zyklus (Abb.1.1) sozusagen von rechts (AM-Komplex) nach links bis zu einem AM.ADP.P_i-analogen Zwischenzustand durchlaufen. Der sich bildende Akto-Myosin-MgADP.AIF₄-Komplex (AM.MgADP.AIF₄) unterscheidet sich deutlich vom AIF_{Aktiv}-Zustand und weist Eigenschaften auf, die typisch für strong-binding states sind.

Definition geeigneter Versuchsbedingungen

Um den Ca^{2+} -Effekt auf die Aktinbindungskinetik und die Aktinaffinität des AIF_{Rigor}-Zustandes untersuchen zu können, waren erst Versuchsbedingungen zu definieren, die es erlaubten, allein den Ca^{2+} -Effekt ohne weitere Nebeneffekte zu messen. Das heißt, es mußte möglichst vollständige Sättigung gewährleistet sein, denn eine unvollständige Sättigung der Querbrücken mit dem Nukleotid-Analagon hat zur Folge, daß die nukleotidfreien ungesättigten Myosinköpfe mit ihrer hohen Aktinaffinität einen Anstieg der Fasersteifheit mit einer Linksverschiebung der Steifheits-Dehnungsgeschwindigkeits-Beziehung (Abb.3.9; Kraft et al., 1992) sowie eine erhöhte Intensität der 1. Aktinschichtlinie in 2D-Röntgendiffraktionsspektren verursachen. Nukleotidfreie Querbrücken können also selbst in Gegenwart des Analogons die Existenz von Querbrücken Zuständen hoher Aktinaffinität vortäuschen und damit zur falschen Interpretation der Meßergebnisse führen. Aus diesem Grund wurde, abweichend von den AIF_{Aktiv}-Experimenten (dort zeigen die fast 100%ige Hemmung der Kraftentwicklung und die 2D-Röntgendiffraktionsbilder die vollständige Sättigung an), durch eine höhere Konzentration von AIF₄ (5 mM statt 2 mM) (s. Abb.3.8) und einer längeren Inkubationszeit (30-60 Minuten; s. Abb.3.3) dafür gesorgt, daß die Myosinköpfe vollständig mit dem Analogon abgesättigt waren. Dies konnte durch Registrierungen der Röntgendiffraktionsspektren, insbesondere der Aktinschichtlinien, und der Fasersteifheit in Abhängigkeit von der Dehnungsgeschwindigkeit bei den unterschiedlichen Nukleotid-

konzentrationen (2 und 5 mM) gezeigt werden. Für alle weiteren Experimente wurde somit eine Konzentration von 5 mM MgADP und 5 mM AlF_4 gewählt.

Vergleich des $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustandes mit Querbrücken unter Relaxationsbedingung und dem $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration

Bei der vergleichenden Analyse der verschiedenen Parameter fällt auf, daß die Fasersteifheit, der Intensitätsquotient $I_{1,1}/I_{1,0}$ der ersten beiden äquatorialen Reflexe bei verschiedenen Ionenstärken und somit auch die Bindungskonstante K_B sowie der Oberflächen- zu Oberflächenabstand $D_{(\text{Aktin-Myosin})}$ der Filamente in Fasern unter Relaxationsbedingung sowie bei inaktivem Aktinfilament (A_{off}) im $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand und im $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand sehr ähnlich sind. Ohne Calcium scheint ein Myosinkopf im $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand das Tropomyosin nicht selbstständig verdrängen zu können, wie es z.B. ein Myosinkopf im Rigor tun kann. Eine hochaffine stereospezifische Interaktion mit Aktin findet nicht statt, die Aktinbindungskinetik ist der Kinetik von Querbrückenzuständen unter Relaxation mit MgATP ähnlich. Dies wird auch durch Registrierungen von Röntgenbeugungsspektren bestätigt: Im $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand ohne Calcium treten ebenfalls wie im $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand bei 12°C deutliche Myosinschichtlinien auf (Mattei, 2004). Dies spricht dafür, daß auch unter diesen Bedingungen die „closed“-Konformation des Myosinkopfes mit $\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$ bevorzugt ist, entsprechend dem $\text{MgADP}\cdot\text{P}_i$ -Zustand.

4.4.1 Der $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand bei hoher Ca^{2+} -Konzentration und seine Einordnung im Querbrückenzyklus

Aktinbindungskinetik und Aktinaffinität

Wie bereits für den $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand erläutert (vgl. 4.2.2), wurde auch für den $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand der Einfluß von Calcium (Bindung der Myosinköpfe an A_{on}) auf Aktinbindungskinetik und Aktinaffinität der Querbrücken untersucht. Die Befunde lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Deutliche Zunahme der Fasersteifheit bei Bindung der $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Querbrücken an A_{on} ; die Steifheit ist aber deutlich verschieden von der Steifheit im Rigor, unter isometrischer Kraftentwicklung und auch vom $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand bei hoher Ca^{2+} -Konzentration.
2. Die Lage der Steifheits-Dehnungsgeschwindigkeits-Beziehung ist mit Calcium deutlich nach links verschoben. Die Geschwindigkeitskonstante für Querbrückenablösung wird mindestens 10^5 mal kleiner. Durch die sehr geringe Ablösewahrscheinlichkeit der $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -

Querbrücken ist die Beziehung Steifheit gegen Dehnungsgeschwindigkeit nahezu unabhängig von der Dehnungsgeschwindigkeit. Dieses Verhalten des $\text{AIF}_{\text{Rigor}}$ -Zustandes ist deutlich verschieden von den Beziehungen in Gegenwart von BDM und im $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand, für die davon ausgegangen werden kann, daß sie weak-binding Analoga repräsentieren. Die beim $\text{AIF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand sehr kleine Geschwindigkeitskonstante für die Ablösung der Querbrücken (k^-) vom aktivierten Aktinfilament (A_{on}) ist ein Charakteristikum für Zustände mit hoher Aktinaffinität (Lymn und Taylor, 1971; Greene und Eisenberg, 1980a; Marston, 1982; Brenner et al., 1986).

3. Anhand der Intensitäten der äquatorialen Reflexe in Röntgendiffraktionsbildern läßt sich berechnen, daß bei hoher Ca^{2+} -Konzentration die Bindungskonstante K_B 74fach zunimmt, es läßt sich damit auch abschätzen, daß k^+ um 1350fach kleiner wird. Diese sehr viel größere Zunahme der Aktinaffinität bei Bindung des $\text{AIF}_{\text{Rigor}}$ -Zustandes an A_{on} , als es für den $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand oder mit BDM beobachtet wurde, ist ein weiteres wesentliches Merkmal der Zustände mit hoher Aktinaffinität.

Der deutliche Effekt von Calcium auf Aktinbindungskinetik und -affinität ist auch mit MgPP_i (Brenner, 1986b), einem Analogon, das die Querbrücken in einem hochaffin gebundenen Zustand akkumuliert, zu erkennen. Die unter diesen Bedingungen große Fraktion der Querbrücken mit verlangsamter Anheftungs- und vor allem Ablösekinetik ist für die relativ hohe Steifheit der Faser verantwortlich. Ein Sättigungsproblem mit 5 mM AIF_4 , das ebenfalls eine erhöhte Steifheit zur Folge hätte, ist, wie bereits oben erwähnt, auszuschließen.

Die Steifheit der Faser im $\text{AIF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand ist aber im Verhältnis zur maximal erreichten Steifheit von Querbrücken unter isometrischer Aktivierung etwas geringer und zeigt eine gänzlich andere Abhängigkeit von der Dehnungsgeschwindigkeit als die Steifheit unter Aktivierung. Da aktiv kraftgenerierende Querbrücken ungehindert den ATPase-Zyklus durchlaufen können, wird die Steifheit aus der Summe aller Querbrückenzustände, beispielsweise $A_{\text{on}}\text{MDP}_i^I$ -, $A_{\text{on}}\text{MDP}_i^{II}$ - und vor allem $A_{\text{on}}\text{MD}$ -Querbrücken, also den kraftgenerierenden Zuständen, verursacht, während im $\text{AIF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand nur ein $A_{\text{on}}\text{MDP}_i$ -analoger Zustand für die Steifheit verantwortlich sein kann. Unter Aktivierung bewirkt die Mischung aus verschiedenen Zuständen, die teilweise eine sehr schnelle Ablösekinetik (k^-) haben, die im Gegensatz zum $\text{AIF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand doch sehr deutliche Abhängigkeit der Steifheit von der Dehnungsgeschwindigkeit.

Ein weiterer interessanter Aspekt der Steifheitsmessung im $\text{AIF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand bei hoher Ca^{2+} -Konzentration (5 mM $\text{MgADP}\cdot\text{AIF}_4$; Abb.3.14) ist, daß die Steifheit des $\text{AIF}_{\text{Rigor}}$ -Zustandes im Gegensatz zur Steifheit im Rigor oder nach Inkubation mit MgADP im Rigor, deren Akto-

Myosin-Komplexe eindeutig den mit hoher Affinität bindenden Zuständen zuzuordnen sind, zwar ebenfalls nahezu unabhängig von der Dehnungsgeschwindigkeit ist, allerdings maximal nur etwa knapp die Hälfte des Rigorwertes erreicht. Dies könnte bedeuten, daß im $\text{AIF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand, wenn alle Myosinköpfe MgADP und AIF_4 gebunden haben, jeweils nur ein Kopf jedes doppelköpfigen Myosinmoleküls mit hoher Affinität an Aktin binden kann. Die Affinität reicht möglicherweise nicht aus, daß auch der zweite $\text{AIF}_{\text{Rigor}}$ -Kopf unter der für das Erreichen einer benachbarten Aktinbindungsstelle notwendigen Deformation ebenfalls (hochaffin) an Aktin binden kann, wodurch die Steifheit nicht Rigorsteifheit (= alle Köpfe angeheftet; Cooke und Franks, 1980; Cooke und Thomas, 1980; Lovell und Harrington, 1991) erreicht.

Strukturelle Eigenschaften

Eine Bestätigung der bereits erwähnten Unterschiede zwischen $\text{AIF}_{\text{Rigor}}$ - und $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand ergibt sich aus dem Vergleich der Ergebnisse zum Widerstand der Querbrücken gegen osmotische Kompression, wo deutliche Unterschiede zwischen den $\text{AIF}_{\text{Rigor}}$ - und $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Versuchen erkennbar sind. In den Kurvenverläufen der $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustände gibt es kaum Unterschiede bei niedriger und hoher Ca^{2+} -Konzentration. Im Gegensatz dazu sieht man beim $\text{AIF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand bei Ca^{2+} -Erhöhung einen Kurvenverlauf, der in etwa dem von hochaffin gebundenen Querbrücken unter isometrischer Aktivierung entspricht (Brenner et al., 1996). Ohne Dextranzugabe tendieren die Querbrücken dazu die Filamente dichter zusammen zu ziehen als unter Relaxierung, bei steigender Dextrankonzentration setzen die $\text{AIF}_{\text{Rigor}}$ -Zustände der Kompression einen größeren Widerstand entgegen als Myosinköpfe unter Relaxierung oder im $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand. Die Ca^{2+} -induzierten Umlagerungen der Regulatorproteine (Bindung an Troponin mit nachfolgender Umlagerung des Tropomyosins) erlauben hier dem Myosinkopf mit hoher Affinität und vermutlich stereospezifisch an Aktin zu binden. Die besondere Konformation des $\text{AIF}_{\text{Rigor}}$ -Kopfes ermöglicht diesen, mit den hochaffinen und hydrophob geprägten Bindungsstellen am Aktinfilament zu interagieren. Dies kann der $\text{AIF}_{\text{Aktiv}}$ -Zustand nicht, weil er offenbar eine andere Konformation hat. Der $\text{AIF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand könnte also dem während isometrischer Aktivierung vorwiegend besetzten kraftgenerierenden Querbrückenzustand zumindest hinsichtlich seiner Gleichgewichtslänge bzw. seiner radialen Komprimierbarkeit entsprechen.

Eine Bestätigung, daß $\text{AIF}_{\text{Rigor}}$ -Myosinköpfe stereospezifisch an A_{on} binden können, kann aus dem Intensitätsanstieg der 6. Aktinschichtlinie und einer Verschiebung des Intensitätsmaximums in Richtung Meridian sowie dem Verlust der Myosinschichtlinien bei hoher Ca^{2+} -

Konzentration abgeleitet werden (Mattei, 2004). Da die Verschiebung des Intensitätsprofils der 6. Aktinschichtlinie aber deutlich kleiner als im Rigor ist und der Kurvenverlauf der radialen Komprimierbarkeit im Dextran-Experiment sich ebenfalls anders verhält als im Rigor, läßt sich schließen, daß es sich bei den AlF_{Rigor} -Querbrücken nicht um eine rigor-äquivalente, stereospezifische Konformation handelt, sondern daß eventuell eine starke Formveränderung bzw. ein variabler Anbindungswinkel des Myosinkopfes an das Aktinfilament vorliegt. Aufgrund früherer Arbeiten von Kraft et al. (2002) mit an Aktin angebondenen Myosinkopffragmenten (Motordomänen) und isolierten Myosinköpfen kann angenommen werden, daß die AlF_{Rigor} -Querbrücken, wie die kraftgenerierenden Querbrücken durch eine relativ hohe Flexibilität und damit größere strukturelle Variabilität der distal von der Aktinbindungsstelle gelegenen Abschnitte des Myosinkopfes gekennzeichnet ist, verglichen mit Querbrücken im Rigor. Die Querbrücken nehmen demzufolge eine von der Rigorstruktur verschiedene Konfiguration ein.

4.4.2 Der AlF_{Rigor} -Zustand in der Literatur

Kim et al. (1998) beobachteten nach $MgADP$ - und AlF_4 - bzw. BeF_x -Zugabe im Rigor zu glycerinisierten Muskelfasern (Kaninchensoas) einen rigor-ähnlichen „strongly bound“ Zustand, da die Intensitätsprofile der 1. und der 6. Aktinschichtlinie in etwa den Intensitätsprofilen im Rigor entsprachen. Sie schlossen hieraus, daß bei Bindung der Phosphat-Analoga einer der beiden Myosinköpfe sich vom Aktinfilament ablöst, während der andere Kopf in einem rigor-ähnlichen Zustand am Aktinfilament angebunden bleibt. Diese Hypothese wurde von Kim et al. jedoch nicht durch Steifheitsmessungen überprüft. Im Gegensatz dazu weisen die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten, beispielsweise die unterschiedlich hohen Intensitätsquotienten $I_{1,1}/I_{1,0}$ und die Fasersteifheit bei niedriger und hoher Ca^{2+} -Konzentration, sowie 2D-Röntgenbeugungsdaten (Mattei, 2004) eindeutig auf einen nicht-rigor-ähnlichen oder $MgADP$ -ähnlichen Querbrückenzustand hin. Der Grund für diese Diskrepanz könnte in den von Kim et al. gewählten Versuchsbedingungen zu finden sein. Nach einer 30 minütigen Inkubation der Muskelfasern mit 1 mM AlF_4 (= 5 mM NaF und 1 mM $AlCl_3$) bei 20°C und niedriger Ca^{2+} -Konzentration sind keine Myosinschichtlinien zu sehen, sondern das Diffraktionsbild sieht eher rigor-ähnlich aus. Nach unseren Vorarbeiten für die gezeigten Experimente (tiefere Temperatur, längere Inkubationszeit, höhere Konzentration) kann allerdings geschlossen werden, daß bei Kim et al. sehr wahrscheinlich nicht alle Myosinköpfe das Phosphat-Analogon gebunden hatten, sondern vielmehr eine

große Zahl von nukleotidfreien Rigor-Querbrücken erhalten blieben. Eigene Kontrollexperimente, bei denen versucht worden war, ADP und AlF_4 (5 mM) bei 12°C an nukleotidfreie Myosinköpfe binden zu lassen, zeigten, daß bei höherer Temperatur keine vollständige Sättigung erreicht werden kann. Dies war an der hohen, rigor-ähnlichen Intensität auf der 1. Aktinschichtlinie zu erkennen. Erfolgt jedoch die Inkubation bei niedriger Temperatur (2°C), so bleibt die Sättigung aufgrund der festen Bindung („trapping“) auch bei hoher Temperatur erhalten.

Außer der Arbeit von Kim et al. wurden bisher keine Daten zu $\text{ADP}\cdot\text{AlF}_4$, das an nukleotidfreie Myosinköpfe gebunden hat, veröffentlicht.

4.4.3 Zusammenfassende Einordnung des $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustandes im Querbrückenzyklus

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß unsere eigenen Ergebnisse aus den Messungen der Fasersteifheit und den Analysen der äquatorialen Reflexe, neben den Resultaten aus 2D-Röntgendiffraktionsexperimenten (Mattei, 2004), für den $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand einen bisher nicht in der Literatur beschriebenen Analog-Zustand des Akto-Myosin-Komplexes ergeben, der einem ersten hochaffin gebundenen Querbrückenzustand, noch mit Phosphat-Rest in der Nukleotidbindungstasche, entsprechen könnte. Aufgrund der hier beschriebenen Eigenschaften könnte er dem verschiedentlich postulierten stereospezifisch und hochaffin gebundenen $\text{AM}\cdot\text{ADP}\cdot\text{P}_i^{\text{II}}$ -Zustand (Millar und Homsher, 1990; Tesi et al., 2002) entsprechen.

4.5 Zwei verschiedene Querbrückenzustände mit $\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$

Aufgrund der aufgezeigten Unterschiede in den mechanischen und röntgenstrukturanalytischen Experimenten mit und ohne Calcium, muß es sich bei $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ und $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ um zwei funktionell und strukturell verschiedene Myosinkopf-Zustände handeln, obwohl bei beiden Zuständen AlF_4 als P_i -Analogon in der Nukleotidbindungstasche der Myosinköpfe gebunden ist. Aufgrund dieser Tatsache müssen beide Akto-Myosin- $\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$ -Komplexe vor der P_i -Freisetzung eingeordnet werden. Offenbar können die $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Myosinköpfe aber im Gegensatz zu den $\text{AlF}_{\text{Aktiv}}$ -Myosinköpfen an die durch die Umlagerung des Troponin/Tropomyosin-Komplexes bei Ca^{2+} -Zugabe zusätzlich freigewordenen Bindungsstellen („strong-binding sites“) am Aktin (Lehman et al., 1994) mit hoher Affinität und in einer stereospezifisch geordneten Konformation binden. Somit stellt der $\text{AlF}_{\text{Rigor}}$ -Zustand möglicherweise ein Analogon für den $\text{AM}\cdot\text{ADP}\cdot\text{P}_i^{\text{II}}$ -Zustand, den ersten

stereospezifisch an Aktin bindenden Zwischenzustand (strong-binding state) des Querbrückenzyklus dar. Der AlF_{Aktiv} -Zustand ist möglicherweise ein Analogzustand für den letzten nicht-stereospezifisch an Aktin bindenden Zwischenzustand vor der Kraftgenerierung (weak-binding state), den $AM.ADP.P_i^I$ -Zustand. Bisher wurde der $AM.ADP.P_i^{II}$ -Zustand in der Literatur nicht genauer beschrieben, da dieser laut Millar und Homsher (1990) sowie Tesi et al. (2002) während aktiver Kraftentwicklung nur wenig besetzt, also kurzlebig sein soll, bevor dann die P_i -Abgabe erfolgt, was eine Charakterisierung sehr schwierig macht. Außerdem stand bisher auch kein Analogon für diesen Zustand in Muskelfasern zur Verfügung.

Es bleibt die Frage, ob der stereospezifisch und mit hoher Affinität an das dünne Filament bindende $AM.ADP.P_i^{II}$ -Komplex, der hier durch den AlF_{Rigor} -Zustand repräsentiert wird, zur Kraftgenerierung beiträgt bzw. ob bereits beim Übergang von $AM.ADP.P_i^I$ nach $AM.ADP.P_i^{II}$ und somit bereits vor P_i -Abgabe ein erster kraftgenerierender Schritt stattfindet. Dies wäre durchaus möglich, weil mit dem AlF_{Rigor} -Zustand hier erstmals ein hochaffin bindender $ADP.P_i$ -Zustand des Akto-Myosin-Komplexes nachgewiesen wurde und strukturelle Umlagerungen beim Übergang von niederaffinen, nicht-stereospezifisch gebundenen ($AM.ADP.P_i^I$) zu hochaffinen, stereospezifisch gebundenen Zuständen ($AM.ADP.P_i^{II}$) mit einer elastischen Deformation des Myosinkopfes verbunden sind, was durchaus Kraftgenerierung bewirken könnte. Das bedeutet, daß der mit dem AlF_{Rigor} -Zustand erreichte Analogzustand den ersten kraftgenerierenden Zustand des Querbrückenzyklus repräsentieren könnte. Dieser erste kraftgenerierende Zustand hätte somit P_i noch gebunden ($AM.ADP.P_i^{II}$), wenn auch in einer anderen Koordination als der schwach gebundene $AM.ADP.P_i^I$ -Zustand, der durch den hier charakterisierten AlF_{Aktiv} -Zustand repräsentiert wird. In jedem Fall stellt der AlF_{Rigor} -Zustand einen hochinteressanten, bisher noch nicht beschriebenen Querbrückenzustand mit hoher, jedoch nicht rigor-ähnlicher Aktinaffinität dar. Uns steht damit ein den kraftgenerierenden Zuständen ähnlicher Analog-Zustand zur Verfügung, der eine umfassende Charakterisierung und Überprüfung bestehender Hypothesen bezüglich der Eigenschaften von hochaffin gebundenen, jedoch nicht rigor-ähnlichen Querbrückenzuständen erlaubt.

4.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe des P_i -Analogons AlF_4 unter definierten Versuchsbedingungen zwei (A)M.ADP. P_i -Analog-Zustände im Querbrückenzyklus nachgewiesen, die sich deutlich in ihrer Aktinaffinität unterscheiden und so den weak- bzw. strong-binding states zuzuordnen sind. Bezüglich der funktionellen und strukturellen Aufklärung des kraftgenerierenden Mechanismus gilt es zu überprüfen, ob die mit dem P_i -Analogon AlF_4 akkumulierten Querbrückenzustände, der AlF_{Aktiv} -Zustand ((A)M.ADP. P_i^I) und der AlF_{Rigor} -Zustand ((A)M.ADP. P_i^{II}) tatsächlich unterschiedliche Strukturen im intakten System der Muskelfasern aufweisen. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten zeigen, daß im AlF_{Rigor} -Zustand der Myosinkopf eine andere Konfiguration hat als der Myosinkopf im AlF_{Aktiv} -Zustand und somit eine strukturell andere Bindung an Aktin eingehen kann. Der AlF_{Rigor} -Zustand bindet mit hoher Affinität und vermutlich stereospezifisch an das aktivierte Aktinfilament ohne zwangsweise Phosphat abgeben zu müssen. Dementsprechend müßte es beim Übergang zwischen den beiden Zuständen ((A)M.ADP. $P_i^I \rightarrow$ (A)M.ADP. P_i^{II}) zu Strukturumlagerungen im Myosinkopf kommen, die zu einer Bewegung des Hebelarms (leichte-Ketten-bindende Domäne des Myosinkopfes) und damit zur Kraftgenerierung führen könnten.

Hinweise auf eine solche Rotation des Hebelarms während der Kraftentwicklung ergaben sich u.a. aus Fluoreszenz-Polarisations-Messungen an Muskelfasern, in denen die native regulatorische leichte Kette des Myosins durch eine fluoreszenz-markierte leichte Kette ersetzt worden war (Irving et al., 1995). Hier wäre es interessant, an Muskelfasern, die im AlF_{Rigor} -Zustand sind, den oben genannten Austausch der regulatorischen leichten Kette des Myosins durchzuführen und die resultierende Fluoreszenz-Polarisationsänderung in Abhängigkeit von Dehnungen und Entdehnungen verschiedener Amplituden der Fasern bei aktiviertem Aktinfilament (mit Calcium) zu messen, um so die Winkeländerungen des Hebelarms zu bestimmen. Mit Hilfe der Positionsänderung des Hebelarms sollte es dann möglich sein die Struktur des AlF_{Rigor} -Zustandes weiter zu charakterisieren, ob dieser Zustand eine Struktur einnimmt, in der die leichte-Ketten-bindende Domäne des Myosinkopfes in der „tail up“- oder in der „tail-down“-Konformation vorliegt. Basierend auf dem Konzept von Huxley und Simmons (1971) wird heute angenommen, daß nach hochaffiner und stereospezifischer Bindung des Myosinkopfes an Aktin eine Umlagerung des Hebelarms relativ zur stereospezifisch gebundenen Motordomäne (von „tail up“ nach „tail down“) für die Kraftentwicklung bzw. Filamentverschiebung verantwortlich ist (Geeves und Holmes, 1999).

Mit Hilfe der Fluoreszenz-Polarisations-Mikroskopie sollte es möglich sein zu klären, ob der AlF_{Rigor} -Zustand strukturell einem ersten kraftgenerierenden Zustand, der noch nicht die „tail-down“-Konfiguration einnimmt, ähnlich ist.

Darüber hinaus ist es zur genauen strukturellen Charakterisierung der kraftgenerierenden Querbrücken wichtig, die mit den mechanischen und röntgenstrukturanalytischen Experimenten gewonnenen Interpretationen durch Modellrechnungen zu unterstützen. Dafür ist ein bereits existierendes Modell des regulierten Aktinfilamentes durch die Integration von Myosinköpfen mit unterschiedlicher Struktur, um die beiden hier beschriebenen Analog-Zustände zu simulieren, zu erweitern. Durch den Vergleich von berechneten Beugungsbildern mit den im Experiment registrierten 2D-Röntgendiffraktionsbildern sollte es möglich sein die im Experiment vorliegende Struktur des Akto-Myosin-Komplexes zumindest anzunähern.

5 Literaturverzeichnis

- Brenner B. 1985. Sarcomeric domain organization within single skinned rabbit psoas fibers and its effects on laser light diffraction patterns. *Biophys J* 48(6):967-82.
- Brenner B. 1986a. Zum molekularen Mechanismus der Muskelkontraktion. Mechanische, biochemische und röntgenstrukturanalytische Untersuchungen am isolierten kontraktilem Apparat von Skelettmuskelfasern. Habilitationsschrift an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Brenner B. 1986b. The cross-bridge cycle in muscle. Mechanical, biochemical, and structural studies on single skinned rabbit psoas fibers to characterize cross-bridge kinetics in muscle for correlation with the actomyosin-ATPase in solution. *Basic Res Cardiol* 81(Suppl 1):1-15.
- Brenner B. 1988. Effect of Ca^{2+} on cross-bridge turnover kinetics in skinned single rabbit psoas fibers: implications for regulation of muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(9):3265-9.
- Brenner B. 1991. Rapid dissociation and reassociation of actomyosin cross-bridges during force generation: a newly observed facet of cross-bridge action in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(23):10490-4.
- Brenner B, Chalovich JM. 1999. Kinetics of thin filament activation probed by fluorescence of N-((2-(Iodoacetoxy)ethyl)-N-methyl)amino-7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazole-labeled troponin I incorporated into skinned fibers of rabbit psoas muscle: implications for regulation of muscle contraction. *Biophys J* 77(5):2692-708.
- Brenner B, Chalovich JM, Greene LE, Eisenberg E, Schoenberg M. 1986. Stiffness of skinned rabbit psoas fibers in MgATP and MgPP_i solution. *Biophys J* 50(4):685-91.
- Brenner B, Chalovich JM, Yu LC. 1995. Distinct molecular processes associated with isometric force generation and rapid tension recovery after quick release. *Biophys J* 68(4 Suppl):106S-111S.
- Brenner B, Schoenberg M, Chalovich JM, Greene LE, Eisenberg E. 1982. Evidence for cross-bridge attachment in relaxed muscle at low ionic strength. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(23):7288-91.
- Brenner B, Xu S, Chalovich JM, Yu LC. 1996. Radial equilibrium lengths of actomyosin cross-bridges in muscle. *Biophys J* 71(5):2751-8.

- Brenner B, Yu LC. 1985. Equatorial x-ray diffraction from single skinned rabbit psoas fibers at various degrees of activation. Changes in intensities and lattice spacing. *Biophys J* 48(5):829-34.
- Brenner B, Yu LC. 1991. Characterization of radial force and radial stiffness in Ca^{2+} -activated skinned fibres of the rabbit psoas muscle. *J Physiol* 441:703-18.
- Brenner B, Yu LC. 1993. Structural changes in the actomyosin cross-bridges associated with force generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(11):5252-6.
- Brenner B, Yu LC, Chalovich JM. 1991. Parallel inhibition of active force and relaxed fiber stiffness in skeletal muscle by caldesmon: implications for the pathway to force generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(13):5739-43.
- Brenner B, Yu LC, Podolsky RJ. 1984. X-ray diffraction evidence for cross-bridge formation in relaxed muscle fibers at various ionic strengths. *Biophys J* 46(3):299-306.
- Chalovich JM, Chock PB, Eisenberg E. 1981. Mechanism of action of troponin . tropomyosin. Inhibition of actomyosin ATPase activity without inhibition of myosin binding to actin. *J Biol Chem* 256(2):575-8.
- Chase PB, Kushmerick MJ. 1988. Effects of pH on contraction of rabbit fast and slow skeletal muscle fibers. *Biophys J* 53(6):935-46.
- Chase PB, Kushmerick MJ. 1990. Calcium requirement for aluminiumfluoride inhibition of force in skinned muscle fibers. In *Muscle and Motility* (edited by Marechal, G. & Carraro, U.):247-51.
- Chase PB, Martyn DA, Hannon JD. 1994. Activation dependence and kinetics of force and stiffness inhibition by aluminiumfluoride, a slowly dissociating analogue of inorganic phosphate, in chemically skinned fibres from rabbit psoas muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 15(2):119-29.
- Chase PB, Martyn DA, Kushmerick MJ, Gordon AM. 1993. Effects of inorganic phosphate analogues on stiffness and unloaded shortening of skinned muscle fibres from rabbit. *J Physiol* 460:231-46.
- Combeau C, Carlier MF. 1988. Probing the mechanism of ATP hydrolysis on F-actin using vanadate and the structural analogs of phosphate BeF-3 and AlF-4. *J Biol Chem* 263(33):17429-36.
- Cooke R, Franks K. 1980. All myosin heads form bonds with actin in rigor rabbit skeletal muscle. *Biochemistry* 19(10):2265-9.
- Cooke R, Thomas D. 1980. Spin label studies of the structure and dynamics of glycerinated muscle fibers: applications. *Fed Proc*(39):1962.

- Fisher AJ, Smith CA, Thoden J, Smith R, Sutoh K, Holden HM, Rayment I. 1995a. Structural studies of myosin:nucleotide complexes: a revised model for the molecular basis of muscle contraction. *Biophys J* 68(4 Suppl):19S-26S; discussion 27S-28S.
- Fisher AJ, Smith CA, Thoden JB, Smith R, Sutoh K, Holden HM, Rayment I. 1995b. X-ray structures of the myosin motor domain of *Dictyostelium discoideum* complexed with MgADP.BeFx and MgADP.AIF₄. *Biochemistry* 34(28):8960-72.
- Ford LE, Huxley AF, Simmons RM. 1981. The relation between stiffness and filament overlap in stimulated frog muscle fibres. *J Physiol* 311:219-49.
- Frisbie SM, Chalovich JM, Brenner B, Yu LC. 1997. Modulation of cross-bridge affinity for MgGTP by Ca²⁺ in skinned fibers of rabbit psoas muscle. *Biophys J* 72(5):2255-61.
- Frisbie SM, Xu S, Chalovich JM, Yu LC. 1998. Characterizations of cross-bridges in the presence of saturating concentrations of MgAMP-PNP in rabbit permeabilized psoas muscle. *Biophys J* 74(6):3072-82.
- Geeves MA, Holmes KC. 1999. Structural mechanism of muscle contraction. *Annu Rev Biochem* 68:687-728.
- Goldman YE, Hibberd MG, Trentham DR. 1984. Relaxation of rabbit psoas muscle fibres from rigor by photochemical generation of adenosine-5'-triphosphate. *J Physiol* 354:577-604.
- Goody RS, Holmes KC, Mannherz HG, Leigh JB, Rosenbaum G. 1975. Cross-bridge conformation as revealed by x-ray diffraction studies on insect flight muscles with ATP analogues. *Biophys J* 15(7):687-705.
- Greene LE, Eisenberg E. 1980a. Dissociation of the actin.subfragment 1 complex by adenylyl-5'-yl imidodiphosphate, ADP, and PP_i. *J Biol Chem* 255(2):543-8.
- Greene LE, Eisenberg E. 1980b. Cooperative binding of myosin subfragment-1 to the actin-troponin-tropomyosin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(5):2616-20.
- Greene LE, Sellers JR, Eisenberg E, Adelstein RS. 1983. Binding of gizzard smooth muscle myosin subfragment 1 to actin in the presence and absence of adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry* 22(3):530-5.
- Gulick AM, Bauer CB, Thoden JB, Rayment I. 1997. X-ray structures of the MgADP, MgATP γ S, and MgAMPPNP complexes of the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain. *Biochemistry* 36(39):11619-28.
- Haselgrove JC, Huxley HE. 1973. X-ray evidence for radial cross-bridge movement and for the sliding filament model in actively contracting skeletal muscle. *J Mol Biol* 77(4):549-68.

- Heizmann S, Kraft T, Brenner B. 1997. AMP-PNP: An analog for weak-binding cross-bridge states. *Biophys J* 72:A380.
- Herrmann C, Wray J, Travers F, Barman T. 1992. Effect of 2,3-butanedione monoxime on myosin and myofibrillar ATPases. An example of an uncompetitive inhibitor. *Biochemistry* 31(48):12227-32.
- Highsmith S. 1977. The effects of temperature and salts on myosin subfragment-1 and F-actin association. *Arch Biochem Biophys* 180(2):404-8.
- Hill TL. 1974. Theoretical formalism for the sliding filament model of contraction of striated muscle. Part I. *Prog Biophys Mol Biol* 28:267-340.
- Holmes KC, Angert I, Kull FJ, Jahn W, Schroder RR. 2003. Electron cryo-microscopy shows how strong binding of myosin to actin releases nucleotide. *Nature* 425(6956):423-7.
- Huxley AF. 1980. *Reflections on muscle*. Princetown, New Jersey: Princetown University Press.
- Huxley AF, Simmons RM. 1971. Proposed mechanism of force generation in striated muscle. *Nature* 233(5321):533-8.
- Huxley AF, Simmons RM. 1973. Mechanical transients and the origin of muscular force. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 37:669-680.
- Huxley HE. 1957. The double array of filaments in cross-striated muscle. *J Biophys Biochem Cytol* 3(5):631-48.
- Huxley HE. 1968. Structural difference between resting and rigor muscle; evidence from intensity changes in the lowangle equatorial x-ray diagram. *J Mol Biol* 37(3):507-20.
- Huxley HE. 1973. Structural changes in the actin- and myosin-containing filaments during contraction.
- Irving M, St Claire Allen T, Sabido-David C, Craik JS, Brandmeier B, Kendrick-Jones J, Corrie JE, Trentham DR, Goldman YE. 1995. Tilting of the light-chain region of myosin during step length changes and active force generation in skeletal muscle. *Nature* 375(6533):688-91.
- Kim DS, Takezawa Y, Ogino M, Kobayashi T, Arata T, Wakabayashi K. 1998. X-ray diffraction studies on the structural changes of rigor muscles induced by binding of phosphate analogs in the presence of MgADP. *Biophys Chem* 74(1):71-82.
- Kohler J, Winkler G, Schulte I, Scholz T, McKenna W, Brenner B, Kraft T. 2002. Mutation of the myosin converter domain alters cross-bridge elasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6):3557-62.

- Kraft T. 1990. Die Calcium-Regulation der Kontraktion quergestreifter Muskulatur. Mechanische und röntgenstrukturanalytische Untersuchungen an membranfreien Einzelfasern des Kaninchenpsoas. Dissertation an der Eberhard-Karls-Universität.
- Kraft T, Brenner B. 2001. Evidence for actin-induced structural changes of weakly attached cross-bridges. *Biophys J* 80/1:266A.
- Kraft T, Chalovich JM, Yu LC, Brenner B. 1995. Parallel inhibition of active force and relaxed fiber stiffness by caldesmon fragments at physiological ionic strength and temperature conditions: additional evidence that weak cross-bridge binding to actin is an essential intermediate for force generation. *Biophys J* 68(6):2404-18.
- Kraft T, Mattei T, Radocaj A, Piep B, Nocula C, Furch M, 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, Yu LC. 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 LC, Kuhn HJ, 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.
- Lehman W, Craig R, Vibert P. 1994. $Ca^{(2+)}$ -induced tropomyosin movement in *Limulus* thin filaments revealed by three-dimensional reconstruction. *Nature* 368(6466):65-7.
- Lienhard GE, Secemski, II. 1973. P 1 ,P 5 -Di(adenosine-5')pentaphosphate, a potent multisubstrate inhibitor of adenylate kinase. *J Biol Chem* 248(3):1121-3.
- Lovell SJ, Harrington WF. 1981. Measurement of the fraction of myosin heads bound to actin in rabbit skeletal myofibrils in rigor. *J Mol Biol* 149(4):659-74.
- Lymn RW, Taylor EW. 1971. Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* 10(25):4617-24.
- Marston SB. 1982. The rates of formation and dissociation of actin-myosin complexes. Effects of solvent, temperature, nucleotide binding and head-head interactions. *Biochem J* 203(2):453-60.
- Mattei T. 2004. Strukturelle Charakterisierung eines neuen potenziell kraftgenerierenden ADP.P_i-Zustandes des Akto-Myosin-Komplexes. Dissertation an der Universität Hannover.

- McKillop DF, Fortune NS, Ranatunga KW, Geeves MA. 1994. The influence of 2,3-butanedione 2-monoxime (BDM) on the interaction between actin and myosin in solution and in skinned muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 15(3):309-18.
- Millar NC, Homsher E. 1990. The effect of phosphate and calcium on force generation in glycerinated rabbit skeletal muscle fibers. A steady-state and transient kinetic study. *J Biol Chem* 265(33):20234-40.
- Milligan RA, Flicker PF. 1987. Structural relationships of actin, myosin, and tropomyosin revealed by cryo-electron microscopy. *J Cell Biol* 105(1):29-39.
- Parry DA, Squire JM. 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.
- Raucher D, Fajer PG. 1994. Orientation and dynamics of myosin heads in aluminum fluoride induced pre-power stroke states: an EPR study. *Biochemistry* 33(39):11993-9.
- Regnier M, Chase PB, Martyn DA. 1999. Contractile properties of rabbit psoas muscle fibres inhibited by beryllium fluoride. *J Muscle Res Cell Motil* 20(4):425-32.
- Regnier M, Morris C, Homsher E. 1995. Regulation of the cross-bridge transition from a weakly to strongly bound state in skinned rabbit muscle fibers. *Am J Physiol* 269(6 Pt 1):C1532-9.
- Rudel R, Zite-Ferenczy F. 1979. Interpretation of light diffraction by cross-striated muscle as Bragg reflexion of light by the lattice of contractile proteins. *J Physiol* 290(2):317-30.
- Smith CA, Rayment I. 1996. X-ray structure of the magnesium(II).ADP.vanadate complex of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain to 1.9 Å resolution. *Biochemistry* 35(17):5404-17.
- Squire JM. 1981. The structural basis of muscular contraction. New York, London: Plenum Press.
- Stehle R. 1995. Die Aktomyosin-Interaktion bei schneller Verkürzung des Muskels. Kinetische und röntgenstrukturanalytische Untersuchungen an enthäuteten Psoas-Einzelfasern des Kaninchens. Dissertation an der Universität Hannover.
- Stehle R, Brenner B. 2000. Cross-bridge attachment during high-speed active shortening of skinned fibers of the rabbit psoas muscle: implications for cross-bridge action during maximum velocity of filament sliding. *Biophys J* 78(3):1458-73.
- Stehle R, Kraft T, Brenner B. 1993. Stiffness-speed-relations for isometric and isotonic contraction. Significance for occupancy of strong-binding states during high-speed shortening. *Biophys J* 64:250a.

- Stein LA, Schwarz RP, Jr., Chock PB, Eisenberg E. 1979. Mechanism of actomyosin adenosine triphosphatase. Evidence that adenosine 5'-triphosphate hydrolysis can occur without dissociation of the actomyosin complex. *Biochemistry* 18(18):3895-909.
- Szent-Gyorgyi AG. 1953. Meromyosins, the subunits of myosin. *Arch Biochem Biophys* 42(2):305-20.
- Tesi C, Colomo F, Piroddi N, Poggesi C. 2002. Characterization of the cross-bridge force-generating step using inorganic phosphate and BDM in myofibrils from rabbit skeletal muscles. *J Physiol* 541(Pt 1):187-99.
- Urbanke C, Wray J. 2001. A fluorescence temperature-jump study of conformational transitions in myosin subfragment 1. *Biochem J* 358(Pt 1):165-73.
- White HD, Taylor EW. 1976. Energetics and mechanism of actomyosin adenosine triphosphatase. *Biochemistry* 15(26):5818-26.
- Xu S, Brenner B, Yu LC. 1993. State-dependent radial elasticity of attached cross-bridges in single skinned fibres of rabbit psoas muscle. *J Physiol* 465:749-65.
- Xu S, Malinchik S, Gilroy D, Kraft T, Brenner B, Yu LC. 1997. X-ray diffraction studies of cross-bridges weakly bound to actin in relaxed skinned fibers of rabbit psoas muscle. *Biophys J* 73(5):2292-303.
- Xu S, Offer G, Gu J, White HD, Yu LC. 2003. Temperature and ligand dependence of conformation and helical order in myosin filaments. *Biochemistry* 42(2):390-401.
- Xu SG, Kress M, Huxley HE. 1987. X-ray diffraction studies of the structural state of crossbridges in skinned frog sartorius muscle at low ionic strength. *J Muscle Res Cell Motil* 8(1):39-54.
- Yamaguchi M, Takemori S. 2001. Activating efficiency of Ca^{2+} and cross-bridges as measured by phosphate analog release. *Biophys J* 80(1):371-8.
- Yu LC, Brenner B. 1986. High resolution equatorial x-ray diffraction from single skinned rabbit psoas fibers. *Biophys J* 49:133-135.
- Yu LC, Brenner B. 1989. Structures of actomyosin crossbridges in relaxed and rigor muscle fibers. *Biophys J* 55(3):441-53.
- Zhao L, Naber N, Cooke R. 1995. Muscle cross-bridges bound to actin are disordered in the presence of 2,3-butanedione monoxime. *Biophys J* 68(5):1980-90.
- Zite-Ferenczy F, Haberle KD, Rudel R, Wilke W. 1986. Correlation between the light diffraction pattern and the structure of a muscle fibre realized with Ewald's construction. *J Muscle Res Cell Motil* 7(3):197-214.

Publizierte Abstracts

Mählmann, E., Mattei, T., Brenner, B., Kraft, T.: Actin-binding properties of weak binding cross-bridges in the presence of ADP.AIF₄ or BDM. *Biophys. J.* 84/2: 449a (2003)

Kraft, T., Mählmann, E., Mattei, T., Brenner, B.: Effects of myosin binding to actin on structural and functional properties of the myosin head domain. *Biophys. J.* 86/1: 566a (2004)

Mattei, T., Mählmann, E., Piep, B., Kraft, T., Brenner, B.: MgADP.AIF₄-binding to cross-bridges under rigor conditions: mechanical and structural properties of the resulting cross-bridge state. *Biophys. J.* 86/1: 566a (2004)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Enke Mählmann, geboren am 19.12.1974 in Dinklage, an Eides statt, daß ich die von mir eingereichte Dissertation mit dem Titel:

„Funktionelle Charakterisierung von AM.ADP.P_i-Zuständen des Akto-Myosin-Komplexes im Kaninchenskelettmuskel“

selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Gleichzeitig versichere ich an Eides statt, daß die in der Dissertation aufgeführten Ergebnisse hiermit zum ersten Mal in einer Prüfungsarbeit erwähnt sind und nicht bereits schon zuvor für eine Diplomarbeit o.ä. verwendet wurden.

Hannover, den 28.06.2004

Unterschrift

Danksagung

Ganz besonderen Dank schulde ich meiner Betreuerin Frau PD Dr. T. Kraft für die sehr interessante Fragestellung dieser Dissertation, ihre jederzeit freundliche und unkomplizierte Unterstützung und Beratung bei der Durchführung der Experimente sowie für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Dr. B. Brenner danke ich ebenfalls sehr herzlich für die langjährige fachkundige Betreuung und seinem technischen Interesse an den Meßapparaturen sowie für die Möglichkeit, daß ich die Versuche in seiner Abteilung durchführen durfte.

Ebenso darf ich Herrn Prof. Dr. W. Müller für seine Hilfe und freundliche Unterstützung als Doktorvater meinen ganz besonderen Dank ausdrücken.

Ganz besonders danke ich Frau E. Harder für die seelische Unterstützung, ihre ständige Gesprächsbereitschaft sowie ihre Hilfe in logistischen und organisatorischen Arbeiten.

Bei allen anderen Mitarbeitern und Kollegen der Abteilung Molekular- und Zellphysiologie möchte ich mich für das angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima sowie ihren netten Gesprächen bedanken. Ein besonderes Dankeschön geht an Frau B. Piep für die geduldige Einarbeitung in die Laborarbeit sowie an Frau C. von Grumbkow für die Bereitstellung ihres Auswerteprogramms für die Röntgendiffraktionsexperimente und ihrer Hilfe im Bereich der EDV.

Mein persönlicher Dank gilt meinen Eltern für ihre anhaltend große Unterstützung bei der Verwirklichung meines Berufswunsches.

Besonders wichtig ist mir der Dank an meine Geschwister und der ganzen Familie und vor allem auch an meine Freunde für den Ausgleich zur täglichen Laborarbeit und bei so mancher Frustration.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei denen bedanken, die sich nicht erwähnt fühlen, aber erwähnt werden sollten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Mählmann
Vorname	Enke
Geburtstag	19.12.1974
Geburtsort	Dinklage
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand:	Ledig
Eltern:	Otto Mählmann Hildegard Mählmann, geb. Suing, adop. gr. Siemer
Geschwister:	3 Brüder und 1 Schwester

Schulausbildung

1981 bis 1985	Grundschule St. Johannes Bakum
1985 bis 1994	Gymnasium Liebfrauenschule Vechta
1994	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

Universitätsausbildung

WS 1994/1995 bis SS 1999	Studium der Pharmazie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
August 1997	1. Staatsexamen
Mai 1999	2. Staatsexamen

Praktisches Jahr

Juli 1999 bis Dezember 1999	Pharmaziepraktikum in der Rudolf-Apotheke, Braunschweig
Januar 2000 bis Juni 2000	Pharmaziepraktikum bei Schaper & Brümmer, Hauptbereich Forschung und Entwicklung, Salzgitter-Ringelheim

Beruf

Juli 2000	3. Staatsexamen Approbation als Apothekerin
August 2000	angestellt als Apothekerin in der Friedenstal-Apotheke, Hannover
ab September 2000	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung für Molekular- und Zellphysiologie

Hannover, den 28.06.2004