

Strukturelle Charakterisierung eines neuen  
potenziell kraftgenerierenden ADP.P<sub>i</sub> - Zustandes  
des Akto-Myosin-Komplexes

Vom Fachbereich Chemie der Universität  
Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von

Dipl.-Biol. Thomas Mattei  
geboren am 17/07/1962 in Langenhagen

2004

Referent: Prof. Dr. W. Müller

Korreferentin: PD. Dr. T. Kraft

Tag der Promotion: 31. Oktober 2003

### Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Thomas Mattei, geboren am 17/07/1962 in Langenhagen, an Eides statt, dass ich die von mir eingereichte Dissertation mit dem Titel

‚Strukturelle Charakterisierung eines neuen potenziell kraftgenerierenden ADP.P<sub>i</sub> -  
Zustandes des Akto-Myosin-Komplexes‘

selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Gleichzeitig versichere ich an Eides statt, dass die in dieser Dissertation gezeigten  
Ergebnisse hiermit zum erstenmal in einer Prüfungsarbeit erwähnt sind und nicht bereits  
zuvor für eine Diplomarbeit o.ä. verwendet wurden.

Hannover, den 25/06/03

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Zusammenfassung	2
Summary	4
<b>1 Einleitung</b>	
1.1 Allgemeine Einführung und Fragestellung	6
1.2 Strukturelle Charakterisierung der $A_{\text{off}}$ - und $A_{\text{on}}$ MD.P <sub>I</sub> -Querbrücken-Zustände	10
1.3 Auswahl geeigneter Analog-Zustände	11
1.4 Experimenteller Ansatz dieser Arbeit	13
1.5 Auswahl einer geeigneten Methode zur strukturellen Charakterisierung der Querbrücken-Zustände vor und während Kraftgenerierung	13
1.6 Interpretation der 2D-Röntgendiffraktionsbilder im Hinblick auf die Charakterisierung der Analog-Zustände für Querbrücken vor und während Kraftgenerierung	15
<b>2 Material und Methoden</b>	
2.1 Versuchstiere	19
2.2 Faserpräparation	19
2.2.1 Permeabilisierungslösung	20
2.3 Vorbereitung der Einzelfasern für die Messungen	20
2.4 Röntgendiffraktion	21
2.4.1 Allgemeine Meßbedingungen	21
2.4.2 Kontrollexperimente	21
2.4.3 Meß-Lösungen	24
2.5 Elektronische Bildverarbeitung und Datenverarbeitung	
2.5.1 Bildbearbeitung	26
2.5.2 Intensitätsanalyse der Schichtlinien	27
2.6 Zusammenfassung des Ablaufs der elektronischen Datenverarbeitung mit den Schritten für die Bearbeitung von Diffraktionsbildern und Bildern des Gerätehintergrundes	31

### 3 Ergebnisse

3.1 Getrennte Betrachtung der Röntgendiffraktionsbilder	33
3.1.1 Standard-Bedingungen zum Vergleich	
a. Relaxations-Bedingungen	34
b. Rigor-Bedingungen.	35
3.1.2 Die verschiedenen Analog-Zustände bei aktiviertem und nicht aktiviertem Aktinfilament	35
I. AM.MgADP.AIF <sub>4</sub> -Komplexe (Akto-Myosin-Komplexe mit gebundenem Phosphat-Analogen) akkumuliert unter Aktivierungs-Bedingungen (AIF <sub>-A</sub> )	
A. Übersicht der 2D-Röntgendiffraktionsbilder der AIF <sub>-A</sub> Versuche	
a. AM.MgADP.AIF <sub>4</sub> -Komplexe bei niedriger Calcium-Konzentration (Relaxations-Bedingungen) bei 2°C	35
b. AM.MgADP.AIF <sub>4</sub> -Komplexe bei hoher Calcium-Konzentration (unter Aktivierung) bei 2°C	36
c. AM.MgADP.AIF <sub>4</sub> -Komplexe (nach Aktivierung) bei 12°C mit hoher und niedriger Calcium-Konzentration	37
B. Analyse einzelner Schichtlinien aus den Diffraktionsbildern von AM.MgADP.AIF <sub>4</sub> -Komplexen der AIF <sub>-A</sub> Versuche (integrierte Intensitäten)	
a. Myosin- und Aktin-Schichtlinien für AM.MgADP.AIF <sub>4</sub> -Komplexe bei hoher und niedriger Calcium-Konzentration; (AM.MgADP.AIF <sub>4</sub> -Komplexe unter aktivem ‚Turnover‘ generiert; AIF <sub>-A</sub> )	38
b. Erste Aktin- und Myosin-Schichtlinie für AM.MgADP.AIF <sub>4</sub> -Komplexe bei hoher und niedriger Calcium-Konzentration (AIF <sub>-A</sub> )	39
c. Die 1/5.9 nm <sup>-1</sup> AktinSchichtlinie nach Inkorporation von MgADP.AIF <sub>4</sub> in den Myosinkopf. Effekte hoher bzw. niedriger Calcium-Konzentration (AIF <sub>-A</sub> )	40
II. Querbrücken-Zustände mit MgADP.AIF <sub>4</sub> inkorporiert unter Rigor-Bedingungen (AIF <sub>-R</sub> )	42
A. Übersicht der 2D-Röntgendiffraktionsbilder des AM.MgADP.AIF <sub>4</sub> -Komplexes aus Rigor (AIF <sub>-R</sub> )	
a. Der AIF <sub>-R</sub> -Zustand bei niedriger Calcium-Konzentration bei 2°C, im Vergleich zum AM.MgADP-Komplex (Rigor und MgADP)	43
b. Der AIF <sub>-R</sub> -Zustand bei hoher Calcium-Konzentration bei 2°C	43
c. Der AIF <sub>-R</sub> -Zustand bei hoher und niedriger Calcium-Konzentration bei 12°C	44

B.	Analyse einzelner Schichtlinien der AIF <sub>R</sub> -Zustände (integrierte Intensitäten)	
a.	Myosin- und Aktin-Schichtlinien der AIF <sub>R</sub> -Zustände bei hoher und niedriger Calcium-Konzentration bei 12°C	45
b.	Erste Aktin- und Myosin-Schichtlinie der AIF <sub>R</sub> -Zustände bei hoher und niedriger Calcium-Konzentration	45
c.	Die 1/5.9 nm <sup>-1</sup> Aktin-Schichtlinie der AIF <sub>R</sub> -Zustände bei hoher und niedriger Calcium-Konzentration	46
III.	Querbrücken-Zustände in Gegenwart von BDM	46
A.	2D-Röntgendiffraktionsbilder des Akto-Myosin-Komplexes in Gegenwart von BDM	
a.	Der Querbrücken-Zustand in Gegenwart von BDM bei niedriger Calcium-Konzentration (Relaxations-Bedingungen) bei 2°C	47
b.	Der Querbrücken-Zustand in Gegenwart von BDM bei hoher Calcium-Konzentration bei 2°C	47
c.	Der Querbrücken-Zustand in Gegenwart von BDM bei hoher und niedriger Calcium-Konzentration bei 12°C	48
B.	Analyse einzelner Schichtlinien des Akto-Myosin-Komplexes in Gegenwart von BDM (integrierte Intensitäten)	
a.	Myosin- und Aktin-Schichtlinien in Gegenwart von BDM bei hoher und niedriger Calcium-Konzentration bei 12°C	48
b.	Erste Aktin- und Myosin-Schichtlinie in Gegenwart von BDM bei hoher und niedriger Calcium-Konzentration	49
c.	Die 1/5.9 nm <sup>-1</sup> Aktin-Schichtlinie in Gegenwart von BDM bei hoher und niedriger Calcium-Konzentration	49
3.2	Vergleichende Zusammenfassung der Ergebnisse der drei Querbrücken-Zustände	50
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>68</b>
4.1	Bemerkungen zu Methode und Auswertung	70
4.1.1	Datenaufnahme	70
4.1.2	Datenanalyse	71
4.2	Vergleich der Ergebnisse aus den Versuchen mit MgADP.AIF <sub>4</sub> .	72
4.2.1	Die Konformation des Akto-Myosin-Komplexes mit MgADP.AIF <sub>4</sub> bei niedriger Calcium-Konzentration.	73

4.2.2	Der Effekt der Aktivierung der Aktinfilamente auf die AM.MgADP.AIF <sub>4</sub> -Komplexe	75
4.2.3	Zwei grundsätzlich verschiedene Querbrücken-Zustände mit MgADP.AIF <sub>4</sub> ?	78
4.3	Vergleich des durch BDM erreichten Zwischen-Zustandes mit den MgADP.AIF <sub>4</sub> -Zuständen	79
4.4	Bezug zur aktuellen Literatur.	81
4.5	Vergleich der Daten aus den MgADP.AIF <sub>4</sub> Versuchen mit Daten aus Experimenten von isometrisch aktivierten Muskelfasern	85
4.6	Fazit und weitere Überlegungen	87
5	Literaturverzeichnis	90



## Abkürzungsverzeichnis

A	Aktin
AM	Akto-Myosin-Komplex
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-hydrochlorid
$\text{AlF}_4^-$	Aluminiumfluorid (Fluoroaluminat)
$\text{Al}(\text{NO}_3)_3$	Aluminiumnitrat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
$\text{Ap}_5\text{A}$	$\text{P}^1, \text{P}^5$ -Di(Adenosin-5')Pentaphosphat
BDM	2,3-Butandion-monoxim
$\text{Ca}^{++}$	Calcium
CrP	Kreatinphosphat
DTT	Dithiothreitol
E64	trans-Epoxy succinyl-l-leucylamido(4-guanidino)-butan
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
M	Myosin
NaF	Natriumfluorid
$\text{P}_i$	anorganisches Phosphat
$\text{V}_i$	Orthovanadat

## Zusammenfassung

**Schlagworte:** Motorproteine, Akto-Myosin, 2D-Röntgendiffraktion und Strukturanalyse

Ziel dieser Arbeit war es, Zwischen-Zustände des Akto-Myosin-Komplexes im Querbrückenzyklus der Skelettmuskulatur unmittelbar vor und während Kraftgenerierung strukturell zu charakterisieren. Die Aufklärung der für die Kraftentwicklung im Muskel notwendigen Strukturumlagerungen, deren erster Schritt vermutlich mit einem Übergang von Querbrücken-Zuständen mit nicht-stereospezifischer, niederaffiner Aktinbindung zu stereospezifischer, hochaffiner Aktinbindung assoziiert ist, trägt auch zum allgemeinen Verständnis der Erzeugung motiler Kräfte verschiedenster Motorproteine bei.

Um einzelne dieser Zwischen-Zustände nicht nur bei niedriger sondern vor allem auch bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration, also voller Aktivierung der Aktinfilamente, akkumulieren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit ein fest an den Myosinkopf bindendes Phosphat-Analogon ( $\text{AlF}_4$ ) bzw. BDM (2,3-Butandion-Monoxim), ein allosterischer Hemmstoff der aktiven Kraftentwicklung verwendet. Die so erzeugten Akto-Myosin-Komplexe, also die an Aktin gebundenen Querbrücken, wurden im intakten kontraktilem Apparat chemisch permeabilisierter Muskelfasern mit 2D-Röntgendiffraktion untersucht. Grundlage dieses experimentellen Ansatzes ist, dass das Freisetzen des anorganischen Phosphatrests aus der Nukleotidbindungstasche im Myosinkopf und die damit verbundene Strukturänderung der Motordomäne über ein oder zwei Schritte zur Kraftgenerierung führt. Mit Aluminiumfluorid im  $\text{MgADP} \cdot \text{AlF}_4$ -Komplex als  $\text{MgADP} \cdot \text{P}_i$ -Analogon sollte es zu einer Akkumulation von Querbrücken-Zuständen kommen, die genau vor dem kraftgenerierenden Schritt liegen, und zwar dadurch, dass das  $\text{AlF}_4$  nicht oder nur extrem langsam aus dem  $\text{MgADP} \cdot \text{AlF}_4$ -Komplex im Myosinkopf abdissoziieren kann. BDM verhindert in Gegenwart von  $\text{MgATP}$  trotz maximaler Aktivierung der Aktinfilamente (hohe  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration) die Kraftentwicklung und akkumuliert Querbrücken in  $\text{MgADP} \cdot \text{P}_i$ -Zuständen.

Es wurden drei experimentelle Ansätze gewählt : (1) Die Muskelfasern binden während aktivem ATPase-Zyklus, also bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration das Phosphat-Analogon  $\text{AlF}_4$  anstelle des anorganischen Phosphates, was zu einer fast vollständigen Hemmung der Kraftentwicklung führt. (2)  $\text{MgADP}$  und  $\text{AlF}_4$  binden in Muskelfasern unter Rigor-Bedingungen, also ohne ATP, direkt an die nukleotidfreien Myosinköpfe. (3) Die Muskelfasern werden bei maximaler Aktivierung in Gegenwart von ATP mit BDM inkubiert und untersucht.

Die Ergebnisse der Röntgendiffraktionsexperimente zeigen:

- wenn  $\text{AlF}_4$  während aktivem 'Turnover' an die Myosinköpfe bindet, resultiert ein nicht-stereospezifisch an Aktin bindender Querbrücken-Zustand, der dem normalen relaxierten Zustand sehr ähnlich ist und dem  $\text{AM.ADP.P}_i^I$ -Zustand zu entsprechen scheint.
- Binden  $\text{MgADP}$  und  $\text{AlF}_4$  an nukleotidfreie Querbrücken im Rigor, so entsteht ein Zustand, der bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration (aktiviertes Aktinfilament) stereospezifisch an Aktin binden kann und vermutlich dem  $\text{AM.ADP.P}_i^{II}$ -Zustand entspricht.
- In Gegenwart von BDM akkumulieren die Querbrücken in Zuständen, die Merkmale beider mit  $\text{AlF}_4$  erreichten Querbrücken-Zustände aufweisen, d.h. es liegt höchstwahrscheinlich eine Mischung aus  $\text{AM.ADP.P}_i^I$  und  $\text{AM.ADP.P}_i^{II}$  vor.

Von besonderem Interesse ist hier der mit  $\text{MgADP}$  und  $\text{AlF}_4$  aus Rigor-Querbrücken entstandene  $\text{AM.ADP.P}_i^{II}$ -Analog-Zustand, der den ersten stereospezifisch an Aktin gebundenen Querbrücken-Zustand im Querbrückenzyklus darstellt, und der bisher in der Literatur nicht strukturell beschrieben worden ist. Entsprechend dem Konzept, dass der erste kraftgenerierende Schritt auf eine Strukturumlagerung beim Übergang von nicht-stereospezifischer zu stereospezifischer Bindung des Akto-Myosin-Komplexes zurückzuführen ist, repräsentiert der strukturelle Unterschied zwischen dem unter Aktivierung erreichten  $\text{AM.ADP.AIF}_4$ -Zustand (nicht-stereospezifisch gebunden,  $\text{AM.ADP.P}_i^I$ ) und dem aus Rigor erreichten  $\text{AM.ADP.AIF}_4$ -Zustand (stereospezifisch gebunden,  $\text{AM.ADP.P}_i^{II}$ ) den ersten kraftgenerierenden Schritt im Querbrückenzyklus.

## Summary

**Keywords:** Motor proteins, actomyosin, x-ray diffraction and structural analysis

The goal of this project was the structural characterization of those actomyosin intermediates of the cross-bridge cycle in skeletal muscle that precede or are closely associated with force generation. The first reaction step that results in force generation is thought to be the transition from an initial non-stereospecific weak binding of cross-bridges to actin to stereospecific strong binding. Understanding of the structural changes that result in force generation in muscle, e.g. the structural changes associated with the transition from non-stereospecific to stereospecific binding of cross-bridges to actin, will be essential for developing an understanding of the generation of motile forces in other motor proteins as well.

To be able to accumulate cross-bridges in specific intermediates not only at low but especially high  $\text{Ca}^{++}$ -concentrations, i.e., when actin filaments are fully activated, we used (i) a phosphate analog ( $\text{AlF}_4$ ) that binds tightly into the nucleotide binding site of myosin or (ii) BDM (2,3-butanedione-monoxime) an allosteric inhibitor of active force generation. The actomyosin complexes accumulated by these procedures were studied within the structurally intact contractile system of chemically skinned muscle fibers by 2D-X-ray diffraction. This experimental approach is based on the concept that release of inorganic phosphate from the nucleotide binding site on the myosin head and the associated structural changes in the motor domain result in force generation via a one- or two-step process. With aluminumfluoride replacing inorganic phosphate in the  $\text{MgADP} \cdot \text{AlF}_4$ -complex, thus forming an  $\text{MgADP} \cdot \text{P}_i$ -analog state, it should be possible to accumulate cross-bridges in states that immediately precede the force generating step. This is because  $\text{AlF}_4$ , different from inorganic phosphate, dissociates only very slowly from the  $\text{MgADP} \cdot \text{AlF}_4$ -complex in the myosin head domain. BDM inhibits in the presence of ATP and even at full actin activation (high  $\text{Ca}^{++}$ -concentration) force generation and results in accumulation of cross-bridges in  $\text{MgADP} \cdot \text{P}_i$ -intermediates.

We applied three experimental protocols: (1) muscle fibers were allowed to replace inorganic phosphate by  $\text{AlF}_4$  by incubation with  $\text{AlF}_4$  during active turnover (high  $\text{Ca}^{++}$ -concentration in the presence of  $\text{MgATP}$ ), a procedure by which active force is almost completely inhibited. (2)  $\text{MgADP}$  and  $\text{AlF}_4$  were allowed to bind directly to the nucleotide free myosin head. (3) Muscle fibers were incubated with BDM while fully activated (high  $\text{Ca}^{++}$  in the presence of  $\text{MgATP}$ ).

X-ray diffraction experiments showed the following results:

- binding of  $\text{AlF}_4$  to the myosin heads during active turnover (protocol 1) resulted in a cross-bridge state with non-stereospecific binding to actin, very much like the cross-bridge in relaxed muscle that presumably represents the  $\text{AM.ADP.P}_i^{\text{I}}$ -state.
- Binding of  $\text{MgADP}$  and  $\text{AlF}_4$  to the nucleotide free cross-bridge in rigor results in an intermediate that binds stereospecifically to actin filaments at high  $\text{Ca}^{++}$ -concentrations (activated actin) and presumably represents the  $\text{AM.ADP.P}_i^{\text{II}}$ -state.
- In the presence of  $\text{BDM}$  cross-bridges accumulate in states that show features of both intermediates found with  $\text{AlF}_4$ , suggesting the formation of a mixture of the  $\text{AM.ADP.P}_i^{\text{I}}$ - and  $\text{AM.ADP.P}_i^{\text{II}}$ -state.

Most interestingly, the  $\text{AM.ADP.P}_i^{\text{II}}$ -analog state, formed by incubation of muscle fibers in rigor with  $\text{MgADP}$  and  $\text{AlF}_4$  and which represents the first cross-bridge state with stereospecific binding to actin, has so far not been characterized structurally. According to the concept that the first step contributing to force generation is associated with the transition from a non-stereospecific to a stereospecific binding of the myosin head to actin, the structural differences described here for the  $\text{AM.ADP.AIF}_4$ -state generated during active turnover (non-stereospecific binding,  $\text{AM.ADP.P}_i^{\text{I}}$ -analog) and the  $\text{AM.ADP.AIF}_4$ -state formed by addition of  $\text{MgADP}$  and  $\text{AlF}_4$  to rigor cross-bridges (stereospecific binding,  $\text{AM.ADP.P}_i^{\text{II}}$ -analog) represent the first description of the structural change associated with the initial force-generating step in the cross-bridge cycle of muscle.

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeine Einführung und Fragestellung

„Motorproteine“ aus Proteinfamilien wie den Myosinen, Kinesinen oder Dyneinen stehen im Mittelpunkt des Interesses, die physiologischen Vorgänge, die zur Kraftentwicklung, Bewegung und intrazellulärem Transport von Lasten führen, genau zu verstehen. Myosin und Aktin sind die Proteine, die im Muskel für die Kraftentwicklung verantwortlich sind. Myosin als ATPase interagiert dabei mit Aktin, einem  $\text{Ca}^{++}$ -regulierten Strukturprotein. Strukturänderungen in den Kopfdomänen bzw. Umlagerungen im Akto-Myosin-Komplex im Verlauf der ATP-Hydrolyse sollen für Kraftentwicklung und Bewegung verantwortlich sein. Welche Strukturänderungen einer Kraftentwicklung/Bewegung zugrunde liegen und in welchem Nukleotid-Zustand sich dabei der Myosinkopf befindet, ist Gegenstand aktueller Forschung. Allgemein anerkannt ist, dass vor Kraftgenerierung zunächst ATP hydrolysiert wird, während der Myosinkopf sich in einem Zustand geringer Aktinaffinität befindet. Erst mit der nachfolgenden Freisetzung von Phosphat ( $\text{P}_i$ ) aus der Nukleotidbindungstasche kann der Myosinkopf mit hoher Affinität an das aktivierte Aktinfilament binden. Unter isometrischen Bedingungen, wenn sich die Länge des Muskels nicht verändert, erzeugt die dabei entstehende elastische Deformation des Myosinkopfes eine Kraft (vergleichbar einer gespannten Feder) und leistet dabei Haltearbeit. Unter isotonischen Verhältnissen wird diese Spannung in ein Gleiten der dicken gegenüber den dünnen Filamenten und damit in Muskelverkürzung, also Bewegung umgesetzt (Huxley 1957).

Eine Hypothese ist, dass die Kraftgenerierung aus zumindest zwei Schritten besteht, und dass ein Teil der Kraftgenerierung (der eigentliche kraftgenerierende Schritt) schon beim Übergang der Querbrücken von einem ‚weakly-bound‘ state (mit geringer Affinität am Aktin bindenden Myosinkopf, nicht kraftgenerierend) in einen ‚strongly-bound‘ state (mit hoher Affinität bindenden Zustand, kraftgenerierend) erfolgt (Brenner et al., 1995; Brenner et al., 1991). Grundlage einer anderen Hypothese ist, dass Kraftentwicklung ausschließlich bei Umlagerungen innerhalb der hochaffin gebundenen Querbrücken-Zustände stattfindet (Huxley 1980; Huxley and Simmons 1971; Huxley and Simmons 1973). Im ersten Konzept sind diese Umlagerungen weitere kraftgenerierende Schritte, die vor allem unter isotonischer Verkürzung von Bedeutung sind (Brenner et al., 1995).

Eine zentrale Frage der ersten Hypothese ist, inwieweit beim Übergang von nicht-kraftgenerierenden in kraftgenerierende Querbrücken-Zustände die Bindung des

Myosinkopfes an das  $\text{Ca}^{++}$ -aktivierte Aktinfilament ( $A_{\text{on}}$ ) zu Strukturänderungen im Myosinkopf bzw. Akto-Myosin-Komplex führt, die z.B. den ersten Teil der Kraftentwicklung darstellen, und welchem Reaktionsschritt im Querbrückenzyklus diese Strukturumlagerung zuzuordnen ist. Vorstellbar ist eine durch Bindung an das aktivierte Aktinfilament induzierte Umlagerung im Bereich der Nukleotidbindungs tasche des Myosinkopfes (Kraft & Brenner, 2001 Abstract), die eine Delokalisierung des vom ATP schon abgespaltenen  $\gamma$ -Phosphats ( $\text{ADP}\cdot\text{P}_i$ ) erzwingt, und so dem Myosinkopf ermöglicht, sich von einer ‚weak-binding‘- in eine ‚strong-binding‘ Konformation umzulagern.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob sich Zwischen-Zustände des Querbrückenzyklus nachweisen lassen, die die entsprechenden Eigenschaften aufweisen, die also der Kraftgenerierung möglicherweise direkt vorausgehende oder daran beteiligte Umlagerungen zeigen. Welche Zwischen-Zustände dafür in Frage kommen soll anhand des kinetischen Schemas in Abb.1 (Brenner and Chalovich 1999) verdeutlicht werden. Komplexe zwischen Myosin (ATPase) und Aktin im Querbrücken-Zyklus werden in diesem Schema über ihre biochemischen Eigenschaften beschrieben (z.B. Zustand des gebundenen Nukleotids). Grundlage des Schemas sind

- (1) die verschiedenen Zustände der Querbrücken, die durch den Hydrolyse-Zustand des gebundenen Nukleotids im Myosinkopf beschrieben werden, wobei die sog. ‚Querbrücken‘ sowohl an Aktin angeheftet oder davon abgelöst sein können und
- (2) der Aktivierungsgrad des Aktinfilamentes in Abhängigkeit von der  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration des umgebenden Milieus, inaktives Aktin,  $A_{\text{off}}$ , bei niedriger  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration und aktiviertes Aktin,  $A_{\text{on}}$ , bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration.

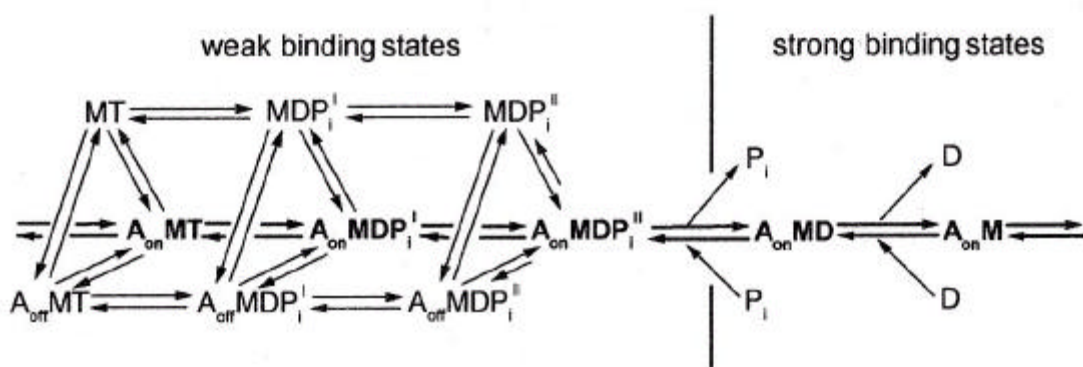


Abb.1: Modell des biochemischen Zyklus des Akto-Myosin-Komplexes mit den hauptsächlich besetzten Querbrücken-Zuständen während ATP-Hydrolyse (modifiziert nach Brenner und Chalovich 1999).

M=Myosin, A=Aktin, T=MgATP, D=MgADP,  $\text{P}_i$ =anorganisches Phosphat,  $A_{\text{on}}$ = $\text{Ca}^{++}$ -aktivierte Aktinfilament,  $A_{\text{off}}$ =inaktivierte Aktinfilament (ohne  $\text{Ca}^{++}$ ).

In dem Schema in Abb.1 werden die Querbrücken-Zustände aufgrund charakteristischer Eigenschaften der Myosinköpfe in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe, die sogenannten ‚weak-binding‘ states, sind charakterisiert durch

- eine geringe Aktinaffinität der Myosinköpfe, sowohl bei inaktivem als auch bei aktiviertem Aktinfilament
- hohe Geschwindigkeitskonstanten für Querbrückenanheftung und -ablösung an bzw. von Aktin (Chalovich et al., 1981; Stein et al., 1979; White and Taylor 1976), wobei in Abb.1 die Pfeillänge hier den Geschwindigkeitskonstanten entspricht und
- die Unfähigkeit der am Aktin gebundenen Myosinköpfe (Akto-Myosin-Komplex) auch ohne  $\text{Ca}^{++}$  das Aktinfilament zu aktivieren, d.h. die Regulatorproteine in einen Zustand zu versetzen, der den Querbrücken erlaubt den gesamten aktiven Querbrückenzyklus auch ohne  $\text{Ca}^{++}$  zu durchlaufen.

Die zweite Gruppe der Querbrücken-Zustände, die sogenannten ‚strong-binding‘ states, haben demgegenüber

- eine hohe Aktinaffinität (Greene and Eisenberg 1980) zum aktivierten Aktinfilament, die vermutlich durch eine von der ‚weak‘-Konformation verschiedene Struktur der Myosinköpfe vorgegeben wird,
- eine wesentlich kleinere Geschwindigkeitskonstante für Querbrückenablösung vom aktivierten Aktinfilament als für die -anheftung (Greene and Eisenberg 1980; Lymn and Taylor 1971; Marston 1982), wobei auch hier in Abb.1 die Pfeillänge den Geschwindigkeitskonstanten entspricht und
- die Fähigkeit der Myosinköpfe nach Bindung an Aktin die Regulatorproteine so zu beeinflussen, dass das Aktinfilament auch ohne  $\text{Ca}^{++}$  aktiviert wird, und die Querbrücken den gesamten Querbrückenzyklus durchlaufen können.

Inwieweit diese biochemischen und strukturellen Unterschiede wesentlich für die Kraftgenerierung sind ist unklar.

Bei genauer Betrachtung der einzelnen Schritte im Querbrückenzyklus muss beachtet werden, dass es mindestens zwei Zustände des Aktinfilamentes gibt, zwischen denen es sich reversibel umlagern kann,  $A_{\text{off}} \rightleftharpoons A_{\text{on}}$  (Abb.1).  $\text{Ca}^{++}$ -Bindung an Troponin C und nachfolgende Umlagerung von Tropomyosin führt zur Freigabe von zusätzlichen hochaffinen Myosin-Bindungsstellen am Aktinfilament, was einer Aktivierung des Aktins entspricht, während ohne  $\text{Ca}^{++}$  nur niederaffine Bindungsstellen für die Myosinköpfe zugänglich sind. Eine  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentrationserhöhung führt demnach zu einem grösseren



Anteil an aktiviertem Aktin ( $A_{on}$ ) und damit zu einer Verschiebung des Gleichgewichts von den  $A_{off}MT$ - und  $A_{off}MDP_i$ -Komplexen zu den entsprechenden  $A_{on}$ -Komplexen ( $A_{on}MT$  und  $A_{on}MDP_i$ ). Bei hoher  $Ca^{++}$ -Konzentration erlaubt die Konformation des Myosinkopfes im ‚strong-binding‘-state, also z.B. im Fall des nukleotidfreien Rigor-Zustandes ( $A_{on}M$ ) oder im kraftgenerierenden AMD-Zustand (nach  $P_i$ -Freisetzung) eine hochaffine Bindung an Aktin (‚strong-binding‘ states). Die Affinität der Myosinköpfe zu den zusätzlichen, Tropomyosin kontrollierten Bindungsstellen ist dabei so hoch, dass sie das Tropomyosin dahingehend beeinflussen können, dass die Tropomyosin kontrollierten Bindungsstellen vermehrt freigegeben werden. Im Fall der  $AMT$ - und  $AMDP_i$ -Zustände wird sowohl bei niedriger als auch bei hoher  $Ca^{++}$ -Konzentration lediglich eine Bindung mit geringer Affinität zwischen Myosin und Aktin erreicht (‚weak-binding‘ state). Diese niedrige Affinität sowohl für das aktivierte als auch inaktive Aktinfilament kommt darin zum Ausdruck, dass immer einige Myosinköpfe nicht am Aktinfilament gebunden sind, und ist im kinetischen Schema durch die  $MT$ - und  $MDP_i$ -Zustände dargestellt. Zur Freisetzung des  $P_i$  kann der Akto-Myosin-Komplex nur über den  $A_{on}MDP_i$ -Zustand gelangen. Die ‚strong-binding‘-Querbrücken-Zustände bei denen Myosinköpfe nicht an Aktin gebunden vorliegen ( $MD$  und  $M$ ) oder an das nicht aktivierte Aktinfilament binden ( $A_{off}MD$  und  $A_{off}M$ ) sind im Schema nicht dargestellt, weil sie praktisch nicht besetzt sind. Die Aufteilung der  $AMDP_i$ -Zustände in zwei Gruppen, die  $AMDP_i^I$ - und  $AMDP_i^{II}$ -Zustände berücksichtigt die Hypothese der zweistufigen  $P_i$ -Freisetzung (Millar and Homsher 1990), wobei der  $AMDP_i^{II}$ -Zustand im steady state nur minimal besetzt ist (Millar and Homsher 1990) und bisher weder strukturell noch in seiner Aktinaffinität bzw. seiner Zuordnung zu ‚weak‘- oder ‚strong-binding‘ states charakterisiert werden konnte. Im Schema der Abb.1 wurde angenommen, dass der  $AMDP_i^{II}$ -Zustand eher zu den ‚strong-binding‘ states gehört und entsprechend mit höherer Affinität an die aktivierte Form des Aktins bindet (vgl. Länge der Pfeile im Schema). Damit wäre der  $AMDP_i^{II}$ -Zustand der erste hochaffin gebundene Zwischen-Zustand, d.h. die Umlagerung von  $AMDP_i^I$  zu  $AMDP_i^{II}$  wäre der erste kraftgenerierende Schritt entsprechend dem oben genannten Konzept.

Um also die hier gestellte Frage nach Strukturänderungen, die am kraftgenerierenden Schritt des Akto-Myosin-Komplexes beteiligt sein könnten, untersuchen zu können, müssen nicht nur die  $A_{off}$ - sondern insbesondere auch die  $A_{on}MDP_i$ -Querbrücken-Zustände näher betrachtet werden.

## 1.2 Strukturelle Charakterisierung der $A_{off}$ - und $A_{on}MD.P_i$ -Querbrücken-Zustände

Für eine Zuordnung der Querbrücken-Zustände zu bestimmten Schritten/Zuständen im biochemischen Schema (Abb.1) bzw. im Querbrückenzyklus und ihre Charakterisierung als möglicherweise kraftgenerierend oder nicht, liefern folgende Fragen die entscheidenden Kriterien:

- Nehmen die Zustände ohne  $Ca^{++}$  eine Konformation ähnlich dem (A)MD.P<sub>i</sub>-Zustand bei hoher Temperatur ein (,closed' bzw. ,tail-up', wie für die Zustände vor Kraftgenerierung angenommen wird) oder liegt stattdessen eine dem ATP-Zustand vergleichbare Konformation vor ((A)MT) (Geeves and Holmes 1999; Urbanke and Wray 2001; Xu et al., 2003)? Die Konformation des (A)MD.P<sub>i</sub>-Zustandes des Myosinkopfes wird aufgrund von Erkenntnissen aus der Protein-Kristallographie auch als ,closed form' des Myosinkopfes bezeichnet (Geeves and Holmes 1999). Sie ist u.a. - durch eine teilweise geschlossene Aktinbindungsregion (lower/ upper 50 kDa domain cleft) des Myosinkopfes, - eine geschlossene Bindungstasche für das  $\gamma$ -Phosphat sowie - durch eine Position der leichte Ketten-bindenden Domäne des Myosinkopfes, wie sie dem kraftgenerierenden Schritt vorausgehen müsste (,tail up'), charakterisiert. Demgegenüber wird der (A)MT-Zustand als ,open form' des Myosinkopfes beschrieben mit ,tail down'.
- Gehören die Querbrücken-Zustände zur Gruppe der Zustände geringer oder hoher Aktinaffinität (,weak'/'strong'-binding states) ?
- Binden sie entsprechend nicht-stereospezifisch bzw. stereospezifisch an Aktin?
- Welchen Effekt hat die Aktivierung des dünnen Filaments (hohe  $Ca^{++}$ -Konzentration) auf diese Akto-Myosin-Komplexe, d.h. sind in den Diffraktionsbildern Merkmale für ,weak'- (deutliche Myosin-Schichtlinien und schwache Aktin-Schichtlinien) oder ,strong-binding' states (schwache Myosin-Schichtlinien und verstärkte Aktin-Schichtlinien) zu sehen?

Um diese Fragen angehen zu können muss eine möglichst einheitliche Population von Querbrücken erzielt werden, denn eine Mischung verschiedener Zustände verhindert eine eindeutige Zuweisung von Strukturänderungen im Akto-Myosin-Komplex zu bestimmten Schritten im Querbrückenzyklus. Unter physiologischen Bedingungen, also in Gegenwart von ATP besetzen die Querbrücken bei hoher  $Ca^{++}$ -Konzentration alle Zwischen-Zustände des Querbrückenzyklus und entwickeln beim Durchlaufen dieser Zwischen-Zustände aktive Kraft. Eine solche Mischung von Akto-Myosin-Komplexen in den verschiedenen Querbrücken-Zuständen erlaubt jedoch nicht einzelne Zwischen-Zustände strukturell und

funktionell zu charakterisieren. Deshalb müssen Nukleotid-Analoga oder Substanzen eingesetzt werden, die Reaktionsschritte verlangsamen oder blockieren und so möglichst alle Querbrücken in definierten Zwischen-Zuständen anhalten/akkumulieren. In der vorliegenden Arbeit mussten geeignete Nukleotid- bzw. Phosphat-Analoga oder andere Substanzen verwendet werden, die die Phosphatfreigabe unterdrücken, und so eine Akkumulation von  $\text{AMDP.P}_i$ -Querbrücken-Zuständen ermöglichen, welche nach dem kinetischen Schema möglichst direkt vor der Kraftgenerierung liegen sollten.

### 1.3 Auswahl geeigneter Analog-Zustände

Ziel dieser Arbeit ist es, die Struktur der Querbrücken-Zustände vor der Kraftentwicklung bzw. während des kraftgenerierenden Schrittes zu charakterisieren. Besonders sollen diese Zwischen-Zustände ( $\text{AMDP.P}_i$ ) auf strukturelle Unterschiede im Akto-Myosin-Komplex, bei Bindung an das aktivierte (hohe  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration) bzw. nicht-aktivierte (niedrige  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration) Aktinfilament untersucht werden, was auch eine Zuordnung der Querbrücken zu Zuständen geringer bzw. hoher Aktinaffinität erlaubt (vgl. 1.2). Aus der Literatur sind mehrere Analoga des gamma-Phosphates von Nukleotiden bekannt (Bigay et al., 1985; Combeau and Carlier 1988), die für die Fragestellung dieser Arbeit eingesetzt werden können, darunter z.B. Vanadat ( $\text{V}_i$ ), Berylliumfluorid ( $\text{BeF}_x$ ), sowie Aluminiumfluorid ( $\text{AlF}_4$ ). Alle diese  $\text{P}_i$ -Analoga können während aktivem ATPase ‚Turnover‘ statt des anorganischen Phosphats mit hoher Affinität an die Myosinköpfe binden (Chase et al., 1993; Dantzig and Goldman 1985; Goody and Hofmann 1980; Regnier et al., 1999; Takemori et al., 1995), ersetzen so das  $\text{P}_i$  und bilden äußerst stabile  $\text{M.DP.P}_i$  bzw.  $\text{AM.DP.P}_i$ -Analog-Zustände, aus denen das Phosphat-Analogon nur sehr langsam abdissoziiert. Diese Analoga müssen den Muskelfasern also während aktiver Kraftentwicklung zugefügt werden. Erfolgreiche Bindung (Ersatz des  $\text{P}_i$ ) erkennt man an einer Hemmung der aktiven Kraftentwicklung. Die Querbrücken werden in einem nicht-kraftgenerierenden Zustand ‚arretiert‘, da die  $\text{P}_i$ -Analoga sehr fest in der Nukleotidbindungstasche des Myosinkopfes festgehalten werden (Fisher et al., 1995b) und extrem langsam abdissoziieren. Man spricht auch von einem ‚trapping‘ der  $\text{P}_i$ -Analoga. Mit  $\text{V}_i$  und  $\text{AlF}_4$  entstehen stabile Zustände, also  $\text{ADP.V}_i$ - und  $\text{ADP.AlF}_4$ -Zustände, die Analoga des  $\text{ADP.P}_i$ -Zustandes sind (Chase et al., 1994; Chase et al., 1993; Dantzig and Goldman 1985; Fisher et al., 1995b; Smith and Rayment 1996). Für  $\text{BeF}_x$  konnten sowohl Hinweise für die ‚open‘ als auch die ‚closed‘ Konformation beobachtet werden (Dominguez et al., 1998; Phan et al., 1993; Regnier et al., 1999; Smith

and Rayment 1995; Xiao et al., 1998). Vorversuche in unserer Arbeitsgruppe mit diesen drei Phosphat-Analoga zeigten nur für  $\text{AlF}_4$  eine nahezu vollständige Akkumulation von Querbrücken im  $\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4$ -Zustand an, die anderen Analoga ( $\text{V}_i$  und  $\text{BeF}_x$ ) brachten bei den erreichbaren Konzentrationen des  $\text{P}_i$ -Analogons keine ausreichende Hemmung der Kraftentwicklung, d.h. keine Sättigung aller Myosinköpfe mit dem  $\text{P}_i$ -Analogon und damit nur eine Mischung verschiedener Querbrücken-Zustände. Aus diesem Grunde wurde in den hier vorgestellten Untersuchungen  $\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4$  (bzw.  $\text{MgADP} \cdot \text{AlF}_4$ ) als Analogon verwendet.

Wie bereits erwähnt, stellt der  $\text{MgADP} \cdot \text{AlF}_4$ -Komplex ein  $\text{MgADP} \cdot \text{P}_i$ -Analogon dar, er wurde kristallographisch als Übergangszustand ('transition state') vor Phosphat-Freisetzung beschrieben (Fisher et al., 1995a; Fisher et al., 1995b; Geeves and Holmes 1999). Die Querbrücken mit gebundenem  $\text{MgADP} \cdot \text{AlF}_4$ -Komplex sollen also analog dem Zustand sein, wenn  $\text{MgATP}$  hydrolysiert ist zu  $\text{MgADP}$  und  $\text{P}_i$ , wobei das  $\gamma$ -Phosphat noch im Myosinkopf gebunden ist. Die Konformation des Myosinkopfes sollte mit  $\text{MgADP} \cdot \text{AlF}_4$  'closed' sein, wobei die 'leichte-Ketten-bindende' Domäne in der 'up'-Konfiguration, also der Konfiguration vor Kraftgenerierung, wie im  $\text{AMDP}_i$ -Zustand bei Temperaturen von  $\approx 10^\circ\text{C}$  (Xu et al., 2003) (Urbanke and Wray 2001). Es kommt also zu einer Akkumulation von Querbrücken-Zuständen, die vor dem kraftgenerierenden Schritt liegen. Auch bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration ist der Übergang in die kraftgenerierenden Zustände sehr langsam (sehr unwahrscheinlich), da  $\text{AlF}_4$  nur eine sehr geringe Ablöserate vom Myosinkopf aufweist.

Als eine weitere Möglichkeit trotz aktiviertem Aktinfilament Querbrücken in den Zuständen vor der Kraftentwicklung zu akkumulieren bietet sich BDM (2,3-Butandion-Monoxim) an, eine Substanz, die nicht als Analogon an die Myosinköpfe bindet, also nicht kompetitiv ist wie das  $\text{AlF}_4$  (Herrmann et al., 1992). Normalerweise kommt es mit  $\text{MgATP}$  bzw. dem Hydrolyse-Produkt  $\text{MgADP} \cdot \text{P}_i$  am Myosinkopf bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration schnell zur  $\text{P}_i$ -Abgabe und damit zur Entwicklung von aktiver Kraft. Durch den Einsatz von BDM wird auch in Gegenwart von  $\text{Ca}^{++}$  die aktive Kraftentwicklung mehr oder weniger stark reduziert, abhängig von der BDM-Konzentration (Regnier et al., 1995; Zhao and Kawai 1994). Es wird angenommen, dass BDM einen allosterischen Effekt auf das Myosin, vielleicht auf Proteine allgemein hat. Die Querbrücken akkumulieren mit BDM in einem nicht-kraftgenerierenden Zustand (Herrmann et al., 1992; Higuchi and Takemori 1989; McKillop et al., 1994; Regnier et al., 1995; Yagi et al., 1992), der aufgrund mechanischer Untersuchungen als  $\text{MgADP} \cdot \text{P}_i^1$ -Zustand (vgl. Abb.1) beschrieben wurde (Regnier et al., 1995). Der Vorteil, BDM als Inhibitor aktiver Kraftentwicklung in Muskelfasern zu verwenden liegt darin, dass mit BDM die Querbrücken in Gegenwart ihres

physiologischen Nukleotids ATP untersucht werden können. Es muss kein Nukleotidanalogen verwendet werden, das zu Analog-Zuständen führt, die sich unter Umständen doch von den ‚physiologischen‘ Zwischen-Zuständen der ATP-Hydrolyse unterscheiden.

#### 1.4 Experimenteller Ansatz dieser Arbeit

Zur Akkumulation der Querbrücken in Zuständen vor bzw. während Kraftgenerierung wird

1. den Muskelfasern, wie in der Literatur beschrieben (Chase et al., 1993),  $\text{AlF}_4$  und  $\text{MgATP}$  bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration angeboten. Während aktivem ATPase-Zyklus ersetzt dann  $\text{AlF}_4$  das  $\text{P}_i$  im Myosinkopf, sodass ein  $\text{MgADP}.\text{AlF}_4$ -Komplex im Myosinkopf entsteht.

2. Die Muskelfasern werden in Gegenwart von  $\text{MgATP}$  und  $\text{Ca}^{++}$  mit BDM inkubiert (Regnier et al., 1995), um aktive Kraftentwicklung zu unterdrücken und die Querbrücken in einem  $\text{MgADP}.\text{P}_i$ -Zustand zu akkumulieren.

3. Durch Zugabe von zuerst  $\text{MgADP}$  und dann  $\text{AlF}_4$  lässt man, in zunächst nukleotidfreien Muskelfasern den  $\text{MgADP}.\text{AlF}_4$ -Komplex an den Myosinkopf binden. Das heisst, man geht im kinetischen Schema (Abb.1) von rechts nach links, um einen  $\text{ADP}.\text{P}_i$ -Analog-Zustand zu erreichen. Damit nutzen wir die Tatsache aus, dass  $\text{MgADP}.\text{AlF}_4$  prinzipiell an den Myosinkopf binden kann, wenn das Aktinfilament aktiviert ist (Chase et al., 1994). Im vorliegenden Experiment werden die Aktinfilamente auch ohne  $\text{Ca}^{++}$  durch die sterespezifischen ‚strong-binding‘ Querbrücken-Zustände im Rigor aktiviert, sodass  $\text{MgADP}$  und  $\text{AlF}_4$  als  $\text{MgADP}.\text{AlF}_4$ -Komplex an die Myosinköpfe binden kann. Kim et al. (1998) hatten bereits versucht  $\text{MgADP}$  und  $\text{AlF}_4$  unter diesen Bedingungen an den Myosinkopf binden zu lassen, allerdings mit widersprüchlichen Ergebnissen (Kim et al., 1998).

#### 1.5 Auswahl einer geeigneten Methode zur strukturellen Charakterisierung der Querbrücken-Zustände vor und während Kraftgenerierung

Für eine strukturelle Untersuchung des Akto-Myosin-Komplexes vor und während aktiver Kraftentwicklung müssen Akto-Myosin-Komplexe aus niederaffinen (‚weak-binding‘) und hochaffinen (‚strong-binding‘), an aktiviertes Aktin gebundenen Querbrücken-Zuständen

untersucht werden. Für eine eindeutige Zuordnung der in Gegenwart von AIF<sub>4</sub> bzw. BDM akkumulierten Zustände zu den ‚weak‘- oder ‚strong-binding‘ states kann der Vergleich mit den strukturellen Eigenschaften bei Bindung an das nicht aktivierte Aktinfilament genutzt werden (vgl. 1.2). Für diese strukturelle Charakterisierung kann die 2D-Röntgendiffraktion von Muskelfasern verwendet werden. Myosin und Aktin führen dabei als regelmäßig angeordnete Strukturen, sozusagen als Gitter zu einer Beugung der Röntgenstrahlung. Dieses Beugungsbild wird als charakteristisches Diffraktionsmuster registriert, welches Aussagen über die Struktur der Bausteine, ihre Orientierung, ihre Anordnung in den Filamenten sowie die Anordnung der Filamente innerhalb der Myofibrillen erlaubt. Unterschiedliche physiologische Bedingungen, die zu strukturellen Änderungen führen, zeigen sich demnach als Unterschiede in den Reflexen und Schichtlinien der Diffraktionsbilder.

Um für eine genaue Analyse auch der schwachen Schichtlinien Diffraktionsbilder mit ausreichender Intensität aufnehmen zu können, wurde zum einen die ‚single fiber array‘-Methode eingesetzt, bei der jeweils 30 einzelne Muskelfasern nebeneinander im Röntgenstrahl platziert werden (Kraft et al., 1999), zum anderen wurde die hohe Intensität der Synchrotron-Strahlung genutzt. Alle in dieser Arbeit gezeigten Strukturuntersuchungen des Akto-Myosin-Komplexes wurden deshalb am Deutschen Elektronen Synchrotron in Hamburg (DESY) registriert.

In den im Rahmen der drei Versuchsansätze registrierten Diffraktionsbildern fallen üblicherweise drei Arten von Reflexen auf (vgl. Abb.2).

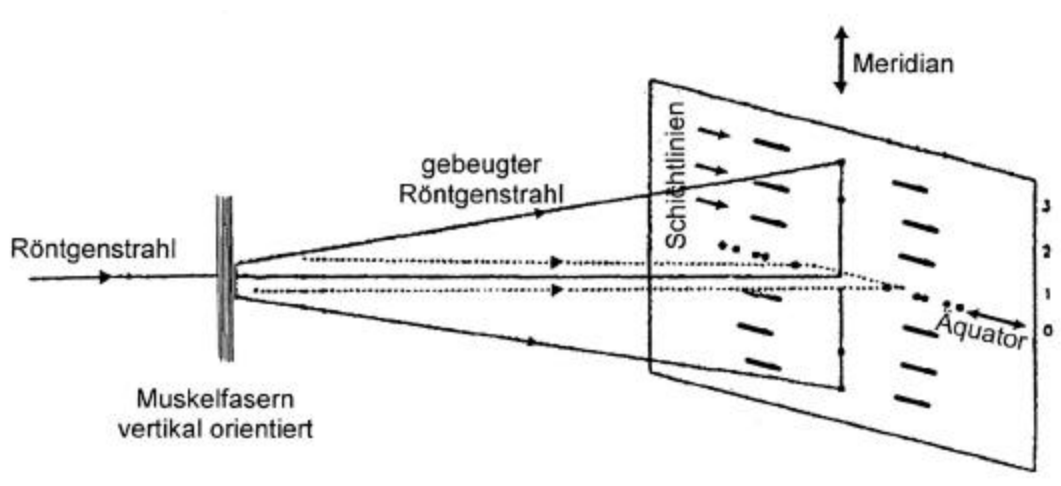


Abb.2: Schematische Darstellung der Diffraktionsbereiche (Gegenüber den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Diffraktionsbildern um 90° rotiert.), zu sehen sind äquatoriale- und meridionale Reflexe, sowie die Schichtlinien. (Verändert nach Squire, 1998).

## Äquatoriale Reflexe.

Sie geben Auskunft über die Masseverteilung zwischen Myosin- und Aktinfilamenten, erlauben aber keine eindeutige Aussage über die Struktur der Akto-Myosin-Komplexe, da sich äquatoriale Reflexe z.B. schon ändern wenn sich die Myosinköpfe in der Nähe des Aktinfilamentes befinden, ohne wirklich gebunden zu haben.

### 1. Meridionale Reflexe.

Bei ihnen besteht zum Teil Unklarheit über ihre Herkunft (z.B.  $1/21.5 \text{ nm}^{-1}$ ) und darüber, wie stark sie von der Interferenz beider Sarkomerhälften und z.B. von der Rückgrat-Struktur des Myosins beeinflusst werden. Ausserdem sind gerade die meridionalen Myosin-Reflexe (z.B.  $1/14.3 \text{ nm}^{-1}$ ) besonders sensibel für mehr oder weniger strukturelle Unordnung („disorder“) in den zugrundeliegenden Strukturen.

### 2. Schichtlinien neben dem Meridian.

Man unterscheidet Schichtlinien, die dem Aktin und solche, die dem Myosin zuzuordnen sind. Eine orientierte, also stereospezifische, der Aktin-Helix folgende Bindung der Myosinköpfe an das Aktin führt zu einer Veränderung der Schichtlinien. Im Rigor beispielsweise, wo alle Myosinköpfe stereospezifisch an Aktin gebunden sind (Cooke and Franks 1980; Lovell and Harrington 1981), beobachtet man eine starke Intensitätszunahme der Aktin-Schichtlinien mit einer Verschiebung des Intensitätsprofils in Richtung Meridian (scheinbare Zunahme des Aktinfilament-Radius) sowie eine deutliche Intensitätsabnahme der Myosinschichtlinien.

Im Hinblick auf die Fragestellung dieser Arbeit eignen sich für eine genaue Analyse bevorzugt die Schichtlinien. Dementsprechend werden hier die im Diffraktionsbild deutlichsten Schichtlinien analysiert, untereinander und mit Daten aus früheren Untersuchungen vergleichend betrachtet und diskutiert.

## 1.6 Interpretation der 2D-Röntgendiffraktionsbilder im Hinblick auf die Charakterisierung der Analog-Zustände für Querbrücken vor und während Kraftentwicklung.

Myosin- und Aktin-Schichtlinien liegen horizontal neben dem Meridian. Ihre Position wird von den sich periodisch wiederholenden axialen Einheiten der Filamenthelices bestimmt, während die Intensität und die Intensitätsverteilung einer Schichtlinie auch von der radialen Masseverteilung, das heisst von der Struktur und der radialen Position der Helixelemente abhängt.

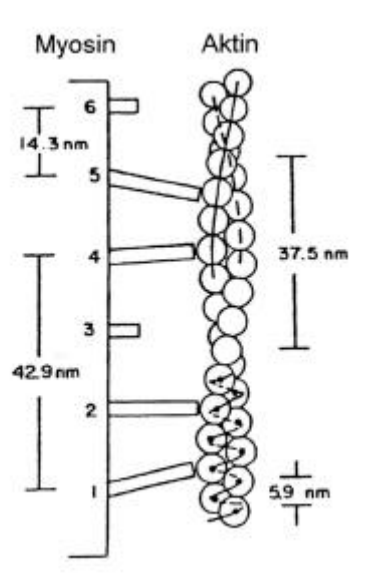


Abb.3: Schematische Darstellung der Myosin- und Aktinfilamente mit den bekannten Helix-Periodizitäten. (Verändert nach Haselgrove, 1980)

Wie in Abb.3 zu sehen ist, beträgt der Abstand von zwei Aktin-Monomeren (G-Aktin) nach einem kurzen Helixumlauf 5.9 nm und nach einem kompletten/langen Helixumlauf 37.5 nm. Das entspricht im reziproken Raum des Diffraktionsbildes der sechsten Aktin-Schichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$ , sowie der ersten Aktin-Schichtlinie bei  $1/37 \text{ nm}^{-1}$ . Ein am Aktin angehefteter Myosinkopf stellt eine laterale Massezunahme der Aktinhelix dar und ist als Intensitätszunahme der Aktin-Schichtlinie im Diffraktionsbild zu sehen (Parry and Squire 1973; Squire 1981), sofern die Anheftung stereospezifisch ist, also der Aktinhelix folgt. Demgegenüber können Zustände der nicht oder nur mit geringer Affinität an Aktin gebundenen Myosinköpfe zu einer deutlichen Verstärkung der Myosin-Helix und damit der Myosin-Schichtlinien führen (Malinchik et al., 1997; Matsuda and Podolsky 1984; Xu et al., 1997).

Um also die Querbrücken-Zustände vor Kraftgenerierung bzw. die Analog-Zustände in Gegenwart von  $\text{AlF}_4$  den entsprechenden Zuständen im kinetischen Schema (Abb.1) zuordnen zu können, stehen mehrere Parameter zur Verfügung, und erlauben folgende Fragen zu klären:

1. Handelt es sich bei den mit BDM akkumulierten Querbrücken um einen dem  $\text{ADP}\cdot\text{P}_i$ -Zustand entsprechenden Zustand, oder eher um einen ATP-Zustand?
2. Binden die Myosinköpfe mit  $\text{AlF}_4$  bzw. BDM stereospezifisch / nicht-stereospezifisch an Aktin und handelt es sich somit um Zustände hoher oder geringer Aktinaffinität?



Zur Klärung der ersten Frage dient die Analyse der Myosin-Schichtlinien, vor allem bei höherer Temperatur. Es war gezeigt worden, dass Myosinköpfe, die ADP.P<sub>i</sub> gebunden haben bei Temperaturen von 10-15°C bevorzugt in der sogenannten ‚closed‘ Konformation sind, die ihnen ermöglicht, eine definierte Myosin-spezifische helikale Anordnung einzunehmen, unabhängig davon, ob sie (mit geringer Affinität) an Aktin gebunden sind oder nicht (Malinchik et al., 1997; Urbanke and Wray 2001; Xu et al., 1997; Xu et al., 2003). Das bedeutet, dass Myosinköpfe mit ADP.P<sub>i</sub> bei höherer Temperatur so angeordnet sind, dass es zu einer deutlichen Verstärkung der Myosin-Schichtlinien kommt, wie z.B. bei Fasern des M.psoas vom Kaninchen unter Relaxations-Bedingungen bei höherer Temperatur (=10°C). Dementsprechend weisen deutliche Myosin-Schichtlinien im Diffraktionsbild von Analog-Zuständen darauf hin, dass es sich um ADP.P<sub>i</sub>-ähnliche Zustände niedriger Aktinaffinität handelt (Urbanke and Wray 2001; Xu et al., 1999; Xu et al., 2003). Entsprechend sollten ADP.AIF<sub>4</sub>-Zustände als Analog-Zustände der ADP.P<sub>i</sub>-Zustände ebenfalls mit Temperaturerhöhung verstärkte Myosin-Schichtlinien zeigen, sofern die ADP.AIF<sub>4</sub>-Zustände tatsächlich den ‚weak-binding‘ states zuzuordnen sind.

Zur Klärung der zweiten Frage, ob also die untersuchten Zustände hohe oder geringe Aktinaffinität haben und dementsprechend stereospezifisch (bei hoher Affinität) oder nicht-stereospezifisch (bei geringer Aktinaffinität) an Aktin binden, müssen weitere Parameter in den Diffraktionsbildern untersucht werden.

Strukturelle Merkmale eines ‚weak-binding‘-Zustandes sind z.B.:

- Eine geringe Aktinaffinität der Myosinköpfe, die sich darin ausdrückt, dass die Ca<sup>++</sup>-Konzentration kaum Einfluss auf den Akto-Myosin-Komplex und damit auch auf die Intensitätsverteilung zwischen den Myosin- und Aktin-Schichtlinien ausübt, das heißt
- auch mit Ca<sup>++</sup> sind ähnlich deutliche Myosin-Schichtlinien wie unter Relaxations-Bedingungen zu erwarten. Dies lässt sich am einfachsten durch Vergleich der Myosin-Schichtlinien bei Temperaturen = 10°C klären. Querbrücken niedriger Aktinaffinität binden aufgrund ihrer Konformation auch an aktiviertes Aktin (A<sub>on</sub> Schema in Abb.1) nur mit geringer Affinität und nicht-stereospezifisch und können deshalb weiterhin eine Myosin-spezifische helikale Anordnung einnehmen (Xu et al., 1999; Xu et al., 2003).
- Da auch die Bindung an aktiviertes Aktin nicht-stereospezifisch ist, bleibt auf der sechsten Aktin-Schichtlinie (1/5.9 nm<sup>-1</sup>) eine für stereospezifische Bindung charakteristische Verschiebung des Intensitätsmaximums Richtung Meridian aus. Auf dieser Schichtlinie kommt es mit Querbrücken geringer Aktinaffinität bei hoher

Ca<sup>++</sup>-Konzentration höchstens zu einem leichten Anstieg der Intensität, einmal hervorgerufen durch Ca<sup>++</sup>-Bindung an Troponin, zum anderen durch leicht veränderte, aber immer noch nicht-stereospezifischer Querbrücken-Anheftung (Kraft et al., 1999).

Ein ‚strong-binding-Zustand ist demgegenüber gekennzeichnet durch

- einen deutlichen Ca<sup>++</sup>-Effekt auf die Aktinaffinität der Myosinköpfe und damit auf die Intensitätsumverteilung zwischen Aktin und Myosin zugunsten des Aktins,
- eine deutliche Intensitätszunahme der Aktin-Schichtlinien infolge der stereospezifischen Bindung der Myosinköpfe an Aktin und
- daraus resultierend eine massive Abnahme der Myosin-Schichtlinien, da aufgrund der stereospezifischen Bindung an Aktin die mit ‚weak-binding‘ states beobachtete dem Myosin folgende helikale Anordnung der Myosinköpfe verloren geht.

Die genaue Analyse dieser Parameter in den registrierten Diffraktionsbildern der drei Versuchsansätze dieser Arbeit zeigt nicht erwartete Unterschiede für das in zwei unterschiedlichen Ansätzen verwendete Phosphat-Analogon AIF<sub>4</sub> auf. Der Akto-Myosin-Komplex mit MgADP.AIF<sub>4</sub>, das während aktivem ATPase-Zyklus an die Myosinköpfe gebunden hat (Chase et al., 1993), hat strukturelle Eigenschaften wie ein (A)MDP.P<sub>i</sub>-Zustand geringer Aktinaffinität (‚weakly-bound‘ state) und repräsentiert so vermutlich den AMD.P<sub>i</sub><sup>-</sup>-Zustand. Überraschenderweise konnte nach MgADP- und AIF<sub>4</sub>-Zugabe unter Rigor-Bedingungen, also Bildung des MgADP.AIF<sub>4</sub>-Komplexes am zunächst nukleotidfreien Myosinkopf, ein neuer Querbrücken-Zustand identifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit können dahingehend interpretiert werden, dass es sich dabei um einen dem A<sub>on</sub>MD.P<sub>i</sub><sup>||</sup>-Zustand analogen Querbrücken-Zustand vor Phosphatabgabe handelt (vgl. Schema in Abb.1), der jedoch schon eine hohe Aktinaffinität besitzt (‚strongly-bound‘ state) und so einen Analog-Zustand für den ersten kraftgenerierenden Zustand darstellen könnte.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden Fasern des *Musculus psoas major* von ca. 4-5 kg schweren, ca. 2 Jahre alten Kaninchen aus Laborzuchtungen verwendet.

### 2.2 Faserpräparation

Die Präparation der Einzelfasern erfolgte nach einer schon früher beschriebenen Methode von (Brenner 1983) und (Yu and Brenner 1989); modifiziert nach (Kraft et al., 1995).

Die Kaninchen wurden durch Genickschlag betäubt und, um die Wirkung von Proteasen zu unterbinden durch sofortiges Eröffnen einer Arteria carotis ausgeblutet. Der Bauchraum wurde durch einen Medianschnitt eröffnet und der *Musculus psoas major* auf beiden Seiten der Wirbelsäule möglichst ganz von Fett und Bindegewebe befreit. Danach konnten mit einer Schere laterale Faserbündel des Muskels, von 2-3 mm Durchmesser und ca. 8 cm Länge herausgetrennt werden. Die Bündel wurden mit dem Lösen des zweiten Endes sofort in ihrer Länge fixiert und durch rostfreie Nadeln in einer Plexigaskammer (30ml) mit Sylgard-Boden (Dow Corning Corp., Midland, Mi., USA) befestigt.

Die Kammer wurde sofort randvoll mit einer Permeabilisierungslösung (s.2.2.1) gefüllt, die zusätzlich 0,5 % Triton X-100 (Boehringer, Mannheim) enthielt. Dabei werden, über einen Zeitraum von mindestens 30 min. bei 4°C, alle membranösen Strukturen permeabilisiert oder aufgelöst. Danach wurde diese Lösung durch eine Permeabilisierungslösung ohne Triton ersetzt, in der die Faserbündel auch über 2-3 Tage, bei 4°C unter Luftausschluss gelagert werden konnten. Um eine ATP-Verarmung zu vermeiden, wurde die Lösung täglich ausgetauscht.

### 2.2.1 Permeabilisierungslösung

Alle Chemikalien, soweit nicht anders vermerkt, stammen von der Firma Sigma-Aldrich GmbH, München.

Die Permeabilisierungslösung enthielt :

5mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5mM Mg-Acetat, 5mM EGTA, 3mM  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , 50mM CrP, 8mM  $\text{NaN}_3$  (Serva) und wurde auf pH 7,0 bei 5°C eingestellt.

Als Proteasehemmer wurden noch folgende Inhibitoren gemäß einer bereits früher beschriebenen Methode zugegeben (Kraft et al., 1995) :

jeweils 0,01 mM Leupeptin, Antipain, E64, Pepstatin A ; 0,001 mg/ml Aprotinin ; 1,0 mM AEBSF (Applichem) ; 10mM GSH, 5mM DTT.

### 2.3 Vorbereitung der Einzelfasern für die Messungen

Für die Röntgendiffraktionsaufnahmen wurden von den Faserbündeln ca. 2,5cm lange Stücke abgeschnitten und in eine kleinere Plexigaskammer mit Permeabilisierungslösung ohne Triton gegeben. Daraus wurden dann vorsichtig, ohne sie zu überdehnen, mit einer feinen Pinzette in Längsrichtung Einzelfasern gezogen und in der Meßkammer an beiden Enden mit Siliconkleber („3145 RTV“, Dow Corning, USA und Histoacryl, Braun, Melsungen) auf sogenannten Faserhaltern (V2A-Stahlplättchen) befestigt. Zur besseren Fixierung der Fasern, besonders für die Experimente, die mit einer kurzzeitigen aktiven Kraftentwicklung verbunden waren, wurden für alle Experimente die Fasern noch zusätzlich mit Histoacryl (Gewebekleber; Braun, Melsungen) festgeklebt. Für jedes Experiment wurden in solch einer Meßkammer parallel 30 unverletzte Einzelfasern montiert. Die Kammer ließ bezogen auf die Meßapparatur eine vertikale Ausrichtung der Fasern zu, dementsprechend ist auch der Meridian in den Diffraktionsbildern vertikal orientiert. Mit 30 Fasern erhält man für die spätere Analyse der Röntgendiffraktionsbilder eine ausreichende Intensität der Reflexe und vor allem der relativ wenig intensiven Schichtlinien neben dem Meridian (Kraft et al., 1999).

Mittels Laserdiffraktion wurde die Sarkomerenlänge der Fasern in der Meßkammer bestimmt und für alle Versuche auf die physiologische Länge von 2,4  $\mu\text{m}$  eingestellt.

## 2.4 Röntgendiffraktion

Die Röntgenstrukturanalytischen Untersuchungen wurden in insgesamt 4 Meßserien am Deutschen Elektronen-Synchrotron Hamburg (DESY) durchgeführt. Die Bildaufnahmen fanden bei HASYLAB (Hamburger Synchrotronstrahlungslabor) an der Station A2 statt.

### 2.4.1 Allgemeine Meßbedingungen

Die Kameralänge war auf 285 cm justiert, gemessen von der Faser bis zur Oberfläche der Imaging-Plate. Kurz vor der Imaging-Plate, im Zentrum des Strahlrohrs war ein semipermeabler Stopp für den Hauptstrahl, bestehend aus einem Bleirahmen mit aufgeklebter Nickelfolie, (11,5 \* 10 mm) durch Nylonfäden aufgehängt. Über die Nickelfolie wurde der Hauptstrahl abgeschwächt, der sonst die Imaging-Plate schädigen würde. Der Bleirahmen diente der Abschwächung der Streustrahlung, die beim Auftreffen des Hauptstrahls auf die Nickelfolie entsteht. Der Hauptstrahl wurde nur abgeschwächt, nicht blockiert, um für Normierungszwecke dienen zu können.

Zur Aufzeichnung der Beugungsmuster war eine Imaging-Plate (Fuji) mit einer Größe von 25 cm \* 20 cm installiert.

Die Meßkammer und damit die Muskelfasern konnten im Röntgenstrahl auf und ab gefahren werden, um Veränderungen der Fasern durch Strahlenschäden bei sehr intensiver Bestrahlung an immer der gleichen Stelle zu vermeiden. Ebenfalls der Reduktion von Strahlenschäden diente der Zusatz von DTT, Glutathion und Katalase in den Meßlösungen. Die Meßkammer ließ einen Austausch der Lösungen während einer Meßserie (z.B. Relaxiert/ Rigor/ Inkubation mit  $\text{AlF}_4$  oder BDM und Aktivierung) zu, ohne daß die Muskelfasern zusätzlich manipuliert werden mußten. Die Temperatur der Lösungen in der Meßkammer wurde während allen Versuchen durch Peltierelemente und Durchflußkühlung auf 2°C bzw. 12°C eingestellt. Die Lösung wurde während der Messung in der Kammer auf- und abgepumpt (die Fasern waren dabei immer von Lösung umgeben), um Temperatur- und Konzentrationsgradienten zu minimieren.

Am Ende einer Meßserie wurden die Fasern durch Überdehnung zerstört, und eine Registrierung ohne Muskelfasern, der sogenannte Geräte-Hintergrund mit der Imaging-Plate aufgenommen. Für die Versuche, bei denen  $\text{MgADP}$  und  $\text{AlF}_4$  an die Myosinköpfe im aktivierten Akto-Myosin-Komplex binden, sowie für die Versuche mit Querbrücken-Zuständen in Gegenwart von BDM wurde jeweils ein Hintergrund ohne Kreatinphosphokinase für die Rigor-Bedingungen und ein Hintergrund mit Kreatinphosphokinase für die Relaxations- und Aktivierungs-Bedingungen aufgenommen

(die Relaxations- und Aktivierungslösung enthielt CrP und Kreatinphosphokinase für die Regeneration des ATP-Pools; der Beitrag diffuser Streuung durch Kreatinphosphokinase in der hier verwendeten Konzentration zum Hintergrund des Diffraktionsbildes ist beachtlich). Die Versuche, bei denen MgADP und  $\text{AlF}_4$  an die nukleotidfreien Myosinköpfe (Rigor-Bedingungen) in den aktivierten Muskelfasern bindet, fanden ohne Kreatinphosphokinase statt.

#### 2.4.2 Kontrollexperimente

Für die Experimente dieser Arbeit wurden Vorversuche durchgeführt, um zu entscheiden, bei welcher höheren Temperatur (zusätzlich zu den  $2^\circ\text{C}$  Messbedingungen) die Intensität der Schichtlinien für eine gute Analysierbarkeit ausreichend ist. Hier geht es um die Myosin-Schichtlinien, erzeugt von Myosinköpfen die bei höherer Temperatur eine bevorzugte helikale Anordnung einnehmen („closed“-Konformation der Myosinköpfe; (Xu et al., 2003).

Es musste auch ermittelt werden, welche Konzentration für eine Sättigung mit dem Phosphat-Analogon ( $\text{AlF}_4$ ) bzw. mit BDM auch bei dieser höheren Temperatur ausreichend ist, um die Entwicklung aktiver Kraft weitgehend zu unterdrücken. Gleichzeitig musste ermittelt werden, wie stark mit dieser gerade benötigten Konzentration der Streuungshintergrund im Zentrum der Diffraktionsbilder als Auswirkung des bei hohen Konzentrationen präzipitierenden Metallfluorids ist.

Durch die zunehmende Präzipitation des  $\text{AlF}_4$ , vor allem bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration ist eine wirkliche Titration nicht möglich, bei einer Temperatur von  $20^\circ\text{C}$  ist die für eine Sättigung nötige Konzentration, die zu einer weitgehenden Unterdrückung der Kraftentwicklung führt, kaum zu erreichen. Dagegen zeigte die Messung der aktiven Kraftentwicklung bei  $12^\circ\text{C}$  und einer Konzentration von  $2\text{mM}$   $\text{AlF}_4$  nach kurzer Inkubationszeit die für das Eindiffundieren von  $\text{AlF}_4$  benötigt wird (Chase et al., 1993) eine weitgehende Unterdrückung aktiver Kraft an. Mit  $2\text{mM}$   $\text{AlF}_4$  und  $2\text{mM}$  ADP (s. 2.4.3) kann bei  $2^\circ\text{C}$  die aktive Kraftentwicklung auf 5% der maximal möglichen isometrischen Kraft reduziert werden, bei  $12^\circ\text{C}$  bleiben dann noch etwa 10% Restkraft übrig.

Ebenso musste die Inkubationszeit für die  $\text{AlF}_4$ -Rigor Experimente festgelegt werden, d.h. die Zeit, die das Phosphat-Analogon benötigt, um an die nukleotidfreien Myosinköpfe (Rigor) zu binden. Dazu wurden von den Muskelfasern unter Rigor-Bedingungen nach Beginn der Inkubation mit  $\text{AlF}_4$  in kurzen Abständen (10min) Diffraktionsbilder registriert. Eine Analyse der ersten beiden äquatorialen Reflexe  $I_{1,0}$  und  $I_{1,1}$  ergab, dass der Intensitätsquotient  $I_{1,1}/I_{1,0}$  im Diffraktionsbild während der Inkubation von Muskelfasern

unter Rigor-Bedingungen mit ADP und  $\text{AlF}_4$  bis zu einer Stunde abnahm, danach nicht mehr.

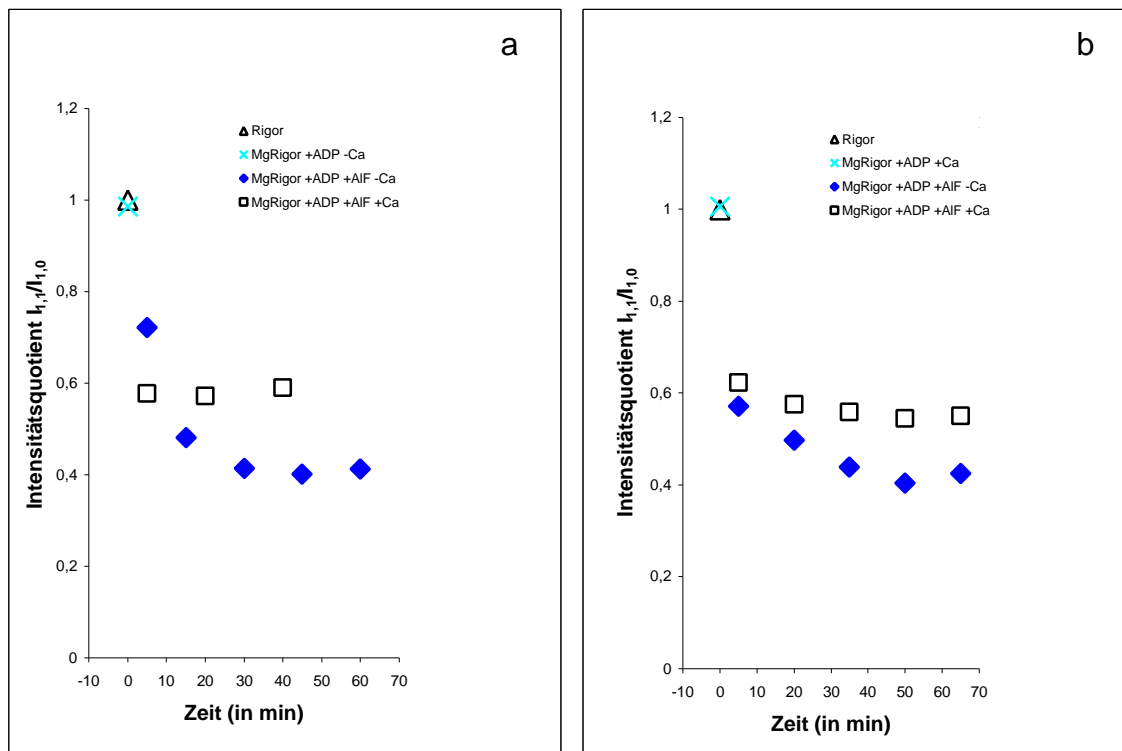


Abb.4: Analyse des Zeitverlaufes der äquatorialen 1.1 und 1.0 – Reflexe, bzw. die daraus resultierende Intensitätsquotients-Änderung  $I_{1.1}/I_{1.0}$  nach Zugabe von MgADP und  $\text{AlF}_4$  unter Rigor-Bedingungen. Gezeigt ist in a.) der Zeitverlauf der Inkubation mit  $\text{AlF}_4$  zuerst bei niedriger und dann bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration, in b.) zuerst bei hoher und dann bei niedriger  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration. Die höhere Intensität des Quotienten nach Bindung von MgADP und  $\text{AlF}_4$  bei hoher  $\text{Ca}^{++}$  - Konzentration kommt durch die stereospezifische Bindung der Querbrücken an Aktin zustande (Verändert nach E.Mählmann, unveröffentlicht).

Diese Abnahme von  $I_{1.1}/I_{1.0}$  kommt durch die zunehmende Bindung von  $\text{MgADP} \cdot \text{AlF}_4$  an die Myosinköpfe und die daraus resultierende Strukturänderung des Akto-Myosin-Komplexes zustande.

Basierend auf eigenen früheren Messungen sowie auf Literaturangaben (Brixius and Schwinger 2000) wurde durch Messung aktiver Kraftentwicklung eine Titration mit BDM (2,3-Butandion-Monoxim) durchgeführt (E. Mählmann, Abt. Molekular- und Zellphysiologie). Eine weitgehend reduzierte aktive Kraftentwicklung zeigt dabei die benötigte Konzentration von BDM für die Bedingungen bei  $2^\circ\text{C}$  und  $12^\circ\text{C}$  an. Bei  $2^\circ\text{C}$  kann die Kraftentwicklung durch 50 mM BDM auf 3,5-7% der maximal möglichen isometrischen Kraft reduziert werden, bei  $12^\circ\text{C}$  sind für eine ähnliche Reduktion 100 mM BDM nötig.

Insgesamt wurde aus den Vorversuchen ersichtlich, dass eine Temperatur von 12°C ausreichend ist, um deutliche Myosin-Schichtlinien in den Diffraktionsbildern zu erhalten und eine mindestens 90%ige Reduktion der aktiven Kraftentwicklung mit  $\text{AlF}_4$  und BDM bei dieser Temperatur erreicht werden kann. Bei 12°C lässt sich mit  $\text{AlF}_4$  ein Streuungshintergrund in den Registrierungen nicht vermeiden, der zudem nicht immer gleich stark ist.

#### 2.4.3 Meß-Lösungen

Die Chemikalien, soweit nicht anders vermerkt, stammen von der Firma Sigma-Aldrich GmbH, München.

Alle Lösungen wurden mit Kaliumpropionat bzw. Natriumpropionat auf die gewünschte Ionenstärke gebracht und auf pH 7.0 bei der jeweiligen Temperatur der Experimente gebracht.

Relaxations-Lösung: 10 mM Imidazol, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM EGTA, 10 mM CrP, 10mM Coffein, 2 mM MgATP, 5 mM DTT, 10 mM Glutathion, 1000 U/ml Katalase, 200 U/ml Kreatinphosphokinase (CPK).  
Ionenstärke I = 80mM

Vorrigor-Lösung: 10 mM Imidazol, 2,5 mM EGTA, 7,5 mM EDTA, 5 mM DTT, 10 mM Glutathion, 1000 U/ml Katalase  
Ionenstärke I = 80mM

Rigor-Lösung: 10 mM Imidazol, 2,5 mM EGTA, 2,5 mM EDTA 5 mM DTT, 10 mM Glutathion, 1000 U/ml Katalase  
Ionenstärke I = 80mM

Aktivierungs-Lösung: 10 mM Imidazol, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM Ca-EGTA, 10 mM CrP, 10mM Coffein, 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2 mM MgATP, 5 mM DTT, 10 mM Glutathion, 1000 U/ml Katalase, 200 U/ml CPK  
Ionenstärke I = 80mM

Relaxations-Lösung mit Aluminiumfluorid: wie Relaxations-Lösung plus 10 mM NaF, 2 mM  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$   
Ionenstärke I = 80mM



Aktivierungs-Lösung mit Aluminiumfluorid: wie Aktivierungs-Lösung plus 10 mM NaF,  
2 mM  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$   
Ionenstärke I = 80mM

MgRigor-Lösung mit geringer  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration: 10 mM Imidazol, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ,  
3 mM EGTA, 5 mM DTT, 10 mM Glutathion, 200 mM Glucose, 1000 U/ml Katalase,  
0,1 U/ml Hexokinase  
Ionenstärke I = 80mM

MgRigor-Lösung mit geringer  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration und MgADP: wie MgRigor-Lösung mit  
geringer  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration plus 0,25 mM  $\text{Ap}_5\text{A}$ , 2 mM MgADP  
Ionenstärke I = 80mM

MgRigor-Lösung mit geringer  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration, MgADP und Aluminiumfluorid:  
wie MgRigor-Lösung mit geringer  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration und MgADP plus  
2 mM  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ , 10 mM NaF  
Ionenstärke I = 80mM

MgRigor-Lösung mit hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration: 10 mM Imidazol, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ,  
3 mM Ca-EGTA, 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM DTT, 10 mM Glutathion, 200 mM Glucose,  
1000 U/ml Katalase, 0,1 U/ml Hexokinase  
Ionenstärke I = 80mM

MgRigor-Lösung mit hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration und MgADP: wie MgRigor-Lösung  
mit hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration plus 0,25 mM  $\text{Ap}_5\text{A}$ , 2 mM MgADP  
Ionenstärke I = 80mM

MgRigor-Lösung mit hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration, MgADP und Aluminiumfluorid:  
wie MgRigor-Lösung mit hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration und MgADP plus  
2 mM  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ , 10 mM NaF  
Ionenstärke I = 80mM

Relaxations-Lösung mit 2,3-Butandion-Monoxim (BDM): wie Relaxations-Lösung plus  
50 mM BDM bei den Experimenten mit 2°C und 100 mM BDM bei den Bedingungen mit  
12°C.  
Ionenstärke I = 80mM

Aktivierungs-Lösung mit BDM: wie Aktivierungs-Lösung plus 50 mM BDM bei den Experimenten mit 2°C und 100 mM BDM bei den Bedingungen mit 12°C.

Ionenstärke I = 80mM

## 2.5 Elektronische Bildverarbeitung und Datenanalyse

### 2.5.1 Bildbearbeitung

Die bestrahlten Imaging-Plates (Fuji) wurden mit einem speziellen Scanner (BAS 2000, Fuji) ausgelesen. An einer Silicon Graphics Workstation wurden die Daten mit den Programmen ‚unfuji‘, ‚fromham‘, ‚Q‘, ‚wsum‘ und ‚mcut‘ (Dan Gilroy, National Institutes of Health, Bethesda, USA; vgl. Kraft et al., 1999) weiter bearbeitet (Siehe dazu 2.6).

Im ersten Schritt wurden alle Bilder zunächst aus dem logarhythmischen ‚Fuji-Datenformat‘ in ein Bildformat mit linearer Darstellung konvertiert. Da die Intensität des Röntgenstrahls durch Energieverluste im Lauf eines Messtages variiert (z.B. Kollision der Elektronen mit Gasmolekülen), mußte dieses durch eine Normierung jedes Bildes auf den jeweiligen Ionisationskammerwert berücksichtigt werden. Für die Versuche, bei denen AIF<sub>4</sub> unter Rigor-Bedingungen eingesetzt wurde, ist dafür der mitregistrierte, abgeschwächte Hauptstrahl im Zentrum jedes Bildes benutzt worden, da der Ionisationskammerwert in dieser Serie fehlerhaft war. Damit einzelne Aufnahmen der gleichen experimentellen Bedingung auch addiert werden und so das Signal-/Rauschverhältnis verbessert werden konnte, mußten alle Bilder zentriert und rotiert werden. Die von der Imaging-Plate ausgelesenen Diffraktionsbilder haben eine Größe von 2560\*2048 Pixeln. Bei der Normierung jedes Diffraktionsbildes auf den Ionisationskammerwert oder den Faktor aus der Integration der Fläche des horizontalen Profils des Hauptstrahls mit dem Programm ‚fromham‘ wird jedes Diffraktionsbild auf 2000\*2000 Pixel geschnitten. Demnach mußte bei Rotation und Zentrierung die Mitte des Diffraktionsbildes, am Schnittpunkt der horizontalen (äquatorialen-) und vertikalen (meridionalen-) Reflexe, auf Pixel 999-1000 zu liegen kommen.

Nach gewichteter Addition mehrerer, unter gleichen Bedingung registrierter Bilder wurde der jeweils zugehörige Geräte-Hintergrund (Diffraktionsbild ohne Muskelfasern; mit/ohne Kreatinphosphokinase) subtrahiert. Es wurde soviel Hintergrund subtrahiert, dass die Intensität des Hauptstrahls im Zentrum des Bildes genau auf Null reduziert wurde. Um dennoch beim späteren Vergleich von Schichtlinien unter verschiedenen Bedingungen Intensitätsunterschiede durch unterschiedliche Muskelmassen im Röntgenstrahl (wenn

sich z.B. zu Beginn der Inkubation mit BDM während isometrischer Kraftentwicklung Muskelfasern verschieben oder reißen) ausgleichen zu können, wurden die Diffraktionsbilder der Versuche mit BDM auch auf die Gesamtintensität im Diffraktionsbild unter Rigor-Bedingungen normiert. Dem zugrunde liegt die Überlegung aus der Diffraktionstheorie, daß die Gesamtintensität in einem Diffraktionsbild von der gesamten streuenden Masse (Gesamtmasse) im Strahl abhängt (Kress et al., 1986), nicht aber von deren Anordnung/Verteilung in der Struktur der Faser, das heißt unabhängig von den experimentellen Bedingungen wie z.B. Relaxation, Rigor oder isometrische Aktivierung in Gegenwart von BDM. Das bedeutet, mit den experimentellen Bedingungen ändert sich lediglich die Verteilung der Intensität im Diffraktionsbild, solange dieselben Fasern zum Diffraktionsbild beitragen. Das heißt, sind die Diffraktoren sehr geordnet (z.B. Myosinköpfe im Rigor), so ist die Intensität in den Reflexen hoch, der Hintergrund niedrig ; sind die Diffraktoren weniger geordnet (Myosinköpfe unter Relaxierung oder bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration in Gegenwart von BDM), so ist der Hintergrund höher und die Reflexe schwächer. Durch eine Normierung auf die Gesamtintensität unter Rigor-Bedingungen kann daher ein möglicher Verlust an Muskelfasern unter isometrischer Aktivierung, ausgeglichen werden.

Der relativ intensive Streuungshintergrund im Zentrum der Diffraktionsbilder aus den beiden Versuchansätzen mit  $\text{AlF}_4$  in aktivem ATPase-Zyklus und unter nukleotidfreien Bedingungen eingesetzt, der durch die unvermeidliche und vor allem variable Präzipitation des  $\text{AlF}_4$  verursacht wird lässt eine Normierung auf die Gesamtintensität nicht zu (vgl. dazu Diskussion 4.1.2). Hier wurde also lediglich die Normierung auf die Strahlungsintensität (Hauptstrahl oder Ionisationskammerwert) durchgeführt.

Nach der Normierung wurden die Bilder „gefaltet“, das heißt, die vier Quadranten wurden zur Deckung gebracht, gemittelt und mit diesem so nochmals verbesserten Signal-/Rauschverhältnis wieder auf alle vier Quadranten gespiegelt. Die so bearbeiteten Diffraktionsbilder wurden dann für die detaillierte Analyse verwendet.

### 2.5.2 Intensitätsanalyse der Schichtlinien

Die erste Myosin-Schichtlinie bei  $1/42.9 \text{ nm}^{-1}$ , sowie die erste Aktin-Schichtlinie bei  $1/37 \text{ nm}^{-1}$  wurden horizontal, also parallel zum Meridian von Pixel 1164 - 1240 (76 Pixel) integriert (Abb.5a.), um daraus Profile (Intensitätskurven) dieser Schichtlinien in dem Bereich der Diffraktionsbilder zu bilden, der auf Höhe des äquatorialen 1.1 Reflexes liegt, um so die maximale Intensität der ersten Aktin-Schichtlinie zu erfassen.

Die Schichtlinien in den Diffraktionsbildern wurden zusätzlich über einen breiteren Bereich parallel zum Meridian von Pixel 1090 - 1400 (310 Pixel) integriert (Abb.5b.), um daraus Profile der Schichtlinien zu bilden, die die ganze Breite vor allem der Myosin-Schichtlinien 1-6 umfassen.

Für eine detaillierte Analyse der Aktinschichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  mit der ‚Segment-Technik‘ wurden sowohl von den Diffraktionsbildern aus dem Versuchsansatz mit  $\text{AlF}_4$  in aktivem ATPase-Zyklus eingesetzt, als auch aus dem Versuchsansatz mit BDM eine Serie von ‚Segmenten‘ unterschiedlicher Breite parallel zum Meridian integriert (Abb.5c.), um nach Subtraktion des Hintergrundes daraus die Intensitätsprofile dieser Schichtlinie erstellen zu können. Die einzelnen Segmente waren neben dem Meridian von Pixel 1000 - 1384 jeweils 24 Pixel breit, in der Mitte von Pixel 1384 - 1672 jeweils 48 Pixel breit und am äusseren Rand des Diffraktionsbildes von Pixel 1672 - 1960 jeweils 96 Pixel breit. In jedem dieser Segmente wurde die Fläche des zu untersuchenden Reflexes, also der Schichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$ , mit dem Programm „Origin“ (Microcal, USA) bestimmt, nachdem zuvor der Hintergrund unter dem Peak subtrahiert worden war. Diese für das Endergebniss kritische Subtraktion eines linearen Hintergrundes erfolgte anhand der Bestimmung des Hintergrundes in jedem Segment über etliche Pixel rechts und links des Peaks. Die Integration des Peaks erfolgte einmal ohne Vorgabe von Position und Breite (FWHM;= Full Width Half Maximum) und ein zweites und drittes Mal mit vorgegebener Position und Breite des Peaks (bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$ ). Hierfür wurde nach Anfitten der am besten definierten Peaks, also der intensivitätsstärksten Segmente durch Extrapolation die Position und Breite der Peaks in allen Segmenten bestimmt. Dies ist wichtig, um das Breiterwerden der Schichtlinie mit zunehmendem Abstand vom Meridian und den Verlauf nach außen im Diffraktionsbild berücksichtigen zu können. Eine vierte Integration wurde mit „Origin“ so durchgeführt, dass nur in den intensivitätsschwächeren Endbereichen der Schichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Position und FWHM vorgegeben wurden. Aus den jeweils vier Analysen wurde ein Mittelwert gebildet. Die Intensitäten der Peaks in allen Segmenten wurden gegen die Segmentposition aufgetragen und so die Intensitätsprofile der Schichtlinie unter verschiedenen Bedingungen mit „Origin“ graphisch dargestellt.

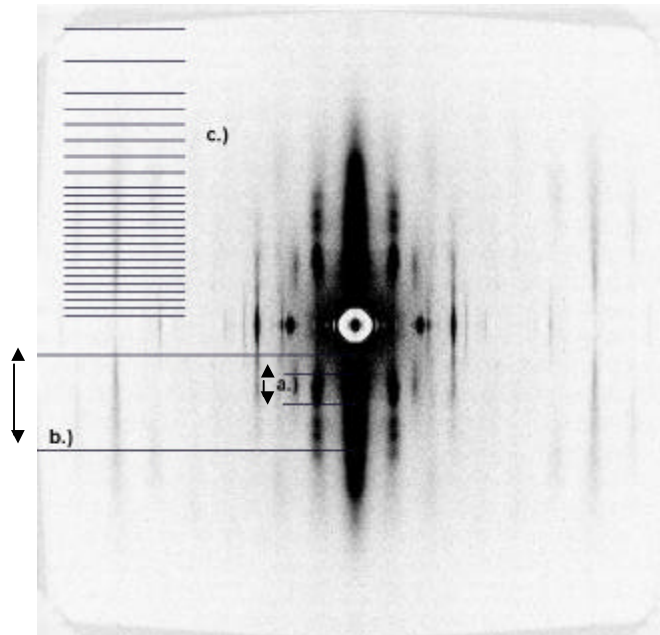
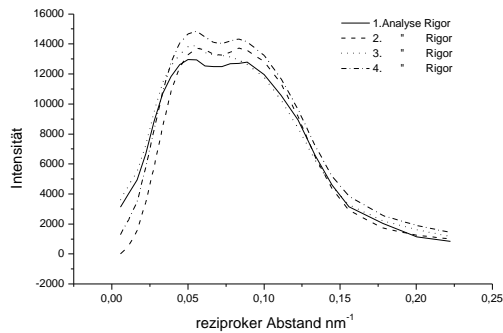
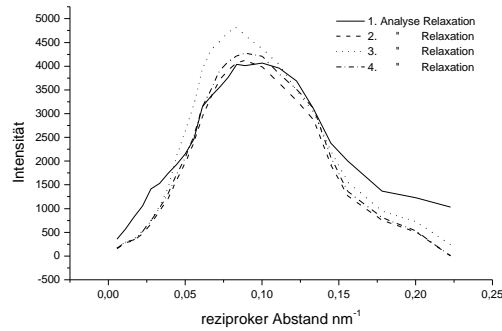


Abb.5: Darstellung der verschiedenen Bereiche für die Integration der Schichtlinien; a.) Integration eines 76 Pixel breiten Segmentes parallel zum Meridian für die Darstellung der ersten Schichtlinie des Myosins und des Aktins; b.) Integration eines 310 Pixel breiten Segmentes parallel zum Meridian für die Gesamt-Darstellung der Myosin- und Aktin-Schichtlinien; c.) Serie von Segmenten parallel zum Meridian für die Integration der  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie (Segmenttechnik), für die Darstellung als Funktion der radialen Position, mit 16 Segmenten/24 Pixel breit, 6 Segmenten/48 Pixel breit und 3 Segmenten/96 Pixel breit.

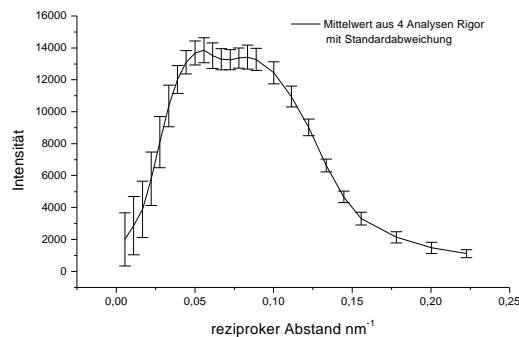
Hinsichtlich der Datenanalyse mit der Segmenttechnik stellt sich die Frage, inwieweit die gezeigten Profile von dieser Analyse beeinflusst werden. Abb.6 zeigt für zwei Beispiele (Rigor, Abb.6a. und Relaxation, Abb.6b.) die Ergebnisse der einzelnen Analysen, sowie die jeweilige Standardabweichung der Intensitäten für die zusammengefassten Analysen (Abb.6c. und d.). Aus der in Abb.6 dargestellten Standardabweichung des Mittelwertes einer 4-fachen Analyse der  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie ergibt sich, dass die Reproduzierbarkeit der Analyse unter Rigor-Bedingungen  $\pm 5\%$  der maximalen Intensität beträgt, unter Relaxations-Bedingungen liegt die Reproduzierbarkeit bei  $\pm 7\%$  der maximalen Intensität. Ebenso liegen in Abb. 6b. die Intensitätsmaxima der einzelnen Analysen bei  $0.09 \pm 0.008 \text{ nm}^{-1}$  (SD), was einer Standardabweichung für die Position des Maximums von  $\pm 5\%$  entspricht.



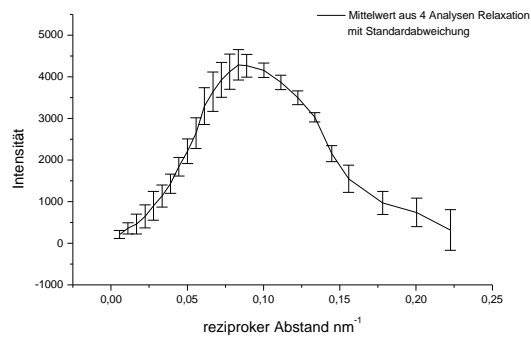
a.)



b.)



c.)



d.)

Abb.6: Dargestellt sind vier einzelne Analysen der Aktin-Schichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  mit der ‚Segment-Technik‘ aus Diffraktionsbildern der Versuche mit Muskelfasern in Gegenwart von BDM. a.) und c.) Muskelfasern im Rigor; b.) und d.) Muskelfasern unter Relaxations-Bedingungen; In c.) und d.) sind die entsprechenden Standardabweichungen des Mittelwertes aus 4 Analysen gezeigt.

Von der Segmenttechnik abweichend wurde zur Analyse der Aktin-Schichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  für die Versuche mit  $\text{AlF}_4$  den Muskelfasern unter Rigor-Bedingungen zugegeben eine von C. v. Grumbkow (Abt. Molekular- und Zellphysiologie) entwickelte automatische Analyse Routine verwendet (vgl. dazu Diskussion 4.2.1). Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Analyse mit der ‚Segment-Technik‘ bestimmt dieses Programm für jedes hier nur ein Pixel breite Segment den Hintergrund neben der Schichtlinie automatisch und subtrahiert diesen. Wie in der Diskussion erläutert (Abschnitt 4.2.1), ist die Hintergrundsubtraktion mit dieser Routine nicht ganz ausgereift, da über einen zu schmalen Bereich der Hintergrund bestimmt wird und auch das Schmälerwerden der Schichtlinie nach innen hin nicht berücksichtigt wird.

Für die endgültige Darstellung aller Profile mussten schließlich auch noch die absoluten axialen und radialen Positionen der Reflexe bestimmt werden. Als Referenz hierfür dient

der sehr prominente, dritte Myosin-Reflex auf dem Meridian, der beim Kaninchen-Skelettmuskel im Rigor (20°C, 170 mM Ionenstärke) bei  $14,43 \text{ nm}^{-1}$  liegt (Xu et al., 1997). Darauf basierend wurden für alle erstellten Profile die Pixel in Abstände ( $\text{nm}^{-1}$ ) umgerechnet und in ‚Origin‘ entsprechend dargestellt.

Da in den verschiedenen Meßperioden am Synchrotron die Bedingungen (Strahlintensität, Strahlprofil, Kameralänge etc.) geringfügig verschieden waren, können nur jeweils Daten gleicher experimenteller Bedingungen aus einer Meßperiode aufaddiert und direkt verglichen werden. Daher wurden in jeder Meßzeit auch alle nötigen Kontroll-Bedingungen (wie Rigor und Relaxiert) wieder neu aufgenommen und analysiert.

Hinsichtlich einer statistischen Auswertung dieser Daten ist zu sagen, dass eine Abschätzung der statistischen Signifikanz der Daten nicht wirklich möglich ist. Die hier gezeigten Daten (Diffraktionsbilder und Profile) stellen bereits Mittelwerte dar, weil immer Diffraktionsbilder von mehreren (bis zu 8) Registrierungen aus verschiedenen (bis zu 4) Einzelfaserpräparationen aufaddiert werden müssen, damit vor allem die schwachen Schichtlinien neben dem Meridian überhaupt analysiert werden können (ausreichendes Signal-Rausch-Verhältnis). Das bedeutet aber auch, dass eine Analyse einzelner Diffraktionsbilder und damit eine statistische Auswertung der Variabilität von Experiment zu Experiment nicht durchführbar ist, da eine wiederholte Aufnahme ganzer Datensätze wegen limitierter Meßzeiten am Synchrotron nicht möglich ist. Aus diesen Gründen muss sich die Datenanalyse und Interpretation der Parameter auf eine qualitative Betrachtung beschränken.

## 2.6 Zusammenfassung des Ablaufs der elektronischen Datenverarbeitung mit den Schritten für die Bearbeitung von Diffraktionsbildern und Bildern des Gerätehintergrundes:

Konvertierung des ‚Fuji-Datenformates mit „unfuji“.
Normierung auf den Ionisationskammerwert jeder Registrierung (AIF <sub>4</sub> -Aktiv und BDM) bzw. auf den Hauptstrahl (AIF <sub>4</sub> -Rigor) mit „fromham“.
Zentrieren und Rotieren des Bildes mit „Q“, dabei Zurechtschneiden auf 2000*2000 Pixel
Falten des Bildes mit „Q“.
Addition von Bildern gleicher Bedingungen bzw. der aufgenommenen Gerätehintergründe für jedes Experiment mit „wsum“.
Erstellen eines Profils des Hauptstrahls in jedem Bild für die Subtraktion des Geräte-Hintergrundes mit „mcut“.

Integration der Fläche des horizontalen Profils des Hauptstrahls nach Konvertierung (mit dem Programm „mcutconv“) im Programm „Origin“ (Microcal, USA) am PC, daraus Berechnung, wieviel Geräte-Hintergrund (mit/ohne Kreatinphosphokinase) subtrahiert werden muß, damit der Hauptstrahl im Muskeldiffraktionsbild exakt auf Null reduziert wird.
Subtraktion des unter den entsprechenden Bedingungen aufgenommenen Geräte-Hintergrundes mit „wsum“.
<u>Für die Versuche in Gegenwart von BDM:</u>
<i>Integration der Gesamtintensität des Bildes von Pixel 0 bis 1999 horizontal,</i>
<i>Konvertierung, Integration mit „Origin“, wie oben beschrieben und Berechnung des Normierungsfaktors.</i>
<i>Normierung auf Gesamtintensität im Rigor.</i>
Erstellen eines Profils der ersten Myosin- und Aktin-Schichtlinie bei $1/42.9 \text{ nm}^{-1}$ bzw, $1/37 \text{ nm}^{-1}$ mit „mcut“.
Integration eines schmalen Bereichs von Pixel 1164 bis 1240, also 76 Pixel breit (der Bereich des äquatorialen 1.1-Reflexes).
Erstellen eines Profils aller Schichtlinien mit „mcut“.
Integration eines breiten Bereichs von Pixel 1090 bis 1400, also 310 Pixel breit.
Erstellen von Profilen von nebeneinander liegenden Segmenten über die ganze Breite des halben (gefalteten) Diffraktionsbildes weg für die Analyse der Aktinschichtlinie bei $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$ mit „mcut“.
Integration über je 24 Pixel Breite von Pixel 1000-1384
Integration über je 48 Pixel Breite von Pixel 1385-1672
Integration über je 96 Pixel Breite von Pixel 1673-1960
Für die Integration mit „Origin“ Konvertierung wie oben beschrieben.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Getrennte Betrachtung der Röntgendiffraktionsbilder

Die Ergebnisse dieser Arbeit stammen aus drei verschiedenen Ansätzen. Bei geringer und hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration wurden (1.) Querbrücken-Zustände untersucht, die durch Bindung von MgADP und  $\text{AlF}_4$  an die Myosinköpfe in aktivierten Muskelfasern akkumulierten (nachfolgend auch  $\text{AlF}_A$  genannt), (2.) Querbrücken-Zustände, die durch Bindung von MgADP und  $\text{AlF}_4$  an nukleotidfreie Myosinköpfe (Rigor-Bedingungen) in den Muskelfasern entstanden (nachfolgend auch  $\text{AlF}_R$  genannt) und (3.) Querbrücken-Zustände, die in Gegenwart von BDM (2,3-Butandion-Monoxim) akkumulierten. Durch Zugabe von  $\text{AlF}_4$  zu  $\text{Ca}^{++}$ -aktivierten Muskelfasern wird das Aluminiumfluorid statt Phosphat in die Nukleotidbindungstasche des Myosinkopfes gebunden, wir erhalten einen Zustand analog zum  $\text{AMDP.P}_i$ -Zustand, der jedoch MgADP. $\text{AlF}_4$  gebunden hat (Chase et al., 1994; Regnier et al., 1999). Durch Zugabe von MgADP und  $\text{AlF}_4$  im nukleotidfreien Rigor-Zustand wurde untersucht, ob auch auf diese Weise (sozusagen rückwärts im Querbrückenzyklus, vgl. Abb.1 in der Einleitung), ein  $\text{AMDP.P}_i$ -Analog-Zustand erreicht werden kann. Im dritten Ansatz sollte der Querbrücken-Zustand untersucht werden, der vorherrscht wenn durch Zugabe von BDM die aktive Kraftentwicklung unterdrückt wird, also ebenfalls ein  $\text{AMDP.P}_i$ -Zustand vor Kraftgenerierung (Regnier et al., 1995).

Unter allen drei Bedingungen wurden die Akto-Myosin-Komplexe durch 2D-Röntgendiffraktion von isolierten Muskelfasern daraufhin untersucht, ob sie ohne  $\text{Ca}^{++}$ , also bei nicht aktivierten Aktinfilamenten eine Konformation wie  $\text{ADP.P}_i$ -Zustände mit Myosin-Schichtlinien bei hoher Temperatur einnehmen. Weiterhin wurde überprüft, ob sie strukturelle Merkmale für stereospezifisch gebundene Querbrücken aufweisen (z.B. Rigor-ähnlich oder wie Querbrücken unter aktiver Kraftgenerierung), oder Merkmale für nicht-stereospezifisch gebundene, nicht-kraftgenerierende Zustände zeigen (z.B. Querbrücken unter Relaxations-Bedingungen). Insbesondere war zu prüfen, welche Effekte  $\text{Ca}^{++}$ -Bindung und damit Aktivierung der Aktinfilamente auf diese verschiedenen Akto-Myosin-Komplexe hat bzw. ob es dabei zu großen strukturellen Umlagerungen kommt oder nicht. Im Folgenden sollen die registrierten 2D-Röntgendiffraktionsbilder der drei Ansätze bei niedriger und hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration vergleichend betrachtet werden. Gezeigt sind die Diffraktionsbilder nach Addition der einzelnen Aufnahmen von 2-4 verschiedenen Einzelfaser-Präparationen. Die Bilder wurden (wie im Methodenteil beschrieben) nach der Standard Methode normiert, zentriert und gefaltet. Jedes Diffraktionsbild ist in drei

Helligkeitsstufen dargestellt. Erstens, mit mittlerer Intensität für die Gesamtdarstellung (Abb. 7a.-25a.), zweitens mit der höchsten Intensität um den äusseren Bereich der  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie (Abb. 7b.-25b.) sichtbar zu machen und drittens, mit geringster Intensität um den inneren Bereich mit der ersten Aktin- und Myosin-Schichtlinie bei  $1/37 \text{ nm}^{-1}$  bzw.  $1/42.9 \text{ nm}^{-1}$  (Abb. 7c.-25c.) zu verdeutlichen. Zwei Standard-Bedingungen, Relaxation (niedrige  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration) und der nukleotidfreie Rigor-Zustand sind für alle drei Ansätze in den Abbildungen 7a.-c. bzw. 8a.-c. als Kontrollen mit dargestellt. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Zuständen lassen sich hier oft mit dem blossen Auge nachvollziehen.

Aus Gründen der besseren Vergleichsmöglichkeit von Diffraktionsbildern und Intensitätsprofilen unter den verschiedenen Bedingungen werden die entsprechenden Abbildungen zusammen am Ende des Ergebnisteils gezeigt.

### 3.1.1 Standard-Bedingungen zum Vergleich

#### a. Relaxations-Bedingungen

Um später die Diffraktionsbilder in Gegenwart von  $\text{AlF}_4$  oder BDM mit Relaxations-Bedingungen, also mit AMT und  $\text{AMDP.P}_i$ -Komplexen vergleichen zu können, sowie um Effekte des  $\text{AlF}_4$  oder des BDM selbst, von Effekten, die z.B. durch  $\text{Ca}^{++}$ -Zugabe entstehen, unterscheiden zu können, wurden als Kontrolle zunächst für jede Präparation Diffraktionsbilder unter Relaxations-Bedingungen aufgenommen. Entsprechend der nicht-stereospezifischen Anheftung der Myosinköpfe an Aktin unter diesen Bedingungen zeigt sich die  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie in den Röntgendiffraktionsbildern unter Relaxations-Bedingungen bei  $2^\circ\text{C}$  (Abb.7a.+b.) sehr schwach gegenüber der  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie in den Diffraktionsbildern unter Rigor-Bedingungen bei  $2^\circ\text{C}$  (Abb.8a.+b.). Unter Relaxations-Bedingungen tragen Myosinköpfe („weak-binding“ states) nicht zur Intensität der Aktin-Schichtlinien bei; die Intensitätsverteilung auf der  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie entspricht hier in etwa der Intensität des dünnen Filamentes ohne angeheftete Querbrücken. Jedoch bedingt die regelmäßige Anordnung der Myosinköpfe, die unter Relaxations-Bedingungen vorwiegend der helikalen Struktur des Myosinfilamentes folgen, eine gut sichtbare erste Myosin-Schichtlinie bei  $1/42.9 \text{ nm}^{-1}$ .

## b. Rigor-Bedingungen

Unter nukleotidfreien Bedingungen binden alle Myosinköpfe an Aktin (Cooke and Franks 1980; Cooke and Thomas 1980; Lovell and Harrington 1981) und nehmen dabei eine stereospezifische Konformation ein. Diese Myosinköpfe repräsentieren einen Typ stereospezifisch gebundener Myosinköpfe, die mit den Querbrücken-Zuständen in Gegenwart von  $\text{AlF}_4$  bzw. BDM verglichen werden sollen. Aufgrund stereospezifischer Anheftung aller Myosinköpfe an Aktin zeigt sich die  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie in den Abbildungen der Rigor-Bedingungen (Abb.8a.+b.) deutlich intensiver im Helligkeitsprofil und mit ihrem Intensitätsmaximum in Richtung Meridian verschoben im Vergleich zu Relaxations-Bedingungen (Abb.7a.+b.). Die erste Myosin-Schichtlinie bei  $1/42.9 \text{ nm}^{-1}$  ist nicht zu erkennen, da die Myosinköpfe jetzt eine Aktin-spezifische Orientierung einnehmen. Auffällig dagegen ist die erste Aktin-Schichtlinie bei  $1/37 \text{ nm}^{-1}$  mit zwei punktförmigen Maxima, die durch das 'lattice sampling' (Huxley and Brown 1967) bzw. die präzise Anordnung der dünnen und dicken Filamente im Rigor hervorgerufen werden.

### 3.1.2 Die verschiedenen Analog-Zustände bei aktiviertem und nicht-aktiviertem Aktinfilament

#### I. AM.MgADP. $\text{AlF}_4$ -Komplexe (Aktin-Myosin-Komplexe mit gebundenem Phosphat-Analogon) akkumuliert unter Aktivierungs-Bedingungen ( $\text{AlF}_A$ )

##### A. Übersicht der 2D-Röntgendiffraktionsbilder der $\text{AlF}_A$ Versuche

##### a. AM.MgADP. $\text{AlF}_4$ -Komplexe bei niedriger Calcium-Konzentration (Relaxations-Bedingungen) bei $2^\circ\text{C}$

Bei aktivem ‚Turnover‘ (ATP-Hydrolyse) in Gegenwart von  $\text{AlF}_4$  kann das  $\text{AlF}_4$  während die Querbrücken den aktiven Querbrücken-Zyklus durchlaufen das Phosphat in der Nukleotidbindungstasche ersetzen (Chase et al., 1994; Chase et al., 1993). Auf diese Weise wurde auch hier durch Bindung von  $\text{AlF}_4$  an die Myosinköpfe ein  $\text{MgADP}.\text{AlF}_4$ -Zustand erzeugt. Das in diesem Zustand unter Relaxations-Bedingungen (ohne  $\text{Ca}^{++}$ ) aufgenommene Diffraktionsbild (Abb.11a.-c.) sieht grundsätzlich dem Diffraktionsbild eines relaxierten Muskelfaser-Präparates sehr ähnlich. Zum Vergleich wurden zuvor nicht

nur Diffraktionsbilder unter Relaxations-Bedingungen ohne  $\text{AlF}_4$  registriert (Abb.7a.-c.), sondern auch nach Zugabe von  $\text{AlF}_4$  direkt zu Relaxations-Bedingungen, also ohne aktiven ‚Turnover‘ (Abb.9a.-c.). Unter diesen Bedingungen kann das  $\text{AlF}_4$  nicht das  $\text{P}_i$  in der Nukleotidbindungstasche ersetzen, der Myosinkopf hat nach wie vor  $\text{MgADP.P}_i$  gebunden. Das Röntgendiffraktionsbild des Relaxations-Zustands mit  $\text{MgADP}$  und  $\text{AlF}_4$  in der Inkubationslösung und vor einer Aktivierung (Abb.9a.-c.) lässt gegenüber dem Diffraktionsbild unter Relaxations-Bedingungen ohne  $\text{AlF}_4$  (Abb.7a.-c.) keine wesentlichen Unterschiede erkennen. Demgegenüber fällt aber in Abbildung 11a., also unter Relaxations-Bedingungen mit  $\text{MgADP}$  und  $\text{AlF}_4$  nachdem  $\text{MgADP.AIF}_4$  an die Myosinköpfe gebunden hat auf, dass die Myosin-Schichtlinien deutlicher sind als vor Bindung von  $\text{MgADP.AIF}_4$ . Diese Verstärkung der Myosin-Schichtlinien spricht für eine Zunahme der Ordnung in den Myosinfilamenten durch Bindung von  $\text{MgADP}$  und  $\text{AlF}_4$  an die Myosinköpfe. Diese erhöhte Ordnung soll durch eine charakteristische Konformation des Myosinkopfes mit  $\text{MgADP.AIF}_4$  zustande kommen (Urbanke and Wray 2001; Xu et al., 2003).

b.  $\text{AM.MgADP.AIF}_4$ -Komplexe bei hoher Calcium-Konzentration (unter Aktivierung) bei  $2^\circ\text{C}$

Wie bereits erwähnt wurde durch eine kurze Aktivierung der Muskelfasern (hohe  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration und ATP) in Gegenwart von  $\text{MgADP}$  und  $\text{AlF}_4$  das an den Myosinkopf gebundene  $\text{P}_i$  durch  $\text{AlF}_4$  ersetzt. Auf diese Weise wird die aktive Kraftentwicklung der Fasern fast vollständig unterdrückt. Der dabei entstandene Analog-Zustand kann nicht nur ohne  $\text{Ca}^{++}$  sondern auch mit  $\text{Ca}^{++}$  untersucht werden (vgl. I a), da das  $\text{AlF}_4$  offensichtlich nur extrem langsam abdiffundiert bzw. sich nur extrem langsam umlagert. Die fast vollständig unterdrückte aktive Kraft bedeutet, dass der mit  $\text{MgADP.AIF}_4$  entstandene Querbrücken-Zustand und seine Bindung an das aktivierte Aktinfilament (mit  $\text{Ca}^{++}$ ) ohne störende Effekte von anderen, z.B. kraftentwickelnden Querbrücken-Zuständen untersucht werden kann. Das Diffraktionsbild, aufgenommen mit  $\text{MgADP.AIF}_4$  in der Nukleotidbindungstasche des Myosinkopfes bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration (Aktivierung) (Abb.10a.-c.) zeigt im Vergleich zum Diffraktionsbild bei niedriger  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration (Relaxations-Bedingungen) (Abb.11a.-c.) keine gravierenden Unterschiede.  $\text{Ca}^{++}$ -Aktivierung des Aktinfilamentes führt hier also nicht zu einer gänzlich anderen Konformation des Akto-Myosin-Komplexes. Allerdings zeigen sich bei genauer Betrachtung durchaus gewisse Unterschiede. Die sechste Aktin-Schichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  z.B. fällt im Diffraktionsbild mit im Myosinkopf gebundenem  $\text{MgADP.AIF}_4$  bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -

Konzentration gegenüber dem Diffraktionsbild bei niedriger  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration durch eine höhere Intensität auf. Jedoch sind beide Diffraktionsbilder mit  $\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$  am Myosinkopf sowohl ohne  $\text{Ca}^{++}$  als auch mit  $\text{Ca}^{++}$  vollkommen verschieden vom Diffraktionsbild unter Rigor-Bedingungen (Abb.8a.-c.), welches einen stereospezifisch gebundenen Zustand repräsentiert. Besonders ist hier auf die im Rigor mit ihrem Intensitätsmaximum deutlich zum Meridian hin verschobene Aktin-Schichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  hinzuweisen, sowie auf die sehr intensive erste Aktin-Schichtlinie bei  $1/37 \text{ nm}^{-1}$  und auf das Fehlen der ersten Myosin-Schichtlinie bei  $1/42.9 \text{ nm}^{-1}$ .

c.  $\text{AM}\cdot\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$ -Komplexe (nach Aktivierung) bei  $12^\circ\text{C}$  mit hoher und niedriger Calcium-Konzentration

Auch bei höherer Temperatur wurden Diffraktionsbilder der Muskelfasern mit  $\text{AlF}_4$  statt  $\text{P}_i$  im Myosinkopf registriert, um zu überprüfen, ob die Myosinköpfe mit  $\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$  bei geringer  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration, eine ähnliche Konformation wie Myosinköpfe mit  $\text{MgADP}\cdot\text{P}_i$  einnehmen ('closed conformation'), die ihnen eine myosinspezifische helicale Anordnung erlaubt (Xu et al., 2003) und zu einer deutlichen Verstärkung der Myosin-Schichtlinien führt. Ferner war zu klären, welchen Effekt  $\text{Ca}^{++}$ -Aktivierung des Aktinfilamentes auf die Konformation der  $\text{AM}\cdot\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$ -Komplexe bei  $12^\circ\text{C}$  hat. Dabei wurde die Temperatur ( $12^\circ\text{C}$ ) so gewählt, dass die bei höherer Temperatur zu erwartende abnehmende Sättigung der Querbrücken mit  $\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$  (das war für  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  gezeigt worden; (Kraft et al., 1992)) und die daraus resultierende grössere Fraktion von kraftentwickelnden Querbrücken bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration möglichst limitiert sein sollte. Parallel durchgeführte Registrierungen der aktiven Kraftentwicklung zeigten, dass bei  $12^\circ\text{C}$  unter den hier gewählten Bedingungen ( $2\text{mM MgADP}\cdot\text{AlF}_4$ ) etwa 10% der maximal möglichen isometrischen Kraft erzeugt werden. Nach wie vor ist also der grösste Teil der Querbrücken in einem nicht-kraftgenerierenden  $\text{AMDP}\cdot\text{P}_i$ -Analog-Zustand arretiert. Andererseits ist üblicherweise zumindest unter Relaxations-Bedingungen bei  $12^\circ\text{C}$  bereits eine deutliche Verstärkung der Myosin-Schichtlinien zu erkennen, sodass uns damit ein weiteres Kriterium für die Zuordnung der Querbrücken-Zustände zur Verfügung steht.

Auch für die  $\text{AM}\cdot\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$ -Komplexe zeigt das Röntgendiffraktionsbild unter Relaxations-Bedingungen bei einer Temperatur von  $12^\circ\text{C}$  intensivere Myosin-Schichtlinien als bei  $2^\circ\text{C}$  (Abb.12a.), was auf eine dem  $\text{AM}\cdot\text{MgADP}\cdot\text{P}_i$ -Komplex ähnliche Konformation schließen lässt. Auch die Aktin-Schichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  zeigt etwas höhere Intensität als bei  $2^\circ\text{C}$  unter Relaxations-Bedingungen. Wie bereits für  $2^\circ\text{C}$  gezeigt, hat auch bei  $12^\circ\text{C}$  die Erhöhung der  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration (Abb.13a.-c.) keinen wesentlichen Einfluss auf das

Diffractionsbild der Muskelfasern mit AM.MgADP.AIF<sub>4</sub>-Komplexen. Es sind zwar kleine Unterschiede erkennbar, die ohne Ca<sup>++</sup> sehr deutlich erkennbaren Myosin-Schichtlinien bleiben aber auch mit Ca<sup>++</sup> in ihrer Intensität erhalten. Die erste Aktin-Schichtlinie bei 1/37 nm<sup>-1</sup> ist auch hier sowohl ohne als auch mit Ca<sup>++</sup> nicht zu erkennen.

Um einige Unterschiede in den Diffractionsbildern im Detail untersuchen zu können, wurden Intensitätsprofile einzelner Schichtlinien erstellt. Es sollen hier diejenigen Schichtlinien eingehender untersucht werden, die für die Einordnung z.B. des AM.MgADP.AIF<sub>4</sub>-Komplexes als Analog-Zustand für Zwischen-Zustände des Querbrückenzyklus bei ATP-Hydrolyse aufschlussreich sind.

## B. Analyse einzelner Schichtlinien aus den Diffractionsbildern von AM.MgADP.AIF<sub>4</sub>-Komplexen der AIF-A Versuche (integrierte Intensitäten)

- a. Myosin- und Aktin-Schichtlinien für AM.MgADP.AIF<sub>4</sub>-Komplexe bei hoher und niedriger Calcium-Konzentration; (AM.MgADP.AIF<sub>4</sub>-Komplexe unter aktivem ‚Turnover‘ generiert; AIF-A)

Die Intensitäten der Myosin- und Aktin-Schichtlinien in den oben gezeigten Diffractionsbildern (Abb.12a./13a.), aufgenommen bei 12°C, werden durch Integration parallel zum Meridian am besten erfasst. Wie bereits erläutert, ist die deutliche Zunahme der Intensität der Myosin-Schichtlinien bei steigender Temperatur ohne Ca<sup>++</sup> (Relaxations-Bedingungen) ein charakteristisches Merkmal für eine spezifische (‚closed‘) Konformation der Myosinköpfe mit MgADP.P<sub>i</sub>, die der Kraftgenerierung vorausgeht (Urbanke and Wray 2001; Xu et al., 2003). Als Beispiel ist in Abb.35 ein Profil der parallel zum Meridian integrierten Schichtlinien aus einem Diffractionsbild unter Relaxations-Bedingungen bei 12°C gezeigt. Die Myosin-Schichtlinien 1-6 sind hier deutlich zu erkennen. Demgegenüber zeigen Querbrücken-Zustände, die stereospezifisch an Aktin binden, z.B. im Rigor, sowohl bei niedriger als auch bei hoher Temperatur kaum Myosin-Schichtlinien. Dafür nehmen hier infolge der stereospezifischen Bindung der Myosinköpfe an Aktin und ihrer resultierenden aktinspezifischen Orientierung die Aktin-Schichtlinien an Intensität deutlich zu, was in dem Intensitätsprofil der Schichtlinien eines Diffractionsbildes im Rigor deutlich zu erkennen ist (Abb.36). Aus eben diesem Grunde sind auch in Diffractionsbildern aufgenommen während isometrischer Kraftgenerierung die Myosin-Schichtlinien sehr schwach, bei Zunahme der Aktin-Schichtlinien (vgl. Diskussion, Abschnitt 4.5). Aus den Profilen (Abb.26) wird deutlich, was bereits in den Diffractionsbildern der Muskelfasern mit MgADP.AIF<sub>4</sub> (Abb.12a./13a.) auffiel: Die Myosin-Schichtlinien 1-5 sind deutlich erkennbar,

$\text{Ca}^{++}$  hat nur wenig Effekt auf ihre Intensität, lediglich die erste Myosin-Schichtlinie nimmt etwas ab (vgl. Abb.27). Erkennbar ist in diesen Profilen auch eine geringfügige Zunahme der Aktin-Schichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$ , sowie der Aktin-Schichtlinie bei  $1/5.1 \text{ nm}^{-1}$ , was größtenteils durch die Bindung von  $\text{Ca}^{++}$  an das dünne Filament verursacht wird (Kraft et al., 1999). Die hier offenbar sowohl mit als auch ohne  $\text{Ca}^{++}$  nur nicht-stereospezifisch an Aktin bindenden Querbrücken mit  $\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$  verstärken die Aktin-Schichtlinien höchstens bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration geringfügig (Kraft et al., 1998).

b. Erste Aktin- und Myosin-Schichtlinie für  $\text{AM}\cdot\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$ -Komplexe bei hoher und niedriger Calcium-Konzentration ( $\text{AlF}_4^-$ )

Die Intensitäten der ersten Schichtlinie des Aktins und des Myosins können als Indikatoren dafür betrachtet werden, ob die Myosinköpfe stereospezifisch am Aktin angeheftet sind (hohe Intensität der Aktin-Schichtlinie) oder ob sie stattdessen als nicht-stereospezifisch gebundene Zustände zu einer hohen Intensität der Myosin-Schichtlinie beitragen. Somit lässt auch die Analyse der Intensitätsverteilung zwischen diesen beiden eng benachbarten Schichtlinien Aufschlüsse darüber zu, ob ein Querbrücken-Zustand zu den nicht-stereospezifisch gebundenen Querbrücken-Zuständen gehört, die auch bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration keinen wesentlichen Beitrag zur Aktin-Schichtlinie machen, oder ob sich spätestens mit  $\text{Ca}^{++}$  deutliche Veränderungen der Intensitätsverteilung ergeben. Da die beiden Schichtlinien sehr nahe beieinander liegen, wurde hier eine Integration über die Intensitätsmaxima parallel zum Meridian durchgeführt (vgl. Material und Methoden).

Als Beispiele für nicht-stereospezifisch gebundene Querbrücken-Zustände zeigen alle Intensitätsprofile der Relaxations-Bedingungen aus den drei Versuchsansätzen (Abb.27,30,33) einen Peak bei etwa  $1/42.9 \text{ nm}^{-1}$ , was der ersten Myosin-Schichtlinie entspricht. Im Gegensatz dazu sieht man in den Profilen aus den Diffraktionsbildern unter Rigor-Bedingungen (Abb.27,30,33) jeweils einen deutlich grösseren Peak bei etwa  $1/37 \text{ nm}^{-1}$ , was der ersten Aktin-Schichtlinie entspricht. An der Position des Myosin-Peaks ( $1/42.9 \text{ nm}^{-1}$ ), sieht man in den Rigor-Profilen höchstens eine kleine Schulter, da die Myosinköpfe stereospezifisch an Aktin gebunden sind und kaum einen Beitrag zur Myosin-Periodizität liefern.

Die zwei Profile der Relaxations-Bedingungen mit und ohne  $\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$  in der Lösung bei  $2^\circ\text{C}$ , also vor Inkorporation von  $\text{AlF}_4^-$  in die Nukleotidbindungstasche des Myosinkopfes, zeigen einen ähnlichen Verlauf mit einem deutlichen Myosin-Peak, der bei  $\text{AlF}_4^-$ -Zugabe in die Lösung (ohne Inkorporation) lediglich etwas schwächer wird (Abb.27).

Jedoch hat die Bindung von  $\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$  in die Nukleotidbindungstasche des Myosinkopfes einen Effekt auf die Intensität der ersten Myosin-Schichtlinie, wie später auch noch für die Aktin-Schichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  gezeigt wird (s. unten, 3.1.2, l. B. c.). Die erste Myosin-Schichtlinie zeigt eine Zunahme der Intensität (Abb.27) gegenüber der Relaxation vor Bindung von  $\text{AlF}_4$ , was für einen direkten Effekt von  $\text{AlF}_4$  auf die Myosinkopfstruktur spricht. Nach Inkorporation von  $\text{AlF}_4$  in den Myosinkopf zeigt der Myosin-Peak bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration ( $2^\circ\text{C}$ ) eine kleine Abnahme der Intensität. Gleichzeitig ist ein schwacher Aktin-Peak zu erkennen, der auf eine geringfügige Strukturänderung im Akto-Myosin-Komplex bei Bindung an das aktivierte Aktinfilament hindeutet.

Bei  $12^\circ\text{C}$  zeigt das Intensitätsprofil bei integriertem  $\text{AlF}_4$  unter Relaxations-Bedingungen eine deutliche Erhöhung des Myosin-Peaks, was schon mit dem blossen Auge im Röntgendiffraktionsbild zu erkennen war. Die Intensität des Myosin-Peaks mit  $\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$  bei  $12^\circ\text{C}$  nimmt bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration gegenüber Relaxations-Bedingungen etwas ab. Auch bei  $12^\circ\text{C}$  ist mit  $\text{Ca}^{++}$  eine kleine Intensitätszunahme im Bereich des Aktin-Peaks zu erkennen. Insgesamt sind die Effekte einer  $\text{Ca}^{++}$ -Aktivierung des Aktinfilamentes auf die erste Aktin- und Myosin-Schichtlinie des hier untersuchten Querbrücken-Zustandes sowohl bei  $2^\circ\text{C}$  als auch bei  $12^\circ\text{C}$  sehr klein und vergleichbar mit dem Effekt von  $\text{Ca}^{++}$  auf die nicht-stereospezifisch an Aktin bindenden Querbrücken („weak-binding“ states) mit  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  (Kraft et al., 1999).

c. Die  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie nach Inkorporation von  $\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$  in den Myosinkopf. Effekte hoher bzw. niedriger Calcium-Konzentration ( $\text{AlF}_4$ )

Die Aktin-Schichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  im Röntgendiffraktionsbild wird vor allem von stereospezifisch bindenden Querbrücken beeinflusst (Squire 1981), sie zeigt aber auch einen allerdings kleinen Intensitätsanstieg wenn  $\text{Ca}^{++}$  an die Regulatorproteine bindet (Kraft et al., 2002). Nicht-stereospezifisch an ein nicht  $\text{Ca}^{++}$ -aktiviertes Aktinfilament gebundene Myosinköpfe (z.B.  $\text{MgATP}$ - und  $\text{MgADP}\cdot\text{P}_i$ -Zustände) beeinflussen die Intensität der  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie nur geringfügig. Auch nach Zugabe von  $\text{Ca}^{++}$  ändert sich für Querbrücken-Zustände nicht-stereospezifischer Aktinbindung die Akto-Myosin-Konformation nur wenig, es ist höchstens ein kleiner zusätzlicher Anstieg der Intensität zu verzeichnen (Kraft et al., 1999). Demgegenüber zeigt sich eine deutliche Intensitätszunahme und eine Verschiebung des Intensitätsmaximums, wenn Querbrücken-Zustände stereospezifisch an Aktin binden, so z.B. im Rigor oder bei aktiver Kraftentwicklung (Kraft et al., 2002; Squire 1981). Daher eignet sich die genaue Analyse



dieser Schichtlinie bei geringer und hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration als Parameter für die Differenzierung der Querbrücken mit verschiedenen Analoga als Querbrücken-Zustände nicht-stereospezifischer, bzw. stereospezifischer Aktinbindung („weak“- bzw. „strong-binding“-states). Zunächst wird hier untersucht, um was für Zustände es sich mit  $\text{MgADP}\cdot\text{AIF}_4$ , das nach Aktivierung der Fasern in die Nukleotidbindungstasche des Myosinkopfes integriert ist, handelt.

Das Profil der  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie unter Relaxations-Bedingungen mit  $\text{AIF}_4$  im Inkubationsmedium aber bevor es  $\text{P}_i$  vom Myosinkopf verdrängt (Abb.28) entspricht etwa dem Intensitätsprofil unter Relaxations-Bedingungen. Nach Aktivierung der Fasern in Gegenwart von  $\text{AIF}_4$ , wenn also  $\text{MgADP}\cdot\text{AIF}_4$  am Myosinkopf gebunden hat, ist die Intensität mit  $\text{Ca}^{++}$  deutlich höher und zeigt eine Verlagerung des Intensitätsmaximums in Richtung Meridian. Beide Effekte, also Anstieg und Verlagerung sind wesentlich geringer als bei einem Übergang von Relaxations- zu Rigor-Bedingungen. Werden die Muskelfasern jetzt wieder in Relaxations-Bedingungen (ohne  $\text{Ca}^{++}$ ) gebracht, kommt das Intensitätsprofil nicht wieder auf die Position der Relaxations-Bedingungen mit und ohne  $\text{AIF}_4$  (Abb.28) vor der Aktivierung zurück. Während die Intensität etwas geringer ist als vor Bindung von  $\text{AIF}_4$ , bleibt das Intensitätsmaximum auf der Position mit  $\text{MgADP}\cdot\text{AIF}_4$  im Myosinkopf bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration. Die beobachtete Verschiebung des Intensitätsmaximums unter Relaxations-Bedingungen (ohne  $\text{Ca}^{++}$ ) beruht vermutlich auf einem Effekt von  $\text{MgADP}\cdot\text{AIF}_4$  auf die Struktur des Akto-Myosin-Komplexes.

Eine Aktivierung des Aktinfilamentes durch  $\text{Ca}^{++}$  führt für  $\text{AM}\cdot\text{MgADP}\cdot\text{AIF}_4$ -Komplexe also in Wirklichkeit zu einem Anstieg der Intensität der Schichtlinie, aber nicht zu einer Verschiebung. Dieser Anstieg mit  $\text{Ca}^{++}$  entspricht ungefähr dem, was auch in früheren Untersuchungen mit  $\text{MgATP}\gamma\text{S}$ , einem Analogon für Querbrücken-Zustände nicht-stereospezifischer Aktinbindung beobachtet worden war (Kraft et al., 1999). Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei den hier untersuchten Querbrücken, die  $\text{MgADP}\cdot\text{AIF}_4$  unter Aktivierung gebunden haben, um Querbrücken-Zustände nicht-stereospezifischer Aktinbindung handelt, die sich aber in ihrer Struktur von den  $\text{AM}\cdot\text{ATP}/\text{AM}\cdot\text{ADP}\cdot\text{P}_i$ -Populationen unterscheiden, die unter Relaxations-Bedingungen (in Gegenwart von ATP) beobachtet werden, zu sehen bei gebundenem  $\text{AIF}_4$  an der Verschiebung des Intensitätsmaximums der  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie in Richtung Meridian.

## II. Querbrücken-Zustände mit MgADP.AIF<sub>4</sub> inkorporiert unter Rigor-Bedingungen (AIF<sub>R</sub>)

Aufgrund der aus der Literatur und durch unsere eigenen Versuche bekannten Beobachtung, dass AIF<sub>4</sub> sich an einen mit hoher Affinität an das aktivierte Aktinfilament bindenden Myosinkopf während aktivem Querbrücken-,Turnover' anlagern kann, wurde überprüft, ob MgADP.AIF<sub>4</sub> auch in die nukleotidfreien Myosinköpfe, also im Rigor-Zustand, binden kann. Querbrücken im Rigor-Zustand binden ebenfalls mit hoher Affinität an Aktin und können so selbst ohne Ca<sup>++</sup> das Aktinfilament aktivieren. Eine weitere Voraussetzung für das Gelingen dieses Versuchs ist, dass MgADP an Rigor-Querbrücken bindet (Greene and Eisenberg 1980; Gulick et al., 1997; Schoenberg and Eisenberg 1987). Die nachfolgend in allen Analysen (Diffraktionsbilder und Intensitätsprofile der Schichtlinien) dargestellten Kontrollexperimente zeigen, dass MgADP alleine zwar an den Myosinkopf bindet (vgl. kleine Veränderungen im Diffraktionsbild), dass aber mit MgADP alleine keine wesentliche Strukturänderung des Akto-Myosin-Komplexes erfolgt, wie sie im Folgenden für die Inkorporation von MgADP und AIF<sub>4</sub> demonstriert wird. Eine Reihe von Kontrollexperimenten zeigte schließlich, dass MgADP und AIF<sub>4</sub> im Verlaufe einer Inkubationszeit von 60 Min. bei 2°C in die zuvor mit MgADP alleine generierten AM.ADP-Komplexe integriert werden, was an deutlichen Veränderungen im Diffraktionsbild zu erkennen war, die auch nach Entzug von AIF<sub>4</sub> aus dem Inkubationsmedium bestehen blieben (sehr langsame Abdissoziation von AIF<sub>4</sub>). Erst gegen Ende der Inkubationszeit von ca. 60 Min. war der Übergang vom Rigor-Zustand in den MgADP.AIF<sub>4</sub>-Zustand abgeschlossen, was beispielsweise am Intensitätsquotienten der ersten beiden äquatorialen Reflexe ( $I_{1,1}/I_{1,0}$ ) verfolgt werden konnte (Abb.4, Material und Methoden), und an mehreren Reflexen im Diffraktionsbild zu erkennen war.

Analog den Untersuchungen zum MgADP.AIF<sub>4</sub>-Zustand nach Aktivierung (vgl. 3.1.2, I. A. a.-c.; I. B. a.-c. ) sollen im Nachfolgenden für den MgADP.AIF<sub>4</sub>-Querbrücken-Zustand, der durch Bindung von MgADP und AIF<sub>4</sub> in den Myosinkopf im Rigor erreicht wird, einige Merkmale der Diffraktionsbilder analysiert werden. Es geht um die Frage, ob dieser AM.MgADP.AIF<sub>4</sub>-Komplex, aus dem nukleotidfreien Zustand generiert (im weiteren AIF<sub>R</sub> genannt), dem AM.MgADP.AIF<sub>4</sub>-Komplex, erzeugt über aktiven ,Turnover' (genannt AIF<sub>A</sub>), entspricht oder ob ein neuer, zusätzlicher Querbrücken-Zustand anzunehmen ist. Schließlich war der Effekt einer Ca<sup>++</sup>-Aktivierung der Aktinfilamente auf diesen Zustand zu untersuchen.

A. Übersicht der 2D-Röntgendiffraktionsbilder des AM.MgADP.AIF<sub>4</sub>-Komplexes aus Rigor (AIF<sub>R</sub>)

- a. Der AIF<sub>R</sub>-Zustand, bei niedriger Calcium-Konzentration, bei 2°C, im Vergleich zum AM.MgADP-Komplex (Rigor und MgADP).

Das Diffraktionsbild von Muskelfasern im AIF<sub>R</sub>-Zustand bei 2°C ohne Ca<sup>++</sup> gezeigt in Abbildung 18a.-c., sieht grundsätzlich dem Diffraktionsbild von relaxierten Muskelfasern (Abb.7a.-c.) ähnlich, ausser einer für AM.MgADP.AIF<sub>4</sub>-Komplexe etwas stärkeren ersten Myosin-Schichtlinie (Abb.18c.). Die Verstärkung der Myosin-Schichtlinie mit AIF<sub>4</sub> könnte, wie bei den AIF<sub>A</sub> Experimenten, durch die mit AM.MgADP.AIF<sub>4</sub>-Komplexen vorliegende ‚closed‘ Konformation des Myosinkopfes verursacht sein, die eine bessere helikale Anordnung der Myosinköpfe erlaubt (Xu et al., 2003). Gravierende Unterschiede bestehen hingegen zwischen dem Diffraktionsbild des AIF<sub>R</sub>-Zustandes ohne Ca<sup>++</sup> (inaktives Aktinfilament) zum Diffraktionsbild im Rigor.

Um die Veränderungen im Akto-Myosin-Komplex, die alleine durch Ca<sup>++</sup>- oder MgADP-Effekte verursacht sind, in den Diffraktionsbildern identifizieren und von Effekten durch Inkorporation von MgADP und AIF<sub>4</sub> unterscheiden zu können, wurden hier als Kontrolle auch Diffraktionsbilder vom Akto-Myosin-Komplex unter Rigor-Bedingungen mit und ohne Ca<sup>++</sup>, jeweils mit und ohne MgADP aufgenommen (Abb.14-17). Diese vier Diffraktionsbilder unterscheiden sich bei genauer Betrachtung lediglich geringfügig im meridionalen Reflex bei 1/14.3 nm<sup>-1</sup>. Das deutet darauf hin, dass MgADP an die nukleotidfreien Querbrücken bindet, aber keine große Strukturänderung zur Folge hat, da das Diffraktionsbild unverändert Rigor-typische Merkmale zeigt (z.B. unverändert hohe Intensität der sechsten und ersten Aktin-Schichtlinien bei 1/5.9 nm<sup>-1</sup> bzw. 1/37 nm<sup>-1</sup> usw.). Erst die Bindung von AIF<sub>4</sub> an den Myosinkopf mit MgADP führt zu gravierenden Strukturänderungen, ohne Ca<sup>++</sup> entspricht der AIF<sub>R</sub>-Zustand einem relaxierten Querbrücken-Zustand.

- b. Der AIF<sub>R</sub>-Zustand bei hoher Calcium-Konzentration bei 2°C

Der Vergleich des aufgenommenen Diffraktionsbildes für AIF<sub>R</sub>-Komplexe bei hoher Ca<sup>++</sup>-Konzentration (Abb.19) mit dem Diffraktionsbild ohne Ca<sup>++</sup> (Abb.18) gibt Aufschluss darüber, ob sich die Struktur des Akto-Myosin-Komplexes ändert wenn das Aktinfilament aktiviert wird (A<sub>on</sub>). Mit Ca<sup>++</sup>-Aktivierung zeigte sich überraschenderweise eine deutliche Zunahme der Intensität auf der sechsten Aktin-Schichtlinie bei 1/5.9 nm<sup>-1</sup>. Zusätzlich fällt

die Intensitätsabnahme der ersten Myosin-Schichtlinie bei  $1/42.9 \text{ nm}^{-1}$  sowie Zunahme der Intensität auf der ersten Aktin-Schichtlinie bei  $1/37 \text{ nm}^{-1}$  auf. Damit zeigt das Diffraktionsbild für AIF<sub>R</sub>-Komplexe mit Ca<sup>++</sup> charakteristische Unterschiede zum Diffraktionsbild ohne Ca<sup>++</sup>, die auf eine mit Ca<sup>++</sup>-Aktivierung veränderte Konformation des Akto-Myosin-Komplexes hindeutet. Es erscheinen hier Merkmale (z.B. Intensitätsanstieg der ersten Aktin-Schichtlinie sowie Anstieg und Verlagerung des Profils der sechsten Aktin-Schichtlinie Richtung Rigor-Profil) für stereospezifisch gebundene Querbrücken, wie sie z.B. für isometrische Aktivierung (Kraft et al., 2002) typisch sind. Im Einklang mit diesen Beobachtungen sind auch die im Rahmen eines weiteren Projektes (E. Mählmann, Abt. Mol. u. Zellphysiol. MHH) durchgeführten Messungen der Fasersteifheit unter identischen Bedingungen, die bei hoher Ca<sup>++</sup>-Konzentration ebenfalls Merkmale zeigte, wie sie für Querbrücken-Zustände hoher Aktinaffinität typisch sind. Dennoch ist das im AIF<sub>R</sub>-Zustand bei hoher Ca<sup>++</sup>-Konzentration registrierte Diffraktionsbild deutlich vom Diffraktionsbild unter Rigor-Bedingungen (Abb.8) verschieden, aber dem Diffraktionsbild unter aktiver Kraftentwicklung ähnlich (vgl. Abb.37,38 und Diskussion 4.5).

#### c. Der AIF<sub>R</sub>-Zustand bei hoher und niedriger Calcium-Konzentration bei 12°C

Wie schon für MgADP.AIF<sub>4</sub> nach Aktivierung gezeigt, wurde auch hier bei höherer Temperatur überprüft, ob der AIF<sub>R</sub>-Zustand ohne Ca<sup>++</sup> deutliche Myosin-Schichtlinien zeigt und damit eine Konformation („closed“) vergleichbar dem MgADP.P<sub>i</sub>-Zustand einnimmt, und ob gegebenenfalls bei 12°C deutliche Myosin-Schichtlinien auch in Gegenwart von Ca<sup>++</sup> auftreten. Dazu wurden auch hier Diffraktionsbilder bei 12°C registriert. Das Diffraktionsbild ohne Ca<sup>++</sup> zeigt gegenüber dem entsprechenden Diffraktionsbild bei 2°C deutlich stärkere Myosin-Schichtlinien, wie auch eine verstärkte sechste Aktin-Schichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  (Abb.20). Grundsätzlich gleicht es aber dem Diffraktionsbild von relaxierten Muskelfasern. Das bei hoher Temperatur aufgenommene Diffraktionsbild vom MgADP.AIF<sub>4</sub>-Querbrücken-Zustand mit Ca<sup>++</sup> zeigt gegenüber dem Diffraktionsbild des MgADP.AIF<sub>4</sub>-Querbrücken-Zustandes ohne Ca<sup>++</sup> wesentlich schwächere Myosin-Schichtlinien (Abb.21). Darüber hinaus ist die erste Schichtlinie des Aktins hier noch intensiver als bei 2°C und lässt sich in Abbildung 21c auch deutlicher von der Myosin-Schichtlinie trennen. Damit sind die Veränderungen durch hohe Ca<sup>++</sup>-Konzentration bei 12°C qualitativ vergleichbar mit den Veränderungen bei 2°C und weisen ebenfalls auf einen mit Ca<sup>++</sup> veränderten Akto-Myosin-Komplex hin.

## B. Analyse einzelner Schichtlinien der AIF<sub>R</sub>-Zustände (integrierte Intensitäten)

### a. Myosin- und Aktin-Schichtlinien der AIF<sub>R</sub>-Zustände bei hoher und niedriger Calcium-Konzentration bei 12°C

Auch für diesen Querbrücken-Zustand ist die genaue Analyse der Myosin- und Aktin-Schichtlinien im Diffraktionsbild notwendig, um die Konformation des AIF<sub>R</sub>-Komplexes ohne Ca<sup>++</sup> mit der Myosin-MgADP.P<sub>i</sub>-Konformation vergleichen zu können, und so eine Zuordnung zu Zuständen nicht-stereospezifischer Aktinbindung (deutliche Myosin-Schichtlinien) oder stereospezifischer Aktinbindung (schwache Myosin-Schichtlinien, Zunahme der Aktin-Schichtlinien) vornehmen zu können. Wie bereits in der Übersicht des Diffraktionsbildes bei 12°C zu erkennen war, sieht man in den Intensitätsprofilen der Schichtlinien parallel zum Meridian integriert (Abb.29), dass im AIF<sub>R</sub>-Zustand ohne Ca<sup>++</sup> deutliche Myosin-Schichtlinien, ähnlich einem MgADP.P<sub>i</sub>-Zustand in relaxierten Fasern sichtbar sind, dass aber Ca<sup>++</sup>-Aktivierung einen deutlichen Effekt auf diese Querbrücken-Zustände hat. Die Intensität der ersten und sechsten Aktin-Schichtlinie steigen deutlich an, die Intensität der ersten, vierten und fünften Myosin-Schichtlinie fällt ab. Die Intensität der zweiten und dritten Myosin-Schichtlinie bleibt auch mit Ca<sup>++</sup> unverändert. Wie bereits in den Diffraktionsbildern zu sehen war, sind jedoch die Intensitäten der verschiedenen Schichtlinien des AIF<sub>R</sub>-Zustandes nicht nur ohne, sondern auch mit Ca<sup>++</sup> vom Rigor-Zustand deutlich verschieden (Abb.36).

### b. Erste Aktin- und Myosin-Schichtlinie der AIF<sub>R</sub>-Zustände bei hoher und niedriger Calcium-Konzentration

Weiteren Aufschluss über diesen AIF<sub>R</sub> Aktin-Myosin-Komplex, der offenbar bei Änderung des Aktivierungs-Zustandes des dünnen Filamentes deutliche Veränderungen zeigt, gibt die Intensitätsverteilung zwischen Aktin- und Myosin-Komponenten der ersten Schichtlinie (Abb.30). Die Profile der Kontrollexperimente zeigen auch hier, dass Ca<sup>++</sup> alleine und ADP alleine nur sehr kleine Intensitätsänderungen (Umverteilung zwischen Myosin- und Aktin-Komponente) der ersten Aktin-Schichtlinie zur Folge haben. Erst nach Bindung von AIF<sub>4</sub> erfolgt eine Umverteilung der Intensitäten, ohne Ca<sup>++</sup> sieht das Profil für den AIF<sub>R</sub>-Zustand dem relaxierten Profil sehr ähnlich. Als direkter Effekt von MgADP.AIF<sub>4</sub> auf die Konformation der Myosinköpfe ist zu werten, dass das Intensitätsprofil des AIF<sub>R</sub>-Zustandes ohne Ca<sup>++</sup> bei 2°C gegenüber dem Profil der Relaxations-Bedingungen eine Erhöhung des Myosin-Peaks zeigt. Ganz deutlich lässt sich aber für den AIF<sub>R</sub>-Zustand

eine  $\text{Ca}^{++}$ -induzierte Umverteilung mit Intensitätsabnahme der ersten Myosin-Schichtlinie und Intensitätszunahme der ersten Aktin-Schichtlinie im Intensitätsprofil dieser Schichtlinien schon bei  $2^\circ\text{C}$  beobachten. Bei  $12^\circ\text{C}$ , wo ohne  $\text{Ca}^{++}$ , wie schon erläutert, eine deutliche Erhöhung des Myosin-Peaks gegenüber  $2^\circ\text{C}$  zu sehen ist, kommt es bei  $\text{Ca}^{++}$ -Erhöhung zu einer ähnlichen Intensitätsumverteilung wie bei  $2^\circ\text{C}$  beobachtet: Wie schon im Übersichts-Diffraktionsbild zu erkennen war, fällt die Intensität des Myosin-Peaks stark ab, gleichzeitig steigt dagegen der Aktin-Peak in seiner Intensität deutlich an, fast auf die Höhe des Myosin-Peaks. Damit zeigt der  $\text{AIF-R}$ -Zustand mit  $\text{Ca}^{++}$  typische Eigenschaften eines stereospezifisch gebundenen Querbrücken-Zustandes.

c. Die  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie der  $\text{AIF-R}$ -Zustände bei hoher und niedriger Calcium-Konzentration

Durch einen Vergleich der Profile der Aktin-Schichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  mit und ohne  $\text{Ca}^{++}$  sollte weiter untersucht werden, ob bei den  $\text{AIF-R}$ -Komplexen mit  $\text{Ca}^{++}$  stereospezifisch gebundene Querbrücken vorherrschen, was an einer Intensitätsverstärkung und Verschiebung des Intensitätsmaximums der sechsten Aktin-Schichtlinie zu erkennen wäre. Zunächst zeigen Kontrollexperimente, dass trotz der hier verwendeten automatischen Analyseverfahren (vgl. Material und Methoden), wie schon zuvor gezeigt,  $\text{MgADP}$  alleine auch auf diese Schichtlinie keine wesentlichen Veränderungen der Intensitätsverteilung bewirkt (Abb.31). Erst durch  $\text{AIF}_4$ -Zugabe kommt es zu gravierenden Veränderungen, wobei sich das Profil der  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie des  $\text{AIF-R}$ -Zustandes ohne  $\text{Ca}^{++}$  nur wenig vom Profil unter Relaxations-Bedingungen unterscheidet. Bei  $\text{Ca}^{++}$ -Erhöhung schliesslich zeigt die Intensitätsverteilung der  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie des  $\text{AIF-R}$ -Zustandes wiederum deutliche Änderungen. Zum einen steigt die Intensität mit  $\text{Ca}^{++}$  deutlich an, zum anderen verlagert sich das Intensitätsmaximum Richtung Meridian, beides Veränderungen, die für einen stereospezifisch gebundenen Querbrücken-Zustand sprechen, der hier durch Bindung von  $\text{MgADP.AIF}_4$  an Myosinköpfe im Rigor-Zustand erreicht wird.

### III. Querbrücken-Zustände in Gegenwart von BDM

BDM ist eine Substanz, die in Muskelfasern auch in Gegenwart von  $\text{Ca}^{++}$  die aktive Kraftentwicklung konzentrationsabhängig fast vollständig unterdrückt. Die Querbrücken sollen in einem nicht-kraftgenerierenden Zustand vor Phosphat-Abgabe, d.h. in einem der

AMDP.P<sub>i</sub>-Zustände akkumulieren (Regnier et al., 1995). In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass bei 2°C durch Zugabe von 50mM BDM die aktive Kraftentwicklung auf etwa 3,5-7% reduziert wird, d.h. nahezu alle Querbrücken sind in einem nicht-kraftgenerierenden Zustand (Untersuchungen von E. Mählmann, Abt. Mol. u. Zellphysiol. MHH). Das heisst, unter diesen Bedingungen kann auch in Gegenwart von physiologischen MgATP-Konzentrationen nicht nur ohne Ca<sup>++</sup>, sondern vor allem auch mit Ca<sup>++</sup> ein Akto-Myosin-Komplex unmittelbar vor Kraftgenerierung strukturell untersucht werden, während ohne BDM ein Großteil der Myosinköpfe einen kraftgenerierenden Zustand besetzen würden. Wie bereits für die beiden MgADP.AIF<sub>4</sub>-Analog-Zustände sollten auch für den in Gegenwart von BDM akkumulierten Akto-Myosin-Komplex die mit und ohne Ca<sup>++</sup> aufgenommenen Diffraktionsbilder eingehend analysiert werden.

#### A. 2D-Röntgendiffraktionsbilder des Akto-Myosin-Komplexes in Gegenwart von BDM

##### a. Der Querbrücken-Zustand in Gegenwart von BDM bei niedriger Calcium-Konzentration (Relaxations-Bedingungen) bei 2°C

Das Diffraktionsbild des Querbrücken-Zustandes in Gegenwart von BDM ohne Ca<sup>++</sup> bei 2°C (Abb.22) fällt hier im Vergleich zum Diffraktionsbild aufgenommen unter Relaxations-Bedingungen (Abb.7) vor allem durch eine viel deutlichere erste Myosin-Schichtlinie auf (Abb.22c.). Insgesamt zeigen sich alle Schichtlinien mit BDM etwas deutlicher. Das ist evtl. ein Hinweis darauf, dass BDM über allosterische Effekte die Myosinköpfe in einer Konformation (,closed') akkumuliert, die, wie für Myosinköpfe mit MgADP.P<sub>i</sub> bei höherer Temperatur ohne Ca<sup>++</sup> typisch, eine verbesserte Anordnung der Myosinköpfe entsprechend der helikalen Struktur der Myosinfilamente erlaubt (Xu et al., 2003).

##### b. Der Querbrücken-Zustand in Gegenwart von BDM bei hoher Calcium-Konzentration bei 2°C

Auch das Diffraktionsbild des Querbrücken-Zustandes in Gegenwart von BDM mit Ca<sup>++</sup> (Abb.23) wird unter der Frage betrachtet, ob eine Ca<sup>++</sup>-induzierte Strukturänderung des Akto-Myosin-Komplexes stattfindet, und welchem Zustand der Myosinkopf damit entspricht, einem Zustand nicht-stereospezifischer Aktinbindung (Myosin-Schichtlinien bleiben mit Ca<sup>++</sup> gleich) oder stereospezifischer Aktinbindung (Myosin-Schichtlinien

werden mit  $\text{Ca}^{++}$  schwächer, Aktin-Schichtlinien werden stärker). Das Diffraktionsbild des Querbrücken-Zustandes in Gegenwart von BDM mit  $\text{Ca}^{++}$  unterscheidet sich vom Diffraktionsbild ohne  $\text{Ca}^{++}$  vor allem durch die mit BDM deutlichere sechste Aktin-Schichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$ . In Abbildung 23c. sieht man ausserdem im inneren Bereich des Diffraktionsbildes eine im Vergleich zu Relaxations-Bedingungen schwächere erste Myosin-Schichtlinie sowie eine deutliche Zunahme der Intensität im Bereich der ersten Aktin-Schichtlinie. Diese Unterschiede können als erste Hinweise auf  $\text{Ca}^{++}$ -induzierte strukturelle Veränderungen der in Gegenwart von BDM akkumulierten Querbrücken gewertet werden.

c. Der Querbrücken-Zustand in Gegenwart von BDM bei hoher und niedriger Calcium-Konzentration bei  $12^\circ\text{C}$

Insgesamt sind bei  $12^\circ\text{C}$  mit BDM hinsichtlich der durch  $\text{Ca}^{++}$ -Zugabe induzierten Veränderungen keine qualitativen Unterschiede gegenüber den Veränderungen bei  $2^\circ\text{C}$  zu erkennen. Bei hoher Temperatur sind Intensitätsabnahme der ersten Myosin-Schichtlinie sowie Intensitätsanstieg der ersten Aktin-Schichtlinie bei Aktivierung der Aktinfilamente durch  $\text{Ca}^{++}$  allerdings deutlicher (Abb.25). Ausserdem fällt wiederum die in Gegenwart von BDM ohne  $\text{Ca}^{++}$  bei  $12^\circ\text{C}$  (Abb.24) hohe Intensität von Myosin- und Aktin-Schichtlinien auf. Möglicherweise ist dies nicht nur Folge der mit BDM bevorzugten Konformation („closed“) der Myosinköpfe, sondern auch auf zusätzliche Effekte von BDM auf andere Strukturproteine der Fasern zurückzuführen.

B. Analyse einzelner Schichtlinien aus Diffraktionsbildern des Akto-Myosin-Komplexes in Gegenwart von BDM (integrierte Intensitäten)

a. Myosin- und Aktin-Schichtlinien in Gegenwart von BDM bei hoher und niedriger Calcium-Konzentration bei  $12^\circ\text{C}$

Wie schon in den Diffraktionsbildern zu erkennen war, zeigt die Integration der Myosin- und Aktin-Schichtlinien parallel zum Meridian aus Diffraktionsbildern von Muskelfasern in Gegenwart von BDM mit und ohne  $\text{Ca}^{++}$  bei  $12^\circ\text{C}$  eine sehr hohe Intensität der ersten Myosin-Schichtlinie (ohne  $\text{Ca}^{++}$ ), die mehr als 10-fach höher ist als die Intensität der  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie (Abb.32). Durch diese hohe Intensität erscheint das Profil der



anderen Myosin-Schichtlinien relativ schwach. In Gegenwart von BDM bewirkt eine  $\text{Ca}^{++}$ -Aktivierung bei  $12^\circ\text{C}$  eine Intensitätsabnahme der 1.-5. Myosin-Schichtlinie sowie eine gleichzeitige Intensitätszunahme der ersten und sechsten Aktin-Schichtlinie. Das scheint für den Akto-Myosin-Komplex in Gegenwart von BDM auf einen stereospezifisch gebundenen Analog-Zustand hinzuweisen.

b. Erste Aktin- und Myosin-Schichtlinie in Gegenwart von BDM bei hoher und niedriger Calcium-Konzentration

Auch hier soll als weiterer Parameter zur Charakterisierung des Zustandes der Querbrücken in Gegenwart von BDM mit und ohne  $\text{Ca}^{++}$  das Intensitätsprofil einer parallel zum Meridian erstellten Integration der ersten Aktin- und Myosin-Schichtlinie Auskunft darüber geben, ob die Querbrücken mit BDM, Zustände nicht-stereospezifischer oder stereospezifischer Aktinbindung der Myosinköpfe darstellen. Wie bereits in der Übersicht der Diffraktionsbilder erkennbar, steigt im Vergleich zu Relaxations-Bedingungen ohne BDM bei  $2^\circ\text{C}$  der Myosin-Peak bei Zugabe von BDM stark an (Abb.33). Mit Erhöhung der  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration wird die Intensität der Myosin-Schichtlinie schwächer und die Aktin-Schichtlinie nimmt an Intensität zu. Bei  $12^\circ\text{C}$  ist der Myosin-Peak unter Relaxations-Bedingungen mit BDM deutlich intensiver. Erhöht man bei  $12^\circ\text{C}$  die  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration, so wird der Myosin-Peak schwächer und der Aktin-Peak steigt deutlich an. Qualitativ besteht also kein Unterschied im  $\text{Ca}^{++}$ -Effekt zwischen niedriger ( $2^\circ\text{C}$ ) und hoher ( $12^\circ\text{C}$ ) Temperatur. Die bei beiden Temperaturen mit hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration beobachtete Intensitätsabnahme des Myosin-Peaks bei Zunahme des Aktin-Peaks lassen den Schluss zu, dass zumindest ein Teil der Querbrücken stereospezifisch an das aktivierte Aktinfilament bindet.

c. Die  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie in Gegenwart von BDM bei hoher und niedriger Calcium-Konzentration

Die Intensität der  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie in Gegenwart von BDM ohne  $\text{Ca}^{++}$  nimmt gegenüber der Intensität unter Relaxations-Bedingungen zu (Abb.34), was vermutlich auf Auswirkungen von BDM auf den Ordnungsgrad der Aktinfilamente zurückzuführen ist. Unter  $\text{Ca}^{++}$ -Erhöhung ist neben einem weiteren Anstieg der Intensität (der sechsten Aktin-Schichtlinie) zusätzlich eine Verlagerung des Intensitätsmaximums nach links, also in Richtung Meridian zu erkennen. Dies ist ebenfalls als Hinweis auf die Existenz eines

stereospezifisch an Aktin gebundenen Zustandes der Querbrücken in Gegenwart von BDM zu werten.

### 3.2 Vergleichende Zusammenfassung der Ergebnisse der drei Querbrücken-Zustände

Ohne  $\text{Ca}^{++}$  zeigen sowohl die beiden  $\text{MgADP}\cdot\text{AIF}_4$ -Zustände, als auch der Akto-Myosin-Komplex in Gegenwart von BDM bei  $2^\circ\text{C}$  und  $12^\circ\text{C}$  strukturelle Merkmale, die auch für Querbrücken unter Relaxations-Bedingungen, insbesondere  $\text{MgADP}\cdot\text{P}_i$ -Zustände typisch sind. Eine Ausnahme bildet dabei die sehr hohe erste Myosin-Schichtlinie, sowie verstärkte erste und sechste Aktin-Schichtlinien in Gegenwart von BDM, die Folge eines unspezifischen Effektes von BDM auf die Muskelfasern zu sein scheint.

Mit  $\text{Ca}^{++}$  zeigen sich dagegen deutliche Unterschiede zwischen den drei untersuchten Akto-Myosin-Komplexen. Zu trennen sind hier  $\text{Ca}^{++}$ -Effekte allein auf die  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie von den Effekten, die durch Veränderungen im Akto-Myosin-Komplex in Gegenwart von  $\text{Ca}^{++}$  zustande kommen und sich auf die sechste und erste Aktin-Schichtlinien bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  bzw.  $1/37 \text{ nm}^{-1}$  auswirken.

1.) Bindet  $\text{MgADP}\cdot\text{AIF}_4$  während Aktivierung an den Myosinkopf ( $\text{AIF}_A$ ; 3.1.2, I), so sind die beobachteten Unterschiede mit und ohne  $\text{Ca}^{++}$  vor allem durch  $\text{Ca}^{++}$ -induzierte Änderungen im dünnen Filament verursacht, es finden sich keine Hinweise auf große strukturelle Veränderungen des Akto-Myosin-Komplexes mit  $\text{Ca}^{++}$ .

2.) Die Experimente bei denen  $\text{MgADP}\cdot\text{AIF}_4$  in Rigor-Bedingungen an den Myosinkopf bindet ( $\text{AIF}_R$ ) zeigen deutliche Unterschiede mit und ohne  $\text{Ca}^{++}$ , die nicht nur Aktivierungseffekte des dünnen Filamentes sind, sondern auch auf Veränderungen im Akto-Myosin-Komplex durch  $\text{Ca}^{++}$ -Aktivierung hinweisen. Die so erzeugten Querbrücken-Zustände sind offenbar grundlegend verschieden von den  $\text{AIF}_A$ -Zuständen.

3.) Auch in Gegenwart von BDM sind deutliche Effekte von  $\text{Ca}^{++}$  auf den Akto-Myosin-Komplex festzustellen. Die Effekte von  $\text{Ca}^{++}$  auf die Querbrücken-Zustände mit BDM sind ähnlich den  $\text{Ca}^{++}$ -Effekten auf  $\text{AIF}_R$ .

Welche Bedeutung diese Daten für die Zuordnung dieser Akto-Myosin-Komplexe zu einzelnen Zuständen des Querbrückenzyklus haben, soll in der Diskussion näher erläutert werden.

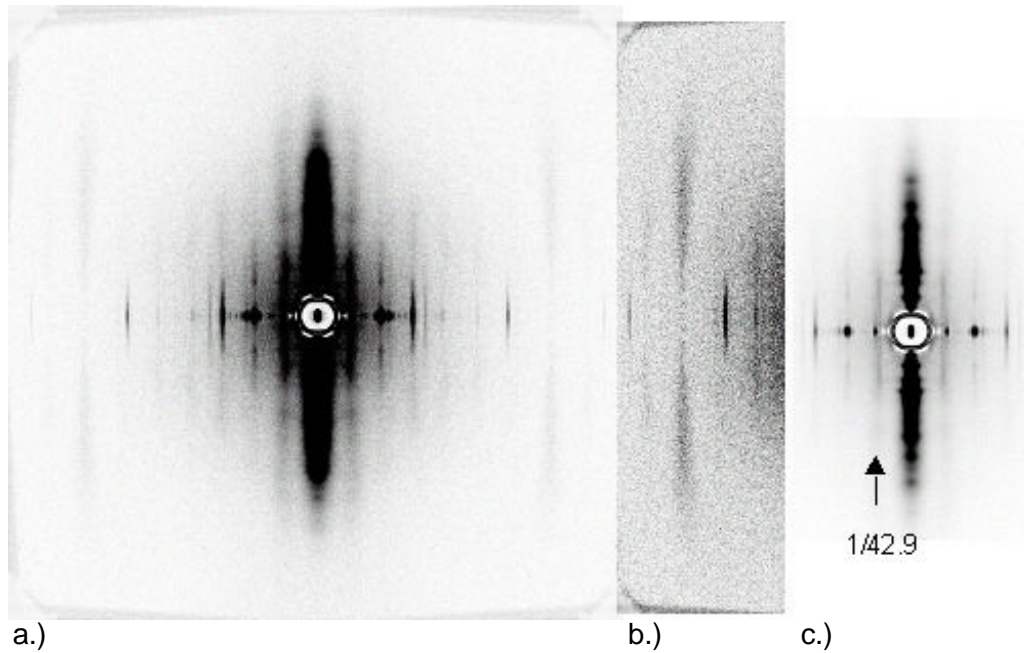


Abb.7: Diffraktionsbild von Muskelfasern in Relaxation bei 2°C, in a.) mit mittlerer, b.) höchster und c.) geringster Intensität im Gegensatz zu Abb.2 um 90° rotiert dargestellt, wie alle folgenden Diffraktionsbilder. Es wurden 4 Bilder von 4 Einzelfaserpräparationen zusammen addiert (Belichtungszeit insg. 80sek.). In c.) ist die Position der ersten Myosin-Schichtlinie bei  $1/42.9 \text{ nm}^{-1}$  mit Pfeil markiert. Die Position der Myosin-Schichtlinien 2-6 kann aus Abb.26 entnommen werden. Für die Position der anderen Schichtlinien und des meridionalen Reflexes bei  $1/14.3 \text{ nm}^{-1}$  siehe Abb.8.

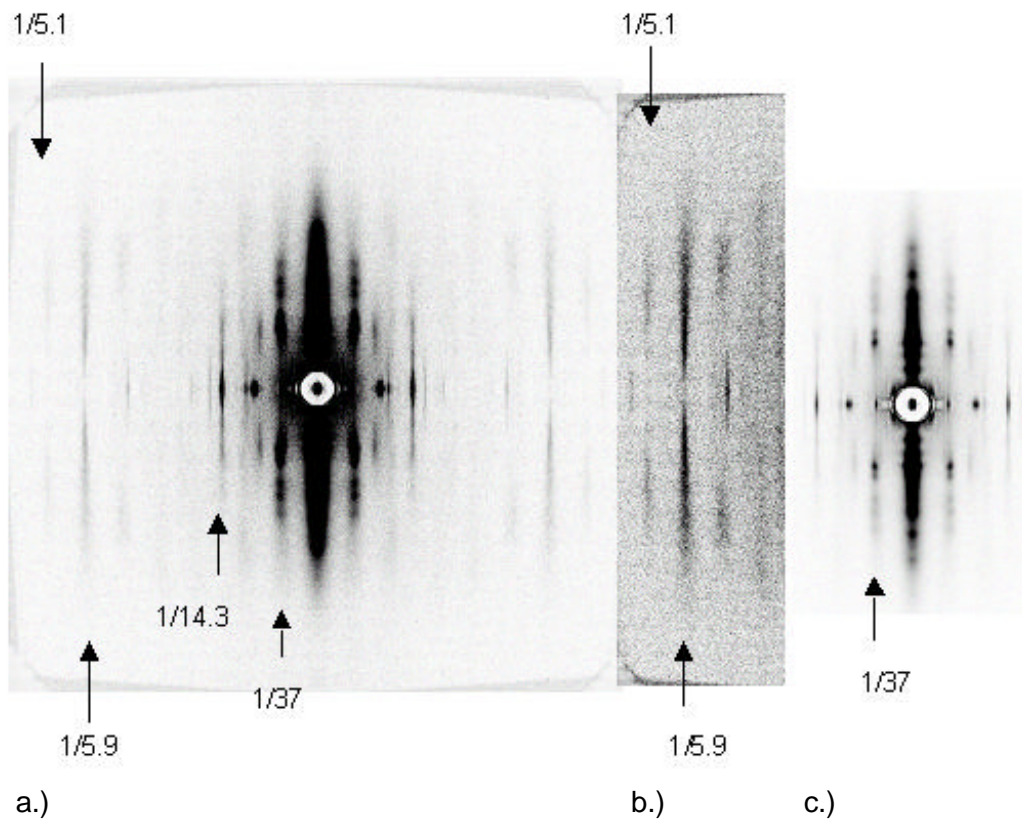


Abb.8: Diffraktionsbild unter Rigor-Bedingungen, in a.) mit mittlerer, b.) höchster und c.) geringster Intensität. Es wurden 3 Bilder von 3 Einzelfaserpräparationen zusammen addiert (Belichtungszeit insg. 60sek.). Am Rand sind hier die Positionen der Aktin-Schichtlinien bei  $1/5.1 \text{ nm}^{-1}$ ,  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  und  $1/37 \text{ nm}^{-1}$  markiert. Bei  $1/14.3 \text{ nm}^{-1}$  ist ein meridionaler Myosin-Reflex markiert.

AM.MgADP.AIF<sub>4</sub>-Komplexe aus aktivem ‚Turnover‘ (AIF<sub>A</sub>-Zustände)

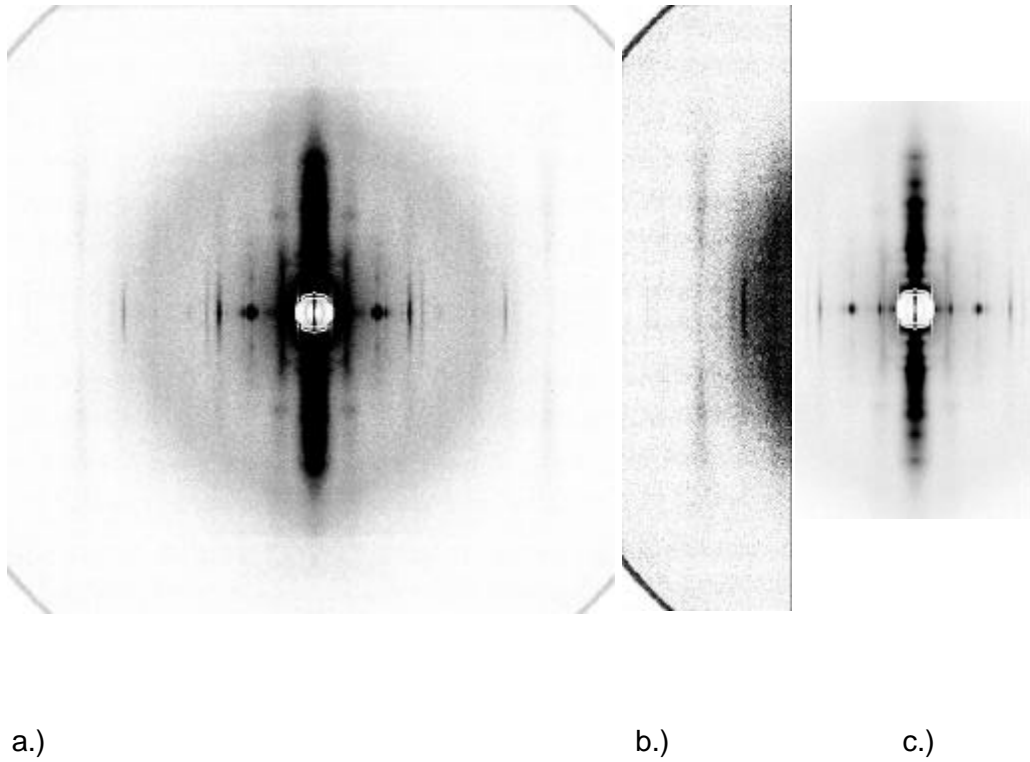


Abb.9: Diffraktionsbild von Muskelfasern in Relaxation (niedrige Ca<sup>++</sup>-Konzentration) mit AIF<sub>4</sub> in der Inkubationslösung ( vor Inkorporation in den Myosinkopf), in a.) mit mittlerer, b.) höchster und c.) geringster Intensität. Es wurden 5 Bilder von 3 Einzelfaserpräparationen zusammen addiert (Belichtungszeit insg. 150sek.).

AM.MgADP.AIF<sub>4</sub>-Komplexe aus aktivem ‚Turnover‘ (AIF<sub>A</sub>-Zustände)

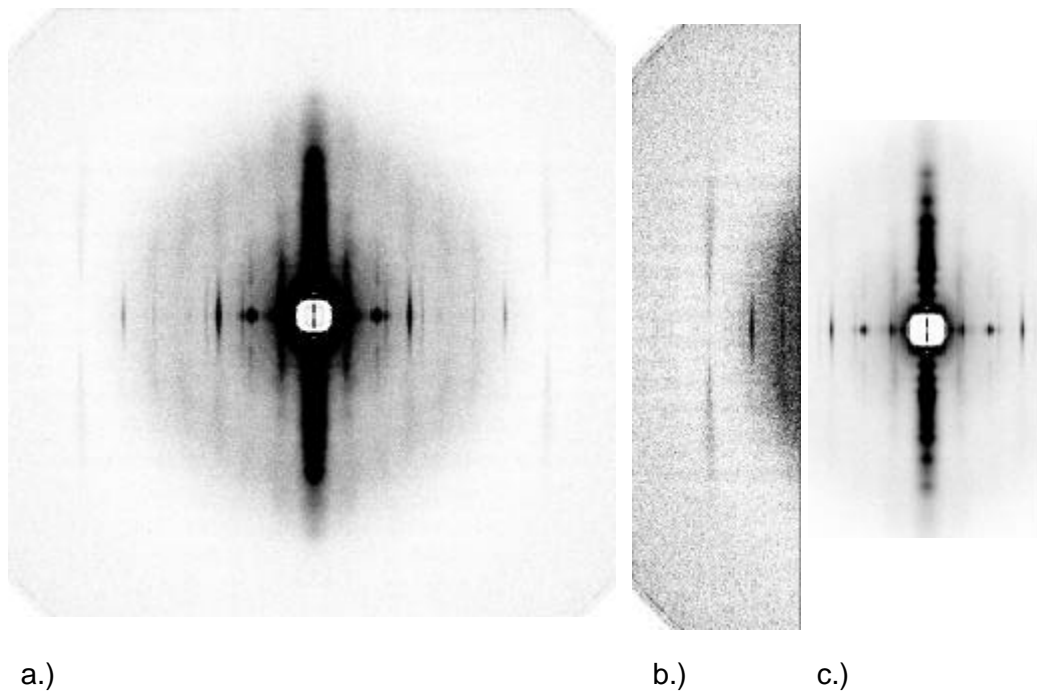


Abb.10: Diffraktionsbild von Muskelfasern bei hoher Ca<sup>++</sup>-Konzentration (unter Aktivierungs-Bedingungen) mit inkorporiertem AIF<sub>4</sub> (AIF<sub>A</sub>), bei 2°C in a.) mit mittlerer, b.) höchster und c.) geringster Intensität. Es wurden 6 Bilder von 3 Einzelfaserpräparationen zusammen addiert (Belichtungszeit insg. 180sek.).

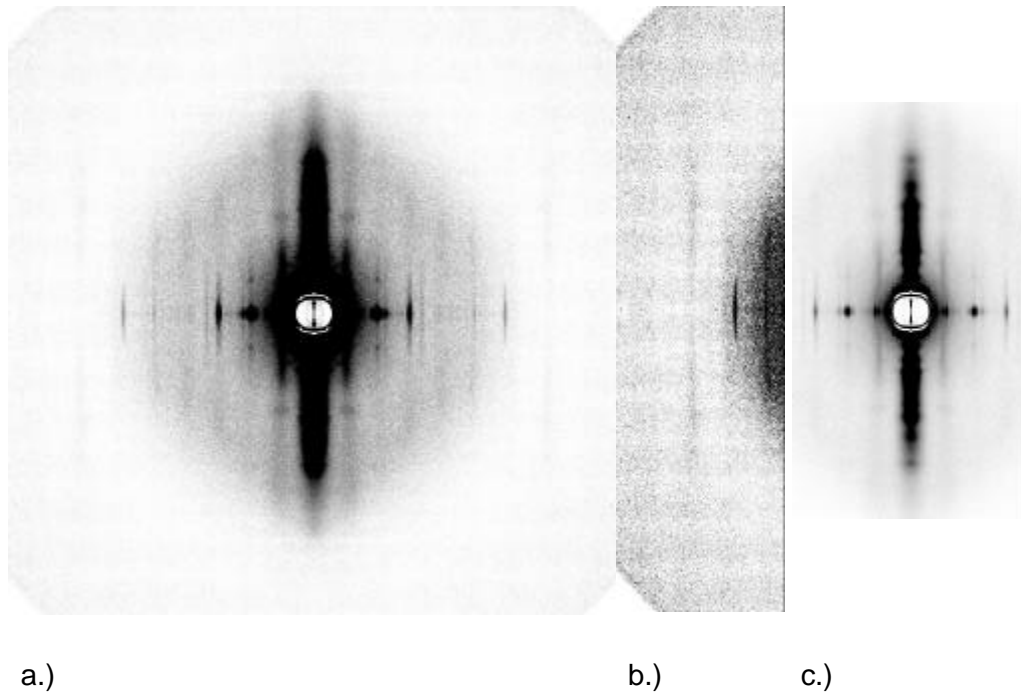


Abb.11: Diffraktionsbild von Muskelfasern bei niedriger Ca<sup>++</sup>-Konzentration (Relaxations-Bedingungen) mit inkorporiertem AIF<sub>4</sub> (AIF<sub>A</sub>), bei 2°C in a.) mit mittlerer, b.) höchster und c.) geringster Intensität. Es wurden 6 Bilder von 3 Einzelfaserpräparationen zusammen addiert (Belichtungszeit insg. 180sek.).

AM.MgADP.AIF<sub>4</sub>-Komplexe aus aktivem ‚Turnover‘ (AIF<sub>A</sub>-Zustände)

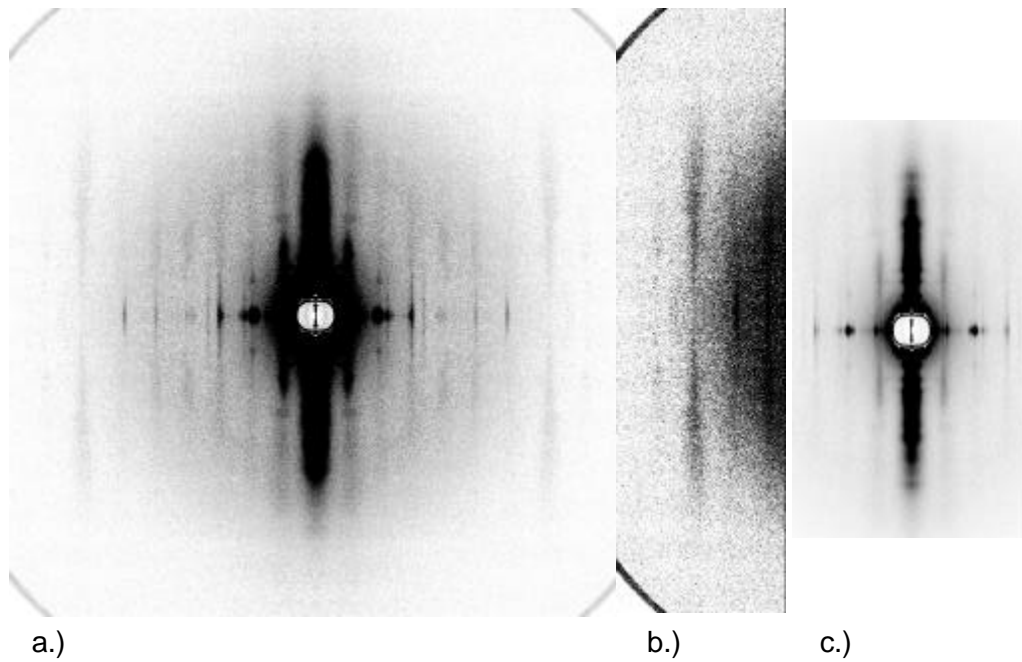


Abb.12: Diffraktionsbild von Muskelfasern bei niedriger Ca<sup>++</sup>-Konzentration mit inkorporiertem AIF<sub>4</sub> (AIF<sub>A</sub>), bei 12°C in a.) mit mittlerer, b.) höchster und c.) geringster Intensität. Es wurden 3 Bilder von 3 Einzelfaserpräparationen zusammen addiert (Belichtungszeit insg. 90sek.).

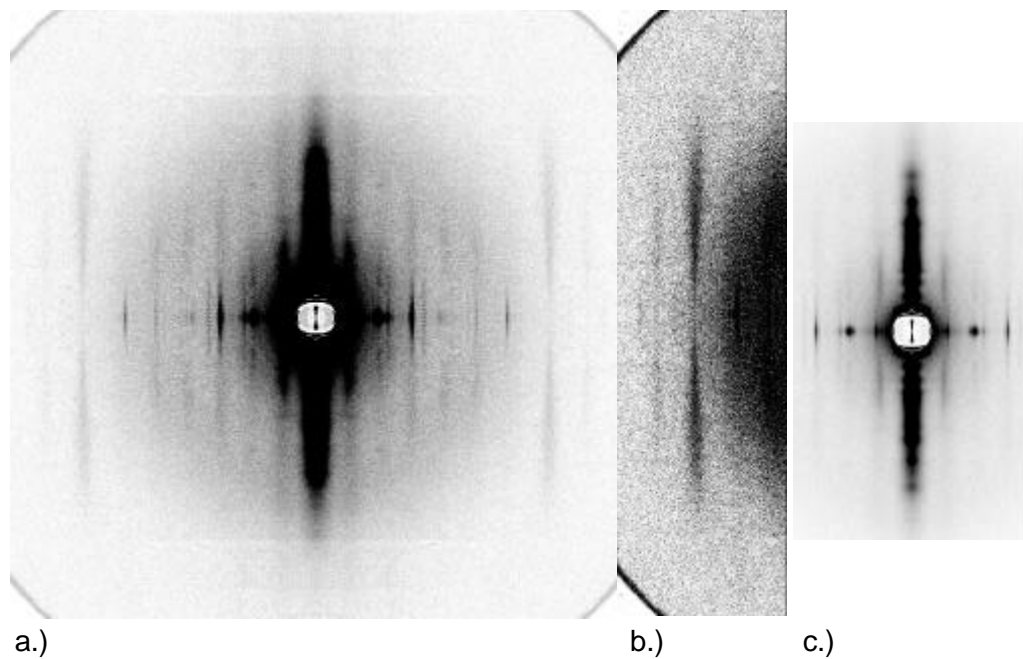


Abb.13: Diffraktionsbild von Muskelfasern bei hoher Ca<sup>++</sup>-Konzentration mit inkorporiertem AIF<sub>4</sub> (AIF<sub>A</sub>), bei 12°C in a.) mit mittlerer, b.) höchster und c.) geringster Intensität. Es wurden 3 Bilder von 3 Einzelfaserpräparationen zusammen addiert (Belichtungszeit insg. 90sek.).

AM.MgADP.AIF<sub>4</sub>-Komplexe generiert aus Rigor (AIF<sub>R</sub>-Zustände)

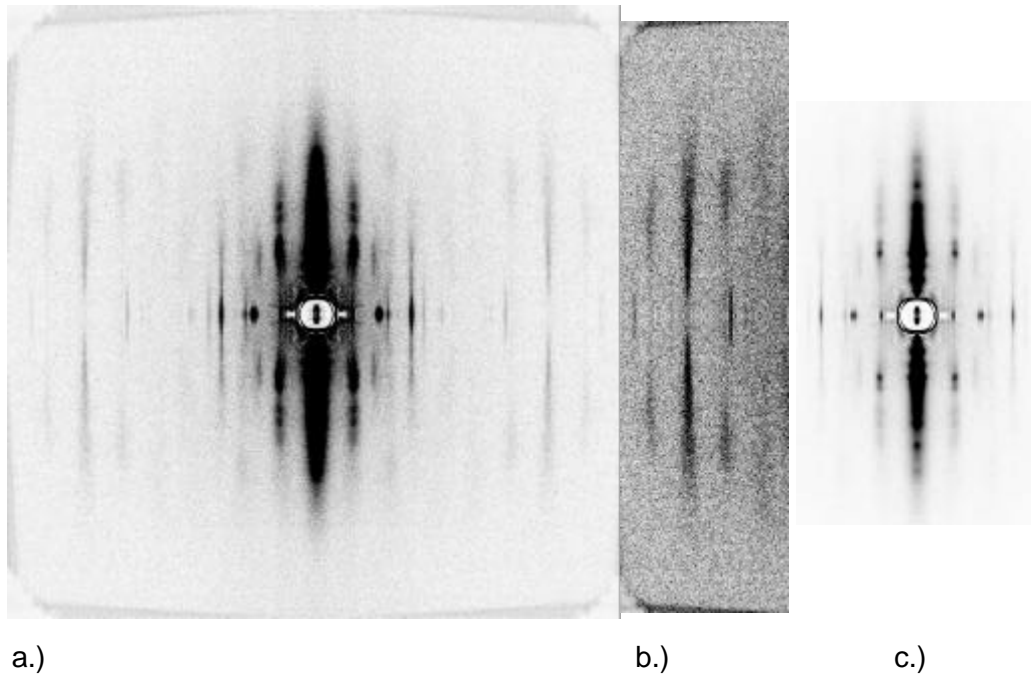


Abb.14: Diffraktionsbild von Muskelfasern im MgRigor bei niedriger Ca<sup>++</sup>-Konzentration, in a.) mit mittlerer, b.) höchster und c.) geringster Intensität. Es wurden 3 Bilder von 3 Einzelfaserpräparationen zusammen addiert (Belichtungszeit insg. 60sek.).

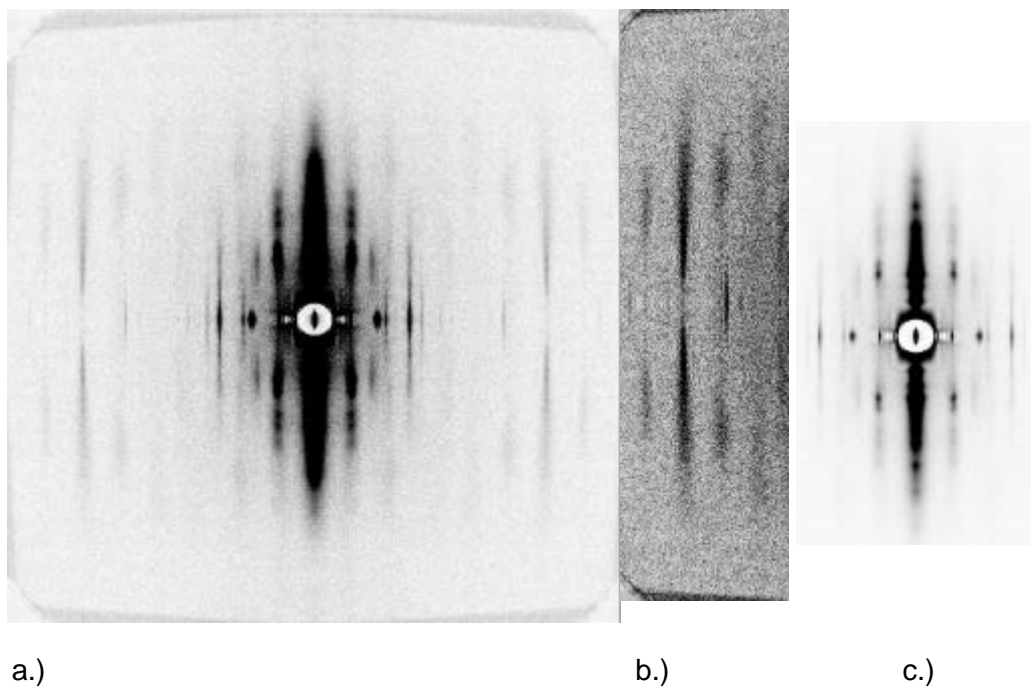


Abb.15: Diffraktionsbild von Muskelfasern im MgRigor bei hoher Ca<sup>++</sup>-Konzentration, in a.) mit mittlerer, b.) höchster und c.) geringster Intensität. Es wurden 3 Bilder von 3 Einzelfaserpräparationen zusammen addiert (Belichtungszeit insg. 60sek.).



AM.MgADP.AIF<sub>4</sub>-Komplexe generiert aus Rigor (AIF<sub>R</sub>-Zustände)

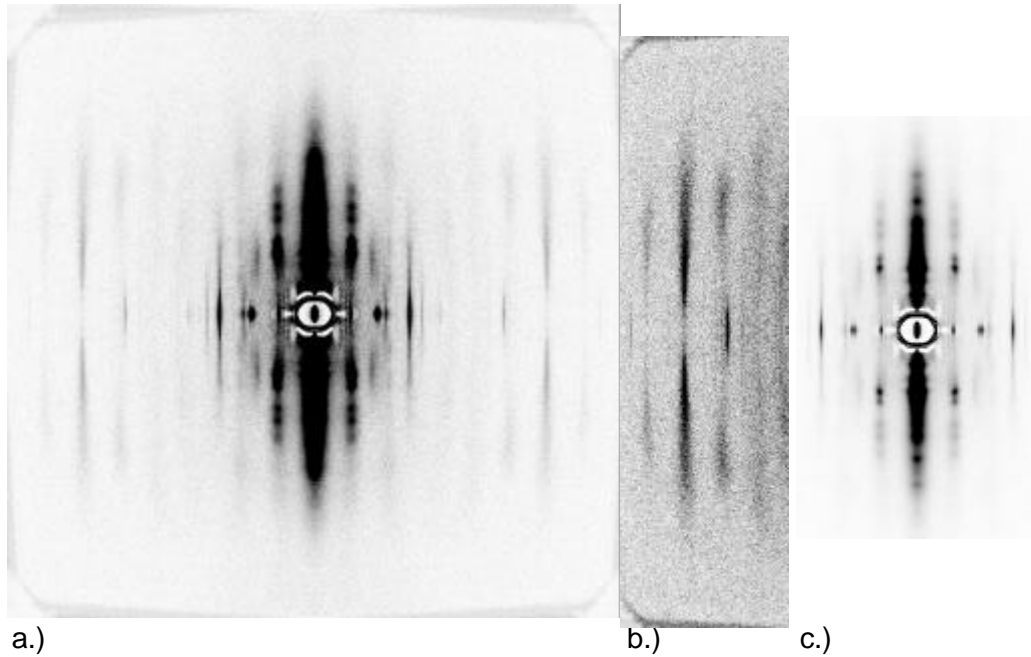


Abb.16: Diffraktionsbild von Muskelfasern im MgRigor mit MgADP bei niedriger Ca<sup>++</sup>-Konzentration, in a.) mit mittlerer, b.) höchster und c.) geringster Intensität. Es wurden 5 Bilder von 4 Einzelfaserpräparationen zusammen addiert (Belichtungszeit insg. 100sek.).

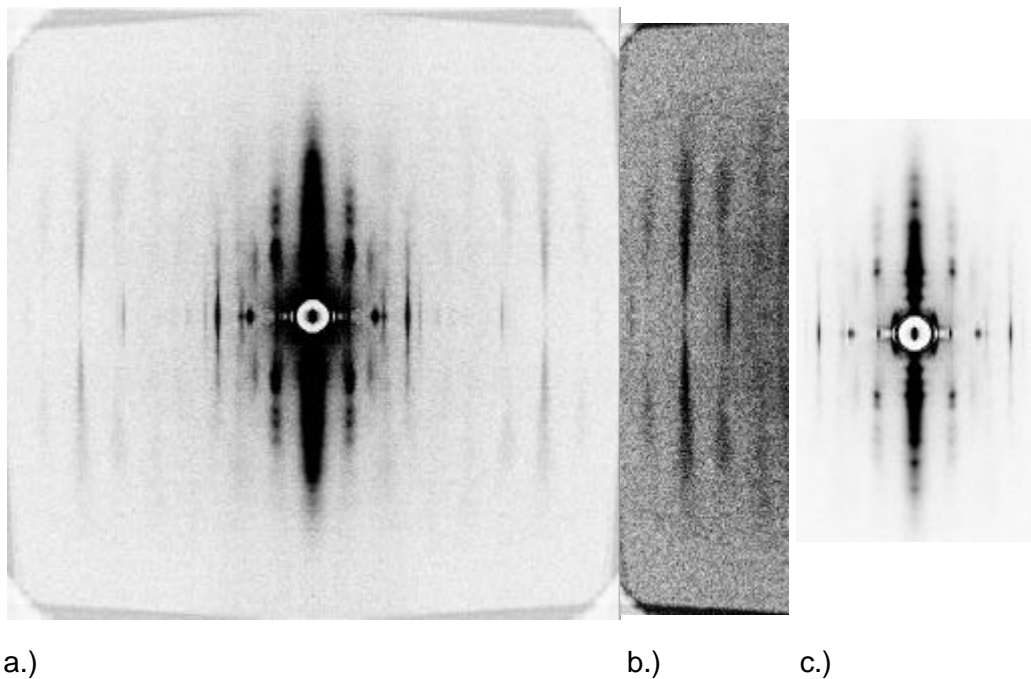


Abb.17: Diffraktionsbild von Muskelfasern im MgRigor mit MgADP bei hoher Ca<sup>++</sup>-Konzentration, in a.) mit mittlerer, b.) höchster und c.) geringster Intensität. Es wurden 2 Bilder von 2 Einzelfaserpräparationen zusammen addiert (Belichtungszeit insg. 40sek.).



AM.MgADP.AIF<sub>4</sub>-Komplexe generiert aus Rigor (AIF<sub>R</sub>-Zustände)

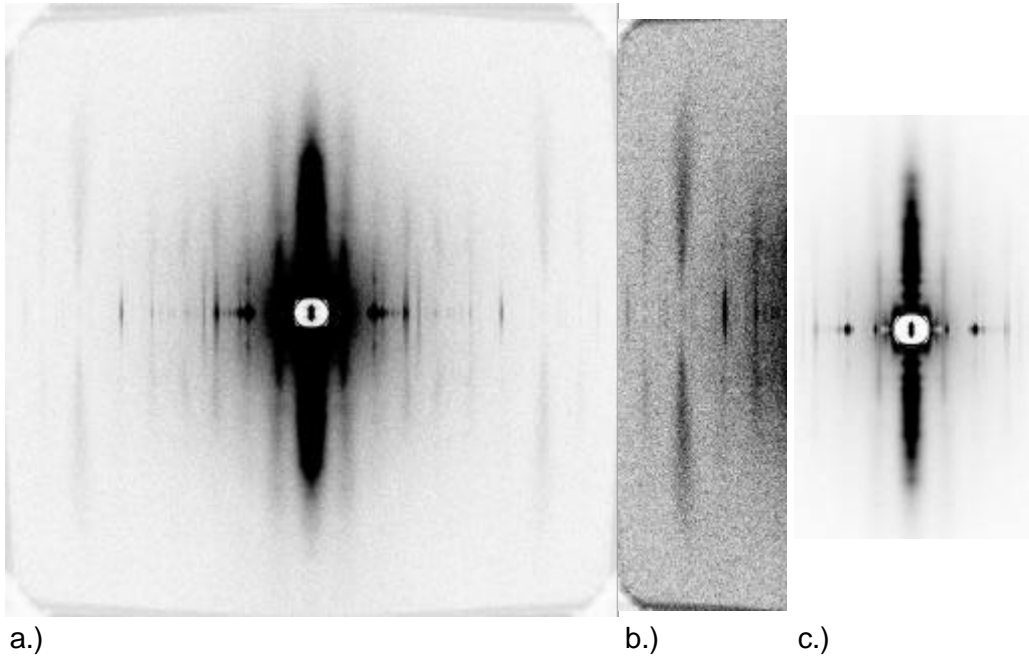


Abb.18: Diffraktionsbild von Muskelfasern mit MgADP und AIF<sub>4</sub> (AIF<sub>R</sub>-Zustand) bei niedriger Ca<sup>++</sup>-Konzentration bei 2°C, in a.) mit mittlerer, b.) höchster und c.) geringster Intensität. Es wurden 8 Bilder von 4 Einzelfaserpräparationen zusammen addiert (Belichtungszeit insg. 160sek.).

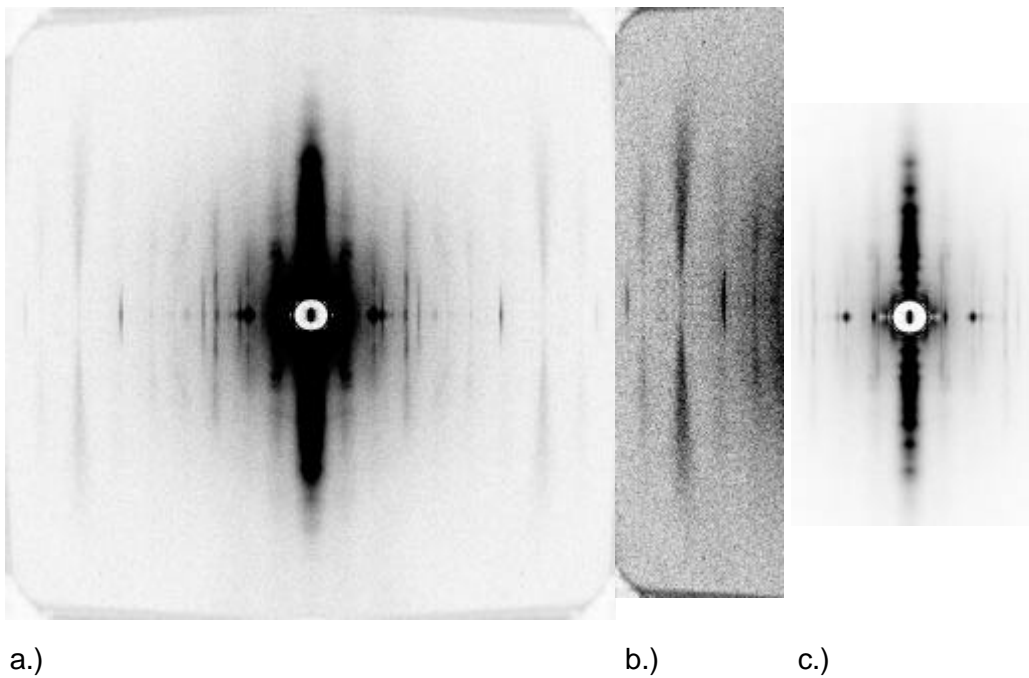


Abb.19: Diffraktionsbild von Muskelfasern mit MgADP und AIF<sub>4</sub> (AIF<sub>R</sub>-Zustand) bei hoher Ca<sup>++</sup>-Konzentration (2°C), in a.) mit mittlerer, b.) höchster und c.) geringster Intensität. Es wurden 8 Bilder von 4 Einzelfaserpräparationen zusammen addiert (Belichtungszeit insg. 160sek.).

AM.MgADP.AIF<sub>4</sub>-Komplexe generiert aus Rigor (AIF<sub>R</sub>-Zustände)

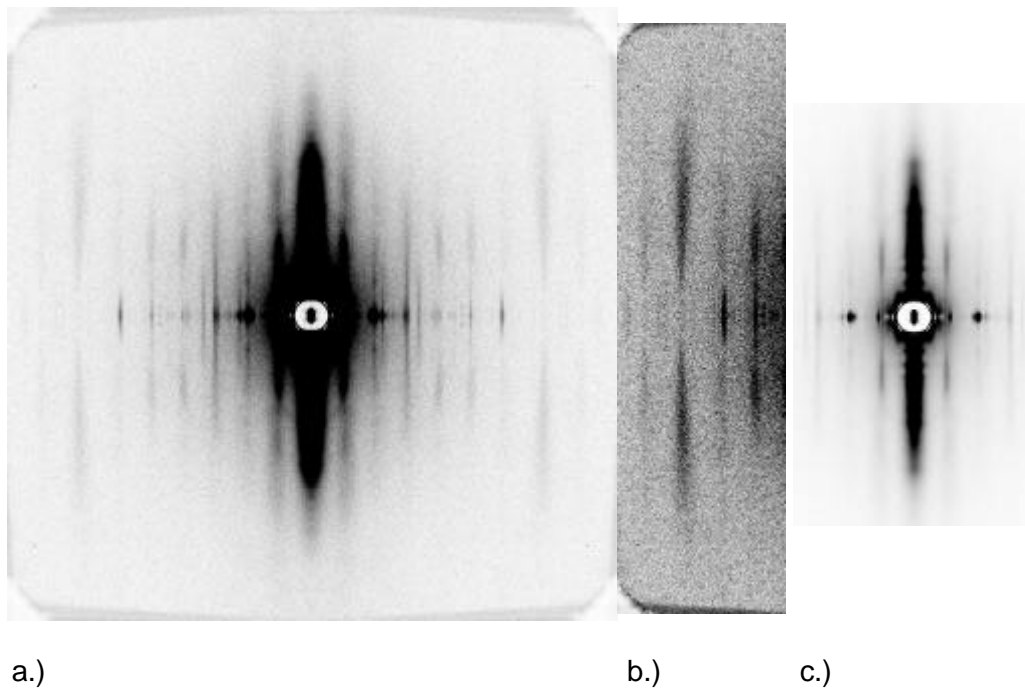


Abb.20: Diffraktionsbild von Muskelfasern mit MgADP und AIF<sub>4</sub> (AIF<sub>R</sub>-Zustand) bei niedriger Ca<sup>++</sup>-Konzentration und 12°C, in a.) mit mittlerer, b.) höchster und c.) geringster Intensität. Es wurden 8 Bilder von 4 Einzelfaserpräparationen zusammen addiert (Belichtungszeit insg. 160sek.).

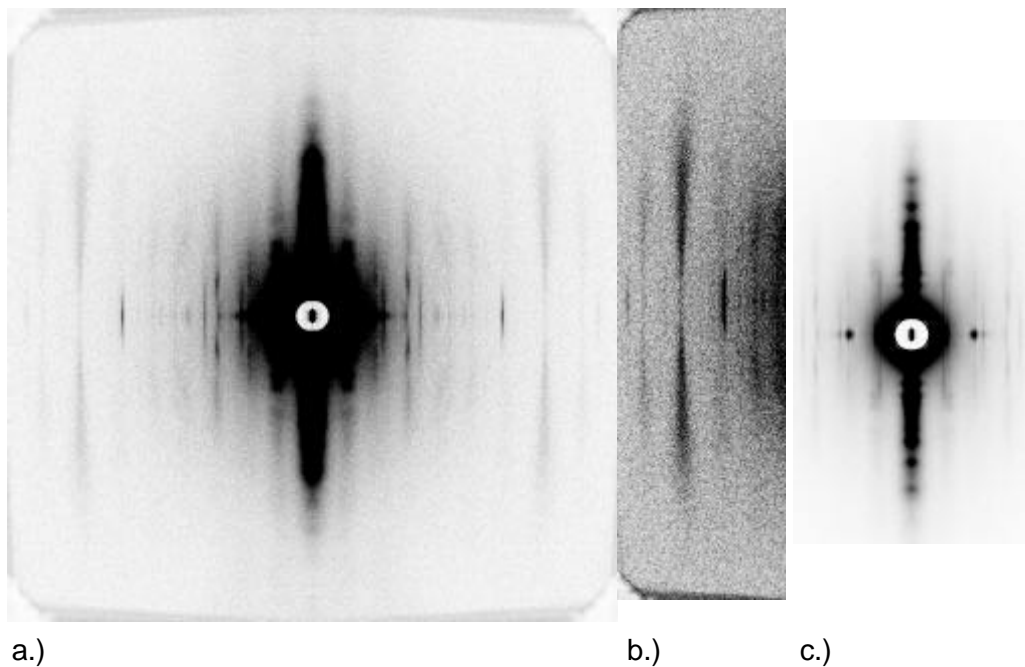


Abb.21: Diffraktionsbild von Muskelfasern mit MgADP und AIF<sub>4</sub> (AIF<sub>R</sub>-Zustand) bei hoher Ca<sup>++</sup>-Konzentration und 12°C, in a.) mit mittlerer, b.) höchster und c.) geringster Intensität. Es wurden 8 Bilder von 4 Einzelfaserpräparationen zusammen addiert (Belichtungszeit insg. 160sek.).

### Querbrücken-Zustände in Gegenwart von BDM

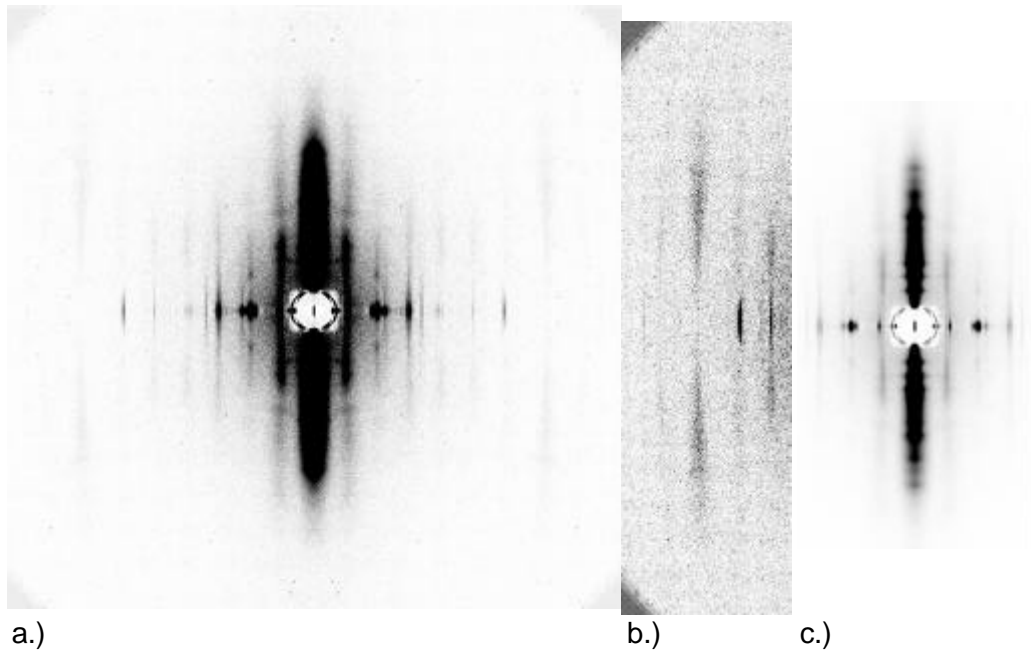


Abb.22: Diffraktionsbild von Muskelfasern in Gegenwart von BDM mit niedriger  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration bei  $2^\circ\text{C}$ , in a.) mit mittlerer, b.) höchster und c.) geringster Intensität. Es wurden 4 Bilder von 4 Einzelfaserpräparationen zusammen addiert (Belichtungszeit insg. 240sek.).

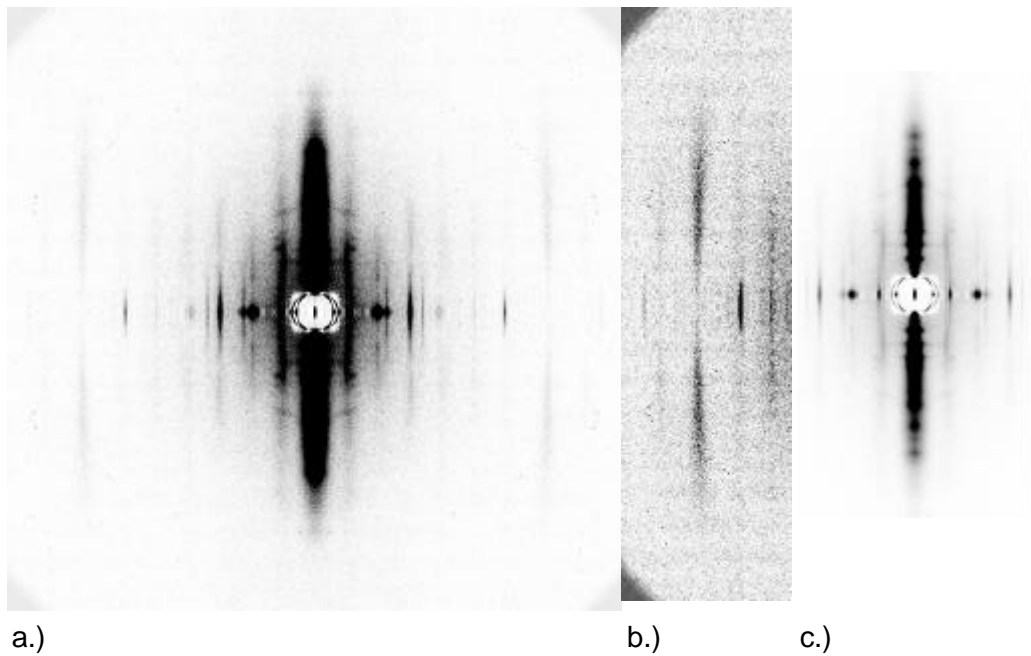


Abb.23: Diffraktionsbild von Muskelfasern in Gegenwart von BDM mit hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration bei  $2^\circ\text{C}$ , in a.) mit mittlerer, b.) höchster und c.) geringster Intensität. Es wurden 4 Bilder von 4 Einzelfaserpräparationen zusammen addiert (Belichtungszeit insg. 240sek.).

### Querbrücken-Zustände in Gegenwart von BDM

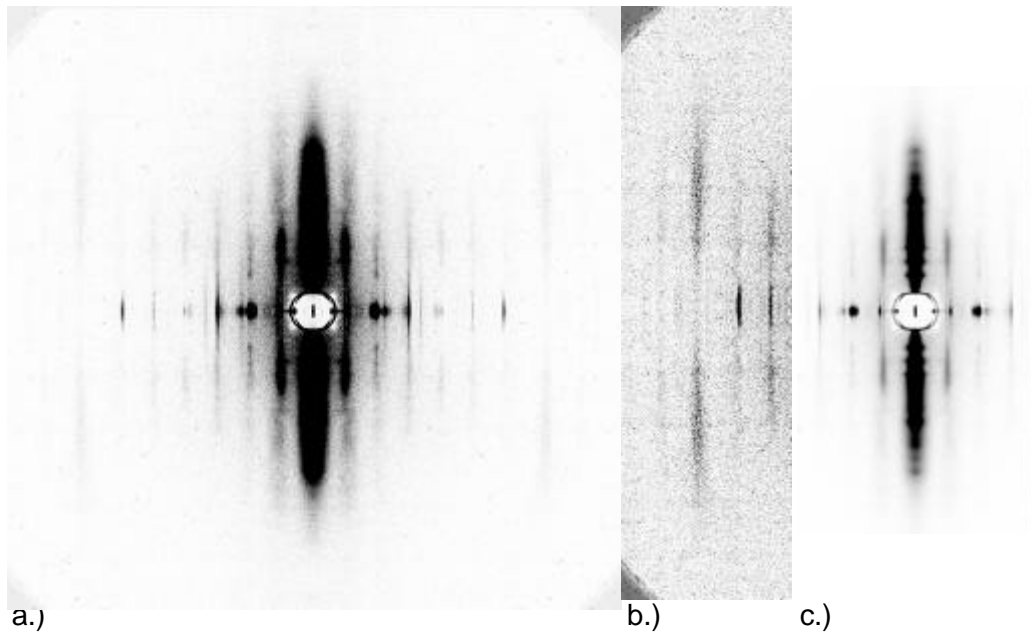


Abb.24: Diffraktionsbild von Muskelfasern in Gegenwart von BDM mit niedriger  $Ca^{++}$ -Konzentration bei  $12^{\circ}C$ , in a.) mit mittlerer, b.) höchster und c.) geringster Intensität. Es wurden 4 Bilder von 4 Einzelfaserpräparationen zusammen addiert (Belichtungszeit insg. 240sek.).

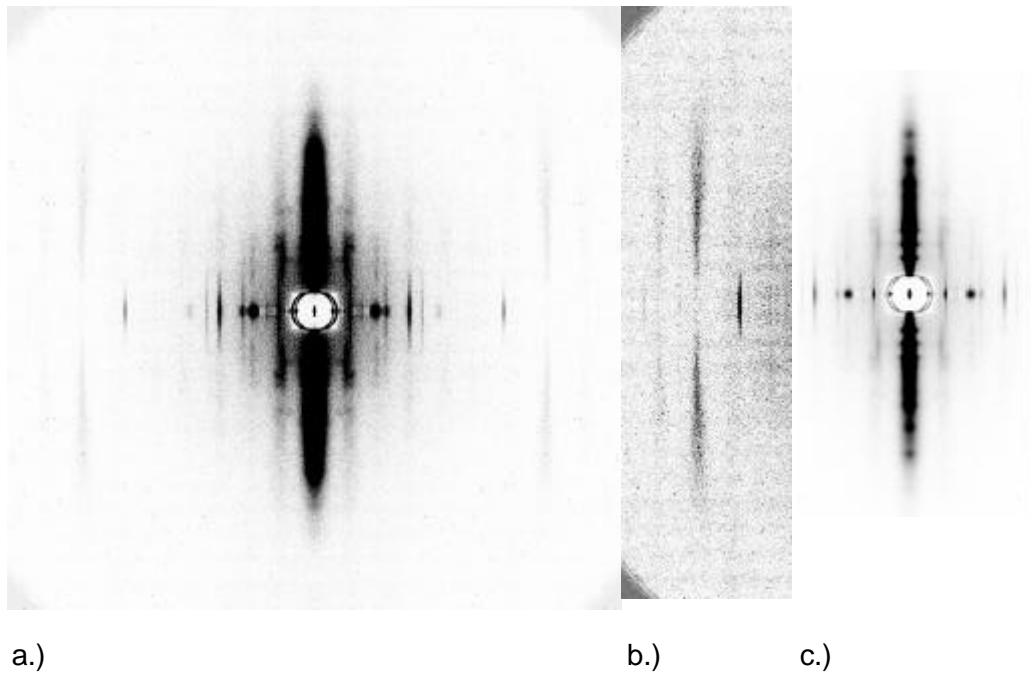


Abb.25: Diffraktionsbild von Muskelfasern in Gegenwart von BDM mit hoher  $Ca^{++}$ -Konzentration bei  $12^{\circ}C$ , in a.) mit mittlerer, b.) höchster und c.) geringster Intensität. Es wurden 4 Bilder von 4 Einzelfaserpräparationen zusammen addiert (Belichtungszeit insg. 240sek.).

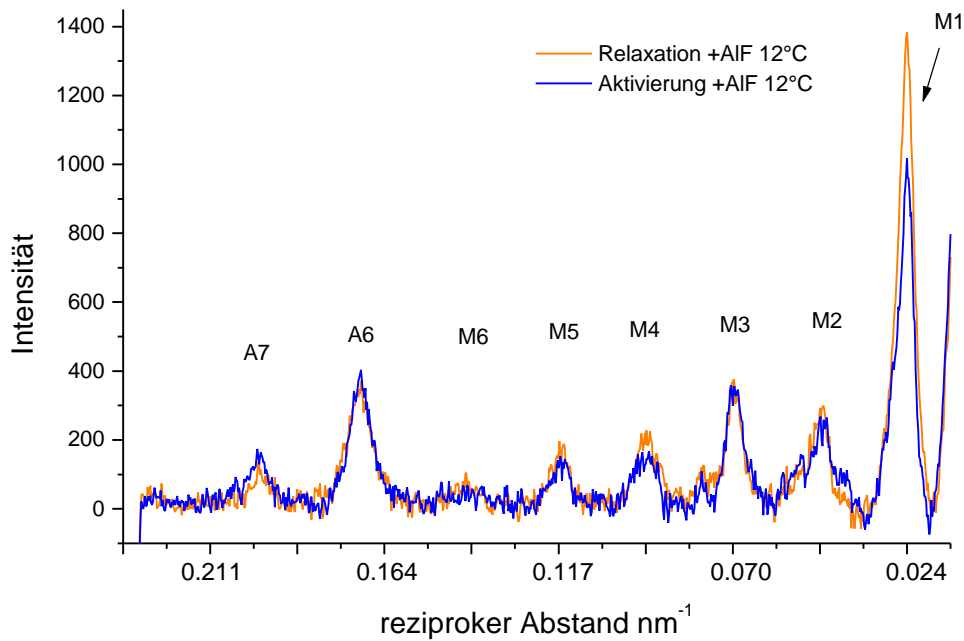


Abb.26: AIF-A Experimente: Intensitätsprofil der Myosin- und Aktin-Schichtlinien aus den in Abb.12 und 13 gezeigten Diffraktionsbildern. Dargestellt ist eine Integration über 310 Pixel parallel zum Meridian. Markiert sind hier die Myosin-Schichtlinien 1-6 (M1-6), sowie die 6. und 7. Aktin-Schichtlinie (A6 und A7).

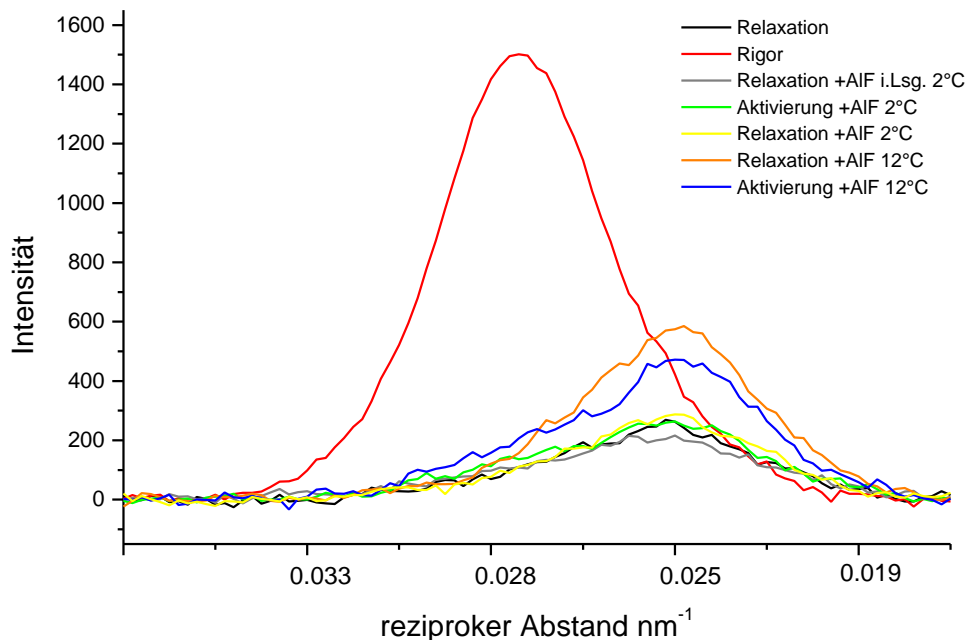


Abb.27: AIF-A Experimente: Intensitätsprofil der ersten Myosin- und Aktin-Schichtlinie aus einer Integration über 76 Pixel parallel zum Meridian aus den in Abb.9 und 10-13 gezeigten Diffraktionsbildern sowie aus zugehörigen Diffraktionsbildern in Relaxation und Rigor. Zu sehen ist im Rigor der Aktin-Peak (bei  $1/37 \text{ nm}^{-1}$ ), unter Relaxation der Myosin-Peak (bei  $1/42.9 \text{ nm}^{-1}$ ).

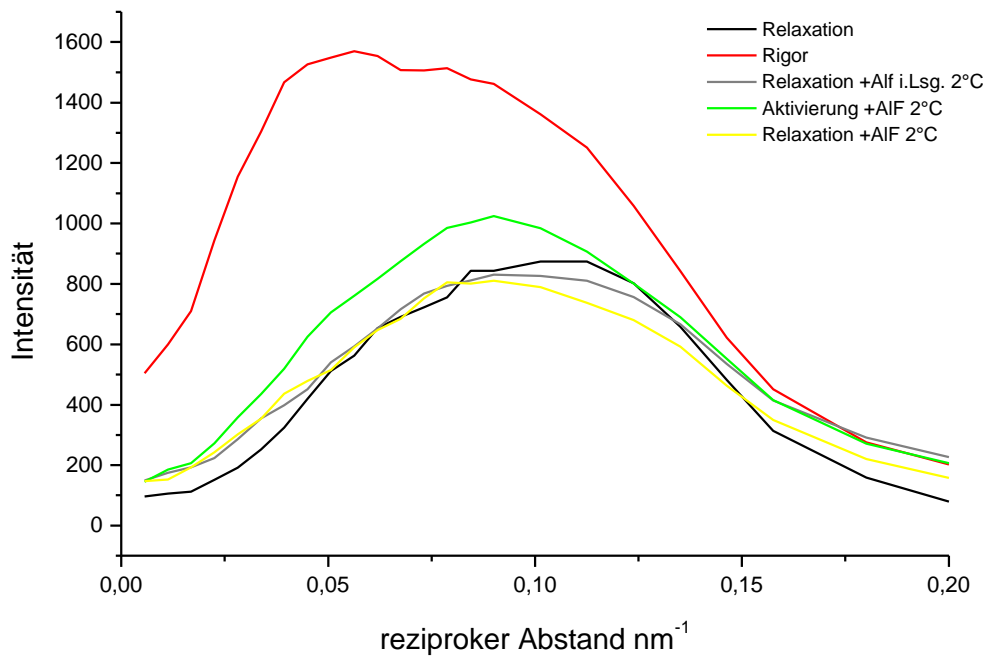


Abb.28: AIF-A Experimente: Intensitätsprofile der 1/5.9 nm<sup>-1</sup> Aktin-Schichtlinie aus einer Serie von Profilen parallel zum Meridian aus den in Abb.12 und 13 gezeigten Diffraktionsbildern sowie aus zugehörigen Diffraktionsbildern in Relaxation und Rigor als Funktion der radialen Position. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei verschiedenen Analysen mit ‚Origin‘.

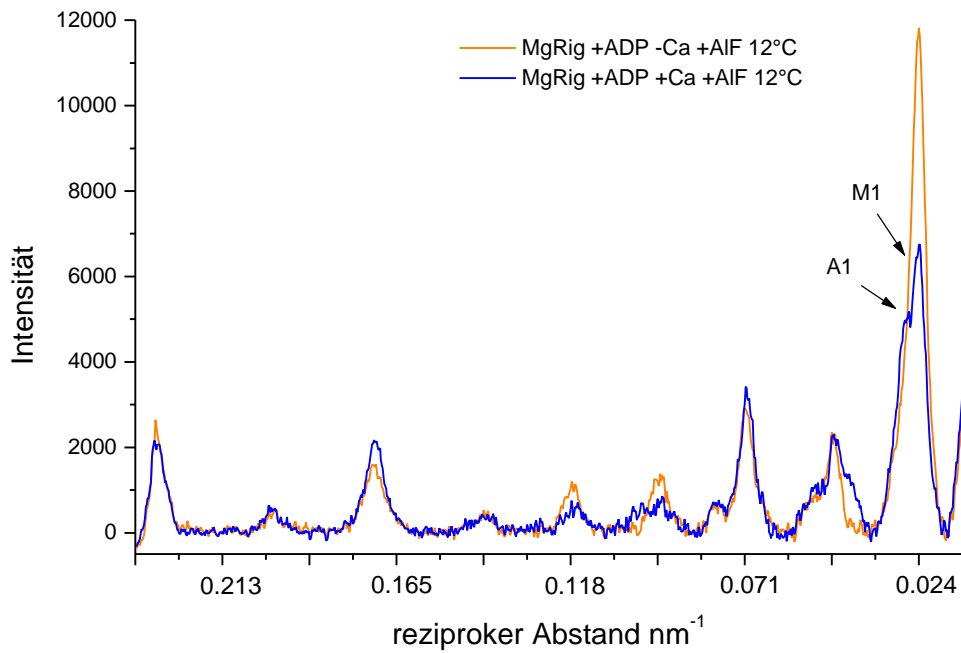
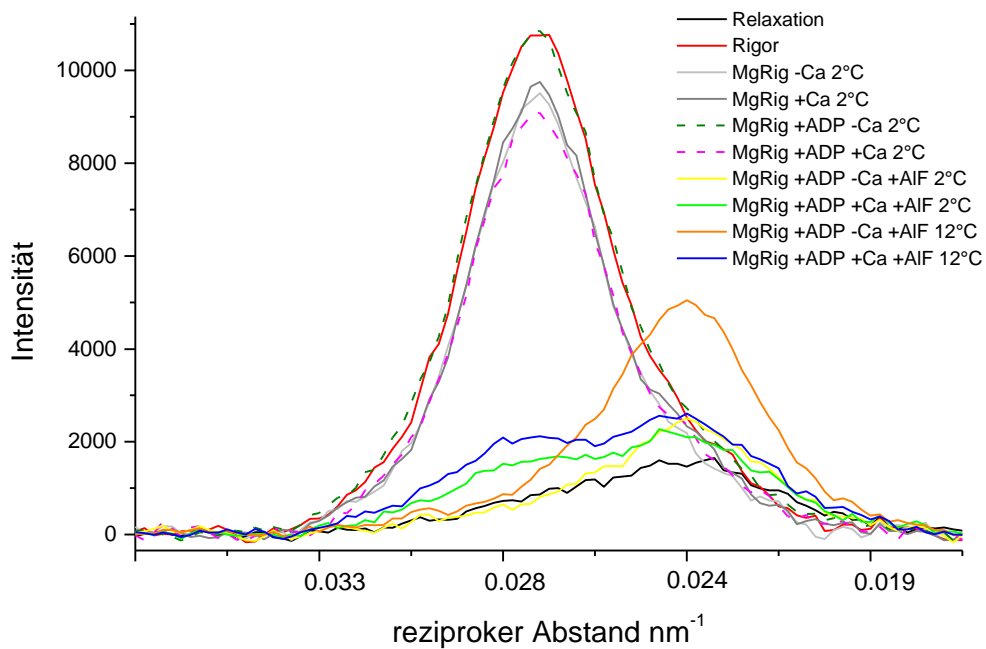


Abb.29: AIF-R Experimente: Intensitätsprofil der Myosin- und Aktin-Schichtlinien aus einer Integration über 310



Pixel parallel zum Meridian aus den in Abb.20 und 21 gezeigten Diffraktionsbildern. Markiert sind hier die erste Myosin- und Aktin-Schichtlinie (M1 bzw. A1)

Abb.30: AIF-R Experimente: Intensitätsprofil der ersten Myosin- und Aktin-Schichtlinie aus einer Integration parallel zum Meridian über 76 Pixel aus den in Abb.7, 8 und 14 - 21 gezeigten Diffraktionsbildern.

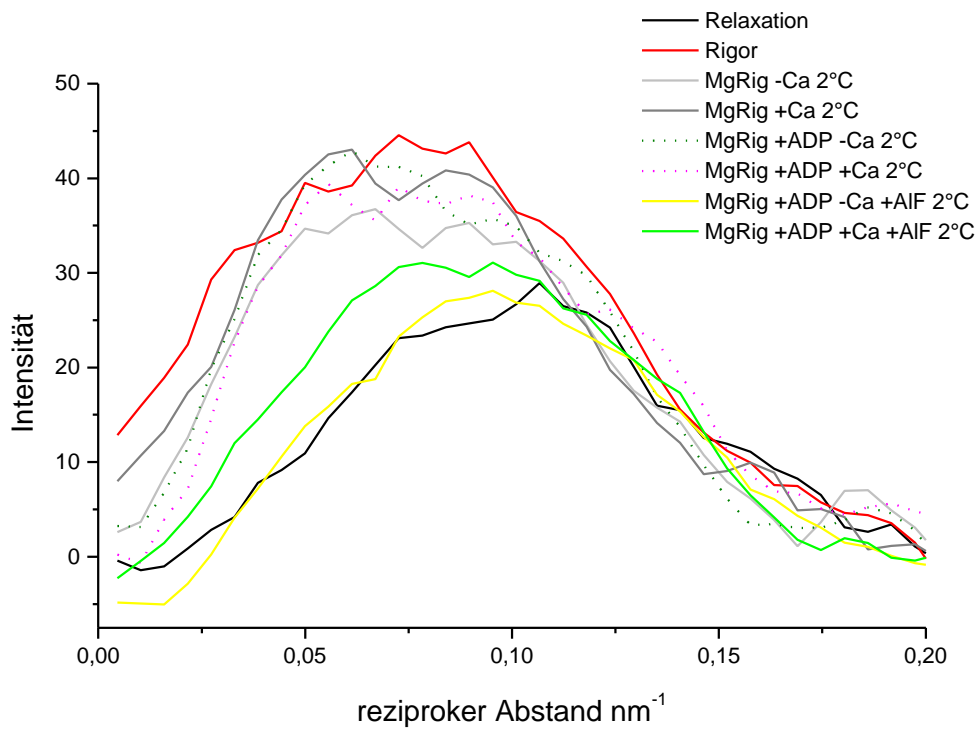


Abb.31: AIF<sub>R</sub> Experimente: Intensitätsprofile der 1/5.9 nm<sup>-1</sup> Aktin-Schichtlinie aus einer automatischen Analyse-Routine (vgl. dazu Diskussion 4.1.2).



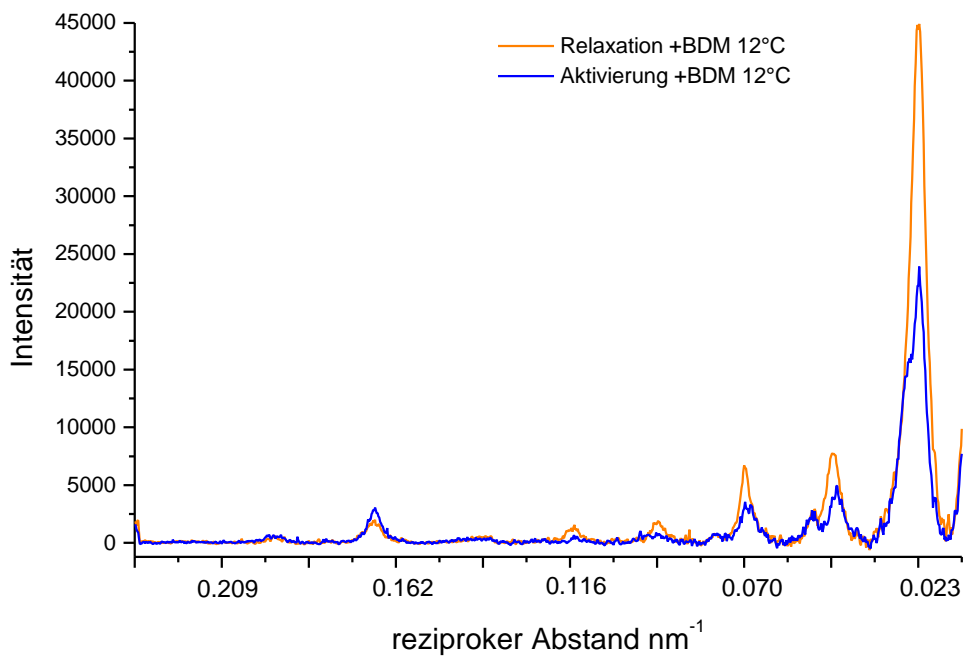


Abb.32: BDM-Experimente: Intensitätsprofil der Myosin- und Aktin-Schichtlinien aus einer Integration über 310 Pixel parallel zum Meridian aus den in Abb.24 und 25 gezeigten Diffraktionsbildern.

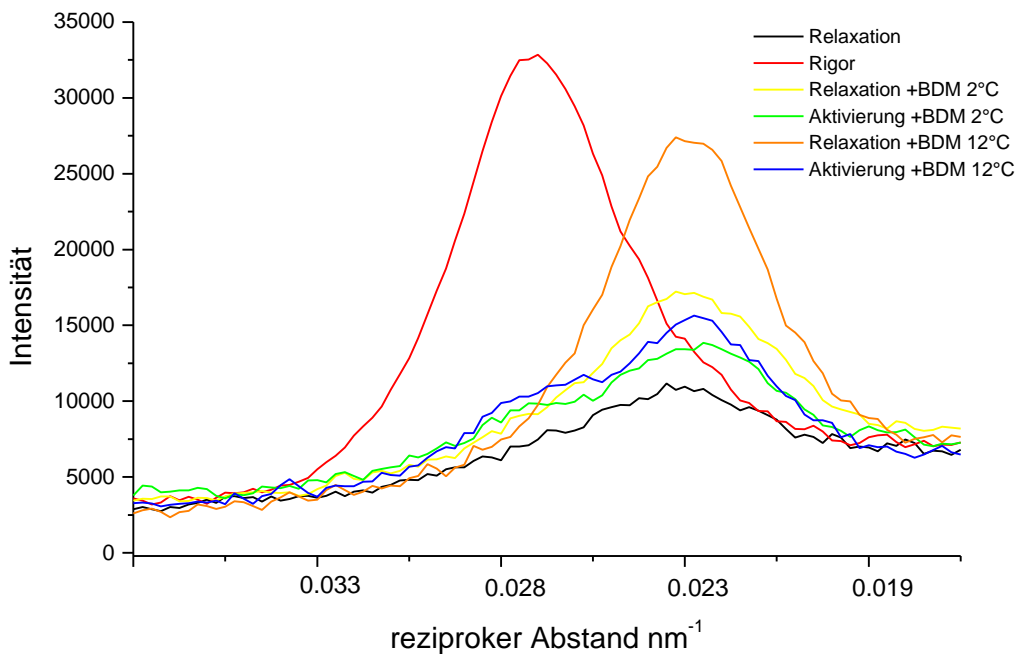


Abb.33: BDM-Experimente: Intensitätsprofil der ersten Myosin- und Aktin-Schichtlinie aus einer Integration parallel zum Meridian über 76 Pixel aus den in Abb. 22 - 25 gezeigten Diffraktionsbildern sowie aus zugehörigen Diffraktionsbildern in Relaxation und Rigor.

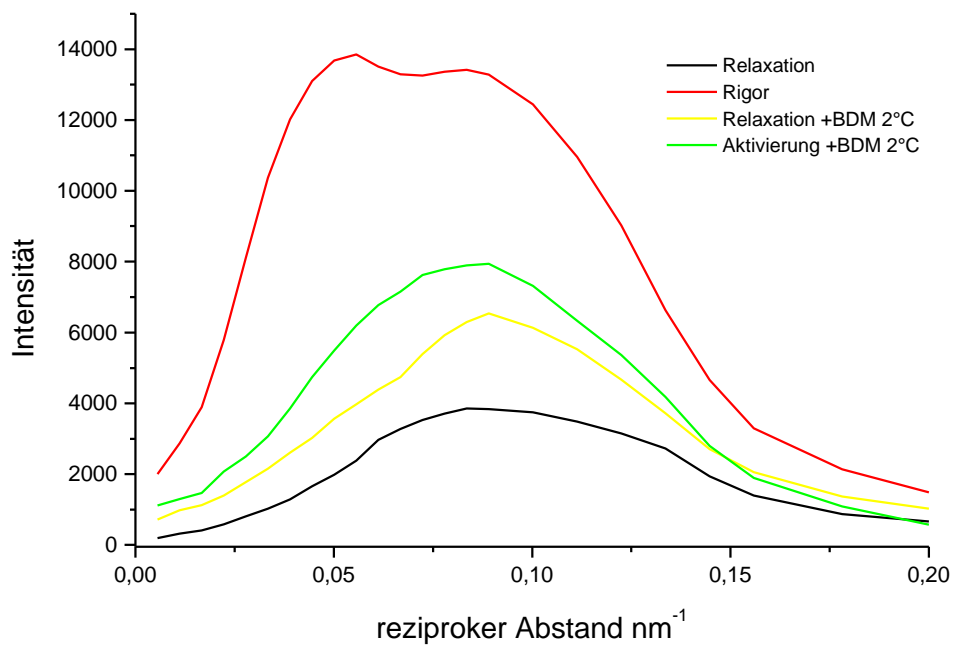


Abb.34: BDM-Experimente: Intensitätsprofile der  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie aus einer Serie von Profilen parallel zum Meridian aus den in Abb.22 und 23 gezeigten Diffraktionsbildern sowie aus zugehörigen Diffraktionsbildern in Relaxation und Rigor, dargestellt als Funktion der radialen Position. Gezeigt ist der Mittelwert aus vier verschiedenen Analysen mit ‚Origin‘.

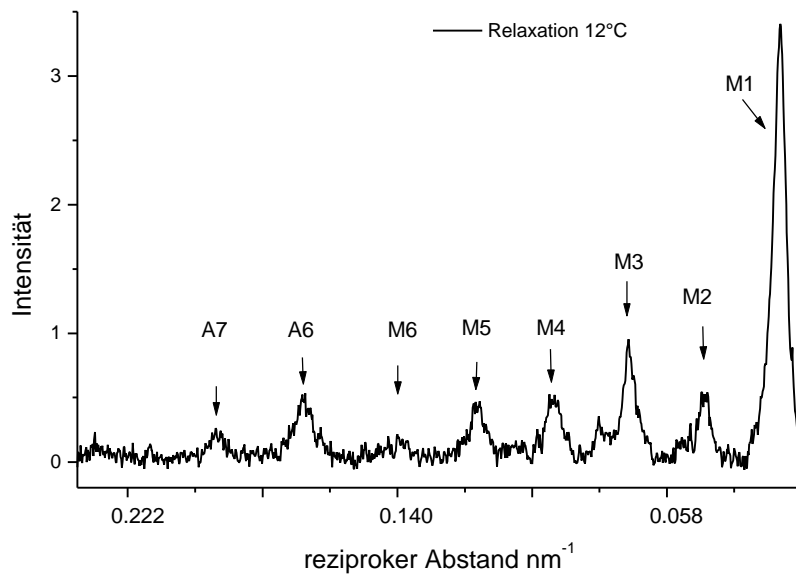


Abb.35: Intensitätsprofil der Aktin- und Myosin-Schichtlinien eines Einzelfaserpräparates unter Relaxations-Bedingungen bei 12°C (Integration parallel zum Meridian) zur Veranschaulichung des temperaturbedingten Anstiegs der Intensität der Myosin-Schichtlinien. (A = Aktin-Schichtlinien; M = Myosin-Schichtlinien).

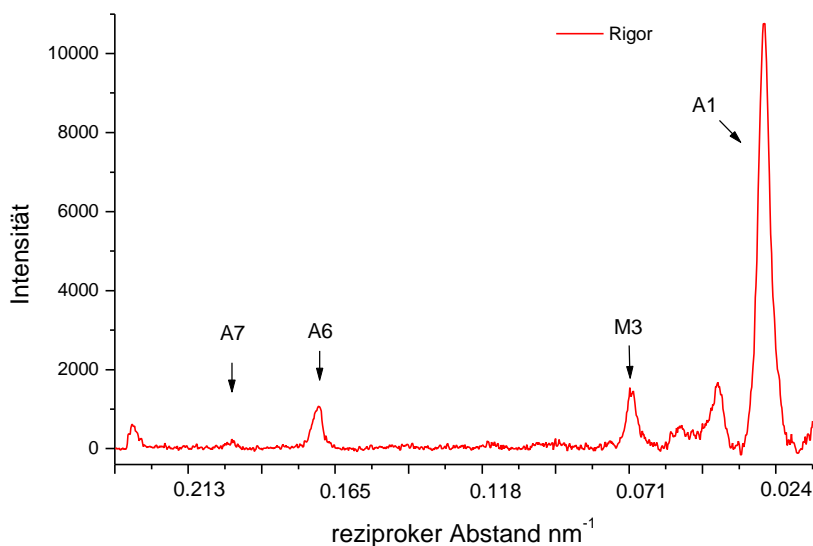


Abb.36: Intensitätsprofil der Schichtlinien eines Diffraktionsbildes aufgenommen unter Rigor-Bedingungen (Abb.8) aus einer 310 Pixel breiten Integration parallel zum Meridian (A = Aktin-Schichtlinien; M = Myosin-Schichtlinie). Beachte das Verschwinden der Myosinschichtlinien im Rigor verglichen mit Abb.35.

#### 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, Zwischen-Zustände des Akto-Myosin-Komplexes (Querbrücken) im Querbrückenzyklus der Skelettmuskulatur unmittelbar vor und unter Kraftgenerierung zu untersuchen. Dabei ist derzeit umstritten, ob es sich bei der Kraftentwicklung in der Hauptsache um eine Strukturumlagerung aus einem Querbrücken-Zustand geringer Aktinaffinität (nicht-stereospezifische Akto-Myosinbindung) in einen Querbrücken-Zustand hoher Aktinaffinität (stereospezifische Akto-Myosinbindung) handelt (Brenner et al., 1995), oder ob Strukturveränderungen innerhalb zweier Querbrücken-Zustände stereospezifischer Aktinbindung auch einen wesentlichen Beitrag zur isometrischen Kraftgenerierung leisten (Huxley and Simmons 1971). Möglicherweise sind auch beide Mechanismen an der Kraftentwicklung beteiligt. Unabhängig von möglichen Beiträgen von Strukturumlagerungen in den Querbrücken-Zuständen stereospezifischer Aktinbindung ist die Charakterisierung der Strukturen des Akto-Myosin-Komplexes vor und nach dem Übergang von nicht- stereospezifischer Aktinbindung in stereospezifische Aktinbindung und damit der für die Kraftentwicklung notwendigen Strukturumlagerungen für das allgemeine Verständnis der Funktion von Motorproteinen und insbesondere zum Verständnis des kraftgenerierenden Mechanismus essentiell.

In der vorliegenden Arbeit sollten durch Verwendung eines Phosphat-Analogons ( $\text{AlF}_4$ ) bzw. von BDM (2,3-Butandion-Monoxim) Querbrücken-Zustände unmittelbar vor dem Übergang in die stereospezifisch gebundene Form des Akto-Myosin-Komplexes untersucht werden, und zwar mit Hilfe der 2D-Röntgendiffraktion am strukturell intakten kontraktilem Apparat, d.h. direkt an Muskelfasern. Wichtig ist hierbei, dass vor allem auch der Akto-Myosin-Komplex unter Aktivierungs-Bedingungen, also bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration ( $\text{A}_{on}\text{MDP}\cdot\text{P}_i$ ) charakterisiert werden musste, um eine präzise Zuordnung zu nicht-stereospezifisch bzw. stereospezifisch gebundenen Akto-Myosin-Komplexen sicherstellen zu können. Das bedeutet aber, dass die experimentellen Bedingungen so zu wählen waren, dass auch bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration aktiver ‚Turnover‘ mit einer Mischung aus Zuständen geringer und hoher Aktinaffinität (‚weak‘- und ‚strong-binding‘ states) verhindert werden konnte.

Biochemisch ist das  $\text{MgATP}$ -Molekül in der Nukleotidbindungstasche des Myosinkopfes vor der Kraftgenerierung schon in  $\text{MgADP}$  und  $\text{P}_i$  gespalten. Es ist allgemein anerkannt, dass das Freisetzen des anorganischen Phosphatrests aus der Nukleotidbindungstasche im Myosinkopf und die daraus resultierende Strukturänderung der Motordomäne über ein oder zwei Schritte zur Kraftgenerierung führt. Aluminiumfluorid im Komplex mit  $\text{MgADP}$  ( $\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$ ) stellt ein  $\text{MgADP}\cdot\text{P}_i$ -Analogon dar (Chase et al., 1994), das kristallographisch als ‚Übergangszustand‘ vor Phosphatabgabe beschrieben wurde

(Fisher et al., 1995a; Fisher et al., 1995b). Der Akto-Myosin-MgADP.AIF<sub>4</sub>-Komplex (AM.MgADP.AIF<sub>4</sub>) sollte entsprechend ein Analog-Zustand der nicht stereospezifisch gebundenen Akto-Myosin-Komplexe sein. Durch MgADP.AIF<sub>4</sub> sollte es entsprechend zu einer Akkumulation von Myosinköpfen in Querbrücken-Zuständen kommen, die genau vor dem Übergang von ‚weak‘ nach ‚strong‘ und somit unmittelbar vor dem kraftgenerierenden Schritt liegen, da das AIF<sub>4</sub> nicht, oder nur extrem langsam aus dem MgADP.AIF<sub>4</sub>-Komplex im Myosinkopf abdissoziieren kann. BDM verhindert in Gegenwart von MgATP, selbst bei hoher Ca<sup>++</sup>-Konzentration, die aktive Kraftentwicklung, da in Gegenwart von BDM Querbrücken auch bei hoher Ca<sup>++</sup>-Konzentration in MgADP.P<sub>i</sub>-Zuständen geringer Aktinaffinität akkumulieren sollen (Regnier et al., 1995).

Die vorliegenden Experimente lassen sich in drei Gruppen einteilen: Im ersten Ansatz wurde chemisch permeabilisierten einzelnen Muskelfasern sog. ‚Skinned fibers‘ während aktivem ATPase-Zyklus bei hoher Ca<sup>++</sup>-Konzentration das Phosphat-Analogon AIF<sub>4</sub> angeboten. AIF<sub>4</sub> bindet während aktivem ATPase-Zyklus der Querbrücken im Austausch gegen P<sub>i</sub>. Es resultiert ein MgADP.AIF<sub>4</sub>-Komplex in der Nukleotidbindungstasche des Myosinkopfes (AIF<sub>-A</sub>) (Chase et al., 1993). In einem zweiten Ansatz kam wiederum MgADP.AIF<sub>4</sub> als Nukleotid-Analogon zum Einsatz, allerdings wurden die Fasern unter Rigor-Bedingungen mit MgADP und AIF<sub>4</sub> inkubiert (AIF<sub>-R</sub>) und nicht während aktivem Querbrücken-Zyklus. In einem dritten Versuchsansatz wurden die Eigenschaften permeabilisierter Muskelfasern mit BDM bei niedriger und hoher Ca<sup>++</sup>-Konzentration untersucht. Da hierbei die Querbrücken auch bei hoher Ca<sup>++</sup>-Konzentration in einem MgADP.P<sub>i</sub>-Zustand akkumulieren, kommt dieser Ansatz im Vergleich zu den MgADP.AIF<sub>4</sub>-Zuständen den physiologischen Zwischen-Zuständen im Skelettmuskel näher.

Die Ergebnisse aus 2D-Röntgendiffraktionsexperimenten, neben Messungen der Fasersteifheit und Analysen der äquatorialen Reflexe (Enke Mählmann, persönliche Mitteilung), lassen für den MgADP.AIF<sub>4</sub>-Zustand unter Rigor-Bedingungen einen bisher nicht in der Literatur beschriebenen Analog-Zustand des Akto-Myosin-Komplexes vermuten, der aufgrund der hier beschriebenen Eigenschaften einem stereospezifisch und hochaffin gebundenen MgADP.P<sub>i</sub>-Analog-Zustand entspricht, und als Analog-Zustand dem ersten kraftgenerierenden Querbrücken Zwischen-Zustandes entsprechen könnte.

## 4.1 Bemerkungen zu Methode und Auswertung

### 4.1.1 Datenaufnahme

Die 2D-Röntgendiffraktion erlaubt eine Betrachtung des intakten kontraktiven Proteinkomplexes mit entscheidenden Vorteilen gegenüber anderen Methoden. Mit der Kristallographie an isolierten Myosinkopf-Domänen (Fisher et al., 1995b), also ohne Bindung an Aktinfilamente können die Aktin-induzierten Umlagerungen im Akto-Myosin-Komplex nicht beobachtet werden. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen von dekorierten Aktinfilamenten (Milligan and Flicker 1987) sind die Myosinköpfe nicht mehr mit ihrem Myosinfilament (Rückgrat) verbunden, wodurch Strukturveränderungen des Akto-Myosin-Komplexes nicht auch zu elastischer Deformation des Akto-Myosin-Komplexes und sich eigentlich daraus ergebender Kraftentwicklung führen.

Zwischen-Zustände des Akto-Myosin-Komplexes, einschliesslich elastischer Deformation können derzeit ausschließlich durch Registrierung von Röntgenbeugungsspektren von isolierten Muskelfasern untersucht werden. Die dafür entwickelte Methode der ‚single fiber arrays‘ (Kraft et al., 1999) erlaubt mit ausreichender Intensität Reflexe und vor allem auch die oft sehr schwachen Schichtlinien in den Diffraktionsbildern zu registrieren. Dabei hat sich die Anzahl von ca. 30 zu den ‚arrays‘ montierten Fasern, für eine durch hinreichende Intensität gute Analysierbarkeit der Beugungsspektren (gutes Signal-Rausch-Verhältnis), als geeignet erwiesen. Permeabilisieren von Skelettmuskelfasern, z.B. des *M. psoas major* vom Kaninchen durch Detergenzien bietet den Vorteil mit Nukleotid-Analoga arbeiten zu können. Die Verwendung von Einzelfasern beugt einer Verarmung von benötigten Substraten sowie einer Anhäufung von nicht erwünschten Stoffwechselendprodukten vor. Die Voraussetzung für eine Akkumulation der zu untersuchenden physiologischen Zwischen-Zustände bzw. Analog-Zuständen des Akto-Myosin-Komplexes ist damit gegeben.

Andere Präparate lassen diese experimentellen Möglichkeiten vermissen. Intakte Muskelfasern erlauben z.B. nur bedingt den Akto-Myosin-Komplex in den Rigor-Zustand zu bringen, Nukleotid-Analoga können über die Membranbarrieren nicht zu den kontraktiven Proteinen gelangen. In demembraniserten, natürlichen Muskelfaserbündeln sind die einzelnen Fasern so dicht gepackt, dass sie sich diffusionsmäßig wie eine Riesenskelfaser verhalten, sodass die Diffusionsstrecken für Substrate und Produkte zu einem Konzentrationsgradienten und damit über den Faserbündel-Querschnitt betrachtet zu inhomogenen Bedingungen führen (Kraft et al., 1999).

#### 4.1.2 Datenanalyse

##### Intensitäts-Normierung auf die Gesamtintensität und Analyse der Schichtlinien

Intensitätsunterschiede durch Verlust einzelner Muskelfasern im Röntgenstrahl, was durch aktive Kraftentwicklung oder transiente aktive Kraftentwicklung der Einzelfasern verursacht sein kann, werden bei den Experimenten mit BDM durch eine Normierung aller Diffraktionsbilder einer Versuchsserie auf die Gesamtintensität eines Bildes dieser Serie, z.B. unter Rigor- oder Voraktivierungs-Bedingungen ausgeglichen. Dabei geht man davon aus, dass, sofern kein Faserverlust oder Faserverschiebung auftritt (streuende Masse im Röntgenstrahl bleibt gleich), die Gesamtintensität (Reflexe und Hintergrund) durch diffuse Streuung der Röntgenstrahlung durch die Muskelfasern etc. im Diffraktionsbild unter allen Bedingungen (Rigor, Relaxation, Aktivierung) gleich bleibt (Zahl der gestreuten Photonen bleibt konstant). Lediglich die Verteilung der Intensitäten im Diffraktionsbild variiert; im Rigor z.B. ist die Intensität in den Reflexen sehr hoch, unter Relaxations-Bedingungen ist der Hintergrund höher durch die weniger geordnete Struktur der Filamente.

Der Mittelhell dargestellte Zentrumsbereich der Diffraktionsbilder der beiden Versuchsansätze mit Aluminiumfluorid (Abb.10a.-13a. und 18a.-21a.) zeigt allerdings einen variablen Streuungshintergrund verursacht durch das Metall-Fluorid, das unvermeidlich zu gewisser Präzipitation neigt. Daher ist eine Normierung der Gesamtintensität des jeweiligen Diffraktionsbildes auf die Gesamtintensität unter Rigor- oder Voraktivierungs-Bedingungen hier weder für die Experimente mit MgADP.AIF<sub>4</sub> aus aktivem ‚Turnover‘ noch für die Versuche mit MgADP.AIF<sub>4</sub> durch Zugabe von MgADP und AIF<sub>4</sub> unter Rigor-Bedingungen möglich. Basierend auf folgenden Überlegungen können dennoch Aussagen über die beobachteten Intensitätsveränderungen der Schichtlinien, insbesondere der sechsten Aktin-Schichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  gemacht werden: Große Bewegungen der ‚Faserarrays‘ oder Faserverlust durch (vorübergehende) Kraftgenerierung in den Filamenten, wie unter isometrischer Aktivierung, ist in den Versuchen, bei denen AIF<sub>4</sub> in Rigor-Bedingungen eingesetzt wird, unwahrscheinlich, da keine aktive Kraftgenerierung erfolgt. Selbst für die Versuche mit Zugabe von AIF<sub>4</sub> unter aktivem ATPase-Zyklus lassen die parallel zu den 2D-Röntgenbeugungsregistrierungen durchgeführten mechanischen Kraft-Messungen einen Faserverlust ausschließen, da es durch den schon in kurzer Zeit im Myosinkopf gebundenen MgADP.AIF<sub>4</sub>-Komplex nicht zur Entwicklung hoher aktiver Kräfte kommt. Die aktive Kraftentwicklung fällt innerhalb weniger Minuten auf ca. 5-10 % der isometrischen Maximalkraft ab. Zusätzlich ist der Röntgenstrahl in horizontaler Richtung breiter als die vertikal montierten Muskelfasern, so dass selbst bei kleinen seitlichen Bewegungen der Fasern praktisch immer alle Fasern

vom Röntgenstrahl getroffen werden und zum Diffraktionsbild beitragen. Unter den hier gewählten Versuchsbedingungen können also trotz Streuungshintergrund durch das Aluminiumfluorid vergleichende Aussagen zu den Intensitäten der Schichtlinien getroffen werden, da davon ausgegangen werden kann, dass sich die Muskelmasse im Röntgenstrahl nicht verändert hat.

Vergleicht man die Intensitätsprofile der Aktin-Schichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  aus drei Versuchsansätzen, sehen die Kurven der AIF-R Versuche (Abb.31) anders aus als die Kurven der AIF-A Versuche (Abb.28) und der Versuche mit BDM (Abb.34). Normalerweise wird für die Analyse der Aktin-Schichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  die ‚Segment‘-Technik verwendet (vgl. Material und Methoden 2.5.2, 2.6 und Abb.5c.). Für die Auswertung der AIF-R Versuche wurde eine andere, von der ‚Segment‘-Methode abweichende, hier einmalig benutzte Analyse-Methode der Aktin-Schichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  eingesetzt. Eine genaue Betrachtung der Profile zeigt jedoch, dass diese Methode offenbar Probleme mit der korrekten Subtraktion des Hintergrundes im Diffraktionsbild aufweist. Der Kurven-Anfang, also der linke Bereich in Meridian Nähe, fällt bei einigen Kurven in Abbildung 31 durch eine höhere Intensität auf, was in den entsprechenden Diffraktionsbildern nicht nachzuvollziehen ist. Bei anderen Kurven fallen in diesem Bereich negative Werte auf. Das Programm führt eine automatische Subtraktion des Hintergrundes durch, indem es den Hintergrund neben der Schichtlinie für jeden Kanal bestimmt, durch lineare Interpolation den Hintergrund unter der Schichtlinie definiert und subtrahiert. Offenbar hat das Programm vor allem Schwierigkeiten, nahe dem Meridian diesen Hintergrund zu definieren, da es die anderen, nahe an der zu analysierenden sechsten Aktin-Schichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  liegenden Reflexe und Schichtlinien nicht abtrennen kann. Da sich dieses Problem aber auf alle in dieser AIF<sub>4</sub>-Serie analysierten Versuchsbedingungen ähnlich auswirkt, können zumindest grundsätzliche Aussagen zur Intensität der sechsten Aktin-Schichtlinie mit MgADP.AIF<sub>4</sub> unter Rigor-Bedingungen gemacht werden.

#### 4.2 Vergleich der Ergebnisse aus den Versuchen mit MgADP.AIF<sub>4</sub>

Zuerst sollen die Ergebnisse der Versuche mit MgADP.AIF<sub>4</sub>, das während aktivem ATPase-Zyklus an den Myosinkopf gebunden hat, weiterhin kurz AIF-A (für MgADP.AIF<sub>4</sub>- ‚Aktiv‘) genannt, betrachtet und mit den entsprechenden Resultaten aus den Versuchen mit MgADP.AIF<sub>4</sub> in Rigor-Bedingungen, weiterhin AIF-R (für MgADP.AIF<sub>4</sub>- ‚Rigor‘) genannt, verglichen werden. Insbesondere sollen in beiden Versuchsansätzen die Effekte von niedriger und hoher Ca<sup>++</sup>-Konzentration bei 2°C und 12°C im Hinblick auf Aktinaffinität



und Stereospezifität des Akto-Myosin-Komplexes analysiert werden. Niedrige  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration entspricht dabei Relaxations-Bedingungen, d.h. die Aktinfilamente sind nicht aktiviert, hohe  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration entspricht Aktivierungs-Bedingungen mit aktivierten Aktinfilamenten, bei denen durch Umlagerungen des Troponin / Tropomyosin-Komplexes bei  $\text{Ca}^{++}$ -Zugabe zusätzliche Bindungsstellen am Aktin für Wechselwirkungen mit Myosinköpfen zugänglich sind. Die Auswirkung höherer Temperatur ( $12^\circ\text{C}$ ) erlaubt ebenfalls eine genauere Zuordnung der Querbrücken-Konformation. Eine deutliche Verstärkung der Myosin-Schichtlinien unter Relaxations-Bedingungen bei Temperaturerhöhung von  $2^\circ\text{C}$  auf  $12^\circ\text{C}$  bedeutet, dass die Myosinköpfe vermehrt eine ‚geschlossene‘ Konformation (‚closed‘) einnehmen, die eine Anordnung der Myosinköpfe entsprechend der Myosin-Helix favorisiert, wie beispielsweise für den nicht-stereospezifisch an Aktin gebundenen  $\text{MgADP}\cdot\text{P}_i$ -Zustand gezeigt (Malinchik et al., 1997; Urbanke and Wray 2001; Wray et al., 1988; Xu et al., 1997; Xu et al., 2003). Bleibt diese Verstärkung aus, handelt es sich um Zwischen-Zustände bei denen selbst bei  $12^\circ\text{C}$  die ‚offene‘ (‚open‘) Konformation der Myosinköpfe (Xu et al., 2003) dominiert, die keine geordnete Myosin-Helix zulässt, wie z.B. der  $\text{MgATP}$ -Zustand bzw. der  $\text{MgATP}\cdot\text{S}$ -Zustand.

Eine Abschwächung der Myosin-Schichtlinien bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration deutet auf eine deutliche strukturelle Veränderung des Akto-Myosin-Komplexes durch veränderte Bindung des Myosinkopfes an das aktivierte Aktinfilament hin. Insbesondere die Intensitätsprofile einer Gesamt-Integration der Myosin- und Aktin-Schichtlinien parallel zum Meridian, dargestellt für einen Quadranten der Diffraktionsbilder (z.B. Abb.29) zeigen solche Veränderungen deutlich. Ebenso kann aus der genauen Intensitätsverteilung, wie sie aus einer parallel zum Meridian durchgeführten Integration der ersten Schichtlinie des Myosins und des Aktins bei  $1/42.9 \text{ nm}^{-1}$  bzw. bei  $1/37 \text{ nm}^{-1}$  hervorgeht (z.B. Abb. 30), eine veränderte Anheftung (stärker Aktin-orientierte Konformation) der Myosinköpfe beispielsweise nach  $\text{Ca}^{++}$ -Bindung an Aktin abgeleitet werden. Schließlich lässt auch die Intensität und die Intensitätsverteilung entlang der sechsten Aktin-Schichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Rückschlüsse darüber zu, ob die Querbrücken z.B. bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration eine Aktin-spezifische Orientierung mit Verstärkung dieser Schichtlinie einnehmen.

#### 4.2.1 Die Konformation des Akto-Myosin-Komplexes mit $\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$ bei niedriger Calcium-Konzentration

Bevor der Effekt einer Aktivierung der dünnen Filamente (durch  $\text{Ca}^{++}$ ) auf die Struktur des Akto-Myosin-Komplexes mit  $\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$  diskutiert wird, soll die Konformation des Akto-

Myosin-Komplexes im AIF<sub>R</sub>-Zustand bzw. im AIF<sub>A</sub>-Zustand ohne Ca<sup>++</sup> (inaktives Aktinfilament) analysiert werden.

Nicht nur bei 12°C, sondern auch bei 2°C zeigt der AIF<sub>A</sub>-Zustand deutliche Myosin-Schichtlinien. Wie oben erwähnt, deutet dies auf eine ‚closed‘ Konformation der Myosinköpfe hin, deren Anzahl mit dieser Konformation bei steigender Temperatur zunimmt (Urbanke and Wray 2001; Xu et al., 2003). In dieser Konformation nehmen die Myosinköpfe eine der Myosin-Helix folgende Anordnung (‚ordered conformation‘) ein, selbst wenn sie mit geringer Affinität an Aktinfilamente angeheftet sind, und führen so zur Intensitätszunahme der Myosin-Schichtlinien. Diese mit MgADP.AIF<sub>4</sub> beobachtete Zunahme der ‚closed‘ Konformation mit Temperaturerhöhung auf 12°C entspricht dem Verhalten von Myosinköpfen mit MgADP.P<sub>i</sub>, die ebenfalls bei 12°C überwiegend in der ‚closed‘ Konformation vorliegen.

Beim Vergleich der Profile der Aktin-Schichtlinie bei 1/5.9 nm<sup>-1</sup> des AIF<sub>A</sub>-Zustandes ohne Ca<sup>++</sup> (2°C) zeigt sich, dass nicht nur die Konformation der Myosinköpfe, sondern des ganzen Akto-Myosin-Komplexes durch das Phosphat-Analogon beeinflusst wird. Im Intensitätsprofil der 1/5.9 nm<sup>-1</sup> Aktin-Schichtlinie unter Relaxations-Bedingungen mit MgADP.AIF<sub>4</sub> vor Aktivierung, also bevor das Analogon in die Nukleotidbindungstasche des Myosinkopfes gebunden hat, ist, verglichen mit dem Intensitätsprofil dieser Schichtlinie unter Relaxations-Bedingungen keine Verschiebung des Intensitätsmaximums zu erkennen, lediglich eine geringfügig niedrigere Intensität. Vergleicht man dann aber dazu das Intensitätsprofil der gleichen Schichtlinie unter Relaxations-Bedingungen mit MgADP.AIF<sub>4</sub> nach einer Aktivierung, also nachdem das Phosphat-Analogon in die Nukleotidbindungstasche integriert wurde, sieht man eine Verschiebung des Intensitätsmaximums in Richtung Meridian (Abb.28). Diese Verschiebung des Intensitätsmaximums der 1/5.9 nm<sup>-1</sup> Aktin-Schichtlinie kann verschiedene Ursachen haben: 1.) Ein möglicher Grund könnte ein direkter Effekt von AIF<sub>4</sub> auf die Konformation des Myosinkopfes im Akto-Myosin-Komplex sein. Möglicherweise können die nicht-stereospezifisch gebundenen Querbrücken mit AIF<sub>4</sub> (auch ohne Ca<sup>++</sup>) das Aktinfilament beeinflussen oder so an Aktin binden, dass sich die Intensitätsverteilung auf der 1/5.9 nm<sup>-1</sup> Aktin-Schichtlinie verschiebt. 2.) Demgegenüber war allerdings in der Vergangenheit gezeigt worden, dass in Gegenwart von ATP nicht-stereospezifisch am Aktin gebundene Querbrücken keinen Beitrag zur 1/5.9 nm<sup>-1</sup> Aktin-Schichtlinie haben, d.h. sie tragen nicht zur Intensität dieser Schichtlinie bei (Kraft et al., 1999; Xu et al., 1997). Unter der Annahme, dass dies auch für die AIF<sub>A</sub>-Zustände gilt (s.u.) bedeuten die mit AIF<sub>4</sub> beobachteten Veränderungen der 1/5.9 nm<sup>-1</sup> Aktin-Schichtlinie, dass AIF<sub>4</sub> einen direkten Einfluss auf das Aktin hat. Es war gezeigt worden,

dass  $\text{AlF}_4$  das  $\text{P}_i$  des an Aktin gebundenen  $\text{MgADP.P}_i$  ersetzt und so eine Konformationsänderung des Aktins induziert (Combeau and Carlier 1988).

Abbildung 30 zeigt, dass auch im  $\text{AlF-R}$ -Zustand ohne  $\text{Ca}^{++}$  sowohl bei  $2^\circ\text{C}$  als auch bei  $12^\circ\text{C}$  die erste Myosin-Schichtlinie eine hohe Intensität hat und zumindest bei  $2^\circ\text{C}$  gegenüber Relaxations-Bedingungen mit ATP deutlich ansteigt. Dies spricht dafür, dass auch unter diesen Bedingungen die ‚closed‘ Konformation des Myosinkopfes mit  $\text{MgADP.AlF}_4$  bevorzugt ist, entsprechend dem  $\text{MgADP.P}_i$ -Zustand. Die unter Relaxations-Bedingungen geringere Intensität der Myosin-Schichtlinie ist durch die Koexistenz von  $\text{MgATP}$ - und  $\text{MgADP.P}_i$ -Zuständen zu erklären. Myosinköpfe mit  $\text{MgATP}$  nehmen selbst bei  $12^\circ\text{C}$  überwiegend die offene Konformation mit schwächeren Myosin-Schichtlinien ein. Auch im  $\text{AlF-R}$ -Zustand deutet sich, wie bereits oben für den  $\text{AlF-A}$ -Zustand gezeigt, auf der  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie durch Bindung von  $\text{AlF}_4$  in den Myosinkopf eine Verschiebung des Intensitätsmaximums in Richtung Meridian an. Jedoch ist dies durch die veränderte Analyseverfahren nicht mit Sicherheit zu sagen.

#### 4.2.2 Der Effekt der Aktivierung der Aktinfilamente auf die $\text{AM.MgADP.AlF}_4$ -Komplexe

Bei der vergleichenden Analyse der verschiedenen Parameter fällt auf, dass sich bei den  $\text{AlF-A}$  Versuchen die Aktin- bzw. Myosin-Anteile der Intensitätsprofile der ersten Schichtlinie (Abb.27) bei Aktivierung der Aktinfilamente durch  $\text{Ca}^{++}$  anders verhalten als in den  $\text{AlF-R}$  Versuchen (Abb.30). Bei niedriger  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration sind die Intensitätsprofile in beiden Versuchsansätzen gut vergleichbar. Sowohl bei  $2^\circ\text{C}$  als auch bei  $12^\circ\text{C}$  zeigen sie einen ganz ähnlichen Verlauf. Es kommt in beiden Versuchsansätzen, also  $\text{AlF-A}$  und  $\text{AlF-R}$ , bei der höheren Temperatur zu einer Verstärkung der Myosin-Schichtlinien. Die Myosinköpfe besetzen mit steigender Temperatur vermehrt einen Zustand mit ‚closed‘ Konformation, entsprechend dem  $\text{MgADP.P}_i$ -Zustand. Während es im Intensitätsprofil der  $\text{AlF-A}$  Versuche bei Aktivierung des Aktinfilamentes durch Erhöhung der  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration, d.h. beim Übergang des Akto-Myosin-Komplexes von  $\text{A}_{\text{off}}\text{MDP}_i$ -Zuständen zu  $\text{A}_{\text{on}}\text{MDP}_i$ -Zuständen, nur zu einer ganz leichten Abnahme des Myosin-Peaks bei gleichzeitig nur geringfügigem Ansteigen des Aktin-Peaks kommt, macht sich die Aktivierung des Aktinfilamentes in den Intensitätsprofilen der  $\text{AlF-R}$ -Zustände in einem stark abnehmenden Myosin-Peak und einem stark ansteigenden Aktin-Peak bemerkbar. Die Myosinköpfe mit dem Nukleotid-Analogon zeigen damit in den beiden Versuchsansätzen ein unterschiedliches Verhalten.

Da sich in den AIF<sub>A</sub> Versuchen die durch Ca<sup>++</sup>-Konzentrationserhöhung induzierten Umlagerungen nicht in einer deutlichen Verstärkung der ersten Aktin-Schichtlinie bemerkbar machen, kann angenommen werden, dass die Querbrücken auch nach Aktivierung des Aktinfilamentes mit Ca<sup>++</sup> nicht stereospezifisch an Aktin binden, sondern sich in einem nicht-stereospezifisch gebundenen Zustand befinden. Dass es sich bei diesem Querbrücken-Zustand (AIF<sub>A</sub>) tatsächlich um Myosinköpfe mit MgADP.AIF<sub>4</sub> in der Nukleotidbindungstasche handelt, konnte in parallel durchgeführten Messungen der aktiven Kraftentwicklung gezeigt werden. Sofort nach Zugabe von AIF<sub>4</sub> zeigt das Abfallen der Kraft die Bindung von MgADP.AIF<sub>4</sub> an den Myosinkopf an. Auch bei hoher Ca<sup>++</sup>-Konzentration können Querbrücken mit MgADP.AIF<sub>4</sub> keine aktive Kraft entwickeln, die gezeigten Intensitätsprofile der ersten Aktin- und Myosin-Schichtlinie weisen auf die nicht-stereospezifische Aktinbindung dieser Querbrücken auch bei hoher Ca<sup>++</sup>-Konzentration hin, das bleibt auch so, wenn AIF<sub>4</sub> aus der Meßlösung entfernt wird, das AIF<sub>4</sub> ist fest gebunden („trapped“). Auch Messungen der Fasersteifheit konnten dies bestätigen (Enke Mählmann, unveröffentlicht). Hohe Ca<sup>++</sup>-Konzentration hatte auch hier nur wenig Effekt auf die Aktin-Affinität der AIF<sub>A</sub>-Zustände, was typisch für einen Zustand geringer Aktinaffinität („weakly bound“-Zustand) ist.

Demgegenüber weist die deutliche Intensitätszunahme der Aktin-Schichtlinie im AIF<sub>R</sub>-Zustand mit Ca<sup>++</sup> darauf hin, dass der AIF<sub>R</sub>-Zustand stereospezifisch und somit möglicherweise mit hoher Affinität an das Ca<sup>++</sup>-aktivierte Aktinfilament bindet. Dass auch im AIF<sub>R</sub>-Zustand MgADP.AIF<sub>4</sub> an den Myosinkopf gebunden ist zeigt die Intensitätsabnahme der Aktin-Schichtlinie und die Zunahme der Myosin-Schichtlinien wenn MgADP.AIF<sub>4</sub> in Muskelfasern im Rigor eindiffundiert. Aus dem Rigor-Diffraktionsbild (Abb.8) wird hier ein der Relaxation ähnliches Diffraktionsbild (Abb.7).

Eine Bestätigung der Unterschiede zwischen AIF<sub>A</sub>- und AIF<sub>R</sub>-Zustand ergibt sich auch beim Vergleich einer 310 Pixel breiten Integration (parallel zum Meridian) der Diffraktionsbilder mit der Darstellung der Intensitätsprofile der Myosin-Schichtlinien eines Quadranten (Abb.26 und 29), wo deutliche Unterschiede zwischen den AIF<sub>A</sub> und AIF<sub>R</sub> Versuchen erkennbar sind. In den Profilen der AIF<sub>A</sub>-Zustände gibt es kaum Unterschiede mit niedriger und hoher Ca<sup>++</sup>-Konzentration, ausser einem leichten Abnehmen der ersten und vierten Myosin-Schichtlinie bei Ca<sup>++</sup>-Erhöhung. Im Gegensatz dazu sieht man in den Profilen der AIF<sub>R</sub>-Zustände bei Ca<sup>++</sup>-Erhöhung eine deutliche Abnahme einiger Myosin-Schichtlinien (ausser bei der zweiten und dritten) und ein deutliches Ansteigen der sechsten Aktin-Schichtlinie bei 1/5.9 nm<sup>-1</sup>. Wiederum ist der nur sehr geringe Ca<sup>++</sup>-Effekt bei den AIF<sub>A</sub>-Zuständen ein Indiz dafür, dass dies Zustände nicht-stereospezifischer Akto-Myosinbindung sind, die in ihrer Aktinaffinität kaum von Ca<sup>++</sup> beeinflusst werden (Kraft et al., 1999; Kraft et al., 1992). Dagegen bestätigt der deutliche Effekt von Ca<sup>++</sup>-

Aktivierung der Aktinfilamente auf die AIF<sub>R</sub>-Zustände die Annahme, dass es sich hier um einen anderen Querbrücken-Zustand handelt, der an das aktivierte Aktinfilament stereospezifisch binden kann.

Weitere Hinweise auf zwei verschiedene MgADP.AIF<sub>4</sub>-Querbrücken-Zustände liefert eine genaue Analyse der sechsten Aktin-Schichtlinie bei 1/5.9 nm<sup>-1</sup>. Es werden die beiden Versuchsansätze mit und ohne Ca<sup>++</sup> bei 2°C verglichen (Abb.28;31). Unter Berücksichtigung des bereits oben diskutierten Effektes (vgl. 4.2.1), von MgADP.AIF<sub>4</sub> selbst, auf Aktinfilamente oder Akto-Myosin-Komplexe wird hier nur der Effekt der Ca<sup>++</sup>-Aktivierung der Aktinfilamente auf die Konformation des Akto-Myosin-Komplexes im AIF<sub>A</sub>- bzw. im AIF<sub>R</sub>-Zustand untersucht. Bei den AIF<sub>A</sub> Versuchen macht sich eine Aktivierung des Aktinfilamentes durch Ca<sup>++</sup> in den Intensitätsprofilen der Aktin-Schichtlinie bei 1/5.9 nm<sup>-1</sup> zwar in einem Ansteigen der Intensität bemerkbar, eine Verlagerung des Intensitätsmaximums in Richtung Meridian ist durch die Aktivierung mit Ca<sup>++</sup> jedoch nicht zu beobachten. Ein ähnlicher Intensitätsanstieg der 1/5.9 nm<sup>-1</sup> Aktin-Schichtlinie mit Ca<sup>++</sup>-Aktivierung war schon früher beobachtet worden (Kraft et al., 1999) und scheint ein Effekt der Ca<sup>++</sup>-Bindung an Troponin mit nachfolgender Umlagerung des Tropomyosins zu sein, da er auch bei langer Sarkomerenlänge, also ohne Anheftung von Myosinköpfen erkennbar ist. Ein kleiner Teil des Anstiegs könnte auch von Querbrücken verursacht sein, die nicht-stereospezifisch an das aktivierte Aktin gebundenen sind (Kraft et al., 1999). Es gibt also auch auf der 1/5.9 nm<sup>-1</sup> Aktin-Schichtlinie keine Hinweise auf einen stereospezifisch gebundenen AIF<sub>A</sub>-Komplex.

Ganz anders wirkt sich eine Ca<sup>++</sup>-Aktivierung des Aktinfilamentes auf die Intensitätsprofile der Aktin-Schichtlinie bei 1/5.9 nm<sup>-1</sup> bei den AIF<sub>R</sub> Versuchen aus. Hier ist durch die Aktivierung mit Ca<sup>++</sup> neben dem Intensitätsanstieg auch eine deutliche Verlagerung des Intensitätsmaximums in Richtung Meridian zu sehen. Die Ca<sup>++</sup>-induzierten Umlagerungen der Regulatorproteine erlauben hier dem Myosinkopf stereospezifisch an Aktin zu binden, da es zu einer Verstärkung der Aktinhelix durch Massenlagerung an das Aktinfilament kommt, die sich in einer Intensitätszunahme und Verschiebung des Intensitätsmaximums zum Meridian äußert (Huxley and Brown 1967; Kraft et al., 2002; Maeda et al., 1988; Parry and Squire 1973; Yagi and Matsubara 1988). Allerdings ist die Verschiebung des Intensitätsmaximums der Aktin-Schichtlinie bei 1/5.9 nm<sup>-1</sup> in Richtung Meridian deutlich kleiner als im Rigor (Abb.31). Daraus lässt sich ableiten, dass es sich hier nicht um eine rigor-äquivalente, stereospezifische Konformation der Querbrücken handelt. Aufgrund früherer Untersuchungen mit an Aktin gebundenen Myosinkopf-Fragmenten (Kraft et al., 2002) kann angenommen werden, dass die Myosinköpfe im AIF<sub>R</sub>-Zustand eine größere strukturelle Variabilität der weiter distal von den Interaktionsstellen mit Aktin gelegenen

Abschnitte des Myosinkopfes aufweisen als an Aktin gebundene nukleotidfreie Myosinköpfe (Rigor-Zustand).

#### 4.2.3 Zwei grundsätzlich verschiedene Querbrücken-Zustände mit MgADP.AIF<sub>4</sub>?

Insgesamt deuten die hier gezeigten Daten darauf hin, dass sich die durch Integration von MgADP.AIF<sub>4</sub> in die Nukleotidbindungstaschen unter Rigor-Bedingungen (AIF<sub>R</sub>) erzeugten Akto-Myosin-Komplexe von den Akto-Myosin-Komplexen klar unterscheiden, die durch Integration von MgADP.AIF<sub>4</sub> unter aktivem ‚Turnover‘ in Gegenwart von ATP erzeugt werden (AIF<sub>A</sub>). Die für den AIF<sub>R</sub>-Zustand bei Aktivierung der Aktinfilamente gezeigte Verstärkung der ersten Aktin-Schichtlinie und die deutliche Intensitätsabnahme der Myosin-Schichtlinien bei 12°C, sowie die Verschiebung und Erhöhung des Intensitätsmaximums der Aktin-Schichtlinie bei 1/5.9 nm<sup>-1</sup> bedeuten, dass dieser Zustand im Gegensatz zum AIF<sub>A</sub>-Zustand stereospezifisch an das aktivierte Aktinfilament bindet. Dies wird durch weitere, hier nicht diskutierte Veränderungen im Diffraktionsbild (z.B. äquatoriale Reflexe) sowie durch Messungen der Faserelastizität bestätigt, die jedoch im Rahmen eines anderen Projektes aber unter den gleichen experimentellen Bedingungen durchgeführt wurden. Ein solcher, stereospezifisch bindender AM.MgADP.AIF<sub>4</sub>-Zustand war bisher in der Literatur nicht beschrieben worden und konnte durch die Bindung von MgADP und AIF<sub>4</sub> in Muskelfasern im zunächst nukleotidfreien (Rigor-) Zustand erreicht werden. Dabei wird das kinetische Schema des Querbrückenzyklus (Abb.1) vom AM-Komplex nach links bis zu einem AM.ADP.P<sub>i</sub>-analogen Zwischen-Zustand durchlaufen, der sich allerdings vom AM.ADP.P<sub>i</sub>-Analog-Zustand unterscheidet, der unter aktivem ‚Turnover‘ bei Zugabe von AIF<sub>4</sub> erreicht wird (Austausch von P<sub>i</sub> gegen AIF<sub>4</sub> in einem AM.ADP.P<sub>i</sub>-Komplex; AIF<sub>A</sub>)

Dass es sich bei AIF<sub>A</sub> und AIF<sub>R</sub> um zwei *strukturell* verschiedene Myosinkopf-Zustände handeln muss, ergibt sich aus den aufgezeigten Unterschieden im Diffraktionsbild (z.B. 1/5.9 nm<sup>-1</sup> Aktin-Schichtlinie) unter Ca<sup>++</sup>-Aktivierung. Offenbar kann der AIF<sub>R</sub>-Zustand anders an das aktivierte Aktinfilament binden als der AIF<sub>A</sub>-Zustand. Im Gegensatz zum AIF<sub>R</sub>-Zustand erlaubt die Konformation der Myosinköpfe im AIF<sub>A</sub>-Zustand diesen nicht, stereospezifisch an die in Gegenwart von Ca<sup>++</sup> freigewordenen Tropomyosin-kontrollierten Aktinbindungsstellen (‚strong-binding-sites‘, (Lehman et al., 1994)) zu binden. Demnach müssen die beiden hier beschriebenen MgADP.AIF<sub>4</sub>-Zustände verschiedenen Zwischen-Zuständen des Querbrückenzyklus zugeordnet werden. Da bei beiden Zuständen AIF<sub>4</sub> als P<sub>i</sub>-Analogon in der Nukleotidbindungstasche der Myosinköpfe gebunden ist, müssen beide als Analog-Zustände für Akto-Myosin-Komplexe vor P<sub>i</sub>-Freisetzung eingeordnet

werden. Bei den AIF<sub>A</sub> Versuchen wird möglicherweise der AMDP<sub>i</sub><sup>I</sup>-Zustand als letzter (vor der Kraftgenerierung) nicht-stereospezifisch an Aktin bindender Zwischen-Zustand („weak-binding-state“) erreicht. In den AIF<sub>R</sub> Versuchen, wo mit dem Analogon ein stereospezifisch an Aktin bindender Zwischen-Zustand („strong-binding-state“) generiert wird, erreichen wir möglicherweise den AMDP<sub>i</sub><sup>II</sup>-Zustand als ersten stereospezifisch an Aktin gebundenen Zwischen-Zustand des Querbrückenzyklus. Bereits in der Literatur (Millar and Homsher 1990; Tesi et al., 2002) wird der AMDP<sub>i</sub><sup>II</sup>-Zustand postuliert und als ein stereospezifischer an Aktin gebundener, kraftgenerierender Zustand vor P<sub>i</sub>-Abgabe beschrieben, der allerdings während aktiver Kraftgenerierung nur wenig besetzt, also kurzlebig sein soll und deshalb bisher nicht weiter charakterisiert werden konnte. Unter der Voraussetzung, dass AIF<sub>4</sub> als Analogon für P<sub>i</sub> gewertet werden kann und der hier charakterisierte AIF<sub>R</sub>-Zustand einen Analog-Zustand für den AMDP<sub>i</sub><sup>II</sup>-Zustand darstellt, bestätigen die hier gezeigten Daten, dass ein solcher stereospezifisch gebundener Zustand vor P<sub>i</sub>-Abgabe Teil des Querbrückenzyklus ist. Nicht klären lässt sich hier, ob dieser Zustand tatsächlich bereits zur Kraftentwicklung beiträgt, oder ob aktive Kraftentwicklung erst mit/nach P<sub>i</sub>-Abgabe erfolgt. Für die Strukturumlagerungen am Übergang von nicht-stereospezifischer zu stereospezifischer Bindung an Aktin ist jedoch zu erwarten, dass sie zu einer elastischen Deformation der an Aktin gebundenen Querbrücken und somit zu aktiver Kraftentwicklung führt (Brenner et al., 1995; Köhler et al., 2002).

#### 4.3 Vergleich des durch BDM erreichten Zwischen-Zustandes mit den MgADP.AIF<sub>4</sub>-Zuständen

Betrachtet man nun die Ergebnisse der Versuche mit BDM (2,3-Butandion-Monoxim) vor dem Hintergrund der Frage, wie sich der mit BDM erreichte Zwischen-Zustand einordnen lässt, so fällt zunächst auf, dass bei 2°C unter Relaxations-Bedingungen mit BDM einige Myosin- und Aktin-Schichtlinien eine deutlich höhere Intensität aufweisen als ohne BDM (vgl. Abb.33;34). Die Intensitätsverteilung auf den ersten Schichtlinien von Aktin und Myosin (Abb.33), auf den Myosin-Schichtlinien insgesamt (Abb.32), sowie das Intensitätsprofil der sechsten Aktin-Schichtlinie bei 1/5.9 nm<sup>-1</sup> (Abb.34) zeigen ohne Ca<sup>++</sup> einen gewissen ‚Ordnungs‘-Effekt des BDM auf, der zu der Verstärkung aller Aktin- und Myosin-Schichtlinien führt und zumindest teilweise durch einen unspezifischen Effekt von BDM auf alle (kontraktilen) Proteine entstanden sein könnte. Die ausgeprägte Verstärkung vor allem der Myosin-Schichtlinien bei 2°C und 12°C weist aber auch auf

eine vermehrte Akkumulation von Myosinköpfen in der sogenannten ‚closed‘ Konformation hin (Urbanke and Wray 2001; Xu et al., 2003), die dann geordnet der Myosin-Helix folgen und zu höherer Intensität beitragen. Das heißt, BDM akkumuliert die Querbrücken vermehrt in einem  $MgADP.P_i$ -Zustand, sowohl bei niedriger als auch hoher Temperatur.

Betrachtet man jetzt bei Anwesenheit von BDM die Folgen einer Erhöhung der  $Ca^{++}$ -Konzentration, durch die das Aktinfilament vom relaxierten ( $A_{off}$ ) in den aktivierten-Zustand ( $A_{on}$ ) übergeht, sieht man in den Intensitätsprofilen der ersten Aktin- und Myosin-Schichtlinien bei  $1/37\text{ nm}^{-1}$  bzw. bei  $1/42.9\text{ nm}^{-1}$  ein ähnliches Verhalten wie bei den  $AIF_{-R}$  Versuchen. Bei  $2^\circ\text{C}$  fällt bei  $Ca^{++}$ -Zugabe die Intensität des Myosin-Peaks in Abbildung 33 sichtbar ab und der Aktin-Peak wird deutlich höher. Diese Intensitätsabnahme des Myosin-Peaks ist bei der höheren Temperatur von  $12^\circ\text{C}$  wesentlich grösser, wie auch die Intensitätszunahme des Aktin-Peaks bei  $12^\circ\text{C}$  noch deutlicher erscheint. Die horizontale Integration der Myosin-Schichtlinien eines Quadranten der Diffraktionsbilder bei  $12^\circ\text{C}$  in Abbildung 32 zeigt in den zugehörigen Intensitätsprofilen bei hoher  $Ca^{++}$ -Konzentration ebenfalls eine deutliche Abnahme aller Myosin-Schichtlinien und einen deutlichen Anstieg der  $1/5.9\text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie. Bei detaillierter Analyse ist für die sechste Schichtlinie des Aktins bei  $1/5.9\text{ nm}^{-1}$  bei hoher  $Ca^{++}$ -Konzentration sowohl ein Intensitätsanstieg als auch eine Verlagerung des Intensitätsmaximums nach links, also Richtung Meridian zu sehen (zu kleineren reziproken Abständen).

Insgesamt sehen die Ergebnisse der BDM-Versuche bei Aktivierung des Aktinfilamentes durch  $Ca^{++}$  den Ergebnissen der  $AIF_{-R}$  Versuche sehr ähnlich, was für die Ausbildung eines ähnlichen Zwischen-Zustandes des Akto-Myosin-Komplexes bei beiden Versuchsansätzen spricht. Neben den Gemeinsamkeiten der Ergebnisse aus  $AIF_{-R}$  und BDM Versuchen, sind allerdings auch Unterschiede (zweite und dritte Myosin-Schichtlinie) zu erkennen. Der Grund dafür könnte in der Tatsache liegen, dass bei den  $AIF_{-R}$  Experimenten nur ein Phosphat-Analog-Zustand erreicht wird, d.h. praktisch alle Myosinköpfe in einem bestimmten Zwischen-Zustand, möglicherweise einem  $A_{on}MDP.P_i^{II}$ -Analog-Zustand ‚arretiert‘ sind, während mit BDM, zwei Zwischen-Zustände und zwar die  $A_{on}MDP.P_i^I$  - und  $A_{on}MDP.P_i^{II}$  -Zustände im Gleichgewicht stehen könnten. Für eine Mischung mehrerer Zustände im BDM Experiment spricht auch, dass Messungen der Fasersteifheit mit BDM Werte ergeben, die sich von Steifheitsmessungen im  $AIF_{-R}$ -Zustand unterscheiden und eher einem mit geringer Affinität gebundenen Zustand entsprechen (E. Mählmann, unveröffentlicht).

Man kann aber den Schluss ziehen, dass sich mit BDM zumindest ein Teil der Querbücken in einem stereospezifisch (hochaffin) gebundenen Zustand entsprechend dem  $AMDP.P_i^{II}$ -Zustand befindet. Das wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass in



parallelen Messungen der aktiven Kraftentwicklung auch bei hoher BDM-Konzentration eine aktive Kraftentwicklung von etwa 3,5-7% der maximal möglichen isometrischen Kraft festzustellen ist. Diese Kraft könnte durch die akkumulierten  $\text{AMDP.P}_i^{\text{II}}$ -Zustände generiert werden, die in der Literatur als kraftgenerierende Zustände postuliert wurden (Millar and Homsher 1990; Tesi et al., 2002). Die Ähnlichkeiten der  $\text{Ca}^{++}$ -Effekte auf die erste Aktin- und Myosin-Schichtlinie, sowie die sechste Aktin-Schichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  in den  $\text{AIF-R}$ - und BDM- Zuständen zeigen, dass bei den  $\text{AIF-R}$  Versuchen ein Analog-Zwischen-Zustand erreicht wird, der den physiologisch im Querbrückenzyklus durchlaufenen Zwischen-Zuständen sehr nahe kommt. Beispielsweise könnte der  $\text{AIF-R}$ -Zustand einem stereospezifisch gebundenen Zwischen-Zustand, noch mit Phosphat-Rest in der Nukleotidbindungstasche, und somit dem ersten kraftgenerierenden Zwischen-Zustand entsprechen.

#### 4.4 Bezug zur aktuellen Literatur

Charakterisierung/Zuordnung der  $\text{MgADP.AIF}_4$  Querbrücken bei Bindung des  $\text{AIF}_4$  unter aktivem ‚Turnover‘ ( $\text{AIF-A}$ )

Vor etwa 10 Jahren wurde erstmals gezeigt, dass die Phosphat-Analoga Aluminiumfluorid und Orthovanadat, wenn sie Muskelfasern während aktivem Querbrückenzyklus (also während Kraftgenerierung) zugegeben werden, zu einer fast vollständigen Hemmung der aktiven Kraftentwicklung führen (Chase et al., 1993). Es wurde angenommen, dass die Querbrücken mit  $\text{AIF}_4$  einen Zustand analog den  $\text{ADP.P}_i$ -Zuständen (Schema in Abb.1) des Querbrückenzyklus, also nicht-kraftgenerierende Querbrücken simulieren (Chase et al., 1994; Chase et al., 1993). Dabei fiel auf, dass die nach Hemmung der Kraftentwicklung entstandenen  $\text{ADP.AIF}_4$ -Querbrücken-Zustände den Muskelfasern eine hohe Steifheit verleihen (höher als unter Relaxations-Bedingungen), woraus geschlossen wurde, dass diese  $\text{ADP.AIF}_4$ -Querbrücken-Zustände mit ‚verhältnismäßig‘ hoher Affinität an Aktin binden und somit nicht die üblichen Kriterien für Querbrücken-Zustände geringer Aktinaffinität (‚weakly-bound‘ states) erfüllen (Chase et al., 1994). Auch EPR- (electron paramagnetic resonance) Messungen zeigten, dass die Myosinköpfe mit  $\text{ADP.AIF}_4$  zwar Zuständen geringer Aktinaffinität ähnlich sind, jedoch eine geringere Mobilität als diese aufweisen (Raucher and Fajer 1994), und somit weder die Kriterien für ‚weak-binding‘- noch für ‚strong-binding‘ states wirklich erfüllen.

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die im AIF-A Experiment akkumulierten Querbrücken (AM.ADP.AIF<sub>4</sub>) strukturell den Querbrücken in ‚weak-binding‘ states (unter Relaxations-Bedingungen) entsprechen. Dieser Befund wird durch in der Arbeitsgruppe durchgeführte funktionelle Untersuchungen (Steifheitsmessungen) bestätigt. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei Zugabe von AIF<sub>4</sub> während aktivem ‚Turnover‘ typische Querbrücken-Zustände geringer Aktinaffinität akkumulieren (E.Mählmann, unveröffentlicht). Die Diskrepanz zu den anderen Untersuchungen (Chase et al., 1994); (Raucher and Fajer 1994) kommt aller Wahrscheinlichkeit nach daher, dass diese Autoren den von Kraft et al., 1992 gezeigten Effekt von Ca<sup>++</sup> auf die Querbrücken-Zustände geringer Aktinaffinität bzw. auf die Fasersteifheit übersehen hatten (Kraft et al., 1992). Querbrücken geringer Aktinaffinität (z.B. mit ATP<sup>γ</sup>S oder wie hier mit AIF<sub>4</sub>) zeigen bei Bindung an A<sub>on</sub> eine verlangsamte Anheftungs- und Ablösekinetik, die zu deutlicher Erhöhung der beobachteten Fasersteifheit führt. Dennoch sind diese Myosinköpfe aufgrund ihres gebundenen Nukleotids auch bei aktivem Aktinfilament in einer Konformation, die nur mit geringer Affinität (‚weak-binding‘ state) an Aktin binden kann. Dementsprechend zeigen die Diffraktionsbilder der Muskelfasern im AIF-A Experiment auch typische Merkmale von Querbrücken-Zuständen in den ‚weakly-bound‘ states. Dies wird mit dieser Arbeit erstmals gezeigt. In der Literatur sind keine Röntgendiffraktions-Untersuchungen an Muskelfasern nach Bindung von AIF<sub>4</sub> im aktiven Querbrückenzyklus beschrieben.

In mehreren Arbeiten und mit verschiedenen Methoden wurde mittlerweile gezeigt, dass isolierte Myosinköpfe ((Xiao et al., 1998), Lumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer) bzw. Myosinkopf-Fragmente ((Fisher et al., 1995a); Röntgenkristallographie) mit MgADP.AIF<sub>4</sub> einen ‚pre-powerstroke‘-Zustand bzw. den ‚transition-state‘ des Myosinkopfes simuliert, d.h. ATP ist bereits zu ADP und P<sub>i</sub> hydrolysiert, das P<sub>i</sub> noch im Myosinkopf gebunden und der Myosinkopf nimmt die ‚closed‘ Konfiguration ein, für die das Auftreten von Myosin-Schichtlinien bei Temperaturen von = 10°C typisch ist.

#### Untersuchungen zu Querbrückeneigenschaften in Gegenwart von BDM

Basierend auf den in dieser Arbeit präsentierten strukturellen Eigenschaften der Querbrücken in Gegenwart des nicht-kompetitiven Inhibitors der Kraftentwicklung BDM kann angenommen werden, dass dieser Analog-Zustand vorwiegend dem AM.ADP.P<sub>i</sub><sup>||</sup>-Zustand entspricht. Dies gründet sich vor allem auch auf folgenden Punkten, die nicht nur aus den strukturellen Untersuchungen, sondern auch aus parallel in der Arbeitsgruppe durchgeführten funktionellen Untersuchungen abgeleitet werden können: (1.) mit MgADP

und  $\text{AIF}_4$  wurden ausgehend von Aktivierung bzw. vom Rigor-Zustand zwei verschiedene  $\text{AM.ADP.P}_i$ -analog-Zustände akkumuliert: der  $\text{AIF-A}$ -Zustand entspricht  $\text{AM.ADP.P}_i^I$  (Schema in Abb.1), der  $\text{AIF-R}$ -Zustand entspricht  $\text{AM.ADP.P}_i^{II}$ . (2.) Der in Gegenwart von BDM akkumulierte Querbrücken-Zustand entspricht weder eindeutig dem einen noch dem anderen  $\text{AIF}_4$ -Zustand und stellt daher am ehesten wohl eine Mischung aus beiden dar. Allerdings bedeutet die größere Ähnlichkeit des in Gegenwart von BDM akkumulierten Zustandes mit dem  $\text{AIF-R}$ -Zustand, dass mit BDM der größte Teil der Querbrücken im  $\text{AM.ADP.P}_i^{II}$ -Zustand ist. Dieser Befund ist im Widerspruch zu biochemischen Daten und funktionellen Untersuchungen an Muskelfasern aus der Literatur (McKillop et al., 1994; Regnier et al., 1999; Regnier et al., 1995), die dahingehend interpretiert werden, dass BDM den Übergang vom  $\text{AM.ADP.P}_i^I$ -Zustand in den  $\text{AM.ADP.P}_i^{II}$ -Zustand deutlich verlangsamen soll und somit eine Akkumulation der Querbrücken im  $\text{AM.ADP.P}_i^I$ -Zustand bewirken sollte. Durch die hier gezeigten Untersuchungen konnte aber nicht nur der  $\text{AM.ADP.P}_i^I$ -Zustand, sondern auch der  $\text{AM.ADP.P}_i^{II}$ -Zustand (Schema in Abb.1) strukturell (und parallel auch funktionell) charakterisiert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die Querbrücken in Gegenwart von BDM dem  $\text{AM.ADP.P}_i^{II}$ -Zustand ähnlicher sind.

In einer weiteren Studie wurde der Effekt von BDM auf native Froschmuskelfasern untersucht (Yagi et al., 1992). Dabei zeigte sich bei Zugabe von BDM und daraus resultierender Hemmung der aktiven Kraftentwicklung eine Abnahme der Aktin-Schichtlinien und ein gewisser Intensitätsanstieg von Myosin-Reflexen. Es wurde daraus geschlossen, dass die Querbrücken mit BDM nur nicht-stereospezifisch an Aktin binden können. Es erfolgt aber keine genauere Einordnung des Zustandes in ein Schema des Querbrückenzyklus. Bei diesem experimentellen Ansatz stellt sich die Frage, ob bei Verwendung von BDM an intakten Froschmuskelfasern nicht der Effekt von BDM auf die elektromechanische Kopplung der Muskelfasern (Horiuti et al., 1988) überwiegt und die Muskelfasern relaxieren, ohne dass BDM wie in den hier verwendeten chemisch permeabilisierten Kaninchenmuskelfasern durch einen allosterischen Effekt direkt auf die Querbrücken wirkt.

#### MgADP. $\text{AIF}_4$ -Querbrücken durch $\text{AIF}_4$ -Zugabe im Rigor ( $\text{AIF-R}$ )

Bisher wurde erst eine Arbeit veröffentlicht, in der versucht wurde,  $\text{AIF}_4$  und MgADP an Muskelfasern bzw. Myosinköpfe im Rigor binden zu lassen (Kim et al., 1998). Die Autoren zeigten, dass nach MgADP- und  $\text{AIF}_4$ -Zugabe zu permeabilisierten Muskelfasern

(Kaninchen-Psoas) im Rigor die Aktin-Schichtlinien-Intensitäten deutlich schwächer werden.

Ferner wird in dieser Arbeit gezeigt, dass nach Zugabe von  $\text{BeF}_x$  zu Muskelfasern im Rigor

- das Intensitätsmaximum der  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie sich von der Rigor-Position, also vom Meridian weg verschiebt, und eine ähnliche Position einnimmt wie bei aktivem ‚Turnover‘ in Gegenwart von ATP,
- das Profil der ersten Aktin-Schichtlinie wie unter Rigor-Bedingungen aussieht, nur viel schwächer,
- der Intensitätsquotient ( $I_{1.1}/I_{1.0}$ ) der beiden äquatorialen Reflexe 1.1 und 1.0 kleiner wird,
- kein Diffraktionsbild wie unter Relaxations-Bedingungen bzw. wie bei Bindung von  $\text{AlF}_4$  unter aktivem ‚Turnover‘ zu registrieren ist. Es sind z.B. keine Myosin-Schichtlinien zu sehen, das Diffraktionsbild sieht eher Rigor-ähnlich aus.

Für den mit  $\text{MgADP} \cdot \text{AlF}_4$  erreichten Zustand wird nur die  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$ - und die erste Aktin-Schichtlinie gezeigt, wobei hier beide Intensitätsprofile fast genau wie im Rigor aussehen. Die Zugabe von  $\text{MgADP}$  und  $\text{AlF}_4$  zu Muskelfasern im Rigor hat bei Kim et al. nur wenig Effekt. Dies ist im Widerspruch zu den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten, wonach mit  $\text{MgADP}$  und  $\text{AlF}_4$  zu Rigor-Fasern zugegeben ein nicht-Rigor-ähnlicher Zustand entsteht. Der Grund für diese Diskrepanz könnte in den gewählten Versuchsbedingungen bei Kim et al. zu finden sein. Ihre Methode wird hier für  $\text{BeF}_x$  bei einer Meßtemperatur von  $20^\circ\text{C}$  beschrieben. Nach einer 30 minütigen Inkubation der Fasern mit  $\text{BeF}_x$  sehen sie nach weiteren 30 min. mit  $\text{BeF}_x$  keine weiteren Änderungen im Diffraktionsbild, auch nicht nach Verdopplung der Konzentration von  $\text{BeF}_x$ . Danach wird hier auf eine Sättigung mit  $\text{BeF}_x$  geschlossen, was aber nicht für  $\text{AlF}_4$  überprüft wurde. Dementsprechend kann nach unseren, aus den Vorarbeiten für die gezeigten Experimente gemachten Erfahrungen geschlossen werden, dass bei Kim et al. mit  $\text{AlF}_4$  nicht alle Querbrücken  $\text{MgADP}$  und  $\text{AlF}_4$  gebunden hatten, sondern vielmehr nukleotidfreie ‚Rigor‘-Querbrücken erhalten blieben, daher das Rigor-ähnliche Diffraktionsbild. Kim et al. schlossen weiter, dass Querbrücken, gebunden mit  $\text{MgADP}$  und Phosphat-Analoga unter Rigor-Bedingungen einem Rigor-ähnlichen ‚strongly-bound‘-state entsprechen, der auch Teil des aktiven Querbrückenzyklus sein könnte. Diffraktionsbilder unserer früheren Versuche mit Fasern unter aktivem ‚Turnover‘ in Gegenwart von ATP zeigen jedoch keine Evidenz für Rigor-ähnliche Zustände der Querbrücken (Kraft et al., 2002) während aktivem ‚Turnover‘.

#### 4.5 Vergleich der Daten aus den MgADP.AIF<sub>4</sub> Versuchen mit Daten aus Experimenten von isometrisch aktivierten Muskelfasern

Es stellt sich die Frage inwieweit der hier als Querbrücken-Zustand stereospezifischer Aktinbindung am Beginn der Kraftgenerierung charakterisierte AIF<sub>R</sub>-Zustand strukturell dem während isometrischer Aktivierung vorwiegend besetzten kraftgenerierenden Querbrücken-Zustand entspricht. Für diesen Vergleich sind hier in Abbildung 37 und 38 Auswertungen von 2D-Röntgenbeugungsexperimenten an ‚single fiber arrays‘ unter isometrischer Aktivierung gezeigt (teilweise entnommen aus Kraft et al., 2002). Dabei ist in Abbildung 37 das Intensitätsprofil einer Integration parallel zum Meridian der ersten Aktin- und Myosin-Schichtlinie und in Abbildung 38 die Intensitätsprofile einer Integration der sechsten Schichtlinie des Aktins bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  nach einer Auswertung mit der ‚Segment‘-Technik dargestellt. Aus der Intensität der sechsten Aktin-Schichtlinie war abgeschätzt worden, dass unter isometrischer Kraftentwicklung ca. 55% aller Querbrücken stereospezifisch an Aktin gebunden sind.

Sowohl bei der ersten Aktin- und Myosin- Schichtlinie als auch bei der sechsten Aktin-Schichtlinie zeigen die Profile unter Relaxation und isometrischer Aktivierung eine ähnliche Intensitätsverteilung wie der in dieser Arbeit untersuchte AIF<sub>R</sub>-Analog-Zustand. Dieser Vergleich spricht dafür, dass der durch Bindung von MgADP.AIF<sub>4</sub> unter Rigor-Bedingungen erreichte Zwischen-Zustand (AMDP.P<sub>i</sub><sup>II</sup>-Analogon), ein physiologisch relevanter Zwischenzustand des Querbrückenzyklus, mit stereospezifisch an Aktin gebundenen Querbrücken ist. Allerdings kann in Gegenwart der AIF<sub>R</sub>-Querbrücken keine der aktiven isometrischen Kraft entsprechende Kraft generiert werden. Für die Interpretation der  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie könnte das heissen, dass Amplitude und Verteilung ihrer Intensität ein Ausdruck dafür ist, ob und wieviele Myosinköpfe stereospezifisch an Aktin binden, eventuell aber nichts darüber aussagt, ob es sich dabei um kraftgenerierende Querbrücken handelt. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass im AIF<sub>R</sub> Experiment der Querbrücken-Zyklus rückwärts durchlaufen wird, also AM ? AM.ADP.AIF<sub>4</sub>. Entsprechend ist gar nicht zu erwarten, dass AM ? AM.ADP.AIF<sub>4</sub> zu aktiver Kraftentwicklung führt. Andererseits führt bei fehlendem aktivem ‚Turnover‘ bereits geringstes ‚Nachgeben‘ der Faserenden zu einem massiven Kraftabfall. Ein Nachgeben von ca. 4-6 nm / Halbsarkomer ( $\sim 0.5\%$  der Gesamtlänge) lässt die entwickelte Kraft auf Null absinken. Da die Bindung von AIF<sub>4</sub> und MgADP an alle Querbrücken im Rigor mindestens eine Stunde dauert, ist davon auszugehen, dass durch langsames Nachgeben ein Kraftbeitrag kaum zu beobachten ist.

Für eine definitiven Aussage zur Ähnlichkeit der Aktin-Schichtlinie bei  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  zwischen den AIF-R Versuchen und den Versuchen unter isometrischer Aktivierung ist jedoch die Analyse dieser Schichtlinie aus den AIF-R Versuchen mit der Segment-Methode nötig.

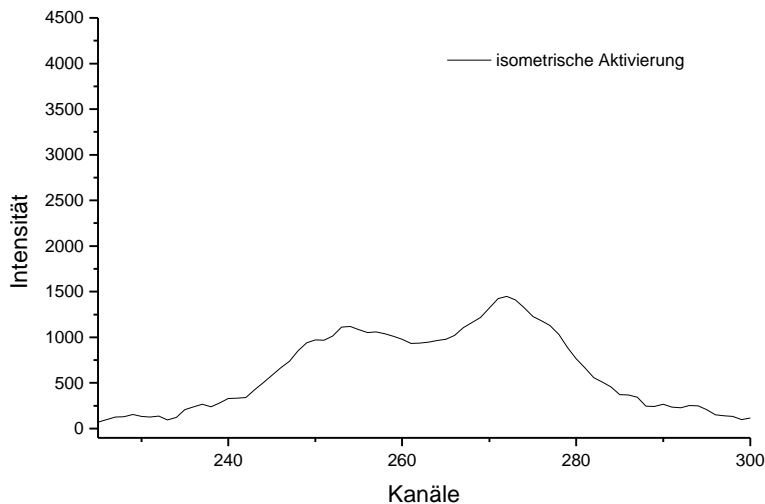


Abb.37: Intensitätsprofil der ersten Myosin- und Aktin-Schichtlinie von Diffraktionsbildern aufgenommen unter isometrischer Kraftentwicklung ( $T=2^{\circ}\text{C}$ ). Gezeigt ist eine 310 Pixel breite Integration parallel zum Meridian. (Die y-Achse ist hier so gewählt, dass ein Vergleich mit den Abbildungen 27, 30 und 33 möglich ist.)

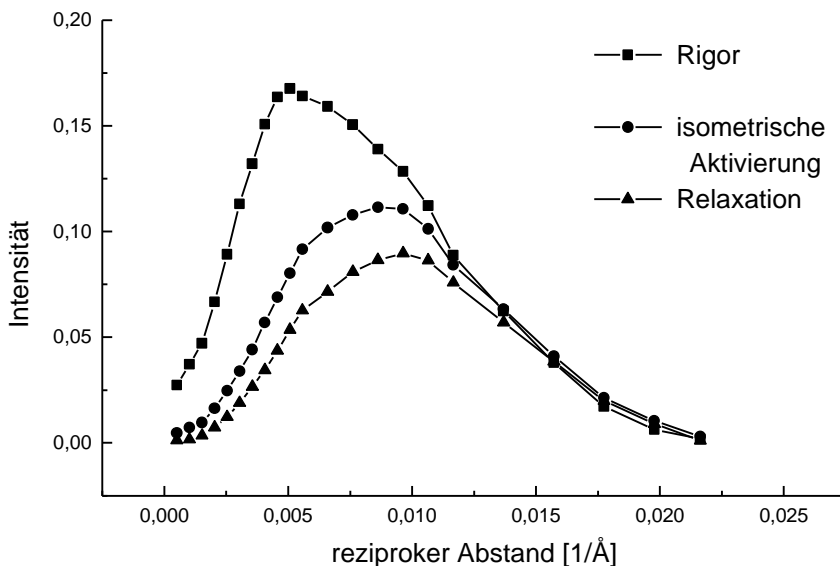


Abb.38: Intensitätsprofile der  $1/5.9 \text{ nm}^{-1}$  Aktin-Schichtlinie von Diffraktionsbildern aufgenommen unter isometrischer Kraftentwicklung, im Rigor und unter Relaxations-Bedingungen ( $T=2^{\circ}\text{C}$ ). Dargestellt sind Kurven erstellt aus einer Serie von Profilen parallel zum Meridian als Funktion der radialen Position. (entnommen aus T.Mattei, Diplomarbeit, 1998).

#### 4.6 Fazit und weitere Überlegungen

Es wurde ein neuer, bisher in der Literatur nicht beschriebener Analog-Zustand für den Akto-Myosin-Komplex mit  $\text{MgADP}\cdot\text{P}_i$  charakterisiert. Die gezeigten Daten lassen den Schluss zu, dass der als Nukleotid-Analogon verwendete  $\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$ -Komplex, wenn er wie in einem für diese Arbeit definierten Versuchansatz unter Rigor-Bedingungen eingesetzt wird, einen stereospezifisch gebundenen Zwischen-Zustand der Querbrücken vor Phosphat Freisetzung repräsentiert. Das ist grundsätzlich verschieden von der Vorstellung, dass die erste stereospezifische Bindung lediglich nach Phosphat-Abgabe und der daraus resultierenden Strukturveränderung möglich ist. Ob damit auch der erste kraftgenerierende Schritt im Querbrückenzyklus ein Zustand vor  $\text{P}_i$ -Abgabe ist kann mit den hier gezeigten Daten noch nicht geklärt werden.

Die  $\text{Ca}^{++}$ -induzierte Umlagerung der Regulatorproteine und die damit verbundene Freigabe weiterer Bindungsstellen am Aktin, ermöglicht eine andere Bindung des Myosinkopfes an Aktin und könnte auch im Myosinkopf zu einer Strukturveränderung führen. Inwieweit dies in der Folge auch die Nukleotidbindungs-Stelle /-Tasche des Myosinkopfes beeinflusst, ist eine zentrale Frage. Nach der Freigabe der weiteren Bindungsstellen könnte es aus einer nicht-stereospezifischen Bindung unter elastischer Verformung und somit begleitet von aktiver Kraftentwicklung zu einer stereospezifischen Bindung der Querbrücken kommen. Biochemisch könnte das dem Übergang vom  $\text{A}_{\text{on}}\text{MDP}\cdot\text{P}_i^{\text{I}}$ - zum  $\text{A}_{\text{on}}\text{MDP}\cdot\text{P}_i^{\text{II}}$ -Zustand entsprechen (Abb.1). Die unter  $\text{Ca}^{++}$  mögliche stereospezifische Bindung der Myosinköpfe könnte Strukturumlagerungen im Akto-Myosin-Komplex induzieren, die nachfolgend zu einer Destabilisierung und Delokalisierung des  $\gamma$ -Phosphats führen, das im Gegensatz zu  $\text{AlF}_4$  normalerweise schnell abdissoziiert (kurze ‚Lifetime‘ des  $\text{AM}\cdot\text{ADP}\cdot\text{P}_i^{\text{II}}$ -Zustandes) und zum ersten langlebigen kraftgenerierenden Zustand führt ( $\text{AM}\cdot\text{ADP}$ -Zustand), u.U. verbunden mit einem weiteren kraftgenerierenden Schritt. Lässt man den  $\text{MgADP}\cdot\text{AlF}_4$ -Komplex während Aktivierung an den Myosinkopf binden ( $\text{AlF}_4$ -Zustand), lassen die Ergebnisse der Röntgenbeugungsexperimente auch bei hoher  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration einen nicht stereospezifisch gebundenen Zustand der Querbrücken erkennen. Möglicherweise entspricht dieser Zustand dem  $\text{A}_{\text{on}}\text{MDP}\cdot\text{P}_i^{\text{I}}$ -Zustand, der als letzter, nicht-stereospezifisch an Aktin gebundener Zustand von den Querbrücken vor Kraftgenerierung besetzt wird. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Phosphat-Analogon bei diesem Ansatz nach Bindung an den Myosinkopf eine Position in der Nukleotidbindungstasche einnimmt, welche keine der sonst bei  $\text{Ca}^{++}$ -Aktivierung induzierten Strukturveränderungen im Myosinkopf und damit auch keine stereospezifische Bindung zulässt.

Setzt man MgADP und AIF<sub>4</sub> den Muskelfasern unter nukleotidfreien Rigor-Bedingungen zu, nach dem Schema in Abbildung 1 also dem A<sub>on</sub>M-Zustand, einem stereospezifisch-hochaffin gebundenen Zwischen-Zustand der Querbrücken, (also quasi rückwärts), so scheint nach Bindung von MgADP und Phosphat-Analogen an den Myosinkopf der A<sub>on</sub>MDP.P<sub>i</sub><sup>II</sup>-Zustand, ein stereospezifisch ans Aktin gebundener Querbrücken Zwischen-Zustand erreicht zu sein. Der Unterschied zwischen diesem Zustand und dem AIF<sub>-A</sub>-Zustand könnte darauf zurückzuführen sein, dass im AIF<sub>-R</sub>-Zustand AIF<sub>4</sub> in einer veränderten Position in die Nukleotidbindungstasche des im vorausgehenden Rigor-Zustandes bereits stereospezifisch an Aktin gebunden Myosinkopfes bindet und der Myosinkopf so eine andere Konformation einnimmt, die trotz AIF<sub>4</sub> stereospezifisch an Aktin binden kann. Demnach könnte der A<sub>on</sub>MDP.P<sub>i</sub><sup>I</sup> → A<sub>on</sub>MDP.P<sub>i</sub><sup>II</sup>-Übergang mit der  $\gamma$ -Phosphat Delokalisierung als Voraussetzung für den Übergang von einem nicht-stereospezifisch in einen stereospezifisch an Aktin gebundenen Querbrücken-Zustand schon (erster) Teil des kraftgenerierenden Prozesses sein. Danach könnte die endgültige Phosphat-Freisetzung in einen langlebigen kraftgenerierenden Zustand führen, u.U. verbunden mit einem weiteren (zweiten) Schritt der aktiven Kraftentwicklung.

Nach Vergleichen der unter isometrischer Aktivierung registrierten ersten und sechsten Aktin-Schichtlinien mit den entsprechenden Daten der AIF<sub>-R</sub> Versuche könnte der AIF<sub>-R</sub>-Zustand ein Analogon für einen kraftgenerierenden Zustand sein. Das bedeutet, dass die unter isometrischen Bedingungen charakterisierten kraftgenerierenden Zustände zumindest teilweise (kraftgenerierende) Zustände vor P<sub>i</sub>-Abgabe (AMDP.P<sub>i</sub><sup>II</sup>) sein könnten. Die bereits erwähnten P<sub>i</sub>-Freisetzungsexperimente (Millar and Homsher 1990) zeigten jedoch, dass die Besetzung dieses Zustandes aufgrund schneller P<sub>i</sub>-Abgabe nur gering ist. Das bedeutet, während isometrischer Kraftentwicklung befindet sich der grösste Teil der Querbrücken in einem Zustand nach P<sub>i</sub>-Abgabe (z.B. A<sub>on</sub>MD). Die Ähnlichkeit der Intensitätsverteilung auf der 1/5.9 nm<sup>-1</sup> Aktin-Schichtlinie zwischen isometrischen- und AIF<sub>-R</sub>-Bedingungen lässt dann den Schluss zu, dass beide Zustände strukturell sehr ähnlich sein müssen, zumindest im Bereich der hier erreichbaren Auflösung. Das schließt nicht aus, dass es beim Übergang zwischen den beiden Zuständen (A<sub>on</sub>MD.P<sub>i</sub> → A<sub>on</sub>MD) zu hier nicht detektierten Strukturumlagerungen im Myosinkopf kommt, die zu einer Bewegung des Hebelarms (leichte-Ketten-bindende Domäne des Myosinkopfes) und damit zu weiterer Kraftgenerierung führen. Eine detaillierte Analyse anderer Reflexe in den Diffraktionsbildern könnte darüber eventuell Auskunft geben. Es kann aber davon ausgegangen werden (wie schon früher postuliert, (Kraft et al., 2002)), dass weder der A<sub>on</sub>MDP.P<sub>i</sub><sup>II</sup>-Zustand (bzw. AIF<sub>-R</sub>) noch die unter isometrischer Aktivierung stereospezifisch gebundenen Querbrücken (A<sub>on</sub>MD), eine rigor-ähnliche Struktur aufweisen.



Die Ähnlichkeiten der Schichtlinien und Reflexe aus Diffraktionsbildern der BDM-Versuche sowohl zu den Daten der AIF<sub>R</sub>-Versuche wie auch zu denen der AIF<sub>A</sub>-Versuche könnten einem Gleichgewicht zwischen A<sub>on</sub>MDP.P<sub>i</sub><sup>I</sup> und A<sub>on</sub>MDP.P<sub>i</sub><sup>II</sup>-Zuständen entsprechen, welches sich nach Inkubation mit BDM einstellen könnte. Die auch bei hohen BDM-Konzentrationen immer noch messbare Kraftentwicklung der Fasern könnte daher kommen, dass die A<sub>on</sub>MDP.P<sub>i</sub><sup>II</sup>-Zustände in der Tat kraftgenerierende Zustände sind.

Für eine genauere Identifizierung der strukturellen Eigenschaften der hier gefundenen Zwischen-Zustände des Akto-Myosin-Komplexes, besonders die durch Ca<sup>++</sup>-Aktivierung induzierten Strukturveränderungen des AIF<sub>R</sub>-Zustandes mit daraus resultierender, stereospezifischer Bindung sind zukünftige Modellrechnungen zur Auswirkung definierter Strukturumlagerungen auf 2D-Röntgenbeugungsbilder und ein Vergleich mit den experimentell erhaltenen Daten nötig.

## Literaturverzeichnis

- Bigay J, Deterre P, Pfister C, Chabre M. 1985. Fluoroaluminates activate transducin-GDP by mimicking the gamma-phosphate of GTP in its binding site. *FEBS* 191(2):181-185.
- Brenner B. 1983. Technique for stabilizing the striation pattern in maximally calcium-activated skinned rabbit psoas fibers. *Biophys J* 41(1):99-102.
- Brenner B, Chalovich 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, 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, 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.
- Brixius K, Schwinger RH. 2000. Modulation of cross-bridge interaction by 2,3-butanedione monoxime in human ventricular myocardium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 361(4):440-444.
- 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, Martyn DA, Hannon JD. 1994. Activation dependence and kinetics of force and stiffness inhibition by aluminofluoride, 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<sub>3</sub> and AlF<sub>4</sub>. *J Biol Chem* 263(33):17429-17436.
- 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.
- Dantzig JA, Goldman YE. 1985. Suppression of muscle contraction by vanadate. Mechanical and ligand binding studies on glycerol-extracted rabbit fibers. *J Gen Physiol* 86(3):305-27.
- Dominguez R, Freyzon Y, Trybus KM, Cohen C. 1998. Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain: visualization of the pre-power stroke state. *Cell* 94(5):559-71.

- 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.AIF<sub>4</sub>. *Biochemistry* 34(28):8960-72.
- Geeves MH, Holmes KC. 1999. Structural Mechanism of Muscle Contraction. *Annu Rev Biochem* 68:687-728.
- Goody RS, Hofmann W. 1980. Stereochemical aspects of the interaction of myosin and actomyosin with nucleotides. *J Muscle Res Cell Motil* 1(1):101-15.
- Greene LE, Eisenberg E. 1980. Dissociation of the actin.subfragment 1 complex by adenylyl-5'-yl imidodiphosphate, ADP, and PPI. *J Biol Chem* 255(2):543-8.
- Gulick AM, Bauer CB, Thoden JB, Rayment I. 1997. X-ray structures of the MgADP, MgATPgammaS, and MgAMPPNP complexes of the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain. *Biochemistry* 36(39):11619-28.
- Haselgrove JC. 1980. Structure of vertebrate striated muscle as determined by X-ray-diffraction studies. *Handbook of Physiology-Skeletal Muscle*:143-171.
- 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.
- Higuchi H, Takemori S. 1989. Butanedione monoxime suppresses contraction and ATPase activity of rabbit skeletal muscle. *J Biochem* 105(4):638-643.
- Horiuti K, Higuchi H, Umazume Y, Konishi M, Okazaki O, Kurihara S. 1988. Mechanism of action of 2, 3-butanedione 2-monoxime on contraction of frog skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 9(2):156-64.
- Huxley AF. 1957. Muscle structure and theories of contraction. *Prog Biophys Biophys Chem* 7:255-318.
- 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, Brown W. 1967. The low-angle x-ray diagram of vertebrate striated muscle and its behaviour during contraction and rigor. *J Mol Biol* 30(2):383-434.
- 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.
- Köhler 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, 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, Brenner B. 1998. Structural features of force-generating cross-bridges. A 2D-X-ray diffraction study. *Adv Exp Med Biol* 453:289-95; discussion 295-6.
- 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<sup>2+</sup> on weak cross-bridge interaction with actin in the presence of adenosine 5'-[gamma-thio]triphosphate). *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(23):11362-6.
- Kress M, Huxley HE, Faruqi AR, Hendrix J. 1986. Structural Changes During Activation of Frog Muscle Studied by Time-resolved X-ray Diffraction. *J Mol Biol* 188:325-342.
- 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.
- 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.
- Maeda Y, Popp D, McLaughlin SM. 1988. Cause of changes in the thin filament-associated reflexions on activation of frog muscle--myosin binding or conformational change of actin. *Adv Exp Med Biol* 226:381-90.
- Malinchik S, Xu S, Yu LC. 1997. Temperature-induced structural changes in the myosin thick filament of skinned rabbit psoas muscle. *Biophys J* 73(5):2304-12.
- 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.
- Matsuda T, Podolsky RJ. 1984. X-ray evidence for two structural states of the actomyosin cross-bridge in muscle fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(8):2364-8.
- 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):309-318.
- 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 relationship of actin, myosin, and tropomyosin revealed by cryo-electron microscopy. *J Cell Biol* 105:29-39.

- 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.
- Phan BC, Faller LD, Reisler E. 1993. Kinetic and equilibrium analysis of the interactions of actomyosin subfragment-1.ADP with beryllium fluoride. *Biochemistry* 32(30):7712-9.
- 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.
- Schoenberg M, Eisenberg E. 1987. ADP binding to myosin cross-bridges and its effect on the cross-bridge detachment rate constants. *J Gen Physiol* 89(6):905-20.
- Smith CA, Rayment I. 1995. X-ray structure of the magnesium(II)-pyrophosphate complex of the truncated head of Dictyostelium discoideum myosin to 2.7 Å resolution. *Biochemistry* 34(28):8973-81.
- Smith CA, Rayment I. 1996. X-ray structure of the magnesium(II).ADP.vanadate complex of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain to 1.9 Å resolution. *Biochemistry* 35(17):5404-17.
- Squire J. 1998. Time resolved X-ray diffraction. In: Sugi H, editor. *Current Methods in Muscle Physiology*. Oxford: Oxford University Press. p 241-285.
- Squire JM. 1981. *The structural basis of muscular contraction*. New York, London: Plenum Press.
- 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.
- Takemori S, Yamaguchi M, Yagi N. 1995. An X-ray diffraction study on a single frog skinned muscle fiber in the presence of vanadate. *J Biochem (Tokyo)* 117(3):603-8.
- 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* 541:187-199.
- Urbanke C, Wray J. 2001. A fluorescence temperature-jump study of conformational transitions in myosin subfragment 1. *Biochem J* 358:165-173.
- White HD, Taylor EW. 1976. Energetics and mechanism of actomyosin adenosine triphosphatase. *Biochemistry* 15(26):5818-26.
- Wray JS, Goody RS, Holmes KC. 1988. Towards a molecular mechanism for the crossbridge cycle. *Adv Exp Med Biol* 226:49-59.
- Xiao M, Li H, Snyder GE, Cooke R, Yount RG, Selvin PR. 1998. Conformational changes between the active-site and regulatory light chain of myosin as determined by luminescence resonance energy transfer: The effect of nucleotides and actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15309-15314.

- Xu S, Gu J, Rhodes T, Belknap B, Rosenbaum G, Offer G, White H, Yu LC. 1999. The M.ADP.P(i) state is required for helical order in the thick filaments of skeletal muscle. *Biophys J* 77(5):2665-76.
- 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* 42:390-401.
- Yagi N, Matsubara I. 1988. Changes in the 5.9 nm actin layer-line on activation of frog skeletal muscles. *Adv Exp Med Biol* 226:369-80.
- Yagi N, Takemori S, Watanabe M, Horiuti K, Amemiya Y. 1992. Effects of 2,3-butanedione monoxime on contraction of frog skeletal muscles: an X-ray diffraction study. *J Muscle Res Cell Motil* 13(2):153-60.
- Yu LC, Brenner B. 1989. Structures of actomyosin crossbridges in relaxed and rigor muscle fibers. *Biophys J* 55(3):441-53.
- Zhao Y, Kawai M. 1994. BDM affects nucleotide binding and force generation steps of the cross-bridge cycle in rabbit psoas muscle fibers. *Am J Physiol* 266(2 Pt 1):C437-47.

## Lebenslauf

Name : Thomas Mattei

Anschrift : Hinrichsring 22  
30177 Hannover  
Telefon: 0511- 391753

geb. am : 17/07/1962

in : Langenhagen

Familienstand : Ledig

Eltern : Friedel und Elisabeth Mattei, geb. Tompel

Geschwister : Bettina Mattei

### Schulbildung

1969 - 1972  
1972 - 1982

Grundschule Rhemer Feld  
Integrierte Gesamtschule Roderbruch  
Abschluß Abitur

### Zivildienst

1982 -1984

Medizinische Hochschule Hannover

### Beruflicher Werdegang

Okt. 1984

Beginn des Studiums der Biologie

Jun. 1998

Abschluß des Studiums mit Diplom

Juli 1998

Seit Juli '98 wissenschaftlicher Mitarbeiter  
in der Molekular- und Zellphysiologie der  
Medizinischen Hochschule Hannover

Zwischendurch Tätigkeiten als Akkordarbeiter in der Industrie, Jobs in der  
Tourismus- und Versicherungsbranche, sowie mehrere Jahre Dienst als  
Extrawache in der Krankenpflege.

Hannover, den 25/06/03

## Publikationen

Kraft, T., Mattei, T., Brenner, B.: Structural features of force-generating cross-bridges: A 2D-X-ray diffraction study. *Adv. Exp. Med. Biol.* 289-296 (1998).

Kraft, T., Mattei, T., Radocaj, A., Piep, B., Nocula, Ch., Furch, M., and Brenner, B.: Structural features of cross-bridges in isometrically contracting skeletal muscle *Biophys. J.* 82, 2536-2547 (2002).

## Publizierte Abstracts

Kraft, T., Mattei, T., and B. Brenner: Actin layer-line profiles arising from attachment of rigor-like, weak-binding, and force-generating cross-bridges. *Biophys. J.* 74, A22 (1998).

Kraft, T., Mattei, T., and B. Brenner: Structural features of force generating cross-bridges: a 2D-X-ray diffraction study on single skinned rabbit muscle fibers during isometric contraction. *J. Muscle Res. Cell Mot.* 19 (02), (1998).

Kraft, T., Mattei, T., Nocula, C., Radocaj, A., Furch, M., Manstein, D., and B. Brenner: Effects of myosin-subfragment -1 and truncated S-1 binding on actin layer-line profiles of single fibers from rabbit psoas. *Biophys. J.* 76/1:A34 (1999).

Kraft, T., Mattei, T., Radocaj, A., and B. Brenner: Actin layer line profiles of single skinned fibers of rabbit psoas muscle during isometric contraction, relaxation and rigor at 20°C. *Biophys. J.* 78/1:228A (2000).

Kraft, T., Mattei, T., Radocaj, A., Nocula, C., Piep, B., Furch, M., and Brenner, B.: Force generating cross-bridges in isometrically contracting skeletal muscle are structurally different from rigor-like cross-bridges. *Pflüg. Arch.* 439 (6), R408 (2000).

Kraft, T., Mattei, T., Radocaj, A., Nocula, C., and Brenner, B.: 2D-X-Ray Diffraction on Single Muscle Fibers: A Tool for Studying the Molecular Mechanism of Muscle Contraction. *Am. Cryst. Assoc.* 27 (2), p.46 (2000).

Brenner, B., Mattei, T., Radocaj, A., and Kraft, T.: Kinetics and structural properties of cross-bridges during isotonic steady state contraction. *Biophys. J.* 78/1:134A (2000).

Brenner, B., Stehle, R., Mattei, T., Radocaj, A., and Kraft, T.: Cross-bridge attachment during isotonic steady state contraction: Kinetic and structural studies. *Pflüg. Arch.* 439 (6), R433 (2000).

Mählmann, E., Mattei, T., Brenner, B., and Kraft, T.: Actin-binding properties of weak-binding cross-bridges in the presence of ADP.AIF<sub>4</sub> or BDM. *Biophys. J.* 84/2: 449a (2003).



## Danksagung

Frau PD Dr. T. Kraft und Herrn Prof. Dr. B. Brenner danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung des Themas sowie die jederzeit freundliche Unterstützung und Beratung bei der Durchführung der Versuche und der Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Müller danke ich für seine Hilfe und freundliche Unterstützung.

Frau Eva Harder sowie allen anderen Mitarbeitern und Kollegen der Abteilung Molekular- und Zellphysiologie danke ich ebenfalls für die geleistete Unterstützung und stete Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern danke ich für die anhaltend grosse Unterstützung in allen Bereichen.

Und für alle, die sich nicht erwähnt fühlen, aber erwähnt werden sollten, weil sie auch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, Danke.