

Mechanismus und Regulation eines prozessiven Klasse V Myosins

von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Diplom-Biochemiker Manuel Henry Taft
geboren am 27.09.1977 in Hannover

2007

Referent: Prof. Dr. Georgios Tsiavaliaris

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Walter Steffen

Tag der Promotion: 05.12.2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 02.02.2004 bis 31.08.2007 am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. G. Tsiavaliaris angefertigt.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, Manuel Taft, die Arbeit selbständig verfaßt zu haben.

Es wurden ausschließlich die angegebenen Hilfsmittel verwendet.

Gutachter:

Prof. Dr. Georgios Tsiavaliaris

Priv.-Doz. Dr. Walter Steffen

Danksagung:

Besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Dietmar J. Manstein und Herrn Prof. Dr. Georgios Tsiavaliaris für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit am Institut für Biophysikalische Chemie in einem hervorragenden wissenschaftlichen Umfeld anfertigen zu können.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Georgios Tsiavaliaris für die Bereitstellung des interessanten und anspruchsvollen Themas sowie die hervorragende Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Walter Steffen danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe Ralph Diensthuber, Falk Hartmann, Daniela Kathmann, Agrani Rump, Claudia Thiel und Christian Waßmann, die zu einer phantastischen Arbeitsatmosphäre in unserer ständig gewachsenen Gruppe beigetragen haben. Weiterer Dank geht auch an die ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe Heiko Keller, Wolfram Langer, Nikolai Mischerikow und Christine Völkel, die meine Promotionszeit auf fachlicher und persönlicher Ebene bereichert haben.

Ich danke Herrn Dr. Igor Chizov für die Bereitstellung der *flash-photolysis* Apparatur sowie die zahlreichen Denkanstöße zur Betrachtung kinetischer Fragestellungen.

Herrn Dr. Roman Fedorov danke ich für die Einführung in die Welt der Proteinkristallographie sowie die Möglichkeit, mit ihm das DESY am EMBL in Hamburg zu besuchen.

Weiterer Dank gilt auch den anderen Mitgliedern des Instituts für Biophysikalische Chemie, die ich nicht namentlich erwähnt habe, und die auch ein Stück zum Erfolg beigetragen haben.

Meinen Eltern Sabine und Mario, meinem Bruder Florian sowie meinen Großeltern, Verwandten und Freunden gehört besonderer Dank für ihre uneingeschränkte Unterstützung und ihr andauerndes Interesse an meiner Arbeit.

Zuletzt gilt mein Dank Julia für den Rückhalt und die Unterstützung über Jahre hinweg.

„Wenn wir wüßten, was wir tun, würden wir es nicht Forschung nennen, oder?“

Albert Einstein

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in einer umfassenden kinetischen Charakterisierung der molekulare Mechanismus von Myosin-Vb aus dem eukaryotischen Modellorganismus *Dictyostelium discoideum* aufgeklärt werden. Es konnte erstmals gezeigt werden, daß ein niederer Eukaryot wie *Dictyostelium* über ein Myosin mit prozessiven Eigenschaften verfügt. Ergänzend konnten existierende kinetische Modelle zur Prozessivität von Myosinen bestätigt werden sowie neue Erkenntnisse zur Regulation der Bewegung und des prozessiven Verhaltens von Klasse V Myosinen gewonnen werden.

Wie für alle bislang bekannten prozessiven Klasse V Myosine wird der kinetische Mechanismus von *Dictyostelium* Myosin-Vb durch eine hohe Aktin-Affinität, eine hohe ATP-Hydrolyserate, sowie einen geschwindigkeitsbestimmenden ADP-Dissoziationsschritt bestimmt. Darüber hinaus zeigt *D. discoideum* Myosin-Vb jedoch die Fähigkeit, zwischen einer schnellen Bewegung und einem Zustand der Spannungserhaltung umzuschalten, welche durch den Einfluß freier physiologischer Magnesiumionenkonzentrationen bestimmt wird. Es konnte in einer Reihe von Einzel- und sequentiellen Mischverfahren gezeigt werden, daß hohe Konzentrationen an freien Magnesiumionen die Verweildauer des Motors in den stark aktinbindenden Zuständen während eines ATP-Umsatzes beträchtlich verlängern. Dies führt zu einer Erhöhung der *duty ratio*, dem zeitlichen Anteil der Dauer, die der Motor im stark an Aktin gebundenen Zustand verbringt. Zusätzlich wird die hohe *duty ratio* von Myosin-Vb durch eine für Klasse V Myosine ungewöhnliche kinetische Anpassung erreicht, da es eine langsame Dissoziationsgeschwindigkeit des Aktomyosinkomplexes durch ATP aufweist. Umgekehrt ermöglichen niedrige freie Magnesiumionenkonzentrationen Myosin-Vb eine schnelle Bewegung entlang des Aktinzytoskeletts. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wird postuliert, daß Myosin-Vb sich in seiner nativen Form als dimeres Molekül prozessiv entlang von Aktinfilamenten bewegen kann. Die in dieser Arbeit vorgestellten kinetischen und biochemischen Untersuchungen schließen eine flexible Ankerfunktion an der kontraktile Vakuole, dem Lokalisationsort von Myosin-Vb in *D. discoideum*, nicht aus. Dazu schaltet Myosin-Vb magnesiumionenabhängig zwischen schneller Bewegung und prozessiver Bewegung, die eine dynamische Verankerung ermöglicht, um. Damit kommt den Myosinen der Klasse V ein erweitertes Aufgabenspektrum zu, das sich von der etablierten Funktion als Vesikeltransporter abhebt.

Ein regulatorischer Mechanismus der Motordomänenphosphorylierung von Myosinen mittels Schwerkettenkinasen ist für Klasse I und Klasse II Myosine bereits bekannt, für Myosine der Klasse V hingegen noch nicht beschrieben. Erste Hinweise auf eine Motordomänenphosphorylierung von Myosin-Vb konnten in dieser Arbeit durch Myosin-V-Mutanten, Kinase-Assays und massenspektrometrische Untersuchungen gefunden werden. Potentielle phosphorylierbare Aminosäurereste befinden sich demnach im Bereich einer flexiblen Schleife, welche als Bindeglied zwischen den Aktin- und ATP-Bindungsstellen dient. Es wurde gezeigt, daß mit der Phosphorylierung Veränderungen der kinetischen Eigenschaften einhergehen. Damit wird eine weitere Form der Regulation von Klasse V Myosinen ermöglicht, die diese Klasse von Myosinen an die Wege der Signaltransduktion ankoppelt. Die Untersuchung der Auswirkung von Motordomänenphosphorylierungen wurde außerdem auf einen bislang noch uncharakterisierten Motor - Myosin-IC - erweitert. Für Klasse I Myosine bestätigt sich, daß Phosphorylierung als ein Ein/Aus-Schalter wirkt. Weitere Experimente mit Myosin-IC ergaben zudem erste Hinweise, wie das Ein- bzw. Ausschalten der Motorfunktion auch anders bewerkstelligt werden kann.

Abschließend zeigt diese Arbeit durch die erstmalige Identifizierung und Charakterisierung eines prozessiven Myosins aus *Dictyostelium discoideum*, daß dieser Organismus seinen Stellenwert als Modellsystem zu Recht vertritt und gibt Anlaß, die grundlegenden molekularen Mechanismen von Myosinen auch im zellulären Kontext zu studieren.

Schlüsselwörter: Myosin, Kinetik, Prozessivität

Abstract

During my Ph.D. work I performed a complete kinetic characterization of myosin-Vb from the eukaryotic model organism *Dictyostelium discoideum* to unravel the regulation and molecular mechanism. The results clearly demonstrate that Myosin-Vb is the first class V myosin from a lower eukaryote, which is kinetically equipped to move processively along actin filaments. In addition, established kinetic models describing the mechanism of processivity have been proven and new insights into the mechanism of movement and regulation of processivity of class-V myosins have been achieved.

Comparable to all processive class-V myosins characterized so far, the kinetic mechanism of *Dictyostelium* myosin-Vb is mainly determined by a high actin affinity, a fast ATP hydrolysis rate and a slow, rate-limiting ADP dissociation. In addition, *D. discoideum* myosin-Vb displays the ability to switch between fast movement and tension-bearing states. This feature is triggered by free magnesium ions at concentrations within the physiological range. By a series of single- and sequential-mixing experiments it was shown that high concentrations of free magnesium ions considerably extend the time the motor spends in the strongly actin bound states within a single ATP turnover. This results in an increase of the duty ratio, which defines the fraction of time the motor spends in the strongly actin bound states. Furthermore, the high duty ratio of myosin-Vb is achieved by a kinetic adaptation that is unusual for class-V myosins as it displays a slow dissociation rate of the actomyosin complex by ATP. Contrary, low concentrations of free magnesium ions enable myosin-Vb to move rapidly along the actin cytoskeleton. Based on these results it is postulated that as a native, dimeric molecule myosin-Vb is capable of moving processively along actin filaments.

The results of the kinetic and biochemical investigations presented in this work give evidence for a possible role of myosin-Vb to function as a flexible anchor at the contractile vacuole system, where it is localized within *D. discoideum*. At the contractile vacuole, myosin-Vb may switch between strong and weak actin bound states in order to achieve a dynamic integration of the contractile vacuole system. Accordingly, class V myosins do not only fulfill the established function to be vesicle transporters but seem to have a broader range of tasks within the cell.

A regulatory mechanism such as myosin motor domain phosphorylation by myosin heavy chain kinases has been well characterized by class I myosins but is still elusive for class V myosins. In this work, first indications for a motor domain phosphorylation have been found by a combined approach of myosin-Vb mutant analyses, kinase-based assays and investigations by mass spectrometry. Possible phosphorylation sites are located within a flexible loop (so-called Loop-1) that connects the actin- and ATP-binding sites. It has been shown that phosphorylation leads to changes in the kinetic properties. This provides another mode of regulation of class V myosins and connects this class of myosins directly to signal transduction pathways. Furthermore, the investigation of the effect of motor domain phosphorylation was extended to a motor not characterized so far, myosin-IC. As observed for other class I myosins, motor domain phosphorylation acts in case of myosin-IC as well as an on/off-switch of the motile activity. In addition, experiments with myosin-IC constructs that varied in length of their motor domain gave first indications for an additional mechanism of on/off switching.

In summary, this work describes the first identification and characterization of a processive myosin in *Dictyostelium discoideum*. This leads to the conclusion that the position of this organism as a model system is absolutely justifiable and gives reason to study the fundamental molecular mechanisms of myosins within the cellular context.

keywords: myosin, kinetics, processivity

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1.	MOLEKULARE MOTOREN	1
1.2.	DIE FAMILIE DER MYOSINE.....	2
1.3.	STRUKTURELLE KONSERVIERTHEIT INNERHALB DER MYOSINKLASSEN.....	7
1.3.1.	Nukleotid-Bindungsstelle	9
1.3.2.	Oberflächenschleifen und Aktinbindungsstellen.....	10
1.3.3.	Konverter und Hebelarm	11
1.4.	STRUKTUR-FUNKTIONSBEZIEHUNGEN DER AKTOMYOSIN INTERAKTION	12
1.4.1.	Molekularer Mechanismus des ATPase-Zyklus.....	13
1.4.2.	Mechanismus der Prozessivität von Myosin-V	15
1.4.3.	Regulation der Myosinaktivität	18
1.4.4.	Direktionalität.....	19
1.5.	FLUORESZENZSPEKTROSKOPISCHE MEßMETHODEN ZUR AUFKLÄRUNG DER KINETISCHEN MECHANISMEN VON MYOSINEN	20
1.5.1.	Absorption.....	20
1.5.2.	Intrinsische und extrinsische Fluoreszenz	21
1.6.	KINETISCHE MODELLE UND REAKTIONSGLEICHUNGEN ZUR AUFKLÄRUNG DER MOLEKULAREN MECHANISMEN VON MYOSINEN.....	22
1.6.1.	Aktin-aktivierte ATPase von Myosin.....	23
1.6.2.	Interaktion von Myosin mit Nukleotiden	24
1.6.3.	Interaktion von Myosin mit Aktin.....	25
1.6.4.	Interaktion des Aktomyosinkomplexes mit Nukleotiden	26
1.7.	<i>D. DISCOIDEUM</i> ALS EUKARYOTISCHER MODELLORGANISMUS	29
1.7.1.	<i>D. discoideum</i> Myosin-Vb.....	31
1.7.2.	<i>D. discoideum</i> Myosin-IC	31
1.8.	ZIEL DER ARBEIT	32
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	33
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	35
2.1.	MATERIAL	35
2.1.1.	Chemikalien.....	35
2.1.2.	Geräte	36
2.1.3.	Antibiotika.....	37
2.1.4.	Enzyme und Antikörper	38
2.1.5.	Organismen	38
2.1.5.1.	Bakterienstamm.....	38
2.1.5.2.	Zelllinie	38

2.2.	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN.....	39
2.2.1.	Transformation von <i>E. coli</i>	39
2.3.	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	39
2.3.1.	Transformation von <i>D. discoideum</i>	39
2.3.2.	Kultivierung von <i>D. discoideum</i>	40
2.3.3.	Konservierung von <i>D. discoideum</i> Sporen.....	40
2.3.4.	Cryo-Konservierung von vegetativen Zellen	41
2.4.	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	41
2.4.1.	Plasmidpräparation.....	41
2.4.2.	Restriktionsspaltung	42
2.4.3.	Dephosphorylierung von DNA	42
2.4.4.	Ligation linearer DNA	43
2.4.5.	Agarose-Gelelektrophorese	43
2.4.6.	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	44
2.4.7.	Präparation genomischer DNA aus <i>D. discoideum</i>	44
2.4.8.	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
2.4.9.	Verwendete Oligonukleotide.....	46
2.4.10.	DNA-Aufreinigung	46
2.4.11.	TOPO-cloning und <i>Blue-white screening</i>	46
2.5.	VERWENDETE VEKTOREN	47
2.5.1.	Der Vektor pDXA-3H.....	47
2.5.2.	Der Vektor pDXA-3Flag.....	48
2.5.3.	pDXA-3H basierte Expressionsvektoren	48
2.6.	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	48
2.6.1.	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	48
2.6.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration durch UV-Absorptionsmessung	48
2.6.3.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	49
2.6.4.	Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli.....	49
2.6.5.	Western-Blot	50
2.6.6.	Analytische Proteinpräparation	51
2.6.7.	Puffer und Lösungen für die analytische Proteinpräparation	51
2.6.8.	Aufreinigung von Aktin aus Kaninchenmuskeln	52
2.6.9.	Präparation von F-Aktin.....	53
2.6.10.	Präparation von Pyren-markiertem F-Aktin.....	53
2.6.11.	Präparative Aufreinigung von Myosinkonstrukten aus <i>D. discoideum</i>	54
2.6.12.	Phosphorylierung von Myosinen mit MIHCK.....	57
2.6.13.	Dephosphorylierung von Myosinen mit λ -Phosphatase.....	58

2.6.14.	Kinase-Assay zur Untersuchung der Phosphorylierung von Myosinen	58
2.6.15.	Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Untersuchung von Myosinen.....	59
2.7.	BIOPHYSIKALISCHE METHODEN.....	60
2.7.1.	<i>steady-state</i> -Kinetik.....	60
2.7.2.	Stopped-Flow-Messungen.....	61
2.7.3.	<i>flash photolysis</i> Experimente.....	62
2.7.4.	<i>In vitro</i> -Motilitätsassays	65
2.7.5.	Kristallisationsansätze	67
3.	ERGEBNISSE.....	68
3.1.	HOMOLOGIEN VON MYOSINEN DER KLASSE V MITTELS PRIMÄR-SEQUENZANALYSE	68
3.2.	DARSTELLUNG DER EXPRESSIONSVEKTOREN FÜR <i>D. DISCOIDEUM</i> MYOSIN-VB	71
3.3.	EXPRESSION UND AUFREINIGUNG VON <i>D. DISCOIDEUM</i> MYOSIN-VB- MOTORDOMÄNENKONSTRUKTEN.....	72
3.3.1.	Expressionsanalyse verschiedener Myosin-Vb Konstrukte	72
3.3.2.	Präparation von Myosin-Vb Konstrukten	73
3.4.	KINETISCHE CHARAKTERISIERUNG VON <i>D. DISCOIDEUM</i> MYOSIN-VB.....	75
3.4.1.	Bestimmung der katalytischen Aktivität - k_{cat} und K_M der <i>steady-state</i> -ATPase	75
3.4.2.	Transientenkinetische Charakterisierung	78
3.4.3.	Nukleotidinteraktionen mit Myosin	78
3.4.3.1.	Bestimmung der ATP-Bindung durch intrinsische Fluoreszenz	78
3.4.3.2.	Bestimmung der ATP Bindung durch extrinsische Fluoreszenz.....	80
3.4.3.3.	Auflösung von zwei Myosin-Vb.ADP-Zuständen	80
3.4.3.4.	Bestimmung der ADP-Dissoziation von Myosin-Vb durch extrinsische Fluoreszenz.....	82
3.4.3.5.	Bestimmung der ADP-Affinität über extrinsische Pyren-Aktin-Fluoreszenz	82
3.4.4.	Nukleotidinteraktionen mit dem Akto.Myosin Komplex.....	85
3.4.4.1.	ATP-induzierte Dissoziation des Akto.Myosinkomplexes.....	85
3.4.4.2.	mantADP-Bindung an Akto.Myosin.....	86
3.4.4.3.	mantADP-Dissoziation von Akto.Myosin.....	87
3.4.4.4.	Einfluß von ADP auf die Dissoziation von Akto.Myosin durch ATP	88
3.4.5.	Interaktionen von Myosin mit Aktin	90
3.4.5.1.	Bindung von Myosin und Myosin.ADP an Aktin	90
3.4.5.2.	Aktin-Dissoziation.....	92
3.4.6.	Messungen mit dem <i>flash-photolysis</i> System.....	94
3.5.	UNTERSUCHUNGEN ZUR Mg^{2+} -REGULATION VON KLASSE V MYOSINEN.....	96
3.5.1.	<i>In vitro</i> Motilität von Aktinfilamenten	96
3.5.2.	Mg^{2+} -Abhängigkeit der ADP-Affinität von Myosin-Vb	97
3.5.3.	Mg^{2+} -Abhängigkeit der ADP-Affinität von Akto.Myosin-Vb	99

3.5.4.	Einfluß der freien Mg^{2+} -Ionen-Konzentration auf die Population der stark aktinbindenden Zustände	103
3.6.	UNTERSUCHUNG DER PHOSPHORYLIERUNG DER MOTORDOMÄNE VON MYOSIN-VB UND IDENTIFIZIERUNG NEUER PHOSPHORYLIERBARER RESTE IN SCHLEIFE-1	106
3.6.1.	Nachweis der Phosphorylierung der Motordomäne von <i>D. discoideum</i> Myosin-Vb.....	107
3.6.2.	Identifizierung der Phosphorylierungsstelle durch Massenspektrometrie	110
3.6.3.	Charakterisierung der Schleife-1-Mutante von <i>D. discoideum</i> Myosin-Vb.....	111
3.7.	KRISTALLISATION DER MOTORDOMÄNE VON <i>D. DISCOIDEUM</i> MYOSIN-VB	114
3.8.	UNTERSUCHUNGEN DER NACKENREGION UND DER REGULATION VON <i>D. DISCOIDEUM</i> MYOSIN-IC.....	116
3.8.1.	Sequenzanalyse und Generierung der Expressionsvektoren.....	116
3.8.2.	Expression und Aufreinigung von verschiedenen Myosin-IC-Konstrukten	118
3.8.3.	Untersuchung der Phosphorylierung von <i>D. discoideum</i> Myosin-IC	119
4.	DISKUSSION	121
4.1.	KINETISCHE CHARAKTERISIERUNG VON MYOSIN-VB AUS <i>D. DISCOIDEUM</i>	121
4.1.1.	Expression und Aufreinigung von <i>D. discoideum</i> Myosin-Vb	121
4.1.2.	<i>D. discoideum</i> Myosin-Vb zeigt kinetische Eigenschaften eines prozessiven Motors	122
4.1.3.	<i>D. discoideum</i> Myosin-Vb weist niedrige thermodynamische und kinetische Kopplungen auf.	125
4.1.4.	Im Verlauf des ATPase-Zyklus populierte Myosin-Vb überwiegend die stark aktinbindenden Zustände	127
4.1.5.	Die Motoraktivität von Myosin-Vb wird durch freie Mg^{2+} -Ionen reguliert.....	128
4.1.6.	Bei hohen Konzentrationen an freien Mg^{2+} -Ionen wird die ADP-Dissoziation von Akto-Myosin-Vb zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des ATPase-Zyklus.....	130
4.1.7.	<i>D. discoideum</i> Myosin-Vb erfüllt durch eine hohe <i>duty ratio</i> ein grundlegendes Kriterium für prozessives Verhalten.....	131
4.1.8.	Strukturelle Grundlagen der Mg^{2+} -Regulation für Klasse V Myosine.....	133
4.1.9.	<i>D. discoideum</i> Myosin-Vb erfüllt die Eigenschaften eines Ankers	134
4.2.	SERINE IN DER SCHLEIFE-1-REGION VON MYOSIN-VB SIND POTENTIELLE PHOSPHORYLIERUNGSRESTE MIT REGULATIONSFUNKTION DER ATPASE	134
4.3.	GEWINNUNG VON PROTEINKRISTALLEN DER MOTORDOMÄNE VON MYOSIN-VB	136
4.4.	PHOSPHORYLIERUNG VON <i>D. DISCOIDEUM</i> MYOSIN-IC DURCH MIHCK IST ESSENTIELL FÜR DIE MOTORAKTIVITÄT DIESES MYOSINS	137
4.5.	BETRACHTUNGEN ZUR STRUKTUR-FUNKTIONSBEZIEHUNG VON MYOSIN-IC	137
5.	LITERATURVERZEICHNIS	139
6.	PRÄSENTATIONEN UND PUBLIKATIONEN IN VORBEREITUNG	152
7.	LEBENS LAUF	153

1. Einleitung

1.1. Molekulare Motoren

Es gibt drei Klassen von molekularen Motoren, die für Bewegungsvorgänge in der Zelle zuständig sind: Myosine, Dyneine und Kinesine. Diese arbeiten alle nach dem gleichen, grundlegenden Mechanismus: Sie bauen enzymatisch das Energieäquivalent ATP ab und konvertieren die Energie, die aus der Hydrolyse resultiert, in gerichtete Bewegung entlang von Proteinfilamenten des Cytoskeletts. Dynein und Kinesin interagieren dabei mit Mikrotubuli, während sich Myosin entlang von filamentösem Aktin bewegt [Vale, 1987; Milligan und Flicker, 1987]. Motorproteine sind an zellulären Prozessen wie Organell- und Membrantransport, der Chromosomentrennung bei der Zellteilung, der Zellbewegung, der Veränderung oder Stabilisierung der Zellgestalt, der Signalübertragung innerhalb der Zelle, dem Schlagen von Cilien und eukaryotischen Flagellen sowie an der Muskelkontraktion beteiligt [Vale und Milligan, 2000].

Das Myosin aus der Muskulatur diente mehrere Jahrzehnte lang als Modellsystem, um die Entstehung von Bewegungen zu beschreiben. Weitere Einsichten in die Evolution und die Funktionsweise von Myosinen wurden durch die Entdeckung einer großen Anzahl an weiteren Myosingenen gewonnen. Im Menschen wurden 39 Myosingene aus mindestens elf unterschiedlichen Klassen gefunden, der Modellorganismus Maus verfügt über 26 Myosine aus sieben Klassen, die Fliege besitzt mindestens 11 Myosingene aus neun Klassen, in *C. elegans* sind es 17 Myosine aus sieben Klassen. *D. discoideum* exprimiert 13 Myosine aus fünf Klassen und selbst *S. cerevisiae* produziert fünf Myosine aus drei verschiedenen Klassen.

Mutationen in vielen dieser Gene führen beim Menschen zu schwerwiegenden Krankheiten. So ist die familiäre hypertrophe Kardiomyopathie eine genetisch bedingte Herzmuskelerkrankung mit regionaler oder diffuser Myokardverdickung, die zu Herzversagen und plötzlichem Tod führen kann. Die Krankheit resultiert aufgrund eines Gendefektes in Form von Punktmutationen in der β -kardialen Isoform von Myosin-II [Bonne *et al.*, 1998]. Eine weitere Krankheit, das Griscelli Syndrom Typ 1, welches zu einer Hypomelanose (Depigmentierung) mit einhergehenden primären neurologischen Defekten führt, wird durch Mutationen im Myosin-Va-Gen hervorgerufen [Menasche *et al.*, 2002]. Punktmutationen in den Genen für Myosin-VI und Myosin-VIIA führen innerhalb der ersten Lebensjahre zu Taubheit und Störungen des Gleichgewichtssinnes [Melchionda *et al.*, 2001; Tamagawa *et al.*, 2002]. Darüberhinaus spielen Mutationen in den Genen von Nicht-Muskel Myosin-IIA und Myosin-IIB eine Rolle in der Entstehung und Progression von Tumoren [Betapudi *et al.*, 2006].

Die Möglichkeit, verschiedene Myosine aufgrund ihrer Funktionalität zu klassifizieren, bietet einen wertvollen Ansatz, die grundlegenden molekularen Mechanismen von myosinabhängigen Prozessen innerhalb der Zelle genauer zu verstehen. Dies liefert wichtige Erkenntnisse für neue therapeutische Ansätze zur Behandlung neurodegenerativer und kardiovaskulärer Krankheiten. Die strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Myosinen ist also für das Grundverständnis der elementaren Mechanismen von Kraftentwicklung und Bewegung sowie für die Erforschung bestimmter Krankheitsbilder unerlässlich.

Für die funktionelle Charakterisierung sind neben den kinetischen Verfahren in den letzten Jahren vermehrt neue Methoden zur Analyse von molekularen Motoren auf Einzelmolekülebene entwickelt worden, die es erlauben, die Kraftentwicklung und Bewegung einzelner Myosine direkt zu messen. Viele dieser Techniken, die ihre Anwendung auch in

anderen Forschungsbereichen gefunden haben, wurden anhand von Kinesinen und Myosinen etabliert. Dazu gehören die optischen Laserfallen, Einzelmolekül-Fluoreszenzmessungen, sowie verschiedene Arten hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie [Steffen und Sleep, 2004; Dantzig *et al.*, 2006].

Die Grundlage der Charakterisierung eines molekularen Motors wie Myosin bildet die kinetische Beschreibung der einzelnen Schritte der ATPase-Reaktion während der Interaktion mit Aktin. Dadurch lassen sich Modelle zur Beschreibung der funktionalen Mechanismen von Myosinen aufstellen, die mit Hilfe von strukturellen und direkten funktionalen Untersuchungen ergänzt werden können.

1.2. Die Familie der Myosine

Myosine bilden eine große Familie von Motorproteinen, die alle eine katalytische Motordomäne besitzen, die ATP hydrolysiert und die daraus gewonnene Energie in eine gerichtete Bewegung entlang von filamentösem, polarem Aktin (F-Aktin) umsetzt. Diese Motordomäne ist innerhalb der Familie hochkonserviert. Sie dient auch zur Einteilung der Myosine in verschiedene Klassen. Mittlerweile unterscheidet man 24 verschiedene Myosinklassen, die in weitere Unterklassen unterteilt sind [Foth *et al.*, 2006]. Abbildung 1.1 stellt eine auf Proteinsequenzhomologie basierende, neuere Klassifizierung der Myosine anhand eines phylogenetischen Baumes dar.

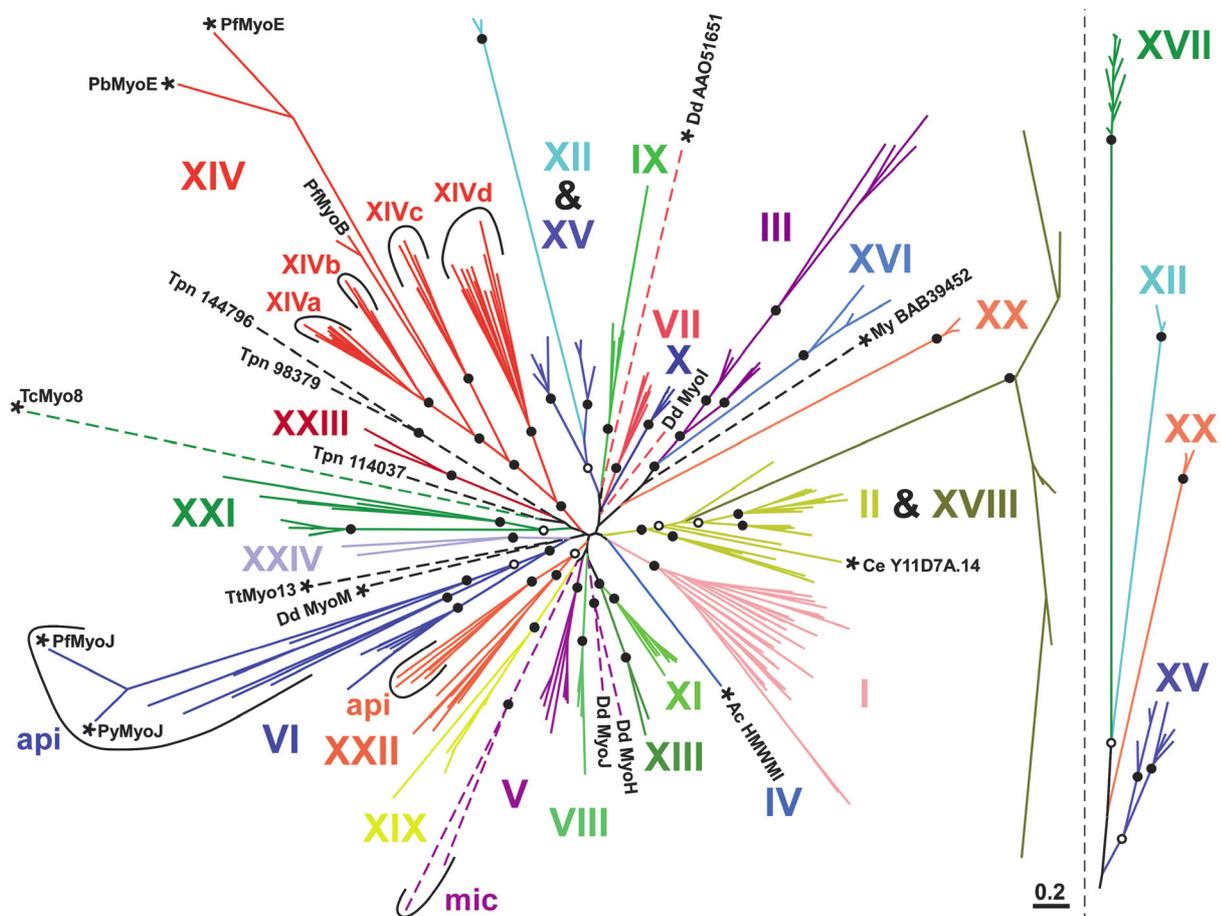


Abb. 1.1: Die Myosin Superfamilie [Foth *et al.*, 2006]. Phylogenetischer Stammbaum nach Sequenzvergleich der Motordomänen von 267 Myosinen aus 24 Klassen.

Dieser beruht auf einer phylogenetischen Untersuchung unter Einbeziehung vieler neu entdeckter Myosingene und berücksichtigt neben der Architektur der Proteindomänen auch spezifische Aminosäurepolymorphismen. Das zuerst entdeckte Myosin ist das doppelköpfige Muskelmyosin. Es gehört mit einigen anderen Nicht-Muskel Myosinen zu Klasse II, welche auch als konventionelle Myosine bezeichnet werden (im Stammbaum hellgrün). Innerhalb dieser Klasse ist die Myosinklasse XVIII positioniert, deren Linie aus der Myosin-II Klasse hervorgeht, dann aber divergiert. Es ist jedoch anzunehmen, daß die Mitglieder dieser Klasse XVIII aus einem gemeinsamen Vorläufer mit Myosin-II hervorgehen [Foth *et al.*, 2006]. Alle anderen Mitglieder der Myosinfamilie werden zu den unkonventionellen Myosinen gezählt. Die zuerst entdeckten unkonventionellen Myosine wurden in Klasse I zusammengefaßt [Pollard und Korn, 1973]. Neuere Klassen unkonventioneller Myosine werden fortlaufend numeriert (III, IV, V ...).

Alle Myosine bestehen aus drei Domänen, die unterschiedliche Funktionen haben. Die Kopfdomäne enthält die Bereiche für die Wechselwirkung mit Aktin und Nukleotid; sie ist in der Lage, aus chemisch gewonnener Energie durch eine Reihe von konformationellen Umwandlungen und *rigid body*-Bewegungen Kraft zu generieren und wird deshalb auch Motordomäne genannt. An diese schließt sich eine Nackendomäne mit einer unterschiedlichen Anzahl von Bindungsstellen für leichte Ketten (*Light Chain Binding Domain*, LCBD) an. Die Leichte-Ketten-Bindungsstellen beinhalten ein typisches sogenanntes IQ-Motiv [Cheney und Mooseker, 1992]. Die Konsensus-Sequenz des IQ-Motives lautet (I/x)Qxx(Y/F/W)Rx(Y/F/W)xx(R/x) und konnte durch umfangreiche Sequenzanalysen von über 1700 Myosin-Motordomänen detailliert beschrieben werden [Kollmar, 2006].

Die an diese IQ-Motive bindenden leichten Ketten sind Calmoduline oder Calmodulin-ähnliche Aminosäureketten. Bislang sind nur wenige leichte Ketten charakterisiert worden. Je nach Klasse variiert die Anzahl, Sequenz und Struktur der LCBDS; die assoziierten leichten Ketten stabilisieren den Nackenbereich und haben unter anderem regulatorische Funktion für die ATPase-Aktivität der Myosine [Bahloul *et al.*, 2004; Bähler und Rhoads, 2002]. Die darauf folgende Schwanzregion ist ebenso klassenspezifisch ausgeprägt [Oliver *et al.*, 1999]. Bei Myosinen, in denen Regionen vorliegen, die superspiralisierte Strukturen ausbilden können, besteht die Möglichkeit der Dimerisierung zu doppelköpfigen Myosinen. Die superspiralisierten Schwanzregionen konventioneller Myosine formen *in vitro* und *in vivo* Filamente, da sich diese ca. 1000 Aminosäuren langen, hydrophoben Bereiche in physiologischer Umgebung aneinanderlagern und stabile Filamente ausbilden [Sellers, 2000]. Für einige Nicht-Muskel-Myosine wird über bestimmte Interaktionsdomänen (z.B. SH3-ähnliche Domänen) in der Schwanzregion die Spezifität des Transporters bestimmt [Ma *et al.*, 2001; Tuxworth und Titus, 2000; Mermall *et al.*, 1998].

In der vorliegenden Arbeit wurden die kinetischen und funktionalen Eigenschaften von zwei Myosinen aus der sozialen Amöbe *Dictyostelium discoideum*, die als eukaryotischer Modellorganismus für zahlreiche Gebiete der Grundlagenforschung dient, untersucht. *D. discoideum* exprimiert 13 Myosine, darunter eines der Klasse II. Anhand von Myosin-II *knock-out*-Zellen konnten De Lozanne und Spudich zeigen, daß es beim Aufbau des Zytoskeletts wichtige Aufgaben für die Aufrechterhaltung der Zellstruktur übernimmt, da bei diesen Zelllinien Zellteilung, Chemotaxis und die Entwicklung in Suspensionskultur stark beeinträchtigt sind [De Lozanne und Spudich, 1987]. *D. discoideum* besitzt weiterhin zwei unkonventionelle dimere Myosine (im Stammbaum gestrichelte Linien, MyoJ und MyoH), die bis vor kurzem der Klassen V (violett) bzw. der Klasse XI (hellgrün) zugeordnet wurden. In Klasse XI sind dimere Pflanzenmyosine gruppiert, die einen ähnlichen Aufbau wie Klasse V Myosine haben und am nächsten mit diesen verwandt sind. Nach neueren *multiple sequence alignments* von über 1700 Myosin-Motordomänen unter Zuhilfenahme bekannter

struktureller Motive wurde MyoH als Myosin-Va und das in dieser Arbeit untersuchte MyoJ als Myosin-Vb klassifiziert [Kollmar, 2006]. Ein schematischer Überblick zum Aufbau der Myosine verschiedener Klassen ist in Abbildung 1.2 gegeben.

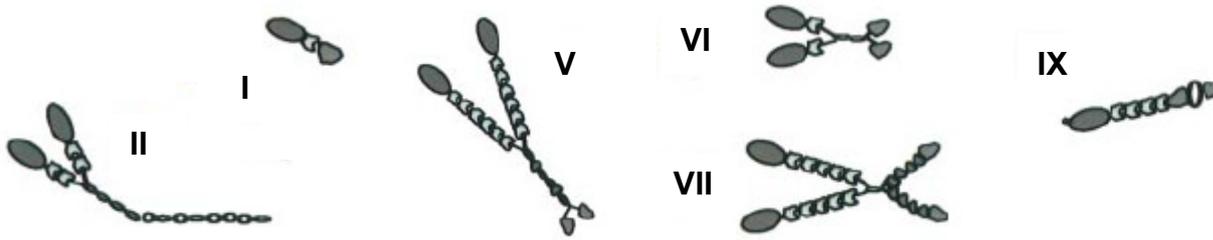


Abb. 1.2: Schematische Darstellung von einigen Myosinen der Klassen I, II, V, VI, VII und IX. Dargestellt sind die Motordomänen (grau), die Nackendomänen mit den daran gebundenen leichten Ketten (hellgrau) sowie superspiralisierte Dimerisierungsdomänen. Myosin-II bildet bipolare Filamente aus, Myosin-V -VI und -VII können als Dimere vorliegen, Myosin-I und -IX sind Monomere. Außer Myosin-II haben die Myosine aller gezeigten Klassen globuläre Bereiche in der Schwanzregion (überarbeitet nach [Mermall *et al.*, 1998]; weitere Erläuterungen im Text).

Die einzelnen Myosinklassen unterscheiden sich teilweise erheblich in ihren Schwanz- und Nackenregionen, wodurch die besonderen Funktionen der jeweiligen Myosinisoform in der Zelle definiert werden. Die Myosinklasse I (im Stammbaum rosa dargestellt) besteht aus einer Vielzahl von monomeren Myosinen, die eine konservierte Motordomäne, eine Nackendomäne mit Bindungsstellen für eine bis sechs leichte Ketten sowie eine kurze, basische Schwanzdomäne zur direkten Bindung an Membranen aufweisen. Diese Klasse läßt sich in vier Unterklassen aufteilen ($I\alpha$, $I\beta$, IC und $I\gamma$), wobei die Unterklasse IC , die auch ‚*amoeboid*‘ genannt wird, die Myosine mit längerem Schwanzbereich und einer SH3 Domäne enthält [Pollard *et al.*, 1991; Coluccio, 1997; Barylko *et al.*, 2000]. Im Gegensatz zu Myosin-II besitzen Klasse-I Myosine eine verkürzte N-terminale Domäne. Sie werden in vielen verschiedenen Organismen vom Einzeller bis zum Menschen gefunden und sind an Prozessen wie Organell- und Membrantransport, Endo- und Exocytose, Aufrechterhaltung der Zellstruktur sowie Signaltransduktion beteiligt [Soldati *et al.*, 1999]. Das erste unkonventionelle Myosin, das isoliert wurde, war Myosin-I aus der Amöbe *Acanthamoeba castellanii* [Pollard und Korn, 1973]. Sieben der 13 Myosine aus *D. discoideum* gehören zur Klasse I (Myosin-IA bis Myosin-IF und Myosin-IK). Dies spiegelt die wichtige Rolle von Klasse I Myosinen bei Prozessen der Membrandynamik und der Organisation des Zytoskeletts wieder. Eine Besonderheit der Klasse I Myosine aus *D. discoideum*, *S. cerevisiae* und *A. castellanii* ist ihre Regulation durch Phosphorylierung der Motordomäne (vgl. Kapitel 1.4.3.) [Brzeska und Korn, 1996; Yamashita und May, 1998; Grosshans *et al.*, 2006].

Die in den letzten Jahren neben Myosin II am intensivsten untersuchten Myosine sind die Mitglieder der Klasse V (im Stammbaum Abb. 1.1 violett). Ihre strukturelle, kinetische und funktionale Charakterisierung ist Gegenstand zahlreicher aktueller Forschungsprojekte, aus denen Erkenntnisse gewonnen werden, die das Verständnis der Funktionsweise aller Myosinklassen vertiefen. Klasse V Myosine sind dimere Myosine mit zwei identischen Motordomänen, Nackendomänen mit sechs (bei *D. discoideum* Myosin-Va sind es nur fünf) IQ Motiven, die als Bindungsstellen für Calmodulin dienen, sowie einer Schwanzdomäne mit superspiralisierten Bereichen, die der Dimerisierung dienen. Am carboxyterminalen Ende besitzen sie eine globuläre Domäne, die in Wirbeltierzellen mit Organellen wie Melanosomen und Endosomen interagiert. Dadurch ist Myosin-V in der Lage, diese Vesikel zu transportieren [Cheney und Mooseker, 1993; Wu *et al.*, 2002; Rodriguez und Cheney, 2002]. Diese Interaktion geschieht indirekt über die G-Proteine Rab11a und Rab27a oder

Melanophilin [Wu *et al.*, 2002; Hammer und Wu, 2002; Langford, 2002]. Mit Hilfe der Kristallstruktur der globulären Schwanzdomäne von Myosin-V aus Hefe wurden zwei konservierte Oberflächenbereiche als Bindungsdomänen für Vakuolen und sekretorische Vesikel identifiziert [Pashkova *et al.*, 2006].

Viele Mitglieder dieser Myosinklasse wie *G. gallus* Myosin-Va, *M. musculus* Myosin-Va und humanes Myosin-Vb haben die besondere Eigenschaft einer hohen Verweildauer (*duty-ratio*) am Aktinfilament im stark gebundenen Zustand, das heißt, die einzelnen Myosinköpfe befinden sich die längste Zeit des ATPase-Zyklus im stark aktinengebundenen Zustand [De La Cruz *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2006]. Für einige Vertreter dieser Klasse wie *G. gallus* Myosin-Va und *M. musculus* Myosin-V wurde gezeigt, daß sie sich in einem *hand-over-hand* Mechanismus für viele aufeinanderfolgende Schritte entlang eines Aktinfilamentes bewegen können, ohne von diesem zu dissoziieren [Mehta *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 2000; Veigel *et al.*, 2002; Yildiz *et al.*, 2003]. Diese Eigenschaft wird Prozessivität genannt (siehe Kapitel 1.4.2.); sie ermöglicht den effektiven Transport eines Vesikels über eine längere Distanz (μm) mit Hilfe eines einzelnen Myosin-V-Moleküls. Im Gegensatz dazu binden nichtprozessive Myosine wie Myosin-II aus dem Skelettmuskel an das Aktinfilament, führen einen Schritt aus und dissoziieren dann schnell.

Für einige Myosine der Klasse V wird aufgrund von experimentellen Befunden postuliert, daß sie in Folge einer niedrigen *duty ratio* zu keiner prozessiven Bewegung befähigt seien [Tóth *et al.*, 2005; Reck-Peterson *et al.*, 2001]. Diese Studien können Prozessivität für die untersuchten Klasse V Myosine aus *S. cerevisiae* allerdings nicht ausschließen. In Experimenten mit Chimären aus Motordomänen dieser putativ nichtprozessiven Myosine mit den Nacken- und Schwanzdomänen von prozessiven Myosinen konnte für die Chimären Prozessivität nachgewiesen werden [Krementsova *et al.*, 2006]. Daher stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, welche Parameter, sowohl kinetischer als auch struktureller Natur, maßgeblich für prozessives Verhalten von Myosinen sind.

D. discoideum exprimiert zwei Myosine der Klasse V: Myosin-Va und das in dieser Arbeit untersuchte Myosin-Vb. Bisher konnten innerhalb der Klasse V nur für Myosine aus Wirbeltieren die Voraussetzungen für Prozessivität nachgewiesen werden (Klasse V Myosine aus *G. gallus*, *M. musculus* und *H. sapiens*). Es gibt noch keine eindeutigen Hinweise auf Prozessivität von Klasse V Myosinen aus niederen Eukaryoten wie *S. cerevisiae* oder *D. discoideum*.

Myosine der Klasse VI werden in höheren Eukaryoten ubiquitär exprimiert und spielen dabei eine besondere Rolle bei vesikulärem Membrantransport, der Clathrin-vermittelten Endozytose, der Zellmigration und der Mitose [Sellers, 2000; Self *et al.*, 1999; Buss *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2004]. Im Gegensatz zu den meisten anderen Myosinen bewegen sich Mitglieder dieser Klasse entlang eines bipolaren Aktinfilamentes nicht in Richtung des (+)-Endes, sondern ‚rückwärts‘ in Richtung des (-)-Endes [Wells *et al.*, 1999] (vgl. Kapitel 1.4.4.).

Da Myosin-VI im Bereich der Schwanzdomäne Regionen enthält, die aufgrund der Sequenz superspiralisierte Strukturen ausbilden können, wird angenommen, daß es in der Zelle als Dimer vorliegt. Für die funktionale Charakterisierung von Myosin-VI wurde ein Konstrukt eingesetzt, bei dem die Dimerisierung durch Einführung eines Leucin-*zippers* stabilisiert wurde. Für diese Konstrukte wurde eine prozessive Bewegung entlang von Aktinfilamenten mit einer Schrittlänge von 30 nm nachgewiesen [Rock *et al.*, 2001; Nishikawa *et al.*, 2002]. Neuere Untersuchungen mit rekombinantem, nicht verkürztem Myosin-VI ohne artifizielle Dimerisierungsdomäne, die unter anderem auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen basieren, haben gezeigt, daß dieses als Monomer vorliegt [Lister *et al.*, 2004]. Durch Initiierung der Dimerisierung über die Bindung der Monomere an Aktin oder Antikörper wurde allerdings prozessives Verhalten als Dimer nachgewiesen [Park *et al.*, 2006]. Eine

neue, genauere Analyse der *in vivo* Funktion mit FRET-Messungen hat gezeigt, daß Myosin-VI in der Lage ist, je nach Aufgabe und Umgebung als Monomer oder – an endozytotischen Vesikeln – als prozessiver, dimerer Motor zu existieren [Altman *et al.*, 2007]. Kürzlich wurde für ein dimerisiertes, über einen Leucin-*zipper* stabilisiertes Myosin-VI ein besonderer kinetischer Mechanismus zur Koordinierung der zwei Myosinköpfe bei der prozessiven Bewegung beschrieben [Sweeney *et al.*, 2007]. Aufgrund der umgekehrten Bewegungsrichtung unterscheidet sich diese grundlegend von dem eines Myosin-V Dimers, weil hier nicht die Produktfreisetzung nach der Hydrolyse des ATP, sondern die Bindung des ATP an den Aktomyosinkomplex für beide Myosinköpfe unterschiedlich ist. Mechanistisch betrachtet ist die Bindung von ATP an den vorderen Kopf unmittelbar nach Freisetzung von ADP durch interne Spannung blockiert, während für Klasse V Myosine die ADP-Freisetzung durch einen nicht vollständig ausgeführten Kraftschlag blockiert ist. In *D. discoideum* existiert kein Klasse VI Myosin. Wenn es für eukaryotische Organismen vorteilhaft ist, einen für den rückwärts gerichteten Transport geeigneten Motor im Myosin-Repertoire zu haben, so kann vermutet werden, daß in *D. discoideum* ein anderes Myosin diese Aufgabe übernimmt.

Myosin-VII wurde in einer Reihe von Organismen wie *D. discoideum*, *Drosophila melanogaster* oder in Säugetieren gefunden und ist in Prozessen der Endozytose und Zelladhäsion involviert [Wang *et al.*, 2007; Tuxworth *et al.*, 2005; Tuxworth *et al.*, 2001; Mermall *et al.*, 1998]. Myosin-VII besitzt im Bereich der Nackendomäne fünf IQ Motive, an die leichte Ketten und/oder Calmodulin binden können. Im Schwanzbereich befinden sich Bereiche, die superspiralisiert sein können und somit eine Dimerisierung ermöglichen würden; dies konnte allerdings für ein endogenes Myosin-VII noch nicht gezeigt werden. Klasse VII Myosine aus *D. melanogaster* und *M. musculus* haben eine hohe *duty ratio*, sie befinden sich die längste Zeit des ATPase-Zyklus im stark aktungebundenen Zustand [Yang *et al.*, 2005; Henn und De La Cruz, 2005; Watanabe *et al.*, 2006]. Daher haben sie die Voraussetzung für prozessives Verhalten als Dimer, was für Myosin-VIIa aus *D. melanogaster*, bei dem die Dimerisierung mit Hilfe eines Leucin-*zipper*s stabilisiert wurde, bereits nachgewiesen wurde [Yang *et al.*, 2006]. Die kinetischen Voraussetzungen für die Prozessivität von Klasse-VII Myosinen sind ähnlich denen von Myosin-V: Sie besitzen eine hohe *duty-ratio*. Diese resultiert aus einer langsamen und geschwindigkeitsbestimmenden Freisetzung des Hydrolyseproduktes ADP. Darüber hinaus weisen Klasse-VII Myosine auch in Anwesenheit von ADP eine hohe Aktinaffinität auf.

Myosine der Klasse IX weisen in Struktur und Funktion viele bemerkenswerte Unterschiede zu den anderen bisher beschriebenen Myosinklassen auf. Myosin-IX wurde in Wirbeltieren und Wirbellosen nachgewiesen. Die am besten untersuchten Vertreter dieser Klasse sind *R. norvegicus* Myosin-IXb sowie humanes Myosin-IXa und -IXb [Behment *et al.*, 1994; Bähler, 2000; Nalavadi *et al.*, 2005]. Klasse IX Myosine sind monomer und tragen in ihrer Schwanzdomäne eine GAP (GTPase aktivierendes Protein) Domäne, die strukturell den G-Proteinen der *Rho* Familie ähnelt. Somit scheinen Myosine dieser Klasse nicht nur Transporter für Organellen oder andere Proteine zu sein, sondern bewegen sich auch zu Zellbereichen, in denen eine Herabregulierung *Rho*-abhängiger Signaltransduktionswege nötig ist [Bähler, 2000; Mermall *et al.*, 1998]. Strukturell auffällig ist ein erweiterter aminoterminaler Bereich sowie eine Erweiterung im Bereich der Aktinbindungsdomäne. Untersuchungen zum Mechanismus eines verkürzten, rekombinanten Myosin-IX Konstruktes haben Hinweise für prozessive Bewegung geliefert [Inoue *et al.*, 2002]. Da es sich jedoch um ein monomeres Myosin handelt, muß sich die Funktionsweise der prozessiven Bewegung grundsätzlich von der eines dimeren Klasse V Myosins unterscheiden. Kinetische Untersuchungen haben gezeigt, daß Myosin-IX eine niedrige ADP-Affinität aufweist und die ADP-Freisetzung, anders als bei Myosin-V, nicht geschwindigkeitsbestimmend ist [Nalavadi *et al.*, 2005]. Der Schritt der ATP-Hydrolyse oder einer nachfolgenden Isomerisierung ist

dagegen langsam und geschwindigkeitsbestimmend. Mechanistisch wurde vermutet, daß die große Erweiterung im Aktinbindungsbereich als eine Art Anker oder ‚Feder‘ dient, der die Motordomäne von Myosin-IXb bei der Diffusion zur nächsten Bindungsstelle am Aktinfilament hält und eine vollständige Dissoziation verhindert [Nishikawa *et al.*, 2006]. Dies konnte bisher nicht durch weitere Studien belegt werden. Es wurde außerdem gezeigt, daß sich dieses verkürzte, rekombinante Myosin-IX in Richtung des (-)-Endes entlang von Aktinfilamenten bewegt. Eine neuere Studie hingegen liefert Hinweise, daß sich endogenes Myosin-IXb, das die gesamte Schwanzregion mit der GAP Domäne enthält, in Richtung des (+)-Endes von Aktinfilamenten bewegt [O’Connell und Mooseker, 2003]. Aufgrund dieser unterschiedlichen Befunde ist nicht auszuschließen, daß die Schwanzdomäne eine regulatorische Funktion für die Bewegungsrichtung von Myosin-IX ausübt.

Eine systematische Untersuchung der funktionalen, kinetischen und strukturellen Eigenschaften der oben vorgestellten Myosinklassen hilft dabei, die funktionelle Vielfalt dieser Motoren trotz ihrer hohen strukturellen Konserviertheit zu verstehen.

1.3. Strukturelle Konserviertheit innerhalb der Myosinklassen

Die Primärsequenzen der Motordomänen von Myosinen weisen eine sehr hohe Varianz auf (vgl. [Foth *et al.*, 2006]). Trotz der sequentiellen Unterschiede sind alle bisher ermittelten dreidimensionalen Strukturen der Myosin-Motordomänen sehr ähnlich aufgebaut. Die Varianz in der Primärsequenz führt hauptsächlich zu Unterschieden im Bereich der nukleotidkoordinierenden und an der Aktinbindung beteiligten Regionen. Dadurch werden diese Molekülbereiche an die speziellen Aufgaben eines bestimmten Myosins angepaßt [Vale und Milligan, 2000]. So sind Unterschiede in einzelnen Aminosäuren, der Sequenz und Ausdehnung einiger Oberflächendomänen sowie Splicevarianten, ausreichend, um die große funktionale Vielfalt der Myosine zu ermöglichen.

Die erste Struktur eines Myosinmoleküls, die gelöst werden konnte, war die des S1-Fragmentes von Myosin II (Motordomäne mit Nackendomäne und zwei daran gebundene leichte Ketten) aus dem Skelettmuskel vom Huhn [Rayment *et al.*, 1993]. In den folgenden Jahren wurde die Kristallstruktur der Motordomäne von Myosin-II aus *D. discoideum* nukleotidfrei und als Nukleotidkomplexe aufgeklärt [Smith und Rayment, 1995; Gulick *et al.*, 1997; Bauer *et al.*, 1997; Reubold *et al.*, 2003]. Weiterhin wurden die Strukturen von konventionellem Myosin aus der Muschel und aus der glatten Muskulatur von Wirbeltieren gelöst [Dominguez *et al.*, 1998; Houdusse *et al.*, 1999; Houdusse *et al.*, 2000]. Mit der Struktur von *D. discoideum* Myosin-IE steht auch die atomare Struktur eines unkonventionellen Klasse I Myosins zur Verfügung [Kollmar *et al.*, 2002]. Die Struktur von *G. gallus* Myosin-Va wurde in nukleotidfreiem Zustand sowie im Komplex mit ADP-BeF_x und ADP gelöst, wobei für die Kristallisation des nukleotidfreien Zustandes ein Konstrukt verwendet wurde, das nicht nur die Motordomäne, sondern auch die Nackendomäne mit dem ersten IQ-Motiv und der daran gebundenen essentiellen leichten Kette umfaßt [Coureux *et al.*, 2003; Coureux *et al.*, 2004]. Auch die atomare Struktur von Myosin-VI im nukleotidfreien Zustand wurde aufgeklärt. Es wurde die Struktur der Motordomäne allein und die von Konstrukten mit einem oder beiden IQ-Motiven und daran gebundenem Calmodulin gelöst [Menetrey *et al.*, 2005]. Alle Motordomänen zeigen dabei einen prinzipiell ähnlichen Aufbau. Die Hauptunterschiede liegen einerseits in flexiblen Oberflächenschleifen, die in der Länge, Ladung und Aminosäurezusammensetzung variieren. Weitere Abweichungen gibt es in den Aktinbindungsdomänen, die eine unterschiedliche Größe der Schleifen sowie verschiedene Ladungen aufweisen können. Abbildung 1.3 zeigt in Anlehnung an das Thema dieser Arbeit

exemplarisch die Kristallstruktur der Motordomäne von *G. gallus* Myosin-Va im nukleotidfreien Zustand [Coureux *et al.*, 2003]. Die heute übliche Bezeichnung der einzelnen Domänen im Myosinkopf resultiert historisch aus dem tryptischen Verdau der Motordomäne von Myosin-II. Dieser erzeugt Proteinfragmente einer Größe von 25 kDa (N-Terminus, in der Struktur von Myosin-Va schwarz dargestellt), 20 kDa (C-Terminus bzw. Konverter, grün) und 50 kDa. Die 50 kDa Domäne ist dabei in eine obere 50 kDa Domäne (blau) und eine untere 50 kDa Domäne (weiß) separiert. Die Verbindungsstellen dieser Domänen wurden später anhand der Kristallstrukturen zwei flexiblen Oberflächenschleifen zugeordnet. Schleife-1 (rosa) befindet sich an der 25 kDa/50 kDa-Verbindung und Schleife-2 (blau) verbindet die 50 kDa Domäne mit dem 20 kDa Fragment (C-Terminus/ Konverter).

Die Myosin-Motordomäne weist eine hohe Homologie zu anderen Motorproteinen (Kinesine, Dyneine) und zu G-Proteinen auf. In allen Proteinen dieser Familien findet man einen zentralen siebenteiligen β -Faltblatt-Bereich. Die obere 50 kDa Domäne ist von der unteren 50 kDa Domäne durch einen langen Spalt separiert. Dieser erstreckt sich von den Aktinbindungsstellen (linke Seite; CM-Schleife, Schleife-2 und untere 50 kDa Domäne) bis zur Nukleotidbindungstasche. An den C-Terminus (Konverter, grün) schließt sich die α -helikale Bindungsdomäne für die leichten Ketten an (Hebelarm).

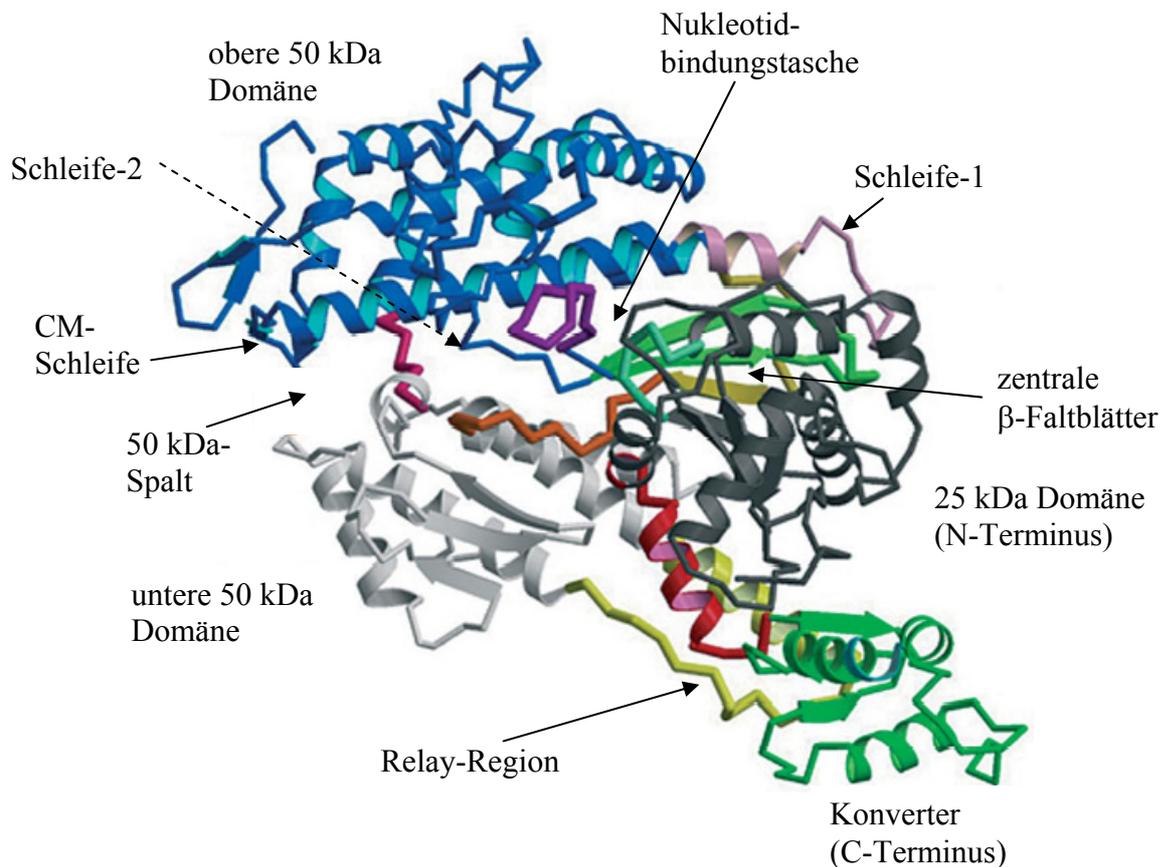


Abb 1.3.: Kristallstruktur der Motordomäne von *G. gallus* Myosin-Va im nukleotidfreien Zustand mit geschlossenem 50 kDa-Spalt [Coureux *et al.*, 2003]. N-Terminus (25 kDa Domäne) schwarz, obere 50 kDa Domäne: blau, untere 50 kDa Domäne: weiß, Relay-Region: gelb, C-Terminus (Konverter): grün. Im Bereich der Nukleotidbindungstasche befinden sich Schalter I (violett), Schalter II (orange) und die P-Schleife (türkis), die an der Bindung, Koordination und Hydrolyse von ATP beteiligt sind (aus [Sweeney und Houdusse, 2004]).

Die hier gezeigte nukleotidfreie Struktur von Myosin-Va wird als *rigor*-ähnlicher (*rigor-like*) Zustand bezeichnet, da vermutet wird, daß Myosine im aktin gebundenen Zustand eine solche

Konformation annehmen [Sweeney und Houdusse, 2004; Coureux *et al.*, 2003]. Eine Besonderheit dieser Konformation ist die geschlossene Spalte zwischen der oberen und unteren 50 kDa Domäne. Dadurch sind sich die Aktinbindungselemente einander örtlich näher und die Kontaktfläche zum Aktinfilament vergrößert sich. Einen ähnlichen Zustand mit leicht geschlossener Spalte konnten Reubold *et al.* in der nukleotidfreien *D. discoideum* Myosin-II Struktur beobachten [Reubold *et al.*, 2003]. Im Gegensatz zu diesen beiden Strukturen ist der 50 kDa-Spalt in allen anderen Myosinstrukturen weit geöffnet.

Zur besseren Übersicht und für die räumliche Vorstellung werden in den folgenden Kapiteln die Nukleotidbindungsstelle, die Aktinbindungsgebiete und der Konverter mit dem daran anschließenden Hebelarm näher beschrieben. Den Angaben der Positionen von Aminosäureresten wird die Sequenz von Myosin-II aus *D. discoideum* zugrunde gelegt, weil die Struktur der Motordomäne dieses Myosins bereits in vielen unterschiedlichen Konformationen gelöst wurde und sie deshalb zu den am besten charakterisierten Myosinstrukturen gehört [Smith und Rayment, 1995; Gulick *et al.*, 1997; Bauer *et al.*, 1997; Reubold *et al.*, 2003].

1.3.1. Nukleotid-Bindungsstelle

In Abbildung 1.4 ist die Struktur der Nukleotidbindungstasche von Myosin-II aus *D. discoideum* mit dem gebundenen ATP-Analogen $Mg^{2+}ADP.BeF_3$ gezeigt.

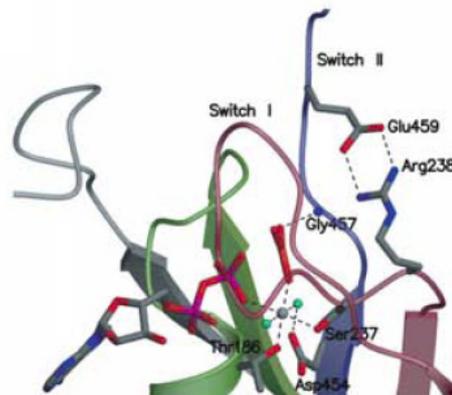


Abb. 1.4: Darstellung der Elemente der Nukleotidbindungstasche von *D. discoideum* Myosin-II mit gebundenem $Mg^{2+}ADP.BeF_3$. $ADP.BeF_3$ dient dabei als ATP-Analogen, BeF_3 nimmt die Position des γ -Phosphatrestes von ATP ein. Die P-Schleife ist in grün dargestellt und koordiniert das γ -Phosphat über Threonin 186 über das Mg^{2+} Ion (grau). Schalter I ist in violett dargestellt, Serin 237 koordiniert über das Mg^{2+} Ion das γ -Phosphat. Arginin 238 bildet mit Glutamat 459 von Schalter II eine Salzbrücke aus. Schalter II (blau) bildet eine Wasserstoffbrücke zum γ -Phosphat aus. Die dargestellte Konformation wird als geschlossen/geschlossen (*closed/closed*, C/C) bezeichnet, da beide Schalterelemente in Kontakt mit dem Nukleotid stehen (aus: [Reubold *et al.*, 2003]).

Die Nukleotidbindungstasche enthält eine charakteristische P-Schleife (grün), wie sie auch in G-Proteinen und anderen ATPasen zu finden ist. Diese hochkonservierte P-Schleife hat die Konsensus-Sequenz GESGAGKT (an Position 5 kann in einzelnen Fällen ein Serin das Alanin ersetzen) und ist in Kontakt mit dem γ -Phosphat des gebundenen ATP. An der Bindung des Nukleotids sind zusätzlich zwei konservierte Schleifenbereiche beteiligt, die in Analogie zu G-Proteinen Schalter I und Schalter II genannt werden (s. Abbildung 1.4). Schalter I enthält eine konservierte Sequenz SSR (Aminosäuren 236 bis 238 der Sequenz von Myosin II aus *D. discoideum*). Die Serine (Serin 236 und Serin 237) können mit dem

γ -Phosphat bzw. Mg^{2+} wechselwirken [Shimada *et al.*, 1997; Reubold *et al.*, 2003]. Zwischen Arginin 238 und Glutamat 459 von Schalter II entsteht bei Annäherung der Schleifen eine Salzbrücke [Ruppel und Spudich, 1996; Onishi *et al.*, 1998; Furch *et al.*, 1999; Risal *et al.*, 2004]. Diese Salzbrücke stabilisiert die katalytisch aktive Konformation der Nukleotidbindungstasche. In Schalter II findet man weiterhin ein konserviertes Glycin (G457), das eine Wasserstoffbrücke zum γ -Phosphat ausbilden kann.

Beide Schleifen können sich von der Nukleotidbindungsstelle wegbewegen (offene Konformation; auch *open* genannt und als O gekennzeichnet), wodurch die Wechselwirkungen je nach Zustand im ATPase-Zyklus moduliert werden. Für die Hydrolyse müssen sich sowohl Schalter I als auch Schalter II in Kontakt mit ATP befinden (Konformation C/C, als Abkürzung für *closed/closed* bzw. geschlossen/geschlossen). Neben den bereits erwähnten Stabilisierungen befindet sich Glutamat 459 der Salzbrücke in einer Position, in der es ein Wassermolekül für den nukleophilen Angriff auf das γ -Phosphor-Atom polarisieren kann. In der C/C Konformation wird dadurch der Übergangszustand eines pentakovalenten γ -Phosphats begünstigt (vgl. Kapitel 1.4.1.).

1.3.2. Oberflächenschleifen und Aktinbindungsstellen

Die Anpassung der enzymatischen Aktivität verschiedener Myosin-Motordomänen an ihre speziellen Aufgaben innerhalb der Zelle geschieht außer über Phosphorylierungen und einzelne Aminosäureveränderungen in konservierten Bereichen der Domänen desweiteren auch über die Modulation der Sequenz, Länge und Struktur von zwei Oberflächenschleifen (Schleife-1 und Schleife-2) [Murphy und Spudich, 2000]. Die Schleife-1 und Schleife-2 Oberflächensegmente bilden die proteolytisch zugänglichen Verbindungen zwischen dem 25 kDa, 50 kDa und 20 kDa Fragment. Schleife-1 befindet sich in der Nähe der Nukleotidbindungstasche. Kinetische Experimente und funktionale Assays weisen darauf hin, daß Schleife-1 die ADP-Freisetzung und die Motoraktivität reguliert [Spudich, 1994; Sweeney *et al.*, 1998; Kurzawa-Goertz *et al.*, 1998]. Schleife-2 liegt im Bereich der primären Aktinbindungsstelle. Durch Mutationsstudien wurde gezeigt, daß eine elektrostatische Interaktion zwischen positiv geladenen Lysin- und Argininresten in Schleife-2 und negativ geladenen Resten im aminoterminalen Bereich von Aktin die primäre, schwache Bindung von Myosin an Aktin darstellt [Sutoh *et al.*, 1991, Uyeda *et al.*, 1994; Furch *et al.*, 1998].

Die zweite Kontaktregion von Myosin zu Aktin liegt im Bereich einer Helix-Schleife-Helix Struktur in der unteren 50 kDa Domäne. In *D. discoideum* Myosin-II entspricht dies den Aminosäuren Serin 510 bis Lysin 546. Es konnte gezeigt werden, daß die Einführung einer einzigen negativen Ladung an Position 532 (Mutation Q532E) zu einer fünffach höheren Aktin-Affinität führt [Furch *et al.*, 2000]. Außer der Wechselwirkung der negativ geladenen Aminosäuren im Schleifenbereich (Aspartat 530 und Glutamat 531) wird die zweite Kontaktstelle auch über den stereospezifischen Kontakt exponierter hydrophober Seitenketten auf den Oberflächen von Aktin und Myosin stabilisiert. Die dritte Kontaktstelle der primären Aktinbindungsgebiete von Myosin liegt in der sogenannten CM-Schleife. Die Mutation eines konservierten Arginins in dieser Oberflächenschleife löst beim Menschen die Krankheit „Familiäre hypertrophe Kardiomyopathie“ (*cardiomyopathy*; CM) aus. Weitere, in den Aktinbindungsregionen befindliche Mutationen sind für weitere Formen der Kardiomyopathie verantwortlich. Es bestehen Hinweise, daß bei der Bindung von Aktin die Aminosäuren Glutamat 395 bis Leucin 409 der CM-Schleife mit zwei Prolinresten an der Oberfläche von Aktin (P332 und P333) interagieren.

Die sekundäre Aktinbindungsstelle liegt im Bereich von Schleife-3, die sich im unteren Bereich der unteren 50 kDa Domäne befindet. Positiv geladene Aminosäuren in dieser Region bauen elektrostatische Wechselwirkungen zu einem zweiten, benachbarten F-Aktin Monomer auf [Van Dijk *et al.*, 1999].

1.3.3. Konverter und Hebelarm

Mit der Bewegung von Schalter I und Schalter II während der Nukleotidbindung und der anschließenden Hydrolyse gehen Veränderungen an der Aktin-Bindungsstelle einher. Darüber hinaus ist Schalter II direkt über die sich anschließende Helix und die sogenannte Relay-Region mit dem Konverter verbunden. Die Relay-Region hat ihren Namen aufgrund ihrer Funktion als zentrales Element zur Weiterleitung von konformationeller Information von den Aktin- und Nukleotidbindungselementen zum Konverter hin bekommen.

Der Übergang von Schalter II aus der offenen in die geschlossene Konformation wird durch die Bewegung von festen Elementen der Sekundär- und Tertiärstruktur hervorgerufen (untere und obere 50 kDa Domäne). In Folge dessen wird die Schalter II Helix abgeknickt, so daß sich ihr Ende, das Teil der Relay-Region ist, um 60° dreht. Über starke hydrophobe Wechselwirkungen wird die Rotation auf den Konverter übertragen und von dort weiter an den Hebelarm geleitet [Dominguez *et al.*, 1998; Tsiavaliaris *et al.*, 2002]. Der Großteil der Bewegung ist nur am Hebelarm zu beobachten. Kleine Bewegungen im restlichen Teil der Kopfdomäne, insbesondere am katalytischen Zentrum, werden also durch den Konverter verstärkt. Die eigentliche Länge des Kraftschlages korreliert demnach mit der Länge des Hebelarms. Experimentell konnte dies durch Verlängerung der Nackenregion mittels zusätzlichen IQ-Motiven und künstliche Hebelarme mit variierender Länge gezeigt werden [Anson *et al.*, 1996; Uyeda *et al.*, 1996; Ruff *et al.*, 2001; Purcell *et al.*, 2002].

Die Fähigkeit von Myosin, aus der Energie der ATP Hydrolyse Bewegung entlang von Aktinfilamenten zu erzeugen, wird in einem Modell beschrieben, das als Hypothese vom schwingenden Hebelarm (*swinging-lever-arm-hypothesis*) bezeichnet wird [Holmes und Geeves, 1999; Houdusse und Sweeney, 2001]. Der vorgeschlagene Mechanismus beinhaltet, daß Nukleotidbindung, Hydrolyse und Produktfreisetzung mit kleinen Bewegungen innerhalb der Myosin-Motordomäne gekoppelt sind. Diese strukturellen Veränderungen werden amplifiziert und über die Konverter-Region auf den Hebelarm übertragen. Der Hebelarm verstärkt die Bewegung des Konverters in eine gerichtete Bewegung entlang des Aktinfilamentes [Dominguez *et al.*, 1998; Houdusse *et al.*, 1999]. Mit der Hilfe von optischen Laserfallen kann die Bewegung des Hebelarmes und die dabei ausgeübte Kraft verschiedener Myosine direkt gemessen werden [Cornish und Ha, 2007; Sleep *et al.*, 2005].

Strukturelle Belege für die Hebelarm-Hypothese stammen unter anderem aus der Lösung der Kristallstruktur von *D. discoideum* Myosin-II mit einem künstlichen Hebelarm (s. Abbildung 1.5 [Kliche *et al.*, 2001]). Bei diesem Konstrukt, das mit Methoden des *Protein-Engineerings* entworfen wurde, ersetzt ein künstlicher Hebelarm bestehend aus zwei α -Aktinin-Molekülen den natürlichen α -helikalen Hebelarm [Anson *et al.*, 1996]. Die Länge des künstlichen Hebelarmes beträgt 14 nm, er ist damit fast eineinhalbmal so lang wie der natürliche (7,5 nm). Durch den Einsatz von ein bis sechs α -Aktinin- oder Spektrin-Molekülen können Hebelarme verschiedener Länge mit der Motordomäne beliebiger Myosine verknüpft werden. Dies ermöglicht die Untersuchung der funktionalen Eigenschaften von Myosinen, die nicht nativ mit ihrem natürlichen Hebelarm exprimiert werden können. Erst durch Koexpression der leichten Ketten sind Untersuchungen zur Motoraktivität und Kraftentfaltung durchführbar. Eine Koexpression der leichten Ketten ist jedoch meist nicht möglich, da diese oft nicht

bekannt sind [Hachikubo *et al.*, 2007; Dürrwang *et al.*, 2005; Fujita-Becker *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2003; Ruff *et al.*, 2001]. In dieser Arbeit wurden in Anlehnung an die Kristallstruktur der Motordomäne von *D. discoideum* Myosin-II mit künstlichem Hebelarm ebenfalls Konstrukte mit künstlichen Hebelarmen eingesetzt (s. Abbildung 1.5).



Abb. 1.5: Kristallstruktur der Motordomäne von *D. discoideum* Myosin-II mit einem künstlichen Hebelarm aus zwei α -Aktinin-Molekülen. Der N-Terminus von Myosin-II ist in grün gezeigt, die 50 kDa Domäne in rot, der Converter in blau. An den Converter schließt sich ein Übergang aus drei Aminosäuren an (orange), auf den der künstliche Hebelarm folgt (gelb). Dieser besteht aus zwei aufeinanderfolgenden α -Aktinin-Molekülen, wobei jedes aus drei gebündelten α -Helices aufgebaut ist. Am C-Terminus befindet sich ein His-tag (grau). Der Übergang zwischen den zwei α -Aktinin-Molekülen ist mit einem Pfeil gekennzeichnet (aus [Kliche *et al.*, 2001]).

Dadurch ist es möglich, für die entsprechenden Myosine die Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten zu messen. Weiterhin können mit Hilfe künstlicher Hebelarme Kraftmessungen und Einzelmolekülmessungen durchgeführt werden. Auch eine direkte Bestimmung der Direktionalität unterschiedlichster Myosine wird durch künstliche Hebelarme ermöglicht. Für die Konstruktion dieser Myosine ist es notwendig, einen α -helikalen Übergang zwischen dem Converter und dem ersten α -Aktinin zu erzeugen. Der Hebelarm muß fest mit dem Converter verbunden aber auch in der Lage sein frei zu schwingen, ohne sterisch gehindert zu werden. Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse gelang es sogar, mit Hilfe von Strukturmodellen einen künstlichen, rückwärtslaufenden Motor zu konstruieren [Tsiavaliaris *et al.*, 2004].

1.4. Struktur-Funktionsbeziehungen der Aktomyosin Interaktion

Die Kenntnis der atomaren Struktur verschiedener Myosine in unterschiedlichen Zuständen gibt einen Einblick in die molekularen Vorgänge der Bewegungserzeugung. Allerdings geben die einzelnen Strukturen immer nur Momentaufnahmen eines thermodynamisch stabilen Zustandes innerhalb des ATPase-Zyklus wieder. Durch die Verknüpfung von strukturellen Daten mit umfassenden Informationen aus kinetischen Experimenten ist es möglich, ein

detailliertes Verständnis der Struktur-Funktionsbeziehungen verschiedener Myosine zu gewinnen.

1.4.1. Molekularer Mechanismus des ATPase-Zyklus

Das heutige Verständnis der mechanochemischen Vorgänge während des Akto-Myosin ATPase-Zyklus beruht in erster Linie auf biochemischen, biophysikalischen und strukturellen Erkenntnissen von Untersuchungen an Myosin-II, Myosin-I, Myosin-V und Myosin-VI [Geeves *et al.*, 2005; Holmes *et al.*, 2004; Sweeney und Houdusse, 2004].

Die folgende Beschreibung des ATPase-Zyklus, wie er auch in Abbildung 1.6 gezeigt ist, stellt ein minimales Modell der Aktomyosin-Interaktion dar. Jeder der dargestellten Schritte läßt sich in Teilschritte unterteilen, die weiteren Konformationsänderungen zuzuordnen sind. Die kinetischen Parameter der Teilschritte und die damit verbundenen konformationellen Änderungen sind noch nicht vollständig beschrieben. Aufgrund unterschiedlicher Anforderungen an die Wirkungsweise der Motordomäne bei prozessiven Myosinen, Myosinen mit Ankerfunktion bzw. schnell oder langsam arbeitenden, nicht prozessiven Myosinen können sich die Mechanismen der Zwischenschritte unterscheiden.

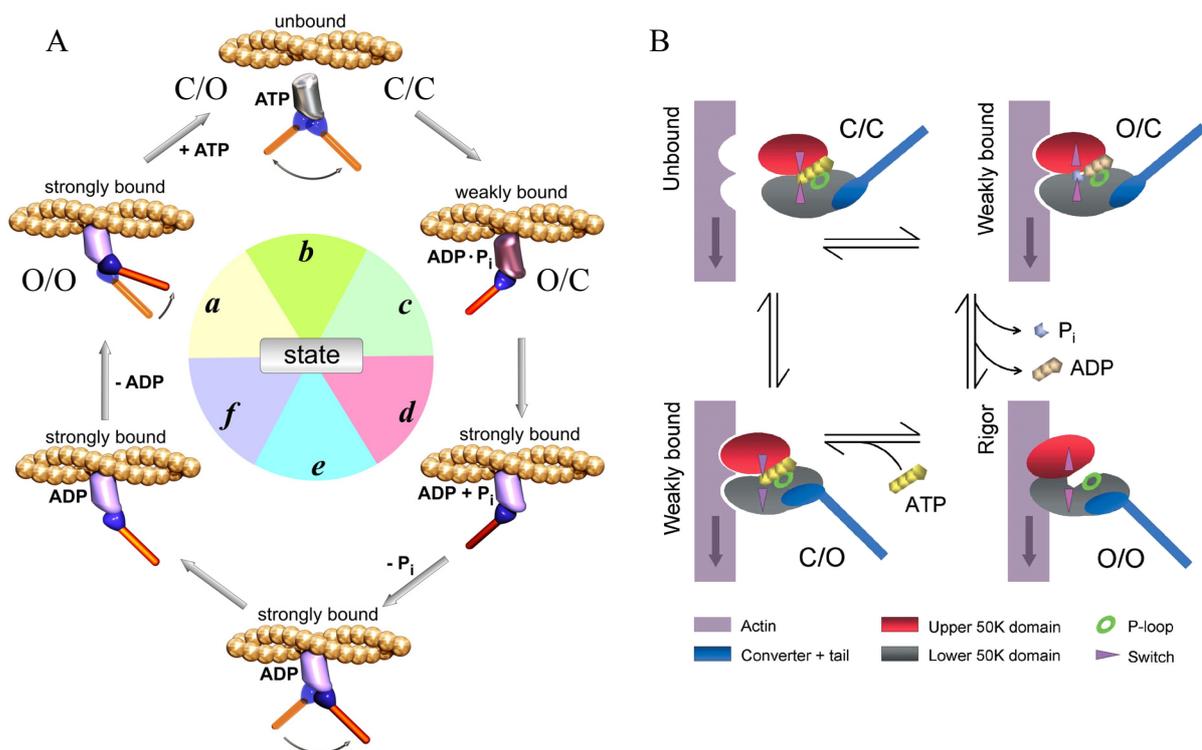


Abb. 1.6: (A) Schematische Darstellung des ATPase-Zyklus von Aktomyosin. ATP bindet an den *rigor*-Komplex (a). Dadurch dissoziiert Myosin und der Hebelarm schwingt zurück (b). Nach der Hydrolyse des ATP bindet Myosin in einem zweistufigen Prozeß erst schwach, dann stark an Aktin (c, d). Durch die Bindung wird die Dissoziation des P_i induziert, was zum Kraftschlag führt (e). Die Dissoziation von ADP (f) führt zu einer zusätzlichen Hebelarmbewegung, wodurch der *rigor* Komplex wieder hergestellt wird [Geeves *et al.*, 2005]. (B) Schematische Darstellung der Konformation der Schalter I und Schalter II Elemente innerhalb der Nukleotidbindungstasche [Reubold *et al.*, 2003]. Die Konformationen werden entsprechend der Position der Schalterelemente bezeichnet, wobei C/C (*closed/closed*, geschlossen/geschlossen) bedeutet, daß beide Schalterelemente in Kontakt mit dem Nukleotid stehen, während sie in der O/O Konformation (*open/open*, offen/offen) die geöffnete Konformation der Nukleotidbindungstasche darstellen.

Aus neueren strukturellen und kinetischen Erkenntnissen [Conibear *et al.*, 2003; Reubold *et al.*, 2003; Coureux *et al.*, 2003; Coureux *et al.*, 2004; Holmes *et al.*, 2004] kann folgender vereinfachter molekularer Mechanismus aufgestellt werden, der die wesentlichen einzelnen Zustände der Motordomäne während der zyklischen Interaktion mit Nukleotiden und Aktin beschreibt. Im stark Aktin bindenden sogenannten *rigor*-Zustand ist die Nukleotidbindungstasche der Myosin-Motordomäne nicht besetzt (Abbildung 1.6 A, „state a“). Die Schleifen im katalytischen Zentrum, Schleife I und Schleife II, befinden sich in der offen/offen (*open/open*, O/O) Konformation (s. Abbildung 1.6 B).

Durch die schnelle Bindung von Mg^{2+} -ATP über Interaktion mit der P-Schleife schließt sich Schalter I. Dieser Schritt ist aufgrund der hohen physiologischen Konzentration von ATP im millimolaren Bereich praktisch irreversibel. Das Schließen von Schalter I stabilisiert einerseits die Koordination des Nukleotids durch Wechselwirkungen von Mg^{2+} mit Serin 237, andererseits über die Koordination des γ -Phosphates durch Serin 236. Darüber hinaus wird die Salzbrücke zwischen Arginin 238 und Glutamat 459 gebrochen. Diese von ATP ausgelösten konformationellen Änderungen an der Nukleotidbindungsstelle bewirken eine Umordnung der zentralen β -Faltblätter, wodurch sich Schalter II geringfügig, aber ohne Bewegung des Konverters schließt (geschlossen/offen Konformation, *closed/open*, C/O). Als Folge dessen wird die Spalte zwischen oberer und unterer 50 kDa Domäne um bis zu 20 Å geöffnet, wodurch die primären Aktinbindungsstellen separiert werden [Coureux *et al.*, 2003; Reubold *et al.*, 2003]. Dies halbiert die Kontaktfläche zwischen Myosin und Aktin und reduziert die Aktin-Affinität im *near-rigor* Zustand (C/O) um den Faktor 10.000 [Conibear *et al.*, 2003]. Aufgrund der dadurch erfolgten Dissoziation des Myosinkopfes vom Aktinfilament schließt sich auch Schalter II (C/C-Konformation, katalytisch aktive Konformation für die ATP-Hydrolyse), wodurch der Hebelarm durch den sogenannten „*recovery stroke*“ wieder in die Position vor dem Kraftschlag zurückschwingt (*pre-powerstroke* Konformation, Abbildung 1.6 A, „state b“). In diesem Übergangszustand wird die Salzbrücke wieder ausgebildet. Das γ -Phosphat des gebundenen ATP wird über Serin 236 in Schalter II, über das Mg^{2+} -Ion, das durch Serin 237 koordiniert wird sowie durch Glycin 457 in Schalter I in den Übergangszustand gebracht.

Dadurch wird die Hydrolyse des ATP katalysiert. Das nun vorliegende Myosin.ADP.P_i hat eine höhere Affinität zu Aktin und bindet zunächst schwach, dann stark, wodurch sich Schalter I in die offene Konformation bewegt (O/C Konformation, siehe Abbildung 1.6 A „state c und d“). Dies führt zur Zerstörung der Salzbrücke und zur Dissoziation des anorganischen Phosphates. Dadurch ist die Wasserstoffbrückenbindung von Glycin 457 in Schalter II nicht mehr vorhanden, wodurch sich Schalter II in die offene Konfiguration bewegt, was zum als ‚Kraftschlag‘ bezeichneten Umklappen des Hebelarmes führt (Abbildung 1.6 A, „state e“). Durch die anschließende Dissoziation des noch schwach gebundenen Mg^{2+} -ADP, was mit einer zusätzlichen Bewegung des Hebelarms verbunden ist (Abbildung 1.6 A, „state f“), liegt das Myosin wieder im nukleotidfreien *rigor* Zustand (O/O) vor.

Obwohl dieses Modell den grundlegenden ATPase-Mechanismus für alle Myosine beschreibt, gibt es doch einige wichtige Unterschiede, die aus der Anpassung verschiedener Myosine an bestimmte Aufgaben und Funktionen resultieren. Bei nichtprozessiven Klasse II Myosinen ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt innerhalb des Zyklus die Dissoziation des anorganischen Phosphates. Die anschließenden Schritte der ADP-Dissoziation und der erneuten ATP-Bindung, die zur Dissoziation vom Aktinfilament führt, werden sehr schnell durchlaufen. Das liegt daran, daß durch die Aktinbindung eine effektive Schwächung der Nukleotidbindung hervorgerufen wird. Man spricht dabei von der Kopplung zwischen Aktin- und Nukleotidbindungsstelle, die für nichtprozessive und schnelle Myosine (z.B. Myosin-II im Muskel) sehr groß ist. Im Gegensatz dazu haben prozessive Myosine eine sehr geringe Kopplung. Die Phosphatfreisetzung geschieht bei prozessiven Myosinen sehr schnell und ist

nicht geschwindigkeitsbestimmend. Durch die schwache Kopplung wird die ADP-Freisetzung jedoch durch Aktin nicht sehr effektiv beschleunigt, wodurch das ADP lange gebunden bleibt. Dadurch wird die ADP-Freisetzung zum langsamsten Schritt innerhalb des ATPase-Zyklus von prozessivem Myosin-V und damit geschwindigkeitsbestimmend.

1.4.2. Mechanismus der Prozessivität von Myosin-V

Die detaillierte Aufklärung der molekularen und kinetischen Grundlagen für die prozessive Bewegung von Klasse V Myosinen würde ein umfassendes Verständnis der Funktionsweise dieser Myosine ermöglichen und ist deshalb Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten und der vorliegenden Arbeit.

Entsprechend ihres Mechanismus können Myosine funktionell in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden; diese umfassen Myosine mit Ankerfunktion, spannungssensitive Myosine, Myosine, die für eine schnelle oder langsame Bewegung optimiert sind, Myosine mit Schalterfunktion als Bestandteil von Signaltransduktionswegen sowie prozessive Myosine, die als einzelnes Molekül den effektiven Transport von Vesikeln über längere Distanzen ermöglichen [Altman *et al.*, 2004; Cremona und Geeves, 1998; Nyitrai und Geeves, 2004]. Trotz der umfangreichen Studien über prozessives Myosin-V existiert bis heute noch kein allgemein akzeptiertes Modell, mit dem alle Aspekte der Prozessivität erklärt werden könnten. Vor allem ist umstritten, welche minimalen Voraussetzungen ein Myosin auf struktureller und kinetischer Ebene erfüllen muß, um prozessiv zu sein. Der kinetische Aspekt dieser Fragestellung wird in der vorliegenden Arbeit untersucht. In diesem Kapitel wird deshalb der Mechanismus der Prozessivität von Myosin-V diskutiert, wie er in den gängigen Modellen vorgeschlagen wird.

Prozessive doppelköpfige Myosine wie Myosin-V binden mit beiden Köpfen an ein Aktinfilament und führen mehrere aufeinanderfolgende Schritte aus, ohne zu dissoziieren [Mehta *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 2000]. Dabei bleibt ein Kopf immer an das F-Aktin Filament gebunden, während sich der zweite in einem 36 nm Schritt (eine Drehung des Aktinfilamentes) nach einem *hand-over-hand* Mechanismus zur nächsten Bindungsstelle weiterbewegt [Yildiz *et al.*, 2003; Warshaw *et al.*, 2005]. Für die Beschreibung dieses Prozesses existieren verschiedene Modelle, die kontrovers diskutiert werden. Nach Veigel *et al.* setzt sich dieser Schritt aus einem Kraftschlag von 25 nm mit anschließender Diffusion um weitere 11 nm entlang des Aktinfilamentes zusammen [Veigel *et al.*, 2002]. Dadurch könnte die Diskrepanz zwischen der Länge eines Kraftschlages (25 nm) und der Schrittlänge von Myosin-V (36 nm) erklärt werden. Allerdings ist bisher nicht eindeutig geklärt, ob die Länge des Kraftschlages tatsächlich nur 25 nm beträgt oder ob die Ungenauigkeit der Messung zu einer Unterschätzung der Länge des Kraftschlages führt [Brenner, 2006; Sleep *et al.*, 2005; Molloy *et al.*, 1995]. Neuere Publikationen weisen der Diffusion eine weitaus größere Rolle bei der prozessiven Bewegung zu [Shiroguchi und Kinosita, 2007; Okada *et al.*, 2007].

Eine notwendige Voraussetzung für die prozessive Bewegung eines dimeren Myosin-V ist ein ausreichend langer Hebelarm, der in der Lage ist, 35 nm lange Schrittweiten zu vollführen [Purcell *et al.*, 2002]. Damit jedoch weiterhin eine effiziente und gerichtete Bewegung entlang des Aktinfilamentes gewährleistet wird, ist es notwendig, daß die zwei identischen Myosinköpfe ihre Bewegungen koordinieren. Dies wird bei Myosin-V dadurch erreicht, daß intramolekulare Spannung dazu führt, daß der vordere Myosinkopf so lange am Aktin gebunden bleibt, bis sich der hintere Kopf zur nächsten Bindungsstelle am Aktinfilament bewegt hat (s. Abbildung 1.7) [Purcell *et al.*, 2005; Veigel *et al.*, 2005].

Dieser synchronisierende Effekt auf den chemo-mechanischen Zyklus der zwei Köpfe erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß der hintere Myosinkopf zuerst dissoziiert und erhöht gegenüber einem System ohne Spannungssensitivität die Anzahl an prozessiven Schritten vor der Dissoziation des gesamten Moleküls.

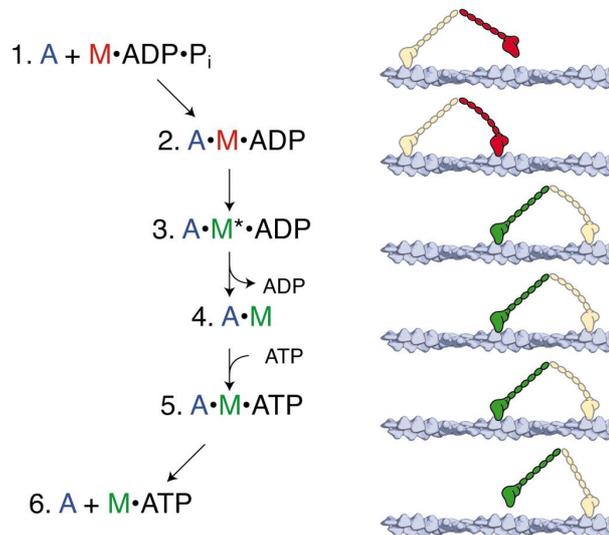


Abb. 1.7: Intramolekulare Spannung koordiniert die Bewegung der zwei Myosinköpfe von prozessivem Myosin-V. 1. Der vordere Myosinkopf befindet sich in der Konformation vor dem Kraftschlag (rot) und hat ADP und P_i gebunden. 2. Bei der Bindung an das Aktinfilament wird P_i abgegeben und der Kraftschlag wird ausgeführt, sobald der hintere Kopf vom Aktinfilament dissoziiert. 3. Dadurch wird der hintere Myosinkopf nach vorne geschwungen. Der gebundene Kopf befindet sich nun in der Konformation nach dem Kraftschlag (grün). 4. Dadurch kann er ADP freisetzen und 5. anschließend ein neues ATP Molekül binden. 6. Das führt zur Dissoziation des Kopfes vom Aktinfilament und auch dieser Myosinkopf kann durch den Kraftschlag des vorderen Kopfes zur nächsten Aktinbindungsstelle geschwungen werden. Intramolekulare Spannung trägt dazu bei, daß der Myosinkopf, der einer rückwärtsgerichteten Kraft ausgesetzt ist (rot), ADP langsam freisetzt, während der hintere Kopf, der vorwärtsgerichteter Kraft ausgesetzt ist (grün), das ADP schneller dissoziiert (aus [Purcell *et al.*, 2005]).

Eine mögliche Erklärung für den Einfluß intramolekularer Spannung auf die Koordinierung der Produktfreisetzung der zwei Myosinköpfe wird im folgenden Modell basierend auf den Arbeiten von Rosenfeld *et al.* gegeben. Hierzu wurde die Freisetzung der Hydrolyseprodukte mit Hilfe von kinetischen Methoden untersucht [Rosenfeld *et al.*, 2005]. Es konnten experimentelle Hinweise geliefert werden, daß die Produktfreisetzung von *G. gallus* Myosin-Va in der Reihenfolge Phosphat – Magnesiumion – ADP geschieht. Da die Geschwindigkeit der ADP-Freisetzung von der Konzentration an freiem Magnesium abhängig ist, wird postuliert, daß die innere Spannung des Dimers sich auf die Magnesium-Affinität auswirkt: Der hintere Myosinkopf des Dimers, der vorwärtsgerichteter intramolekularer Spannung ausgesetzt ist, setzt das Magnesiumion schnell frei, wodurch auch ADP schnell dissoziieren kann. Im vorderen Myosinkopf sorgt rückwärtsgerichtete intramolekulare Spannung dafür, daß das Magnesiumion stark gebunden bleibt und dadurch auch die Dissoziation des ADP verlangsamt wird.

Mit Hilfe der atomaren Struktur der Motordomäne von Myosin-V sowie der transientenkinetischen Untersuchung des Effektes von Magnesiumionen auf die Produktfreisetzung konnte ein Modell für die Korrelation von strukturellen und kinetischen Zuständen entwickelt werden, das im Folgenden beschrieben wird:

Die Kristallstruktur von *G. gallus* Myosin-Va wurde in Anwesenheit von einem ATP-Analog bzw. ADP sowie in Abwesenheit von Nukleotid gelöst [Coureux *et al.*, 2003; Coureux *et al.*, 2004]. Zwischen diesen Zuständen muß es eine Vielzahl von Übergangsstrukturen geben.

Diese sind im ATPase-Zyklus nach dem Hydrolyseschritt einzuordnen und enthalten in der Nukleotidbindungstasche ADP, Mg^{2+} und/oder Phosphat. Diese Zustände lassen sich auch transientenkinetisch beschreiben, da sie nach dem Hydrolyseschritt durch eine zunehmend höhere Aktin-Affinität und eine zunehmend niedrigere Nukleotid-Affinität gekennzeichnet sind:



Die verschiedenen Zustände sind durch ihre relative Aktin-Affinität charakterisiert, wie dies durch die tiefgestellten Bezeichnungen gekennzeichnet wird (*weak* = schwachgebunden, *intermediate* = mit mittlerer Affinität gebunden, *strong* = stark gebunden, *rigor* = sehr stark gebunden) [Rosenfeld und Sweeney, 2004]. Auch der Inhalt der Nukleotidbindungstasche ändert sich im Verlauf des Überganges vom schwachgebundenen zum sehr stark gebundenen Zustand: Direkt nach der ATP Hydrolyse enthält sie ADP, Mg^{2+} und Phosphat, während die Bindungstasche im *rigor state* leer ist. Es konnte kinetisch gezeigt werden, daß die Produktfreisetzung sukzessive in der Reihenfolge Phosphat – Magnesiumion – ADP stattfindet [Rosenfeld *et al.*, 2005]. Dadurch ist jeder der oben gezeigten Zustände auch über den Inhalt der Nukleotidbindungstasche definiert: ADP, Magnesiumion und Phosphat im ersten; ADP und Magnesiumion im zweiten; nur ADP im dritten. Auch röntgenkristallographische Erkenntnisse liefern Einblicke in diesen Mechanismus, da die Struktur von Myosin-V mit schwach gebundenem ADP aber ohne Magnesiumion im katalytischen Zentrum gelöst wurde [Coureux *et al.*, 2004].

Das folgende Reaktionsschema zeigt die möglichen Wege der Produktfreisetzung nach der Phosphatabgabe:

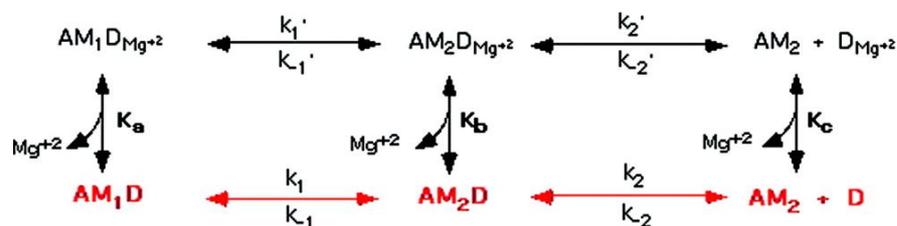


Abb. 1.8: Reaktionsschema der Produktfreisetzung von Akto.Myosin-V nach der Phosphatdissoziation. Der obere Weg (schwarz) zeigt den Reaktionsverlauf, der zu einer gleichzeitigen Abgabe von ADP und Mg^{2+} führt. Der untere Weg (rot) wird erreicht, wenn das Magnesiumion zuerst dissoziiert und danach ADP als kationenfremde Spezies freigesetzt wird. M_1 und M_2 steht für verschiedene Konformationen der Myosin-V-Motordomäne, die verschiedene Affinitäten für ADP und Mg^{2+} aufweisen. K_x sind Gleichgewichtskonstanten für die Dissoziation von Mg^{2+} , k_x bezeichnet Geschwindigkeitskonstanten (aus [Rosenfeld *et al.*, 2005]).

Bei Sättigung mit Magnesiumionen (oberer Weg, schwarz) beträgt die Geschwindigkeit der Isomerisierung zwischen den zwei Akto.Myosin-V.ADP Zuständen $4,6 \text{ s}^{-1}$ (k_1'). Die anschließende Dissoziation des Mg^{2+} ADP geschieht mit einer Rate von 28 s^{-1} (k_2'). Bei niedrigen freien Magnesiumionen-Konzentrationen führt der untere Weg (rot) über eine schnelle Isomerisierung ($k_1 = 40 \text{ s}^{-1}$) zu einer sehr schnellen Freisetzung des nur noch schwach gebundenen ADP mit $k_2 = 141 \text{ s}^{-1}$. Die Geschwindigkeiten der Rückreaktionen sind –unter physiologischen ADP-Konzentrationen von $<1 \text{ mM}$ – um mindestens den Faktor drei geringer. Unter physiologischen Bedingungen an freiem Mg^{2+} dissoziiert das Magnesiumion zuerst ($K_a = 0,7 \text{ mM}$, physiologische Magnesiumionen-Konzentration $0,5$ bis $1,2 \text{ mM}$ [Satre und Martin, 1985; Michailova und McCulloch, 2001]). Deshalb ist der untere Weg, bei dem erst Mg^{2+} und dann ADP abgegeben wird, der physiologisch relevante.

Außer der Regulation der ADP-Freisetzung durch Magnesiumionen besitzen prozessive Myosine der Klasse V weitere kinetische Anpassungen an ihre Aufgabe:

Prozessive Klasse V Myosine sind kinetisch und strukturell dafür optimiert, sich als einzelne, doppelköpfige Moleküle für viele Schritte entlang von Aktinfilamenten zu bewegen. Die einzelnen Myosinköpfe befinden sich einen großen zeitlichen Anteil des gesamten ATPase-Zyklus fest an das Aktinfilament gebunden. Dieser Zeitanteil wird als *duty ratio* bezeichnet. Die *duty ratio* kann berechnet werden, indem die Zeitdauer des stark gebundenen Zustandes (T_{stark}) durch die Gesamtdauer eines ATP-Umsatzes (T_{total}) geteilt wird:

$$\text{duty ratio} = T_{\text{stark}} / T_{\text{total}}$$

Myosin-V hat eine *duty ratio* von 0,7 bis 0,9. Das bedeutet, daß sich der einzelne Myosinkopf für 70 bis 90 % der Zeitdauer eines ATP Umsatzes im stark aktinengebundenen Zustand befindet. Weiterhin wurde in kinetischen Untersuchungen gezeigt, daß Myosin-V im „schwach“ bindenden Akto.Myosin-ADP Komplex eine sehr viel höhere Aktin-Affinität als nichtprozessive Myosine hat [De La Cruz *et al.*, 1999; Yengo *et al.*, 2002]. Dieser Zustand kann also für Myosin-V als stark bindend bezeichnet werden.

Die Dissoziation von ADP aus dem ternären Komplex ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im ATPase-Zyklus prozessiver Klasse V Myosine. Durch die langsame ADP-Dissoziation aus dem stark Aktin bindenden Akto.Myosin-V.ADP Komplex wird die Zeitdauer des stark gebundenen Zustandes verlängert. Das trägt wiederum zu einer hohen *duty ratio* bei. Die großen Unterschiede in den kinetischen Eigenschaften zwischen prozessiven und nichtprozessiven Myosinen spiegeln eine unterschiedliche Kopplung zwischen Konformationsänderungen in der Nukleotidbindungstasche und den Aktinbindungsdomänen wieder. Diese Kopplung muß grundsätzlich für alle Myosine vorhanden sein, damit Aktinbindung die Produktfreisetzung beschleunigt und verhindert wird, daß der Kraftschlag von Myosin im dissoziierten Zustand stattfindet. Die Stärke der Kopplung bietet allerdings die Möglichkeit, den grundlegenden ATPase-Zyklus an die kinetischen Anforderungen an verschiedene Myosine anzupassen. Während schnelle Myosine, die in großen Verbänden arbeiten (Myosin-II), eine starke Kopplung benötigen, sind Aktin- und ADP-Bindung bei prozessivem Myosin-V nur schwach gekoppelt, um eine hohe Aktin-Affinität des Akto.Myosin-V.ADP-Komplexes und eine langsame, geschwindigkeitsbestimmende ADP-Dissoziation zu ermöglichen.

1.4.3. Regulation der Myosinaktivität

Es gibt eine Vielzahl von verschiedenen Mechanismen, mit denen die Motoraktivität von Myosinen reguliert wird. In Anlehnung an das Thema dieser Arbeit wird hier auf ganz bestimmte Regulationsmechanismen unkonventioneller Myosine eingegangen.

Die Ca^{2+} -abhängige Assoziation von leichten Ketten an die Nackendomäne von Myosinen moduliert die Festigkeit des Hebelarmes. Für Myosin-V wurde gezeigt, daß die Ca^{2+} -abhängige Bindung und Dissoziation der leichten Ketten (Calmodulin) an die Nackendomäne das Gleichgewicht zwischen einer aktivierten, entfalteten und einer inaktivierten, gefalteten Konformation beeinflusst [Trybus *et al.*, 2007; Kremmentsov *et al.*, 2004; Nguyen und Higuchi, 2005; Thirumurugan *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006].

Die Phosphorylierung der Motordomäne von Myosinen der Klasse I und VI ist ein weiterer Regulationsmechanismus. Sie erfolgt an einem Serin- oder Threoninrest, der sich 16 Aminosäuren *upstream* einer hochkonservierten Sequenz mit dem Konsensusmotiv DALAK befindet. Diese Position liegt im Bereich der primären Aktinbindungsstelle in einer

Oberflächenschleife (CM-Schleife). Die durch die Phosphorylierung eingeführte negative Ladung interagiert vermutlich mit positiv geladenen Aminosäuren der Aktinoberfläche. Sie könnte außerdem dazu führen, daß eine geordnete Struktur dieser Schleife stabilisiert wird, die zur Aktinbindung beiträgt. Alle anderen Myosine besitzen an dieser Stelle eine negativ geladene Aminosäure wie Glutamat (E) oder Aspartat (D), weswegen diese Position auch als TEDS-Stelle bezeichnet wird; sie sind ohne Phosphorylierung enzymatisch und mechanisch aktiv [Bement und Mooseker, 1995].

In aktuellen Studien konnte eine neue Form der Regulation für Myosine aufgedeckt werden. Die Motoraktivität der *D. discoideum* Klasse I Myosine Myosin-ID und Myosin-IE wird durch die Konzentration an freien Mg^{2+} Ionen moduliert. Es konnte gezeigt werden, daß hohe Konzentrationen an freiem Magnesium im Bereich der physiologischen Magnesiumionen-Konzentration für beide Myosine die ADP-Freisetzung inhibieren [Fujita-Becker *et al.*, 2004; Dürrwang *et al.*, 2005]. Dadurch wird einerseits die Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten reduziert, zum anderen wird die Funktionalität des Myosins auf die Anforderungen an einen ‚Anker‘ oder Spannungssensor optimiert, da der spannungssensitive Akto.Myosin.ADP Komplex stabilisiert wird.

Ein vergleichbarer Effekt von freien Magnesiumionen auf die ADP-Freisetzung wurde auch für *G. gallus* Myosin-Va gezeigt [Rosenfeld *et al.*, 2005; Hannemann *et al.*, 2005]. Bei diesem prozessiven Myosin verlängern hohe Konzentrationen an freiem Magnesium die Zeitdauer, in der es sich im stark an Aktin gebundenen Zustand befindet (vgl. Kapitel 1.4.2.).

1.4.4. Direktionalität

Die meisten bis heute untersuchten Myosine bewegen sich in Richtung des (+)-Endes von Aktinfilamenten. Für Myosin-VI konnte eindeutig gezeigt werden, daß es sich „rückwärts“ in Richtung des (-)-Endes von Aktinfilamenten fortbewegt [Wells *et al.*, 1999]. Auch für Myosin-IX existieren experimentelle Hinweise für rückwärtsgerichtete Bewegung [Inoue *et al.*, 2002].

Für Myosin-VI wurde zunächst der Aufbau der Motordomäne selbst als Grund für die Umkehr der Bewegungsrichtung angenommen [Homma *et al.*, 2001]. Mit Hilfe von *Protein-Engineering* konnte aber gezeigt werden, daß sich die Bewegungsrichtung eines „vorwärts“ laufenden Klasse I Myosins durch Umorientierung des Hebelarmes um 180° umkehren läßt [Tsiavaliaris *et al.*, 2004]. Dies lieferte den ersten Beweis dafür, daß die Struktur der Nackendomäne die Bewegungsrichtung des Myosins festlegt.

Mit Hilfe der atomaren Struktur von Myosin-VI sowie Untersuchungen mit Chimären aus Myosin V und VI konnte später tatsächlich ein besonderes strukturelles Element im Bereich der Nackendomäne des Myosin-Kopfbereiches als Voraussetzung für die Umkehr der Bewegungsrichtung von Myosin-VI identifiziert werden [Menetrey *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007]. Dieses befindet sich zwischen der Motordomäne und dem einzigen IQ Motiv von Myosin-VI und orientiert den Hebelarm im Verhältnis zum Konverter um 120° - 180° in die entgegengesetzte Richtung [Bryant *et al.*, 2007]. Darüber hinaus ist das 53 Aminosäuren lange Insert eine Bindungsstelle für ein Calmodulin-ähnliches Protein [Bahloul *et al.*, 2004]. Dieses dient nicht der Regulation der Aktivität von Myosin-VI, sondern ist ein struktureller Bestandteil der Nackendomäne und stabilisiert die entgegengesetzte Orientierung des Hebelarmes. Auf dieses Insert folgt das IQ-Motiv und darauf eine flexible Domäne, die die große Schrittweite von Myosin-VI ermöglicht [Okten *et al.*, 2004; Rock *et al.*, 2005; Bryant *et al.*, 2007].

Die rückwärtsgerichtete Bewegung von Myosin-IXb wurde mit rekombinanten Konstrukten nachgewiesen, denen der C-terminale Bereich fehlt [Inoue *et al.*, 2002]. Neuere Studien mit

endogenem Myosin-IXb zeigen jedoch eine zum (+)-Ende des Aktinfilamentes gerichtete Bewegung [O'Connell *et al.*, 2003]. Weitere Studien müssen also aufklären, ob die Schwanzdomäne hier eine regulatorische Funktion für die Direktionalität hat und ob der Mechanismus der Richtungsumkehr des verkürzten Konstruktes dem von Myosin-VI ähnelt.

1.5. Fluoreszenzspektroskopische Meßmethoden zur Aufklärung der kinetischen Mechanismen von Myosinen

Als wesentliche Methoden zur Charakterisierung von enzymatischen Reaktionen dienen spektroskopische Meßverfahren. Neben der Absorption zur Bestimmung von Konzentrationen und Konzentrationsänderungen in einer Lösung wird die Fluoreszenz als Signal für Konformationsänderungen verwendet. Auch Lichtstreuung, Anisotropie oder Circular-dichroismus sind spektroskopische Meßverfahren, die zur Aufklärung kinetischer Mechanismen sowie struktureller Information und Untersuchung zu Zustandsänderungen von Proteinen genutzt werden können. Im Folgenden wird auf die in dieser Arbeit angewendeten Methoden näher eingegangen.

1.5.1. Absorption

Mit Hilfe der Absorption konnte in der vorliegenden Arbeit die Konzentration der aufgereinigten rekombinanten Myosine mit Hilfe von theoretisch für das jeweilige Myosin und Konstrukt errechneten Extinktionskoeffizienten (mit dem Programm „Sednterp“ [www.jphilo.mailway.com/download.htm]) in Lösung bestimmt werden. Außerdem wurde die Absorptionsspektroskopie für die Bestimmung der ATPase-Geschwindigkeit der Myosinkonstrukte eingesetzt (s. Kapitel 1.6.1.).

Wenn Licht einer bestimmten Wellenlänge ein Molekül trifft, nimmt dieses die Energie auf (Absorption). Die Energie wird anschließend thermisch, chemisch oder wiederum als elektromagnetische Welle weitergegeben. Die Absorption entspricht dabei dem negativen dekadischen Logarithmus des Verhältnisses aus ausgestrahlter zu eingestrahelter Lichtintensität:

$$A = -\log I / I_0$$

Da die Menge an absorbiertem Licht bei einer bestimmten Wellenlänge spezifisch für jedes Molekül ist, besitzt jedes Myosinkonstrukt abhängig von seiner Zusammensetzung an absorbierenden Aminosäuren einen spezifischen Extinktionskoeffizienten bei einer bestimmten Wellenlänge. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes kann bei Kenntnis des Extinktionskoeffizienten aus der gemessenen Absorption die Konzentration einer (Protein-) Lösung berechnet werden:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Dabei ist c die Konzentration der Substanz in der Lösung, A die Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge, ε der molare Extinktionskoeffizient bei dieser Wellenlänge und d die Strecke, die das Licht durch die Lösung zurücklegt.

1.5.2. Intrinsische und extrinsische Fluoreszenz

Kinetische Messungen sind eine einfache, schnelle und zugängliche Methode für die Untersuchung der Einzelschritte des ATPase-Zyklus von Myosinen. Für fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an Myosinen kann sowohl die intrinsische Fluoreszenz, die von fluoreszierenden Aminosäuren des betrachteten Moleküls stammt, als auch die extrinsische Fluoreszenz, die in Form von fluoreszierenden Gruppen eingebracht wird, beobachtet werden. Hierzu wird in dieser Arbeit die *stopped-flow* Methode als schnelle Mischmethode angewendet (s. Material und Methoden, Kapitel 2.7.2.).

Intrinsische Fluoreszenz

Bei der Charakterisierung von Myosinen mittels Fluoreszenzspektroskopie wird hauptsächlich die Fluoreszenz der Aminosäure Tryptophan gemessen. Die beiden anderen aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin werden aufgrund von niedriger Quantenausbeute bzw. Fluoreszenzlöschung kaum genutzt. Die Tryptophanfluoreszenz ist abhängig von der Polarität und der Anwesenheit von Wassermolekülen in der direkten Umgebung. Deshalb ist sie dazu geeignet, Konformationsänderungen eines Moleküls zu beobachten, bei denen sich die Umgebung von Tryptophanresten ändert. Dies ist bei den meisten Myosinen der Fall, da sich der konservierte Tryptophanrest W501 (Position in der Sequenz von *D. discoideum* Myosin-II) bei der ATP-Hydrolyse von einer wäßrigen in eine lösungsmittelfreie Umgebung bewegt. Die Tryptophanfluoreszenz wird mit Licht einer Wellenlänge von 296 nm angeregt und die Emission oberhalb einer Wellenlänge von 320 nm durch einen 320 nm *cut-off* Filter detektiert. Durch Anregung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz kann die Interaktion von Myosin mit ATP beobachtet werden.

Extrinsische Fluoreszenz

Für die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung von biochemischen Prozessen wie Nukleotid-Protein Interaktionen, Protein-Protein Interaktionen oder Konformationsänderungen von Proteinen werden hauptsächlich kovalent gebundene Fluorophore eingesetzt. Diese werden an bestimmte Aminosäureketten gekoppelt, ihre Fluoreszenz ist stark von der Umgebung abhängig. Zur Markierung werden die Farbstoffe mit reaktiven Gruppen wie Iodoacetamid oder Isothiocyanat verknüpft, die dann in einer Kopplungsreaktion mit spezifischen reaktiven Aminosäuren reagieren. Zu diesen zählen z. B. die Sulfhydrylgruppe von Cystein oder die Aminogruppe von Lysin bzw. vom N-Terminus von Proteinen. Die Funktionalität und die spezifischen Eigenschaften eines Proteins dürfen dabei durch die Farbstoffgruppe nicht beeinflusst werden.

Die Interaktion von Myosin mit Aktin kann durch Beobachtung der extrinsischen Fluoreszenz von Pyren-Aktin beobachtet werden. Dazu wird Aktin durch Reaktion mit N-(1-pyrenyl)iodoacetamid selektiv an Cystein 374 markiert. Pyren wird mit Licht einer Wellenlänge von 365 nm angeregt und die durch Fluoreszenz hervorgerufene Emission durch einen 389 nm *cut-off* Filter detektiert.

Eine selektive Farbstoffkopplung ist aufgrund der oftmals großen Anzahl an reaktiven Gruppen in einem Protein sehr schwierig. Daher werden auch Substrate, die mit dem Protein in Wechselwirkung treten, fluoreszenzmarkiert. Zur Untersuchung der Nukleotidbindung an Myosin wird in dieser Arbeit N-Methylantraniloyl-(mant)-markiertes ATP (s. Abbildung 1.9) oder ADP verwendet. Der Farbstoff ist an die 2' oder der 3' Hydroxylgruppe des Nukleotids gebunden [Hiratsuka und Uchida, 1973; Hiratsuka, 1983].

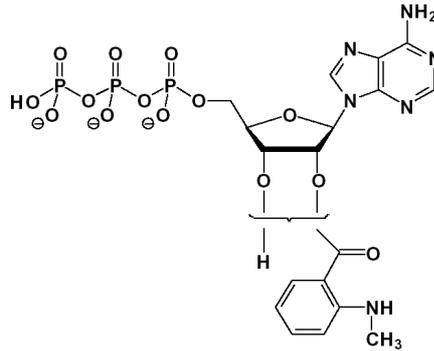


Abb. 1.9: Strukturformel von mant-ATP (2'/3'-(N-Methyl-anthraniloyl)-Adenosin-5'-triphosphat). Die fluorphore mant-Gruppe wird mit Licht einer Wellenlänge von 355 nm angeregt, die Wellenlänge des emittierten Lichtes beträgt 448 nm.

Alternativ können auch Coumarin-Derivate der Nukleotide verwendet werden. Diese haben andere Quantenausbeuten als die mant-Derivate. Des weiteren könnten bei unterschiedlichen Myosinen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen andere Konformationsänderungen oder Zwischenschritte aufgelöst werden [Webb und Corrie, 2001].

Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

Zur Untersuchung der Bindung von mant-Nukleotiden an Myosin kann außer der direkten Anregung der extrinsischen Fluoreszenz der Prozeß des Elektronentransfers angewendet werden. Nach Anregung der Tryptophanfluoreszenz (Donor) findet ein strahlungsloser Energietransfer auf die mant-Gruppe (Akzeptor) statt. Diesen Vorgang bezeichnet man als Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer. Die Fluoreszenzintensität ist dabei geringer als bei direkter Anregung der mant-Gruppe. Weil aber bei Verwendung des Nukleotids im Überschuß nur myosin gebundene Nukleotide angeregt werden, ist sowohl die relative Fluoreszenzerhöhung als auch die Sensitivität erhöht [Woodward *et al.*, 1991]. FRET kann über eine Distanz von 1 bis 10 nm stattfinden [Berlman, 1973]. Voraussetzung dafür ist, daß das Emissionsspektrum des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors überlappt. Da die Energie für die Absorption im Akzeptor kleiner ist als für die Absorption im Donor, ist der Prozeß gerichtet. Dieser strahlungslose Prozeß basiert auf der Dipol-Dipol-Wechselwirkung der beiden Übergangsdipole und läuft im Rahmen von Femtosekunden bis Millisekunden ab [Förster, 1951; Xiao *et al.*, 2003; Shih *et al.*, 2000].

1.6. Kinetische Modelle und Reaktionsgleichungen zur Aufklärung der molekularen Mechanismen von Myosinen

Die Enzymkinetik befaßt sich mit der Geschwindigkeit und den Mechanismen von Reaktionen, bei denen biologische Katalysatoren - Enzyme - wirken. Aus der Konzentrationsänderung eines oder mehrerer Reaktionspartner lassen sich Rückschlüsse auf die molekularen Mechanismen des Enzyms ziehen. Dabei wird zwischen *Steady State*- und Transientenkinetik unterschieden. Bei der *Steady State*-Kinetik befinden sich das freie Enzym (Myosin) und seine Zwischenzustände im Fließgleichgewicht. Die Transientenkinetik hingegen beschreibt den Reaktionsverlauf zweier oder mehrerer Reaktanten vom Zeitpunkt des Mischens bis zur Einstellung eines Gleichgewichtes. Dabei können einzelne Reaktionsschritte anhand der Änderungen des Fluoreszenzsignals mit einer zeitlichen Auflösung im Millisekundenbereich detektiert werden.

1.6.1. Aktin-aktivierte ATPase von Myosin

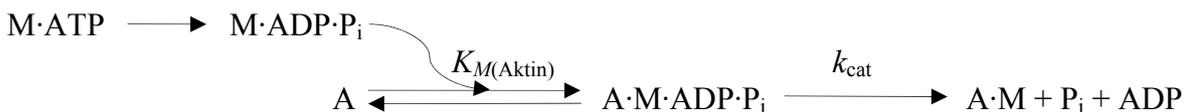
Für die Bestimmung der ATPase-Aktivität von Myosin im Fließgleichgewicht wird das Substrat ATP in großem Überschuß eingesetzt. Mit der Einstellung des Gleichgewichtes der Reaktion befindet sich das System im *steady-state*-Zustand, das heißt, daß die Geschwindigkeit der Bildung der Zwischenprodukte gleich groß ist wie die ihres Zerfalls. Die Konzentration der Intermediate bleibt also konstant, während die der Edukte und Produkte ab- bzw. zunimmt.

In Abwesenheit von Aktin kann die basale ATPase-Aktivität von Myosin mit dem Formalismus der Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben werden [Michaelis und Menten, 1913]. Das Substrat (ATP) wird in großem Überschuß eingesetzt, so daß das Enzym (Myosin) mit Substrat gesättigt ist. Dadurch ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit annähernd unabhängig von der ATP-Konzentration, die Reaktion ist pseudo 1. Ordnung. Die Michaelis-Menten-Gleichung bezogen auf die basale ATPase lautet unter diesen Bedingungen (für eine detaillierte Herleitung dieser und der folgenden Gleichungen siehe Lehrbücher der Biochemie oder [Fersht *et al.*, 1985]):

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [ATP]}{K_{M(ATP)} + [ATP]}$$

Wie man der Gleichung entnehmen kann, besteht also ein hyperbolischer Zusammenhang zwischen ATP-Konzentration und Geschwindigkeit v . Dabei ist v_{\max} die maximal erreichbare Geschwindigkeit und K_M die Michaelis-Menten-Konstante; sie hat die Einheit mol/l und gibt die ATP-Konzentration an, bei der die ATPase-Geschwindigkeit auf die Hälfte von v_{\max} aktiviert wird. Aufgrund der physiologischen ATP-Konzentration im millimolaren Bereich innerhalb der Zelle besitzen Myosine einen $K_{M(ATP)}$ im mikromolaren Bereich (μM). Die erreichbare maximale ATPase-Geschwindigkeit in Abwesenheit von Aktin liegt meist in der Größenordnung von $0,1 \text{ s}^{-1}$. Obwohl der Mechanismus der ATP-Hydrolyse durch Myosin ein komplexer Reaktionsmechanismus ist, der aus mehreren transientenkinetisch auflösbaren Zwischenschritten besteht, folgt das kinetische Verhalten im Fließgleichgewicht der Michaelis-Menten-Kinetik. Tatsächlich fließen in die Konstanten v_{\max} und K_M Geschwindigkeitsparameter von Reaktionen ein, die vor der Hydrolyse stattfinden. In Abwesenheit von Aktin wird die Freisetzung von P_i als der Schritt angenommen, der die Umsatzrate limitiert (*rate limiting step*).

Durch Anwesenheit von F-Aktin (A) wird die Freisetzung der Hydrolyseprodukte beschleunigt. Um jedoch in diesen Aktin-aktivierten ATPase-Zyklus eintreten zu können, muss der Komplex $\text{M}\cdot\text{ADP}\cdot\text{P}_i$ zunächst einen Kollisionskomplex mit Aktin ($\text{A}\cdot\text{M}\cdot\text{ADP}\cdot\text{P}_i$) bilden. Diese Reaktion kann dabei durch ein Gleichgewicht beschrieben werden, welches der Freisetzung der Hydrolyseprodukte vorgelagert ist:



Sofern ATP im Überschuß vorliegt, kann die Aktin-aktivierte ATPase-Aktivität nach dem Formalismus der Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben werden. Dabei wird das Gleichgewicht zwischen dem Komplex $\text{M}\cdot\text{ADP}\cdot\text{P}_i$, Aktin und $\text{A}\cdot\text{M}\cdot\text{ADP}\cdot\text{P}_i$ durch die Michaelis-Menten-Konstante $K_{M(\text{Aktin})}$ beschrieben. Auch in diesem Fall beinhaltet K_M weitere Geschwindigkeitskonstanten von Reaktionsschritten, welche der Hydrolyse vorausgehen und wird daher auch als apparente Konstante, $K_{\text{app}(\text{Aktin})}$, bezeichnet. Die Geschwindigkeits-

konstante des limitierenden Schrittes, k_{cat} , charakterisiert dabei die maximale Katalyserate der gesamten Myosin-ATPase unter Sättigung mit F-Aktin. Die ATPase-Geschwindigkeit k_{ATP} kann auch im Aktin-aktivierten Fall durch eine Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden:

$$k_{ATP} = \frac{k_{cat} [\text{Aktin}]}{K_{M(\text{Aktin})} + [\text{Aktin}]}$$

Bei hohen Aktin-Konzentrationen $[\text{Aktin}] \gg K_{M(\text{Aktin})}$ und damit $K_{M(\text{Aktin})}/[\text{Aktin}] \ll 1$, vereinfacht sich diese Gleichung zu $k_{ATP} = k_{cat}$. Ist der Wert k_{cat} bekannt, so läßt sich $K_{M(\text{Aktin})}$ über $k_{cat}/2$ graphisch bestimmen. k_{cat} kann häufig nicht direkt gemessen werden, da viele Myosine mit gebundenem Nukleotid eine geringe Affinität zu F-Aktin besitzen. Aufgrund der zunehmenden Viskosität einer Lösung mit hohen Aktin-Konzentrationen kann der Sättigungsbereich $[\text{Aktin}] \gg K_{M(\text{Aktin})}$ nicht erreicht werden, so daß eine unabhängige Bestimmung beider Parameter ebensowenig möglich ist. Der geeignete Parameter für eine Diskussion der katalytischen Aktivität verschiedener Myosinkonstrukte beinhaltet beide Konstanten, k_{cat} und $K_{M(\text{Aktin})}$. Für $[\text{Aktin}] \ll K_{M(\text{Aktin})}$, nimmt die obige Gleichung folgende vereinfachte Form an:

$$k_{ATP} = \frac{k_{cat}}{K_{M(\text{Aktin})}} [\text{Aktin}]$$

Es handelt sich bei der Konstanten $k_{cat}/K_{M(\text{Aktin})}$ um eine Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung, die als eine apparente Aktinbindungskonstante (in Anwesenheit von ATP) interpretiert werden kann.

Tabelle 1.1 zeigt exemplarisch die Größenordnung der *steady-state*-Parameter eines typischen Klasse II und Klasse V Myosins im Vergleich. Die basale ATPase-Geschwindigkeit ist vergleichbar hoch, sie wird jedoch durch Aktin unterschiedlich stark aktiviert. Myosin-V zeigt eine höhere Maximalgeschwindigkeit k_{cat} von 15 s^{-1} , die schon bei geringen Aktin-Konzentrationen um $1 \text{ }\mu\text{M}$ (K_M) erreicht wird. Die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung für die Aktinbindung in ATP-Anwesenheit ($k_{cat}/K_{M(\text{Aktin})}$) ist für Myosin-V um mehr als den Faktor 100 höher.

Tab. 1.1: Typische Parameter der Aktin-aktivierten ATPase-Aktivität exemplarischer Myosine im Fließgleichgewicht.

Myosin	Myosin-II	Myosin-V
basale ATPase (s^{-1})	0,1	0,03
k_{cat} (s^{-1})	2	15
$K_{M(\text{Aktin})}$ (μM)	50	1
k_{cat}/K_{app} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	0,03	15

1.6.2. Interaktion von Myosin mit Nukleotiden

Alle Myosine, die bisher untersucht wurden, folgen demselben grundlegenden Mechanismus der ATP-Hydrolyse, der im Bagshaw-Trentham-Schema beschrieben wird [Bagshaw und Trentham, 1974; Bagshaw *et al.*, 1974]. Dieses 7-Schritt-Modell wurde für Myosin S1 aus Kaninchen aufgestellt und löst die einzelnen Schritte der Interaktion von Myosin und Nukleotid auf. Es läßt sich auch auf andere Myosine übertragen. Basierend auf intensiven

kinetischen Studien mit *D. discoideum* Myosin-II konnte dieses Modell zu einem „8-Schritt-Modell“ erweitert werden [Zeng *et al.*, 2004]:

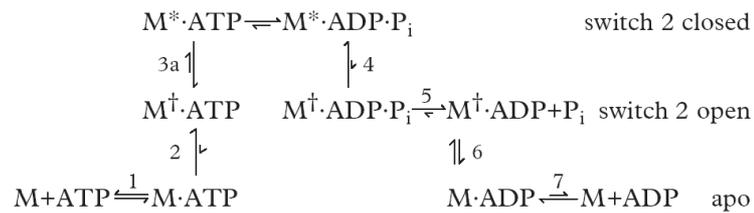


Abb. 1.10: Reaktionsschema der Interaktion von Kaninchen Myosin S1 und Nukleotiden. M=Myosin, P_i=anorganisches Phosphat, Kreuz (†, *) bezeichnen Konformationsänderungen, die mit einer Änderung der Tryptophanfluoreszenz einhergehen. Auf der rechten Seite ist der Zustand der Schalter 1 (*switch* 1) und Schalter 2 (*switch* 2) Elemente bei der Interaktion mit dem gebundenen Nukleotid angegeben [Zeng *et al.*, 2004; Bagshaw und Trentham, 1974].

Zunächst bildet sich diffusionskontrolliert (Schritt 1) ein binärer Kollisionkomplex M.ATP. Der nachfolgende Isomerisierungsschritt (2) ist schnell, das Gleichgewicht liegt sehr stark auf Seiten des Produktes. Er geht mit einer Konformationsänderung (Öffnen von Schalter II) einher, die mit einer erhöhten Tryptophanfluoreszenz verbunden ist (M[†].ATP). Durch die anschließende, reversible Hydrolyse des ATP (Schritt 3a und 3b) kommt es zu einer weiteren Fluoreszenzerhöhung (M^{*}), weil ein fluoreszenzsensitives Tryptophan (Tryptophan 501 in *D. discoideum* Myosin-II) in der Relay-Region seine Dielektrizitätskonstante sehr stark ändert [Malnasi-Csizmadia *et al.*, 2000]. Die Hydrolyseprodukte bleiben zunächst gebunden, es findet eine Konformationsänderung (Öffnen von Schalter II, Schritt 4) statt, begleitet von einer Verminderung der Tryptophanfluoreszenz, bevor dann Phosphat freigesetzt wird (Schritt 5). Auch die nachfolgende ADP-Freisetzung ist ein Zwei-Schritt-Prozeß mit einem Isomerisierungsschritt (Schritt 6), der mit einer Fluoreszenzverminderung einhergeht, sowie der anschließenden Dissoziation des ADP (Schritt 7).

Für Skelett-Myosin S1 setzt sich die Fluoreszenzerhöhung bei der Interaktion mit ATP also aus zwei Komponenten zusammen. Dies zeigt sich darin, daß die Amplitude der Fluoreszenzänderung bei höheren ATP-Konzentrationen sinkt [Millar und Geeves, 1983]. Es kann nur noch die Fluoreszenzänderung des Hydrolyseschrittes beobachtet werden, da die Bindungsreaktion zu schnell abläuft, um im *Stopped-Flow*-Spektrometer detektiert werden zu können. Für *D. discoideum* Myosin-II wird eine geringere Amplitude der Fluoreszenzänderung beobachtet, die bei steigender ATP-Konzentration konstant bleibt. Deshalb wird diese dem Hydrolyseschritt zugeordnet [Ritchie *et al.*, 1993; Kurzawa *et al.*, 1997]. Das Fehlen eines Fluoreszenzsignals für die ADP-Bindung an *D. discoideum* Myosin-II sowie die Abwesenheit konservierter Tryptophanreste (W113 und W131 in Kaninchen Myosin S1) in der Nukleotidbindungstasche von *D. discoideum* Myosin II (D112 und R130) unterstützen diese Interpretation.

1.6.3. Interaktion von Myosin mit Aktin

Die Bindung von Aktin an Myosin kann als ein dreistufiger Prozeß betrachtet werden [Geeves *et al.*, 1984; Geeves und Conibear, 1995].

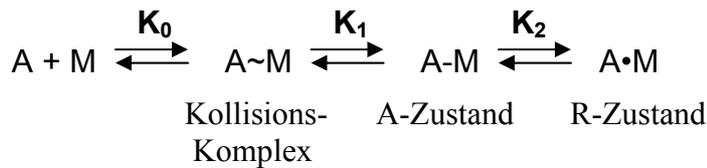
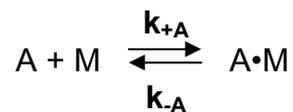


Abb. 1.11: Reaktionsschema der Interaktion von Kaninchen Myosin S1 und Aktin. A=Aktin, M=Myosin [nach Geeves und Conibear, 1995].

Zunächst bildet sich ein Kollisionskomplex aus Aktin und Myosin (K_0). Dieser Schritt beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen und ist deshalb abhängig von der Ionenstärke [Furch *et al.*, 1998]. Die nachfolgende Isomerisierung zum A-Zustand (*attached state*, K_1) führt zur Ausbildung von stereospezifischen, hydrophoben Interaktionen und somit einer schwachen Bindung zwischen Aktin und Myosin. Der anschließende Übergang zum stark aktungebundenen R-Zustand (*rigor-like state*, K_2) kann fluoreszenzspektroskopisch über eine Verringerung der Pyren-Aktin Fluoreszenz beobachtet werden. Bei diesem Schritt schließt sich die Spalte zwischen der oberen und der unteren 50 kDa Domäne, wodurch alle Interaktionen in der Aktomyosin-Bindungsstelle ausgebildet werden [Conibear *et al.*, 2003]. Wenn fluoreszenzspektroskopisch nicht mehrere Zustände aufgelöst werden können, kann die Interaktion nach dem folgenden einfachen Ein-Schritt-Mechanismus beschrieben werden:



1.6.4. Interaktion des Aktomyosinkomplexes mit Nukleotiden

Betrachtet man die Interaktion von Aktin und Myosin in Anwesenheit von Nukleotid, so kann das oben gezeigte Modell durch Nukleotid zu einem kompetitiven Bindungsmodell ergänzt werden. Abbildung 1.12 zeigt das sogenannte 3G-Modell [Geeves, Goody und Gutfreund, 1984].

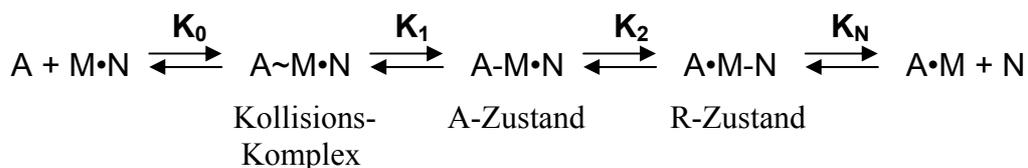


Abb. 1.12: Zwei-Schritt Modell der Interaktion von Kaninchen Myosin S1 mit Nukleotid und Aktin. A=Aktin, M=Myosin, N=Nukleotid [Geeves und Conibear, 1995; Geeves *et al.*, 1984].

Dabei resultiert aus einer zunehmend stärkeren Bindung von Aktin eine schwächere Bindung des Nukleotides und umgekehrt. Die Geschwindigkeit der Ausbildung des Kollisionskomplexes (K_0) sowie der Isomerisierung zum A-Zustand (K_1) sind nukleotidunabhängig, während der Übergang zum R-Zustand sehr sensitiv für gebundenes Nukleotid und in Anwesenheit des γ -Phosphates von ATP signifikant verringert ist.

Mit transientenkinetischen Methoden konnten mehrere Aktomyosinzustände in Anwesenheit von Nukleotiden aufgelöst werden, woraus das folgende Modell abgeleitet wurde [Millar und Geeves, 1983; Siemankowski und White, 1984]:

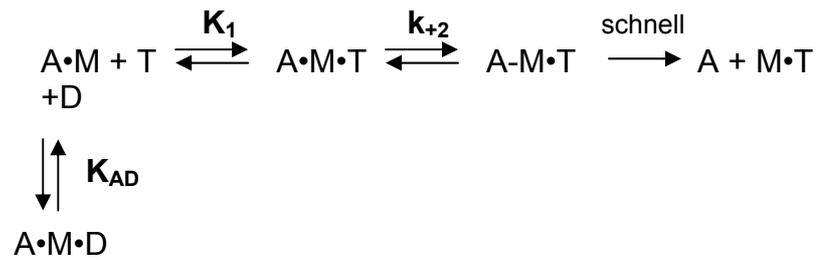


Abb 1.13.: Modell der Interaktion von Akto.Myosin mit Nukleotiden. A=Aktin, M=Myosin, T=ATP, D=ADP [Millar und Geeves, 1983; Siemankowski und White, 1984].

Der erste Schritt bei der Interaktion von ATP mit Akto.Myosin (Abbildung 1.13, waagerechter Reaktionsverlauf) ist die schnelle Einstellung eines Gleichgewichtes mit der Gleichgewichtskonstanten \mathbf{K}_1 . Darauf folgt eine Isomerisierung des ternären Komplexes, die geschwindigkeitsbestimmend für die Aktindissoziation ist (\mathbf{k}_{+2}).

Die Geschwindigkeitskonstante dieser Reaktion ist durch $k_{obs} = \mathbf{K}_1\mathbf{k}_{+2} [\text{ATP}]/(1+\mathbf{K}_1[\text{ATP}])$ definiert. Bei sehr kleinen ATP-Konzentrationen hängt die beobachtete Geschwindigkeitskonstante linear von der ATP-Konzentration ab und die Gleichung vereinfacht sich zu $k_{obs} = \mathbf{K}_1\mathbf{k}_{+2} [\text{ATP}]$. $\mathbf{K}_1\mathbf{k}_{+2}$ gibt dabei die Steigung der Geraden an und definiert eine Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung. Bei höheren ATP-Konzentrationen zeigt \mathbf{k}_{+2} eine Sättigung und der Prozeß kann mit einer Hyperbel beschrieben werden: $k_{obs} = \mathbf{k}_{+2}[\text{ATP}]/([\text{ATP}]+\mathbf{K}_1)$.

In Anwesenheit von ADP (Abbildung 1.13, senkrechter Reaktionsverlauf) konkurrieren beide Nukleotide um die Bindung an Akto.Myosin, da auch ADP in schnellem Gleichgewicht mit Akto.Myosin steht (Gleichgewichtskonstante \mathbf{K}_{AD}). Experimentell kann \mathbf{K}_{AD} ermittelt werden, indem die Dissoziationsgeschwindigkeit des Aktomyosinkomplexes in Anwesenheit steigender ADP-Konzentrationen gemessen und gegen die ADP-Konzentration aufgetragen wird. Der Prozeß kann mit einer Hyperbel $k_{obs} = k_0/(1 + [\text{ADP}]/\mathbf{K}_{\text{AD}})$ beschrieben werden, wobei k_0 die beobachtete Geschwindigkeitskonstante in Abwesenheit von ADP ist und \mathbf{K}_{AD} die Dissoziationsgleichgewichtskonstante von ADP definiert.

Die Kopplungen der Interaktionen zwischen Myosin, Aktin und ADP können nach dem folgenden Schema interpretiert werden:

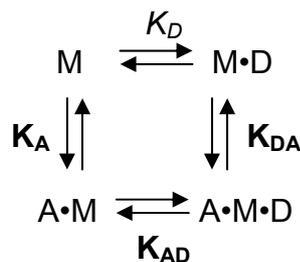


Abb. 1.14: Affinität von Aktin und ADP für Myosin. A=Aktin, M=Myosin, D=ADP. Die Gleichgewichtskonstanten in Anwesenheit von Aktin sind **fett**, in Abwesenheit von Aktin *kursiv* dargestellt [nach Ritchie *et al.*, 1993].

Die Anpassung verschiedener Myosine an ihre vielfältigen Aufgaben erfordert eine Feineinstellung der Funktionalität der konservierten Motordomäne. Kleine Unterschiede in der Primärsequenz und der atomaren Struktur gehen mit veränderten kinetischen Parametern einher.

Wie bereits in Kapitel 1.6.1. (Tabelle 1.1) gezeigt, äußern sich diese Unterschiede zwischen Myosin-II und Myosin-V z.B. darin, daß die maximale ATPase-Geschwindigkeit von Myosin-V um eine Größenordnung höher ist als die von Myosin-II. Betrachtet man die Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der einzelnen Schritte des ATPase-Zyklus

dieser Myosine, wird klar, daß feine Unterschiede in einzelnen Parametern eine sehr unterschiedliche Funktionsweise ermöglichen.

Das Schema oben (Abbildung 1.14) zeigt die Interaktionen zwischen Aktin, Myosin und ADP. Wie die meisten Myosine weisen auch Myosin-II und Myosin-V in Abwesenheit von Nukleotiden eine sehr hohe Aktin-Affinität auf, K_A liegt zwischen 1-20 nM. Die ADP-Affinität in Abwesenheit von Aktin (K_D) zeigt größere Unterschiede, sie liegt für Myosin-V im Bereich von 0,1-1 μ M, Myosin-II hat eine ADP-Affinität von 1-10 μ M. Aufgrund der starken Kopplung zwischen Nukleotid- und Aktinbindung bei Myosin-II und anderen Myosinen, die für schnelle Bewegung optimiert sind, führt die Anwesenheit von ADP zu einer Schwächung der Aktin-Affinität um den Faktor 10-20, so daß K_{DA} im Bereich von 100-500 nM liegt. Bei ATP-Anwesenheit liegt dieser Faktor bei ~ 10.000 , so daß eine sofortige Dissoziation des Komplexes stattfindet. Für Myosin-V bewirkt die ADP-Anwesenheit kaum eine Schwächung der Aktin-Affinität, so daß K_{DA} hier ebenfalls bei 1-20 nM liegt. Eine der wichtigsten kinetischen Anpassungen äußert sich in der Beschleunigung der ADP-Freisetzung durch Aktin. Bei Myosin-II wird die Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation von $\sim 1 \text{ s}^{-1}$ im aktinfreien Zustand (Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-D}) auf $\sim 100 \text{ s}^{-1}$ in Anwesenheit von Aktin (k_{AD}) beschleunigt. Dies hat auch eine 100-fache Schwächung der ADP-Affinität zur Folge, K_{AD} liegt für Myosin-II bei $\sim 200 \mu$ M. Die ADP-Dissoziation von Myosin-V wird durch Aktin nur moderat beschleunigt und erreicht mit einer Geschwindigkeit von $\sim 15-20 \text{ s}^{-1}$ die Größenordnung der maximalen ATPase-Geschwindigkeit im Fließgleichgewicht. Dadurch wird dieser Schritt für Myosin-V geschwindigkeitsbestimmend. Die Affinität für ADP sinkt in Anwesenheit von Aktin nur unwesentlich und bleibt im mikromolaren Bereich ($K_{AD} = 1-10 \mu$ M).

Auch in den weiter oben beschriebenen Schritten gibt es einige Unterschiede zwischen Myosin-V und *D. discoideum* Myosin-II. Die Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse ($k_{+3} + k_{-3}$) ist für *D. discoideum* Myosin-II langsam ($\sim 30 \text{ s}^{-1}$), während dieser Schritt für Myosin-V sehr schnell abläuft ($\sim 750 \text{ s}^{-1}$). Dadurch kann Myosin-V nach der ATP-Bindung und Dissoziation den Hydrolyseschritt sehr schnell durchlaufen und somit schnell wieder an Aktin binden. Die Phosphatfreisetzung, die bei Myosin-II langsam und geschwindigkeitsbestimmend ist, erfolgt für Myosin-V mit einer Geschwindigkeit von $>250 \text{ s}^{-1}$.

Durch Änderungen in wichtigen Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten um ein bis zwei Größenordnungen werden also grundlegende Unterschiede in der Funktionalität verschiedener Myosine ermöglicht.

Außer der kinetischen Beschreibung von Myosinen gibt es noch weitere Methoden, die für die Charakterisierung der Funktion hilfreich sind. Die Bestimmung der Geschwindigkeit, mit der Aktinfilamente *in vitro* über immobilisierte Myosinkonstrukte bewegt werden, kann mit fluoreszenzmarkierten Aktinfilamenten mikroskopisch im sogenannten *in vitro* Motilitätsassay verfolgt und bestimmt werden (s. Kapitel 2.7.4.). Da prozessive Myosine wie Myosin-V in der Lage sind, Aktinfilamente als einzelnes Molekül zu bewegen, kann untersucht werden, bei welchen minimalen Myosin-Konzentrationen noch Bewegung von Aktinfilamenten beobachtbar ist. Zeigt ein Myosin auch bei sehr niedrigen Oberflächenkonzentrationen noch Bewegung von Aktinfilamenten, so ist das ein erster Hinweis auf mögliche Prozessivität. Weitere direkte Methoden zur funktionalen Charakterisierung von Myosinen sind Einzelmolekül-Fluoreszenzmessungen zur direkten Beobachtung der Laufweite von prozessiven Myosinen sowie Kraftmessungen und die Bestimmung der Länge des Kraftschlages mit Hilfe optischer Laserfallen [Steffen und Sleep, 2004; Dantzig *et al.*, 2006].

1.7. *D. discoideum* als eukaryotischer Modellorganismus

Dictyostelium discoideum ist ein niederer Eukaryot, der als zellulärer Schleimpilz bezeichnet wird. Nach klassischer Taxonomie wird er zum Reich der *Protisten*, Stamm *Amoebozoa*, Ordnung *Dictyosteliida* gezählt. Heute werden Schleimpilze als eigene Gruppe angesehen, da sie phänotypische Eigenschaften sowohl von Pilzen (Lebenszyklus, Sporenbildung) als auch von Protozoen (Bewegung) zeigen. Aufgrund der ausgeprägten Interaktionen der Individuen, auch im einzelligen Amöben-Stadium, wird *D. discoideum* in der aktuellen Literatur als soziale Amöbe bezeichnet [Kessin, 2001].

Aufgrund ihres sehr dynamischen Zytoskeletts eignen sich die amöboiden Zellen von *D. discoideum* besonders gut für Untersuchungen von Bewegungsprozessen [Schleicher *et al.*, 1995]. *Dictyostelium*-Amöben weisen im Gegensatz zu Hefen keine Zellwand auf, verfügen über chemotaktische Aktivität und besitzen die Fähigkeit zur Differenzierung. Hierbei können durchaus Parallelen zu Entwicklungsvorgängen in tierischen Organismen gezogen werden.

Im vegetativen Stadium lebt *D. discoideum* als einzellige Amöbe in Waldböden und ernährt sich durch Phagozytose von Bakterien und Hefen [Raper, 1935]. Das definierte Differenzierungsprogramm von *D. discoideum* wird durch Nahrungsmangel ausgelöst und führt durch Aggregation der Amöben zur Bildung von multizellulären Strukturen. Im ersten Stadium des Entwicklungszyklus sekretieren *D. discoideum* Zellen zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP), das als chemotaktisches Signal dient [Gerisch und Wick, 1975]. Die Zellen bewegen sich entlang des cAMP-Gradienten und bilden ein Aggregat, das aus etwa 10^5 Zellen besteht (s. Abbildung 1.15). Durch die Aggregation entsteht ein sogenanntes Pseudoplasmodium (*slug*), ein wurmähnlicher Zellverband mit einer Länge von 1 bis 2 mm. Gleichzeitig beginnt die Differenzierung in zwei Zelltypen, die Prä-Sporenzellen und die Prä-Stielzellen [Firtel, 1995]. In diesem Stadium ist das Zellaggregat lichtempfindlich und bewegt sich positiv phototaktisch zu einer günstigen Umgebung, wo der nächste Entwicklungsschritt, die Kulmination, eingeleitet wird. Über das Zwischenstadium des *mexican hat* wird aus dem Zellklumpen ein Fruchtkörper mit Basalplatte, Stiel und Sporenkopf gebildet. Die Zellen des Stiels und der Basalplatte sind stark vakuolisiert, bilden eine Zellwand und sterben im fertigen Sporenträger ab. Die Sporenzellen bilden ebenfalls eine Zellwand, verlieren Wasser und werden metabolisch inaktiv [Loomis, 1975]. Der Differenzierungsprozeß von *D. discoideum* ist 24 bis 30 h nach Beginn der Aggregation beendet. Bei Berührung des Sporenkopfes werden die Sporen freigesetzt und beginnen unter geeigneten Bedingungen mit der Keimung. Dadurch bilden sich wieder einzelne Amöben und der Entwicklungszyklus von *D. discoideum* ist damit geschlossen.

D. discoideum verfügt als Modellorganismus über praktische Vorteile gegenüber anderen, komplizierteren Zellsystemen. Da der Organismus nicht pathogen ist, läßt er sich einfach im Labor handhaben. Er ist seit der Einführung von axenischen Mutationen nicht nur auf Bakterienrasen, sondern auch in flüssigen Medien einfacher Zusammensetzung zu kultivieren [Sussman und Sussman, 1967; Watts und Ashworth, 1970; Loomis, 1971]. Bei den axenisch wachsenden Zellen handelt es sich um spezifisch modifizierte *Dictyostelium*-Stämme (AX2, AX3), die nicht auf feste Nahrungsbestandteile angewiesen sind. Auf diese Weise können Zelldichten bis 10^7 Zellen/ml erreicht werden. Eine Kultivierung in dieser Form ermöglicht es, *D. discoideum* unter anderem als Proteinexpressionssystem einzusetzen, ähnlich den prokaryotischen Expressionssystemen [Manstein und Hunt, 1995].

Ein weiterer Vorteil ist die leichte molekularbiologische Manipulierbarkeit. Vor kurzem wurde die vollständige Sequenzierung des Genoms von *D. discoideum* abgeschlossen [Kreppel *et al.*, 2004; Eichinger *et al.*, 2005]. Es ist auf 6 Chromosomen verteilt und mit 34 Mbp nur etwa zehnmal größer als das von Bakterien. Es liegt in der Regel haploid vor,

wodurch die Isolierung von Mutanten im Vergleich zu anderen gentechnisch manipulierbaren, eukaryotischen Zellsystemen erleichtert wird.

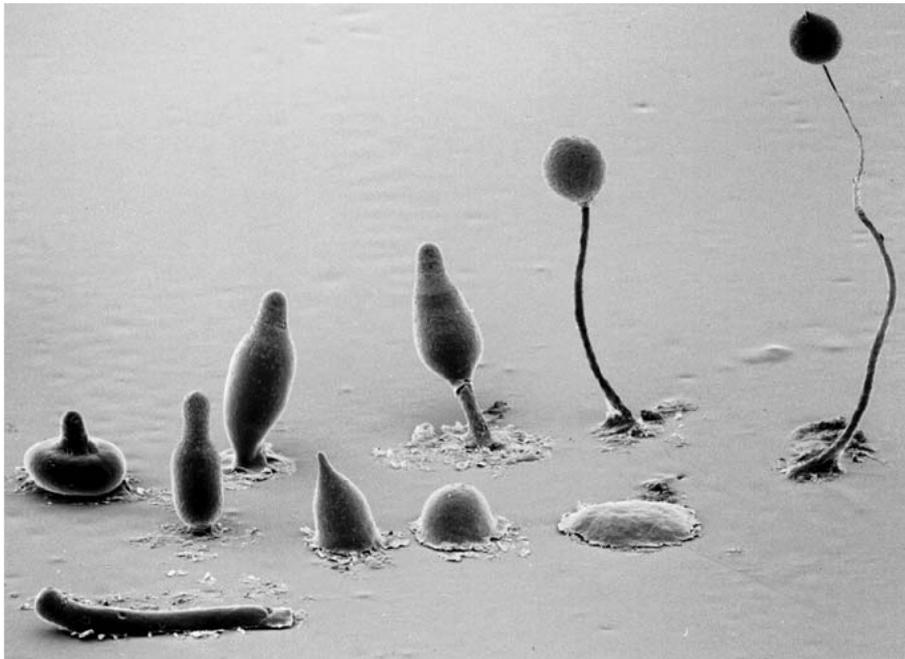


Abb. 1.15: Entwicklungsszyklus von *Dictyostelium discoideum*. Die Metamorphose von *D. discoideum* beginnt mit der Aggregation (vorne rechts) und läuft (im Uhrzeigersinn) über die Stadien *first finger* und Pseudoplasmodium zum *mexican hat*. Aus diesem wird der Fruchtkörper differenziert. Die elektronenmikroskopische Aufnahme stammt von M. J. Grimson und R. L. Blanton, Texas Technical University, USA.

Des Weiteren ist *D. discoideum* für die Bearbeitung von Fragestellungen bezüglich der Zellmotilität besonders geeignet. Der Organismus zeigt neben intrazellulärer und amöboider Bewegung auch Bewegungserscheinungen des gesamten Organismus und exprimiert aus diesem Grund eine wesentliche größere Anzahl verschiedener Myosinklassen als niedrigere Eukaryoten [Kollmar, 2006]. Darüber hinaus wird *D. discoideum* für die Untersuchung von Signaltransduktion, Zellentwicklung und Zell-Zell-Adhäsion verwendet [Soldati, 2003].

Die Arbeit mit *D. discoideum* hat für das Gebiet der Myosinforschung eine herausragende Bedeutung. Ein großer Teil der heute verfügbaren Kristallstrukturen von Myosinen, auch in unterschiedlichen Zuständen, konnte anhand von *D. discoideum* Myosin-II Konstrukten gelöst werden [Smith und Rayment, 1995; Gulick *et al.*, 1997; Bauer *et al.*, 1997; Reubold *et al.*, 2003]. Auch die einzige bisher verfügbare atomare Struktur eines Klasse I Myosins stammt von *D. discoideum* Myosin-IE [Kollmar *et al.*, 2002]. Mit Hilfe des Expressionssystems *D. discoideum* ist es außerdem gelungen, unkonventionelle Pflanzenmyosine rekombinant zu exprimieren, was deren kinetische und funktionale Charakterisierung ermöglichte [Hachikubo *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 2003]. *D. discoideum* exprimiert 13 Myosine aus mindestens vier Klassen [Kollmar, 2006]. Bisher sind bereits Myosin-II und Myosin-IB, -ID und -IE kinetisch und funktional charakterisiert [Manstein *et al.*, 1989; Ritchie *et al.*, 1993; Woodward *et al.*, 1995; Anson *et al.*, 1996; Kurzawa *et al.*, 1997; Fujita-Becker *et al.*, 2005; Dürrwang *et al.*, 2006; Tsiavaliaris *et al.*, eingereicht]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die funktionale und kinetische Charakterisierung eines weiteren Myosins aus *D. discoideum*, Myosin-Vb, abgeschlossen, sowie die Grundlage für die Charakterisierung von *D. discoideum* Myosin-IC gelegt werden. Somit ist absehbar, daß in nächster Zukunft die kinetischen und funktionalen Eigenschaften aller Myosine aus *D. discoideum* erfaßt sein werden. Dadurch wird die erste Charakterisierung des gesamten „Myosoms“ eines Organismus zugänglich sein.

Im folgenden wird näher auf die zwei Myosine eingegangen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

1.7.1. *D. discoideum* Myosin-Vb

D. discoideum Myosin-Vb weist Sequenzhomologien zu pflanzlichen Klasse XI Myosinen und zu Klasse V Myosinen auf [Peterson *et al.*, 1996]. Basierend auf Sequenzvergleichen von Motordomänen wird es den Klasse V Myosinen zugeordnet [Kollmar, 2006]. Die schwere Kette von Myosin-Vb besteht aus 2249 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 258 kDa. An die Motordomäne schließt sich die Nackenregion mit sechs IQ-Motiven an, die zugehörigen leichten Ketten sind nicht bekannt. Es wird allerdings vermutet, daß es sich um Calmodulin oder Calmodulin-ähnliche Aminosäureketten handelt. Die Schwanzregion enthält Bereiche, die superspiralisierte Strukturen ausbilden können und damit für die Dimerisierung geeignet sind.

Die mRNA von Myosin-Vb hat eine Größe von 7,8 kb und kann während des gesamten Lebenszyklus von *D. discoideum* nachgewiesen werden. In der vegetativen Wachstumsphase ist die mRNA-Konzentration sehr hoch, mit Beginn der chemotaktischen Aggregation fällt sie stark ab [Hammer III. und Jung, 1996]. In Myosin-Vb *knock-out*-Mutanten konnte keine offensichtliche Veränderung des Phänotyps festgestellt werden. Entwicklung, Pinozytose, Aktin- und Calmodulinverteilung, Osmoregulation und Phagozytose sind normal [Peterson *et al.*, 1996]. Da Myosin-Vb sechs Bindungsstellen für Calmodulin pro schwerer Kette besitzt, könnte es die intrazelluläre Lokalisation von Calmodulin -ähnlich wie das Klasse V Myosin Myo2 aus *S. cerevisiae*- beeinflussen [Hammer III. und Jung, 1996]. Es wurde deshalb vermutet, daß Myosin-Vb bei der Funktion der kontraktilen Vakuole eine Rolle spielt, weil Calmodulin in der Membran der kontraktilen Vakuole hoch konzentriert vorliegt und auch Klasse I Myosine mit der Funktion der kontraktilen Vakuole in Verbindung gebracht werden [Doberstein *et al.*, 1993]. Mit fluoreszenzmarkiertem Myosin-Vb konnte die Lokalisierung an der kontraktilen Vakuole bestätigt werden [Tsiavaliaris *et al.*, unveröffentlicht]. Erste Ergebnisse weisen darauf hin, daß ein konditional lethaler Phänotyp der Myosin-Vb *knock-out*-Zellen besteht und diese einen osmotischen Schock nicht überleben.

1.7.2. *D. discoideum* Myosin-IC

Myosin-IC ist eines von sieben Klasse I Myosinen aus *D. Discoideum* und ist mit *A. castellanii* Myosin-IA verwandt [Foth *et al.*, 2006]. Es gehört zusammen mit Myosin-IB und Myosin-ID zur Unterklasse IC, die auch ‚*amoeboid*‘ genannt wird und deren Mitglieder im aktinreichen Zellcortex in migrierenden Zellen, an Zell-Zell-Kontaktstellen und in Filopodien lokalisiert sind [Morita *et al.*, 1996; Peterson *et al.*, 1995; Fujita-Becker *et al.*, 2005]. Myosin-IC ist ein monomeres Myosin mit 1181 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 133 kDa [Peterson *et al.*, 1995]. Im Bereich der Nackendomäne besitzt es drei IQ-Motive, bei den anderen Klasse I Myosine aus *D. discoideum* sind es nur ein bis zwei. In der Schwanzregion von Myosin-IC befinden sich polybasische Bereiche, die zur Interaktion mit anionischen Phospholipiden dienen, sowie eine nukleotidunabhängige Aktinbindungsdomäne [Doberstein und Pollard, 1992; Novak und Titus, 1998]. Myosin-IC *knock-out*-Zellen weisen keinen Phänotyp auf, allerdings konnte in Doppelmutanten gezeigt werden, daß myoB⁻/myoC⁻ Zellen Defekte in der Pinozytose aufweisen [Novak *et al.*, 1995].

1.8. Ziel der Arbeit

Für Myosin-V aus Wirbeltieren wurde in kinetischen und direkten funktionalen Experimenten die Fähigkeit zur prozessiven Bewegung entlang von Aktinfilamenten nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnten bei Klasse V Myosinen aus *D. melanogaster* oder den niederen Eukaryoten *D. discoideum* und *S. cerevisiae* bisher keine Hinweise für einen ähnlichen prozessiven Mechanismus wie er für Wirbeltier Myosin-V existiert, beschrieben werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob ein Klasse V Myosin aus der sozialen Amöbe *D. discoideum* die kinetischen, strukturellen und funktionalen Voraussetzungen erfüllt, um als einzelner prozessiver Motor zu arbeiten. Um dieses Ziel zu erreichen, sollte eine umfassende kinetische Charakterisierung der Einzelschritte des ATPase-Zyklus von Myosin-Vb aus *D. discoideum* durchgeführt werden. Aus den Ergebnissen sollte abgeleitet werden, ob die notwendigen kinetischen Voraussetzungen für Prozessivität zwischen Klasse V Myosinen konserviert sind, oder ob fundamentale Unterschiede in den molekularen Mechanismen bestehen.

Die Regulation der Motoraktivität durch freie Magnesiumionen wurde in jüngster Zeit für einige wenige unkonventionelle Myosine beschrieben. Die zugrundeliegenden kinetischen Mechanismen wurden bisher jedoch nur unzureichend untersucht. Deshalb sollten diese in einer umfassenden Untersuchung des Einflusses von freien Magnesiumionen auf die kinetischen Parameter einzelner Schritte des ATPase-Zyklus von *D. discoideum* Myosin-Vb aufgeklärt werden. Daraus sollten Hinweise auf den Mechanismus der Regulation und Prozessivität von Myosin-V gewonnen werden.

Ein weiterer bekannter Regulationsmechanismus von Myosinen ist ihre Phosphorylierung an einer konservierten Position der Motordomäne. Für Klasse V Myosine ist bisher keine Regulation durch Phosphorylierung bekannt. Deshalb sollten Phosphorylierungsassays etabliert und damit die Phosphorylierung von Klasse V Myosinen untersucht werden. Durch die Identifikation einer putativen Phosphorylierungsstelle sollte die Grundlage für die Charakterisierung der Regulation von Myosin-V durch Phosphorylierung gelegt werden. Zusätzliche Erkenntnisse zur Phosphorylierung der Motordomäne von Myosinen sollten durch die Untersuchung eines weiteren Vertreters der Myosinklasse I, namentlich Myosin-IC, gewonnen werden.

Durch die Untersuchung kinetischer, struktureller und funktionaler Grundlagen für Prozessivität, Phosphorylierung und Domänenarchitektur sollten neue Aspekte der Struktur-Funktions-Verknüpfung von unkonventionellen Myosinen aufgedeckt werden.

Abkürzungsverzeichnis

A	2'Desoxyadenosin-5'monophosphat
ad	auffüllen auf
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	<i>base pairs</i> , Basenpaare
C	2'Desoxycytosin-5'monophosphat
C-	Carboxy-
CIAP	Calf Intestine Alkalic Phosphatase
C-term	C-terminales Ende
d	desoxy
<i>Dd</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
Da	Dalton
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EB	Elution Buffer
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
G	2'Desoxyguanosin-5'monophosphat
g	Gramm
h	Stunden
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
His	Histidin
(His) ₈ -tag	His-Oktapeptid
IEX	ion exchanger, Ionenaustauscher
k	Kilo
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAP	Laemmliauftragspuffer
LB	Luria Bertani
mantATP	N-Methylanthraniloyl-ATP
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MIHCK	myosin I heavy chain kinase, Myosin I Schwerkettenkinase
m	Milli
min	Minuten
N-	Amino-
Ni ²⁺ -NTA	Nickel ²⁺ -Nitrilotriacetat
OD	optische Dichte
ori	<i>origin of replication</i> (Replikationsursprung)
PAA	Polyacrylamid
PAAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAAGE	denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit SDS
T	2'-Desoxythymidin-5'-monophosphat
TAME	N α -Tosyl-L-Argininmethylesterhydrochlorid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TLCK	N α -p-Tosyl-L-Lysin-Chloromethylketon
TPCK	N-Tosyl-L-Phenylalaninchlormethylketon
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
U	Unit (Aktivitätseinheit für Enzyme)
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> , gelb fluoreszierendes Protein
μ	Micro
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprozent

Aminosäuren werden nach dem internationalen Ein- oder Dreibuchstabencode abgekürzt.
Die Abkürzung der Basen entspricht den IUB tentative rules.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Alle Chemikalien werden in höchster verfügbarer Reinheit von den Herstellern bezogen, falls anderes nicht ausdrücklich vermerkt ist.

Chemikalie	Hersteller
Aceton	J. T. Baker, Deventer, NE
Acrylamid: N,N'-Methylenbisacrylamid (30:0,8), 40%ig	Sigma-Aldrich, Steinheim
Adenosin-5'-triphosphat, Na-Salz (ATP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agar (Agar Bacteriological)	Oxoid Ltd., Basingstoke, UK
Agarose (TopVision LE GQ Agarose)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Benzamidin-Hydrochlorid	Merck, Darmstadt
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	J. T. Baker, Deventer, NE
Ethanol	J. T. Baker, Deventer, NE
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA, "Titriplex II")	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure (EGTA, "Titriplex VI")	Merck, Darmstadt
Geneticin (G418-Sulfat)	Calbiochem, Darmstadt
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Guanidiniumhydrochlorid	Merck, Darmstadt
Salzsäure, 37 %ig	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt ("BactoYeast Extract")	Becton Dickinson, Sparks, USA
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Imidazol	BDH Laboratory Supplies, Poole, UK
Isopropanol (2-Propanol)	Merck, Darmstadt
K ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Kalilauge	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumacetat	Merck, Darmstadt

2-Mercaptoethanol (β -Mercaptoethanol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	J. T. Baker, Deventer, NE
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ -Lösung, 4,9 mol/l, titriert	Sigma-Aldrich, Steinheim
MnCl ₂	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
NaN ₃	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Nickel-Nitriltriacetat-Säulenmaterial „superflow“ (Ni-NTA)	Qiagen, Hilden
NiSO ₄ · 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin-Lösung (1000 U/ml Penicillin, 200 μ g/l Streptomycin)	Gibco, Paisley, UK
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
1,10-Phenanthrolin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenylmethylsulfonsäurefluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphoenolpyruvat (PEP)	Roche, Mannheim
Phosphorsäure, 85%	J. T. Baker, Deventer, NE
Proteose-Pepton	Oxoid Ltd., Basingstoke, UK
Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
N _{α} -Tosyl-L-Argininmethylesterhydrochlorid (TAME)	Sigma-Aldrich, Steinheim
N _{α} -Tosyl-L-Lysinchlormethylketonhydrochlorid (TLCK)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduziert (NADH)	Roche, Mannheim
N-Tosyl-L-Phenylalaninchlormethylketon (TPCK)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Merck, Darmstadt

2.1.2. Geräte

Gerät

FPLC-Anlage Äkta purifier 10
 Säulen: XK16/20
 Säulenmaterial Ni-NTA superflow
 Säulenmaterial ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel
 Anionenaustauschersäule HiTrap ResourceQ
 Gelfiltrationssäule HiLoad 26/60 superdex 200 PG
 Superloop 50 und 150 ml
 Sampleloop 7.8 ml
 Peristaltische Pumpe Minipuls 2
 Pipetten 2-1000 μ l

Hersteller

Amersham Pharmacia, Freiburg
 Amersham Pharmacia, Freiburg
 Qiagen, Hilden
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Amersham Pharmacia, Freiburg
 Amersham Pharmacia, Freiburg
 Amersham Pharmacia, Freiburg
 Amersham Pharmacia, Freiburg
 Gilson, WI, USA
 Gilson, WI, USA

Spannungsquelle Power-Pac 300	Biorad, München
SDS-PAGE Apparatur Mini-Protean	Biorad, München
Western-Blot-Apparatur Trans-Blot SD	Biorad, München
Semidry Transfer Cell	
Geldokumentationssystem Chemidoc	Biorad, München
Phosphoimager BAS-1500 Imager	Fujifilm
Phosphoimagerplatten BAS-MP 2040S Imaging Plate	Fujifilm
Eraser	Raytest
Mikroskop CK 2	Olympus, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop IX 81	Olympus, Hamburg
Elektroporator Gene Pulser Xcell Electroporation System	Biorad, München
PCR-Thermoblock Px 2	Thermo Electron Corp., Boston, USA
Photometer DU 800	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Stopped-Flow Applied Photophysics Pi-Star 180	Applied Photophysics, GB
Stopped-Flow Hi-Tech Scientific SF-61SX2	Hi-Tech, GB
Orbital Shaker	Thermo Forma, MA, USA
Gyrotory Shaker G2 und G10	New Brunswick Sci., USA
Ultraschallgerät Sonoplus UW 2200	Bandelin Electronic, Berlin
Ultrazentrifuge Optima LE-80 K mit Rotoren 70 Ti und 45 Ti	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Ultrazentrifuge Optima Max mit Rotor TLA 120.1	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Zentrifuge Avanti J-20 XP mit Rotoren JLA 16.250 und JA 25.50	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Zentrifuge Avanti J-HC mit Rotor TY.JS 4.2	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau

2.1.3. Antibiotika

Folgende Antibiotika werden in der angegebenen Endkonzentration eingesetzt. In Stock-Lösungen werden die Antibiotika in 500-facher bis 2000-facher Endkonzentration in dH₂O gelöst und über einen 0,4 µm-Filter steril filtriert.

Tab. 2.1: eingesetzte Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller	Endkonzentration
Geneticin (G418-sulfat)	Calbiochem, Darmstadt	10 µg / ml
Penicillin	Gibco, Paisley, UK	10 U / ml
Streptomycin	Gibco, Paisley, UK	10 µg / ml
Ampicillin	Gibco, Paisley, UK	50 µg / ml
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim	100 µg / ml

2.1.4. Enzyme und Antikörper

Tab. 2.2: Verwendete Enzyme und Antikörper

Enzym/ Antikörper/ Protein	Hersteller
RNase A	Serva, Heidelberg
Alkalische Phosphatase (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, CIAP)	Roche, Mannheim
Monoklonaler Maus IgG-Antikörper Anti-(His) ₅ , 0,2 mg / ml, BSA-frei	Qiagen, Hilden
Ziege anti-Maus IgG, Peroxidase-gekoppelt	Biorad, München
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Myosinschwerkettenkinase (MIHCK)	Edward Korn, NHLBI, Bethesda, MD, USA
Katalytische Domäne der MIHCK	Heiner Wolfes, MHH, Hannover
λ -Phosphatase	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.5. Organismen

2.1.5.1. Bakterienstamm

XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg)

Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac
[F'proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr)]

2.1.5.2. Zelllinie

Für die Proteinexpression wird der Stamm AX3-ORF⁺ des Schleimpilzes *D. discoideum* verwendet [Manstein *et al.*, 1989]. Dabei handelt es sich um einen Stamm, der in axenischem Nährmedium kultiviert werden kann und eine ins Genom integrierte Kopie des Ddp2 ORF-Gens trägt. Dessen Genprodukt ermöglicht die Replikation von den verwendeten Derivaten des Vektors pDXA-3H [Manstein *et al.*, 1995].

2.2. Mikrobiologische Methoden

2.2.1. Transformation von *E. coli*

Der in 2.1.5.1. aufgeführte *Escherichia coli*-Stamm wird für die Amplifikation von Plasmiden benutzt. Hierzu werden die Bakterien entweder mit einem Plasmid oder mit einem kompletten Ligationsansatz transformiert. Die Transformation der kompetenten *E. coli*-Bakterien (RbCl₂-Methode, Biolabs 1996) erfolgt nach der Hitzeschockmethode:

Ca. 200 µl Bakteriensuspension (-70°C) werden aufgetaut und mit 0,1-1 µg Plasmid-DNA 20 min. auf Eis und anschließend 60 sek. bei 42°C inkubiert. Anschließend können noch 500 µl LB-Medium hinzugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert werden. Nach Abzentrifugieren der Zellen bei 2000 Upm für 4 min. werden die Zellen auf einer (bei Bedarf Amp-haltigen) Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Luria Bertani-Kulturmedium (LB) für *E.coli*

1% (w/v)	Pepton
1% (w/v)	Hefeextrakt
0,5% (w/v)	NaCl
pH 7,0	

LB^{Amp}-Agarplatten:

1% (w/v)	Pepton
1% (w/v)	Hefeextrakt
0,5% (w/v)	NaCl
2% (w/v)	Agar
50 µg/ml	Ampicillin
pH 7,0	

2.3. Zellbiologische Methoden

2.3.1. Transformation von *D. discoideum*

Die Zellen werden bei einer Dichte von 3-5 x 10⁶ Zellen/ml durch Zentrifugation bei 1100 g für 5 Minuten geerntet, zweimal mit kaltem Elektroporationspuffer gewaschen und anschließend in einer Dichte von 1 x 10⁷ Zellen/ml in EP-Puffer resuspendiert.

Anschließend werden in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß 0,8 ml der Zellsuspension mit 15-30 µg DNA auf Eis gemischt und in eine gekühlte 0,4 cm Elektroporationsküvette überführt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis werden die abgesetzten Zellen aufgeschüttelt, die Küvette von außen getrocknet und sofort bei 1,2 kV, 10 µF und 100 Ω mit einer Zeitkonstante von ~0,8 ms elektroporiert (Gene Pulser Xcell Electroporation System, Biorad, München). Danach werden die Zellen noch 5-10 Minuten auf Eis gekühlt. Es werden 200 und 600 µl auf je eine Petrischale überführt und mit je 11 ml Penicillin- und Streptomycinhaltigem HL5c-Medium versetzt. Nach 24 Stunden wird das Medium gewechselt und zur Selektion von Transformanten mit G418 versetzt (10 µg/ml).

HL5c-Medium	
10 g/l	Protease-Pepton
5 g/l	Bacto yeast extract
10 g/l	Glucose
1,2 g/l	KH ₂ PO ₄
0,4 g/l	Na ₂ HPO ₄
auf pH 6,6 mit 2 N NaOH einstellen	

EP-Puffer (Elektroporationspuffer)	
3,8 g/l	NaH ₂ PO ₄ pH 6.3
17,1 g/l	Sucrose

Bonner's Lösung	
0,6 g/l	NaCl
0,75 g/l	KCl
0,3 g/l	CaCl ₂

2.3.2. Kultivierung von *D. discoideum*

D. discoideum-Zellen werden entweder in Gewebekultur-Petrischalen oder in Schüttelkulturen bei 20°C kultiviert. Dem Kulturmedium HL5c werden zur Verhinderung von Bakterienwachstum 10 U/ml Penicillin und 10 µg/ml Streptomycin zugesetzt. Um auf transformierte Zellen Selektionsdruck auszuüben, wird dem Medium G418 zugesetzt. Die in dieser Arbeit benutzten pDXA-Vektoren enthalten das *neoR*-Gen, so dass die Transformanten mit 10 bis 20 µg/ml G418 selektiert werden können. Nicht transformierte AX3 Orf⁺-Zellen werden ohne Zugabe von G418 kultiviert.

Auf den Petrischalen lässt man die Zellen konfluent wachsen und kann sie dann für die analytische Proteinpräparation mit Medium abwaschen. Die verbleibenden Zellen werden durch Zugabe von frischem HL5c-Medium weiter kultiviert. Es ist möglich, die Platten bei Bedarf bei 4°C für einige Wochen zu lagern.

Für die präparative Proteinaufreinigung werden die Zellen in Erlenmeyer-Kolben (100 ml bis 5 l) in Schüttelkultur angezogen. Die Kolben werden maximal bis zur Hälfte mit Medium gefüllt und bei 180 rpm geschüttelt. Bevor die Zellen eine Dichte von 1 x 10⁷ Zellen/ml erreichen, werden sie auf minimal 1 x 10⁶ Zellen/ml verdünnt.

Die benutzten Wildtyp- und transformierten *Dictyostelium discoideum*-Zellen haben eine Generationszeit von 8-24 Stunden.

2.3.3. Konservierung von *D. discoideum* Sporen

Rekombinante Zellen von *D. discoideum* können in Form von Sporen bei -80°C für mehrere Jahre gelagert werden.

Für die Erzeugung von Sporen werden 50 bis 100 mL Zellsuspension einer Schüttelkultur bei einer Zelldichte von etwa 5 x 10⁶ Zellen/ml durch Zentrifugation bei 1000 g (2700 Upm in einer Heraeus Megafuge 1.0R mit Rotor #2704) für 5 min bei 4°C pelletiert. Anschließend werden sie dreimal mit MES-Puffer durch Resuspendierung und Zentrifugation gewaschen. Schließlich werden sie in 1 ml MES-Puffer resuspendiert und auf einer MES-Agarplatte ausplattiert. Die Platten werden zunächst ohne Deckel getrocknet und anschließend zwei Tage über Kopf bei 20°C inkubiert. Dann hat sich der Fruchtkörper von *D. discoideum* gebildet, der durch einen leichten Schlag der Platte auf eine Unterlage aufplatzt und die Sporen freigibt. Diese fallen in den Deckel der Platte, von dem sie mit 500 µL 10% (v/v) 0,2 µm-filtriertem

Glycerin abgespült werden. 100 µL-Aliquote dieser Suspension werden bei -80°C eingefroren und gelagert.

Um die Sporen wieder zum Keimen zu bringen, werden 100 µL Suspension in einer Petrischale mit 11 mL HL-5c mit Penicillin und Streptomycin versetzt. Selektierendes Medium mit Geneticin wird bei transformierten Zellen erst nach 24 h zugesetzt.

MES-Puffer

20 mM	MES pH 6,8
2 mM	MgCl ₂
0,2 mM	CaCl ₂

MES-Agar

2 % (w/v)	Agar in MES-Puffer
-----------	--------------------

2.3.4. Cryo-Konservierung von vegetativen Zellen

Vegetative *D. discoideum* Zellen können auch ohne Sporenbildung eingefroren werden. Dazu werden die Zellen mit kalter Bonner's Lösung gewaschen und mit einer Zelldichte $> 10^8$ Zellen/ml in HL5-c Medium mit 10% DMSO resuspendiert. Aliquots dieser Suspension werden zunächst für 2h bei -20°C gekühlt, wobei durch Umwickeln mit einem Handtuch der Kühlungsprozess verlangsamt wird. Dies ist wichtig für ein gleichmäßiges Einfrieren der Zellen. Anschließend werden die Zellen auf -80°C überführt, wobei hier eine Styropor[®]-Box ebenfalls für ein langsames Abkühlen sorgt. Die Zellen können dann bei -80°C gelagert werden.

Das Auftauen der gefrorenen Zellen sollte rasch erfolgen (in der Hand), anschließend werden die Zellen sofort in eine Petrischale mit frischem Medium überführt. Nachdem sich die Zellen abgesetzt haben (ca. 5-15 min.), wird das Medium zur Entfernung des DMSO gewechselt.

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. Plasmidpräparation

Für Plasmidpräparationen aus *E.coli* werden Materialien und Vorschrift der Firma Qiagen (Qiagen, Hilden) verwendet. Hierbei handelt es sich um die Kombinationen der alkalischen Extraktionsmethode [Birnboim und Dory, 1979] mit anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung der DNA, wodurch die Abtrennung der Plasmid-DNA von chromosomaler DNA, RNA und Proteinen möglich wird. In Abhängigkeit vom Kulturvolumen werden verschiedene, jedoch nur leicht unterschiedliche Protokolle verwendet (Puffervolumina sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt):

Minipräparation:

4 ml LB Medium werden mit einer *E. coli* Kultur angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag werden die Zellen bei 3500 g pelletiert und in Puffer P1 resuspendiert. Durch fünfminütige Inkubation mit Puffer P2 wird der alkalische Zellaufschluß durchgeführt. Nach Zugabe von Puffer N3 (Neutralisation) und nachfolgender fünfminütiger Inkubation auf Eis werden die präzipitierten Proteine und chromosomale DNA durch zehnminütige Zentrifugation (9000 rpm) abgetrennt. Das klare Lysat enthält die Plasmid-

DNA. Es wird auf eine QIAprep-spin-Säule gegeben, an die die Plasmid-DNA bindet und durch Waschen mit Puffer PE gereinigt wird. Durch Zugabe von Puffer EB wird die DNA eluiert.

Midi- und Maxipräparation:

Bei Midipräparationen beträgt das Kulturvolumen 100 ml, bei Maxipräparationen 250 bzw. 500 ml. Die Resuspension und der Zellaufschluß erfolgen analog zur Minipräparation. Die Neutralisation und Präzipitation geschehen durch Zugabe von Puffer P3 und anschließender 15-20 minütiger Inkubation auf Eis. Es folgt eine 30 minütige Zentrifugation bei 6000 g und 4°C. Zur Isolierung der Plasmid-DNA werden Qiagen tip-100- bzw. tip-500-Säulen benutzt. Diese müssen vor Gebrauch mit Puffer QBT äquilibriert werden und binden die Plasmid-DNA des klaren Lysats. Nach Waschen mit Puffer QC wird die DNA mit Puffer QF eluiert, mit Isopropanol gefällt und für 30 Minuten bei 6000 g sedimentiert. Das Pellet wird nochmals mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in EB-Puffer aufgenommen.

Mengenangaben für eingesetzte Puffer in Mini-, Midi- und Maxipräparationen:

	<u>Mini-Präp.</u>	<u>Midi-Präp.</u>	<u>Maxi-Präp.</u>
Puffer P1 [ml]	0,25	4	10
Puffer P2 [ml]	0,25	4	10
Puffer N3 [ml]	0,35	-	-
Puffer P3 [ml]	-	4	10
Puffer QBT [ml]	-	4	10
Puffer QC [ml]	-	2 x 10	2 x 30
Puffer PE [ml]	2 x 0,75 -	-	-
Puffer QF [ml]	-	5	15
Isopropanol [ml]	-	3,5	10,5
Ethanol 70% [ml]	-	2	5
Puffer EB [µl]	50	150	250

2.4.2. Restriktionsspaltung

Restriktionsspaltungen von (Plasmid-)DNA werden für analytische und präparative Zwecke durchgeführt. Hierbei werden DNA-Fragmente aus Vektoren herausgeschnitten bzw. Vektoren geöffnet (linearisiert).

Für eine Restriktionsspaltung werden, je nachdem ob es sich um einen analytischen oder präparativen Ansatz handelt, 0,5 bis 5 µg DNA, Puffer (Ansatzgröße: 10 bis 50 µl) und 5 bis 30 U Enzym eingesetzt. Der Spaltansatz wird 1 bis 4 Stunden oder über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert, anschließend mit 5 bis 25 µl Stopppuffer versetzt und auf einem Agarosegel analysiert.

Zur Restriktionsspaltung werden Restriktionsendonukleasen von den Firmen Amersham, MBI-Fermentas und New England Biolabs in den vom Hersteller angegebenen Puffern und Reaktionsbedingungen eingesetzt.

2.4.3. Dephosphorylierung von DNA

Um nach der Restriktionsspaltung von DNA eine Ligation durchführen zu können, ist es notwendig, daß zumindest auf einer der beiden zu verknüpfenden Seiten des DNA-Stranges eine Phosphatgruppe vorhanden ist. Um nach dem Restriktionsverdau die Religation des

Plasmids zu verhindern, müssen die Phosphatgruppen entfernt werden. Die benötigten Phosphatgruppen für die Ligation werden dann vom Insert bereitgestellt. Diese Spaltungsreaktion wird mit der Alkalischen Phosphatase (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*, CIAP) durchgeführt, welche in den gängigen Restriktionsendonukleasepuffern arbeitet, so daß sie direkt im Anschluß an eine Restriktionsspaltung der Reaktionsmischung zugesetzt werden kann. Alternativ kann der Spaltungsansatz auch über eine QIAquick-spin-Säule aufgearbeitet und anschließend nach Zugabe eines CIAP-Reaktionspuffers dephosphoryliert werden. Man verwendet 1 U CIAP/20 pmol DNA und inkubiert 30 min. bei 37°C. Anschließend wird die Phosphatase durch 20minütiges Erhitzen auf 85°C inaktiviert oder die DNA sofort im Anschluß an die Inkubation über ein Agarosegel aufgetrennt.

CIAP-Puffer 10x

0,1 M	Tris/HCl, pH 7,5 bei 25°C
0,1 M	MgCl ₂

2.4.4. Ligation linearer DNA

Etwa 100 bis 400 ng linearisiertes Plasmid und Insert werden im molaren Verhältnis Rahmen:Insert ~ 1:1 bis 1:5 gemischt, mit Ligasepuffer und 2 bis 10 U Ligase versetzt. Der Ansatz wird 1-2 Stunden bei 37°C (oder alternativ vier Stunden bei Raumtemperatur oder 16 Stunden bei 16°C) inkubiert. Die Gesamtmenge des Ligationsansatzes kann direkt zur Transformation von kompetenten Bakterien eingesetzt werden.

T4 DNA Ligase-Puffer 10x

400 mM	Tris/HCl, pH 7,8
100 mM	MgCl ₂
100 mM	DTT
5 mM	ATP

2.4.5. Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegele eignen sich zur präparativen und analytischen Auftrennung von DNA einer Größe > 250 bp. Bei Standardgelen, die zur Qualitätskontrolle von Plasmidpräparationen oder Restriktionsverdau oder zur präparativen Trennung von Restriktionsfragmenten dienen, wird 1 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer (= 1%iges Agarosegel) durch Aufkochen gelöst und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Plexiglaskämme formen die Probenaschen aus. Nachdem das Gel opak geworden ist, wird es mit TAE-Puffer überschichtet. Der Gellauf erfolgt über etwa eine Stunde bei 70-100 mA. Nach Färbung mit 0,04% Ethidiumbromid (10 min) und anschließender Entfärbung in Wasser (15 min) wird das Gel unter UV-Licht (312 nm) betrachtet und mit einem Videosystem dokumentiert.

TAE-Puffer (1x)

40 mM	Tris-Base
20 mM	Essigsäure
2 mM	EDTA
pH 8,0 einstellen	

Auftragspuffer für Agarosegele (MBI) 6x

50 mM	EDTA
0,25% (w/v)	Bromphenolblau
0,25% (w/v)	Xylencyanol FF
30% (v/v)	Glycerin

Längenmarker für Agarosegele

GeneRuler 1 kb DNA-Leiter, MBI-Fermentas

Der Marker enthält 14 definierte Fragmente mit einer Länge von 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, **2000**, 1500, 1000, 750, 500 und 250 Basenpaaren.

2.4.6. DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Bei dem hier beschriebenen Vorgehen handelt es sich um eine Abwandlung des QIAquick Gel Extraction Kit Protokolls:

Das zu isolierende DNA-Fragment wird unter UV-Licht aus einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel ausgeschnitten und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt (max. 400 mg). Pro 100 mg Gel werden 300 µl Puffer QG zugegeben und das Gemisch bis zur vollständigen Auflösung des Gels bei 50°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Isopropanol/100 mg Gel wird der Ansatz auf eine QIAquick-spin-Säule überführt, eine Minute zentrifugiert (10.000 g) und auf der Säule mit 700 µl PE-Puffer gewaschen. Die DNA wird mit 30-50 µl EB-Puffer oder ddH₂O eluiert. Anschließend kann mit einer 1:100-Verdünnung mittels eines UV-Spektrums die Konzentration der erhaltenen DNA-Lösung bestimmt werden ($c = E_{260} * 50 * \text{Verdünnungsfaktor}$).

2.4.7. Präparation genomischer DNA aus *D. discoideum*

Die Präparation von genomischer DNA aus *D. discoideum* erfolgt nach einem Protokoll von Charette und Cosson [Charette und Cosson, 2004]. Die isolierte genomische DNA wird als Template für präparative PCRs eingesetzt, um Gene von *D. discoideum* Myosinen zu amplifizieren und diese in Expressionsvektoren zu klonieren.

Die *D. discoideum* Zellen einer Schüttelkultur mit einer Zellzahl von $0,5-10 * 10^6$ Zellen/ml werden pellettiert und in gleicher Konzentration in frischem HL5c Medium oder Wasser resuspendiert. Dazu wird ein gleiches Volumen an Lysis-Puffer gegeben und diese Mischung für 10 min. bei RT inkubiert. Im Anschluß wird die Suspension zur Inaktivierung der Proteinase K für 1 min. auf 95°C erhitzt. Das Lysat kann direkt für die PCR eingesetzt werden (1µl Lysat für eine 25µl PCR Reaktion).

Lysis-Puffer

10 mM	TRIS-HCl pH 8,3
50 mM	KCl
2,5 mM	MgCl ₂
0.45%	NP40
0.45%	Tween 20
1 µg/µl	Proteinase K

2.4.8. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels *Polymerase Chain Reaction* (PCR) läßt sich DNA spezifisch *in vitro* amplifizieren. Die PCR wird im analytischen Maßstab zum *screenen* nach positiven Klonen bei Klonierungen und präparativ für PCR-Klonierung eingesetzt.

Für die analytischen PCR-Ansätze wird die Taq-Polymerase der Firma MBI-Fermentas eingesetzt. Die Taq-Polymerase stammt aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, sie ist hitzestabil und arbeitet mit einer Geschwindigkeit von 1000 Basen pro Minute bei einer Fehlerquote von 1×10^{-4} .

Für Klonierungen ist eine geringe Fehlerrate der Polymerase sehr wichtig, deshalb werden hierfür *proofreading*-Polymerasen, zum Beispiel aus *Pyrococcus furiosus* (Pfu-Polymerasen) oder kommerziell erhältliche Mischungen aus Taq (mit 5'->3' Polymerase Aktivität) sowie einer thermostabilen 3'->5' *proofreading* Polymerase (*Pwo*) wie das Expand High Fidelity plus PCR System (Roche) eingesetzt.

Analytische PCRs werden üblicherweise in 25 µl Volumen durchgeführt. Für präparative Ansätze kann das Volumen auf bis zu 50 µl erhöht werden.

Tab. 2.3: Beispiele typischer PCR-Ansätze

Substanz	Screen-PCR	präparative PCR
Template-DNA	<50 ng	<50 ng
dd H ₂ O	13,9 µl	28,5 µl
10x PCR-Puffer	2,5 µl	5,0 µl
dNTPs (2mM)	2,5 µl	5,0 µl
5'Primer	2,5 µl (10 pmol/µl)	5,0 µl (10 pmol/µl)
3'Primer	2,5 µl (10 pmol/µl)	5,0 µl (10 pmol/µl)
Polymerase	0,1 µl (1,0 U Taq)	0,5 µl (1,5 U Pfu)

Die Bedingungen der PCR-Reaktion variieren sehr stark und sind abhängig vom eingesetzten Template, dem Primer-Paar und dem verwendeten Enzym.

Tab. 2.4: Parameter der durchgeführten PCRs

PCR-Schritt	T [°C]	Zeit [s]
1. Einleitende Denaturierung	94	120
2. Denaturierung	94	40
3. Annealing	42-68	60
4. Elongation	72	60
Anzahl Zyklen		28-30
5. Abschließende Elongation	72	300
6. Endtemperatur	4	∞

Die gewählte Annealingtemperatur hängt von den Schmelzpunkten der eingesetzten Primer ab und muß gegebenenfalls für jedes Primerpaar optimiert werden.

2.4.9. Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
J-BamHI	5'-GGATCCACCACATCAACAATTGAAAATGGAGC-3'
SZ15	5'-GCACCAATAATTTGGCCCATTTTCATTAATAATG-3'
SZ14	5'-GAAATGGGCCAAATTATTGGTGCAAAAATTTTAGC-3'
J-XhoI	5'-CTCGAGCACTACGATCCAATTGCTCCAATCTC-3'
MJ-STED-mut-fwd	5'-GAAGAAGATTCATCATCATCAATAAATGGAATTAATACATCATCTG ACGGTATTCC-3'
MJ-STED-BstXI-rev	5'-GCACCAATAATTTGGCCCATTTTC-3'
T341E-New-rev	5'-GGTACATTATATTGTTACCTCTTTGATTAC-3'
MyoIC-1	5'-GTCGGATCCGCACAACAAAACCAGAATGGGGAAAT-3'
MyoIC-head-as	5'-TAATGCATCTCGAGTTCTTGGCATTTC AAGCTCACGAGTTTCTTCGA GAGA-3'
MIC-long_head-as	5'-TAATGCATCTCGAGTTCTTGGCATTTC AAGCTCTTGAATAATTGTTTC-3'
MIC-head-IQ-as	5'-TAATGCATCTCGAGTTCTTGGCATTTC AAGCTCACGGGTTTGAGCAC AACG-3'

2.4.10. DNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung von DNA nach Restriktionsverdau sowie von PCR-Produkten erfolgt nach dem Protokoll des QIAquick PCR Purification Kits der Firma Qiagen. Mit dieser Methode können DNA-Fragmente mit bis zu 10 kbp aufgereinigt oder Enzyme aus den Ansätzen entfernt werden. Dazu wird der PCR- oder Restriktionsansatz mit dem fünffachen Volumen PB Puffer versetzt und auf eine QIAquick Spin Säule gegeben. Diese Lösung wird bei 16.000 g zentrifugiert und die Säule dann mit 600 µl Puffer PE gewaschen. Die Elution der gereinigten DNA erfolgt mit 30 µl EB Puffer. Es werden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet.

2.4.11. TOPO-cloning und Blue-white screening

Um mittels PCR erzeugte DNA-Fragmente für die weitere Umklonierung sequenzieren und amplifizieren zu können, wird das TOPO-TA *cloning kit* (Invitrogen) und das pGEM-T Easy *cloning kit* (Promega) benutzt. Hierbei wird das erhaltene PCR-Produkt entweder über den 3'-A Überhang (bei Verwendung der Taq-Polymerase) mit dem TOPO-Vektor oder *blunt-end* (bei Verwendung von *proofreading* Polymerasen) mit dem pGEM-Vektor ligiert. Die Plasmide liegen im *kit* linearisiert vor und sind mit dem Enzym *Topoisomerase I* verknüpft, das die Ligation des DNA-Fragments erleichtert.

Der Klonierungserfolg kann über das *blue-white-screening* überprüft werden. Die Einfügung eines DNA-Fragments in den Vektor führt zu einer Unterbrechung des lacZ Genes, das für das Enzym β -Lactamase codiert. Religierte Vektoren ohne Insert exprimieren funktionale β -Lactamase, die auf mit X-Gal (Substratanalog der β -Galactosidase) versehenen Agarplatten für die Entstehung von blau gefärbten Kolonien sorgt. *E.coli*-Klone mit erfolgreich inseriertem PCR-Fragment hingegen bleiben weiß. Die Expression der β -Lactamase steht unter der Kontrolle des lac Operons, so dass den Agarplatten nicht nur 20 mg/ml X-Gal sondern auch 200 mg/ml IPTG zur Induktion der Expression zugegeben werden.

2.5. Verwendete Vektoren

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Vektoren handelt es sich um Derivate des extrachromosomalen *D. discoideum*-Vektors pDXA [Manstein *et al.*, 1995]. Zur Amplifikation dieser Vektoren wurde der *Escherichia coli* Stamm XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg) verwendet.

Die Vektoren dienen zur Expression und Aufreinigung von Proteinen in *D. discoideum*. Sie tragen den Replikationsursprung (*ori*) des *D. discoideum* high-copy-number Plasmids Ddp2. Die Expressionskassette aller Vektoren enthält den starken, konstitutiven Aktin-Promotor *act15*, ein Startcodon *upstream* der *multiple cloning site* sowie C- oder N-terminale Sequenzen für Affinitäts-Tags. Außerdem besitzen sie die *act6* Tn5 *neo*^R Kasette für die Resistenz gegen G418 zur Selektion positiver Transformanten. *Downstream* der MCS folgen *D. discoideum* Polyadenylierungs- und Terminationssignale. Zur Plasmidproduktion und Selektion in *E. coli* besitzen die Vektoren einen high-copy-number *E. coli* Plasmid Replikationsursprung sowie das bakterielle Ap^R-Gen. Diese Vektoren werden zur Expression von Myosinkonstrukten in *D. discoideum* genutzt. Nachfolgend ist eine Plasmidkarte des Ursprungsvektors pDXA zu sehen:

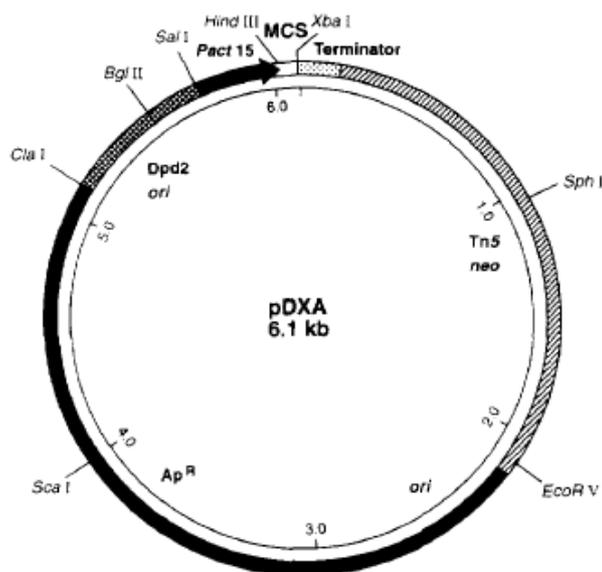


Abb. 2.1: Plasmidkarte des Vektors pDXA [Manstein *et al.*, 1995].

2.5.1. Der Vektor pDXA-3H

Dieser Vektor [Manstein *et al.*, 1995] enthält zusätzlich zu den bereits aufgeführten Merkmalen eine *downstream* der MCS gelegene Sequenz, die für ein Histidin-Oktamer codiert. Somit können C-terminal His-*tag*-haltige Fusionsproteine zur Aufreinigung mit Ni²⁺-NTA-Agarose exprimiert werden.

2.5.2. Der Vektor pDXA-3Flag

Dieser Vektor [Knetsch *et al.*, 2002] enthält anstelle des His-tags des pDXA-3H einen FLAG-Tag ist, der aus dem hydrophilen Oktapeptid DYKDDDDK besteht und vom monoklonalen Anti-Flag-Antikörper M2 gebunden wird, so daß auch hier das Protein über Affinitätschromatographie aufgereinigt werden kann.

2.5.3. pDXA-3H basierte Expressionsvektoren

In die oben beschriebenen Vektoren kann *downstream* der MCS und *upstream* des C-terminalen Affinitätstags die DNA-Sequenz für zwei α -Aktinin-Moleküle inkloniert werden. Das exprimierte Myosinkopffragment besitzt dadurch einen künstlichen Hebelarm aus zwei α -Aktinin-Molekülen mit einem C-terminalen Affinitätstag [Anson *et al.*, 1996]. Des Weiteren kann noch die Sequenz für die Expressierung des *yellow fluorescent proteins* (YFP) *downstream* der α -Aktinin-Sequenz inkloniert werden. Die so markierten Proteine können für die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden.

2.6. Proteinbiochemische Methoden

2.6.1. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Konzentration von Proteinlösungen läßt sich durch die Methode von Bradford bestimmen [Bradford, 1976]. Das Bradford-Färbereagenz enthält den Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue* G250, dessen Absorptionsmaximum sich in Gegenwart von Proteinen von 465 zu 595 nm verschiebt. Der Farbstoff bindet dabei relativ unspezifisch an kationische und hydrophobe Seitenketten. Der Vorteil gegenüber alternativen Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration wie z. B. dem BCA-Assay ist die höhere Sensitivität und Unempfindlichkeit besonders gegenüber Reduktionsmitteln. Nachteilig ist allerdings die höhere Abhängigkeit der gemessenen Absorption von der Aminosäuresequenz.

Für die Messung wird eine kleine Menge der Lösung (üblicherweise 1-20 μ l) in einer 1 ml Einwegplastikküvette mit 950 μ l Bradford-Reagenz versetzt und das Volumen wird mit Wasser auf 1 ml ergänzt. Nach Mischen und fünfminütiger Inkubation wird die Absorption bei 595 nm in einem Spektrophotometer bestimmt. Durch Erstellen einer Eichgeraden mit einer Proteinlösung einer bekannten Konzentration kann die Proteinkonzentration der gemessenen Lösung berechnet werden.

2.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration durch UV-Absorptionsmessung

Die Proteinkonzentration kann zusätzlich durch Messung der Lichtabsorption bei 280 nm bestimmt werden, welche im Wesentlichen durch die Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin verursacht wird. Der Extinktionskoeffizient eines bekannten Proteins kann daher auf Grund seiner Sequenz mit Hilfe des Programms SEDNTERP berechnet werden. Allerdings wird die Messung durch verschiedene Pufferkomponenten gestört, was sich wegen der starken

Absorption oft auch nicht durch Subtraktion eines Leerwertes des gleichen Puffers ohne das Protein ausgleichen lässt. Falls die Konzentration eines Fusionsproteins mit YFP (*yellow fluorescent protein*, gelb fluoreszierendes Protein) bestimmt werden soll, kann auch die Absorption des Fluorophors gemessen werden. Dabei ist zu beachten, dass unter Umständen wegen der Anregbarkeit durch sichtbares Licht bereits vor der Messung eine Ausbleichung stattgefunden haben kann.

2.6.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-PAGE [Laemmli, 1970] wird sowohl für die Überprüfung der Expression bei der analytischen Proteinpräparation als auch zur Reinheitsbestimmung bei der Proteinaufreinigung eingesetzt. Das Analyseigel besteht aus einem Trenngel und dem darauf aufpolymerisierten Sammelgel. Die Zusammensetzung der Teilgele ist in 2.6.4. angegeben. Es wird eine Minigelkammer benutzt. Die Proben werden vor dem Auftragen mit Laemmliauftragspuffer versetzt und 2-5 min. auf 95°C erhitzt. Der Gellauf erfolgt über ca. 1,5 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA. Das Gel wird nach dem Gellauf entweder für Western-Blots eingesetzt oder durch Aufkochen mit Coomassie-Färbelösung angefärbt, in 7%iger Essigsäure unter Aufkochen entfärbt und mit einem Videosystem dokumentiert.

2.6.4. Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli

Trenngel (10%); 10 ml Volumen:

3,3 ml	30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid
2,8 ml	1,5M Tris-HCl-Puffer, pH 8,8
1 ml	1% SDS
2,9 ml	ddH ₂ O
30 µl	TEMED
30 µl	40% APS

Sammelgel (5%); 1,5 ml Volumen:

250 µl	30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid
190 µl	1M Tris-HCl-Puffer, pH 6,8
150 µl	1% SDS
960 µl	ddH ₂ O
5 µl	TEMED
5 µl	40% APS

Proteinstandard (MBI Fermentas Protein Ladder, 10-200 kDa):

enthält 14 Fragmente definierter Größe: 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, **50**, 40, 30, 25, 20, 15, 10 kDa

Blot-Proteinstandard (MBI Fermentas Prestained Protein Ladder, ~10-200 kDa):

enthält zehn Fragmente definierter Größe: 170, 130, 100, **70**(rot), 55, 45, 35, 25, 15, 10 kDa

Blot-Proteinstandard (Amersham Pharmacia Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker):

enthält zehn Fragmente definierter Größe:

250 (blau), 160(rot), 105(grün), 75(gelb), 50(violett), 35(blau), 30(braun), 25(grün), 15(blau), 10(rosa) kDa

Laufpuffer (10x)

250 mM	Tris/HCl, pH 8,3
1,9 M	Glycin
1%	SDS

Coomassie-Färbelösung

0,2% (w/v)	Coomassie Blue R 250
0,05% (w/v)	Coomassie Blue G 250
42,6%	EtOH
5%	MeOH
10%	Essigsäure

Entfärbelösung

7% (v/v)	Essigsäure
----------	------------

Laemmliauftragspuffer (LAP) 6x

0,2 M	Tris-Base
50%	Glycerin
3%	SDS
auffüllen auf 60 ml; pH 6,8 einstellen,	
3,2%	β -Mercaptoethanol
1,6% (w/v)	Bromphenolblau

2.6.5. Western-Blot

Zur Detektion der rekombinanten Proteine nach einer analytischen Protein-Mini-Präparation werden Western-Blots nach dem Verfahren des *Semi Dry* - Blottings durchgeführt.

Hierzu wird das Acrylamidgel nach der Elektrophorese für einige Minuten in Blotpuffer gelegt und eine Nitrocellulose-Membran (Fluorotrans[®] W Membran, 2Micron, PALL oder Immobilon[®]-P, Millipore) passgenau auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Das Laemmliigel wird dann auf zwei in Blotpuffer eingeweichte passgenaue Whatman-Papiere gelegt. Die Nitrocellulose-Membran wird kurz in Blotpuffer geschwenkt und luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Den Abschluss bilden zwei weitere in Blotpuffer getränkte Whatman-Papiere. Die Blotkammer wird geschlossen und die Proteine bei 14 V für 45-60 Minuten auf die Membran geblottet. Zur Kontrolle der Blot-Effizienz kann das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt werden. Außerdem kann die Membran mit einer Lösung aus 2 % Ponceau S in 3 % TCA gefärbt werden, um die Überführung der Proteine zu überprüfen.

Die Membran wird nun für 30 min. bei RT in 10-12 ml TBST-Puffer mit 5 % Magermilchpulver inkubiert und anschließend dreimal für 10 min. mit TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (in TBST-Puffer mit 5 % Magermilchpulver verdünnt) erfolgt bei 4°C über Nacht. Unspezifisch gebundener Antikörper wird anschließend durch Waschen mit TBST entfernt (dreimal 10 min.). Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgt bei RT für eine Stunde. Es folgen wiederum drei Waschschritte in TBST für je 20 min. Der sekundäre Antikörper ist mit *Horseradish* Peroxidase gekoppelt, die mittels einer Chemolumineszenzreaktion nachgewiesen wird. Hierzu wird ein Kit von PIERCE (Super Signal Dura West Extended Duration Substrate) verwendet und die Chemolumineszenz mit Hilfe des Videodokumentationssystems Chemidoc detektiert.

TBST-Puffer

20 mM	Tris/HCl, pH 7,5
137 mM	NaCl
0.05 %	Tween-20

Blotpuffer

48 mM	Tris
39 mM	Glycin
0,03%	SDS

2.6.6. Analytische Proteinpräparation

Um transformierte *D. discoideum*-Kulturen auf die Expression des gewünschten Proteins zu untersuchen, wird eine analytische Protein-Mini-Präparation durchgeführt.

Hierzu wird das Medium einer konfluent gewachsenen Petrischale abgenommen, die Zellen mit 10-15 ml Bonner's Lösung gewaschen und in 1ml Bonner's Lösung resuspendiert. Nach Überführung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß und vierminütiger Zentrifugation bei 2500 upm (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) wird der Überstand verworfen und das Pellet nochmals mit 1 ml Lysis-Puffer gewaschen. Anschließend wird das Zellpellet in 500 µl Resuspensionspuffer resuspendiert und die Zellen nachfolgend durch Zugabe der gleichen Menge Zell-Lysis-Puffer und 45minütige Inkubation auf Eis lysiert.

Für die Untersuchung von rekombinanten Myosinkonstrukten wird nach Zentrifugation für 30 min bei 13.000 Upm bei 4°C der Überstand (cytosolische Fraktion) abgenommen und das Pellet (Zelltrümmer, Aktin, Myosin, rekombinante Myosinproteine) gewaschen, indem es in 500 µl Lysis-Puffer resuspendiert und nochmals pelletiert wird. Rekombinantes Myosin wird aus dem Pellet durch Homogenisierung mit einem Mikropistill in 40-50 µl Extraktionspuffer (enthält Mg^{2+} -ATP) extrahiert. Um die Extraktion von Myosinkonstrukten mit hoher Aktin-Affinität zu verbessern, können dem Extraktionspuffer 100-500 mM Salz (KCl oder NaCl) zugesetzt werden. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 13.000 upm und 4°C wird der Überstand (ca. 40 µl) mit 10 µl Laemmliauftragspuffer versetzt, für 2 Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend werden 10-20 µl auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

Zur Überprüfung der Effektivität der Extraktion wird das Pellet in 40 µl dH₂O resuspendiert, mit 6x Laemmliauftragspuffer aufgeköcht und ebenfalls auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

2.6.7. Puffer und Lösungen für die analytische Proteinpräparation

Bonner's Standard Solution

NaCl		0.6g
KCl		0.75g
CaCl ₂		0.3g
H ₂ O	ad.	1000 ml
Steril filtrieren		

Lysis-Puffer

50mM	Tris-HCl, pH 8,1
2,5mM	EDTA
1mM	DTT
5mM	Benzamidin

Resuspensionspuffer = Lysis-Puffer mit:

2 bis 5 U	Alkalische Phosphatase
0.02%	NaN ₃
	Proteaseinhibitormischung 1 & 2

Zell-Lysis-Puffer = Lysis-Puffer mit:

1%	Triton-X100
	Proteaseinhibitormischung 1 & 2

Extraktionspuffer = Lysis-Puffer mit:

	Proteaseinhibitormischung 1 & 2
10mM	ATP
12mM	MgCl ₂

Proteaseinhibitormischung 1 (100x in Ethanol)

10 mg/ml	TAME
8 mg/ml	TPCK
0,2 mg/ml	Pepstatin A
0,5 mg/ml	Leupeptin

Proteaseinhibitormischung 2 (1.000x in Ethanol)

100 mM	PMSF
200 mM	o-Phenanthrolin

2.6.8. Aufreinigung von Aktin aus Kaninchenmuskeln

Das für biochemische Assays und kinetische Experimente benötigte Aktin wird aus Neuseeland-Kaninchen gewonnen. Da ein sehr großer Gewichtsanteil des Muskelfleisches von Kaninchen aus Aktin und Myosin II besteht, können diese Proteine relativ einfach und in großen Mengen daraus aufgereinigt werden. Es wird für die Präparation ausgenutzt, dass Aktin bei hohen Salzkonzentrationen in Form von filamentösem F-Aktin vorliegt, Myosin II hingegen erst bei geringeren Salzkonzentrationen präzipitiert [Spudich und Watts, 1971]. Die gesamte Präparation wird bei 4°C im Kühlraum durchgeführt und alle Puffer werden vorgekühlt. Für die Präparation wird ein junges Neuseeland-Kaninchen geschlachtet und das Muskelfleisch von Rücken und Beinen wird sofort nach der Präparation auf Eis gekühlt. Dazu wird es in Plastiktüten verpackt, in einer Lage ausgebreitet und ca. 30 min auf Eis stehen gelassen. Die Sehnen werden möglichst entfernt und das zerkleinerte restliche Fleisch wird gewogen und in einen Fleischwolf gegeben. Spätere Mengenangaben beziehen sich immer auf dieses Gewicht. Das Homogenat wird in 3 Volumina Guba-Straub-Puffer extrahiert (3 l pro kg Fleisch). Während der Extraktion wird die Suspension die ganze Zeit langsam gerührt. Unter kräftigem Rühren werden 12 Volumina Wasser zugegeben und die Suspension wird anschließend durch ein Mulltuch filtriert. Der Rückstand, welcher das Aktin enthält, wird in Carbonatpuffer A aufgenommen. Das Filtrat kann für die Präparation von Myosin verwendet werden.

Der resuspendierte Rückstand wird 30 min lang gerührt. Nach Abfiltrieren durch ein feines Baumwolltuch wird der Rückstand in 1 l Carbonatpuffer B erneut resuspendiert und nach 10 min mit 10 l destilliertem, 20°C warmem Wasser verdünnt. Die festen Bestandteile werden abfiltriert, mit 2,5 l Aceton versetzt, erneut abfiltriert und wieder mit Aceton versetzt. Nach erneutem Filtrieren wird das Aceton ein bis zwei Tage lang unter der Sterilwerkbank bei Raumtemperatur abgedampft und das Pulver getrocknet. Größere Gewebebestandteile werden schließlich durch Sieben entfernt. Das so gewonnene Aceton-Pulver kann mehrere Monate bei -20°C gelagert werden.

Guba-Straub-Puffer (pH 6,6)

0,3 M	KCl
0,1 M	KH ₂ PO ₄
0,05 M	K ₂ HPO ₄

Carbonatpuffer A

4 % (w/v)	NaHCO ₃
0,1 mM	CaCl ₂

Carbonatpuffer B

10 mM	NaHCO ₃
10 mM	Na ₂ CO ₃
0,1 mM	CaCl ₂

2.6.9. Präparation von F-Aktin

Aus dem Acetonpulver kann reines F-Aktin durch wiederholtes Depolymerisieren und Polymerisieren gewonnen werden [Lehrer und Kerwar, 1972]. Es wird ausgenutzt, dass Aktin bei niedriger Ionenstärke als monomeres G-Aktin und bei hoher Ionenstärke als polymeres F-Aktin vorliegt. Zur Extraktion des G-Aktins werden 5 g Aceton-Pulver in 120 ml kaltem Aktinpuffer 30 min bei 4°C gerührt. Die Fasern werden dabei mehrmals mit einem Spatel zerkleinert. Anschließend werden faserige Bestandteile des Aceton-Pulvers entfernt, indem die Suspension durch ein Mulltuch filtriert und gepresst wird. Darauf folgt eine Zentrifugation, um restliche unlösliche Bestandteile abzutrennen (1 h, 70.000 g, 4°C, Beckman Optima LE 80k Ultrazentrifuge, Rotor 70 Ti: 30.000 rpm). Die Konzentration der Aktinlösung wird durch Messung der Absorption bei 280 nm abgeschätzt ($\epsilon_{280} = 46 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, 41,7 kDa). Die Polymerisierung des Aktins wird ausgelöst, indem die Lösung auf eine Endkonzentration von 100 mM KCl und 2 mM MgCl₂ gebracht und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wird. Danach sollte sie so viskos sein, dass Luftblasen nicht mehr aufsteigen. Durch Zentrifugation kann das F-Aktin als Pellet isoliert werden (3 h, 70.000 g, 4°C, Beckman Optima LE 80k Ultrazentrifuge, Rotor 70 Ti: 30.000 rpm). Ist es nicht vollständig klar, deutet dies auf Verunreinigungen hin. Zum Depolymerisieren wird das F-Aktin-Pellet zunächst in 50 - 100 ml Depolymerisierungspuffer mit einem Glashomogenisator resuspendiert. Durch Dialyse gegen 5 l desselben Puffers über Nacht bei 4°C wird das Salz entfernt und es kommt zur Depolymerisierung. Unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation abgetrennt (1 h, 70.000 g, 4°C, Beckman Optima LE 80k Ultrazentrifuge, Rotor Ti-70: 30.000 rpm) und die Konzentration des G-Aktins wird photometrisch bestimmt.

Für Experimente, die eine höhere Reinheit erfordern, wie zum Beispiel *in vitro*-Motilitätsassays, wird das G-Aktin wie beschrieben weitere ein bis zwei Male polymerisiert und depolymerisiert. Der letzte Polymerisierungsschritt wird in dem für das Experiment gewünschten Puffer durchgeführt. Falls das F-Aktin kein freies ATP enthalten soll, wird im letzten Schritt ein Puffer ohne ATP verwendet. G-Aktin kann nach Zugabe von 3 % Saccharose und 1 mM DTT bei -80°C gelagert werden. Nach dem Auftauen wird die Polymerisierung durch Zugabe von 3 M KCl und 1 M MgCl₂ bis zu den Endkonzentrationen von 100 mM KCl und 2 mM MgCl₂ ausgelöst. Um lange Filamente zu erhalten, wird dieser Schritt über Nacht oder länger bei 4°C durchgeführt.

Aktinpuffer

10 mM	Tris-HCl, pH 8
0,2 mM	CaCl ₂
1 mM	DTT (frisch)
0,5 mM	ATP (frisch)

Depolymerisierungspuffer

5 mM	Tris-HCl, pH 7,5
0,2 mM	CaCl ₂
1 mM	NaN ₃
0,1 mM	ATP (frisch)

2.6.10. Präparation von Pyren-markiertem F-Aktin

Für kinetische Messungen der Aktin-Myosin-Interaktion wird fluoreszenzmarkiertes Aktin benötigt. Die Präparation von Pyren-markiertem F-Aktin (Pyr-Aktin) wird nach einer Methode von Criddle *et al.* (1985) durchgeführt. Eine ungefähr 1 mg/ml konzentrierte F-Aktinlösung wird mit N-(1-pyrenyl)iodoacetamid (5 mg/ml in DMF gelöst) in einem

Verhältnis von ungefähr 0,9 % (v/v) Pyren/Aktin unter Rühren versetzt. Die Lösung wird 14 h bei RT im Dunkeln gerührt. Überschüssiger, beziehungsweise unlöslicher Farbstoff wird daraufhin bei 8000 upm 1h bei 4 °C abzentrifugiert. Das erhaltene Aktin-Sediment wird dann im gewünschten Experiment-Puffer aufgenommen und gegen diesen über Nacht dialysiert. Um eventuell vorhandene Feststoffe zu entfernen, kann das Dialysat 4 min bei 13000 upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert werden.

Die Konzentration von Pyr-Aktin wird entsprechend unmarkiertem Aktin bestimmt, wobei jedoch zusätzlich die Absorption von Pyren bei 280 nm berücksichtigt werden muß. Dazu wird zunächst die Pyren-Konzentration am Absorptionsmaximum bei 344 nm ($\epsilon_{344} = 2,33 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bestimmt [Kouyama *et al.*, 1981]. Daraufhin kann mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten bei 280 nm $\epsilon_{280} = 2,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ die Pyren-Absorption bei 280 nm errechnet und diese von der Gesamtabsorption subtrahiert werden. Die Konzentration des fluoreszenzmarkierten Pyr-Aktin liegt typischerweise bei 80-160 μM und der Markierungsgrad zwischen 60 und 90 %.

2.6.11. Präparative Aufreinigung von Myosinkonstrukten aus *D. discoideum*

Für die Aufreinigung von rekombinanten Myosinen aus *D. discoideum* im präparativen Maßstab wird im Wesentlichen entsprechend der analytischen Proteinpräparation vorgegangen (vgl. Kapitel 2.6.6.), wobei allerdings mehr Zellmaterial eingesetzt wird [Manstein *et al.*, 1995]. Im Anschluss an die Auftrennung unter Ausnutzung des *rigor*-Komplexes findet eine Affinitätsaufreinigung statt. Bei Bedarf werden weitere säulenchromatographische Trennverfahren angewandt.

12- bis 16 l Suspensionskultur der exprimierenden Zelllinie werden bei einer Dichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen / ml durch Zentrifugation geerntet (7 min, 4.000 rpm in Beckman Avanti J-HC Zentrifuge). Bei höheren Zelldichten sinkt die Aktivität des in pDXA-Vektoren vorhandenen act15-Promotors und damit auch die Konzentration des rekombinanten Myosins.

Alle weiteren Schritte erfolgen bei 4°C oder auf Eis und werden durch die Analyse von Proben durch SDS-PAGE überprüft. Die vereinigten Zellpellets werden in 0,5 l kaltem PBS gewaschen und erneut unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Anschließend wird das Nassgewicht der Zellen bestimmt (typischerweise zwischen 20 und 60 g aus 12 l Schüttelkultur) und das Pellet wird in 4 – 8 ml Lysepuffer pro Gramm Zellen vollständig resuspendiert. Zu der Suspension werden pro Gramm Zellen 2 – 4 ml Lysepuffer mit 1 % (w/v) Triton-X100, 15 μg / ml RNase A und 100 U alkalischer Phosphatase gegeben. Darin werden die Zellen durch Ultraschallbehandlung für 1 min mit dem Gerät Sonoplus der Firma Bandelin electronic, Berlin, aufgeschlossen (3/4 Zoll Spitze, 40% „power setting“, 50 % „duty cycle“). Das Lysat wird 45 min. lang auf Eis inkubiert, danach sollten unter dem Mikroskop keine intakten Zellen mehr sichtbar sein. Anschließend wird abzentrifugiert (1 h, 45.000 Upm in Beckman 45 Ti Rotor), wobei zu beachten ist, dass die Zentrifugationsgefäße vollständig gefüllt sein müssen. Die vereinigten Pellets, welche Aktinfilamente mit daran gebundenem Myosin enthalten, werden mit 60 – 100 ml Extraktionspuffer gewaschen und unter gleichen Bedingungen erneut 45 min lang zentrifugiert. Das Pellet wird in mindestens 1,6 ml Extraktionspuffer pro Gramm Zellen mit 15 mM ATP mit Hilfe eines Glashomogenisators resuspendiert. Die Aktinfilamente werden durch Zentrifugation entfernt (1h, 60.000 rpm in Beckman 70 Ti Rotor) und der Überstand wird nach Sterilfiltration durch einen Filter mit 0,45 μM Porengröße für die säulenchromatographische Auftrennung eingesetzt. Entsprechend dem verwendeten Affinitäts-tag wird der Extraktionsüberstand entweder (bei Konstrukten mit (His)₈-tag) auf eine selbst gepackte Ni-NTA-Säule (Nickel-Nitriltriacetat, Qiagen) oder (bei Konstrukten mit FLAG-tag) auf eine selbst gepackte α -FLAG-Säule (ANTI-FLAG® M2

Affinity Gel, Sigma-Aldrich) aufgetragen. Es werden XK-16/20 Leersäulen der Firma Amersham Pharmacia mit einem Innendurchmesser von 1,6 cm und einer Füllhöhe von 5 bis 15 cm verwendet, so dass sich ein Säulenvolumen (*column volume*, CV) von 10 – 30 ml ergibt.

Für den Betrieb der α -FLAG-Säule wird eine peristaltische Pumpe (Minipuls 2, Gilson) eingesetzt, alle anderen säulenchromatographischen Trennschritte werden mit dem Flüssigchromatographiesystem ÄKTApurifier 10 der Firma Amersham Biosciences durchgeführt.

Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Die Säule wird zunächst durch Spülen mit jeweils einem Volumen Imidazol- und Ni-NTA-Hochsalzpuffer und 10 Volumina Ni-NTA-Niedrigsalzpuffer äquilibriert. Die Proteinlösung wird mit Hilfe eines 50 oder 150 ml Superloops (Amersham Pharmacia) mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule geladen. Nach Waschen mit 10 CV Ni-NTA-Niedrigsalzpuffer und 5 CV Ni-NTA-Hochsalzpuffer sowie 5 CV Ni-NTA-Niedrigsalzpuffer mit 10 % Imidazolpuffer (entspricht 50 mM Imidazol) mit einer Flußrate von 3 ml/min wird das Protein durch einen Gradienten mit einem Anteil von 10 – 100 % Imidazolpuffer über 4 CV, welcher dem Ni-NTA-Niedrigsalzpuffer zugesetzt wird, bei einer Flussrate von 2 ml/min eluiert und in Fraktionen zu 1,5 ml aufgefangen. Die Fraktionen, die laut Analyse mittels SDS-PAGE das rekombinante Myosin enthalten, werden vereinigt und über Nacht gegen den für den nächsten Schritt erforderlichen Puffer dialysiert.

α -FLAG-Affinitätschromatographie

Vor der Benutzung wird die Säule mit 1 CV TBS, dann mit 3 CV 0.1 M Glycin-HCl, pH 3.5 und anschließend mit weiteren 5 CV TBS äquilibriert. Um optimale Bedingungen für die Bindung an das Säulenmaterial zu erreichen, wird der Salzgehalt der Proteinlösung zunächst auf 150 mM KCl eingestellt, dann wird die Lösung mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule geladen. Nach Waschen mit 15 CV FLAG-Waschpuffer wird das gebundene Protein durch kompetitive Verdrängung mit 5 CV FLAG-Elutionspuffer eluiert und es werden Fraktionen zu je 5 ml gesammelt. Nach Analyse mittels SDS-PAGE werden die proteinhaltigen Fraktionen vereinigt und über Nacht gegen den Puffer, der für den nächsten Reinigungsschritt benötigt wird, dialysiert.

Ionenaustauschchromatographie (*ion exchange*, IEX)

Eine weitere Aufreinigung der Proteinlösung durch Anionenaustauschchromatographie ist oft sinnvoll, da das Protein dabei gleichzeitig aufkonzentriert wird. Dazu wird eine fertig gepackte Anionentauscher-Säule von Amersham Biosciences genutzt (HiTrap Resource Q, 6 ml Säulenvolumen). Diese Säule wird nach Herstellerangaben äquilibriert und bei einer Flussrate von 1 ml/min mit der über Nacht gegen IEX-Niedrigsalzpuffer dialysierten Proteinlösung beladen. Die Säule wird mit 5 CV IEX-Niedrigsalzpuffer und 2 CV 5 % IEX-Hochsalzpuffer gewaschen. Zur Elution wird ein Gradient von 5 % bis 100 % IEX-Hochsalzpuffer über 2-6 CV genutzt. Die aufgefangenen 250 μ l-Fraktionen werden mit Hilfe einer SDS-PAGE analysiert und die gewünschten Fraktionen werden vereinigt und über Nacht gegen den erforderlichen Puffer dialysiert.

Größenausschlußchromatographie (Gelfiltration)

Soll das Protein für die Kristallisation eingesetzt werden, ist eine höhere Reinheit erforderlich. In diesem Fall folgt als letzter Reinigungsschritt eine Gelfiltration. Dazu wird gegen 2 l IEX Niedrigsalzpuffer mit 150 mM KCl über Nacht dialysiert. Für die Gelfiltration wird eine fertig gepackte Säule HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade (320 ml Bettvolumen), Amersham Biosciences, eingesetzt. Die Trennung erfolgt mit IEX Niedrigsalzpuffer mit

150 mM KCl als Laufmittel bei einer Flussrate von 2 ml/min. Maximal 5 % des Säulenvolumens an Proteinlösung werden mit Hilfe eines 7,8 ml Sampleloops aufgetragen. Die Peaks werden in Fraktionen zu je 0,5 ml aufgefangen und nach Analyse mit SDS-PAGE entsprechend vereinigt.

Konzentrierung und Lagerung der Proteinlösung

Nach dem letzten Reinigungsschritt erfolgt abschließend eine Dialyse über Nacht gegen 2 l IEX Niedrigsalzpuffer mit 3 % (w/v) Saccharose sowie ein Aufkonzentrieren der Probe mit Hilfe von Vivaspin Konzentratoren (MWcut-off = 50 kDa, Vivascience AG, Hannover). Für kinetische und funktionale Untersuchungen wird die Myosinlösung auf eine Konzentration von 2-4 mg/ml, für Kristallisationsansätze auf 7,5-15 mg/ml eingestellt. Soll das Myosin im *in vitro*-Motilitätsassay verwendet werden, wird die Salzkonzentration der Proteinlösung auf mindestens 25 mM KCl eingestellt und es werden 30 % (w/v) Saccharose zugesetzt. Abschließend wird das Protein in geeigneten Aliquots entweder in 0,2 ml Plastikreaktionsgefäßen oder in Tropfenform (~40 µl) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate-buffered saline, PBS)

8 mM	Na ₂ HPO ₄
1,8 mM	KH ₂ PO ₄
140 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
pH 7,4	

Lysepuffer

50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
2 mM	EDTA
0,2 mM	EGTA
1 mM	DTT (frisch zugeben)
5 mM	Benzamidin (frisch zugeben)
40 µg/ml	TLCK (frisch zugeben)
1 % (v/v)	Proteaseinhibitormischung 1
0,1 % (v/v)	Proteaseinhibitor 2

Proteaseinhibitormischung 1 (100x in Ethanol)

10 mg/ml	TAME
8 mg/ml	TPCK
0,2 mg/ml	Pepstatin A
0,5 mg/ml	Leupeptin

Proteaseinhibitor 2 (1.000x in Ethanol)

100 mM	PMSF
--------	------

Extraktionspuffer

50 mM	HEPES, pH 7,3
30 mM	Kaliumacetat
15 mM	Magnesiumacetat
7 mM	2-Mercaptoethanol (frisch zugeben)
5 mM	Benzamidin (frisch zugeben)
(15 mM	ATP)
(0-500 mM	KCl)

Ni-NTA-Niedrigsalzpuffer

50 mM	HEPES, pH 7,3
30 mM	Kaliumacetat
3 mM	Benzamidin (frisch zugeben)

Ni-NTA-Hochsalzpuffer

50 mM	HEPES, pH 7,3
300 mM	Kaliumacetat
3 mM	Benzamidin (frisch zugeben)

Imidazolpuffer

50 mM	HEPES, pH 7,3
30 mM	Kaliumacetat
500 mM	Imidazol, pH 7,3
3 mM	Benzamidin (frisch zugeben)

Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris-buffered saline, TBS)

50 mM	Tris-HCl, pH 7,4
150 mM	NaCl

Glycin-HCl

0.1 M	Glycin-HCl, pH 3,5
-------	--------------------

FLAG-Waschpuffer

50 mM	HEPES, pH 7,3
150 mM	Kaliumacetat
3 mM	Benzamidin

FLAG Elutionspuffer

50 mM	HEPES, pH 7,3
150 mM	Kaliumacetat
100 µg/ml	FLAG Peptid
3 mM	Benzamidin

IEX-Niedrigsalzpuffer

50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
0,5 mM	EDTA
0,2 mM	EGTA
1 mM	Magnesiumacetat
1 mM	DTT (frisch zugeben)
1 mM	Benzamidin (frisch zugeben)

IEX-Hochsalzpuffer

50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
500 mM	KCl
0,5 mM	EDTA
0,2 mM	EGTA
1 mM	Magnesiumacetat
1 mM	DTT (frisch zugeben)
1 mM	Benzamidin (frisch zugeben)

2.6.12. Phosphorylierung von Myosinen mit MIHCK

Um verschiedene Myosinkonstrukte zu phosphorylieren, wird eine Myosin I Schwereketten-Kinase aus *Acanthamoeba castellanii* verwendet (MIHCK [Brzeska *et al.*, 1999], durch FLAG-Affinitätschromatographie gereinigt; zur Verfügung gestellt von E. D. Korn). Alternativ wird mit der katalytischen Domäne der MIHCK (zur Verfügung gestellt von H. Wolfes) gearbeitet.

Die Autophosphorylierung der Kinase erfolgt durch Mischen gleicher Volumina an Kinaselösung und Autophosphorylierungspuffer und einer Inkubation der Mischung für 20 min bei 30 °C. Anschließend wird die Kinase im Verhältnis 1:50 (w/w) mit Myosinen der Klasse I bzw. 1:20 (w/w) mit Klasse V Myosinen in Phosphorylierungspuffer inkubiert. Für

analytische Ansätze (Kinase-Assay) reichen 1-3 μg Protein aus, für die präparative Phosphorylierung können bis zu 0,5 mg Protein in einem Ansatz eingesetzt werden. Die Inkubation erfolgt für 1 h bei 30°C oder über Nacht (16 h) auf Eis. Bei analytischen Ansätzen wird die Reaktion durch Mischen mit Laemmli-Auftragspuffer und Erhitzen auf 95°C gestoppt, bei präparativen Ansätzen kann das phosphorylierte Myosin entweder direkt eingesetzt werden (*in vitro* Motilitäts-Assay) oder es wird über eine Ionenaustauschersäule von der Kinase getrennt (kinetische Messungen).

Autophosphorylierungspuffer (2x)

4 mM	EGTA
200 mM	Imidazol, pH 7,0
12 mM	MgCl ₂
8 mM	ATP

Phosphorylierungspuffer:

20 mM	MOPS, pH 7,0
2 mM	ATP
2 mM	MgCl ₂
1 mM	EGTA
100mM	KCl

2.6.13. Dephosphorylierung von Myosinen mit λ -Phosphatase

Um aufgereinigte Myosinkonstrukte zu dephosphorylieren wird λ -Phosphatase (New England Biolabs, 400 U/ μl = 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) eingesetzt. Für 10 μg Myosin werden 0,1 μg λ -Phosphatase eingesetzt. Die Inkubation erfolgt in λ -Phosphatase-Puffer (mit MnCl₂) für 45 min. bei 30°C.

1x λ -PPase Puffer:

50 mM	Tris-HCl pH 7.5
100 mM	NaCl
2 mM	MnCl ₂
2 mM	Dithiothreitol
0.1 mM	EGTA
0.01 %	Brij 35

2.6.14. Kinase-Assay zur Untersuchung der Phosphorylierung von Myosinen

Um den Phosphorylierungsstatus von aufgereinigten Myosinen nach Behandlung mit MIHCK oder λ -Phosphatase detektieren zu können, wird ein Kinase-Assay durchgeführt. Dazu wird die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung des Myosins in Anwesenheit von radioaktiv markiertem ATP (γ -³³P-ATP; 0,1 μCi pro 1 μg Protein) durchgeführt. Anschließend werden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das SDS-Gel wird getrocknet und über Nacht gegen eine sensitive Phospho-Imager Platte exponiert. Im Phospho-Imager (Phosphoimager BAS-1500, Fujifilm) können phosphorylierte, also radioaktive Banden, detektiert werden.

2.6.15. Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Untersuchung von Myosinen

Um nach der Detektion einer Phosphorylierung des Myosins mit Hilfe des Kinase-Assays die Phosphorylierungsstelle zu identifizieren, bietet sich eine massenspektrometrische Untersuchung an. Ein direkter Vergleich von phosphoryliertem mit dephosphoryliertem Myosin ermöglicht dabei die Zuordnung der Peptidfragmente. Hierzu wird die Phosphorylierung/ Dephosphorylierung wie in 2.6.12. und 2.6.13. beschrieben mit jeweils 50 µg Myosin durchgeführt und das (de)phosphorylierte Protein über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Färben des Gels mit Coomassie-Färbelösung und Entfärben in 7%iger Essigsäure werden die Myosinbanden ausgeschnitten.

Die weitere Probenaufbereitung und die massenspektrometrische Analyse wird in Kooperation von T. Reinl und Dr. L. Jänsch (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) durchgeführt. Die Probenaufbereitung umfasst die Carbamidomethylierung der Cystein-Seitenketten, einen in-Gel-Verdau mit Trypsin, die Peptidextraktion aus dem PAA-Gel und das Entsalzen der extrahierten Peptide (C18-µZipTip). Die anschließende Anreicherung phosphorylierter Peptide sowie die Abreicherung nicht phosphorylierter Peptide geschieht mittels IMAC (*Immobilized Metalion Affinity Chromatography*, Affinitätschromatographie mit immobilisierten Metallionen) mit dem Phosphopeptide Isolation Kit (Pierce Biotechnology). Hierbei werden die extrahierten Peptide unter sauren Bedingungen an ein Gallium-Säulenmaterial gebunden, gewaschen und unter basischen Bedingungen eluiert.

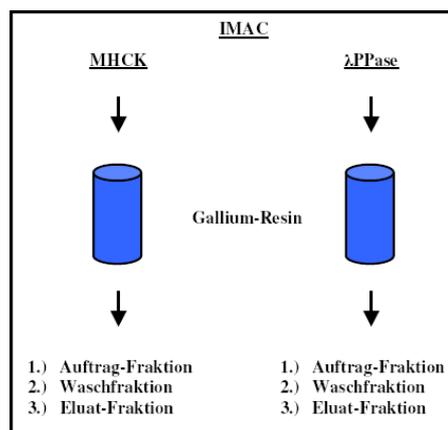


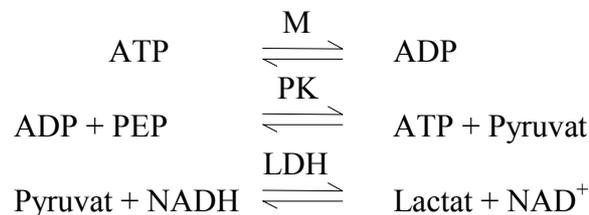
Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Aufreinigungsstrategie phosphorylierter und unphosphorylierter Peptide.

Die Auftrags-, Wasch- und Eluatfraktion werden dann mittels nHPLC (*normal phase liquid chromatography*) nach Hydrophobizität mit einem Acetonitril-Gradienten getrennt und massenspektrometrisch untersucht (nESI-Q-TOF-MS/MS, µQ-TOF, Waters). Die Auswertung der Messdaten geschieht automatisiert (Mascot-Algorithmus, MatrixScience) sowie manuell (MassLynx; Pepseq-Tool, Protein-Editor).

2.7. Biophysikalische Methoden

2.7.1. *steady-state*-Kinetik

Während der durch Myosin katalysierten Umsetzung von ATP zu ADP bleiben die spektralen Eigenschaften von Edukten und Produkten unverändert. Aus diesem Grund muß dieser Prozeß an eine Indikatorreaktion gekoppelt werden, die zum Verbrauch oder zur Bildung von chromophoren Produkten führt. Eine grundlegende Voraussetzung hierfür ist, daß keine der sekundären Reaktionsschritte geschwindigkeitsbestimmend ist, sondern die Gesamtgeschwindigkeit stets durch den zu untersuchenden Reaktionsschritt limitiert ist. Die ATPase-Aktivität von Myosin (M) wird im Fließgleichgewicht mit Hilfe von Pyruvatkinase (PK) und Laktatdehydrogenase (LDH), welche den ATP-Verbrauch mit der Oxidation von NADH koppeln, gemessen [Trentham *et al.*, 1972; Furch *et al.*, 1998]:



Die Oxidation von NADH zu NAD^+ wird dabei durch Messung der Lichtabsorption bei 340 nm verfolgt ($\epsilon_{340, \text{NADH}} = 6220 \text{ L M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Die Messungen im Fließgleichgewicht werden bei 21°C durchgeführt, die Zusammensetzung der Probelösung ist unten aufgeführt. Die Bestandteile werden gemischt und nach Zugabe von ATP in eine Küvette mit 0.5 oder 1 cm Lichtweg überführt. Die Reaktion wird bis zu 600 s lang photometrisch verfolgt.

25mM	HEPES, pH 7.3
25 mM	KCl
1-5 mM	MgCl ₂
0,5 mM	DTT
0,2 mM	NADH
0,5 mM	PEP
0,02 mg/ml	LDH
0,05 mg/ml	PK
0-80 µM	F-Aktin
0,1-1 µM	Myosin
1 mM	ATP

Aus der zeitabhängigen linearen Abnahme der Absorption wird bei bekannten Konzentrationen der Reaktionspartner die Reaktionsgeschwindigkeit des Myosins berechnet. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz kann aus der gemessenen zeitlichen Absorptionsänderung ΔA pro Minute die Änderung der NADH-Konzentration mit der Zeit berechnet werden. Die Änderung der NADH-Konzentration entspricht der Änderung der ATP-Konzentration.

$$\Delta A = \epsilon_{\text{NADH}} * \Delta[\text{NADH}] * d$$

$$\Delta[\text{NADH}] = \Delta A / (\epsilon_{\text{NADH}} * d)$$

Bei bekannter Myosin-Konzentration läßt sich nun die Geschwindigkeitskonstante des ATP-Umsatzes berechnen.

$$\text{ATPase} = \frac{-\Delta A}{60s * \varepsilon * d * c}$$

2.7.2. Stopped-Flow-Messungen

Aus *steady-state*-Untersuchungen des Aktin-Myosin-ATPase-Zyklus erhält man keine mechanistischen Informationen und kann auch keine einzelnen Zwischenschritte beobachten. Mit Hilfe von transientenkinetischen Messmethoden lassen sich diese Einzelschritte auflösen. Da ein einziger Zyklus der Aktin-Myosin-Interaktion bereits in weniger als 50 ms vollendet sein kann, sind die Einzelreaktionen zu schnell, um mit einem konventionellen Spektrometer oder Fluorimeter gemessen werden zu können. Die Bestimmung der Geschwindigkeiten der einzelnen Reaktionen geschieht durch die Messung der zeitlichen Änderung der Konzentration eines oder mehrerer Reaktionsteilnehmer. Entscheidend dafür ist, die Ausgangsstoffe entweder möglichst schnell und homogen zu durchmischen oder die Bedingungen in der Reaktionsmischung schnell so zu verändern, dass eine Reaktion initiiert wird. Zur Untersuchung schneller Reaktionen mit Halbwertszeiten unter 1 s wurden besondere Methoden entwickelt. Es lassen sich zwei Techniken unterscheiden:

- Schnelle Mischmethoden, zu denen die *continous-flow*, *stopped-flow* und *quench-flow*-Methode gehören.
- Relaxationsmethoden, dazu gehören Temperatursprung-, Drucksprung-, Konzentrationsprung (*flash photolysis*)-, elektrischer Feldsprung- und kernmagnetische Resonanzverfahren.

Im Folgenden wird die in dieser Arbeit angewandte Stopped-Flow-Technik erläutert [Chance *et al.*, 1964; Eccleston *et al.*, 1987]: Ein Stopped-Flow-Gerät ist im Wesentlichen ein Spektrometer mit einer zusätzlichen Einheit, die ein schnelles Mischen der Reaktanden zuläßt. Die Apparatur ist schematisch in Abb. 2.3 gezeigt.

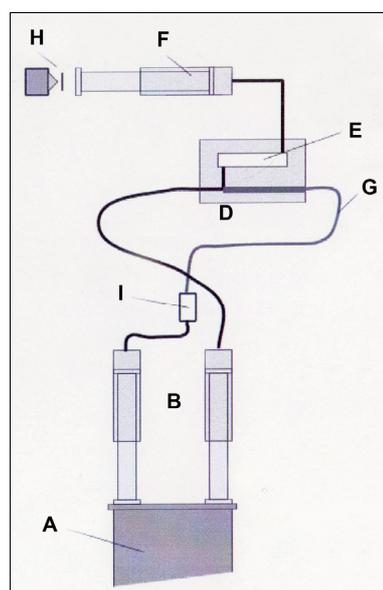


Abb. 2.3: Schematische Darstellung einer Stopped-Flow-Apparatur. Erläuterungen im Text [verändert nach: Applied Photophysics π^* -180 Spectrometer User Handbook, 2003].

In dieser Arbeit wird parallel mit zwei verschiedenen Stopped-Flow-Apparaturen gearbeitet: Applied Photophysics Pi-Star 180 und Hi-Tech Scientific SF-61SX2.

Zwei Spritzen (B) werden aus Vorratsgefäßen mit den Reaktanden befüllt. Der Fluss durch flexible Verbindungsschläuche (G) und Konnektoren (I) zu oder aus diesen Spritzen wird durch Teflon-3-Wege-Ventile kontrolliert. Die Spritzenstempel werden synchron mittels eines pneumatischen Antriebs (A) bewegt. Die Druckluft drückt die Reaktanden in die Mischkammer (D) und von dort weiter in die Meßzelle (E). Der Fluss der Reaktionslösung wird schließlich in der Stoppspritze (F) abgebremst. Der Kolben der Spritze löst bei diesem Vorgang über einen Mikroschalter (H) die Aufzeichnung des Signals mit Hilfe eines Photomultipliers aus. Ein externes Wasserbad erlaubt es, sowohl die Spritzen, als auch die Misch- und Messzellen zu temperieren. Die obere Auflösungsgrenze wird durch die Totzeit, also der Zeit zwischen dem Mischen der Lösungen und dem Auslösen der Aufzeichnung, bestimmt, die bei den verwendeten Instrumenten zwischen 1,3 und 1,5 ms liegt. Es können also Reaktionen mit Geschwindigkeiten bis zu 650 s^{-1} beobachtet werden, schnellere Reaktionen sind bereits in der Totzeit vollständig abgelaufen.

Als optisches Signal wird die zeitliche Änderung der extrinsischen oder intrinsischen Fluoreszenz eines Reaktanden während der Reaktion verfolgt. Als Lichtquelle dient dazu eine 75 W Hg/Xe -Lampe. Das emittierte Licht wird durch einen Monochromator und einen Quarz-Lichtleiter zur Beobachtungszelle geleitet. Hier wird das Licht zur Anregung einer spezifischen Fluoreszenz genutzt, der Excitationsweg beträgt 2 oder 10 mm. Das von dem Fluorophor emittierte Licht wird mit Hilfe eines passenden Filters von der Anregungsstrahlung diskriminiert und über einen Photomultiplier detektiert. Für die Tryptophanfluoreszenz wird ein WG320-Filter verwendet, der nur Licht einer Wellenlänge größer als 320 nm durchlässt. Das eingestrahelte Licht (296 nm) wird herausgefiltert und nur das emittierte Licht bei 348 nm vom Photomultiplier detektiert. Die Fluoreszenz des an Aktin gebundenen Pyrens beziehungsweise die der mant-Nukleotide wird bei 365 nm angeregt und das Emissionslicht nach Durchgang durch einen KV389 Filter registriert. Lichtstreuungsmessungen können bei jeder Anregungswellenlänge (250-700 nm) durchgeführt werden, bei der die Hg/Xe Lampe eine hohe Lichtintensität besitzt.

Das Signal des Photomultipliers wird elektronisch gefiltert und von einem PC aufgezeichnet. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses der Messungen und um Artefakte zu vermeiden, werden mindestens drei Messungen pro Lösung durchgeführt und anschließend gemittelt. Jeder Mischvorgang erfordert 35-50 μl von jeder der Lösungen. Die Reaktanden werden im Verhältnis 1:1 gemischt, ihre Konzentrationen halbieren sich also beim Mischen. Die Auswertung der Messungen, d.h. die Anpassung von Exponentialfunktionen an den Signalverlauf und die Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten und Amplituden wird sowohl mit der Software der jeweiligen Stopped-Flow-Apparatur (KinetAsyst 2.0, Hi-Tech Scientific bzw. π^* -ProData fitting tool, Applied Photophysics) als auch mit dem Programm Origin 7.0 durchgeführt.

2.7.3. *flash photolysis* Experimente

Die zweite transientenkinetische Methode, die in dieser Arbeit angewendet wird, ist die zu den Relaxationsmethoden gehörende *Flash Photolysis*-Methode [Weiss *et al.*, 2000]. Mit ihr kann die Kinetik der ATP-induzierten Dissoziation des Aktomyosinkomplexes sowie die Umsatzgeschwindigkeit k_{cat} untersucht werden.

Die Apparatur

Der Lichtblitz für die Photolyse von *caged* ATP (cATP) wird von einem 347 nm Rubinlaser (Strahldurchmesser 6 mm, Pulsenergie bis 300 mJ, Pulsdauer 20 ns) erzeugt. Der Laserstrahl wird dabei mit Hilfe einer Quarzlinse von unten in eine Quarzküvette fokussiert, welche ein Minimalvolumen von 10 μ l fasst. Die Absorption des photolysierten aci-nitro Zustandes bei 405 nm wird über den Photomultiplier 1 mit vorgeschaltetem Monochromator detektiert. Zur Messung der Streulichtintensität wird außerdem weißes Licht über eine Halogenlampe in die Probe eingestrahlt. Ein vorgeschalteter Filter, der keine Wellenlängen unter 389 nm durchlässt, verhindert dabei die vorzeitige Photolyse der ATP-Käfigverbindung durch den UV-Anteil des Lichtes. Durch den Laserpuls freigesetztes ATP induziert die Dissoziation des Aktomyosinkomplexes, welche mit einer Abnahme der über den Photomultiplier 2 im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl detektierbaren Streulichtintensität einhergeht.

Mit Hilfe von 2 digitalen Oszilloskopen werden die Signale der Photomultiplier in unterschiedlichen Zeitbereichen wiedergegeben. Die gemessenen Signale werden über eine GPIB-Schnittstelle auf einen Computer übertragen. Der schematische Aufbau der *Flash Photolysis*-Apparatur ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

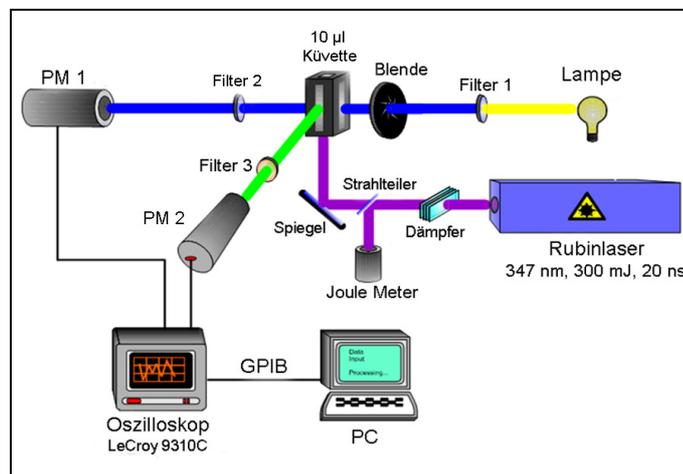


Abb. 2.4: Aufbau der *Flash Photolysis*-Apparatur (verändert nach Weiss *et al.*, 2000). PM: Photomultiplier

Vorbereitung der Proben

Zur Messung der Aktomyosin-Dissoziationskinetik wird der folgende Reaktionsansatz mit einem Volumen von 25 μ l pipettiert:

25 mM	HEPES, pH 7,3
25 mM	KCl
5 mM	MgCl ₂
10 mM	DTT
1 μ M	Myosin
1 μ M	F-Aktin (Phalloidin-stabilisiert)
0,5 mM	cATP

Vor Beginn der Messung wird die Probenlösung in der 1 mm Küvette für einige Sekunden bei 10.000 Upm zentrifugiert, um eventuelle Luftblasen und/oder Aggregate zu entfernen.

Photochemische Freisetzung von ATP aus cATP

Die ATP-Käfigverbindung cATP (*caged* ATP), die zu der Aktomyosin-Probe gegeben wird, ist ein inerter Vorläufer von ATP, der mittels eines kurzen Laserblitzes in ATP und

Nitroacetophenon photolysiert wird (siehe Abbildung 2.5). Die Reaktion verläuft über einen instabilen angeregten Zustand (*aci*-nitro Zustand), dessen Absorption bei 405 nm photometrisch gemessen werden kann. Da diese Zwischenstufe in einer protonenkatalysierten Reaktion vollständig in ATP und Nitroacetophenon zerfällt, kann aus der gemessenen Absorption auf die Konzentration an freigesetztem ATP rückgeschlossen werden. Es wird die Abnahme der Absorption beim Zerfall verfolgt. Dabei ist die Amplitude des Signals proportional zur freigesetzten Konzentration an ATP. Der experimentell bestimmte Proportionalitätsfaktor beträgt 1400 μM ATP pro $\text{OD}_{405\text{nm}}$.

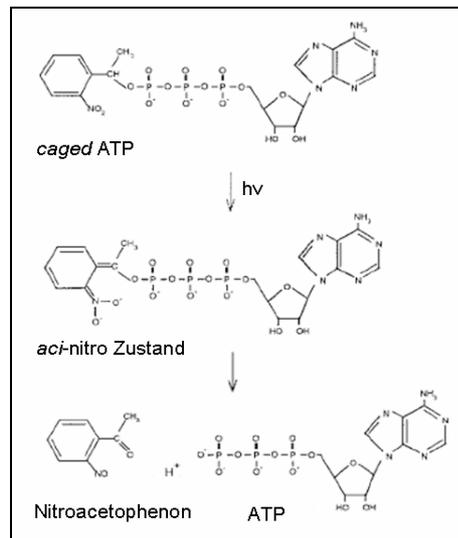


Abb. 2.5: Photolyse von *caged*ATP. Nach Einstrahlung eines Laserblitzes (347 nm Wellenlänge, Dauer 20 ns) geht das cATP in den angeregten *aci*-nitro Zustand über, der eine erhöhte Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm hat. Dieser Übergangszustand zerfällt in die Endprodukte ATP und Nitroacetophenon. Erläuterungen siehe Text (verändert nach Weiss *et al.*, 2000).

Durch das so freigesetzte ATP wird die Aktomyosin-Dissoziation ausgelöst. Um die Dissoziationskinetik des Aktomyosinkomplexes auf diese Weise untersuchen zu können, ist Voraussetzung, dass die ATP-Freisetzung schneller stattfindet als die Aktomyosin-Dissoziation. Die Freisetzungsrates von ATP aus cATP beträgt dabei $1,25 \cdot 10^9 \cdot [\text{H}^+] \text{ s}^{-1}$. Demnach findet die Freisetzung von ATP mit einer Geschwindigkeit von 63 s^{-1} bei einem hier verwendeten pH-Wert von 7,3 statt und ist damit schneller als die Dissoziation des Aktomyosinkomplexes.

Zur Berechnung der pro Laserpuls freigesetzten ATP-Konzentration aus cATP wird die folgende Exponentialfunktion mit Hilfe des Programmes Origin 7.0 an die jeweilige Absorptionskurve bei 405 nm angepasst :

$$y = y_0 + A_1 \cdot e^{-\frac{(x-x_0)}{t_1}}$$

A_1 ist dabei die Amplitude der ATP-Freisetzung und entspricht multipliziert mit dem oben erwähnten Proportionalitätsfaktor von 1400 der ATP-Konzentration.

Messung der ATP-induzierten Aktomyosin-Dissoziation

Durch das aus cATP freigesetzte ATP wird die Dissoziation des Aktomyosinkomplexes ausgelöst. Der Aktomyosinkomplex zeigt ein starkes Lichtstreusignal, welches bei Dissoziation des Komplexes zunehmend kleiner wird. Diese Änderung der Lichtstreuintensität kann detektiert und so die Reaktion zeitlich verfolgt werden. Ist die Dissoziation des Aktomyosinkomplexes abgeschlossen, dann ist das Lichtstreusignal an seinem Minimum angelangt. Myosin hydrolysiert das ATP zu ADP und Phosphat. Dabei

bleibt die Streuintensität konstant. Ist ATP vollständig abgebaut, beginnt die Reassoziierung des Aktomyosinkomplexes, welche unter Zunahme des Lichtstreusignals stattfindet. Auch diese Änderung der Lichtstreuintensität wird detektiert, so daß die Reaktion zeitlich verfolgt werden kann. Aus der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation kann die Bindungskonstante zweiter Ordnung K_1k_{+2} berechnet werden.

In Abbildung 2.6 ist der typische Verlauf des Streulichtsignals von Aktomyosin nach ATP-Freisetzung in Abhängigkeit der Zeit dargestellt.

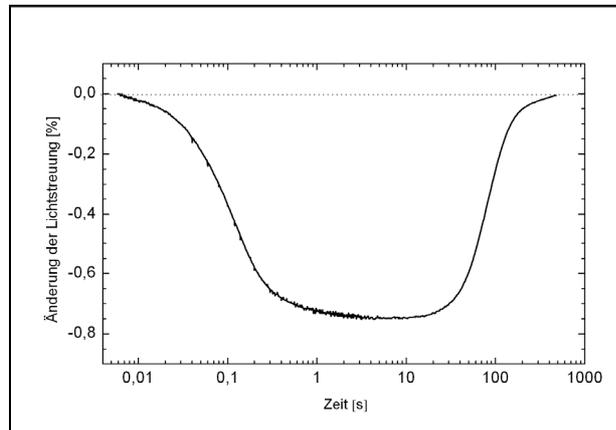


Abb. 2.6: Exemplarisches Streulichtsignal von Aktomyosin in Abhängigkeit der Zeit nach der Freisetzung von ATP aus cATP durch einen Laserpuls.

Zur Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstanten k_{obs} und der Amplitude des Streulichtsignals wird an die Dissoziationskurve eine Exponentialfunktion angepasst. Der Parameter A_1 entspricht dabei der Amplitude der Streulichtintensität, $1/t_1$ gibt die apparente Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation, k_{obs} , an. Die Auftragung von k_{obs} gegen die jeweils freigesetzte ATP-Konzentration ergibt eine Gerade, deren Steigung der ATP-induzierten Dissoziationsgeschwindigkeit K_1k_{+2} entspricht.

Bestimmung von k_{cat} durch die Reassoziationsgeschwindigkeit

Mit der Hydrolyse des freigesetzten ATP im Fließgleichgewicht wird der Überschuss an ATP gegenüber Aktin und Myosin abgebaut. Die Bildung des Aktomyosins verläuft daher nicht in einer Reaktion pseudo-erster Ordnung, und es gibt kein Modell, das diese Reaktion beschreibt. Trotzdem kann aus der Reassoziationsreaktion die Umsatzgeschwindigkeit der Gesamtreaktion bestimmt werden. Dies geschieht durch Anpassung einer Kurve, die phänomenologisch den sigmoiden Kurvenverlauf der Reassoziierung beschreibt. Dabei ist der Zeitpunkt bei halbmaximaler Reassoziierung $t_{0,5}$ interessant, weil aus seiner Abhängigkeit von der umgesetzten ATP-Menge und der Enzymkonzentration die Umsatzgeschwindigkeit k_{cat} bestimmt werden kann. Diese ist proportional zur Menge des umgesetzten ATP bezogen auf die Enzymkonzentration.

$$t_{0,5} = \tau_{cat} \frac{[T]}{[M]} = \frac{[T]}{k_{cat}[M]}$$

2.7.4. *In vitro*-Motilitätsassays

Zur Bestimmung der Geschwindigkeit, mit der Aktinfilamente *in vitro* über Myosinkonstrukte bewegt werden, wird im Wesentlichen nach einem Protokoll von Anson *et al.* [Anson, 1992] verfahren. Die Durchführung des Versuchs erfolgt in einer transparenten Durchflußzelle.

Dazu wird ein 22 mm × 50 mm × 0,15 mm Deckglas über Abstandshalter kontaktfrei auf einem Objektträger befestigt. Zur besseren Haftung der Myosinkonstrukte auf der Glasoberfläche des Deckglases wird dieses mit einer Nitrocellulosemembran beschichtet.

Zur Nitrocellulose-Beschichtung wird 1 Tropfen einer Lösung von 1 % (v/v) Nitrocellulose in Amylacetat vorsichtig auf die Wasseroberfläche eines randvoll gefüllten 2l-Becherglases gegeben. Die Wasseroberfläche wird zuvor mittels eines Parafilmstreifens, der vorsichtig von Hand über die Wasserschicht gezogen wird, von Staubpartikeln befreit. Auf eine so vorbereitete Fläche werden fünf Deckgläser blasenfrei für einige Minuten gelegt und danach mit einer Pinzette aus dem Filmverband gelöst. Die beschichteten Deckgläser werden bei RT getrocknet und innerhalb von 12 h benutzt. Zur Konstruktion der Durchflußzelle wird ein beschichtetes Deckglas mit zwei Streifen doppelseitigen Klebandes auf einem Objektträger platziert.

Die zu untersuchenden Myosinlösungen werden vor dem Einsatz im *in vitro* Motilitätsassay durch eine Aktin-Affinitätsaufreinigung von toten Myosinköpfen befreit. Dazu wird die Lösung nach Zugabe von 0,2 – 0,5 mg/ml nicht markiertem F-Aktin, 2 mM ATP und 10 mM DTT für 10 min bei 100.000 x g (54.000 Upm in Beckman TLA 120.1 Rotor) zentrifugiert. Dadurch wird nicht-funktionelles Myosin, das durch ATP nicht dissoziiert wird, entfernt, so daß es den Test nicht störend beeinflussen kann.

Zur Herstellung von fluoreszenzmarkiertem F-Aktin wird dieses auf eine Konzentration von 2 µM verdünnt und mit 3 µM TRITC-Phalloidin versetzt. Das Phalloidin lagert sich dabei an Aktin in seiner filamentären Form an und ist kovalent mit dem Fluorophor Tetramethylrhodamin-B-isothiocyanat verknüpft. Anschließend wird die Mischung gevortext und über Nacht unter Lichtausschluß auf Eis inkubiert.

Für die Durchführung des Gleitfilamentassays kann die Durchflußzelle zunächst mit Antikörper beschichtet werden, um eine bessere und gerichtete Bindung der Myosinmoleküle zu erreichen. Dazu werden 10 µl einer Lösung von 0,05 mg/ml αHis5-Antikörper in AB-Puffer in die Durchflußzelle gegeben und für 5 min. inkubiert. Anschließend werden 2 Volumina einer Blockierungslösung (V) mit 10 mg/ml BSA zugegeben, um eine Adsorption der Myosine an ungebundene Nitrocellulose zu vermeiden. Weitere 2 min später wird mit 2 Volumina BSA-Lösung (I) gespült.

Zum Beladen werden 10 µl einer Myosinlösung mit einer Konzentration von 0,1–1 mg/ml in die Durchflußzelle gegeben. Im Falle einer vorherigen Antikörperbeschichtung wird nach 5 min, ansonsten nach 2 min mit 2 Volumina BSA-Lösung (I) gespült. Denaturierte Myosinköpfe werden durch 2-minütige Inkubation mit 2 Volumina einer Lösung von 2 µM unmarkiertem F-Aktin in BSA-Lösung und anschließendem Spülen mit 2 Volumina einer ATP-Lösung (IV) und 2 Volumina BSA Lösung (I) blockiert. Danach werden 2 Volumina einer 1:100-Verdünnung des TRITC-markierten F-Aktins mit BSA-Lösung hinzugegeben und 2 min später wird mit je 2 Volumina BSA-Lösung (I) und Antibleichlösung (II) gespült. Jetzt wird die Dekoration der Oberfläche mit fluoreszierenden Aktinfilamenten unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft. Nach Infusion einer ATP-haltigen Antibleichlösung (III) kann die Bewegung der Filamente mikroskopisch beobachtet werden.

Für den *in vitro*-Motilitätsassay wird das Fluoreszenzmikroskop IX 81 von Olympus mit dem Objektiv PlanApo 100x mit einer numerischen Apertur von 1,4 genutzt. Die Aufnahmen der Gleitfilamentassays werden mit den CCD-Kameras „C8484“ und „EB-CCD C7190“ der Firma Hamamatsu Photonics, Herrsching gemacht. Zur Beobachtung von TRITC- oder YFP-Fluoreszenz werden ein Excitationsfilter mit maximaler Transparenz bei einer Wellenlänge von 545 nm bzw. 500 nm und die Kombinationen „Cy3/Cy5“ bzw. „CFP/YFP“ als Emissionsfilter und dichroischem Spiegel verwendet.

Die erhaltenen Bildsequenzen werden mit dem Programm DiaTrack 3.0 der Firma Semasopht aus Chavannes (Schweiz) ausgewertet. Die mittleren Geschwindigkeiten der Filamente entlang der Trajektorien („Flugbahn“ der Mittelpunkte der Filamente) werden in einem

Histogramm dargestellt und eine Gaußfunktion daran angepasst. Der Mittelpunkt der Gaußkurve entspricht dabei der Bewegungsgeschwindigkeit der Aktinfilamente entlang der immobilisierten Myosinmoleküle, während die Halbwertsbreite der Verteilung zur Abschätzung der oberen Grenze des Fehlers genutzt wird. Der tatsächliche Fehler liegt allerdings in den meisten Fällen erheblich darunter.

AB-Puffer

25 mM	Imidazol (pH 7,4)
25 mM	KCl
0-10 mM	MgCl ₂
1 mM	EGTA
10 mM	DTT

BSA-Lösung (I)

0,5 mg/ml BSA in AB-Puffer

Antibleichlösung (II)

5 mg/ml	Glucose
0,1 mg/ml	Glucoseoxidase
0,02 mg/ml	Katalase

in BSA-Lösung (I)

Antibleichlösung mit ATP (III)

4 mM	ATP
------	-----

in Antibleichlösung (II)

ATP-Lösung (IV)

2 mM	ATP
------	-----

in BSA-Lösung (I)

Blockierungslösung (V)

10 mg/ml	BSA
----------	-----

in AB-Puffer

2.7.5. Kristallisationsansätze

Die Kristallisation verschiedener Myosinkonstrukte erfolgt bei 4°C über Dampfdiffusion im *Sitting-Drop*- und im *Hanging-Drop*-Verfahren. Zur Bestimmung der Kristallisationsbedingungen wird ein High-Throughput Myosin-Fusions-Screen (MFS-HT, Fedorov *et al.*, nicht publiziert) eingesetzt. Auf einer 96-well-Platte von Hampton-Research, Aliso Viejo, USA, wird dabei zeitgleich eine große Anzahl von Pufferkonditionen getestet. 1-2 µl Proteinlösung einer Konzentration von 8-15 mg/ml werden dazu mit der gleichen Menge der Reservoir-Lösung gemischt. Im *Hanging-Drop*-Verfahren werden größere Proteinmengen mit 5 µl Lösung eingesetzt.

Kristalle werden nach Eintauchen in Cryoprotectant-Lösung in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufnahme der Röntgenstreuung erfolgt am Synchrotron DESY/EMBL, Hamburg, Beamline X-11 sowie am Synchrotron ESRF, Grenoble, Beamline ID 13 und 14-2.

3. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den kinetischen Mechanismus des ATPase-Zyklus von *D. discoideum* Myosin-Vb aufzuklären. Es sollte untersucht werden, ob Myosin-Vb die kinetischen Voraussetzungen erfüllt, als prozessives Myosin zu funktionieren. Auf der Grundlage der erhaltenen Daten sollte ein kinetisches Modell der Prozessivität von Klasse V Myosinen entworfen werden, mit dem die gängigen Modelle getestet und erweitert werden können.

Dazu wurden zunächst entsprechende Motordomänenkonstrukte und Motordomänenkonstrukte mit künstlichem Hebelarmen mit Hilfe des *Molecular-Modeling* entworfen. Anschließend wurden entsprechende Expressionsvektoren kloniert, in *Dictyostelium discoideum* Zellen exprimiert und mittels unterschiedlicher chromatographischer Verfahren aufgereinigt. Mit diesen Konstrukten wurde zuerst die ATPase-Aktivität von Myosin-Vb im Fließgleichgewicht charakterisiert und anschließend wurden die Geschwindigkeits- und Gleichgewichts-konstanten der wesentlichen Einzelschritte des ATPase-Zyklus transientenkinetisch bestimmt. Mit der Modifikation der Prozessivität von Myosin-Vb durch die Konzentration an freien Magnesiumionen sowie durch Phosphorylierung wurden mögliche Regulationsmechanismen untersucht.

3.1. Homologien von Myosinen der Klasse V mittels Primärsequenzanalyse

Das in dieser Arbeit untersuchte Genprodukt des *Dictyostelium discoideum* myoJ Gens (DictyBase ID: DDB0185050; www.dictybase.com [Kreppel *et al.*, 2004]) ist bisher nicht funktional oder kinetisch charakterisiert worden. Lokalisierungsstudien weisen auf eine Funktion an der kontraktile Vakuole hin. Das Myosin wurde aufgrund von phylogenetischer und struktureller Zuordnung als Myosin der Klasse V bzw. XI klassifiziert [Hammer III. und Jung, 1996; Peterson *et al.*, 1996]. Basierend auf einem *multiple sequence alignment* von über 1700 Myosin-Motordomänen wird es nach einer neueren Studie als Myosin-Vb bezeichnet [Kollmar, 2006]. Es hat eine ähnliche Domänenstruktur wie die bekannten Myosine der Klasse V sowie die der Klasse XI zugehörigen Pflanzenmyosine (siehe Abbildung 3.1). Da sich *Dictyostelium* allerdings nach den Pflanzen vom Stammbaum der Pilze/ Metazoen separiert hat und aufgrund der Sequenzanalyse näher mit den Myosinen der Klasse V verwandt ist, wird Myosin-Vb der Klasse V zugeordnet.

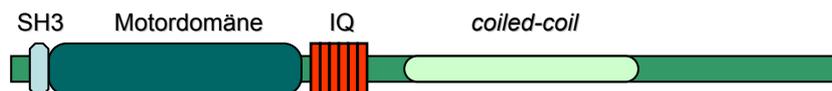


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von *D. discoideum* Myosin-Vb. Die Primärsequenz hat eine Länge von 2249 Aminosäuren, auf die Motordomäne entfallen die Aminosäuren 1 bis 839.

Um eine weitere Klassifizierung von *D. discoideum* Myosin-Vb zu ermöglichen, wurde eine umfassende vergleichende Primärsequenzanalyse mit einem *Multiple Alignment* durchgeführt und diese mit Informationen aus Sekundärstruktur-Daten ergänzt. Dazu wurde die Primärsequenz der Motordomäne von *D. discoideum* Myosin-Vb auf Sequenzhomologien mit den Motordomänen von *D. discoideum* Myosin-Va [Titus *et al.*, 1994; Kreppel *et al.*, 2004],

H. sapiens Myosin-Vb, *G. gallus* Myosin-Va, *S. cerevisiae* Myosin-2p und Myosin-4p sowie *D. melanogaster* Myosin-V und Myosin-VIIb untersucht. *G. gallus* Myosin-Va und *D. melanogaster* Myosin-VIIb dienen dabei als Beispiele für prozessive Motoren, während *D. melanogaster* Myosin-V sowie beide Klasse V Myosine aus Hefe bisher als nicht prozessive Myosine eingestuft werden.

D. discoideum Myosin-II ist ein kinetisch umfassend untersuchtes konventionelles Myosin. Es ist kinetisch dafür optimiert, im Verband mit vielen Molekülen als nichtprozessives Myosin zu funktionieren. Daher wurde die Sequenz der Motordomäne von Myosin-II ebenfalls in das *Multiple Alignment* mit einbezogen, um die wesentlichen sequentiellen Unterschiede hervorzuheben.

Die Abbildungen 3.2-3.4 zeigen Auszüge aus dem *Multiple Alignment* von *D. discoideum* Myosin-Vb (Dd_MVb, rot markiert) und heben besondere Sequenzbereiche hervor. Der Schleife-1-Bereich von *D. discoideum* Myosin-Vb ist 18 Aminosäuren länger als der von *D. discoideum* Myosin-Va und sogar zwischen 22 und 30 Aminosäuren länger als die Schleife-1 der anderen Klasse V Myosine. Er befindet sich im Bereich der Nukleotidbindungstasche an der Proteinoberfläche der *upper 50 kD* Domäne und wird mit der Modulation der ADP-Freisetzung in Verbindung gebracht [Spudich, 1994; Sweeney *et al.*, 1998; Kurzawa-Goertz *et al.*, 1998; Murphy und Spudich, 1998; Clark *et al.*, 2005].

		p-Schleife	Schleife-1
Dd_MII	179	GESGAGKTENTKKVIQYLASVAG---- <td>VLEQQILQANPILEAFGNAK</td>	VLEQQILQANPILEAFGNAK
Dd_MVb	174	GESGAGKTETTKFLLQYFAAMGNMKESTSSSSINGINTSSDGI PVTPPPSPMKKS PVDKSVEER VLESTPLLEAFGNAK	
Dd_MVa	154	GESGAGKTETTKFLLQYFAAMGEKGNVNTS-----	LISEEDIVEGNNIETQVIKSTPPILEAFGNSK
Hs_MVb	163	GESGAGKTVSAKYAMRYFATVG-----GSASSE-----	TNIEKVLASSPIMEAIGNAK
Gg_MVa	163	GESGAGKTVSAKYAMRYFATV-----SGSASEAN-----	VEEKVLASNPFIMESIGNAK
Sc_M4p	165	GESGAGKTVSAKYIMRYFASVQEE-----SN-----	NREGEVMSQIESQIILATNPIMEAFGNAK
Sc_M2p	164	GESGAGKTVSAKYIMRYFASVEEEE-----NSA-----	TVQHQVEMSETEQKILATNPIMEAFGNAK
Dm_MV	164	GESGAGKTVSAKYAMRYFAAVG-----GSESE-----	TQVERKVLASSPIMEAFGNAK
Dm_MVIIb	159	GESGAGKTESTKLILQYLAAIS-----GKH-----	SWIEQQIIEANPIMEAFGNAK

Abb. 3.2: Vergleich der Sequenzen der Motordomänen von *D. discoideum* Myosin-II, Klasse V Myosinen verschiedener Organismen sowie *D. melanogaster* Myosin-VIIb im Bereich von Schleife-1.

Die in der primären Aktinbindungsstelle im Bereich der CM (*cardiomyopathy*)-Schleife liegende TEDS-Stelle, 16 Aminosäuren *upstream* der hochkonservierten DALAK Sequenz, enthält bei allen hier aufgelisteten Myosinen eine negativ geladene Aminosäure (Glutamat, bei *D. discoideum* Myosin-II Aspartat) [Bement und Mooseker, 1995]. Sie werden demnach in ihrer konstitutiv aktivierten Form exprimiert und benötigen keine Phosphorylierung der TEDS-Stelle. Im Bereich von Schalter II haben alle Klasse V Myosine ein hochkonserviertes Tyrosin. Es wird vermutet, daß dieses eine wichtige Rolle bei der Koordinierung des Mg^{2+} ADP in der Nukleotidbindungstasche spielt (unveröffentlichte Daten). *D. discoideum* Myosin-II trägt an dieser Stelle ein Serin, *D. melanogaster* Myosin-VIIb ein Phenylalanin.

		TEDS-Stelle	DALAK	Schalter II
Dd_MII	387	SVLEKALMEPRILAGRDVLAQHNLNVEKSSSSRDALV	KALYGRFLWLWVKINNVLQERKA-----	YFNGVLDISGFIEI
Dd_MVb	415	DELLNSMLTRKVVTKESY ISHNTKERANARD DSL SMFLYGMFDLWLVVKINSSMS-ISTQQKSKS--	FIGVLDIYGFES	
Dd_MVa	415	DSLKSTFCSRKMKAGNESY	TINHTVEQASQARD DSL SMFLYSRFLDWLVVRINQSIDRIGTEKKDNSFLFIGILDIYGFES	
Hs_MVb	370	SQMEHWLCHRKLVTTS	ETYVKTMSLQQVINARNALAKHIYAQLFGWIVEHINKALHTSLKQ-----	HSFIGVLDIYGFET
Gg_MVa	369	EEMAHWLCHRKLATAT	ETIKPISKLHAINARDALAKHIYANLFWIVDHNKALHSTVQ-----	HSFIGVLDIYGFET
Sc_M4p	376	FNFAKWIVKKQIVTRS	EKIVTNLNYQALIARD DSV AKFIYSTLFDWLVDNINKTLYDPELDQDHFVFIGILDIYGFES	
Sc_M2p	377	YNFAKWVTKKQIITRS	EKIVSNLNYQALVAK DSV AKFIYSALFDWLVENINTVLCNPVAVN--	DQISSFIGVLDIYGFES
Dm_MV	379	DDLRRWLLMRKIESVNE	YVLIPNSIEAAQAARDALAKHIYAKLFQYIVGVLNKS LNNGSKQ-----	CSFIGVLDIYGFET
Dm_MVIIb	367	SALNAALTQRTIFVHGE	HVTTLSKEAAIEGR DAFV KSLYDGI FVRIVRRINETINKQVDQP----	MNSIGVLDIYGFEN

Abb. 3.3: Vergleich der Sequenzen der Motordomänen von *D. discoideum* Myosin-II, Klasse V Myosinen verschiedener Organismen sowie *D. melanogaster* Myosin-VIIb im Bereich von CM-Schleife und Schalter II.

Der Schleife-2-Bereich, der wie die CM-Schleife ebenfalls im Bereich der Aktin-bindenden Regionen liegt, ist in allen Klasse V Myosinen verlängert. Die Sequenzen von Schleife-2 sind wenig konserviert. Klasse V Myosine besitzen in Schleife-2 eine große Anzahl positiv geladener Aminosäuren (Arginin, Lysin), die, wie aus einigen Interaktionsstudien mit Mutationskonstrukten hervorgeht, mit negativ geladenen Aminosäureresten von F-Aktin interagieren [Furch *et al.*, 1998; Joel *et al.*, 2003; Yengo und Sweeney, 2004; Kremontsova *et al.*, 2006]. Die hohe und konzentrierte positive Nettoladung in diesem Bereich, welche zwischen +3 und +5 variiert, ist für die hohe Affinität zu Aktin maßgeblich. Allerdings ist dieser Zusammenhang bei einigen unkonventionellen Myosinen nicht nachweisbar, da z. B. Myosin-VIIb im Schleife-2 Bereich eine Nettoladung von -1 trägt und dennoch eine sehr hohe Aktin-Affinität von 35 nM (in Anwesenheit und Abwesenheit von ADP) aufweist.

		Schleife-2	Σ Ladung
Dd_MII	609	T K LFN-----D-----PNIAS R K K GANFITVAAQYKEQLASLMATLETTNPHFVRCI	+3
Dd_MVb	637	K VLM S HSD--- K FTQSPGGHPQGGNGPSSNT K GTS G SSSM K FLSVGSQFSTSLATLMKTI S TTTPHYVRCI	+3
Dd_MVa	640	TNLFQILS--- K KMNGGGTSGGGGAGGN K ASSAAG K STF K F S VSSQF K ESLNSLMTTINSTNPHYIRCI	+5
Hs_MVb	589	ADLFH D K --DVPATTPG K GSS K LSV R SARPPM K VSN K H K TVGHQFRTSLHLLMETLNATTPHYVRCI	+3
Gg_MVa	590	PELFQ D E E K AISPTSATPSGRVPLSRTPV K PA K ARPGQTS K H K TVGHQFRNSLHLLMETLNATTPHYVRCI	+4
Sc_M4p	603	K QILD-----N R EL S DDAPEE Q NT E K RIMIPARLSQ K PTLGS M F K SLGELMAIINSTNVHYIRCI	+1
Sc_M2p	602	INILEGLE--- K --AA K L E E A K L E L E QAGS K K PGPIR T VNR R K PTLGS M F K SLIELMNTINSTNVHYIRCI	+3
Dm_MV	598	K QVMTLEE--IDTLCV D SA K SSTLGG R VVISAG R QVVPS K H R K TVGSQFQESLASLISTLHATTPHYVRCI	+4
Dm_MVIIb	589	VDIFP-----H E MPMD T A K K QPTLCVKFRNSLDMLMRTLSQAH P F I R C I	-1

Abb. 3.4: Vergleich der Sequenzen der Motordomänen von *D. discoideum* Myosin-II, Klasse V Myosinen verschiedener Organismen sowie *D. melanogaster* Myosin-VIIb im Bereich von Schleife-2. Basische Aminosäuren (positiv geladen, Lysin und Arginin) sind rot markiert und grau hinterlegt, saure Aminosäuren (negativ geladen, Aspartat und Glutamat) sind blau markiert. Rechts ist die Nettoladung aller Aminosäuren im Schleife-2-Bereich angegeben.

Die dritte Kontaktstelle zum F-Aktin liegt in einem Helix-Schleife-Helix Bereich der unteren 50 kDa Domäne, der konservierte negative Ladungen trägt, die von hydrophoben Bereichen flankiert werden. Während bei *D. discoideum* Myosin-II hier nur zwei negativ geladene Aminosäuren liegen (D530, E531, Q532), tragen alle Klasse V Myosine sowie *D. melanogaster* Myosin-VIIb an dieser Position das gleiche Triplet negativ geladener Aminosäuren (DEE). Durch Mutationsstudien wurde gezeigt, daß negative Ladungen in diesem Bereich die Affinität zu Aktin stark erhöhen [Milligan, 1996; Furch *et al.*, 2000].

Anhand der Sequenzvergleiche läßt sich vermuten, daß es sich bei *D. discoideum* Myosin-Vb um ein ungewöhnliches Klasse V Myosin handeln könnte. Der vergrößerte Schleife-1-Bereich läßt sich in keinem anderen Klasse V Myosin finden. Es ist daher von Interesse, inwiefern dieser Bereich Einfluß auf die Geschwindigkeit der ADP-Freisetzung und die Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten hat. Für Myosin-II konnte gezeigt werden, daß Mutationskonstrukte und Chimären mit längeren Schleife-1-Bereichen eine höhere ADP-Freisetzungsgeschwindigkeit und Motoraktivität aufweisen [Spudich, 1994; Sweeney *et al.*, 1998; Kurzawa-Goertz *et al.*, 1998]. Die ungewöhnliche Verteilung der Ladungen in der zweiten Oberflächenschleife, dem aktinbindenden Schleife-2 Bereich, könnte ebenfalls ein besonderes kinetisches Verhalten im Vergleich zu anderen Klasse V Myosinen zur Folge haben. Eine umfassende kinetische Charakterisierung von *D. discoideum* Myosin-Vb wird zeigen, ob aus diesen sequentiellen Unterschieden auch Änderungen bei der Interaktion mit Nukleotiden und Aktin resultieren.

3.2. Darstellung der Expressionsvektoren für *D. discoideum* Myosin-Vb

Für die Klonierung der Expressionsvektoren der Myosin-Vb Konstrukte wurde zunächst die für die Motordomäne codierende DNA mittels PCR aus frisch isolierter genomischer DNA von *D. discoideum* AX2-Zellen amplifiziert. Die Gesamtsequenz wurde dazu in zwei Teilen amplifiziert, die über eine *Bst*XI Schnittstelle ligiert werden konnten. Als Primer wurden für den 5' Teil (950 bp) die Oligonukleotide J-BamHI und SZ15, für den 3' Teil (1740 bp) SZ14 und J-XhoI eingesetzt (s. 2.4.9.). Die PCR-Produkte wurden zunächst in einen pGEM-Vektor kloniert. Dies erleichterte das spätere Umklonieren sowie die Sequenzierung der PCR-Produkte. Die Sequenzierung von mehreren unabhängigen Klonen ergab folgende Abweichungen zu den zwei veröffentlichten Sequenzen des myoJ-Gens (NCBI accession number: U42409 bzw. DictyBase ID: DDB0185050), das für Myosin-Vb in *D. discoideum* codiert [Hammer III. *et al.*, 1996 (NCBI)/ Kreppel *et al.*, 2004 (DictyBase)]: L/F191F, S/S276Q, A/T284A, G/R291R und N/K550K.

Die für die Motordomäne codierende Sequenz (2690 bp) wurde über die Schnittstellen *Bam*HI und *Xho*I in die Vektoren pDXA-3H und pDX-3FLAG kloniert, um C-terminal mit einem His₈- bzw. FLAG-tag fusionierte Myosinkopfkonstrukte exprimieren zu können [Manstein *et al.*, 1995; Knetsch *et al.*, 2002]. Die exprimierten Myosin-Motordomänen bestehen aus den Aminosäuren 1 bis 839 und dem jeweiligen Affinitäts-tag. Sie werden als MVb-His bzw. MVb-FLAG bezeichnet, um zu kennzeichnen, daß es sich um Motordomänenkonstrukte handelt.

Für *in vitro* Motilitätsmessungen wurde ein Konstrukt mit einem Hebelarm benötigt. Dies wurde bestehend aus einer Motordomäne und zwei Wiederholungen des Proteins α -Aktinin mittels *Molecular-Modeling* entworfen und kloniert (vgl. Kapitel 1.3.3.). Jede α -Aktinin-Untereinheit besteht aus 121 Aminosäureresten und hat eine superspiralisierte Struktur, die aus drei α -Helices besteht und eine sehr dichte und stabile Einheit von etwa 6 nm Länge bildet [Parry *et al.*, 1992; Kliche *et al.*, 2001].

Für die Klonierung wurden die Vektoren für die Expression der Motordomänenkonstrukte (s.o.) mit *Xho*I und *Sph*I geschnitten und ein DNA-Fragment aus dem Vektor pM765-2R, das für zwei α -helikale Wiederholungen („2R“) des Proteins α -Aktinin codiert und durch Restriktionsverdau mit *Xho*I und *Sph*I erhalten wurde, einkloniert [Anson *et al.*, 1996]. Zusätzlich wurde ein Konstrukt verwendet, das einen verlängerten Hebelarm aus zwei α -Aktinin-Wiederholungen sowie einem Spektrin-Rest („3R“) trägt und das am C-terminalen Ende mit YFP markiert ist. Die exprimierten Myosinkonstrukte werden der Einfachheit halber als MVb-2R bzw. MVb-3R-YFP bezeichnet.

An der TEDS-Stelle befindet sich bei Myosin-Vb ein Glutamat (s.o.). Die TEDS + 1 Position enthält des weiteren einen Serinrest, der eine potentielle Phosphorylierungsstelle darstellt. Durch Phosphorylierung ließe sich in diesem Bereich eine weitere negative Ladung einbringen. Um die Folgen einer möglichen Phosphorylierung untersuchen zu können, wurde mittels zielgerichteter Mutagenese ein Konstrukt generiert, bei dem das Serin 432 zu Glutamat verändert wurde (MVb-S432E-His).

Es wurden weiterhin Vektoren mit einem Resistenzgen für G418 für die Expression der Motordomäne von *D. discoideum* Myosin-II (M761-FLAG) sowie der Motordomäne mit einem künstlichen Hebelarm (M765-2R-His), die mit einem entsprechenden Affinitätstag versehen wurden, eingesetzt, um die entsprechenden Proteine rekombinant exprimieren und aufzureinigen zu können.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Expressionsvektoren und das jeweils exprimierte Protein in Anlehnung zum jeweiligen experimentellen Vorhaben.

Tab. 3.1: Übersicht der verwendeten Expressionsvektoren

Bezeichnung	Exprimiertes Protein	Verwendung
pMVb-His	Motordomäne von Myosin-Vb	Kinetik
pMVb-FLAG	Motordomäne von Myosin-Vb	Kinetik, <i>flash-photolysis</i> -Experimente, Kristallographie
pMVb-2R-His	Motordomäne von Myosin-Vb mit 2 α -Aktinin- <i>repeats</i>	Kinetik, <i>in vitro</i> Motilität, Kristallographie
pMVb-2R-FLAG	Motordomäne von Myosin-Vb mit 2 α -Aktinin- <i>repeats</i>	Kinetik, Kristallographie
pMVb-3R-YFP-His	Motordomäne von Myosin-Vb mit 2 α -Aktinin- <i>repeats</i> , einem Spektrin- <i>repeat</i> und YFP	Kinetik, <i>in vitro</i> Motilität
pMVb-S432E-His	Motordomäne von Myosin-Vb mit Mutation S432E	Kinetik
pM761-FLAG	Motordomäne von Myosin-II	Kinetik
pM765-2R-His	Motordomäne von Myosin-II mit 2 α -Aktinin- <i>repeats</i>	Kinetik, <i>in vitro</i> Motilität

3.3. Expression und Aufreinigung von *D. discoideum* Myosin-Vb-Motordomänenkonstrukten

3.3.1. Expressionsanalyse verschiedener Myosin-Vb Konstrukte

Die angegebenen Expressionsplasmide wurden für die Transformation durch Elektroporation in *D. discoideum* AX3-ORF⁺-Zellen eingesetzt [Manstein *et al.*, 1989]. Die Transformanten wurden unter Verwendung von Gentamycin in einer Konzentration von 10 μ g/ml als Selektionsmarker selektioniert. Die Expression wurde durch analytische Myosinpräparationen getestet (s. 2.6.6.). Dieses etablierte Protokoll erlaubte neben einer Anreicherung von aktivem Myosin auch eine erste funktionale Überprüfung, da im finalen Extraktionsschritt mit ATP nur hydrolysekompetentes Myosin isoliert wird. Durch Western Blots unter Verwendung von anti-Histidin- oder anti-FLAG-Antikörpern wurde das Vorhandensein der Affinitätstags nachgewiesen.

Abbildung 3.5 zeigt beispielhaft die Expression von zwei Myosin-Vb Konstrukten in Petrischalen-Kultur (A-C) und in Schüttelkultur (D und E). Die Bande bei 220 kDa stammt von endogenem Myosin-II, die 42 kDa Bande ist endogenes Aktin. Die Expression aller Konstrukte war vergleichbar mit der von Myosin-II, die zwei unterschiedlichen Klone des MVb-2R-His Konstruktes (A und B, 122 kDa) zeigten keine Unterschiede in der Expressionsstärke. Für beide Konstrukte konnte auch in Schüttelkultur eine stabile Expression nachgewiesen werden (D und E). Die Zelllinien wurden anschließend für die präparative Aufreinigung eingesetzt.

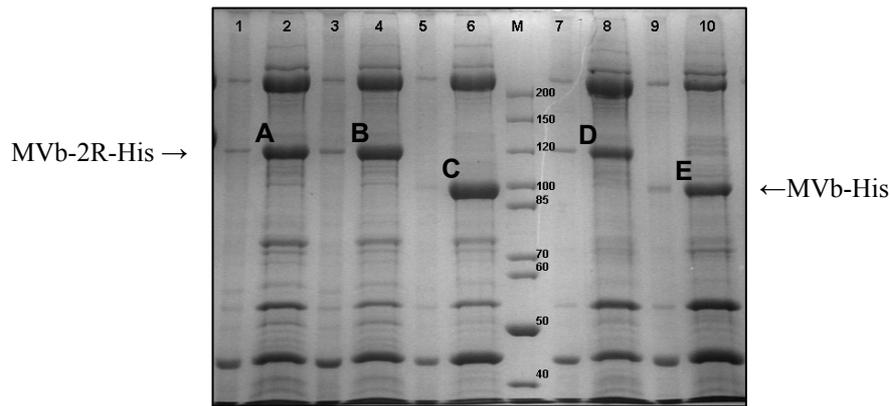


Abb. 3.5: Coomassie Blue-gefärbtes 10%iges PAA-Gel der Expressionsanalyse von Myosin-Vb Konstrukten von Plattenkultur (1-6) und Schüttelkultur (7-10). Aufgetragen sind jeweils Pellet und Überstand des letzten Extraktions-Zentrifugationsschrittes. 1+2: MVb-2R-His Klon 1, 3+4: MVb-2R-His Klon 2, 5+6 MVb-His, M: Marker, 7+8: MVb-2R-His Klon 1 aus Schüttelkultur, 9+10: MVb-His aus Schüttelkultur.

3.3.2. Präparation von Myosin-Vb Konstrukten

Für die Aufreinigung im präparativen Maßstab wurden 12-16 l Schüttelkultur mit einer Zelldichte von $4-6 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingesetzt. Die Präparation wurde entsprechend Kapitel 2.6.11. durchgeführt. Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch das Elutionsprofil einer NiNTA Säule (Abb. 3.6), eines Anionenaustauschers (Abb. 3.7) sowie einer anti-FLAG-Säule (Abb. 3.8). Aus 40 g Zellen konnten typischerweise 12 bis 15 mg rekombinantes Myosin isoliert werden. Das entspricht einer Ausbeute von 0,3 bis 0,4 mg pro Gramm Zellen.

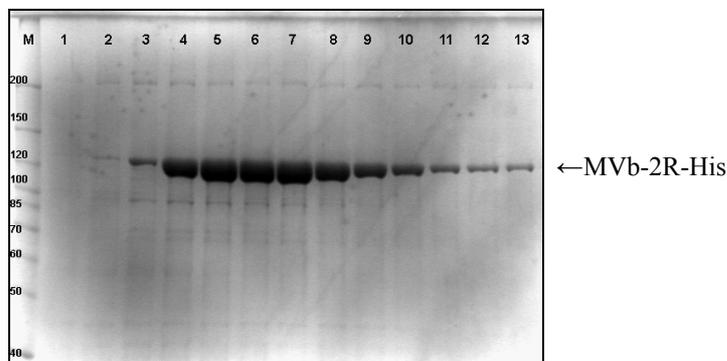


Abb. 3.6: Coomassie Blue-gefärbtes 10%iges PAA-Gel der Eluatfraktionen der NiNTA-Säule von MVb-2R-His. M: Marker, 1-13: Eluatfraktionen mit steigendem Imidazolgradienten von 150 bis 500 mM. Die Fraktionen 4 bis 12 wurden vereinigt, dialysiert und für die weitere Aufreinigung mittels Anionenaustausch-Chromatographie eingesetzt.

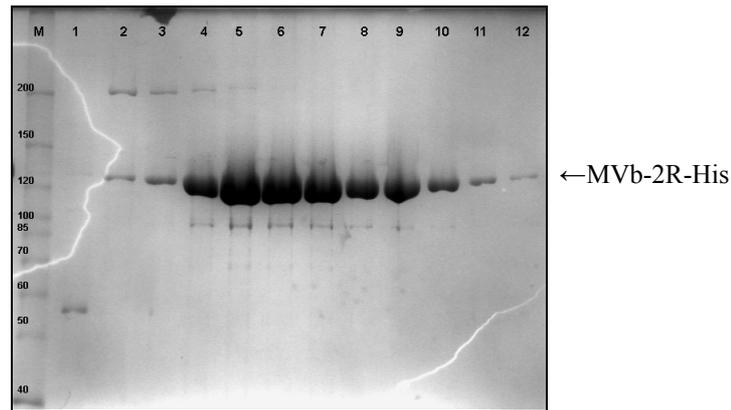


Abb. 3.7: Coomassie Blue-gefärbtes 10%iges PAA-Gel der Eluatfraktionen der Anionenaustauscher-Säule von MVb-2R-His. M: Marker, 1-12: Eluatfraktionen mit steigendem KCl-Gradienten von 150 bis 250 mM. Die Fraktionen 5 bis 9 wurden vereinigt, dialysiert und für die weitere Aufreinigung mittels Größenausschluß-Chromatographie (Gelfiltration) eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

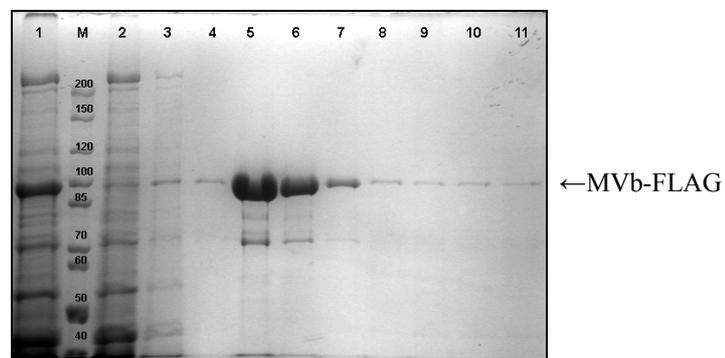


Abb. 3.8: Coomassie Blue-gefärbtes 10%iges PAA-Gel der Eluatfraktionen der anti-FLAG-Säule von MVb-FLAG. M: Marker, 1: geladene Proteinlösung, 2: Durchfluß der anti-FLAG-Säule nach dem Laden, 3: Nidrigsalz-Waschfraktion, 4-11: Fraktionen der anti-FLAG-Säule nach Elution mit $100\ \mu\text{g/ml}$ FLAG-Peptid. Die Fraktionen 4 bis 11 wurden vereinigt, dialysiert, aufkonzentriert und bei -80°C gelagert.

3.4. Kinetische Charakterisierung von *D. discoideum* Myosin-Vb

Die Myosin-Klasse V hat eine heterogene Zusammensetzung, da sie strukturell gesehen ausschließlich aus dimeren Myosinen besteht, funktional jedoch sowohl Myosine einschließt, die als einzelne Moleküle prozessiv sind, als auch solche, die in funktionalen Einheiten aus vielen Myosinen zusammenarbeiten müssen, um eine prozessive Bewegung der Ladung zu ermöglichen. Durch eine detaillierte Charakterisierung des ATPase-Zyklus von *D. discoideum* Myosin-Vb wird in den folgenden Experimenten untersucht, ob sich dieses Myosin aufgrund seiner kinetischen Eigenschaften in die Untergruppe der prozessiven, *high duty ratio* Motoren oder die der nichtprozessiven Myosine klassifizieren läßt. Darüber hinaus sollten aus den Ergebnissen neue Erkenntnisse mechanistischer Natur gewonnen werden, um die Modelle zur Beschreibung der Prozessivität zu verfeinern, so z. B. die Notwendigkeit einer hohen Aktin-Affinität in Anwesenheit von ADP und einer geschwindigkeitsbestimmenden ADP-Dissoziation.

Der ATPase-Zyklus von *D. discoideum* Myosin-Vb wurde im Fließgleichgewicht (*steady-state*) sowie mit transientenkinetischen Methoden aufgeklärt. Zusätzlich wurde die Motorfunktion mit *in vitro* Motilitätsmessungen untersucht. Die Experimente wurden ebenfalls mit Motordomänenkonstrukten von Myosin-II aus *D. discoideum* durchgeführt (M761-FLAG, M765-2R). Dadurch wurde ein typisches nicht prozessives Myosin als Referenz zur Validierung der Einzelmessungen mitgeführt. Die Daten der etablierten Messungen von Myosin-II Konstrukten deckten sich in allen Fällen sehr gut mit den publizierten Werten [Kurzawa *et al.*, 1997; Furch *et al.*, 1999; Batra *et al.*, 1999; Tsiavalariis *et al.*, 2002].

Die erhaltenen *steady-state*-Parameter, Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten sowie Bewegungsgeschwindigkeiten von *D. discoideum* Myosin-Vb wurden denen eines charakterisierten prozessiven Myosins, *Gallus gallus* Myosin-Va, gegenübergestellt und die entsprechenden Werte in die einzelnen Tabellen aufgenommen [De La Cruz *et al.*, 1999; Rosenfeld *et al.*, 2004].

Bei allen kinetischen Messungen von Myosin-II oder Myosin-Vb Konstrukten wurden gemäß den Erwartungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konstrukten mit und ohne künstlichen Hebelarm festgestellt (vgl. [Anson *et al.*, 1996]). Die Analyse und Interpretation der Meßergebnisse erfolgte nach den in Kapitel 1.6. beschriebenen Modellen. Die angegebenen Fehler und Fehlerbalken resultieren aus der Standardabweichung bei der Kurvenanpassung sowie dem Fehler bei der Bestimmung der Konzentration von Myosin, Aktin, Nukleotiden und Mg^{2+} .

3.4.1. Bestimmung der katalytischen Aktivität - k_{cat} und K_M der *steady-state*-ATPase

Für die Untersuchung der ATPase-Aktivität im Fließgleichgewicht wurden die *steady-state*-Parameter k_{cat} und K_M mit dem NADH-gekoppelten Assay bestimmt (s. Kapitel 2.7.1.). Die ATPase-Aktivität von Myosin-Vb und Myosin-II wurde in Abwesenheit von Aktin sowie über einen Konzentrationsbereich von 2,5 bis 60 μM Aktin gemessen. Abbildung 3.9 zeigt für beide Myosine die Abhängigkeit der Mg^{2+} -ATPase-Aktivität von der Aktin-Konzentration. Dabei ist in (A) ein vergrößerter Ausschnitt der Datenpunkte von 0 bis 20 μM Aktin dargestellt.

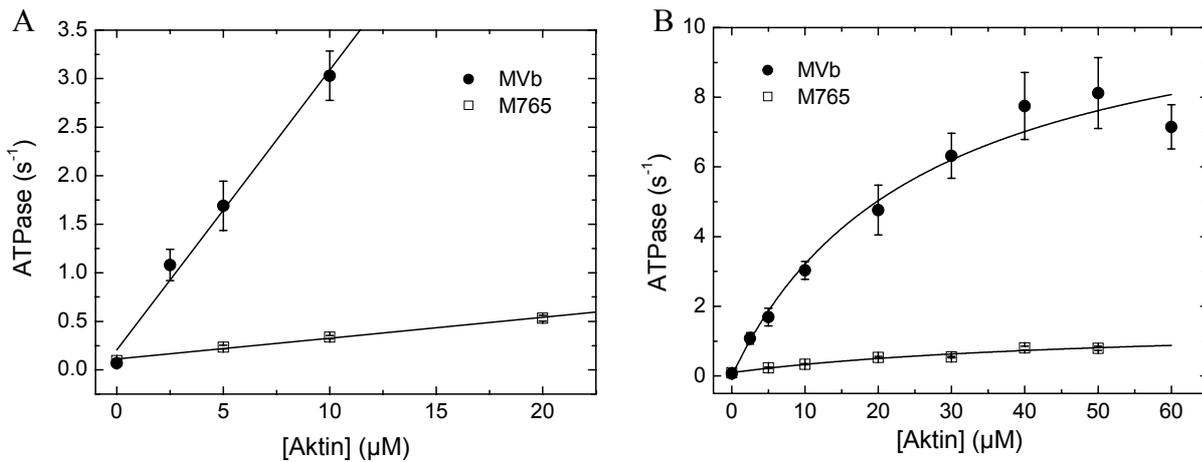


Abb. 3.9: Aktin-aktivierte *steady-state*-ATPase von Myosin-Vb und M765. (A) Die ATPase-Aktivität wurde gegen die Aktin-Konzentration aufgetragen und im Bereich von 0 bis 10 μM (MVb) bzw. 0 bis 20 μM Aktin an eine lineare Funktion angepaßt. (B) Die ATPase-Aktivität wurde gegen die Aktin-Konzentration aufgetragen und an die Daten wurde eine Hyperbel angepaßt.

Für MVb wurde eine basale ATPase-Aktivität von $0.069 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ gemessen. Die gemessene basale ATPase-Aktivität für M765 liegt bei $0,095 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$.

Es wurde die maximale Aktin-aktivierte ATPase-Aktivität (k_{cat}) sowie die Effizienz, mit der Aktin die Produktfreisetzung beschleunigt, bestimmt. Dazu wurden Messungen mit steigenden Aktin-Konzentrationen von 0 bis 60 μM Aktin durchgeführt. Die ATPase-Aktivität wurde gegen die Aktin-Konzentration aufgetragen und an die Daten wurde eine Hyperbel gemäß der Michaelis-Menten Gleichung angepaßt. Aus der hyperbolischen Anpassung wurden die Konstanten k_{cat} , K_{app} und $k_{\text{cat}}/K_{\text{app}}$ erhalten. Die Konstante k_{cat} gibt den berechneten Maximalwert der Umsatzgeschwindigkeit bei vollständiger Aktinaktivierung an. K_{app} entspricht der apparenten Gleichgewichtskonstante K_{M} für Aktin gemäß des in Kapitel 1.6.1. beschriebenen Formalismus. Das ist die Aktin-Konzentration, bei der eine halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. Die Bindungskonstante 2. Ordnung für Aktin ($k_{\text{cat}}/K_{\text{app}}$) wurde durch Berechnung des Quotienten beider Werte erhalten. Sie entspricht der apparenten Aktinbindungskonstante in Anwesenheit von ATP. Bei geringeren Aktin-Konzentrationen als K_{app} konnten die Daten auch mit einer Geraden beschrieben werden. $k_{\text{cat}}/K_{\text{app}}$ wurde aus der Steigung dieser Geraden bestimmt.

Aus der Anpassung der Daten an die Michaelis-Menten-Gleichung wurde für M765 eine Maximalgeschwindigkeit (k_{cat}) von $1,44 \text{ s}^{-1}$ und ein K_{app} von $51 \mu\text{M}$ erhalten. Die apparente Aktinbindungskonstante in Anwesenheit von ATP wurde aus diesen Werten zu $k_{\text{cat}}/K_{\text{app}} = 0,028 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ berechnet. Aus der Steigung der Geraden, die an die Datenpunkte unterhalb von $20 \mu\text{M}$ Aktin angepaßt wurde, konnte $k_{\text{cat}}/K_{\text{app}} = 0,022 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden.

Für MVb wurde eine 10-fach höhere maximale ATPase-Geschwindigkeit (k_{cat}) von $11,6 \text{ s}^{-1}$ und ein kleinerer Wert für K_{app} von $27 \mu\text{M}$, was einer höheren Affinität zu Aktin in Anwesenheit von ATP entspricht, bestimmt. Die apparente Aktinbindungskonstante in Anwesenheit von ATP wurde zu $k_{\text{cat}}/K_{\text{app}} = 0,43 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ berechnet, aus der Steigung der Geraden, die an die Daten unterhalb von $10 \mu\text{M}$ Aktin angepaßt wurde, ergab sich $k_{\text{cat}}/K_{\text{app}} = 0,29 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. MVb weist also eine 10-15 fach höhere Kopplungseffizienz als M765 auf.

Entsprechend dem prozessiven *G. gallus* Myosin-Va zeigt sich, daß *D. discoideum* Myosin-Vb ebenfalls eine hohe maximale ATPase-Aktivität hat. Diese wird nicht so effektiv von Aktin aktiviert wie im Fall von *G. gallus* Myosin-Va. Die Aktin-Affinität in Anwesenheit von ATP ist doppelt so hoch wie die von *D. discoideum* Myosin-II, aber um den Faktor 20 niedriger als von *G. gallus* Myosin-Va.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in der Abbildung 3.9 A und B und der Tabelle 3.2 dargestellt. Die angegebenen Fehler der basalen ATPase-Aktivität sowie die Fehler der einzelnen Meßpunkte entstammen aus dem Fehler der linearen Anpassung an den Absorptionsverlauf der NADH-gekoppelten Messung sowie dem Fehler bei der Bestimmung der Konzentration von Myosin und Aktin. Die Fehler für k_{cat} und K_{app} resultieren aus der Standardabweichung der Kurvenanpassung.

Tab. 3.2: *steady-state*-Parameter der Aktin-aktivierten ATPase-Aktivität

Myosin	basale ATPase (s^{-1}) ^a	k_{cat} (s^{-1}) ^b	K_{app} (μM) ^b	$k_{\text{cat}}/K_{\text{app}}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ^c
M765	$0,095 \pm 0,01$	$1,44 \pm 0,4$	51 ± 23	0,028
<i>Dd</i> Myosin-Vb	$0,069 \pm 0,01$	$11,6 \pm 0,8$	27 ± 7	0,43
<i>Gg</i> Myosin-Va*	0,03	15	1,4	11

* aus: De La Cruz, 1999

Reaktionsbedingungen: 25 mM HEPES, pH-Wert 7,3; 25 mM KCl und 5 mM MgCl_2 bei 25 °C.

- a) Die basale ATPase-Aktivität entspricht der ATP-Umsatzgeschwindigkeit ohne Aktinfilamente
 b) Die Werte für k_{cat} und K_{app} wurden durch Beschreibung der Daten mit der Michaelis-Menten-Gleichung erhalten.
 c) Die Bindungskonstante 2. Ordnung für Aktin ($k_{\text{cat}}/K_{\text{app}}$) wurde durch Berechnung des Quotienten beider Werte erhalten. Bei viel niedrigeren Aktin-Konzentrationen als K_{app} konnte $k_{\text{cat}}/K_{\text{app}}$ auch mit einer linearen Regression aus der Steigung der Geraden bestimmt werden.

3.4.2. Transientenkinetische Charakterisierung

Die Messung der ATPase-Aktivität von Myosinen im Fließgleichgewicht eignet sich nicht dazu, einzelne Reaktionsschritte des ATPase-Zyklus aufzulösen. Die transientenkinetische Bestimmung der Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten für die Wechselwirkung von Myosin mit Aktin und Nukleotiden bietet die Möglichkeit, den kinetischen Mechanismus der Prozessivität aufzuklären.

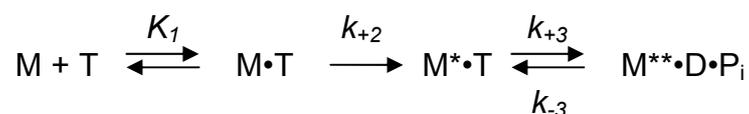
Im vorigen Kapitel wurde gezeigt, daß die maximale ATPase-Aktivität von *D. discoideum* Myosin-Vb 10-fach höher als die von nichtprozessivem Myosin-II ist. Die Aktin-Affinität in ATP-Anwesenheit ist gegenüber Myosin-II ebenfalls erhöht. Die umfassende transientenkinetische Charakterisierung von Myosin-Vb wird zeigen, ob die einzelnen Schritte des ATPase-Zyklus darauf abgestimmt sind, die kinetischen Anforderungen an ein prozessives Myosin zu erfüllen. Dies sind neben einer hohen Aktin-Affinität in Abwesenheit und Anwesenheit von ADP ein geschwindigkeitsbestimmender ADP-Dissoziationsschritt sowie eine schnelle ATP-Hydrolyse.

3.4.3. Nukleotidinteraktionen mit Myosin

3.4.3.1. Bestimmung der ATP-Bindung durch intrinsische Fluoreszenz

Die ATP-Bindung an Myosin-Vb wurde durch Messung des Anstiegs der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz nach Zugabe eines Überschusses an ATP bestimmt. Der transiente Anstieg der Fluoreszenz folgte Exponentialfunktionen 1. Ordnung. Abbildung 3.10 zeigt exemplarisch den Fluoreszenzverlauf nach dem schnellen Mischen von 40 μM ATP mit 1 μM MVb im Stopped-Flow-Fluoreszenzspektrometer. Es ergab sich eine Geschwindigkeitskonstante von 11,1 s^{-1} mit einer Signalamplitude von 8%.

Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten bis zu einer ATP-Konzentration von 2 mM wurden entsprechend einem Zwei-Schritt-Mechanismus angepaßt [Bagshaw und Trentham, 1974; Malnasi-Csizmadia *et al.*, 2001]. Der schnellen Bildung eines Kollisionskomplexes ($\text{M}\cdot\text{T}$) mit der Gleichgewichtskonstanten K_1 folgt die schnelle und fast vollständig irreversible Isomerisierung (Geschwindigkeitskonstante k_{+2}). Für *D. discoideum* Myosin-II ist nur der anschließende Hydrolyseschritt mit einer Fluoreszenzerhöhung verbunden (vgl. Kapitel 1.6.2.). Da auch für Myosin-Vb die Fluoreszenzänderung bei der ATP-Bindung eine kleine Amplitude hat und diese bei steigender ATP-Konzentration konstant bleibt, wird diese Fluoreszenzänderung ebenfalls dem Hydrolyseschritt zugeordnet [Ritchie *et al.*, 1993; Kurzawa *et al.*, 1997]. Der nachfolgende Reaktionsmechanismus zeigt in Anlehnung an Bagshaw und Trentham die Schritte bei der Interaktion von Myosin mit ATP [Zeng *et al.*, 2004; Malnasi-Csizmadia *et al.*, 2001; Bagshaw und Trentham, 1974].



In diesem und den nachfolgenden Reaktionsschemata sind Gleichgewichtskonstanten mit kursiven Großbuchstaben K_x , Geschwindigkeitskonstanten mit kursiven Kleinbuchstaben k_x bezeichnet. Die kursive Darstellung verdeutlicht dabei, daß es sich um Interaktionen in der

Abwesenheit von Aktin handelt. M steht für Myosin, T für ATP, D für ADP und P_i für anorganisches Phosphat (vgl. Kapitel 1.6.2.).

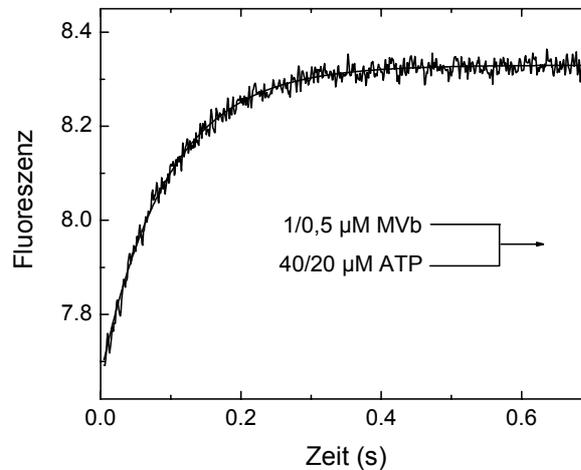


Abb. 3.10: Veränderung der intrinsischen Proteinfluoreszenz bei der Bindung von 40 μM ATP an 1 μM MVb bei der Messung im Stopped-Flow-Fluoreszenzspektrometer. Die Fluoreszenz wurde bei 297 nm angeregt und die Emission durch einen WG 320-Filter verfolgt. Die Kurve wurde mit einer Exponentialfunktion 1. Ordnung beschrieben.

Aus der Auftragung der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten gegen die ATP-Konzentration konnten Werte für K_1 und k_{+2} ermittelt werden. Bei niedrigen ATP-Konzentrationen von 5 bis 100 μM (MVb) bzw. 5 bis 20 μM (M765) stieg k_{obs} linear in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration an (s. Abbildung 3.11 A). Die Bindungskonstante 2. Ordnung (K_1k_{+2}) wird durch die Steigung der Geraden definiert. Es ergibt sich für MVb eine Bindungskonstante 2. Ordnung K_1k_{+2} von $0,47 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, für M765 von $0,66 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$.

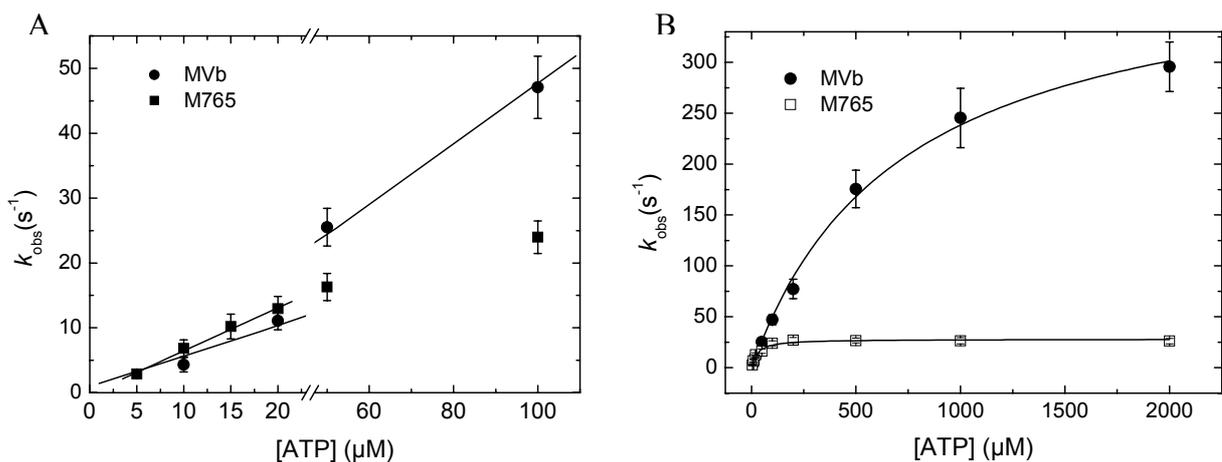


Abb. 3.11: ATP-Bindung an Myosinkopfkonstrukte. (A) Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von M765 (■) und MVb (●) von der ATP-Konzentration. Bei niedrigen ATP-Konzentrationen konnte an die k_{obs} -Werte eine Gerade angepaßt werden. (B) Bei hohen ATP-Konzentrationen bis 2 mM konnten die Daten hyperbolisch angepaßt werden, um eine Maximalgeschwindigkeit zu bestimmen.

Bei ATP-Konzentrationen oberhalb von 50-100 μM waren die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten nicht mehr linear von der ATP-Konzentration abhängig (s. Abbildung 3.11 B), sondern näherten sich einem Sättigungswert an. Durch Anpassung einer Hyperbel ($k_{\text{obs}} = k_{\text{max}}[\text{ATP}] / ([\text{ATP}] + K_I)$) an die k_{obs} -Werte konnte ein Maximalwert (k_{max}) bestimmt werden. Für M765 entspricht dieser der Geschwindigkeit des reversiblen Hydrolyseschrittes [Marston und Taylor, 1980]. Für M765 wurde ein Maximalwert ($k_{+3} + k_{-3}$) von 28 s^{-1} erhalten, der gut mit den Literaturwerten von 30 s^{-1} [Furch *et al.*, 1999] oder 24 s^{-1} [Ritchie *et al.*, 1993] übereinstimmt. Auch für MVb entspricht der Maximalwert der Geschwindigkeit des Hydrolyseschrittes. Aus der hyperbolischen Anpassung an die Meßwerte von MVb ergibt sich $k_{+3} + k_{-3} = 410 \text{ s}^{-1}$. Die Hydrolysegeschwindigkeit ist etwa 15mal höher als bei Myosin-II.

3.4.3.2. Bestimmung der ATP Bindung durch extrinsische Fluoreszenz

Die Geschwindigkeit der Nukleotidbindung an Myosin kann auch mit fluoreszenzmarkierten Nukleotidanaloga bestimmt werden. Es wurde mantATP eingesetzt, um die in 3.4.3.1. ermittelten Daten für die ATP-Bindung einerseits zu bestätigen, andererseits sind die ATP-Analoga zur Bestimmung von weiteren kinetischen Parametern essentiell, die nicht über intrinsische Fluoreszenzänderung zugänglich sind.

Die Bindung von mantATP führte nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 365 nm zu einem Fluoreszenzanstieg von 8% (MVb) bzw. 20% (M765) und wurde über einen Bereich von 2,5 bis 20 μM mantATP gemessen. An die Messpunkte konnte eine Gerade angepaßt werden, deren Steigung $K_I k_{+2}$ entsprach. Es ergaben sich Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung von $0,8 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für MVb und ebenfalls $0,8 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für M765. Im Rahmen des Fehlers stimmen sowohl die über die intrinsischen als auch über die extrinsischen Fluoreszenzmessungen erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten für die ATP-Bindung überein.

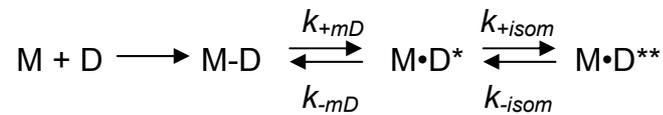
3.4.3.3. Auflösung von zwei Myosin-Vb.ADP-Zuständen

Für Klasse V Myosine wurde die Existenz von zwei Myosin.ADP-Zuständen beschrieben. Dies hat eine grundlegende Bedeutung für die Koordinierung der Myosinköpfe bei der prozessiven Bewegung eines Dimers: wenn die ADP-Affinität der zwei Zustände durch intramolekulare Spannung moduliert wird, kann zwischen vorderem und hinterem Myosinkopf des Dimers unterschieden werden. Dies hat einen synchronisierenden Effekt und erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß sich der hintere Myosinkopf zuerst vom Aktinfilament löst. Dadurch wird die Prozessivität des Dimers erhöht [Rosenfeld und Sweeney, 2004; Veigel *et al.*, 2005; Purcell *et al.*, 2005].

Um zu untersuchen, ob für *D. discoideum* Myosin-Vb ebenfalls zwei Myosin.ADP-Zustände existieren und es somit die Voraussetzungen für die Reaktion auf Zugspannung und/oder die Koordinierung von zwei Köpfen während prozessiver Bewegung hat, wurde die Bindung von ADP an Myosin-Vb gemessen. Um zwei Zustände auflösen zu können, müssen beide fluoreszenz sensitiv sein, die Abwesenheit eines Fluoreszenzsignals für einen zweiten Zustand schließt nicht aus, daß es sich um einen Zwei-Schritt-Mechanismus handelt.

Das nachfolgende Schema zeigt den Zwei-Schritt-Mechanismus bei der Interaktion von Myosin mit ADP. Die Geschwindigkeitskonstanten für die jeweiligen Schritte sind mit k_x bezeichnet, die kursive Darstellung verdeutlicht dabei, daß es sich um Interaktionen in der

Abwesenheit von Aktin handelt, mD bedeutet, daß der Reaktionsverlauf über das Fluoreszenzsignal von mantADP verfolgt wurde. M steht für Myosin und D für ADP.



Für die ADP-Bindung wurde sowohl für M765 als auch für MVb kein Fluoreszenzsignal erhalten. Daher wurde die Bindungskonstante 2. Ordnung für die ADP-Bindung mit Hilfe des fluoreszenzmarkierten Nukleotidderivates mantADP bestimmt. Die Reaktion mit mantADP wurde für MVb in einem Konzentrationsbereich von 2,5 bis 20 μM untersucht. Die Abbildung 3.12 A zeigt die Fluoreszenzveränderung bei der Zugabe von 2,5 sowie 5, 10 und 20 μM mantADP zu 1 μM MVb, das Signal hat eine von 3,5 auf 1,7 % abnehmende Gesamtamplitude. Die beobachtete Reaktion ist biphasisch. An die erhaltenen Transienten wurden Exponentialfunktionen 2. Ordnung angepaßt.

Die Geschwindigkeitskonstanten der schnellen Phase zeigen keine Abhängigkeit von der mantADP-Konzentration. Die Steigung einer Geraden durch die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der langsamen Phase (Abbildung 3.12 B) ergibt eine Bindungskonstante 2. Ordnung (k_{+mD} , das eingefügte ‚m‘ bezeichnet dabei hier und in den folgenden Kapiteln die Messung über das Fluoreszenzsignal der mant-Gruppe des mantADP). Sie beträgt $0,17 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für Myosin-Vb, die Geschwindigkeitskonstanten der schnellen Phase liegen im Mittel bei $84,2 \pm 15 \text{ s}^{-1}$. Für M765 sind die Reaktionsverläufe monophasisch, k_{+mD} beträgt $0,42 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Aus dem y-Achsenabschnitt konnte nach Extrapolation der Geraden zur Ordinate eine Dissoziationskonstante für mantADP von MVb ermittelt werden, die bei $k_{-mD} = 0,8 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$ liegt.

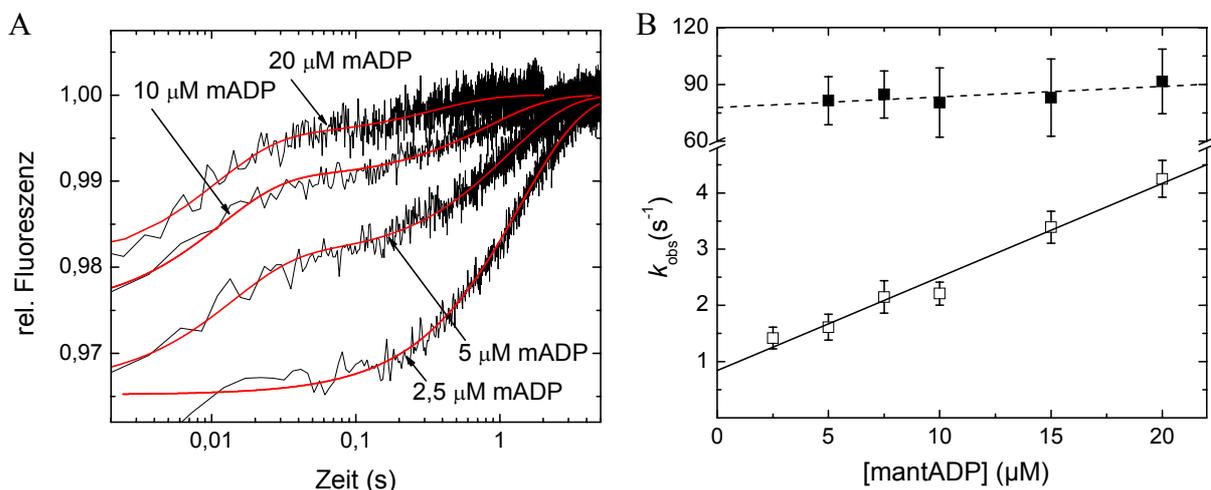


Abb. 3.12: mantADP-Bindung an Myosin-Vb. (A) Fluoreszenzänderung bei der Bindung von 5/ 10/ 20/ 40 μM mantADP an 1 μM MVb bei der Messung im Stopped-Flow-Fluoreszenzspektrometer. Die Fluoreszenz wurde bei 296 nm angeregt und die Emission nach Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer durch einen KV 389-Filter verfolgt. Die Kurven wurde mit Exponentialfunktionen 2. Ordnung beschrieben. (B) Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der langsamen (\square) und schnellen (\blacksquare) Phase von der mantADP-Konzentration. Bei Anpassung einer Geraden an die Meßwerte der langsamen Phase ergab die Steigung die Bindungskonstante 2. Ordnung für mantADP (k_{+mD}).

3.4.3.4. Bestimmung der ADP-Dissoziation von Myosin-Vb durch extrinsische Fluoreszenz

Die Dissoziationsgeschwindigkeit von mantADP aus dem Komplex mit Myosin konnte außerdem direkt bestimmt werden. Dazu wurde mantADP mit einem Überschuss an ATP aus seinem Komplex mit Myosin verdrängt. Die beobachtete Geschwindigkeit des Fluoreszenzabfalls wird dabei durch die Dissoziationsgeschwindigkeit des mantADP bestimmt. Die Fluoreszenzverläufe folgten Exponentialfunktionen 2. Ordnung (s. Abbildung 3.13). Allerdings hat die erste Phase eine Amplitude von <1%, die mit diesem Schritt verbundene Fluoreszenzänderung ist also sehr klein.

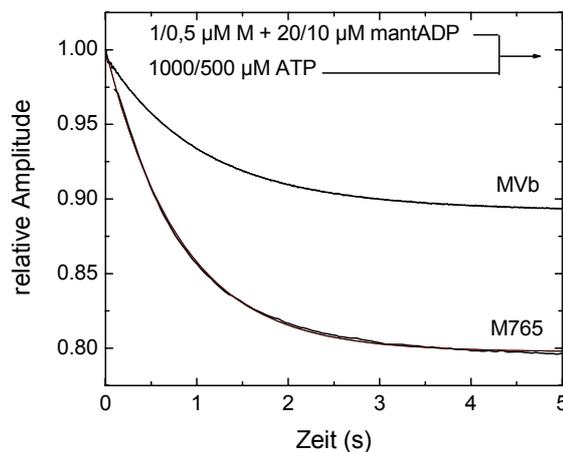


Abb. 3.13: mantADP-Dissoziation aus dem Komplex mit Myosin. Gezeigt ist die Veränderung der mant-Fluoreszenz nach Mischen von 1000 μM ATP mit dem Komplex aus 1 μM Myosin und 20 μM mantADP im Stopped-Flow-Fluoreszenzspektrometer. Die beobachtete Reaktion wurde mit einer Exponentialfunktion 1. Ordnung beschrieben, k_{obs} entspricht der Dissoziationsgeschwindigkeit $k_{\text{-mD}}$ von mantADP.

Die Messungen ergaben für MVb eine Dissoziationskonstante von $k_{\text{-mD}} = 0,92 \text{ s}^{-1}$ mit einer Amplitude von 12 %. Diese zeigt gute Übereinstimmung mit dem aus dem y-Achsenabschnitt der mantADP-Bindungstiteration erhaltenen Wert von $0,8 \text{ s}^{-1}$ für die langsame Phase. Die schnelle Phase hat eine Amplitude von unter 1 % und eine Geschwindigkeitskonstante von 50 s^{-1} . Diese Phase könnte der beobachteten schnellen Phase bei der mantADP-Bindung entsprechen. Für M765 wurde $k_{\text{-mD}} = 1,35 \text{ s}^{-1}$ mit einer Signalamplitude von 21 % gemessen.

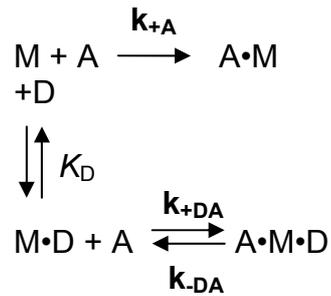
Aus den ermittelten Bindungs- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten von mantADP für Myosin konnte die mantADP-Affinität (K_{mD}) über den Quotienten $k_{\text{-mD}}/k_{\text{+mD}}$ berechnet werden. Für M765 ergab sich eine Gleichgewichtskonstante von 3,2 μM , für MVb von 5,4 μM .

3.4.3.5. Bestimmung der ADP-Affinität über extrinsische Pyren-Aktin-Fluoreszenz

Die von MVb für ADP wurde im vorherigen Kapitel über die mantADP-Bindung und -Dissoziation berechnet. Die ADP-Affinität läßt sich indirekt auch durch die Messung der ADP-Inhibierung der Pyren-Aktin-Bindung an Myosin ermitteln [Kurzawa-Goertz *et al.*,

1998; Batra *et al.*, 1999]. In Anwesenheit von ADP ist die Bindungsgeschwindigkeit von Aktin an Myosin reduziert. Diese Reduktion der Aktinbindungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der ADP-Konzentration ermöglicht die Bestimmung der ADP-Affinität für Myosin.

Das nachfolgende Schema zeigt die Interaktion von Myosin mit ADP und Pyren-Aktin. Die Geschwindigkeitskonstanten für die jeweiligen Schritte sind mit k_x bezeichnet, die fettgedruckte Darstellung verdeutlicht dabei, daß es sich um Interaktionen in der Anwesenheit von Aktin handelt. K_D definiert die Affinität von ADP für Myosin in Abwesenheit von Aktin. M steht für Myosin, A für Aktin und D für ADP.



An die Auftragung der normalisierten Bindungsraten gegen die ADP-Konzentration kann die folgende Funktion angepaßt werden:

$$k_{\text{obs}}/k_0 = (K_D/(K_D+[ADP])) + k_{+DA} * ([ADP]/(K_D+[ADP]))$$

Dabei wird vorausgesetzt, daß ADP in schnellem Gleichgewicht mit Myosin steht und die Dissoziationsgeschwindigkeit von Aktin aus dem A.M.D-Komplex (k_{-DA}) vernachlässigbar klein ist [Kurzawa-Goertz *et al.*, 1998; Batra *et al.*, 1999].

Die Bindungsreaktionen zeigten für Myosin-II und Myosin-Vb einphasiges Verhalten. An alle Transienten konnten Exponentialfunktionen 1. Ordnung angepaßt werden (s. Abbildung 3.14 A). Die Auftragung gegen die ADP-Konzentrationen und die Anpassung der Funktion an die Daten (s. Abbildung 3.14 B) ergab für MVb eine ADP-Affinität von 2,54 μM , für M765 lag K_D bei 7,1 μM (Daten nicht gezeigt).

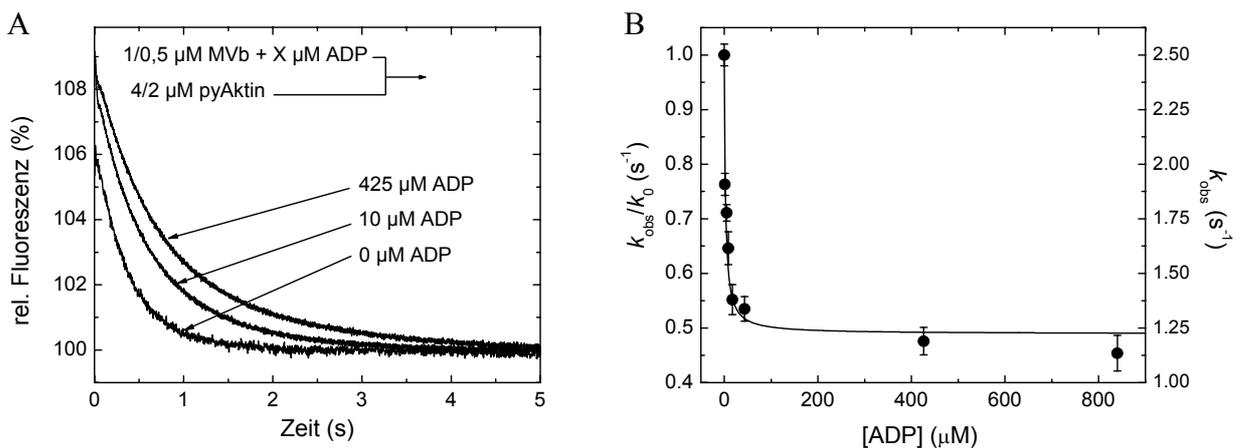


Abb. 3.14: ADP-Inhibierung der Pyren-Aktin Bindung an Myosin-Vb. (A) Die Bindungstransienten von Pyren-Aktin an MVb in Abwesenheit von ADP und in Anwesenheit steigender ADP-Konzentrationen waren monphasisch und wurden durch Exponentialfunktionen beschrieben. (B) Das Verhältnis k_{obs}/k_0 wurde gegen die ADP-Konzentration aufgetragen, wobei k_0 der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten ohne ADP entsprach ($k_0 = 2,5 \text{ s}^{-1}$, siehe Skala an der Ordinate). K_D wurde bestimmt, indem die Funktion $k_{\text{obs}}/k_0 = (K_D/(K_D+[ADP])) + k_{+DA} * ([ADP]/(K_D+[ADP]))$ an die Daten angepaßt wurde.

Bei Myosin-Vb wurde die Geschwindigkeit der Aktinbindung durch die Anwesenheit von hohen ADP-Konzentrationen nur wenig beeinflusst, k_{obs} fiel hier nur auf 50 % des Wertes in ADP-Abwesenheit (s. Abbildung 3.14 B, rechte Ordinate); der Wert von $1,16 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ entspricht der Bindungskonstante 2. Ordnung für Aktin in Anwesenheit von ADP ($k_{+\text{DA}}$).

Die Ergebnisse der transientenkinetischen Charakterisierung der Nukleotidinteraktionen mit Myosin sind in Tabelle 3.3 zusammengefaßt und den Daten für *G. gallus* Myosin-Va gegenübergestellt.

Die Bindungskonstante 2. Ordnung für ATP, bestimmt über extrinsische und intrinsische Fluoreszenz, ist für *D. discoideum* Myosin-II und Myosin-Vb etwa gleich hoch, für *G. gallus* Myosin-Va liegt sie um den Faktor 3 höher. Die ADP-Bindung zeigt für beide Klasse V Myosine bei der Messung über extrinsische mantADP-Fluoreszenz ein biphasisches Verhalten. Dieses resultiert daraus, daß die ADP-Bindung mit zwei konformationellen Schritten verbunden ist. Einer Bindung von ADP an Myosin-V folgt eine Konformationsänderung, die zur Ausbildung des stabilen Myosin.ADP-Komplexes führt. Die Geschwindigkeit der schnellen Phase zeigt für Myosin-Vb keine Abhängigkeit von der ADP-Konzentration.

Tab. 3.3: Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Nukleotidinteraktionen mit Myosin

Nukleotid	Konstante	M765	<i>Dd</i> Myosin-Vb	<i>Gg</i> Myosin-Va*
ATP	K_1k_{+2} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$0,66 \pm 0,04$	$0,47 \pm 0,02$	1,6
	$k_{+3} + k_{-3}$ (s^{-1})	28 ± 18	410 ± 18	≥ 750
mantATP	K_1k_{+2} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$0,8 \pm 0,02$	$0,8 \pm 0,04$	1,6
mantADP	$k_{+\text{mD}}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$0,42 \pm 0,04$	$0,17 \pm 0,01$	3,7
	$k_{+\text{isom}}$ (s^{-1})	-	$[84,2 \pm 15 \text{ s}^{-1}]^+$	$[2,8 \text{ s}^{-1}]^+$
	$k_{-\text{mD}}$ (s^{-1})	$1,35 \pm 0,1$	$0,92 \pm 0,1$	1,9/ 15
	K_{mD} (μM)	$3,2 \pm 0,6$	$5,4 \pm 0,9$	0,51
ADP (<i>pyren</i>)	K_{D} (μM)	$7,1 \pm 0,5$	$2,54 \pm 0,9$	-

* aus: De La Cruz, 1999 und Rosenfeld, 2005

+ die Isomerisierungsgeschwindigkeit zeigt keine Abhängigkeit von der mantADP-Konzentration

Reaktionsbedingungen: 20 mM MOPS, pH-Wert 7,0; 5 mM MgCl_2 , 100 mM KCl bei 20 °C.

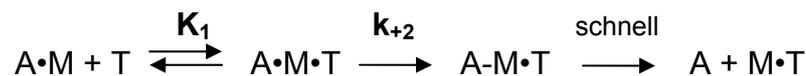
Für *G. gallus* Myosin-Va konnte auch für die Dissoziation von ADP ein biphasischer Prozeß gezeigt werden, für *D. discoideum* Myosin-Vb ließ sich auch eine zweite Phase auflösen, deren Amplitude jedoch mit unter einem Prozent sehr klein war. Das bedeutet, daß der Übergang zwischen den zwei Myosin.ADP-Zuständen von Myosin-Vb nur mit einer sehr geringen Fluoreszenzänderung verbunden ist. Die aus den Geschwindigkeitskonstanten berechnete und über Pyren-Aktin-Fluoreszenz indirekt bestimmten Affinitäten von Myosin-II und *D. discoideum* Myosin-Vb für ADP sind vergleichbar groß. *G. gallus* Myosin-Va hingegen zeigt eine über die mantADP Fluoreszenz bestimmte ADP-Affinität, die um den Faktor 10 höher liegt als die von *D. discoideum* Myosin-Vb.

3.4.4. Nukleotidinteraktionen mit dem Akto.Myosin Komplex

3.4.4.1. ATP-induzierte Dissoziation des Akto.Myosinkomplexes

Die Bindung von ATP an aktungebundenen Myosin führt in der Nukleotidbindungstasche zu einer Interaktion der P-Schleife mit dem γ -Phosphat des ATP. Dadurch schließt sich Schalter I, was eine Umordnung der zentralen β -Faltblätter bewirkt. Dies hat das Öffnen der Spalte zwischen oberer und unterer 50 kDa Domäne zur Folge, woraus eine Schwächung der Affinität zu Aktin und eine anschließende Dissoziation des Komplexes resultiert [Reubold *et al.*, 2003; Holmes *et al.*, 2003]. Die Bestimmung der Geschwindigkeit dieses Prozesses liefert wichtige Hinweise für die kinetische und funktionale Charakterisierung eines Myosins, weil durch diesen Schritt im ATPase-Zyklus der Übergang vom stark Aktin gebundenen zum ungebundenen Zustand beschrieben wird.

Das nachfolgende Schema stellt die zwei Schritte bei der Dissoziation des Akto.Myosin Komplexes durch ATP dar [Millar und Geeves, 1983; Siemanowski und White, 1984]. Die Gleichgewichtskonstante für das schnelle Gleichgewicht zwischen ATP und dem Aktomyosinkomplex ist mit K_1 bezeichnet, k_{+2} ist die Geschwindigkeitskonstante für die Isomerisierung des ternären Komplexes. Diese limitiert die maximale Geschwindigkeit der Dissoziation. M steht für Myosin, A für Aktin und T für ATP.



Die Dissoziation des Aktomyosinkomplexes kann durch die Messung des exponentiellen Fluoreszenzanstiegs von Pyren-Aktin verfolgt werden, der bei der Dissoziation des Komplexes nach Zugabe eines Überschusses an ATP zu beobachten ist (s. Abbildung 3.15). Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten waren im Konzentrationsbereich von 5 bis 100 μM linear von der ATP-Konzentration abhängig. Die Bindungskonstante 2. Ordnung ($K_1 k_{+2}$) wird durch die Steigung einer Geraden durch die Meßwerte angegeben und beträgt für MVb $0,19 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (s. Abbildung 3.16 A). Bei hohen ATP-Werten ($>500 \mu\text{M}$) näherten sich die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten einem Maximalwert an und konnten durch eine Hyperbel beschrieben werden (s. Abbildung 3.16 B). Der Maximalwert (k_{max}) entspricht dabei dem Wert von k_{+2} . Dieser liegt für MVb bei 150s^{-1} .

M765 hat eine Bindungskonstante 2. Ordnung von $0,24 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten sättigten erst bei ATP-Konzentrationen oberhalb von 2 mM bei ungefähr 1000s^{-1} .

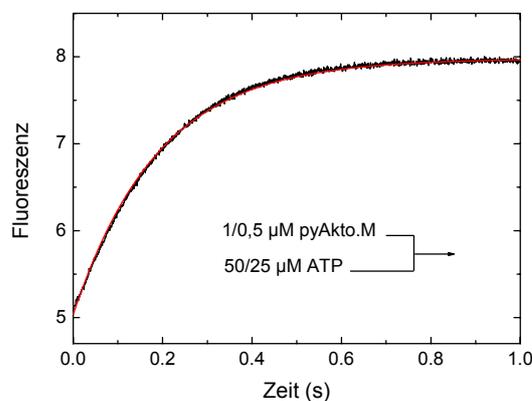


Abb. 3.15: Anstieg der Pyren-Fluoreszenz bei der Dissoziation eines Komplexes aus 1 μM Pyren-Aktin und MVb durch Mischen mit 50 μM ATP.

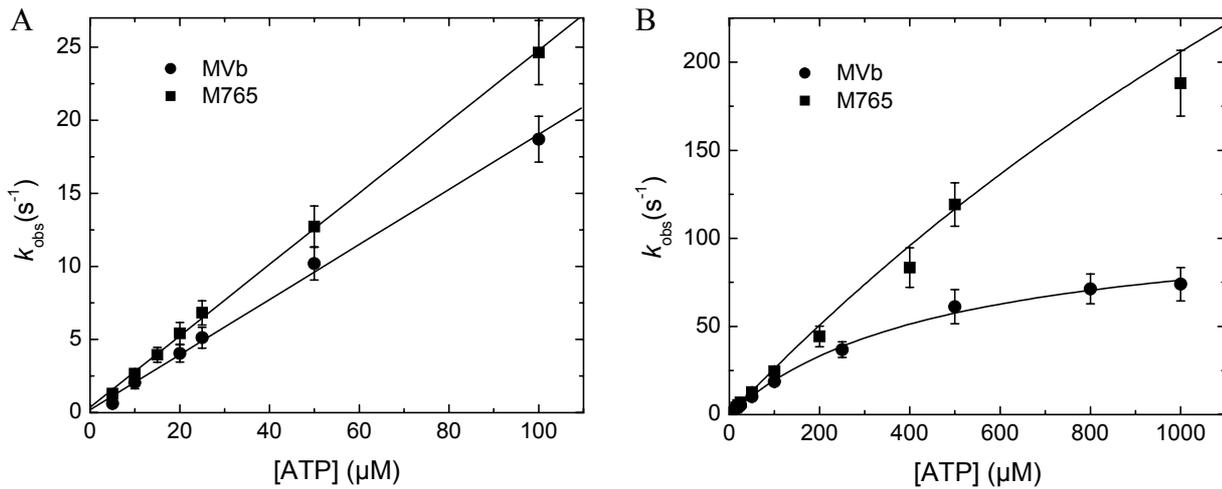


Abb. 3.16: ATP-induzierte Dissoziation des Akto-Myosin Komplexes. (A) Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) für M765 (■) und MVb (●) waren im Konzentrationsbereich von 5-100 μM linear von der ATP-Konzentration abhängig. Die Bindungskonstanten 2. Ordnung (K_1k_{+2}) ließen sich durch die Steigung der Geraden durch die Meßwerte ermitteln. (B) An die Daten für ATP-Konzentrationen bis 1 mM (MVb) bzw. bis 5 mM (M765) wurde eine Hyperbel angepaßt. Die Geschwindigkeitskonstanten des Isomerisierungsschrittes (k_{+2}) wurden durch die berechneten Maximalwerte erhalten.

3.4.4.2. mantADP-Bindung an Akto-Myosin

Wie in Kapitel 3.4.3.3. beschrieben, verläuft die Bindung von ADP an Myosin-Vb nach einem Zwei-Schritt-Mechanismus. Um den Mechanismus der ADP-Bindung an Akto-Myosin-Vb aufzuklären, wurde die ADP-Bindung an Myosin-Vb in Anwesenheit von Aktin gemessen. Auch für diesen Prozeß konnte kein intrinsisches Fluoreszenzsignal detektiert werden. Deshalb wurden die Messungen mit mantADP durchgeführt.

Die Reaktion mit mantADP wurde für MVb in einem Konzentrationsbereich von 2,5 bis 20 μM untersucht. Messungen mit höheren Konzentrationen an mantADP waren aufgrund des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses nicht möglich. Im Gegensatz zur mantADP Bindung an Myosin-Vb in Abwesenheit von Aktin ist die Reaktion in Anwesenheit von Aktin ein monophasischer Prozeß.

Die Abbildung 3.17 A zeigt die Fluoreszenzveränderung bei der schnellen Mischung von 20 μM mantADP mit 2 μM Akto.MVb. Das Signal hat eine Amplitude von 2,2 %, die beobachtete Geschwindigkeitskonstante beträgt 77 s⁻¹. Die Steigung einer Geraden durch die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (s. Abbildung 3.17 B) ergibt die Bindungskonstante 2. Ordnung ($k_{+\text{AmD}}$). Sie beträgt 4,0 μM⁻¹s⁻¹ für Myosin-Vb; aus dem y-Achsenabschnitt konnte nach Extrapolation der Geraden zur Ordinate eine Dissoziationskonstante für mantADP von Akto.MVb ermittelt werden, die bei $k_{-\text{AmD}} = 30 \pm 12 \text{ s}^{-1}$ liegt.

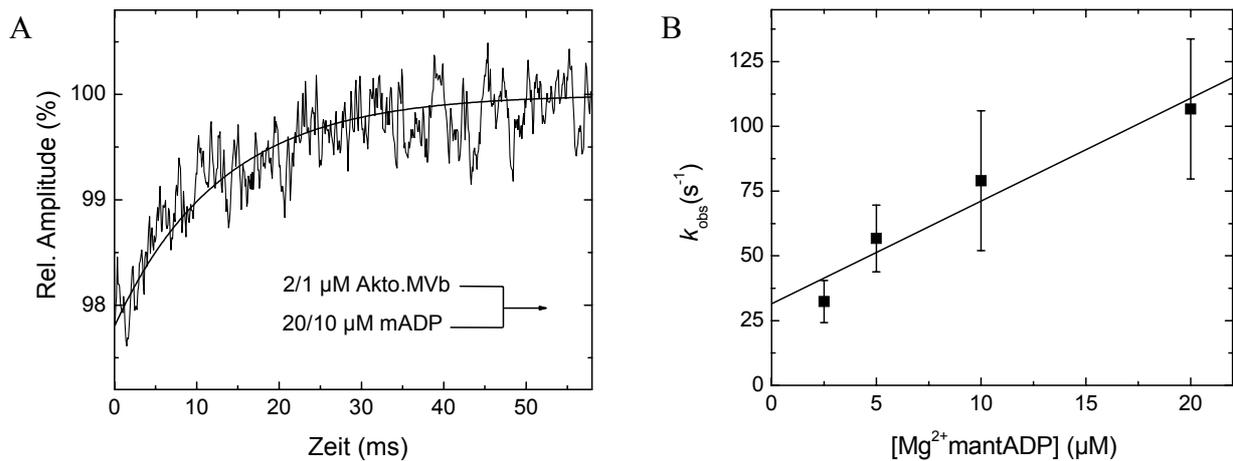


Abb. 3.17: mantADP-Bindung an Akto.Myosin-Vb. (A) Fluoreszenzänderung bei der Bindung von 20 μM mantADP an 2 μM Akto.MVb bei der Messung im Stopped-Flow-Fluoreszenzspektrometer. Die Fluoreszenz wurde bei 296 nm angeregt und die Emission nach Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer durch einen KV 389-Filter verfolgt. Die Kurve wurde mit einer Exponentialfunktion 1. Ordnung beschrieben. (B) Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von Akto.MVb von der mantADP-Konzentration. Bei Anpassung einer Geraden an die Meßwerte ergab die Steigung die Bindungskonstante 2. Ordnung für mantADP ($k_{+\text{AMD}}$).

3.4.4.3. mantADP-Dissoziation von Akto.Myosin

Für prozessive Myosine der Klasse V ist die Dissoziation von ADP aus dem Akto.Myosin-V Komplex der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des ATPase-Zyklus. Für nichtprozessive Myosine ist die Phosphat-Dissoziation geschwindigkeitsbestimmend, da die ADP-Freisetzung durch Aktin-Bindung stark beschleunigt wird. Im Gegensatz dazu führt Aktin bei prozessiven Myosinen zu einer weniger starken Beschleunigung der ADP-Freisetzung. Die Kopplung zwischen Nukleotid- und Aktinbindung ist also für prozessive Myosine klein. Durch die ratenlimitierende ADP-Freisetzung bleiben sie für einen großen zeitlichen Anteil des ATPase-Zyklus stark an Aktin gebunden.

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob Aktin die ADP-Affinität von Myosin-Vb schwächt und ob die Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation von Akto.Myosin-Vb vergleichbar mit der maximalen ATPase-Geschwindigkeit ist. Die Dissoziation von mantADP aus dem ternären Komplex mit Akto.Myosin wurde direkt gemessen. Dazu wurde mantADP mit einem Überschuß an ATP oder ADP aus seinem Komplex mit Akto.Myosin verdrängt (s. Abbildung 3.18). Die Dissoziationsgeschwindigkeit des mantADP bestimmt dabei die beobachtete Geschwindigkeit des Fluoreszenzabfalls. Die Messungen ergaben für MVb eine Dissoziationskonstante von $k_{-\text{AMD}} = 21,6 \text{ s}^{-1}$ mit einer Signalamplitude von 3 %. Dieser Wert deckt sich gut mit dem aus dem y-Achsenabschnitt der mantADP-Bindungstitration erhaltenen Wert von 30 s^{-1} . Bei der Verdrängung mit ATP wurde ebenfalls eine Dissoziationskonstante von $k_{-\text{AMD}} = 22 \text{ s}^{-1}$ erhalten.

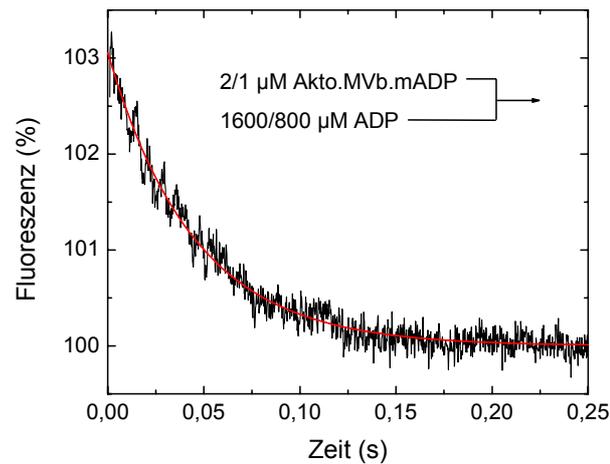


Abb. 3.18: mantADP-Dissoziation aus dem Komplex mit Akto.Myosin-Vb. Gezeigt ist die Veränderung der mant-Fluoreszenz nach Mischen von 1600 μM ADP mit dem Komplex aus 2 μM Akto.Myosin-Vb und mantADP im Stopped-Flow-Fluoreszenzspektrometer. Die beobachtete Reaktion wurde mit einer Exponentialfunktion beschrieben, k_{obs} entspricht der Dissoziationsgeschwindigkeit (k_{AmD}) von mantADP.

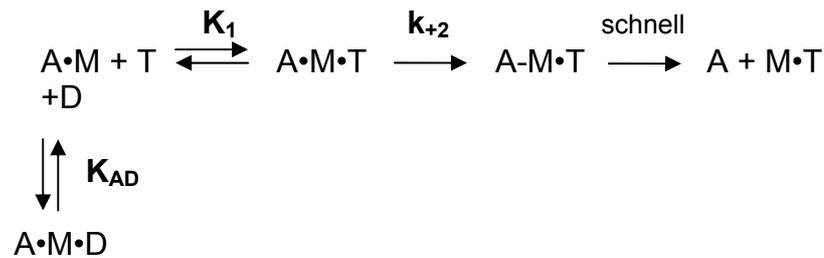
Aus den ermittelten Bindungs- und Dissoziationskonstanten von mantADP für Akto.Myosin-Vb konnte die mantADP-Affinität (K_{AmD}) über den Quotienten $k_{\text{AmD}}/k_{+\text{AmD}}$ berechnet werden. Für Myosin-Vb ergab sich eine Gleichgewichtskonstante von 5,4 μM . Die Affinität von Myosin-Vb zu ADP ist also in Anwesenheit und Abwesenheit von Aktin vergleichbar hoch.

3.4.4.4. Einfluß von ADP auf die Dissoziation von Akto.Myosin durch ATP

Prozessive Myosine und Myosine mit Ankerfunktion benötigen eine hohe Affinität zu Aktin im ADP-gebundenen Zustand. Diese Affinität wurde im vorigen Kapitel über die Bindungs- und Dissoziationsgeschwindigkeit von ADP und dem Akto.Myosin-Komplex bestimmt. Eine andere Methode ist die direkte Bestimmung des Einflusses von ADP auf die Dissoziation des Komplexes durch ATP.

Die ADP-Affinität für den Aktomyosinkomplex wurde über die ADP-Inhibierung der ATP-induzierten Dissoziation des Pyren-Akto.Myosin-Komplexes bestimmt. Durch Zugabe ansteigender ADP-Konzentrationen zu den Aktomyosinkomplexen von Myosin-II und Myosin-Vb konnte eine Verringerung der beobachteten Dissoziationsgeschwindigkeit durch ATP beobachtet werden.

Das nachfolgende Schema stellt die Konkurrenzreaktionen der Bindung von ADP und ATP an den Akto.Myosin Komplex dar [Millar und Geeves, 1983; Siemankowski und White, 1984]. Die Gleichgewichtskonstante für das schnelle Gleichgewicht zwischen ATP und dem Akto.Myosin-Komplex ist mit K_1 bezeichnet, k_{+2} ist die Geschwindigkeitskonstante für die Isomerisierung des ternären Komplexes. Diese limitiert die maximale Geschwindigkeit der Dissoziation. Die Gleichgewichtskonstante K_{AD} beschreibt die Affinität von ADP für den Akto.Myosin-Komplex. M steht für Myosin, A für Aktin, D für ADP und T für ATP.



An die Transienten (s. Abbildung 3.19 A) wurden für Myosin-Vb Exponentialfunktionen 1. Ordnung angepasst. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten wurden gegen die ADP-Konzentration aufgetragen. Die ADP-Affinität zum Aktomyosinkomplex (K_{AD}) wurde berechnet, indem die Hyperbel $k_{\text{obs}}/k_0 = 1/(1 + [\text{ADP}]/K_{\text{AD}})$ an die normalisierten Daten angepasst wurde. Die ADP-Affinität von Akto.Myosin-Vb liegt bei $K_{\text{AD}} = 8 \mu\text{M}$. Der über das Pyren-Aktin-Signal erhaltene K_{AD} -Wert befindet sich in guter Übereinstimmung mit dem über mantADP bestimmten K_{AmD} -Wert von $5,4 \mu\text{M}$. Für Myosin-II ist $K_{\text{AD}} = 107 \mu\text{M}$.

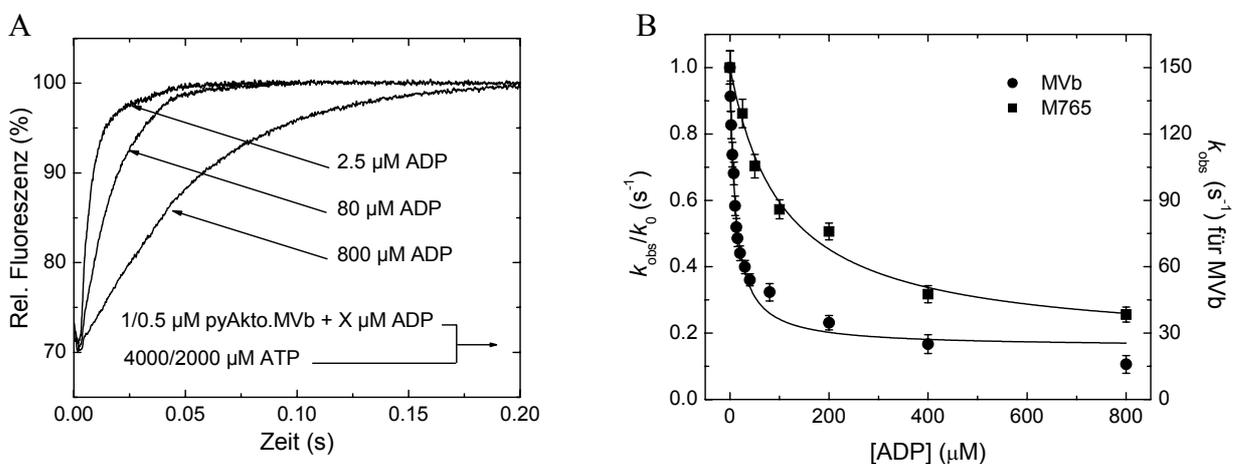


Abb. 3.19: ADP-Inhibition der ATP-induzierten Dissoziation des Aktomyosinkomplexes. (A) Die Dissoziationsreaktionen für MVb wurden durch Exponentialfunktionen 1. Ordnung beschrieben. Das Verhältnis k_{obs}/k_0 wurde gegen die ADP-Konzentration aufgetragen, wobei k_0 der beobachteten Geschwindigkeitskonstante ohne ADP entsprach. (B) K_{AD} wurde bestimmt, indem die Hyperbel $k_{\text{obs}}/k_0 = 1/(1 + [\text{ADP}]/K_{\text{AD}})$ an die Daten für M765 (■) und MVb (●) angepasst wurde.

Aus den Geschwindigkeitskonstanten bei hohen ADP-Konzentrationen konnte ein Wert für die Dissoziationsgeschwindigkeit von ADP aus dem Akto.Myosin-Vb.ADP-Komplex ermittelt werden [Robblee *et al.*, 2005]. Dieser lag für MVb bei hohen ADP-Konzentrationen oberhalb von K_{AD} bei $k_{\text{AD}} = 17,4 \pm 1,7 \text{ s}^{-1}$ und ist damit vergleichbar mit dem aus der mantADP-Dissoziation erhaltenen Wert k_{AmD} von $21,6 \text{ s}^{-1}$ (s. Kapitel 3.4.4.3.). Für M765 kann die Dissoziationsgeschwindigkeit von ADP aus dem Akto.Myosin-Komplex ebenfalls aus Abbildung 3.19 B entnommen werden. k_{AD} liegt bei $\sim 50 \text{ s}^{-1}$.

Die Ergebnisse der transientenkinetischen Charakterisierung der Nukleotidinteraktionen mit Akto.Myosin sind in Tabelle 3.4 zusammengefaßt und den Daten für *G. gallus* Myosin-Va gegenübergestellt.

Tab. 3.4: Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Nukleotidinteraktionen mit Akto.Myosin

Nukleotid	Konstante	M765	<i>Dd</i> Myosin-Vb	<i>Gg</i> Myosin-Va*
ATP	$K_1 k_{+2}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$0,24 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,01$	0,9
	k_{+2} (s^{-1})	~ 1000	150 ± 16	870
mantADP	$k_{+\text{AmD}}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) mant-Signal	-	$4,0 \pm 0,7$	12,6
	$k_{-\text{AmD}}$ (s^{-1}) mant-Signal	-	$21,6 \pm 6$	12
	K_{AmD} (μM) ($k_{-\text{AmD}}/k_{+\text{AmD}}$)	-	$5,4 \pm 2$	0,93
ADP	K_{AD} (μM) Pyren-Signal	107 ± 23	$8 \pm 0,5$	-
	$k_{-\text{AD}}$ (s^{-1})	~ 50	$17,4 \pm 1,7$	16

* aus: De La Cruz, 1999

Reaktionsbedingungen: 20 mM MOPS, pH-Wert 7,0; 5 mM MgCl_2 , 100 mM KCl bei 20 °C.

D. discoideum Myosin-Vb zeigt die geringste Dissoziationsgeschwindigkeit des Akto.Myosinkomplexes durch ATP. Für Myosin-II und *G. gallus* Myosin-Va liegt diese Geschwindigkeit 6-7mal höher. Der limitierende Schritt für die Dissoziation des Akto.Myosin-Vb-Komplexes ist die Isomerisierung des ternären ATP.Akto.Myosin-Vb-Komplexes. Die maximale Geschwindigkeit dieses Prozesses liegt für *D. discoideum* Myosin-Vb bei 150 s^{-1} . Bei physiologischen ATP-Konzentrationen von ungefähr 1 mM liegt sie bei 50 bis 75 s^{-1} (s. Abbildung 3.19 B).

Die ADP-Affinität für den Aktomyosinkomplex ist für beide Klasse V Myosine sehr viel höher als für Myosin-II. Die ADP-Affinität dieses Motors wird durch die Anwesenheit von Aktin nicht wesentlich geschwächt, während sie bei Myosin-II um den Faktor 15 verringert wird. Die Dissoziationsgeschwindigkeit von ADP aus dem ternären Komplex liegt für Myosin-II bei $\sim 50 \text{ s}^{-1}$, beide Klasse V Myosine weisen eine sehr viel niedrigere ADP Dissoziationsgeschwindigkeit auf. Diese liegt mit 16 s^{-1} für *G. gallus* Myosin-Va bzw. mit $21,6 \text{ s}^{-1}$ (mant-Signal) und $17,4 \text{ s}^{-1}$ (Pyren-Signal) für *D. discoideum* Myosin-Vb im Bereich der jeweiligen maximalen ATPase-Geschwindigkeit.

3.4.5. Interaktionen von Myosin mit Aktin

3.4.5.1. Bindung von Myosin und Myosin.ADP an Aktin

Die Aktin-Affinität, die im nanomolaren Bereich liegt, läßt sich aus der Messung der Aktinbindungs- und Dissoziationsgeschwindigkeit berechnen. Prozessive Myosine müssen auch im ADP-gebundenen Zustand eine hohe Affinität zum Aktinfilament besitzen. Damit wird gewährleistet, daß das dimere Molekül mit einem Kopf trotz gebundenem ADP stark an Aktin gebunden bleibt, während der zweite Kopf sich zur nächsten Aktinbindungsstelle bewegt. Daher wurden die Bindungs- und Dissoziationsmessungen auch in Anwesenheit von ADP durchgeführt, um die Affinität von ADP.Myosin für Aktin berechnen zu können.

Die nachfolgenden Schemata zeigen die Reaktionsschritte bei der Interaktion von Aktin mit Myosin bzw. dem Myosin.ADP-Komplex. Diese Interaktion ist ein zweistufiger Prozeß (s. Kapitel 1.6.3.) [Geeves *et al.*, 1984]. Da die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten im

untersuchten Konzentrationsbereich linear von der Aktin-Konzentration abhängen, wurden die Reaktionsschemata als einfache bimolekulare Reaktionen dargestellt [De La Cruz *et al.*, 1999]. Die Geschwindigkeitskonstanten für die jeweiligen Schritte sind mit k_x bezeichnet, die fettgedruckte Darstellung verdeutlicht dabei, daß es sich um Interaktionen in der Anwesenheit von Aktin handelt. M steht für Myosin, A für Aktin und D für ADP.



Die Aktin-Bindung wurde über die Verringerung der Pyren-Fluoreszenz nach Bindung von Pyren-Aktin an Myosin gemessen. Der Reaktionsverlauf wurde mit einer Exponentialfunktion 1. Ordnung beschrieben (s. Abbildung 3.20) und die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} wurden gegen die Pyren-Aktin-Konzentration aufgetragen.

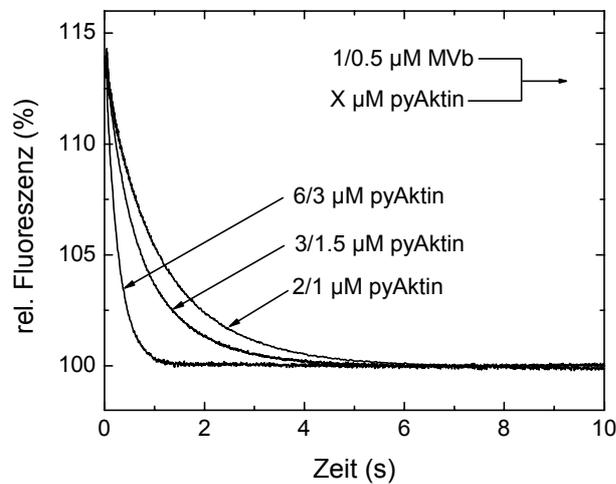


Abb. 3.20: Aktin-Bindung an Myosin-Vb. Fluoreszenzveränderung bei der Reaktion von 2, 3 bzw. 6 μM Pyren-Aktin mit 1 μM MVb. An die Daten wurden Exponentialfunktionen 1. Ordnung angepaßt.

An die Daten wurde eine Gerade angepaßt (s. Abbildung 3.21 A und B); aus der Steigung wurden die Bindungskonstanten 2. Ordnung erhalten.

Für Myosin-Vb wurde die Pyren-Aktin-Bindung auch in Anwesenheit eines Überschusses an ADP (500 μM) gemessen. Als Bindungskonstante 2. Ordnung (k_{+A}) ergab sich für Myosin-Vb ein Wert von 1,17 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, für Myosin-II 0,53 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. In Anwesenheit von ADP beträgt die Bindungskonstante k_{+DA} für Myosin-Vb 0,78 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, für Myosin-II verringert sie sich auf 0,14 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

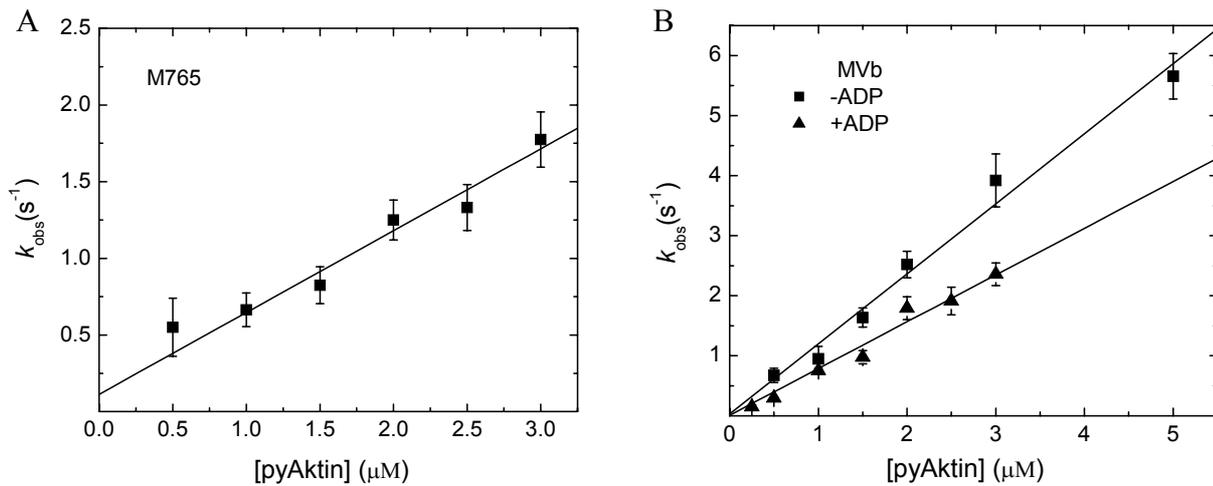


Abb. 3.21: Aktin-Bindung an Myosin. A) Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten für M765 von der Konzentration an Pyren-Aktin. B) Abhängigkeit der k_{obs} -Werte für MVb von der Aktin-Konzentration in Abwesenheit (\bullet) und Anwesenheit (\blacktriangle) von 500 μM ADP. An die Daten wurden Geraden angepaßt, deren Steigungen die Bindungskonstanten 2. Ordnung angeben.

3.4.5.2. Aktin-Dissoziation

Die Geschwindigkeitskonstante für die Dissoziation von Aktin aus dem stark gebundenen Akto.Myosin oder Akto.Myosin.ADP-Komplex wurde über die Verdrängung von Pyren-Aktin mit einem 40-fachen Überschuß an unmarkiertem F-Aktin gemessen. An die beobachtete Fluoreszenzerhöhung wurde eine Exponentialfunktion angepaßt, deren Geschwindigkeitskonstante k_{obs} der Dissoziationgeschwindigkeit in Abwesenheit von ADP (k_{A}) bzw. in Anwesenheit von 500 μM ADP (k_{DA}) entspricht (s. Abbildung 3.22).

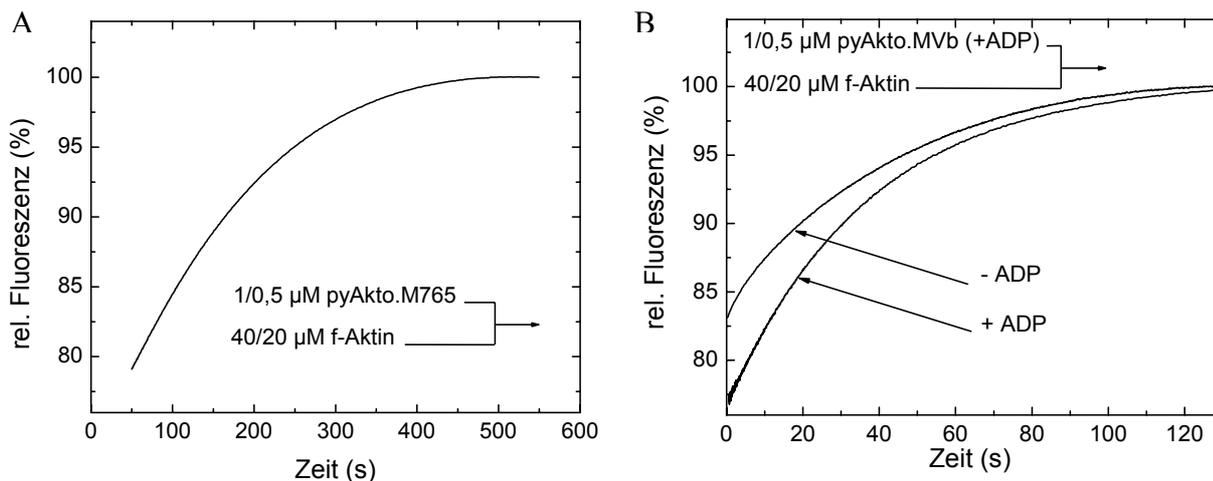


Abb. 3.22: Dissoziation von Aktin aus dem Komplex mit Myosin. A) Die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation (k_{A}) für M765 wurde aus der Geschwindigkeit der Fluoreszenzerhöhung bei der Verdrängung von Pyren-Aktin aus dem Komplex mit Myosin durch einen Überschuß an unmarkiertem Aktin bestimmt. An den Kurvenverlauf wurde eine Exponentialfunktion angepaßt und k_{obs} entspricht k_{A} . B) Die Geschwindigkeitskonstanten für die Dissoziation von Pyren-Aktin aus dem Komplex mit MVb (k_{A}) bzw. dem Komplex mit MVb.ADP (k_{DA}) wurden ebenfalls durch Anpassen einer Exponentialfunktion bestimmt.

Für Myosin-II ergab sich eine Dissoziationskonstante k_{-A} von $0,006 \text{ s}^{-1}$, für Myosin-Vb von $0,023 \text{ s}^{-1}$. Aus dem Pyren-Akto.Myosin-Vb.ADP-Komplex dissoziiert Aktin mit einer nur leicht erhöhten Geschwindigkeitskonstante von $k_{-DA} = 0,03 \text{ s}^{-1}$.

Aus den Bindungs- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten konnten Gleichgewichtskonstanten für die Interaktion von Aktin mit Myosin berechnet werden. Für Myosin-II ergab sich für K_A ein Wert von $11,3 \text{ nM}$, für Myosin-Vb von 20 nM . In Anwesenheit von ADP verringerte sich die Aktin-Affinität von Myosin-Vb nur um etwa die Hälfte auf $K_{DA} = 38 \text{ nM}$.

Die Ergebnisse der transientenkinetischen Charakterisierung der Interaktionen von Myosin mit Aktin sind in Tabelle 3.5 zusammengefaßt und den Daten für *G. gallus* Myosin-Va gegenübergestellt.

Tab. 3.5: Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Myosininteraktionen mit Aktin

Konstante	M765	<i>Dd</i> Myosin-Vb	<i>Gg</i> Myosin-Va*
$k_{+A} (\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$0,53 \pm 0,05$	$1,17 \pm 0,08$	73
$k_{-A} (\text{s}^{-1})$	$0,006 \pm 0,0002$	$0,023 \pm 0,001$	0,00036
$K_A (\text{nM})$	$11,3 \pm 1$	20 ± 2	0,005
$k_{+DA} (\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$0,14 \pm 0,01$	$0,78 \pm 0,06$	4,2
$k_{-DA} (\text{s}^{-1})$	$0,011 \pm 0,0006$	$0,03 \pm 0,001$	0,032
$K_{DA} (\text{nM})$	$79,5 \pm 14$	38 ± 5	7,6
K_{DA}/K_A	7	1,9	1520

* aus: De La Cruz, 1999

Reaktionsbedingungen: 20 mM MOPS, pH-Wert 7,0; 5 mM MgCl_2 , 100 mM KCl bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Aus den Daten geht hervor, daß Myosin-II und *D. discoideum* Myosin-Vb in Abwesenheit von Nukleotid vergleichbare Aktinbindungs- und Dissoziationsgeschwindigkeiten aufweisen. Die Affinität zu Aktin liegt im nanomolaren Bereich und ist somit ebenfalls für beide Myosine hoch. *G. gallus* Myosin-Va zeigt eine mehr als sechzigfach schnellere Bindung sowie eine sechzigfach langsamere Dissoziation von Aktin als *D. discoideum* Myosin-Vb. Daraus resultiert eine mehr als 1000fach höhere Affinität zu Aktin im nukleotidfreien Zustand. In Anwesenheit von ADP haben alle drei Myosine eine ähnlich hohe Affinität zu Aktin im nanomolaren Bereich. Dabei fällt auf, daß *D. discoideum* Myosin-Vb eine sehr geringe Kopplung zwischen der Aktin-Affinität in Anwesenheit und in Abwesenheit von ADP zeigt. ADP schwächt die Aktin-Affinität nur um den Faktor 1,9 während die Aktin-Affinität von Myosin-II durch ADP um den Faktor 7 verringert wird. Die Dissoziationsgeschwindigkeit von Aktin aus dem ternären Komplex ist für alle drei Myosine sehr gering.

3.4.6. Messungen mit dem *flash-photolysis* System

Mit dem *flash-photolysis* System läßt sich die apparente Bindungskonstante 2. Ordnung K_1k_{+2} für die ATP-Bindung an Akto.Myosin bestimmen [Weiss *et al.*, 2000]. Dazu wird mit dem Lichtblitz eines Lasers ATP aus einer inerten Käfigverbindung freigesetzt. Als Signal dient die Abnahme der Lichtstreuung bei der Dissoziation des Aktomyosinkomplexes. Die Interaktion von ATP mit dem Aktomyosinkomplex wurde bereits mit Hilfe eines extrinsischen Fluoreszenzsignals untersucht (s. Kapitel 3.4.4.1.). Dabei ist die Geschwindigkeit der Isomerisierung des Akto.Myosin.ATP-Kollisionskomplexes, mit der die Fluoreszenzänderung einhergeht, limitierend für die Aktindissoziation (s. Kapitel 1.6.4.). Im *flash-photolysis* System kann diese Dissoziation über das Streulichtsignal direkt beobachtet werden.

Für die Messungen wurde ein Konstrukt mit FLAG-tag eingesetzt (MVb-FLAG). Dadurch wurde eine bei Konstrukten mit His-tag beobachtete Aggregation minimiert. Der Verlauf des Lichtstreusignals folgte Exponentialfunktionen 2. Ordnung. Die langsame Phase zeigte keine Abhängigkeit von der eingesetzten ATP-Konzentration. Sie entstammt einem Streuprozess, der aus der geringfügigen Aggregation des Myosins resultieren könnte und wurde nicht weiter untersucht.

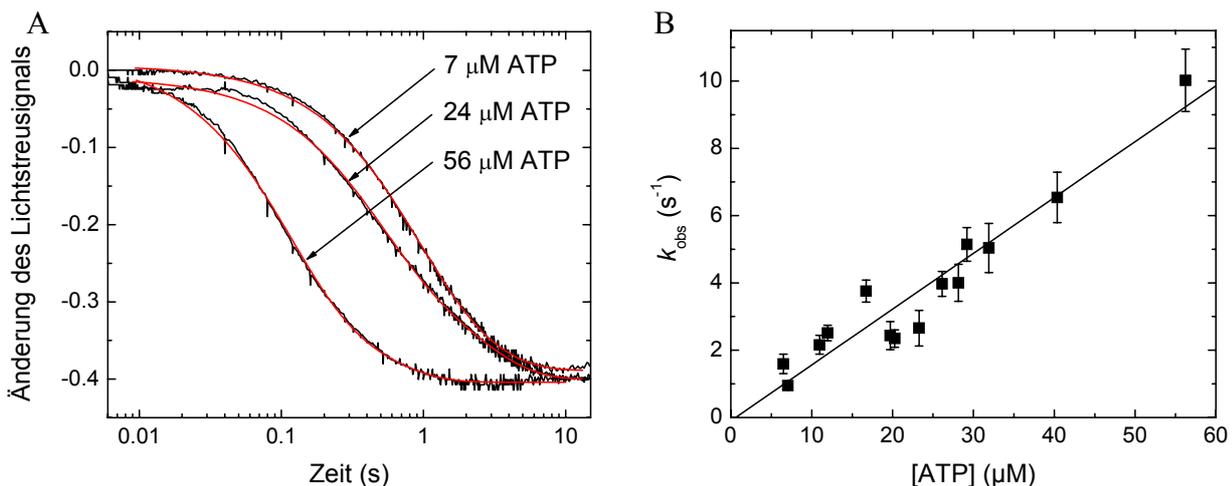


Abb. 3.23: Messung der ATP induzierten Dissoziation von Akto.Myosin-Vb mit dem *flash-photolysis* System. A) Verlauf des Lichtstreusignals bei der Freisetzung von 7, 24 bzw. 56 μM ATP aus cagedATP. An die Kurvenverläufe konnten Exponentialfunktionen 2. Ordnung angepaßt werden. B) An die Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten der schnellen Phase der Dissoziationsreaktionen gegen die freigesetzte ATP-Konzentration wurde eine Gerade angepaßt, deren Steigung K_1k_{+2} ergab.

Die Streulichtamplitude lag bei einer Reaktionslösung mit je 1 μM Myosin und Aktin bei 40 % (siehe Abbildung 3.23 A), es wurden verschiedene Messungen mit jeweils variierender Konzentration an freigesetztem ATP durchgeführt. Die Kurvenverläufe des Lichtstreusignals konnten mit Exponentialfunktionen 2. Ordnung beschrieben werden. Die schnelle Phase zeigte eine Abhängigkeit von der ATP-Konzentration. An die Auftragung der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten gegen die ATP-Konzentration (s. Abbildung 3.23 B) wurde eine Gerade angepaßt, deren Steigung K_1k_{+2} entspricht. Der für *D. discoideum* Myosin-Vb erhaltene Wert von $0,166 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ deckt sich gut mit dem über Pyren-Aktin erhaltenen Wert von $0,19 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Aus den Messungen im *flash-photolysis* System ließ sich auch die ATPase-Aktivität in Anwesenheit von 1 μM Aktin ermitteln. Dazu wurde ausgenutzt, daß das Lichtstreusignal bei der Reassoziaton des Aktomyosinkomplexes wieder zunimmt. Das geschieht nach der Umsetzung des gesamten freigesetzten ATP in der Küvette zu ADP.

Aus der Halbwertzeit der Reassoziaton (siehe Abbildung 3.24), der eingesetzten Myosin-Konzentration und der freigesetzten ATP-Konzentration konnte für *D. discoideum* Myosin-Vb eine ATPase von $0,15 \text{ s}^{-1}$ berechnet werden (Durchschnittswert aus 4 Experimenten mit variierender ATP-Konzentration).

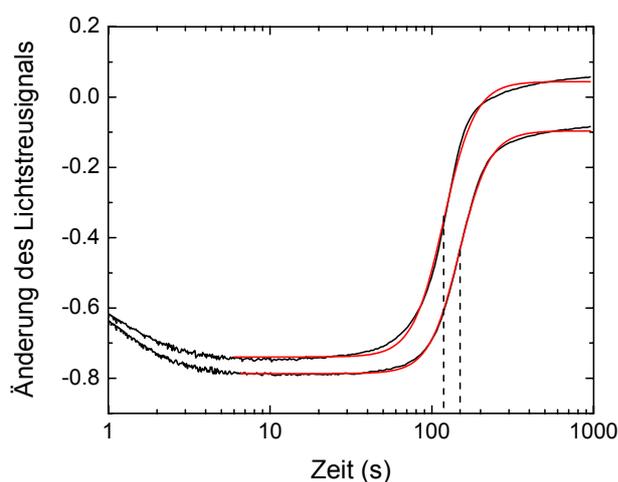


Abb. 3.24: Bestimmung der ATPase von *D. discoideum* Myosin-Vb in Anwesenheit von 1 μM Aktin mit dem *flash-photolysis* System. An den Verlauf des Lichtstreusignals der Reassoziationsreaktion konnte phänomenologisch eine Hill-Funktion angepasst werden. Aus der Reassoziationszeit (gestrichelte Linie) konnte die ATPase-Geschwindigkeit berechnet werden.

Die Experimente ergaben für die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung für die ATP induzierte Dissoziation des Aktomyosinkomplexes über das Fluoreszenzsignal von Pyren-Aktin und über das Lichtstreusignal vergleichbare Ergebnisse. Für die Geschwindigkeit der Fluoreszenzänderung ist die Isomerisierung des Akto.Myosin.ATP-Komplexes geschwindigkeitsbestimmend. Mit den Lichtstremessungen konnte gezeigt werden, daß diese Isomerisierung auch limitierend für die Dissoziation des ternären Komplexes ist.

Außerdem konnte alternativ zum NADH gekoppelten Assay die ATPase bei 1 μM Aktin mit Hilfe des Lichtstreusignals gemessen werden. Bei dieser Aktin-Konzentration ist gegenüber der basalen ATPase eine Aktivierung der ATPase-Geschwindigkeit zu beobachten.

	Konstante	<i>stopped-flow</i>	Lichtstreuung
ATP + Akto.M	$K_1k_{+2} (\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$0,19 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,04$

	Konstante	NADH-Assay	Lichtstreuung
ATPase (1 μM Aktin)	$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1})$	$0,17 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,03$

3.5. Untersuchungen zur Mg^{2+} -Regulation von Klasse V Myosinen

Die Regulation der Motoraktivität durch Mg^{2+} -Ionen wurde erstmals für Myosine der Klasse I und V beschrieben [Fujita-Becker *et al.*, 2004; Dürrwang *et al.*, 2005; Rosenfeld *et al.*, 2005; Hannemann *et al.*, 2005]. Durch hohe Konzentrationen an freiem Magnesium im physiologischen Bereich wird die ADP-Freisetzung von Myosin-ID und Myosin-IE aus *D. discoideum* inhibiert. Da auch die Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten reduziert wird, wird postuliert, daß die Produktfreisetzung hierfür verantwortlich ist. Die Ergebnisse implizieren, daß für diese Myosine durch Veränderungen der freien Magnesiumionen-Konzentration zwischen schneller Bewegung (bei niedriger freier Mg^{2+} -Konzentration) und der Aufrechterhaltung von Zugspannung (bei hoher freier Mg^{2+} -Konzentration) umgeschaltet werden kann.

Ein vergleichbarer Effekt von freien Magnesiumionen auf die ADP-Freisetzung wurde auch für *G. gallus* Myosin-Va gezeigt. Bei diesem prozessiven Myosin verlängern hohe Konzentrationen an freiem Magnesium die Zeitdauer, in der es sich im stark aktin gebundenen Zustand befindet (vgl. Kapitel 1.4.2.).

Es wird vermutet, daß freies Mg^{2+} auch für *D. discoideum* Myosin-Vb die Produktfreisetzung reguliert. Deshalb wird im Folgenden untersucht, inwiefern freie Magnesiumionen die Bindungs- und Dissoziationskinetiken mit Aktin und Nukleotiden beeinflussen.

Zunächst wurde der Einfluß freier Mg^{2+} Ionen auf die Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten untersucht, um im Anschluß die Einzelschritte der Regulation durch Magnesiumionen transientenkinetisch zu beschreiben. In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse der transientenkinetischen Messungen dargestellt, die einen Effekt bei der Veränderung der freien Mg^{2+} -Konzentration zeigten.

3.5.1. *In vitro* Motilität von Aktinfilamenten

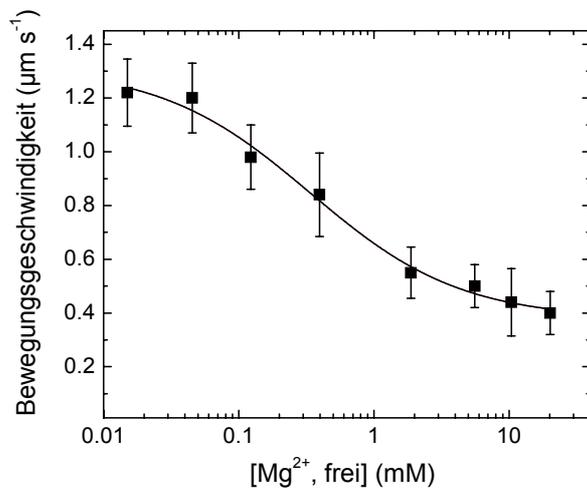
Zur Untersuchung des Einflusses von freien Mg^{2+} Ionen auf die funktionellen Eigenschaften von Myosin-Vb wurde eine Charakterisierung mit Hilfe von *in vitro* Motilitätsassays durchgeführt. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit H. Keller in der Arbeitsgruppe durchgeführt. Für die Experimente wurde das MVb-2R-His Konstrukt eingesetzt (s. Kapitel 3.3.2., gelagert in 30% Sucrose bei $-80^{\circ}C$); die Oberfläche der Durchflußzellen wurde mit 0,05 mg/ml anti-Pentahistidin-Antikörper beschichtet.

Die maximale Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten konnte bei niedrigen freien Magnesiumionen-Konzentrationen ($<50 \mu M$) beobachtet werden (s. Abbildung 3.25). Hohe Konzentrationen von freiem Mg^{2+} ($> 1 mM$) führten zu einer dreifachen Reduzierung der Bewegungsgeschwindigkeit. Für die Beschreibung der Mg^{2+} -Abhängigkeit der Bewegungsgeschwindigkeit eignete sich am besten die Hill-Gleichung:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2$$

A_1 und A_2 geben die Grenzwerte für $[Mg^{2+}] \rightarrow 0$ bzw. $[Mg^{2+}] \rightarrow \infty$ an. x_0 markiert den Wendepunkt der sigmoid verlaufenden Kurve. Der Hill-Koeffizient p , der ein Maß für die Kooperativität der Bindung mehrerer Liganden darstellt, wurde mit $p = 1$ festgelegt.

Aus der Anpassung der Hill-Gleichung an die Daten wurde eine Inhibierungskonstante K_i von $0,34 \pm 0,1$ mM erhalten.



Bewegungsgeschwindigkeit (µm s ⁻¹)	<i>Dd</i> Myosin-Vb
5 mM Mg ²⁺ , frei	0,5 ± 0,2
50 µM Mg ²⁺ , frei	1,2 ± 0,2
Inhibierungskonstante K_i (mM)	0,34 ± 0,1

Abb. 3.25: Einfluß von freien Magnesiumionen auf die Bewegungsgeschwindigkeit in *in vitro* Motilitätsversuchen. Die höchste Bewegungsgeschwindigkeit für *D. discoideum* Myosin-Vb wurde bei niedrigen freien Mg²⁺-Konzentrationen gemessen. Tabelle rechts: Bewegungsgeschwindigkeiten und Inhibierungskonstante aus *in vitro* Motilitätsversuchen. Reaktionsbedingungen: 25 mM Imidazol, pH-Wert 7,4; X mM MgCl₂, 25 mM KCl, 1 mM EGTA, 10 mM DTT bei 20 °C.

Hohe Konzentrationen an freien Magnesiumionen führen für *D. discoideum* Myosin-Vb zu einer Verminderung der Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten. Dies muß mit der Verlängerung der Zeitdauer bestimmter Zustände im ATPase-Zyklus einhergehen. In diesem Zusammenhang ist besonders eine Ausdehnung der stark Aktin bindenden Zustände (Akto.Myosin und Akto.Myosin.ADP) interessant, da dies den Grad an Prozessivität von Myosin-Vb erhöhen könnte. Deshalb wurde transientenkinetisch der Einfluß von freien Magnesiumionen auf einzelne Schritte des ATPase-Zyklus untersucht.

3.5.2. Mg²⁺-Abhängigkeit der ADP-Affinität von Myosin-Vb

Um zu untersuchen, ob freie Magnesiumionen die Bindung von ADP im aktinfreien Zustand modulieren, wurde die Affinität von Myosin-Vb für ADP bei hoher (5 mM) und niedriger (0,2 mM) Konzentration an freien Mg²⁺ Ionen bestimmt. Die Bestimmung der ADP-Affinität wurde über die ADP-Inhibierung der Pyren-Aktin-Bindung an Myosin-Vb durchgeführt (s. Kapitel 3.4.3.5.). Wie in Abbildung 3.26 zu sehen ist, erhöht sich die ADP-Affinität K_D von Myosin-Vb bei hoher Magnesiumionen-Konzentration um mehr als das 10-fache von 29,8 µM (bei 0,2 mM freiem Mg²⁺) auf 2,54 µM (bei 5 mM freiem Mg²⁺).

Die Konzentration an freien Mg²⁺ Ionen in der Lösung wurde hier und in allen nachfolgenden Messungen mit Hilfe des Programms MaxChelator 2004 ermittelt (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html> [Patton *et al.*, 2004]). Das Programm errechnet mit Hilfe der Affinität von ADP, ATP und EDTA für Mg²⁺ sowie der Angabe der Ionenstärke, des pH-Wertes und der Temperatur die Konzentration an freiem Mg²⁺ in der Reaktionslösung. Die vom Programm verwendeten Stabilitätskonstanten sind: 71,9 µM für

den Mg^{2+} -ATP Komplex, $615,2 \mu\text{M}$ für den Mg^{2+} -ADP-Komplex und 2 nM für den Komplex aus EDTA und Mg^{2+} .

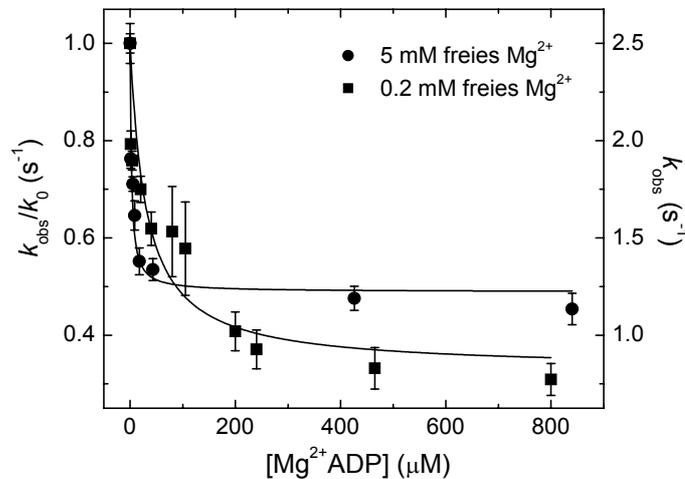


Abb. 3.26: ADP-Inhibition der Pyren-Aktin-Bindung an MVb. Die ADP-Affinität für MVb (K_D) wurde wie in 3.4.3.5. beschrieben bestimmt. Bei einer hohen Konzentration an freiem Mg^{2+} von 5 mM (●) wurde eine 10-fach höhere Affinität von ADP für MVb bestimmt als bei einer niedrigen ($0,2 \text{ mM}$, ■).

Die Affinität von Myosin-Vb für ADP wurde auch über die Bindungs- und Dissoziationsraten von mantADP für Myosin-Vb bei hoher und niedriger freier Magnesiumionen-Konzentration bestimmt.

Aufgrund der geringeren Amplitude und des schlechteren Signal-Rausch-Verhältnisses des Bindungssignals bei niedrigen Magnesiumionen-Konzentrationen konnte für die Messung bei $0,2 \text{ mM}$ freiem Mg^{2+} kein biphasischer Reaktionsverlauf beobachtet werden (vgl. Kapitel 3.4.3.5.). An die Fluoreszenzverläufe konnten Exponentialfunktionen 1. Ordnung angepaßt werden. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten wurden gegen die Konzentration an Mg^{2+} -mantADP aufgetragen, an die Daten konnte eine Gerade angepaßt werden (s. Abbildung 3.27 A). Die Bindungskonstante 2. Ordnung (k_{+mD}) liegt mit $0,05 \pm 0,004 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ um den Faktor 3,4 niedriger als die der langsamen Phase bei 5 mM freiem Mg^{2+} . Aus dem y-Achsenabschnitt konnten nach Extrapolation der Geraden zur Ordinate Dissoziationskonstanten für mantADP von MVb ermittelt werden, die bei $k_{-mD} = 0,8 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$ (5 mM freies Mg^{2+}) bzw. $k_{-mD} = 1,2 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$ ($0,2 \text{ mM}$ freies Mg^{2+}) liegen.

Die Dissoziationskonstanten wurden auch direkt bestimmt (s. Abbildung 3.27 B). Dazu wurde mantADP bei 5 und $0,2 \text{ mM}$ freiem Mg^{2+} mit einem Überschuß an ADP aus dem Komplex mit Myosin-Vb verdrängt. Die Fluoreszenzverläufe folgten Exponentialfunktionen 1. Ordnung. Bei einer freien Magnesiumionen-Konzentration von 5 mM wurde eine Dissoziationskonstante von $k_{-mD} = 0,92 \text{ s}^{-1}$ gemessen, bei $0,2 \text{ mM}$ freiem Mg^{2+} lag sie bei $k_{-mD} = 1,05 \text{ s}^{-1}$.

Aus den ermittelten Bindungs- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten von mantADP für Myosin konnte die mantADP-Affinität (K_{mD}) über den Quotienten k_{-mD}/k_{+mD} berechnet werden. Bei 5 mM freiem Mg^{2+} ergab sich für Myosin-Vb eine Gleichgewichtskonstante von $5,4 \mu\text{M}$, bei $0,2 \text{ mM}$ freiem Mg^{2+} lag diese um den Faktor 4 höher bei $K_{mD} = 21 \mu\text{M}$.

D. discoideum Myosin-Vb zeigt in Anwesenheit geringer freier Magnesiumionen-Konzentrationen eine niedrigere ADP-Affinität. Dies wurde sowohl mit extrinsischer Pyren-Fluoreszenz als auch mit extrinsischer mant-Fluoreszenz als Meßsignal nachgewiesen. Im

aktinfreien Zustand wird die Verringerung der Affinität hauptsächlich durch eine langsamere ADP-Bindung hervorgerufen.

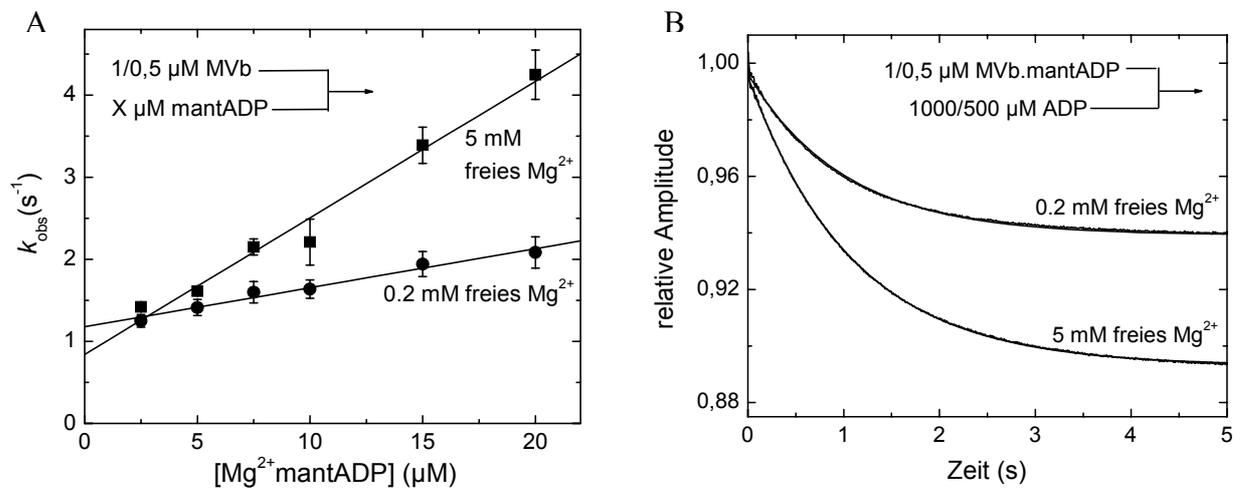


Abb. 3.27: Mg²⁺-Abhängigkeit der ADP-Interaktion mit Myosin-Vb. (A) Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der mantADP-Bindung bei 0,2 (●) und 5 mM freiem Mg²⁺ (■) von der mantADP-Konzentration. Bei Anpassung von Geraden an die Meßwerte ergaben die Steigungen die Bindungskonstanten 2. Ordnung für mantADP (k_{+mD}). (B) mantADP-Dissoziation aus dem Komplex mit Myosin-Vb bei 0,2 und 5 mM freiem Mg²⁺. Der Fluoreszenzverlauf wurde mit einer Exponentialfunktion 1. Ordnung beschrieben, k_{obs} entspricht der Dissoziationsgeschwindigkeit k_{-mD} von mantADP.

3.5.3. Mg²⁺-Abhängigkeit der ADP-Affinität von Akto.Myosin-Vb

Im vorigen Kapitel wurde die Mg²⁺-Abhängigkeit der ADP-Affinität von Myosin-Vb in Abwesenheit von Aktin gezeigt.

Um einzelne Schritte im ATPase-Zyklus von Myosin-Vb in Anwesenheit von Aktin genauer zu charakterisieren, wurde der Einfluß von Mg²⁺-Ionen auf die ADP-Bindung an den Akto.Myosin-Vb-Komplex untersucht. Dazu wurden die Bindungskonstanten 2. Ordnung von mantADP für den Komplex aus Aktin und Myosin-Vb bei verschiedenen freien Mg²⁺-Konzentrationen gemessen (s. Abbildung 3.28 A). Der Fluoreszenzverlauf folgte für alle Magnesiumionen-Konzentrationen einer Exponentialfunktion 1. Ordnung.

An die Auftragung der Ratenkonstanten gegen die mantADP-Konzentration ließen sich lineare Funktionen anpassen (s. Abbildung 3.28 B), deren Steigungen Bindungskonstanten zweiter Ordnung (k_{+AmD}) ergaben; aus den Y-Achsenabschnitten ließen sich Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{-AmD}) bestimmen. Die mantADP-Dissoziationsraten im Bereich von 0,2 bis 5 mM freiem Mg²⁺ verringern sich invers hyperbolisch von $\sim 185 \text{ s}^{-1}$ auf $\sim 30 \text{ s}^{-1}$. Freie Mg²⁺ Ionen beeinflussen ebenfalls die Bindungskonstante 2. Ordnung von mantADP für den Akto.Myosin-Vb-Komplex, die von $k_{+AmD} = 6.7 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ auf $4.0 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ fällt.

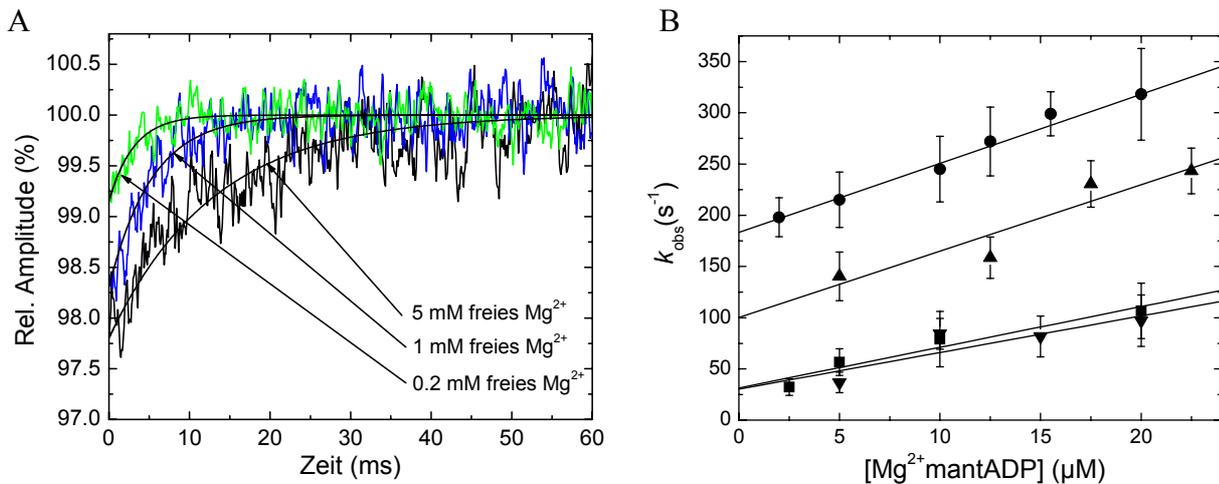
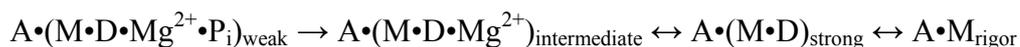


Abb. 3.28: Einfluß von freien Mg²⁺ Ionen auf die ADP-Bindung von Akto-Myosin-Vb. A) Fluoreszenzänderung bei der Bindung von 20 μM mantADP an 2 μM Akto.MVb. Die Fluoreszenz wurde bei 296 nm angeregt und die Emission nach Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer durch einen KV 389-Filter verfolgt. Die Kurve wurde mit einer Exponentialfunktion 1. Ordnung beschrieben. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten lagen bei 77 s⁻¹ (5 mM freies Mg²⁺), 152 s⁻¹ (1 mM freies Mg²⁺), bzw. 243 s⁻¹ (0,2 mM freies Mg²⁺). B) Die Auftragung der Ratenkonstanten gegen die mantADP-Konzentration folgt linearen Funktionen bei 0.2 mM (●), 1 mM (▲), 3 mM (▼) und 5 mM (■) freier Mg²⁺-Konzentration. Die Steigung der Geraden ergibt jeweils eine Bindungskonstante zweiter Ordnung (k_{+AMD}).

Im ATPase-Zyklus von Myosin-V führt die Bindung an Aktin zu einer sukzessiven Abgabe der Hydrolyseprodukte (s. Kapitel 1.4.2.). Dies geht mit einer zunehmend stärkeren Bindung von Myosin an Aktin einher. Für die Reihenfolge der Produktfreisetzung wird bislang folgender Mechanismus vorgeschlagen [Rosenfeld und Sweeney, 2004; Rosenfeld *et al.*, 2005]:



Wie aus dem Schema ersichtlich ist, wird das Magnesiumion vor ADP freigesetzt. Das ermöglicht die Regulation des *weak-strong*-Überganges durch die Konzentration an freiem Mg²⁺. Hohe Konzentrationen können die Zeitdauer der stark Aktin bindenden Zustände verlängern.

Die aus den y-Achsenabschnitten der mantADP-Bindungstitration bei verschiedenen freien Mg²⁺-Konzentrationen ermittelten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten zeigen eine invers hyperbolische Abhängigkeit von der Magnesiumionen-Konzentration. Diese Abhängigkeit sollte durch die direkte Messung der ADP-Dissoziation aus dem Akto-Myosin-Vb-Komplex (k_{-AMD}) überprüft werden. Die Geschwindigkeit der Verdrängung von mantADP aus dem ternären Komplex wurde wie in 3.4.4.3. beschrieben bei unterschiedlichen freien Magnesiumionen-Konzentrationen gemessen.

Wie in Abbildung 3.29 A zu erkennen ist, nahm die Dissoziationsgeschwindigkeit von mantADP aus dem ternären Komplex mit steigender freier Magnesiumionen-Konzentration ab. Nach Auftragung der erhaltenen Dissoziationsratenkonstanten gegen die freie Mg²⁺-Konzentration konnte an die Daten eine Hyperbel der Form $k_{-AMD} = k_{\min} * [Mg^{2+}] / (K_i + [Mg^{2+}]) + k_{\max}$ angepaßt werden (Abbildung 3.29 B). Aus dieser Anpassung ergab sich eine Inhibierungskonstante K_i von $0,52 \pm 0,3$ mM.

Bei hohen Konzentrationen an freien Mg^{2+} Ionen wird die Geschwindigkeit der Dissoziation von ADP aus dem ternären Akto.Myosin-Vb.ADP-Komplex um den Faktor 8 verlangsamt.

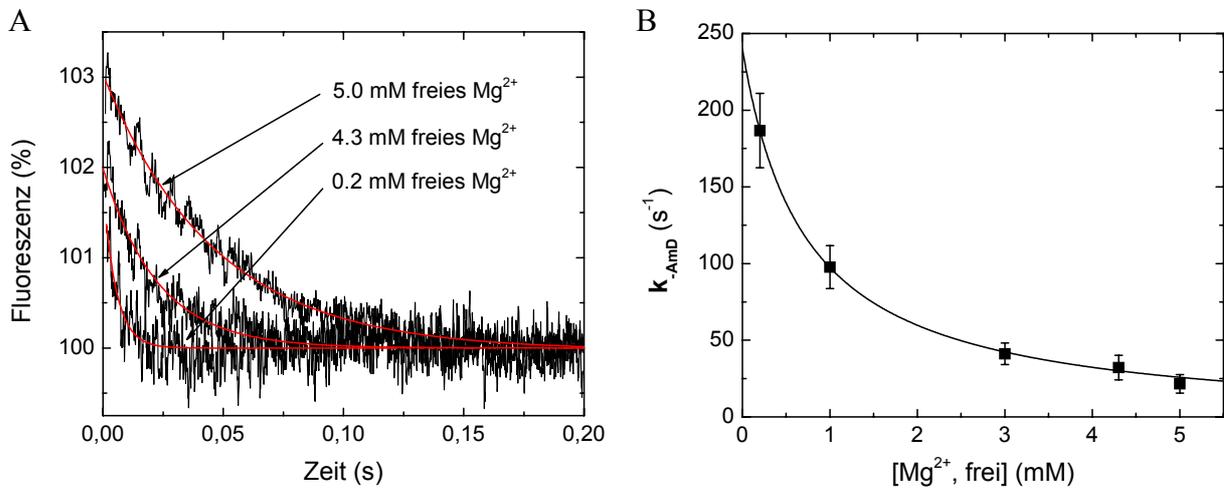


Abb. 3.29: Einfluß von freien Mg^{2+} Ionen auf die ADP Dissoziation von Akto.Myosin-Vb. A) Fluoreszenzänderung bei der schnellen Mischung von 1600 μM ADP mit einem Komplex aus 20 μM mantADP und 2 μM Akto.MVb in Anwesenheit verschiedener freier Magnesiumionen-Konzentrationen. Die Fluoreszenz wurde bei 296 nm angeregt und die Emission nach Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer durch einen KV 389-Filter verfolgt. Die Kurven wurden mit Exponentialfunktionen 1. Ordnung beschrieben. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten lagen bei 21,6 s⁻¹ (5 mM freies Mg^{2+}), 32,2 s⁻¹ (4,3 mM freies Mg^{2+}) sowie 186,7 s⁻¹ (0,2 mM freies Mg^{2+}). B) An die Auftragung der Ratenkonstanten gegen die freie Mg^{2+} -Konzentration ließ sich eine Hyperbel anpassen.

Aus den erhalten Bindungs- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten konnte durch Quotientenbildung die Affinität von ADP für den Akto.Myosin-Vb-Komplex bei verschiedenen Magnesiumionen-Konzentrationen berechnet werden. Die aus der Gleichung $K_{AmD} = k_{-AmD} / k_{+AmD}$ erhaltenen Werte wurden gegen die freien Mg^{2+} -Konzentrationen aufgetragen (s. Abbildung 3.30) und an die Daten konnte eine Hyperbel angepaßt werden.

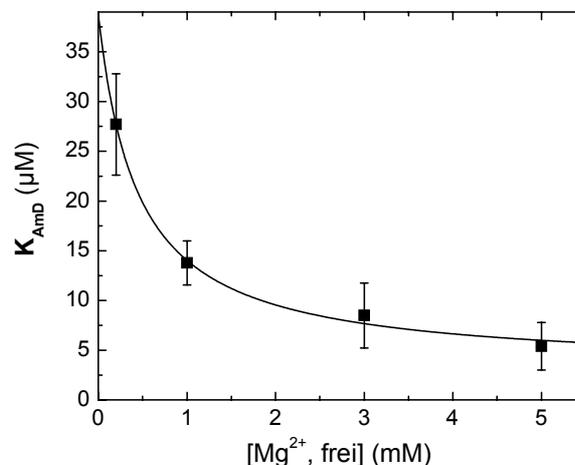


Abb. 3.30: Einfluß von freien Mg^{2+} Ionen auf die ADP-Affinität von Akto.Myosin-Vb. Die Gleichgewichtskonstante K_{AmD} zeigt eine hyperbolische Abhängigkeit von der freien Magnesiumionen-Konzentration.

Die aus der Anpassung erhaltene Inhibierungskonstante (K_i) beträgt $0,44 \pm 0,18$ mM. Die Erhöhung der Konzentration an freien Magnesiumionen führt im Bereich von 0,2 bis 5 mM zu einer Erhöhung der ADP-Affinität von Akto.Myosin-Vb um den Faktor 5.

Die Ergebnisse der transientenkinetischen Untersuchung der Regulation des ATPase-Zyklus von Myosin-Vb durch freie Magnesiumionen sind in Tabelle 3.6 zusammengefaßt und den Daten für *G. gallus* Myosin-Va gegenübergestellt.

Tab. 3.6: Abhängigkeit von Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten von der freien Magnesiumionen-Konzentration.

	Konstante	<i>Dd</i> Myosin-Vb		<i>Gg</i> Myosin-Va*	
		5 mM freies Mg ²⁺	0,2 mM freies Mg ²⁺	10 mM freies Mg ²⁺	0 mM freies Mg ²⁺
Myosin	K_D (μM) (<i>Pyren</i>)	$2,54 \pm 0,9$	$29,8 \pm 7$	-	-
	k_{+mD} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) langsam	$0,17 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,004$	$3,7/ [3 \text{ s}^{-1}]^{++}$	$8,7/ [52 \text{ s}^{-1}]^{++}$
	k_{-mD} (s^{-1})	$0,92 \pm 0,1$	$1,05 \pm 0,1$	$15/ 1,9^{++}$	$163/ 41^{++}$
	K_{mD} (μM)	$5,4 \pm 0,3$	21 ± 3	$4/ 0,51^{++}$	$19/ 4,7^{++}$
Akto.Myosin	k_{+AmD} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$4,0 \pm 0,7$	$6,7 \pm 0,4$	3,5	9,6
	k_{-AmD} (s^{-1}) #	30 ± 10	185 ± 20	28	141
	$K_{i(\text{Mg})}$ #	$0,45 \pm 0,25$		0,81	
	k_{-AmD} (s^{-1})	$21,6 \pm 6$	187 ± 24	4,6	40
	$K_{i(\text{Mg})}$	$0,52 \pm 0,3$		0,7	
	K_{AmD} (μM)	$5,4 \pm 2$	28 ± 5	1,3	4,2
	$K_{i(\text{Mg})}$	$0,44 \pm 0,18$		-	
	K_{AmD}/K_{mD}	1	1,4	2,5	0,9

y-Achsenabschnitt

* aus: Rosenfeld, 2005; 0 mM freies Mg²⁺ wurde durch Zugabe von 8 mM EDTA erreicht.

++ biphasischer Reaktionsverlauf; der erste Wert definiert jeweils die schnelle, der zweite die langsame Phase. Die langsame Phase der mantADP-Bindung zeigt keine Abhängigkeit von der mantADP-Konzentration

Die angegebenen Geschwindigkeitskonstanten für die mantADP Dissoziation sowie die Bindungskonstanten 2. Ordnung für mantADP in Abwesenheit von Aktin sind kursiv dargestellt (k_{-mD} , k_{+mD}), die daraus berechnete Gleichgewichtskonstante ist mit K_{mD} bezeichnet. Die entsprechenden Konstanten in Anwesenheit von Aktin sind fett gedruckt und mit dem Index ‚A‘ gekennzeichnet. K_i entspricht der jeweiligen Inhibierungskonstante für freies Magnesium.

Reaktionsbedingungen: 20 mM MOPS, pH-Wert 7,0; X mM MgCl₂, 100 mM KCl bei 20 °C.

Im direkten Vergleich zeigen *D. discoideum* Myosin-Vb und *G. gallus* Myosin-Va einen ähnlichen Einfluß auf die einzelnen kinetischen Parameter.

Die ADP-Affinität in Abwesenheit von Aktin wird für beide Klasse V Myosine durch hohe Magnesiumionen-Konzentrationen um den Faktor fünf bis zehn erhöht. Für *G. gallus* Myosin-Va ist dies vor allem eine Folge der stark erhöhten ADP-Dissoziationsgeschwindigkeit bei niedrigen Magnesiumionen-Konzentrationen. Die Dissoziationsgeschwindigkeit wird für

beide beobachteten Phasen um mehr als das zehnfache beschleunigt. Bei *D. discoideum* Myosin-Vb zeigt sich im Gegensatz dazu nur für die ADP-Bindung bei hohen freien Magnesiumionen-Konzentrationen ein biphasisches Verhalten. Bei 0,2 mM freiem Mg^{2+} war die Bindungsreaktion monophasisch, auch die Dissoziationskinetiken zeigten unabhängig von der Magnesiumionen-Konzentration einen monophasischen Verlauf. Die höhere Affinität von Myosin-Vb zu ADP in Abwesenheit von Aktin wird hauptsächlich durch eine 3,4-fach höhere Bindungskonstante 2. Ordnung für ADP bewirkt. Die ADP-Dissoziationsgeschwindigkeit wird im Gegensatz zu *G. gallus* Myosin-Va kaum durch geringe freie Magnesiumionen-Konzentrationen verringert.

Die Affinität von ADP zum Akto-Myosin-Komplex wird ebenfalls für beide Myosine durch hohe Magnesiumionen-Konzentrationen erhöht. *D. discoideum* Myosin-Vb zeigt in Anwesenheit von Aktin bei hoher Mg^{2+} -Konzentration eine fünffach höhere Affinität zu ADP als bei niedrigen freien Mg^{2+} -Konzentrationen. Für *G. gallus* Myosin-Va steigt die Affinität um den Faktor drei. Für beide Klasse V Myosine wird die Geschwindigkeit der Freisetzung von ADP aus dem ternären Komplex (k_{AMD}) sehr stark durch hohe freie Magnesiumionen-Konzentrationen verringert. Die Inhibierungskonstanten für die beschriebenen Effekte liegen zwischen 0,4 und 0,8 mM, was im Bereich der physiologischen Magnesiumionen-Konzentration in *D. discoideum* und vielen anderen Zelltypen liegt [Satre und Martin, 1985; Michailova und McCulloch, 2001]. Der K_i -Wert von k_{AMD} für *D. discoideum* Myosin-Vb von $0,52 \pm 0,3$ mM zeigt gute Übereinstimmung mit dem in 3.5.1. ermittelten K_i von $0,34 \pm 0,1$ mM für die Inhibierung der Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten.

Durch die Verringerung der ADP-Dissoziationsgeschwindigkeit aus dem stark Aktin gebundenen Akto-Myosin-Vb-ADP-Komplex durch hohe Magnesiumionen-Konzentrationen wird die Zeitdauer dieses Zustandes innerhalb des ATPase-Zyklus verlängert. Dies führt dazu, daß sich die Geschwindigkeit der ADP-Freisetzung der maximalen ATPase-Geschwindigkeit von *D. discoideum* Myosin-Vb annähert und dadurch geschwindigkeitsbestimmend wird. Diese Verringerung der Geschwindigkeit der Produktfreisetzung durch freie Magnesiumionen bewirkt eine längere Verweildauer im stark Aktin gebundenen Zustand und dadurch eine Verringerung der Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten.

3.5.4. Einfluß der freien Mg^{2+} -Ionen-Konzentration auf die Population der stark aktinbindenden Zustände

Um den Einfluß freier Magnesiumionen auf die Geschwindigkeit des Überganges vom schwach zum stark aktinbindenden Zustand direkt zu messen, wurde in Anlehnung an die Experimente von De La Cruz *et al.* ein sequentielles Mischexperiment im Stopped-Flow-Fluoreszenzspektrometer durchgeführt [De La Cruz *et al.*, 1999]. Da hohe Konzentrationen an ADP die ATPase-Aktivität von Myosin-Vb inhibieren, konnte das folgende Experiment durchgeführt werden: (a) eine vorinkubierte, equilibrierte Lösung von 4 μ M Myosin-Vb und 20 μ M Pyren-Aktin wurde mit 400 μ M ATP gemischt. (b) die Reaktionslösung wurde im Stopped-Flow-Fluoreszenzspektrometer im sequentiellen Mischmodus für 50 ms gealtert, um die ATP-Bindung, Hydrolyse und die Populierung des schwach aktinbindenden Zustandes zu ermöglichen, und (c) die Reaktionslösung wurde anschließend mit 2 mM ADP abgefangen, um freies ATP (nach ADP-Dissoziation) an der Bindung zu hindern. Der beobachtete Fluoreszenzverlauf (s. Abbildung 3.31 A) beschreibt den Übergang vom hoch fluoreszenten, schwach gebundenen zum niedrig fluoreszenten, starkgebundenen Zustand.

Bei hohen freien Magnesiumionenkonzentrationen (5 mM, mittlere Transiente) ergibt sich durch exponentielle Anpassung eine Geschwindigkeitskonstante von $2,4 \text{ s}^{-1}$. Diese Geschwindigkeit ist höher als die *steady-state* ATPase-Geschwindigkeit bei der eingesetzten

Aktinkonzentration von $5 \mu\text{M}$, die bei $1,6 \text{ s}^{-1}$ liegt. Die Geschwindigkeit der Populierung des stark aktinbindenden Zustandes ist also bei hohen Magnesiumionenkonzentrationen nicht geschwindigkeitsbestimmend, die ADP-Dissoziation limitiert die Akto.Myosin-Vb ATPase-Geschwindigkeit.

Bei niedrigen freien Mg^{2+} -Ionen-Konzentrationen ändert sich die *steady-state* ATPase-Geschwindigkeit nicht ($1,6 \text{ s}^{-1}$), der Übergang vom schwach zum stark gebundenen Zustand verläuft jedoch mit einer Geschwindigkeit von $1,5 \text{ s}^{-1}$ (s. Abbildung 3.31 A, obere Transiente) und wird deshalb geschwindigkeitsbestimmend.

Die finale Pyren-Aktin Fluoreszenz zeigt, daß bei 5 mM freiem Mg^{2+} 48% des Myosin-Vb stark an Aktin gebunden vorliegen (Amplitude von $-0,48$). Dies spricht für eine *duty ratio* von $0,48$ bei einer Aktinkonzentration von $5 \mu\text{M}$. Bei $0,2 \text{ mM}$ freiem Mg^{2+} wird nur eine Amplitude von $-0,18$ erreicht, das heißt, das der größte Teil des Myosin-Vb dissoziiert bleibt und die *duty ratio* auf $0,18$ sinkt. Der Effekt der Regulation der *duty ratio* wird bei höheren Aktinkonzentrationen noch stärker ausfallen, da diese direkt von der Aktinkonzentration abhängig ist.

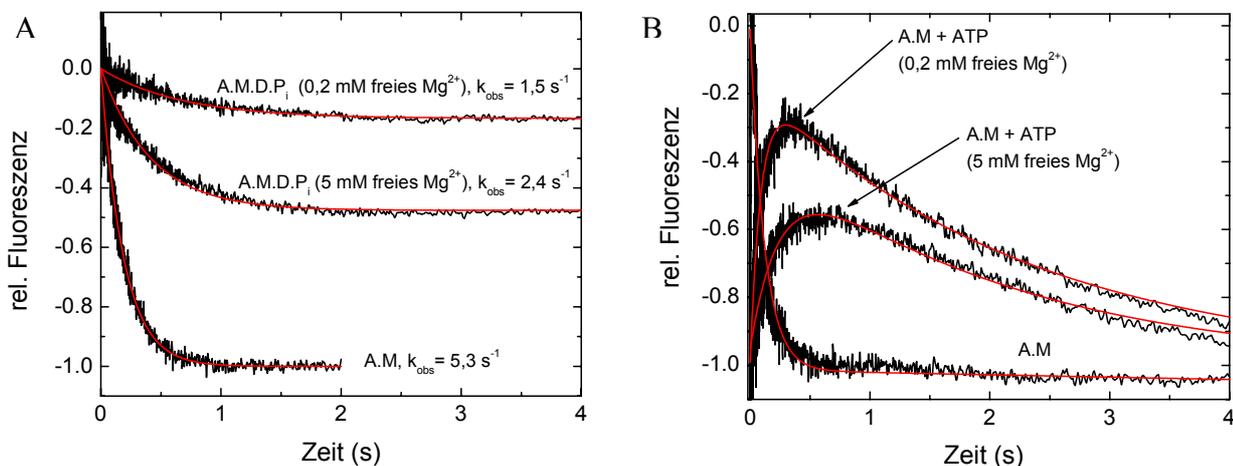


Abb. 3.31: Einfluß von freien Mg^{2+} -Ionen auf die Population der stark aktinbindenden Zustände von Myosin-Vb. A) Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante des Überganges vom schwach zum stark aktinbindenden Zustand bei verschiedenen freien Magnesiumionenkonzentrationen durch ein sequentielles Mischverfahren. Die Messung wurde wie im Text beschrieben durchgeführt. Die Fluoreszenz des stark aktinbindenden Zustandes (*rigor*) wurde auf -1 , die des schwach bindenden Zustandes auf 0 normalisiert. Die Bedingungen bei Beginn der Fluoreszenzaufzeichnung waren: $1 \mu\text{M}$ Myosin-Vb, $5 \mu\text{M}$ Pyren-Aktin, (nur obere Transienten: $100 \mu\text{M}$ ATP, 2 mM ADP). B) Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeit und -amplitude des Akto.Myosin-Vb-Komplexes durch ATP bei verschiedenen freien Magnesiumionenkonzentrationen. Die Messung wurde wie im Text beschrieben durchgeführt. Die Fluoreszenz des schwach bindenden und des *rigor*-Zustandes wurde wie in A normalisiert. Die Endkonzentrationen waren: $1 \mu\text{M}$ Myosin-Vb, $7,5 \mu\text{M}$ Pyren-Aktin, (nur obere Transienten: $50 \mu\text{M}$ ATP).

Um die Abhängigkeit der Population der schwach aktinbindenden Zustände von der freien Magnesiumionenkonzentration weiter zu charakterisieren, wurde die Dissoziation des Akto.Myosin-Vb-Komplexes durch ATP bei verschiedenen Mg^{2+} -Ionen-Konzentrationen untersucht (s. Abbildung 3.31 B). Die Fluoreszenz der Dissoziation eines Komplexes von $2 \mu\text{M}$ Myosin-Vb und $15 \mu\text{M}$ Pyren-Aktin durch $50 \mu\text{M}$ ATP zeigte bei hoher und niedriger Magnesiumionenkonzentration einen doppelt exponentiellen Verlauf. Auf einen schnellen Anstieg der Fluoreszenz durch die Dissoziation des Komplexes durch ATP folgt eine langsamere Phase der Reassoziierung. Die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation ist mit $4,2 \text{ s}^{-1}$ bei 5 mM freiem Mg^{2+} fast dreimal geringer als bei $0,2 \text{ mM}$ freiem Mg^{2+} . Da die

Dissoziation den Austritt aus dem stark aktinbindenden Zustand markiert, bedeutet eine langsame Dissoziationgeschwindigkeit bei hoher freier Magnesiumionenkonzentration eine Verlängerung der Zeitdauer innerhalb des ATPase-Zyklus, in der Myosin-Vb die stark aktinbindenden Zustände populiert. Dies führt zu einer hohen *duty ratio*, die sich entsprechend der Ergebnisse des sequentiellen Mischexperimentes aus der Amplitude der Dissoziationsreaktion ableiten läßt: Bei 5 mM freiem Mg^{2+} ergibt sich eine *duty ratio* von 0,56 (Amplitude von -0,56), die bei 0,2 mM freiem Mg^{2+} auf 0,29 (Amplitude von -0,29) fällt. Die Ergebnisse der Bestimmung des Einflusses der freien Mg^{2+} -Ionen-Konzentration auf die Population der stark aktinbindenden Zustände identifizieren die Bindung des Myosin-Vb.ADP.P_i-Komplexes an Aktin als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des ATPase Zyklus bei niedrigen freien Magnesiumionenkonzentrationen, bei denen die Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation stark erhöht ist (vgl. Abbildung 3.29). Die Experimente zeigen zudem eine langsamere Dissoziation des ternären Akto.Myosin-Vb.ATP-Komplexes bei hohen freien Magnesiumionen sowie eine direkte Abhängigkeit der *duty ratio* von freien Mg^{2+} -Ionen, wobei hohe Magnesiumionenkonzentrationen zu einer Erhöhung der *duty ratio* führen.

3.6. Untersuchung der Phosphorylierung der Motordomäne von Myosin-Vb und Identifizierung neuer phosphorylierbarer Reste in Schleife-1

Myosine der Klasse I aus *Acanthamoeba castellanii*, *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Dictyostelium discoideum* werden durch Phosphorylierung der TEDS-Stelle in der Motordomäne reguliert [Brzeska und Korn, 1996; Yamashita und May, 1998; Wu *et al.*, 1997]. Diese befindet sich 16 Aminosäuren *upstream* einer hochkonservierten Sequenz mit dem Konsensusmotiv DALAK. Die Position liegt im Bereich der primären Aktinbindungsstelle in einer Oberflächenschleife (CM-Schleife). Die Phosphorylierung ist für eine effektive Aktin-Aktivierung der *steady-state*-ATPase, eine Erhöhung der Bewegungsgeschwindigkeit der Myosine entlang von Aktinfilamenten sowie eine Erhöhung der Kopplungseffizienz zwischen Aktin- und Nukleotidbindungsstelle notwendig [Maruta und Korn, 1977; Brzeska *et al.*, 1999; Ostap *et al.*, 2002; Dürrwang *et al.*, 2006]. Der genaue Mechanismus dieser Aktivierung ist noch nicht aufgeklärt. Es wird vermutet, daß negative Ladungen im Bereich der primären Aktinbindungsregionen die Ausbildung des Kollisionskomplexes stabilisieren. Dies wurde für die Einführung einer einzelnen negativen Ladung im Bereich von Schleife-2 gezeigt [Furch *et al.*, 1998].

Auch *sus scrofa* Myosin-VI wird *in vivo* im Bereich der Motordomäne phosphoryliert [Buss *et al.*, 1998]; rekombinante Myosin-VI-Konstrukte, bei denen das Serin an der TEDS-Stelle durch Glutamat (Nachahmung der Phosphorylierung) oder Alanin (Dephosphorylierung) ersetzt wurde, zeigen eine Erhöhung der Geschwindigkeit der Aktin-aktivierten Phosphatfreisetzung [De La Cruz *et al.*, 2001]. Auch hier ist die Kopplung zwischen Aktinbindung und Produktfreisetzung durch die Phosphorylierung verstärkt.

Für ein Klasse V Myosin ist bisher noch keine Phosphorylierung der Motordomäne beschrieben. Um zu testen, ob *D. discoideum* Myosin-Vb durch Phosphorylierung reguliert wird, wurde es mit der Myosin-Schwerkettenkinase MIHCK aus *A. castellanii* [Brzeska *et al.*, 1999] phosphoryliert. Diese gehört zur Familie der p21-aktivierten Kinasen (PAKs), deren bestcharakterisierte Mitglieder die PAKs aus Säugetieren sowie die STE20 Kinase aus Hefe sind. PAKs werden von kleinen GTP-bindenden Proteinen (p21) wie Rac und Cdc42 im GTP-gebundenen Zustand aktiviert [Manser *et al.*, 1994]. Die minimale Konsensussequenz der *A. castellanii* MIHCK ist: (K, R)X₁₋₃(S, T)XY, wobei X für variable Aminosäuren steht [Brzeska *et al.*, 1990].

Bei Myosin-Vb aus *D. discoideum* befindet sich an der TEDS-Stelle ein Glutamat, es handelt sich also um eine konstitutiv aktivierte Myosinform. An der TEDS + 1 Position (Aminosäurerest 432) liegt allerdings ein Serin, welches phosphoryliert werden könnte. Daher wurden Myosin-Vb-Konstrukte hergestellt, bei denen das Serin durch ein Glutamat ersetzt wurde; diese Konstrukte zeigten keine Expression in *D. discoideum*.

Weitere mögliche Phosphorylierungsstellen sind Regionen mit Oberflächenschleifen wie Schleife-1 und Schleife-2. Diese bilden exponierte Bereiche der Myosinoberfläche und sind als Substrat für Kinasen gut erreichbar. In Studien mit Schleife-1-Chimären verschiedener Myosine wurde eine Verbindung zwischen der Länge von Schleife-1 und der Zugänglichkeit der Nukleotidbindungsstelle aufgedeckt (Sweeney *et al.*, 1998; Murphy und Spudich, 2000; Murphy und Spudich, 1998). Größere und flexiblere Schleifen ermöglichen schnellere ADP-Dissoziationsgeschwindigkeiten. Schleife-1 von *D. discoideum* Myosin-Vb ist gegenüber der Schleife-1 von *D. discoideum* Myosin-II um 20 Aminosäuren verlängert. Da Myosin-Vb trotzdem eine geschwindigkeitsbestimmende, langsame ADP-Dissoziation aufweist, bildet es also eine Ausnahme. Eine Phosphorylierung in diesem Bereich könnte die Faltung von

Schleife-1 stabilisieren und somit eine Auswirkung auf die Geschwindigkeit der Produktfreisetzung haben. In kinetischen Untersuchungen mit Schleife-1-Chimären von Myosin-Ib aus Säugetieren wurde gezeigt, daß die Länge und Ladung von Schleife-1 auch die Aktin-Affinität, die ATP-Bindung und die Kopplung zwischen Nukleotid- und Aktinbindungsbereichen beeinflusst [Clark *et al.*, 2005]. Eine Phosphorylierung in dieser Oberflächenschleife bietet also die Möglichkeit einer umfassenden Regulation der kinetischen Eigenschaften von Myosin-Vb.

Es sollte deshalb untersucht werden, ob die Motordomäne von Myosin-Vb im Bereich von Schleife-1 phosphoryliert wird. Auch die genaue Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle sollte aufgeklärt werden. Dazu wurden Kinase-Assays mit radioaktiv markiertem γ - ^{33}P -ATP zur Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von Myosinen etabliert. Zur genauen Identifikation der Phosphorylierungsstelle wurden massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in 3.6.1. und 3.6.2. zusammengefaßt.

3.6.1. Nachweis der Phosphorylierung der Motordomäne von *D. discoideum* Myosin-Vb

Die Phosphorylierung von *D. discoideum* Myosin-Vb wurde im Vergleich mit anderen Myosinen mit der Myosin Klasse I Schwerkettenkinase (MIHCK) aus *A. castellanii* durchgeführt. Zur Überprüfung des Phosphorylierungsstatus der untersuchten Myosine wurde ein Kinase-Assay etabliert (s. Kapitel 2.6.14.). Dadurch konnte die Phosphorylierung über die Detektion von radioaktiv markiertem Phosphat nachgewiesen werden, welches von der Kinase vom γ - ^{33}P -ATP auf die Myosinkonstrukte übertragen wurde.

In Abb. 3.32 ist das Ergebnis eines Kinase-Assays von MVb-2R und einem Myosin-IB-Motordomänenkonstrukt (MIB-His, AS 1-698 von *D. discoideum* Myosin-IB) zu sehen. Von Myosin-IB ist bekannt, daß es -ähnlich wie Myosin-ID und Myosin-IE aus *D. discoideum*- durch Phosphorylierung der TEDS-Stelle aktiviert wird [G. Tsiavaliaris *et al.*, eingereicht]. Beide Myosine wurden bereits nach 1 min. Inkubationszeit (bei 30°C) effektiv von MIHCK phosphoryliert. Durch längere Inkubationszeit intensivierte sich das Signal, nach 30-45 min. waren beide Myosine vollständig phosphoryliert.

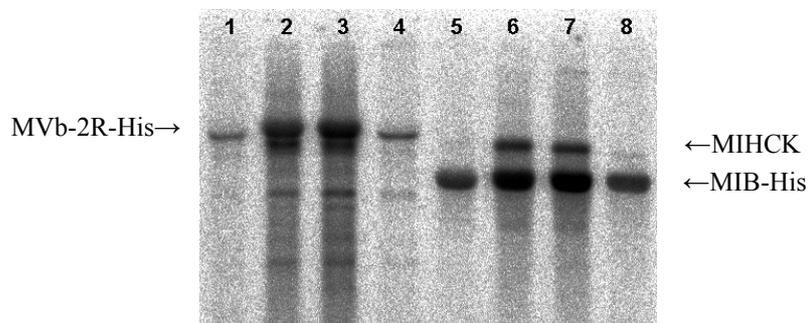


Abb. 3.32: Nachweis der Phosphorylierung von *D. discoideum* Myosin-Vb und Myosin-IB mit Hilfe eines Kinase-Assays. 1-4: MVb-2R; 5-8: MIB-His. 1+5: 1 min. Inkubation, 2+6: 15 min. Inkubation, 3+7: 45 min. Inkubation, 4+8: Zugabe von λ -Phosphatase nach 45 min. und Inkubation für weitere 45 min. (MVb-2R: 122 kDa, MIB-His: 80 kDa, MIHCK: 96 kDa; Myosin-Konzentration: 3 $\mu\text{g}/\text{lane}$).

Die Zugabe von 200 U (0,25 μg) λ -Phosphatase nach 45-minütiger Phosphorylierung und eine weitere Inkubation für 45 min. führte zu einer Abnahme der Bandenintensität für beide

Myosine auf den Anfangswert. Da Kinase und Phosphatase in diesem Fall konkurrieren, verschwanden die Banden nicht vollständig. Die Assays mit längerer Inkubationszeit der Kinase (15 und 45 min.) zeigen zusätzlich eine Bande für MIHCK, da sich die Kinase autophosphoryliert und dadurch auch radioaktiv markiertes Phosphat trägt.

Die Phosphorylierungs-Assays ergaben, daß *D. discoideum* Myosin-Vb ähnlich wie Myosin-IB von der Myosin Klasse I Schwerekettenkinase phosphoryliert werden kann; diese Reaktion ist zeitabhängig und läßt sich durch Behandlung mit λ -Phosphatase wieder rückgängig machen.

Um zu überprüfen, ob auch Myosin-Va aus Huhn durch MIHCK phosphoryliert wird, wurde der Assay mit allen drei Myosinen wiederholt. Da von dem nativen *G. gallus* Myosin-Va nur sehr wenig Protein zur Verfügung stand, wurde die Menge an eingesetztem Myosin in allen Ansätzen auf jeweils 0,5 μg pro Auftragung reduziert. In Abbildung 3.33 ist die Auswertung des Assays mit dem Phosphoimager dargestellt.

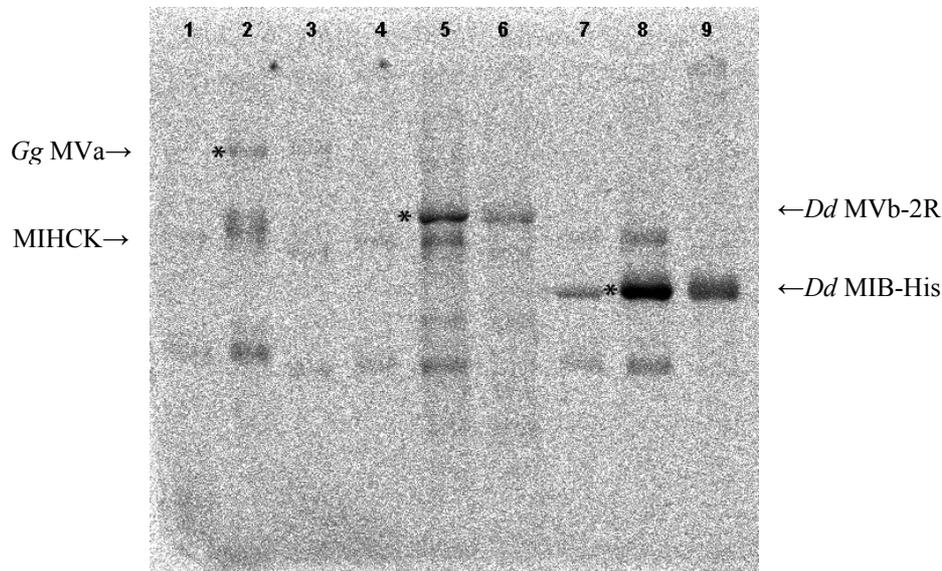


Abb. 3.33: Vergleich der Phosphorylierung von *Gg* Myosin-Va, *Dd* Myosin-Vb und *Dd* Myosin-IB mit Hilfe eines Kinase-Assays. 1-3: *Gg* MVa; 4-6: *Dd* MVb-2R; 7-9: *Dd* MIB-His. 1, 4, 7: 1 min. Inkubation, 2, 5, 8: 60 min. Inkubation, 3, 6, 9: Zugabe von λ -Phosphatase nach 60 min. und Inkubation für weitere 45 min. (*Gg* MVa: 200 kDa, *Dd* MVb-2R: 122 kDa, *Dd* MIB-His: 80 kDa, MIHCK: 96 kDa; Myosin-Konzentration: 0,5 μg /lane).

Alle drei Myosine werden durch MIHCK phosphoryliert. Myosin-IB zeigt das stärkste Signal, Myosin-Vb wird etwa vergleichbar phosphoryliert. Die Bandenintensität für das native *G. gallus* Myosin-Va ist sehr viel schwächer; allerdings mußte das Protein für den Assay aufkonzentriert werden, da es in sehr geringer Konzentration vorlag. Dadurch konnte die Konzentration der Myosinlösung nicht genau bestimmt werden. Aus der Intensität der Banden auf dem Gel läßt sich abschätzen, daß nur 0,1 μg Myosin-Va geladen wurde. Bei der in allen Ansätzen auftauchenden Bande mit niedrigem Molekulargewicht (ungefähr 40 kDa) könnte es sich um die autophosphorylierte katalytische Domäne der MIHCK handeln.

Alle drei Myosine konnten durch λ -Phosphatase dephosphoryliert werden. Beide Klasse V Myosine sind also Substrate für die Myosin Klasse I Schwerekettenkinase aus *A. castellanii*.

Kinaseassays mit radioaktiv markiertem γ - ^{33}P -ATP wurden etabliert und die Phosphorylierung von zwei Klasse V Myosinen aus unterschiedlichen Organismen durch *Acanthamoeba castellanii* MIHCK konnte nachgewiesen werden.

Da zeitgleich in der Arbeitsgruppe von H. Wolfes (Institut für Biophysikalisch Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) die katalytische Domäne von MIHCK rekombinant im Baculovirus/ SF9 System exprimiert und aufgereinigt wurde, sollte diese im neu etablierten Kinaseassay getestet werden. Parallel wurde auch die Kinase MARK2 (microtubule-associated protein/microtubule affinity regulating kinase, [Drewes *et al.*, 1997]) eingesetzt, um die Spezifität verschiedener Kinasen für unterschiedliche Myosine zu überprüfen. Die Kinase MARK2 phosphoryliert die Mikrotubuli-assoziierten Proteine tau, MAP2 und MAP4, was zu deren Dissoziation von den Mikrotubuli führt.

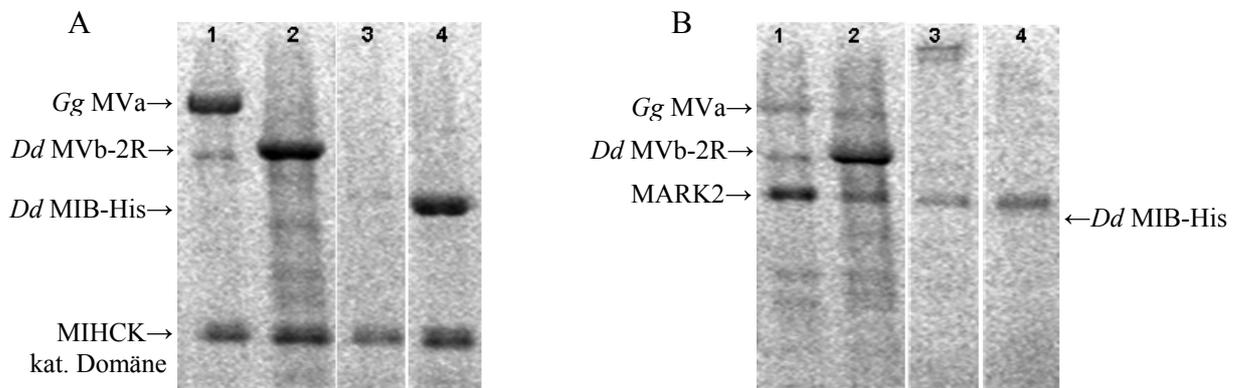


Abb. 3.34: Phosphorylierung von Myosinen durch verschiedene Kinasen. A) Phosphorylierung durch die katalytische Domäne von MIHCK. 1: *Gg* MVa; 2: *Dd* MVb-2R; 3: HMM; 4: *Dd* MIB-His. B) Phosphorylierung durch MARK2. 1: *Gg* MVa; 2: *Dd* MVb-2R; 3: HMM; 4: *Dd* MIB-His. (*Gg* MVa: 200 kDa, *Dd* MVb-2R: 122 kDa, HMM: 150 kDa, *Dd* MIB-His: 80 kDa, katalytische Domäne der MIHCK: 35 kDa, MARK2: 85 kDa; Myosin-Konzentration: 1 $\mu\text{g}/\text{lane}$).

In Abbildung 3.34 sind die Ergebnisse der Kinaseassays mit der katalytischen Domäne von MIHCK (A) und MARK2 (B) dargestellt. Die katalytische Domäne der MIHCK phosphoryliert die Klasse V Myosine sowie Myosin-IB sehr effektiv. Alle drei Myosine zeigen ein sehr deutliches Signal, die vergleichbare Intensität der autophosphorylierten Kinase-Bande als interner Standard für die geladene Proteinmenge bestätigt dies. Das als Kontrolle ebenfalls im Assay mitgeführte HMM (Heavy Meromyosin aus New Zealand White Rabbit, konventionelles Myosin-II) wird nicht von der katalytischen Domäne der MIHCK phosphoryliert. Eine unspezifische Phosphorylierung exponierter Serin-, Tyrosin- oder Threoninreste auf Oberflächenschleifen der Myosine (Schleife-1 bis -4) kann daher ausgeschlossen werden.

Die ebenfalls untersuchte Kinase MARK2 zeigt ein abweichendes Phosphorylierungsmuster der vier Myosine. Während *G. gallus* Myosin-Va zumindest schwach phosphoryliert wird und *D. discoideum* Myosin-Vb ein vergleichbar starkes Signal wie bei der Behandlung mit MIHCK aufweist, ist bei HMM und Myosin-IB keine Phosphorylierung nachweisbar. Obwohl MARK2 keine Myosinkinase ist, scheint die Spezifität von MARK2 der Aminosäuresequenz und/ oder der Tertiärstruktur der Phosphorylierungsstelle von Klasse V Myosinen näher zu kommen als der von Klasse I Myosinen.

3.6.2. Identifizierung der Phosphorylierungsstelle durch Massenspektrometrie

Die im vorigen Kapitel gezeigten Ergebnisse der Phosphorylierungs-Assays liefern erste Hinweise darauf, daß *D. discoideum* Myosin-Vb im Bereich der Motordomäne phosphoryliert wird. Deshalb sollte die genaue Phosphorylierungsstelle mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert werden.

Um genügend Protein für die Analyse zur Verfügung zu haben, wurden jeweils 50 µg MVb-2R präparativ phosphoryliert (mit MIHCK, s. Kapitel 2.6.12.) bzw. dephosphoryliert (mit λ-Phosphatase, s. Kapitel 2.6.13.). Nach der Auftrennung der Proben über SDS-PAGE wurden die Myosinbanden ausgeschnitten; die restliche Probenaufbereitung sowie die massenspektrometrische Analyse mittels nESI-Q-TOF-MS/MS wurde (wie in Kapitel 2.6.14. beschrieben) in Kooperation von T. Reinl und Dr. L. Jänsch (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) durchgeführt.

Es wurde eine vergleichende massenspektrometrische Untersuchung der phosphorylierten und dephosphorylierten Myosin-Vb Proben durchgeführt. Dabei wurde in der MIHCK-behandelten Probe bei der automatischen Auswertung eine Masse gefunden wurde, die nicht in der λ-Phosphatase behandelten Probe vorhanden ist. Die Masse beträgt 1005,16 Da. Um sicherzugehen, daß diese Masse nicht doch auch in der mit λ-Phosphatase behandelten Probe vorhanden ist und nur nicht für Fragmentierungsexperimente ausgewählt wurde, wurden die Spektren auch manuell mit dem Programm MassLynx ausgewertet (s. Abbildung 3.35).

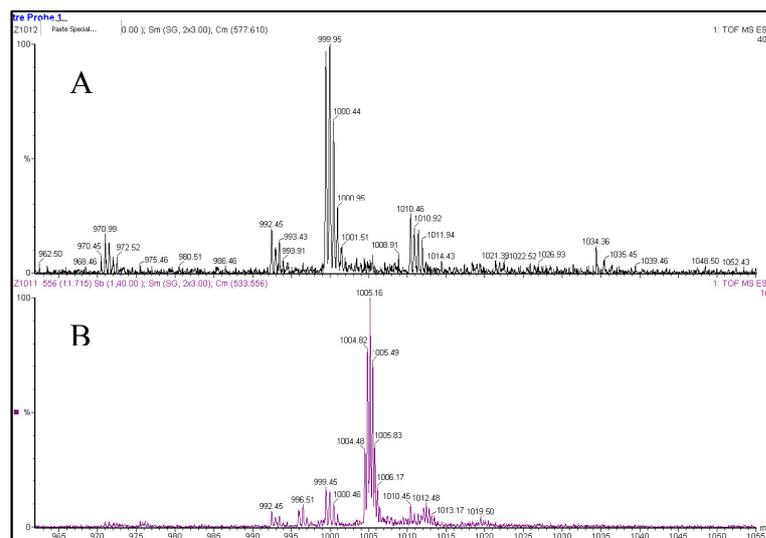


Abb. 3.35: Auswertung der MS/MS-Fragmentspektren mit dem Programm MassLynx. Die Masse 1005,16 Da wurde nur in der MIHCK behandelten Probe gefunden (B), nicht aber in der mit λ-Phosphatase behandelten (A). Spektrum von T. Reinl und L. Jänsch (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig).

Die in der λ-Phosphatase-Probe gefundenen Isotopenmuster sind auch in der MIHCK-Probe vorhanden. Da die Y-Skala allerdings prozentual kalibriert ist und in der MIHCK-Probe die Masse von 1005,16 Da eine hohe Countzahl (168, Ecke rechts oben im Spektrum B) zeigt, erscheinen die übrigen Peaks viel geringer. Sie entsprechen in der Countzahl den korrespondierenden Peaks der λ-Phosphatase-Probe.

Das nur in der MHCK-Probe gefundene modifizierte Peptid hat die Sequenz:

ESTSSSSINGINTSSPDGIPVTPPPSPMK

Die automatische Auswertung ergab als Modifikation aufgrund der Differenz zur Gesamtmasse phosphoryliertes Serin oder Threonin. Die manuelle Auswertung bestätigte die Phosphorylierung von Serin-2 des oben abgebildeten Peptids, teilweise war aber auch Threonin-3 phosphoryliert. Aufgrund der mäßigen Qualität der Spektren konnte die Zuordnung zu einer dieser beiden Aminosäuren nicht als eindeutig abgesichert werden.

Ein Vergleich der Peptidsequenz mit der Sequenz der Motordomäne von *D. discoideum* Myosin-Vb zeigte eine Lokalisierung der putativen Phosphorylierungsstelle im Bereich von Schleife-1 (s. Abbildung 3.36).

Consensus	SGESGAGKTEXTKKXMQYLAXVSGXXSASGSX-----VEEXVLXSNPLLE
Peptid	-----E <u>ST</u> SSSSINGINTSSDGIPVTPPPSPMK-----
Dd M-Vb 173	S <u>GESGAG</u> KTETTKFLLQYFAAMGNMIKE <u>ST</u> SSSSINGINTSSDGIPVTPPPSPMKKSPVDKSVEERVLESTPLLE
Gg M-Va 162	S <u>GESGAG</u> KTVSAKYAMRYFATV----- <u>SGS</u> AEAN-----VEEKVLASNPIE
Dd M-II 182	T <u>GESGAG</u> KTENTKKVIQYLASV-----AGRNQANGSG-----VLEQQILQANPILE
	P-Schleife Schleife-1

Abb. 3.36: Sequenzvergleich des phosphorylierten Peptids mit der Sequenz von *D. discoideum* Myosin-Vb, *G. gallus* Myosin-Va und *D. discoideum* Myosin-II. Die Phosphorylierungsstelle ist unterstrichen hervorgehoben, zur Orientierung sind auch die P-Schleife und Schleife-1 gekennzeichnet.

Die Aminosäuren Serin-2/ Threonin-3 des Peptids befinden sich im N-terminalen Bereich der erweiterten Schleife-1 von *D. discoideum* Myosin-Vb. Während *D. discoideum* Myosin-II in diesem Bereich nur einen phosphorylierbaren Serinrest aufweist, befindet sich an der zu Serin-2 homologen Position bei *G. gallus* Myosin-Va ebenfalls ein Serin, welches als Phosphorylierungsstelle in Frage kommen könnte. Die putative Phosphorylierungsstelle von *D. discoideum* Myosin-Vb befindet sich bei Serin-208 und Threonin-209 der Aminosäuresequenz.

3.6.3. Charakterisierung der Schleife-1-Mutante von *D. discoideum* Myosin-Vb

Nach der Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle von *D. discoideum* Myosin-Vb wurden Konstrukte mit einer Mutation des Schleife-1-Bereiches entworfen. Dadurch sollte die Charakterisierung des Phosphorylierungseinflusses auf den kinetischen Mechanismus dieses Motors ermöglicht werden. Die Aminosäurereste Serin-208 und Threonin-209 wurden durch zielgerichtete Mutagenese mittels PCR zu Glutamat und Aspartat verändert. Die synthetisierten Plasmide für Motordomänenkonstrukte mit und ohne künstlichen Hebelarm und Oktahistidin- oder FLAG-tag wurden wie in 3.2. und 3.3. für das Wildtyp-Konstrukt beschrieben transformiert, selektiert und auf Expression untersucht. Alle Konstrukte zeigten dem Wildtyp vergleichbare Expression, von den Konstrukten mit künstlichem Hebelarm (MVb^{STED}-2R-His und MVb^{STED}-2R-FLAG) wurden Proteinaufreinigungen im präparativen Maßstab durchgeführt. Abbildung 3.37 zeigt exemplarisch die Aufreinigung des MVb^{STED}-2R-FLAG-Konstruktes.

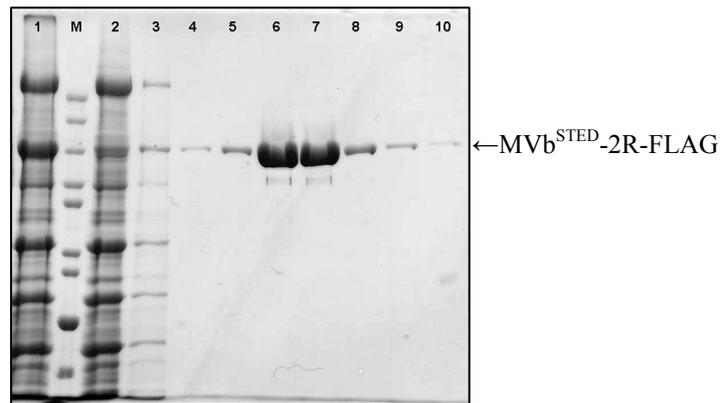


Abb. 3.37: Coomassie Blue-gefärbtes 10%iges PAA-Gel der Aufreinigung von MVb^{STED}-2R-FLAG. M: Marker, 1: geladene Proteinlösung, 2: Durchfluß der anti-FLAG-Säule nach dem Laden, 3: Niedrigsalz-Waschfraktion, 4-10: Fraktionen der anti-FLAG-Säule nach Elution mit 100 µg/ml FLAG-Peptid. Die Fraktionen 4 bis 10 wurden vereinigt, dialysiert, aufkonzentriert und bei -80°C gelagert.

Um den Einfluß der Schleife-1-Mutation auf die Funktionalität von *D. discoideum* Myosin-Vb aufzuklären, wurde zunächst das kinetische Verhalten im Fließgleichgewicht mittels *steady-state*-ATPase-Messungen untersucht.

Wie Abbildung 3.38 zeigt, werden mehrere der *steady-state*-Parameter durch die Phosphorylierung von Schleife-1 bzw. deren Nachahmung durch Einführung von negativ geladenen Aminosäuren verändert. Die basale ATPase-Aktivität steigt um den Faktor 5 von 0,069 s⁻¹ auf 0,35 s⁻¹. Die maximal erreichbare Umsatzgeschwindigkeit, erhalten aus der Anpassung einer Hyperbel an die Meßwerte, steigt von 11,6 s⁻¹ (für den Wildtyp) auf 17,1 s⁻¹ für die Schleife-1-Mutante. Die Affinität zu Aktin in Anwesenheit von ATP, K_{app} , ist nicht stark verändert, sie steigt von 27,0 µM für den Wildtyp auf 21,8 µM für die Mutante. Aus den Michaelis-Menten Parametern sowie aus der Steigung der Geraden, die an die Meßwerte bis 10 bzw. 5 µM Aktin angepaßt werden konnte, wurde die Kopplungseffizienz k_{cat}/K_{app} errechnet. Diese beträgt 0,43 für den Wildtyp und steigt für die Schleife-1-Mutante um den Faktor 2 auf 0,8.

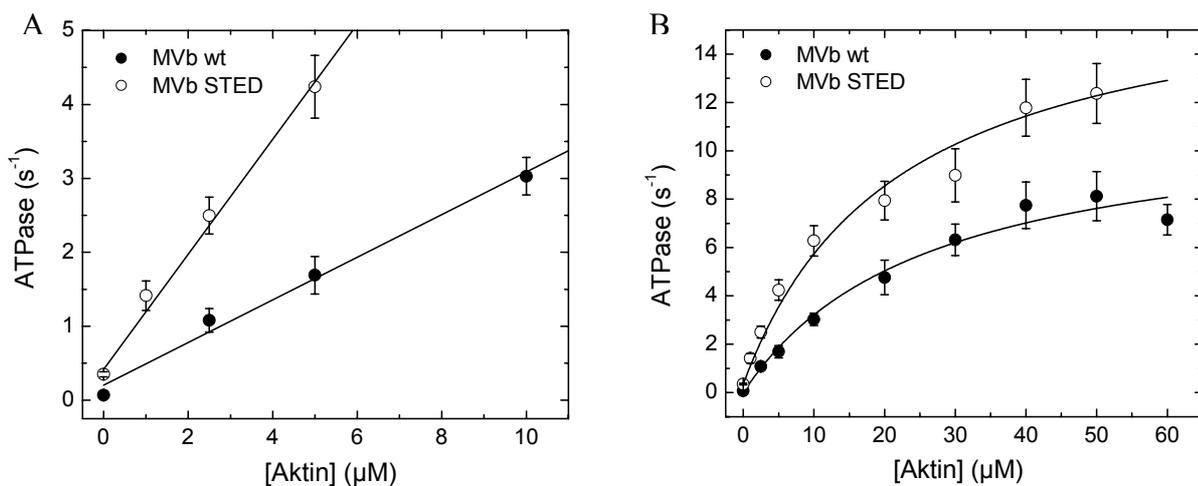


Abb. 3.38: Aktin-aktivierte *steady-state*-ATPase von Myosin-Vb (Wildtyp) und Myosin-Vb (Schleife-1-Mutante). (A) Die ATPase-Aktivität wurde gegen die Aktin-Konzentration aufgetragen und im Bereich von 0 bis 10 µM (MVb) bzw. 0 bis 5 µM Aktin an eine lineare Funktion angepaßt. (B) Die ATPase-Aktivität wurde gegen die Aktin-Konzentration aufgetragen und an die Daten wurde eine Hyperbel angepaßt.

Insgesamt weisen alle Veränderungen bei den *steady-state*-Parametern darauf hin, daß die Schleife-1-Mutante eine aktivierte Form von Myosin-Vb darstellt. Sowohl die basale ATPase als auch die maximal Aktin-aktivierte ATPase sind erhöht. Die höhere Kopplungseffizienz sowie der niedrigere Wert für K_{app} weisen außerdem darauf hin, daß bei der Mutante die Kopplung zwischen Aktinbindung und Nukleotidbindung gegenüber dem Wildtyp erhöht ist.

Tab. 3.7: *steady-state*-Parameter der Aktin-aktivierten ATPase-Aktivität

Myosin	basale ATPase (s^{-1}) ^a	k_{cat} (s^{-1}) ^b	K_{app} (μM) ^b	k_{cat}/K_{app} ($\mu M^{-1}s^{-1}$) ^c
<i>Dd M-Vb</i>^{STED}	0,35 ± 0,05	17,1 ± 1,5	21,8 ± 4,8	0,8
<i>Dd M-Vb</i> (wt)	0,069 ± 0,01	11,6 ± 0,8	27 ± 7	0,43
<i>Gg Myosin-Va</i>*	0,03	15	1,4	11

* aus: De La Cruz, 1999

Reaktionsbedingungen: 25 mM HEPES, pH-Wert 7,3; 25 mM KCl und 5 mM MgCl₂ bei 25 °C.

- a) Die basale ATPase-Aktivität entspricht der ATP-Umsatzgeschwindigkeit ohne Aktinfilamente
 b) Die Werte für k_{cat} und K_{app} wurden durch Beschreibung der Daten mit der Michaelis-Menten-Gleichung erhalten.
 c) Die Bindungskonstante 2. Ordnung für Aktin (k_{cat}/K_{app}) wurde durch Berechnung des Quotienten beider Werte erhalten. Bei viel niedrigeren Aktin-Konzentrationen als K_{app} konnte k_{cat}/K_{app} auch mit einer linearen Regression aus der Steigung der Geraden bestimmt werden.

Nach der *steady-state*-Charakterisierung des Einflusses der Phosphorylierung sollten die *pre-steady-state*-Eigenschaften untersucht werden. Die komplette kinetische Charakterisierung der Schleife-1-Mutante von *D. discoideum* Myosin-Vb konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeschlossen werden. Allerdings wurden einige der transientenkinetischen Parameter bereits bestimmt. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 3.8 aufgeführt und den Werten des Wildtyp Myosin-Vb gegenübergestellt.

Tab. 3.8: Vergleich der kinetischen Parameter von Myosin-Vb Wildtyp und Mutante.

	Konstante	<i>Dd M-Vb</i> (wt)	<i>Dd M-Vb</i> ^{STED}
ATP-Bindung an Akto.Myosin	K_1k_{+2} ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	0,19 ± 0,08	0,21 ± 0,08
	k_{+2} (s^{-1})	150 ± 16	230 ± 20
mantADP-Dissoziation	k_{-mD} (s^{-1})	0,92 ± 0,1	1,24 ± 0,1
Aktin-Dissoziation	k_A (s^{-1})	0,023 ± 0,001	0,022 ± 0,001

Wie man den Daten entnehmen kann, zeigt sich keine wesentliche Änderung bei den bisher untersuchten Geschwindigkeitskonstanten. Weitere Messungen werden aufzeigen, durch welche Veränderungen innerhalb des ATPase-Zyklus der Myosin-Vb-Mutante die höhere basale und maximale ATPase-Aktivität hervorgerufen werden. Außerdem muß überprüft werden, ob das phosphorylierte Myosin-Vb immer noch durch freie Magnesiumionen reguliert wird und ob ein Einfluß auf die Wechselwirkung mit ADP im aktungebundenen Zustand besteht.

3.7. Kristallisation der Motordomäne von *D. discoideum* Myosin-Vb

Die Aufklärung der Motordomänenstruktur von Myosinen eröffnet die Möglichkeit, die mit transientenkinetischen Methoden aufgelösten Zustände bestimmten konformationellen Änderungen zuzuordnen, sowie die Koordinationsgeometrie in der Nukleotidbindungstasche zu ermitteln, die Hinweise auf den Hydrolysemechanismus geben könnte. Dies vertieft das Verständnis der molekularen Grundlagen des ATPase-Zyklus von Myosinen. Prozessive Myosine zeigen die Besonderheit der hohen Aktin-Affinität in Anwesenheit von Nukleotiden. Damit verbunden ist eine geringe Kopplung der Konformationsänderungen in der Nukleotidbindungstasche mit denen im Bereich der Aktinbindungsgebiete. Durch die Aufklärung der Kristallstruktur von *D. discoideum* Myosin-Vb können in Verbindung mit der transientenkinetischen Charakterisierung tiefere Einblicke in die Struktur-Funktionsbeziehungen eines prozessiven Myosins gewonnen werden.

In der Vergangenheit konnte bereits die Struktur von verschiedenen Myosinen und Myosinkonstrukten aus *D. discoideum* aufgeklärt werden. Dazu gehört das S1-Fragment von Myosin-II [Rayment *et al.*, 1993], die Motordomäne von *D. discoideum* Myosin-II in verschiedenen Nukleotidkonformationen [Fisher *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1996; Gulick *et al.*, 1997] sowie mit einem künstlichen Hebelarm aus zwei α -Aktinin-Molekülen [Kliche *et al.*, 2001]. Auch die Struktur der Motordomäne von *D. discoideum* Myosin-II fusioniert mit der GTPase Domäne von *D. discoideum* Dynamin A [Niemann *et al.*, 2001] sowie der GTPase Domäne von *R. norvegicus* Dynamin 1 [Reubold *et al.*, 2005] konnte gelöst werden, wobei die Motordomäne als Kristallisations-tag und zur Lösung des Phasenproblems genutzt wurde. Mit der Aufklärung der Struktur von Myosin-IE [Kollmar *et al.*, 2002] wurde auch erstmals die Struktur eines unkonventionellen Myosins aus *D. discoideum* gelöst.

Für die Kristallisation von *D. discoideum* Myosin-Vb wurden verschiedene Proteinkonstrukte aufgereinigt und eingesetzt. Die mit einem Oktahistidintag verknüpften Konstrukte MVb-2R-His und MVb-His wurden über vier verschiedene Chromatographiestufen zur Homogenität aufgereinigt. Die mit einem FLAG-tag versehenen Konstrukte MVb-2R-FLAG sowie MVb-FLAG wurden direkt nach der α FLAG-Affinitätsaufreinigung eingesetzt, da hier die Reinheit bereits ausreichend hoch war. Für alle Konstrukte, die für die Kristallographie eingesetzt wurden, wurde die enzymatische Aktivität der Myosine durch Messung der Aktin-aktivierten ATPase-Aktivität verifiziert.

In Anlehnung an die erfolgreiche Kristallisation des Fusionskonstruktes aus der Motordomäne von *D. discoideum* Myosin-II und der *R. norvegicus* Dynamin 1 GTPase Domäne wurde auch ein Fusionskonstrukt aus der Motordomäne von Myosin-Vb und der GTPase Domäne von *R. norvegicus* Dynamin 1 konstruiert, aufgereinigt und zur Kristallisation eingesetzt [Reubold *et al.*, 2005]. Alle Myosinpräparationen wurden in höchster Reinheit und mit einer Konzentration von 7,5 bis 15 mg/ml bereitgestellt.

Alle zuvor beschriebenen Konstrukte ergaben nach 3 bis 14 Tagen nadelförmige Kristalle, die eine Ausdehnung von einigen Millimetern in eine Raumrichtung, aber nur von 10 – 30 μ m in die anderen Dimensionen hatten. Teilweise konnten auch kompaktere, hexagonale Kristalle erhalten werden (s. Abbildung 3.39), die allerdings eine Dicke von nur 10 μ m hatten.

Zur Optimierung der Kristallisation wurden Ansätze im High-Throughput Myosin-Fusions-Screen (MFS-HT, [R. Fedorov, nicht publiziert]) bei verschiedenen Temperaturen (4°C, 8°C und 12°C) und mit verschiedenen Nukleotidanaloga durchgeführt. Außerdem wurde versucht, die Schleife-1-Mutante von Myosin-Vb (s. 3.6.3.) zu kristallisieren, da vermutet wurde, daß bei den Wildtyp-Präparationen das Vorhandensein einer Mischpopulation aus

phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem Myosin zu einer nicht homogenen Proteinlösung führen könnte.



Abb. 3.39: Hexagonaler Proteinkristall von MVb-2R-His. Zusammensetzung der Cryoprotectant-Lösung: 50 mM TRIS-HCl, 140mM NaCl, 15 % (w/v) PEG8000, 8 % (v/v) MPD, 12 % (v/v) PEG400, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM EGTA, pH 7.6. Die Länge des Balkens beträgt 50 μ m.

Die erfolgversprechendsten Kristalle jedes Konstruktes wurden zur Aufnahme der Röntgenstreuung am Synchrotron DESY/EMBL, Hamburg, Beamline X-11 vermessen. Zur Verbesserung der Qualität der Aufnahmen wurden einzelne Kristalle auch am Synchrotron ESRF, Grenoble, Beamline 14-2 sowie der Microfocus Beamline ID 13 vermessen.

Trotz aller Optimierungsversuche konnte bisher keine ausreichende Qualität der Proteinkristalle erreicht werden, um mit den Daten der Röntgenstreuung die Struktur von *D. discoideum* Myosin-Vb zu lösen. Tabelle 3.9 gibt eine Zusammenfassung der bisher erhaltenen Kristallparameter und der bestimmten Raumgruppe.

Die Beugungsdatensätze von Proteinkristallen von MVb-2R wurden mit monochromatischer Synchrotronstrahlung der Wellenlänge 0.933 Å am Meßplatz ID14-2 des ESRF (Grenoble, Frankreich) auf einem CCD-Detektor aufgenommen.

Tab 3.9: Vorläufige Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse von MVb-2R (Apo-Form), Beugungsdaten bis 15°.

Data collection	
Beam-Line	ID14-2, ESRF
Wave length	0.933 Å
Resolution of data	3.3 Å
No. of observations / unique reflections	6108 / 4640
Completeness (total / high)	19.6 % / 19.8 %
$\langle I/\sigma(I) \rangle$ (total / high)	5.6 / 1.9
R _{sym} (total / high)	7.8 % / 31.7 %
Crystal parameters	
Group	<i>C</i> 2
Cell parameters: a, b, c, α , β , γ	321.5 Å, 72.5 Å, 54.2 Å, 90°, 94.5°, 90°

3.8. Untersuchungen der Nackenregion und der Regulation von *D. discoideum* Myosin-IC

D. discoideum exprimiert sieben Myosine der Klasse I: Myosin-IA bis Myosin-IG [Kollmar, 2006]. Diese können in vier Unterklassen unterteilt werden. Myosin-IB, Myosin-IC und Myosin-ID gehören zur Unterklasse IC. Sie sind im aktinreichen Zellcortex in migrierenden Zellen, an Zell-Zell-Kontaktstellen und in Filopodien lokalisiert [Morita *et al.*, 1996; Peterson *et al.*, 1995; Fujita-Becker *et al.*, 2005]. Sie besitzen alle in ihrer Schwanzregion polybasische Bereiche, die zur Interaktion mit anionischen Phospholipiden dienen, sowie nukleotidunabhängige Aktinbindungsdomänen [Doberstein und Pollard, 1992; Novak und Titus, 1998]. Sie erfüllen ähnliche, überlappende Aufgaben beim Organell- und Membrantransport, Endo- und Exocytose und der Aufrechterhaltung der Zellstruktur [Soldati *et al.*, 1999].

Myosin-IC ist ein ungewöhnliches Mitglied dieser Unterklasse, da es in der Nackendomäne nicht ein sondern drei IQ-Motive aufweist. Das könnte darauf hinweisen, daß es trotz ähnlicher Lokalisierung und zellulärer Funktion eine Sonderstellung unter den Klasse I Myosinen von *D. discoideum* einnimmt.

3.8.1. Sequenzanalyse und Generierung der Expressionsvektoren

Im Gegensatz zu Myosin-II und Myosin-IE besitzt Myosin-IC vor dem ersten IQ-Motiv eine weitere putative Bindungsstelle für leichte Ketten. Diese zeigt hohe Homologie zu einem entsprechenden Sequenzmotiv im Nackenbereich von Myosin-VI (s. Abbildung 3.40), das dort als Bindungsstelle für ein Calmodulin-ähnliches Protein dient [Bahloul *et al.*, 2004]. Dieses ist ein struktureller Bestandteil der Nackendomäne von Myosin-VI und stabilisiert die entgegengesetzte Orientierung des Hebelarmes. Auch bei Myosin-IC könnte dieses Motiv als Bindungsstelle für eine leichte Kette dienen, für die Umkehr der Bewegungsrichtung geeignet sein oder durch Umfaltung den Motor in eine aktive bzw. inaktive Form überführen. Außerdem könnte der verlängerte Nackenbereich einen größeren Kraftschlag im Vergleich zu den anderen Klasse I Myosinen ermöglichen, wie bereits für Klasse X Myosine postuliert wird.

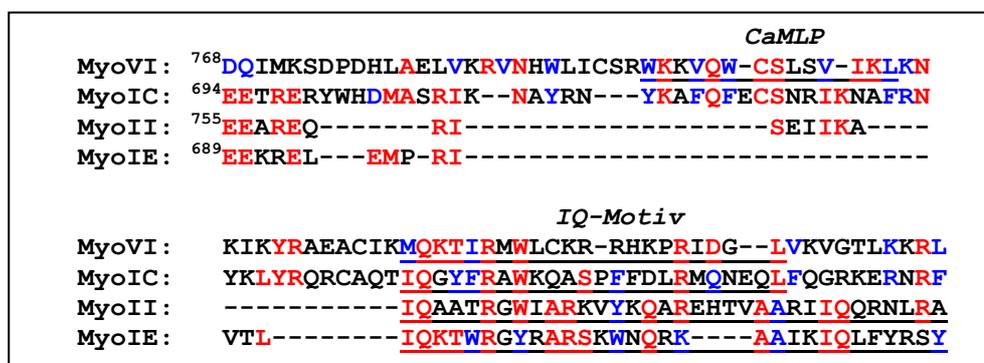


Abb. 3.40: Multiple Alignment der Nackendomänen von *Sus scrofa* Myosin-VI und den *Dictyostelium discoideum* Myosinen Myosin-IC, Myosin-IE und Myosin-II. Identische Aminosäurereste sind in rot, konservierte in blau gezeigt. IQ-Motiv: Bindungsstelle für leichte Ketten/ Calmodulin; CaMLP: Bindungsstelle für Calmodulin oder Calmodulin-ähnliche leichte Ketten.

Um untersuchen zu können, ob *D. discoideum* Myosin-IC für den rückwärts gerichteten Transport geeignet ist, sowie den Einfluß der Nackendomäne und der leichten Ketten auf die Bewegungsrichtung zu charakterisieren und auch kinetische Untersuchungen der Motordomäne vornehmen zu können, wurden verschiedene rekombinante Proteinkonstrukte von Myosin-IC entworfen.

Da Myosin-IC bisher nicht *in vitro* untersucht wurde, mußten zunächst alle Expressionsvektoren kloniert werden. Wie unter 2.4.7. [Charette und Cosson, 2004] beschrieben, wurde dazu genomische DNA aus *D. discoideum* AX2 Zellen isoliert und daraus mittels PCR Gensequenzen für verschiedene Motordomänenkonstrukte amplifiziert. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden wie unter 3.2. für Myosin-Vb beschrieben über die Schnittstellen *Bam*HI und *Xho*I in verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Eine schematische Darstellung der generierten Konstrukte ist in Abbildung 3.41 zu sehen. Die in der Motordomäne angegebene Zahl entspricht der Anzahl an Aminosäuren, die dem Myosin-IC Gen entstammen. Das Konstrukt „697“ besteht aus den ersten 697 Aminosäuren von Myosin-IC, das entspricht der Motordomäne. „743“ enthält außer der Motordomäne noch die Aminosäuren der darauffolgenden putativen Bindungsstelle für leichte Ketten (*Insert*). Das Konstrukt „769“ enthält die Aminosäuren der Motordomäne, der putativen Bindungsdomäne sowie des ersten IQ-Motives.

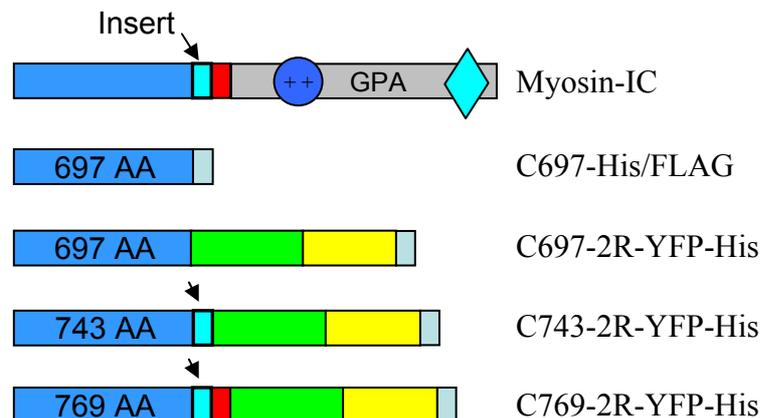


Abb. 3.41: Schematische Darstellung der generierten Konstrukte zur Expression von *D. discoideum* Myosin-IC. Der Pfeil markiert die Position des erweiterten Nackenbereichs. Blau: Motordomäne; türkis: Insert; rot: IQ-Motiv; (++): Membranbindungsdomäne; GPA: Glycin-Prolin-Alanin-reiche Domäne für ATP-unabhängige Aktinbindung; \diamond : SH3 (*src*-homology domain-3) Domäne; grün: künstlicher Hebelarm aus 2 α -Aktinin-Molekülen (2R); gelb: YFP; blau-grün: Oktahistidin- oder FLAG-tag.

Die Konstrukte sollten zur Expression von Protein zur kinetischen Charakterisierung (C697-His/FLAG) sowie zur funktionalen Charakterisierung, der Bestimmung der Motilität und der Identifizierung der leichten Ketten eingesetzt werden (Konstrukte mit Insert und/oder IQ-Motiv).

Für Klasse I Myosine ist bekannt, daß sie durch Phosphorylierung der TEDS-Stelle der Motordomäne reguliert werden [Brzeska und Korn, 1996; Yamashita und May, 1998]. Von allen Konstrukten wurden deshalb über zielgerichtete Mutagenese auch Versionen generiert, bei denen das Threonin an der TEDS-Stelle (T341) durch Glutamat ersetzt wurde.

3.8.2. Expression und Aufreinigung von verschiedenen Myosin-IC-Konstrukten

Alle genannten 12 Konstrukte wurden in *D. discoideum* transformiert und die erhaltenen Klone auf Expression getestet. Abbildung 3.42 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der analytischen Proteinpräparation der Motordomänenkonstrukte C697-FLAG und C697-2R-YFP sowie der Konstrukte mit *Insert* und IQ-Motiv C769-FLAG und C769-2R-YFP.

Wie dem PAA-Gel zu entnehmen ist, werden die Motordomänenkonstrukte hoch exprimiert, die Expressionslevel der Konstrukte mit Nackendomäne und IQ-Motiv sind viel geringer. Die Expressionsstärke der C743-Konstrukte, die zwar den N-Terminus der Nackendomäne, nicht aber das IQ-Motiv enthalten, liegt dazwischen (nicht gezeigt). Die Expressionsstärke der Mutanten mit aktivierter TEDS-Stelle (T341E) liegt für alle Konstrukte unterhalb der des Wildtyps.

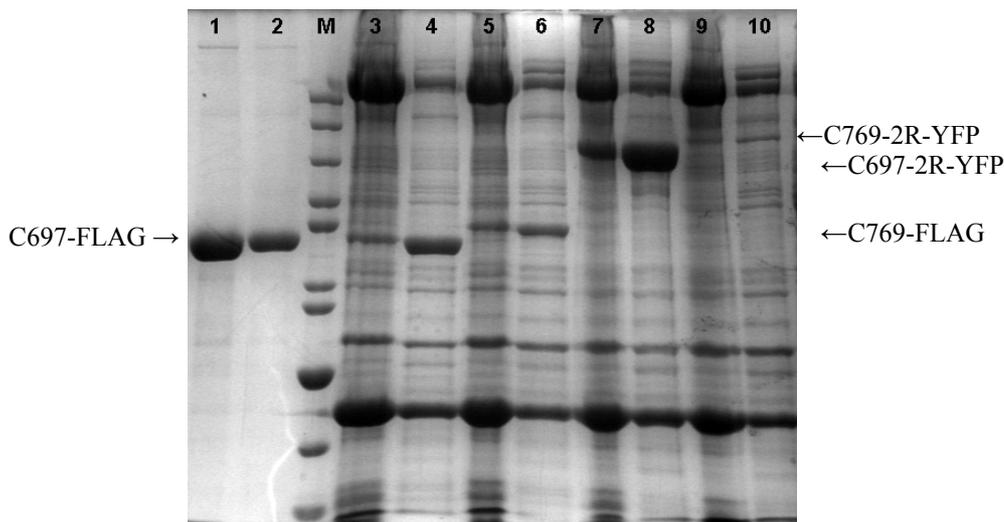


Abb. 3.42: Coomassie Blue-gefärbtes 10%iges PAA-Gel von aufgereinigtem C697-FLAG (1 und 2, ~80 kDa) sowie der Expressionsanalyse von verschiedenen Myosin-IC Konstrukten. Aufgetragen sind jeweils Pellet und Überstand des letzten Extraktions-Zentrifugationsschrittes. M: Marker, 3+4: C697-FLAG (~80 kDa), 5+6: C769-FLAG (~85 kDa), 7+8: C697-2R-YFP-His (~138 kDa), 9+10: C769-2R-YFP-His (~147 kDa).

Es wurden präparative Proteinaufreinigungen einiger Konstrukte durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst.

Tab. 3.10: Präparative Aufreinigungen von Myosin-IC Konstrukten

Konstrukt	Menge	Bemerkung
C697-2R-YFP-His	~ 27 mg	präzipitiert bei Salzkonzentrationen unter 300 mM
C697-His	5,5 mg	präzipitiert beim Einkonzentrieren
C697-FLAG	~0,3 mg	hohe Reinheit
C769-2R-YFP-His	~0,2 mg	präzipitiert bei Salzkonzentrationen unter 300 mM
C769-2R-YFP-His	~0,5 mg	stabil bei 500 mM KCl
C769-FLAG	<0,1 mg	geringe Expression
C697 ^{T341E} -FLAG	~0,2 mg	hohe Reinheit
C697 ^{T341E} -FLAG	~0,8 mg	hohe Reinheit

3.8.3. Untersuchung der Phosphorylierung von *D. discoideum* Myosin-IC

Da Myosin-IC zu den Klasse I Myosinen gehört, wird vermutet, daß es, wie auch Myosin-IB, Myosin-ID und Myosin-IE aus *D. discoideum*, durch Phosphorylierung im Bereich der TEDS-Stelle aktiviert wird. Deshalb wurde mit Kinase-Assays mit radioaktiv markiertem γ - ^{33}P -ATP überprüft, ob sich aufgereinigte Myosin-IC Proteine mit der Myosin Klasse I Schwerkettenkinase (MIHCK) phosphorylieren lassen. In Abbildung 3.43 ist das Ergebnis von zwei Kinaseassays mit C697-2R-YFP sowie C697-FLAG dargestellt. Myosin-IC lässt sich durch MIHCK aus *A. castellanii* phosphorylieren, durch Zugabe von λ -Phosphatase lässt sich die Phosphorylierung wieder rückgängig machen. Der Kinaseassay mit C697-FLAG im Vergleich zu einem Myosin-IB Konstrukt, bei dem das Serin in der TEDS-Stelle zu einem Alanin mutiert wurde, sowie einem HMM zeigt, daß Myosin-IC quantitativ phosphoryliert wird, während die Kontrollproteine kein Signal zeigen. Die Stärke des Signals ist vergleichbar mit dem von Myosin-IB.

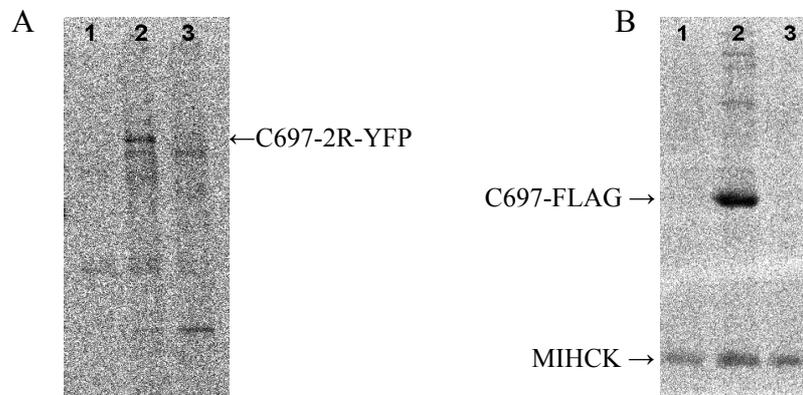


Abb. 3.43: Phosphorylierung von Myosin-IC Konstrukten mit MIHCK. A) Phosphorylierung von C697-2R-YFP. 1: 1 min. Inkubation, 2: 45 min. Inkubation, 3: Zugabe von λ -Phosphatase nach 45 min. und Inkubation für weitere 45 min. (Myosin-Konzentration: 0,5 $\mu\text{g}/\text{lane}$). B) Phosphorylierung von C697-FLAG und Kontrollproteinen mit der katalytischen Domäne von MIHCK. 1: B698-S332A, 2: C697-FLAG, 3: HMM (Myosin-Konzentration: 1 $\mu\text{g}/\text{lane}$).

Mit den aufgereinigten Motordomänenkonstrukten (C697-His, C697-FLAG) wurden Messungen der basalen ATPase-Geschwindigkeit im Fließgleichgewicht durchgeführt. Diese ergaben für die Wildtypkonstrukte und die TEDS-Stellen Mutante C697^{T341E}-FLAG einen Wert von $k_{\text{basal}} = 0,01 \text{ s}^{-1}$. Dieser liegt um den Faktor 5-10 niedriger als die basale ATPase-Aktivität von Myosin-IB, Myosin-ID und Myosin-IE aus *D. discoideum*. Die Aktin-aktivierte ATPase wurde für Wildtyp und Mutante bei 30 μM F-Aktin gemessen und ergab für beide Konstrukte eine sehr geringe Aktivierung auf $k_{\text{aktiviert}} = 0,04 \text{ s}^{-1}$.

Die Funktionalität des Konstruktes mit künstlichem Hebelarm als molekularer Motor wurde durch die Messung der Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten im *in vitro* Motilitätsassay nachgewiesen. Das Konstrukt C697-2R-YFP-His zeigte nach ATP-Zugabe ein „Zittern“ der fluoreszenzmarkierten Aktinfilamente. Nach Phosphorylierung des Myosinkonstruktes mit MIHCK aus *A. castellanii* konnte eine Bewegung der Aktinfilamente mit einer Geschwindigkeit von $0,27 \pm 0,15 \mu\text{m}/\text{s}$ gezeigt werden. Für das Konstrukt mit der erweiterten Nackendomäne und dem ersten IQ-Motiv, C769-2R-YFP-His, war keine Bewegung feststellbar, nach Phosphorylierung wurde aber ebenfalls ein „Zittern“ der Aktinfilamente beobachtet. Bislang konnten jedoch keine Bedingungen ermittelt werden, die eine gleichmäßige Bewegung der Aktinfilamente bewirken. Diese Beobachtung könnte darauf

hinweisen, daß die leichten Ketten zur Stabilisierung der Nackenregion für eine effektive Translokation der Filamente fehlen oder das Protein in dieser Form nicht stabil genug ist.

Es wurden Expressionsvektoren für Konstrukte mit variierender Länge der Nackendomäne und verschiedenen Affinitätstags sowie Mutationen im Bereich der TEDS-Stelle generiert und nach Transformation exprimierende Klone isoliert. Die Aufreinigung der Konstrukte zeigte eine Abhängigkeit der Stabilität der Präparationen von der Salzkonzentration. Die Phosphorylierung der Motordomäne von Myosin-IC durch die Klasse I Schwerekettenkinase aus *A. castellanii* wurde nachgewiesen. Die Wildtypkonstrukte zeigen eine basale ATPase-Aktivität sowie die Fähigkeit zur Bewegung von Aktinfilamenten.

Die durchgeführten Untersuchungen legen eine Regulation von Myosin-IC durch Phosphorylierung und die Stabilisierung der nackenregion durch leichte Ketten nahe, wobei beide Mechanismen nach dem Prinzip eines Ein/Aus-Schalters wirken können.

Durch diese Arbeiten konnte gezeigt werden, daß es sich bei den Konstrukten um aktive molekulare Motoren handelt, wodurch die Grundlage für die kinetische und funktionale Charakterisierung von *D. discoideum* Myosin-IC -insbesondere im Hinblick auf die Regulation- geschaffen wurde.

4. Diskussion

4.1. Kinetische Charakterisierung von Myosin-Vb aus *D. discoideum*

4.1.1. Expression und Aufreinigung von *D. discoideum* Myosin-Vb

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der ATPase-Zyklus von *D. discoideum* Myosin-Vb durch eine umfassende kinetische Charakterisierung aufgeklärt. Der niedere Eukaryot *D. discoideum* exprimiert 13 verschiedene Myosine aus mindestens vier Klassen [Kollmar, 2006]. Im Gegensatz dazu exprimiert die Hefe *S. cerevisiae* nur fünf Myosine aus drei Klassen. *D. discoideum* eignet sich aufgrund der Vielzahl von Myosinen hervorragend als Modellorganismus für die Untersuchung der Funktionen verschiedener Myosine. Die Zusammensetzung des Myosin-Repertoires von *D. discoideum* kann also als Minimalmodell für höhere eukaryotische Organismen angesehen werden.

Bisher wurde nur für Klasse V Myosine aus Wirbeltieren die prozessive Bewegung als einzelnes Molekül nachgewiesen. Die zwei Klasse V Myosine aus *S. cerevisiae* wurden aufgrund von funktionalen Untersuchungen als nicht prozessiv eingestuft [Reck-Peterson *et al.*, 2001]. Hierbei fehlt jedoch die kinetische Charakterisierung. Für Myosin-V aus *D. melanogaster* wurde aufgrund kinetischer Parameter eine niedrige *duty-ratio* ermittelt, es wurde deshalb ebenfalls als nicht prozessiver Motor eingeordnet [Tóth *et al.*, 2005]. Es stellt sich daher die Frage, ob Prozessivität von Klasse V Myosinen eine spezielle Eigenschaft höherer Eukaryoten ist, oder ob auch Myosin-V aus Metazoen die kinetischen und strukturellen Voraussetzungen für prozessives Verhalten besitzt.

Die kinetischen und funktionalen Experimente mit den bisher in der Literatur als prozessiv eingestuften Klasse V Myosinen wurden anhand von nativ aufgereinigten oder im Baculovirus/SF9-System rekombinant exprimierten Myosinen durchgeführt [Mehta *et al.*, 1999; De La Cruz *et al.*, 1999; Trybus *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999; Rosenfeld und Sweeney, 2004; Rosenfeld *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2006]. Die verwendeten Konstrukte waren S1-Fragmente mit IQ-Motiven und den daran gebundenen essentiellen leichten Ketten und/oder Calmodulin. Die in dieser Arbeit untersuchten Myosin-Vb-Motordomänenkonstrukte wurden ohne IQ-Motive und leichte Ketten rekombinant in *D. discoideum* exprimiert, um ausschließlich die kinetischen und funktionalen Eigenschaften der Motordomäne zu untersuchen. Dadurch können die gewonnenen Erkenntnisse mit den Eigenschaften der bislang studierten Myosine verglichen werden. Für die Untersuchung der Motoraktivität von Myosin-Vb mit Hilfe von *in vitro* Motilitätsassays wurden Konstrukte mit Hebelarm benötigt. Es wurde ein künstlicher Hebelarm eingesetzt, der eine Länge von 14 nm hat, was einem natürlichen Hebelarm von Myosin-V mit drei gebundenen leichten Ketten entspricht.

Für die Durchführung der einzelnen Experimente sowie für die Kristallisation wurden Motordomänenkonstrukte kloniert, im *D. discoideum*-System exprimiert und aufgereinigt [Manstein und Hunt, 1995] (vgl. Kapitel 3.2., Tabelle 3.1). Das Expressionsniveau dieser Konstrukte lag mit 0,3 bis 0,4 mg Protein pro Gramm Zellen unterhalb dem von bisher aufgereinigten Myosin-I und Myosin-II Konstrukten. Bei einer typischen Myosinpräparation aus 40 g Zellen konnten zwischen 12 und 15 mg rekombinantes Myosin-Vb isoliert werden. Für die Kristallisation wurden weitere Reinigungsstufen etabliert und Konstrukte mit FLAG-tag exprimiert [Knetsch *et al.*, 2002].

4.1.2. *D. discoideum* Myosin-Vb zeigt kinetische Eigenschaften eines prozessiven Motors

Der ATPase-Zyklus von *D. discoideum* Myosin-Vb wurde mit Hilfe von Messungen im Fließgleichgewicht sowie mit transientenkinetischen Untersuchungen umfassend charakterisiert. Das Ziel war eine Klassifizierung von Myosin-Vb anhand seiner kinetischen Parameter. Auf der Grundlage der gewonnenen Daten wurden die gängigen Modelle zur Beschreibung der kinetischen Mechanismen von Klasse V Myosinen überprüft und erweitert. Wie bislang aus der Literatur hervorgeht, weist die Myosinklasse V eine heterogene Zusammensetzung aus prozessiven und nichtprozessiven Motoren auf. Auch in anderen Klassen, wie z.B. der Klasse I, sind Myosine gruppiert, die zwar phylogenetische und strukturelle Parallelen aufweisen, sich aber funktional und kinetisch drastisch voneinander unterscheiden. Daraus resultiert auch, daß diese Myosine innerhalb der Zelle sehr unterschiedliche Funktionen ausüben können. Während beispielsweise prozessives Myosin-Va in Säugetieren als einzelnes Molekül zytoplasmatische Vesikel transportieren kann, müssen die nichtprozessiven Klasse V Myosine, sofern sie an Transportvorgängen beteiligt sind, in operativen, prozessiven Einheiten aus vielen Molekülen zusammenwirken, um die Aufgabe des Vesikeltransportes zu erfüllen. Das gilt z. B. für Myosin-2p und Myosin-4p in *S. cerevisiae* im Organelltransport [Titus, 1997; Bretscher, 2003] sowie für *D. melanogaster* Myosin-V in der Spermatogenese und im Vesikeltransport [Mermall *et al.*, 2005; Tóth *et al.*, 2005]. Dies erfordert andere Mechanismen der Rekrutierung dieser Transporter an den Vesikeln und spezifische Regulationsmechanismen.

Die Grundlage der kinetischen Charakterisierung von *D. discoideum* Myosin-Vb bildet die Bestimmung der katalytischen Aktivität durch die Messung der basalen und der Aktin-aktivierten ATPase-Aktivität. Wie ein Großteil der bisher untersuchten konventionellen und unkonventionellen Myosine weist Myosin-Vb eine basale ATPase-Geschwindigkeit von $\sim 0,1 \text{ s}^{-1}$ auf. Die Aktivierung der ATPase-Aktivität durch den „Austauschfaktor“ Aktin führt zu einer effektiven Erhöhung der ATPase-Geschwindigkeit um etwa den Faktor 200. Diese Aktivierung ist vergleichbar mit der von *G. gallus* Myosin-Va und steht im Kontrast zur nur 15-fachen Aktivierung der ATPase von Myosin-II. Für das Erreichen der maximalen ATPase-Geschwindigkeit ist für *D. discoideum* Myosin-Vb eine viel höhere Aktin-Konzentration als für Myosin-Va notwendig, da $K_{\text{app(Aktin)}}$ um den Faktor 20 höher liegt ($27 \mu\text{M}$ gegenüber $1,4 \mu\text{M}$). Bisher wurde ein niedriger $K_{\text{app(Aktin)}}$ als wichtige Voraussetzung für prozessives Verhalten angesehen. *D. melanogaster* Myosin-VIIB weist ebenfalls einen hohen $K_{\text{app(Aktin)}}$ von $39 \mu\text{M}$ auf [Yang *et al.*, 2005]. Für dieses Myosin wurde aufgrund der kinetischen Charakterisierung eine hohe *duty ratio* sowie die kinetischen Voraussetzungen für prozessives Verhalten gezeigt, nämlich eine geschwindigkeitsbestimmende ADP-Dissoziation aus dem Aktomyosinkomplex sowie eine hohe Aktin-Affinität in Abwesenheit und Anwesenheit von ADP. Später wurde die prozessive Bewegung von *D. melanogaster* Myosin-VIIB entlang von Aktinfilamenten mit Einzelmolekülmessungen bestätigt [Yang *et al.*, 2006]. Ein niedriger K_{app} -Wert für Aktin ist somit keine notwendige Voraussetzung für Prozessivität.

Als Ursache für die schwächere Aktin-Aktivierung der ATPase von *D. melanogaster* Myosin-VIIB vermuten Henn und De La Cruz das fehlende positiv geladene Insert in Schleife-2 (Nettoladung -1, vgl. Sequenzvergleich Abbildung 3.4) [Henn und De La Cruz, 2005]. Auch Krementsova *et al.* und Hodges *et al.* haben nach Studien mit Chimären und Mutationskonstrukten in Schleife-2 von Myosin-V postuliert, daß die absolute Anzahl an positiven Ladungen in Schleife-2 direkt mit dem Prozessivitätsgrad korreliert [Krementsova *et al.*, 2006; Hodges *et al.*, 2007]. Das steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit über *D. discoideum* Myosin-Vb, da dieses wie nichtprozessives *D. discoideum* Myosin-II eine Nettoladung der Schleife-2 von +3 in dieser Region aufweist.

Insgesamt scheint also nicht allein die Nettoladung, sondern auch die absolute Anzahl an positiv und negativ geladenen Aminosäuren in Schleife-2 sowie deren Position eine wichtige Rolle für die Aktin-Affinität bzw. Aktin-Aktivierung und die Möglichkeit zu prozessiver Bewegung zu spielen.

Im Folgenden wird der ATPase-Zyklus von *D. discoideum* Myosin-Vb diskutiert, wie er über transientkinetische Messungen der zugänglichen Einzelschritte charakterisiert wurde. Die Parameter werden dabei denen von weiteren Klasse V Myosinen gegenübergestellt, um die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den kinetischen Konstanten innerhalb der Klasse V hervorzuheben.

Für die Reaktion von Myosin-Vb mit ATP konnte eine Fluoreszenzerhöhung detektiert werden. Dieses Fluoreszenzsignal zeigte im Gegensatz zu Kaninchen Myosin-S1 eine geringe Amplitude [Bagshaw *et al.*, 1974]. Des Weiteren blieb die Amplitude bei steigender ATP-Konzentration konstant, während sie bei Kaninchen Myosin-S1 abnimmt, weil sich das Fluoreszenzsignal hier aus zwei Anteilen zusammensetzt, da sowohl die Isomerisierung (k_{+2}) als auch die ATP-Hydrolyse ($k_{+3} + k_{-3}$) dazu beitragen. Für Myosin-Vb wird deshalb - in Anlehnung an *D. discoideum* Myosin-II - die Fluoreszenzänderung nur dem Hydrolyseschritt zugeschrieben [Ritchie *et al.*, 1993; Kurzawa *et al.*, 1997]. Diese Interpretation wird dadurch gestützt, daß Myosin-Vb (wie auch Myosin-II) keine intrinsische Fluoreszenzänderung bei der ADP-Bindung aufweist. Darüber hinaus fehlen Myosin-Vb zwei konservierte Tryptophanreste im Bereich der Nukleotidbindungstasche (W113 und W131 in Kaninchen Myosin S1; N108 und N126 in Myosin-Vb), die mit der Fluoreszenzänderung bei der ATP- und ADP-Bindung in Verbindung gebracht werden. Die maximale Geschwindigkeit der Fluoreszenzänderung bei der ATP-Bindung entspricht also bei *D. discoideum* Myosin-Vb der Geschwindigkeit des Hydrolyseschrittes, der mit einer Geschwindigkeit von 410 s^{-1} sehr viel schneller abläuft als bei Myosin-II (30 s^{-1}). Eine vergleichbar hohe Hydrolysegeschwindigkeit weisen *M. musculus* Myosin-V (200 s^{-1}) sowie *G. gallus* Myosin-Va (750 s^{-1}) auf [Trybus *et al.*, 1999; De La Cruz *et al.*, 1999]. Dadurch können diese prozessiven Myosine im aktinfreien Zustand gebundenes ATP sehr schnell hydrolysieren und im M.D.P_i bzw. im M.D Zustand schneller wieder in einen schwach bzw. stark aktungebundenen Zustand übergehen. Die schnelle Hydrolysegeschwindigkeit trägt also für *D. discoideum* Myosin-Vb maßgeblich dazu bei, die Zeitspanne des von Aktin dissoziierten Zustandes zu minimieren.

Die Bindungs- und Dissoziationsreaktionen von ADP mit Myosin-Vb in Abwesenheit von Aktin zeigten ein biphasisches Verhalten. Die Geschwindigkeitskonstanten der schnellen Phase sind mit einer Fluoreszenzänderung von 1,5 % nicht abhängig von der eingesetzten ADP-Konzentration und liegen im Mittel bei $84,2 \text{ s}^{-1}$. Hierbei könnte es sich um die Geschwindigkeit eines fluoreszenz sensitiven Isomerisierungsschrittes handeln, der auf die Bindung des ADP folgt. Dafür spricht auch, daß die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten unabhängig von der eingesetzten ADP-Konzentration sind. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der langsamen Phase sind ADP-abhängig und ergeben eine Geschwindigkeitsskonstante 2. Ordnung für die Bindung von ADP an Myosin-Vb von $0,17 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Auch *G. gallus* Myosin-Va zeigt ein biphasisches Verhalten bei der Interaktion mit mantADP. Im Gegensatz zu *D. discoideum* Myosin-Vb weist hier die langsame Phase der ADP-Bindung keine Abhängigkeit von der ADP-Konzentration auf und liegt im Mittel bei $2,8 \text{ s}^{-1}$. Sie ist dem Isomerisierungsschritt zuzuordnen, der auf die ADP-Bindung folgt. Die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung für die mantADP-Bindung beträgt für Myosin-Va $3,7 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Für dieses Myosin läuft also die Bindung sehr schnell ab und die Konformationsänderung ist geschwindigkeitsbestimmend. Die etwa 20-fach höhere Bindungskonstante 2. Ordnung für ADP ist also bestimmend für die 10-fach höhere ADP-Affinität von Myosin-Va im Vergleich zu *D. discoideum* Myosin-Vb.

Für die Dissoziation von mantADP von Myosin-Vb wurde eine Geschwindigkeit von $0,92 \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Aus der Bindungs- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante konnte die mantADP-Affinität zu $5,4 \text{ }\mu\text{M}$ berechnet werden. Die alternative Bestimmung der ADP-Affinität über das Pyren-Aktin-Signal ergab $K_D = 2,54 \text{ }\mu\text{M}$. Mit beiden Meßmethoden wurde also eine vergleichbare Affinität für ADP ermittelt, die ähnlich der von Myosin-II, allerdings um den Faktor 10 geringer als die von Myosin-Va ist.

Die Interaktionen der Nukleotide ATP und ADP mit Myosin-Vb in Anwesenheit von Aktin wurden ebenfalls gemessen und erlaubten es, die bevorzugten stabilen Zwischenzustände des ATPase-Zyklus von Myosin-Vb zu bestimmen. Die Messung der Dissoziationsgeschwindigkeit des Akto.Myosin-Vb-Komplexes durch ATP ergab eine Bindungskonstante 2. Ordnung von ATP an den Komplex von $K_1k_{+2} = 0,19 \text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Diese wurde im *flash photolysis* System mit Hilfe des Lichtstreusignals als geschwindigkeitsbestimmend für die Dissoziation des Aktomyosinkomplexes bestätigt. Sie liegt um den Faktor 4,5 niedriger als die von *G. gallus* Myosin-Va. Für *S. scrofa* Myosin-VI wird ebenfalls eine sehr geringe Bindungsgeschwindigkeit von ATP an den Akto.Myosin Komplex ($K_1k_{+2} \sim 0,02 \text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) als maßgebliche Determinante für die hohe *duty ratio* dieses prozessiven Myosins postuliert [De La Cruz *et al.*, 2001]. Darüber hinaus zeigt Myosin-Vb eine im Vergleich zu anderen Myosinen sehr langsame Isomerisierung des Akto.Myosin.ATP Komplexes, die geschwindigkeitsbestimmend für die Dissoziation ist. Die Maximalgeschwindigkeit beträgt $k_{+2} = 150 \text{ s}^{-1}$, dieser Wert ist 5-10fach niedriger als der von Myosin-Va oder Myosin-II. Da die Isomerisierungsgeschwindigkeit bei physiologischen ATP-Konzentrationen von ungefähr 1 mM bei 50 bis 75 s^{-1} liegt, was etwa der von Myosin-VI entspricht (25 bis 50 s^{-1}), trägt die langsame Dissoziation des Komplexes maßgeblich dazu bei, daß Myosin-Vb für längere Zeit im stark Aktin gebundenen Zustand verbleibt.

Die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung für die ADP-Bindung an Akto.Myosin-Vb ($k_{+AD} = 4,0 \text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ist um den Faktor 20 höher als die von ATP ($K_1k_{+2} = 0,19 \text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Dieses Verhalten zeigen die prozessiven Myosine *S. scrofa* Myosin-VI (Faktor 30) und *G. gallus* Myosin-Va (Faktor 12) ebenfalls. Die absoluten Werte liegen bei Myosin-VI sehr viel niedriger ($k_{+AD} = 0,6 \text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $K_1k_{+2} = 0,018 \text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) als bei Myosin-Va ($k_{+AD} = 12,6 \text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $K_1k_{+2} = 0,9 \text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Für Myosin-VI konnte anhand der Kristallstruktur gezeigt werden, daß für die geringe ATP-Affinität ein besonderes Insert in der Nähe von Schalter-I verantwortlich ist, das die Zugänglichkeit der Nukleotidbindungstasche für ATP herabsetzt [Menetrey *et al.*, 2005]. In der Nukleotidbindungstasche von Myosin-Va existiert kein solches Insert. Allerdings wurde mit Hilfe der Kristallstruktur von Myosin-Va in Anwesenheit und Abwesenheit von ADP gezeigt, daß sich im nukleotidfreien *rigor-like* Zustand P-Schleife und Schalter I in einer Position befinden, die die Bindung von ADP, nicht jedoch von ATP, ermöglichen [Coureux *et al.*, 2004]. Es läßt sich für *D. discoideum* Myosin-Vb ebenfalls vermuten, daß die Positionen von P-Schleife und Schalter I im aktungebundenen Zustand die bevorzugte ADP-Bindung ermöglichen.

Die hohe Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung für die ADP-Bindung an Akto.Myosin-Vb weist auf eine sehr hohe ADP-Affinität hin. Diese konnte über das Verhältnis der Bindungs- und Dissoziationsgeschwindigkeit von mantADP zu $K_{AmD} = 5,4 \text{ }\mu\text{M}$ bestimmt werden. Dieser Wert konnte auch über die unabhängige Bestimmung mit Hilfe der Pyren-Aktin-Fluoreszenz bestätigt werden ($K_{AD} = 8 \text{ }\mu\text{M}$). Die ADP-Affinität von Myosin-Vb, die in Abwesenheit von Aktin ebenfalls bei $5,4 \text{ }\mu\text{M}$ liegt, wird also durch Aktin kaum beeinflusst. Die Kopplung zwischen den Affinitäten in Anwesenheit und Abwesenheit von Aktin (K_{AD}/K_D) beträgt 1. Dieser Wert zeigt, daß Aktin- und ADP-Bindung von Myosin-Vb, vergleichbar zu *G. gallus* Myosin-Va, nicht gekoppelt sind. Die Bindung von Myosin-Vb.ADP an Aktin führt daher nicht zu einer Schwächung der ADP-Affinität.

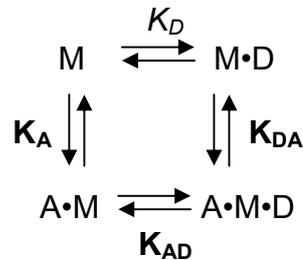
Der stark aktinbindende Akto.Myosin.ADP-Komplex stellt für prozessives Myosin-Va aus *G. gallus* den vorherrschenden Zustand des ATPase-Zyklus dar. Um die Dauer des stark gebundenen Zustandes zu bestimmen, wurde die Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation aus dem Akto.Myosin-Vb.ADP-Komplex direkt gemessen. Diese beträgt $21,6 \text{ s}^{-1}$ für mantADP bzw. $17,4 \text{ s}^{-1}$ für ADP, gemessen über die Pyren-Fluoreszenz. Die ADP-Dissoziationsgeschwindigkeit von *D. discoideum* Myosin-Vb liegt damit wie bei *G. gallus* Myosin-Va nur geringfügig über der ATPase-Geschwindigkeit im Fließgleichgewicht ($k_{\text{cat}} = 11,6 \text{ s}^{-1}$). Dadurch wird dieser Schritt wie für alle prozessiven dimeren Myosine geschwindigkeitsbestimmend für den gesamten ATPase-Zyklus von Myosin-Vb. Der geschwindigkeitsbestimmende ADP-Dissoziationsschritt kann also als eine der wichtigsten Voraussetzungen für prozessives Verhalten angesehen werden, er trägt darüber hinaus maßgeblich zu einer hohen *duty ratio* bei (vgl. Kapitel 4.1.7.).

Am Gesamtschema des ATPase-Zyklus von Myosin-Vb (s. Kapitel 4.1.4.) ist ersichtlich, daß während des Durchlaufes eines ATPase-Zyklus sowohl Myosin als auch Myosin.ADP im Gleichgewicht mit der aktin gebundenen Form Akto.Myosin bzw. Akto.Myosin.ADP stehen. Es wurden daher die Bindungsaffinitäten von Myosin-Vb für Aktin in Anwesenheit und Abwesenheit von ADP bestimmt, indem die Bindungs- und Dissoziationsgeschwindigkeiten gemessen wurden. Es zeigte sich, daß Myosin-Vb eine hohe Aktin-Affinität von 20 nM aufweist, die durch ADP nur um den Faktor 1,9 auf 38 nM verringert wird. Daraus läßt sich rückschließen, daß der Myosin-Vb.ADP-Komplex *rigor*-ähnliche Eigenschaften aufweist. Die ADP-Freisetzung erfolgt wie für *G. gallus* Myosin-Va im stark aktin gebundenen Zustand [Hannemann *et al.*, 2005]. Eine ähnlich hohe Aktin-Affinität in ADP-Anwesenheit haben auch *G. gallus* Myosin-Va (7,6 nM), *D. melanogaster* Myosin-VIIb (34 nM) sowie *S. scrofa* Myosin-VI (67 nM). Daraus ergibt sich, daß diese prozessiven Myosine einschließlich *D. discoideum* Myosin-Vb in der ADP-gebundenen Form eine fast geschlossene Spalte zwischen oberer und unterer 50 kDa Domäne aufweisen müssen. Die Konformation im Bereich der Aktinbindungsstellen ist also ähnlich der im nukleotidfreien *rigor-like* Zustand. Dadurch wird eine hohe Aktin-Affinität des Akto.Myosin.ADP-Komplexes ermöglicht. Diese strukturelle Anpassung, die sich auch in den kinetischen Parametern der Bindung und Dissoziation von Aktin widerspiegelt, ist eine Grundvoraussetzung für prozessives Verhalten.

4.1.3. *D. discoideum* Myosin-Vb weist niedrige thermodynamische und kinetische Kopplungen auf

In den letzten Jahren wurde in vielen Studien gezeigt, daß die thermodynamische Kopplung zwischen Aktin- und ADP-Bindung zwischen verschiedenen Myosinen große Unterschiede aufweist [De La Cruz und Ostap, 2004; Nyitrai und Geeves, 2004; Dürrwang *et al.*, 2005]. Schnelle Myosine wie Myosin-II aus dem Skelettmuskel oder *D. discoideum* Myosin-II zeigen eine starke sogenannte negative Kopplung, das heißt, Aktin-Bindung an Myosin schwächt die ADP-Affinität um den Faktor 50-100 während ADP-Bindung die Aktin-Affinität ebenfalls stark erniedrigt. Im Gegensatz dazu zeigen einige Klasse-I Myosine sowie Myosin-V und Myosin-VI eine sehr schwache Aktin/ADP-Kopplung, die aus einer hohen ADP-Affinität des Aktomyosinkomplexes ($K_{\text{AD}} < 20 \text{ }\mu\text{M}$) sowie einer langsamen ADP-Dissoziationsgeschwindigkeit hervorgeht. Die damit verbundene „lange“ zeitliche Dauer des stark aktin gebundenen Akto.Myosin.ADP-Zustandes spielt gemäß neuerer Interpretationen für einige Klasse I Myosine eine Rolle in der Sensitivität für Zugspannung, während sie für doppelköpfige Klasse V und Klasse VI Myosine wichtig für den Mechanismus der prozessiven Bewegung ist [De La Cruz *et al.*, 1999; De La Cruz *et al.*, 2001; Baker *et al.*,

2004; Rosenfeld und Sweeney, 2004]. Für *D. discoideum* Myosin-Vb zeigen die Gleichgewichtskonstanten für die ADP- und die Aktin-Bindung keine ($K_{AD}/K_D = 1$) oder nur sehr geringe ($K_{DA}/K_A = 1,9$) Kopplung. Mit Hilfe dieser vier Gleichgewichtskonstanten läßt sich auch die thermodynamische Konsistenz des Systems berechnen. Dies gibt Aufschluß darüber, ob die für Myosin-Vb gemessenen Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten ein geschlossenes System definieren, in dem andere Zwischenzustände nicht bestimmend sind. In einem solchen geschlossenen, zyklischen System muß das Produkt aller Gleichgewichtskonstanten 1 ergeben:



Da alle Gleichgewichtskonstanten in dieser Arbeit als Dissoziationsgleichgewichtskonstanten definiert sind, muß also gelten: $1/K_D * 1/K_A * K_{AD} * K_{DA} = 1$. Für Myosin-Vb ergibt sich hier ein Wert von 1,9. Wenn man die Vielzahl an möglichen Fehlerquellen bedenkt, die in die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten einfließen, ist dieser Wert ein guter Hinweis darauf, daß die unabhängig voneinander bestimmten Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten ein geschlossenes System definieren. Bei der ersten transientenkinetischen Charakterisierung von Myosin-Vb aus *G. gallus* ergab sich bei der obigen Rechnung ein Wert von 0,0022 [De La Cruz *et al.*, 1999]. Diese extreme Abweichung wurde damit erklärt, daß ein möglicher 2-Schritt-Prozeß bei der Interaktion von ADP mit Aktin nicht aufgelöst werden konnte. Diese Vermutung bestätigte sich in späteren Untersuchungen, die ein biphasisches Verhalten für diesen Prozeß nachweisen konnten [Rosenfeld und Sweeney, 2004; Rosenfeld *et al.*, 2005]. Für Myosin-Vb wurde in die Berechnung der thermodynamischen Konsistenz der für die ADP-Bindung gezeigte 2-Schritt-Prozeß nicht mit einbezogen, da in Anwesenheit von Aktin kein biphasisches Verhalten für die Interaktion mit ADP beobachtet wurde. Allerdings ist es dennoch möglich, daß auch unter Einbeziehung einer zweistufigen ADP-Myosin-Interaktion thermodynamische Konsistenz erreicht wird, da auch im akingebundenen Fall die Existenz von zwei ADP-Zuständen angenommen wird, die jedoch durch die Messungen nicht aufgelöst werden konnte.

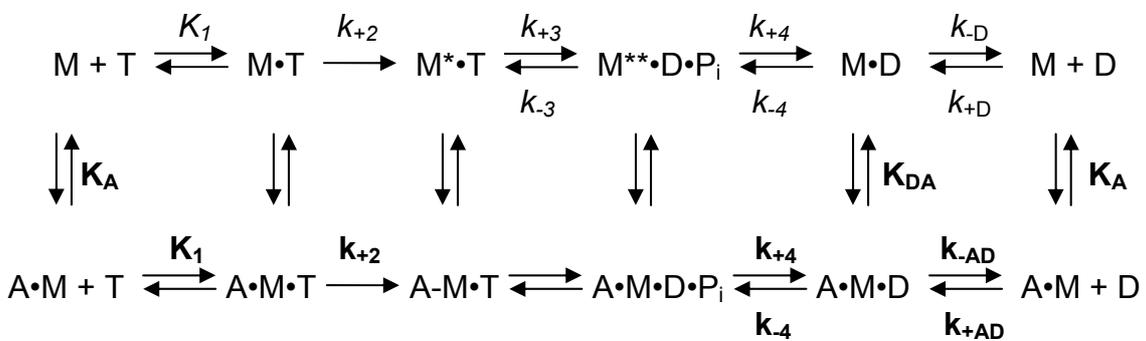
Im Gegensatz zur thermodynamischen Kopplung gibt die kinetische Kopplung an, wie stark die ADP-Dissoziationsgeschwindigkeit von Aktin beschleunigt wird. *D. discoideum* Myosin-Vb hat - vergleichbar mit *G. gallus* Myosin-Va - eine kinetische Kopplung ($k_{AD}/k_{.D}$) von ungefähr 15. Die kinetische Kopplung von schnellen Klasse II Myosinen liegt mit einem Wert von etwa 100 viel höher. Aktin führt hierbei zu einer weitaus effektiveren Beschleunigung der ADP-Dissoziation als bei Myosin-V. Die kinetische Kopplung kann zwischen 1 (bei Myosin-VI) und 100 (Myosin-II) liegen. Eine moderate kinetische Kopplung von 10 bis 20 ist daher eine wichtige Determinante für eine lange Zeitdauer des stark aktinegebundenen Akto-Myosin-ADP-Zustandes und somit für eine hohe *duty ratio*.

Außer der Geschwindigkeitskonstante für die ADP-Dissoziation von Aktomyosin ist das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten der ATP- und ADP-Bindung an Akto-Myosin eine wichtige Einflußgröße für die Produktinhibierung des ATPase-Zyklus durch ADP. Dies kann eine physiologische Bedeutung haben, wenn dieses Verhältnis sehr klein ist, das heißt, wenn das Myosin im Komplex mit Aktin bevorzugt ADP bindet [De La Cruz *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003; Kovács *et al.*, 2003]. Für *D. discoideum* Myosin-Vb liegt das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten der ATP- und ADP-Bindung bei $K_1 k_{+2}/k_{+AmD} = 0,05$. Für *G.*

gallus Myosin-Va liegt das Verhältnis bei 0,07. Zusammen mit dem langsamen ADP-Dissoziationsschritt weisen diese Daten darauf hin, daß die *steady-state*-ATPase-Aktivität von *D. discoideum* Myosin-Vb - auch bei einem ADP/ATP Verhältnis unter 1 - effizient durch ADP inhibiert wird.

4.1.4. Im Verlauf des ATPase-Zyklus populierte Myosin-Vb überwiegend die stark aktinbindenden Zustände

Auf der Grundlage der oben diskutierten Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten läßt sich anhand des hier gezeigten Schemas ein bevorzugter Weg für den Ablauf des ATPase-Zyklus von *D. discoideum* Myosin-Vb postulieren. Die in dieser Arbeit ermittelten transientenkinetischen Parameter von Myosin-Vb sind unten zusammengefaßt.



$K_1 k_{+2}$ ($\mu M^{-1} s^{-1}$)	$0,47 \pm 0,02$	$K_1 k_{+2}$ ($\mu M^{-1} s^{-1}$)	$0,19 \pm 0,01$
$1/K_1$ (μM)	870 ± 80	K_1 (μM)	790 ± 90
$k_{+3} + k_{-3}$ (s^{-1})	410 ± 18	k_{+2} (s^{-1})	150 ± 16
k_{+4} (s^{-1}) *	<1	k_{+4} (s^{-1}) *	~80-100
k_{+D} ($\mu M^{-1} s^{-1}$)	$0,17 \pm 0,01$	k_{+AD} ($\mu M^{-1} s^{-1}$)	$4,0 \pm 0,7$
k_{-D} (s^{-1})	$0,92 \pm 0,1$	k_{-AD} (s^{-1})	$17,4 \pm 1,7$
K_D (μM)	$5,4 \pm 0,9$	K_{AD} (μM)	$5,4 \pm 2$
k_{+A} ($\mu M^{-1} s^{-1}$)	$1,17 \pm 0,08$	k_{+DA} ($\mu M^{-1} s^{-1}$)	$0,78 \pm 0,06$
k_{-A} (s^{-1})	$0,023 \pm 0,001$	k_{-DA} (s^{-1})	$0,03 \pm 0,001$
K_A (nM)	20 ± 2	K_{DA} (nM)	38 ± 5

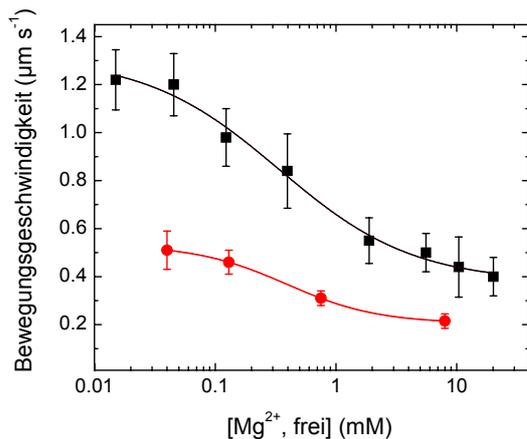
In Abwesenheit von Nukleotiden ist Myosin-Vb fest ($K_A = 20$ nM) an Aktin gebunden (links unten, Zustand $A \cdot M$). Unter physiologischen Bedingungen (ATP-Konzentration ungefähr 1 mM) bildet sich ein Kollisionskomplex $A \cdot M \cdot T$, der mit einer Geschwindigkeit von $75 s^{-1}$ zum dissoziationskompetenten $A \cdot M \cdot T$ -Komplex isomerisiert. Anschließend erfolgt die Dissoziation vom Aktin (gezeigt durch die Änderung der Lichtstreuung im *flash photolysis*

System). Die Hydrolyse des gebundenen ATP erfolgt im dissoziierten Zustand sehr schnell ($k_{+3} + k_{-3} = 410 \text{ s}^{-1}$). Der entstandene $M^{**}\cdot D\cdot P_i$ -Komplex könnte nun das anorganische Phosphat freisetzen, mit einer abgeschätzten Geschwindigkeit von weniger als 1 s^{-1} , was den Werten von *S. scrofa* Myosin-VI oder *D. melanogaster* Myosin-VIIIb entsprechen würde. Wenn die Affinität des Komplexes zu Aktin hoch ist, bindet *D. discoideum* Myosin-Vb zunächst an Aktin und dissoziiert erst danach das Phosphat-Ion (mit einer im Vergleich zu Myosin-Va und Myosin-VI abgeschätzten Geschwindigkeit von $80\text{-}100 \text{ s}^{-1}$). Die Geschwindigkeit der Phosphatfreisetzung ließe sich mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten phosphatbindenden Proteins messen. Wenn über einen der beschriebenen Wege der stark Aktin ($K_{DA} = 38 \text{ nM}$) und stark ADP ($K_{AD} = 5,4 \text{ }\mu\text{M}$) bindende $A\cdot M\cdot D$ -Komplex entstanden ist, dissoziiert dieser langsam und geschwindigkeitsbestimmend das ADP ($k_{AD} = 17,4 \text{ s}^{-1}$). An den danach vorliegenden stabilen Akto.Myosin-Vb-Komplex kann dann erneut ATP binden und der Zyklus beginnt von vorne.

Die grundlegenden kinetischen Parameter, die den ATPase-Zyklus von Myosin-Vb bestimmen, sind also eine langsame Isomerisierung des $A\cdot M\cdot T$ -Komplexes nach ATP-Bindung, die die Dissoziationsgeschwindigkeit vom Aktinfilament bestimmt, eine sehr schnelle ATP-Hydrolyse im dissoziierten Zustand, eine hohe Aktin-Affinität in Abwesenheit und Anwesenheit von ADP sowie eine relativ langsame, geschwindigkeitsbestimmende ADP-Dissoziation des stark Aktin und ADP bindenden $A\cdot M\cdot D$ -Intermediates.

4.1.5. Die Motoraktivität von Myosin-Vb wird durch freie Mg^{2+} -Ionen reguliert

In Anlehnung an die Charakterisierung von *D. discoideum* Myosin-ID und Myosin-IE, die eine Regulation der Motoraktivität durch freie Magnesiumionen zeigen [Fujita-Becker *et al.*, 2004; Dürrwang *et al.*, 2005], sowie die Untersuchungen an *G. gallus* Myosin-Va, die einen Einfluß der Magnesiumionen-Konzentration auf die Reihenfolge und Geschwindigkeit der Produktfreisetzung aufgezeigt haben [Rosenfeld *et al.*, 2005; Hannemann *et al.*, 2005], wurde in dieser Arbeit die Regulation von *D. discoideum* Myosin-Vb durch die Konzentration an freien Magnesiumionen aufgeklärt. Zunächst wurde der Effekt von freien Mg^{2+} -Ionen auf die Aktinbewegungsgeschwindigkeit getestet. Hier zeigte sich durch hohe Konzentrationen an freiem Mg^{2+} eine Inhibierung um den Faktor 3. Aufgrund des sigmoidalen Verlaufes der Inhibierungskurve konnte eine Inhibierungskonstante K_i von $0,34 \text{ mM}$ ermittelt werden. Dieser Wert liegt im Bereich der physiologischen Magnesiumionen-Konzentration im Zytoplasma von *D. discoideum* und vielen anderen Zelltypen [Satre und Martin, 1985; Michailova und McCulloch, 2001]. Für den Einfluß von hohen freien Magnesiumionen-Konzentrationen auf die Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten durch *G. gallus* Myosin-Va wurde aufgrund von transientenkinetischen Messungen in Abhängigkeit der Mg^{2+} -Konzentration ein ähnlicher Effekt vermutet [Rosenfeld *et al.*, 2005]. Allerdings liegen bisher keine veröffentlichten Daten dazu vor. Die entsprechenden Experimente wurden daher in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. Brenner (Institut für Molekular- und Zellphysiologie, Medizinische Hochschule Hannover) mit endogenem Myosin-Va aus dem Gehirn von Huhn durchgeführt. Abbildung 4.1 (rote Kurve) zeigt den Verlauf der Inhibierung der Aktinbewegungsgeschwindigkeit von Myosin-Va durch die Magnesiumionen-Konzentration. Auch hier zeigte sich eine Verminderung der Bewegungsgeschwindigkeit durch freie Mg^{2+} -Ionen um den Faktor 3, aus der an die Daten angepaßten Hill-Kurve ließ sich eine Inhibierungskonstante K_i von $0,39 \pm 0,05 \text{ mM}$ ermitteln. Beide Klasse V Myosine weisen somit eine vergleichbare Reduktion der Motoraktivität durch hohe Konzentrationen an freien Magnesiumionen auf.



Bewegungsgeschwindigkeit ($\mu\text{m s}^{-1}$)	<i>Dd</i> Myosin-Vb	<i>Gg</i> Myosin-Va
5 mM Mg^{2+} , frei	$0,5 \pm 0,2$	$0,25 \pm 0,05$
50 μM Mg^{2+} , frei	$1,2 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,1$
K_i (mM)	$0,34 \pm 0,1$	$0,39 \pm 0,05$

Abb. 4.1: Einfluß von freien Magnesiumionen auf die Bewegungsgeschwindigkeit von *G. gallus* Myosin-Va (●) und *D. discoideum* Myosin-Vb (■) in *in vitro*-Motilitätsversuchen. Die höchste Bewegungsgeschwindigkeit wurde für beide Myosine bei niedrigen freien Mg^{2+} -Konzentrationen gemessen. Tabelle rechts: Bewegungsgeschwindigkeiten und Inhibierungskonstanten aus *in vitro* Motilitätsversuchen. Reaktionsbedingungen: 25 mM Imidazol, pH-Wert 7,4; X mM MgCl_2 , 25 mM KCl, 1 mM EGTA, 10 mM DTT bei 20 °C.

Basierend auf den Erkenntnissen aus den direkten funktionalen Assays wurde der Mechanismus der Regulation von Myosin-Vb durch freie Mg^{2+} Ionen transientenkinetisch untersucht. Obwohl der Vollständigkeit halber alle zuvor durchgeführten Messungen nochmals mit variierender Magnesiumionen-Konzentration wiederholt wurden, waren besonders die Schritte, die eine Ausdehnung der Zeitdauer der stark aktinbindenden Zustände ermöglichen (Akto.Myosin und Akto.Myosin.ADP) von besonderem Interesse. Dadurch könnte einerseits die langsamere Bewegungsgeschwindigkeit erklärt werden, weil eine längere Verweildauer im aktin gebundenen Zustand die Gesamtgeschwindigkeit herabsetzen würde ($v = \text{Länge des Kraftschlages} / \text{Zeitdauer im stark aktin gebundenen Zustand}$). Andererseits würde sich daraus eine Möglichkeit der Regulation der Prozessivität von Myosin-Vb ergeben.

Der Effekt von freien Magnesiumionen wurde für die Interaktion mit ADP in Abwesenheit sowie in Anwesenheit von Aktin gezeigt. Für beide Zustände führen hohe Konzentrationen an freiem Mg^{2+} im physiologischen Bereich thermodynamisch zu einer vier- bis zehnfach höheren Affinität für ADP. Allerdings unterscheidet sich der zugrundeliegende Mechanismus in beiden Fällen erheblich. In Abwesenheit von Aktin ist die höhere Affinität bei hohen Magnesiumionen-Konzentrationen hauptsächlich eine Folge der dreifach höheren Bindungskonstante 2. Ordnung für ADP. Die Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation ist in Abwesenheit von Aktin kaum durch freie Magnesiumionen beeinflusst. Dies steht im Gegensatz zu dem für *G. gallus* Myosin-Va beobachteten Mechanismus, bei dem einerseits eine zweistufige Dissoziation gezeigt wurde und andererseits eine Erniedrigung der Dissoziationsgeschwindigkeit um den Faktor zehn bei hohen Konzentrationen an freiem Mg^{2+} nachweisbar ist. Der resultierende thermodynamische Effekt einer Erhöhung der ADP-Affinität durch hohe Konzentrationen an freien Magnesiumionen ist aber für beide Klasse V Myosine belegbar.

In Anwesenheit von Aktin wurde für *D. discoideum* Myosin-Vb der Reaktionsmechanismus für die Regulation der ADP-Interaktion durch freie Magnesiumionen aufgeklärt. Der grundlegende thermodynamische Effekt einer Erhöhung der ADP-Affinität des Akto.Myosin Komplexes durch hohe Konzentrationen an freien Magnesiumionen wurde auch hier beobachtet. Die ADP-Affinität steigt um den Faktor fünf, von 28 μM (bei 0,2 mM freiem

Mg²⁺) auf 5,4 µM (bei 5 mM freiem Mg²⁺). Da die ADP-Affinität bei niedriger Magnesiumionen-Konzentration bereits als schwach einzustufen ist, bei hoher Magnesiumionen-Konzentration allerdings eine hohe Affinität vorliegt, ist für *D. discoideum* Myosin-Vb ein thermodynamischer Regulationsmechanismus vorhanden. Im Gegensatz dazu erhöht sich für *G. gallus* Myosin-Va die ADP-Affinität um den Faktor drei, von 4,2 auf 1,3 µM. Die ADP-Affinität ist also unabhängig von der Magnesiumionen-Konzentration hoch. Darüberhinaus wurden die Messungen für hohe und niedrige Konzentrationen an freiem Mg²⁺ hier unter anderen Bedingungen als die Messungen in der vorliegenden Arbeit durchgeführt [Rosenfeld *et al.*, 2005]: Der Fall ‚niedrige Magnesiumionen-Konzentration‘ entspricht hier der vollständigen Abwesenheit von freien Magnesiumionen, da in diesen Experimenten 8 mM EDTA zugegeben wurde. Die Messungen bei ‚hohen Magnesiumionen-Konzentrationen‘ wurden bei 10 mM freiem Mg²⁺ durchgeführt. Dieser Wert liegt weit oberhalb der physiologischen Magnesiumionen-Konzentration. Die für *G. gallus* Myosin-Va beschriebene Erhöhung der ADP-Affinität um den Faktor drei ist also unter physiologischen Bedingungen weitaus kleiner. Die kinetischen Effekte, die der beschriebenen Verschiebung der ADP-Affinität zugrunde liegen, unterscheiden sich ebenfalls. Während für beide Klasse V Myosine eine Erniedrigung der Dissoziationsgeschwindigkeit von ADP aus dem ternären Akto.Myosin.ADP-Komplex durch hohe Magnesiumionen-Konzentrationen um den Faktor zehn beobachtet wird, erniedrigt sich bei *G. gallus* Myosin-Va auch die Bindungskonstante 2. Ordnung für ADP um den Faktor drei. Bei *D. discoideum* Myosin-Vb liegt dieser Faktor bei 1,5. Dadurch erklärt sich der unterschiedlich starke Einfluß von freiem Mg²⁺ auf die ADP-Affinität.

4.1.6. Bei hohen Konzentrationen an freien Mg²⁺-Ionen wird die ADP-Dissoziation von Akto.Myosin-Vb zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des ATPase-Zyklus

Für beide Klasse V Myosine ist der grundlegendste kinetische Effekt der Erhöhung der freien Magnesiumionen-Konzentration eine drastische Erniedrigung der Dissoziationsgeschwindigkeit von ADP aus dem Aktomyosinkomplex. Dieser Schritt ist für prozessive dimere Myosine geschwindigkeitsbestimmend für den gesamten ATPase-Zyklus. Für *D. discoideum* Myosin-Vb konnte gezeigt werden, daß die Erhöhung der freien Magnesiumionen-Konzentration im Rahmen des physiologischen Bereiches zu einer Senkung der ADP-Dissoziationsgeschwindigkeit bis auf die Größenordnung der *steady-state*-ATPase-Geschwindigkeit führt. Damit geht eine zehnfache Erhöhung der Zeitdauer des stark aktungebundenen Zustandes einher, die eine drastische Erhöhung der *duty ratio* zur Folge hat. Durch Änderungen in der Konzentration an freiem Mg²⁺ besteht also die Möglichkeit der Modulation des Prozessivitätsgrades von *D. discoideum* Myosin-Vb: bei niedrigen Magnesiumionen-Konzentrationen ist Myosin-Vb ein schnelles Myosin (Bewegungsgeschwindigkeit 1,2 µm/s) mit niedriger Prozessivität. Bei hohen Magnesiumionen-Konzentrationen, wie sie z.B. in der Peripherie von Organellen oder der kontraktilen Vakuole vorkommen, sinkt die Bewegungsgeschwindigkeit (0,5 µm/s), während sich die *duty ratio* und damit die Zeitdauer im stark aktungebundenen Zustand und der Grad an Prozessivität erhöhen. Dieser Effekt kann sich unter Einwirkung äußerer Last noch stärker erhöhen, so daß dieser Motor seine motilen Eigenschaften gänzlich verliert. *D. discoideum* Myosin-Vb ist dann in der Lage, als spannungssensitiver ‚Anker‘ zu fungieren, der die Dynamik der kontraktilen Vakuole aufrechterhält. Unabhängig davon ist eine Funktion als prozessiver Vesikeltransporter denkbar, allerdings konnte bislang eine solche Funktion in *Dictyostelium* Zellen nicht beobachtet werden.

Es lässt sich also zusammenfassend sagen, daß dies ein möglicher Mechanismus der Regulation der Prozessivität von Klasse V Myosinen ist, der in der Literatur noch nicht beschrieben wurde. Trotz teilweise unterschiedlicher kinetischer Parameter der einzelnen Schritte des ATPase-Zyklus von *D. discoideum* Myosin-Vb im Vergleich zu anderen Klasse V Myosinen (s. *G. gallus* Myosin-Va) erfüllt Myosin-Vb die kinetischen Voraussetzungen für prozessives Verhalten als Dimer. Die im Gegensatz zu *G. gallus* Myosin-Va etwas niedrigere ADP-Affinität des Aktomyosinkomplexes sowie die etwas geringere Aktin-Affinität in Anwesenheit von ADP könnten eine Anpassung an die Regulationsfähigkeit der Prozessivität dieses Motors sein, da somit die Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten näher an der Schwelle zwischen ‚prozessiv‘ und ‚nichtprozessiv‘ liegen und dadurch eine Regulation durch geringe Änderungen der freien Magnesiumionen-Konzentration im physiologischen Bereich ermöglicht wird.

4.1.7. *D. discoideum* Myosin-Vb erfüllt durch eine hohe *duty ratio* ein grundlegendes Kriterium für prozessives Verhalten

Für dimere prozessive Myosine wurde eine hohe *duty ratio* als Voraussetzung für Prozessivität postuliert [De La Cruz und Ostap, 2004; Sweeney und Houdusse, 2004]. Dadurch läßt sich der prozentuale zeitliche Anteil des stark aktin gebundenen Zustandes an der Gesamtdauer eines ATP-Umsatzes ausdrücken. Die *duty ratio* kann vereinfacht berechnet werden, indem die Zeitdauer des stark Aktin gebundenen Zustandes (T_{stark}) durch die Gesamtdauer eines ATP-Umsatzes (T_{total}) geteilt wird [Ito *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2006]. Dabei entspricht die Zeitdauer des stark gebundenen Zustandes dem Kehrwert der Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation aus dem Akto-Myosin-ADP-Komplex (k_{AD}) addiert zum Kehrwert der Geschwindigkeit der Akto-Myosin-Dissoziation (k_{+2}). Die Gesamtdauer eines ATP-Umsatzes entspricht dem Kehrwert der maximalen ATPase-Geschwindigkeit.

$$duty\ ratio = \frac{(1/k_{AD}) + (1/k_{+2})}{(1/v_{max})} = \frac{T_{stark}}{T_{total}}$$

Für *D. discoideum* Myosin-Vb ergibt sich damit:

$$duty\ ratio = \frac{(1/17,4s^{-1}) + (1/75s^{-1})}{(1/11,6s^{-1})} = \frac{57,5ms + 13,4ms}{86,2ms} = \frac{70,9ms}{86,2ms} = 0,82.$$

Diese *duty ratio* liegt im Bereich der Werte für prozessive Klasse V Myosine von 0,7 bis 0,9. Sie gilt für *D. discoideum* Myosin-Vb für eine freie Magnesiumionen-Konzentration von 5 mM. Des weiteren wurde eine physiologische ATP-Konzentration von 1 mM angenommen. Als Vergleich ist in der folgenden Tabelle die nach der obigen Formel berechnete *duty ratio* einiger prozessiver und nichtprozessiver Myosine aufgelistet.

Myosin [Quelle]	k_{cat} (s^{-1})	k_{AD} (s^{-1})	k_{+2} (s^{-1})	<i>duty-ratio</i>
<i>Dd</i> Myosin-II [diese Arbeit]	1,44	~50	~1000	0,03 ± 0,02
<i>Dd</i> Myosin-Vb [diese Arbeit]	11,6	17,4	75	0,82 ± 0,05
<i>Gg</i> Myosin-Va [De La Cruz <i>et al.</i> , 1999]	15	16	870	0,95
<i>Dm</i> Myosin-VIIb [Yang <i>et al.</i> , 2005]	8,4	9,8	>400	0,88
<i>Dm</i> Myosin-V [Tóth <i>et al.</i> , 2005]	12,5	150	>180	0,15

Die berechneten Werte für die *duty ratio* von *G. gallus* Myosin-Va und *D. melanogaster* Myosin-VIIb zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Werten, die in den entsprechenden Veröffentlichungen direkt gemessen wurden (0,7 für Myosin-Va, 0,8 für Myosin-VIIb). Für *D. melanogaster* Myosin-V wurde durch Simulation des gesamten ATPase-Zyklus eine *duty ratio* von 0,1 berechnet, die ebenfalls im Bereich des hier berechneten Wertes von 0,15 liegt. Für *D. discoideum* Myosin-II liegt die *duty ratio*, errechnet mit den kinetischen Parametern, die in dieser Arbeit ermittelt wurden, bei 0,03. Setzt man die Literaturwerte von Batra *et al.* ein ($k_{\text{cat}} = 2,7 \text{ s}^{-1}$, $k_{+2} = 504 \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{AD}} \sim 100 \text{ s}^{-1}$), so erhält man ebenfalls eine *duty ratio* von 0,03 [Batra *et al.*, 1999].

Für *D. discoideum* Myosin-Vb erhöht sich bei einer niedrigen Konzentration an freien Magnesiumionen (0,2 mM) die Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation auf 187 s^{-1} , wodurch sich die Zeitspanne des stark aktin gebundenen Zustandes auf 12 ms vermindert. Die Gesamtgeschwindigkeit der ATPase im Fließgleichgewicht ändert sich im physiologischen Bereich an freiem Mg^{2+} jedoch nicht. Dies führt - nach der obigen Formel - zu einer beträchtlich verringerten *duty ratio* von 0,22 bei 0,2 mM freiem Mg^{2+} . Wenn man annimmt, daß die *duty ratio* hauptsächlich von der Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation aus dem Akto-Myosin-ADP-Komplex als geschwindigkeitsbestimmendem Schritt abhängt, würde die Erhöhung der Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation bei geringen Magnesiumionenkonzentrationen mit einer Erniedrigung der *duty ratio* korrelieren. Die Konzentration an freiem Mg^{2+} hat also - über die *duty ratio* - einen direkten Einfluß auf den Grad der Prozessivität von *D. discoideum* Myosin-Vb. Dieser Zusammenhang besteht auch für *G. gallus* Myosin-Va: die Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation erhöht sich in Abwesenheit von freien Magnesiumionen auf 141 s^{-1} , wodurch sich die berechnete *duty ratio* von 0,95 auf 0,12 vermindert. Die Prozessivität von Myosin-Va wird also ebenfalls über die Konzentration an freien Magnesiumionen reguliert.

Um den Einfluß der freien Magnesiumionenkonzentration auf die Population der stark aktinbindenden Zustände direkt zu messen, wurde ein sequentielles Mischexperiment im Stopped-Flow-Fluoreszenzspektrometer durchgeführt. Hiermit konnte gezeigt werden, daß der nach der ATP-Hydrolyse entstehende $\text{M}\cdot\text{D}\cdot\text{P}_i$ -Komplex bei hohen freien Magnesiumionen schnell und nicht geschwindigkeitsbestimmend an Aktin bindet. Bei niedrigen freien Magnesiumionenkonzentrationen sinkt die Geschwindigkeit der Aktinbindung des $\text{M}\cdot\text{D}\cdot\text{P}_i$ -Komplexes, so daß dieser Schritt geschwindigkeitsbestimmend wird. Aus den Amplituden der Pyren-Aktin-Fluoreszenz im *double-mixing* Experiment ließ sich eine Erniedrigung der *duty ratio* von 0,48 auf 0,18 durch die Herabsetzung der freien Magnesiumionenkonzentration ableiten.

Alle bisher in der Literatur beschriebenen direkten Messungen der Prozessivität von Klasse V Myosinen wurden unter Bedingungen durchgeführt, bei denen ein Überschuß an freien Magnesiumionen vorliegt. Basierend auf den Erkenntnissen aus der vorliegenden Arbeit läßt sich postulieren, daß bei geringen Magnesiumionenkonzentrationen voraussichtlich ein geringerer Grad an Prozessivität zu beobachten wäre. Dies würde sich bei Einzelmolekül-Fluoreszenzmessungen in einer verringerten Laufweite von Myosin-V entlang von Aktinfilamenten äußern. Die Modulation des Prozessivitätsgrades durch die Konzentration an freien Magnesiumionen stellt somit einen bisher unbekanntem Regulationsmechanismus der Prozessivität von Myosin-V dar.

4.1.8. Strukturelle Grundlagen der Mg^{2+} -Regulation für Klasse V Myosine

Für die strukturellen Grundlagen des für *D. discoideum* Myosin-Vb beschriebenen kinetischen Mechanismus der prozessiven Bewegung und der Regulation durch Magnesiumionen kann an dieser Stelle aus den bislang bekannten Myosin-Strukturen (Klasse V, I und II) ein Modell aufgestellt werden.

Es ist anzunehmen, daß die Koordinierung des Mg^{2+} -Ions in der Nukleotidbindungstasche auf Änderungen in der Konzentration an freien Magnesiumionen reagiert. Durch eine Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration wird das Bindungsgleichgewicht verschoben. Das Mg^{2+} -Ion wird über Threonin-178 in der P-Schleife, Serin-261 in Schalter I und Aspartat-485 in Schalter II (Aminosäurereste in *D. discoideum* Myosin-Vb) koordiniert. Diese Koordinierung muß für die als magnesiumreguliert klassifizierten Myosine (*D. discoideum* Myosin-ID, Myosin-IE sowie Myosin-Vb und *G. gallus* Myosin-Va) gegenüber den unregulierten Myosinen (z.B. *D. discoideum* Myosin-II) weitere Elemente enthalten. Auf der Grundlage der atomaren Struktur des magnesiumregulierten Myosin-IE sowie von Sequenzvergleichen der Hauptmotive der Nukleotidbindungstasche (Schalter I, Schalter II und P-Schleife) diverser Myosine wird vermutet, daß ein konserviertes Tyrosin in Schalter II eine wichtige Rolle bei der Koordinierung des Mg^{2+} -ADP in der Nukleotidbindungstasche spielt. *D. discoideum* Myosin-Vb besitzt an dieser Stelle - ebenso wie alle oben genannten magnesiumsensitiven Myosine und weitere Klasse V Myosine - einen Tyrosinrest (Y487, vgl. Sequenzvergleich Kapitel 3.1., Abbildung 3.3). Im Gegensatz dazu weist *D. discoideum* Myosin-II an dieser Position ein Serin auf; das ebenfalls nicht magnesiumregulierte *D. discoideum* Myosin-IB hat an dieser Stelle ein Phenylalanin.

Auf der Grundlage von transientenkinetischen und strukturellen Daten von *G. gallus* Myosin-Va haben Rosenfeld *et al.* ein Modell der Magnesiumregulation vorgeschlagen, nach dem die Bindung an Aktin eine Bewegung von Schalter I bewirkt, die die Magnesium-Affinität senkt [Rosenfeld *et al.*, 2005]. Verantwortlich hierfür ist der Verlust der Koordinierung des Mg^{2+} -Ions durch Serin-218 (S260 in *D. discoideum* Myosin-Vb). Durch die Dissoziation des Magnesiumions und die damit einhergehende Öffnung von Schalter I sowie kleinere Konformationsänderungen in P-Schleife und Schalter II würde dann die Koordinierung des ADP geschwächt werden, so daß es ebenfalls dissoziieren kann.

Ergänzend zu diesem Modell kann auf der Grundlage der vorliegenden Arbeit ein weiterer Mechanismus postuliert werden. Der konservierte Tyrosinrest Y487 stabilisiert über Wasserstoffbrückenbindungen eine Konformation von Schalter II, in der ein benachbarter Aspartatrest (D485) das Magnesiumion koordiniert. Dies geschieht indirekt einerseits über schwache elektrostatische Wechselwirkungen des Aspartatrestes mit einem Threoninrest (T178) in der P-Schleife, andererseits über die Koordinierung eines Wassermoleküls. Dadurch ist in magnesiumsensitiven Myosinen mit einem konservierten Tyrosinrest die Bindung des ADP stärker von der Bindung des Mg^{2+} -Ions abhängig. Dies könnte eine Regulation der Geschwindigkeit der ADP-Freisetzung durch die Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen ermöglichen oder verstärken.

Ob die vorgeschlagenen Mechanismen ausreichen, um die strukturellen Voraussetzungen für die Regulation der Myosin-Motoraktivität durch Magnesiumionen zu erklären, werden zukünftige Studien zeigen.

Aus mechanistischer Sicht muß der oben ausgeführten Diskussion noch ein weiterer Aspekt hinzugefügt werden. Die Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten sowie die Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten wurden in der vorliegenden Arbeit unter Bedingungen gemessen, in denen das Myosin keiner oder nur einer sehr geringen Last ausgesetzt ist. Für spannungssensitive Myosine besteht jedoch ein Zusammenhang zwischen der ausgeübten Zugspannung (hervorgerufen während der prozessiven Bewegung als Dimer

bzw. in Anwesenheit von Lasten) und der Geschwindigkeit der ADP-Freisetzung sowie der Mg^{2+} -Affinität: durch Zugspannung wird die Magnesiumaffinität erhöht, was zu einer langsameren ADP-Freisetzung führt [Rosenfeld und Sweeney, 2004; Rosenfeld *et al.*, 2005; Dürrwang *et al.*, 2005; Purcell *et al.*, 2005; Veigel *et al.*, 2005]. Es ist daher zu erwarten, daß die Effekte von freien Magnesiumionen auf die Bewegungsgeschwindigkeit und die Prozessivität von *D. discoideum* Myosin-Vb unter Bedingungen, die eine Last simulieren (optische Laserfalle) oder als Dimer noch verstärkt werden.

4.1.9. *D. discoideum* Myosin-Vb erfüllt die Eigenschaften eines Ankers

Wie in der Einleitung beschrieben (s. Kapitel 1.7.1.), wurde durch Studien in der Arbeitsgruppe gezeigt, daß Myosin-Vb in *D. discoideum* an der kontraktilen Vakuole lokalisiert. Die kontraktile Vakuole in *D. discoideum* ist ein tubulär-vesikuläres System. Es arbeitet als osmoregulatorische Organelle, die Flüssigkeit in einem Netzwerk aus Tubuli und Zisternen sammelt, um sie über durchlässige Poren in der Plasmamembran aus der Zelle zu pumpen [Gerisch *et al.*, 2002]. In diesem dynamischen System wandeln sich Tubuli und Zisternen ineinander um. Die tubulären Kanäle sind mit den Aktinfilamenten des Zytoskelettes assoziiert und können somit bewegt werden und miteinander fusionieren. Der Komplex der kontraktilen Vakuole in *D. discoideum* ist ein eigenes, von den Vesikeln des endosomalen Transportweges abgesondertes System [Maniak, 2002]. Für die Assoziation der Tubuli mit dem Aktinnetzwerk werden Proteine benötigt, die die Stabilität und Flexibilität des dynamischen Systems ermöglichen. Myosin-Vb könnte die Ankerfunktion übernehmen, die notwendig ist, um die kontraktile Vakuole innerhalb des Aktinzytoskeletts zu positionieren. Allerdings ist es für die dynamische Funktion der kontraktilen Vakuole notwendig, daß diese nicht starr ist. Die kinetischen Eigenschaften von Myosin-Vb, die im Rahmen dieser Arbeit beschrieben wurden, ermöglichen eine solche flexible Verankerung der kontraktilen Vakuole durch Myosin-Vb. Bei hohen Konzentrationen an freien Magnesiumionen wird die Bewegungsgeschwindigkeit von Myosin-Vb stark herabgesetzt. Darüber hinaus wird durch eine Inhibierung der Dissoziationsgeschwindigkeit von ADP die Dauer des stark aktinbindenden Zustandes erhöht. Da Myosin-Vb bei der Interaktion mit der kontraktilen Vakuole einer Last ausgesetzt ist, könnte sich dieser Effekt sogar noch verstärken. Durch die Möglichkeit der Modulation der Ankerfunktion durch die Konzentration an freien Magnesiumionen kann Myosin-Vb die Dynamik der kontraktilen Vakuole gewährleisten und dadurch die Funktion eines flexiblen Ankers erfüllen. Auch für Myosin-VI wurde gezeigt, daß es sowohl als Transporter als auch als Anker funktionieren kann [Altman *et al.*, 2004]. Bei diesem dimeren, prozessiven Myosin führen niedrige ATP-Konzentrationen bzw. die Anwesenheit von hohen ADP-Konzentrationen unter Last zu einer Inhibierung der Bewegung entlang von Aktinfilamenten. Bei *D. discoideum* Myosin-Vb liegt der Umschaltung zwischen prozessiver Bewegung und Ankerfunktion also ein anderer kinetischer Mechanismus zugrunde, der an die Bedürfnisse einer flexiblen Verankerung der kontraktilen Vakuole angepaßt ist.

4.2. Serine in der Schleife-1-Region von Myosin-Vb sind potentielle Phosphorylierungsreste mit Regulationsfunktion der ATPase

In der vorliegenden Arbeit konnten erste Beobachtungen einer bisher nicht bekannten Regulation der ATPase-Aktivität eines Klasse V Myosins durch die Phosphorylierung von

Aminosäureresten der Motordomäne gemacht werden. Es wurden Kinaseassays mit radioaktiv markiertem γ - ^{33}P -ATP etabliert, um den Phosphorylierungsstatus der Motordomänen von *D. discoideum* Myosin-Vb und *G. gallus* Myosin-Va im Vergleich zu Klasse I Myosinen und *D. discoideum* Myosin-II zu überprüfen. Es wurde gezeigt, daß sich die Klasse V Myosine ebenso wie Klasse I Myosine mit der Myosin Klasse I Schwerekettenkinase (MIHCK) aus *A. castellanii* phosphorylieren lassen und diese Phosphorylierung für alle untersuchten Myosine mit λ -Phosphatase wieder rückgängig gemacht werden kann. Mit Hilfe maßenspektrometrischer Analysen von phosphorylierten und dephosphorylierten Myosin-Vb-Motordomänenkonstrukten konnte in Kooperation von T. Reinl und Dr. L. Jansch (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) eine putative Phosphorylierungsstelle von Myosin-Vb identifiziert werden.

Die durch MIHCK phosphorylierten Aminosäurereste Serin-208 und Threonin-209 liegen im Schleife-1-Bereich von Myosin-Vb. Dieser Bereich ist in *D. discoideum* Myosin-Vb im Vergleich zu allen anderen Klasse V Myosinen um 18 bis 30 Aminosäuren verlängert (vgl. Sequenzvergleich Kapitel 3.1., Abbildung 3.2). Er befindet sich im Bereich der Nukleotidbindungstasche (s. Abbildung 4.2). Der Schleife-1-Bereich ist über zwei α -Helices mit den nukleotidbindenden Elementen Schalter I und P-Schleife verbunden.

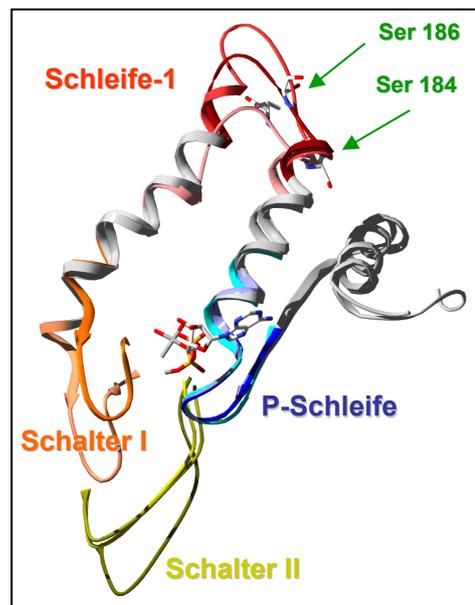


Abb. 4.2: Superpositionierung der Nukleotidbindungstasche von *G. gallus* Myosin-Va, *S. scrofa* Myosin VI und *D. discoideum* Myosin-II. Die Koordinaten entstammen den pdb-Datensätzen 1W8J (Myosin-Va), 2BKH (Myosin-VI) und 1G8X (Myosin-II). Gezeigt sind die nukleotidbindenden Elemente Schalter I, Schalter II sowie P-Schleife und die über α -Helices mit der Nukleotidbindungstasche verbundene Schleife-1. Die markierten Aminosäurereste Serin-184 sowie Serin-186 (Myosin-Va) liegen im Sequenzvergleich an den zu Serin-208 und Threonin-209 von *D. discoideum* Myosin-Vb korrespondierenden Positionen.

In funktionalen Assays und kinetischen Experimenten wurden Hinweise dafür gefunden, daß Schleife-1 die ADP-Freisetzung des Myosins und die Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten reguliert [Spudich, 1994; Sweeney *et al.*, 1998; Kurzawa-Goertz *et al.*, 1998; Murphy und Spudich, 1998; Clark *et al.*, 2005]. Dabei wurde in Studien mit Schleife-1-Chimären gezeigt, daß größere und flexiblere Schleifenbereiche eine schnellere ADP-Dissoziationsgeschwindigkeit zur Folge haben. Eine ähnliche Korrelation wurde auch für Myosin-IE aus *D. discoideum* beschrieben [Kollmar *et al.*, 2002]. Für *D. discoideum* Myosin-Vb scheint diese Wechselbeziehung nicht unbedingt zu gelten. Myosin-Vb hat einen sehr

großen und wahrscheinlich auch flexiblen Schleife-1-Bereich, falls nicht intramolekulare Wechselwirkungen zu einer Kondensierung der Schleife führen. Zusätzlich könnte in Folge der Phosphorylierung der zwei Aminosäurereste in Schleife-1 eine andere, eventuell kompaktere Form dieses Bereiches durch ionische Wechselwirkungen stabilisiert werden. Dies könnte zu einer Veränderung der Zugänglichkeit für Nukleotide oder sogar, wie kürzlich mit Chimären und Mutationskonstrukten einer Klasse I Myosins aus Säugetieren (Myo1b) gezeigt, zu noch weitreichenderen Veränderungen in der Aktin-Affinität und der ATPase-Aktivität führen [Clark *et al.*, 2005].

Die Charakterisierung eines Myosin-Vb Konstruktes mit zwei Mutationen im Bereich von Schleife-1 (S208E, T209D), die durch negative Ladungen eine Phosphorylierung nachahmen, zeigte Änderungen aller *steady-state*-Parameter. Die basale ATPase-Geschwindigkeit der Schleife-1-Mutante ist um den Faktor fünf auf $0,35 \text{ s}^{-1}$ erhöht. Das ist bemerkenswert, da in diesem Fall keine Beschleunigung des geschwindigkeitsbestimmenden ADP-Dissoziationsschrittes durch Aktin erfolgt. Daher könnte entweder eine schwächere ADP-Bindung oder eine schnellere Phosphatfreisetzung, die in Abwesenheit von Aktin geschwindigkeitsbestimmend sein könnte, die Ursache sein. Der K_{app} -Wert für Aktin wird durch die Schleife-1-Mutation nur geringfügig beeinflusst. Allerdings steigt die maximale ATPase-Geschwindigkeit von $11,6 \text{ s}^{-1}$ auf $17,1 \text{ s}^{-1}$, was auf eine effektivere Kopplung zwischen Aktinbindung und Produktfreisetzung hinweisen könnte. Die um den Faktor 2 höhere Bindungskonstante 2. Ordnung für Aktin in Anwesenheit von ATP ($k_{\text{cat}}/K_{\text{app}}$) ist ein weiterer Hinweis dafür. Die bisher bestimmten transientenkinetischen Parameter des ATPase-Zyklus der Schleife-1-Mutante von Myosin-Vb zeigen noch keinen eindeutigen Einfluß auf einen bestimmten Schritt innerhalb des Zyklus. Allerdings sind die bereits gemessenen Bindungs- und Dissoziationsgeschwindigkeiten für ATP und ADP leicht erhöht. Alle bisher ermittelten kinetischen Parameter weisen darauf hin, daß es sich bei der phosphorylierten Form um einen aktivierten Zustand von Myosin-Vb handelt. Es ist aber noch nicht klar, ob die Phosphorylierung auch einen Einfluß auf die Prozessivität oder die Möglichkeit der Regulation durch freie Magnesiumionen hat. Die umfassende transientenkinetische Charakterisierung des ATPase-Zyklus der Schleife-1-Mutante wird zeigen, ob die Phosphorylierung - wie die Variation der freien Magnesiumionen-Konzentration - ein weiterer Mechanismus zur Modulation der Prozessivität ist.

4.3. Gewinnung von Proteinkristallen der Motordomäne von Myosin-Vb

Die Kristallisation verschiedener Myosin-Vb-Konstrukte, die alle die vollständige Motordomäne beinhalteten, führte je nach Kristallisationsbedingungen zum Wachstum nadelförmiger, hexagonaler oder rhomboider Kristalle. Während dieser Arbeit konnten die Kristallisationsbedingungen des MVb-2R-His-Konstruktes so weit optimiert werden, daß bereits nach drei Tagen Kristalle gewachsen waren. Röntgenstrukturanalysen wurden an der Beamline X-11 am Synchrotron DESY/EMBL (Hamburg) sowie an der Beamline ID14-2 am ESRF (Grenoble, Frankreich) durchgeführt. Aufgrund der Kristallform war das Beugungsbild räumlich anisotrop, so daß nur unvollständige Beugungsdaten bis 15° aufgenommen werden konnten. Anhand der vorläufigen Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse können jedoch die Auflösung mit 3.3 \AA und die Geometrie der Raumgruppe angegeben werden. Obwohl bisher keiner der vermessenen Kristalle von Myosin-Vb eine ausreichende Qualität der Röntgenstrahlenbeugung lieferte, um mit den Beugungsdaten die atomare Struktur der Motordomäne von Myosin-Vb zu lösen, ermöglicht die erfolgte Optimierung der Kristallisationsbedingungen eine schnelles *screening* zukünftiger (Mutations-)Konstrukte von

Myosin-Vb mit dem Einsatz geringer Proteinmengen. Durch die Kristallisation der Schleife-1-Mutante von Myosin-Vb wurde versucht, etwaige Mikroinhomogenitäten im Kristallgitter durch das Vorhandensein einer Mischpopulation aus phosphoryliertem und unphosphoryliertem Myosin auszuschließen. Auch die Methylierung der Myosinkonstrukte, die vollständige Dephosphorylierung und die Derivatisierung von oberflächenexponierten Cysteinresten sind weitere vielversprechende Optimierungen, an denen zur Zeit gearbeitet wird.

4.4. Phosphorylierung von *D. discoideum* Myosin-IC durch MIHCK ist essentiell für die Motoraktivität dieses Myosins

Myosin-IC ist eines von sieben Klasse I Myosinen in *D. discoideum*. Bisher sind bereits Myosin-IB, -ID und -IE kinetisch und funktional charakterisiert [Tsiavaliaris *et al.*, eingereicht; Fujita-Becker *et al.*, 2005; Dürrwang *et al.*, 2006]. Diese Klasse I Myosine sind im aktinreichen Zellcortex in migrierenden Zellen, an Zell-Zell-Kontaktstellen und in Filopodien lokalisiert [Morita *et al.*, 1996; Peterson *et al.*, 1995; Fujita-Becker *et al.*, 2005]. Alle bisher charakterisierten Klasse I Myosine zeigen somit eine ähnliche Lokalisierung und eventuell redundante Funktionen innerhalb der Zelle. Sie unterscheiden sich nur geringfügig in ihren kinetischen und funktionalen Eigenschaften. Die Unterschiede könnten ausschlaggebend für die Erfüllung spezifischer Aufgaben sein. So sind Myosin-IB und Myosin-ID nach Phosphorylierung im Bereich der TEDS-Stelle schnelle Motoren, die allerdings auch in der dephosphorylierten Form eine verlangsamte Bewegung entlang von Aktinfilamenten ausführen. Myosin-IE ist ein langsamer Motor, der aber dephosphoryliert ebenfalls Motilität zeigt. Im Gegensatz dazu zeigt *D. discoideum* Myosin-IC in der dephosphorylierten Form einen vollständigen Verlust der Fähigkeit zur gerichteten Bewegung. Nach der Phosphorylierung von Myosin-IC-Motordomänenkonstrukten durch die Myosin Klasse I Schwerekettenkinase aus *A. castellani* konnte eine langsame Bewegung von Aktinfilamenten mit einer Geschwindigkeit von $0,27 \pm 0,15 \mu\text{m/s}$ im *in vitro* Motilitätsassay beobachtet werden. Es läßt sich vermuten, daß diese Regulationsform denen anderer Klasse I Myosine ähnelt, allerdings der Effekt des Ein/Aus-Schaltens stärker ausgeprägt ist. Das ist ein weiterer Hinweis darauf, daß die feinen Unterschiede in Kinetik, Funktionalität und Regulation der Klasse I Myosine aus *D. discoideum* trotz überlappender Lokalisierung unterschiedliche zelluläre Funktionen ermöglichen. Die bisher von Myosin-IC gewonnenen Daten aus den Messungen der ATPase-Aktivität, die sehr gering ist und auch durch Aktin nur wenig aktiviert wird, sowie die langsame Bewegungsgeschwindigkeit könnten darauf hinweisen, daß dieses langsame Myosin an Prozessen der Strukturhaltung des Zytoskelettes beteiligt ist oder eine Ankerfunktion erfüllt.

4.5. Betrachtungen zur Struktur-Funktionsbeziehung von Myosin-IC

Eine Hypothese für die Arbeiten mit Myosin-IC war eine vermutete besondere Funktion der Nackendomäne, da sie sich strukturell von denen anderer Klasse I Myosine absetzt. Durch Sequenzvergleiche wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß Myosin-IC im Bereich der Nackendomäne eine putative Bindungsstelle für bis zu drei leichte Ketten besitzt, die eine hohe Homologie zur Nackendomäne von Myosin-VI aufweist. Es könnte sich um ein Element zur Umfaltung des Nackens handeln, das eventuell durch gebundene leichte Ketten stabilisiert

werden muß. Expressions- und Aufreinigungsvorläufe mit verschiedenen Myosin-IC Konstrukten, die verschieden lange Nackendomänen besitzen, haben eine Abhängigkeit der Expressionsrate und der Stabilität der Konstrukte von der Länge der Nackendomäne aufgezeigt. Motordomänenkonstrukte konnten in ausreichender Konzentration exprimiert und aufgereinigt werden, während Konstrukte, bei denen die putative Bindungsstelle für leichte Ketten und das erste IQ-Motiv mitexprimiert werden, eine weitaus geringere Konzentration innerhalb der Zellen aufweisen. Ein möglicher Grund dafür könnte das Fehlen der stabilisierenden leichten Ketten sein. Diese sind bisher unbekannt und werden nicht hoch exprimiert. Es ist wahrscheinlich, daß Moleküle, die nicht mit den endogenen leichten Ketten und/oder Calmodulin abgesättigt werden können, im Zytoplasma als nicht funktionale Myosine erkannt werden und deshalb durch Proteolyse abgebaut werden. Des Weiteren ist die Nackendomäne mit gebundenen leichten Ketten für viele Myosine wichtig für die Aktivität. Die assoziierten leichten Ketten stabilisieren den Nackenbereich und haben eine regulatorische Funktion für die ATPase-Aktivität der Myosine. Für die weiteren Arbeiten zur Untersuchung der Funktion der Nackendomäne von Myosin-IC ist es daher notwendig, die leichten Ketten zu identifizieren. Erste Experimente zur Auffindung der leichten Ketten mit Hilfe von Immunopräzipitation und *pull-down* Assays wurden bereits durchgeführt. Bisher liegen hierzu noch keine Ergebnisse vor, weitere vergleichende Durchläufe mit Konstrukten mit und ohne die erweiterte Nackendomäne sowie verschiedenen Affinitätstags (His- und FLAG-tag) werden die Identifikation der leichten Ketten und die Bestimmung ihrer Funktion zur Stabilisierung der Nackendomäne ermöglichen.

Durch die bisherigen Arbeiten an Myosin-IC konnten Konstrukte mit katalytischer Aktivität und der Fähigkeit zur Bewegung von Aktinfilamenten exprimiert und aufgereinigt werden. Es konnte die Regulation der Motoraktivität von Myosin-IC durch die Phosphorylierung der Motordomäne sowie die leichte Ketten-abhängige Stabilisierung der Nackendomäne gezeigt werden. Beide Mechanismen können in Form eines Ein/Aus-Schalters eine effektive Regulation von Myosin-IC ermöglichen. Es wurde somit die Basis für die Identifikation der leichten Ketten, die Aufklärung der Funktion der Nackendomäne sowie die Untersuchung des Effektes der Phosphorylierung von Myosin-IC geschaffen.

5. Literaturverzeichnis

- Altman, D., Sweeney, H. L. und Spudich, J. A. (2004). The mechanism of myosin VI translocation and its load-induced anchoring. *Cell* **116**, 737-749
- Altman, D., Goswami, D., Hasson, T., Spudich, J. A. und Mayor, S. (2007). Precise positioning of myosin VI on endocytic vesicles in vivo. *PLoS Biol.* **5**(8), e210
- Anson, M., Geeves, M. A., Kurzawa, S. E. und Manstein, D. J. (1996). Myosin motors with artificial lever arms. *EMBO J.* **15**, 6069-6074
- Bagshaw, C. R., Trentham, D. R. (1974). The characterization of myosin-product complexes and of product-release steps during the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase reaction. *Biochem J* **141**, 331-349
- Bagshaw, C. R., Eccleston, J. F., Eckstein, F., Goody, R. S., Gutfreund, H., Trentham, D. R. (1974). The magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase of myosin. Two-step processes of adenosine triphosphate association and adenosine diphosphate dissociation. *Biochem J.* **141**(2), 351-364
- Bähler, M. (2000). Are class III and class IX myosins motorized signalling molecules? *Biochim. Biophys. Acta* **1496**, 52-59
- Bähler, M., Rhoads, A. (2002). Calmodulin signaling via the IQ motif. *FEBS Lett.* **20**(513), 107-113
- Bahloul, A., Chevreux, G., Wells, A. L., Martin, D., Nolt, J., Yang, Z., Chen, L.-Q., Potier, N., Van Dorselaer, A., Rosenfeld, S. S., Houdusse, A. und Sweeney, H. L. (2004). The unique insert in myosin VI is a structural calcium-calmodulin binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**(14), 4787-4792
- Baker, J. E., Kremntsova, E. B., Kennedy, G. G., Armstrong, A., Trybus, K. M., Warshaw, D. M. (2004). Myosin V processivity: multiple kinetic pathways for head-to-head coordination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**(15), 5542-5546
- Barylko, B., Bins, D. D. und Albanesi, J. P. (2000). Regulation of the enzymatic and motor activities of myosin I. *Biochim. Biophys. Acta* **1496**, 23-35
- Batra, R., Geeves, M. A. und Manstein, D. J. (1999). Kinetic Analysis of Dictyostelium discoideum Myosin Motor Domains with Glycine-to-Alanine Mutations in the Reactive Thiol Region. *Biochemistry* **38**, 6126-6134
- Batra, R. und Manstein, D. J. (1999). Functional characterisation of Dictyostelium myosin II with conserved tryptophanyl residue 501 mutated to tyrosine. *Biol. Chem.* **380**, 1017-1023
- Bauer, C. B., Kuhlman, P. A., Bagshaw, C. R. und Rayment, I. (1997). X-ray crystal structure and solution fluorescence characterization of Mg²⁺(3')-O-(N-methyl-anthraniloyl) nucleotides bound to the Dictyostelium discoideum myosin motor domain. *J. Mol. Biol.* **274**, 394-407
- Bement, W. M., Hasson, T., Wirth, J. A., Cheney, R. E. und Mooseker, M. S. (1994). Identification and overlapping expression of multiple unconventional myosin genes in vertebrate cell types. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 6549-6553
- Bement, W. M. und Mooseker, M. S. (1995). TEDS rule: a molecular rationale for differential regulation of myosins by phosphorylation of the heavy chain head. *Cell Motil Cytoskeleton* **31**(2), 87-92
- Berlman, I.B. (1973). Energy transfer parameters of aromatic compounds, *Academic Press*, New York
- Betapudi, V., Licate, L. S., Egelhoff, T. T. (2006). Distinct roles of nonmuscle myosin II isoforms in the regulation of MDA-MB-231 breast cancer cell spreading and migration. *Cancer Res.* **66**(9), 4725-4733
- Bonne, G., Carrier, L., Richard, P., Hainque, B., Schwartz, K. (1998). Familial hypertrophic cardiomyopathy from mutations to functional defects. *Circ Res.* **83**, 580-593

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**, 248-254
- Brenner, B. (2006). The stroke size of myosins: a reevaluation. *J Muscle Res Cell Motil.* **27**(2), 173-187
- Bretscher, A. (2003). Polarized growth and organelle segregation in yeast: the tracks, motors, and receptors. *J Cell Biol.* **160**(6), 811-816
- Bryant, Z., Altman, D., Spudich, J. A. (2007). The power stroke of myosin VI and the basis of reverse directionality. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**(3), 772-777
- Brzeska, H., Lynch, T. J., Martin, B., Corigliano-Murphy, A., und Korn, E. D. (1990). Substrate specificity of Acanthamoeba myosin I heavy chain kinase as determined with synthetic peptides. *J. Biol. Chem.* **265**, 16138-16144
- Brzeska, H., Korn, E. D. (1996). Regulation of class I and class II myosins by heavy chain phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **271**(29), 16983-16986
- Brzeska, H., Young, R., Knaus, U., Korn, E. D. (1999). Myosin I heavy chain kinase: cloning of the full-length gene and acidic lipid-dependent activation by Rac and Cdc42. *Proc Natl Acad Sci* **96**(2), 394-399
- Buss, F., Kendrick-Jones, J., Lionne, C., Knight, A. E., Cote, G. P. und Luzio, P. J. (1998). The localization of myosin VI at the golgi complex and leading edge of fibroblasts and its phosphorylation and recruitment into membrane ruffles of A431 cells after growth factor stimulation. *J. Cell Biol.* **143**, 1535-1545
- Buss, F., Arden, S. D., Lindsay, M., Luzio, J. P. und Kendrick-Jones, J. (2001) Myosin VI isoform localized to clathrin-coated vesicles with a role in clathrin-mediated endocytosis. *EMBO J.* **20**, 3676-3684
- Chance, B., Eisenhardt, R. M., Gibson, Q. H., Lonberg-Holm, K. K. (1964). Rapid mixing and sampling techniques in biochemistry. New York: *Academic Press.* p 89-102.
- Charette, S. J. and Cosson, P. (2004). Preparation of genomic DNA from Dictyostelium discoideum for PCR analysis. *Biotechniques* **36**(4):574-575
- Cheney, R. E., Mooseker, M. S. (1992). Unconventional myosins. *Curr Opin Cell Biol* **4**, 27-35
- Cheney, R. E., Mooseker, M. S. (1993). Brain myosin-V is a 2-headed unconventional myosin with motor-activity. *Cell* **75**, 13-23
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T. J., Higgins, D. G., Thompson, J. D. (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* **31**, 3497-3500
- Clark, R., Ansari, M. A., Dash, S., Geeves, M. A. und Coluccio, L. M. (2005). Loop 1 of Transducer Region in Mammalian Class I Myosin, Myo1b, Modulates Actin Affinity, ATPase Activity, and Nucleotide Access. *J Biol Chem* **280**(35), 30935-30942
- Coluccio, L. M. (1997). Myosin I. *Am. J. Physiol.* **273**, C347-C359
- Coluccio, L. M. und Geeves, M. A. (1999). Transient Kinetic Analysis of the 130-kDa Myosin I (MYR-1 Gene Product) from Rat Liver. *J Biol Chem* **274**(31), 21575-21580
- Conibear, P. B., Bagshaw, C. R., Fajer, P. G., Kovacs, M., Malnasi-Csizmadia, A. (2003). Myosin cleft movement and its coupling to actomyosin dissociation. *Nat Struct Biol* **10**, 831-835
- Cornish, P. V., Ha, T. (2007). A survey of single-molecule techniques in chemical biology. *ACS Chem Biol.* **2**(1), 53-61
- Coureux, P. D., Wells, A. L., Menetrey, J., Yengo, C. M., Morris, C. A., Sweeney, H. L., Houdusse, A. (2003). A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide. *Nature* **425**, 419-423
- Coureux, P. D., Sweeney, H. L. und Houdusse, A. (2004). Three myosin V structures delineate essential features of chemo-mechanical transduction. *EMBO J.* **23**, 4527-4537

- Cremona, C. R., Neuron, J. M. und Yount, R. G. (1990). Interaction of myosin subfragment 1 with fluorescent ribose-modified nucleotides. A comparison of vanadate trapping and SH1-SH2 cross-linking. *Biochemistry* **29**, 3309-3319
- Cremona, C. R. und Geeves, M. A. (1998). Interaction of actin and ADP with the head domain of smooth muscle myosin: implications for strain-dependent ADP release in smooth muscle. *Biochemistry* **37**, 1969-1978
- Criddle, A. H., Geeves, M. A. und Jeffries, T. (1985). The use of actin labelled with N-(1-pyrenyl)iodoacetamide to study the interaction of actin with myosin subfragments and troponin/tropomyosin. *Biochem. J.* **232**, 343-349
- Dantzig, J. A., Liu, T. Y. und Goldman, Y. E. (2006). Functional Studies of Individual Myosin Molecules. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1080**, 1-18
- De La Cruz, E. M., Wells, A. L., Rosenfeld, S. S., Ostap, E. M., Sweeney, H. L. (1999). The kinetic mechanism of myosin V. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13726-13731
- De La Cruz, E., Ostap, E. M. und Sweeney, H. L. (2001). Kinetic Mechanism and Regulation of Myosin VI. *J. Biol. Chem.* **276** (34), 32373-32381
- De La Cruz, E. M., Ostap, E. M. (2004). Relating biochemistry and function in the myosin superfamily. *Curr Opin Cell Biol.* **16**(1), 61-67
- De Lozanne, A., Spudich, J. A. (1987). Disruption of the Dictyostelium myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* **236**(4805), 1086-1091
- Doberstein, S. K., Baines, I. C., Wiegand, G., Korn, E. D., Pollard, T. D. (1993). Inhibition of contractile vacuole function in vivo by antibodies against myosin-I. *Nature* **365**(6449), 841-843
- Dominguez, R., Freyzon, Y., Trybus, K.M. und 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**, 559-571
- Drewes, G., Ebner, A., Preuss, U., Mandelkow, E.-M. und Mandelkow, E. (1997). MARK, a Novel Family of Protein Kinases That Phosphorylate Microtubule-Associated Proteins and Trigger Microtubule Disruption. *Cell* **89**, 297-308
- Dürrewang, U., Fujita-Becker, S., Erent, M., Kull, F. J., Tsiavaliaris, G., Geeves, M. A. und Manstein, D. J. (2006). Dictyostelium myosin-IE is a fast molecular motor involved in phagocytosis. *J. Cell Sci.* **119**, 550-558
- Eccleston, J. F., Gratton, E., Jameson, D. M. (1987). Interaction of a fluorescent analogue of GDP with elongation factor Tu: steady-state and time-resolved fluorescence studies. *Biochemistry.* **26**(13), 3902-7
- Eichinger, L., Pachebat, J. A., Glöckner, G., Rajandream, M.-A., Sugang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q., et al. (2005). The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **435**, 43-57
- El Mezgueldi, M., Tang, N., Rosenfeld, S. S., Ostap, E. M. (2002). The kinetic mechanism of Myo1c (human myosin-1C). *J Biol Chem.* **277**(24), 21514-21521
- Fersht, A. (1985). Enzyme structure and mechanism. W. H. Freeman and Company, New York.
- Firtel, R. A. (1995). Integration of signaling information in controlling cell-fate decisions in Dictyostelium. *Genes Devel.* **9**, 1427-1444
- Fisher, A. J., Smith, C. A., Thoden, J. B., Smith, R., Sutoh, K., Holden, H. M., Rayment, I. (1995). X-ray structures of the myosin motor domain of Dictyostelium discoideum complexed with MgADP.BeF_x and MgADP.AIF₄. *Biochemistry* **34**, 8960-8972
- Förster, T. (1951). Fluoreszenz Organischer Verbindungen, *Vanderhoeck und Ruprecht*, Goettingen

- Foth, B. J., Goedecke, M. C., Soldati, D. (2006). New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103** (10):3681-3686
- Fujita-Becker, S., Dürrwang, U., Erent, M., Clark, R. J., Geeves, M. A. und Manstein, D. J. (2005). Changes in Mg^{2+} Ion Concentration and Heavy Chain Phosphorylation Regulate the Motor Activity of a Class I Myosin. *J. Biol. Chem.* **280**, 6064-6071
- Furch, M., Geeves, M. A., Manstein, D. J. (1998). Modulation of actin affinity and actomyosin adenosine triphosphatase by charge changes in the myosin motor domain. *Biochemistry* **37**(18), 6317-26
- Furch, M., Fujita-Becker, S., Geeves, M. A., Holmes, K. C., Manstein, D. J. (1999). Role of the salt-bridge between switch-1 and switch-2 of Dictyostelium myosin. *J Mol Biol* **290**, 797-809
- Furch, M., Rimmel, B., Geeves, M. A., Manstein, D. J. (2000). Stabilization of the actomyosin complex by negative charges on myosin. *Biochemistry* **39**(38), 11602-11608
- Geeves, M. A., Fedorov, R. und Manstein, D. J. (2005). Molecular mechanism of actomyosin-based motility. *Cell Mol Life Sci* **62**, 1462-1477
- Geeves, M. A., Perreault-Micale, C. und Coluccio, L. M. (2000). Kinetic Analyses of a Truncated Mammalian Myosin I Suggest a Novel Isomerization Event Preceding Nucleotide Binding. *J Biol Chem* **275**(28), 21624-21630
- Geeves, M. A. und Holmes, K. C. (1999). Structural mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 687-728
- Geeves, M. A. und Conibear, P. B. (1995). The role of three-state docking of myosin S1 with actin in force generation. *Biophys. J.* **68**, 194-201
- Geeves, M. A., Goody, R. S. und Gutfreund, H. (1984). Kinetics of acto-S1 interaction as a guide to a model for the cross-bridge cycle. *J. Muscle Res. Cell M.* **5**, 351-561
- Gerisch, G., und Wick, U. (1975). Intracellular oscillations and release of cyclic AMP from Dictyostelium cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **65**, 364-370
- Gerisch, G., Heuser, J. und Clarke, M. (2002). Tubular-vesikular transformation in the contractile vacuole system of Dictyostelium. *Cell Biology International* **26**(10), 845-852
- Grosshans, B. L., Grotzsch, H., Mukhopadhyay, D., Fernandez, I. M., Pfannstiel, J., Idrissi, F. Z., Lechner, J., Riezman, H., Geli, M. I. (2006). TEDS site phosphorylation of the yeast myosins I is required for ligand-induced but not for constitutive endocytosis of the G protein-coupled receptor Ste2p. *J Biol Chem.* **281**(16), 11104-11114
- Gulick, A. M., Bauer, C. B., Thoden, J. B., Rayment, I. (1997). X-ray structures of the MgADP, MgATP γ S, and MgAMPPNP complexes of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain. *Biochemistry* **36**, 11619-11628
- Hammer III, J. A., Jung, G. (1996). The sequence of the dictyostelium myo J heavy chain gene predicts a novel, dimeric, unconventional myosin with a heavy chain molecular mass of 258 kDa. *J Biol Chem* **271**, 7120-7127
- Hammer III., J. A., Wu, X. S. (2002). Rabs grab motors: defining the connections between Rab GTPases and motor proteins. *Curr Opin Cell Biol.* **14**(1), 69-75
- Hachikubo, Y., Ito, K., Schiefelbein, J., Manstein, D. J. und Yamamoto, K. (2007). Enzymatic activity and motility of recombinant Arabidopsis myosin XI, MYA1. *Plant Cell Phys.* **48**(6), 886-891
- Hannemann, D. E., Cao, W., Olivares, A. O., Robblee, J. P. und De La Cruz, E. M. (2005). Magnesium, ADP, and Actin Binding Linkage of Myosin V: Evidence for Multiple Myosin V-ADP and Actomyosin V-ADP States. *Biochemistry* **44**, 8826-8840
- Henn, A. und De La Cruz, E. M. (2005). Vertebrate Myosin VIIb Is a High Duty Ratio Motor Adapted for Generating and Maintaining Tension. *J. Biol. Chem.* **280**(47), 39665-39676

- Hiratsuka, T. und Uchida, K. (1973). Preparation and properties of 2'(or 3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate, an analog of adenosine triphosphate. *Biochim. Biophys. Acta.* **320**, 635-647
- Hiratsuka, T. (1983). New ribose-modified fluorescent analogs of adenine and guanine nucleotides available as substrates for various enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* **742**, 496-508
- Hodge, T. und Cope, M. J. (2000). A myosin family tree. *J. Cell Sci.* **113**, 3353-3354
- Hodges, A. R., Kremntsova, E. B. und Trybus, K. M. (2007). Engineering the Processive Run Length of Myosin V. *JBC Papers in Press*. Published on July 18, 2007 as Manuscript M703968200
- Holmes, K.C., Angert, I., Kull, F. J., Jahn, W., Schröder, R. R. (2003). Electron cryo-microscopy shows how strong binding of myosin to actin releases nucleotide. *Nature* **425**(6956), 423-427
- Holmes, K. C., Schröder, R. R., Sweeney, H. L. und Houdusse, A. (2004). The structure of the rigor complex and its implications for the power stroke. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**, 1819-1828
- Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W., Kabsch, W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**, 44-49
- Homma, K. und Ikebe, M. (2005). Myosin X Is a High Duty Ratio Motor. *J. Biol. Chem.* **280**(32), 29381-29391
- Houdusse, A. und Sweeney, H. L. (2001). Myosin motors: missing structures and hidden springs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 182-194
- Houdusse, A., Kalabokis, V. N., Himmel, D., Szent-Gyorgyi, A. G. und Cohen, C. (1999). Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: a novel conformation of the myosin head. *Cell* **97**, 459-470
- Houdusse, A., Szent-Györgyi, A. G., Cohen, C. (2000). Three conformational states of scallop myosin S1. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:11238-11243
- Inoue, A., Saito, J., Ikebe, R. und Ikebe, M. (2002). Myosin IXb is a single-headed minusend-directed processive motor. *Nat Cell Biol* **4**, 302-306
- Ito, K., Kashiyama, T., Shimada, K., Yamaguchi, A., Awata, J., Hachikubo, Y., Manstein, D. J. und Yamamoto, K. (2003). Recombinant motor domain constructs of Chara corallina myosin display fast motility and high ATPase activity. *Biochem Biophys Res Comm* **312**, 958-964
- Ito, K., Ikebe, M., Kashiyama, T., Mogami, T., Kon, T., Yamamoto, K. (2007). Kinetic mechanism of the fastest motor protein, chara Myosin. *J Biol Chem.* **282**(27), 19534-19545
- Joel, P. B., Sweeney, H. L., Trybus, K. M. (2003). Addition of lysines to the 50/20 kDa junction of myosin strengthens weak binding to actin without affecting the maximum ATPase activity. *Biochemistry* **42**(30), 9160-9166
- Jontes, J. D., Milligan, R. A., Pollard, T. D., Ostap, E. M. (1997). Kinetic characterization of brush border myosin-I ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 14332-14337
- Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F. und Holmes K. C. (1990). Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* **347**, 37-44.
- Kessin, R. H. (2001). Dictyostelium. Evolution, Cell Biology and the Development of Multicellularity. Cambridge University Press, 1. Auflage
- Klenchin, V. A., Khaitlina, S. Y. und Rayment, I. (2006). Crystal Structure of Polymerization-Competent Actin. *J Mol Biol* **362**(1), 140-150
- Kliche, W., Fujita-Becker, S., Kollmar, M., Manstein, D.J., und Kull, F.J. (2001). Structure of a genetically engineered molecular motor. *EMBO J.*, **20**, 40-46.

- Knetsch, M. L., Tsiavalariis, G., Zimmermann, S., Rühl, U. und Manstein, D. J. (2002). Expression vectors for studying cytoskeletal proteins in *Dictyostelium discoideum*. *J Muscle Res Cell Motil.* **23**: 605-611
- Kollmar, M., Dürrwang, U., Kliche, W., Manstein, D. J., Kull, F. J. (2002). Crystal structure of the motor domain of a class-I myosin. *EMBO J.* **21**, 2517-2525
- Kollmar, M. (2006). Thirteen is enough: the myosins of *Dictyostelium discoideum* and their light chains. *BMC Genomics* **7**(183)
- Korn, E. D. (2000). Coevolution of head, neck, and tail domains of myosin heavy chains. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**(23), 12559-12564
- Kouyama, T. und Mihashi, K. (1996). Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. *Eur. J. Biochem.* **114**, 33-38
- Kovács, M., Wang, F., Hu, A., Zhang, Y., Sellers, J. R. (2003). Functional divergence of human cytoplasmic myosin II: kinetic characterization of the non-muscle IIA isoform. *J Biol Chem.* **278**(40), 38132-38140
- Kovács, M., Wang, F. und Sellers, J. R. (2005). Mechanism of Action of Myosin X, a Membrane-associated Molecular Motor. *J. Biol. Chem.* **280**(15), 15071-15083
- Krementsov, D. N., Krementsova, E. B. und Trybus, K. M. (2004). Myosin V: regulation by calcium, calmodulin, and the tail domain. *J Cell Biol* **164**, 877-886
- Krementsova, E. B., Hodges, A. R., Lu, H. und Trybus, K. M. (2006). Processivity of Chimeric Class V Myosins. *J. Biol. Chem.* **281**(9), 6079-6086
- Kreppel, L., Fey, P., Gaudet, P., Just, E., Kibbe, W. A., Chisholm, R. L., Kimmel, A. R. (2004). dictyBase: a new *Dictyostelium discoideum* genome database. *Nucleic Acids Res.* **32**, 332-333
- Kurzawa, S. E., Manstein, D. J. und Geeves, M. A. (1997). *Dictyostelium discoideum* myosin II: characterization of functional myosin motor fragments. *Biochemistry*, **36**, 317-323
- Kurzawa-Goertz, S. E., Perreault-Micale, C. L., Trybus, K. M., Szent-Györgyi, A. G. und Geeves, M. A. (1998). Loop I Can Modulate ADP Affinity, ATPase Activity, and Motility of Different Scallop Myosins. Transient Kinetic Analysis of S1 Isoforms. *Biochemistry* **37**, 7517-7525
- Langford, G. M. (2002). Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. *Traffic.* **3**(12), 859-865
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259), 680-685
- Lister, I., Schmitz, S., Walker, M., Trinick, J., Buss, F., Veigel, C. und Kendrick-Jones, J. (2004). A monomeric myosin VI with a large working stroke. *EMBO J.* **23**, 1729-1738
- Liu, J., Taylor, D. W., Krementsova, E. B., Trybus, K. M. und Taylor, K. A. (2006). Three-dimensional structure of the myosin V inhibited state by cryoelectron tomography. *Nature* **442**, 208-211
- Loomis, W. (1971). Sensitivity of *Dictyostelium discoideum* to nucleic acid analogues. *Exp. Cell Res.* **64**, 484-486
- Loomis, W. (1975). *Dictyostelium discoideum*. A developmental system. *Academic Press*, NY
- Lorenz, M., Popp, D. und Holmes, K. C. (1993). Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm. *J. Mol. Biol.* **234**, 826-36
- Lowey, S. und Cohen, C. (1962). Studies on the structure of myosin. *J. Mol. Biol.* **42**, 1-29
- Lowey, S., Slayter, H. S., Weeds, A. G. und Baker, H. (1969). Substructure of the myosin molecule. I. subfragments of myosin by enzymatic degradation. *J. Mol. Biol.* **42**, 1-29

- Ma, S., Fey, P., Chisholm, R. L. (2001). Molecular motors and membrane traffic in Dictyostelium. *Biochim Biophys Acta* **1525**, 234-244
- Malnasi-Csizmadia, A., Woolley, R. J., Bagshaw, C. R. (2000). Resolution of conformational states of Dictyostelium myosin II motor domain using tryptophan (W501) mutants: implications for the open-closed transition identified by crystallography. *Biochemistry* **39**, 16135-16146
- Malnasi-Csizmadia, A., Pearson, D. S., Kovacs, M., Woolley, R. J., Geeves, M. A. und Bagshaw, C. R. (2001). Kinetic resolution of a conformational transition and the ATP hydrolysis step using relaxation methods with a Dictyostelium Myosin II mutant containing a single tryptophan residue. *Biochemistry* **40**:12727-37
- Maniak, M. (2002). Conserved features of endocytosis in Dictyostelium. *Int Rev Cytol.* **221**, 257-287
- Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z. und Lim, L. (1994). A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* **367**, 40-46
- Manstein, D. J., Hunt, D. M. (1995). Overexpression of myosin motor domains in Dictyostelium: screening of transformants and purification of the affinity tagged protein. *J Muscle Res Cell Motil* **16**, 325-332
- Marston, S. B. und Taylor, E. W. (1980). Comparison of the myosin and actomyosin ATPase mechanisms of the four types of vertebrate muscles. *J. Mol. Biol.* **139**, 573-600.
- Martin, J. B., Foray, M. F., Klein, G. und Satre, M. (1987). Identification of inositol hexaphosphate in ³¹P-NMR spectra of Dictyostelium discoideum amoebae. Relevance to intracellular pH determination. *Biochim. Biophys. Acta.* **931**, 16-25
- Maruta, H., und Korn, E. D. (1977). Acanthamoeba cofactor protein is a heavy chain kinase required for actin activation of the Mg²⁺-ATPase activity of Acanthamoeba myosin I. *J. Biol. Chem.* **252**, 8329-8332.
- Mehta, A. D., Rock, R. S., Rief, M., Spudich, J. A., Mooseker, M. S., Cheney, R. E. (1999). Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature* **400**(6744), 590-593
- Melchionda, S., Ahituv, N., Bisceglia, L., Sobe, T., Glaser, F., Rabionet, R., Arbones, M. L., Notarangelo, A., Di Iorio, E., Carella, M., Zelante, L., Estivill, X., Avraham, K. B., Gasparini, P. (2001). MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's Waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.* **69**, 635-640
- Menasche, G., Fischer, A., de Saint Basile, G. (2002). Griscelli syndrome types 1 and 2. *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 1237-1238
- Menetrey, J., Bahloul, A., Wells, A. L., Yengo, C. M., Morris, C. A., Sweeney, H. L., Houdusse, A. (2005). The structure of the myosin VI motor reveals the mechanism of directionality reversal. *Nature* **435**, 779-785
- Mermall, V., Post, P. L., Mooseker, M. S. (1998). Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* **279**, 527-533
- Mermall, V., Bonafè, N., Jones, L., Sellers, J. R., Cooley, L., Mooseker, M. S. (2005). Drosophila myosin V is required for larval development and spermatid individualization. *Dev Biol.* **286**(1), 238-255
- Michaelis, L. und Menten, M. L. (1913). *Biochem. Z.* **49**, 333-369
- Michailova, A. und McCulloch, A. (2001). Model study of ATP and ADP buffering, transport of Ca²⁺ and Mg²⁺, and regulation of ion pumps in ventricular myocyte. *Biophys. J.* **81**, 614-629
- Millar, N. C. und Geeves, M. A. (1983). The limiting rate of the ATP-mediated dissociation of actin from rabbit skeletal muscle myosin subfragment 1. *FEBS Lett.* **160**, 141-148
- Milligan, R. A., Flicker, P. F. (1987). Structural relationships of actin, myosin, and tropomyosin revealed by cryo-electron microscopy. *J Cell Biol.*, **105**(1), 29-39
- Milligan, R. A. (1996). Protein-protein interactions in the rigor actomyosin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**(1), 21-26

- Molloy, J. E., Burns, J. E., Kendrick-Jones, J., Tregear, R. T. und White, D. C. (1995). Movement and force produced by a single myosin head. *Nature* **378**, 209-212
- Morita, Y.S., Jung, G., Hammer, J.A., III, and Fukui, Y. (1996). Localization of Dictyostelium myoB and myoD to filopodia and cell-cell contact sites using isoform-specific antibodies. *Eur. J. Cell Biol.* **71**, 371-379
- Murphy, C. T., Spudich, J. A. (1998). Dictyostelium myosin 25-50K loop substitutions specifically affect ADP release rates. *Biochemistry.* **37**(19), 6738-6744
- Murphy, C. T., Spudich, J. A. (2000). Variable surface loops and myosin activity: accessories to a motor. *J Muscle Res Cell Motil.* **21**(2), 139-151
- Nalavadi, V., Nyitrai, M., Bertolini, C., Adamek, N., Geeves, M. A. und Bähler, M. (2005). Kinetic Mechanism of Myosin IXB and the Contributions of Two Class IX-specific Regions. *J. Biol. Chem.* **280**(47), 38957-38968
- Nguyen, H. A. und Higuchi, H. (2005). Motility of myosin V regulated by the dissociation of single calmodulin. *Nat Struct Biol* **12**(2), 127-132
- Niemann, H. H., Knetsch, M. L., Scherer, A., Manstein, D. J., Kull, F. J. (2001). Crystal structure of a dynamin GTPase domain in both nucleotide-free and GDP-bound forms. *EMBO J.* **20**, 5813-21
- Nishikawa, S., Homma, K., Komori, Y., Iwaki, M., Wazawa, T., Iwane, A. H., Saito, J., Ikebe, R., Katayama, E., Yanagida, T., Ikebe, M. (2002). Class VI myosin moves processively along actin filaments backward with large steps. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 311-317
- Nishikawa, M., Nishikawa, S., Inoue, A., Iwane, A. H., Yanagida, T., Ikebe, M. (2006). A unique mechanism for the processive movement of single-headed myosin-IX. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**, 1159-1164
- Novak, K. D., Peterson, M. D., Reedy, M. C., Titus, M. A. (1995). Dictyostelium myosin I double mutants exhibit conditional defects in pinocytosis. *J Cell Biol.* **131**(5), 1205-1221
- Nyitrai, M. & Geeves, M. A. (2004). Adenosine diphosphate and strain sensitivity in myosin motors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**, 1867-1877
- O'Connell, C. B. und Mooseker, M. S. (2003). Native Myosin-IXb is a plus-, not a minus-end-directed motor. *Nat Cell Biol* **5**, 171-172
- Okada, T., Tanaka, H., Iwane, A. H., Kitamura, K., Ikebe, M., Yanagida, T. (2007). The diffusive search mechanism of processive myosin class-V motor involves directional steps along actin subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**, 379-384
- Okten, Z., Churchman, L. S., Rock, R. S., Spudich, J. A. (2004). Myosin VI walks hand-over-hand along actin. *Nat Struct Mol Biol.* **11**(9), 884-887
- Oliver, T. N., Berg, J. S., Cheney, R. E. (1999). Tails of unconventional myosins. *Cell Mol Life Sci* **56**, 243-257
- Onishi, H., Kojima, S., Katoh, K., Fujiwara, K., Martinez, H. M., Morales, M. F. (1998). Functional transitions in myosin: formation of a critical salt-bridge and transmission of effect to the sensitive tryptophan. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(12), 6653-6658
- Ostap, E. M. und Pollard, T. D. (1996). Biochemical Kinetic Characterization of the Acanthamoeba Myosin-I ATPase. *J. Cell Biol.* **132** (6): 1053-1060
- Ostap, E. M., Lin, T., Rosenfeld, S. S., Tang, N. (2002). Mechanism of regulation of Acanthamoeba myosin-IC by heavy-chain phosphorylation. *Biochemistry* **41**(41), 12450-6
- Otterbein, L. R., Graceffa, P., Dominguez, R. (2001). The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science* **293**(5530), 708-711
- Park, H., Li, A., Chen, L.-Q., Houdusse, A., Selvin, P. R., und Sweeney, H. L. (2007). The unique insert at the end of the myosin VI motor is the sole determinant of directionality. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **104**, 778-783

- Park, H., Ramamurthy, B., Travaglia, M., Safer, D., Chen, L. Q., Franzini-Armstrong, C., Selvin, P. R., Sweeney, H. L. (2006). Full-length myosin VI dimerizes and moves processively along actin filaments upon monomer clustering. *Mol Cell*. **21**(3), 331-336
- Parry, D. A., Dixon, T. W. und Cohen, C. (1992) Analysis of the three-alpha-helix motif in the spectrin superfamily of proteins. *Biophys J.*, **61**(4): 858-867
- Pashkova, N., Jin, Y., Ramaswamy, S., Weisman, L. S. (2006). Structural basis for myosin V discrimination between distinct cargoes. *EMBO J.* **25**(4), 693-700
- Patton, C., Thompson, S. und Epel, D. (2004). Some precautions in using chelators to buffer metals in biological solutions. *Cell Calcium* **35**, 427-431
- Peterson, M. D., Novak, K. D., Reedy, M. C., Ruman, J. I. und Titus, M. A. (1995) Molecular genetic analysis of myoC, a Dictyostelium myosin I. *J. Cell Sci.* **108**, 1093-1103
- Peterson, M. D., Urioste, A. S., Titus, M. A. (1996). Dictyostelium discoideum myoJ: a member of a broadly defined myosin V class or a class XI unconventional myosin? *J Muscle Res Cell Motil* **17**(4), 411-424
- Pollard, T. D. und Korn, E. D. (1973). Myosin I. Isolation from Acanthamoeba castellanii of an enzyme similar to muscle myosin. *Biol. Chem.* **248**, 4862-4690
- Pollard, T. D., Doberstein, S. K. und Zot, H. G. (1991). Myosin-I. *Annu. Rev. Physiol.* **53**, 653-681
- Pollard, T. D. (2007). Regulation of Actin Filament Assembly by Arp2/3 Complex and Formins *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**, 451-477
- Purcell, T. J., Morris, C., Spudich, J. A., Sweeney, H. L. (2002). Role of the lever arm in the processive stepping of myosin V. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14159-14164
- Purcell, T. J., Sweeney, H. L., Spudich, J. A. (2005). A force-dependent state controls the coordination of processive myosin V. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 13873-13878
- Raper, K. B. (1935). Dictyostelium discoideum, a new species of slime mould from decaying forest leaves. *J. Agr. Res.* **50**, 135-147
- Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D. R., Benning, M. M., Winkelmann, D. A., Wesenberg, G., Holden, H. M. (1993). Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* **261**, 50-58
- Reck-Peterson, S. L., Tyska, M. J., Novick, P. J., Mooseker, M. S. (2001). The yeast class V myosins, Myo2p and Myo4p, are nonprocessive actin-based motors. *J Cell Biol.* **153**(5), 1121-1126
- Reubold, T. F., Eschenburg, S., Becker, A., Kull, F. J. und Manstein, D. J. (2003). A structural model for actin-induced nucleotide release in myosin. *Nat Struct Biol* **10**, 826 - 830
- Reubold, T. F., Eschenburg, S., Becker, A., Leonard, M., Schmid, S. L., Vallee, R. B., Kull, F. J. und Manstein, D. J. (2005). Crystal structure of the GTPase domain of rat dynamin I. *Proc. Nat. Acad. Sci.USA.* **102**, 13093-13098
- Rief, M., Rock, R. S., Mehta, A. D., Mooseker, M. S., Cheney, R. E. und Spudich, J. A. (2000). Myosin-V stepping kinetics: a molecular model for processivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9482-9486
- Risal, D., Gourinath, S., Himmel, D. M., Szent-Gyorgyi, A. G., Cohen, C. (2004). Myosin subfragment 1 structures reveal a partially bound nucleotide and a complex salt bridge that helps couple nucleotide and actin binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**(24), 8930-8935
- Ritchie, M. D., Geeves, M. A., Woodward, S. K. und Manstein, D. J. (1993). Kinetic characterization of a cytoplasmic myosin motor domain expressed in Dictyostelium discoideum. *Proc. Nat. Acad. Sci.USA.* **90**, 8619-8623

- Robblee, J. P., Cao, W., Henn, A., Hannemann, D. E. und De La Cruz, E. M. (2005). Thermodynamics of Nucleotide Binding to Actomyosin V and VI: A Positive Heat Capacity Change Accompanies Strong ADP Binding. *Biochemistry* **44**, 10238-10249
- Roberts, R., Lister, I., Schmitz, S., Walker, M., Veigel, C., Trinick, J., Buss, F. & Kendrick-Jones, J. (2004). Myosin VI: cellular functions and motor properties. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**, 1931-1944.
- Rock, R. S., Rice, S. E., Wells, A. L., Purcell, T. J., Spudich, J. A. und Sweeney, H. L. (2001). Myosin VI is a processive motor with a large step size. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 13 655-13 659
- Rock, R. S., Ramamurthy, B., Dunn, A. R., Beccafico, S., Rami, B. R., Morris, C., Spink, B. J., Franzini-Armstrong, C., Spudich, J. A., Sweeney, H. L. (2005). A flexible domain is essential for the large step size and processivity of myosin VI. *Mol Cell*. **17**(4), 603-609
- Rodriguez, O. C. und Cheney, R. E. (2002). Human myosin-Vc is a novel class V myosin expressed in epithelial cells. *J. Cell Sci.* **115**, 991-1004
- Rosenfeld, S. S., Houdusse, A. und Sweeney, H. L. (2005). Magnesium Regulates ADP Dissociation from Myosin V. *J. Biol. Chem.* **280**, 6072-6079
- Rosenfeld, S. S. und Sweeney, H. L. (2004). A model of myosin V processivity. *J Biol Chem* **279**: 40100–40111
- Ruff, C., Furch, M., Brenner, B., Manstein, D. J., Meyhöfer, E. (2001). Single-molecule tracking of myosins with genetically engineered amplifier domains. *Nat Struct Biol* **8**(3), 226-229
- Ruppel, K. M. und Spudich, J. A. (1996). Structure-function studies of the myosin motor domain: importance of the 50-kDa cleft. *Mol Biol Cell*. **7**(7), 1123-1136
- Satre, M. und Martin, J. B. (1985). ³¹P-nuclear magnetic resonance analysis of the intracellular pH in the slime mold Dictyostelium discoideum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **132**, 140-6
- Schleicher, M., Andre, B., Andreoli, C. Eichinger, L., Haugwitz, M., Hofmann, A., Karakesisoglou, J., Stöckelhuber, M. und Noegel, A. A. (1995). Structure-function studies on cytoskeletal proteins in Dictyostelium amoeba as a paradigm. *FEBS Lett.* **369**, 38-42
- Self, T., Sobe, T., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Avraham, K. B. und Steel, K. P. (1999). Role of myosin VI in the differentiation of cochlear hair cells. *Devl Biol.* **214**, 331-341
- Sellers, J. R. (2000). Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* **1496**, 3-22
- Shih, W. M., Gryczynski, Z., Lakowicz, J. R., Spudich, J. A. (2000). A FRET-based sensor reveals large ATP hydrolysis-induced conformational changes and three distinct states of the molecular motor myosin. *Cell* **102**(5), 683-694
- Shimada, T., Sasaki, N., Ohkura, R. und Sutoh, K. (1997). Alanine scanning mutagenesis of the switch I region in the ATPase site of Dictyostelium discoideum myosin II. *Biochemistry* **36**(46), 14037-14043
- Shiroguchi, K. und Kinoshita Jr., K. (2007). Myosin V Walks by Lever Action and Brownian Motion. *Science* **316**, 1208-1212
- Siemankowski, R. F. und White, H. D. (1984). Kinetics of the interaction between actin, ADP, and cardiac myosin-S1. *J. Biol. Chem.* **259**, 5045-5053
- Sleep, J. A., Hutton, R. L. (1980). Exchange between inorganic phosphate and adenosine 5'-triphosphate in the medium by actomyosin subfragment 1. *Biochemistry* **19**(7), 1276-83
- Sleep, J., Lewalle, A., Smith, D.A. (2005). Displacements in the optical trap underestimate the myosin working stroke by a factor of two. *Biophys. J.* **88**
- Smith, C. A. und Rayment, I. (1995). X-ray structure of the magnesium(II)-pyrophosphate complex of the truncated head of Dictyostelium discoideum myosin at 2.7 Å resolution. *Biochemistry* **34**, 8973-8981

- Smith, C. A. und 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**, 5404-5417
- Soldati, T. (2003). Unconventional myosins, actin dynamics and endocytosis: a menage a trois? *Traffic* **4**, 358-366
- Soldati, T., Geissler, H. und Schwarz, E. C. (1999). How many is enough? Exploring the myosin repertoire in the model eukaryote Dictyostelium discoideum. *Cell Biochem Biophys* **30**, 389-411
- Spudich, J. A. und Watt, S. (1971). The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* **246**, 4866-4871
- Spudich, J. A. (1994). How molecular motors work. *Nature* **372**, 515-518
- Steffen, W., Sleep, J. (2004). Using optical tweezers to relate the chemical and mechanical cross-bridge cycles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **359**, 1857-1865
- Sussman, R. R. und Sussman, M. (1967). Growth of Dictyostelium discoideum in axenic media. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29**, 53-55
- Sutoh, K., Ando, M., Sutoh, K., Toyoshima, Y. Y. (1991). Site-directed mutations of Dictyostelium actin: disruption of a negative charge cluster at the N terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**(17), 7711-7714
- Sweeney, H. L. und Houdusse, A. (2004). The motor mechanism of myosin V: insights for muscle contraction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**, 1899-1841
- Sweeney, H. L., Rosenfeld, S. S., Brown, F., Faust, L., Smith, J., Xingi, J., Stein, L. A. und Sellers, J. R. (1998). Kinetic Tuning of Myosin via a Flexible Loop Adjacent to the Nucleotide Binding Pocket. *J Biol Chem* **273**(11), 6262-6270
- Sweeney, H. L., Park, H., Zong, A. B., Yang, Z., Selvin, P. R. und Rosenfeld, S. S. (2007). How myosin VI coordinates its heads during processive movement. *EMBO J.*, **26**(11), 2682-2692
- Tamagawa, Y., Ishikawa, K., Ishikawa, K., Ishida, T., Kitamura, K., Makino, S., Tsuru, T., Ichimura, K. (2002). Phenotype of DFNA11: a nonsyndromic hearing loss caused by a myosin VIIA mutation. *Laryngoscope* **112**, 292-297
- Thirumurugan, K., Sakamoto, T., Hammer III., J. A., Sellers, J. R. und Knight, P. J. (2006). The cargo-binding domain regulates structure and activity of myosin 5. *Nature* **442**, 212-215
- Titus, M. A., Kuspa, A., Loomis, W. F. (1994). Discovery of myosin genes by physical mapping in Dictyostelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9446-50
- Titus, M. A. (1997). Motor proteins: myosin V--the multi-purpose transport motor. *Curr Biol.* **7**(5), R301-304
- Tóth, J., Kovacs, M., Wang, F., Nyitray, L., Sellers, J. R. (2005). Myosin V from Drosophila reveals diversity of motor mechanisms within the myosin V family. *J Biol Chem.* **280**(34), 30594-30603
- Trentham, D. R., Bardsley, R. G., Eccleston, J. F., und Weeds, A. G. (1972). Elementary processes of the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase activity of heavy meromyosin. A transient kinetic approach to the study of kinases and adenosine triphosphatases and a colorimetric inorganic phosphate assay in situ. *Biochem. J.* **126**, 635-644
- Trybus, K. M., Gushchin, M. I., Lui, H., Hazelwood, L., Krementsova, E. B., Volkmann, N., Hanein, D. (2007). Effect of calcium on calmodulin bound to the IQ motifs of myosin V. *J Biol Chem.* 2007 Jun 11 [Epub ahead of print]
- Tsiavaliaris, G., Fujita-Becker, S., Batra, R., Levitsky, D. I., Kull, F. J., Geeves, M. A., Manstein, D. J. (2002). Mutations in the relay loop region result in dominant-negative inhibition of myosin II function in Dictyostelium. *EMBO Rep.* **3**, 1099-1105

- Tsiavaliaris, G., Fujita-Becker, S., Manstein, D. J. (2004). Molecular engineering of a backwards-moving myosin motor. *Nature* **427**, 558-561
- Tuxworth, R. I., Titus, M. A. (2000). Unconventional myosins: anchors in the membrane traffic relay. *Traffic* **1**, 11-18
- Tuxworth, R. I., Weber, I., Wessels, D., Addicks, G. C., Soll, D. R., Gerisch, G. und Titus, M. A. (2001). A role for myosin VII in dynamic cell adhesion. *Curr. Biol.* **11**, 318-329
- Tuxworth, R. I., Stephens, S., Ryan, Z. C., Titus, M. A. (2005). Identification of a myosin VII-talin complex. *J Biol Chem.* **280**(28), 26557-26564
- Uyeda, T. Q., Ruppel, K. M., Spudich, J.A. (1994). Enzymatic activities correlate with chimaeric substitutions at the actin-binding face of myosin. *Nature* **368**, 567-569
- Uyeda, T. Q., Abramson, P. D., Spudich, J. A. (1996). The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**(9), 4459-4464
- Vale, R. D. (1987). Intracellular transport using microtubule-based motors. *Annu. Rev. Cell Biol.* **3**, 347-378
- Vale, R. D. (1996). Switches, latches, and amplifiers: common themes of G proteins and molecular motors. *J Cell Biol* **135**, 291-302
- Vale, R. D., Milligan, R. A., (2000). The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science*, **288**(5463), 88-95
- Van Dijk, J., Furch, M., Lafont, C., Manstein, D. J. und Chaussepied, P. (1999). Functional characterization of the secondary actin binding site of myosin II. *Biochemistry* **38**, 15078-15085
- Veigel, C., Wang, F., Bartoo, M. L., Sellers, J. R. und Molloy, J. E. (2002). The gated gait of the processive molecular motor, myosin V. *Nat Cell Biol* **4**, 59-65
- Veigel, C., Schmitz, S., Wang, F., Sellers, J. R. (2005). Load-dependent kinetics of myosin-V can explain its high processivity. *Nat Cell Biol* **7**, 861-869
- Volkman, N., Hanein, D., Ouyang, G., Trybus, K. M., DeRosier, D. J. und Lowey, S. (2000). Evidence for cleft closure in actomyosin upon ADP release. *Nature Struct. Biol.* **7**, 1147-1155
- Walker, M. L., Burgess, S. A., Sellers, J. R., Wang, F., Hammer, J. A., III., Trinick, J. & Knight, P. J. (2000). Two-headed binding of a processive myosin to F-actin. *Nature* **405**, 804-807
- Wang, F., Chen, L., Arcucci, O., Harvey, E. V., Bowers, B., Xu, Y., Hammer III., J. A. und Sellers, J. R. (2000). Effect of ADP and Ionic Strength on the Kinetic and Motile Properties of Recombinant Mouse Myosin V *J Biol Chem* **275**(6), 4329-4335
- Wang, F., Kovacs, M., Hu, A., Limouze, J., Harvey, E. V., Sellers, J. R. (2003). Kinetic mechanism of non-muscle myosin IIB: functional adaptations for tension generation and maintenance. *J Biol Chem.* **278**(30), 27439-27448
- Wang, Q., Deloia, M. A., Kang, Y., Litchke, C., Zhang, N., Titus, M. A., Walters, K. J. (2007). The SH3 domain of a M7 interacts with its C-terminal proline-rich region. *Protein Sci.* **16**(2), 189-196
- Warrick, H. M. und Spudich, J. A. (1987). Myosin structure and function in cell motility. *Annu. Rev. Cell Biol.* **3**, 379-421
- Watanabe, S., Mabuchi, K., Ikebe, R. and Ikebe, M. (2006). Mechanoenzymatic Characterization of Human Myosin Vb. *Biochemistry* **45**, 2729-2738
- Watanabe, S., Ikebe, R. und Ikebe, M. (2006). Drosophila Myosin VIIA Is a High Duty Ratio Motor with a Unique Kinetic Mechanism. *J Biol Chem* **281**(11), 7151-7160

- Watts, D. J. und Ashworth, J. M. (1970). Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.* **119**, 171-174
- Webb, M. R., Corrie, J. E. (2001). Fluorescent coumarin-labeled nucleotides to measure ADP release from actomyosin. *Biophys J.* **81**(3), 1562-1569
- Weiss, S., Chizhov, I. und Geeves, M. A. (2000). A Flash photolysis Fluorescence/light scattering apparatus for use with sub microgram quantities of muscle proteins. *J Muscle Res Cell Motil* **21**, 423-432
- Wells, A. L., Lin, A. W., Chen, L.-Q., Safer, D., Cain, S. M., Hasson, T., Carragher, B. O., Milligan, R. A. & Sweeney, H. L. (1999). Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature* **401**, 505-508.
- Whittaker, M., Wilson-Kubalek, E. M., Smith, J. E., Faust, L., Milligan, R. A., Sweeney, H. L. (1995). A 35-A movement of smooth muscle myosin on ADP release. *Nature* **378**, 748-751
- Woodward, S. K., Eccleston, J. F. und Geeves, M. A. (1991). Kinetics of the interaction of 2'(3')-O-(N-methylanthraniloyl)-ATP with myosin subfragment 1 and actomyosin subfragment 1: characterization of two acto-S1-ADP complexes. *Biochemistry* **30**, 422-430
- Wu, C., Lytvyn, V., Thomas, D. Y., Leberer, E. (1997). The phosphorylation site for Ste20p-like protein kinases is essential for the function of myosin-I in yeast. *J Biol Chem.* **272**(49), 30623-30626
- Wu, X. S., Rao, K., Zhang, H., Wang, F., Sellers, J. R., Matesic, L. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., und Hammer III., J. A. (2002). Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat. Cell Biol.* **4**, 271-278
- Xiao, M., Reifengerger, J. G., Wells, A. L., Baldacchino, C., Chen, L. Q., Ge, P., Sweeney, H. L., Selvin, P. R. (2003). An actin-dependent conformational change in myosin. *Nat Struct Biol.* **10**(5), 402-408
- Yamashita, R. A., May, G. S. (1998). Constitutive activation of endocytosis by mutation of *myoA*, the myosin I gene of *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **273**(23), 14644-8
- Yang, Y., Kovács, M., Xu, E., Anderson, J. B. und Sellers, J. R. (2005). Myosin VIIB from *Drosophila* is a high duty ratio motor. *J Biol Chem.* **280**(37), 32061-32068
- Yang, Y., Kovács, M., Sakamoto, T., Zhang, F., Kiehart, D. P. und Sellers, J. R. (2006). Dimerized *Drosophila* myosin VIIa: A processive motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(15), 5746-5751
- Yengo, C. M. und Sweeney, H. L. (2004). Functional Role of Loop 2 in Myosin V. *Biochemistry* **43**, 2605-2612
- Yildiz, A., Forkey, J. N., McKinney, S. A., Ha, T., Goldman, Y. E., Selvin, P. R. (2003). Myosin V Walks Hand-Over-Hand: Single Fluorophore Imaging with 1.5-nm Localization. *Science* **300**, 2061-2065
- Yoshimura, M., Homma, K., Saito, J., Inoue, A., Ikebe, R. and Ikebe, M. (2001). Dual Regulation of Mammalian Myosin VI Motor Function. *J Biol Chem* **276**, 39600-39607
- Zeng, W., Conibear, P. B., Dickens, J. L., Cowie, R. A., Wakelin, S., Malnasi-Csizmadia, A., Bagshaw, C. R. (2004). Dynamics of actomyosin interactions in relation to the cross-bridge cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **359**(1452), 1843-1855

6. Präsentationen und Publikationen in Vorbereitung

Taft, M. H., Hartmann, F. K., Keller, H., Manstein, D. J. und Tsiavaliaris, G. (2008). *Dictyostelium* myosin-Vb displays properties of a Mg^{2+} -regulated processive motor. (Manuskript in Vorbereitung)

Vortrag, März 2007

12th Alpbach Workshop on Molecular Motors 2007; Alpbach, Austria
“*Dictyostelium* myosin-Vb displays processive properties”

Poster, März 2007

12th Alpbach Workshop on Molecular Motors 2007; Alpbach, Austria
“*Dictyostelium* myosin-Vb displays processive properties”

Abstract

Taft, M. H., Keller, H., Fujita-Becker, S., Manstein, D. J., und Tsiavaliaris, G. (2006). Regulation of myosin-V motor activity by free magnesium ions. *J. Muscle Res. Cell Mot.* **27**: 489

7. Lebenslauf

Manuel H. Taft

Finkenweg 31
29336 Nienhagen

Persönliche Daten

Geburtsdatum:	27.09.1977
Geburtsort:	Hannover
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulische Bildung

1984 - 1988	Grundschule Nienhagen, 29336 Nienhagen
1988 - 1990	Orientierungsstufe des Schulzentrums Burgstraße, 29221 Celle
1990 - 1997	Gymnasium Ernestinum Celle, 29221 Celle, Abschluß Abitur

Zivildienst

Sep. '97 - Sep. '98	Individuelle Schwerstbehindertenbetreuung bei der Gesellschaft für integrative Sozialdienste, GIS, 30165 Hannover.
---------------------	--

Studium

1998 - 2000	Grundstudium im Fach Biochemie an Universität Hannover
2000 - 2003	Hauptstudium im Fach Biochemie an der Universität Hannover, Abschluß Diplom-Biochemiker
Jun. '03 - Dez. '03	Diplomarbeit mit dem Thema „Expression des Protoonkogenproduktes c-Myb in <i>Dictyostelium discoideum</i> “ im Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover, 30625 Hannover
Feb. '04 - Dez. '07	Promotion im Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover, 30625 Hannover