

Molekulare Grundlagen der Regulation und Modulation der Motorfunktion von Myosinen

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

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Falk Alexander Karl Hartmann
geboren am 10.11.1978 in Bremen

2010

Referent: Prof. Dr. Georgios Tsiavaliaris
Korreferent: Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen
Tag der Promotion: 15.01.2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 16.02.2006 bis 15.08.2009 am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Georgios Tsiavaliaris angefertigt.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, Falk Hartmann, die Arbeit selbständig verfasst zu haben.

Es wurden ausschließlich die angegebenen Hilfsmittel verwendet.

Gutachter:

Prof. Dr. Georgios Tsiavaliaris

Institut für Biophysikalische Chemie – Medizinische Hochschule Hannover

Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen

Institut für Pflanzengenetik – Leibniz Universität Hannover

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation „Molekulare Grundlagen der Regulation und Modulation der Motorfunktion von Myosinen“ selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 15.01.2010

Falk Alexander Karl Hartmann

Meinen Eltern gewidmet

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Georgios Tsiavaliaris und Herrn Prof. Dr. Dietmar Manstein für die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für Biophysikalische Chemie zu erarbeiten.

Für die Bereitstellung des spannenden und zugleich anspruchsvollen Themas sowie für die hervorragende Betreuung gilt Herrn Prof. Dr. Georgios Tsiavaliaris mein besonderer Dank. Die offene Arbeitsatmosphäre in seiner Arbeitsgruppe hat für meine Doktorarbeit stets neue Ideen und Impulse geschaffen.

Herrn Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Meinen beiden Kollegen Dr. Manuel Taft und Dr. Ralph Diensthuber danke ich besonders für ihr Korrekturlesen und ihre hilfreichen Anmerkungen beim Schreiben dieser Arbeit.

Den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Daniela Kathmann, Agrani Rump, Claudia Thiel und Christian Waßmann danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und die besonders gute Arbeitsatmosphäre. Ich werde meine Promotionszeit in sehr guter Erinnerung behalten.

Ich danke Herrn Dr. Igor Chizhov dafür, dass unser TIRF-Mikroskop über die Jahre ständig funktionsbereit war und somit die Ergebnisproduktion nie durch technische Probleme behindert wurde.

Frau Daniela Kathmann und Herrn Dr. Roman Fedorov danke ich für die Kooperation bei der Erstellung atomarer Strukturmodelle.

Ich danke Aike Schweda für die mehrmalige Bereitstellung von Myosin-5.

Weiterer Dank gilt auch den Mitgliedern der anderen Arbeitsgruppen unseres Instituts. Das produktive wissenschaftliche Umfeld wurde durch das gesamte Kollegium gebildet.

Meinen lieben Eltern möchte ich für die stete Unterstützung, ihr andauerndes Vertrauen und ihr Interesse an meiner Arbeit danken.

Zuletzt möchte ich mich bei Dani für ihren Rückhalt und ihre aufmunternden Worte bedanken. Zu zweit wird alles leichter.

„Der Blick des Forschers fand nicht selten mehr, als er zu finden wünschte.“

Gotthold Ephraim Lessing (1729-81)

Zusammenfassung

Der Schalter-2-Bereich in der Kernstruktur von Myosinen ist ein hoch konserviertes Strukturelement und nimmt eine Schlüsselrolle bei der ATP-Reaktion von Myosinen ein. Schalter-2 fungiert über die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen und die Mg^{2+} -Koordination als ein Nukleotidsensor. Es wird postuliert, dass Schalter-2 die Hydrolyse und die Produktfreisetzung kontrolliert. Die Schalter-2-Sequenz der meisten Mitglieder der Myosin-Superfamilie weist ein Tyrosin auf, wohingegen einige andere Myosine ein Alanin, Serin oder Phenylalanin an dieser Position besitzen, z.B. Skelettmuskel-Myosin-2 und Myosin-2 aus der glatten Muskulatur. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass Änderungen in der Konzentration von freien Mg^{2+} -Ionen die kinetischen und funktionalen Eigenschaften von *Dictyostelium* Myosin-1E, *Dictyostelium* Myosin-5b (Taft et al., 2008) und Myosin-5a aus Huhn modulieren, aber nicht die Motoreigenschaften von *Dictyostelium* Myosin-1B und *Dictyostelium* Myosin-2 beeinflussen. Es wird vermutet, dass das Tyrosin in Schalter-2 ein kritischer Faktor für die Mg^{2+} -abhängigen funktionalen Eigenschaften von Myosinen mit einer hohen *duty ratio* ist. Um diese Hypothese zu beweisen, habe ich die funktionalen Eigenschaften von Myosinen aus verschiedenen Klassen mit Punktmutationen in Schalter-2 analysiert. Für diese Studien wurden der *in vitro*-Motilitätsassay und der TIRF-Mikroskopie-basierte Landeassay eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen, wie ein Tyrosin im Schalter 2 die funktionalen Motor-Eigenschaften des Myosins bestimmt. Ein Tyrosin in Schalter-2 befähigt das Myosin über Änderungen der Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen zwischen schneller Bewegung und Spannungsaufbau umzuschalten. Die Daten werden durch ein atomares Strukturmodell unterstützt, das aufzeigt wie Schalter-2 als Sensor für physiologische Änderungen in der Konzentration von freien Mg^{2+} -Ionen fungiert.

Die funktionale Integration von Motorproteinen in künstlichen Oberflächenstrukturen ist eine grundlegende Voraussetzung für die Konstruktion von biohybriden Systemen, die für aktive *in vitro*-Transportprozesse verwendet werden können. In dieser Arbeit werden die funktionalen Analysen von zwei konstruierten künstlichen Myosinen, zum einen M5P (Prozessives Myosin-5) und M5S (Monomeres Myosin-5) beschrieben. Die Motoren haben eine größere Stabilität auf künstlichen Oberflächen und ihre Motoreigenschaften können über mehrere Parameter reguliert werden. Die Experimente zeigen, dass das Bewegungsverhalten des dimeren M5P Konstrukts über Änderungen der Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen zwischen prozessiver und nicht-prozessiver Bewegung umgeschaltet werden kann. Die Motoraktivität des monomeren M5S Konstrukts kann über koordinierte Änderungen in der Konzentration von $MgCl_2$ und KCl stufenlos reguliert werden. Die einfache Parameter-abhängige Kontrolle der zwei generierten Motoren ermöglicht die Konstruktion von biohybriden Systemen mit einer Sensor- oder Anordnungs-Funktion.

Der abschließende Teil meiner Doktorarbeit beschreibt meinen Beitrag bei der Aufklärung des Mechanismus der Inhibierung der Myosin-Motoraktivität durch Pentabromopseudilin (PBP) (Fedorov et al., 2009). ATPase-Experimente im Fließgleichgewicht, *single turnover*-Experimente und *in vitro*-Motilitätsassays wurden mit verschiedenen Myosin-Isoformen durchgeführt. Die Ergebnisse der Studien zeigen deutlich, dass die Geschwindigkeitskonstanten für die ATP-Bindung, die Hydrolyse und die ADP-Freisetzung durch PBP deutlich reduziert werden und dass der Inhibitor eine Myosin-Isoform-Spezifität besitzt.

Schlüsselwörter: *duty ratio*; Mg^{2+} -Sensitivität; Myosin-Inhibitor

Abstract

The switch-2 region in the core structure of myosins is a highly conserved structural element that plays a key role in the ATPase reaction of myosins. With its ability to function as a nucleotide sensor through hydrogen bond formation and Mg^{2+} -coordination, it is assumed to tightly control the hydrolysis reaction and product release. In most members of the myosin superfamily a tyrosine residue is found in the amino acid sequence of switch-2, whereas some other myosins contain an alanine, serine or phenylalanine at this position, e.g. skeletal and smooth muscle myosin-2. According to recent investigations, where it has been shown that changes in the concentration of free magnesium ions modulate the kinetic and functional properties of *Dictyostelium* myosin-1E, *Dictyostelium* myosin-5b (Taft et al., 2008), and chicken myosin-5a but not those of *Dictyostelium* myosin-1B and *Dictyostelium* non-muscle myosin-2, it is assumed that this particular tyrosine is a critical determinant for the Mg^{2+} -dependent motile properties of high duty ratio myosins. In order to prove this hypothesis, I have analyzed the motile properties of myosins from different classes with point mutations in the switch-2 region using direct functional assays including *in vitro* motility assay and TIRF-microscopy-based landing assay. The results show the importance of the tyrosine in switch-2 in dictating the motile properties of myosins and thus, the ability of the motors to switch between rapid movement and tension bearing upon changes of free Mg^{2+} -ions. The data are consistent with a structural model that proposes how switch-2 acts as a sensor for physiological changes in the concentration of free Mg^{2+} -ions.

The functional integration of motor proteins in artificial surface structures is a basic requirement for the construction of biohybrid systems, which can be used for active *in vitro*-transport processes. Here, the functional analyses of two engineered artificial myosins, namely M5P (processive myosin-5) and M5S (single-headed myosin-5) are described. The motors have an increased stability on synthetic surfaces and their motor properties can be externally regulated. The experiments show that the motile behavior of the dimeric M5P construct can be switched between processive and non-processive modes of movement and the motor activity of the monomeric M5S construct can be turned on and off in a controlled, continuous, and reversible manner by coordinated changes in the concentration of $MgCl_2$ and KCl. The simple parametric control that is possible with the engineered motors is important for the generation of biohybrid fluidic micro-devices with assembly and sensing functions.

Finally, the last part of the thesis describes my contribution in elucidating the mechanism of pentabromopseudilin inhibition of myosin motor activity (Fedorov et al., 2009). Steady-state ATPase measurements, single-turnover experiments, and *in vitro* motility assays were performed with different myosin isoforms that clearly demonstrate that the rate constants for ATP-binding, -hydrolysis and ADP dissociation are highly reduced by PBP and that the inhibitor acts myosin-isoform specific.

Key words: duty ratio; Mg^{2+} -Sensitivity; Myosin-Inhibitor

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Molekulare Motoren	1
1.2.	Die Motorproteinfamilie der Myosine	1
1.2.1.	Struktureller Aufbau der Myosinmotordomäne	2
1.2.2.	Molekularer Mechanismus des ATPase-Zyklus	6
1.2.2.1.	ATP-Bindung an Akto-Myosin und Dissoziation des Akto-Myosin-ATP-Komplexes	7
1.2.2.2.	Zurückschwingen des Hebelarms in die Position vor dem Kraftschlag und Hydrolyse	7
1.2.2.3.	Phosphat-Freisetzung und Kraftschlag	8
1.2.2.4.	Stark an Aktin gebundener Zustand nach dem Kraftschlag	8
1.3.	Direkte funktionale Assays zur Charakterisierung der Myosin-Motoreigenschaften	8
1.3.1.	<i>In vitro</i> -Motilitätsassays zur Bestimmung der Aktin-Translokationsgeschwindigkeit	8
1.3.1.1.	Ursprung des <i>in vitro</i> -Motilitätsassays	8
1.3.1.2.	Aufbau des <i>in vitro</i> -Motilitätsassays	9
1.3.1.3.	Datenauswertung beim <i>in vitro</i> -Motilitätsassay	10
1.3.2.	Landeassay-Experimente zur Bestimmung der <i>duty ratio</i>	12
1.3.3.	Einzelmolekül-Experimente zur Bestimmung der Prozessivität	13
1.4.	Totale Interne Reflexions Fluoreszenz-Mikroskopie	15
1.5.	Enzym-Effektoren	17
1.5.1.	Myosin-Effektoren	17
1.5.1.1.	Trifluoperazin	17
1.5.1.2.	N-Benzyl-p-Toluen-Sulphonamid	18
1.5.1.3.	Blebbistatin	19
1.6.	Zielsetzung der Arbeit	20
2.	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1.	Material	21
2.1.1.	Chemikalien	21
2.1.2.	Geräte	23
2.1.3.	Enzyme	24
2.1.4.	Antibiotika	24
2.1.5.	Antikörper	24
2.1.6.	Marker	24

2.1.7.	Organismen	25
2.2.	Methoden	25
2.2.1.	Mikrobiologische Methoden	25
2.2.1.1.	Transformation in <i>E. coli</i>	25
2.2.1.2.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	26
2.2.2.	Zellbiologische Methoden	26
2.2.2.1.	Transformation in <i>D. discoideum</i>	26
2.2.2.2.	Kultivierung von <i>D. discoideum</i>	27
2.2.2.3.	Herstellung von <i>D. discoideum</i> -Sporen und deren Konservierung	27
2.2.3.	Molekularbiologische Methoden	28
2.2.3.1.	Präparation von Plasmiden	28
2.2.3.2.	Spaltung von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen	29
2.2.3.3.	Ligation von linearisierter DNA	29
2.2.3.4.	Agarose-Gelelektrophorese	30
2.2.3.5.	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	30
2.2.3.6.	Isolierung von genomischer DNA aus <i>D. discoideum</i>	31
2.2.3.7.	Dephosphorylierung von DNA	31
2.2.3.8.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
2.2.3.9.	Verwendete Oligonukleotide	32
2.2.3.10.	Aufreinigung von PCR-Fragmenten	33
2.2.3.11.	pGEM-TEasy-Klonierung und <i>Blue-White-Screening</i>	33
2.2.3.12.	Verwendete Expressionsvektoren	33
2.2.4.	Proteinbiochemische Methoden	34
2.2.4.1.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	34
2.2.4.2.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen über UV-Absorption	34
2.2.4.3.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli	34
2.2.4.4.	Western-Blot	36
2.2.4.5.	Analytische Proteinaufreinigung	37
2.2.4.6.	Präparative Proteinaufreinigung	38
2.2.4.7.	Präparation von Aktin aus dem Kaninchenmuskel	41
2.2.4.8.	Präparation von Pyren-markierten F-Aktin	42
2.2.5.	Biophysikalische Methoden	43
2.2.5.1.	Steady-state-Kinetik	43
2.2.5.2.	Messungen mittels <i>stopped-flow</i> -Fluoreszenzspektrometer	44
2.2.5.3.	<i>In vitro</i> -Motilitätsassay	45
2.2.5.4.	Landeassay	48
2.2.5.5.	Einzelmolekül-Prozessivitätsassay	49

3.	ERGEBNISSE	51
3.1.	Mechanismus der Schalter-2 vermittelten Mg^{2+}-Sensitivität und der Einfluss auf die <i>duty ratio</i>	51
3.1.1.	<i>In vitro</i> -Motilitätsexperimente in Anwesenheit verschiedener freier Mg^{2+} -Konzentrationen	53
3.1.1.1.	Funktionale Untersuchung der Motoraktivitäten von <i>DdMyosin-1E</i> und <i>DdMyosin-5b</i>	53
3.1.1.2.	Funktionale Untersuchung der Motoraktivitäten von <i>DdMyosin-1B</i> und <i>DdMyosin-2</i>	54
3.1.2.	Funktionale Assays zur indirekten Bestimmung der <i>duty ratio</i>	56
3.1.2.1.	Landeassay-Experimente mit <i>DdMyosin-1E</i> und <i>DdMyosin-5b</i>	56
3.1.2.2.	Landeassay-Experimente mit <i>DdMyosin-1B</i>	58
3.2.	Ein künstlicher prozessiver Nanomotor auf Basis eines Klasse-5 Myosins	59
3.2.1.	Funktionale Untersuchungen der Motoraktivität von M5P	60
3.2.2.	Prozessive Bewegung von M5P in Einzelmolekül-Experimenten	61
3.2.3.	Konstruktion eines Myosins mit kontrollierbarer Motoraktivität	62
3.2.4.	Immobilisierte M5S- und <i>DdMyosin-2</i> -Moleküle im Langzeit-Stabilitäts-Test	63
3.2.5.	Pflanzen-Myosin-11 als Basis für schnelle Nanomotoren	64
3.3.	Myosin-Modulatoren auf Basis von Pseudilinderivaten	65
3.3.1.	Charakterisierung von Myosin-5a aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	66
3.3.1.1.	<i>Steady-state</i> -Kinetik und funktionale Untersuchung der Motoraktivität von <i>DdMyosin-5a</i>	66
3.3.1.2.	Transientenkinetische Untersuchung von <i>DdMyosin-5a</i>	67
3.3.2.	Der Myosin-Inhibitor Pentabromopseudilin	68
3.3.2.1.	Inhibierung der basalen ATPase verschiedener Myosine durch PBP	68
3.3.2.2.	Inhibierung der Aktin-aktivierten ATPase verschiedener Myosine durch PBP	69
3.3.2.3.	<i>Single turnover</i> -Experimente mit PBP und <i>DdMyosin-2</i> , -5a und -5b	70
3.3.2.4.	PBP-Einfluss auf die ATP-Bindung an Myosin	72
3.3.2.5.	PBP-Einfluss auf die ATP-induzierte Dissoziation des Pyren-Akto-Myosin-Komplexes	73
3.3.2.6.	PBP-Einfluss auf die ADP-Dissoziation aus dem Akto-Myosin-ADP-Komplex	74
3.3.2.7.	Funktionale Untersuchungen zum PBP-Einfluss auf die Myosin-Motoraktivität	75
3.3.2.8.	Der Einfluss von Pentachloropseudilin auf die Motoraktivität	77
4.	DISKUSSION	78
4.1.	Ein Tyrosin in Schalter-2 vermittelt den Mg^{2+}-sensitiven Mechanismus von hoher und niedriger <i>duty ratio</i>	78
4.1.1.	Y487F in <i>DdMyosin-5b</i> führt zu einer Entkopplung der ATPase-Aktivität von der Bewegungsgeschwindigkeit	79
4.1.2.	Strukturelles Modell zur Erklärung des Mg^{2+} -sensitiven Mechanismus von hoher und niedriger <i>duty ratio</i>	80
4.2.	Artifizielle Nanomotoren auf Basis eines Klasse-5-Myosins	81
4.2.1.	Konstruktion eines artifiziellen prozessiven Myosins	81

4.2.2. <i>Protein-Engineering</i> -Ansatz zur Herstellung eines Myosins mit Ionenstärke-abhängiger Motoraktivität	82
4.3. Der Myosin-Inhibitor Pentabromopseudilin	83
5. LITERATURVERZEICHNIS	86
6. PUBLIKATIONEN	96
7. LEBENSLAUF	97

1. Einleitung

1.1. Molekulare Motoren

Innerhalb einer Zelle, in der Nähr- und Botenstoffen entgegen eines Konzentrationsgradienten gepumpt, Chromosomen bei der Zellteilung getrennt und Vesikel bzw. Organellen vom Zentrum einer Zelle an die Peripherie und wieder zurück transportiert werden, sind gerichtete Bewegungsabläufe unerlässlich. Zuständig dafür sind sogenannte Motorproteine. Vergleichbar mit makroskopischen Maschinen werden verschiedene Funktionen innerhalb der Zelle durch verschiedene Motorproteine bewerkstelligt. Motorproteine werden grundsätzlich in zwei Klassen unterteilt: die Rotationsmotoren zu denen die ATP-Synthase gehört und die Linearmotoren. Innerhalb der Gruppe der linearen Motoren konnte bisher drei Mitglieder identifiziert werden: Kinesine, Dyneine und Myosine. Diese Motoren setzen die chemische Energie eines Adenosintriphosphat (ATP)-Äquivalents in eine gerichtete Bewegung entlang ihres filamentösen Partnerproteins um. Während sich Kinesine und Dyneine auf Mikrotubulifilamenten bewegen, sind Myosine die einzigen Motoren die sich entlang von filamentösem Aktin bewegen (Vale, 1987; Milligan & Flicker, 1987).

Dyneine und Kinesine sind am Transport von Organellen sowie an der Zellteilung beteiligt (Vale & Milligan, 2000). Während sich die meisten Kinesine in Richtung des Plus-Endes von Mikrotubuli bewegen, ist die Bewegungsrichtung aller bislang bekannter Dyneine ausschliesslich zum Minus-Ende gerichtet. Dyneine sorgen für die Bewegung der eukaryotischen Geißel- und Cilienbewegung. Die Bewegung entsteht dadurch, dass die Dyneine die Mikrotubuli-Zylinder in den Geißeln gegeneinander verschieben (Brokaw, 2009). Diese Verschiebung krümmt die Geißeln und sie beginnen rhythmisch hin- und herzuschlagen. Ebenso wie Kinesine sind auch Dyneine an der Zellteilung beteiligt. Die Gruppe der Kinesine ist vielfältiger als die der Dyneine. Neben dem Transport von Organellen und der Beteiligung an Mitose und Meiose sind Kinesine auch am Vesikeltransport in Neuronen beteiligt (Vale & Milligan, 2000). Die Myosin-Superfamilie wird aktuell 24 Klassen unterteilt, welche in weitere Unterklassen unterteilt sind (Foth et al., 2006). Im Mensch konnten bisher 39 Myosingene aus 12 verschiedenen Klassen identifiziert werden. In den folgenden Kapiteln sollen die Myosine und der Mechanismus ihrer Kraft- und Bewegungserzeugung genauer beschrieben werden.

1.2. Die Motorproteinfamilie der Myosine

Die Muskelkontraktion, die zytoplasmatische Strömung in Pflanzenzellen, die Fortbewegung von einzelnen Zellen, die Zytokinese, der intrazelluläre Transport von Nähr- und Botenstoffen oder die dynamische Organisation des Zytoskeletts und die Architektur von Zellen werden von Myosinen angetrieben. Myosine sind Motorproteinen, die Kräfte im Pico-Newton-Bereich entwickeln können und diese in eine Bewegungsform umsetzen. Das hexamere Myosin-2 aus dem Gewebe des Skelettmuskels (s. Abb. 1) ist für die Kontraktion der Muskeln verantwortlich und wird in die Klasse 2 der Myosin-Superfamilie eingruppiert. Die später in verschiedensten eukaryotischen Zellen identifizierten Myosine aus anderen Klassen werden als unkonventionelle Myosine bezeichnet.

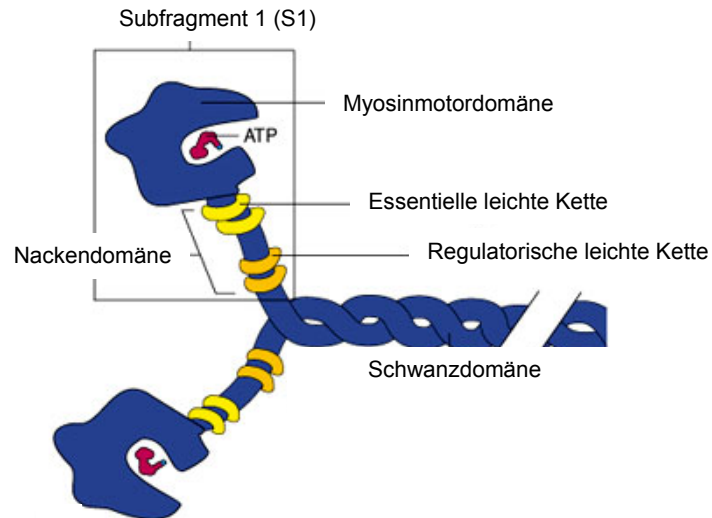


Abb. 1: Schematische Darstellung eines dimeren Klasse-2 Myosins.

Myosine haben einen sehr ähnlichen strukturellen Aufbau und setzen sich aus mehreren Domänen zusammen. N-terminal befindet sich die globuläre, katalytisch aktive Motordomäne. Die Motordomäne besitzt die Bindungsstelle für ATP und interagiert in einem zyklischen Prozess mit filamentösem Aktin (F-Aktin). Die Energie, die bei der Spaltung von ATP zu den Produkten ADP und Phosphat freigesetzt wird, setzt das Myosin in eine gerichtete Bewegung entlang des F-Aktins um. An die Motordomäne schließt sich der sogenannte Nacken, an den je nach Myosin-Isoform eine unterschiedliche Anzahl an leichten Ketten bindet. Das Leichte-Ketten-Bindungsmotiv, auch als IQ-Motif bekannt, hat die konservierte Sequenz (I/X)QXX(Y/F/W)RX(Y/F/W)XX(R/X) (Kollmar, 2006). Die leichten Ketten haben eine essentielle bzw. regulatorische Funktion (Trybus, 1994). Die Bindung der leichten Ketten stabilisiert zum einen die helikale Struktur des Nackens und zum anderen reguliert die Anwesenheit der leichten Ketten sowie deren Phosphorylierung die ATPase und Motoraktivität der Myosine. Die Energie aus der ATP-Umsetzung wird vom Myosin in eine hebelarmartige Bewegung des Nackens umgesetzt. Die Bewegung der Nackendomäne wird als Kraftschlag bezeichnet (Holmes, 1997). Der Schwanzbereich weist sowohl in seiner Länge als auch in seiner Sequenz und Funktion eine hohe Divergenz innerhalb der Myosin-Isoformen auf. Neben verschiedenen funktionsgebundenen Domänen besitzen viele Schwanzbereiche eine superspiralisierte *coiled-coil*-Region, die eine Dimerisierung der Myosine ermöglicht (Sellers, 2000).

1.2.1. Struktureller Aufbau der Myosinmotordomäne

Um den Mechanismus der Kraft- und Bewegungsentwicklung genau verstehen zu können, sind insbesondere hochauflösende Strukturen der Myosinmotordomänen notwendig. Für Kristallisationsstudien werden daher rekombinant hergestellte Motordomänen bzw. proteolytisch gespaltene Subfragmente, wie das S1-Fragment (s. Abb. 1), welches die Nackenregion und die daran gebunden leichten Ketten enthält, verwendet. Durch diesen Ansatz konnten die atomaren Strukturen zahlreicher Myosinmotordomänen aufgeklärt werden. Die erste Struktur eines Myosins wurde in einem

nukleotidfreien Zustand gelöst und stellte die Struktur des Subfragment 1 von Myosin-2 aus Skelettmuskel des Huhns dar (Rayment et al., 1993). In den folgenden Jahren konnten die Strukturen von Myosinen aus der Klasse-1 (Kollmar et al., 2002), Klasse-2 (Smith & Rayment, 1995; Fisher et al., 1995; Bauer et al., 1997; Reubold et al., 2003), Klasse-5 (Coureux et al., 2003 & 2004) und Klasse-6 (Menetrey et al., 2005 & 2008) aufgeklärt werden. Durch die Verwendung von verschiedenen Nukleotidanaloga konnten die Strukturänderungen während der ATP-Umsetzung teilweise aufgeklärt werden. In diesem Zusammenhang soll hier die atomare Struktur der Motordomäne des unkonventionellen Myosin-1E aus *D. discoideum* im Komplex mit MgADP·VO₄ genauer beschrieben werden (s. Abb. 2). (Kollmar et al., 2002).

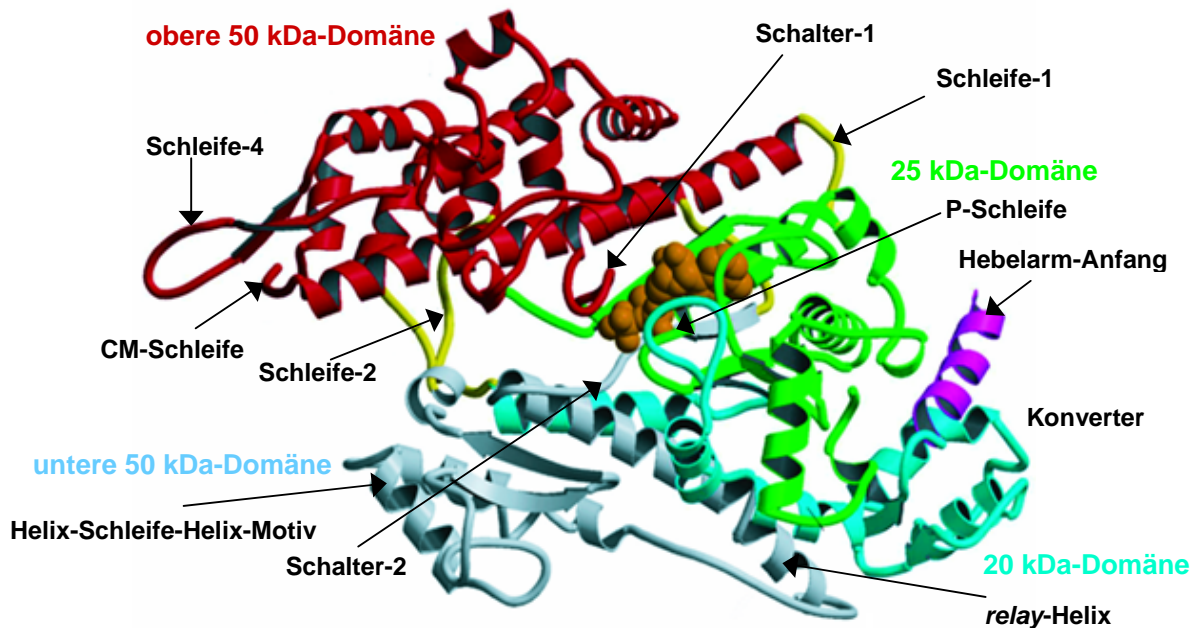


Abb. 2: Dreidimensionales Bänderdiagramm der Motordomäne von Myosin-1E aus *D. discoideum* im Komplex mit ADP·VO₄ (Kollmar et al., 2003).

Die verschiedenen strukturellen und funktionellen Untereinheiten der Motordomäne von *Dd*Myosin-1E sind farblich gekennzeichnet. Historisch betrachtet, werden die einzelnen Untereinheiten entsprechend ihres Molekulargewichts bei Myosin-2 in die N-terminale 25 kDa-Domäne (Grün) sowie die obere und untere 50 kDa-Domäne (Rot und Blau) unterschieden. Die C-terminale 20 kDa-Domäne (Cyan) besteht aus dem Konverter und dem Beginn der α -helikalen Nackendomäne (violett).

Im Gegensatz zu Myosin-2 fehlt am N-Terminus der Motordomäne von *Dd*Myosin-1E (Abb. 2, Grün) die SH3-ähnliche Domäne. Die SH3-ähnliche Domäne stabilisiert durch hydrophobe Interaktionen den N-Terminus der Myosinmotordomäne und ist für eine produktive Kommunikation der funktionalen Untereinheiten unerlässlich (Fujita-Becker et al., 2006). Eine funktionale Analogie wird bei *Dd*Myosin-1E durch polare bzw. geladene Aminosäuren in dieser Region erreicht. Weiterhin ist die N-terminale 25 kDa-Domäne zusammen mit der oberen 50 kDa-Domäne an der Bildung von 6 der insgesamt 7 zentralen β -Faltblätter beteiligt. Die Schleife-1 verknüpft die N-terminale 25 kDa-Domäne mit der oberen 50 kDa-Domäne. Schleife-2 verbindet die obere mit der unteren 50 kDa-Domäne und ist

Bestandteil der Aktinbindungsdomäne. Daneben sind die *Cardiomyopathy* (CM)-Schleife und Schleife-4 aus der oberen 50 kDa-Domäne sowie das Helix-Schleife-Helix-Motiv und Schleife-3 aus der unteren 50 kDa-Domäne an der Aktinbindung beteiligt (Geeves et al., 2005). Die obere und untere 50 kDa-Domäne sind durch eine Spalte von einander getrennt. Die Struktur von *DdMyosin-1E* im Komplex mit $MgADP \cdot VO_4$ repräsentiert den ungebundenen bzw. den schwach an Aktin gebundenen Zustand. Die Spalte zwischen der oberen und unteren 50 kDa-Domäne ist geöffnet. Während der Interaktion mit F-Aktin kommt es zur Annäherung beider Domänen, wodurch sich die Spalte schließt und sich die Interaktionsfläche zwischen Aktin und Myosin stark vergrößert (Conibear et al., 2003; Coureux et al., 2003; Reubold et al., 2003).

Der zentrale Kern der Myosinmotordomäne bildet die Nukleotidbindungstasche. Dieses katalytische Zentrum wird aus drei hochkonservierten Elementen aufgebaut, der P-Schleife mit der Konsensus-Sequenz GESG(A/S)GKT (25 kDa-Domäne), Schalter-1 mit der Konsensus-Sequenz N(N/D)NSSR. (ober 50 kDa-Domäne) und Schalter-2 mit der Konsensus-Sequenz DI(A/S/F/Y)GFE (untere 50 kDa-Domäne). Der Begriff Schalter wurde in Anlehnung an die G-Proteine verwendet, in denen ähnliche konservierte Bereiche an der Nukleotidbindung beteiligt sind. G-Proteine sind als molekulare Schalter in der zellulären Signaltransduktion beteiligt. Auch bei Kinesinen ist die Nukleotidbindungstasche in ähnlicher Form zu finden (Vale, 1996). Es wird daher vermutet, dass G-Proteine, Kinesine und Myosine einen gemeinsamen evolutionären Ursprung haben (Kull & Endow, 2002).

Konformationelle Änderungen innerhalb der Nukleotidbindungstasche werden über Schalter-2 an die *relay*-Helix übermittelt (s. Abb. 3). Die Kommunikation zwischen den beiden Strukturelementen erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Interaktionen. Die *relay*-Helix übermittelt die Bewegung von Schalter-2 an den Konverter (Fisher et al., 1995).

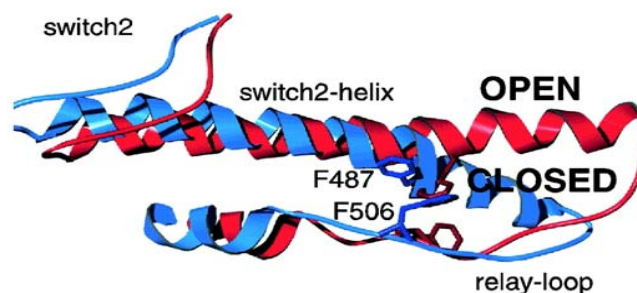


Abb. 3: Darstellung des Schalter-2-Bereichs und der *relay*-Helix aus *DdMyosin-2* in zwei verschiedenen Konformationen. Schalter-2 in der offenen Konformation ist rot dargestellt und Schalter-2 in der geschlossenen Konformation ist blau dargestellt. Die beiden dargestellten Phenylalanine sind essentiell für die hydrophoben Interaktionen in dieser Region und die produktive Kopplung der konformationellen Änderungen der Nukleotidbindungstasche mit der Konverter-Domäne (Tsiavaliaris et al., 2002).

Die Bewegung von Schalter-2 von der offenen in die geschlossene Konformation überbrückt 6 Å. Dies führt bei der *relay*-Helix zu einer partiellen Entwindung, einem Knick und einer Rotation um 60° - 65°. Die Rotation der *relay*-Helix wird durch starke hydrophobe Wechselwirkungen auf die Konverter-Domäne übertragen und löst das Zurückschwingen des Hebelsarms in die Position vor dem Kraftschlag aus (Dominguez et al., 1998; Tsiavaliaris et al., 2002; Koppole et al., 2006). Durch den umgekehrten Übergang von der geschlossenen in die offene Konformation löst Schalter-2 den

Kraftschlag aus. Die einzelnen strukturellen Elemente innerhalb der Motordomäne bewegen sich während des ATPase-Zyklus nur minimal (Holmes, 1997). Die kleinen konformationellen Änderungen werden durch den Konverter amplifiziert und auf den Hebelarm übertragen. Daraus folgt, dass das Ausmass des Kraftschlags von der Länge des Hebelarms abhängt (Anson et al., 1996; Uyeda et al., 1996; Ruff et al., 2001; Purcell et al., 2002). Mit Hilfe optischer Laserfallen kann die Bewegung des Hebelarms direkt gemessen und die Kraftentwicklung bestimmt werden (Steffen & Sleep, 2004).

Die Verwendung von künstlichen Hebelarmen macht es möglich verschiedene Myosin-Motordomänen mit identisch langen Hebelarmen zu versehen und so die funktionalen Eigenschaften der Motordomänen im Hinblick auf die Kinetik der ATP-Umsetzung und die Motoraktivität vergleichend zu charakterisieren. Der Einsatz eines künstlichen Hebelarms wurde zuerst von Anson et al. (1996) realisiert. Zwei α -Aktinin-Moleküle wurden so an die Motordomäne von Myosin-2 aus *D. discoideum* angebracht (s. Abb. 4), dass ein rigider Hebelarm entstand, der die struktureller Voraussetzung für eine effiziente Kraftübertragung erfüllte. Der künstliche Hebelarm weist eine Länge von 13 nm und entspricht annähernd der Länge des nativen Hebelarms. Vergleichbar mit der Kristallstruktur in Abbildung 6 wurde in dieser Arbeit ausschließlich mit Konstrukten gearbeitet, die einen Hebelarm aus zwei α -Aktininen besitzen.

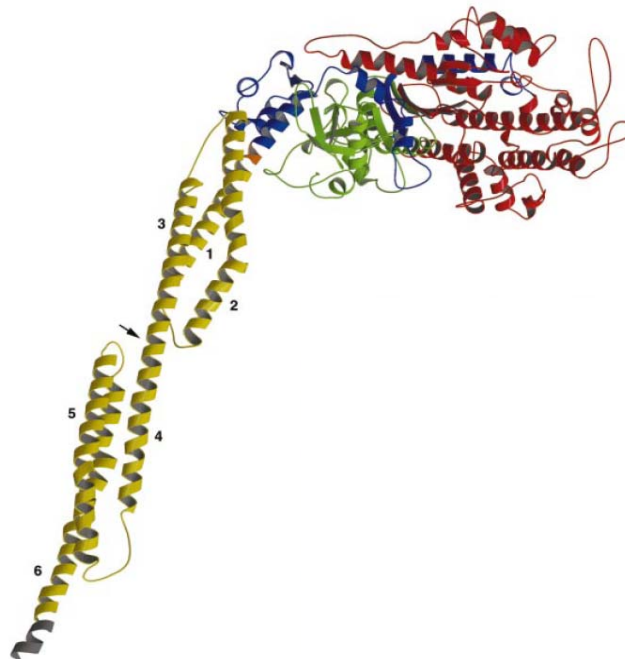


Abb. 4: Kristallstruktur von *Dd*Myosin-2 mit einem künstlichen Hebelarm aus 2 α -Aktinin-Molekülen (gelb). Der N-terminale Bereich der Motordomäne ist grün, die 50 kDa-Domäne ist rot und die Konverter-Domäne ist blau dargestellt. Der Übergang vom Konverter zum ersten α -Aktinin besteht aus 3 Aminosäuren und ist orange markiert. Der Übergang vom ersten zum zweiten α -Aktinin ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Das rekombinante Myosinkonstrukt besitzt einen C-terminalen Histidin-tag, der grau dargestellt ist (Kliche et al., 2001).

1.2.2. Molekularer Mechanismus des ATPase-Zyklus

Der Prozess der Kraft- und Bewegungsentwicklung von Myosinen beruht auf der katalytischen Spaltung von ATP. In den sechziger Jahren konnte H.E. Huxley Erkenntnisse über den möglichen Mechanismus der Kraftgenerierung durch die Auswertung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen gewinnen. Daten aus Röntgenstruktur-Analysen verfeinerten das damalige Modell der Muskelkontraktion, wobei die Bewegung als ein teleskopartiges ineinander Gleiten des parallel angeordneten Akto-Myosin-Komplexes beschrieben wurde (Huxley, 1969). Das mechanistische Modell der schwingenden Querbrücken konnte später durch kinetische Daten aus ATPase-Experimenten ergänzt werden (Lymn & Taylor, 1971).

Der ATPase-Zyklus mit der koordinierten Interaktion von Myosin-Motordomäne und Aktinfilament stellt ein hochkomplexes Geschehen dar, welches auch nach aktuellem Stand der Forschung nur modellhaft beschrieben werden kann. Neben den mechanistischen, funktionalen und kinetischen Daten fließen insbesondere Erkenntnisse aus diversen Kristallstrukturen der Myosinmotordomäne aus verschiedenen Zwischenzuständen des ATPase-Zyklus in das aktuelle Modell ein (u. a. Rayment et al., 1993; Fisher et al., 1995; Dominguez et al., 1998; Houdusse et al., 1999; Reubold et al., 2003; Fischer et al., 2005; Koppole et al., 2007).

Geeves et al. (2005) haben ein Modell des Akto-Myosin-ATPase-Zyklus entwickelt, das die wesentlichen Myosin-Zustände im Verlauf der ATP-Umsetzung zeigt (s. Abb. 5). Den dargestellten Abschnitten des Zyklus von a - f lassen sich weitere Unterschritte und zugehörige Konformationsänderungen zuordnen. Diese Unterschritte und ihre kinetischen Parameter sind allerdings noch nicht vollständig beschrieben und werden hier nicht näher berücksichtigt. Die folgende Nummerierung der Aminosäuren liegt einem Myosin-2 aus *D. discoideum* zugrunde.

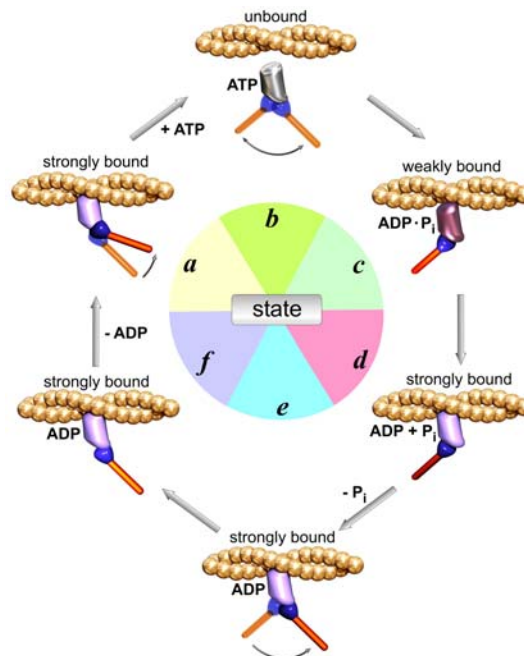


Abb. 5: Schematische Darstellung des Akto-Myosin-ATPase-Zyklus (Geeves et al., 2005). (a) ATP-Bindung an den Akto-Myosin-Komplex. (b) Dissoziation des Myosins und Zurückschwingen des Hebelarms in die Position vor dem Kraftschlag. (c) Im Anschluss an die ATP-Hydrolyse bindet zuerst schwach an Aktin. (d) Darauf folgt ein

Übergang in einen stark Aktin-bindenden Zustand. (e) Die starke Bindung an Aktin führt zu der Freisetzung von Phosphat aus dem Akto-Myosin-Komplex, welche den Kraftschlag auslöst. (f) Die Freisetzung von ADP führt bei manchen Myosinen zu einer zusätzlichen Bewegung des Hebelarms. Dadurch wird der anfängliche nukleotidfreie und stark Aktin-bindende Zustand wiederhergestellt.

Bei der Betrachtung des Akto-Myosin-ATPase-Zyklus werden ungebundene bzw. schwach Aktin-gebundene und stark Aktin-gebundene Zustände für das Myosin unterschieden. Die Verweildauer des Myosins am Aktinfilament in einem stark Aktin-gebundenen Zustand wird als *duty ratio* bezeichnet. Das bedeutet, dass sich Myosine mit einer hohen *duty ratio* die längste Zeit des ATPase-Zyklus in einem stark Aktin-gebundenen Zustand befinden (de la Cruz et al., 1999; Wang et al., 2000; Watanabe et al., 2006).

1.2.2.1. ATP-Bindung an Akto-Myosin und Dissoziation des Akto-Myosin-ATP-Komplexes

In Abschnitt (a) befindet sich das Myosin im *rigor*-Zustand. Schalter-1 und -2 aus der Nukleotidbindungstasche befinden sich in der offenen Konformation. Die physiologischen Konzentration von Mg^{2+} -ATP liegt im millimolaren Bereich, weshalb Mg^{2+} -ATP sehr schnell und nahezu irreversibel an Myosin bindet. Dabei erfolgt die erste Interaktion von der Nukleotidbindungstasche und ATP über die P-Schleife. Bei dieser Interaktion bewegt sich die P-Schleife auf das ATP zu und bewirkt gleichzeitig das beginnende Schließen von Schalter-1. Die Serine 236 und 237 aus Schalter-1 stabilisieren über koordinative Bindungen das γ -Phosphat und das Mg^{2+} -Ion. Durch die neue Ausrichtung von Schalter-1 wird eine existierende Salzbrücke zwischen Arginin 238 (Schalter-1) und Glutamat 459 (Schalter-2) zerstört (Reubold et al., 2003). Die geringen konformationellen Änderungen, die Schalter-2 während dieser Phase durchläuft, haben keinen Einfluss auf die Konverter-Domäne. Durch die Neuorientierung der P-Schleife und Schalter-1 öffnet sich der Spalt zwischen oberer und unterer 50 kDa-Domäne um bis zu 20 Å, was mit einer drastischen Abnahme der Affinität von Myosin zu Aktin und einer schnellen Dissoziation des Akto-Myosin-Komplexes einhergeht (Conibear et al., 2003; Goody, 2003).

1.2.2.2. Zurückschwingen des Hebelarms in die Position vor dem Kraftschlag und Hydrolyse

In Abschnitt (b) führt die Dissoziation des Akto-Myosin-Komplexes dazu, dass sich Schalter-2 in seiner geschlossene Konformation bewegt. Diese konformationellen Änderungen führen zum Zurückschwingen des Hebelarms in die Position vor dem Kraftschlag (Koppole et al., 2006). Zur Stabilisierung des Hydrolyse-kompetenten Zustands kommt es zur Rückbildung der Salzbrücke zwischen Arginin 238 und Glutamat 459 (Furch et al., 1999; Reubold et al., 2003).

Abschnitt (c) stellt den ATPase-Zyklus nach der Hydrolyse-Reaktion dar. Mg^{2+} -ADP·P_i ist in der Nukleotidbindungstasche gebunden und die für die Produktfreisetzung notwendigen konformationellen

Änderungen werden durch die Reassoziaton des Myosin an Aktin ausgelöst. Die zuerst schwache Aktinbindung führt zu einer Entfernung der P-Schleife vom Nukleotid und der ersten Bewegung von Schalter-1, der eine Abschwächung der koordinativen Bindungen der Serine 236 und 237 führt (Holmes & Schröder, 2003; Coureux et al., 2003).

1.2.2.3. Phosphat-Freisetzung und Kraftschlag

In Abschnitt (d) ist der Übergang zu einem stark Aktin-bindenden Zustand dargestellt, welcher zu einer Beschleunigung der Phosphat-Freisetzung um den Faktor 100 führt (White et al., 1997).

Nach der Freisetzung von Phosphat folgt in Abschnitt (e) der Kraftschlag des Myosins. Eine weitere Bewegung von Schalter-1 in die offene Position führt zu einem vollständigen Verlust der Koordinationsbindung zum Mg^{2+} -Ion und der Salzbrücke zwischen Arginin 238 und Glutamat 459 (Koppole et al., 2006).

1.2.2.4. Stark an Aktin gebundener Zustand nach dem Kraftschlag

In Abschnitt (f) kommt es zu der Bewegung von Schalter-2 in die offene Position, die zu einer weiteren Destabilisierung von Mg^{2+} -ADP in der Nukleotidbindungstasche führt (Rayment et al., 1993; Zeng et al., 2004). Es kommt zu einer schrittweisen Freisetzung des Mg^{2+} -Ions und des ADP. Dadurch ist der ursprüngliche *rigor*-Zustand wiederhergestellt und die drei Elemente der Nukleotidbindungstasche liegen in der jeweils offenen Konformation vor. Die Freisetzung von ADP führt bei manchen spannungssensitiven Myosinen wie Myosin-1 aus *G. gallus* und *R. norvegicus* (Veigel et al., 1999) sowie Myosin-5 aus *M. musculus* (Veigel et al., 2002) zu einem zusätzlichen Kraftschlag von ungefähr 5 nm.

1.3. Direkte funktionale Assays zur Charakterisierung der Myosin-Motoreigenschaften

1.3.1. *In vitro*-Motilitätsassays zur Bestimmung der Aktin-Translokationsgeschwindigkeit

1.3.1.1. Ursprung des *in vitro*-Motilitätsassays

Der *in vitro*-Motilitätsassay erlaubt es kontraktile Prozesse des Akto-Myosin-Systems in Lösung direkt zu studieren. Myosine entwickeln durch die Hydrolyse von ATP eine Kraft, die im Pico-Newton-Bereich liegt (Veigel et al., 1998). Durch diese Kraft können - abhängig von der Myosinform - Bewegungsgeschwindigkeiten von wenigen Nanometern (nm) bis hin zu 100 Mikrometern (μ m) pro Sekunde generiert werden. Damit diese Motoreigenschaft der Myosine untersucht und auch quantifiziert werden kann, wurde Mitte der achtziger Jahre der *in vitro*-Motilitätsassay entwickelt. Die Grundlage dafür legten Sheetz und Spudich (1983) mit ihren Arbeiten. Sie konnten zeigen, dass sich Myosin-dekorierte Latexkügelchen nach Zugabe von ATP auf präparierten Aktinbündeln der

Glanzleuchter-Alge *Nitella axillaris* fortbewegen können. *In vivo* sind die peripheren Aktinbündel der Algenzelle für die bis zu $80 \mu\text{m s}^{-1}$ schnelle Rotationsströmung der Chloroplasten zuständig. Auf Grund unterschiedlicher Polaritäten benachbarter Aktinkabel änderten die Latexkügelchen teilweise unvermittelt ihre Bewegungsrichtung, so dass eine Bewegung auf Grund äußerer, unkontrollierbarer Einflüsse ausgeschlossen werden konnte.

Einen weiteren Grundstein für den in dieser Arbeit verwendeten *in vitro*-Motilitätsassay war die erstmalige Verwendung von Aktinfilamenten, die mit Tetramethyl-Rhodamin-Iso-Thiocyanat (Tritc)-Phalloidin markiert wurden (s. Abb. 6 (A)) (Yanagida et al, 1984).

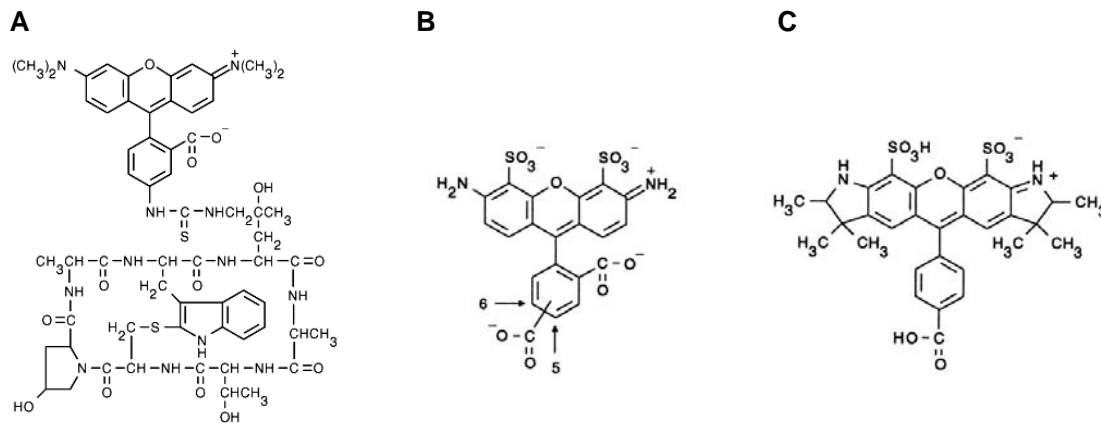


Abb. 6: (A) Strukturformel von Tetramethyl-Rhodamin-Iso-Thiocyanat (Tritc)-Phalloidin. Strukturformeln der Fluorophore (B) Alexa® 488 und (C) Alexa® 532.

Phalloidin, ein zyklisches Heptapeditoxin aus dem Grünen Knollenblätterpilz, bindet an Aktinfilamente und stabilisiert diese gegenüber der Zugkraftentwicklung der Myosine ohne deren kinetische bzw. funktionale Parameter zu beeinflussen (VanBuren et al., 1998). Phalloidin wird mittlerweile mit verschiedensten Fluorophoren konjugiert. Neben Tritc-Phalloidin wurden in dieser Arbeit Alexa-Fluorophore® verwendet (s. Abb. 6 (B+C)), welche sich durch eine hohe Stabilität und Quanten-Ausbeute auszeichnen.

1.3.1.2. Aufbau des *in vitro*-Motilitätsassays

Der direkte Vorläufer des heutigen *in vitro*-MotilitätsAssays wurde von Kron und Spudich (1986) entwickelt. In diesem Versuchsaufbau werden ausschließlich gereinigte Proteine verwendet, wobei das Myosin auf der Glasoberfläche eines Deckgläschens immobilisiert wird. Nach der Zugabe von fluoreszenzmarkierten Aktinfilamenten und ATP kann die gleitende Bewegung der Aktinfilamente fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden (s. Abb. 7).

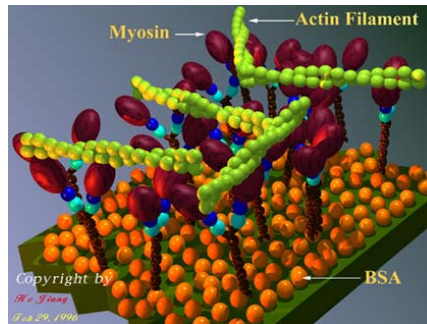


Abb. 7: Schematische Darstellung einer Deckglasoberfläche im *in vitro*-Motilitätsassay. Ein dimeres Myosin mit jeweils zwei leichten Ketten an der Nackendomäne ist über seine Schwanzdomäne an der Oberfläche immobilisiert. Der verbleibende Anteil der Oberfläche ist durch Rinderserumalbumin (BSA) blockiert. Die helikalen Aktinfilamente sind an der Myosin-beschichteten Deckglasoberfläche gebunden (NIH, Bethesda, Maryland).

Auf Grund der zufälligen Orientierung der einzelnen Myosinmoleküle auf der Deckglasoberfläche konnten Kron und Spudich beobachten, dass sich die Bewegungsrichtung der Aktinfilamente häufig änderte und niemals über längere Strecken linear verlief. Dieses Verhalten beruht auf der Polarität der Aktinfilamente. Die Myosine arbeiten in diesem Assay im Ensemble, wobei nur die Myosinmoleküle mit dem Aktinfilament produktiv zusammenarbeiten können, die eine annähernd richtige Orientierung zu dem polaren Filament besitzen. Auf Grund der Tatsache, dass alle Myosine einer Isoform ein Aktinfilament in die gleiche Richtung transportieren, kann sich die Bewegungsrichtung durch die Filament-Flexibilität ändern aber niemals umkehren. Nahezu sämtliche bekannten Myosine bewegen sich in Richtung Plus-Ende des Aktinfilaments. Zum jetzigen Zeitpunkt ist das Myosin-6 der einzige Myosin-Motor, der sich auf dem Aktinfilament in Richtung des Minus-Endes bewegt (Rock et al., 2001).

Ein Jahr nach der Arbeit von Kron und Spudich konnte mit Hilfe des *in vitro*-Motilitätsassays und Versuchen mit dem S1-Fragment des Myosin-2 (s. Abb. 1) aus dem Kaninchen-Skelettmuskel festgestellt werden, dass allein die Motordomäne des Myosins für die Bewegungsentwicklung ausreichend ist (Toyoshima et al., 1987). Auf Basis der S1-Struktur eine rekombinante Expression von Myosinen, die einen künstlichen Hebelarm besitzen, etabliert (s. Abb. 4) (Anson et al., 1996). Als künstlicher Hebelarm wurde α -Aktinin aus *Dictyostelium discoideum*, ein quervernetzendes Protein aus dem Aktin-Zytoskelett, das eine ähnliche Rigidität wie die natürliche Nackendomäne besitzt, verwendet. Das verwendete α -Aktinin ist aus 120 Aminosäuren aufgebaut und bildet eine *coiled-coil*-Struktur aus drei α -Helices mit einer Länge von 6,5 nm (Parry et al. 1992).

1.3.1.3. Datenauswertung beim *in vitro*-Motilitätsassay

Die Aufnahme von videomikroskopischen Sequenzen erlaubt es die Translationsgeschwindigkeit der entsprechenden Myosine zu bestimmen. Die Bewegungsgeschwindigkeiten der Aktinfilamente können in Abhängigkeit verschiedener Parameter durch das Verfolgen vieler einzelner Filamente quantifiziert werden. Eine Software-gesteuerte Datenauswertung bietet den Vorteil, dass eine sehr große Anzahl an Aktinfilamenten über die jeweiligen Bildsequenzen simultan verfolgt werden kann. Die Programme

bieten konfigurierbare Algorithmen zur Erkennung der Filamente und bilden bei deren Verfolgung so genannte Trajektorien (Flugbahnen; s. Abb. 8). Jede einzelne Trajektorie beinhaltet die Information über die Bewegungsgeschwindigkeit des entsprechenden Filaments, welche durch Pixelgröße und Bild zu Bild-Zeitintervall bestimmt wird.

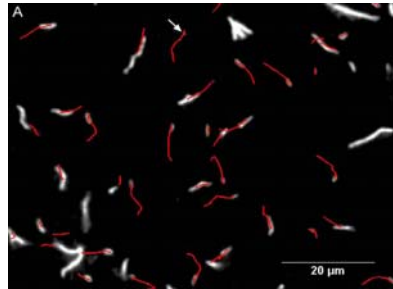


Abb. 8: Darstellung einer Software-gesteuerten Auswertung einer Bildsequenz aus dem *in vitro*-Motilitätsassay. Durch die Gleitbewegungen der fluoreszenzmarkierten Aktinfilamente generiert das Programm so genannte Trajektorien (rot). Trajektorien ohne zugehöriges Filament wurden durch vorher von der Oberfläche dissoziierte Filamente hervorgerufen (s. Pfeil).

Die Daten aus dem *in vitro*-Motilitätsassay können mit Hilfe der Gauß-Gleichung statistisch ausgewertet werden:

$$y = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\left(\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2\right)}$$

μ : Erfahrungswert; σ : Standardabweichung; π : Kreiszahl

In Abbildung 9 ist eine für Myosin-5b aus *D. discoideum* exemplarische Geschwindigkeitsverteilung dargestellt. Die Messung wurde bei 30°C mit einem rekombinanten Myosin mit einem künstlichen Hebelarm aus 2 α -Aktininen und C-terminalen Histidin-*tag* durchgeführt. Für den statistischen Mittelwert μ ergibt sich durch die Gauß-Verteilung der Wert 1,7 $\mu\text{m s}^{-1}$. Die Standardabweichung σ wird zu dem Wert 0,16 $\mu\text{m s}^{-1}$ bestimmt.

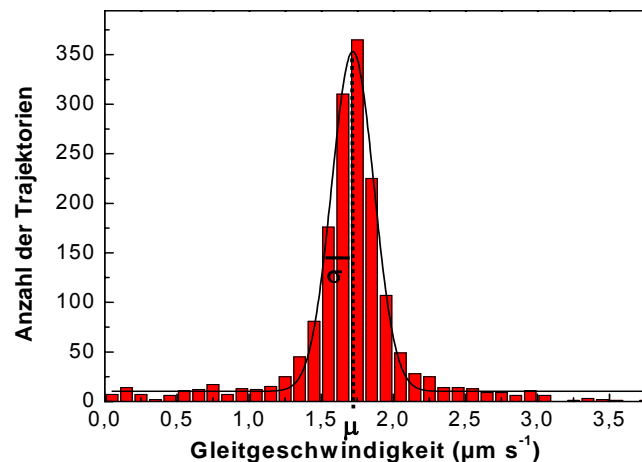


Abb. 9: Gleitgeschwindigkeitsverteilung von Myosin-5b aus *D. discoideum*. Das rekombinante Myosin hat einen künstlichen Hebelarm aus 2 α -Aktininen und einen C-terminalen Histidin-*tag*. Der *in vitro*-Motilitätsassay wurde bei 30°C durchgeführt. μ gibt die statistische mittlere Gleitgeschwindigkeit der Aktinfilamente an. σ gibt die Standardabweichung an.

Die zweifarbige Fluoreszenzmarkierung von Aktinfilamenten macht es mittlerweile möglich die Direktionalität der Bewegung eines Myosins im *in vitro*-Motilitätsassay zu beobachten. Die polare Fluoreszenzmarkierung beruht auf der Tatsache, dass die Plus-Enden der Aktinfilamente schneller wachsen als deren Minus-Enden (Wells et al., 1999; Tsiavaliaris et al., 2004).

Der *in vitro*-Motilitätsassay erlaubt es, den Einfluss von verschiedenen Pufferbedingungen, posttranslationale Modifikationen, oder Interaktionen mit anderen Proteinen auf Kraftgenerierungs- bzw. Bewegungsverhalten zu studieren. So können beispielsweise Produktinhibierungsprozesse der von Myosin-5 katalysierten Filamenttranslokation durch ADP quantifiziert werden, der Einfluss von pH, Salz- und Temperaturänderungen, Änderungen in ATP-Konzentrationen, oder Ca^{2+} und Mg^{2+} -Ionen Abhängigkeiten ermittelt werden (Anson et al., 1996; Joel et al., 2003; Fujita-Becker et al., 2005; Dürrwang et al., 2006; Taft et al., 2008). Durch den präzise definierten und zugleich einfachen Aufbau dieses Experiments können Myosine aus verschiedenen Klassen und Organismen schnell und reproduzierbar auf ihre funktionalen Motoreigenschaften untersucht werden.

1.3.2. Landeassay-Experimente zur Bestimmung der *duty ratio*

Der Landeassay stellt eine Weiterentwicklung des klassischen *in vitro*-Motilitätsassays dar, bei dem fluoreszenzmarkierte Aktinfilamenten über eine Myosindekorierte Oberfläche gleiten. Der Landeassay, inklusive der zugrunde liegenden mathematischen Theorie, wurde erstmals im Zusammenhang mit der Untersuchung der Prozessivität eines Kinesins beschrieben (Hancock & Howard, 1998). Der Aufbau dieses Experiments ist prinzipiell analog zu dem Gleitfilamentassay. Allerdings wird im Landeassay die Myosindichte an der Deckglasoberfläche genau definiert und im Verlauf des Experiments schrittweise erniedrig. Bei der statistischen Auswertung des Landeassays wird überprüft, wie viele Aktinfilamente pro Quadratmillimeter und Sekunde, in Abhängigkeit von der Myosindichte pro Quadratmikrometer, an der Deckglasoberfläche landen und sich über eine definierte Minimaldistanz fortbewegen, bevor sie wieder von der Myosinoberfläche dissoziieren (Rock et al., 2000). Der Vorgang der Filament-Landung, -Bewegung und -Dissoziation wird als Landeereignis bezeichnet.

Der Landeassay ist geeignet, um Myosine qualitativ auf ihr prozessives Verhalten bzw. ihre *duty ratio* zu untersuchen. Bei einem klassischen nicht-prozessiven Myosin sind mit zunehmender Verdünnung nicht mehr genügend Myosin-Motordomänen in einen stark Aktin-bindenden Zustand präsent, um ein Aktinfilament an der Oberfläche zu halten und zu transportieren. Im Gegensatz dazu sind prozessive Myosine, die sich den größten zeitlichen Anteil des ATPase-Zyklus im stark Aktin-bindenden Zustand befinden, selbst mit einem einzigen doppelköpfigen Myosinmolekül in der Lage ein Aktinfilament über einen längeren Zeitraum zu binden und eine Bewegung zu initialisieren.

Trägt man die Anzahl der Landeereignisse in Abhängigkeit der Myosindichte doppelt-logarithmisch auf, können die Landeraten an das Modell von Hancock und Howard angepasst werden. Die Landerate L wird als Funktion der Myosindichte ρ dargestellt: $L(\rho) = Z(1 - e^{-\rho/\rho_0})^n$. Dadurch ergibt sich die Ordnung (n) des beobachteten Landeprozesses (s. Abb. 10). Ein Wert von $n = 1$ würde bedeuten,

dass ein Myosinmolekül ausreicht, um ein Landeereignis zu generieren. Je größer der Wert für n wird, desto niedriger ist der Grad der Prozessivität des untersuchten Myosins.

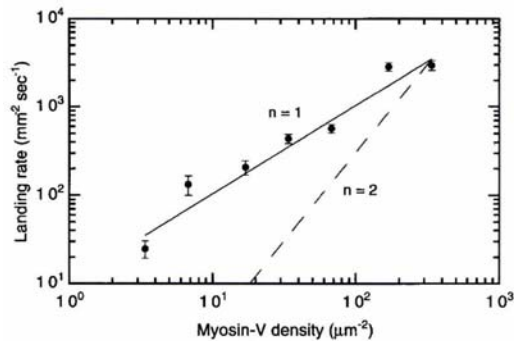


Abb. 10: Landeprozess eines prozessiven Myosin-5. Über das Modell von Hancock und Howard ergibt sich eine Ordnung von $n = 1$ für den Landeprozess. Das bedeutet, dass ein Molekül des Myosins ausreicht, um ein Landeereignis zu generieren. Der Verlauf eines hypothetischen Landeprozesses mit der Ordnung $n = 2$ wird durch die gestrichelte Linie dargestellt (Rock et al., 2000).

Bedingt durch den systematischen Fehler bei der Errechnung der Myosindichte aus der Proteinkonzentration sind absolute Aussagen bzw. quantitative Prozessivitätsmessungen mittels Landeassay nicht möglich. Durch eine vergleichende Analyse von zwei oder mehr Datensätzen werden allerdings die relativen Änderungen der verschiedenen Landeprozesse deutlich und es ist möglich eine qualitative Aussage über die *duty ratio* der Myosine zu treffen.

1.3.3. Einzelmolekül-Experimente zur Bestimmung der Prozessivität

Prozessive doppelköpfige Myosine, wie z. B. Myosin-5 oder Myosin-6, führen mehrere aufeinanderfolgende Schritte entlang eines Aktinfilaments aus, ohne vom Filament zu dissoziieren. Die Myosine müssen dafür zwangsweise in der Lage sein mit beiden Motordomänen gleichzeitig an das Filament zu binden (Mehta et al., 1999; Walker et al., 2000). Trotz umfangreicher Untersuchungen der prozessiven Myosine existiert bis heute noch kein allgemeines Modell, welches alle mechanistischen und kinetischen Aspekte der Prozessivität vereint und erklärt.

Für Myosin-5 wurde eine prozessive Bewegung nach dem *hand over hand*-Modell postuliert. Dabei bleibt ein Kopf immer an das Aktinfilament gebunden, während sich der zweite in einem 36 nm Schritt (eine Drehung des Aktinfilaments; *pseudorepeat*) zu der nächsten Bindungsstelle weiterbewegt (Forkey et al., 2003; Yildez et al., 2003). Durch die Markierung der Motordomänen des dimeren Myosin-5 mit verschiedenfarbigen Quantumdots konnte die Bewegung des Myosins nach dem *hand over hand*-Mechanismus und die Schrittweite von 36 nm (Distanz von hinterer zur vorderer Motordomäne) bzw. 72 nm (Distanz zwischen zwei Aktin-Bindungsstellen einer Motordomäne) bestätigt werden (Warshaw et al., 2005).

Zurzeit wird kontrovers diskutiert wie sich die 36 nm-Schrittweite von Myosin-5 aufbaut. Veigel et al. (2002) vertreten die Auffassung, dass dieser Schritt durch einem Kraftschlag von 25 nm mit anschließender Diffusion um weitere 11 nm entlang des Aktinfilamentes entsteht. Durch Diffusionsprozesse könnte die Diskrepanz zwischen der Länge eines Kraftschlages (25 nm) und der Schrittlänge von Myosin-5 erklärt werden. Zur Diskussion steht auch ein längerer Kraftschlag, weil Ungenauigkeiten in den Messungen zu einer Unterschätzung der Länge des Kraftschlages führen kann (Sleep et al., 2005; Brenner, 2006). Aktuellere wissenschaftliche Publikationen räumen der Brownschen Molekularbewegung eine deutlich größere Beteiligung bei der prozessiven Bewegung ein (Okada et al., 2007; Shiroguchi & Kinoshita, 2007).

Zur Überbrückung der Schrittweite von 36 nm während der prozessiven Bewegung eines dimeren Myosin-5 ist ein ausreichend langer Hebelarm notwendig (Purcell et al., 2002). Darüber hinaus bedarf eine effiziente und gerichtete Bewegung entlang des Aktinfilamentes einer Koordination der beiden Motordomänen. Intramolekulare Spannung führt bei Myosin-5 dazu, dass die vordere Myosin-Motordomäne so lange ADP gebunden hat am Aktin gebunden bleibt, bis sich die hintere Motordomäne zur nächsten Bindungsstelle am Aktinfilament bewegt (s. Abb. 11) (Rosenfeld & Sweeney, 2004; Purcell et al., 2005; Veigel et al., 2005). Dieser synchronisierende Effekt auf den chemo-mechanischen Zyklus der zwei Köpfe erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass die hintere Myosin-Motordomäne zuerst dissoziiert und erhöht gegenüber einem System ohne Spannungssensitivität die Anzahl an prozessiven Schritten vor der Dissoziation des gesamten Moleküls.

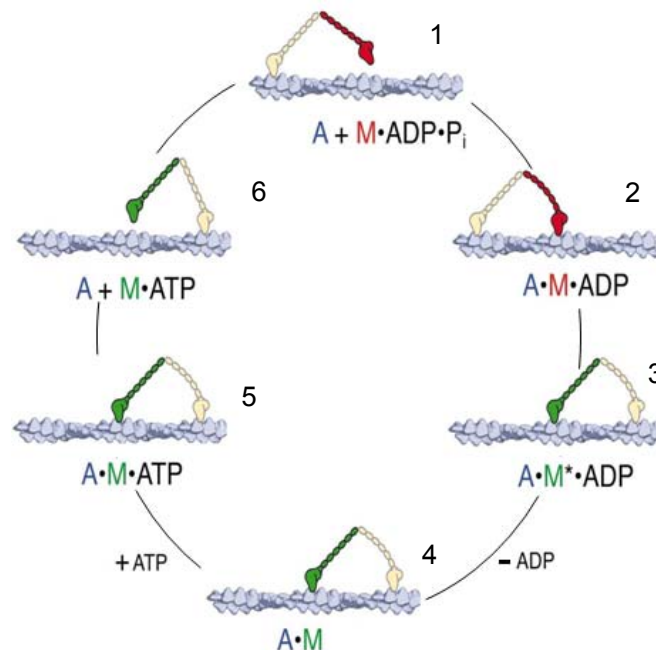


Abb. 11: Intramolekulare Spannung als Grundlage der Prozessivität von Myosin-5. 1. Die vordere Myosin-Motordomäne (Darstellung incl. Nackendomäne mit 6 IQ-Motiven) befindet sich in der Konformation vor dem Kraftschlag (rot) und hat ADP und P_i gebunden. 2. Die Aktin-Bindung führt zur P_i -Freisetzung und der Kraftschlag wird ausgeführt, sobald der hintere Kopf vom Aktinfilament dissoziiert. 3. Durch den Kraftschlag ändert sich die Orientierung des Myosins. Die hintere Myosin-Motordomäne wird nach vorne geschwungen. Die gebundene Motordomäne befindet sich nun in der Konformation nach dem Kraftschlag (grün). 4. Es kommt zur ADP-

Dissoziation und 5. anschließend kann ein neues ATP-Molekül binden. 6. Das führt zur Dissoziation der Motordomäne vom Aktinfilament und folglich kann auch diese Motordomäne durch den Kraftschlag der vorderen Motordomäne zur nächsten Aktinbindungsstelle geschwungen werden. Intramolekulare Spannung trägt dazu bei, dass die Myosinmotordomäne, die einer rückwärtsgerichteten Kraft ausgesetzt ist (rot), ADP langsamer freisetzt, während die hintere Motordomäne, die vorwärtsgerichteter Kraft ausgesetzt ist (grün), das ADP schneller dissoziiert.

Die Entwicklung und der erste Einsatz dieses Einzelmolekülassays erfolgte, vergleichbar der mit Entwicklung des Landeassays anhand der Erforschung eines prozessiven Kinesins (Vale et al, 1996). Um die Bewegung von einzelnen Molekülen sichtbar zu machen, musste eine neue Mikroskopietechnik angewendet werden. Die Totale Interne Reflexions Fluoreszenz (TIRF)-Mikroskopie (s. Kapitel 1.4) ermöglicht die Beobachtung der Bewegung von einzelnen Motoren. Eine erste erfolgreiche wissenschaftliche Anwendung der TIRF-Mikroskopie in der Myosinforschung erfolgte durch die Visualisierung der Cy3-ATP-Umsetzung einzelner Myosinmoleküle in einer Pufferlösung (Funatsu et al., 1995).

Durch den Einzelmolekülassay lassen sich die Laufweiten, die Verweildauer am Filament (*dwell time*) und die Bewegungsgeschwindigkeit der einzelnen Moleküle bestimmen. Anhand der bekannten ATP-Umsatzgeschwindigkeiten für das Myosin können anschließend auch Aussagen über die Schrittweite des molekularen Motors getroffen werden (Sakamoto et al., 2008).

1.4. Totale Interne Reflexions Fluoreszenz-Mikroskopie

Mit der „Totale Interne Reflexions Fluoreszenz“ (TIRF)-Mikroskopie hat sich eine Weitfeld-Mikroskopiemethode etabliert, die eine sehr hohe Auflösung entlang der optischen (z)-Achse ermöglicht. Mit der TIRF-Mikroskopie wird nur ein 100 - 150 nm dünner Bereich der Probe beleuchtet. Im Gegensatz zur konventionellen Epifluoreszenz-Mikroskopie, bei der die gesamte Probe gleichmäßig beleuchtet wird und das Fluoreszenzsignal aus allen Fokus-Ebenen kommt, können mit TIRF-Mikroskopischen Aufnahmen mit einem sehr gutem Signal-Rausch-Verhältnis erzielt werden.

Grundlage des TIR-Effekts ist das Snelliussche Brechungsgesetz ($n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$) welches besagt, dass eine elektromagnetische Welle ihre Richtung verändert, sobald sie von einem transparenten Medium mit einem höheren Brechungsindex in ein anderes transparentes Medium mit einem niedrigeren Brechungsindex übergeht. Dabei wird der Lichtstrahl vom Lot weggebrochen und es gilt nach dem Brechungsgesetz, je größer der Eintrittswinkel θ_1 desto größer ist auch der Austrittswinkel θ_2 (s. Abb. 12). Bei einem bestimmten Einfallswinkel, dem so genannten kritischen Winkel θ_c , beträgt der Austrittswinkel des Lichtstrahls exakt 90° . Aus dem Snelliussche Brechungsgesetz ergibt sich für diesen Fall: $\theta_c = \sin^{-1}(n_2/n_1)$. Mit den typischen Brechungsindices für Glas ($n_1 = 1,52$) und Zytosol ($n_2 = 1,36 - 1,38$) ergibt sich ein kritischer Winkel θ_c von $63,47^\circ - 65,22^\circ$.

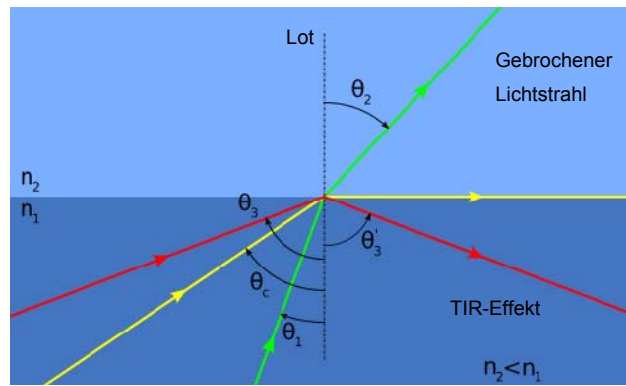


Abb. 12: Schematische Darstellung des physikalischen Verhaltens eines Lichtstrahls an einer Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlicher optischer Dichte (n), wobei n_1 eine höhere optische Dichte besitzt als n_2 . Die Winkel des einfallenden und gebrochenen bzw. reflektierten Lichtstrahls sind mit θ gekennzeichnet. Ab einem kritischen Winkel θ_c kommt es zur Totalreflektion (TIR) des Lichtstrahls innerhalb des optisch dichten Mediums. Bei der Totalreflektion bildet sich an der Grenzfläche der beiden Medien eine evaneszente Welle.

Für alle Eintrittswinkel die größer als θ_c sind, ergibt sich für den Lichtstrahl eine Totalreflektion. Das bedeutet, dass der Lichtstrahl das optisch dichtere Medium nicht mehr verlässt. In diesem Fall gilt nach dem Reflexionsgesetz, dass der Austrittswinkel θ_3' gleich dem Eintrittswinkel θ_3 ist. Im Zuge der Totalreflektion kommt es zu dem physikalischen Phänomen der evaneszenten (dahinschwindenden) Welle. Der Entstehungspunkt der evaneszenten Welle ist die Grenzfläche der beiden Medien mit unterschiedlicher optischer Dichte und sie breitet sich parallel zu dieser Grenzfläche aus. Ein weiteres Kennzeichen des evaneszenten Feldes (Anregungsfeld) ist ein exponentieller Intensitätsverlust mit zunehmender Entfernung vom Entstehungspunkt.

Die Energie des evaneszenten Feldes reicht aus, um Fluorophore innerhalb des Wellenfeldes anzuregen und kann somit bei der TIRF-Mikroskopie zur Anregung der Probe genutzt werden. Auf Grund des exponentiellen Intensitätsverlusts des evaneszenten Feldes können - in Abhängigkeit von der Eindringtiefe der evaneszenten Welle - nur Fluorophore innerhalb einer 100 - 150 nm dünnen Schicht oberhalb der Grenzfläche effektiv angeregt werden. Die Eindringtiefe der evaneszenten Welle ist abhängig von der Wellenlänge des Lichtstrahls, dem Brechungsindex der beiden Medien und dem Einfallswinkel. Die Eindringtiefe d wird über die folgende Formel bestimmt:

$$d = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_1 - n_2^2}}$$

λ : Wellenlänge des Anregungslichts; n : Brechungsindex; π : Kreiszahl

Probenbestandteile außerhalb dieses Bereichs werden nicht angeregt, wodurch sich die hohe axiale Auflösung und das sehr gute Signal-Rausch-Verhältnis ergeben. So können in der Zellbiologie durch die TIRF-Mikroskopie Membranvorgänge aufgelöst werden, die bei Anwendung der klassischen Epifluoreszenz-Mikroskopie, wegen der Autofluoreszenz des Zytosols, unsichtbar wären. In dieser Arbeit ermöglichte die Anwendung der TIRF-Mikroskopie die Auflösung von Oberflächen-gebundene Akto-Myosin-Interaktionen.

1.5. Enzym-Effektoren

Kleine organische Verbindungen können die Aktivität eines Enzyms sowohl positiv als auch negativ beeinflussen indem sie mit ihm in Wechselwirkung treten. Substanzen, die eine Absenkung der Aktivität des Enzyms bewirken, werden als Inhibitoren bezeichnet. Aktivierende chemische Verbindungen hingegen werden als Aktivatoren bezeichnet. Darüber hinaus können bei diesen Modulatoren irreversibel bindende und reversibel bindende Substanzen unterschieden werden. Reversibel bindende Inhibitoren werden anhand ihres Bindungsverhaltens in kompetitive (isosterische), unkompetitive und nicht-kompetitiv (allosterische) Inhibitoren unterteilt. Die verschiedenen Inhibierungsmechanismen lassen sich graphisch anhand eines Lineweaver-Burk-Diagramms unterscheiden (Voet et al., 2002).

Im zellulären Kontext regulieren Effektoren Stoffwechselprozesse. So kann das pflanzliche Enzym Ribulosebiphosphat-Carboxylase aus Chloroplasten erst nach seiner Aktivierung effektiv Kohlendioxid an Ribulosebiphosphat fixieren. Die Aktivierung beruht auf der Bindung von Kohlendioxid an die Aminogruppe des Lysins-201, wodurch ein Carbamat gebildet wird. Dabei kommt es zu konformationellen Änderungen des Enzyms, die durch die Bindung eines Mg^{2+} -Ions an das Carbamat stabilisiert werden. Diese allosterische Regulation unterdrückt eine unsinnige Enzymaktivität (Heldt, 1999). Enzym-Effektoren stellen heutzutage auch einen großen Anteil der modernen pharmazeutischen Produkte dar. So wird zum Beispiel eine Infektion mit dem Humanen-Immundefizienz-Virus (HIV) mit Inhibitoren der viralen reversen Transkriptase und der HIV-Protease therapiert (Sweeney & Klump, 2008). Es gibt eine Reihe Verbindungen die Einfluss auf die Myosin-Aktivität nehmen. Im Folgenden sollen die Myosin-Modulatoren, die bisher in der Literatur charakterisiert wurden, kurz aufgeführt werden.

1.5.1. Myosin-Effektoren

1.5.1.1. Trifluoperazin

Das Phenothiazin-Derivat Trifluoperazin (TFP, s. Abb. 13) ist ein bekanntes Medikament mit neuroleptischer Wirksamkeit. TFP wird bei der Behandlung von Patienten mit Psychosen und starken Angststörungen eingesetzt (Tune et al., 1981). Es blockiert als Dopaminantagonist die Dopaminrezeptoren und dämpft somit die Erregung und Aggressivität der Patienten.

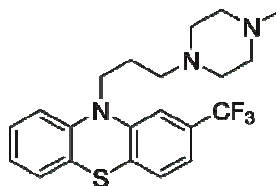


Abb. 13: Strukturformel von Trifluoperazin (TFP).

In der Myosinforschung wurde TFP als ein Calmodulin-Antagonist bekannt. In millimolaren Konzentrationen kann TFP die Bindung der regulatorischen leichten Kette sowohl an Myosin-2 aus

der glatten Muskulatur von Vertebraten blockieren bzw. rückgängig machen (Trybus et al., 1994; Yang & Sweeney, 1995). Der gleiche Effekt wurde auch mit Myosin-2 aus der gestreiften Muskulatur des Schließmuskels einer Jakobsmuschel festgestellt (Patel et al., 2000).

Bereits TFP-Konzentrationen im Bereich von 100 - 200 μM reichen aus, um die ATPase-Aktivität des Myosin-2 aus der Jakobsmuschel zu inhibieren (Patel et al., 2000). In den Studien wurde Motordomänen-Konstrukte eingesetzt, denen die Bindungsstellen für die leichten Ketten fehlen. Dies ist ein Nachweis für den direkter Effekt von TFP auf die schwere Kette des Myosins.

Die inhibierende Wirkung von TFP konnte mit verschiedenen anderen konventionellen und unkonventionellen Myosinen bestätigt werden (Sellers et al., 2003). Für die untersuchten Myosine lag die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) der ATPase-Aktivität im Bereich von 40 - 50 μM TFP. Sellers et al. (2003) setzten in ihrer Arbeit auch den *in vitro*-Motilitätsassay ein und waren damit in der Lage den inhibierenden Effekt von TFP auf die funktionalen Eigenschaften der Myosine direkt nachzuweisen. Allerdings waren, verglichen mit den ATPase-Experimenten, deutlich höhere TFP-Konzentrationen notwendig. Eine substanzielle Inhibierung und damit auch ein sichtbarer Effekt im *in vitro*-Motilitätsassay wurde erst mit 200 μM TFP erzielt. Sellers et al. (2003) postulierten, dass TFP während des ATPase-Zyklus den Übergang vom schwach zum stark Aktin-bindenden Zustand inhibiert. Dies würde dazu führen, dass nur wenige inhibierte Myosin-Moleküle im *in vitro*-Motilitätsassay die Bewegung der Aktinfilamente durch eine starke Bindung behindern.

1.5.1.2. N-Benzyl-p-Toluen-Sulphonamid

Im Jahre 2002 konnte mittels eines *high-throughput screenings* einer kommerziellen chemischen Bibliothek der reversible Myosininhibitor N-Benzyl-p-Toluen-Sulphonamid (BTS, s. Abb. 14) identifiziert werden (Cheung et al., 2002). Auf der Suche nach einem zellpermeablen, isoformspezifischen Klasse-2 Myosininhibitor wurden über 16300 chemische Verbindungen auf ihr Fähigkeit getestet, die Aktin-aktivierte ATPase-Aktivität der S1-Untereinheit des Skelettmuskel-Myosins aus Kaninchen reversibel zu inhibieren.

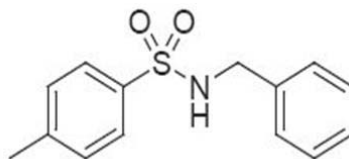


Abb. 14: Strukturformel von N-Benzyl-p-Toluen-Sulphonamid (BTS).

Im ATPase-Assay konnte für BTS, sowohl für die basale als auch für die Aktin-aktivierte ATPase, ein IC_{50} -Wert von 5 μM bestimmt werden. Daher wurde eine indirekte Inhibierung durch die Bindung von BTS an Aktin im initialen *high-throughput screen* ausgeschlossen. Ergebnisse aus funktionalen Untersuchungen im *in vitro*-Motilitätsassay und mit isolierten Muskelfasern bestätigten die inhibitorische Wirkung von BTS auf die Motoraktivität von Myosin-2 (Cheung et al., 2002).

Umfangreiche kinetische Untersuchungen mit Myosin-2 aus Kaninchen zeigten, dass BTS die Affinität von ADP-S1 und ADP-P_i-S1 zu Aktin deutlich herabsetzt (Shaw et al., 2003). Mit Hilfe des Phosphat-Bindungsprotein (White et al., 1997) konnte gezeigt werden, dass 100 µM BTS die Phosphat-Freisetzung, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei Klasse-2 Myosinen, in Anwesenheit von Aktin um den Faktor 100 verlangsamt. Damit konnten die von Cheung et al. (2002) beobachtete Inhibierung der Aktin-aktivierten ATPase transientenkinetisch mit der Inhibierung der Phosphat-Freisetzung begründet werden. Durch die deutlich reduzierten Aktin-Affinitäten von ADP-S1 und ADP-P_i-S1 wurde der verminderte Spannungsaufbau bei den Muskelfaser-Experimenten erklärt. Auf Grund ihrer Ergebnisse aus den kinetischen Experimenten mit BTS postulierten Shaw et al. (2003) eine Bindung von BTS in der Aktinbindungs-Spalte des Myosins.

1.5.1.3. Blebbistatin

Straight et al. (2003) wollten im Zuge von Studien zur Regulation der Zytokinese und der dafür notwendigen Kommunikation zwischen dem Aktin-Zytoskelett und dem Mikrotubuli-Zytoskelett, mittels eines *high-throughput screens* nach einem Inhibitor für das nichtmuskuläre Myosin-2 suchen. Mit Blebbistatin konnte eine kleine chemische Verbindung identifiziert werden, dessen (-)-Enantiomer (s. Abb. 15) höchst effektiv Myosine der Klasse-2 inhibiert.

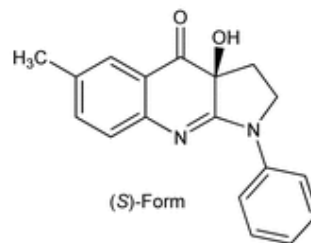


Abb. 15: Strukturformel von (-)-Blebbistatin.

Im ATPase-Assay mit dem humanen nichtmuskulären Myosin-2 konnte mit Blebbistatin eine IC₅₀ von 2 µM gemessen werden. In ähnlicher Weise wurde auch das Skelett-Muskel-Myosin-2 aus Kaninchen inhibiert, während Blebbistatin andererseits auf die humanen Myosine-1B, -5a und -10 keinen inhibitorischen Effekt zeigte. Mittels zellbiologischer Experimente, die mit humanen HeLa-Zellen durchgeführt wurden, konnte die direkte Inhibierung von Myosin-2-abhängigen Prozessen während der Zellteilung nachgewiesen werden. Innerhalb von 2 Minuten nach Zugabe von Blebbistatin ist das namensgebende *blebbing* der Zellen, die Abschnürung der bläschenförmigen Tochterzellen, nicht mehr möglich.

Zur Aufklärung des Inhibierungsmechanismus wurden kinetische Studien durchgeführt (Kovacs et al., 2004; Ramamurthy et al., 2004). Kovacs et al. (2004) führten eine umfassende kinetische Analyse von Blebbistatin mit dem S1-Fragment aus Myosin-2 (Skelettmuskel, Kaninchen) durch. Der IC₅₀-Wert für die Aktin-aktivierte ATPase liegt für Blebbistatin bei 0,4 µM, wobei der Inhibitor keinen Effekt auf den K_m-Wert der Aktin-aktivierte ATPase hat. Transientenkinetische Untersuchungen zeigten, dass der

Zerfall des quaternären Blebbistatin-S1-ADP-Pi-Komplex durch die Freisetzung von Blebbistatin oder Phosphat der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der inhibierten S1-ATPase ist.

Die Anwendung von *docking*-Simulationen mit verschiedenen Strukturen von Myosin-2 zeigten, dass Blebbistatin ein unkompetitiver Inhibitor ist, der in der Aktinbindungs-Spalte von Myosin-2 bindet (Kovacs et al., 2004).

Die strukturelle Grundlage der Myosin-Inhibierung durch Blebbistatin wurde durch Kristalle von Myosin-2 aus *D. discoideum* im Komplex mit Blebbistatin und MgADP-Vanadat erklärt (Allingham et al., 2005). Der MgADP-Vanadat-Komplex imitiert den MgADP-P_i-Zustand und konnte bis zu einer 2 Å-Auflösung dargestellt werden. Durch die Struktur wird eindeutig sichtbar, dass Blebbistatin im Scheitel der Aktinbindungs-Spalte in einem hydrophoben Bereich bindet. Allingham et al. (2005) vermuten, dass Blebbistatin durch seine Bindungsposition ein komplettes Schließen der Aktinbindungs-Spalte und damit den *rigor*-Zustand des Myosins unmöglich macht.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Die Konzentration an freien Mg²⁺-Ionen reguliert die Motoraktivität von Myosinen der Klasse 1 und Klasse 5 über eine Mg²⁺-sensitive ADP-Freisetzung aus dem Akto-Myosin-Mg²⁺ADP-Komplex. Dieser kinetische Parameter bestimmt maßgeblich die *duty ratio* der Myosine. Eine Sequenzanalyse der Schalter-2-Region deutet auf einzelne Aminosäure als Vermittler der Mg²⁺-Sensitivität und einer hohen *duty ratio* hin. Der molekulare Mechanismus einer niedrigen und hohen *duty ratio* sollte durch die funktionale Charakterisierung von Schalter-2 Punktmutanten mittels *in vitro*-Motilitätsassay und Landeassay aufgeklärt werden.

Die Integration von kontrollierbaren molekularen Motoren in biohybriden Systemen ist eine Voraussetzung für nanotechnologische Anwendungen von Motorproteinen. Mittels *protein engineering*-Werkzeugen wurden zwei artifizielle Myosin generiert: ein dimeres Konstrukt (M5P) und ein monomeres Konstrukt (M5S). Die Funktionalität, die Haltbarkeit und die Kontrollierbarkeit der Motoraktivität der beiden artifiziellen Myosine sollte auf künstlichen Oberflächen untersucht werden.

Kleine organische Verbindungen können die Motoraktivität von Myosinen modulieren. Pentabromopseudilin (PBP) ist ein Antibiotikum aus einem marinen Bakterium und inhibiert die Motoraktivität von Myosinen. Mit einer umfangreichen kinetischen und funktionalen Untersuchung der Inhibierung verschiedener Myosine aus den Klassen 1, Klasse 2 und Klasse 5 durch PBP sollte der molekulare Inhibierungs-Mechanismus aufgeklärt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Chemikalie

Aceton
 Acrylamid: N,N'-Methylenbisacrylamid (30:0,8), 40%ig
 Adenosin-5'-triphosphat, Na-Salz (ATP)
 Alexa488-Phalloidin
 Alexa635-Phalloidin
 Agar (Agar Bacteriological)
 Agarose (TopVision LE GQ Agarose)
 Ammoniumperoxodisulfat (APS)
 Ampicillin
 Benzamidin-Hydrochlorid
 Bradford Reagenz
 Bromphenolblau
 CaCl₂
 Coomassie Brilliant Blue G250
 Coomassie Brilliant Blue R250
 Cytochrom-C
 Dithiothreitol (DTT)
 Essigsäure
 Ethanol
 Ethidiumbromid
 Ethylendiamintetraacetat (EDTA, "Titriplex II")
 Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure (EGTA, "Titriplex VI")
 Geneticin (G418-Sulfat)
 Glucose
 Glycerin
 Glycin
 Guanidiniumhydrochlorid
 Salzsäure, 37 %ig
 Hefeextrakt ("BactoYeast Extract")
 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)
 Imidazol
 Isopropanol (2-Propanol)

Hersteller

J. T. Baker, Deventer, NE
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Molecular Probes, Eugene, USA
 Molecular Probes, Eugene, USA
 Oxoid Ltd., Basingstoke, UK
 MBI Fermentas, St. Leon-Rot
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Merck, Darmstadt
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Merck, Darmstadt
 Merck, Darmstadt
 Serva, Heidelberg
 Serva, Heidelberg
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 J. T. Baker, Deventer, NE
 J. T. Baker, Deventer, NE
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Merck, Darmstadt
 Merck, Darmstadt
 Calbiochem, Darmstadt
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Merck, Darmstadt
 Roth, Karlsruhe
 Becton Dickinson, Sparks, USA
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 BDH Laboratory Supplies, Poole
 Merck, Darmstadt

K_2HPO_4	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
KH_2PO_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
$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	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_2CO_3	Merck, Darmstadt
Na_2HPO_4	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaH_2PO_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
$NiSO_4 \cdot 6 H_2O$	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
Tetramethyl-Rhodamin-Iso-Thiocyanat (Tritc)-Phalloidin	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
 Peristaltische Pumpe Minipuls 2
 Pipetten 2-1000µl
 Spannungsquelle Power-Pac 300
 SDS-PAGE Apparatur Mini-Protean
 Western-Blot-Apparatur Trans-Blot SD
 Semidry Transfer Cell
 Geldokumentationssystem Chemidoc
 Eraser
 Mikroskop CK 2
 Fluoreszenzmikroskop IX 81
 Elektroporator Gene Pulser Xcell Electroporation System
 PCR-Thermoblock Px 2

 Photometer DU 800

 Stopped-Flow Applied Photophysics Pi-Star 180
 Stopped-Flow Hi-Tech Scientific SF-61SX2
 Orbital Shaker
 Gyrotory Shaker G2 und G10
 Ultraschallgerät Sonoplus UW 2200
 Ultrazentrifuge Optima LE-80 K
 mit Rotoren 70 Ti und 45 Ti

 Ultrazentrifuge Optima Max
 mit Rotor TLA 120.1
 Zentrifuge Avanti J-20 XP
 mit Rotoren JLA 16.250 und JA 25.50
 Zentrifuge Avanti J-HC mit Rotor TY.JS 4.2

Hersteller

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

 Biorad, München
 Raytest
 Olympus, Hamburg
 Olympus, Hamburg
 Biorad, München
 Thermo Electron Corp.,
 Boston, USA
 Beckman Coulter,
 Fullerton, CA, USA
 Applied Photophysics, GB
 Hi-Tech, GB
 Thermo Forma, MA, USA
 New Brunswick Sci., USA
 Bandelin Electronic, Berlin
 Beckman Coulter,
 Fullerton, CA, USA

 Beckman Coulter,
 Fullerton, CA, USA
 Beckman Coulter,
 Fullerton, CA, USA
 Beckman Coulter,

Zentrifuge Biofuge fresco	Fullerton, CA, USA
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau

2.1.3. Enzyme

Calf Intestine Alcaline Phosphatase 1 U/μl	Boehringer-Mannheim
Catalase	Sigma
Glucose-Oxidase	Sigma
Ribonuclease A 90 Kunitz-U/mg lysophil.	Serva
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas
Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase	Finnzymes
Lactatdehydrogenase 550 U/mg	Roche Diagnostics GmbH
Pyruvatkinase 200 U/mg	Roche Diagnostics GmbH
Apyrase >200 U/mg lysophil.	Sigma

2.1.4. Antibiotika

Ampicillin	GIBCO
Penicillin G 10000 U/ml / Streptomycin 10000 μg/ml	GIBCO
G418 Sulfat (Geneticin)	Calbiochem

2.1.5. Antikörper

Monoklonaler Maus-IgG Anti-(His) ₅ -Antikörper 0.2 mg/ml	Qiagen
Ziege IgG anti-Maus, HRP-konjugiert 10 μg/ml	Pierce

2.1.6. Marker

GeneRuler 1 kB DNA-Leiter (10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 Bp)	MBI Fermentas
Page Ruler Protein Ladder 10-200 kDa (200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 kDa)	US Biological

BenchMark™ Protein Ladder
(220, 160, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 kDa) Invitrogen

2.1.7. Organismen

E. coli XL1-Blue Stratagene
Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)], Kompetenz: 2×10^7 cfu/μg DNA

Dictyostelium discoideum-AX3 ORF⁺ D. J. Manstein (Manstein et al., 1989a)

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1. Transformation in *E. coli*

Der in *E. coli*-Stamm XL1-Blue wird für die Amplifikation von Plasmiden benutzt. Die Bakterien werden 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: 200 μl Bakteriensuspension (-80°C) werden zusammen mit 0,1 - 1 μg Plasmid-DNA auf Eis aufgetaut und 20 min. bei gelegentlichem Schütteln inkubiert. Im Anschluss folgt der 60 s Hitzeschock bei 42°C. Der Transformationsansatz wird mit 500 μl LB-Medium versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. 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

2.2.1.2. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Zu Beginn der Herstellung von kompetenter *E. coli*-Zellen werden 5 ml SOB-Medium mit *E. coli* beimpft und über Nacht bei 225 rpm und 37°C geschüttelt. Nach 16 Stunden werden 200 ml SOB-Medium mit 1 ml der Vorkultur beimpft und bei 225 rpm und 20°C geschüttelt, bis eine optische Dichte von $OD_{600} = 0,6$ erreicht wird. Der Kolben wird für 10 min auf Eis gekühlt, die Suspension zu je 100 ml in vorgekühlte Zentrifugenbecher überführt und schließlich bei 2300 rpm (Beckman JS-4.2) und 4°C für 10 min zentrifugiert. Die beiden Pellets werden in 33 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und bei 1500 rpm (Beckman JS-4.2) und 4°C für 10 min zentrifugiert. Jedes Pellet wird in 6 ml eiskaltem TB-Puffer mit 7% (v/v; Volumen/Volumen) DMSO resuspendiert. Die Suspension wird in 100 µl-Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

TB-Puffer:

250 mM KCl

10 mM HEPES

15 mM CaCl₂

55 mM MnCl₂ (steril filtriert, Zugabe von MnCl₂ erfolgt direkt vor Gebrauch).

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Transformation in *D. discoideum*

Die *D. discoideum*-Zellen werden bei einer Dichte von $3 - 5 \times 10^6$ Zellen/ml mittels eines Zentrifugationsschritts (1100 g / 5 min) geerntet. Im Anschluss wird zweimal mit kaltem Elektroporationspuffer gewaschen. Die Dichte der Zellen wird mit Elektroporationspuffer auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt.

0,8 ml der Zellsuspension werden zusammen mit 15 - 30 µg DNA in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß auf Eis gemischt und anschließend 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 KH₂PO₄

0,4 g/l Na₂HPO₄

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

2.2.2.2. Kultivierung von *D. discoideum*

Kleinere Kulturen von *D. discoideum*-Zellen werden in Gewebekultur-Petrischalen kultiviert. Größere Kulturen werden in Schüttelkulturen kultiviert. Die optimale Wachstumstemperatur beträgt jeweils 20°C. Dem HL5c-Medium 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 - 20 µg/ml G418 selektiert werden können. Reine AX3 Orf⁺-Zellen werden ohne Zugabe von G418 kultiviert.

Auf den Petrischalen lässt man die Zellen konfluent wachsen und kann sie dann für weitere Zwecke (analytische Proteinpräparation, Überführung in einer Schüttelkultur) mit Medium abwaschen. Die verbleibenden Zellen werden durch Zugabe von frischem HL5c-Medium weiter kultiviert. Die Gewebekultur-Petrischalen können bei Bedarf bei 4°C für einige Wochen gelagert werden.

Für die präparative Proteinaufreinigung werden die Zellen in Erlenmeyer-Kolben (100 ml - 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 1×10^7 Zellen/ml erreichen, werden sie auf minimal 1×10^6 Zellen/ml verdünnt.

Die Generationszeit von *D. discoideum*-Zellen liegt bei 8 - 24 Stunden.

2.2.2.3. Herstellung von *D. discoideum*-Sporen und deren Konservierung

Die Zellen von *D. discoideum* können in Form von Sporen bei -80°C für mehrere Jahre gelagert werden. Die Herstellung von Sporen wird mit einer 50 - 100 ml Schüttelkultur gestartet. Bei einer Zelldichte von etwa 5×10^6 Zellen/ml werden die Zellen durch Zentrifugation (1000 g; 2700 rpm in einer Heraeus Megafuge 1.0R mit Rotor #2704 / 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. Innerhalb

dieser Zeit bildet sich der Fruchtkörper von *D. discoideum*, 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. Bei der Keimung von transformierten Zellen wird das Selektionsmedium (incl. G418) erst nach einer Wartezeit von 24 Stunden 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
----------	--------------------

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1. Präparation von Plasmiden

Die Vorschrift und die Puffer für die Präparationen von Plasmiden aus *E.coli* sind von der Firma Qiagen (Qiagen, Hilden). Hierbei handelt es sich um die Kombinationen der alkalischen Extraktionsmethode (Birnboim & Dory, 1979) mit anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung der DNA. Diese Methode ermöglicht die Abtrennung der Plasmid-DNA von chromosomaler DNA, RNA und Proteinen. In Abhängigkeit vom Kulturvolumen werden verschiedene, jedoch nur leicht unterschiedliche Protokolle verwendet.

Minipräparation:

Eine 4 ml *E. coli*-Kultur, die über Nacht bei 37°C im Schüttler gewachsen ist, wird bei 3500 g pelletiert und anschließend in Puffer P1 resuspendiert. Die alkalische Lyse der Zellen erfolgt über eine 5 min Inkubation mit Puffer P2. Die Neutralisation des Lysats erfolgt durch die Zugabe von Puffer N3 und eine 5 min Inkubation auf Eis. Die präzipitierten Proteine und chromosomale DNA werden durch eine Zentrifugation (9000 rpm) abgetrennt. Das klare Lysat enthält die Plasmid-DNA. Es wird auf eine QIAprep-spin-Säule gegeben. Die Plasmid-DNA bindet an die Säule und ein Waschschrift mit Puffer PE reinigt die Plasmid-DNA. Durch Zugabe von Puffer EB wird die DNA von der Säule eluiert.

Midi- und Maxipräparation:

Bei Midipräparationen beträgt das Kulturvolumen 100 ml, bei Maxipräparationen 250 / 500 ml. Die erste Schritte erfolgen analog zur Minipräparation. Allerdings wird nach Zugabe von Puffer P3 die Inkubationszeit auf 15 - 20 min verlängert. Im Anschluss folgt eine Zentrifugation für 30 min 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

2.2.3.2. Spaltung von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen

Bei der Restriktionsspaltung werden DNA-Fragmente aus Vektoren herausgeschnitten bzw. Vektoren linearisiert. Für eine Restriktionsspaltung werden 0,5 bis 5 µg DNA, Puffer (Ansatzgröße: 10 bis 50 µl) und 5 bis 30 U Enzym eingesetzt. Die kleineren Werte beziehen sich auf eine analytische Spaltung. Der Reaktionsansatz wird 1 - 4 Stunden oder über Nacht bei der vom Enzym-Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert, anschließend mit 5 - 25 µl Stoppuffer versetzt und auf einem Agarosegel analysiert.

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

2.2.3.3. Ligation von linearisierter DNA

100 - 500 ng linearisierte Plasmid-DNA und ein passendes DNA-Insert werden im molaren Verhältnis 1:1 - 1:5 (Rahmen / Insert) gemischt. Der Ligationsansatz wird 2 - 10 U Ligase versetzt und mit Ligasepuffer aufgefüllt. 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 *E. coli*s eingesetzt werden.

T4 DNA Ligase-Puffer 10x:

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

2.2.3.4. Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese eignet sich zur präparativen und analytischen Auftrennung von DNA ab einer Größe von 250 Basenpaaren. Ein 1%iges Agarosegel (1 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer) ist ein Standardgel. Die Suspension aus Agarose und Puffer wird in der Mikrowelle aufgeköcht und so gelöst. Die Lösung wird in eine horizontale Gelkammer gegossen, die den gewünschten Probenaschen-Kamm enthält. Nachdem das Agarosegel verfestigt ist, wird es mit TAE-Puffer überschichtet. Der Gellauf erfolgt über etwa eine Stunde bei 70-100 mA. Die aufgetrennte DNA im Gel wird mit 0,04% Ethidiumbromid für 10 min angefärbt. Im Anschluss wird durch eine Inkubation für 10 min in Wasser das Gel von überschüssigen Ethidiumbromid befreit. Das Elektrophorese-Muster wird anschließend unter UV-Licht (312 nm) betrachtet und 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

2.2.3.5. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Unter UV-Licht wird das entsprechende DNA-Fragment aus einem Agarosegel genau ausgeschnitten (bis zu 400 mg) und in ein Reaktionsgefäß überführt. Pro 100 mg Gel werden 300 µl Puffer QG zugegeben und das Gemisch bis zur vollständigen Auflösung des Gels bei 50°C inkubiert (ca. 10 min). Pro 100 mg Gel werden anschließend 100 µl Isopropanol zugegeben. Der Ansatz wird nun auf eine QIAquick-spin-Säule überführt und eine Minute zentrifugiert (10.000 g). Die DNA auf der Säule wird mit 700 µl PE-Puffer gewaschen. Danach wird die DNA mit 30 - 50 µl warmen EB-Puffer eluiert.

2.2.3.6. Isolierung von genomischer DNA aus *D. discoideum*

Charette und Cosson (2004) entwickelten das Protokoll der Isolierung von genomischer DNA aus *D. discoideum*. Die isolierte genomische DNA wurde als PCR-Template eingesetzt, um das myoH-Gen aus *D. discoideum* zu amplifizieren und anschließend in Expressionsvektoren zu klonieren.

Die *D. discoideum* Zellen einer Schüttelkultur mit einer Zellzahl von $0,5 - 10 \times 10^6$ Zellen/ml werden pelletiert und in gleicher Konzentration in frischem HL5c Medium resuspendiert. Dazu wird ein gleiches Volumen an Lysis-Puffer gegeben und diese Mischung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wird die Suspension zur Inaktivierung der Proteinase K für 1 min auf 95°C erhitzt. 1 μl des Lysats kann direkt für einen 25 μl PCR-Ansatz verwendet werden.

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 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Proteinase K

2.2.3.7. Dephosphorylierung von DNA

Die Abspaltung des Phosphats wird von der Alkalischen Phosphatase (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*, CIAP) katalysiert. Dieses Enzym ist in den gängigen Restriktionsendonukleasepuffern aktiv, so dass sie direkt nach einer Restriktionsspaltung der Reaktionsmischung zugesetzt werden kann. Es werden 1 U CIAP pro 20 pmol DNA verwendet. Der Reaktionsansatz wird für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die CIAP durch Erhitzen auf 85°C (ca. 20 min) inaktiviert.

CIAP-Puffer 10x:

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

2.2.3.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ermöglicht eine spezifische *in vitro*-Amplifikation von DNA. 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. In dieser Arbeit wurde auch die *Phusion Hot Start high Fidelity* DNA-Polymerase eingesetzt (Finnzymes).

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

Ein analytischer PCR-Ansatz enthält die folgenden Komponenten:

2 ng *Template*-DNA
 je 0.5 µl 0.1 mM Primer
 0.5 µl 10 mM dNTP-Mix
 5 µl 5x-Puffer
 0.5 U Polymerase
 ad 25 µl H₂O.

Die Bedingungen für einen optimalen Ablauf der PCR sind stark von der Zusammensetzung des PCR-Ansatzes abhängig, insbesondere die Schmelztemperaturen der verwendeten Primer sind zu beachten. Prinzipiell jedoch besteht die PCR aus drei Abschnitten. Im Anschluss an die anfängliche Denaturierung der *Template*-DNA binden die beiden Primer an die DNA-Einzelstränge und die Polymerase kann den folgenden DNA-Abschnitt synthetisieren (Elongation). Danach beginnt der Zyklus von vorne. In Tabelle 1 ist ein Standard-Ablauf einer PCR-Reaktion zusammengefasst.

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

Tab. 1: Ablauf einer PCR-Reaktion

2.2.3.9. Verwendete Oligonukleotide

Für die Amplifizierung des Gens von Myosin-5a aus genomischer DNA von *D. discoideum* (myoh; DDB_G0289447; Dictybase) wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz</u>
Fhmyohfrwbamh1	5'-CCG GAT CCA TTG ATA ATA ATT GTG GTA AAG AAA AAG TAT GGG-3'
Fhmyohrxhol1	5'-CCT CGA GTT GCA CTG TTT ATC ATG GTT TGT GAT CTT AAC AAT TCC-3'

2.2.3.10. Aufreinigung von PCR-Fragmenten

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.

2.2.3.11. pGEM-TEasy-Klonierung und *Blue-White-Screening*

Die amplifizierten PCR-Fragmente wurden mit dem linear vorliegenden pGEM-TEasy-Vektor (Promega) ligiert. Das gewonnene Plasmid konnte weiter vervielfältigt und sequenziert werden. Der pGEM-TEasy-Vektor ist mit dem Enzym *Topoisomerase I* verknüpft, das die Ligation erleichtert. Durch die Einführung des PCR-Inserts in den Vektor kommt es zu einer Unterbrechung des integrierten *lacZ*-Gens, das Bakterien die Expression von β -Galaktosidase erlaubt. Somit können leere, religierte pGEM-Vektoren von Vektoren mit PCR-Produkt unterschieden werden. Für das *Blue-White-Screening* müssen die transformierten Bakterien mit 20 mg/ml X-Gal und 200 mg/ml IPTG ausgestrichen werden. IPTG induziert die Expression der β -Galaktosidase, die X-Gal zu einem blauen Farbstoff umsetzt. Bakterien mit einem Plasmid ohne PCR-Produkt bilden somit blaue Kolonien, während Klone, die einen pGEM-TEasy-Vektor mit Insert enthalten, weiß bleiben.

2.2.3.12. Verwendete Expressionsvektoren

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Vektoren handelt es sich um Derivate des *D. discoideum*-Vektors pDXA (Manstein et al., 1995). Die Vervielfältigung der Vektoren erfolgte in dem *E. coli* Stamm XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg). Die Vektoren dienen zur Expression 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* Kassette 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.

In dieser Arbeit kam ein pDXA-3H-Vektor zum Einsatz, der zusätzlich zu den bereits aufgeführten Merkmalen eine *downstream* der MCS gelegene Sequenz enthält, die für ein Histidin-Oktamer codiert. Somit können C-terminal Histidin-*tag*-haltige Fusionsproteine zur Aufreinigung mit Ni²⁺-NTA-Agarose exprimiert werden. Daneben wurde ein pDXA-3FLAG-Vektor verwendet. Dieser Vektor (Knetsch et al., 2002) enthält anstelle des Histidin-*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.

2.2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die Bestimmung einer Proteinkonzentration nach Bradford (1976) beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs *Coomassie Brilliant Blue* G250. Der Farbstoff im Bradford-Färbereagenz ändert sein Absorptionsmaximum in Gegenwart von Proteinen von 465 zu 595 nm. Der Farbstoff bindet dabei relativ unspezifisch an kationische und hydrophobe Seitenketten.

Für die Konzentrationsbestimmung werden 1-20 µl Proteinlösung in einer 1 ml Einwegplastikküvette mit 950 µl 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.

2.2.4.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen über UV-Absorption

Die Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin absorbieren Licht bei einer Wellenlänge von 280 nm. Über die Absorption kann die Proteinkonzentration einer Lösung bestimmt werden. Der Extinktionskoeffizient eines bekannten Proteins kann mittels seiner Sequenz durch das Programm 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. Bei YFP-Fusionsproteinen kann alternativ auch die Absorption des Fluorophors bei 514 nm bestimmt werden.

2.2.4.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970) trennt Proteingemische anhand ihres Molekulargewichts. Die Methode wird sowohl für die Überprüfung der Expression bei der analytischen Proteinpräparation als auch zur Reinheitsbestimmung bei der Proteinaufreinigung eingesetzt. Das

Polyacrylamidgel besteht aus einem Trenngel und einem Sammelgel. Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel ist im Anschluss an diese Beschreibung angegeben. Der Gellauf erfolgt in einer Minigelkammer. Die Proteinproben werden vor dem Auftragen mit Laemmliauftragspuffer versetzt und 15 min auf 95°C erhitzt. Der SDS-Gellauf erfolgt bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA. Der Fortschritt wird in regelmäßigen Abständen über die Position der Bromphenolblau-Bande verfolgt. Das Gel kann nach Abschluss der Elektrophorese direkt mit Coomassie-Färbelösung angefärbt werden und anschließend in 6%iger Essigsäure entfärbt werden. Alternativ kann mit dem SDS-Gel ein Western-Blot durchgeführt werden. Zur Größen-Abschätzung der verschiedenen Proteinbanden im Gel stehen verschiedene Proteinstandards zur Auswahl (s. unten).

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

Laemmli-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:

6% (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

2.2.4.4. Western-Blot

Zur Detektion rekombinanter Proteine wird ein Western-Blots nach dem Verfahren des *Semi Dry-Blottings* durchgeführt. Hierzu wird das Acrylamidgel nach der Elektrophorese für einige Minuten in Blotpuffer gelegt. Eine Nitrocellulose-Membran (PROTRAN Nitrocellulose Transfer Membran) wird auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten. 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 60 min auf die Membran geblottet. Zur Kontrolle der Blot-Effizienz kann das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt werden. Alternativ kann die Membran mit einer Lösung aus 2% Ponceau S in 3% TCA gefärbt werden, um den Proteintransfer zu überprüfen.

Die Membran wird nun für 30 min bei Raumtemperatur 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 Raumtemperatur für eine Stunde. Es folgen wiederum drei Waschschritte in TBST für je 20 min. Der sekundäre Antikörper ist mit *Horseradish* Peroxidase (Peroxidase aus dem Meerrettich) 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

2.2.4.5. Analytische Proteinaufreinigung

Der Grad der Expression von rekombinanten Myosinkonstrukten in *D. discoideum* kann mittels einer analytischen Proteinpräparation untersucht werden. Dazu werden ca. 3×10^7 Zellen durch fünfminütige Zentrifugation bei 3500 rpm pelletiert. Das Zellpellet wird mit 1 ml Lysispuffer 1 gewaschen und erneut pelletiert. Im Anschluss wird das Pellet in 500 µl Lysispuffer 2 resuspendiert. Durch die Zugabe des gleichen Volumens Lysispuffer 3 beginnt die Lyse-Reaktion und es folgt eine einstündige Inkubation auf Eis. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wird der Überstand verworfen. Das Pellet der Lyse wird mit Lysispuffer 1 gewaschen und erneut für 20 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Wiederum wird der Überstand verworfen und das im Pellet, in dem das Myosin enthalten ist, wird durch Zugabe von 40 µl Lysispuffer 4 unter Verwendung eines Mikropistills extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation für 20 Minuten bei 13000 rpm befindet sich Myosin im Überstand. Der Überstand wird mit 6x-Protein-Auftragspuffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Von dieser Myosin-haltigen Lösung werden 10 µl für die Analyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Als Vergleich dient eine analytische Proteinpräparation aus *DdAX3-ORF*⁺.

Lysispuffer 1:

50 mM Tris/HCl pH 8.0, 2.5 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, Protease-Inhibitor Mix I (frisch hinzugefügt), Protease-Inhibitor Mix II (frisch hinzugefügt).

Lysispuffer 2:

Lysispuffer 1, 1 U CIAP/Probe (frisch hinzugefügt).

Lysispuffer 3:

Lysispuffer 1, 1 % v/v Triton-X 100.

Lysispuffer 4:

Lysispuffer 1, 12 mM MgCl₂, 10 mM ATP (frisch hinzugefügt).

100x Protease-Inhibitor Mix I:

10 mg/ml TAME, 8 mg/ml TPCK, 0.2 mg/ml Pepstatin A, 0.5 mg/ml Leupeptin, in Ethanol abs.

1000x Protease-Inhibitor Mix II:

100 mM PMSF, in Ethanol abs.

2.2.4.6. Präparative Proteinaufreinigung

Das Prinzip der präparative Proteinaufreinigung ist analog zur analytischen Präparation. Die beiden Verfahren unterscheiden sich nur in der verarbeiteten Zellmenge sowie durch die Affinitätschromatographie nach der Extraktion des Myosins (Manstein & Hunt, 1995).

16 l einer Schüttelkultur exprimierenden *D. discoideum*-Zellen werden bei einer Zelldichte von 5×10^6 - 1×10^7 Zellen/ml geerntet. Die Zellen werden hierfür 5 min bei 4200 rpm (Rotor JS-4.2) pelletiert und anschließend mit 0,5 l PBS-Puffer gewaschen und erneut pelletiert. Sämtliche Präparationsschritte finden auf Eis bzw. bei 4°C statt. Das Nassgewicht des Zell-Pellets wird für die Ermittlung der Puffervolumina bestimmt. Bei einer normalen Zellgröße ist von ca. 40 - 80 g auszugehen. Die Zellen werden in 4 bis 8 ml/g Zellen Lysispuffer I gründlich resuspendiert. Diese Suspension wird für eine Minute mit Ultraschall behandelt (3/4 Füllhöhe, 50 % *Power Setting*, 40 % *Duty Cycle*). Nach Zugabe des gleichen Volumens an Lysispuffer II wird die Suspension zur weiteren Zellyse für 45 Minuten unter leichtem Rühren bei 4°C inkubiert. Im Anschluss an die Lyse erfolgt eine Zentrifugation für 1 Stunde bei 16000 rpm (Rotor JLA 16.250). Danach wird der Überstand verworfen und die Pellets in 2 x 200 ml Waschpuffer resuspendiert. Die erneute Pelletierung erfolgt bei 16000 rpm (Rotor JLA 16.250) für 30 Minuten. Die Pellets werden in 2 ml/g Zellen (mindestens 75 ml) Extraktionspuffer sorgfältig homogenisiert. Es folgt eine einstündige Zentrifugation bei 60000 rpm (Rotor 70Ti). Der Myosin-haltige Überstand wird durch einen Sterilfilter mit der Porengröße 0.45 µm filtriert. Zur Analyse und Dokumentation des Präparationsverlaufs wird von jeder Fraktion eine Probe genommen und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht. Der Fortgang des Aufreinigungsprozess des extrahierten Myosins wird durch den verwendeten Affinitäts-*tag* bestimmt. Im Verlauf dieser Arbeit wurden sowohl NiNTA-Affinitätschromatographien als auch α-FLAG-Affinitätschromatographien durchgeführt.

NiNTA-Affinitätschromatographie:

Die chromatographische Aufreinigung des Myosinkonstrukts wird mit einer FPLC-Anlage betrieben. Eine Bestimmung des Proteingehalts des fraktionierten Eluats durch Messung der Tryptophan-Absorption bei 280 nm ist parallel zur Aufreinigung möglich.

Rekombinante Myosinkonstrukte mit (His)₇-Affinitäts-*tag* werden mittels NiNTA-Säule (Nickel-Nitriltriacetat, Qiagen) aufgereinigt. Diese wird mit einem Säulenvolumen NiNTA Imidazol-Puffer, einem Säulenvolumen NiNTA Hochsalz-Puffer und 10 Säulenvolumina NiNTA Niedrigsalz-Puffer äquilibriert. Anschließend kann der filtrierte Myosin-haltige Überstand auf die NiNTA-Säule aufgetragen werden. Im folgenden wird die Säule mit jeweils 3 Säulenvolumina NiNTA Niedrigsalz-Puffer, NiNTA Hochsalz-Puffer und 3% NiNTA Imidazol-Puffer in NiNTA Niedrigsalz-Puffer gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgt durch einen Gradienten von 3 bis 100% NiNTA Imidazol-Puffer, welcher dem NiNTA Niedrigsalz-Puffer zugesetzt wird, über 6 Säulenvolumina (2 ml/min Flussrate). Mittels automatisiertem Fraktionssammler werden 1.5 ml-Fraktionen gesammelt. Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird der Myosin Gehalt der Fraktionen analysiert. In Abbildung 16 ist ein SDS-Polyacrylamidgel der Fraktionen der NiNTA-Affinitätschromatographie von Myosin-5a-2R-

Hier dargestellt. Die ausgewählten Fraktionen werden vereinigt und über Nacht gegen 3 l Lager-Puffer dialysiert.

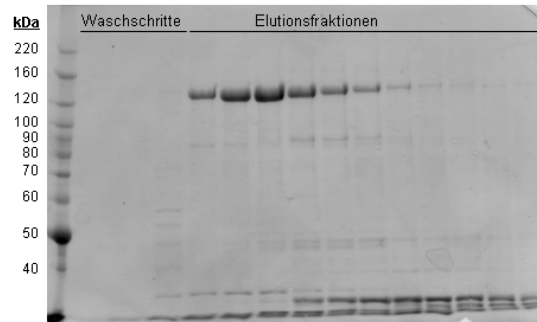


Abb. 16: SDS-Polyacrylamid-Gel der NiNTA-Affinitätschromatographie von Myosin-5a-2R-His aus *D. discoideum*. Zu sehen ist der Proteinmarker (links) sowie Proben der drei Waschschritte und Proben gesammelter Elutionsfraktionen.

α -FLAG-Affinitätschromatographie:

Bei rekombinanten Myosinkonstrukten mit FLAG-Affinitäts-tag wird der Überstand nach der Extraktion auf eine α -FLAG-Säule (ANTI-FLAG M2 Affinity Gel, Sigma Aldrich) aufgetragen. Die Säule wurde zuvor mit einem Säulenvolumen TBS-Puffer, 3 Säulenvolumina 0.1 M Glycin/HCl pH 3.5 und weiteren 5 Säulenvolumina TBS-Puffer äquilibriert. Die geladene Säule wird mit 15 Säulenvolumina FLAG-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wird das Protein mit 5 Säulenvolumina FLAG-Elutionspuffer eluiert, wobei 5 ml-Fractionen gesammelt werden. Die Fraktionen können mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert werden. Die ausgewählten Fraktionen werden gegen 3 l Lager-Puffer über Nacht dialysiert. In Abbildung 17 ist das SDS-Polyacrylamidgel der α -FLAG-Affinitätschromatographie von *Dd*Myosin-5a-2R-FLAG dargestellt.

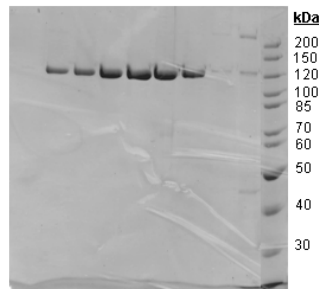


Abb. 17: SDS-Polyacrylamid-Gel der α -FLAG-Affinitätschromatographie von *Dd*Myosin-5a-2R-FLAG. Zu sehen ist der Proteinmarker (rechts) sowie Proben der aufgefängenen Fraktionen.

Die dialysierte Proteinlösung wird mit Vivaspin-Konzentratoren (M_w cut-off = 50 kDa, Vivascience AG) einkonzentriert. Sowohl für kinetische als auch funktionale Untersuchungen wird das Myosin auf eine Konzentration von ca. 3 bis 4 mg/ml eingestellt. Die Lösung wird in PCR-Gefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

PBS-Puffer:

10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.4, 150 mM NaCl.

Lysispuffer I:

50 mM Tris/HCl pH 8.0, 2.5 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 1 mM DTT (frisch hinzugefügt), 5 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt), 40 µg/ml TLCK (frisch hinzugefügt), Protease-Inhibitor Mix I (frisch hinzugefügt), Protease-Inhibitor Mix II (frisch hinzugefügt).

Lysispuffer II:

Lysispuffer I, 1 % v/v Triton-X 100, 15 µg/ml Ribonuklease A (frisch hinzugefügt), 100 U CIAP abs. (frisch hinzugefügt).

Waschpuffer:

50 mM HEPES pH 7.3, 30 mM KOAc, 15 mM Mg(OAc)₂, 7 mM β-ME (frisch hinzugefügt), 5 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt).

Extraktionspuffer:

50 mM HEPES pH 7.3, 30 mM KOAc, 15 mM Mg(OAc)₂, 0 – 300 mM KCl, 7 mM β-ME (frisch hinzugefügt), 5 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt), 15 mM ATP (frisch hinzugefügt).

NiNTA Niedersalz-Puffer:

50 mM HEPES pH 7.3, 30 mM KOAc, 3 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt).

NiNTA Hochsalz-Puffer:

50 mM HEPES pH 7.3, 300 mM KOAc, 3 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt).

NiNTA Imidazol-Puffer:

1 M Imidazol pH 7.3, 3 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt).

TBS-Puffer:

50 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl.

FLAG-Waschpuffer:

50 mM HEPES pH 7.3, 150 mM KOAc, 3 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt).

FLAG-Elutionspuffer:

50 mM HEPES pH 7.3, 150 mM KOAc, 100-200 µg/ml FLAG Peptid (frisch hinzugefügt), 3 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt).

Lager-Puffer:

50 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT (frisch hinzugefügt), 1 mM Benzamidin (frisch hinzugefügt).

2.2.4.7. Präparation von Aktin aus dem Kaninchenmuskel

Das filamentöse Aktin wird aus dem Muskelfleisch eines Kaninchen gewonnen. Das Prinzip der Aufreinigung basiert auf dem unterschiedlichen Verhalten von Myosin und Aktin, den zwei hauptsächlichen Proteinen im Muskel, bei verschiedenen Salzkonzentrationen. Während Aktin bei hohen Salzkonzentrationen als F-Aktin vorliegt, präzipitiert Myosin-2 erst bei niedrigen Salzkonzentrationen (Spudich & Watts, 1971).

Die Aufreinigung findet bei 4 °C statt und sämtliche Puffer werden vorgekühlt. Das Muskelfleisch von Rücken und Beinen eines frisch geschlachteten Kaninchens wird für 30 min auf Eis gekühlt. Nach Entfernung der Sehnen wird das Fleisch für die Berechnung der benötigten Puffervolumina gewogen und mittels Fleischwolf zerkleinert. Die Fleisch-Masse wird im dreifachen Volumen (3 l/kg) Guba-Straub-Puffer zur Extraktion des Aktins langsam gerührt. Nach Zugabe von 12 Volumina H₂O wird die Suspension durch ein Mulltuch filtriert. Der Rückstand im Mulltuch enthält das Aktin und wird in Carbonatpuffer A resuspendiert. Die Lösung wird für 30 min gerührt. Die Prozedur des Filtrierens wird wiederholt und der gewonnene Rückstand wird in 1 l Carbonatpuffer B resuspendiert. Die Suspension wird nach 10 min Rühren mit 10 l 20°C warmen H₂O verdünnt. Nach einer weiteren Filtration wird der Aktin-haltige Rückstand in 2.5 l Aceton gerührt, abfiltriert und in weiteren 2.5 l Aceton gerührt. Im Anschluss an eine abschließende Filtration wird der Rückstand für einen Tag unter der Sterilwerkbank gelagert, um das vollständige Abdampfen des Acetons zu gewährleisten. Das so gewonnene Acetonpulver wird gesiebt und schließlich bei -20°C gelagert.

Zur Gewinnung von reinem Aktin wird das Acetonpulver weiter verarbeitet. Das Prinzip dieser Aufreinigung beruht auf dem mehrmaligen Polymerisieren und Depolymerisieren von Aktin durch veränderte Ionenstärken im Puffer (Lehrer & Kerwar, 1972).

5 g Acetonpulver werden mit 120 ml kaltem Aktinpuffer versetzt. Zur Extraktion des G-Aktins wird die Suspension für 30 min bei 4°C gerührt und anschließend mittels Vakuumpumpe filtriert. Eine Zentrifugation der filtrierten Lösung bei 70.000 g und 4°C über eine Stunde werden unlösliche Bestandteile sedimentiert. Das Aktin im Überstand wird nun polymerisiert. Die Reaktion erfolgt bei Raumtemperatur durch Zugabe von 100 mM KCl und 2 mM MgCl₂. Das erhaltene F-Aktin wird durch eine Zentrifugation bei 70.000 g und 4 °C über drei Stunden pelletiert und nach Entfernung des Überstands in 50 - 100 ml Depolymerisationspuffer mittels eines Glashomogenisators homogenisiert. Eine vollständige Entfernung des Salzes und die verbundene Depolymerisation des F-Aktins wird durch eine Dialyse gegen 5 l Depolymerisationspuffer über Nacht bei 4°C erreicht. Nach erneuter Zentrifugation bei 70.000 g und 4°C für eine Stunde besteht der Überstand aus reinem G-Aktin. Für die Gewinnung des reinen F-Aktins muss erneut durch Zugabe von 100 mM KCl und 2 mM MgCl₂ polymerisiert werden. Die Reaktion kann für eine Stunde bei Raumtemperatur oder, zur Gewinnung von längeren Filamenten, über Nacht bei 4°C ablaufen. Erneute Pelletierung für eine Stunde bei 70.000 g und 4°C sowie Homogenisierung des F-Aktins in Aktin-Resuspensionspuffer führt zu der in den verschiedenen Experimenten eingesetzten F-Aktin-Lösung. Für kinetische Experimente eignet sich eine Konzentration zwischen 150 und 300 µM. Die Konzentration des F-Aktins kann durch eine photometrische Messung bestimmt werden ($\epsilon_{\text{Aktin}} = 46000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$; $M_{\text{W (Aktin)}} = 41,7 \text{ kDa}$).

Guba-Straub-Puffer:

0.1 M KH_2PO_4 pH 6.6, 0.05 M K_2HPO_4 , 0.3 M KCl.

Carbonatpuffer A:

4 % (w/v) NaHCO_3 , 0.1 mM CaCl_2 .

Carbonatpuffer B:

10 mM NaHCO_3 , 10 mM Na_2CO_3 , 0.1 mM CaCl_2 .

Aktinpuffer:

10 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.2 mM CaCl_2 , 1 mM DTT (frisch hinzugefügt), 0.5 mM ATP (frisch hinzugefügt).

Depolymerisationspuffer:

5 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.2 mM CaCl_2 , 1 mM NaN_3 , 0.1 mM ATP (frisch hinzugefügt).

Aktin-Resuspensionspuffer:

5 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0.04 % NaN_3 .

2.2.4.8. Präparation von Pyren-markierten F-Aktin

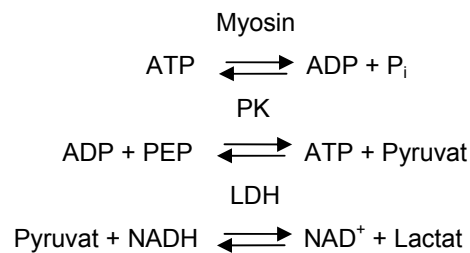
Kinetische Studien der Akto-Myosin-Interaktion machen den Einsatz von fluoreszenzmarkiertem F-Aktin notwendig. Die Präparation von Pyren-markiertem F-Aktin (Pyr-Aktin) wird nach einer Methode von Criddle et al. (1985) durchgeführt. Dabei wird eine 1 mg/ml konzentrierte F-Aktinlösung mit dem Fluoreszenzfarbstoff N-(1-pyrenyl)iodoacetamid (5 mg/ml in DMF gelöst) in einem Verhältnis von ~0,9 % (v/v) Pyren/Aktin unter Rühren versetzt. Die Lösung wird 14 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln gerührt. Nicht gelöster Farbstoff wird anschließend bei 8000 rpm für eine Stunde bei 4°C abzentrifugiert. Das erhaltene Aktin-Sediment wird dann im gewünschten Experiment-Puffer aufgenommen und über Nacht gegen gleichen dialysiert. Feststoffe im Dialysat werden durch einen Zentrifugationsschritt über 4 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge entfernt.

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 Gesamtaborption subtrahiert werden. Die Konzentration des fluoreszenzmarkierten Pyr-Aktin liegt typischerweise bei 80 - 160 μM und der Markierungsgrad zwischen 60 und 90 %.

2.2.5. Biophysikalische Methoden

2.2.5.1. Steady-state-Kinetik

Myosine spalten in einer enzymatischen Reaktion ATP zu ADP und P_i . Auf Grund der Tatsache, dass sich das Absorptionsverhalten von ATP und ADP nicht unterscheidet, muss die Messung der ATP-Umsetzung im Fließgleichgewicht (*steady state*) indirekt mit Hilfe eines gekoppelten Enzymtests erfolgen (Trentham et al., 1972; Furch et al., 1998). Dabei wird das von Myosin produzierte ADP von der Pyruvatkinase, unter Umsetzung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat, wieder zu ATP umgewandelt. Die Lactat-Dehydrogenase (LDH) setzt wiederum das entstandene Pyruvat zu Lactat um. Bei der letzten Reaktion wird NADH zu NAD^+ zu oxidiert. Diese Reaktion kann photometrisch durch Messung der NADH-Absorption bei 340 nm ($\epsilon_{NADH} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) verfolgt werden.



Ein typischer ATPase-Ansatz hat die folgende Zusammensetzung:

0.2 mM NADH
 0.5 mM PEP
 0.02 mg/ml LDH
 0.05 mg/ml PK
 1 mM ATP
 0 - 80 μM F-Aktin
 0.1 - 1 μM Myosin
 in ATPase-Puffer.

Die Enzyme der ATP-Rückgewinnung arbeiten sehr schnell, so dass sicher gestellt ist, dass die Myosin-abhängige Umsetzung von ATP zu ADP den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Die Geschwindigkeit der Umsetzung von NADH zu NAD^+ entspricht somit der Myosin-Umsatzgeschwindigkeit.

Gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz kann aus der Konzentrationsänderung von NADH die Geschwindigkeitskonstante der Umsetzung von ATP zu ADP durch Myosin (k_{ATPase}) berechnet werden:

$$\begin{aligned}
 \Delta A &= \epsilon_{NADH} * \Delta[NADH] * d \\
 \Delta[NADH] &= \Delta A / (\epsilon_{NADH} * d)
 \end{aligned}$$

Über die eingesetzte Myosin-Konzentration lässt sich die Geschwindigkeitskonstante des ATP-Umsatzes berechnen.

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

(ΔA : Absorptionsdifferenz, ϵ : Extinktionskoeffizient, d : Schichtdicke, c : Konzentration)

ATPase-Puffer:

25mM HEPES pH 7.4, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT (frisch hinzugefügt).

2.2.5.2. Messungen mittels *stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer

Aus *steady-state*-Untersuchungen des Akto-Myosin-ATPase-Zyklus erhält man keine Informationen über die einzelnen Teilschritte der Reaktion. Mittels des *stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometers lassen sich diese Einzelschritte in transientenkinetischen Experimenten auflösen. Die beobachteten Teil-Reaktionen sind 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 möglichst schnell und homogen zu durchmischen.

Im Folgenden wird die in dieser Arbeit angewandte *stopped-flow*-Technik erläutert (Chance et al., 1964; Eccleston et al., 1987): Ein *stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer ist im wesentlichen ein Spektrometer mit einer zusätzlichen Einheit, die ein schnelles Mischen der Reaktanden zulässt. Die Mischeinheit der Apparatur ist schematisch in Abbildung 21 dargestellt.

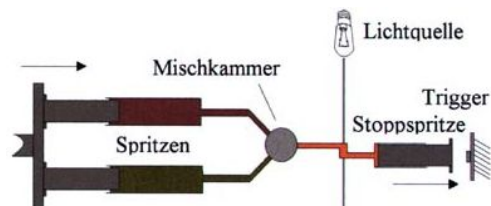


Abb. 18: Schematischer Aufbau eines *stopped-flow*-Spektrophotometers. PM: Photomultiplier (Koschner et al., 1997)

Die Mischapparatur wird über zwei Spritzen mit den Reaktanden befüllt (s. Abb. 18). Die Reaktionslösungen werden synchron mit 5 bar Druck über zwei getrennte Schläuche in die Mischkammer und weiter in eine Küvette geleitet. Für die Küvette kann zwischen zwei Schichtdicke (2 oder 10 mm) gewählt werden. Der Fluss der Reaktionslösung wird mittels der Stoppspritze gestoppt. Dabei stößt der Stempel der Spritze auf einen Mikroschalter (Trigger) und löst die Messung aus. Die Detektion der spektroskopischen Änderungen in der Küvette erfolgt mithilfe eines Photomultipliers. Ein

angeschlossenes temperierbares Wasserbad gewährleistet eine konstante Temperatur der gesamten Mischung. Die Totzeit, das Alter der zum Zeitpunkt des Anhaltens in der Messküvette befindlichen Lösung, begrenzt die zeitliche Auflösung der *stopped-flow*-Apparatur. Sie liegt bei den in dieser Arbeit verwendeten Geräten bei ~1 ms. Das angeschlossene Spektrophotometer ermöglicht Messungen sowohl von Absorptions- als auch Fluoreszenzänderungen. Das von einer 75 W Hg/Xe-Lampe ausgestrahlte Licht wird über Spiegel durch einen Monochromator und weiter über einen Quarzlichtleiter zur Küvette geleitet.

Die transientenkinetische Charakterisierung der Interaktion von Myosin mit Nukleotid und Aktin wird durch Änderungen der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz des Proteins sowie der extrinsischen Fluoreszenz mittels synthetisierter Nukleotidderivate und Pyren-markiertem F-Aktin ermöglicht.

Die Tryptophan-Fluoreszenz von Myosin wird bei einer Wellenlänge von 296 nm angeregt. Das emittierte Fluoreszenzlicht gelangt durch einen 320 nm *cut-off*-Filter zum Photomultiplier. Der *cut-off*-Filter trennt Licht mit Wellenlängen unter 320 nm vom eigentlichen 348 nm-Fluoreszenzsignal ab. Eine Störung des Photomultipliers durch das Anregungslicht wird somit unterbunden. Pyren und die in dieser Arbeit verwendeten mant-Nukleotide werden bei 365 nm angeregt. In diesem Fall wird das emittierte Licht durch einen 389 nm-*cut-off*-Filter von der Anregungsstrahlung getrennt. Das Ausgangssignal des Photomultipliers wird von einem PC dokumentiert. Jede beobachtete Reaktion wird mindestens dreimal gemessen und die aufgezeichneten Reaktionsverläufe gemittelt. Eine einzelne Messung erfordert 35 - 50 µl jeder Reaktandenlösung. Dieses Volumen übersteigt deutlich das Küvettenvolumen. Allerdings ist dadurch eine komplette Durchmischung und damit die Minimierung von Mischartefakten gewährleistet. Als Puffer wird MOPS-Experimentalpuffer verwendet. Die Reaktionsverläufe werden durch Anpassung von Exponentialfunktionen an den Signalverlauf mit der Software des *stopped-flow*-Spektrophotometers (KinetAsyst 2.0) bzw. mit dem Programm Origin 7.0 ausgewertet.

MOPS-Experimentalpuffer:

20 mM MOPS pH 7.0, 100 mM KCl, 0 - 20 mM MgCl₂.

2.2.5.3. *In vitro*-Motilitätsassay

Im *in vitro*-Motilitätsassays wird die Translationsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten bestimmt, die sich über immobilisierte Myosinkonstrukte bewegen. Die Methode leitet sich im wesentlichen von dem Protokoll von Kron und Spudich (1986) ab. Die Durchführung des Motilitätsassays erfolgt in einer transparenten Durchflusszelle. Dazu wird ein 22 mm × 22 mm × 0,17 mm ± 0,01 mm Deckglas über doppelseitiges Klebeband kontaktfrei auf einem Objektträger befestigt. Eine effiziente Absorption von vielen Myosinkonstrukten auf der Oberfläche des Deckglases setzt eine Beschichtung mit einer Nitrozellulosemembran voraus.

Der Feststoff Nitrozellulose muss in Essigsäurepentylester (Amylacetat) zur Lösung gebracht werden. Die vollständige Lösung erfolgt am besten unter leichtem Schütteln über Nacht bei 4°C. Die

Nitrozellulose-Lösung kann etwa eine Woche bei 4°C gelagert werden. Zur Nitrozellulose-Beschichtung wird 1 Tropfen einer Lösung von 1% (w/v) Nitrozellulose in Amylacetat vorsichtig auf die Wasseroberfläche eines randvoll gefüllten 3 l-Becherglases gegeben. Die Wasseroberfläche sollte dazu absolut staubfrei sein. Auf eine so vorbereitete Fläche werden nun mehrere Deckgläser blasenfrei platziert und für kurze Zeit inkubiert. Anschließend werden sie mit Hilfe eines Skalpell und einer Pinzette aus dem Filmverband gelöst. Die beschichteten Deckgläser werden bei Raumtemperatur getrocknet und danach auf den Objektträger fixiert. Über die zwei Streifen doppelseitiges Klebeband kann das Volumen der Durchflusszelle bestimmt werden.

Inaktive Myosine können den Motilitätsassay teilweise empfindlich stören. Aus diesem Grund wurde eine Aktin-Affinitätsaufreinigung der zu untersuchenden Myosinlösungen durchgeführt. Bei dem Verfahren werden inaktive Myosine in Anwesenheit von ATP zusammen mit F-Aktin sedimentiert, während aktives Myosin im Überstand verbleibt. Dazu wird die Lösung nach Zugabe von F-Aktin (50% Masse F-Aktin : Myosin), 2 mM ATP, 2 mM MgCl₂ und 10 mM DTT für 10 min bei 100.000 g (54.000 rpm; TLA 120.1 Rotor) zentrifugiert.

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 kurz angevortext und über Nacht unter Lichtausschluß auf Eis inkubiert.

Sofern rekombinante Myosine im *in vitro*-Motilitätsassay eingesetzt werden, kann die Durchflusszelle primär mit Antikörper beschichtet werden. Dadurch ist in der Regel eine gleichmäßigere Orientierung der Myosinkonstrukte an der Oberfläche gewährleistet. In der Folge ist auch die Bewegung der Aktinfilamente gleichmäßiger. Dazu werden ein Durchflusszellen-Volumen einer Lösung von 0,025 - 0,05 mg/ml Anti-Histidin-Antikörper in H₂O in die Durchflusszelle gegeben und für mindestens 5 min inkubiert. Anschließend werden 3 Volumina einer BSA-Lösung (I) mit 0,5 mg/ml BSA zugegeben, um eine spätere Bindung der Myosine an freie Nitrozellulosebereiche zu verhindern.

Bei nativen Myosinen oder bei Verzicht des Antikörpers startet das Beladen der Durchflusszelle hier. Beladen wird ein Durchflusszellen-Volumen einer Myosinlösung mit einer Konzentration von 0,05 - 1 mg/ml (mindestens 5-fach Überschuss zur Antikörper-Konz.) in die Durchflusszelle gegeben. Nach 2 min wird mit 3 Volumina BSA-Lösung (I) gespült. Denaturierte Myosin-Motordomänen werden durch 2-minütige Inkubation mit 2 Volumina einer Lösung von 2 µM unmarkiertem F-Aktin in BSA-Lösung und anschließendem Spülen mit 3 Volumina einer ATP-Lösung (IV) und 3 Volumina BSA Lösung (I) blockiert. Anschließend werden 3 Volumina einer 1:200-Verdünnung des TRITC-markierten F-Aktins mit BSA-Lösung hinzugegeben. Nach 2-minütiger Inkubation wird mit je 3 Volumina BSA-Lösung (I) und Antibleichlösung (II) gespült. Danach kann die Dekoration der Deckglasoberfläche mit fluoreszierenden Aktinfilamenten unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft werden. Durch die Zugabe einer ATP-haltigen Antibleichlösung (III) wird die Bewegung der Filamente gestartet. Die Motilität der Filamente kann fluoreszenzmikroskopisch beobachtet und dokumentiert werden.

Für den *in vitro*-Motilitätsassay wird das Fluoreszenzmikroskop IX 81 von Olympus mit dem Objektiv Apo N 60x (Olympus) mit einer numerischen Apertur von 1,49 genutzt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen werden mit einer CCD-Kamera „Orca-ER xxx“ der Firma Hamamatsu Photonics gemacht. Das TRITC-Fluorophor wird bei 545 nm angeregt und emittiert Licht einer Wellenlänge von 570 nm. Entsprechende Anregungs- und Emissionsfilter stehen im Mikroskop zur Verfügung.

Im Standardaufnahme-Protokoll wurde das TRITC-Fluorophor für 233 ms belichtet. Daraus ergibt sich ein Bildintervall von 300 ms. Eine Aufnahmesequenz enthält 100 - 200 Bilder. Damit die Aufnahmen sicher ausgewertet werden können, wurde ein Kamera-*Binning* von 2 x 2 verwendet. Durch die Vergrößerung von 60 x ergibt sich eine Pixel-Größe von 0,215 µm.

Die erhaltenen Bildsequenzen werden mit dem Programm DiaTrack 3.01 der Firma Semasopt 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 - 30 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):

2 - 10 mM	ATP
-----------	-----

in Antibleichlösung (II)

ATP-Lösung (IV):

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

in BSA-Lösung (I)

2.2.5.4. Landeassay

Der Landeassay stellt eine Spezialform des *in vitro*-Motilitätsassays (s. Kapitel 1.2.5.3) dar. Im Landeassay wird die immobilisierte Myosindichte an der Deckglasoberfläche exakt bestimmt und im Verlauf der Studien schrittweise reduziert. Unter Einsatz der *total internal reflexion fluorescence* (TIRF)-Mikroskopie (s. Kapitel 1.5) wird die Anzahl der Landeereignisse der Aktinfilamente in Abhängigkeit von der Myosindichte bestimmt (Rock et al., 2000).

Bei der Herstellung der Durchflusszellen werden Deckgläser verwendet, die für die TIRF-Mikroskopie auf Grund ihrer gleichmäßigen Dicken besonders geeignet sind. Die Maße der Deckgläser beträgt 22 mm x 22 mm x $0,17 \pm 0,01$ mm. Die Deckgläser sind mit 1%iger Nitrozellulose beschichtet (s. Kapitel 1.2.5.3). Durch die Verwendung doppelseitigen Klebebands werden Durchflusszellen mit einer Oberfläche von 100 ± 4 mm² hergestellt. Die Oberfläche entspricht einem Volumen von exakt 10 µl pro Durchflusszelle. Anhand der Oberfläche und des Volumens der Durchflusszelle lässt sich die Myosindichte pro µm² berechnen. Die Berechnung wird unter der Annahme durchgeführt, dass sich die Myosinmoleküle gleichmäßig verteilen und an beide Seiten der Durchflusszelle gleichmäßig binden.

Die Fluoreszenzmarkierung der Aktinfilamente erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie in Kapitel 1.2.5.3 beschrieben. Allerdings wird für den Landeassay Alexa488-Phalloidin-Farbstoff verwendet, welcher den Einsatz eines 488 nm-Lasers ermöglicht. Im Anschluss an die Inkubation über Nacht wird der Ansatz bei 120.000 g für 15 min zentrifugiert, um ungebundenen Farbstoff im Überstand zu entfernen. Sedimentiertes Alexa488-Phalloidin-Aktin wird mit Hilfe eines Mikropistills in AB-Puffer resuspendiert.

Nachdem 10 µl Myosinlösung einer definierten Konzentration in eine Durchflusszelle eingeführt wird, inkubiert die Zelle für 20 - 30 min bei 4°C unter hoher Luftfeuchtigkeit. Im Anschluss wird die Durchflusszelle mit 3 Volumina BSA-Lösung gewaschen. Anschließend wird direkt 2 Volumina Landeassay-Puffer zugegeben und die Dokumentation der Landeereignisse gestartet. Die Aufnahmen werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Das Aufnahmeprotokoll der Landeassays beinhaltet die Verwendung der vollen Auflösung der CCD-Kamera (Hamamatsu Orca R²) mit 1344 x 1024 Bildpunkten. Als Objektiv wird das Olympus PlanApo 60x mit einer NA von 1,49 verwendet. Sofern das gesamte Bild bei der Auszählung der Landeereignisse genutzt wird, hat das Observationsfenster eine Fläche von 0,0159 mm². Das Bildintervall beträgt 500 ms und die Aufnahmelänge ist 1 - 2 Minuten. Die Auszählung der Landeereignisse wird manuell durchgeführt und dabei pro Aufnahme dreimal wiederholt. Damit Landeereignisse von zufälligen Kollisionen der Aktinfilamente mit der Deckglasoberfläche unterschieden werden können, zählen nur Ereignisse die mindestens 2 s (4 Bilder) bestehen und sich das Filament über 0,5 µm bewegt (Tominaga et al., 2003). Die Anzahl der Landeereignisse wird gemittelt und auf Ereignisse pro mm² s umgerechnet.

AB-Puffer:

25 mM Imidazol (pH 7,4)

25 mM	KCl
3,5 / 9,5 mM	MgCl ₂
1 mM	EGTA
10 mM	DTT

BSA-Lösung:

0,5 mg/ml BSA in AB-Puffer

Landeassay-Puffer

4 mM	ATP
100 nM	Alexa488-Phalloidin-Aktin
5 mg/ml	Glucose
0,1 mg/ml	Glucoseoxidase
0,02 mg/ml	Katalase

in BSA-Lösung.

2.2.5.5. Einzelmolekül-Prozessivitätsassay

Im Einzelmolekül-Prozessivitätsassay sind Aktinfilamente an der Deckglasoberfläche immobilisiert und die Bewegung einzelner Myosinmoleküle wird mittels „Totaler Interner Reflexions Fluoreszenz (TIRF)-Mikroskopie (s. Kapitel 1.5) beobachtet (Yildiz et al., 2003).

Die Durchflusszellen entsprechen Kapitel 1.2.5.3, wobei die Deckglasoberfläche für Einzelmolekül-Experimente nicht mit Nitrozellulose beschichtet wird.

Heavy mero myosin (HMM) aus Kaninchen-Skelettmuskel wird durch N-Ethylmaleimid (NEM) inaktiviert. NEM ist ein Modifizierungsreagenz, das die freien Thiol-Gruppen des HMM irreversibel alkyliert. Die Alkylierung inhibiert die Umsetzung von ATP ohne die Aktinbindung des HMM zu verhindern. Das präparierte HMM wurde mit einem 100-fachen molaren Überschuss mit NEM versetzt (Kuhn & Pollard, 2005). Die Reaktion von NEM mit freien Thiol-Gruppen ist weitestgehend unabhängig vom pH-Wert (Bednar, 1990) aber unterschiedliche Temperaturen und Inkubationszeiten haben großen Einfluss auf das Ergebnis. Die besten Resultate sind bei Inkubationen über Nacht bei 4°C erzielt wurden. Die Reaktion erfolgt in AB-Puffer. Anschließend muss überschüssiges NEM durch eine Dialyse entfernt werden.

Ein Volumen einer 1 mg/ml NEM-HMM-Lösung werden in AB-Puffer mit 500 mM KCl in eine Durchflusszellen gegeben. Nach Ablauf einer 5 min Inkubation wird mit 3 Volumina BSA-Lösung gewaschen und blockiert. Nachdem 2 Volumina 20 nM Alexa633-Phalloidin-Aktin (Markierung s. Kapitel 1.2.5.3) in die Flusszelle gebracht werden, erfolgt umgehend ein Waschschrift mit 3 Volumina BSA-Lösung um möglichst gerade Filamente zu erhalten. Anschließend wird 1 nM Myosin in Motilitäts-Puffer zugesetzt und die Bewegung der einzelnen Moleküle unter dem TIRF-Mikroskop verfolgt. Dafür

wird das C-terminale *yellow fluorescent protein* (YFP) mit Hilfe des 488 nm-Lasers angeregt. Die mikroskopischen Aufnahmen werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Aufnahmen am TIRF-Mikroskop erfolgen mit einem Bildintervall von 100 ms.

AB-Puffer:

25 mM	Imidazol (pH 7,4)
25 mM	KCl
3,5 - 9,5 mM	MgCl ₂
1 mM	EGTA
10 mM	DTT

BSA-Lösung:

0,5 mg/ml BSA in AB-Puffer

Motilitäts-Puffer

1 nM	Myosin
4 mM	ATP
5 mg/ml	Glucose
0,1 mg/ml	Glucoseoxidase
0,02 mg/ml	Katalase

in BSA-Lösung.

3. Ergebnisse

3.1. Mechanismus der Schalter-2 vermittelten Mg^{2+} -Sensitivität und der Einfluss auf die *duty ratio*

Trotz der teilweise stark unterschiedlichen Motor-Eigenschaften ist die Nukleotidbindungstasche bestehend aus Schalter-1, Schalter-2 und P-Schleife, innerhalb aller Myosinklassen hochkonserviert. Auch in G-Proteinen und anderen Motorproteinen findet man diese konservierten Motive in den katalytischen Zentren (Vale, 1996). Schalter-2, der durch die Konsensussequenz DIXGFE identifiziert wird, ist sowohl an der Koordination des Nukleotids als auch des Mg^{2+} -Ions beteiligt (Rayment et al., 1993). Eine Regulation der Myosin-Motoraktivität durch freie Mg^{2+} -Ionen wurde sowohl für Myosine der Klasse-1 (Fujita-Becker et al., 2005; Dürrwang et al., 2006) als auch der Klasse-5 (Taft et al., 2008) beschrieben. Der Regulationsmechanismus beruht auf einer beschleunigten Mg^{2+} -ADP-Dissoziation aus dem Akto-Myosin- Mg^{2+} -ADP-Komplex bei niedrigen freien Mg^{2+} -Ionenkonzentrationen. Die geringere zeitliche Anteil der Verweildauer des Motors im Akto-Myosin- Mg^{2+} -ADP-Komplex bzw. im stark an Aktin gebundenen Zustand bei niedrigen freien Mg^{2+} -Ionenkonzentrationen führt demzufolge zu einer niedrigeren *duty ratio* des betreffenden Myosins (Taft et al., 2008). Durch zelluläre Studien mit *D. discoideum* konnte belegt werden, dass Mg^{2+} -Konzentration innerhalb der Zelle im Millisekunden-Bereich fluktuiert (Taft et al., 2008). Auch in Säuger-Zellen sind vergleichbar schnelle Variationen in der Mg^{2+} -Ionenkonzentration beobachtet worden (Suzuki et al., 2002; Farruggia et al., 2006). Eine physiologische Relevanz der *in vitro*-Daten zur Mg^{2+} -Regulation von verschiedenen Myosinen ist also anzunehmen.

Durch ein Alanin-Scanning innerhalb der Nukleotidbindungstasche von *Dd*Myosin-2 kann dem Schalter-2 eine elementare Funktion bei der Produktdissoziation zugewiesen werden (Sasaki et al., 1998). Um die molekulare Grundlage der Schalter-2 vermittelten ADP-Freisetzung genauer zu verstehen und einen Bezug zur beschriebenen Abhängigkeit der ADP-Freisetzung von der Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen zu erstellen, wurde eine umfassende Sequenzanalysen der Schalter-2-Region aus Myosinen verschiedener Klassen und phylogenetischen Taxa durchgeführt. Bei dem in Abbildung 19 dargestellten Sequenzvergleich sind Myosine mit einer niedrigen *duty ratio* (<0,5) bzw. einer schnellen, nicht geschwindigkeitsbestimmenden ADP-Freisetzung solchen mit einer hohen (>0,5) *duty ratio* und einer langsamen, den ATPase Zyklus zeitlich limitierenden ADP-Freisetzung gegenübergestellt. In Abbildung 19 sind Myosine deren Motoraktivität nachweislich über freie Mg^{2+} -Ionen reguliert wird mit einem Stern markiert.

382	G	I	L	D	I	F	G	F	E	I	F	E	DdMyosin-1B
451	G	V	L	D	I	S	G	F	E	I	F	K	DdMyosin-2
460	G	V	L	D	I	A	G	F	E	I	F	D	OcMyosin-2
444	G	V	L	D	I	Y	G	F	E	T	F	E	DmMyosin-5
432	G	V	L	D	I	Y	G	F	E	T	F	D	HsMyosin-5c
445	G	V	L	D	I	Y	G	F	E	H	F	E	CcMyosin-11
382	G	I	L	D	I	Y	G	F	E	I	F	E	DdMyosin-1D *
383	G	I	L	D	I	Y	G	F	E	V	F	Q	DdMyosin-1E *
485	G	I	L	D	I	Y	G	F	E	S	F	E	DdMyosin-5a *
482	G	V	L	D	I	Y	G	F	E	S	F	E	DdMyosin-5b *
434	G	V	L	D	I	Y	G	F	E	T	F	E	GgMyosin-5a *
434	G	V	L	D	I	Y	G	F	E	T	F	E	HsMyosin-5b

Abb. 19: Sequenzvergleich der Schalter-2-Region (roter Rahmen) von Myosinen aus unterschiedlichen Klassen und phylogenetischen Taxa. Der obere Bereich stellt Myosine mit einer niedrigen *duty ratio* dar, der untere Bereich solche mit einer hohen *duty ratio*. Die nicht konservierte Aminosäure aus Schalter-2 ist rötlich unterlegt. Myosine, die durch die Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen reguliert werden, sind durch einen Stern markiert.

Dem Sequenzvergleich und kinetischen Daten folgend besitzen die hier aufgelisteten Mg^{2+} -Ionen regulierte Myosine ein Tyrosin in Schalter-2. Hingegen weisen Myosine wie *DdMyosin-1B*, *DdMyosin-2* und *OcMyosin-2*, deren kinetischen Eigenschaften keine Sensitivität gegenüber freien Mg^{2+} -Ionenkonzentration zeigen (Tsiavaliaris et al., 2008), an dieser Position ein Phenylalanin, Serin bzw. Alanin auf und sind durch eine niedrige *duty ratio* charakterisiert.

Im Rahmen dieser Arbeit soll überprüft werden, in welchem Maße die nicht konservierte Aminosäure in Schalter-2 (Y/F/S/A) zu der Mg^{2+} -Regulation und dem Grad der *duty ratio* beiträgt. Dazu wurden funktionale Untersuchungen mit Hilfe des *in vitro*-Motilitäts- und des Landeassays durchgeführt. In den Studien wurden variierende Konzentrationen an freien Mg^{2+} -Ionen eingesetzt. Insgesamt wurden vier Myosine aus *Dictyostelium discoideum* sowie deren jeweiligen Schalter-2 Punktmutante dafür verwendet: *DdMyosin-1E*, *DdMyosin-1B*, *DdMyosin-2* und *DdMyosin-5b*. In Tabelle 2 sind diese Myosinkonstrukte mit ihren entsprechenden Punktmutationen zusammengefasst. Für sämtliche Messungen, die in den folgenden Kapiteln beschrieben werden, wurden generell Myosinkonstrukte verwendet, die einen künstlichen Hebelarm aus 2 α -Aktininen und einen C-terminalen Histidin-tag besitzen.

	<i>DdMyosin-1E</i>	<i>DdMyosin-5b</i>	<i>DdMyosin-1B</i>	<i>DdMyosin-2</i>
Wildtyp Mg^{2+} reguliert	+	+	-	-
Schalter-2-Punktmutation	Y388F	Y487F	F387Y	S456Y

Tab. 2: Darstellung der verwendeten Myosinkonstrukte aus *Dictyostelium discoideum*.

3.1.1. *In vitro*-Motilitätsexperimente in Anwesenheit verschiedener freier Mg^{2+} -Konzentrationen

3.1.1.1. Funktionale Untersuchung der Motoraktivitäten von *DdMyosin-1E* und *DdMyosin-5b*

Die Durchführung des *in vitro*-Motilitätsassay baut auf dem Prinzip von Kron & Spudich (1986) auf (s. Kapitel 1.3.1). Für die Konstrukte von *DdMyosin-1E* und *DdMyosin-5b* stellte sich eine Anti-Histidin-Antikörper-Konzentration von 0,025 mg/ml als ideal heraus. Die Experimente mit den Schalter-2-Mutanten im *in vitro*-Motilitätsassay erfolgten generell bei 30°C. Die ATP-Konzentration war konstant 10 mM (*DdMyosin-1E*) bzw. 4 mM (*DdMyosin-5b*). Es wurden Messungen im Bereich von 0,01 – 20 mM freien Mg^{2+} -Ionenkonzentration ($[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$) durchgeführt, um anschließend die Gleitgeschwindigkeit der Aktinfilamente in Abhängigkeit der $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ aufzutragen. Die Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen in der Reaktionslösung wurde mittels der Internet-Software MaxChelator 2004 (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>; Patton et al., 2004) unter Angabe der Ausgangskonzentrationen von ATP und Mg^{2+} sowie unter Berücksichtigung des pH-Werts, der Ionenstärke sowie der Temperatur berechnet. Die gemessenen Werte der Gleitgeschwindigkeiten der beiden Wildtyp-Myosine zeigen bei halblogarithmischer Auftragung gegen $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ einen sigmoidalen Verlauf (s. Abb. 20) und konnten an die Hill-Gleichung angepasst werden:

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

A_1 und A_2 stellen die Grenzwerte der Funktion dar und beziehen sich auf die freie Mg^{2+} -Ionenkonzentration von 0 - ∞ . x_0 stellt den Wendepunkt der sigmoidalen Kurve dar und p ist der Hill-Koeffizient. Wie in Abbildung 20 ebenfalls zu erkennen ist, zeigen die beiden Y-zu-F-Mutanten von *DdMyosin-1E* und -5b eine annähernd lineare Abhängigkeit der Aktinfilament-Gleitgeschwindigkeit von der $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$.

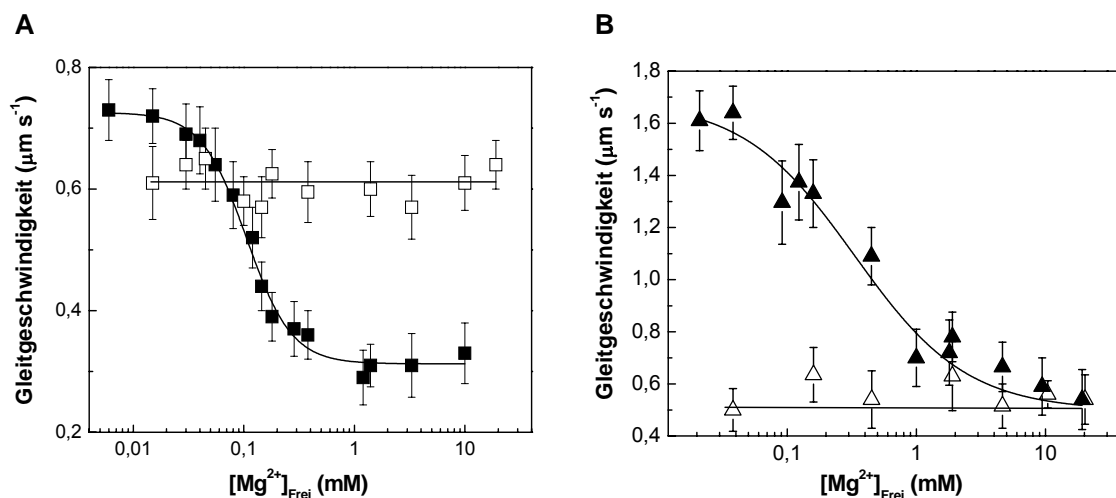


Abb. 20: Messung zur Abhängigkeit der *in vitro*-Motilität von der Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen. **(A)** *DdMyosin-1E* Wildtyp (■); *DdMyosin-1E* (Y388F) (□). **(B)** *DdMyosin-5b* Wildtyp (▲); *DdMyosin-5b* (Y487F) (△). Die Darstellung erfolgt in halblogarithmischer Form. Die Daten mit einer linearen Abhängigkeit wurden an eine Gerade angepasst. Die Daten mit einer sigmoidalen Abhängigkeit wurden an die Hill-Gleichung angepasst.

Für beide Wildtyp-Myosine wurden die maximalen Gleitgeschwindigkeiten bei $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{frei}} < 50 \mu\text{M}$ gemessen. Die maximale Inhibierung der Motoraktivität bei *DdMyosin-1E* ist schon bei $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{frei}}$ von 1 mM erreicht, während hierfür bei *DdMyosin-5b* 10 mM benötigt werden. Dieser Unterschied spiegelt sich auch im Hill-Koeffizienten wider, der bei *DdMyosin-1E* ~ 2 beträgt und bei *DdMyosin-5b* bei ~ 1 liegt. Dadurch ist der Verlauf der sigmoidalen Kurve bei *DdMyosin-5b* deutlich flacher. Beiden Wildtyp-Myosine sind durch eine Reduktion der Gleitgeschwindigkeit der Aktinfilamente um den Faktor 2,5 charakterisiert. Die Inhibierungskonstante (K_i) konnte für *DdMyosin-1E* mit $0,13 \pm 0,02$ mM bestimmt werden. Für *DdMyosin-5b* liegt der K_i bei $0,43 \pm 0,05$ mM.

Die Ionenstärke in den Reaktionslösungen änderte sich durch die MgCl_2 -Titration maximal um 56 mM. In Kontrollexperimenten wurde der Einfluss einer höheren Ionenstärke auf die Gleitgeschwindigkeit der Aktinfilamente durch Erhöhung der KCl-Konzentration analysiert. Eine Erhöhung der Ionenstärke um 50 mM zeigte ausschließlich bei *DdMyosin-1E* (Y388F) den Effekt einer leichten Reduktion der Gleitgeschwindigkeit der Aktinfilamente um $0,09 \mu\text{m s}^{-1}$. Die Werte der Gleitgeschwindigkeit für *DdMyosin-1E* (Y388F) sind entsprechend normiert worden.

Tabelle 3 fasst die Parameter aus dem Motilitätsassay für *DdMyosin-1E* und -5b, sowie deren Schalter-2-Mutanten zusammen.

Parameter	<i>DdMyosin-1E</i>	<i>DdMyosin-1E</i> (Y388F)	<i>DdMyosin-5b</i>	<i>DdMyosin-5b</i> (Y487F)
$v_{\text{max}} (\mu\text{m s}^{-1})$	$0,73 \pm 0,05$	$0,64 \pm 0,06$	$1,62 \pm 0,11$	$0,63 \pm 0,11$
$v_{\text{min}} (\mu\text{m s}^{-1})$	$0,31 \pm 0,05$	$0,58 \pm 0,05$	$0,54 \pm 0,12$	$0,5 \pm 0,07$
K_i (mM)	$0,13 \pm 0,02$	-	$0,43 \pm 0,05$	-
Hill-Koeffizient	$2,11 \pm 0,21$	-	$0,95 \pm 0,16$	-

Tab. 3: Parameter der *in vitro*-Motilität von *DdMyosin-1E* und -5b.

Verglichen mit dem Wildtyp zeichnet sich die Y388F-Mutante von *DdMyosin-1E* durch eine geringere maximale Gleitgeschwindigkeit bei niedrigen $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{frei}}$ aus. Mit steigenden $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{frei}}$ kommt es im Rahmen des Fehlers zu keiner Änderung der Bewegungsgeschwindigkeit. Im Gegensatz dazu liegt die Bewegungsgeschwindigkeit der Y487F-Mutante von *DdMyosin-5b* auf dem Niveau der maximal inhibierten Gleitgeschwindigkeit des Wildtyps. Analog zu *DdMyosin-1E* (Y388F) haben steigende $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{frei}}$ keinen Einfluss auf die Bewegungsgeschwindigkeit der Aktinfilamente.

Somit lässt sich feststellen, dass für diese beiden Myosine, der Austausch eines Tyrosins gegen ein Phenylalanin in Schalter-2, zum Verlust der Mg^{2+} -Sensitivität der Motoraktivität im *in vitro*-Motilitätsassay führt.

3.1.1.2. Funktionale Untersuchung der Motoraktivitäten von *DdMyosin-1B* und *DdMyosin-2*

Analog zu *DdMyosin-1E* und -5b wurde die Bewegungsgeschwindigkeit der Aktinfilamente in Abhängigkeit von $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{frei}}$ für *DdMyosin-1B* und -2 untersucht. Bei diesen beiden Myosinen wurde ein Tyrosin, anstelle des Wildtyp-Phenylalanins bzw. -Serins, in Schalter-2 eingeführt. Es sollte untersucht

werden, ob sich für diese Myosine durch Einführung eines Tyrosins in Schalter-2 eine Sensitivität gegenüber freien Mg^{2+} -Ionen künstlich generieren lässt. Des weiteren sollte überprüft werden, ob *DdMyosin-1B* und -2, die als Motoren mit niedriger *duty ratio* charakterisiert sind, durch die Schalter-2-Mutation eine hohe *duty ratio* zeigen. Die resultierenden Erkenntnisse sollen weitere Einblicke in den molekularen Mechanismus von Myosinen mit hoher und niedriger *duty ratio* geben.

Die Experimente im *in vitro*-Motilitätsassay zeigen, dass freie Mg^{2+} -Ionen keinen Einfluss auf die „Motilität“ der beiden Wildtyp-Myosine zeigen (s. Abb. 21). Für die F387Y-Mutante von *DdMyosin-1B* zeigt sich mit steigenden $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ eine Reduktion der Aktin-Gleitgeschwindigkeit. Für *DdMyosin-1B* (F387Y) konnte ein K_i von $0,44 \pm 0,08$ mM bestimmt werden. Die Gleitgeschwindigkeit nimmt mit steigenden Mg^{2+} -Ionenkonzentrationen von $1,65 \pm 0,04 \mu\text{m s}^{-1}$ auf $0,82 \pm 0,1 \mu\text{m s}^{-1}$ um Faktor 2 ab (s. Abb. 21 (A)). Damit sind die Motoreigenschaften von *DdMyosin-1B* (F387Y) sehr ähnlich mit denen der Wildtypen von *DdMyosin-1E* und -5b.

Bei *DdMyosin-2* führt die S456Y-Mutation in Anwesenheit von niedrigen $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ zu einer drastischen Abnahme der Filamentgleitgeschwindigkeit um das Zehnfache (s. Abb. 21 (B)). Für *DdMyosin-2* (S456Y) konnte keine Änderung der Motoraktivität mit steigenden $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ festgestellt werden. Die Parameter aus dem *in vitro*-Motilitätsassays mit *DdMyosin-1B* und -2 sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

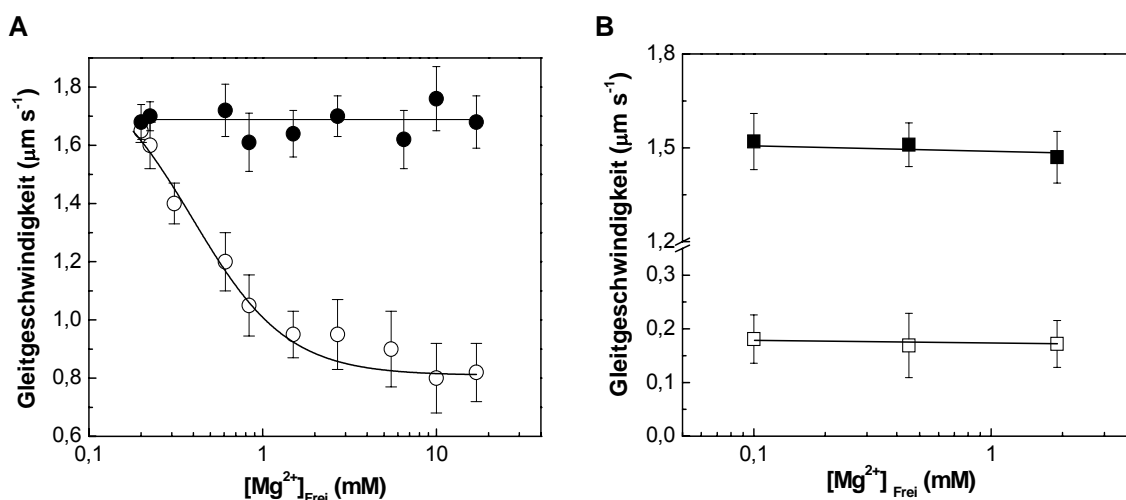


Abb. 21: Messung zur Abhängigkeit der *in vitro*-Motilität von der Konz. an freien Mg^{2+} -Ionen. **(A)** *DdMyosin-1B* Wildtyp (●); *DdMyosin-1B* (F387Y) (○). **(B)** *DdMyosin-2* Wildtyp (■); *DdMyosin-2* (S456Y) (□). Die Darstellung erfolgt in halblogarithmischer Form. Die Daten mit einer linearen Abhängigkeit wurden an eine Gerade angepasst. Die Daten mit einer sigmoidalen Abhängigkeit wurden an die Hill-Gleichung angepasst.

Parameter	<i>DdMyosin-1B</i>	<i>DdMyosin-1B</i> (F387Y)	<i>DdMyosin-2</i>	<i>DdMyosin-2</i> (S456Y)
v_{max} ($\mu\text{m s}^{-1}$)	$1,76 \pm 0,11$	$1,68 \pm 0,04$	$1,58 \pm 0,09$	$0,18 \pm 0,07$
v_{min} ($\mu\text{m s}^{-1}$)	$1,61 \pm 0,09$	$0,82 \pm 0,1$	$1,22 \pm 0,08$	$0,15 \pm 0,04$
K_i (mM)	-	$0,44 \pm 0,08$	-	-
Hill-Koeffizient	-	$1,96 \pm 0,17$	-	-

Tab. 4: Parameter der *in vitro*-Motilität von *DdMyosin-1B* und -2.

3.1.2. Funktionale Assays zur indirekten Bestimmung der *duty ratio*

3.1.2.1. Landeassay-Experimente mit *DdMyosin-1E* und *DdMyosin-5b*

Im vorherigen Kapitel wurde beschrieben, welche Auswirkungen der Austausch der nicht konservierten Aminosäure in Schalter-2 auf die Mg^{2+} -Sensitivität der Aktin-Translokationsgeschwindigkeiten von Klasse-1 und -5 Myosinen hat. In den folgenden Kapiteln soll nun untersucht werden, in wie weit die Punktmutation Einfluss auf die *duty ratio* dieser Myosine hat. Damit man eine Vorhersage über die *duty ratio* bzw. die Prozessivität eines bestimmten Myosins treffen kann, müssen die motilen Eigenschaften des Myosins bei geringen Myosin-Oberflächendichten untersucht werden. Dazu wird eine Abänderung des *in vitro*-Motilitätsassays, der sogenannte Landeassay, angewendet. Dabei wird die Myosindichte an der Oberfläche der Durchflusszellen stetig reduziert, bis auf 20 Moleküle pro μm^2 (*in vitro*-Motilitätsassays $\sim 25000 \mu m^2$), und die Lande-Ereignisse der Aktinfilamente dokumentiert. Der Landeassay wurde analog zu Rock et al. (2000) durchgeführt. Ein Landereignis musste von zufälligen Kollisionen der Aktinfilamente mit der Oberfläche, hervorgerufen durch die Brownsche Molekularbewegung, unterschieden werden. Aus diesem Grund wurden nur Lande-Ereignisse gezählt, bei denen sich die Aktinfilamente für mindestens 4 Bilder in Folge (2 s) in der Fokusebene befanden und sich dabei mindestens $0,5 \mu m$ bewegten (Sakamoto et al., 2003). Bei höheren Myosindichten ($> 100 \mu m^2$) entsprach die Gesamtbewegung ihrer Länge (s. Abb. 22). Die Bildsequenz zeigt ein Lande-Ereignis für *DdMyosin-5b* Wildtyp mit einer Myosindichte von 75 Molekülen pro μm^2 und $[Mg^{2+}]_{frei} = 5 \text{ mM}$. Die errechnete Gleitgeschwindigkeit des Aktinfilaments von $\sim 0,75 \mu m \text{ s}^{-1}$ deckt sich gut mit der Geschwindigkeit aus dem *in vitro*-Motilitätsassay (s. Abb. 20 (B)). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Myosindichte für ein prozessives Myosin der Klasse-5 keinen Einfluss auf die Gleitgeschwindigkeit der Aktinfilamente hat (Rock et al., 2000).

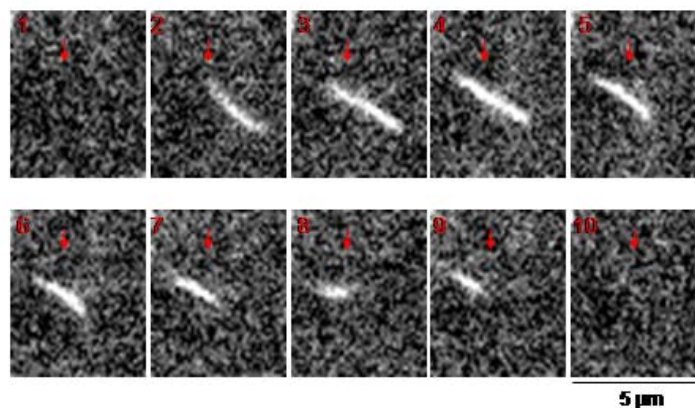


Abb. 22: Landereignis für *DdMyosin-5b* Wildtyp bei 75 Molekülen/ μm^2 und $[Mg^{2+}]_{frei} = 5 \text{ mM}$. Zwischen den einzelnen Bildern liegen 0,5 s. Die Länge des Aktinfilaments wird auf ca. $3 \mu m$ geschätzt. Dadurch ergibt sich eine Aktinfilament-Gleitgeschwindigkeit von $\sim 0,75 \mu m \text{ s}^{-1}$.

Die Landeereignisse der Wildtypen von *DdMyosin-1E* und *-5b* - wie auch der Mutanten - wurden bei 250 μM und 5 mM freien Mg^{2+} -Ionen bestimmt. Generell zeigte sich, dass die Anzahl der Landeereignisse zusammen mit der Myosindichte abnahm. Von einer Durchflusszelle wurden mindestens drei Aufnahmen von unterschiedlichen Regionen angefertigt und die Anzahl der Landeereignisse ausgewertet. Zu den bestimmten Mittelwerten wurde die Standardabweichung errechnet und als Fehlerwert angegeben.

Nach einem Modell von Hancock & Howard (1998) kann die Landerate L in Abhängigkeit von der Myosindichte ρ mit der Gleichung $L(\rho) = Z(1 - e^{-\rho/\rho_0})^n$ bestimmt werden. Das Modell wurde ursprünglich für Prozessivitätsassays mit Kinesinen entwickelt. Der Exponent n gibt hierbei die Ordnung des Landeprozesses an. Grundlage des Modells ist, dass sich die Myosinmoleküle rein zufällig auf der planaren Deckglasoberfläche verteilen und mindestens n Motoren für ein Landeereignis benötigt werden. Dabei wird für das Modell angenommen, dass ein Landeereignis ein Prozess ist, der schrittweise abläuft. Ein Aktinfilament bindet ein Myosin an der Deckglasoberfläche, dann ein zweites Myosin in Reichweite und so weiter, bis genügend Myosine für eine kontinuierliche Bewegung an das Filament gebunden haben. Z gibt die Kollisionsrate an mit der die Aktinfilamente auf die Oberfläche treffen und ist unabhängig von der Myosindichte. ρ_0 ist der Oberflächenbereich in dem Landeereignisse theoretisch möglich sind.

Ein $n = 1$ würde bedeuten, dass nur ein Motormolekül für das Auftreten eines Landeereignisses benötigt wird. Der Kehrwert von n kann als Näherungswert für die *duty ratio* des Myosins herangezogen werden (Sumiyoshi et al., 2007).

Sowohl der Wildtyp von *DdMyosin-1E* als auch der Wildtyp von *DdMyosin-5b* zeigen im Landeassay bei $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{frei}} = 5 \text{ mM}$ eine Landerate mit n von 1 - 2 (s. Abb. 23). Dies lässt vermuten, dass die beiden Myosine unter hohen freien Mg^{2+} -Konzentrationen durch eine hohe *duty ratio* gekennzeichnet sind. Im Gegensatz dazu konnte bei $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{frei}} = 250 \mu\text{M}$ für Wildtyp-*DdMyosin-1E* n mit $4 \pm 0,75$ bestimmt werden. Für Wildtyp-*DdMyosin-5b* wurde unter diesen Bedingungen ein n von 18 ± 2 ermittelt. Diese Werte schließen eine hohe *duty ratio* der Myosine unter niedrigen freien Mg^{2+} -Konzentrationen praktisch aus. Wie in Abbildung 23 deutlich zu erkennen ist, unterscheiden sich die Landeraten der Punktmutanten unter hohen und niedrigen freien Mg^{2+} -Konzentrationen nur wenig. Die Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen hat analog zum *in vitro*-Motilitätsassay keinen Einfluss auf das Verhalten der Schalter-2-Mutanten im Landeassay. Da n in beiden Fällen deutlich über 2 liegt, kann eine niedrige *duty ratio*, unabhängig von der Mg^{2+} -Konzentration, für die Y-zu-F-Mutanten postuliert werden. Tabelle 5 fasst die Parameter des Landeassays zusammen.

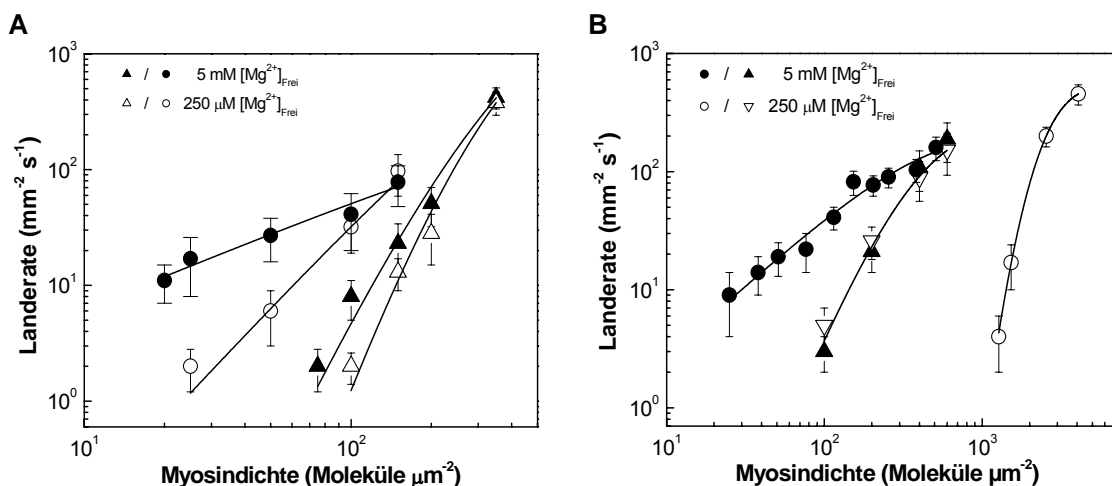


Abb. 23: Landeassay mit *DdMyosin-1E* und *DdMyosin-5b*. **(A)** *DdMyosin-1E* Wildtyp (●/○); *DdMyosin-1E* (Y388F) (▲/△). **(B)** *DdMyosin-5b* Wildtyp (●/○); *DdMyosin-5b* (Y487F) (▲/△). Die Landereignisse wurden bei $[Mg^{2+}]_{\text{frei}} = 250 \mu\text{M}$ (leere Symbole) und $[Mg^{2+}]_{\text{frei}} = 5 \text{mM}$ (volle Symbole) untersucht. Die Landerate wurde in Abhängigkeit der Myosindichte doppelt logarithmisch aufgetragen und an das Modell von Hancock und Howard angepasst (1998).

Parameter	<i>DdMyosin-1E</i>		<i>DdMyosin-1E</i> (Y388F)		<i>DdMyosin-5b</i>		<i>DdMyosin-5b</i> (Y487F)	
	250 μM $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$	5 mM $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$	250 μM $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$	5 mM $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$	250 μM $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$	5 mM $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$	250 μM $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$	5 mM $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$
Ordnung der Landerraten n	$2,6 \pm 0,75$	$1,1 \pm 0,1$	$7 \pm 1,1$	$5,1 \pm 0,9$	$18,9 \pm 2$	$1,2 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,7$	$3,3 \pm 0,7$
<i>duty ratio</i> (n^{-1})	$0,38 \pm 0,11$	$0,91 \pm 0,07$	$0,14 \pm 0,017$	$0,2 \pm 0,038$	$0,05 \pm 0,009$	$0,83 \pm 0,08$	$0,3 \pm 0,085$	$0,3 \pm 0,085$
min. Myosindichte § (Moleküle μm^{-2})	25 ± 4	20 ± 3	100 ± 15	75 ± 11	1200 ± 180	25 ± 4	100 ± 15	100 ± 15
Landerate bei 100 Mol. μm^{-2} ($\text{mm}^{-2} \text{s}^{-1}$)	32 ± 13	41 ± 17	2 ± 1	8 ± 3	-	41 ± 9	5 ± 2	3 ± 1

Tab. 5: Parameter aus den Landeassays mit *DdMyosin-1E* und *DdMyosin-5b*.

§ Die minimale Myosindichte gibt die Anzahl der Myosinmoleküle an, die für die Erzeugung eines Landereignisses notwendig sind.

3.1.2.2. Landeassay-Experimente mit *DdMyosin-1B*

DdMyosin-1B war im Landeassays deutlich schwieriger zu handhaben als *DdMyosin-1E* und *-5b*. Für den Wildtyp konnten, unabhängig von der $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$, bis zu Myosindichte von $5000 \mu\text{m}^{-2}$ keine Landereignisse beobachtet werden. Im Fall von *DdMyosin-1B* (F387Y) landeten Filamente an der Deckglasoberfläche, welche sich allerdings nicht bewegten und auch nicht mehr von der Oberfläche dissoziierten. Dadurch kam es mit zunehmender Zeit zu einer Anreicherung von Aktinfilamenten an der Deckglasoberfläche. In verschiedenen Landeassay-Experimenten mit *DdMyosin-1B* (F387Y) wurden die KCl-Konzentrationen im Reaktionspuffer von 25 mM - 100 mM variiert. Die veränderten Ionenstärken hatten keinen Einfluss auf das Verhalten der Aktinfilamente an der Deckglasoberfläche.

Auch Änderungen der Konzentration an Mg^{2+} -ATP im Bereich von 4 mM - 10 mM führten keine Veränderung im Landerverhalten der Aktinfilamente herbei. Wegen den unvollständigen Landereignissen wurde auf die Auswertung nach dem Modell von Hancock und Howard verzichtet. Trotzdem wird durch die Auftragung der unvollständigen Landereignisse deutlich, dass ein unterschiedliches Verhalten von *Dd*Myosin-1B (F387Y) bei $[Mg^{2+}]_{\text{frei}} = 250 \mu\text{M}$ und 5 mM vorliegt (s. Abb. 24).

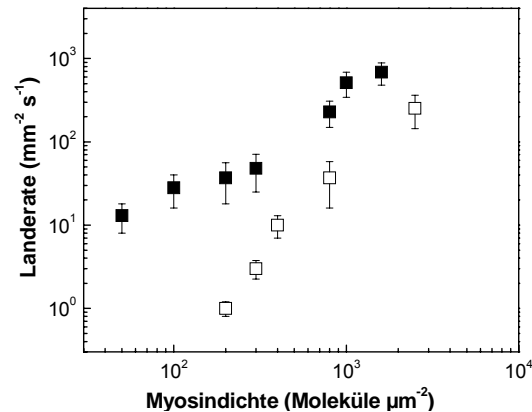


Abb. 24: Landeassay mit *Dd*Myosin-1B (F387Y) unter $[Mg^{2+}]_{\text{frei}} = 250 \mu\text{M}$ (□) und $[Mg^{2+}]_{\text{frei}} = 5 \text{ mM}$ (■).

3.2. Ein künstlicher prozessiver Nanomotor auf Basis eines Klasse-5 Myosins

Myosine sind dadurch gekennzeichnet, dass ihre kinetischen und mechanischen Eigenschaften im Allgemeinen sehr gut charakterisiert sind. Die Myosin-Motordomäne ist ein hochkonservierter Nanomotor, der mit jeweils kleinen Modifikationen in allen Eukaryonten vertreten ist. Der modulare strukturelle Aufbau der Proteine, bestehend aus Motordomäne, Hebelarm und Schwanzbereich, macht Myosine zu einem idealen Ziel für *protein engineering*-Ansätze (Tsiavaliaris et al., 2004; Manstein, 2004). Myosine aus der Klasse-5 sind bekannt dafür intrazelluläre Transportprozesse über längere Distanzen zu bewerkstelligen (Desnos et al., 2007). Um eine solche Aufgabe zu leisten, müssen die Myosine als Dimere vorliegen und ihr Mechanismus der Fortbewegung auf dem Aktinfilament muss prozessiv sein. Ihre Dimerisierung, hervorgerufen durch die C-terminale *coiled-coil* Region, ermöglicht es den prozessiven Vertretern der Klasse-5 sich nach dem *hand over hand*-Mechanismus auf dem Aktinfilament über mehrere Schritte fortzubewegen, ohne vom Filament zu dissoziieren (Yildiz et al., 2003).

Im Rahmen einer methodenübergreifenden Kooperation mit Mitgliedern der Arbeitsgruppe wurden künstliche Myosin-basierte Motoren aus verschiedenen, nicht miteinander verwandten Bausteinen hergestellt. Dadurch sollte einerseits ein möglichst einfacher prozessiver Motor generiert werden und zum anderen ein Motor konstruiert werden, dessen funktionale Eigenschaften extern zu kontrollieren und zu regulieren sind. Die Konstruktion des prozessiven Myosinmotors erfolgte in Zusammenarbeit mit Daniela Kathmann und Dr. Ralph Diensthuber, die für das Modellieren und das Konstruieren der Motoren verantwortlich waren. Die Motordomäne von *Dd*Myosin-5b diente hierbei als Grundbaustein

des künstlichen prozessiven Motors (M5P). *DdMyosin-5b* ist durch eine hohe *duty ratio* gekennzeichnet und erfüllt damit die Voraussetzung für Prozessivität. Darüberhinaus lässt sich die Motoraktivität leicht durch die Anwesenheit freier Mg^{2+} -Ionen regulieren (Taft et al., 2008). Zur Kraftentwicklung wurde die Motordomäne an einen künstlichen Hebelarm aus 2 α -Aktininen (2R) gekoppelt. Die Dimerisierung des künstlichen Nanomotors erfolgte über den *coiled-coil*-Struktur bildenden Transkriptionsfaktor GCN4 (Leucin-*Zipper*, LZ) aus *Saccharomyces cerevisiae*. Damit das Konstrukt fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden konnte, wurde ein eYFP-Molekül an den Leucin-*Zipper* fusioniert. Um den artifiziellen Motor aufzureinigen zu können, wurde das Konstrukt mit einem C-terminalen FLAG-tag versehen. Zur Untersuchung der Motoraktivität und der Prozessivität wurden im folgenden *in vitro*-Motilitätsassays und TIRF-Mikroskopie-basierte Einzelmolekülexperimente durchgeführt.

3.2.1. Funktionale Untersuchungen der Motoraktivität von M5P

Der Motilitätsassay wurde analog zu Kapitel 3.1.1.1 durchgeführt, wobei auf Grund des geänderten Affinitäts-tags auf eine Antikörperbeschichtung der Durchflusszellenoberfläche verzichtet wurde. Die Verwendung eines Anti-FLAG-Antikörpers führte bei mehreren getesteten Myosinkonstrukten zu keiner Aktinfilament-Gleitbewegung. Eine weitere Abwandlung gegenüber den vorherigen Motilitätstests ist die Durchführung bei 24°C, anstatt 30°C. Während der Experimente wurde die Konzentration der freien Mg^{2+} -Ionen im Bereich von 20 μ M - 20 mM variiert und die jeweilige Geschwindigkeit der Aktinfilamente bestimmt. Für das monomere Konstrukt von *DdMyosin-5b* wurde der K_i von 0,43 mM aus Kapitel 3.1.1.1 (vgl. Abb. 20 (B); Taft et al., 2008) auch bei einer Assay-Temperatur von 24°C bestätigt. Nur die absoluten Geschwindigkeiten waren, bedingt durch die niedrigere Temperatur, um Faktor 2 langsamer (s. Abb. 25). Für M5P zeigte sich, dass die Gleitgeschwindigkeiten bei sehr niedrigen und sehr hohen freien Mg^{2+} -Ionenkonzentrationen identisch mit denen des Monomers waren. In einem Bereich, der für *Dictyostelium discoideum* physiologischen Mg^{2+} -Ionenkonzentration, von 0,1 - 1 mM lagen die Gleitgeschwindigkeiten M5P über denen des monomeren Konstrukts. Die Inhibierungskonstante für M5P wurde zu $0,81 \pm 0,14$ mM bestimmt.

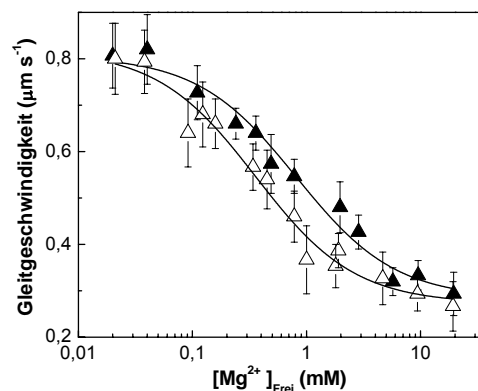


Abb. 25: *In vitro*-Motilitätsassay mit *DdMyosin-5b-2R-His* (Δ , Monomer) und M5P (\blacktriangle , Dimer) bei 24°C und in Abhängigkeit der freien Mg^{2+} -Konzentration im Bereich von 20 μ M bis 20 mM. Die Darstellung erfolgt in halblogarithmischer Form. Der sigmoidale Verlauf der Daten wurde an die Hill-Gleichung angepasst.

Die Fragmentierung der Aktinfilamente während des *in vitro*-Motilitätsassays, die typisch ist für in dieser Arbeit verwendeten Klasse-5 Myosine (*Dd*Myosin-5a, -5b und *Gg*Myosin-5a), wurde bei den Motilitäts-Experimenten mit M5P nicht beobachtet (s. Abb. 26).

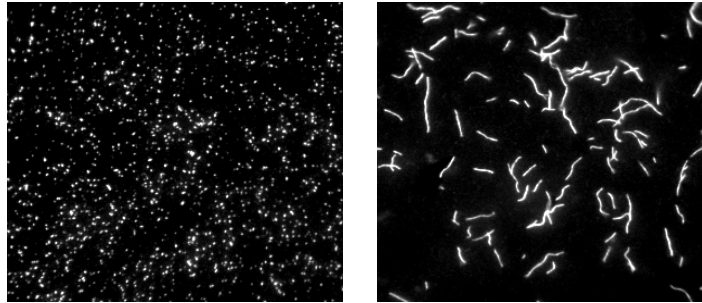


Abb. 26: Gegenüberstellung der Aktinfilamente an der Deckglasoberfläche von *Dd*Myosin-5b-2R-His (Monomer, links) und M5P (Dimer, rechts). Die beiden dargestellten Oberflächen haben eine identische Größe. Für die Aufnahmen wurde eine 60x Vergrößerung verwendet.

3.2.2. Prozessive Bewegung von M5P in Einzelmolekül-Experimenten

Die Einzelmolekül-Experimente mit M5P wurden mittels TIRF-Mikroskopie (vgl. Kapitel 1.4) durchgeführt. Dafür wurden Alexa®635-Phalloidin markierte Aktinfilamente mit NEM inaktiviertem Myosin-2 an die Deckglasoberfläche fixiert (Hodges et al., 2007). Anschließend wurde 1 nM M5P zusammen mit einer Pufferlösung mit 4 mM ATP und 9 mM MgCl₂ in die Durchflusszelle gegeben. Dadurch ergibt sich eine Konzentration an freien Mg²⁺-Ionen von 4,7 mM. Mittels der TIRF-Mikroskopie konnte das Fluoreszenzsignal von einzelnen oberflächennahen M5P-Molekülen observiert werden. Sofern ein Molekül an ein Aktinfilament andockte, konnte eine gerichtete Einzelmolekülbewegung beobachtet werden (s. Abb. 27). Bei diesem Einzelmolekül-Ereignis konnte das Myosin über 3,5 s beobachtet werden. Die Bildfrequenz der Aufnahme betrug 8,3 s⁻¹ und das Ereignis konnte über insgesamt 29 Bilder verfolgt werden. Für die zurückgelegte prozessive Laufstrecke konnte eine Distanz von ~ 600 nm ermittelt werden (Particle Tracker, ImageJ), woraus eine Geschwindigkeit von 185 nm s⁻¹ für das Myosin abzuleiten ist. Für sämtliche Einzelmolekül-Experimente bei denen die freie Mg²⁺-Ionenkonzentration unter 5 mM lag, konnte für M5P keine prozessive Bewegung beobachtet werden.

Die quantitative Auswertung der Laufweiten und *dwell-times* von M5P wurden von Dr. Mamta Amrute-Nayak (Amrute-Nayak et al., 2009) durchgeführt. Die Prozessivitäts-Experimente erfolgten bei 10 mM [Mg²⁺]_{frei} und die Ergebnisse liegen in sehr guter Übereinstimmung mit dem Resultat der Einzelmolekül-Experimente in dieser Arbeit.

Der *in vitro*-Motilitätsassay wurde mit M5S analog zu Kapitel 3.1.1.1 durchgeführt. Die Gleitgeschwindigkeit der Aktinfilamente, die von der K6-Mutante transportiert werden, ist unter niedrigen freien Mg^{2+} -Ionenkonzentrationen ($[Mg^{2+}]_{\text{frei}} = 40 \mu\text{M}$) mit $0,27 \pm 0,043 \mu\text{m s}^{-1}$ deutlich geringer als beim Wildtyp (vgl. Abb. 20 (B)). Durch eine Erhöhung der $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ auf 1,9 mM konnte die Bewegung der Aktinfilamente innerhalb der gleichen Durchflusszelle vollständig gestoppt werden (s. Abb. 29 (A-1)). Dieser Ablauf war, mit der Durchführung eines Pufferwechsels auf die ursprüngliche Mg^{2+} -Konzentration, reversibel (A-2). Nach Erhöhung der Kaliumchlorid-Konzentration von 25 mM auf 100 mM konnte - unter Verwendung der gleichen Durchflusszelle - die Gleitgeschwindigkeit auf $0,53 \pm 0,04 \mu\text{m s}^{-1}$ verdoppelt werden (A-3). Bei einer anschließenden Erhöhung der $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ auf wiederum 1,9 mM wurde die Gleitgeschwindigkeit zwar auf $0,35 \pm 0,06 \mu\text{m s}^{-1}$ reduziert, aber nicht mehr gestoppt (A-4). Erst der Pufferwechsel auf die Standard-Salz-Konzentration von 25 mM führte abermals zum Stillstand der Aktinfilamente (A-5).

Die Einführung von 6 GKK-Motiven in Schleife-2 von *DaMyosin-2* erfolgte analog zu M5S. Das Konstrukt zeigte, verglichen mit dem Wildtyp von *DaMyosin-2* (s. Abb. 21 (B)), eine deutlich langsamere Gleitgeschwindigkeit der Aktinfilamente im *in vitro*-Motilitätsassay (s. Abb. 29 (B)). Messungen mit 100 mM Kaliumchlorid im Puffer waren nicht möglich, weil eine gleichmäßige Bewegung der Aktinfilamente nicht mehr gegeben war.

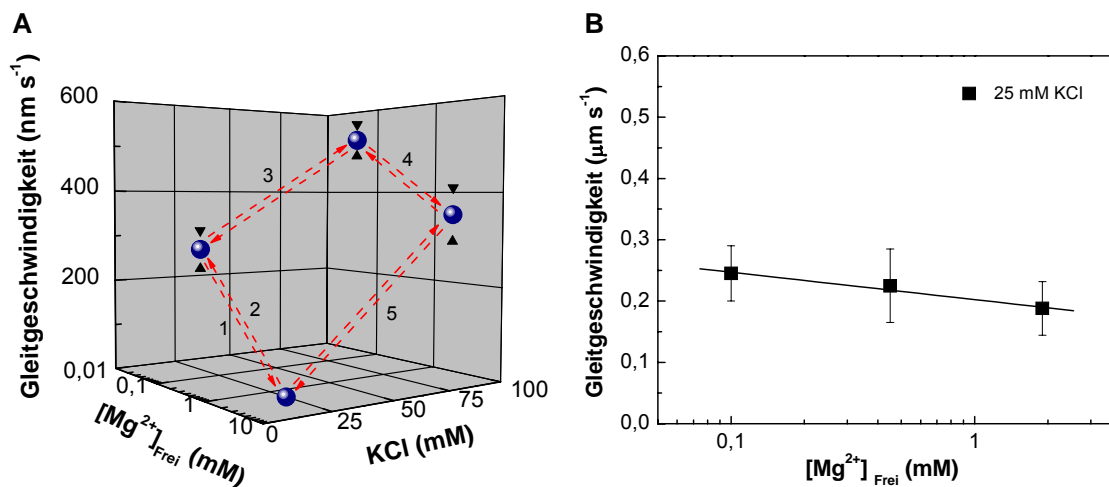


Abb. 29: (A) *In vitro*-Motilitätsassay mit M5S. Alle Messpunkte wurden unter Verwendung einer Durchflusszelle durch Pufferwechsel generiert. (B) *In vitro*-Motilitätsassay mit *DaMyosin-2*-K6. Die Daten zeigten eine lineare Abhängigkeit und wurden an eine Gerade angepasst.

3.2.4. Immobilisierte M5S- und *DaMyosin-2*-Moleküle im Langzeit-Stabilitäts-Test

Bei der Integration von Myosinen in artifiziellen Oberflächen zur Konstruktion von biohybriden Systemen ist die Haltbarkeit der einzelnen Komponenten ein kritischer Faktor. Zur Darstellung der Haltbarkeit des generierten M5S-Konstrukt auf artifiziellen Oberflächen wurden Deckgläschen mit Tetrachlormethylsilan (Mansson et al., 2008) behandelt. M5S wurde über einen Anti-Histidin-

Antikörper an der Oberfläche gebunden. Freie Oberflächenbereiche wurden mit dem Polymer Pluronic F107 blockiert. Die immobilisierten M5S-Moleküle wurden mit $2 \mu\text{M}$ F-Aktin überschichtet. Die Bildung des Akto-Myosin-Komplexes führte zu einer Stabilisierung des Systems. Die Durchflusszellen mit 0,04% Natriumazid-haltigen Assay-Puffer versiegelt (Twinsil, Picodent) und bei 4°C gelagert. In einem 24 Stunden-Rhythmus wurden Durchflusszellen geöffnet und die Prozedur des Motilitätsassays gestartet. Bei der Analyse der mikroskopischen Aufnahmen wurde der Anteil der bewegenden Filamente gemessen. In Abbildung 33 ist der Anteil der bewegenden Filamente in Abhängigkeit von der Lagerungszeit dargestellt. Dabei zeigt M5S nach sieben Tagen (168 Std) noch 60 % bewegende Filamente. Die Gleitgeschwindigkeit der bewegenden Aktinfilamente ist identisch mit der Gleitgeschwindigkeit in einer frisch erstellten Durchflusszelle. Ein vergleichbares Konstrukt aus *DdMyosin-2* zeigt bereits nach drei Tagen keine Motilität mehr (s. Abb. 30).

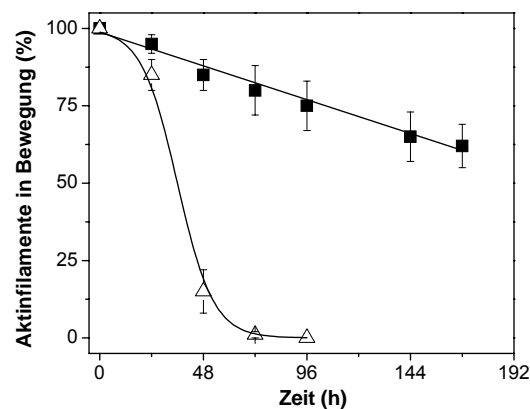


Abb. 30: Vergleich der Langzeit-Stabilität von M5S (■) und *DdMyosin-2* (Δ) im *in vitro*-Motilitätsassay. Die Daten von M5S zeigen eine lineare Abhängigkeit und wurden an eine Gerade angepasst. Die Daten von *DdMyosin-2* werden durch einen sigmoidalen Verlauf beschrieben und wurden an die Hill-Gleichung angepasst.

3.2.5. Pflanzen-Myosin-11 als Basis für schnelle Nanomotoren

Die Strömung des hochviskosen Zytoplasmas einer Pflanzenzelle ist die schnellste bekannte Bewegung, die von Motorproteinen angetrieben wird (Shimmen et al., 1994). Dabei transportieren Myosinen der Klasse-11 die Organellen mit bis zu $100 \mu\text{m s}^{-1}$ entlang eines peripheren Aktin-Zytoskeletts. Zum heutigen Zeitpunkt sind drei Pflanzen-Myosine aus der Klasse-11 näher charakterisiert: MYA1 aus *A. thaliana* (Hachikubo et al., 2007), Myosin-11 aus *C. corallina* (Ito et al., 2007) und das prozessive Myosin-11 aus *N. tabacum* (Tominaga et al., 2003; Diensthuber, 2009).

Der vergleichsweise geringe Kenntnisstand über Pflanzen-Myosine beruht auf deren Instabilität während des Aufreinigungsprozesses und bei der anschließenden Lagerung des gereinigten Proteins. Im Zuge dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob ein geändertes Protokoll der Aufreinigung zu einer höheren Stabilität eines Myosin-11 aus *N. Tabacum* (*NtMyosin-11*) führt und somit der Einsatz für nanotechnologische Zwecke ermöglicht wird.

Die Verwendung von 3 % Trehalose und 2 mM ATP in den Puffern der Proteinaufreinigung führte zu einer höheren Viskosität des Puffers und einer andauernden Bindung von Nukleotid. Dies führte zu einer deutlich höheren Stabilität von *NtMyosin-11*. Auf diese Weise war es möglich sowohl die

ATPase-Aktivität als auch verschiedene transientenkinetische Parameter reproduzierbar zu messen (Diensthuber, 2009).

Zur Überprüfung der funktionalen Motoreigenschaften wurde ein Konstrukt aus der Motordomäne und einem künstliche Hebelarm aus 2 α -Aktininmolekülen (*NtMyosin-11-2R-His*) verwendet. Der C-terminale Histidin-tag ermöglichte den Einsatz eines Antikörpers zur Fixierung der Myosine an der Deckglasoberfläche. Auf Grund der zu erwartenden hohen Gleitgeschwindigkeit der Aktinfilamente wurden die *in vitro*-Motilitäts-Experimente bei Raumtemperatur (24°C) durchgeführt. In den Experimenten konnte für *Nt-Myosin-11-2R-His* eine schnelle Gleitgeschwindigkeit von $4,7 \pm 0,3 \mu\text{m s}^{-1}$ gemessen werden (s. Abb. 31). Dieses Ergebnis konnte mit verschiedenen Fraktionen aus den Proteinaufreinigungen, die bei -80°C gelagert wurden, reproduziert werden.

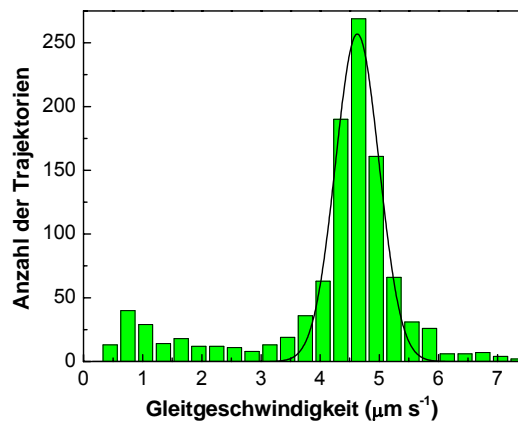


Abb. 31: *Nt-Myosin-11-2R-His* im *in vitro*-Motilitätsassay. Für die Messung wurde ein Anti-Histidin-Antikörper mit einer Konzentration von 0,05 mg/ml verwendet. Die ATP-Konzentration lag bei 4 mM und die Mg^{2+} -Konzentration lag bei 2 mM. Die Messung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt (24°C). Die Trajektorien-Verteilung wurde an die Gauss-Gleichung angepasst, worüber sich eine mittlere Gleitgeschwindigkeit von $4,7 \pm 0,3 \mu\text{m s}^{-1}$ errechnet werden konnte.

3.3. Myosin-Modulatoren auf Basis von Pseudilinderivaten

Kleine Moleküle, welche die Motoraktivität von bestimmten Myosin-Isoformen selektiv inhibieren bzw. aktivieren, haben ein großes Potential bei der Behandlung von Krankheiten die durch defekte Motorproteine ausgelöst werden (Ciarka et al., 2008). Solche Wirkstoffe könnten ihren therapeutischen Einsatz bei Krebs (Betapudi et al., 2006), pathogenen Infektionen (Ireton, 2007), Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems (Bonne et al., 1998) und des zentralen Nervensystems (Melchionda et al., 2001) haben. Bei der zielgerichteten Entwicklung solcher kleinen Moleküle kommen sowohl *in silico*-Methoden als auch Röntgenstrukturanalyse zum Einsatz.

In den folgenden Kapiteln soll die Effektivität von zwei Myosin-Modulatoren auf Pseudilin-Basis validiert werden. Die chemische Synthese der Modulatoren erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Joachim Knölker (TU Dresden) (Martin et al., 2009).

3.3.1. Charakterisierung von Myosin-5a aus *Dictyostelium discoideum*

In *D. discoideum* (*Dd*) sind zwei Klasse-5 Myosine, *DdMyosin-5a* und *-5b*, bekannt. *DdMyosin-5b* wurde durch umfangreiche kinetische und funktionale Untersuchungen als prozessiver Motor beschrieben (Taft et al., 2008). Damit ein Myosin-klassenspezifischer Effekt der Modulatoren untersucht werden kann, wird in dieser Arbeit eine grundlegende kinetische Charakterisierung und funktionale Untersuchung von *DdMyosin-5a* vorangestellt. Myosin-5a ist - neben Myosin-1A und -1G - das letzte bisher vollständig uncharakterisierte Myosin aus *D. discoideum*.

DdMyosin-5a ist auch als *DdMyosin-H* bekannt, als Genprodukt des *Dd* Gens myoh (DDB_G0289447; Dictybase), genannt und erhält seine aktuelle Klassifizierung Sequenzanalysen von über 1700 Myosin-Motordomänen (Kollmar, 2006). *DdMyosin-5a* ist mit einem Molekulargewicht von 201 kDa etwas kleiner als *DdMyosin-5b*. Es besitzt eine N-terminale Verlängerung mit einer SH3-ähnlichen Domäne und die darauf folgende Motordomäne besteht aus 847 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 95,2 kDa. Im Anschluss an die Motordomäne befindet sich eine Nackendomäne mit 5 IQ-Motiven. Der Schwanz-Bereich von *DdMyosin-5a* weist mehrere *coiled coil*-bildende Strukturen auf (Kollmar, 2006).

3.3.1.1. Steady-state-Kinetik und funktionale Untersuchung der Motoraktivität von *DdMyosin-5a*

In Abwesenheit von F-Aktin wurde die basale ATPase (k_{basal}) von *DdMyosin-5a* bestimmt. Die Aktin-aktivierte ATPase wurde in Anwesenheit von 0,5 - 70 μM F-Aktin gemessen. Durch die Anpassung der jeweiligen ATP-Umsatzgeschwindigkeiten (k_{obs}) an die Michaelis-Menten-Gleichung konnte die maximale ATPase (k_{cat}) mit $10,8 \pm 0,8 \text{ s}^{-1}$ ermittelt werden. Der K_{m} -Wert wurde zu $35 \pm 4 \mu\text{M}$ bestimmt. In Tabelle 6 sind die Parameter der Aktin-aktivierten ATPase von *DdMyosin-5a* zusammengefasst sowie mit denen von *DdMyosin-5b*, *GgMyosin-5a* sowie *DdMyosin-2* verglichen.

Konstante	<i>DdMyosin-2</i> *	<i>DdMyosin-5a</i>	<i>DdMyosin-5b</i> *	<i>GgMyosin-5a</i> §
$k_{\text{basal}} (\text{s}^{-1})$	$0,095 \pm 0,01$	$0,098 \pm 0,015$	$0,069 \pm 0,01$	0,03
$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$1,44 \pm 0,4$	$10,8 \pm 0,8$	$11,6 \pm 0,8$	15
$K_{\text{app}} (\mu\text{M})$	51 ± 23	35 ± 4	27 ± 7	1,4
$k_{\text{cat}}/K_{\text{app}} (\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$0,028 \pm 0,002$	$0,31 \pm 0,04$	$0,43 \pm 0,05$	11
Aktivierung	14,2	110	167	500

Tab. 6: Parameter der ATPase-Aktivität von *DdMyosin-5a* im Vergleich. Aktivierung der ATPase: ($k_{\text{cat}}/k_{\text{basal}}/k_{\text{basal}}$).

* Taft (2007); § de la Cruz et al. (1999)

Die funktionale Untersuchung der Motoraktivität im *in vitro*-Motilitätsassay wurde mit einem Motordomänen-Konstrukt mit künstlichem Hebelarm durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss der Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen auf die Motoraktivität von *DdMyosin-5a* analog zu Kapitel 3.1.1.1 studiert. Bei niedrigen freien Mg^{2+} -Ionenkonzentrationen ($[\text{Mg}^{2+}]_{\text{frei}}$) konnte für die Aktinfilamente eine

Gleitgeschwindigkeit von $1,2 \pm 0,04 \mu\text{m s}^{-1}$ gemessen werden. Ab einer $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{frei}}$ von $\sim 100 \mu\text{M}$ kommt es zu einer Verlangsamung der Gleitgeschwindigkeit bis zu $0,45 \pm 0,08 \mu\text{m s}^{-1}$ bei $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{frei}}$ von $3,4 \text{ mM}$. Das entspricht einer Verlangsamung der Bewegungsgeschwindigkeit um den Faktor 2,7 mit einer Inhibierungskonstante $K_i = 0,31 \pm 0,06 \text{ mM}$. Es lassen sich Unterschiede bei den absoluten Gleitgeschwindigkeiten von *DdMyosin-5a* und *-5b* beobachten. Der K_i -Wert für die beiden Myosine ist dagegen annähernd identisch (s. Tab. 7).

<i>In vitro</i> -Motilitätsassay	<i>DdMyosin-5a</i>	<i>DdMyosin-5b</i>
v_{max} ($\mu\text{m s}^{-1}$)	$1,2 \pm 0,04$	$1,62 \pm 0,11$
v_{min} ($\mu\text{m s}^{-1}$)	$0,45 \pm 0,08$	$0,54 \pm 0,12$
K_i (mM)	$0,31 \pm 0,06$	$0,43 \pm 0,05$
Geschwindigkeitsverlust (Faktor)	2,7	3
Hill-Koeffizient	$1,82 \pm 0,36$	$0,95 \pm 0,16$

Tab. 7: Parameter aus den *in vitro*-Motilitätsassays mit *DdMyosin-5a* im Vergleich mit *DdMyosin-5b*.

3.3.1.2. Transientenkinetische Untersuchung von *DdMyosin-5a*

Die Daten aus den *steady-state*-Kinetiken und dem *in vitro*-Motilitätsassay zeigen, dass die entsprechenden Parameter von *DdMyosin-5a* denen von *DdMyosin-5b* sehr ähnlich sind. Für eine differenzierte Betrachtung wurden zusätzlich einzelne Reaktionsschritte des ATPase-Zyklus mittels transientenkinetischen Experimenten untersucht. Zur Bestimmung der Daten wurde das *stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer eingesetzt. Die ermittelten Daten wurden den Modellen von Bagshaw & Trentham (1974) und Malnasi-Csizmadia et al. (2001) angepasst.

Folgende Daten konnten für *DdMyosin-5a* ermittelt werden: die apparente Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung der mantATP-Bindung an Myosin (K_1k_{+2}) sowie die Hydrolyserate ($k_{+3} + k_{-3}$), die apparente Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung der mantADP-Bindung an Myosin (k_{+mD}), die apparente Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung der ATP-induzierten Dissoziation des Akto-Myosin-Komplexes (K_1k_{+2}) und die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung der Bindung von Myosin an Aktin (k_{+A}). Die Bindung von *DdMyosin-5a* an Aktin musste über das Lichtstreuungssignal des Akto-Myosin-Komplexes bestimmt werden, weil die Bindung an Pyren-Aktin kein Signal ergab. Die Parameter der transientenkinetischen Messungen mit *DdMyosin-5a* sind in Tabelle 8 im Vergleich mit *DdMyosin-2*, *-5b* und *GgMyosin-5a* dargestellt.

Konstante	<i>DdMyosin-2</i> *	<i>DdMyosin-5a</i>	<i>DdMyosin-5b</i> *	<i>GgMyosin-5a</i> [§]
K_1k_{+2} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	0.8 ± 0.02	0.45 ± 0.02	0.8 ± 0.04	1.6
$k_{+3} + k_{-3}$ (s^{-1})	28 ± 18	188 ± 31	410 ± 18	≥ 750
k_{+mD2} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	0.42 ± 0.04	$4,64 \pm 0,25$	$[84.2 \pm 15]^+$	3.7
k_{+mD1} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	-	$0,14 \pm 0,04$	0.17 ± 0.01	$[2.8 \text{ s}^{-1}]^+$
K_1k_{+2} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	0.24 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.9
k_{+A} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	0.53 ± 0.05	2.68 ± 0.11	1.17 ± 0.08	73

Tab. 8: Parameter der transientenkinetischen Experimente mit *DdMyosin-5a* im Vergleich mit *DdMyosin-2*, *-5b* und *GgMyosin-5a*.

* Taft (2007); § de la Cruz et al. (1999).

3.3.2. Der Myosin-Inhibitor Pentabromopseudilin

Pentabromopseudilin (PBP) ist ein natürliches Stoffwechselprodukt des marinen gramnegativen Bakteriums *Pseudomonas bromoutilis* (s. Abb. 32). Es handelt sich um ein fünffach bromiertes Pyrrol-Antibiotikum, dessen Wirkung, als erstes beschriebenes Metabolit eines marinen Bakteriums, auf grampositive Bakterien nachgewiesen wurde (Burckholder et al., 1966). Die systematische Bezeichnung von PBP lautet 2,3,4-tribromo-5-(3,5-dibromo-2-hydroxy-phenyl)-1H-pyrrol.

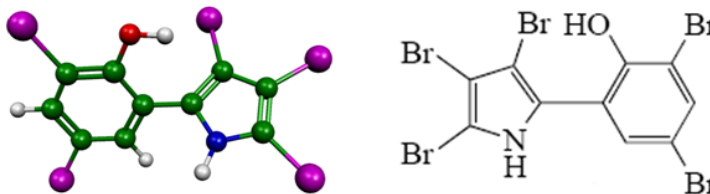


Abb. 32: Strukturformel von Pentabromopseudilin.

Bei Untersuchungen an Kardiomyozyten und ihren G-Protein-gekoppelten β -Adrenorezeptoren stellte sich heraus, dass PBP myosinabhängige Prozesse inhibiert. Durch die Untersuchungen in dieser Arbeit sollte der Grad der Inhibierung, die Isoformspezifität und der Mechanismus des Inhibierungsprozesses aufgeklärt werden. Teile der im folgenden beschriebenen transientenkinetischen Experimente zur Charakterisierung des Einflusses von PBP auf transientenkinetische Parameter wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Georgios Tsiavaliaris und Dr. Manuel Taft durchgeführt.

Das PBP wurde generell in 90 %igen Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Für sämtliche folgenden Experimente wurde darauf geachtet, dass das DMSO im Reaktionsansatz niemals eine Endkonzentration von 2,5 % überschritt. Durch verschiedene Kontrollexperimente ohne PBP konnte eine Beeinflussung der Messergebnisse durch das Lösungsmittel ausgeschlossen werden.

3.3.2.1. Inhibierung der basalen ATPase verschiedener Myosine durch PBP

Für die Untersuchung der ATPase-Aktivität im Fließgleichgewicht wurde der NADH-gekoppelte Assay verwendet. Es wurde der Einfluss von PBP-Konzentrationen im Bereich von 0,02 – 200 μM auf die basale ATPase von OcMyosin-2 und den *Dictyostelium*-Myosinen-1E, -2, -5a, -5b untersucht. Um den Inhibierungs-Grad der verschiedenen Myosine vergleichen zu können, wurden die ATPasen auf den Startwert 1 normiert. Für sämtliche untersuchte Myosine war der Verlauf der PBP-Inhibierung sigmoidal und die Kurven wurden an die Hill-Gleichung angepasst (vgl. Kapitel 3.1.1.1) (s. Abb. 33). Die stärkste Inhibierung der basalen ATPase mit einer Inhibierungskonstante K_i von 0,4 μM zeigt das Klasse-5a Myosin aus Huhn. Die K_i -Werte von DdMyosin-1E, -2 und -5b sind mit Werten um 10 μM sehr ähnlich und signifikant höher. In diesem Vergleich wird DdMyosin-5a nochmals deutlich

schwächer inhibiert. Der K_i von $57,2 \mu\text{M}$ liegt eine Zehnerpotenz über den anderen *Dictyostelium*-Myosinen. Vergleicht man *Dd*Myosin-5a mit *Gg*Myosin-5a sind es sogar zwei Zehnerpotenzen. Anhand der basalen ATPase lässt sich somit keine Myosin-Klassenspezifität von PBP festmachen aber die Unterschiede zwischen einzelnen Isoformen sind signifikant. Die Tabelle 9 fasst die Parameter der PBP-inhibierten basalen ATPasen zusammen.

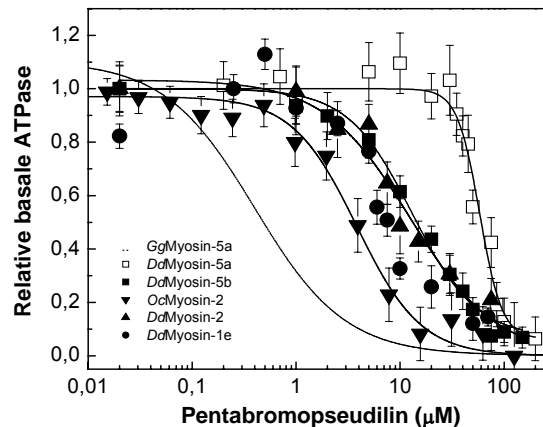


Abb. 33: Relative basale ATPase-Aktivität verschiedener Myosine aus Klasse-1, -2 und -5 inhibiert durch Pentabromopseudilin in Konzentrationen von $0,02 - 200 \mu\text{M}$. An den sigmoidalen Verlauf der Datenpunkte bei halblogarithmischer Darstellung wurde eine Hill-Kurve angepasst.

Myosin	Basale ATPase - PBP (s^{-1})	Basale ATPase + PBP (s^{-1})	Inhibierungskonstante K_i (μM)	Inhibierungs- Faktor
<i>Dd</i> Myosin-1E	$0,14 \pm 0,03$	$0,015 \pm 0,015$	$8,4 \pm 0,8$	9
<i>Dd</i> Myosin-2	$0,08 \pm 0,01$	$0,011 \pm 0,008$	$12,8 \pm 0,8$	7
<i>Oc</i> Myosin-2	$0,069 \pm 0,012$	$0,002 \pm 0,001$	$3,9 \pm 0,5$	34,5
<i>Gg</i> Myosin-5a	$0,03 \pm 0,01$	$0,006 \pm 0,003$	$0,4 \pm 0,06$	5
<i>Dd</i> Myosin-5a	$0,098 \pm 0,015$	$0,006 \pm 0,005$	$57,2 \pm 4,8$	16
<i>Dd</i> Myosin-5b	$0,102 \pm 0,009$	$0,007 \pm 0,006$	$13,8 \pm 0,9$	14,5

Tab. 9: Parameter der basalen ATPase von *Dd*Myosin-1E, -2, -5a, -5b, *Gg*Myosin-5a und *Oc*Myosin-2 in An- und Abwesenheit PBP.

3.3.2.2. Inhibierung der Aktin-aktivierten ATPase verschiedener Myosine durch PBP

In weiteren *steady-state*-Experimenten sollte der Einfluss von PBP auf die Aktin-aktivierte ATPase von verschiedenen Myosinen untersucht werden. Analog zu den Untersuchungen der basalen ATPase sollte auch in diesen Experimenten die Inhibierungskonstante (K_i) durch eine PBP-Titration im Bereich von $0,01 - 300 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Auch in diesen *steady-state*-Experimenten wurde das Myosin fünf Minuten mit der entsprechenden Konzentration an PBP inkubiert bevor F-Aktin und ATP zugegeben wurde.

In Abbildung 34 (A) ist die Aktin-aktivierte ATPase von *Dd*Myosin-5b in An- und Abwesenheit von $25 \mu\text{M}$ PBP dargestellt. Die ATPase-Aktivität wurde gegen die Aktinkonzentration aufgetragen und an die Daten wurde eine Hyperbel gemäß der Michaelis-Menten-Gleichung angepasst. Aus der

hyperbolischen Anpassung wurden die maximale ATP-Umsatzrate (k_{cat}), der Wert der halbmaximalen Aktivierung der ATPase (K_{app}) und die apparente Aktinbindungskonstante in Anwesenheit von ATP ($k_{\text{cat}}/K_{\text{app}}$) bestimmt. k_{cat} ist durch den PBP-Einfluss von $11,8 \text{ s}^{-1}$ auf $2,1 \text{ s}^{-1}$ reduziert. K_{app} ändert sich von $27 \text{ }\mu\text{M}$ auf $175 \text{ }\mu\text{M}$. Durch die Verschiebung dieser Parameter ändert sich auch $k_{\text{cat}}/K_{\text{app}}$ von $0,43 \text{ }\mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf $0,012 \text{ }\mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Bei der systematischen Untersuchung des PBP-Einflusses auf die Aktin-aktivierte ATPase sind verschiedene Myosine der Klasse 1, Klasse 2 und Klasse 5 im Vergleich zu dem von mir untersuchten Myosin-5a dargestellt (s. Abb. 34 (B)). Dem Reaktionsgemisch wurden stets $30 \text{ }\mu\text{M}$ F-Aktin zugesetzt und die ATP-Umsatzgeschwindigkeit des PBP-freien Ansatzes wurde auf den Wert 1 normiert. Die Daten wurden halblogarithmisch aufgetragen und nach der Hill-Gleichung (vgl. Kapitel 3.1.1.1) analysiert. Die Aktin-aktivierte ATPase von GgMyosin-5a wird am stärksten durch PBP inhibiert. Der K_i liegt im Fall von GgMyosin-5a bei $1,2 \pm 0,2 \text{ }\mu\text{M}$. Myosin-5b aus *D. discoideum* zeigt einen K_i von $19,3 \pm 0,9 \text{ }\mu\text{M}$ und liegt damit in einem ähnlichen Bereich wie DdMyosin-1E und -2. Die schlechte PBP-Inhibierung der basalen ATPase von DdMyosin-5a bestätigt sich auch in der Aktin-aktivierten ATPase. Der K_i liegt mit $143 \pm 19 \text{ }\mu\text{M}$ deutlich über den Werten der anderen Myosine.

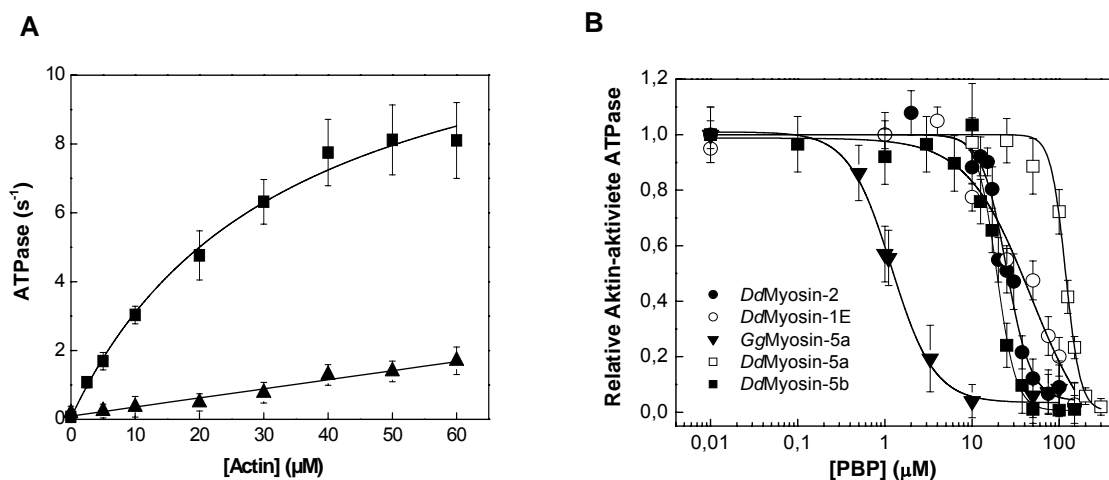


Abb. 34: (A) Aktin-aktivierte ATPase von DdMyosin-5b in An- (\blacktriangle) und Abwesenheit (\blacksquare) von $25 \text{ }\mu\text{M}$ PBP. Die ATPase-Aktivität wurde gegen die Aktin-Konzentration aufgetragen und an die Daten wurde eine Hyperbel angepasst. (B) Relative Aktin-aktivierte ATPase-Aktivität verschiedener Myosine aus Klasse-1, -2 und -5 in Anwesenheit von $30 \text{ }\mu\text{M}$ F-Aktin inhibiert durch Pentabromopseudinin in Konzentrationen von $0,01 - 300 \text{ }\mu\text{M}$. An den sigmoidalen Verlauf der Datenpunkte bei halblogarithmischer Darstellung wurde eine Hill-Kurve angepasst.

3.3.2.3. Single turnover-Experimente mit PBP und DdMyosin-2, -5a und -5b

In *single turnover*-Experimenten wird das Myosin mit einer Unterschusskonzentration an mantATP versetzt. Der mantATP-Umsatz wird anschließend spektroskopisch zu verfolgen. Bei den Ansätzen in dieser Arbeit wurde die Fluoreszenz-Änderung nach dem Mischen von $0,5 \text{ }\mu\text{M}$ Myosin und $0,4 \text{ }\mu\text{M}$ mantATP im *stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer verfolgt. Das Signal wurde in Abwesenheit von PBP sowie in Anwesenheit von 20 und $50 \text{ }\mu\text{M}$ PBP über 300 bzw. 500 Sekunden aufgezeichnet (s. Abb. 37). Generell kann die Reaktion in drei Phasen unterteilt werden: ein anfänglicher, schneller Anstieg der mant-Fluoreszenz resultierend aus der ATP-Bindung; eine Plateau-Phase, die von den

Raten der konformationellen Änderungen im Anschluss an die mantATP-Bindung abhängt; ein Absinken der mant-Fluoreszenz nach der Freisetzung von mantADP und Bindung von weiterem mantATP. Bei allen drei untersuchten Myosinen führt die Zugabe von PBP zu einem Verlust an Signalamplitude und zu einer Verlängerung der Plateau-Phase. Die dritte Phase ist zumindest bei *DdMyosin-2* und *-5b* ebenfalls verlangsamt (s. Abb. 35 (A), (B)). Im Gegensatz zu *DdMyosin-2* und *-5b* zeigt *DdMyosin-5a* erst bei 50 μM PBP eine deutliche Inhibierung im *single turnover*-Experiment (s. Abb. 35 (C)).

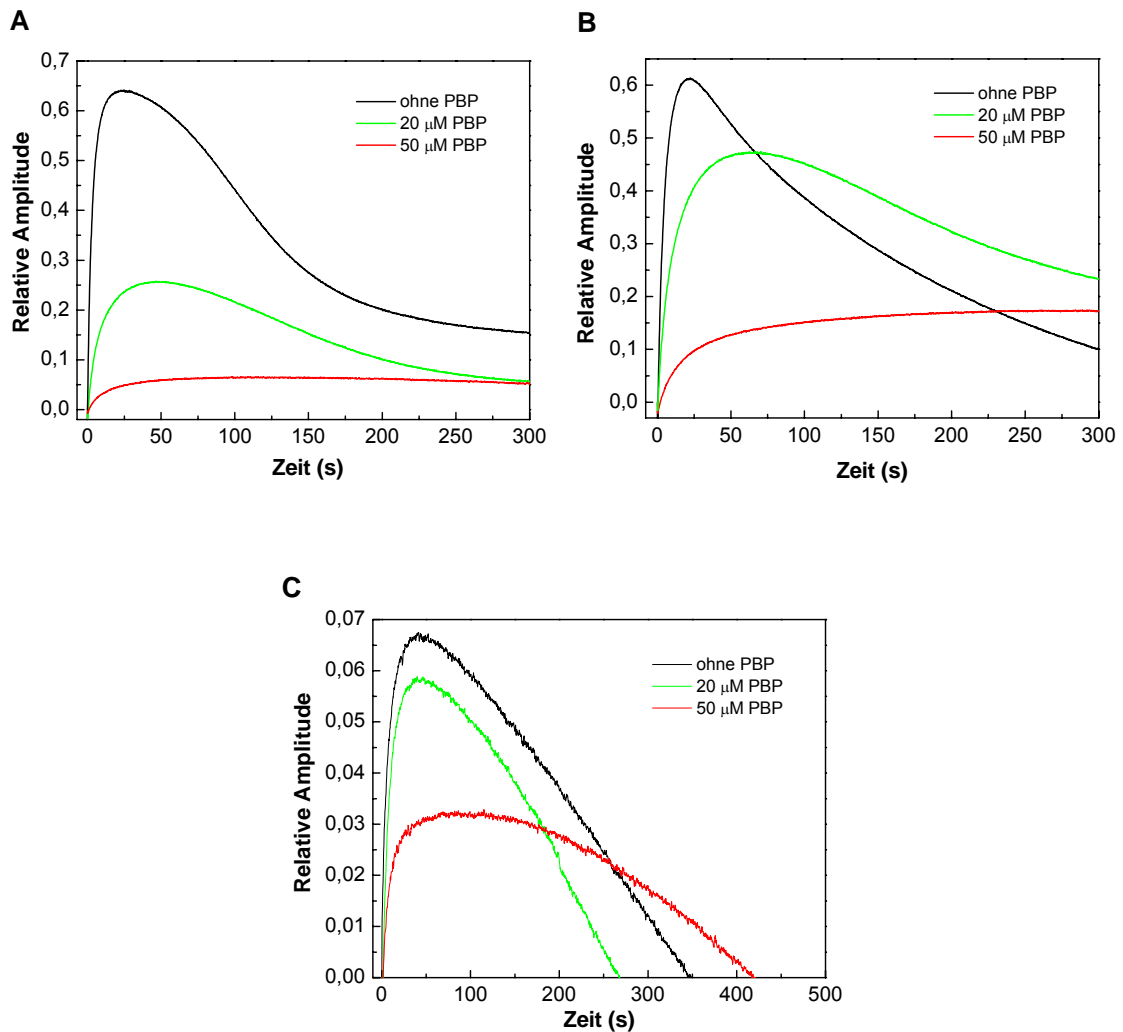


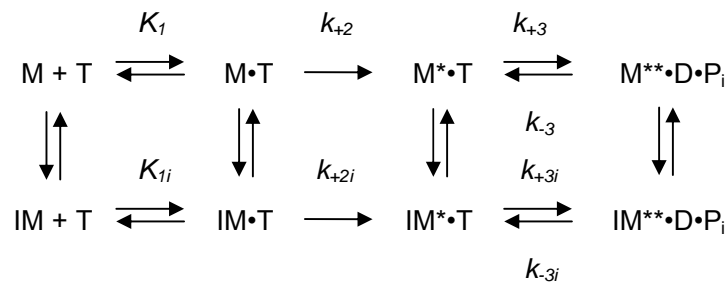
Abb. 35: *Single turnover*-Reaktion nach dem Mischen von 0,4 μM mantATP mit 0,5 μM (A) *DdMyosin-2*, (B) *DdMyosin-5b* und (C) *DdMyosin-5a* im *stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer in Abwesenheit und Anwesenheit von 20 und 50 μM PBP. Die Anregungswellenlänge liegt bei 365 nm und die Fluoreszenzemission wurde durch einen WG389-Filter beobachtet.

3.3.2.4. PBP-Einfluss auf die ATP-Bindung an Myosin

Der Einfluss von PBP auf die ATP-Bindung wurde sowohl über den Anstieg der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz gemessen als auch über extrinsische Fluoreszenz unter Verwendung des Nukleotidanalogs mantATP.

Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von steigenden PBP-Konzentrationen einen negativen Einfluss auf die Amplitude der mant-Fluoreszenz bei der Bindung von mantATP an Myosin-5b aus *D. discoideum* hat (s. Abb. 36). Für dieses Experiment wurden 1 μM *Dd*Myosin-5b mit 10 μM mantATP in An- und Abwesenheit von 5, 25, 50 und 100 μM PBP im *stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer gemischt. Die eingefügte Grafik in Abbildung 36 zeigt die Signal-Amplituden in Abhängigkeit der PBP-Konzentration. Die Transienten sind in Abwesenheit von PBP bzw. bei sättigenden PBP-Konzentrationen monophasisch. Bei mittleren PBP-Konzentrationen zeigen die Transienten biphasisches Verhalten. Die Daten wurden entsprechend an eine Exponentialfunktion 1. bzw. 2. Ordnung angepasst.

Der nachfolgende Reaktionsmechanismus zeigt die Schritte bei der Interaktion von Myosin mit ATP in An- und Abwesenheit von Inhibitor. Das von mit aufgestellte Schema basiert auf den Überlegungen von Bagshaw und Trentham (1974), Malnasi-Csizmadia et al. (2001) und Zeng et al. (2004) und wurde entsprechend erweitert. Die Gleichgewichtskonstante K_1 entspricht der schnellen Bildung eines Kollisionskomplexes zwischen ATP und Myosin ($M\cdot T$). Die Geschwindigkeitskonstante k_{+2} entspricht der irreversiblen Isomerisierung des Myosin-ATP-Komplexes ($M^*\cdot T$).



I: Inhibitor, M: Myosin; T: ATP; D: ADP; P: Phosphat.

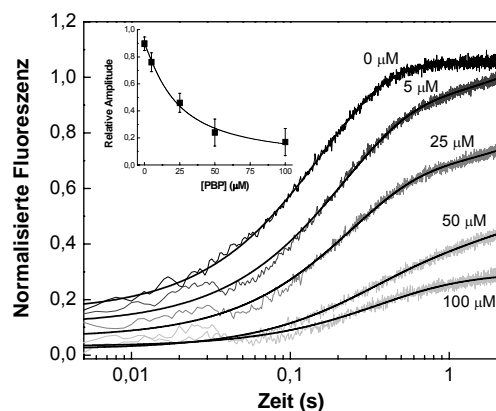
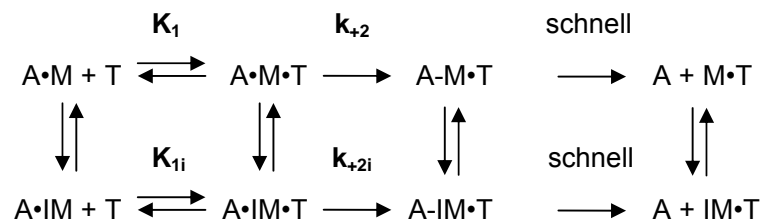


Abb. 36: Bindung von mantATP an *Dd*Myosin-5b. 1 μM *Dd*Myosin-5b werden mit 10 μM mantATP in *stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer in Anwesenheit von 0, 5, 25, 50 und 100 μM PBP gemischt. Der Anstieg der mant-Fluoreszenz wird halblogarithmisch dargestellt und an eine Exponentialfunktion 1. Ordnung angepasst. Die Signal-Amplituden werden in Abhängigkeit der PBP-Konzentration aufgetragen (Einsatz).

3.3.2.5. PBP-Einfluss auf die ATP-induzierte Dissoziation des Pyren-Akto-Myosin-Komplexes

Die Bindung von ATP an Aktin-gebundenes Myosin führt zum Schließen der Schalterelemente in der Nukleotidbindungstasche und zur Öffnung der Aktinbindungspalte zwischen der oberen und unteren 50 kDa-Domäne. Dieser Prozess führt zu einer drastischen Erniedrigung der Affinität des Myosins zu Aktin und in der Folge zu einer Dissoziation des Akto-Myosin-Komplexes (Reubold et al., 2003; Holmes et al., 2003). Der nachfolgende Reaktionsmechanismus zeigt die Dissoziation des Akto-Myosin-Komplexes durch die ATP-Bindung in An- und Abwesenheit des Inhibitors. Der Reaktionsmechanismus beruht auf Arbeiten von Millar und Geeves (1983) und Siemanowski und White (1984) und wurde entsprechend erweitert. Die Gleichgewichtskonstante K_1 charakterisiert die schnelle Bindung von ATP an Akto-Myosin ($A \cdot M \cdot T$). Die Geschwindigkeitskonstante k_{+2} steht für die Isomerisierung zum schwach Aktin-bindenden Myosin-ATP-Komplex ($A-M \cdot T$). Anschließend zerfällt der Komplex zu F-Aktin und Myosin-ATP.



A: F-Aktin; I: Inhibitor, M: Myosin; T: ATP

Der Akto-Myosin-Komplex wurde aus *Dd*Myosin-5b und Pyren-markiertem F-Aktin gebildet. 1 μM Pyren-Akto-Myosin-Komplex wurde für 10 Minuten mit 5 μM ATP inkubiert. Die Dissoziation des Komplexes wurde durch die Mischung von 0,5 mM ATP im *stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer ausgelöst. Der durch die Dissoziation des Akto-Myosin-Komplexes verursachte Anstieg der Pyren-Fluoreszenz wurde in An- und Abwesenheit von 50 μM PBP gemessen (s. Abb. 37). Der beobachtete Fluoreszenzanstieg lässt sich an eine Exponentialfunktion 2. Ordnung anpassen. Sowohl die Amplituden als auch die Ratenkonstanten der schnellen und langsamen Phase werden durch PBP beeinflusst. In Abwesenheit von PBP ergeben sich folgende Amplituden und Ratenkonstanten: $A_{\text{Schnell}} = 1,7$ und $k_{\text{Schnell}} = 46,7 \text{ s}^{-1}$; $A_{\text{Langsam}} = 0,8$ und $k_{\text{Langsam}} = 9,8 \text{ s}^{-1}$. Durch die Anwesenheit von 50 μM PBP reduzieren sich die Werte für die schnelle Phase auf: $A_{\text{Schnell}} = 1,13$ und $k_{\text{Schnell}} = 11,1 \text{ s}^{-1}$. Die langsame Phase ist in Anwesenheit von 50 μM PBP durch folgende Werte charakterisiert: $A_{\text{Langsam}} = 1,08$ und $k_{\text{Langsam}} = 0,9 \text{ s}^{-1}$.

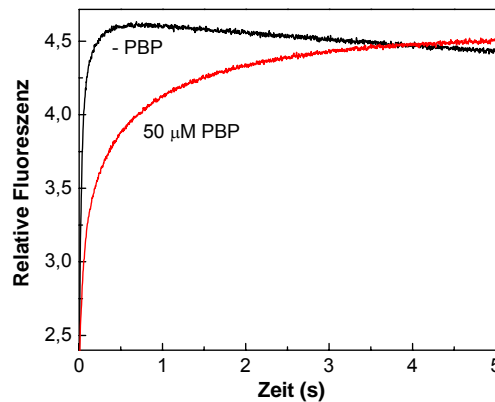
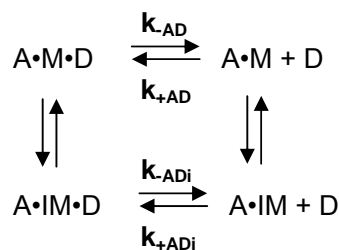


Abb. 37: ATP-induzierte Dissoziation des Pyren-Akto-Myosin-Komplexes. 1 μM Pyren-Akto-Myosin wurden mit 5 μM ATP für 10 min vorinkubiert und anschließend mit 0,5 mM ATP im *stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer gemischt. Der Anstieg der Pyren-Fluoreszenz wurde in An- (rot)- und Abwesenheit (schwarz) von 50 μM PBP über 5 s verfolgt. Die Anregungswellenlänge lag bei 365 nm und die Fluoreszenzemission wurde durch einen WG389-Filter beobachtet.

3.3.2.6. PBP-Einfluss auf die ADP-Dissoziation aus dem Akto-Myosin-ADP-Komplex

Die Freisetzung von ADP aus dem Akto-Myosin-ADP-Komplex (k_{AD}) ist der Geschwindigkeitsbestimmende Schritt des ATPase-Zyklus bei prozessiven Myosinen aus der Klasse 5, weil diese Myosine funktionsbedingt eine hohe Aktinaffinität in Anwesenheit von ADP zeigen müssen (de la Cruz et al., 1999; Taft et al., 2008). Im Gegensatz dazu ist der Geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei nichtprozessiven Myosinen die Phosphatfreisetzung. Der nachfolgende Reaktionsmechanismus zeigt die Freisetzung von ADP aus dem Akto-Myosin-ADP-Komplex ($A \cdot M \cdot D$) in An- und Abwesenheit von Inhibitor.



A: F-Aktin, I: Inhibitor, M: Myosin, D: ADP

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob PBP einen Einfluss auf die ADP-Dissoziation aus dem Akto-Myosin-ADP-Komplex hat. Dazu wurde k_{AD} von *Dd*Myosin-5b in An- und Abwesenheit von 50 μM PBP gemessen. Die Messung wurde im *stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer mit dem Nukleotidanalogen mantADP (daher k_{AmD}) in Anwesenheit von 4,4 mM freien Mg^{2+} -Ionen durchgeführt. Das mantADP wurde mit einem Überschuss an ATP aus der Nukleotidbindungstasche verdrängt. Dabei zeigt sich, dass durch die Zugabe von PBP sowohl die Amplitude als auch die Ratenkonstante (k_{obs}) negativ beeinflusst wird (s. Abb. 38 (A)). Die Amplitude

reduziert sich innerhalb 0,5 s von 2,92 % auf 0,77 %. k_{obs} , die in diesem Experiment k_{AmD} entspricht, sinkt von $k_{\text{AmD}} = 34,3 \text{ s}^{-1}$ auf $k_{\text{AmDi}} = 23,2 \text{ s}^{-1}$.

Eine weitere Methode die ADP-Dissoziation aus dem Akto-Myosin-ADP-Komplex zu untersuchen, ist die Bestimmung der ADP-Inhibierung der ATP-induzierten Dissoziation des Akto-Myosin-ADP-Komplexes. Auch für dieses Experiment wurde der Akto-Myosin-Komplex aus *DaMyosin-5b* gebildet. Allerdings wird in diesem Fall Pyren-markiertes Aktin verwendet. 1 μM Pyren-Akto-Myosin wurden mit 800 μM ADP vorinkubiert und anschließend mit 1mM ATP im *stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer gemischt. Die Messung wurde in Anwesenheit von 5 mM freien Mg^{2+} -Ionen durchgeführt. Anschließend konnte ein monophasischer Anstieg der Pyren-Fluoreszenz beobachtet werden (s. Abb. 38 (B)). Durch die Anpassung einer Exponentialfunktion 1. Ordnung konnte eine ADP-Dissoziationsrate von $17,4 \text{ s}^{-1}$ in Abwesenheit von PBP gemessen werden. In Anwesenheit von 50 μM PBP wurde die verlangsamte ADP-Dissoziationsrate zu 7 s^{-1} bestimmt.

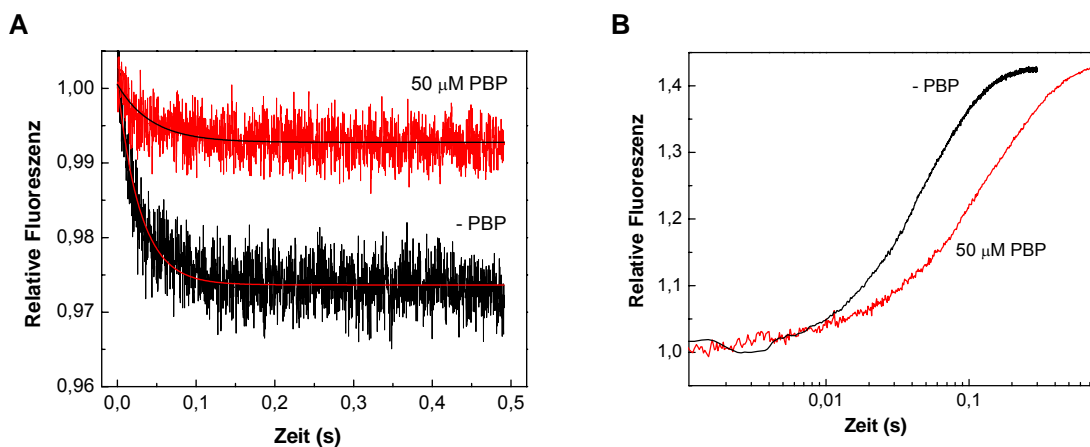


Abb. 38: (A) Freisetzung von mantADP aus dem Akto-Myosin-mantADP-Komplex von *DaMyosin-5b* in An (rot-) und Abwesenheit (schwarz) von 50 μM PBP. Gezeigt ist der Verlauf der mant-Fluoreszenz nach dem Mischen von 1 mM ATP mit dem Komplex aus 3 μM Akto-Myosin-mantADP im *stopped-flow*-Fluoreszenz-Spektrometer. Die Messung wurde in Anwesenheit von 4,4 mM freien Magnesium durchgeführt. (B) ADP-Inhibierung der ATP-induzierten Dissoziation des Akto-Myosin-Komplexes in An (rot-) und Abwesenheit von 50 μM PBP. 1 μM Pyren-Akto-Myosin wurde unter sättigenden ADP-Konzentrationen mit 1 mM ATP im *stopped-flow*-Fluoreszenz-Spektrometer gemischt. Die Messung wurde in Anwesenheit von 5 mM freien Magnesium durchgeführt und der Fluoreszenzverlauf wurde logarithmisch aufgenommen.

3.3.2.7. Funktionale Untersuchungen zum PBP-Einfluss auf die Myosin-Motoraktivität

Mit Hilfe des *in vitro*-Motilitätsassays wurden funktionale Studien zur Inhibierung der Myosin-Motoraktivität mit PBP durchgeführt. Zu diesem Zweck musste der Aufbau des Motilitätsassays abgewandelt werden, weil PBP das Rinderserumalbumin (BSA), welches zum Blockieren der Durchflusszellenoberfläche benutzt wird, bindet (persönliche Information von Prof. Gutzeit & Prof. Manstein). Da sich BSA im Überschuss in der Durchflusszelle befindet, konnte im Standard-Versuchsaufbau selbst mit 150 μM PBP keine Inhibierung der Gleitgeschwindigkeit der fluoreszenzmarkierten Aktinfilamente festgestellt werden. Als Alternative zum BSA wurde Pferde-Cytochrom-C als Blockierungsprotein getestet. Das hochkonservierte eukaryontische Protein

Cytochrom-C besteht aus knapp über 100 Aminosäuren und ist, ähnlich wie BSA, ein globuläres Protein. Es konnten bei verschiedenen Tests im *in vitro*-Motilitätsassays keine unspezifischen Wechselwirkungen zwischen dem Cytochrom-C und Myosin bzw. Aktin festgestellt werden. Da auch zwischen Cytochrom-C und PBP keine Wechselwirkungen beobachtet werden konnten, wurde im Folgenden grundsätzlich diese Methode der Oberflächenblockierung durchgeführt.

Die *in vitro*-Motilitäts-Experimente mit Myosin-Inhibitoren wurden stets bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Inhibierung der Gleitgeschwindigkeit durch 10 μM PBP wurde mit GgMyosin-5a und DdMyosin-5b ermittelt. An die gemessenen Geschwindigkeiten der einzelnen Trajektorien wurde die Gauß-Gleichung angepasst (vgl. Kapitel 1.3.1). Dabei zeigte GgMyosin-5a eine deutlich stärkere Abnahme der Bewegungsgeschwindigkeit von $0,58 \mu\text{m s}^{-1}$ auf $0,012 \mu\text{m s}^{-1}$ (s. Abb. 39). Im Gegensatz dazu verringert sich die Gleitgeschwindigkeit bei DdMyosin-5b nur um Faktor 2 von $0,64 \mu\text{m s}^{-1}$ auf $0,32 \mu\text{m s}^{-1}$. Der Prozess der PBP-Inhibierung ist reversibel und die Filamente erreichten nach einem Pufferwechsel in der gleichen Durchflusszelle wieder ihre ursprüngliche Geschwindigkeit. In Tabelle 10 sind die Werte aus dem Motilitätsassay mit PBP und den zwei Klasse-5 Myosinen zusammengefasst.

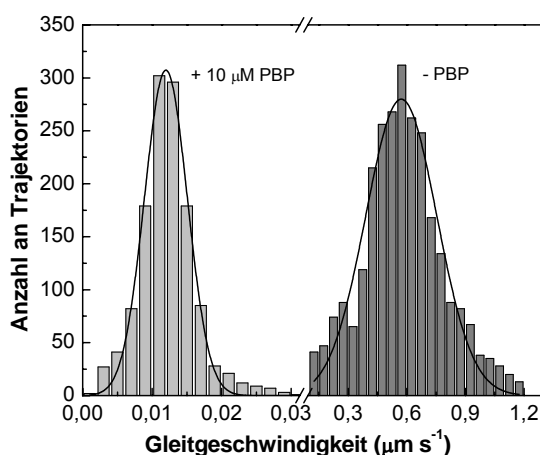


Abb. 39: Einfluss von 10 μM PBP auf die Motoraktivität von nativem GgMyosin-5a im *in vitro*-Motilitätsassay. Beide Geschwindigkeitsverteilungen wurden innerhalb einer Durchflusszelle durch einen Pufferwechsel generiert. Durch Zugabe des ursprünglichen PBP-freien Puffers konnte die Inhibierung aufgehoben werden und die Ausgangsgeschwindigkeit reproduziert werden. Das Experiment wurde bei Raumtemperatur (24°C) durchgeführt. Die Trajektorien-Verteilungen wurden an die Gauss-Gleichung angepasst, worüber sich eine Inhibierung der mittlere Gleitgeschwindigkeit von $0,58 \pm 0,09 \mu\text{m s}^{-1}$ auf $0,012 \pm 0,002 \mu\text{m s}^{-1}$ errechnet werden konnte.

<i>In vitro</i> -Motilitätsassay (RT)	GgMyosin-5a	DdMyosin-5b
Gleitgeschwindigkeit [0 μM PBP] ($\mu\text{m s}^{-1}$)	$0,58 \pm 0,09$	$0,64 \pm 0,05$
Gleitgeschwindigkeit [10 μM PBP] ($\mu\text{m s}^{-1}$)	$0,012 \pm 0,002$	$0,32 \pm 0,06$
Faktor (Geschwindigkeitsverlust)	48	2

Tab. 10: Vergleich der Inhibierung von GgMyosin-5a und DdMyosin-5b im *in vitro*-Motilitätsassay durch 10 μM PBP.

3.3.2.8. Der Einfluss von Pentachloropseudilin auf die Motoraktivität

Die Ergebnisse die mit Pentabromopseudilin (PBP) erzielt wurden, rechtfertigten eine Suche nach weiteren Pseudilin-Derivaten mit gleicher inhibitorischer Wirkung aber mit einer höheren Myosin-spezifischen Selektivität. In der Arbeitsgruppe von Prof. Gutzeit (TU Dresden) wurden über 200 Verbindungen auf ihre inhibitorische Wirkung überprüft, wobei Pentachloropseudilin (PCP) entdeckt wurde (Martin et al., 2009). PCP ist sowohl chemisch als auch strukturell ein Analogon zu PBP, wobei die Brom-Reste des PBP durch Chlor ersetzt wurden. Ähnlich wie PBP wurde PCP erstmals als ein Antibiotikum aus *Actinoplanes*-Stamm A/15104 isoliert und zeigt eine toxische Wirkung auf Gram-positive und -negative Bakterien, Hefen und Dermatophyten (Cavalleri et al., 1978).

In *in silico*-Docking-Studien konnte für PCP eine Spezifität für Klasse-1 Myosine festgestellt werden (Chinthalapudi et al., 2009). Diese Selektivität konnte durch Chinthalapudi et al. (2009) mittels *steady-state*-Kinetiken von verschiedenen *Dictyostelium*-Myosinen der Klasse 1, Klasse 2 und Klasse 5 sowie zwei Ratten-Klasse-1 Myosinen bestätigt werden. Die Selektivität sollte in dieser Arbeit im funktionalen Assay überprüft werden.

Die Durchführung des *in vitro*-Motilitätsassays erfolgte analog zu den Experimenten mit PBP und erfolgte mit *Dd*Myosin-1E und -5b und jeweils 10 μM PCP. Für *Dd*Myosin-5b konnte im Rahmen des Fehlers keine Inhibierung der Motoraktivität durch 10 μM PCP festgestellt werden. Bei *Dd*Myosin-1E reduziert sich die Gleitgeschwindigkeit um Faktor 14 von 0,152 $\mu\text{m s}^{-1}$ auf 0,011 $\mu\text{m s}^{-1}$ (s. Abb. 40). Neben der Verlangsamung der Motilität kann im Verlauf des Experiments ein zunehmender Filamentverlust an der Deckglasoberfläche beobachtet werden. Dieser Effekt wird in Abbildung 40 die 40% geringere Anzahl an Trajektorien nach Zugabe von 10 μM PCP deutlich. Die Parameter aus dem *in vitro*-Motilitätsassay mit PCP sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

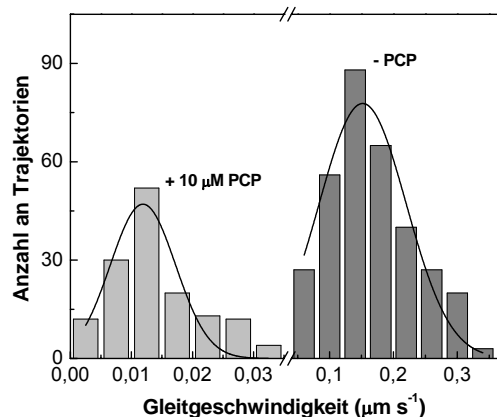


Abb. 40: Einfluss von 10 μM PCP auf die Motoraktivität von nativem *Dd*Myosin-1E im *in vitro*-Motilitätsassay. Beide Geschwindigkeitsverteilungen wurden innerhalb einer Durchflusszelle durch einen Pufferwechsel generiert. Das Experiment wurde bei Raumtemperatur (24°C) durchgeführt.

<i>In vitro</i> -Motilitätsassay (RT)	<i>Dd</i> Myosin-1E	<i>Dd</i> Myosin-5b
Gleitgeschwindigkeit [0 μM PBP] ($\mu\text{m s}^{-1}$)	0,152 \pm 0,035	0,64 \pm 0,05
Gleitgeschwindigkeit [10 μM PBP] ($\mu\text{m s}^{-1}$)	0,011 \pm 0,001	0,6 \pm 0,07
Faktor (Geschwindigkeitsverlust)	14	-

Tab. 11: Vergleich der Inhibierung von *Dd*Myosin-1E und *Dd*Myosin-5b im *in vitro*-Motilitätsassay durch 10 μM PCP.

4. Diskussion

4.1. Ein Tyrosin in Schalter-2 vermittelt den Mg^{2+} -sensitiven Mechanismus von hoher und niedriger duty ratio

Schalter-2 bildet zusammen mit Schalter-1 und der P-Schleife die Nukleotidbindungstasche innerhalb der Myosin-Motordomäne. Anhand röntgenkristallografischer Untersuchungen kann man für Schalter-1 und Schalter-2 zwischen einer offenen und einer geschlossenen Konformation unterscheiden (Fisher et al., 1995; Reubold et al., 2003). Die Hydrolyse-kompetente Konformation, die die Abspaltung des γ -Phosphats ermöglicht, ist die geschlossene. In dieser Konformation bildet Aminosäure R238 aus Schalter-1 mit Aminosäure E459 aus Schalter-2 eine Salzbrücke, welche diesen katalytisch aktiven Zustand stabilisiert (Ruppel & Spudich, 1996; Furch et al., 1999). Es wurde bereits gezeigt, dass Schalter-2 sowohl an der Hydrolyse als auch an der Produktfreisetzung beteiligt ist (Sasaki et al., 1998; Furch et al., 1999). Schalter-2 steht durch seine konformationellen Änderungen am Beginn einer kaskadenartig ablaufenden Reaktion innerhalb der Myosin-Motordomäne, die über die *relay*-Helix und die Konverter-Region letztlich die Bewegung des Hebelarms auslöst (Fischer et al., 2005). Die hochkonservierte Sequenz von Schalter-2 lautet: DI(Y/F/S/A)GFE.

Die *duty ratio* gibt den zeitlichen Anteil des ATPase-Zyklus an, den sich das Myosin in einem stark Aktin-gebundenen Zustand befindet. Die *duty ratio* lässt sich kinetisch über die Parameter der maximalen ATP-Umsatzrate (k_{cat}) im Fließgleichgewicht, der Geschwindigkeitskonstante der ADP-Freisetzung aus dem Akto-Myosin- Mg^{2+} -ADP-Komplex (k_{AD}) und der Geschwindigkeitskonstante der Isomerisierung des Akto-Myosin- Mg^{2+} -ATP-Komplexes vom stark- zum schwach-Aktin-bindenden Zustand (k_{+2}) berechnen (Watanabe et al., 2006; Ito et al., 2007). Die entsprechende Formel lautet:

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

(T_{stark} : zeitlicher Anteil des ATPase-Zyklus, den sich das Myosin in einem stark Aktin-gebundenen Zustand befindet; T_{total} : maximale Aktin-aktivierte ATPase)

Die Wildtypen von *Dd*Myosin-1E und -5b, die ein Tyrosin in der Schalter-2-Sequenz besitzen, wurden bereits als Mg^{2+} -sensitive Myosine charakterisiert (Dürrwang et al., 2006; Taft et al., 2008). Unter hohen freien Mg^{2+} -Konzentrationen sind sie durch eine hohe *duty ratio* gekennzeichnet. Die Wildtypen von *Dd*Myosin-1B und -2 haben anstatt eines Tyrosins ein Phenylalanin bzw. ein Serin in der Schalter-2-Sequenz. Beide Myosine werden nicht über die Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen ($[Mg^{2+}]_{frei}$) reguliert und die Myosine sind durch eine niedrige *duty ratio* charakterisiert (Tsiavaliaris et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Motoraktivität von Wildtyp-Myosinen der Klasse 1, Klasse 2 und Klasse 5 sowie von den entsprechenden Myosinen mit Punktmutationen in Schalter-2 (Y-zu-F und S/F-zu-Y) mittels *in vitro*-Motilitätsassay und Landeassay charakterisiert. Dabei kam neben Epifluoreszenz-Mikroskopie auch die hochauflösende totale interne Reflexions Fluoreszenz (TIRF)-Mikroskopie zum Einsatz. Die Studie, in der variierende physiologische Konzentrationen an freien Mg^{2+} -Ionen eingesetzt wurden, zeigte eindeutig, dass ein Tyrosin in Schalter-2 von Myosinen der Klasse 1 und Klasse 5 notwendig ist, um eine Mg^{2+} -Sensitivität und, damit verbunden, eine hohe *duty*

ratio bei hohen Konzentrationen an freien Mg^{2+} -Ionen zu generieren. Die Ergebnisse belegen, dass die Interaktionen von Schalter-2 mit dem Nukleotid und umliegenden Strukturelementen - in Abhängigkeit einer bestimmten Aminosäure - die *duty ratio* eines Myosins bestimmen. Somit kann ein Aspekt des molekularen Mechanismus der *duty ratio* für verschiedene Myosin-Klassen definiert werden.

4.1.1. Y487F in *DdMyosin-5b* führt zu einer Entkopplung der ATPase-Aktivität von der Bewegungsgeschwindigkeit

Die Motilität von *DdMyosin-5b* (Y487F) ist identisch mit der Bewegungsgeschwindigkeit des Wildtyp bei hohen $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ (s. Abb. 20 (B)). Dagegen sind die relevanten kinetischen Parameter der Y-zu-F-Mutante, wie die Geschwindigkeitskonstante der ADP-Freisetzung aus dem Akto-Myosin-ADP-Komplex, im Bereich der Werte des Wildtyps bei niedrigen $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ (Diensthuber, 2009). Die Geschwindigkeitskonstante der ADP-Freisetzung aus dem Akto-Myosin- Mg^{2+} -ADP-Komplex (k_{AD}) konnte für *DdMyosin-5b* (Y487F) zu 233 s^{-1} bestimmt werden (Diensthuber, 2009). Damit ist k_{AD} der Y-zu-F-Mutante nahezu identisch mit dem Wert des Wildtypen bei sehr niedrigen $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ ($\sim 225 \text{ s}^{-1}$, Taft et al., 2008). Anhand dieser Werte muss man für *DdMyosin-5b* (Y487F) eine Bewegungsgeschwindigkeit im Bereich der maximalen Motilität des Wildtyps bei niedrigen $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ erwarten. Durch Untersuchungen an Myosin-2 konnte gezeigt werden, dass ein Aminosäureaustausch Serin zu Leucin an der nicht-konservierten Position in Schalter-2 zu einer Entkopplung der mechanischen Aktivität von der chemischen Energie des ATP führt (Murphy et al., 2001). Mittels Experimenten in einer optischen Laserfalle konnte belegt werden, dass die S-zu-L-Mutation in Myosin-2 zu geringeren Schrittweiten und damit auch zu langsameren *in vitro*-Motilitäten führt. Murphy et al. (2001) postulieren, dass die Kommunikation der konformationellen Änderungen innerhalb der Nukleotidbindungstasche über die *relay*-Region zum Konverter durch die Mutation gestört wird. Die kinetischen Studien von Murphy et al. (2001) zeigen, dass die ATP-Umsatzrate durch die Punktmutation unbeeinflusst ist. Eine vergleichbare strukturelle Grundlage für die langsame Motilität von *DdMyosin-5b* (Y487F) ist somit anzunehmen.

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten funktionalen Analysen wird gezeigt, dass ein Tyrosin in Schalter-2 von Myosin-1E und -5b aus *D. discoideum* für die Generierung einer Sensitivität gegenüber der Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen und der Generierung einer hohen *duty ratio* ein kritischer Faktor ist. Der nicht-konservierte Aminosäurerest in Schalter-2 bestimmt einen Aspekt des molekularen Mechanismus der *duty ratio* bei Myosinen aus der Klasse 1 und Klasse 5. Die Aussage wird durch die Tatsache bekräftigt, dass ein Aminosäure-Austausch von F-zu-Y in Schalter-2 von *DdMyosin-1B* eine $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ -Sensitivität für dieses Myosin im *in vitro*-Motilitätsassay generiert.

4.1.2. Strukturelles Modell zur Erklärung des Mg^{2+} -sensitiven Mechanismus von hoher und niedriger *duty ratio*

Rosenfeld et al. (2005) beschreiben für Myosin-5 eine sequentielle Freisetzung von Mg^{2+} und ADP aus dem Akto-Myosin- Mg^{2+} -ADP-Komplex. Dabei geht die Dissoziation des Mg^{2+} -Ions der Dissoziation des ADP-Nukleotids voraus. Das Modell von Rosenfeld und Mitarbeitern lässt darauf schließen, dass $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ in der Umgebung einen Einfluss auf die Dissoziation des Mg^{2+} -Ions aus der Nukleotidbindungstasche hat. Ein atomares Modell der Nukleotidbindungstasche mit Y-zu-F-Mutation in Schalter-2, welches in Zusammenarbeit Daniela Kathmann und Dr. Roman Fedorov erstellt wurde, bestätigt die experimentellen Befunde und gibt strukturelle Details über die Funktion von Schalter-2 in Myosinmotoren mit einer hohen *duty ratio* wieder. Um die Ausrichtung der relevanten Aminosäuren innerhalb der Nukleotidbindungstasche darzustellen, wurde das atomares Modell auf Basis einer Röntgenkristallstruktur von GgMyosin-5a (Coureux et al., 2004) *in silico* erstellt. Dabei wurde das Tyrosin an Position 439 durch ein Phenylalanin ersetzt, um anschließend die dadurch hervorgerufenen konformationellen Änderungen über Kraftfeldkalkulationen zu ermitteln. Das verwendete Programm führt eine Energieminimierung durch, um das energetisch günstigste dreidimensionale Modell der Nukleotidbindungstasche darzustellen. Das Modell ist in Abbildung 41 dargestellt.

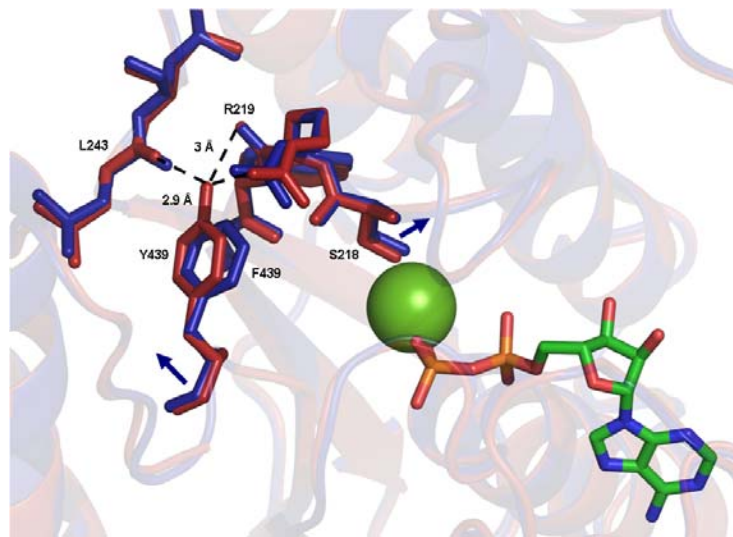


Abb. 41: Strukturelles Modell der Schalter-2-Region der Motordomäne von Myosin-5. Die Grundlage für das Modell ist eine Röntgenkristallstruktur von GgMyosin-5a mit dem Nukleotidanalogen Mg^{2+} -ADP- BeF_3 (Coureux et al., 2004). Dargestellt sind die Wechselwirkungen über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Y439 (Schalter-2) mit R219 (Schalter-1) und L243 im Wildtyp von Myosin-5a. Durch die Y439F-Mutation werden diese Wasserstoffbrückenbindungen aufgelöst und es kommt zu konformationellen Änderungen innerhalb der Nukleotidbindungstasche, die durch die blauen Pfeile verdeutlicht werden. Die Koordination des Magnesiums (Grüner Ball) durch das S218 wird durch diese Konformationsänderungen geschwächt. Zur Darstellung des Modells wurde das Programm „Pymol“ verwendet.

Im Wildtyp von GgMyosin-5a bestehen zwischen Y439 aus Schalter-2 und R219 aus Schalter-1 sowie L243 aus dem zentralen β_7 -Faltblatt Wasserstoffbrückenbindungen. Dadurch werden Schalter-1 und Schalter-2 mit dem β_7 -Faltblatt der Myosin-Kernstruktur verknüpft und stabilisiert. Der Aminosäureaustausch von Tyrosin zu Phenylalanin zerstört diese Wasserstoffbrückenbindung. Die Mutation führt zu einer veränderten Konformation innerhalb der Nukleotidbindungstasche, wobei sich

Schalter-1 vom Nukleotid entfernt. Die Mg^{2+} -Koordination durch S218 aus Schalter-1 wird durch diese Konformationsänderung abgeschwächt. Diese Destabilisierung des Akto-Myosin- Mg^{2+} -ADP-Komplexes führt vermutlich zu einer beschleunigten Freisetzung von Mg^{2+} und folglich von ADP. Diese Vermutung wird durch Ergebnisse von Rosenfeld et al. (2005) unterstützt. Weiterhin kann postuliert werden, dass auch steigende $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ nicht mehr zu einer Stabilisierung des Akto-Myosin- Mg^{2+} -ADP-Komplexes innerhalb der Y-zu-F-Mutante beitragen können und dadurch die Geschwindigkeitskonstante der Produktfreisetzung unbeeinflusst bleibt. Dies lässt sich durch Ergebnisse aus den kinetischen Studien der Y-zu-F-Mutanten belegen. Es konnte gezeigt werden, dass die Dissoziation des ADP aus dem Akto-Myosin- Mg^{2+} -ADP-Komplex nicht durch variierende $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ beeinflusst wird (Diensthuber, 2009).

4.2. Artificielle Nanomotoren auf Basis eines Klasse-5-Myosins

Die Fähigkeit von molekularen Motoren chemische Energie in mechanische Arbeit und gerichtete Bewegung umzusetzen, macht diese Proteine prinzipiell zu idealen Nanomotoren für die biomechanische Kraftübertragung in einer künstlichen Umgebung (Hess et al., 2004; Sundberg et al., 2006; Brunner et al., 2007). Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass molekulare Motoren in Form von „Nanomaschinen“ in artifiziellen Systemen - als *lab on the chip*-Baustein - zum Einsatz gebracht werden können (van den Heuvel & Dekker, 2007; Goel & Vogel, 2008). Derartige Nanomaschinen haben ein sehr großes Potential für die Anwendung als kontrollierbare Nanotransporter in Biohybridsystemen. Die Anwendung solcher nanobiotechnologischen Apparaturen ist allerdings noch stark eingeschränkt. Die Probleme liegen in der Funktionalität und Steuerung der artifiziellen Motoren. Weiterhin limitiert die Haltbarkeit der Motorproteine in der künstlichen Umgebung deren Einsatz.

Der modulare Aufbau von Myosinen bietet die Möglichkeit durch gezielte Modifikation von speziellen Domänen oder den Austausch von funktionalen Untereinheiten Motoren zu entwickeln, die verbesserte, geänderte oder gar kontrollierbare funktionale Eigenschaften besitzen. Durch den so genannten *protein engineering*-Ansatz konnten bereits Myosin-Motoren mit veränderter Aktin-Gleitgeschwindigkeit, Schrittweite und Bewegungsrichtung generiert werden (Anson et al., 1996; Ruff et al., 2001; Tsiavaliaris et al., 2004).

4.2.1. Konstruktion eines artifiziellen prozessiven Myosins

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktionalität des artifiziellen dimeren Myosin-Motors (M5P) einleitend durch *in vitro*-Motilitätsexperimente überprüft. Bei der Analyse der Mg^{2+} -abhängigen Gleitgeschwindigkeiten von M5P im Vergleich mit einem monomeren Konstrukt (*Dd*Myosin-5b) wird deutlich, dass beide Myosin-Konstrukte durch eine identisches Motilitätsverhalten bei niedrigen und hohen freien Mg^{2+} -Ionenkonzentrationen ($[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$) charakterisiert sind, welches sich in identischen Aktinfilaments-Gleitgeschwindigkeiten äußert. Die Inhibierungskonstante im *in vitro*-Motilitätsassay ist

für M5P zu 0,81 mM bestimmt und damit um den Faktor 2 größer als beim monomeren Konstrukt. Dies lässt sich durch den Aufbau einer intramolekularen Spannung innerhalb des dimeren Moleküls erklären. Eine Zugkraft, die auf ein dimeres Myosin in Laufrichtung einwirkt, beschleunigt die Freisetzung von ADP aus dem Akto-Myosin-ADP-Komplex (Rosenfeld et al., 2005). Bei Prozessivität-Experimenten mit einzelnen Molekülen kann gleichzeitig eine verlangsamte Produktfreisetzung durch rückwärts gerichtete Spannung beobachtet werden. Vermutlich wird dieser Effekt im *in vitro*-Motilitätsassay durch eine simultane, koordinierte und vorwärts gerichtete Zugkraft von mehreren tausend M5P-Molekülen, unterdrückt. Aus diesem Grund werden bei dem dimeren Motor höhere $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ benötigt, um eine Reduktion der Gleitgeschwindigkeit zu beobachten. Die Vermutung, dass M5P-Moleküle im *in vitro*-Motilitätsassay zu einer koordinierten Kraftentwicklung fähig ist, wird auch durch die Länge der Aktinfilamente im Experiment belegt. M5P-Moleküle bewegen Aktinfilamente bis zu einer Länge von 20 μm . Dagegen verkürzt das monomere Konstrukt - bei gleicher Myosin-Oberflächenkonzentration - die Aktinfilamente auf weniger als 1 μm . Dieser Effekt beruht auf dem Aufbau von unkoordinierten Spannungen an den Aktinfilamenten, welche letztlich zum Bruch der Aktinfilamente führen.

In vitro-Motilitäts-Experimente geben zwar Aufschluss über die Motoraktivität und Aktin-Translokationsfähigkeit von Myosinen können aber keine Rückschlüsse über das prozessive Verhalten eines Motors geben. Zur Ermittlung von prozessiver Bewegung wurden TIRF-Mikroskopie-basierte Experimente mit einzelnen Myosinmolekülen durchgeführt. Hierbei wurde die Bewegung einzelner fluoreszenzmarkierter Motoren zeitlich verfolgt. In den Studien wurde, analog zum *in vitro*-Motilitätsassay, die $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ variiert. Die Prozessivität von M5P wurde durch ein Einzelmolekül-Experiment belegt. Die $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ in Reaktionspuffer war 5 mM. Bei Experimenten mit einzelnen M5P-Molekülen, in denen die $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ unter der Inhibierungskonstante von 0,81 mM aus dem *in vitro*-Motilitätsassay lag, konnte kein prozessives Laufverhalten festgestellt werden. Dies bestätigt die Ergebnisse aus den Landeassays mit dem monomeren *DdMyosin-5b*-Konstrukt (vgl. Kapitel 3.1.2.1) und den kinetischen Untersuchungen von *DdMyosin-5b* (Taft et al., 2008). M5P ist ein kontrollierbarer prozessiver Nanomotor, der durch die Variierung von $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ zwischen langsamer prozessiver und schneller nicht-prozessiver Bewegung umschalten kann. Die prozessive Bewegung von M5P konnte durch eine weitere Zusammenarbeit mit Dr. Walter Steffen in Experimenten mit einer optischen Laserfalle bestätigt werden (Amrute-Nayak et al., 2010). In den Studien variierte die Schrittweite von einzelnen M5P-Molekülen zwischen 4 und 17 nm.

4.2.2. Protein-Engineering-Ansatz zur Herstellung eines Myosins mit Ionenstärke-abhängiger Motoraktivität

Die Sensitivität der Myosin-Motoraktivität gegenüber $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ führt bei *DdMyosin-5b* zu einer Regulation der Prozessivität. Durch die Einführung von sechs GKK-Motiven (K6) in die Myosin-Oberflächenschleife-2 konnte gezeigt werden, dass sich die Aktin-Affinität der Myosine in den schwach-Aktin-bindenden Zuständen deutlich erhöht ist (Furch et al., 1999, 2000; Yengo & Sweeney,

2004). Zusätzlich konnte bereits dargestellt werden, dass die Einführung der positiven Ladungen in Schleife-2 zu einer Ionenstärke-abhängigen Produktfreisetzung führt (Joel et al., 2003).

In Kooperation mit Daniela Kathmann ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen ein *DdMyosin-5b*-Konstrukt mit einer K6-Mutation (M5S) herzustellen. Mit M5S ist es gelungen einen molekularen Motor zu generieren, dessen Motoraktivität nicht nur sensitiv gegenüber $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$, sondern auch gegenüber Änderungen in der Ionenstärke. In den entsprechenden Experimenten lag Mg^{2+} -ATP als Substrat immer in sättigenden Konzentrationen vor. Durch die Erhöhung der positiven Ladungen in Schleife-2 kann die Gleitbewegung der Aktinfilamente im *in vitro*-Motilitätsassay von 530 nm s^{-1} bis zum vollständigen Stoppen der Bewegung stufenlos reguliert werden. Unter den Standardbedingungen des *in vitro*-Motilitätsassays ($40 \mu\text{M } [Mg^{2+}]_{\text{frei}}$; 25 mM KCl) ist die Motilität von M5S im Vergleich zum Wildtyp um Faktor 6 kleiner. Die verringerte Translationsgeschwindigkeit der Aktinfilamente könnte durch eine verringerte ATP-Umsatzgeschwindigkeit oder eine verlangsamte Freisetzung von ADP aus dem Akto-Myosin-ADP-Komplex begründet sein. Neben den kinetischen Begründungen könnte die langsame Bewegung auch eine strukturelle Ursache haben. Es ist nicht auszuschließen, dass die Veränderungen innerhalb der Schleife-2 einen negativen Einfluss auf die Hebelarmbewegung haben. Ein kleinerer Winkel bei der Hebelarmbewegung würde ebenfalls einen Grund für eine langsamere Bewegung der Filamente darstellen.

Die Ergebnisse aus dem *in vitro*-Motilitätsassay zeigen, dass die $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ -Sensitivität auch bei M5S mit steigenden $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ zu einer Verlangsamung der Aktinfilament-Gleitgeschwindigkeit führt. Die steigenden $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ resultieren in einer längeren Verweildauer von M5S im stark Aktin-gebundenen Zustand. Der Ionenstärke-abhängige Effekt der K6-Mutation in Schleife-2 verstärkt diesen stark Aktin-gebundenen Zustand derart, dass die einzelnen Motordomänen von M5S im *in vitro*-Motilitätsassay nicht mehr produktiv zusammen arbeiten können. Bei $[Mg^{2+}]_{\text{frei}} = 1,9 \text{ mM}$ und $[KCl] = 25 \text{ mM}$ stoppt die Bewegung der Aktinfilamente. Durch eine Erhöhung der Ionenstärke im Motilitätspuffer auf $[KCl] = 100 \text{ mM}$ wird der Einfluss der K6-Mutation aufgehoben und die Aktinfilamente bewegen sich. Eine Begründung für dieses Verhalten liegt in den elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Aktin und M5S. Höhere Ionenstärken unterbinden die durch elektrostatische Kräfte vermittelte Interaktion zwischen M5S und F-Aktin. Der Motor befindet sich zu einem geringeren zeitlichen Anteil in den stark an Aktin-gebundenen Zuständen. Dies ermöglicht den schnellen Übergang von stark zu schwach Aktin-gebundenen Zuständen und damit zu einer schnelleren Bewegung. Durch koordinierte Konzentrationsänderungen von $[Mg^{2+}]_{\text{frei}}$ und $[KCl]$ ist es möglich die Motoraktivität von M5S stufenlos zu regulieren.

4.3. Der Myosin-Inhibitor Pentabromopseudilin

Myosine spielen eine zentrale Rolle bei den Zytoskelett-vermittelten, zellulären Prozessen. Kleine chemische Verbindungen, die selektiv bestimmte Myosin-Isoformen inhibieren, besitzen prinzipiell eine große Anzahl zellbiologischer als auch pharmakologischer Anwendungsmöglichkeiten. Viele Myosin-abhängige Prozesse stehen im Zusammenhang mit der Ausprägung von teils schwerwiegenden Krankheiten, wie z. B. Myopathie (Oldfors, 2007). Dadurch stellen Myosine ein

erstklassiges Ziel dar, wenn diese zellulären Abläufe durch pharmakologische Substanzen kontrolliert werden sollen. Bisher sind nur wenige chemische Verbindungen bekannt, die einer solchen Anwendung gerecht werden. Mit Pentabromopseudilin (PBP) konnte ein neuer Myosin-Inhibitor identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Aufklärung des Mechanismus der Inhibierung beigetragen.

Durch Inhibierungsexperimente der Aktin-aktivierten ATPase von fünf verschiedenen Myosinen zeigte sich, dass Myosin-5a aus Hühnergehirn mit einer Inhibierungskonstante (IC_{50}) von $1,2 \mu\text{M}$ am stärksten durch PBP inhibiert wird. Myosin-5b aus *D. discoideum* wird ähnlich wie das untersuchte Klasse-1 und Klasse-2 Myosin mit einem IC_{50} -Wert von $9,4 \mu\text{M}$ inhibiert. Die Aktin-aktivierte ATPase von Myosin-5a aus *D. discoideum* wird deutlich schwächer mittels PBP inhibiert. In diesem Fall liegt der IC_{50} -Wert bei $143 \mu\text{M}$. Der Grad der Inhibierung der drei Myosine aus der Klasse-5 unterscheidet sich jeweils um eine 10er-Potenz. Generell wurde die maximale ATP-Umsatzrate (k_{cat}) unter sättigenden PBP-Konzentrationen für sämtliche untersuchten Myosine um den Faktor >50 inhibiert. Der sigmoidale Verlauf der PBP-Inhibierung ist für alle untersuchten Myosine sowohl in An- als auch in Abwesenheit von F-Aktin zu beobachten. Aus diesem Grund kann eine Inhibierung der Aktin-aktivierten ATPase durch eine PBP-Aktin-Interaktion ausgeschlossen werden.

Der exakte Mechanismus der PBP-Inhibierung sollte in dieser Arbeit durch umfangreiche transientenkinetische Studien bestimmt werden. Auf Grund der Verfügbarkeit und der vollständigen kinetischen Charakterisierung wurde diese Analyse mit Myosin-5b aus *D. discoideum* durchgeführt.

Die Experimente im *stopped flow*-Fluoreszenzspektrometer zeigen, dass die ATP-induzierte Dissoziation des Akto-Myosin-Komplex in Anwesenheit von PBP um den Faktor 4 verlangsamt ist. Der Dissoziation des Komplexes gehen die ATP-Bindung und die Formation des Myosin-PBP-ATP-Komplexes voraus. Auch in Abwesenheit von F-Aktin ist die Bindung von Nukleotid an Myosin durch PBP gestört und dieser Prozess ist von der Konzentration an PBP abhängig.

Aus dem Schema des Akto-Myosin-ATPase-Zyklus in Abbildung 5 geht hervor, dass im Anschluss an die Dissoziation des Akto-Myosin-ATP-PBP-Komplexes die Hydrolyse folgt. Die Hydrolyse ist der PBP-sensitivste Schritt im ATPase-Zyklus. $25 \mu\text{M}$ PBP reduziert die Hydrolysegeschwindigkeit um den Faktor 10. Dies deutet darauf hin, dass die konformationellen Änderungen innerhalb der Nukleotidbindungstasche zum Hydrolyse-kompetenten Zustand durch die Inhibitoranwesenheit erschwert werden. Die verlangsamte ATP-Bindung und -Hydrolyse spiegelt sich auch in den durchgeführten *single turnover*-Experimenten wider. Die ATP-Hydrolyse ist durch die Plateau-Phase dargestellt, die bei $50 \mu\text{M}$ PBP über den beobachteten Zeitraum von 300 s nicht mehr beendet wird.

Die folgende Reassoziaton an Aktin und die damit verbundene Freisetzung von Phosphat aus dem Akto-Myosin-ADP- P_i -Komplex sind nicht signifikant durch PBP beeinflusst. Der Geschwindigkeitsbestimmende Schritt der ATPase von Myosin-5b aus *D. discoideum* ist die Freisetzung von ADP aus dem Akto-Myosin-ADP-Komplex. Anhand von zwei unterschiedlichen Messverfahren konnte gezeigt werden, dass $50 \mu\text{M}$ PBP diesen Prozess ungefähr um den Faktor 2 verlangsamt.

Die Verlangsamung der ADP-Freisetzung aus dem Akto-Myosin-Komplex sowie die langsamere ATP-induzierte Dissoziation des Akto-Myosin-Komplexes führen zu einer Populierung des stark Aktin-bindenden Zustands. Diese Anhäufung der Myosin-Motordomänen im stark Aktin-gebundenen

Zustand kann auch als Begründung für die Faktor 2 langsamere Gleitgeschwindigkeit der Aktinfilamente im *in vitro*-Motilitätsassay herangezogen werden. Die Aktinfilament-Gleitgeschwindigkeit von Myosin-5a aus *G. gallus* ist mit Faktor 50 deutlich stärker inhibiert. Es kann postuliert werden, dass die Kinetiken der ADP-Freisetzung und des Zerfalls des Akto-Myosin-Komplexes bei GgMyosin-5a deutlich stärker durch PBP beeinflusst werden.

Pentachloropseudilin (PCP) ist ein chemisches und strukturelles Analogon von PBP. In umfangreichen kinetischen und strukturellen Studien konnte für PCP eine Selektivität für Klasse-1 Myosine festgestellt werden (Chintalapudi et al., 2009). Die funktionalen Experimente in dieser Arbeit, die für *Dd*Myosin-1E eine 14-fach stärkere Inhibierung durch PCP zeigen als für *Dd*Myosin-5b, unterstützen die kinetischen Daten. Verglichen mit PBP muss für PCP ein anderer Mechanismus der Inhibierung vorliegen, weil eine Population von stark Aktin-bindenden Zuständen dem beobachteten Verlust von Aktinfilamenten an der Deckglasoberfläche im *in vitro*-Motilitätsassay widerspricht. Daher kann vermutet werden, dass bei der Inhibierung durch PCP vom Myosin ausschließlich schwach Aktin-bindende Zustände eingenommen werden. Dieser Effekt ist für die therapeutische Verwendung eines Myosin-Inhibitors von Vorteil, weil vermutet werden kann, dass die Populierung von stark Aktin-bindenden Zuständen während der Inhibierung mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden ist.

5. Literaturverzeichnis

- Allingham, J. S., Smith, R., and Rayment, I. (2005) The structural basis of blebbistatin inhibition and specificity for myosin II. *Nat Struct Mol Biol.* 12, 378-9. Epub 2005 Mar 6.
- Amrute-Nayak, M., Diensthuber, R. P., Steffen, W., Kathmann, D., Hartmann, F. K., Fedorv, R., Urbanke, C., Manstein, D. J., Brenner, B., and Manstein, D. J. (2010) Targeted optimization of a protein nanomachine for operation in biohybrid devices. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010;49(2):312-6.
- Anson, M., Geeves, M. A., Kurzawa, S. E., and Manstein, D. J. (1996) Myosin motors with artificial lever arms. *Embo J.* 15, 6069-74.
- Aspenstrom, P., and Karlsson, R. (1991) Interference with myosin subfragment-1 binding by site-directed mutagenesis of actin. *Eur J Biochem.* 200, 35-41.
- Bagshaw, C. R., and 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, 331-49.
- Batra, R., and Manstein, D. J. (1999) Functional characterisation of Dictyostelium myosin II with conserved tryptophanyl residue 501 mutated to tyrosine. *Biol Chem.* 380, 1017-23.
- Bauer, C. B., Kuhlman, P. A., Bagshaw, C. R., and Rayment, I. (1997) X-ray crystal structure and solution fluorescence characterization of Mg₂'(3')-O-(N-methylantraniloyl) nucleotides bound to the Dictyostelium discoideum myosin motor domain. *J Mol Biol.* 274, 394-407.
- Betapudi, V., Licate, L.S., and 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, 4725-33
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-23.
- Bonne, G., Carrier, L., Richard, P., Hainque, B., and Schwartz, K. (1998) Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects. *Circ Res.* 86 (6), 580-93.
- Bosgraaf, L., and van Haastert, P. J. (2006) The regulation of myosin II in Dictyostelium. *Eur J Cell Biol.* 85, 969-79. Epub 2006 Jun 30.
- 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, 248-54.
- Brokaw, C.J. (2009) Thinking about flagellar oscillation. *Cell Motil Cytoskeleton.* 66 (8), 425-36.
- Brenner, B. (2006) The stroke size of myosins: a reevaluation. *J Muscle Res Cell Motil.* 27, 173-87. Epub 2006 Feb 10.
- Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 54, 905-21.
- Brunner, C., Wahnes, C., and Vogel, V. (2007) Cargo pick-up from engineered loading stations by kinesin driven molecular shuttles. *Lab Chip.* 7, 1263-71. Epub 2007 Jul 25.
- Burkholder, P. R., Pfister, R. M., and Leitz, F. H. (1966) Production of a pyrrole antibiotic by a marine bacterium. *Appl Microbiol.* 14, 649-53.

- Chance, B., Gibson, Q. H., Eisenhardt, R. H., and Lonberg-Holm, K. K. (1964) Rapid Mixing and Sampling Techniques. *Science*. 146, 1697-1699.
- Charette, S. J., and Cosson, P. (2004) Preparation of genomic DNA from *Dictyostelium discoideum* for PCR analysis. *Biotechniques*. 36, 574-5.
- Cheung, A., Dantzig, J. A., Hollingworth, S., Baylor, S. M., Goldman, Y. E., Mitchison, T. J., and Straight, A. F. (2002) A small-molecule inhibitor of skeletal muscle myosin II. *Nat Cell Biol*. 4, 83-8.
- Chinthalapudi, K., Taft, M. H., Hartmann, F. K., Fedorov, R., Kathmann, D., Martin, R., Knölker, H.-J., Coluccio, L. M., Tsiavaliaris, G., Gutzeit, H. O., Manstein, D. J. (2009) Molecular mechanism of pentachloropseudilin mediated inhibition of myosin motor activity. *Manuskript in Vorbereitung*.
- Conibear, P. B., Bagshaw, C. R., Fajer, P. G., Kovacs, M., and Malnasi-Csizmadia, A. (2003) Myosin cleft movement and its coupling to actomyosin dissociation. *Nat Struct Biol*. 10, 831-5. Epub 2003 Sep 21.
- Cook, R. K., Root, D., Miller, C., Reisler, E., and Rubenstein, P. A. (1993) Enhanced stimulation of myosin subfragment 1 ATPase activity by addition of negatively charged residues to the yeast actin NH2 terminus. *J Biol Chem*. 268, 2410-5.
- Coureux, P. D., Sweeney, H. L., and Houdusse, A. (2004) Three myosin V structures delineate essential features of chemo-mechanical transduction. *Embo J*. 23, 4527-37. Epub 2004 Oct 28.
- Coureux, P. D., Wells, A. L., Menetrey, J., Yengo, C. M., Morris, C. A., Sweeney, H. L., and Houdusse, A. (2003) A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide. *Nature*. 425, 419-23.
- Criddle, A. H., Geeves, M. A., and 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, 343-9.
- De La Cruz, E. M., Wells, A. L., Rosenfeld, S. S., Ostap, E. M., and Sweeney, H. L. (1999) The kinetic mechanism of myosin V. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96, 13726-31.
- Desnos, C., Huet, S., and Darchen, F. (2007) 'Should I stay or should I go?' myosin V function in organelle trafficking. *Biol Cell*. 99, 411-23.
- Diensthuber, R. D. (2009) Dissertation: Struktur-Funktionsanalysen prozessiver und nicht-prozessiver Myosine.
- Dominguez, R., Freyzon, Y., Trybus, K. M., and 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, 559-71.
- Durrwang, U., Fujita-Becker, S., Erent, M., Kull, F. J., Tsiavaliaris, G., Geeves, M. A., and Manstein, D. J. (2006) *Dictyostelium* myosin-IE is a fast molecular motor involved in phagocytosis. *J Cell Sci*. 119, 550-8.
- Eccleston, J. F., Gratton, E., and Jameson, D. M. (1987) Interaction of a fluorescent analogue of GDP with elongation factor Tu: steady-state and time-resolved fluorescence studies. *Biochemistry*. 26, 3902-7.
- Elston, T., Wang, H., and Oster, G. (1998) Energy transduction in ATP synthase. *Nature*. 391, 510-3.
- Farruggia, G., Iotti, S., Prodi, L., Montalti, M., Zaccheroni, N., Savage, P. B., Trapani, V., Sale, P., and Wolf, F. I. (2006) 8-hydroxyquinoline derivatives as fluorescent sensors for magnesium in living cells. *J Am Chem Soc*. 128, 344-50.

- Fedorov, R., Bohl, M., Tsiavaliaris, G., Hartmann, F. K., Taft, M. H., Baruch, P., Brenner, B., Martin, R., Knolker, H. J., Gutzeit, H. O., and Manstein, D. J. (2009) The mechanism of pentabromopseudilin inhibition of myosin motor activity. *Nat Struct Mol Biol.* 16, 80-8. Epub 2009 Jan 4.
- Fischer, S., Windshugel, B., Horak, D., Holmes, K. C., and Smith, J. C. (2005) Structural mechanism of the recovery stroke in the myosin molecular motor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 6873-8. Epub 2005 Apr 29.
- Fisher, A. J., Smith, C. A., Thoden, J. B., Smith, R., Sutoh, K., Holden, H. M., and Rayment, I. (1995) X-ray structures of the myosin motor domain of Dictyostelium discoideum complexed with MgADP.BeFx and MgADP.AIF4. *Biochemistry.* 34, 8960-72.
- Forgacs, E., Sakamoto, T., Cartwright, S., Belknap, B., Kovacs, M., Toth, J., Webb, M. R., Sellers, J. R., and White, H. D. (2009) Switch 1 mutation S217A converts myosin V into a low duty ratio motor. *J Biol Chem.* 284, 2138-49. Epub 2008 Nov 12.
- Forkey, J. N., Quinlan, M. E., Shaw, M. A., Corrie, J. E., and Goldman, Y. E. (2003) Three-dimensional structural dynamics of myosin V by single-molecule fluorescence polarization. *Nature.* 422, 399-404.
- Foth, B. J., Goedecke, M. C., and Soldati, D. (2006) New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 3681-6. Epub 2006 Feb 27.
- Fujita-Becker, S., Durrwang, U., Erent, M., Clark, R. J., Geeves, M. A., and Manstein, D. J. (2005) Changes in Mg²⁺ ion concentration and heavy chain phosphorylation regulate the motor activity of a class I myosin. *J Biol Chem.* 280, 6064-71. Epub 2004 Dec 4.
- Fujita-Becker, S., Tsiavaliaris, G., Ohkura, R., Shimada, T., Manstein, D. J., and Sutoh, K. (2006) Functional characterization of the N-terminal region of myosin-2. *J Biol Chem.* 281, 36102-9. Epub 2006 Sep 17.
- Funatsu, T., Harada, Y., Tokunaga, M., Saito, K., and Yanagida, T. (1995) Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature.* 374, 555-9.
- Furch, M., Fujita-Becker, S., Geeves, M. A., Holmes, K. C., and 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., Geeves, M. A., and Manstein, D. J. (1998) Modulation of actin affinity and actomyosin adenosine triphosphatase by charge changes in the myosin motor domain. *Biochemistry.* 37, 6317-26.
- Furch, M., Rimmel, B., Geeves, M. A., and Manstein, D. J. (2000) Stabilization of the actomyosin complex by negative charges on myosin. *Biochemistry.* 39, 11602-8.
- Geeves, M. A., and Conibear, P. B. (1995) The role of three-state docking of myosin S1 with actin in force generation. *Biophys J.* 68, 194S-199S; discussion 199S-201S.
- Geeves, M. A., Fedorov, R., and Manstein, D. J. (2005) Molecular mechanism of actomyosin-based motility. *Cell Mol Life Sci.* 62, 1462-77.
- Goel, A., and Vogel, V. (2008) Harnessing biological motors to engineer systems for nanoscale transport and assembly. *Nat Nanotechnol.* 3 (8), 465-75.
- Goody, R. S. (2003) The missing link in the muscle cross-bridge cycle. *Nat Struct Biol.* 10, 773-5.
- Guthold, M., Zhu, X., Rivetti, C., Yang, G., Thomson, N. H., Kasas, S., Hansma, H. G., Smith, B., Hansma, P. K., and Bustamante, C. (1999) Direct observation of one-dimensional diffusion and transcription by Escherichia coli RNA polymerase. *Biophys J.* 77, 2284-94.

- Hachikubo, Y., Ito, K., Schiefelbein, J., Manstein, D. J., and Yamamoto, K. (2007) Enzymatic activity and motility of recombinant Arabidopsis myosin XI, MYA1. *Plant Cell Physiol.* **48**, 886-91. Epub 2007 May 15.
- Hancock, W. O., and Howard, J. (1998) Processivity of the motor protein kinesin requires two heads. *J Cell Biol.* **140**, 1395-405.
- Heldt, J.-W. (1999) Pflanzenbiochemie. *Spektrum Akademischer Verlag*
- Helenius, J., Brouhard, G., Kalaidzidis, Y., Diez, S., and Howard, J. (2006) The depolymerizing kinesin MCAK uses lattice diffusion to rapidly target microtubule ends. *Nature.* **441**, 115-9.
- Hess, H., Bachand, G. D., and Vogel, V. (2004) Powering nanodevices with biomolecular motors. *Chemistry.* **10** (9), 2110-6.
- Hodges, A. R., Kremetsova, E. B., and Trybus, K. M. (2007) Engineering the processive run length of Myosin V. *J Biol Chem.* **282**, 27192-7. Epub 2007 Jul 18.
- Hodneland, C. D., Lee, Y. S., Min, D. H., and Mrksich, M. (2002) Selective immobilization of proteins to self-assembled monolayers presenting active site-directed capture ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 5048-52.
- Holmes, K. C. (1997) The swinging lever-arm hypothesis of muscle contraction. *Curr Biol.* **7**, R112-8.
- Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W., and Kabsch, W. (1990) Atomic model of the actin filament. *Nature.* **347**, 44-9.
- Holmes, K. C., and Schroder, R. R. (2003) Switch 1 opens on strong binding to actin. Molecular and cellular aspects of muscle contraction. *Adv Exp Med Biol.* **538**, 159-66; discussion 166-7.
- Houdusse, A., Kalabokis, V. N., Himmel, D., Szent-Gyorgyi, A. G., and Cohen, C. (1999) Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: a novel conformation of the myosin head. *Cell.* **97**, 459-70.
- Huxley, H. E. (1969) The mechanism of muscular contraction. *Science.* **164**, 1356-65.
- Ireton, K. (2007) Entry of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* into mammalian cells. *Cell Microbiol.* **9**(6), 1365-75.
- Ito, K., Ikebe, M., Kashiyama, T., Mogami, T., Kon, T., and Yamamoto, K. (2007) Kinetic mechanism of the fastest motor protein, Chara myosin. *J Biol Chem.* **282**, 19534-45. Epub 2007 May 7.
- Ito, K., Kashiyama, T., Shimada, K., Yamaguchi, A., Awata, J., Hachikubo, Y., Manstein, D. J., and Yamamoto, K. (2003) Recombinant motor domain constructs of Chara corallina myosin display fast motility and high ATPase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* **312**, 958-64.
- Joel, P. B., Sweeney, H. L., and 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**, 9160-6.
- Kliche, W., Fujita-Becker, S., Kollmar, M., Manstein, D. J., and Kull, F. J. (2001) Structure of a genetically engineered molecular motor. *Embo J.* **20**, 40-6.
- Knetsch, M. L., Tsiavaliaris, G., Zimmermann, S., Ruhl, U., and Manstein, D. J. (2002) Expression vectors for studying cytoskeletal proteins in Dictyostelium discoideum. *J Muscle Res Cell Motil.* **23**, 605-11.
- Kollmar, M. (2006) Thirteen is enough: the myosins of Dictyostelium discoideum and their light chains. *BMC Genomics.* **7**, 183.
- Kollmar, M., Durrwang, U., Kliche, W., Manstein, D. J., and Kull, F. J. (2002) Crystal structure of the motor domain of a class-I myosin. *Embo J.* **21**, 2517-25.

- Koppole, S., Smith, J. C., and Fischer, S. (2006) Simulations of the myosin II motor reveal a nucleotide-state sensing element that controls the recovery stroke. *J Mol Biol.* 361, 604-16. Epub 2006 Jun 30.
- Koppole, S., Smith, J. C., and Fischer, S. (2007) The structural coupling between ATPase activation and recovery stroke in the myosin II motor. *Structure.* 15, 825-37.
- Kouyama, T., and Mihashi, K. (1981) Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin. *Eur J Biochem.* 114, 33-8.
- Kovacs, M., Toth, J., Hetenyi, C., Malnasi-Csizmadia, A., and Sellers, J. R. (2004) Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J Biol Chem.* 279, 35557-63. Epub 2004 Jun 16.
- Kron, S. J., and Spudich, J. A. (1986) Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 6272-6.
- Kull, F. J., and Endow, S. A. (2002) Kinesin: switch I & II and the motor mechanism. *J Cell Sci.* 115, 15-23.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-5.
- Lee, T. H., Mozsolits, H., and Aguilar, M. I. (2001) Measurement of the affinity of melittin for zwitterionic and anionic membranes using immobilized lipid biosensors. *J Pept Res.* 58, 464-76.
- Lehrer, S. S., and Kerwar, G. (1972) Intrinsic fluorescence of actin. *Biochemistry.* 11, 1211-7.
- Lymn, R. W., and Taylor, E. W. (1971) Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry.* 10, 4617-24.
- Malnasi-Csizmadia, A., Pearson, D. S., Kovacs, M., Woolley, R. J., Geeves, M. A., and 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.
- Malnasi-Csizmadia, A., Woolley, R. J., and 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, 16135-46.
- Manstein, D. J. (2004) Molecular engineering of myosin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 359, 1907-12.
- Manstein, D. J., and 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, 325-32.
- Manstein, D. J., Schuster, H. P., Morandini, P., and Hunt, D. M. (1995) Cloning vectors for the production of proteins in Dictyostelium discoideum. *Gene.* 162, 129-34.
- Marston, S. B., and 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, C. R., and Kohli, P. (2003) The emerging field of nanotube biotechnology. *Nat Rev Drug Discov.* 2, 29-37.
- 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, 635-40.

- Mehta, A. D., Rock, R. S., Rief, M., Spudich, J. A., Mooseker, M. S., and Cheney, R. E. (1999) Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature*. 400, 590-3.
- Menetrey, J., Bahloul, A., Wells, A. L., Yengo, C. M., Morris, C. A., Sweeney, H. L., and Houdusse, A. (2005) The structure of the myosin VI motor reveals the mechanism of directionality reversal. *Nature*. 435, 779-85.
- Menetrey, J., Llinas, P., Cicolari, J., Squires, G., Liu, X., Li, A., Sweeney, H. L., and Houdusse, A. (2008) The post-rigor structure of myosin VI and implications for the recovery stroke. *Embo J*. 27, 244-52. Epub 2007 Nov 29.
- Michailova, A., and McCulloch, A. (2001) Model study of ATP and ADP buffering, transport of Ca(2+) and Mg(2+), and regulation of ion pumps in ventricular myocyte. *Biophys J*. 81, 614-29.
- Milligan, R. A., and Flicker, P. F. (1987) Structural relationships of actin, myosin, and tropomyosin revealed by cryo-electron microscopy. *J Cell Biol*. 105, 29-39.
- Murphy, C. T., Rock, R. S., and Spudich, J. A. (2001) A myosin II mutation uncouples ATPase activity from motility and shortens step size. *Nat Cell Biol*. 3, 311-5.
- Nagerl, U. V., Willig, K. I., Hein, B., Hell, S. W., and Bonhoeffer, T. (2008) Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 18982-7. Epub 2008 Nov 21.
- Ohtsuki, I., and Morimoto, S. (2008) Troponin: regulatory function and disorders. *Biochem Biophys Res Commun*. 369, 62-73. Epub 2007 Dec 26.
- Okada, T., Tanaka, H., Iwane, A. H., Kitamura, K., Ikebe, M., and Yanagida, T. (2007) The diffusive search mechanism of processive myosin class-V motor involves directional steps along actin subunits. *Biochem Biophys Res Commun*. 354, 379-84. Epub 2007 Jan 8.
- Oldfors, A. (2007) Hereditary myosin myopathies. *Neuromuscul Disord*. 17, 355-67. Epub 2007 Apr 16.
- Onishi, H., Kojima, S., Katoh, K., Fujiwara, K., Martinez, H. M., and 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, 6653-8.
- Onishi, H., Mikhailenko, S. V., and Morales, M. F. (2006) Toward understanding actin activation of myosin ATPase: the role of myosin surface loops. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 6136-41. Epub 2006 Apr 7.
- Onishi, H., Mochizuki, N., and Morales, M. F. (2004) On the myosin catalysis of ATP hydrolysis. *Biochemistry*. 43, 3757-63.
- O'Shea, E. K., Klemm, J. D., Kim, P. S., and Alber, T. (1991) X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science*. 254, 539-44.
- Parry, D. A., Dixon, T. W., and Cohen, C. (1992) Analysis of the three-alpha-helix motif in the spectrin superfamily of proteins. *Biophys J*. 61, 858-67.
- Patel, H., Margossian, S. S., and Chantler, P. D. (2000) Locking regulatory myosin in the off-state with trifluoperazine. *J Biol Chem*. 275, 4880-8.
- Patton, C., Thompson, S., and Epel, D. (2004) Some precautions in using chelators to buffer metals in biological solutions. *Cell Calcium*. 35, 427-31.
- Post, P. L., Tyska, M. J., O'Connell, C. B., Johung, K., Hayward, A., and Mooseker, M. S. (2002) Myosin-IXb is a single-headed and processive motor. *J Biol Chem*. 277, 11679-83. Epub 2002 Jan 18.
- Purcell, T. J., Morris, C., Spudich, J. A., and Sweeney, H. L. (2002) Role of the lever arm in the processive stepping of myosin V. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 14159-64. Epub 2002 Oct 17.

- Purcell, T. J., Sweeney, H. L., and Spudich, J. A. (2005) A force-dependent state controls the coordination of processive myosin V. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 13873-8. Epub 2005 Sep 6.
- Ramamurthy, B., Yengo, C. M., Straight, A. F., Mitchison, T. J., and Sweeney, H. L. (2004) Kinetic mechanism of blebbistatin inhibition of nonmuscle myosin IIb. *Biochemistry.* 43, 14832-9.
- Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D. R., Benning, M. M., Winkelmann, D. A., Wesenberg, G., and Holden, H. M. (1993) Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science.* 261, 50-8.
- Renault, L., Bugyi, B., and Carlier, M. F. (2008) Spire and Cordon-bleu: multifunctional regulators of actin dynamics. *Trends Cell Biol.* 18, 494-504. Epub 2008 Sep 5.
- Reubold, T. F., Eschenburg, S., Becker, A., Kull, F. J., and Manstein, D. J. (2003) A structural model for actin-induced nucleotide release in myosin. *Nat Struct Biol.* 10, 826-30. Epub 2003 Sep 21.
- Rock, R. S., Rice, S. E., Wells, A. L., Purcell, T. J., Spudich, J. A., and Sweeney, H. L. (2001) Myosin VI is a processive motor with a large step size. *Proc Natl Acad Sci.* 98(24) 13655-9
- Rock, R. S., Rief, M., Mehta, A. D., and Spudich, J. A. (2000) In vitro assays of processive myosin motors. *Methods.* 22, 373-81.
- Rosenfeld, S. S., Houdusse, A., and Sweeney, H. L. (2005) Magnesium regulates ADP dissociation from myosin V. *J Biol Chem.* 280, 6072-9. Epub 2004 Dec 4.
- Rosenfeld, S. S., and Sweeney, H. L. (2004) A model of myosin V processivity. *J Biol Chem.* 279, 40100-11. Epub 2004 Jul 14.
- Ruff, C., Furch, M., Brenner, B., Manstein, D. J., and Meyhofer, E. (2001) Single-molecule tracking of myosins with genetically engineered amplifier domains. *Nat Struct Biol.* 8, 226-9.
- Ruppel, K. M., and Spudich, J. A. (1996) Structure-function studies of the myosin motor domain: importance of the 50-kDa cleft. *Mol Biol Cell.* 7, 1123-36.
- Sakamoto, T., Wang, F., Schmitz, S., Xu, Y., Xu, Q., Molloy, J. E., Veigel, C., and Sellers, J. R. (2003) Neck length and processivity of myosin V. *J Biol Chem.* 278, 29201-7. Epub 2003 May 11.
- Sakamoto, T., Webb, MR., Forgacs, E., White, HD., and Seller, JR. (2008) Direct observation of the mechanochemical coupling in myosin Va during processive movement. *Nature.* 455, 128-32.
- Sasaki, N., Shimada, T., and Sutoh, K. (1998) Mutational analysis of the switch II loop of Dictyostelium myosin II. *J Biol Chem.* 273, 20334-40.
- Sasaki, N., and Sutoh, K. (1998) Structure-mutation analysis of the ATPase site of Dictyostelium discoideum myosin II. *Adv Biophys.* 35, 1-24.
- Satre, M., and 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.
- Schutt, C. E., Myslik, J. C., Rozycki, M. D., Goonesekere, N. C., and Lindberg, U. (1993) The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature.* 365, 810-6.
- Sellers, J. R. (2000) Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta.* 1496, 3-22.
- Sellers, J. R., Thirumurugan, K., Sakamoto, T., Hammer, J. A., 3rd, and Knight, P. J. (2008) Calcium and cargoes as regulators of myosin 5a activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 369, 176-81. Epub 2007 Dec 3.
- Sellers, J. R., Wang, F., and Chantler, P. D. (2003) Trifluoperazine inhibits the MgATPase activity and in vitro motility of conventional and unconventional myosins. *J Muscle Res Cell Motil.* 24, 579-85.

- Shaw, M. A., Ostap, E. M., and Goldman, Y. E. (2003) Mechanism of inhibition of skeletal muscle actomyosin by N-benzyl-p-toluenesulfonamide. *Biochemistry*. 42, 6128-35.
- Sheetz, M. P., and Spudich, J. A. (1983) Movement of myosin-coated fluorescent beads on actin cables in vitro. *Nature*. 303, 31-5.
- Shimmen, T., Mimura, T., Kikuyama, M., and Tazawa, M. (1994) Characean cells as a tool for studying electrophysiological characteristics of plant cells. *Cell Struct Funct*. 19, 263-78.
- Shiroguchi, K., and Kinosita, K., Jr. (2007) Myosin V walks by lever action and Brownian motion. *Science*. 316, 1208-12.
- Sleep, J., Irving, M., and Burton, K. (2005) The ATP hydrolysis and phosphate release steps control the time course of force development in rabbit skeletal muscle. *J Physiol*. 563, 671-87. Epub 2004 Dec 20.
- Smith, C. A., and Rayment, I. (1995) X-ray structure of the magnesium(II)-pyrophosphate complex of the truncated head of Dictyostelium discoideum myosin to 2.7 Å resolution. *Biochemistry*. 34, 8973-81.
- Spudich, J. A. (1994) How molecular motors work. *Nature*. 372, 515-8.
- Spudich, J. A., and 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, 4866-71.
- Steffen, W., and Sleep, J. (2004) Repriming the actomyosin crossbridge cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 12904-9. Epub 2004 Aug 23.
- Straight, A. F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N. J., Sellers, J. R., and Mitchison, T. J. (2003) Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor. *Science*. 299, 1743-7.
- Sumiyoshi, H., Ooguchi, M., Ooi, A., Okagaki, T., and Higashi-Fujime, S. (2007) Insight into the mechanism of fast movement of myosin from Chara corallina. *Cell Motil Cytoskeleton*. 64, 131-42.
- Sundberg, M., Balaz, M., Bunk, R., Rosengren-Holmberg, J. P., Montelius, L., Nicholls, I. A., Omling, P., Tagerud, S., and Mansson, A. (2006) Selective spatial localization of actomyosin motor function by chemical surface patterning. *Langmuir*. 22 (17), 7302-12.
- Sutoh, K., Ando, M., Sutoh, K., and 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, 7711-4.
- Sweeney, Z. K., and Klumpp, K. (2008) Improving non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors for first-line treatment of HIV infection: the development pipeline and recent clinical data. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 11, 458-70.
- Taft, M. H., Hartmann, F. K., Rump, A., Keller, H., Chizhov, I., Manstein, D. J., and Tsiavaliaris, G. (2008) Dictyostelium myosin-5b is a conditional processive motor. *J Biol Chem*. 283, 26902-10. Epub 2008 Jul 23.
- Takagi, Y., Yang, Y., Fujiwara, I., Jacobs, D., Cheney, R. E., Sellers, J. R., and Kovacs, M. (2008) Human myosin Vc is a low duty ratio, nonprocessive molecular motor. *J Biol Chem*. 283, 8527-37. Epub 2008 Jan 16.
- Tominaga, M., Kojima, H., Yokota, E., Orii, H., Nakamori, R., Katayama, E., Anson, M., Shimmen, T., and Oiwa, K. (2003) Higher plant myosin XI moves processively on actin with 35 nm steps at high velocity. *Embo J*. 22, 1263-72.

- Toyoshima, Y. Y., Kron, S. J., McNally, E. M., Niebling, K. R., Toyoshima, C., and Spudich, J. A. (1987) Myosin subfragment-1 is sufficient to move actin filaments in vitro. *Nature*. 328, 536-9.
- Trentham, D. R., Bardsley, R. G., Eccleston, J. F., and 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, 635-44.
- Trybus, K. M. (1994) Role of myosin light chains. *J Muscle Res Cell Motil*. 15(6) 587-94.
- Trybus, K. M., Waller, G. S., and Chatman, T. A. (1994) Coupling of ATPase activity and motility in smooth muscle myosin is mediated by the regulatory light chain. *J Cell Biol*. 124, 963-9.
- Tsiavaliaris, G., Fujita-Becker, S., Batra, R., Levitsky, D. I., Kull, F. J., Geeves, M. A., and Manstein, D. J. (2002) Mutations in the relay loop region result in dominant-negative inhibition of myosin II function in Dictyostelium. *EMBO Rep*. 3, 1099-105. Epub 2002 Oct 22.
- Tsiavaliaris, G., Fujita-Becker, S., Durrwang, U., Diensthuber, R. P., Geeves, M. A., and Manstein, D. J. (2008) Mechanism, regulation, and functional properties of Dictyostelium myosin-1B. *J Biol Chem*. 283, 4520-7. Epub 2007 Dec 17.
- Tsiavaliaris, G., Fujita-Becker, S., and Manstein, D. J. (2004) Molecular engineering of a backwards-moving myosin motor. *Nature*. 427, 558-61.
- Tune, L. E., Creese, I., DePaulo, J. R., Slavney, P. R., and Snyder, S. H. (1981) Neuroleptic serum levels measured by radioreceptor assay and clinical response in schizophrenic patients. *J Nerv Ment Dis*. 169, 60-3.
- Uyeda, T. Q., Abramson, P. D., and 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, 4459-64.
- Vale, R. D. (1987) Intracellular transport using microtubule-based motors. *Annu Rev Cell Biol*. 3, 347-78.
- 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., Funatsu, T., Pierce, D. W., Romberg, L., Harada, Y., and Yanagida, T. (1996) Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. *Nature*. 380, 451-3.
- Vale, R. D., and Milligan, R. A. (2000) The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science*. 288, 88-95.
- Vale, R. D., Soll, D. R., and Gibbons, I. R. (1989) One-dimensional diffusion of microtubules bound to flagellar dynein. *Cell*. 59, 915-25.
- van den Heuvel, M. G., and Dekker, C. (2007) Motor proteins at work for nanotechnology. *Science*. 317, 333-6.
- VanBuren, P., Begin, K., and Warshaw, D. M. (1998) Fluorescent phalloidin enables visualization of actin without effects on myosin's actin filament sliding velocity and hydrolytic properties in vitro. *J Mol Cell Cardiol*. 30, 2777-83.
- Veigel, C., Bartoo, M. L., White, D. C., Sparrow, J. C., and Molloy, J. E. (1998) The stiffness of rabbit skeletal actomyosin cross-bridges determined with an optical tweezers transducer. *Biophys J*. 75, 1424-38.
- Veigel, C., Coluccio, L. M., Jontes, J. D., Sparrow, J. C., Milligan, R. A., and Molloy, J. E. (1999) The motor protein myosin-I produces its working stroke in two steps. *Nature*. 398, 530-3.
- Veigel, C., Schmitz, S., Wang, F., and Sellers, J. R. (2005) Load-dependent kinetics of myosin-V can explain its high processivity. *Nat Cell Biol*. 7, 861-9. Epub 2005 Aug 14.

- Veigel, C., Wang, F., Bartoo, M. L., Sellers, J. R., and Molloy, J. E. (2002) The gated gait of the processive molecular motor, myosin V. *Nat Cell Biol.* 4, 59-65.
- Verkhovskiy, A. B., Svitkina, T. M., and Borisy, G. G. (1997) Polarity sorting of actin filaments in cytochalasin-treated fibroblasts. *J Cell Sci.* 110, 1693-704.
- Voet, D. J., Voet, J. G., and Pratt, C. W. Lehrbuch der Biochemie. *Viley-VCH.*
- Walker, M. L., Burgess, S. A., Sellers, J. R., Wang, F., Hammer, J. A., 3rd, Trinick, J., and Knight, P. J. (2000) Two-headed binding of a processive myosin to F-actin. *Nature.* 405, 804-7.
- Wang, F., Chen, L., Arcucci, O., Harvey, E.V., Bowers, B., Xu, Y., Hammer, J.A. 3rd, and Sellers, J.R. (2000) Effect of ADP ionic strength on the kinetic and motile properties of recombinant mouse myosin V. *J Biol Chem.* 275 (6) 4329-35.
- Warshaw, D. M., Kennedy, G. G., Work, S. S., Kremmentsova, E. B., Beck, S., and Trybus, K. M. (2005) Differential labeling of myosin V heads with quantum dots allows direct visualization of hand-over-hand processivity. *Biophys J.* 88, L30-2. Epub 2005 Mar 11.
- Watanabe, S., Ikebe, R., and Ikebe, M. (2006) Drosophila myosin VIIA is a high duty ratio motor with a unique kinetic mechanism. *J Biol Chem.* 281, 7151-60. Epub 2006 Jan 16.
- Watanabe, S., Mabuchi, K., Ikebe, R., and Ikebe, M. (2006) Mechanoenzymatic characterization of human myosin Vb. *Biochemistry.* 45, 2729-38.
- Watanabe, S., Watanabe, T. M., Sato, O., Awata, J., Homma, K., Umeki, N., Higuchi, H., Ikebe, R., and Ikebe, M. (2008) Human myosin Vc is a low duty ratio nonprocessive motor. *J Biol Chem.* 283, 10581-92. Epub 2007 Dec 12.
- Wells, A. L., Lin, A. W., Chen, L. Q., Safer, D., Cain, S. M., Hasson, T., Carragher, B. O., Milligan, R. A., and Sweeney, H. L. (1999) Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature.* 401, 505-8.
- White, H. D., Belknap, B., and Webb, M. R. (1997) Kinetics of nucleoside triphosphate cleavage and phosphate release steps by associated rabbit skeletal actomyosin, measured using a novel fluorescent probe for phosphate. *Biochemistry.* 36, 11828-36.
- Yanagida, T., Nakase, M., Nishiyama, K., and Oosawa, F. (1984) Direct observation of motion of single F-actin filaments in the presence of myosin. *Nature.* 307, 58-60.
- Yang, Z., and Sweeney, H. L. (1995) Restoration of phosphorylation-dependent regulation to the skeletal muscle myosin regulatory light chain. *J Biol Chem.* 270, 24646-9.
- Yengo, C. M., and Sweeney, H. L. (2004) Functional role of loop 2 in myosin V. *Biochemistry.* 43, 2605-12.
- Yildiz, A., Forkey, J. N., McKinney, S. A., Ha, T., Goldman, Y. E., and Selvin, P. R. (2003) Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science.* 300, 2061-5. Epub 2003 Jun 5.
- Zeng, W., Conibear, P. B., Dickens, J. L., Cowie, R. A., Wakelin, S., Malnasi-Csizmadia, A., and Bagshaw, C. R. (2004) Dynamics of actomyosin interactions in relation to the cross-bridge cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 359, 1843-55.

6. Publikationen

Dictyostelium myosin-5b is a conditional processive motor.

Taft, MH; [Hartmann, FK](#); Rump, A; Keller, H; Chizhov, I; Manstein, DJ; Tsiavaliaris, G.
J Biol Chem. 2008 Oct 3;283(40):26902-10. Epub 2008 Jul 23.

The mechanism of pentabromopseudilin inhibition of myosin motor activity.

Fedorov, R; Böhl, M; Tsiavaliaris, G; [Hartmann, FK](#); Taft, MH; Baruch, P; Brenner, B; Martin, R; Knölker, HJ; Gutzeit, HO; Manstein, DJ.
Nat Struct Mol Biol. 2009 Jan;16(1):80-8. Epub 2009 Jan 4.

Targeted optimization of a protein nanomachine for operation in biohybrid devices.

Amrute-Nayak, M⁺; Diensthuber, RP⁺; Steffen, W; Kathmann, D; [Hartmann, FK](#); Fedorov, R; Urbanke, C; Manstein, DJ; Brenner, B; Tsiavaliaris, G.
Angew Chem Int Ed Engl. 2010;49(2):312-6.

Mechanism of switch-2 mediated Mg²⁺-coordination and ADP release in myosins.

Diensthuber, RP⁺; [Hartmann, FK](#)⁺; Kathmann, D; Fedorov, R; Manstein, DJ; Tsiavaliaris, G.
Manuskript in Vorbereitung.

Molecular mechanism of pentachloropseudilin mediated inhibition of myosin motor activity.

Chinthalapudi, K; Taft, MH; [Hartmann, FK](#); Fedorov, R; Kathmann, D; Martin, R; Knölker, HJ; Coluccio, LM; Tsiavaliaris, G; Gutzeit, HO; Manstein DJ.
Manuskript in Vorbereitung.

7. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Hartmann
 Vorname: Falk
 Wohnort: Sallstr. 49
 30171 Hannover
 Telefon/email: 0511-8503356
 0170-4844122
 hartmann.falk@mh-hannover.de
 Geburtsdatum: 10.11.1978
 Geburtsort: Bremen
 Nationalität: deutsch
 Familienstand: ledig

Berufliche Tätigkeiten

seit 02/2006 Doktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Georgios Tsiavaliaris am Institut für Biophysikalische Chemie an der Medizinischen Hochschule Hannover.
 Thema der Dissertation: Funktionale Charakterisierung des molekularen Mechanismus von hohen und niedrigen *duty ratio* Myosin-Motoren.

09/2005 - 11/2005 Trainee am European Molecular Biology Laboratory (EMBL) - Hamburg.

05/2005 - 12/2005 Doktorand am Institut für Biochemie der Pflanzen, Universität Düsseldorf.

05/2004 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Botanik, Pflanzenphysiologisches Grundpraktikum für Biologen.

02/2003 - 03/2003 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Botanik, Botanisches Grundpraktikum für Biochemiker.

Ausbildung

02/2005 Diplom, Fachbereich Biologie, Universität Hannover, Note: 1,3.
 Thema der Diplomarbeit: Charakterisierung von mehreren Mitgliedern der Multiproteinfamilie der Sulfurtransferasen in *Arabidopsis thaliana*. Die Diplomarbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Jutta Papenbrock am Institut für Botanik angefertigt.

03/2002 Diplomvorprüfung, Fachbereich Biologie, Universität Hannover, Note: 1,9.

06/1999 Abitur am Carl-Spitzweg-Gymnasium Germering, Bayern, Note: 2,3.

Hannover, 24.09.2009

Falk Hartmann