

Funktionsanalyse menschlicher Myosin-Motordomänen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biochem. Sarah Maria Heißler
geboren am 7.12.1981 in Würzburg

2010

Referent: Prof. Dr. Dietmar Manstein

Korreferent: Prof. Dr. Volkhard Kaever

Tag der Promotion: 20.9.2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01.03.2007 bis 20.05.2010 am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Dietmar Manstein angefertigt.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Sarah Maria Heißler, die Arbeit selbständig verfasst zu haben.
Es wurden ausschließlich die angegebenen Hilfsmittel verwendet.

Hannover, den 12. Oktober 2010

Oda, Hans und Julian gewidmet.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dietmar J. Manstein bedanken, der mir am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover hervorragende Voraussetzungen für die Anfertigung meiner Doktorarbeit geschaffen hat. Durch die wissenschaftliche Betreuung meiner Dissertation wurde der Fortgang dieser Arbeit durch kritische und inspirierende Diskussionen bereichert.

Herrn Prof. Dr. Volkhard Kaever danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Allen Kollegen des Instituts für Biophysikalische Chemie danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Besonderer Dank richtet sich dabei an PD Dr. Heiner Wolfes, der mich während meiner Diplomanden- und Doktorandenzeit durch konstruktive Anregungsvorschläge sowie beim Korrekturlesen des Manuskripts permanent und uneingeschränkt unterstützt hat.

Bei Hella Scharnhorst möchte ich mich für die technische Unterstützung bedanken.

Krishna Chinthalapudi, Matthias Preller und Anne Hennig danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre, die einen positiven Einfluss auf diese Arbeit hatte und die Arbeit auf persönlicher Ebene bereichert hat. Herzlich möchte ich mich bei Krishna Chinthalapudi für die kompetente Unterstützung bei der Lösung computerchemischer Probleme sowie seine Freundschaft bedanken.

An dieser Stelle möchte ich mich bei Dr. Manuel Taft, Dr. Ralph Diensthuber und allen nicht namentlich erwähnten Kollegen bedanken, deren scheinbar kleine aber wertvolle Beiträge die vorliegende Arbeit erst zum Ganzen werden ließen.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden für ihre uneingeschränkte Unterstützung.

Was wirklich zählt, ist Intuition.
Albert Einstein (1879-1955)

Zusammenfassung

Die Myosin-Superfamilie umfasst im menschlichen Organismus 12 Klassen. Allgemeines Merkmal der Myosine ist die Konversion chemischer Energie der ATP-Hydrolyse in gerichtete Bewegung entlang eines Aktin-Filaments. Der Reaktionsweg der Aktin-aktivierten ATPase ist für alle Myosine konserviert; die Raten- und Gleichgewichtskonstanten die den Reaktionsweg definieren, variieren zwischen den Mitgliedern der Myosin Superfamilie und resultieren in kinetischen Unterschieden, welche das Funktionsspektrum eines Motors determinieren.

Die vorliegende Arbeit ist auf die kinetische, funktionale und regulatorische Charakterisierung humaner Myosin-Motordomänen der Klassen-2, -6 und -7 fokussiert. Der ATPase-Zyklus der Myosine wird durch transientenkinetische und biochemische Methoden aufgeklärt. Für funktionale Studien wird der *in vitro*-Motilitätsassay eingesetzt. Die Bestimmung der individuellen kinetischen Konstanten und Lebensdauern von Intermediaten des ATPase-Zyklus eines Myosins erlaubt einen Einblick in die spezifischen zellulären Funktionen des Motors.

Die Isoformen des humanen nichtmuskulären Myosins-2C unterscheiden sich in Länge und Sequenz der Oberflächenschleifen-1 und -2. Der ATPase-Zyklus der Isoformen ist durch eine hohe Affinität zu F-Aktin in der An- und Abwesenheit von Nukleotid gekennzeichnet. Isoformspezifische Unterschiede sind durch alternatives *splicing* der Oberflächenschleifen-1 und -2 geprägt. Dabei bewirkt eine expandierte Schleife-2 eine Reduktion der Affinität des Myosins für F-Aktin in der Abwesenheit von Nukleotid sowie eine Verdopplung der ATPase-Aktivität im Fließgleichgewicht. Die ADP-Dissoziation ist stark durch die Anwesenheit einer expandierten Oberflächenschleife-1 beschleunigt und erfährt eine weitere Beschleunigung durch eine verlängerte Oberflächenschleife-2: Die ADP-Bindung ist unabhängig von den Oberflächenschleifen. Variationen der ADP-Bindungs- und Dissoziationskinetik resultieren in Veränderungen der Dissoziationsgleichgewichtskonstanten K_D und K_{AD} . Die Ergebnisse der kinetischen und funktionalen Charakterisierung sind in Übereinstimmung mit den zellulären Funktionen nichtmuskulärer Myosine an der zytoplasmatischen Kontraktilität und der Erhaltung der kortikalen Spannung.

Die kinetischen Eigenschaften der Motordomäne des humanen unkonventionellen Myosins-6 sind durch eine langsame und schwache Bindung von ATP gekennzeichnet. Die ADP-Dissoziation von Aktomyosin stellt den ratenlimitierenden Schritt des Myosin ATPase-Zyklus dar. Humanes Myosin-6 weist eine hohe *duty ratio* auf und erfüllt die kinetischen Voraussetzungen für ein prozessives Verhalten. Die kinetischen Eigenschaften des Motors können die Funktion des Myosins-6 an der zellulären Spannungsausübung erklären.

Der ATPase-Zyklus des humanen Myosins-7a ist durch eine langsame ATPase-Aktivität im Fließgleichgewicht und eine ratenlimitierende ADP-Dissoziation von Aktomyosin gekennzeichnet. Hohe Affinitäten zu F-Aktin, auch in der Gegenwart von Nukleotid sowie eine hohe ADP-Affinität in An- und Abwesenheit von F-Aktin tragen zu einer langen Population der stark aktinbindenden Intermediate des Myosin ATPase-Zyklus bei und resultieren in einer hohen *duty ratio* des Motors. Die kinetischen Charakteristika des unkonventionellen Myosins erfüllen die Voraussetzungen für ein potentiell prozessives Verhalten. Die funktionale Kompetenz des Motors wurde im *in vitro*-Motilitätsassay gezeigt. Die kinetischen und biochemischen Untersuchungen sind konsistent mit den zellulären Funktionen unkonventioneller Myosine der Klasse-7 bei Transport- und strukturbildenden Prozessen.

Weiterhin wird erstmalig gezeigt, dass Myosin-Motordomänen der Klassen-2, -6 und -7 einem magnesiumsensitiven Regulationsmechanismus unterliegen. Dabei wird die ADP-Dissoziation von Aktomyosin im oberen Grenzbereich der physiologischen freien Mg^{2+} -Konzentration inhibiert. Die inhibitorische Gleichgewichtskonstante liegt ebenfalls im physiologischen Bereich der freien Magnesiumionenkonzentrationen. Die Magnesiumsensitivität hat direkte Auswirkungen auf die *duty ratio* der molekularen Motoren und ist Basis funktionaler und regulatorischer Mechanismen dieser Myosine.

Die gezielte Beeinflussung humaner Myosin-Motordomänen durch niedermolekulare Effektoren wird im Rahmen dieser Arbeit durch computerchemische und biochemische Methoden analysiert. Mittels molekularem *docking* werden potentielle Effektoren humaner Myosin-Motordomänen der Klassen-2, -6 und -7 identifiziert und selektierte Effektoren auf ein modulatorisches Potenzial der ATPase-Aktivität der Motordomänen im Fließgleichgewicht charakterisiert. Dabei wird gezeigt, dass der Myosin-Inhibitor Blebbistatin die ATPase-Aktivität der Motordomäne des humanen nichtmuskulären Myosins-2Cs im Fließgleichgewicht 8fach erniedrigt. Dies Verhalten steht im Einklang mit der bekannten Funktion des Blebbistatins als selektiver Inhibitor von Myosinen der Klasse-2.

EMD 57033 ist ein Aktivator des humanen Myosins-6 und des nichtmuskulären Myosins-2Cs. Die ATPase-Aktivität der menschlichen Myosin-Motordomänen im Fließgleichgewicht wird um den Faktor 1,6-2 aktiviert. Der AC_{50} -Wert liegt im mikromolaren Bereich.

Schlüsselwörter: Myosin, Kinetik, Effektor

Summary

The myosin superfamily is organised into 12 different classes in humans. A common feature of myosins is the conversion of chemical energy from ATP-hydrolysis in locomotive motion on actin-filaments. The pathway of the enzyme-catalysed reaction of the actin-activated ATPase is conserved for all myosins. The rate and equilibrium constants defining the pathway vary across the members of the myosin superfamily and result in kinetic differences that determine their functional properties.

The present work is focussed on the kinetic, functional and regulatory characterisation of human myosin motor domains of classes-2, -6 and -7. The actomyosin ATPase cycle of these myosins is determined by transient kinetic analysis and biochemical assays. The *in vitro* motility assay is used for functional studies. The determination of the individual kinetic constants and lifetimes of the intermediates of the actomyosin ATPase cycle is important to obtain an understanding of the specific cellular functions of the motor.

Human nonmuscle myosin-2C isoforms differ in length and sequence of the surface loops-1 and -2. The actomyosin ATPase cycle is determined by a high affinity for F-actin, even in the presence of nucleotide. Isoform specific differences are defined by the alternatively spliced surface loops-1 and -2. An expanded loop-2 is responsible for the observed reduction of F-Actin affinity in the presence of nucleotide and a doubling in k_{cat} under steady-state conditions. ADP-dissociation from actomyosin is accelerated in the presence of an expanded loop-1 region and is further accelerated with an expanded loop-2 region. ADP-binding is independent from the surface-loops. Variations of the ADP binding and release kinetics result in changes of the corresponding equilibrium constants K_D and K_{AD} . Results from the kinetic and functional characterisation are in agreement with the cellular functions of nonmuscle myosins to exert tension on cortical actin filaments and maintain the cytoplasmic contractility.

The actomyosin ATPase cycle of the human unconventional myosin-6 motor domain is characterised by a slow and weak ATP binding. ADP release from actomyosin is the rate-limiting step in the cycle. Human Myosin-6 is a high *duty ratio* motor and has the potential to be processive. The kinetic features of the molecular motor can explain the cellular function of myosin-6 in maintaining tension.

The actomyosin ATPase cycle of human myosin-7a shows a slow ATPase activity and a rate-limiting ADP release from actomyosin. High affinities for F-actin, even in the presence of ADP generate long lifetimes of the strong actin-binding intermediates and result in a high *duty ratio*. The kinetic properties of the unconventional myosin fulfil the criteria for a potential processive behaviour. The functional competence of the motor was shown in the *in vitro* motility assay. The kinetic and biochemical analysis are consistent with the functions of unconventional class-7 myosins in moving cargoes and exert tension forces in the cell.

Furthermore, the present work shows for the first time a magnesium-sensitive regulatory mechanism for myosin motor domains of classes-2, -6 and -7. ADP release kinetics from actomyosin are inhibited at the upper limit of physiological free magnesium-ion concentrations. The equilibrium dissociation constants are in the physiological range of free magnesium-ions. Magnesium sensitivity influences the *duty ratios* of the molecular motors and defines the basis of functional and regulatory mechanisms of these myosins.

In the present work, the direct modulation of human myosin motor domains by small-chemical compounds is analysed with *in silico* and biochemical methods. Molecular docking studies were accomplished to identify potential effectors of human myosin motor domains of classes-2, -6 and -7. Selected effectors were tested to modulate the steady-state ATPase activities of human myosins. The myosin inhibitor blebbistatin inhibits nonmuscle myosin-2C's steady-state ATPase-activity 8-fold. This result is consistent with the known function of blebbistatin in inhibiting class-2 myosins.

EMD 57033 acts as an activator on human nonmuscle myosin-2C and myosin-6. The ATPase activities of these human motor domains under steady-state conditions is activated 1.6-2-fold. The AC_{50} is determined in the micromolar range.

Keywords: Myosin, Kinetics, Effectors

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
A	2'-Desoxyadenosin-5'-monophosphat
ad	auffüllen auf
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
<i>Ai</i>	<i>Aequipecten irradians</i>
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	2'-Desoxycytosin-5'-monophosphat
C-	Carboxy-
ca.	circa
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CIAP	<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i> , Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CM-	Kardiomyopathie-
Cryo-EM	Cryo-Elektronenmikroskopie
d	desoxy
<i>Dd</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
Da	Dalton
<i>Dm</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EB	<i>Elution Buffer</i> , Elutionspuffer
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether) -N,N'-tetraessigsäure
ELC	Essentielle leichte Kette
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i> , verstärkt gelb fluoreszierendes Protein
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i> , Förster-Resonanzenergietransfer
<i>g</i>	Gravitationskonstante

g	Gramm
<i>Gg</i>	<i>Gallus gallus</i>
h	Stunden
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin -1-ethansulfonsäure
His	Histidin
(His) ₈ -tag	Histidin-Oktapeptid
HMM	<i>Heavy Mero Myosin</i> , schweres Meromyosin
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IQ-Motiv	Isoleuzin-Glutamin-Motiv
IUB	<i>International Union of Biochemistry</i>
k	Kilo
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
LAP	Laemmliauftragspuffer
LCBR	<i>Light Chain Binding Region</i> , Bindungsstelle der leichten Ketten
LDH	Laktatdehydrogenase
LB	Luria Bertani
m	Milli
<i>Mammalia</i>	Säugetiere
Mant	N-Methylanthraniloyl-
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i> , multiple Klonierungsstelle
MD	Motordomäne
Mg	Magnesium
min	Minuten
<i>Mm</i>	<i>Mus musculus</i>
M _w	Molekulargewicht
N-	Amino-
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduziert
Ni ²⁺ -NTA	Nickel ²⁺ -Nitrilotriacetat
<i>Oc</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> Wildkaninchen
OD	optische Dichte
P _i	inorganisches Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK3	p21-aktivierte Kinase 3
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDB	Proteindatenbank
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvatkinase
2R	artificialer Hebelarm
RLC	Regulatorische leichte Kette
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	<i>Revolutions per Minute</i> , Umdrehungen pro Minute
<i>Rr</i>	<i>Rattus rattus</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden

S1	Myosin Subfragment-1
<i>S. Cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	denaturierende Polyacrylamid- Gelelektrophorese mit SDS
<i>Sf9</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i> , RNA-Interferenz
<i>Ss</i>	<i>Sus scrofa</i>
T	2'-Desoxythymidin-5'-monophosphat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
U	<i>Unit(s)</i> , Aktivitätseinheit für Enzyme
μ	Mikro
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

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

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Molekulare Motoren	1
1.2	Die Myosin-Superfamilie	2
1.2.1	Nichtmuskuläre Myosine der Klasse-2	4
1.2.2	Myosin-6	6
1.2.3	Myosin-7	7
1.3	Strukturelle Eigenschaften der Myosin-Motordomäne	9
1.3.1	Nukleotidbindungstasche	12
1.3.2	Mg ²⁺ -Regulation	13
1.3.3	Der Myosin ATPase-Zyklus	14
1.3.4	<i>Duty ratio</i> , Prozessivität und Direktionalität	16
1.4	Enzymatik	17
1.4.1	<i>Steady-state</i> ATPase-Aktivität	17
1.4.2	Transientenkinetische Analyse der ATPase-Aktivität	18
1.4.2.1	Interaktion zwischen Myosin und Nukleotid	18
1.4.2.2	Interaktion zwischen Myosin und F-Aktin	20
1.4.2.3	Interaktion zwischen Myosin mit F-Aktin und Nukleotid	21
1.5	Myosin-Effektoren	22
1.6	Das Baculovirus-Expressionssystem	24
1.7	Zielsetzung dieser Arbeit	26
2	Material und Methoden	27
2.1	Material	27
2.1.1	Chemikalien	27
2.1.2	Enzyme	29
2.1.3	Reagenzienkits	29
2.1.4	Vektoren	29
2.1.5	Oligonukleotide	30
2.1.6	Nukleinsäurestandards	30
2.1.7	Proteinstandards	30
2.1.8	Antikörper	30
2.1.9	Mikroorganismen	31
2.1.10	<i>Sf9</i> -Insektenzellkultur	31
2.1.11	Geräte	31
2.1.12	Verbrauchsmaterialien	32
2.2	Methoden	34
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	34
2.2.1.1	Kultivierung von <i>E.coli</i>	34
2.2.1.2	Herstellung transformativkompetenter Bakterienstämme	34
2.2.1.3	Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i> -Stämme	35
2.2.1.4	Plasmidpräparation	35
2.2.1.5	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	35
2.2.1.6	Midi-Präparation von Plasmid-DNA	35
2.2.1.7	Bacmid-Präparation	36

2.2.1.8	Agarosegelelektrophorese	36
2.2.1.9	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	36
2.2.1.10	DNA-Quantifizierung	37
2.2.2	Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren	37
2.2.2.1	Restriktionsanalyse	37
2.2.2.2	Dephosphorylierungsreaktion mit Alkalischer Phosphatase	37
2.2.2.3	Ligation von DNA-Fragmenten	37
2.2.2.4	Klonierung mittels Gateway [®] -Technologie	38
2.2.2.5	Gateway [®] BP-Reaktion	38
2.2.2.6	Gateway [®] LR-Reaktion	38
2.2.2.7	Polymerasekettenreaktion (PCR) und ortsspezifische Mutagenese	39
2.2.2.8	Aufreinigung von PCR-Produkten	39
2.2.2.9	<i>A-tailing</i>	40
2.2.3	Proteinbiochemische Arbeiten	40
2.2.3.1	Protein-Quantifizierung durch UV-Absorptionsmessung	40
2.2.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.2.3.3	Färbung von SDS-PAGE-Gelen	41
2.2.3.4	Western-Blot	41
2.2.3.5	Präparative Aufreinigung von His ₈ -Fusionsproteinen	41
2.2.3.6	Präparation von Aktin aus Kaninchenmuskel	42
2.2.3.7	Präparation von Aktin-Acetonpulver	43
2.2.3.8	Präparation von F- und G-Aktin	43
2.2.3.9	Präparation von Pyren-markiertem F-Aktin	44
2.2.3.10	Präparation von TRITC-Phalloidin-markiertem F-Aktin	45
2.2.4	Zellkultur	45
2.2.4.1	Zelllinie und Kulturführung	45
2.2.4.2	Revitalisierung und Initiation einer <i>Sf9</i> -Kultur	45
2.2.4.3	Kultivierung von <i>Sf9</i> -Zellen in Adhäsions- und Suspensionskultur	45
2.2.4.4	Cryokonservierung	46
2.2.4.5	Zellzahl- und Viabilitätstestung	46
2.2.4.6	Transfektion	47
2.2.4.7	Amplifikation und Isolierung rekombinanter Baculoviren	47
2.2.4.8	Proteinproduktion und Isolierung exprimierender Zellen	47
2.2.5	Biophysikalische Methoden	48
2.2.5.1	<i>Steady-state</i> Kinetik	48
2.2.5.2	Transientenkinetik	49
2.2.5.3	<i>Stopped-flow</i> -Methode	49
2.2.5.4	<i>In vitro</i> -Motilitätsassay	51
2.2.6	Computerchemische Methoden	52
2.2.6.1	Homologiemodellierung	52
2.2.6.2	<i>Docking</i>	53
3	Ergebnisse	54
3.1	Nichtmuskuläres Myosin-2C	54
3.1.1	Homologie und Primärsequenzanalyse	54
3.1.2	Darstellung der Expressionsplasmide	56
3.1.3	Expression und Aufreinigung	57
3.1.4	Homologiemodellierung	58
3.1.5	Funktionale und kinetische Charakterisierung	60
3.1.6	Kinetische Charakterisierung	60
3.1.6.1	ATP-Titration	61
3.1.7	<i>Steady-state</i> ATPase-Aktivität	61
3.1.8	Interaktion zwischen Myosin und Aktomyosin mit ATP	63
3.1.8.1	Bestimmung der ATP-Bindung an Myosin	63
3.1.8.2	ATP-Bindung an Aktomyosin	65
3.1.9	Interaktion zwischen Myosin und ADP	66

3.1.9.1	MantADP-Bindung an Myosin	66
3.1.9.2	Bestimmung der ADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-D}	67
3.1.9.3	Bestimmung der Dissoziationsgleichgewichtskonstante K_D	68
3.1.10	Interaktion zwischen Aktomyosin und ADP	70
3.1.10.1	MantADP-Bindung an Aktomyosin	70
3.1.10.2	ADP-Dissoziation von Aktomyosin	70
3.1.10.3	ADP-Dissoziationsgleichgewichtskonstante von Aktomyosin	70
3.1.11	Einfluss der freien Magnesiumionenkonzentration auf die Interaktion zwischen Aktomyosin und ADP	73
3.1.12	Interaktion zwischen Myosin und Myosin·ADP mit F-Aktin	75
3.1.12.1	Aktinbindung an Myosin	75
3.1.12.2	Dissoziation von Pyren-Aktin aus dem Aktomyosin-Komplex	76
3.1.12.3	Bestimmung der Aktin-Affinitätskonstante K_A	76
3.1.12.4	Aktinbindung an Myosin in der Gegenwart von ADP	77
3.1.12.5	Dissoziation von Pyren-Aktin aus dem Aktomyosin-Komplex in Gegenwart von ADP	77
3.1.12.6	Affinitätskonstante in Gegenwart von ADP	78
3.1.13	Funktionale Charakterisierung	80
3.2	Myosin-6	81
3.2.1	Klonierung, Expression und Darstellung	81
3.2.2	Kinetische Charakterisierung des humanen Myosin-6	82
3.2.2.1	<i>Steady-state</i> ATPase-Aktivität	82
3.2.2.2	Transientenkinetische Charakterisierung des humanen Myosins-6	84
3.2.2.3	Interaktion zwischen Myosin-6 und ATP	84
3.2.2.4	Interaktion zwischen Aktomyosin-6 und ATP	84
3.2.2.5	Interaktion zwischen Myosin-6 sowie Aktomyosin-6 mit ADP	86
3.2.2.6	Interaktion zwischen Myosin-6 sowie Myosin-ADP mit F-Aktin	89
3.3	Myosin-7a	92
3.3.1	Klonierung, Produktion und Darstellung des Myosins-7a	92
3.3.2	Kinetische Charakterisierung des humanen Myosins-7a	93
3.3.2.1	ATP-Titration	93
3.3.2.2	<i>Steady-state</i> ATPase-Aktivität	94
3.3.3	Transientenkinetische Charakterisierung des Myosins-7a	96
3.3.3.1	Interaktion zwischen Myosin-7a und ATP	96
3.3.3.2	Interaktion zwischen Aktomyosin-7a und ATP	98
3.3.3.3	Interaktion zwischen Myosin-7a und ADP	100
3.3.3.4	Interaktion zwischen Aktomyosin-7a und ADP	102
3.3.3.5	Interaktion zwischen Myosin-7a und F-Aktin	105
3.3.3.6	Interaktion zwischen Myosin-7a·ADP und F-Aktin	106
3.3.4	<i>In vitro</i> Motilität	107
3.4	Myosin-Effektoren	108
4	Diskussion	114
4.1	Nichtmuskuläres Myosin-2C	114
4.2	Myosin-6	121
4.3	Myosin-7a	125
4.4	Myosin-Effektoren	131
	Literaturverzeichnis	I
	Präsentationen	XV
	Lebenslauf	XVI

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Molekulare Motoren

Zellen sind komplexe heterologe Systeme, in denen dynamische Prozesse wie die Genreplikation, Transkription und Translation, der Transport von Vesikeln und Organellen und die Chromosomen-Segregation ablaufen [KOLOMEISKY und FISHER 2007, VALE und MILLIGAN 2000]. Motorproteine sind in diese Prozesse involviert; zu den bis heute bekannten Motorproteinen zählen beispielsweise Myosine, Kinesine, Dyneine, DNA- und RNA-Polymerasen sowie Helikasen [KOLOMEISKY und FISHER 2007]. Praktisch jede Zelle weist ein Repertoire von ungefähr 100 unterschiedlichen molekularen Motoren auf, die zentrale Aufgaben übernehmen und deren Funktionen strikt reguliert und koordiniert werden [SPUDICH und SIVARAMAKRISHNAN 2010]. Allgemeines Funktionsprinzip molekularer Motoren ist die Umsetzung von chemischer Energie in mechanische Bewegung. Energiequellen sind zum einen die Hydrolyse von ATP oder verwandten energiereichen Verbindungen, zum anderen die Polymerisation von Nukleinsäuren und Proteinen [KOLOMEISKY und FISHER 2007].

Zytoplasmatische Linearmotoren - Myosine, Dyneine und Kinesine - setzen die Energie der ATP-Hydrolyse in lineare translationale Bewegung um [KOLOMEISKY und FISHER 2007, SCHLIWA und WOEHLEKE 2003]. Die prozessiven Motoren Dynein und Kinesin bewegen sich unidirektional entlang von radial orientierten Mikrotubuli. Myosin bewegt sich entlang von zufällig orientierten Aktin-Filamenten [KOLOMEISKY und FISHER 2007, MALLIK und GROSS 2004, MILLIGAN und FLICKER 1987, VALE 1987]. Während sich Myosine und Kinesine zum Plus- und zum Minus-Ende von F-Aktin bzw. Mikrotubuli bewegen, führen Dyneine eine unidirektionale Bewegung zum Minus-Ende von Mikrotubuli durch [KOLOMEISKY und FISHER 2007, SCHLIWA und WOEHLEKE 2003]. Der Transport intrazellulärer Frachten über lange Distanzen erfolgt über das Mikrotubuli-System, während der Transport über kurze Strecken entlang von Aktin-Filamenten zum Bestimmungsort erfolgt [LANGFORD 1995].

Einzelne Linearmotoren spielen bedeutende Rollen in der räumlichen und zeitlichen Organisation zellulärer Transportprozesse von Organellen und Vesikeln, der Zellokomotion, der Zellteilung und als Kollektiv in der Bewegung von Organismen und Motilitätserscheinungen einzelliger Organismen [BRIDGMAN 1999, FUJIWARA und POLLARD 1976, KOLOMEISKY und FISHER 2007, SCHLIWA und WOEHLEKE 2003, VALE 2003].

Studien zur Aufklärung der funktionalen und kinetischen Charakteristika von Myosinen verschiedener Klassen liefern einen Beitrag für das Verständnis der enzymatischen Konvertierung von Energie in gerichtete Bewegung. Neben kinetischen Verfahren ergänzen moderne experimentelle Methoden und Techniken wie Atomkraftmikroskopie [ANDO *et al.* 2001], optische Laserfallen [UEMURA *et al.* 2004] und Fluoreszenzmikroskopie [SAKAMOTO *et al.* 2008] die funktionale Charakterisierung von Myosinen. Diese Methoden ermöglichen Studien über die Dynamik eines einzelnen Motors mit einer hohen zeitlichen und räumlichen Auflösung und liefern wichtige Einblicke in die Mechanismen der Kraft- und Bewegungserzeugung von Motorproteinen [KOLOMEISKY und FISHER 2007].

1.2 Die Myosin-Superfamilie

Myosine stellen eine Superfamilie aktinbindender molekularer Motoren dar, die in zelluläre Prozesse die Kraft und Translokation erfordern, involviert sind. Ihr Aufgabenspektrum reicht vom intrazellulären Transport von Cargos, über die Endo- und Exozytose bis zur Muskelkontraktion [VICENTE-MANZANARES *et al.* 2009].

Die schwere Kette eines Myosins ist ein bifunktionales Molekül und folgt einem allgemeinen Aufbau aus drei Subdomänen: einer katalytischen Motordomäne, die mit F-Aktin interagiert und ATP bindet, einer Nackenregion, an welche leichte Ketten oder Calmodulin binden und einer Schwanzregion. Die Motordomäne ist innerhalb der Myosin-Superfamilie hoch konserviert: Ausnahmen stellen der N-Terminus und die divergenten Oberflächenschleifen dar [SELLERS 2000]. Die leichten Ketten, die essentielle beziehungsweise regulatorische Funktionen aufweisen [TRYBUS 1994], binden an ein helikales Sequenzmotiv innerhalb der Nackendomäne, welches als IQ-Motiv bezeichnet wird und die Konsensussequenz IQXXXRGXXXR aufweist [CHENEY und MOOSEKER 1992]. Die Anzahl der IQ-Motive variiert zwischen 0 und 17 in Myosinen unterschiedlicher Klassen [MOOSEKER und FOTH 2008]. Die Schwanzdomäne ist divergent und variiert stark in Länge und Sequenz. Funktionale Motive wie beispielsweise SH3-Domänen, GAP-Domänen, FERM-Domänen und PH-Domänen wurden in Schwanzregionen verschiedener Myosine identifiziert und sind in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt. Zusätzlich beinhaltet die Schwanzregion einiger Myosine eine superspiralisierte, *coiled coil* formende Sequenz. Durch die Formation einer langen, umeinander gewundenen parallelen Doppelhelix ermöglicht die *coiled coil*-Sequenz die Dimerisierung von zwei schweren Myosinketten unter der Ausbildung einer doppelköpfigen Struktur [SELLERS 2000]. Diese Dimerisierung wurde bisher für Myosine der Klassen-2, -5 und -18 beschrieben; isolierte Myosine anderer Klassen liegen wahrscheinlich als Monomere vor [PECKHAM und KNIGHT 2009]. Es wird vermutet, dass die Schwanzregion die Funktion eines Myosins determiniert, indem sie durch die Interaktion mit akzessorischen Bindungsproteinen das Myosin zu spezifischen zellulären Kompartimenten leitet [ROBERTS *et al.* 2004].

Die Analyse genomischer Datenbanken identifiziert eine stetig steigende Anzahl an Genen unterschiedlicher Myosin-Klassen. In höheren Eukaryoten gibt es ≈ 40 Myosin-Gene [SPUDICH und SIVARAMAKRISHNAN 2010]. Derzeit unterteilt die phylogenetische Analyse die Myosin-Superfamilie in mindestens 24 Klassen [BERG *et al.* 2001, FOTH *et al.* 2006, HODGE und COPE 2000]. Keine Myosin-Klasse wird universell in allen *Phyla* exprimiert [SELLERS 2000]. Basierend auf der phylogenetischen Analyse sind im humanen Genom derzeit 39 Myosin-kodierende Gene beschrieben [PECKHAM und KNIGHT 2009]. Abbildung 1.1 zeigt die Organisation der humanen Myosin-Gene in 12 Klassen, basierend auf einem *alignment* der hochkonservierten Motordomäne [PECKHAM und KNIGHT 2009].

Myosine der Klasse-2 waren die ersten kontraktile Proteine, die vor über 60 Jahren in der Muskulatur und dem Zytoplasma von Tierzellen identifiziert wurden [SZENT-GYÖRGYI 2004] und werden als *konventionelle* Myosine bezeichnet [ROSENFELD *et al.* 2003, SELLERS 2000]. Diese Bezeichnung separiert sie von anderen Myosin-Klassen, die als *unkonventionell* bezeichnet werden [ROSENFELD *et al.* 2003]. Zu den wichtigsten physiologischen Funktionen *unkonventioneller* Myosine zählen der Transport von Vesikeln und Organellen entlang von Aktin-Filamenten, die Organisation des Zytoskeletts, die Signaltransduktion und die Verankerung von Vesikeln und Proteinen an Aktin-Filamenten [KRENDEL und MOOSEKER 2005].

Die Myosin-2 Subfamilie stellt die größte Familie an Filament-formenden Myosinen dar. Die Assoziation von Myosin-2 Dimeren mit dem *coiled coil* anderer Dimere formt den Schaft der dicken Filamente und somit die Basis für die Ausbildung von bipolaren Filamenten, wie sie in den Sarkomeren des Muskels vorliegen [PECKHAM und KNIGHT 2009, SELLERS 2000]. Prototyp der kontraktile molekulare Motoren ist das Myosin-2 der Muskelzellen. Kontraktilität, die Fähigkeit zur Krafterzeugung, ist besonders im quergestreiften Skelettmuskel verwirklicht. Es existieren eine Vielzahl verschiedener Formen von Kontraktilität, die ein weites Spektrum unterschiedlicher mechanischer Arbeitsleistungen ermöglichen, angefangen von den schnellen Verkürzungen der quergestreiften Skelettmuskulatur über die langsame Bewegung der glatten Muskulatur des Darmes bis zu den

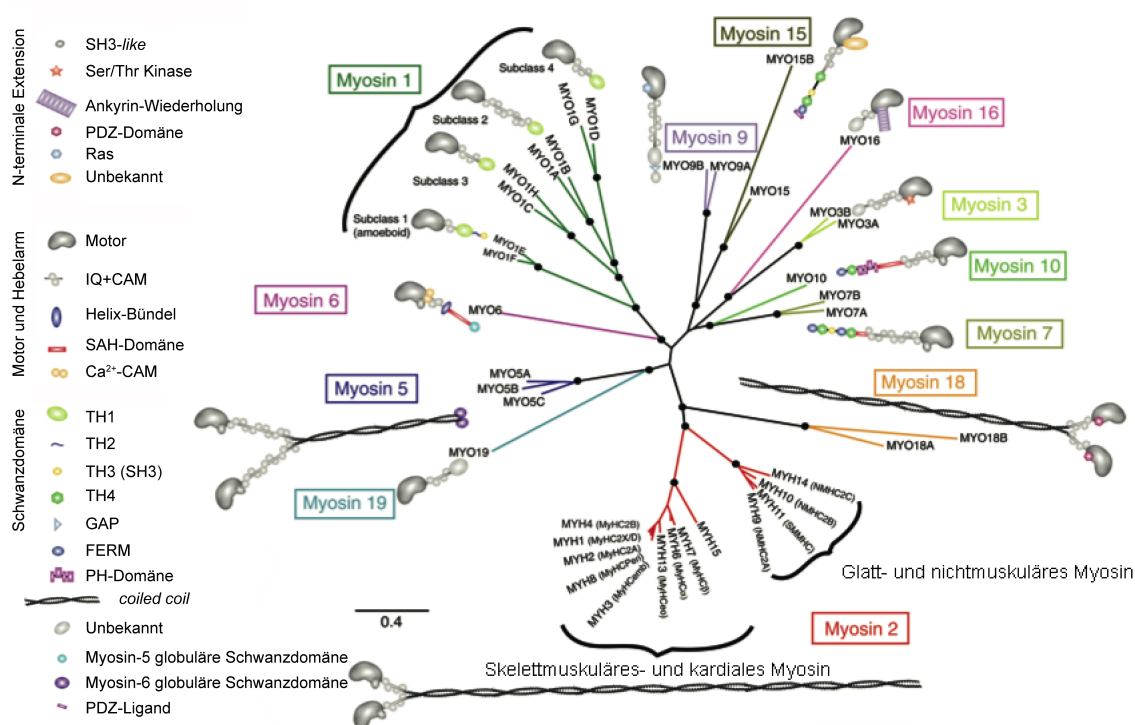


Abbildung 1.1: Phylogenetische Analyse der humanen Myosine. Jeder Ast des Baumes besitzt eine Länge, die proportional der Anzahl an Substitutionen ist, die benötigt werden um von einem Knotenpunkt zum nächsten zu gelangen. Die Variabilität der Myosine wird durch die N-terminale Extension der Motor-domänen sowie durch Domänen der Schwanzregionen erzielt. Mit Ausnahme der Klassen-2, -5 und -18 die zur Dimerisierung befähigt sind, sind Myosine der verbleibenden Klassen monomer [PECKHAM und KNIGHT 2009]. Abbildung verändert nach [PECKHAM und KNIGHT 2009].

ausdauernden tonischen Halteleistungen des Schließmuskels bestimmter Muscheln [HOPPE *et al.* 1982].

Myosin-genetische Dispositionen sind an der Genese von Krankheiten beteiligt. Im Menschen führen Mutationen in den Genen *MYH6* und *MYH7*, codierend für die sarkomeren α - und β -schweren Ketten des Myosins, zu hereditären Erkrankungen des Myokards wie der familiären hypertrophen Kardiomyopathie, die durch eine Hypertrophie des linken Ventrikels gekennzeichnet ist [BONNE *et al.* 1998, KELLER *et al.* 2005, MARON 2002]. Mutationen im Gen des nichtmuskulären Myosins-2A, *MYH9*, sind beispielsweise an den autosomal dominanten Riesenthrombozyten-Krankheiten May-Hegglin-Anomalie, Fechtner-Syndrom und Sebastian-Syndrom sowie dem Alport-Syndrom und dem Epstein-Syndrom beteiligt [ALTHAUS und GREINACHER 2009, HU *et al.* 2002]. *MYH14* ist für eine Form der autosomal dominanten nonsyndromischen sensorineuralen Taubheit (DFNA4) verantwortlich [DONAUDY *et al.* 2004]. Griscelli Syndrom Typ 1, eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die durch Pigmentanomalien sowie primäre neurologische Beeinträchtigungen gekennzeichnet ist, wird durch Mutationen im *MYO5A*-Gen verursacht [MÉNASCHE *et al.* 2002, SANAL *et al.* 2002]. Mutationen in den Genen codierend für die humanen Myosine-6, -7a und -15 sind, wie viele andere unkonventionelle und konventionelle Myosine, in Formen der hereditären auditorischen Dysfunktion involviert [FRIEDMAN *et al.* 1999].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die kinetischen und funktionalen Eigenschaften der Isoformen des humanen nichtmuskulären Myosins-2C sowie der menschlichen Myosine-6 und -7a untersucht. Daher wird im Folgenden detaillierter auf diese Myosin-Klassen eingegangen.

1.2.1 Nichtmuskuläre Myosine der Klasse-2

Die Myosin-2 Subfamilie umfasst skelettmuskuläres, kardiales, glattmuskuläres sowie nichtmuskuläres Myosin und stellt die meisten Mitglieder der Superfamilie. Vertebraten exprimieren über 15 verschiedene Myosin-2 Isoformen, die aus verschiedenen schweren Ketten bestehen. Die Diversität der schweren Ketten wird durch eine Vielzahl an Genen sowie alternatives *splicing* von kodierender pre-mRNA erzielt [CONTI und ADELSTEIN 2008].

Zytoplasmatisches Myosin-2 ist ubiquitär und sowohl in Protisten als auch im Tierreich repräsentiert [CONTI *et al.* 2008]. Nichtmuskuläre Myosine, die muskulären Myosinen strukturell und funktional ähneln, werden in Eukaryoten in allen Zelltypen exprimiert [ROCHLIN *et al.* 1995, ROSENFELD *et al.* 2003, VICENTE-MANZANARES *et al.* 2009]. Sie werden, obwohl der Name etwas anderes impliziert, auch in allen Muskelzellen exprimiert, wenn auch in signifikant geringeren Mengen als muskuläre Myosine [CONTI *et al.* 2008, EDDINGER und MEER 2007]. In Myozyten haben nichtmuskuläre Myosine funktionale Eigenschaften während der Entwicklung des Skelettmuskels und der Aufrechterhaltung von Spannung in der glatten Muskulatur [MORANO *et al.* 2000, VICENTE-MANZANARES *et al.* 2009, YUEN *et al.* 2009].

Phylogenetisch betrachtet sind nichtmuskuläre Myosine enger mit glattmuskulärem als mit sarkomerem Myosin-2 verwandt (siehe Abbildung 1.1) [GOLOMB *et al.* 2004]. Basierend auf Sequenzanalysen werden in Säugetieren drei Klassen nichtmuskulärer Myosine unterschieden [BHATIA-DEY *et al.* 1998, GOLOMB *et al.* 2004, SAEZ *et al.* 1990]. Dabei kodieren drei unterschiedliche Gene, *MYH9*, *MYH10* und *MYH14*, drei unterschiedliche zytoplasmatische Myosine, deren Genprodukte als NMHC-2A, NMHC-2B und NMHC-2C bezeichnet werden [CONTI und ADELSTEIN 2008, ROSENFELD *et al.* 2003, VICENTE-MANZANARES *et al.* 2009]. Auf Aminosäureebene weisen die Isoformen 60-80% Sequenzhomologie auf; signifikante Unterschiede bestehen an den amino- und carboxyterminalen Enden [CONTI *et al.* 2008]. Die komparative Analyse der Aminosäuresequenz lässt vermuten, dass NMHC-2C einen individuellen Ast in der Familie der nichtmuskulären/glattmuskulären Myosine besetzt. Die Identität sowie Similarität zwischen NMHC-2A, NMHC-2B und glattmuskulärem Myosin sind höher als zwischen einem Mitglied dieser Gruppe und NMHC-2C [GOLOMB *et al.* 2004].

In Säugetieren werden die pre-mRNAs, die im Menschen und der Maus von den Genen *MYH10* und *MYH14* transkribiert werden, alternativ *gespleißt* [VICENTE-MANZANARES *et al.* 2009]. An konservierten Positionen in Schleife-1, bezeichnet als B1 und C1, sowie Schleife-2 (B2, C2) werden Aminosäurekassetten inseriert (Abbildung 3.6) [CONTI *et al.* 2008]. Eine homologe Insertion zu B1 respektive C1 ist auch für glattmuskuläres Myosin beschrieben [KELLEY *et al.* 1993, LÉGUILLETTE *et al.* 2005]. Alternatives *splicing* erhöht die Anzahl exprimierter nichtmuskulärer Myosine auf neun [VICENTE-MANZANARES *et al.* 2009]. Obwohl für das *MYH9*-Transkript Hinweise auf alternatives *splicing* in homologen Regionen zu *MYH10* und *MYH14* beschrieben wurden [LI *et al.* 2008], ist unklar, ob diese Transkripte translatiert werden [VICENTE-MANZANARES *et al.* 2009].

Strukturelle und biochemische Eigenschaften

Myosine der Klasse-2 folgen einen allgemeinen Aufbau aus drei Peptidpaaren. Zwei schwere Ketten formen ein Homodimer, an das zwei Paare leichter Ketten binden, welche regulatorische (RLC) und essentielle (ELC) Funktionen besitzen (Abbildung 1.2) [CONTI *et al.* 2008, GOLOMB *et al.* 2004, TRYBUS 1994].

Das Myosin-Dimer ist bifunktional aufgebaut: es besitzt zwei globuläre Motordomänen, welche Bindungsregionen für Aktin und Nukleotid aufweisen. Die Motordomänen werden von einer Nackenregion gefolgt, an die zwei funktional unterschiedliche leichte Ketten binden. An die Nackendomäne schließt sich eine lange *coiled coiled*-Domäne an, die die Dimerisierung der schweren Ketten ermöglicht und in einen relativ kurzen, nicht-helikalen Schwanz übergeht. Ähnlich wie andere Mitglieder der Klasse-2 assoziieren die elongierten stabförmigen Domänen der nichtmuskulären Myosine miteinander und formen bipolare Filamente [VICENTE-MANZANARES *et al.* 2009]. Diese Filamente bestehen aus weniger als 28 Myosinen und sind somit 20-30fach kleiner als die Filamente des Herz- und Skelettmuskels [ROSENFELD *et al.* 2003, VERKHOVSKY und BORISY 1993].

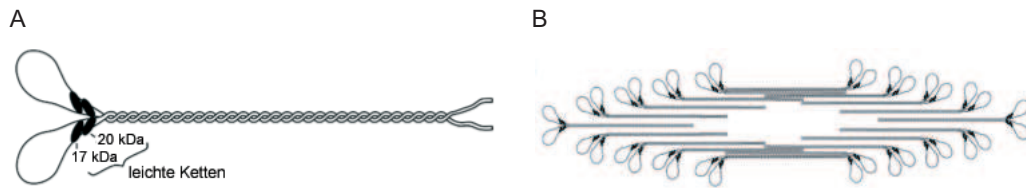


Abbildung 1.2: A: Schematische Darstellung eines nichtmuskulären Myosins. Abgebildet ist das Dimer der schweren Ketten ($M_W \approx 230$ kDa) mit zwei Paaren funktionaler leichter Ketten. Die regulatorische Kette besitzt ein Molekulargewicht von 20 kDa, die essentielle von 17 kDa. B: Diagramm eines bipolaren Filaments eines nichtmuskulären Myosins. Abbildung verändert nach [CONTI *et al.* 2008].

Die geringe Größe der Filamente nichtmuskulärer Myosine repräsentiert die Adaption der Motoren an die Ansprüche der zytoplasmatischen Kontraktilität und die Erhaltung der kortikalen Spannung [ROSENFELD *et al.* 2003]. Es gibt keinen Hinweis über die Formation von Heterodimeren zwischen Mitgliedern der Isoformen der nichtmuskulären Myosine [GOLOMB *et al.* 2004, VICENTE-MANZANARES *et al.* 2009].

Regulationsmechanismen des nichtmuskulären Myosins kontrollieren die Aktin-aktivierte ATPase-Aktivität und die Filamentbildung [CONTI *et al.* 2008]. Die leichten Ketten, die nichtkovalent an die schwere Kette binden, stabilisieren (MLC17) und regulieren (MLC20) sowohl Struktur als auch Funktion des Myosins [CONTI und ADELSTEIN 2008]. MLC20 ist Substrat einer Vielzahl von Kinasen, eingeschlossen der Ca^{2+} -Calmodulin abhängigen Myosin Light Chain Kinase (MLCK), Rho-aktivierten Kinase und AMP-aktivierten Protein Kinase [CONTI und ADELSTEIN 2008]. Die Phosphorylierung von MLC20 erhöht die Aktin-aktivierte ATPase-Aktivität, induziert die Filamentbildung und die kontraktile Aktivität *in vivo* und *in vitro* sowie die *in vitro* Motilität [CONTI und ADELSTEIN 2008, CONTI *et al.* 2008]. Ein Effekt der Phosphorylierung wird in *in vivo* mit einem Wechsel des Myosins aus einer gefalteten Konfiguration, in der die Schwanzregion auf die Motordomäne zurückfaltet und einer gestreckten, phosphorylierten Konfiguration, die in der Filamentbildung partizipieren kann, in Verbindung gebracht [CONTI *et al.* 2008]. Dephosphorylierung resultiert in einer verminderten Kontraktilität und wird durch eine einzige Klasse von Myosin Phosphatasen (MYPT) katalysiert, die ihrerseits beispielsweise von Rho-Kinase reguliert wird [CONTI und ADELSTEIN 2008].

Nichtmuskuläre Myosine partizipieren während der Embryonalentwicklung und im adulten Organismus an Prozessen der zellulären Umgestaltung und Bewegung [CONTI *et al.* 2008, VICENTE-MANZANARES *et al.* 2009]. Die Fähigkeiten der Aktin-Vernetzung und Kontraktilität sowie die Eigenschaft der Filamentbildung werden zur Regulation des Aktin-Zytoskeletts eingesetzt. Die strukturellen und kontraktile Eigenschaften werden bei zellulären Prozessen, die die Generierung und Erhaltung der kortikalen Spannung, einer Schlüsselkomponente der gerichteten Zellmotilität, erfordern, benötigt [ROSENFELD *et al.* 2003, VICENTE-MANZANARES *et al.* 2009]. Beispiele sind Zelladhäsion, Zellpolarität und Zellteilung [GOLOMB *et al.* 2004, VICENTE-MANZANARES *et al.* 2009]. Die Beteiligung an Prozessen der Zellmigration wird durch die Fähigkeit zur Aktin-Vernetzung in Kombination mit kontraktile Eigenschaften verwirklicht [CONTI und ADELSTEIN 2008]. Obwohl alle Isoformen der nichtmuskulären Myosine viele biochemischen und strukturellen Eigenschaften teilen, weisen sie in Säugetieren sowohl überlappende als auch spezifische Charakteristika auf [CONTI *et al.* 2008, VICENTE-MANZANARES *et al.* 2009]. Einige Zelltypen exprimieren solitär eine Isoform; die meisten mehr als eine, inklusive Transkriptvarianten, die durch alternatives *splicing* entstanden sind [CONTI *et al.* 2008].

Während nichtmuskuläres Myosin-2A in nahezu allen Geweben ubiquitär exprimiert wird, ist die Verteilung von NMHC-2B stärker limitiert. NMHC-2B stellt $\approx 70\%$ des Gesamtgehaltes an Myosin-2 im Zentralnervensystem und 100% des nichtmuskulären Myosins in kardialen Gewebe dar [ROSENFELD *et al.* 2003]. Das Expressionsmuster von *MYH14* unterscheidet sich von *MYH9* und *MYH10*: Humane fetale Gewebe zeigen im Gegensatz zu adultem Gewebe wenig oder keine *MYH14*-Expression. Die Expression in humanem, differenziertem Gewebe lieferte die höchste Expression im Skelettmuskel. Ein niedriges Expressionsniveau wurde in Organen nachgewiesen, die

hauptsächlich aus glattmuskulärem Myosin bestehen. Im Kontrast werden die Isoformen -2A und -2B stark in diesen Organen exprimiert [GOLOMB *et al.* 2004]. Im Gegensatz zu den zellulären Funktionen der Isoformen-2A und -2B ist wenig über die zellulären Eigenschaften von -2C und dessen *splice*-Varianten bekannt. Die 2C1-inserierte Transkriptvariante ist für die Zytokinese in einer pneumonalen Tumor-Zelllinie essentiell, während die Expression der 2C2-inserierten Isoform auf das neuronale Gewebe limitiert ist [JANA *et al.* 2006, 2009].

1.2.2 Myosin-6

Myosin-6 ist ein unkonventionelles Myosin, dessen Charakteristikum eine retrograde Bewegungsrichtung zum Minus-Ende eines polarisierten Aktin-Filaments ist [WELLS *et al.* 1999]. Diese funktionale Spezialisierung führt zwangsweise zur strukturellen Differenzierung.

MÉNÉTREY *et al.* konnten 2005 die Kristallstruktur eines porcinen Myosin-6-Konstruktes im nukleotidfreien Zustand aufklären. Die Struktur zeigt im Bereich der Motordomäne wenig Unterschiede im Vergleich zu Strukturen von Myosinen, die durch eine anterograde Bewegungsrichtung zum Plus-Ende eines Aktin-Filaments gekennzeichnet sind.

Abweichend vom allgemeinen Aufbau weist Myosin-6 zwei Insertionen im Bereich der N-terminalen Motordomäne auf: Insertion 1 hat die Länge von 22 Aminosäuren, ist in der Nähe der Nukleotidbindungstasche lokalisiert und kontrolliert die Nukleotidbinde-Kinetik [ROBERTS *et al.* 2004, SPUDICH und SIVARAMAKRISHNAN 2010]. Insertion 2, auch als *unique* Insertion bezeichnet, weist eine Länge von 53 Aminosäuren auf und ist zwischen dem Konverter der Motordomäne und der Nackenregion lokalisiert [WELLS *et al.* 1999]. Distal von Insertion 2 befindet sich die Nackendomäne, die ein IQ-Motiv aufweist. Sowohl das IQ-Motiv als auch Insertion 2 binden Calmodulin als leichte Kette, obwohl die Aminosäuresequenz der *unique* Insertion kein bisher bekanntes IQ-Calmodulin-Bindungsmotiv darstellt [BAHLOUL *et al.* 2004].

Die Kristallstruktur zeigt, dass sich der N-Terminus der *unique* Insertion um den Konverter wickelt und strukturell einen integralen Teil des Konverters formt [MÉNÉTREY *et al.* 2005, SPUDICH und SIVARAMAKRISHNAN 2010]. Die Anordnung der Insertion 2 ist für die Richtungsumkehr des effektiven Hebelarms und somit für die Bewegungsrichtung des Myosins zum Minus-Ende des Aktin-Filaments verantwortlich [SPUDICH und SIVARAMAKRISHNAN 2010, WELLS *et al.* 1999]. Durch Insertion 2 wird der Hebelarm im Verhältnis um 120-180° im Vergleich zum Konverter orientiert [BRYANT *et al.* 2007]. Das gebundene Calmodulin stellt eine strukturelle Einheit dar, welche die entgegengesetzte Orientierung des Hebelarms stabilisiert.

Die Schwanzregion wird funktional in drei Bereiche unterteilt: einen proximalen, einen medialen und einen globulären distalen Teil [SPUDICH und SIVARAMAKRISHNAN 2010]. Der globuläre Bereich ist in die Bindung von Cargo-Molekülen, beispielsweise Membranrezeptor-Bindungsproteine, involviert [ROBERTS *et al.* 2004]. Der mediale Teil formt eine stabile α -Helix und lässt Myosin-6 als Monomer vorliegen [KNIGHT *et al.* 2005]. Myosin-Monomere nehmen im Zytoplasma eine gefaltete Konformation ein, in welcher der distale Teil der Schwanzregion mit der Motordomäne, möglicherweise auch mit dem Hebelarm wechselwirkt. Eine potentiell regulatorische Funktion dieser Konformation wird diskutiert [SPUDICH und SIVARAMAKRISHNAN 2010].

Myosin-6 wird ubiquitär in höheren Eukaryoten exprimiert [SELLERS 2000]. In *Mammalia* weist das unkonventionelle Myosin zwei variable Insertionen in der Schwanzregion auf und liegt in vier unterschiedlichen Transkriptvarianten vor. Diese Isoformen sind *splice*-Varianten eines Gens und weisen ein spezifisches Expressions- und Funktionsmuster auf: Isoformen mit einer langen Insertion (31 Aminosäuren) werden in polarisierten Zellen produziert, während Isoformen ohne oder einem kurzen (9 Aminosäuren) Insert in nichtpolarisierten Zelltypen produziert werden [BUSS *et al.* 2001, ROBERTS *et al.* 2004]. Experimente mit humanen Zelllinien weisen zudem darauf hin, dass ein Zelltyp sein Expressionsmuster verändern kann [ROBERTS *et al.* 2004].

Im zellulären Kontext weisen Aktin-Filamente mit ihren Plus-Ende in Richtung von Membranen [CRAMER 1999]. Aus der Polarität der Aktin-Filamente folgt, dass sich Myosin-6 von der Plasmamembran in Richtung des Zentrums der Zelle bewegt und sich von der Oberfläche intrazellulärer Organellen entfernt [ROBERTS *et al.* 2004]. Die Bewegung zum Minus-Ende von Aktin-Filamenten korreliert mit der Teilnahme des Myosins an zellulären Prozessen wie dem endozytotischen Trans-

port von clathrinumhüllten Vesikeln von der Plasmamembran ins Zellinnere [NACCACHE *et al.* 2006].

Zudem ist Myosin-6 an zellulären Prozessen wie der dynamischen Ausbildung von Membranfalten (*membrane ruffles*) an der Front des Leitsaumes (*leading edge*) einer Zelle, der Erhaltung der Morphologie des Golgi-Komplexes und der Sekretion beteiligt [BUSS *et al.* 1998, ROBERTS *et al.* 2004]. Myosin-6 wird in *membrane ruffles* an T406 der Kardiomyopathie-Schleife, wahrscheinlich durch PAK3, phosphoryliert [BUSS *et al.* 1998]. Diese Aminosäure ist Bestandteil des TEDS-Motiv, Threonin (T), Glutaminsäure (E), Asparaginsäure (D) und Serin (S), das phosphorylierungssensitiv ist [BEMENT und MOOSEKER 1995]. Der Effekt dieser Phosphorylierung wird kontrovers diskutiert: Während YOSHIMURA *et al.* [2001] auf der Grundlage von *in vitro*-Motilitätsassays postulieren, dass die Phosphorylierung der TEDS-site als ein An/AUS-Schalter für die Motilität fungiert, zeigten MORRIS *et al.* [2003], dass die Phosphorylierung keinen Effekt auf die *in vitro*-Gleitbewegung und die maximale *steady-state* ATPase-Aktivität von Myosin-6 hat. Für Myosin-1E wurde eine erhöhte Kopplungseffizienz zwischen der Nukleotid- und der Aktinbindungsregion sowie eine beschleunigte *in vitro*-Motilität durch die Phosphorylierung des TEDS-Motivs der schweren Kette beschrieben [DÜRRWANG *et al.* 2006].

Im Nukleus kolokalisiert Myosin-6 mit der RNA-Polymerase II und dem naszierenden Transkript [VREUGDE *et al.* 2006]. Von idiopathischer Bedeutung ist die Teilnahme des unkonventionellen Myosins beim Transport von CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) und der Metastasierung bei Prostata-Krebserkrankungen [DUNN *et al.* 2006, ROBERTS *et al.* 2004, YOSHIDA *et al.* 2004].

In *Mammalia* ist *MYO6* essenziell für die Pathologie des Innenohrs: In der murinen und fetalen humanen Cochlea wird *MYO6* in den sensorischen Haarzellen exprimiert [AVRAHAM *et al.* 1997, 1995]. Dort ist das Myosin in den Hörprozess sowie die Entwicklung und Erhaltung der strukturellen Integrität der Stereozilien involviert [AVRAHAM *et al.* 1995, SELF *et al.* 1999].

Ein Defekt des *MYO6*-Genes ist mit dem murinen *Snell's waltzer* Phänotyp korreliert [AVRAHAM *et al.* 1995]. Von klinischer Relevanz sind Missense-Mutationen im humanen *MYO6*-Gen, die mit verschiedenen Ausprägungen der auditorischen Dysfunktion, wie der autosomal-dominanten nicht-syndromischen sensorineuralen Gehörschädigung DFNA22 assoziiert sind [MELCHIONDA *et al.* 2001].

1.2.3 Myosin-7

Myosine der Klasse-7 weisen im Tierreich ein weites Expressionsmuster in einer Vielzahl von Geweben und Organismen auf. Vertebraten und manche Invertebraten produzieren zwei Myosine der Klasse-7, Myosin-7a und -7b [EL-AMRAOUI *et al.* 2008].

Die Motordomäne der unkonventionellen Myosine beinhaltet die ATP- und Aktinbindungsregion. *Homology modeling* der Motordomäne von *Drosophila melanogaster* Myosin-7a deutet auf die Anwesenheit einer N-terminalen SH3-like Subdomäne mit einer Größe von ≈ 56 Aminosäuren hin [KIEHART *et al.* 2004]. Diese Domäne konnte auch in allen anderen Myosinen der Klasse-7 identifiziert werden [EL-AMRAOUI *et al.* 2008]. Die Nackenregion weist 5 IQ-Motive auf, die teilweise stark von der Konsensussequenz abweichen [UDOVICHENKO *et al.* 2002]. An diese IQ-Motive bindet Calmodulin als leichte Kette [EL-AMRAOUI *et al.* 2008, UDOVICHENKO *et al.* 2002, WEIL *et al.* 1996]. An die Nackenregion schließt sich eine lange, domänenreiche Schwanzregion an. Auf eine kurze, ≈ 70 Aminosäuren umfassende SAH-Domäne, die nicht in Myosin-7b von Vertebraten und *C.elegans* Myosin-7 präsent ist, folgen zwei großen Wiederholungen (*repeats*) mit einer Länge von je ungefähr 460 Aminosäuren [EL-AMRAOUI *et al.* 2008, KNIGHT *et al.* 2005, UDOVICHENKO *et al.* 2002]. Diese *repeats* bestehen jeweils aus einer MyTH4 (*myosin tail homology 4*)- und einer FERM (*band 4.1, ezrin, radixin, moesin*)-Domäne, die voneinander durch eine SH3 (*src homology 3*)-Domäne separiert werden [EL-AMRAOUI *et al.* 2008].

Die Schwanzregion des unkonventionellen Myosins dient als Bindungsstelle für zelluläre *target*-Proteine. Beispielsweise bindet die Typ1 regulatorische Untereinheit der Protein Kinase A an die FERM-Domäne des Myosins; die Funktion und die Regulation des Myosins durch diese Interaktion sind unbekannt [KÜSSEL-ANDERMANN *et al.* 2000a]. Die FERM-Domäne ist in der Verankerung von Adhäsionsverbindungen (*adherend junctions*) durch einen Cadherin-Catenin-

Komplex involviert [KÜSSEL-ANDERMANN *et al.* 2000b]. Die Schwanzregion des Myosins-7a weist eine Affinität für das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2B auf; dies führt zu der Spekulation einer Interaktion zwischen Myosin-7a und dem Mikrotubuli-basierten Mobilitätssystem [INOUE und IKEBE 2003, TODOROV *et al.* 2001]. EL-AMRAOUI *et al.* beschreiben die Bindung von Myosin-7a an *Myosin-7a-interacting protein* sowie *Rab27-interacting Protein*. Dieser ternäre Komplex assoziiert *via* Rab27A mit Melanosomen und spielt eine Rolle im Melanosomen-Transport [EL-AMRAOUI *et al.* 2002].

Für Myosin-7a wird die Formation einer doppelköpfigen Struktur kontrovers diskutiert. Elektronenmikroskopische Studien an isolierten Myosin-7a Molekülen weisen auf eine monomere Struktur des Myosins hin [YANG *et al.* 2009]. Die Ausbildung einer stabilen α -Helix verhindert die Dimerisierung des Motors [KNIGHT *et al.* 2005, PECKHAM und KNIGHT 2009, YANG *et al.* 2009]. Im zellulären Kontext ist die Formation einer doppelköpfigen Struktur, durch die Beteiligung von Domänen der Schwanzregion sowie die Bindung von Adapter-Proteinen wahrscheinlich [INOUE und IKEBE 2003, PECKHAM und KNIGHT 2009].

Myosin-7a wird in *Mammalia* in einer Vielzahl von Geweben und Organen beispielsweise Gehirn, Darm, Leber und Niere exprimiert [INOUE und IKEBE 2003]. Von pathologischer Bedeutung ist die Präsenz des Myosins-7a in den Haarzellen des Innenohrs sowie im Epithelium und den Photorezeptorzellen der Retina [HASSON *et al.* 1995, LIU *et al.* 1997].

Während der Embryonalentwicklung des Innenohrs und der Retina wird Myosin-7a in der Cochlea und im vestibulären Neuroepithel sowie im Pigmentepithel und in den Photorezeptorzellen der Retina exprimiert [EL-AMRAOUI *et al.* 2008, WEIL *et al.* 1996]. Im retinalen Pigmentepithel (RPE) transportiert Myosin-7a Melanosomen und Phagosomen [EL-AMRAOUI *et al.* 2008, LIU *et al.* 1999]. In den Photorezeptorzellen der Retina ist das Myosin aktiv am Opsin-Transport durch das Zilium sowie der Phagozytose von Zelldebris, die bei der Verschörfung von Außensegmenten der Photorezeptoren entstehen, beteiligt [EL-AMRAOUI *et al.* 2008, EL-AMRAOUI und PETIT 2005, JAIJO *et al.* 2007, LIU *et al.* 1999, UDOVICHENKO *et al.* 2002].

Im Innenohr ist Myosin-7a in die Differenzierung und Organisation der Stereozilien der Haarzellen [ADATO *et al.* 2005, HASSON *et al.* 1997, JAIJO *et al.* 2007], der Signaltransduktion in den Haarzellen, dem Rezeptortransport sowie dem Transport von verschiedenen *Usher Syndrom Proteinen* involviert [EL-AMRAOUI *et al.* 2008, UDOVICHENKO *et al.* 2002].

Defekte in *MYO7A* verursachen phänotypische Anomalien in *Drosophila*, Zebrafish, Maus und Menschen. Bis heute sind mehr als 100 Mutationen im *MYO7A*-Gen beschrieben. Die hohe Diversität der Mutationen, welche über das gesamte Gen verstreut sind, liefern keinen Hinweis auf einen *hot spot* [EL-AMRAOUI *et al.* 2008, JAIJO *et al.* 2007].

Die Untersuchung von Tiermodellen weist auf verschiedene Funktionen von *MYO7A* hin: Myosin-7a-defiziente *shaker-1*-Mäuse zeigen eine abnormale Akkumulation von Opsin im Verbindungszilium der Photorezeptoren und eine reduzierte Membranerneuerung der Sehscheibchen. Dies wird als Hinweis darauf gewertet, dass Myosin-7a eine wichtige Rolle beim Transport des Opsins vom Innensegment zu den Sehscheibchen im Außensegment zukommt. Dies korreliert mit der Lokalisation des Myosins-7a im Bereich des Verbindungsziliums, der Transportroute für alle Proteine vom Innen- zum Außensegment. Sowohl Zebrafische (*mariner*) als auch Mäuse (*shaker-1*) mit *MYO7A*-Mutationen zeigen eine gestörte Motilität von Melanosomen im retinalen Pigmentepithel. Darüber hinaus ist die Phagozytosefunktion der RPE-Zellen, die von essenzieller Bedeutung für die kontinuierliche Erneuerung der Photorezeptoraußensegmente ist, gestört [BOLZ 2009].

Im Menschen führen *loss-of-function* Mutationen in *MYO7A*-Gen zur häufigsten genetischen Form des Usher-Syndroms-Typ1 (USH1B), welches durch eine schwerwiegende kongenitale sensorineurale Taubheit, vestibuläre Dysfunktion und Retinitis Pigmentosa gekennzeichnet ist [EL-AMRAOUI *et al.* 2008, WEIL *et al.* 1996]. Usher-Syndrom ist die häufigste Ursache von Taubheit beim Menschen [WEIL *et al.* 1996]. Die Prävalenz des Usher-Syndroms beträgt 3,8-6,2:100 000 [JAIJO *et al.* 2007]; *MYO7A*-Mutationen sind für 30-50% der USH1-Fälle verantwortlich [BOLZ 2009]. Neben den beschriebenen USH1-Defekten verursachen Mutationen im *MYO7A*-Gen des Menschen die autosomal dominante, nicht-syndromale sensorineurale Gehörschädigung (DFNA11), die autosomal rezessive Taubheit (DFNB2) als auch untypische Formen des Usher-Syndroms, die klinische

ähnlich dem USH3 sind [EL-AMRAOUI *et al.* 2008, INOUE und IKEBE 2003, JAIJO *et al.* 2007]. Im Kontrast zu Myosin-7a sind keine abnormalen Phänotypen mit Mutationen im Myosin-7b-Gen assoziiert [EL-AMRAOUI *et al.* 2008].

1.3 Strukturelle Eigenschaften der Myosin-Motordomäne

Trotz ihrer funktionalen Diversität weisen Myosine verschiedener Klassen eine hohe sequenzielle Konserviertheit im Bereich der Motordomäne auf [BERG *et al.* 2001]. Starke Konserviertheit besteht in Bereichen der ATP-Bindungsstelle und den Strukturelementen Schalter-1, Schalter-2 und P-Schleife [EL-MEZGUELDI und BAGSHAW 2008]. Sequenzielle Variabilität in der Primärsequenz besteht in den Bereichen der Oberflächenschleifen und Termini [EL-MEZGUELDI und BAGSHAW 2008, SELLERS 2000].

Sequenzielle- und damit strukturelle Veränderungen stellen eine Anpassung des Myosins an seine spezifische Funktion dar. Röntgenkristallographische Studien an Myosinen der Klassen-1 [KOLLMAR *et al.* 2002], -2 [z.B. DOMINGUEZ *et al.* 1998, RAYMENT *et al.* 1993, REUBOLD *et al.* 2003], -5 [z.B. COUREUX *et al.* 2003] und -6 [z.B. MÉNÉTREY *et al.* 2005] unter Verwendung verschiedener Nukleotid-Analoga geben einen Einblick in die Korrelation zwischen strukturellen und biochemischen Intermediaten während des Myosin ATPase-Zyklus.

Abbildung 1.3 zeigt die dreidimensionale Struktur von *Gg* Myosin-2 sowie eine schematische Übersicht der Domänenorganisation innerhalb der Motordomäne.

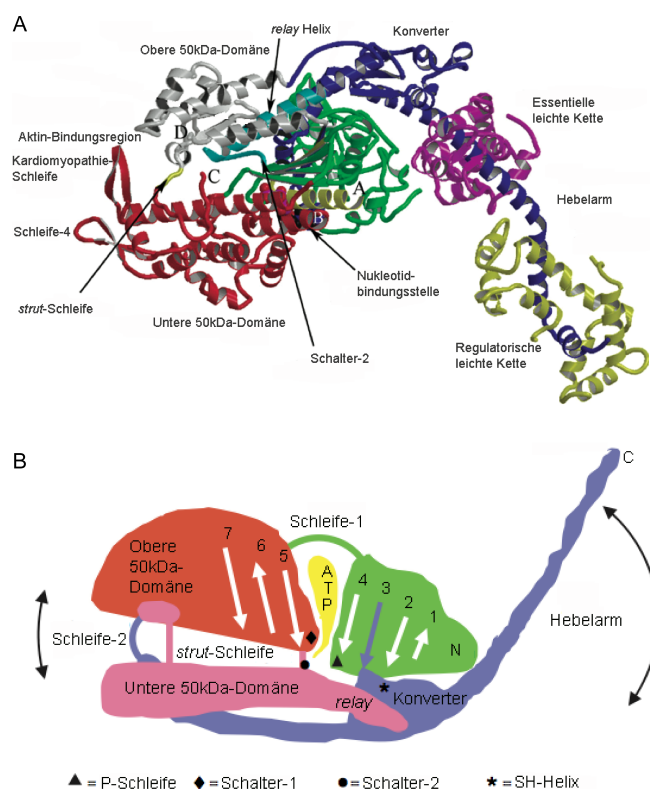


Abbildung 1.3: A: *Post-rigor* Struktur der Myosin-Motordomäne. Der N-Terminus ist in grün und die P-Schleife in gelb dargestellt. Die obere 50 kDa-Domäne ist in rot, die untere 50 kDa-Domäne in grau abgebildet. Schleife-1 befindet sich zwischen den Markierungen A und B, Schleife-2 zwischen C und D. Konverter und Hebelarm sind in blau koloriert [HOLMES 2008]. Abbildung verändert nach [HOLMES 2008]. B: Schematische Darstellung der dreidimensionalen Struktur der Myosin-Motordomäne. Die 20 kDa-Subdomäne ist in grün, die obere 50 kDa-Domäne und die untere 50 kDa-Domäne sind in rot respektive rosa dargestellt. Die blaue 20 kDa-Domäne geht in den Hebelarm über. Die leichten Ketten sind zur Vereinfachung nicht mit dargestellt. Abbildung verändert nach [EL-MEZGUELDI und BAGSHAW 2008].

Skelettmuskelmyosin S1-Subfragment ist ein asymmetrisches Molekül, bestehend aus einer globulären katalytischen Motordomäne, die die ATP- und Aktinbindungsregionen aufweist und einer α -helikalen Nackenregion, die der Verbindung der Motordomäne mit der Schwanzregion dient. An die α -helikale regulatorische Domäne assoziieren die ELC und die RLC [RUPPEL und SPUDICH 1996].

Skelettmuskelmyosin-S1 wird traditionell in mehrere Domänen unterteilt: diese Unterteilung ist auf den proteolytischen Verdau der Oberflächenschleifen, die diese Domänen verbinden, zurückzuführen. Der tryptische Verdau fragmentiert die Motordomäne in die aminoterminalen 25 kDa-Domäne (grün, Abbildung 1.3,B), das zentrale 50 kDa-Segment (rot und rosa, Abbildung 1.3,B) und die carboxyterminale 20 kDa-Domäne (auch als Konverter bezeichnet, blau in Abbildung 1.3,B) [BÁLINT *et al.* 1978, MORNET *et al.* 1979]. Weiterhin kann die zentrale 50 kDa-Domäne in eine obere 50 kDa-Domäne (rot, Abbildung 1.3,B) und eine untere 50 kDa-Domäne (rosa, Abbildung 1.3,B) separiert werden. Die atomare Struktur des skelettmuskulären S1-Subfragmentes des Haushuhnes zeigt, dass die Domänen keine funktionalen Untereinheiten darstellen sondern durch proteolyseempfindliche Schleifen miteinander verbunden sind [RAYMENT *et al.* 1993].

Die proteolytische Spaltung von S1 inhibiert die Aktin-aktivierte ATPase-Aktivität und erniedrigt die Affinität von S1 für Aktin [MORNET *et al.* 1979, MURPHY und SPUDICH 2000, YAMAMOTO und SEKINE 1979]. Die 25/50 kDa- und 50/20 kDa-Spaltstellen können durch die Zugabe von ATP und Aktin geschützt werden und sind in räumlicher Nähe der ATP-Bindungsstelle und der Aktinbindungsregion lokalisiert [MORNET *et al.* 1979, MURPHY und SPUDICH 2000]. Verbindungen der 25/50 kDa- und der 50/20 kDa-Domäne sind die flexiblen Oberflächenschleifen Schleife-1 und Schleife-2.

Biochemische Studien an glattmuskulärem Myosin mit Sequenzvariationen in der flexiblen Oberflächenschleife-1 zeigen eine Modulation der ATPase-Aktivität, der *in vitro* Motilität und der Nukleotidkinetik [HOLMES 2008, ROVNER *et al.* 1997, SWEENEY *et al.* 1998, VOLKMANN und HANEIN 2000]. Sequenz und Länge von Schleife-1 haben direkten Einfluss auf die Rate der ADP-Dissoziation [ROVNER *et al.* 1997, SWEENEY *et al.* 1998, VOLKMANN und HANEIN 2000].

Schleife-2 ist an der elektrostatischen Interaktion mit dem negativ geladenen N-Terminus von Aktin beteiligt [VOLKMANN und HANEIN 2000]. Beides, Länge und Ladungsverteilung der Schleife-2-Region, bestimmen die Aktin-Affinität und die Aktin-aktivierte ATPase-Aktivität [FURCH *et al.* 1998, 2000, VOLKMANN und HANEIN 2000].

Die Kernstruktur der Myosin-Motordomäne ist ein zentrales siebensträngiges β -Faltblatt, das anteilig aus allen drei Fragmenten (25 kDa, 50 kDa und 20 kDa) zusammengesetzt ist [HOLMES 2008]. Zahlreiche α -Helices umgeben die Kernstruktur und bilden einen tiefen Spalt aus, der von der Nukleotid- zur Aktinbindungsregion reicht [GEEVES und HOLMES 1999]. Dieser Spalt separiert die 50 kDa-Domäne in die obere- und untere Subdomäne, die beide in die Aktinbindung involviert sind [HOLMES 2008]. Der C-Terminus der Motordomäne formt eine prolongierte α -Helix, die die Nackenregion, die zwei leichte Ketten oder Calmodulin bindet [GEEVES und HOLMES 1999]. Der N-Terminus liegt in räumlicher Nähe zum proximalen Teil der Schwanzregion [GEEVES und HOLMES 1999]. Die ersten 80 Residien formen eine hervorstehende SH3-like β -Fassstruktur unbekannter Funktion, die in allen Myosinen der Klasse-2 präsent ist [HOLMES 2008]. Die Deletion dieser 80 Residien führt zu einem kompletten Funktionsverlust des Myosins [FUJITA-BECKER *et al.* 2006]. Die Nukleotidbindungsstelle ist zwischen der 25 kDa- und der oberen 50 kDa-Subdomäne, in räumlicher Nähe zum Apex des Spalts lokalisiert. Drei konservierte Schleifenregionen, P (Phosphat-Bindungs)-Schleife, Schalter-1 und Schalter-2, sind die Hauptkomponenten des aktiven Zentrums und teilen strukturelle und funktionale Homologie mit dem Schleifenstrukturen anderer ATPasen und GTPasen wie Kinesinen und G-Proteinen [SMITH und RAYMENT 1996, VALE 1996, VOLKMANN und HANEIN 2000]. Die konservierten Sequenzmotive Schalter-1 und Schalter-2 in der Nukleotid-Bindungstasche verhalten sich als γ -Phosphat-Sensoren und spielen eine entscheidende Rolle im Mechanismus der Kraft- und Bewegungserzeugung [MANSTEIN 2004]. Der Übergang von Schalter-1 und Schalter-2 zwischen einer geschlossenen und offenen Konformation ist nukleotidabhängig und mit intramolekularen Bewegungen verbunden. Mechanisch ist der Übergang einer offenen zu einer geschlossenen Schalter-2-Region mit der Bewegung des Hebelarms aus einer initial gestreckten Position in eine gebeugte Position assoziiert [MANSTEIN 2004].

Die Nukleotid-Bindungsstelle ist ≈ 4 nm von der Aktinbindungsregion entfernt [SPUDICH 2001].

Die Kommunikation der Bindungsregionen erfolgt durch die relative Bewegung von Schalter-1 und Schalter-2, die sich je nach Nukleotidzustand relativ zueinander bewegen. Diese Bewegung wird von β -Faltblättern des zentralen 7-strängigen β -Faltblattes auf die Aktinbindungsregionen der oberen und unteren 50 kDa-Domäne übertragen [MANSTEIN 2004, SPUDICH 2001].

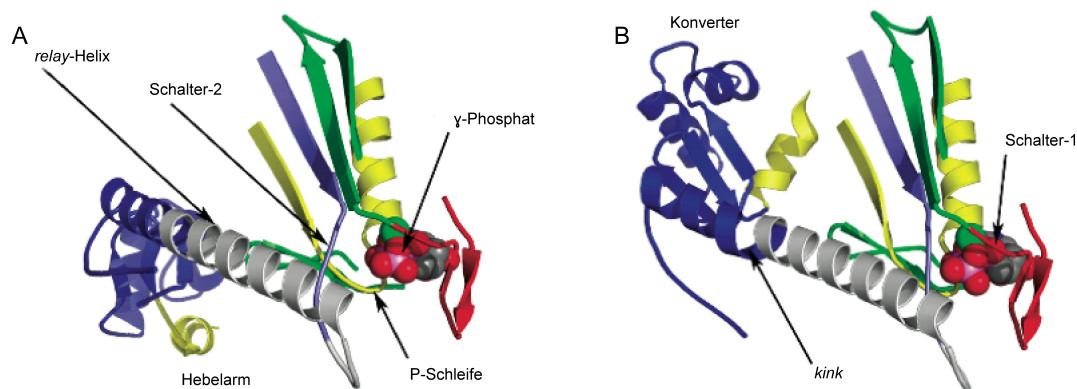


Abbildung 1.4: Nukleotidbindungstasche: Dargestellt sind die P-Schleife, die Schalterelemente-1 und -2, die *relay*-Helix sowie die Konverter-Domäne im *near-rigor*-Zustand (A) und im *pre-powerstroke*-Zustand (B). Abbildung verändert nach [HOLMES 2008].

Die Aktinbindungsregion und die Nukleotidbindungsstelle des Myosins sind auf gegenüberliegenden Seiten des 7-strängigen β -Faltblatts lokalisiert [GEEVES *et al.* 2005]. Zwischen den beiden Zentren befindet sich eine enge Spalte, deren Apex sich an der Basis der Nukleotidbindungsstelle befindet und sich in Richtung Aktinbindungsregion aufweitet [RUPPEL und SPUDICH 1996]. Putative Aktinbindungsregionen sind auf beiden Seiten der Spalte lokalisiert [RUPPEL und SPUDICH 1996]. Im Bereich der primären Aktinbindungsregion ist die positiv geladene Schleife-2 durch elektrostatische Wechselwirkungen an der Interaktion zwischen Myosin und Aktin beteiligt [VOLKMANN und HANEIN 2000]. Weitere Kontakte bestehen zwischen der Kardiomyopathie-Schleife der Myosins und Aktin [COPE *et al.* 1996, VOLKMANN und HANEIN 2000]. YENGO *et al.* schlagen einen Mechanismus vor, in dem die Kardiomyopathie-Schleife in einer Nukleotid-abhängigen Weise mit Aktin interagiert.

Im Bereich der unteren 50 kDa-Domäne besteht durch ein Helix-Schleife-Helix-Motiv eine weitere Kontaktstelle zwischen Myosin und Aktin [COPE *et al.* 1996, VOLKMANN und HANEIN 2000]. *Docking*-Experimente weisen auf eine starke stereospezifische hydrophobe Interaktionen zwischen diesem Sequenzmotiv und Aktin hin [VOLKMANN und HANEIN 2000]. Mutationsstudien zeigen, dass die Einführung einer einzigen positiven Ladung die Aktin-Affinität um den Faktor 5 erhöht [FURCH *et al.* 2000].

Im Bereich der sekundären Aktinbindungsregion ist Schleife-3, auch als sekundäre Aktinbindungsschleife bezeichnet, durch elektrostatische Interaktionen in die Aktinbindung involviert [DIJK *et al.* 1999, VOLKMANN und HANEIN 2000]. Über eine Beteiligung von Schleife-4 an der Aktin-Interaktion wird diskutiert [GEEVES *et al.* 2005].

Der Konverter ist eine flexible Region, die den Hebelarm mit der katalytischen Domäne verbindet und eine Rotation des Hebelarms relativ zur Motordomäne ermöglicht [YENGO *et al.* 2000]. Der Konverter dient als Sockel für die C-terminale α -helikale Nackendomäne, die im Sinne eines Hebelarms die Rotationsbewegungen der Konverterdomäne während der ATP-Hydrolyse amplifiziert [GEEVES und HOLMES 1999]. Die relativen Bewegungen der Schalterelemente-1 und -2 während der ATP-Hydrolyse resultieren in Konformationsänderungen, die an die *relay*-Helix und eine assoziierte rigide Schleife propagiert und auf den Hebelarm übertragen werden [VOLKMANN und HANEIN 2000]. Der Übergang des Schalterelements-2 in den geschlossenen Zustand resultiert in einer Beugung der *relay*-Helix und einer assoziierten Schleife um 24° . Die Translation dieser Bewegung erfolgt durch den Konverter auf den Hebelarm, der dabei um $\approx 70^\circ$ aus seiner Position ausgelenkt wird [GEEVES und HOLMES 1999]. Die *relay*-Helix stellt die Verbindung zwischen dem aktiven Zentrum, dem Konverter und der Aktinbindungsregion her. Sie enthält ein konserviertes

Tryptophan (W512), das sensitiv für die Nukleotidbindung und Hydrolyse ist und als empirisches Verfahren zur Aufklärung des Myosin ATPase-Zyklus genutzt werden kann [YENGO *et al.* 2000]. Der Konverter dient der Verstärkung kleiner Konformationsänderungen des aktiven Zentrums und deren Übertragung auf den Hebelarm. Damit korreliert das Ausmaß des Kraftschlages mit der Länge des Hebelarms [ANSON *et al.* 1996, RUFF *et al.* 2001].

Die meisten Myosine sind durch eine Bewegungsrichtung zum Plus-Ende eines polarisierten Aktin-Filaments gekennzeichnet. WELLS *et al.* [1999] beschreiben, dass Myosin-6 eine retrograde Bewegungsrichtung zum Minus-Ende von filamentösem Aktin aufweist. Strukturelle Basis für die reverse Bewegungsrichtung ist der Konverter des Myosins, der durch eine distale, Calmodulin-bindende *unique* Insertion eine Umlenkung des Hebelarms um bis zu 180° bewirkt [HOLMES 2008, MÉNÉTREY *et al.* 2005].

Der Einfluss des Converters auf die Direktionalität wurde von TSIIVALIARIS *et al.* [2004] durch die Konstruktion eines artifiziellen Motors, der eine Bewegungsrichtung zum Minus-Ende von Aktin-Filamenten aufweist, demonstriert. Die Richtungsumkehr des Klasse-1 Myosins wurde durch die Insertion eines Inverters in den Konverter erzielt, welcher den Hebelarm um 180° rotiert und in einer retrograden Bewegung resultiert [TSIIVALIARIS *et al.* 2004]. Die artifizielle Reorientierung der Direktionalität von Myosin-6 wurde von PARK *et al.* [2007] beschrieben.

1.3.1 Nukleotidbindungstasche

Eine komplexe Kommunikation zwischen der Nukleotidbindungstasche und der Aktinbindungsregion translatiert Konformationsänderungen der Nukleotidbindungstasche in eine mechanische Bewegung des Myosins relativ zu Aktin. Die Positionierung der Schalterelemente-1 und -2 verursacht strukturelle Veränderungen in der Motordomäne, die auf die Aktinbindungsregion amplifiziert werden und das reziproke Verhalten zwischen Aktin- und Nukleotid-Affinität erklären [REUBOLD *et al.* 2003].

Im Folgenden werden detaillierter Veränderungen in der Nukleotidbindungstasche beschrieben, die durch die ATP-Bindung entstehen. Dabei bezieht sich die Nummerierung der Residien auf die Struktur von *Gg* glattmuskulärem Myosin [ONISHI *et al.* 2004]. Die Konformationen der Schaltelemente Schalter-1 und Schalter-2 werden als *o/o* (*open/open*, offen/offen) bezeichnet, wenn die Schalter in der offenen Konformation vorliegen und als *c/c* (*closed/closed*, geschlossen/geschlossen), wenn beide Schalterelemente Kontakt zum Nukleotid haben. Kombinationen der Zustände sind möglich.

Myosin bindet im nukleotidfreien Zustand fest an F-Aktin. Dieser stark aktinbindende Zustand wird auch als Rigor-Zustand bezeichnet und ist strukturell durch eine unbesetzte Nukleotidbindungstasche gekennzeichnet, in der sich Schalter-1 und Schalter-2 in der offenen (*o/o*) Konformation befinden. Es besteht eine Salzbrücke zwischen den Aminosäuren R247 und E470 der beiden Schalter [REUBOLD *et al.* 2003]. Schalter-2 wird über eine Wasserstoffbrückenbindung durch die *relay*-Helix mit dem Konverter und somit dem Hebelarm verknüpft. Der Hebelarm befindet sich in einer gestreckten Konformation [FISHER *et al.* 1995]. Die Bindung von MgATP (Abbildung 1.5, Schritt 1) induziert die Dissoziation des Aktomyosin-Rigorkomplexes (Abbildung 1.5, Schritt 2). Die Bindung von MgATP durch die Interaktion mit der P-Schleife leitet das Schließen von Schalter-1 ein. Das Schließen von Schalter-1 ist mit dem Bruch der Salzbrücke R247/E470 zwischen den Schalterelementen-1 und -2 gekoppelt und definiert den Zustand *c/o* [REUBOLD *et al.* 2003].

Durch das Schließen von Schalter-1 wird das Nukleotid indirekt durch die Wechselwirkung zwischen S246 und Mg²⁺ sowie direkt durch die Koordination des γ -Phosphats durch Ser245 stabilisiert. Die ATP-induzierten Konformationsänderungen der Nukleotidbindungstasche werden durch eine strukturelle Veränderung des zentralen 7-strängigen β -Faltblatts auf die Aminosäuren der oberen und unteren 50 kDa-Domäne übertragen [REUBOLD *et al.* 2003]. Dieser *post-rigor*-Zustand ist strukturell mit einem Öffnen der Aktinbindungsspalte verbunden und resultiert in einer Affinitätsniedrigung des Myosins für Aktin und final der Dissoziation von Aktomyosin [CONIBEAR *et al.* 2003, GOODY 2003, REUBOLD *et al.* 2003]. Schalter-2 schließt sich schrittweise durch eine Bewegung in Richtung des γ -Phosphats; Schleife-1 und Schleife-2 liegen beide in der geschlossenen

Konformation (c/c) vor; MgATP wird vollständig koordiniert [ONISHI *et al.* 2004]. Strukturell ist das Schließen von Schalter-2 mit einer Rotationsbewegung des Konverters um 65° verbunden [KOPPOLE *et al.* 2006]. Als Konsequenz führt der Hebelarm eine als *recovery-stroke* bezeichnete Bewegung aus und schwingt in die Position vor dem Kraftschlag (*pre-powerstroke*-Konformation) zurück.

Der geschlossene Zustand der beiden Schalter-Regionen (c/c) stellt strukturell die katalytisch aktive Konformation dar. In diesem hydrolysekompetenten Übergangszustand ist die Phosphatfreisetzung sterisch gehindert und der Hebelarm befindet sich in der gestreckten Position [REUBOLD *et al.* 2003]. Im Anschluss an die Hebelarmbewegung wird in einem Übergangszustand die Salzbrücke R247/E470 zwischen den Schalterelementen-1 und -2 wieder ausgebildet und stabilisiert den katalytisch aktiven Zustand. Dieser strukturelle Befund wurde durch Mutationsstudien bestätigt: Myosine, bei denen Ausbildung dieser Salzbrücke durch Mutationen inhibiert wird, sind hydrolyseinkompetent [FURCH *et al.* 1999, ONISHI *et al.* 1997].

Das γ -Phosphat des ATPs wird durch die Koordination mit Gly468 der Schalter-2 Region durch eine Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert. Schalter-1 koordiniert über eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Ser245 das γ -Phosphat, während Ser246 Mg^{2+} koordiniert. Diese Koordination bringt das Nukleotid in den hydrolysekompetenten Übergangszustand. Die Hydrolyse führt zu einer Spaltung der Phosphoanhydridbindung zwischen dem β - und γ -Phosphat des ATPs und simultan zu einer Schwächung des c/c-Zustands (Abbildung 1.5, Schritt 3) [REUBOLD *et al.* 2003].

Myosin hydrolysiert das Substrat ATP zu ADP und P_i , wobei die Hydrolyseprodukte mit dem Myosin assoziiert bleiben (*pre-powerstroke*-Zustand). Der metastabile Komplex weist eine Affinität für Aktin auf und bindet F-Aktin erst schwach, dann stark (Abbildung 1.5, Schritt 4). Die Aktinbindung des ternären Komplexes geht mit einer Konformationsänderung der Aktinbindungsregion einher, die eine Öffnung von Schalter-1 induziert und die Konformation der Schalter in den o/c-Zustand überführt [KOPPOLE *et al.* 2006, REUBOLD *et al.* 2003]. Diese Konformation ist strukturell mit dem Bruch der Salzbrücke zwischen den Aminosäuren R247 und E470 verbunden und beschleunigt die P_i -Freisetzung durch die Ausbildung eines Kanals, durch den P_i schnell dissoziieren kann [REUBOLD *et al.* 2003]. Die Aktinbindung beschleunigt die Freisetzung des γ -Phosphats mehr als 100fach [NYITRAI und GEEVES 2004]. Die P_i -Dissoziation führt zum Bruch der Wasserstoffbrückenbindung zwischen Gly468 und dem γ -Phosphat; Schalter-2 bewegt sich in die offene Konformation [REUBOLD *et al.* 2003]. Diese Konformationsänderung ist mechanisch mit dem Kraftschlag des Hebelarms verbunden (Abbildung 1.5, Schritt 5). Der Kraftschlag des Hebelarms führt zu einer Parallelverschiebung von Myosin und Aktin. Im Bereich der Nukleotidbindungstasche führt die Konformationsänderung zu einem Zustand, in dem Mg^{2+} -ADP schwach gebunden ist. Die Öffnung von Schalter-2 wird von der ADP-Dissoziation begleitet und überführt das Myosin in den nukleotidfreien Rigor-Zustand, in dem die Schalter in der o/o-Konformation vorliegen (Abbildung 1.5, Schritt 6) [REUBOLD *et al.* 2003].

1.3.2 Mg^{2+} -Regulation

Strukturelle [COUREUX *et al.* 2004, REUBOLD *et al.* 2003] und kinetische Studien [HANNEMANN *et al.* 2005, ROSENFELD *et al.* 2005, TAFT *et al.* 2008] des Myosin-5 ATPase-Zyklus weisen darauf hin, dass die Freisetzung des Mg^{2+} der ADP-Dissoziation vorausgeht. Dieser Mechanismus führt zu einer modulierten Kinetik des Myosins in Abhängigkeit der freien Magnesiumionenkonzentration [SELLERS und WEISMAN 2008]. Die Modulation der ADP-Dissoziationskinetik und *in vitro* Motilität durch Schwankungen der physiologischen Mg^{2+} -Konzentration wurde auch für Myosine der Klasse-1, *Dictyostelium discoideum* Myosin-1D und -1E, beschrieben [DÜRRWANG *et al.* 2006, FUJITA-BECKER *et al.* 2005].

REUBOLD *et al.* schlagen ein strukturelles Modell für die Magnesiumsensitivität des Myosins vor: Die Aktinbindung an Myosin resultiert in einer Bewegung von Schalter-1, welche die Phosphatfreisetzung induziert und im Umkehrschluss die Magnesium $^{2+}$ -Affinität erniedrigt. Die Freisetzung von Mg^{2+} verursacht eine verminderte ADP-Affinität und schließlich die Freisetzung des Nukleotids. Kinetische Studien an Myosin-5 bestätigen, dass die ATP-Hydrolyseprodukte

in der Reihenfolge Phosphat-Mg²⁺-ADP freigesetzt werden. Jeder Dissoziationsschritt induziert einen graduellen Anstieg der Aktin-Affinität [GEEVES *et al.* 1984, ROSENFELD *et al.* 2005]. Strukturelle Studien an Myosin-5 im *rigor-like*-Zustand sowie Strukturen, in den ADP gebunden ist, Mg²⁺ aber nicht vorhanden ist, unterstützen die Hypothese der sukzessiven Produktfreisetzung. Die Mg²⁺-Dissoziation destabilisiert und rearrangiert die Strukturelemente P-Schleife, Schalter-1 und Schalter-2. Dies erniedrigt die ADP-Affinität des Motors durch den Übergang des Myosins aus dem stark in den schwach ADP-bindenden Zustand [COUREUX *et al.* 2004, REUBOLD *et al.* 2003, ROSENFELD *et al.* 2005]. Dieses Verhalten steht in Analogie zu dem Mechanismus der G-Proteine, die durch eine strikte Regulation der Nukleotid-Hydrolyse und der Produkt-Dissoziation gekennzeichnet sind [VALE 1996]. Im Falle des Myosins verhält sich F-Aktin wie ein Nukleotid-Austauschfaktor für ADP [WHITE *et al.* 1997].

Glattmuskuläres Myosin-2, nichtmuskuläres Myosin-2B und Myosin-6 folgen einem ähnlichen kinetischen Schema wie Myosin-5 und stellen somit Kandidaten für einen magnesiumsensitiven Regulationsmechanismus dar. Dieses Schema ist durch eine lastenabhängige (*strain dependent*) ADP-Dissoziation, die mit einer zusätzlichen Bewegung des Hebelarms assoziiert ist, charakterisiert. Für Myosin-5 und Myosin-6 wird spekuliert, dass ansteigende Konzentrationen an freien Magnesiumionen die *steady-state* ATPase-Aktivität durch eine Verlangsamung des ratenlimitierenden ADP-Dissoziationsschritts erniedrigt. Die maximale *in vitro* Gleitgeschwindigkeit aller Myosine wird durch die ADP-Dissoziation determiniert und ist somit potentiell magnesiumsensitiv [ROSENFELD *et al.* 2005].

1.3.3 Der Myosin ATPase-Zyklus

Information über den Mechanismus der Kraft- und Bewegungserzeugung von Myosinen an Aktin-Filamenten wurden aus Studien der Motordomäne von muskulärem Myosin-2 abgeleitet [GEEVES und HOLMES 1999, ROBERTS *et al.* 2004]. Die Kristallstrukturen der Myosin-2 Motordomäne in An- und Abwesenheit unterschiedlicher Nukleotid-Analoga liefern die strukturelle Grundlage des Myosin ATPase-Zyklus sowie ein mechanisches Modell der Fortbewegung an Aktin-Filamenten [LYMN und TAYLOR 1971, RAYMENT *et al.* 1993, SCHRÖDER *et al.* 1993]. Das Modell beschreibt einen Mechanismus, in dem kleine Konformationsänderungen in der Myosin-Motordomäne, die aus der ATP-Hydrolyse und der Aktin-Interaktion resultieren, vermittelt durch den Konverter eine Bewegung der Nackenregion verursachen, die im Sinne eines Hebelarms eine Rotationsbewegung ausführt [ANSON *et al.* 1996, UYEDA *et al.* 1996].

Der chemomechanische Mechanismus des ATPase-Zyklus, gekoppelt mit dem mechanischen Modell der Hebelarmbewegung, ist schematisch in Abbildung 1.5 dargestellt. Ein Attribut des Kreislaufs ist die zyklische Wechselwirkung der Myosin-Motordomäne mit F-Aktin und Nukleotiden. Die Bindung an filamentöses Aktin erniedrigt die Affinität des Myosins für die Spaltprodukte der ATP-Hydrolyse. Im Kontrast resultiert die ATP-Bindung in einer Erniedrigung der Aktin-Affinität. Dieses reziproke Verhalten ist Grundlage des Aktomyosin ATPase-Zyklus [REUBOLD *et al.* 2003].

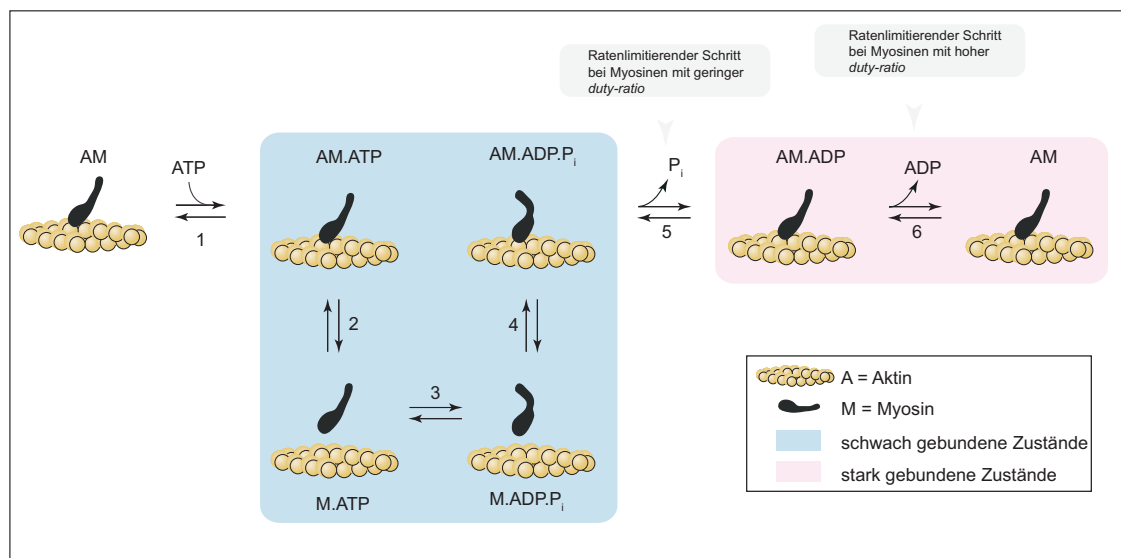


Abbildung 1.5: Der Aktomyosin ATPase-Zyklus. In Abwesenheit von ATP bindet Myosin fest an Aktin. Die ATP-Bindung (1) schwächt die Aktin-Affinität des Myosins und führt zur Dissoziation des Aktomyosin-Komplexes (2). Der ATP-Hydrolyse geht eine Konformationsänderung, der *recovery-stroke*, voraus (3). Die Hydrolyseprodukte bleiben am Myosin gebunden. Der AM·ADP·P_i-Zustand bindet in einem zweistufigen Prozess an Aktin (4). Während der Phosphat-Dissoziation (5) vollzieht der ADP-gebundene Motor einen Übergang vom schwach in den stark aktinbindenden Zustand. Dieser Übergang ist mit einer reversen Konformationsänderung in den *post-powerstroke*-Zustand verbunden, der eine Gleitbewegung des Myosins am Aktin ermöglicht. Myosin bindet fest an Aktin, bis die ADP-Dissoziation erfolgt (6). Der Zyklus beginnt von Neuem mit der ATP-Bindung und der Dissoziation des Aktomyosin-Komplexes. Der Anteil des ATPase-Zyklus, den Myosin stark an Aktin gebunden ist, wird als *duty ratio* bezeichnet. Die Zeit, die ein Myosin in den stark aktinbindenden Zuständen vorliegt bestimmt die Maximalgeschwindigkeit der relativen Bewegung von Myosin entlang von Aktin-Filamenten [CRUZ und OSTAP 2004, SPUDICH und SIVARAMAKRISHNAN 2010]. Bei spannungssensitiven Myosinen der Klassen-1, -5 und -6 ist die Mg²⁺-ADP-Dissoziation mechanisch mit einer weiteren Bewegung des Hebelarms gekoppelt [LISTER *et al.* 2004, VEIGEL *et al.* 1999, 2002]. Abbildung verändert nach [CRUZ und OSTAP 2004].

Der Reaktionsweg des Aktomyosin ATPase-Zyklus ist für alle Myosin-Isoformen konserviert. Die Raten- und Gleichgewichtskonstanten, die den Zyklus determinieren variieren innerhalb der Myosin-Superfamilie und bestimmen die kinetischen Unterschiede, die die mechanischen Funktionen eines Myosins und somit seine spezifische Funktion bestimmen [CRUZ und OSTAP 2009].

Intermediate dieses Reaktionsweges werden entsprechend ihrer Affinität zu Aktin in zwei Zustände unterteilt. Der M·ATP und M·ADP·P_i-Zustand sind schwach bindende Intermediate, die an Aktin binden und dissoziieren (Schritt 2 und 4) und eine geringe, millimolare Aktin-Affinität aufweisen. Die schwach bindenden Zustände üben keine Spannung aus. Der AM und AM·ADP-Zustand sind stark spannungsgenerierende Intermediate, die stereospezifisch an Aktin-Filamente binden und submikromolare Affinitäten aufweisen. Die stark aktinbindenden Zustände sind kraftgenerierend [CRUZ und OSTAP 2004].

Der Kraftschlag ist mit der Phosphat-Dissoziation und dem Übergang von den schwach zu den stark gebundenen Zuständen assoziiert (Abbildung 1.5, Schritt 5). Durch die Kontrolle dieses *weak to strong*-Übergangs stellt dieser Schritt einen idealen Kontrollpunkt der Interaktion zwischen Myosin und F-Aktin und der Motilität dar. Determinante der mechanischen und motilen Eigenschaften eines Myosins ist die Lebensdauer eines stark bindenden Intermediates (AM und AM·ADP) und die *duty ratio*. Diese Parameter sind myosinspezifisch und tragen zur funktionalen Diversität der Myosine bei [CRUZ und OSTAP 2004].

1.3.4 *Duty ratio*, Prozessivität und Direktionalität

Drei Konzepte, *duty-ratio*, Prozessivität und Direktionalität bestimmen die funktionale Aktivität und determinieren das Aufgabenspektrum eines Myosins.

Die *duty ratio* eines Motors ist definiert als der zeitliche Anteil des Myosin ATPase-Zyklus, den das Myosin in den stark aktinbindenden Zuständen verbringt [HOWARD 1997, O'CONNELL *et al.* 2007]. Myosine mit geringer *duty ratio* verbringen einen großen Zeitanteil in den M·ATP und M·ADP·P_i-Zuständen, wohingegen Myosine mit einer großen *duty-ratio* die AM und AM·ADP-Zustände okkupieren [CRUZ und OSTAP 2004, O'CONNELL *et al.* 2007].

Prozessivität ist eine mechanochemische Eigenschaft eines Myosins und beschreibt die Anzahl von katalytischen Zyklen die ein Motor ausführen kann, bevor er vom Aktin-Filament dissoziiert [O'CONNELL *et al.* 2007]. Prozessives Verhalten wird mit Myosinen assoziiert, deren ATPase-Zyklus eine intrinsisch hohe *duty ratio* aufweist [EL-MEZGUELDI und BAGSHAW 2008]. Dies erlaubt dem Motor in einer koordinierten, schrittartigen Bewegung große Distanzen an filamentösem Aktin durchzuführen, bevor er dissoziiert. Klassische Beispiele für prozessive Motoren sind dimere Myosine der Klassen-5 und -6 [MEHTA *et al.* 1999, SWEENEY *et al.* 2007].

Für ein prozessives Verhalten eines dimeren Myosins ist neben einer hohen *duty ratio* eine strikte Koordination der Motordomänen nötig, damit ein Motor permanent mit Aktin interagiert und die Dissoziation des Myosins verhindert [RIEF *et al.* 2000, VEIGEL *et al.* 2005]. Die Koordination der Motoren wird durch die kinetischen Voraussetzungen einer hohen Aktin-Affinität sowie einer ratenlimitierenden ADP-Dissoziation in Kombination mit einer hohen *duty ratio* realisiert [MEHTA *et al.* 1999, WALKER *et al.* 2000].

Nicht-prozessive Motoren weisen eine einzige zyklische Interaktion mit Aktin auf bevor sie dissoziieren und sind durch eine kurze *duty ratio*, die zu schnellen Bewegungsvorgängen an Aktin-Filamenten beiträgt, gekennzeichnet. Ein klassisches Beispiel für ein nicht-prozessives Myosin ist sarkomeres Myosin-2. Einzelköpfige Motoren weisen wahrscheinlich kein prozessives Verhalten auf, da ein Ablösen von Aktin mit einer Dissoziation verbunden sein könnte, bevor der Motor an eine neue Aktinbindungsstelle binden kann. Möglicherweise umgehen manche Myosine dieses Problem, indem sie eine zweite Aktinbindungsregion aufweisen. Eine zusätzliche Aktinbindungsregion könnte in der Art eines Ankers eine längere, aber unspezifische Bindung an Aktin ermöglichen, während der Motor den ATPase-Zyklus durchläuft [EL-MEZGUELDI und BAGSHAW 2008].

Polarität erzeugt Direktionalität und definiert die Richtung des intrazellulären Transports. Polarisierte Aktin-Filamente weisen mit ihrem Plus-Ende in Richtung von Membranen [CRAMER 1999]; Motoren erkennen die Filamentpolarität und transportieren ihre Frachten retrograd oder antero-grad des Filaments.

Die bis heute charakterisierten Myosine verschiedener Klassen weisen mit Ausnahme von Myosin-6 eine Bewegungsrichtung zum Plus-Ende von polarisierten Aktin-Filamenten auf. Kontrovers wird die Direktionalität von Myosin-9 diskutiert; für ein verkürztes Myosin-9 Konstrukt ist eine Bewegungsrichtung zum Minus-Ende des polaren Aktin-Filaments beschrieben [INOUE *et al.* 2002], während sich natives Myosin-9 zum Plus-Ende bewegt [O'CONNELL und MOOSEKER 2003].

1.4 Enzymatik

Die Kombination aus strukturellen und kinetischen Studien stellt eine leistungsfähige Methode dar, um die Effizienz und Spezifität eines Enzyms zu analysieren. Neben strukturellen Studien trägt die kinetische Betrachtung von Einzelschritten des Myosin ATPase-Zyklus zum Verständnis der enzymatischen Aktivität, dem Reaktionsmechanismus und der Dynamik enzymkatalysierter Reaktionen bei [CLELAND 2009, JOHNSON 2009].

Um die kinetischen Eigenschaften eines Myosins zu charakterisieren, müssen die kinetischen Reaktionen die nach der Substratbindung und vor der Produktfreisetzung im aktiven Zentrum ablaufen, analysiert werden. Die Regulation der enzymatischen Spezifität und Effizienz können durch die Quantifizierung der Ratenkonstanten der Substratbindung, Enzym-Isomerisierung, chemischen Konversion von Substrat zum Produkt und der Produktfreisetzung definiert werden [JOHNSON 2009].

Die Translation der experimentellen kinetischen Eigenschaften auf die *in vivo*-Funktion eines Myosins trägt zum Verständnis des Aufgabenspektrums des Enzyms bei. Neben diesen Aspekten erlaubt sie experimentelle Studien zur gezielten Beeinflussung der enzymatischen Aktivität durch Effektoren des Zielproteins.

Verfahren zur Charakterisierung des kinetischen Zyklus eines Enzyms im Fließgleichgewicht (*steady-state*) können keine Details bezüglich der Konversion von Substrat zu Produkt aufklären. Bei der *steady-state* Kinetik befinden sich das freie Enzym und seine Zwischenzustände im Fließgleichgewicht. Transientenkinetische Methoden erlauben die Messung von elementaren Schritten entlang des Reaktionsweges einer enzymkatalysierten Reaktion bis zur Einstellung eines *steady-state* Zustandes. *Stopped-flow*-Methoden basieren auf der schnellen Mischung von Substrat und Enzym und erlauben die direkte Beobachtung der Intermediat- und Produktbildung im aktiven Zentrum eines Enzyms während eines einzigen enzymatischen Zyklus. Messgröße ist die Veränderungen eines optischen Signals als eine Funktion der Zeit nach dem Mischvorgang [JOHNSON 2009].

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgt die Aufklärung kinetischer Konstanten von Myosinen durch lichtspektroskopische Verfahren. Absorptionsverfahren werden zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität eines Myosins im Fließgleichgewicht verwendet. Zur Bestimmung von Reaktionsgeschwindigkeiten und Bindungskonstanten werden Lichtstreuungs- und fluoreszenzspektroskopische Verfahren eingesetzt [BATRA *et al.* 1999].

1.4.1 *Steady-state* ATPase-Aktivität

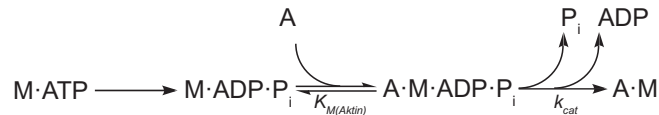
Die Bestimmung der basalen und Aktin-aktivierten ATPase-Aktivität eines Myosins im Fließgleichgewicht ermöglicht die Bestimmung der maximalen ATP-Hydrolysegeschwindigkeit in Abwesenheit von F-Aktin (k_{basal}), der maximalen ATPase-Geschwindigkeit in der Gegenwart saturierender Aktinkonzentrationen (k_{cat}) und der Abhängigkeit der ATPase-Aktivität von der Aktinkonzentration ($K_{M(Aktin)}$) [CRUZ und OSTAP 2009, FURCH *et al.* 1998].

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität eines Myosins im Fließgleichgewicht erfolgt unter Bedingungen *pseudo*-erster Ordnung. Dabei erfolgt die Reaktion zwischen Myosin und ATP in Anwesenheit eines Substratüberschusses. Durch diese Reaktionsbedingungen wird die maximale Umsatzgeschwindigkeit des Myosins unabhängig von der Substratkonzentration. Unter der Annahme, dass die Reaktion einem Mechanismus 2. Ordnung folgt, erfolgt die Interpretation auf der Grundlage des Michaelis-Menten-Mechanismus. Dabei wird vernachlässigt, dass die Umsetzung von ATP durch Myosin ein komplexer Reaktionsmechanismus, bestehend aus mehreren Teilschritten ist. Eine detaillierte Ableitung der folgenden Gleichungen ist in FERSHT [1985] beschrieben. Die Umsatzgeschwindigkeit des Myosins steht mit der ATP-Konzentration über folgenden Formalismus in quantitativer Beziehung.

$$v = \frac{k_{cat}[ATP]}{K_{M(ATP)}} + [ATP] \quad (1.1)$$

In dieser Gleichung repräsentiert k_{cat} die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion bei vollständiger Substratsättigung. Die maximal erreichbare Umsatzgeschwindigkeit des Myosins wird durch den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im ATPase-Zyklus limitiert. In Abwesenheit von Aktin wird dieser Schritt im Allgemeinen der Phosphat-Dissoziation zugeordnet [TRENTHAM *et al.* 1972, WHITE *et al.* 1997]. Die Michaelis-Menten-Konstante, $K_{M(ATP)}$, entspricht der ATP-Konzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit halbmaximal ist.

F-Aktin erhöht die maximale *steady-state* Umsatzgeschwindigkeit der ATP-Hydrolyse des Myosins, indem es im Sinne eines Nukleotidaustauschfaktors für Myosin, die Ratenkonstante der Produktfreisetzung >100fach erhöht [VALE 1996, WHITE *et al.* 1997]. Das folgende Schema repräsentiert den Reaktionsmechanismus der Aktin-aktivierten ATPase-Aktivität eines Myosin mit dem vorgelegten Gleichgewicht der ATP-Hydrolyse.



Gemäß dem Mechanismus bindet der $\text{M} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}_i$ -Komplex an filamentöses Aktin. Sofern ATP im Überschuss vorliegt, kann die Umsatzgeschwindigkeit k_{ATP} über den hyperbolen Formalismus der Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden.

$$k_{ATP} = \frac{k_{cat}[\text{Aktin}]}{K_{M(\text{Aktin})} + [\text{Aktin}]} \quad (1.2)$$

Die ATPase-Aktivität wird in diesem Fall durch die Parameter $K_{M(\text{Aktin})}$, auch als K_{app} bezeichnet, und k_{cat} definiert. $K_{M(\text{Aktin})}$ ist die Gleichgewichtskonstante der Aktinbindung an den Myosin-ADP- P_i -Komplex und entspricht der F-Aktinkonzentration, bei der Myosin das Substrat ATP mit halbmaximaler Umsatzgeschwindigkeit ($k_{cat}/2$) hydrolysiert. Die Geschwindigkeitskonstante des ratenlimitierenden Schrittes (k_{cat}) determiniert die maximale Umsatzgeschwindigkeit der Myosin ATPase-Aktivität unter Sättigung mit F-Aktin.

Bei hohen beziehungsweise niedrigen Aktin-Konzentrationen vereinfacht sich dieser Formalismus: Ist $[\text{Aktin}] \gg K_{M(\text{Aktin})}$, entspricht k_{ATPase} der maximalen Umsatzgeschwindigkeit k_{cat} . Ist $[\text{Aktin}] \ll K_{M(\text{Aktin})}$, vereinfacht sich Gleichung 1.2 zu folgendem linearen Formalismus.

$$k_{ATP} = \frac{k_{cat}[\text{Aktin}]}{K_{M(\text{Aktin})}} \quad (1.3)$$

Der Quotient $k_{cat}/K_{M(\text{Aktin})}$ definiert eine Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung, die als apparente Aktinbindungskonstante in Anwesenheit von ATP interpretiert werden kann. Das Verhältnis $k_{cat}/K_{M(\text{Aktin})}$ ist ein Maß für die katalytische Wirksamkeit eines Enzyms und wird auch als Spezifitätskonstante bezeichnet. In einem Diagramm der ATP-Umsatzgeschwindigkeit in Abhängigkeit der F-Aktinkonzentration ist die Spezifitätskonstante graphisch durch die lineare Regression der Umsatzgeschwindigkeit bei niedrigen Aktinkonzentrationen ermittelbar.

1.4.2 Transientenkinetische Analyse der ATPase-Aktivität

1.4.2.1 Interaktion zwischen Myosin und Nukleotid

Basierend auf der kinetischen Charakterisierung des skelettmuskulären Myosin S1-Fragments aus Kaninchen stellten BAGSHAW und TRENTHAM [1974] ein Modell zur Beschreibung der Interaktion zwischen Myosin und Nukleotid auf. Dieses 7-stufige Modell dient als Grundlage der kinetischen Beschreibung des Mechanismus der ATP-Hydrolyse aller Myosine und ist im Folgenden dargestellt.

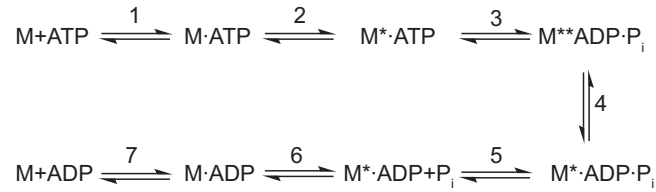
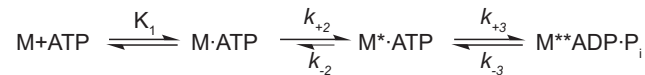


Abbildung 1.6: In diesem und den folgenden Reaktionsschemata, die transientenkinetische Reaktionen beschreiben, sind Gleichgewichtskonstanten als Versalien (K) und Geschwindigkeitskonstanten als Minuskeln (k) geschrieben. Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten von Reaktionen, die in Anwesenheit von F-Aktin stattfinden, sind fett (\mathbf{K} , \mathbf{k}) gedruckt. Die $*$ -Symbole repräsentieren unterschiedliche Konformationszustände des Proteins und korrelieren mit der Intensität der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz [EL-MEZGUELDI und BAGSHAW 2008]. Der ATPase-Zyklus hat Intermediate, die diskrete nukleotidsensitive Fluoreszenzzustände aufweisen und somit als empirisches Verfahren zur Aufklärung des Myosin ATPase-Zyklus genutzt werden können [HALSTEAD *et al.* 2007]. Die Untersuchung der Konformationsänderungen, die in Veränderungen der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz resultieren, geben einen wichtigen Einblick in die Eigenschaften des Zyklus [YENGO *et al.* 2000].

Bei der ATP-Bindung an Myosin formiert sich in einem ersten Schritt ein Kollisionskomplex aus Myosin und ATP (1), der von einer Isomerisierung zum $M^* \cdot ATP$ Komplex gefolgt wird. Diese Isomerisierung ist mit einer Erhöhung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz verbunden. Während des schnellen, reversiblen Prozesses der ATP-Hydrolyse induziert eine strukturelle Änderung eine weitere Fluoreszenzverstärkung M^{**} . Im Anschluss an die ATP-Hydrolyse erniedrigt sich die Fluoreszenz auf das Niveau des ersten Fluoreszenzzustandes M^* . Dieser Übergang wird mit der ratenlimitierenden Strukturänderung der Phosphatfreisetzung in Verbindung gebracht [YENGO *et al.* 2000]. Durch die Phosphat-Freisetzung geht Myosin aus der schwach in die stark bindende Konformation über. Dieser Übergang ist mit der Krafterzeugung während der Muskelkontraktion assoziiert. Die ADP-Freisetzung ist ein schneller zweistufiger Prozess (Schritt 6 und 7, Abbildung 1.6), in dem der erste Schritt mit einer Erniedrigung der Proteinfluoreszenz auf den Grundzustand verbunden ist [YENGO *et al.* 2000].

Für skelettmuskuläres Myosin der Klasse-2 ist die Interaktion zwischen Myosin und ATP durch eine zweistufige Fluoreszenzerhöhung gekennzeichnet [BAGSHAW und TRENTHAM 1974]. Die Fluoreszenz von skelett- und glattmuskulärem Myosin erhöht sich mit der Population des Myosin $\cdot ADP$ -Zustandes und steigt bei der Population des Myosin $\cdot ADP \cdot P_i$ -Zustands weiter an [CRUZ und OSTAP 2009]. Weiterführende Studien von KINTSES *et al.* [2007] sowie MILLAR und GEEVES [1988] demonstrieren, dass $k_3 < k_2$ und die Hydrolyse durch eine separate Phase der Fluoreszenzerhöhung gekennzeichnet ist. K_2 , die Gleichgewichtskonstante der Bindungsreaktion, ist bei einer Temperatur von 20°C zu schnell, um mit *stopped-flow*-Methoden aufgelöst zu werden [EL-MEZGUELDI und BAGSHAW 2008]. Daher kann nur die Fluoreszenzänderung des Hydrolyseschrittes detektiert werden. Die Interpretation transientenkinetischer Messungen erfolgt daher nach folgendem, vereinfachten Modell in Anlehnung an BAGSHAW und TRENTHAM [1974].



Mathematisch wird die Geschwindigkeitskonstante der ATP-Bindung durch folgenden Formalismus beschrieben.

$$k_{obs} = \frac{K_1 k_{+2} [ATP]}{1 + K_1 [ATP]} \quad (1.4)$$

Bei niedrigen ATP-Konzentrationen vereinfacht sich dieser hyperbole zu einem linearen Zusammenhang.

$$k_{obs} = K_1 k_{+2} [ATP] \quad (1.5)$$

In einem k_{obs} versus ATP-Diagramm kann aus der linearen Regression der Daten die Bindungskonstante zweiter Ordnung $K_1 k_{+2}$ ermittelt werden.

Bei hohen ATP-Konzentrationen folgen die Daten einem hyperbolischen Zusammenhang und werden durch den folgenden Formalismus interpretiert. Das Plateau der Hyperbel repräsentiert dabei die Summe der Gleichgewichtskonstanten der Hin- und Rückreaktion ($k_{+3} + k_{-3}$) des Hydrolyseschritts [BAGSHAW und TRENTHAM 1974].

$$k_{obs} = \frac{(k_{+3} + k_{-3})[ATP]}{K_1 + [ATP]} \quad (1.6)$$

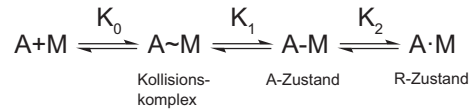
Die ADP-Bindung an Myosin ist mit einer Erhöhung der intrinsischen Proteinfluoreszenz verbunden, deren Amplitude im Vergleich zur Bindung von ATP reduziert ist [EL-MEZGUELDI und BAGSHAW 2008]. Die Interaktion von Myosin mit ADP (D) kann nach BAGSHAW und TRENTHAM [1974] auf der Basis des folgenden Schemas interpretiert werden.



Die Bindungskonstante 2. Ordnung der ADP-Bindung an Myosin, $K_6 k_{+7}$, wird auch als k_{+D} bezeichnet; die Geschwindigkeitskonstante k_{-7} als k_{-D} . Diese Ratenkonstante charakterisiert die ADP-Dissoziation von Myosin.

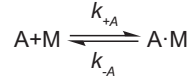
1.4.2.2 Interaktion zwischen Myosin und F-Aktin

Die Interaktion zwischen Myosin und F-Aktin wird als dreistufiger Prozess nach folgendem Schema interpretiert [GEEVES und CONIBEAR 1995, GEEVES *et al.* 1984].



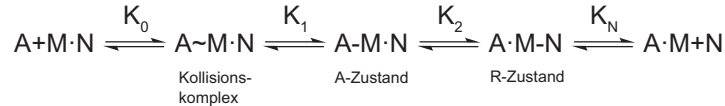
Der erste Schritt des Schemas beschreibt die Formation eines Kollisionskomplexes zwischen den Reaktionspartnern F-Aktin und Myosin. Die Bildung dieses Kollisionskomplexes wird durch die Gleichgewichtskonstante K_0 beschrieben. Die Interaktion wird durch schwache elektrostatische Wechselwirkungen stabilisiert und weist eine starke Abhängigkeit von der Ionenstärke auf. Eine Isomerisierung des Kollisionskomplexes in den A (*attached*)-Zustand wird durch die Gleichgewichtskonstante K_1 charakterisiert. Die Isomerisierung ist durch stereospezifische hydrophobe Interaktionen sowie einer schwachen Bindung zwischen den Reaktionspartnern gekennzeichnet. Der Übergang in den stark aktinbindenden R (*rigor*)-Zustand ist strukturell mit dem Schließen der Aktinbindungsspalte gekoppelt [CONIBEAR *et al.* 2003]. Diese Isomerisierung (*weak to strong*-Übergang) wird durch die Gleichgewichtskonstante K_2 beschrieben. Im R-Zustand weist das Myosin maximale Aktin-Affinität auf.

Fluoreszenzspektroskopisch kann der Übergang in den R-Zustand durch die Erniedrigung der Pyren-Fluoreszenz aufgelöst werden. Alternativ kann die Zunahme des Lichtstreuensignals bei der Ausbildung des Aktomyosin-Komplexes zeitabhängig verfolgt werden. Bei beiden Verfahren kann nur zwischen Aktinbindung und -Dissoziation unterschieden werden; eine Auflösung der Zwischenzustände ist unmöglich. Daher vereinfacht sich der Zusammenhang zu folgendem Ein-Schritt-Mechanismus [SIEMANKOWSKI und WHITE 1984].



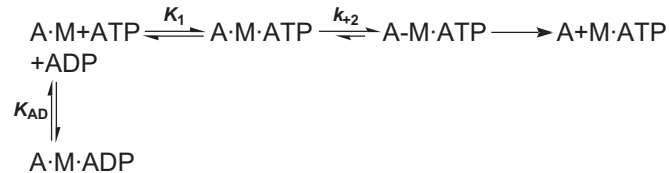
1.4.2.3 Interaktion zwischen Myosin mit F-Aktin und Nukleotid

Das 3G-Modell (GEEVES *et al.* [1984]) stellt eine Erweiterung des unter 1.4.2.2 beschriebenen Modells der Aktin-Myosin-Wechselwirkung dar und beschreibt die Interaktion des Myosin·Nukleotid-Komplexes mit F-Aktin als kompetitives Bindungsmodell.



Die Bindung von Aktin an den Myosin·Nukleotidkomplex resultiert in der Bildung eines Kollisionskomplexes. Die Ausbildung des Kollisionskomplexes (K_0) und dessen Isomerisierung in den A-Zustand (K_1) sind weitgehend nukleotidunabhängig. Dies impliziert, dass die Nukleotidbindung an den Kollisionskomplex oder den A-Zustand ähnlich der Bindung von Nukleotid an Aktin-freies Myosin ist. Die Isomerisierung des A- in den R-Zustand ist mit strukturellen Änderungen sowohl in der Aktinbindungsregion als auch in der Nukleotidbindungstasche des Myosins verbunden. Als Resultat wird die Aktinbindung gestärkt und simultan die Nukleotidbindung geschwächt. Die zweite Umlagerung (K_2) ist nukleotidsensitiv und strukturell mit dem Kraftschlag gekoppelt [GEEVES und CONIBEAR 1995].

Auf der Basis transientenkinetischer Messungen wurde das folgende Modell der Interaktion von Aktomyosin und Nukleotid aus dem 3G-Modell abgeleitet [MILLAR und GEEVES 1983, SIEMAN-KOWSKI und WHITE 1984].



Der waagerechte Reaktionsverlauf beschreibt die ATP-Bindung an Aktomyosin. Der schnelle Prozess der ATP-Bindung wird durch die Gleichgewichtskonstante K_1 charakterisiert. Die Isomerisierung des ternären Komplexes in den schwach aktinbindenden Myosin·ATP-Komplex erfolgt mit der Geschwindigkeitskonstanten k_{+2} . Dieser *strong to weak*-Übergang ist geschwindigkeitsbestimmend für die Aktin-Dissoziation und nahezu irreversibel. In einem weiteren Schritt dissoziiert der Komplex zu Myosin·ATP und Aktin.

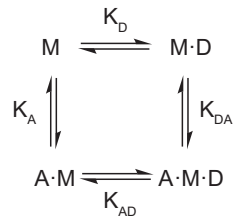
Bei hohen ATP-Konzentrationen weichen die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von der Linearität ab und folgen einem hyperbolen Verlauf. Die Hyperbel kann durch folgenden Formalismus beschrieben werden.

$$k_{obs} = \frac{k_{+2}[ATP]}{K_1 + [ATP]} \quad (1.7)$$

Der senkrechte Reaktionsverlauf beschreibt die Konkurrenz der Nukleotide ATP und ADP um die Bindung an Aktomyosin. Die Dissoziationsgleichgewichtskonstante K_{AD} beschreibt das Gleichgewicht zwischen ADP und Aktomyosin. Experimentell zugänglich ist K_{AD} durch die Messung der ADP-Inhibition der ATP-induzierten Dissoziation des Aktomyosin-Komplexes. Dabei wird Pyren-Aktomyosin mit ansteigenden ADP-Konzentrationen präinkubiert und der Komplex durch einen Überschuss an ATP dissoziiert. Die Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von der ADP-Konzentration ist hyperbol und kann durch folgenden Formalismus beschrieben werden. Dabei definiert k_0 die beobachtete Geschwindigkeitskonstante in Abwesenheit von ADP.

$$k_{obs} = \frac{k_0}{1 + \frac{[ATP]}{K_{AD}}} \quad (1.8)$$

Unter der Annahme, dass die Reaktionen zwischen Myosin, ADP und F-Aktin ein thermodynamisch geschlossenes System darstellen, lassen sich die Dissoziationsgleichgewichtskonstanten dieser Interaktionen als thermodynamische Kopplungen beschreiben. Das folgende Schema präsentiert die Kopplung zwischen Myosin, Aktin und ADP [NYITRAI und GEEVES 2004, RITCHIE *et al.* 1993].



Die Balance in diesem Schema verdeutlicht, dass eine Affinitätserniedrigung von Myosin zu ADP bedingt durch Aktin im Gegenzug zu einer erniedrigten Affinität von Myosin zu Aktin in der Gegenwart von ADP führt. Dieses Verhalten kann durch thermodynamische Kopplungskonstanten ausgedrückt werden, die die Affinität von ADP einerseits zu Myosin (K_D) andererseits zu Aktomyosin (K_{AD}) sowie die Affinität von Aktin zu Myosin (K_A) und Myosin·ADP (K_{DA}) in Relation setzen. Folgender mathematische Zusammenhang verdeutlicht die Relation der zugehörigen Dissoziationsgleichgewichtskonstanten [NYITRAI und GEEVES 2004].

$$\frac{K_{AD}}{K_D} = \frac{K_{DA}}{K_A} \quad (1.9)$$

Niedrige Kopplungskonstanten (< 5) kennzeichnen eine Gruppe von Myosinen, bei denen ADP auch in Gegenwart von Aktin stark gebunden ist. Myosine mit der biochemischen Eigenschaft einer niedrigen thermodynamischen Kopplung für ADP und Aktin haben die funktionalen Eigenschaften als Spannungssensoren zu fungieren. Eine niedrige Kopplungskonstante ist nicht nur signifikant, weil ADP auch in Gegenwart von Aktin stark an Myosin bindet sondern impliziert, dass Myosin·ADP fast genauso stark an Aktin bindet wie Myosin.

Hohe Kopplungskonstanten (> 50) sind ein Charakteristikum von schnellen Myosinen, beispielsweise skelettmuskulärem oder kardialem Myosin, deren Affinitäten durch den jeweils anderen Bindungspartner (ADP oder Aktin) stark (> 100) beeinflusst werden [NYITRAI und GEEVES 2004].

1.5 Myosin-Effektoren

Eine Eigenschaft von Enzymen ist die Regulation ihrer katalytischen Aktivität. Diese Variabilität ist Voraussetzung für die Balance des Stoffwechsels im zellulären Kontext. Allosterische Effektoren binden an ein regulatorisch sensitives Zentrum des Enzyms und verändern dessen katalytische Aktivität. Positive Effektoren (Aktivatoren) steigern, negative Effektoren (Inhibitoren) erniedrigen die enzymatische Aktivität [GOODEY und BENKOVIC 2008, HEINRICH und PETRIDES 2006].

Die Existenz der Myosin-Superfamilie und deren ubiquitäre Expression in verschiedenen Zelltypen wirft Fragen nach der spezifischen Funktion der Motorproteine im zellulären Kontext auf. Isoform-spezifische, zellpermeable Inhibitoren mit einer hohen Selektivität sind nützliche Hilfsmittel um die spezifische Funktion eines Myosins *in vivo* zu studieren [TITUS 2003]. Makromolekulare Effektoren sind essenziell für zellbiologische und funktionale Studien beispielsweise der Zellmotilität und der Muskelkontraktion [ALLINGHAM *et al.* 2005] und haben das Potential, die Idiopathie Myosin-korrelierter Erkrankungen wie die familiäre hypertrophe Kardiomyopathie, Griscelli-Syndrom und

Usher-Syndrom auf molekularer Ebene zu studieren.

Ein kurzer Überblick über ausgewählte Myosin-Effektoren ist im Folgenden beschrieben.

Der Inhibitor BTS, ein Aryl-Sulphonamid, wurde beim *screening* einer Datenbank für Inhibitoren des skelettmuskulären Myosins des Kaninchenmuskels identifiziert [CHEUNG *et al.* 2002]. BTS inhibiert die Ca^{2+} -stimulierte Aktin-aktivierte ATPase-Aktivität und inhibiert die *in vitro* Bewegungsgeschwindigkeit reversibel [CHEUNG *et al.* 2002]. BTS kompetiert nicht um die Nukleotidbindungsstelle des Myosins sondern interferiert mit der Interaktion zwischen Myosin und F-Aktin [CHEUNG *et al.* 2002, SHAW *et al.* 2003]. Während die inhibitorische Aktivität von BTS auf skelettmuskuläres Myosin beschrieben ist, ist der inhibitorische Effekt von BTS auf andere Myosin-Isoformen der Klasse-2 wesentlich geringer. CHEUNG *et al.* [2002] postulieren auf der Basis von kinetischen Studien sowie *kinetic modeling* eine Bindung von BTS in der Aktinbindungstasche des Myosins. Kinetisch inhibiert BTS die Phosphat-Dissoziation von Myosin und Aktomyosin 20-100fach. Des Weiteren reduziert BTS die Affinitäten von Myosin-ADP und Myosin-ADP- P_i für F-Aktin [SHAW *et al.* 2003].

Das effektorische Spektrum des Inhibitors BDM wird kontrovers diskutiert: CRAMER und MITCHISON [1995] beschreiben eine Inhibition von Myosinen der Klassen-1, -2 und -5 *in vivo* and *in vitro* und spekulieren über eine Funktion des BDMs als *pan*-Myosin-Inhibitor [TITUS 2003]. Studien von OSTAP [2002] an heterolog mit dem Baculovirus/*Sf9*-System produzierten Myosinen konnten keinen Effekt von BDM auf die Aktin-aktivierte ATPase-Aktivität von Myosin-Motordomänen der Klassen-1, -5 und -6 zeigen; skelettmuskuläres Myosin-2 wird durch BDM inhibiert.

Blebbistatin inhibiert nichtmuskuläres sowie skelettmuskuläres Myosin-2 effektiv ($\text{IC}_{50} \approx 0,5-4,9 \mu\text{M}$); glattmuskuläres Myosin-2 wird ≈ 160 fach schwächer inhibiert als skelettmuskuläres Myosin-2 [ALLINGHAM *et al.* 2005]. Eine Inhibition von Myosinen der Klassen-1, -5 und -10 wurde nicht beobachtet [STRAIGHT *et al.* 2003].

Kristallographische Studien an *Dd* Myosin-2 beschreiben eine Bindungsstelle des Inhibitors in einer hydrophoben Tasche am Apex der Spalte zwischen der oberen und unteren 50 kDa-Domäne, in räumlicher Nähe zur P_i -Bindungsstelle [ALLINGHAM *et al.* 2005]. Kinetische Studien von RAMAMURTHY *et al.* [2004] an nichtmuskulärem Myosin-2B beschreiben eine Blockade des *weak to strong*-Übergangs durch Blebbistatin, eine reduzierte ADP-Dissoziation und eine blockierte P_i -Dissoziationskinetik. In Analogie beschreiben KOVÁCS *et al.* [2004] eine reduzierte Phosphat-Dissoziation von skelettmuskulärem Myosin-2 und spekulieren, dass Blebbistatin durch seine Positionierung innerhalb der Myosin-Motordomäne die Ausbildung des Rigor-Zustands verhindert. Weiterführende Studien von TAKÁCS *et al.* [2010] dokumentieren das *priming* des Hebelarms des Myosin-ADP-Blebbistatin-Komplexes in die *pre-powerstroke*-Konformation, ähnlich der Konformation des Myosins zu Beginn des Kraftschlags.

Blebbistatin konnte erfolgreich in zellulären Studien eingesetzt werden [JOU *et al.* 2010, LIM *et al.* 2010, Si *et al.* 2010].

EMD 57033, ein Thiadiazinon-Derivat, ist ein Calcium-Sensitizer und induziert einen positiv inotropen Effekt in der intakten kardialen Muskulatur durch eine Erhöhung der myofilamentären Ca^{2+} -Sensitivität [WHITE *et al.* 1993]. Zudem steigert EMD 57033 die isometrische Kraftentwicklung von Muskelfasern [KRAFT und BRENNER 1997]. Der genaue Wirkmechanismus des Effektors ist unklar.

Im Kontrast zu den bisher beschriebenen Myosin-Effektoren zeichnet sich der allosterische Inhibitor Pentabromopseudilin (PBP) durch eine Selektivität für Klasse-5 Myosine aus [FEDOROV *et al.* 2009]. Die Inhibition der *steady-state* ATPase-Aktivität von *Gg* Myosin-5a weist einen IC_{50} -Wert von $0,4-1,2 \mu\text{M}$ in der Ab- respektive Anwesenheit von F-Aktin auf. Kristallographische Studien an *Dd* Myosin-2 beschreiben eine bisher unbekannte Bindungsstelle des Inhibitors an der Spitze der 50 kDa-Domäne. PBP reduziert die Kinetik der ATP-Bindung, ATP-Hydrolyse und ADP-Dissoziation von *Dd* Myosin-5B sowie die Kommunikation zwischen der Nukleotid- und der Aktinbindungsregion. Die spezifische Inhibition von Myo2, einem Klasse-5 Myosin aus *S. cerevisiae* durch PBP ist beschrieben und indiziert ein hohes Potenzial des membranpermeablen Inhibitors in zellulären Studien [FEDOROV *et al.* 2009].

TFP, ein Phenothiazin-Derivat ist ein Calmodulin-Antagonist; In der Anwesenheit von Calcium bindet der Antagonist an Calmodulin, induziert eine Konformationsänderung und reduziert die stimulatorische Funktion des Calmodulins [PATEL *et al.* 2000]. Im Konzentrationsbereich von 200 μM inhibiert TFP die Aktin-aktivierte und intrinsische ATPase-Aktivität des Adduktoren-muskels der Jakobsmuschel. In 10fach höheren Konzentrationen resultiert die Anwesenheit von TFP eine Dissoziation der regulatorischen leichten Ketten des Myosins [PATEL *et al.* 2000]. SELLERS *et al.* [2003] bestimmten für verschiedene konventionelle und unkonventionelle Myosine der Klassen-2 und -5 den IC_{50} -Wert von TFP auf die ATPase-Aktivität zu 50-75 μM ; die Dissoziation der leichten Ketten im experimentellen Konzentrationsbereich wurde nicht beschrieben. Die *in vitro*-Motilität der studierten Myosine wird durch TFP komplett inhibiert. Ein Myosin-5 Minimalkonstrukt ohne gebundenes Calmodulin wird durch TFP im gleichem Maße wie ein S1-Fragment inhibiert. SELLERS *et al.* [2003] spekulieren, dass TFP den *weak to strong*-Übergang des ATPase-Zyklus inhibiert

In der Klinik wird TFP wegen seines neuroleptischen und antidepressiven Potenzials zur Behandlung von Psychosen eingesetzt [HASSAN *et al.* 2009].

1.6 Das Baculovirus-Expressionssystem

Das Baculovirus-Expressionssystem ermöglicht die heterologe Überproduktion rekombinanter Proteine in eukaryotischen Zellen. Das Expressionssystem bedient sich des lytischen, arthropoden-spezifischen DNA-Virus *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV)*, ein viraler Prototyp aus der Familie der *Baculoviridae*. Der Vorteil des Baculovirus/*Sf9*-Expressionssystem gegenüber prokaryotischen Expressionssystemen liegt in der Prozessierung und Modifizierung von Proteinen, die ähnlich wie in höheren Eukaryoten erfolgt [MURPHY und PIWNICA-WORMS 1995].

Für die heterologe Produktion von Myosinen höhere Organismen ist das Baculovirus/*Sf9*-System unersetzlich. S1-, HMM- sowie Motordomänen-Konstrukte aus Myosinen unterschiedlicher Klassen konnten erfolgreich dargestellt und in funktionalen [JANA *et al.* 2009], kinetischen [GEEVES *et al.* 2000, KAMBARA *et al.* 2006, WANG *et al.* 2003] und kristallographischen [COUREUX *et al.* 2004, DOMINGUEZ *et al.* 1998, MÉNÉTREY *et al.* 2005] Studien eingesetzt werden. Subfragmente von skelettmuskulärem und kardialem Myosin konnten bislang nicht, unfunktional oder nur in sehr geringen Ausbeuten produziert werden [TRYBUS 2000].

Der biphasische baculovirale Lebenszyklus ist Grundlage des Expressionssystems. Viren penetrieren durch adsorptive Endozytose in die Wirtszelle, wandern zum Zellkern und setzen ihre doppelsträngige virale DNA frei. An die Replikation schließt sich die virale Assemblierung im Zellkern der infizierten Zelle an. Während einer Infektion mit *AcMNPV* entwickeln sich zwei unterschiedliche virale Nachkommen; extrazelluläre Viruspartikel und *occluded* Viruspartikel. Extrazelluläre Viruspartikel werden in der späten Phase der Infektion gebildet, durch Knospung freigesetzt und dienen der Ausbreitung der Infektion innerhalb des Wirts. Die *occluded* Viruspartikel werden in der sehr späten Phase der Infektion gebildet und dienen der Übertragung der Infektion auf einen anderen Wirt. Diese Viren akkumulieren bis zu einer Zeit von 72 Stunden *post infectionem* oder bis zur Lyse der Zellen. Kolonien von *occluded* Viruspartikeln sind in Nukleus infizierter Zellen von einer proteinösen viralen Okklusion, genannt Polyhedrin, umgeben. Das Polyhedrin-Protein ist das Hauptstrukturprotein der *occlusion bodies* und stellt in infizierten Zellen bis zu 50% des Gesamtproteingehalts dar. In der Zellkultur ist das Polyhedrin-Protein für die Propagation und Replikation des Virus nicht essentiell [MURPHY und PIWNICA-WORMS 1995]. Diese Eigenschaft erlaubt die Entwicklung von Transferplasmiden, die einen modifizierten Polyhedrin-Promotor enthalten und die Substitution des Polyhedrin-Gens durch ein Fremd-Gen erlauben [SAMBROOK 2001].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden rekombinante Baculoviren mit dem Bac-to-Bac[®]-Expressionssystem der Firma Invitrogen erzeugt. Für die Produktion rekombinanter Baculoviren, wird ein Fremd-Gen in einen Transfer-Vektor kloniert und in *E.coli* propagiert. In diesem steht

das Gen unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promotors wird am 5'- und 3'-Terminus durch spezifische Tn7-Sequenzen eingerahmt. Durch die Transformation dieses Donor-Plasmids in den *E.coli*-Stamm DH10Bac™ erfolgt die gerichtete Transposition des mini-Tn7-Elements aus dem Donor-Vektor in die mini-*att*Tn7-Stellen des Bacmids. Die Transposition inseriert das Fremd-Gen in das modifizierte virale Genom, auch als Bacmid bezeichnet. Das Bacmid wird präpariert und in der Sekundärzellkultur *Sf9*-Insektzellen transfiziert. In den Insektzellen kommt es zur Produktion des rekombinanten Virus und subsequent zur heterologen Produktion des Fremdproteins [MURPHY und PIWNICA-WORMS 1995]. Abbildung 1.7 stellt schematisch den experimentellen Ablauf der heterologen Produktion rekombinanter Proteine mit dem Baculovirus/*Sf9*-System dar.

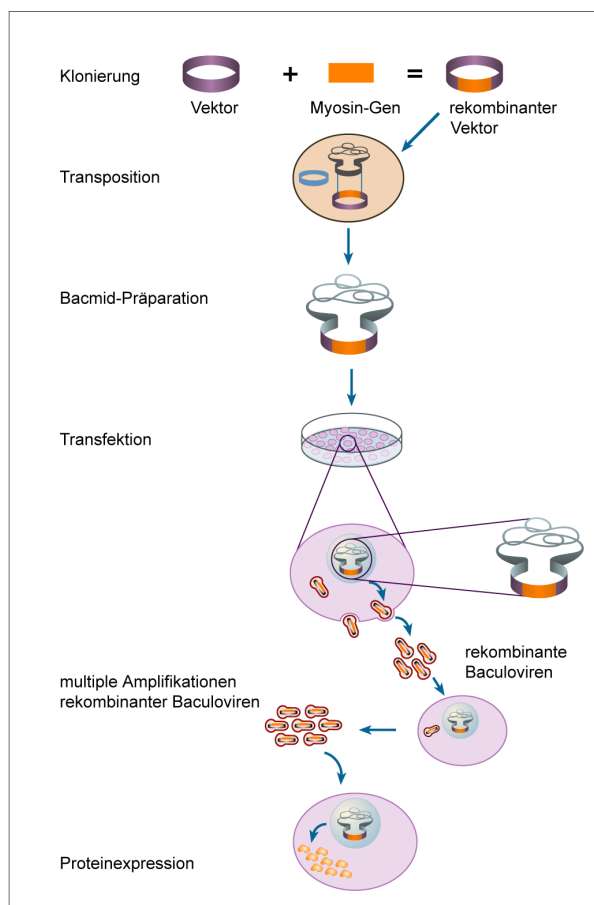


Abbildung 1.7: Das Baculovirus-Expressionssystem. Rekombinantes Protein wird durch die Klonierung eines Gens in einen Donor-Vektor erzeugt. Das rekombinante Plasmid wird in den *E.coli*-Stamm DH10Bac™ transformiert, der das Bacmid mit mini-*att*Tn7-Stellen und ein Helferplasmid enthält. Das mini-Tn7-Element des Donor-Plasmids wird in die mini-*att*Tn7-Erkennungssequenz des Bacmids transponiert, katalysiert durch Transpositionsproteine, die durch das Helfer-Plasmid kodiert werden. Rekombinantes Bacmid wird präpariert und in der Transfektion von *Sf9*-Zellen eingesetzt. Die Insektzellen produzieren in der Folge rekombinantes Virus. Die Amplifikation des Virus ermöglicht die Produktion des Zielproteins in großem Maßstab. Abbildung verändert nach [HANDBUCH BD BIOSCIENCES 2003].

Nachteil des Baculovirus/*Sf9*-Expressionssystems ist die diskontinuierliche und kurzlebige Produktion des rekombinanten Proteins. Deshalb wurden Vektorsysteme mit Promotoren, welche die Expression in unterschiedlichen Stadien des viralen Infektionsprozesses ermöglichen, entwickelt. Promotoren, die die Expression in einem früheren Stadium als der Polyhedrin-Promotor erlauben sind meistens schwächer, halten die Proteinproduktion aber über eine längere Zeitspanne aufrecht. Dadurch ist die Zelle kompetenter in der Durchführung posttranslatonaler Modifikationen [SAM-

BROOK 2001].

Ein weiterer Nachteil ist die differente Proteinprozessierung in Invertebratenzellen im Vergleich zu Vertebratenzellen [MURPHY und PIWNICA-WORMS 1995]. Beispielsweise weisen Insektenzellen im Allgemeinen keine komplexe N-Glykosylierung auf; N-Glykosylierungen sind vom mannose-reichen Typ und werden nicht zu komplexen Oligosaccharid-Strukturen prozessiert [MURPHY und PIWNICA-WORMS 1995, SAMBROOK 2001]. Obwohl diese Art der N-Glykosylierung für die Produktion biologisch aktiver eukaryotischer Proteine ausreicht, kann das Fehlen der komplexen terminalen Glykosylierung auf Proteinebene zu subtilen Unterschieden in Stabilität, Löslichkeit und der Immunreaktion resultieren [SAMBROOK 2001].

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit ist auf die kinetische, funktionale und regulatorische Charakterisierung humaner Myosin-Motordomänen der Klassen-2, -6 und -7 fokussiert. Die Aufklärung der molekularen Funktionsprinzipien der Motorproteine soll einen Beitrag zur kinetischen Aufklärung des humanen Myosoms leisten. Neben regulatorischen Studien soll die gezielte Beeinflussung der Motoraktivität der Myosine durch niedermolekulare Effektoren untersucht werden.

Das humane Genom besitzt drei Gene für nichtmuskuläre Myosine der Klasse-2. Neben umfangreichen kinetischen Studien der zytoplasmatischen Myosine-2A und -2B sollen in dieser Arbeit die kinetischen und regulatorischen Funktionen aller Isoformen des humanen nichtmuskulären Myosins-2C analysiert werden. Die Erstellung von Homologiemodellen dient der strukturellen Interpretation der kinetischen Daten.

Porcines Myosin-6 weisen eine Direktionalität zum Minus-Ende von polarisierten Aktin-Filamenten auf. Dieses Charakteristikum ist einzigartig und mit strukturellen und kinetischen Adaptationen des Motors assoziiert. Eine umfangreiche kinetische Analyse des ATPase-Zyklus sollen die Eigenschaften der Motordomäne des humanen unkonventionellen Myosins-6 analysieren. Ein Vergleich der kinetischen Konstanten der humanen mit der porcinen Isoform kann die kinetischen und funktionalen Aspekte der Motoren systematisieren.

Unkonventionelles Myosin-7a ist im menschlichen Organismus in fundamentale auditorische und visuelle Prozesse involviert. Die Aufklärung der funktionalen und kinetischen Eigenschaften des Klasse-7 Myosins mit biochemischen und biophysikalischen Methoden sowie die Translation der kinetischen Charakteristika auf die zellulären Eigenschaften kann einen Beitrag für das Verständnis der *in vivo*-Funktionen dieses Motors leisten.

Die Motoraktivität von verschiedenen Myosinen der Klassen-1 und -5 wird durch Variationen der Konzentration an freien Magnesiumionen im physiologischen Bereich reguliert. Die Magnesiumionen-Konzentration moduliert die Freisetzung von ADP aus dem Aktomyosin-ADP-Komplex und hat direkte Konsequenzen auf die *duty ratio* des Motors.

Die Relevanz eines magnesiumsensitiven Regulationsmechanismus wird für die humanen nichtmuskulären Myosine-2A, -2B und -2C sowie Myosine der Klassen-6 und -7 im Kontext dieser Arbeit analysiert.

Die gezielte Inhibition von Myosinen stellt eine wertvolle Methode dar, um die funktionale Aktivität und Regulation des Motors *in vitro* und *in vivo* zu charakterisieren. Mit Blebbistatin, TFP, EMD 57033, BTS und PBP stehen bereits niedermolekulare Effektoren zur Verfügung.

Ein aktueller Forschungsschwerpunkt ist die Entwicklung selektiver und potenter Modulatoren der Myosin-Aktivität. Durch *docking*-Studien werden im Rahmen dieser Arbeit aus einer Bibliothek potenzieller Myosin-Effektoren Kandidaten für eine spezifische Inhibition humaner Myosin-Motordomänen der Klassen-2, -6 und -7 ermittelt. Ausgewählte Verbindungen werden auf ihr effektorisches Potenzial der *steady state*-Kinetik humaner Myosine analysiert.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, in der Qualität zur Analyse (p.a.) oder in der höchsten Reinheitsstufe bezogen.

Chemikalie	Firma/Hersteller
Aceton	J.T.Baker
Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1	Merck
ADP, Kaliumsalz	Sigma-Aldrich
Agar	Serva
Agarose, Top Vision™ LE GQ	Fermentas
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Amylacetat (Essigsäurepentylester)	Sigma-Aldrich
APS, Ammoniumperoxodisulfat	Merck
ATP, Natriumsalz	Sigma-Aldrich
β -Mercaptoethanol, 14,3 M	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Calbiochem
Casein	Serva
Chloramphenicol	Fluka
2'-desoxy-mantADP	BIOLOG
2'-desoxy-mantATP	Jena Biosciences
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO) >99%	Sigma-Aldrich
EDTA, Titriplex II	Merck
EGTA, Titriplex VI	Merck
Essigsäure, 100%	Merck
Essigsäurepentylester, 99 %	Sigma-Aldrich
Ethanol, absolut > 99,9%	J. T. Baker
Ethanol, vergällt	J. T. Baker
Ethidiumbromid	Fluka

Gentamicin	PAA
Glucose	Sigma-Aldrich
Glycerin	Merck
Glycin	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Serva
HEPES, 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure	Sigma-Aldrich
Imidazol	Sigma-Aldrich
Inhibitor-Tabletten, Complete Mini, EDTA frei	Roche
IPTG, Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid	Fermentas
Isopropanol, 2-Propanol	J. T. Baker
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
Kaliumhydroxid (KOH), Plätzchen	Merck
Kanamycin	Merck
Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$)	Fluka
Magnesiumchlorid ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	Calbiochem
Magnesiumchlorid (4,9 M, titriert)	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Hansano
Manganchlorid (MnCl_2)	Merck
mantADP	Jena Biosciences
mantATP	Jena Biosciences
Methanol	J. T. Baker
MOPS, 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure	J. T. Baker
N-(1-prenyl)iodoacetamid (Pyren)	Fluka
NADH, Dinatriumsalz	Roche
Natriumazid (NaN_3)	Merck
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	J. T. Baker
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natrium-Dodecylsulfat, SDS	Merck
Natriumhydrogencarbonat (NaH_2CO_3)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH), Plätzchen	Merck
Nickel-Nitrilotriacetat-Säulenmaterial, Ni^{2+} -NTA- <i>superflow</i>	QIAGEN
Nitrozellulose	Sigma-Aldrich
PEP, Phosphoenolpyruvat	Roche
Pepton	Serva
Phosphorsäure, 85%	J. T. Baker
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich
Rubidiumchlorid (RbCl)	Fluka
Salzsäure, konzentriert (37%)	J. T. Baker
TEMED, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Merck
Tetracyclin	Sigma-Aldrich
Tetramethyl-Rhodamin-Iso-Thiocyanat (TRITC)-Phalloidin	Sigma-Aldrich
Trehalose	Fluka
Trichloressigsäure, TCA	Fluka
Tris, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck
Triton X-100	Sigma-Aldrich

Trypton	Serva
X-Gal	Fermentas
Xylencyanol FF	Merck

2.1.2 Enzyme

Wenn nicht gesondert aufgeführt, wurden die verwendeten Enzyme von den Firmen *MBI Fermentas* sowie *New England Biolabs* bezogen.

Enzym	Hersteller
Apyrase, <i>grade VI from potatoe</i> > 200 U/ml	Sigma-Aldrich
CIAP, <i>calf intestine alkaline phosphatase</i> (1 U/ml)	Fermentas
Glucose-Oxidase	Sigma-Aldrich
Katalase	Sigma-Aldrich
Laktatdehydrogenase	Roche
<i>Phusion™ High Fidelity (Hot Start)</i> DNA-Polymerase	Finnzymes
Pyruvatkinase 200 U/mg	Roche
<i>Quick</i> T4-DNA-Ligase	NEB
T4-DNA-Ligase	Fermentas
<i>Taq</i> Polymerase	QIAGEN

2.1.3 Reagenzienkits

Kit	Hersteller
Cellfectin® Reagent	Invitrogen
MinElute Gel Extraction Kit	QIAGEN
<i>Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix</i>	Invitrogen
<i>Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix</i>	Invitrogen
<i>Phusion® Site-directed Mutagenesis Kit</i>	Finnzymes
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN

2.1.4 Vektoren

Vektor	Hersteller
pCMV-Sport6	Invitrogen
pDONR™201	Invitrogen
pDEST™8	Invitrogen
pEGFP-C2	Clontech
pGEM®-T Easy	Promega
pFastBac™1	Invitrogen
pFastBac™Dual	Invitrogen
pJet 1.2	Fermentas

2.1.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide für die Klonierungen wurden von den Firmen MWG Eurofins OPERON oder SIGMA synthetisiert; Standard-Oligonukleotide werden in der Qualitätsstufe „salzfrei“ bezogen, phosphorylierte Oligonukleotide sowie Oligonukleotide für die Mutagenese in den Reinheitsstufen „PAGE“ oder „HPLC“.

Tabelle 2.1: Oligonukleotide

Primer	Sequenz
5-InsertL1	P-ACC GTG TCT TAT GGG AAT TGG AAC GCC AAC TG
3-InsertL1	P-GCT GAC GGA GGC GGG GAC ACC GGG TTC TTT TCG
FWD-MYH14-3 Step1	P-AGC TCT GCT ATT TCT CCG CCA GGG GTC GAA GGA ATT GTA GGA CTG
REV-MYH14-3 Step1	P-GAG AAC TGC TGG AAG CCC CCA TGT TCA TCC TTC CAG ATT TCG GCG
FWD-MYH14-3 Step2	P-CCC CCA GGA TCT GCA GAG AGG TGC AGC TCT GCT ATT TCT CCG CC
REV-MYH14-3 Step2	P-CGA CGG TGG GAA GGA GCC AAG GAA AGA GAA CTG CTG GAA GCC CCC
5Myo7aHis8	GGG GGC GGA TCC CAT GGT GAT TCT TCA GCA GGG GGG AC
3Myo7aHis8	GCG CGC CTC GAG TGT CGG TGA TGG CTT TGT CCC GCT CCA C
5REC-M7MDH8	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTC CGG ATC CAT GGT GAT TCT TCA GCA GGG G
3REC-M7MDH8	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC ATC TCG AGT GTC GGT GAT GGC TTT GTC CCG
REC-FWD-2R+EYFPH8	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA GCA GGC TTC CTC GAG CAT CCG AAC AAA CCA AAT C
REC-REV-2R+EYFPH8	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CTA CTC GAG TCT AGA CTT AGT GGT GAT GA
FWD-MYO6	P-TGC CAC GAT CGA TCG AAT CGG CTT CAG CTC GAT ATT TTA
REV-MYO6	P-CTC AAG CTT CGA ATT CAT GGA GGA TTG AAA GCC CGT
FWD-MYO6-Mut	P-CAA CCA AAT CTG ATT ATC TTA AAA GAG CCA AT
REV-MYO6-Mut	P-GGC TTC AGC TCG ATA TTT TAT TTT GTT TTT CA

2.1.6 Nukleinsäurestandards

GeneRuler™ *1kb DNA Ladder*, Fermentas (Banden: 10000, 8000, **6000**, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, 2000, 1500, **1000**, 750, 500, 250 bp)

2.1.7 Proteinstandards

PageRuler™ *Protein Ladder*, Fermentas, (Banden: 170, 130, 100, **70**, 55, 40, 35, 25, 15, **10** kDa)
Spectra™ *Multicolor Broad Range Protein Ladder*, Fermentas, (Banden: 260, 140, 100, 70, 50, 40, 35, 25, 15, 10 kDa)

2.1.8 Antikörper

Primäre Antikörper

Myosin-6 (*Homo sapiens*), monoklonaler Antikörper gegen die Aminosäuren 291-302,
Santa Cruz Biotechnology

Myosin-7a (*Mus musculus*), polyklonaler Antikörper gegen die Aminosäuren 16-31, AXXORA
Penta-His Antikörper, BSA-frei, QIAGEN

Sekundäre Antikörper

Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) *Horseradish Peroxidase Conjugate, Blotting Grade*,
Bio-Rad Laboratories

Goat Anti-Mouse IgG (H+L) *Horseradish Peroxidase-Conjugate, EIA Grade, Affinity Purified*,
Bio-Rad Laboratories

2.1.9 Mikroorganismen

Für Klonierungen sowie die Isolierung von Plasmid- sowie Bacmid-DNA wurden folgende *Escherichia coli* (*E. coli*)-K12-Sicherheitsstämme verwendet.

Tabelle 2.2: Genotypen der verwendeten *E. coli*-Stämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Hersteller
DH5 α	Φ 80d, <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , (rK ⁻ mK ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>), U169, F ⁻	Invitrogen
DB3.1	F ⁻ , <i>gyrA462</i> , <i>endA1</i> , Δ (<i>sr1-recA</i>), <i>mcrB</i> , <i>mrr</i> , <i>hsdS20</i> (rB-,mB-), <i>supE44</i> , <i>ara14</i> , <i>galK2</i> , <i>lacY1</i> , <i>proA2</i> , <i>rpsL20</i> (Smr), <i>xyl5</i> , Δ <i>leu</i> , <i>mtl1</i>	Invitrogen
DH10Bac	F ⁻ <i>mcrA</i> D(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) f80 <i>lacZ</i> M15 D <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> D(<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> I- <i>rpsL</i> <i>nupG</i> /bMON14272/pMON7124	Invitrogen
JM109	e14 ⁻ (McrA ⁻) <i>recA1</i> , <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> (rK ⁻ mrK ⁺) <i>supE44</i> , <i>relA1</i> Δ (<i>lac-proAB</i>), [F ⁺ <i>traD36</i> <i>proAB</i> <i>lacI^q</i> Z Δ M15]	Stratagene
NEB 10-beta	<i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>fhuA</i> , <i>lacX74</i> , <i>galK</i> , (ϕ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15), <i>mcrA</i> , <i>galU</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i> , <i>rpsL</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>)	NEB
XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F ⁺ <i>proAB</i> <i>lacI^q</i> Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene

2.1.10 Sf9-Insektenzellkultur**Material**

Dulbecco's PBS ohne Ca & Mg
FCS
Sf9-Zellen (SFM *adapted*)
Sf-900™ III SFM
Trypanblau Färbelösung

Firma

PAA
PAN
Invitrogen
Invitrogen
Invitrogen

2.1.11 Geräte**Gerät**

Auftragsloop 7,8 ml
Feinwaage
Fluoreszenzmikroskop CK40
Fluoreszenzmikroskop IX70
FPLC-Anlage Biotech ÄKTA-Purifier 10
Geldokumentationssystem ChemiDoc
Gefiltrationssäule Highload 26/60 Superdex 200 PG
Horizontal-Elektrophorese-Systeme
Kühl-Gefrier-Kombination
Inkubator, *E. coli*
Inkubator, *Sf9*-Zellkultur

Firma

Amersham Biosciences
Sartorius
Olympus
Olympus
Amersham Biosciences
Bio-Rad
Amersham Biosciences
Eigenbau, MHH
Liebherr
Heraeus
Sanyo

Leersäule, <i>Econo-column</i>	Bio-Rad
Magnetrührer MR Hei-Standard	Heidolph
Mikrowelle	Daewoo
Orbitalschüttler, <i>E.coli</i>	Thermo
Orbitalschüttler, Innova 44, <i>Sf9</i> -Zellen	New Brunswick
PCR <i>labcycler</i>	Sensoquest
pH-Meter 3520	Jenway
Photometer DU 800 Spektrophotometer	Beckman Coulter
Pipetten 2-5000 μ l	Gilson
Mikrotiterplattenlesegerät (<i>plate-reader</i>), Multiscan FC	Thermo
<i>Semi-dry</i> Blotkammer	PHASE
SDS-PAGE-Apparatur Mini-PROTEAN [®] 3 Cell	Bio-Rad
Spannungsquelle EV265	Consort
Sterilwerkbank	KOJAIR
<i>Stopped-flow</i> -Apparatur SF-61SX2	Hi-Tech Scientific
Thermostat <i>plus</i>	Eppendorf
Ultraschallgerät Sonoplus HD2200	Bandelin
Ultrazentrifuge Optima LE-80 K	Beckman Coulter
Rotoren 45 Ti, 70 Ti	
Ultrazentrifuge Optima Max	Beckman Coulter
Rotor TLA 120.1	
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	GFL
Wippe	Feinmechanische Werkstatt, MHH
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge Avanti Centrifuge J-20 XP	Beckman Coulter
Rotoren JLA 16.250, JA 25.50	
Zentrifuge Centrifuge J-HC	Beckman Coulter
Rotor JS 4.2	
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus

2.1.12 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial

Cryotubes, CryoPure
 Deckgläser, Abmessungen 22 mm x 22 mm x 22 mm 0,01 mm
 Falcon-Röhren, 15 ml und 50 ml
 Filtrationseinheiten, *Bottle Top* Filter, 22 μ M und 45 μ M PES
 Kolben, steril, mit Belüftungskappe, 125 - 1000 ml
 Mikrotiterplatten, 96 *well*, UV-Transparent, halbe Oberfläche
 Objektträger
 PCR-Reaktionsgefäß, 0,2 ml
 Petrischale
 Pipettenspitzen, 10 - 5000 μ l
 Pipettenspitzen, steril, 2 - 1000 μ l
 Plastikflaschen, 250 ml und 500 ml
 PVDF-Membran
 Reaktionsgefäße, 1,5 ml und 2 ml
 Serologische Pipetten, 2 - 50 ml
 Spritzen, Omnifix, 2 - 50 ml
 Sterilfilter, 0,22 μ M und 0,45 μ M PES
 Visking Dialyseschläuche

Hersteller

Sarstedt
 Roth
 Sarstedt
 Nalgene
 Corning
 Corning
 Roth
 Biozym
 Sarstedt
 Sarstedt
 Star Lab
 Corning
 Millipore
 Sarstedt
 Sarstedt
 Braun
 Millipore
 Serva

Vivaspin Konzentratoren, PES 4 ml und 20 ml, MWCO 50000 Da
Vivaspin Konzentratoren, PES 4 ml, MWCO 10000 Da
Whatman-Papier
Zellkulturflaschen, T25-T175
Zellkulturplatten, 6 *well*
Zellschaber

Vivascience
Vivascience
Whatman
Sarstedt
Nunc
Greiner

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von *E.coli*

Die Kultivierung von *E.coli*-Zellen erfolgt auf Agarplatten oder in Suspensionskultur (Umdrehungsgeschwindigkeit 220 rpm) in *Luria Bertani*-(LB)-Medium bei einer Temperatur von 37 °C unter aeroben Bedingungen. Im Anschluss an eine Transformation erfolgt die Anzucht der Bakterien in S.O.C.-Medium.

Die Selektion auf resistenzvermittelnde Plasmide erfolgt durch Antibiotikazusatz in folgenden Enkonzentrationen: Ampicillin (75 bis 100 µg/ml), Chloramphenicol (30 µg/ml), Gentamicin (7 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml) und Tetracyclin (10 µg/ml). Selektivplatten für die Blau-Weiß-Selektion von Transformanten werden mit 100 µg/ml X-Gal sowie 40 µg/ml IPTG supplementiert. Additiva werden den autoklavierten Nährmedien vor Gebrauch bei Temperaturen unter 40 °C zugesetzt.

Tabelle 2.3: Nährmedien für die Kultivierung von *E.coli*-Stämmen

LB-Medium	LB-Agar	S.O.C.-Medium
10 g/L Trypton	10 g/L Trypton	20 g/L Pepton
10 g/L Casein	10 g/L Casein	5 g/L Hefeextrakt
10 g/L Hefeextrakt	10 g/L Hefeextrakt	10 mM Natriumchlorid
5 g/L Natriumchlorid	5 g/L Natriumchlorid	2,5 mM Kaliumchlorid
	15 g/L Agar	10 mM Magnesiumchlorid
		10 mM Magnesiumsulfat
		20 mM Glucose

2.2.1.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterienstämme

Chemisch transformationskompetente *E.coli*-Stämme werden nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt. Mit einer Einzelkolonie eines *E.coli*-Stammes wird eine 20 ml Übernachtskultur angeimpft und wie unter 2.2.1.1 beschrieben kultiviert. Bei Bedarf erfolgt die Kultivierung in der Gegenwart eines Selektionsmarkers. Mit der Übernachtskultur werden 250 ml LB-Medium, supplementiert mit 20 mM MgSO₄, im Verhältnis 1:100 beimpft und bis zu einer OD₅₉₀ = 0,5 kultiviert. Die Zellen werden sedimentiert (2000 x g, 5 min, 4 °C) und das Sediment in 100 ml eiskalter TFB1-Lösung resuspendiert, 5 Minuten auf Eis inkubiert und zentrifugiert (2000 x g, 5 min, 4 °C). Das Zellpellet wird in 10 ml TFB2-Lösung resuspendiert und die Suspension 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wird in 100 µl Aliquots in vorgekühlte Eppendorfgläser überführt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Tabelle 2.4: Puffer für die Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Stämme

TFB1-Lösung	TFB2-Lösung
30 mM Kaliumacetat	10 mM MOPS
100 mM Rubidiumchlorid	10 mM Rubidiumchlorid
10 mM Calciumchlorid	10 mM Natriumchlorid
50 mM Manganchlorid	75 mM Calciumchlorid
15 % (w/v) Glycerin	15 % (w/v) Glycerin

2.2.1.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Stämme

Chemisch transformationskompetente *E. coli*-Zellen werden auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe eines Ligations- oder Rekombinationsansatzes bzw. 25 ng des zu transformierenden Plasmids, wird die Bakteriensuspension 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wird einem 30sekündigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, bevor eine 5minütige Inkubation auf Eis folgt. Die Bakteriensuspension wird mit 950 µl S.O.C.-Medium versetzt und 1 Stunde bei 37°C kultiviert. Aliquots der Zellen werden auf entsprechendem Selektivagar ausplattiert und bei 37°C über Nacht kultiviert. Bei der Transformation von DH10Bac™-Zellen folgt auf den Hitzeschock eine 4stündige Anzucht der Zellen in S.O.C.-Medium.

2.2.1.4 Plasmidpräparation

Plasmidpräparationen aus *E. coli* werden nach der Anleitung der Firma QIAGEN mit dem *Plasmid Mini Kit* und *Plasmid Midi Kit* mit den entsprechenden Puffern durchgeführt. Die Methode der Plasmidpräparation basiert auf einer modifizierten Strategie der alkalischen Lyse von Bakterien. Bei Mini-Präparationen wird das alkalische Bakterienlysate subsequent neutralisiert und in Hochsalz-Puffer überführt. Die säulenchromatographische Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt durch Adsorption der DNA an eine Silica-Membran unter hohen Salzbedingungen.

Das Prinzip der Midi-Präparation von Plasmid-DNA basiert auf der Bindung des Bakterienlysates unter Konditionen geringer Salzkonzentrationen an ein Anionenaustausch-Resin. Verunreinigungen werden durch einen Waschschriff mit einem Puffer moderater Salzkonzentration abgetrennt. Die Elution der Plasmid-DNA vom Resin erfolgt mit Hochsalzpuffer. Die Plasmid-DNA wird durch eine Isopropanol-Fällung konzentriert und entsalzt.

Bacmid-DNA wird nach einen alternativen Protokoll unter Verwendung der QIAGEN-Puffer isoliert.

2.2.1.5 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

3 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur werden pelletiert (2000 x g, 5 min, RT) und das Pellet in 250 µl eiskaltem Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Puffer P2 wird der Ansatz invertiert, mit 350 µl Puffer P3 versetzt und erneut invertiert. Im Anschluss an einen Zentrifugationsschritt (16 000 x g, 10 min, RT) wird das klare Lysat auf eine *QIAprep-spin*-Säule überführt. Diese wird zentrifugiert (16 000 x g, 1 min, RT) und der Durchfluss verworfen, da die DNA zu diesem Zeitpunkt an der Säule adhärirt vorliegt.

Das Waschen der Säule erfolgt durch die Zugabe von 750 µl Puffer PE und Zentrifugation (16 000 x g, 1 min, RT). Nach Verwerfen des Durchflusses wird der überschüssige Waschpuffer durch einen Zentrifugationsschritt (16 000 x g, 1 min, RT) entfernt. Die DNA wird mit 30 - 50 µl Puffer EB durch Zentrifugation (16 000 x g, 1 min, RT) eluiert.

2.2.1.6 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

100 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur werden zentrifugiert (2000 x g, 20 min, RT). Das Bakterienpellet wird in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wird der Ansatz mit 4 ml Puffer P2 supplementiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wird mit 4 ml Puffer P3 neutralisiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgt eine 30minütige Zentrifugation (6000 x g, 4°C). Der Überstand wird auf eine mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte *QIAGEN-tip 100*-Säule überführt. Die Säule wird zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgt mit 5 ml Puffer QF. Das Eluat wird durch die Zugabe von 3,5 ml Isopropanol gefällt und pelletiert (6000 x g, 30 min, 4°C). Nach einem Waschschriff mit 2 ml 70%igem Ethanol wird das DNA-Sediment luftgetrocknet und in 100 µl Puffer EB aufgenommen.

2.2.1.7 Bacmid-Präparation

Rekombinantes Bacmid wird aus 3 ml einer Suspensionskultur transformierter *E.coli*-DH10Bac™-Zellen isoliert. Zur Isolation der Bacmid-DNA werden die Zellen mindestens 16 h kultiviert. Die Suspension wird zentrifugiert (2000 x g, 5 min, RT) und das Pellet in 300 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach der Zugabe von 300 µl Puffer P2 wird die Suspension 5 Minuten inkubiert. Anschließend werden 300 µl Puffer P3 zugesetzt und die Lösung durch Invertieren gemischt. Es folgt eine 10 minütige Inkubation auf Eis bevor die Lösung zentrifugiert (14 000 x g, 10 min, RT) wird. Das klare Lysat wird isoliert und wiederholt zentrifugiert (14 000 x g, 10 min, RT). Der Überstand wird isoliert und durch die Zugabe von 800 µl Isopropanol gefällt. Die Lösung wird inkubiert (10 min, 4°C) und durch Zentrifugation (14 000 x g, 15 min, RT) pelletiert. Nach einem Waschschriff mit 500 µl 70%igem Ethanol wird das sedimentierte Bacmid zentrifugiert (14 000 x g, 5 min, RT). Das Pellet wird 10 Minuten luftgetrocknet und in 40 µl Puffer EB aufgenommen.

2.2.1.8 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgt mittels horizontaler Gelelektrophorese in Agarosegelen aus 0,8-1% (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer, der auch als Laufpuffer dient. Für die Herstellung der Gelmatrix wird Agarose in Laufpuffer durch Erhitzen gelöst und die Lösung in eine Gelkammer gegossen. Vor dem Auftragen werden die DNA-Proben mit 6 x Auftragspuffer versetzt und zusammen mit einem geeigneten Längenstandard auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei einer konstanten Stromspannung von 100-120 V mit einer Laufzeit von einer Stunde.

Zur Visualisierung der DNA wird das Gel im Anschluss an die Elektrophorese 10 Minuten in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und anschließend 20 Minuten in Wasser entfärbt. Durch Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA werden die DNA-Fragmente unter UV-Licht (Anregungswellenlänge 312 nm) als Banden sichtbar. Zur Auswertung und Dokumentation werden die Gele mit dem Geldokumentationssystem ChemiDoc unter UV-Anregung fotografiert.

Tabelle 2.5: Puffer für die Agarosegelelektrophorese

50 x TAE-Puffer	6 x Auftragspuffer
2 M Tris/HCl pH 8,0	0,2 % Bromphenolblau
1 M Essigsäure	0,2 % Xylencyanol FF
0,5 M EDTA	60 % Glycerin
	60 mM EDTA

2.2.1.9 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung und Aufreinigung von spezifischen DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgt nach dem Protokoll der Firma QIAGEN mit dem *MinElute Gel Extraction Kit*. Dabei bindet DNA in Anwesenheit hoher Konzentrationen an chaotropen Salzen an eine Silikat-Membran und wird anschließend durch Puffer mit geringer Salzkonzentration eluiert.

DNA-Fragmente werden nach der präparativen Gelelektrophorese unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel isoliert. Das Gel-Fragment wird mit dem dreifachen Volumen Puffer QC versetzt und bei 50°C geschmolzen. Die Lösung wird mit einem Gelvolumen Isopropanol versetzt und auf eine *MinElute*-Säule überführt. Nach einer Zentrifugation (16 000 x g, 1 min, RT) wird die Säule mit 500 µl Puffer QG beladen und erneut zentrifugiert (16 000 x g, 1 min, RT). Die Säule wird mit 750 µl Puffer PE gewaschen, 5 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (16 000 x g, 1 min, RT). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (16 000 x g, 1 min, RT) wird die DNA durch die Zugabe von 10 µl Puffer EB nach einer 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur durch Zentrifugation (16 000 x g, 1 min, RT) eluiert.

2.2.1.10 DNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung von DNA erfolgt durch die photometrische Bestimmung der Absorption bei 260 nm. Die Absorption wird in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bestimmt. Für die photometrische Konzentrationsbestimmung wird für doppelsträngige DNA bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eine Absorption (OD_{260}) von 1 angenommen. Zusätzlich wird die Reinheit der DNA-Präparation anhand des Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ermittelt; dieser sollte zwischen 1,8 und 2,2 betragen.

2.2.2 Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren

Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren werden nach den Empfehlungen der Firmen *BMI Fermentas* sowie *New England Biolabs* durchgeführt.

2.2.2.1 Restriktionsanalyse

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen liefert lineare DNA-Fragmente mit definierten Enden. Für Restriktionsanalysen im analytischen Maßstab werden 0,4-1 μg DNA mit 1-3 U des jeweiligen Enzyms für 5-90 min bei der optimalen Arbeitstemperatur der Restriktionsendonuklease inkubiert.

In analytischen Ansätzen beträgt das Gesamtvolumen 20 μl ; präparative Ansätze haben ein Gesamtvolumen von 100 μl und werden mit bis zu 10 μg DNA angesetzt.

Bei Doppelrestriktionen werden die Pufferempfehlungen des Herstellers befolgt. Die Inaktivierung der Restriktionsenzyme vor der Durchführung nachfolgender enzymatischer Modifikationen erfolgt durch Hitzeinaktivierung der Restriktionsendonuklease nach Herstellerangaben.

2.2.2.2 Dephosphorylierungsreaktion mit Alkalischer Phosphatase

Die Dephosphorylierung der 5'- und 3'-Enden linearer DNA-Fragmente, die durch restriktionsenzymatische Spaltungen entstehen, wird durch das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) katalysiert. Durch die Dephosphorylierung wird die Rezirkularisierung linearisierter Vektor-DNA bei der Ligation minimiert und die Ligationseffizienz erhöht.

Die Dephosphorylierung kohäsiver Enden erfolgt direkt im Restriktionsansatz. Hierzu wird der Reaktionsansatz mit 1 U/ μg DNA Alkalische Phosphatase oder FastAP[™] supplementiert und 10-30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Hitzeinaktivierung des Enzyms erfolgt durch 5 minütige Inkubation bei 75°C.

2.2.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden doppelsträngige DNA-Fragmente durch die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden unter ATP-Hydrolyse verbunden. Diese Reaktion wird durch das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert. Das Enzym ligiert sowohl DNA mit kohäsiven als auch mit glatten (*blunt*) Enden.

Für eine Ligation werden 150 ng restriktionsenzymatisch linearisierte und dephosphorylierte Vektor-DNA und eine restriktionsenzymatisch modifizierte Insert-DNA in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem durchgeführt. Um die Ligationseffizienz zu erhöhen, wird die Vektor-Konzentration der verfügbaren Menge an Insert-DNA im molaren Verhältnis von *circa* 1:5 angepasst. Der Ansatz wird über Nacht bei 16°C inkubiert und nach der Hitzeinaktivierung der Ligase (10 min, 65°C) direkt zur Transformation von *E. coli* eingesetzt.

Im Anschluss an die ortsspezifische Mutagenese werden 25 ng PCR-Produkt durch die *Quick* T4-DNA-Ligase (NEB) nach Herstellerangaben zirkularisiert.

2.2.2.4 Klonierung mittels Gateway[®]-Technologie

Die Gateway[®]-Technologie der Firma Invitrogen ist eine Klonierungsmethode, die durch einen effizienten Transfer von heterologen DNA-Sequenzen zwischen multiplen Vektorsystemen gekennzeichnet ist. Das Gateway[®]-System basiert auf zwei Reaktionen des positionsspezifischen Rekombinationssystems des Bakteriophagen λ : der BP- und der LR-Reaktion.

2.2.2.5 Gateway[®]BP-Reaktion

Die BP (*attB* x *attP*)-Reaktion wird vom *Gateway[®] BP Clonase[™] II Enzym Mix* katalysiert. Dieser Enzymmix enthält das Rekombinationsprotein Integrase (Int) des Bakteriophagen λ und das von *E.coli* kodierte Protein *Integration Host Factor* (IHF). Der Enzymmix katalysiert die *in vitro* Rekombination zwischen einer DNA-Sequenz, die terminale *attB1*- und *attB2*-Stellen enthält, mit einem Donorvektor, der *attP*-Stellen besitzt. Der resultierende Eingangsklon (*entry*-Klon) enthält das gewünschte DNA-Segment, das von *attL1*- und *attL2*-Stellen flankiert wird.

Eine Negativselektion gegenüber dem bei der Rekombination ebenfalls entstehenden Nebenprodukt erfolgt durch das *ccdB*-Gen. Das CcdB-Protein interferiert mit der bakteriellen DNA-Gyrase und unterbindet das Wachstum der Bakterienzelle.

Die BP-Reaktion wird nach Angaben des Herstellers durchgeführt. In der BP-Reaktion werden 35 - 50 fmol *attB*-PCR-Produkt sowie 25 fmol Donorplasmid mit TE-Puffer auf ein Endvolumen von 8 μ l aufgefüllt und mit 2 μ l *BP Clonase[™] II Enzym Mix* versetzt. Der Rekombinationsansatz wird über Nacht bei 25 °C inkubiert. Die Zugabe von 1 μ l Proteinase K und eine 10 minütige Inkubation des Ansatzes bei 37 °C stoppt die Reaktion. 1 μ l des Reaktionsansatzes wird, wie unter 2.2.1.3 beschrieben, in einen *recA, endA E.coli*-Stamm transformiert.

2.2.2.6 Gateway[®]LR-Reaktion

Die LR (*attL* x *attR*)-Reaktion wird vom *Gateway[®] LR Clonase[™] II Enzym Mix* vermittelt. Dieser Enzym-Mix enthält die Proteine Integrase (Int) und Exisionase (Xis) des Bakteriophagen λ und das von *E.coli* kodierte Protein IHF. Der Enzymmix katalysiert den Transfer eines *attL*-flankierten DNA-Segments aus dem Eingangsklon in einen *attR*-Gateway[®]-Expressionsvektor. Bei den Rekombinationsstellen in Gateway[®]-Expressionsvektoren handelt es sich um die *attR1*- und *attR2*-Stellen, die das *ccdB*-Gen flankieren. Neben dem gewünschten Expressionsklon entsteht ein Nebenprodukt, welches die von *attP1*- und *attP2*-Stellen flankierte Sequenz für das toxische *ccdB*-Gen enthält. Die Präsenz des *ccdB*-Gens ermöglicht die Selektion der Vektoren im Anschluss an die Rekombination und Transformation.

Die LR-Reaktion wird nach Angaben des Herstellers durchgeführt. 35 - 50 fmol Eingangvektor und 35 fmol Destinations-Plasmid werden mit TE-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 8 μ l eingestellt. Der Ansatz wird mit 2 μ l *LR Clonase[™] II Enzym Mix* supplementiert und über Nacht bei 25 °C inkubiert. Durch Zugabe von 1 μ l Proteinase K und einer Inkubation (10 min, 37 °C) wird die Rekombination beendet. 1 μ l des Rekombinationsansatzes wird in einen *recA, endA E.coli*-Stamm transformiert.

2.2.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR) und ortsspezifische Mutagenese

Die Methode der *in vitro* Amplifikation von DNA dient der Herstellung spezifischer DNA-Fragmente. Die PCR an Plasmid-DNA wird durchgeführt, um definierte DNA-Fragmente zu amplifizieren, die nicht durch restriktionsenzymatische Spaltung isoliert werden können. Als Enzym wird die *Phusion[®] High-Fidelity* DNA Polymerase (NEB) eingesetzt, die sich durch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität und eine hohe Prozessivität auszeichnet. Des Weiteren erzeugt sie Amplifikate mit glatten Enden.

Die ortsspezifische (*site-directed*) Mutagenese wird eingesetzt, um gezielt Mutationen auf DNA-Ebene zu generieren. Mutationen in Form von Deletionen, Insertionen oder Punkt-Mutationen werden durch die exponentielle PCR-Amplifikation von doppelsträngigen Plasmiden durch die *Phusion[®] Hot Start High-Fidelity* DNA Polymerase (NEB) eingeführt. Die *Hot Start*-Modifikation dieser Polymerase basiert auf der Kombination der Polymerase mit einem reversiblen, spezifischen Affibody[®] Protein, welches die Polymeraseaktivität bei Raumtemperatur inhibiert. Diese Inhibition verhindert die Amplifikation unspezifischer PCR-Produkte und die Degradation von Primern und *template*-DNA im Reaktionsansatz. Bei Polymerisationstemperaturen weist die *Hot Start* Polymerase die gleichen Attribute wie die *Phusion[®] High-Fidelity* DNA Polymerase auf. Tabelle 2.6 beschreibt exemplarisch einen Reaktionsansatz und Tabelle 2.7 ein allgemeines PCR-Profil.

Tabelle 2.6: 50 μ l PCR-Ansatz für die *Phusion[®] (Hot Start)* DNA Polymerase

Substanz	Volumen	Endkonzentration
5 x <i>Phusion[®] HF</i> Puffer	10 μ l	1 x
10 mM dNTP-Mix	1 μ l	je 200 μ M
Primer (je 10 μ M)	2,5 μ l	je 0,5 μ M
<i>template</i> -DNA	1 μ l	100 pg - 100 ng
Polymerase (2 U/ μ l)	0,5 μ l	0,02 U/ μ l
ddH ₂ O	ad 50 μ l	

Die PCR Amplifikation des zu mutierenden Plasmids erfolgt durch zwei phosphorylierte Primer, die "back to back" auf dem Plasmid binden. Die Zirkulation des mutierten PCR-Produktes erfolgt durch die Ligation mit *Quick* T4-DNA-Ligase (NEB) (siehe Abschnitt 2.2.2.3).

Tabelle 2.7: PCR-Profil für die Amplifikation und Mutagenese von Plasmid-DNA

Reaktion	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Denaturierung	98	30	1 x
Denaturierung	98	10	25 - 35 x
<i>annealing</i>	50 - 54	30	
Elongation	72	30/1 kbp	
Finale Elongation	72	300	1 x
Lagerung	8	∞	

2.2.2.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgt mit dem *MinElute PCR-Purification Kit* nach der Vorschrift des Herstellers QIAGEN. Die Aufreinigung von doppelsträngigen PCR-Produkten ermöglicht die Abtrennung von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen, die mit nachfolgenden enzymatischen Reaktionen interferieren könnten. Für die Aufreinigung wird ein PCR-Ansatz mit 5 Volumeneinheiten Puffer PB versetzt und auf eine *MinElute*-Säule überführt. Die Säule wird zentrifugiert (16 000 x g, 1 min, RT). Zum Waschen wird die Säule mit 750 μ l Puffer PE beladen und erneut zentrifugiert (16 000 x g, 1 min, RT). Die vollständige Entfernung des Waschpuffers erfolgt durch Zentrifugation (16 000 x g, 1 min, RT). Die Elution des PCR-Produktes erfolgt durch

die Zugabe von 10 μl Puffer EB, einer Inkubation (1 min, RT) sowie einem Zentrifugationsschritt (16 000 $\times g$, 1 min, RT).

2.2.2.9 A-tailing

Für die Klonierung von PCR-Produkten mit glatten Enden in das pGEM[®]-T-Vektor-System (Promega) müssen die Amplifikate am 3'-Ende mit einem Desoxyadenosin-Überhang versehen werden. Dieses kann durch die Verwendung einer *Taq* DNA-Polymerase und dATP erreicht werden. Amplikons, die durch eine thermostabile DNA-Polymerase amplifiziert wurden, werden nach der Aufreinigung (siehe Abschnitt 2.2.2.8) der *A-tailing*-Reaktion unterzogen. Hierzu werden in einem 10 μl -Reaktionsansatz 5 μl PCR-Produkt, 1 μl dATP (1 mM) und 1 μl 10 \times *Taq* Puffer mit 1 μl *Taq* Polymerase (5 U/ μl) (QIAGEN) versetzt und 30 min bei 72 °C inkubiert.

2.2.3 Proteinbiochemische Arbeiten

2.2.3.1 Protein-Quantifizierung durch UV-Absorptionsmessung

Die Konzentrationsbestimmung einer Proteinlösung erfolgt durch die Absorptionsmessung bei 280 nm. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin stark sowie Phenylalanin schwach. Die Absorption einer Proteinlösung wird mit einem Spektralphotometer im Wellenlängenbereich zwischen $\lambda = 240$ und 440 nm gemessen. Mit dem Spektrum wird die Reinheit der Proteinpräparation überprüft und mit dem Lambert-Beerschen-Gesetz die Konzentration bestimmt. Bei bekannter Aminosäuresequenz kann der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280\text{nm}}$ eines Proteins durch das Programm Protparam [<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>] ermittelt werden.

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von denaturierten Proteinen erfolgt durch vertikale, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli. Bei der Probenvorbereitung werden die proteinhaltigen Proben mit 3 \times Laemmli-Auftragspuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die SDS-PAGE wird in Mini-PROTEAN 3 Gelkammern der Firma Bio-Rad durchgeführt. Für die Analyse von Proteinen werden Zweikomponenten-SDS-Polyacrylamidgele verwendet, die aus einem 10%igen Trenngel und einem 6%igen Sammelgel bestehen. Gradientengele (4-20 %, (*Precise Protein Gel*)) werden von der Firma Pierce bezogen und zur Analyse von Proteinaufreinigungen eingesetzt.

Die proteinhaltigen Proben werden nach der Vorbehandlung in die Geltaschen überführt. Die Elektrophorese erfolgt bei einem Konstantstrom von 30 mA für 1 h. Nach der Elektrophorese werden die Gele entweder in einer Proteinfärbung oder in einem Western-Blot eingesetzt.

Tabelle 2.8: Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

Sammelgel (6 %)	Trenngel (10 %)	HEPES-Laufpuffer	3 \times Laemmli-Auftragspuffer
20 % Acrylamid-Bis (30 %)	33,3 % Acrylamid-Bis (30 %)	0,1 M Tris pH 8,0	0,2 M Tris/HCl pH 6,8
12,7 % 1 M Tris/HCl pH 6,8	28 % 1 M Tris/HCl pH 8,8	0,1 M HEPES	33 % Glycerin
10 % SDS (1 %)	10 % SDS (1 %)	3 mM SDS	3 % SDS
0,2 % APS	0,2 % APS		3,2 % β -Mercaptoethanol
0,2 % TEMED	0,2 % TEMED		0,0016 % Bromphenolblau
60,7 % ddH ₂ O	28,3 % ddH ₂ O		

Die Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Analyse erfolgt durch SDS-PAGE. Die Probe wird mit 3 \times Laemmli-Auftragspuffer versetzt und durch Erhitzen denaturiert. Nach dieser

Vorbehandlung wird die Probe mit 2 μ l Acrylamid versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch diesen Schritt werden Cysteine propioamidiert. Nach der Elektrophorese wird das Gel gefärbt und entfärbt. Die weitere Probenaufarbeitung sowie die Durchführung der massenspektroskopischen Analyse erfolgt in Kooperation durch PD Dr. A. Pich (Institut für Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover).

2.2.3.3 Färbung von SDS-PAGE-Gelen

Im Anschluss an die SDS-PAGE wird das Gel in der Mikrowelle (2 min) in Wasser erhitzt. Die Gelmatrix wird in PageBlue[®]-Lösung (Fermentas) überführt, 2 min in der Mikrowelle erwärmt und 10 min in der Färbelösung inkubiert. Der Farbstoff, basierend auf Coomassie Brilliant Blue G-250, färbt sensitiv Proteine direkt in der Gelmatrix an. Die Gelmatrix wird in Wasser gewaschen und der überschüssige Farbstoff durch Kochen des Gels in der Mikrowelle entfernt. Die Dokumentation des Gels erfolgt mittels eines Flachbettscanners.

2.2.3.4 Western-Blot

Durch SDS-PAGE separierte Proteine werden durch Elektrotransfer aus dem Laemmli-Gel auf eine PVDF-Nitrozellulosemembran transferiert. Für den Proteintransfer werden die PVDF-Membran sowie 4 Whatman-Papiere auf die Größe des Gels zugeschnitten. Die Membran wird durch Einlegen in reinem Methanol aktiviert. Die Whatman-Papiere sowie die aktivierte Membran werden in Transferpuffer äquilibriert. Der Aufbau des *semi-dry*-Elektroblots erfolgt nach der *sandwich*-Anordnung: Hierzu werden zwei Blatt äquilibriertes Whatman-Papier auf die Kathode gelegt. Das Trenngel wird luftblasenfrei platziert. Darauf folgen die äquilibrierte PVDF-Membran und das restliche Filterpapier. Der Elektrotransfer erfolgt bei einem Konstantstrom von 150 mA für die Dauer von einer Stunde.

Für die Immundetektion wird die Membran nach dem Proteintransfer 30 min bei einer Temperatur von 4°C in 10 ml *blocking*-Puffer blockiert.

Die anschließende Inkubation (über Nacht, 4°C) mit dem Primärantikörper erfolgt in Verdünnungen des Antiserums von 1:1000 bis 1:2000 in *blocking*-Puffer unter ständigem Schwenken der Membran. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 15 Minuten mit 1 x TBS folgt die einstündige Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper in *blocking*-Puffer. Anschließend wird die Membran erneut dreimal 15 Minuten in 1 x TBS gewaschen. Die Visualisierung des Blots erfolgt durch Chemolumineszenz mit dem *Super Signal Dura West Extended Duration*-Substrats der Firma Pierce nach Herstellerangaben. Hierzu wird die PVDF-Membran 5 Minuten mit einer 1:1 Mischung der Lösungen *Luminol/Enhancer* und *Stable Peroxide*-Puffer inkubiert, das Substrat anschließend entfernt und die Membran in Plastik eingeschweißt. Die Detektion des Chemolumineszenzsignals erfolgt durch das Videodokumentationssystem ChemiDoc.

Tabelle 2.9: Puffer für den Western-Blot

20 x Transferpuffer	<i>blocking</i> -Puffer	10 x TBS
200 mM Tris/HCl pH 8,0 2 M Glycin 12,5 % Methanol	5 % Magermilchpulver in 1 x TBS	500 mM Tris/HCl pH 7,4 1,5 M NaCl

2.2.3.5 Präparative Aufreinigung von His₆-Fusionsproteinen

Die Proteinaufreinigung von rekombinanten Myosinen aus Baculovirus-infizierten *Sf9*-Zellen wird bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt. Puffer und Lösungen werden auf diese Temperatur vorgekühlt. Für die Präparation kann sowohl frisches als auch gefrorenes Zellmaterial verwendet werden. Zellen werden wie unter 2.2.4.8 beschrieben isoliert. Das Zellpellet wird in

600 ml Lysispuffer resuspendiert und mit Ultraschall auf Eis aufgeschlossen. Dabei wird die Lösung 3 x 30 Sekunden mit Ultraschall (*power setting*: 40 %, *duty cycle*: 50 %) behandelt. Die Behandlungsintervalle werden durch Pausen (30 s) unterbrochen, um die Erwärmung der Lösung zu minimieren. Die Zellsuspension wird ultrazentrifugiert (138 000 x g, 30 min, 4 °C, Rotor: 45 Ti). Für die Ni-NTA-Affinitätschromatographie wird die Nickelmatrix (Ni-NTA-*superflow*, QIAGEN) vor der Inkubation mit dem proteinhaltigen Überstand äquilibriert. Hierzu werden 10 ml Säulenmaterial in 120 ml Säulenpuffer resuspendiert, das Resin zentrifugiert (700 x g, 5 min, 4 °C) und der Überstand verworfen.

Das klare Lysat wird im Anschluss an die Ultrazentrifugation auf die äquilibrierte Ni-NTA-*superflow*-Säule überführt und 150 min bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Die Suspension wird zentrifugiert (700 x g, 5 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Säulenmaterial wird in 300 ml ATP-Waschpuffer aufgenommen, 15 min schüttelnd inkubiert und zentrifugiert (700 x g, 5 min, 4 °C). Das Resin wird in 300 ml Waschpuffer 1 resuspendiert, zentrifugiert (700 x g, 5 min, 4 °C) und das Sediment in 300 ml Waschpuffer 2 aufgenommen. Die Suspension wird in eine Leersäule überführt und das His₈-Fusionsprotein mit Elutionspuffer, der einen Imidazolgradienten enthält, eluiert.

Proteinhaltige Fraktionen werden durch SDS-PAGE analysiert. Myosinhaltige Fraktionen werden vereint und über Nacht gegen 3 L Dialysepuffer dialysiert. Die Dialyseschläuche aus regenerierter Zellulose (MWCO12-14 kDa) werden vor der Benutzung in 25 mM EDTA gekocht, mit Wasser gespült und bis zur Verwendung in 50 %iger Glycerin-Lösung bei 4 °C gelagert.

Das Dialysat wird durch Ultrafiltration in *Vivaspin*-Standardkonzentratoren (MWCO 50 kDa) durch Zentrifugation (3000 x g, 4 °C) auf ein Endvolumen von $\approx 2,5$ ml konzentriert. Diese Anreicherung ist notwendig, um eine scharfe Auftrennung des Proteinkonzentrats bei der nachfolgenden Gelfiltration zu erreichen.

Die Gelfiltration trennt gelöste Moleküle nach ihrer Größe bzw. dem hydrodynamischen Volumen und basiert auf der unterschiedlichen Permeation der Analyten in ein poröses Trägermaterial mit definierter Porengröße. Als Trennmatrix wird "Superdex", ein zusammengesetztes Gel, welches durch kovalente Bindungen von Dextranketten an eine hochgradig quervernetzte Agarosegelmatrix entsteht, eingesetzt. Als System für die Gelchromatographie wird die FPLC-Anlage *Äkta purifier 10* mit der gepackten Säule *Superdex[®] 26/60-200 prep grade* der Firma Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Die Säule hat ein Bettvolumen von 320 ml und ist für eine Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 10 bis 600 kDa geeignet.

Nach der Äquilibration des Systems mit dem zweifachen Säulenvolumen (CV) filtriertem und entgastem Dialysepuffer wird das zu analysierende Proteinkonzentrat luftblasenfrei in die Probenschleife injiziert. Die Probe wird mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die Gelfiltrationssäule geladen und anschließend mit Dialysepuffer eluiert, wobei das Eluat fraktioniert gesammelt wird. Die Flussrate der mobilen Phase liegt bei 0,5 ml/min bei einem Maximaldruck von 0,5 MPa. Während des Laufes wird die Absorption bei 280 nm sowie 514 nm bei der Gelfiltration von EYFP-enthaltenden Proteinen mit einem UV-VIS-Spektralphotometer kontinuierlich detektiert.

Im Anschluss an die Gelfiltration werden proteinhaltige Fraktionen per SDS-PAGE analysiert. Myosinhaltige Fraktionen werden vereinigt, durch Ultrafiltration auf Konzentrationen von 4-15 mg/ml eingeeengt, in *storage*-Puffer in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.3.6 Präparation von Aktin aus Kaninchenmuskel

Für die funktionale, biochemische und kinetische Charakterisierung eines Myosins wird Aktin, ein Interaktionspartner des Myosins, benötigt. Die Präparation von G- und F-Aktin aus Aktin-Acetonpulver erfolgt nach einem 2-stufigen Protokoll. Im ersten Schritt wird Aktin-Acetonpulver aus Kaninchenmuskel präpariert und aus diesem Ausgangsmaterial in einem folgenden Schritt monomeres- oder filamentöses Aktin gewonnen. Alle Präparationsschritte werden, wenn nicht anders angegeben, bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt. Puffer und Lösungen werden auf diese Temperatur vorgekühlt.

Tabelle 2.10: Puffer für die Aufreinigung von His₆-Fusionsproteinen

Lysispuffer	Säulenpuffer	ATP-Waschpuffer	Waschpuffer 1
50 mM HEPES pH 7,3	25 mM HEPES pH 7,3	25 mM HEPES pH 7,3	25 mM HEPES pH 7,3
300 mM NaCl	300 mM NaCl	600 mM NaCl	300 mM NaCl
3 mM MgCl ₂		0,5 mM ATP	0,1 mM EGTA
2 mM ATP		0,1 mM EGTA	3 mM MgCl ₂
10 mM β -Mercaptoethanol		3 mM MgCl ₂	40 mM Imidazol
4 mM Imidazol		20 mM Imidazol	
6 Complete-Tabletten		7 mM β -Mercaptoethanol	
		1 % Triton X-100	

Waschpuffer 2	Elutionspuffer	Dialysepuffer	<i>storage</i> -Puffer
25 mM HEPES pH 7,3	25 mM HEPES pH 7,3	25 mM HEPES pH 7,3	25 mM HEPES pH 7,3
500 mM NaCl	400 mM NaCl	400 mM NaCl	400 mM NaCl
0,1 mM EGTA	0,2 mM EGTA	1 mM EGTA	1 mM EGTA
3 mM MgCl ₂	3 mM MgCl ₂	1 mM EDTA	1 mM EDTA
65 mM Imidazol	100-850 mM Imidazol	1 mM DTT	1 mM DTT
		3 % Trehalose	10 % Trehalose

2.2.3.7 Präparation von Aktin-Acetonpuder

Die Präparation von Aktin-Acetonpuder erfolgt aus vier Weißen Neuseeland Kaninchen. Den Tieren werden nach der Tötung die Vorder- und Hinterlaufmuskulatur sowie die Rückenmuskulatur entnommen und das Muskelgewebe auf Eis gekühlt. Die Muskeln werden von Faszien, Sehnen und Fett befreit, manuell zerkleinert und durch einen Fleischwolf gedreht. Das Fleisch wird in 3 Volumen Guba-Straub-Puffer für 10-20 min unter Rühren extrahiert. Die Suspension wird mit 12 Volumen kalten Wassers supplementiert und gerührt. Die Suspension wird durch zwei Lagen Mullverband filtriert. Das Retentat wird ausgewogen, in 5 Volumina Carbonat-Puffer A aufgenommen und 30 min gerührt. Die Suspension wird erneut durch zwei Lagen Mullverband gefiltert und das Retentat in dem gleichen Volumen Carbonat-Puffer B aufgenommen, 10 min gerührt und mit dem 5fachen des Volumens warmen Wassers verdünnt. Die Suspension wird wiederholt durch zwei Lagen feinmaschiges Baumwolltuch filtriert und der Filtrationsrückstand in 2,5 L (pro kg Kaninchenfleisch) kaltem Aceton für 30 min gerührt und erneut durch 2 Lagen Mullverband filtriert. Dieser Vorgang wird einmal wiederholt. Das entstandene Acetonpuder wird zerkleinert und auf Filterpapier über Nacht unter der Sterilbank getrocknet.

Die Langzeitlagerung erfolgt bei einer Temperatur von -20 °C in einer Plastikbox. Aus 2,5 kg Kaninchenmuskel können ca. 225 g trockenes Acetonpuder gewonnen werden. Das Aktin-Acetonpulver steht als Ausgangsmaterial für die Präparation von G- und F-Aktin zur Verfügung.

Tabelle 2.11: Puffer für die Aktin-Acetonpuder-Präparation aus Kaninchenmuskel

Guba-Straub-Puffer	Carbonat-Puffer A	Carbonat-Puffer B
0,3M KCl	47,6 mM NaHCO ₃	10 mM NaHCO ₃
0,1 M KH ₂ PO ₄	0,1 mM CaCl ₂	10 mM Na ₂ CO ₃
0,05 M K ₂ HPO ₄		0,1 mM CaCl ₂
pH 6,5		

2.2.3.8 Präparation von F- und G-Aktin

Aktin-Acetonpuder wird aus Kaninchenmuskel gewonnen (siehe Abschnitt 2.2.3.7). 5 g gemörser-tes Aktinpuder wird mit 80-100 ml Aktin-Puffer versetzt und 30 min gerührt. Mit Hilfe einer Nutsche wird die Aufschlammung durch 2 Lagen Filterpapier in einen Büchner-Trichter filtriert.

Zur Erhöhung der Ausbeute wird das Filterpapier mehrfach mit Aktin-Puffer gewaschen. Nach diesem Schritt beträgt das Gesamtvolumen ungefähr 120 ml.

Die Lösung wird ultrazentrifugiert (70 000 x g, 60 min, 4 °C, Rotor 70 Ti). Das Volumen des aktinhaltigen Überstands nach der Zentrifugation wird ermittelt und die Polymerisation von monomeren G-Aktin zu filamentösem Aktin durch die Zugabe von KCl sowie MgCl₂ zu Endkonzentrationen von 100 mM bzw. 2 mM induziert. Die Aktinlösung wird mindestens 2 h bei Raumtemperatur polymerisiert. Nach der Polymerisation wird die Lösung ultrazentrifugiert (70 000 x g, 180 min, 4 °C, Rotor 70 Ti). Das aktinhaltige Sediment wird mit Hilfe eines Hand-Homogenisators in 50 ml Depolymerisationspuffer homogenisiert und über Nacht gegen 5 L Depolymerisations-Puffer dialysiert. Das Dialysat wird zentrifugiert (70 000 x g, 60 min, 4 °C Rotor 70 Ti). Das Volumen des Überstands wird bestimmt und die Konzentration der Proteinlösung durch Messung der Absorption bei 280 nm ($\epsilon_{280} = 46\,000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, MW = 41,7 kDa) bestimmt.

Für die Herstellung von G-Aktin wird die Lösung mittels Ultrafiltration (MWCO 10 kDa) auf die gewünschte Konzentration eingengt. Die Lösung wird tropfenweise in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei einer Temperatur von -80 °C gelagert. Nach dem Auftauen wird der finale Polymerisationsschritt im entsprechenden Assay-Puffer durch die Zugabe von KCl und MgCl₂ zu finalen Konzentrationen von 100 mM bzw. 2 mM induziert. Um lange Aktin-Filamente zu erhalten, kann die Polymerisation über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C erfolgen.

Für die Herstellung von F-Aktin wird im Anschluss an die Konzentrationsbestimmung das Volumen des Überstands ermittelt und dieser mit Depolymerisations-Puffer auf eine Aktin-Konzentration von 1-2 mg/ml eingestellt. Die Polymerisation des G-Aktins zu filamentösem Aktin wird durch die Zugabe von KCl sowie MgCl₂ zu finalen Konzentrationen von 100 mM bzw. 2 mM induziert. Die Polymerisation erfolgt durch die Inkubation der Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wird das Polymer sedimentiert (70 000 x g, 180 min, 4 °C, Rotor 70 Ti). Das Sediment kann bei einer Temperatur von 4 °C gelagert werden. Vor dem Gebrauch wird das Pellet mit Hilfe eines Hand-Homogenisators in 1-2 ml Homogenisations-Puffer resuspendiert und die Aktinkonzentration photometrisch ermittelt. Aus 5 g Aktinpuder kann durchschnittlich 50 mg F-Aktin gewonnen werden.

Tabelle 2.12: Puffer für die Präparation von G- und F-Aktin

Aktin-Puffer	Depolymerisations-Puffer	Homogenisations-Puffer
10 mM HEPES pH 8,0	5 mM HEPES pH 7,5	5 mM HEPES pH 7,5
0,5 mM ATP	0,2 mM CaCl ₂	2 mM MgCl ₂
0,2 mM CaCl ₂	1 mM NaN ₃	100 mM KCl
1 mM DTT	0,5 mM ATP	0,02 % NaN ₃

2.2.3.9 Präparation von Pyren-markiertem F-Aktin

Haloalkyl-Reagenzien sind fluoreszenzmarkierende Reagenzien für die chemische Thiol-Modifikation. Das Thiol-reaktive N-(1-pyren)iodoacetamid, Pyren, kann verwendet werden, um umgebungssensitive Biokonjugate zu erzeugen (Abbildung 2.3). Für die transientenkinetische Analyse der Interaktion zwischen Myosin und filamentösem Aktin wird F-Aktin spezifisch an Cys374 mit Pyren modifiziert [KOUYAMA und MIHASHI 1981]. Die starke Fluoreszenz der Reportergruppe in Kombination mit der starken Fluoreszenzlöschung ($\approx 70\%$) bei der Bindung an Myosin macht diesen Marker zu einem nützlichen Reagenz für transientenkinetische Studien [CRIDDLE *et al.* 1985].

Für die Modifikationsreaktion wird F-Aktin langsam in einem Verhältnis von 1:5 (w/w) mit Pyren versetzt und über einen Zeitraum von 16 Stunden unter Lichtausschluss gerührt. Die Lösung wird zentrifugiert (4700 x g, 4 °C, Rotor 70 Ti) um überschüssigen Farbstoff und denaturiertes Protein zu pelletieren, während F-Aktin im Überstand verbleibt. In einem weiteren Zentrifugationsschritt (70 000 x g, 180 min, 4 °C, Rotor 70 Ti) wird das fluoreszenzmarkierte F-Aktin pelletiert. Das Sediment wird in Homogenisations-Puffer (Tabelle 2.12) aufgenommen und die Konzentration

on an Pyren-Aktin photometrisch bestimmt. Bei der Konzentrationsbestimmung von Pyren-Aktin muss der Anteil der Pyren-Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm berücksichtigt werden. Die Pyren-Konzentration kann bei Wellenlänge von 344 nm ($\epsilon = 23\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) photometrisch bestimmt werden. Bei einer Wellenlänge von 280 nm wird der Anteil von Pyren ($\epsilon = 22\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) an der Gesamtabsorption bestimmt und von dieser subtrahiert. Der Markierungsgrad beträgt 60-90%.

2.2.3.10 Präparation von TRITC-Phalloidin-markiertem F-Aktin

Für den *in vitro*-Motilitätsassay wird F-Aktin mit TRITC-(Tetramethylrhodamin-B-isothiocyanat)-Phalloidin markiert. TRITC-Phalloidin ist ein fluoreszierendes Rhodaminyl-gekoppeltes Phalloidin-Derivat, das sich selektiv an filamentöses Aktin anlagert, es stabilisiert sowie dessen Depolymerisierung zu G-Aktin verhindert. Für die Fluoreszenzmarkierung wird eine Lösung aus $2\text{ }\mu\text{M}$ F-Aktin mit $3\text{ }\mu\text{M}$ des Fluorophors TRITC-Phalloidin im entsprechenden Assay-Puffer supplementiert. Die Lösung wird über Nacht unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert.

2.2.4 Zellkultur

2.2.4.1 Zelllinie und Kulturführung

Im Rahmen dieser Arbeit werden *Sf9*-Insektenzellen zur heterologen Expression rekombinanter humaner Myosine verwendet. *Sf9*-Zellen entstammen der Zelllinie IPLBSF-21AE, die aus dem pupalen ovarialen Gewebe des Heerwurmes *Spodoptera frugiperda* isoliert wurde.

Sf9-Insektenzellen werden unter sterilen Bedingungen kultiviert. Geräte und Materialien werden vor dem Gebrauch durch Autoklavieren hitzesterilisiert oder mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Lösungen sowie Baculoviren enthaltendes Medium werden vor der Benutzung sterilfiltriert ($0,22\text{ }\mu\text{M}$ Filter). Medien werden vor dem Gebrauch in einem Wasserbad auf eine Arbeitstemperatur von $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt.

Sf9-Zellen können sowohl adhären als auch in Suspension kultiviert werden. Sie besitzen eine Proliferationsrate von ungefähr 72 Stunden. Zum Wachstum benötigen die Zellen eine konstante Temperatur von $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ ohne CO_2 -Supplementierung. *Sf9*-Insektenzellen erscheinen unter dem Lichtmikroskop gleichmäßig rund und leicht granuliert. Mit Baculoviren infizierte Zellen sind größer, unregelmäßiger geformt und entwickeln größere Zellkerne.

2.2.4.2 Revitalisierung und Initiation einer *Sf9*-Kultur

Die Revitalisierung gefrorener *Sf9*-Zellen erfolgt durch das schnelle Erwärmen eines Zellaliquots im Wasserbad auf eine Temperatur von $27\text{ }^{\circ}\text{C}$. Das Zellmaterial wird in 10 ml Kompletmedium überführt und zentrifugiert ($1000\times g$, 5 min, RT). Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 10 ml Kompletmedium aufgenommen. Die Viabilität der Zellen sollte nach dem Auftauprozess mindestens 80% betragen. Die Zellsuspension wird über einen Zeitraum von zwei Wochen bis zum Erreichen einer maximalen Dichte von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml kultiviert; in dieser Zeit sollten die Zellen eine Minimaldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml nicht unterschreiten.

2.2.4.3 Kultivierung von *Sf9*-Zellen in Adhäsions- und Suspensionskultur

Die Kultivierung von *Sf9*-Zellen erfolgt entweder in Adhäsions- oder in Suspensionskultur. In Tabelle 2.13 sind Parameter für die Kultivierung der Insektenzellen in adhärenter Kultur aufgelistet. Die Kultivierung der Insektenzellen in Adhäsionskultur erfolgt in 6 well, T25-, T75- und T175-Zellkulturflaschen. Die Zellen werden in diesen Gefäßen bis zur Konfluenz unter Standardbedingungen kultiviert. Um die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten, wird das konditionierte Medium von dem Zellrasen entfernt und durch frisches Medium substituiert. Die

Zellen werden mechanisch mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden des Kulturgefäßes gelöst und im Verhältnis 1:5 in einem neuen Gefäß ausgesät.

Tabelle 2.13: Parameter für die Kultivierung von *Sf9*-Zellen als Adhäsionskultur

Gefäßgröße [cm ²]	Zelldichte bei Konfluenz	Volumen [ml]
9,6 (6 well)	1,2·10 ⁶	2
25	4,0·10 ⁶	4
75	1,2·10 ⁷	13
175	2,7·10 ⁷	35

Alternativ können *Sf9*-Insektenzellen in Suspension kultiviert werden. Die Umstellung einer Adhäsionskultur auf eine Suspensionskultur und *vice versa* erfolgt problemlos. Suspensionskulturen werden in sterilen Erlenmeyerkolben bei einer konstanten Umdrehungsgeschwindigkeit von 90 rpm bei einer Temperatur von 27 °C in Orbitalschüttlern kultiviert. Um einen optimalen Gasaustausch zu gewährleisten, werden die Kolben bis maximal 50 % des nominellen Volumens befüllt. Um ein Maximum an Viabilität und eine optimale Nährstoffversorgung zu gewährleisten, werden die Zellen zwischen einer Minimaldichte von 0,8·10⁶ Zellen/ml und einer Maximaldichte von 4·10⁶ Zellen/ml kultiviert. Die Subkultivierung der Suspensionskulturen erfolgt durch Verdünnen der Zellsuspension mit Kompletmedium.

Um die Akkumulation von Zelldebris und metabolischen Abbauprodukten in der Suspensionskultur zu minimieren und eine konstante Zellqualität zu gewährleisten, wird die Zellsuspension in dreiwöchigem Abstand zentrifugiert (1000 x g, 5 min, RT) und in frischem Kompletmedium aufgenommen. Um eine gleichbleibende Qualität des Zellmaterials zu erhalten wird im drei-Monatsrhythmus, der ungefähren Zeitspanne von 30 Passagen, eine neue Kultur initiiert.

2.2.4.4 Cryokonservierung

Zur Cryokonservierung werden Zellen einer Suspensionskultur mit einer maximalen Anzahl von 8 Passagen verwendet. Zur Qualitätskontrolle sollte sich diese Vorkultur in der logarithmischen Wachstumsphase befinden und eine Viabilität von 99 % aufweisen. Die Zellen werden zentrifugiert (1000 x g, 5 min, 4 °C) und mit vorgekühltem Einfriermedium auf eine Zelldichte von 1,5 - 2·10⁷ Zellen/ml eingestellt. Ein Milliliter der Zellsuspension wird in ein vorgekühltes Cryoröhrchen überführt und über einen Zeitraum von 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proben werden während des weiteren Einfrierprozesses in einer Styroporbox eine Stunde bei einer Temperatur von -20 °C gekühlt und anschließend über einen Zeitraum von 16 Stunden bei einer Temperatur von -80 °C gelagert. Für die Langzeitlagerung folgt eine Umlagerung in Flüssigstickstoff. Durch die langsame Abkühlrate während des Einfrierprozesses soll in Anwesenheit von DMSO die Eiskristallbildung in den Proben minimiert werden.

Einfriermedium	
50 %	konditioniertes Medium
42,5 %	Kompletmedium
7,5 %	DMSO

2.2.4.5 Zellzahl- und Viabilitätstestung

Zellzahl und Viabilität von *Sf9*-Zellen werden mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Für die Ermittlung der Anzahl vitaler Insektenzellen in einer Zellsuspension wird diese im Verhältnis 1:1 mit einer Trypanblau-Lösung versetzt. 10 µl der angefärbten Zellsuspension werden in eine

Zählkammer überführt. Die Gesamtzahl der Zellen sowie der Anteil gefärbter Zellen werden über 25 Zählquadranten des Hämozytometers ermittelt. Die Auszählung der Zellen erfolgt unter dem Lichtmikroskop mit 10-40facher Vergrößerung. Die Gesamtzahl der Zellen errechnet sich aus den Abmessungen der Zählkammer. Die ermittelte Zellzahl wird mit dem Verdünnungsfaktor sowie dem Faktor 10^4 multipliziert, um die Anzahl vitaler Zellen pro Milliliter Zellsuspension zu kalkulieren. Die Viabilität der *Sf9*-Zellen sollte mindestens 98 % betragen.

2.2.4.6 Transfektion

Die Transfektion von *Sf9*-Zellen mit rekombinanter baculoviraler DNA erfolgt durch das kationische Lipidreagenz *Cellfectin[®] II*. Für die Transfektion werden *Sf9*-Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden, eingesetzt. Pro Vertiefung einer 6 *well*-Platte werden $8 \cdot 10^5$ Zellen ausgesät. Das konditionierte Medium wird entfernt und durch 2 ml Komplettmedium substituiert. In separaten Reaktionsgefäßen werden zum einen 6 μ l *Cellfectin[®] II* mit 100 μ l Komplettmedium, zum anderen 6 μ l der rekombinanten baculoviralen DNA mit 100 μ l Komplettmedium versetzt. Die beiden Lösungen werden vereint und inkubiert (30 min, RT). Nach Zugabe von 800 μ l Komplettmedium wird das Transfektionsgemisch auf den Zellrasen getropft. Nach einer Inkubation (5 h, 27 °C) wird der Überstand vom Zellrasen entfernt und durch 2 ml Komplettmedium ersetzt. Die Zellen werden über einen Zeitraum von 4-6 Tagen kultiviert.

2.2.4.7 Amplifikation und Isolierung rekombinanter Baculoviren

Rekombinante Baculoviren werden durch Inokulation einer *Sf9*-Kultur mit rekombinantem Baculovirus eines niedrigen Titers amplifiziert. Für die Amplifikation wird die Zellsuspension (maximal $1,6 \cdot 10^6$ Zellen/ml) im Verhältnis 1:100 mit rekombinantem Virus infiziert und vier Tage kultiviert. Vier Tage *post infectionem* wird die Viabilität der Zellsuspension ermittelt. Zu diesem Zeitpunkt sollte die Viabilität maximal 20 % betragen. Die Zellsuspension wird durch Zentrifugation (1000 x *g*, 5 min, 4 °C) pelletiert und der virushaltige Überstand sterilfiltriert.

Die Amplifikation rekombinanter Viren in Adhäsionskultur erfolgt durch die Inokulation von 1/50-1/100 des Gesamtvolumens einer *Sf9*-Kultur mit Virus. Für die Infektion sollten die Zellen 70% konfluent sein.

Rekombinante Baculoviren werden 96 Stunden *post infectionem* isoliert. Hierzu werden Zellen einer Adhäsionskultur mit Hilfe eines Zellschabers mechanisch vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst und die Suspension zentrifugiert (1000 x *g*, 5 min, 4 °C). Der virushaltige Überstand wird sterilfiltriert und lichtgeschützt bei einer Temperatur von 4 °C in Plastikflaschen gelagert. Für die Langzeitlagerung kann das Virus mit 10 % FCS versetzt und bei -80 °C gelagert werden.

2.2.4.8 Proteinproduktion und Isolierung exprimierender Zellen

Für die heterologe Proteinproduktion werden *Sf9*-Zellen in Adhäsions- oder Suspensionskultur mit rekombinantem Baculovirus infiziert. Suspensionskulturen werden mit Komplettmedium auf eine Dichte von maximal $1,6 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt und mit 1/10 des Gesamtvolumens rekombinantem Baculovirus infiziert. Die Zellen werden 72 Stunden kultiviert.

Adhäsionskulturen werden bei 70%iger Konfluenz mit rekombinantem Baculovirus infiziert. Das eingesetzte Volumen an Virus beträgt 1/10 des Gesamtvolumens. Die Isolierung Fremdprotein exprimierender *Sf9*-Zellen erfolgt durch Zentrifugation. Adhärenente Kulturen werden nach mechanischer Ablösung der Zellen vom Boden des Zellkulturgefäßes in Suspension gebracht. Bei Suspensionskulturen entfällt dieser Schritt. Die Zellsuspension wird zentrifugiert (1000 x *g*, 5 min, 4 °C) und das Zellpellet in 10 % des Ausgangsvolumens PBS resuspendiert. Durch diesen Waschschritt werden Medienbestandteile aus dem Zellpellet gewaschen, die mit einem nachfolgenden Aufreinigungsschritt interferieren könnten. Die Zellsuspension wird erneut zentrifugiert (1000 x *g*, 5 min, 4 °C) und das Zellpellet entweder direkt für eine Proteinpräparation eingesetzt oder bei einer Temperatur von -80 °C gelagert.

2.2.5 Biophysikalische Methoden

2.2.5.1 *Steady-state* Kinetik

Zur Bestimmung der katalytischen Eigenschaften eines Enzyms kann dessen Aktivität im Fließgleichgewicht (*steady-state*) bestimmt werden.

Der Myosin ATPase-Zyklus ist durch die Hydrolyse von ATP zu ADP gekennzeichnet. Dieser Umsatz kann im Fließgleichgewicht mit Hilfe eines enzymgekoppelten NADH-abhängigen Assays photometrisch und kontinuierlich verfolgt werden (Abbildung 2.1). Voraussetzung für diesen Assay ist, dass die von Myosin katalysierte ATP-Hydrolyse den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. ADP wird durch die Reaktion des Enzyms Pyruvatkinase (PK) zu ATP regeneriert. Das bei dieser Reaktion entstehende Pyruvat wird in einer nachgeschalteten enzymatischen Reaktion durch das Indikatorenzym Laktat-Dehydrogenase (LDH) durch NADH zu Laktat reduziert und dabei NADH oxidiert. Die Oxidation von NADH zu chromophorem NAD^+ kann dabei spektroskopisch durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm zeitabhängig verfolgt werden. Dabei entspricht die Umsatzgeschwindigkeit von NADH zu NAD^+ der Myosin-Hydrolysegeschwindigkeit (k_{ATPase}).

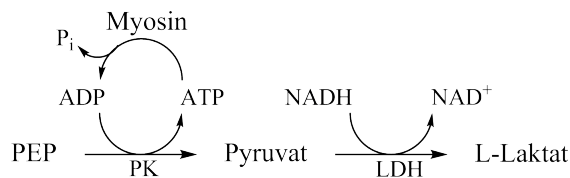


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des enzymgekoppelten Aktivitätstests

k_{ATPase} kann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz aus der Konzentrationsänderung von NADH berechnet werden. Es gilt folgender Zusammenhang:

$$k_{\text{ATPase}} = \frac{-\Delta \text{Abs}/\text{min}}{60 \text{ s} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \epsilon_{\text{NADH}(340 \text{ nm})} \cdot d \cdot [\text{Myosin}]} \quad (2.1)$$

Dabei entsprechen $\Delta \text{Abs}/\text{min}$ der zeitlichen Änderung der Absorption, $\epsilon_{\text{NADH}(340 \text{ nm})} = 6620 \text{ cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ dem Extinktionskoeffizienten von NADH bei einer Wellenlänge von 340 nm, d der Schichtdicke des eingesetzten Reaktionsgefäßes und $[\text{Myosin}]$ der eingesetzten Myosin-Konzentration.

Tabelle 2.14: Puffer für die Bestimmung der ATPase-Aktivität im Fließgleichgewicht

ATPase-Puffer		
25 mM HEPES pH 7,4	0,2 mM NADH	2 mM ATP
0-25 mM KCl	0,05 mg/ml PK	0-140 μM F-Aktin
5 mM MgCl_2	0,5 mM PEP	0,15-0,5 μM Myosin
0,5 mM DTT (frisch)	0,02 mg/ml LDH	

Die Bestimmung der katalytischen ATPase-Aktivität im Fließgleichgewicht wird zum einen in Quarzküvetten in einem Photometer der Firma Beckman und zum anderen in einem Mikroplattenreader der Firma Thermo durchgeführt. Für die Messung werden UV-transparente Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen) mit halber Oberfläche eingesetzt. Bei einem Reaktionsvolumen von 100 μl beträgt die Schichtdicke 0,56 cm. Die Datenakquisition erfolgt mit der Software SkanIt 2.5.1 der Firma Thermo. Die Absorptionsmessung erfolgt bei einer Wellenlänge von 340 nm und einer Arbeitstemperatur von 25 °C über einem Zeitraum von maximal 55 min. Dabei wird im einem Zeitintervall von 4-5 Sekunden die Absorption in den Proben detektiert. Zur Datenanalyse werden die Messwerte in das Programm ORIGIN 8 (OriginLab) importiert und die Messreihen mit einer linearen Regression analysiert.

2.2.5.2 Transientenkinetik

Die Transientenkinetik (*transient-state* Kinetik) beschreibt Elementarschritte entlang des Reaktionswegs einer enzymkatalysierten Reaktion. Die Methode beruht auf einer schnellen Mischung von Substrat mit Enzym und erlaubt die direkte Beobachtung von Intermediaten und Produkten, die während eines einzigen Zyklus im aktiven Zentrum eines Enzyms gebildet werden. Die *stopped-flow*-Technik [CHANCE *et al.* 1964, ECCLESTON *et al.* 1987] wird zur Messung reaktionskinetischer Parameter eingesetzt und ermöglicht die Detektion von Änderungen eines optischen Signals, beispielsweise Absorption, Fluoreszenz oder Lichtstreuung als Funktion der Zeit nach dem Mischen [JOHNSON 2009].

2.2.5.3 *Stopped-flow*-Methode

Ein *stopped-flow*-Spektralphotometer besteht aus zwei Spritzen, in denen homogene Reaktanten-Lösungen vorgelegt werden. Nach der Initiation der Reaktion werden die Reaktanten durch einem pneumatischen Hub synchron aus den Spritzen in eine Mischkammer und aus dieser in die Messküvette gedrückt. Von dort aus gelangt die Lösung in eine Stoppspritze, die auf einen Mikroschalter (*trigger*) drückt, den Fluss der Reaktanten abrupt abstoppt und die Messung eines spektroskopischen Signals in der Küvette initiiert (Abbildung 2.2).

Die Änderung eines spektroskopischen Signals wird durch einen Photomultiplier detektiert und dokumentiert den Reaktionsfortgang. Die Mischeinheit wird während des gesamten Reaktionsverlaufs durch ein temperierbares Wasserbad thermostatisiert.

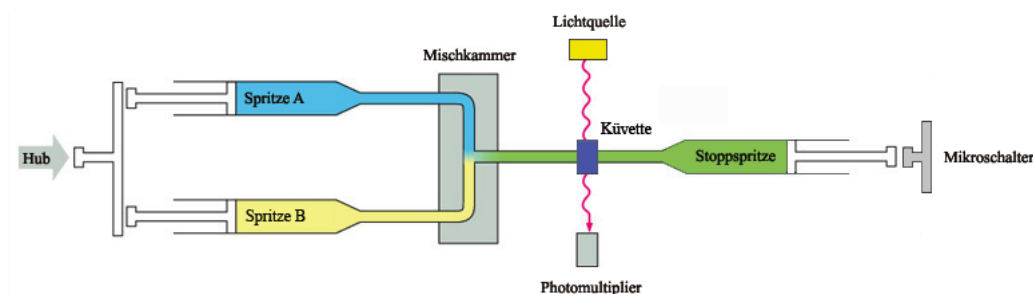


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau eines *stopped-flow*-Spektralphotometers. Erläuterungen siehe Text. Abbildung verändert nach [<http://porpax.bio.miami.edu/~cmallery/255/255enz/ecb3x28.jpg>]

Im Rahmen dieser Arbeit wird die transientenkinetische Analyse des Myosin ATPase-Zyklus mit der *stopped-flow*-Apparatur SF-61SX2 der Firma Hi-Tech Scientific durchgeführt. Die Totzeit, eine Gerätekonstante der Apparatur, beträgt ≈ 1 ms und begrenzt die zeitliche Auflösung des spektroskopischen Signals. Als Lichtquelle dient eine 75 W Hg/Xe-Lampe, deren Licht über einen Spiegel und einen Monochromator sowie einen optischen Quarz Lichtleiter zur Messküvette geleitet wird. Das emittierte Licht wird durch einen Filter vom Anregungslicht diskriminiert und mit einem Photomultiplier detektiert.

Die transientenkinetische Charakterisierung der Interaktionen zwischen Myosin, F-Aktin und Nukleotid wird durch die Veränderung der intrinsischen Proteinfluoreszenz eines Reaktanten oder des Lichtstreuungssignals bei der Reaktion ermöglicht. Durch die Verwendung von mant-Nukleotiden oder fluoreszente Pyren-Aktin ist die direkte Interaktion zwischen den Reaktionsteilnehmern bestimmbar.

Mant-Nukleotide, wie beispielsweise mantATP (2'/3'-(N-Methylanthraniloyl)-Adenosin-5'-triphosphat, Abbildung 2.3) sind wertvolle Reagenzien für die Bestimmung der Struktur und enzymatischen Aktivität von Myosinen. Dies konnte beispielsweise durch die Kristallisation der Motor-domäne von *Dictyostelium discoideum* Myosin-2 mit mant-Nukleotid-Analoga [BAUER *et al.* 1997] als auch durch funktionale Studien von Myosinen unterschiedlicher Klassen gezeigt werden [BARTHA *et al.* 1999, CRUZ *et al.* 2001, KOVÁCS *et al.* 2003, TAFT *et al.* 2008, YANG *et al.* 2006]. Die

mant-Fluoreszenz ist umgebungssensitiv und erlaubt die direkte Detektion der Nukleotid-Protein-Interaktion.

Die Interaktion zwischen Myosin und F-Aktin kann durch die Verwendung von Pyren-Aktin studiert werden. Die starke Fluoreszenz der Pyren-Reportergruppe (Abbildung 2.3) in Kombination mit der starken Fluoreszenzlöschung ($\approx 70\%$) bei der Bindung an Myosin macht die Verwendung von Pyren-Aktin zu einem nützlichen Reagenz um die direkte Interaktionen zwischen Aktin und Myosin zu studieren [CRIDDLE *et al.* 1985].

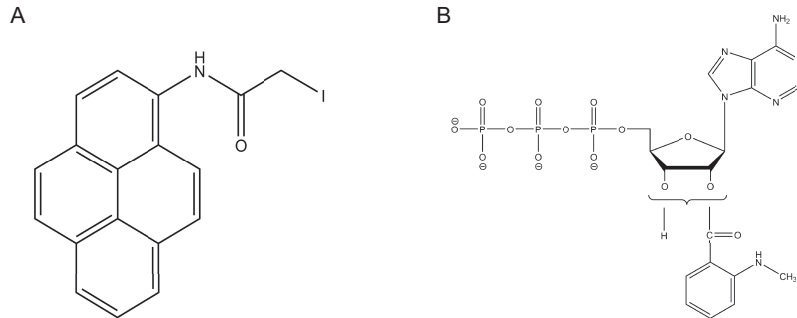


Abbildung 2.3: A: Struktur von Pyren (N-(1-pyrenyl)iodoacetamid). B: Struktur von mantATP (2'/3'-(N-Methylanthraniloyl)-Adenosin-5'-triphosphat). Das Nukleotid-Analogen unterscheidet sich von ATP durch eine Markierung der 2'- oder 3'-Position der Ribose mit einer signalgebenden Reportergruppe. Die kompakte Struktur des mant-Fluorophors und dessen Modifikationsposition resultieren in Nukleotid-Analoga die minimale Störung der Nukleotid-Myosin-Interaktion erzeugen.

Bei der Versuchsdurchführung transientenkinetischer Messungen wird die intrinsische Proteinfluoreszenz mit einer Excitationswellenlänge von 297 nm angeregt und das Emissionslicht nach der Passage eines WG320 *cut-off*-Filters detektiert. Dieser Filter separiert das emittierte Fluoreszenzlicht mit einer Wellenlänge von 348 nm vom Anregungslicht. Bei der Verwendung von mant- oder desoxy-mant-Derivaten wird die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt und die Fluoreszenzemission durch einen KV 389-Filter zeitlich verfolgt. Alternativ kann auch das FRET-Signal, ein strahlungsloser Energietransfer vom Myosin auf die mant-Gruppe, bei der Anregung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz bei einer Wellenlänge von 297 nm durch einen KV 389-Filter verfolgt werden. Die Pyren-Fluoreszenz wird mit einer Excitationswellenlänge von 365 nm angeregt und das Emissionslicht nach der Passage eines KV 389 *cut-off*-Filters detektiert.

Das Lichtstreusignal wird bei einer Wellenlänge von 320 nm oder 420 nm angeregt und das optische Signal im rechten Winkel zum Anregungslicht gemessen.

Die Reaktanten werden im Verhältnis 1:1 in der *stopped-flow*-Apparatur gemischt. Dabei beträgt das Reaktionsvolumen pro Messung 35 - 50 μl . Jede Reaktion wird mindestens 3 mal durchgeführt um das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren. Die Datenakquise sowie Evaluation des spektroskopischen Signals erfolgt mit der Software Kinetic Studio 1.12 (TgK Scientific). Die zeitliche Änderung des spektroskopischen Signals erfolgt durch exponentielle Regression. Fehler resultieren aus der Regression der Daten, sowie der Konzentrationsbestimmung von Myosin, F-Aktin, Nukleotiden sowie Magnesium.

Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich Konzentrationsangaben, die experimentellen Bedingungen beschreiben, auf die Konzentrationen nach dem Mischen der Reaktanten in der *stopped-flow*-Apparatur. Bei der Bestimmung der Aktin- und ADP-Affinitäten werden Gleichgewichtskonzentrationen vor dem Mischen angegeben, da Amplituden analysiert werden und die Konzentrationen der Reaktanten vor dem Mischvorgang relevant sind.

Wenn nicht gesondert aufgeführt, wird in allen Versuchen MOPS-Experimentalpuffer mit einer MgCl_2 -Konzentration von 5 mM verwendet. Der Puffer wird vor der Benutzung sterilfiltriert und entgast. Die Messung transientenkinetischer Parameter erfolgt bei einer konstanten Temperatur von 20°C.

Tabelle 2.15: Puffer für die *stopped-flow*-Versuche

MOPS-Experimentalpuffer	
20 mM	MOPS pH 7,0
100 mM	KCl
0 - 20 mM	MgCl ₂

2.2.5.4 *In vitro*-Motilitätsassay

Der *in vitro*-Motilitätsassay dient der Ermittlung der Gleitgeschwindigkeit von Aktin-Filamenten über eine mit Myosin dekorierte Nitrozelluloseoberfläche. Zudem dient er der Analyse funktionaler und regulatorischer Prozesse.

Für den Gleitassay wird Myosin durch eine Aktinsedimentation aufbereitet. Die Probenvorbereitung separiert funktionale von inaktiven Myosinen durch die Kosedimentation inaktiver Motoren mit F-Aktin in Gegenwart von ATP. Funktionale Motoren bleiben im Überstand. Für die Aktinsedimentation werden 0,4-0,5 mg/ml Myosin im Massenverhältnis 1:1 mit F-Aktin versetzt und in Gegenwart von 3,5 mM ATP in AB-Puffer zentrifugiert (70 000 rpm, 20 min, Rotor 120.1, 4 °C). Nach der Zentrifugation wird der Überstand für die Präparation der Flusszelle eingesetzt.

F-Aktin wird mit TRITC-Phalloidin, wie unter 2.2.3.10 beschrieben, markiert.

Für die Beschichtung der Deckgläser mit Nitrozellulose wird eine 1%ige (m/v) Nitrozelluloselösung in Amylacetat angesetzt und über Nacht schwenkend inkubiert.

Die Beschichtung der Deckgläser mit Nitrozellulose erfolgt durch die Inkubation eines Deckglases mit 0,1-1 %iger Nitrozelluloselösung. Hierzu werden pro Deckglas 1,5 μ l der Nitrozelluloselösung mit einer Pipettenspitze ausgestrichen und das beschichtete Deckglas bei Raumtemperatur getrocknet. Mit den beschichteten Deckgläsern werden Flusszellen konstruiert. Eine Flusszelle besteht aus einem Objektträger, auf den mit zwei parallelen Streifen doppelseitigem Klebeband das beschichtete Deckgläschen kontaktfrei und invers auf der Oberfläche fixiert wird. Ist der Abstand der beiden Doppelklebebandstreifen ca. 4 mm, beträgt das Volumen der Flusszelle ungefähr 10 μ l.

Für den Gleitassay wird die Flusszelle nach folgendem Schema vorbereitet: Zuerst wird die Nitrozelluloseoberfläche mit 10 μ l Penta-Histidin-Antikörper (0,025 mg/ml Antikörper in Wasser) beladen und 5 min inkubiert. In einem zweiten Schritt folgt das Spülen der Flusszelle mit 10 μ l Puffer 1. Dabei werden unbesetzte Bindungsplätze mit BSA geblockt. 10 μ l der Myosinlösung werden eingespült und der Ansatz 2 min inkubiert. In diesem Schritt findet die Immobilisierung des Myosins am Penta-Histidin-Antikörper statt. Dann wird die Flusszelle mit 10 μ l Puffer 1 gespült. Unspezifische Bindungsplätze werden mit 10 μ l fragmentiertem F-Aktin (2 μ M) geblockt und die Flusszelle 2 min inkubiert. Überschüssiges Aktin wird durch die Zugabe von 10 μ l Puffer 4 und 10 μ l Puffer 1 entfernt. Dann erfolgt die Zugabe von 10 μ l TRITC-Aktin (\approx 20 nM) und eine 2 minütige Inkubation. Überschüssiges TRITC-Aktin wird durch das Spülen der Flusszelle mit 10 μ l Puffer 1 und 10 μ l Puffer 2 entfernt. Nach der Zugabe des Puffers 2 wird die Aktin-Dekoration des Myosins unter dem Mikroskop überprüft. Der Assay wird durch die Zugabe von 10 μ l Puffer 3 gestartet.

Die Messung der Motilität der Aktin-Filamente erfolgt fluoresszenzmikroskopisch mit dem Mikroskop IX70 (Olympus) mit einem 60x Ölimmersionsobjektiv (PLAPO/TIRF) bei einer Temperatur von 30 °C. Die Pixelgröße wird durch die Versuchsbedingungen definiert: Bei einer Kamera-*binning* von 2x2, einer mikroskopischen Zwischenvergrößerung von 1 bzw. 1,5 und einer 60fachen Objektivvergrößerung wurde durch die Eichung mit einem Objektmikrometer eine Pixelgröße von 0,215 respektive 0,144 μ M ermittelt.

Pro Versuch wird eine Serie auf 100 Bildern mit einer 1394 *Orca-ERA* CCD-Kamera (Hamamatsu Photonics) aufgenommen. Die TRITC-Fluoreszenz wird bei einer Wellenlänge von 545 nm angeregt und die Fluoreszenzemission bei 570 nm detektiert. Korrespondierende Excitations- und Emissionsfilter sind im Mikroskop vorhanden. Für die Bestimmung der Gleitgeschwindigkeit wird das TRITC-Fluorophor für 230 ms belichtet. Das Intervall zwischen den Aufnahmen von zwei Einzelbildern beträgt 300 bzw. 600 ms.

Die Bildsequenzen werden mit dem Programm Cell^R (Olympus) in .TIFF-Dateien konvertiert und für die Bestimmung der Gleitgeschwindigkeit in das Programm DiaTrack3.01 (Semasopt) impor-

tiert. Das Programm ermittelt die mittlere Bewegungsgeschwindigkeit der Mittelpunkt der Filamente entlang von Trajektorien.

Die Daten werden in das Programm ORIGIN 8 exportiert und die Messwerte von bis zu 10 Auswertungen akkumuliert. Die Bewegungsgeschwindigkeiten der Filamente werden als Histogramm dargestellt und die mittlere Geschwindigkeit durch eine Gauß-Funktion statistisch beschrieben.

$$y = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2} \quad (2.2)$$

In dieser Gleichung beschreibt der Parameter μ den statistischen Mittelwert und σ die Standardabweichung.

Tabelle 2.16: Puffer für den *in vitro*-Motilitätsassay

AB-Puffer	Puffer 1	Puffer 2	Puffer 3	Puffer 4
25 mM Imidazol	10 mM DTT	5 mg/ml Glucose	5 mg/ml Glucose	4 mM ATP
25 mM KCl	0,5 mg/ml BSA	0,1 mg/ml Glucoseoxidase	0,1 mg/ml Glucoseoxidase	in AB-Puffer
0,5-10 mM MgCl ₂	in AB-Puffer	0,02 mg/ml Katalase	0,02 mg/ml Katalase	
1 mM EGTA		in AB-Puffer	4 mM ATP	
pH 7,4			in AB-Puffer	

2.2.6 Computerchemische Methoden

2.2.6.1 Homologiemodellierung

Homologiemodellierung, oder komparative Proteinstruktur-Modellierung, ist eine Methode um ein dreidimensionales Modell eines Proteins (*targets*), ausgehend von dessen Aminosäuresequenz auf der Basis eines Sequenzvergleichs (*alignments*) mit ähnlichen Proteinen bekannter Struktur (*template*) *in silico* zu bilden [BORDOLI *et al.* 2009, MARTI-RENOM 2003, XIANG 2006].

Homologiemodelle werden in der vorliegenden Arbeit mit dem Programm MODELLER 9v6 [ESWAR *et al.* 2006] erstellt. Startpunkt der komparativen Modellierung ist die Identifizierung aller bekannter Proteinstrukturen, die mit der *target*-Sequenz verwandt sind [MARTI-RENOM 2003]. *Templates* werden identifiziert, indem die *target*-Sequenz als Anfrage (*query-Sequenz*) in einer Strukturdatenbank eingegeben wird [MARTI-RENOM 2003]. In einem Protein-Protein-BLAST [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>] gegen die Protein-Datenbank (PDB) werden homologe Proteine mit publizierten Kristallstrukturen ermittelt. Aus der Liste aller verwandten Proteinstrukturen werden Strukturen selektiert, die für die homologiebasierte Modellierung relevant und als *templates* geeignet sind [MARTI-RENOM 2003]. Für die komparative Strukturmodellierung wird ein globales *alignment* der zu modellierenden Sequenz mit den relevanten *template*-Strukturen erzeugt. Das Programm MODELLER 9v6 modelliert auf der Basis dieses *alignments* ein dreidimensionales Modell der *target*-Sequenz mit allen Atomen der Haupt- und Seitenketten, mit Ausnahme der Wasserstoffatome [ESWAR *et al.* 2006]. Das Peptidrückgrat der *template*-Sequenz wird dabei als Modell für das Rückgrat des Zielproteins selektiert. Lückenhafte Regionen der Zielsequenz werden durch eine Schleifenmodellierungsprozedur geschlossen.

Für die Berechnung des dreidimensionalen Modells werden auf der Grundlage des *alignments* räumliche Eigenschaften, beispielsweise C_{α} - C_{α} -Abstände, Wasserstoffbrückenbindungen, Dieder-Winkel zwischen Haupt- und Seitenketten von der *template* auf die *target*-Struktur transferiert. Die Gesamtstruktur des dreidimensionalen Modells wird optimiert, indem die Gesamtkonformationsenergie minimiert wird.

Für die komparative müssen dem Programm MODELLER Eingabe-Dateien (*input-files*) in Form von *alignment*-Dateien im .pir-Format, Atom-Dateien (*atom-files*) im .pdb-Format sowie Skript-Dateien (*script-files*) im Python-Format zur Verfügung gestellt werden.

2.2.6.2 Docking

Die Suche nach Effektoren der enzymatischen Aktivität basiert auf experimentellen und computerchemischen Verfahren. Ein Beispiel für ein computerchemisches Verfahren ist das molekulare *docking* von Liganden an Proteine (Rezeptoren). Dabei werden Liganden *in silico* geometrisch und chemisch an einen Rezeptor mit bekannter 3D-Struktur angepasst und Fragen nach der Struktur und Energetik der Wechselwirkung des binären Komplexes vorhergesagt. Zwei Verfahren werden beim *docking* unterschieden: beim lokalen *docking* ist die Bindungsstelle bekannt, beim globalen *docking* unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wird das Programm AutoDock4.2 [<http://autodock.scripps.edu/>] für das molekulare *docking* verwendet. Bei dem Protein-Ligand-*docking* wird das Protein als rigides Objekt behandelt, während der Ligand als partiell flexibel angesehen wird. Das Protein wird dabei durch eine Gitterdarstellung repräsentiert. Das Programm AutoDock *dockt* Verbindungen aus einer Molekülbibliothek mit einem standardisierten Verfahren automatisiert an einen Rezeptor. Für die Platzierung des Liganden in die Repräsentation des Proteins verwendet AutoDock einen komplexen Suchalgorithmus. Eine empirische Bewertungsfunktion (*scoring*-Funktion) approximiert die freie Bindungsenthalpie ΔG_{bind} . Für die *docking*-Studien müssen dem Programm *input-files* für Ligand und Rezeptor im .pdbqt-Format sowie eine individuelle Gitter-Parameter-Datei (*grid parameter file*, *gfp-file*) der zentrierten Koordinaten der Bindungsstelle, zur Verfügung gestellt werden. Optional kann für das *virtual screening* dem Programm eine *docking*-Parameter-Datei (*dpf-file*) mit universellen *docking*-Parametern für alle Liganden vorgegeben werden.

Die Ausgabe-Dateien (*output-files*) werden im Programm PyMOL [<http://www.pymol.org/>] graphisch dargestellt und die Bindungsmodi sowie die an der Interaktion der beteiligten Aminosäuren des Proteins analysiert.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Nichtmuskuläres Myosin-2C

Nichtmuskuläre Myosine der Klasse-2 partizipieren in zellulären Prozessen wie der Zellmigration und der Zytokinese. Alle drei Isoformen der zytoplasmatischen Myosine werden gewebe- und zellspezifisch in Säugetieren produziert [CONTI und ADELSTEIN 2008, VICENTE-MANZANARES *et al.* 2009]. Als Adaption an ihre zellulären Funktionen weisen nichtmuskuläre Myosine graduelle Unterschiede in ihren kinetischen Eigenschaften auf. Kinetische Studien der humanen nichtmuskulären Myosine-2A und -2B [KOVÁCS *et al.* 2003, WANG *et al.* 2003] sowie *Gg* Myosin-2B [ROSENFELD *et al.* 2003] beschreiben die funktionale und strukturelle Divergenz der Isoformen. Im Kontrast zu den nichtmuskulären Myosinen-2A und -2B ist keine detaillierte kinetische Charakterisierung des nichtmuskulären Myosins-2C und dessen Isoformen bekannt. GOLOMB *et al.* beschrieben im Jahr 2004 erstmalig, dass alternatives *splicing* von *MYH14* zur Genexpression von zwei differenten Proteinen führt; im Jahr 2009 wurde von JANA *et al.* eine dritte *splice*-Variante des nichtmuskulären Myosins-2C publiziert.

Ziel dieser Arbeit war die funktionale und kinetische Charakterisierung aller Isoformen des humanen nichtmuskulären Myosins-2C. Die Expressionskonstrukte, bestehend aus der Motordomäne und einem künstlichen Hebelarm, wurden durch *molecular modeling* entworfen, kloniert und heterolog mit dem Baculovirus/*Sf9*-System produziert. Eine Strategie für die homogene Darstellung der Fusionsproteine wurde etabliert.

Der ATPase-Zyklus aller Transkriptvarianten des nichtmuskulären Myosins-2Cs wurde sowohl im Fließgleichgewicht als auch transientenkinetisch studiert. Die transientenkinetische Charakterisierung der individuellen Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten relevanter Einzelschritte des ATPase-Zyklus ermöglicht eine detaillierte Beschreibung der Enzymatik und mechanischen Funktion der jeweiligen *splice*-Variante. Die funktionale Kompetenz der Fusionsproteine wurde im *in vitro*-Motilitätsassay bestätigt. Durch die Beobachtung, dass eine Erhöhung der freien Magnesiumionenkonzentration im physiologischen Bereich zu einer verzögerten ADP-Freisetzung von Aktomyosin führt, wurde dieser Regulationsmechanismus erstmalig für Myosine der Klasse-2 beschrieben.

3.1.1 Homologie und Primärsequenzanalyse

Alternatives *splicing* erhöht die Diversität nichtmuskulärer Myosine und resultiert in der Genexpression von funktional differenten Proteinen. Zwei Isoformen der zytoplasmatischen Myosine, NMHC-2B und NMHC-2C werden alternativ in den Bereichen der Oberflächenschleifen-1 und -2 *gespleißt*. Die Lokalisation der Oberflächenschleifen in der schweren Kette des Myosins ist schematisch in Abbildung 3.6,D dargestellt. In Schleife-1 werden Exons, codierend für 10 (NMHC-2B)

respektive 8 Aminosäuren (NMHC-2C), inseriert [GOLOMB *et al.* 2004, TAKAHASHI *et al.* 1992]. Alternatives *splicing* an diesem Lokus ist auch für glattmuskuläres Myosin beschrieben, welches eine Insertion von 7 Aminosäuren aufweist [KELLEY *et al.* 1993, LÉGUILLETTE *et al.* 2005]. NMHC-2B weist eine Insertion von 21 Aminosäuren in Schleife-2 auf, während 33 Aminosäuren in humanes NMHC-2C inseriert werden [ITO und ADELSTEIN 1995, JANA *et al.* 2009, TAKAHASHI *et al.* 1992]. NMHC-2B2 weist eine Entkopplung der ATPase-Aktivität von dem Phosphorylierungsstatus der leichten Kette MLC20 auf und zeigt keine *in vitro* Motilität [KIM *et al.* 2008]. Auf Proteinebene existieren im Bereich der Motordomäne des humanen nichtmuskulären Myosins-2C drei Isoformen; Isoform 2 stellt dabei die kürzeste *splice*-Variante dar. Im Vergleich zu Isoform 1 fehlt eine Insertion von 8 Aminosäuren an Position 232 der Schleife-1 (Abbildung 3.1). Isoform 3 stellt die längste Transkriptvariante dar und beinhaltet neben der analogen Insertion in Schleife-1 eine weitere Insertion mit einer Länge von 33 Aminosäuren in Schleife-2 (Abbildung 3.2). In Anlehnung an die Nomenklatur publizierter Isoformen der nichtmuskulären Myosine wird im weiteren Verlauf Isoform 2 als NMHC-2C0, Isoform 1 als NMHC-2C1 und Isoform 3 als NMHC-2C2 bezeichnet. Ein *alignment* der Aminosäuresequenzen von Oberflächenschleife-1 der Isoformen des humanen nichtmuskulären Myosins-2C ist in der folgenden Abbildung aufgeführt.

```
NMHC-2C0 188-REDQSILCTGESGAGKTENTKKVIQYLAHVASSPKGRKEPQV-----GELERQLLQANPILEAFGNAKTVKN
NMHC-2C1 188-REDQSILCTGESGAGKTENTKKVIQYLAHVASSPKGRKEPQVPSVSTVSYGELERQLLQANPILEAFGNAKTVKN
NMHC-2C2 188-REDQSILCTGESGAGKTENTKKVIQYLAHVASSPKGRKEPQVPSVSTVSYGELERQLLQANPILEAFGNAKTVKN
```

Abbildung 3.1: Sequenzvergleich der Schleife-1 Region der Isoformen des humanen nichtmuskulären Myosins-2C. Die *accession*-Nummern der *splice*-Varianten sind NP_079005 (NMHC-2C0), NP_001070654 (NMHC-2C1) und NP_001139281 (NMHC-2C2). Aminosäuren der Schleife-1 sind unterstrichen, die Insertion blau dargestellt.

Abbildung 3.2 stellt das sequenzielle *alignment* der Schleife-2 Region des nichtmuskulären Myosins-2C dar. NMHC-2C2 ist durch eine Insertion von 33 Aminosäuren an Position 649 der Oberflächenschleife-2 charakterisiert. Durch die Extension verringert sich die Nettoladung der Schleife-2 von $\sum +1$ für NMHC-2C0 und NMHC-2C1 auf $\sum 0$ für NMHC-2C2. Programme zur Sekundärstrukturvorhersage wie HNN [GEURMEUR 1997] weisen darauf hin, dass Schleife-2 des NMHC-2C2s hauptsächlich unstrukturiert als *random coil* vorliegt, während die Aminosäuren QQFSF eine kurzen *extended strand* ausbilden.

```
NMHC-2C0 622-AALLHQSTDRLTAEIWKD-----VEGIVGLEQVSSLGDGPPGGRPRRGMFRTV
NMHC-2C1 630-AALLHQSTDRLTAEIWKD-----VEGIVGLEQVSSLGDGPPGGRPRRGMFRTV
NMHC-2C2 630-AALLHQSTDRLTAEIWKDEHGGFQQFSFLGSFPSPGSAERCSSAISPVGVEGIVGLEQVSSLGDGPPGGRPRRGMFRTV
```

Abbildung 3.2: Sequenzvergleich der Oberflächenschleife-2 der Isoformen des humanen nichtmuskulären Myosins-2C. Die *accession*-Nummern der *splice*-Varianten sind NP_079005 (NMHC-2C0), NP_001070654 (NMHC-2C1) und NP_001139281 (NMHC-2C2). Schleife-2 ist durch den Unterstrich, die Insertion blau hervorgehoben.

Vorhersageprogramme wie KinasePhos [HUANG *et al.* 2005] weisen für die Insertion in Schleife-2 zwei phosphorylierungssensitive Serin-Reste in den Sequenzen AISPP sowie PPSPPG auf. Diese Aminosäuren werden potenziell durch die Kinasen *cdc2*, ATM sowie MAPK phosphoryliert. Die Phosphorylierung der analogen Insertion von NMHC-2B2 durch *Src*-Kinase wurde beschrieben [KIM *et al.* 2008].

Modifizierte Schleifenregionen beeinflussen neben den kinetischen Eigenschaften die zelluläre Funktion und Lokalisation eines Myosins. Analog zu den Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2B weist nichtmuskuläres Myosin-2C isoformspezifische zelluläre Lokalisationen auf; Isoform-2C1 wird ubiquitär in einer Vielzahl von Geweben sowie in Tumorzelllinien exprimiert [GOLOMB *et al.* 2004, JANA *et al.* 2006]. Von Relevanz ist die Erniedrigung der isoformspezifischen Expressionsrate durch siRNA in der Pneumozyten-Tumorzelllinie A549, die zu einer Verzögerung eines späten Schrittes der Zytokinese führt [JANA *et al.* 2006]. Im Kontrast zu NMHC-2C0 und NMHC-2C1 ist die Expression von murinem NMHC-2C2 auf das neuronale Gewebe beschränkt [JANA *et al.* 2009]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *in vitro* Modulation der kinetischen und funktionalen Ei-

genschaften aller Isoformen des humanen nichtmuskulären Myosins-2C in Abhängigkeit von den Oberflächenschleifen charakterisiert. Dazu wurden Homologiemodelle angefertigt und die ermittelten kinetischen Parameter mit den strukturellen Variationen in Relation gesetzt.

3.1.2 Darstellung der Expressionsplasmide

Für die kinetische Charakterisierung des humanen NMHC-2Cs wurde die cDNA-Sequenz der Motordomäne bis zum Ende der putativen Konverterdomäne, korrespondierend zu den Aminosäuren 1-799 des NMHC-2C0, fusioniert mit einem künstlichen Hebelarm (2R) sowie einem His₈-tag, optimiert für die Expression in *Sf9*-Zellen von der Firma Eurofins MWG Operon (Martinsried) synthetisiert und in den Vektor pFastBac™ 1 subkloniert.



Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Fusionskonstrukts, bestehend aus der Motordomäne des Myosins fusioniert mit einem künstlichen Hebelarm (2R). Die DNA-Kassette steht für die heterologe Expression unter der Kontrolle des starken Polyhedrin-Promotors (P_{PH}). Auf die Darstellung des C-terminalen Oktahistidin-tags wurde verzichtet.

Die Fusion der Motordomäne mit einem künstlichen Hebelarm dient der funktionalen Charakterisierung des Myosins. Die carboxyterminale Ligation der Motordomäne mit zwei *Dictyostelium discoideum* α -Aktinin-Untereinheiten resultiert in der Expression eines einzelköpfigen Fusionsproteins. Jede α -Aktinin-Untereinheit besteht aus ca. 120 Aminosäuren und bildet eine linksgängige, superspiralisierte *coiled coiled*-Struktur aus, die aus drei α -Helices besteht und sowohl kompakte als auch rigide Strukturmodule mit einer Länge von ca. 6 nm formt [ANSON *et al.* 1996]. Der künstliche Hebelarm ersetzt die native Bindungsregion der leichten Ketten und dient der Krafterzeugung bei Bewegungsvorgängen. Die Funktionalität und nativen kinetischen Eigenschaften analoger Fusionskonstrukte von Myosinen der Klassen-1, -2, -5, -6 und -11 aus Säugetieren, Pflanzen und *Dictyostelium discoideum* ist beschrieben [DÜRRWANG *et al.* 2006, ITO *et al.* 2003, LIAO *et al.* 2009, RUFF *et al.* 2001, TAFT *et al.* 2008]. Das Fusionskonstrukt kann im *in vitro*-Motilitätsassays zur Bestimmung der Bewegungsgeschwindigkeit von Aktin-Filamenten über eine mit Myosin dekorierte Nitrozelluloseoberfläche eingesetzt werden. Die Aufreinigung durch Affinitätschromatographie an Ni^{2+} -NTA wird durch die Präsenz eines Histidin-Oktapeptids ermöglicht. Ein Modell des Fusionsproteins ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

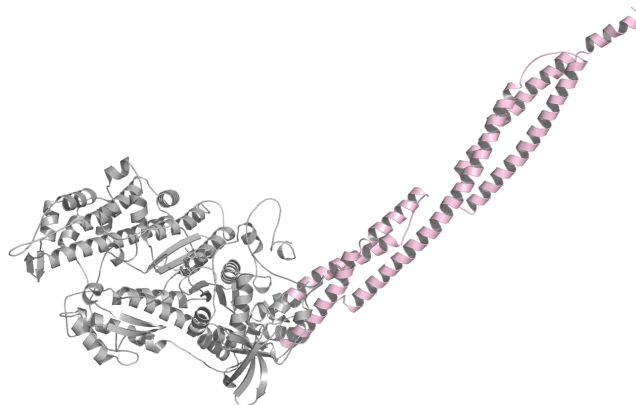


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der dreidimensionalen Struktur des Fusionsproteins, bestehend aus dem Homologiemodell der Motordomäne (grau) des humanen nichtmuskulären Myosins-2C0 fusioniert mit der Kristallstruktur des artifiziellen Hebelarms (rosa) (PDB-Code: 1G8X, [KLICHE *et al.* 2001]).

Die Integrität des synthetischen Plasmids pFastBac™1-NMHC-2C0-2R wurde *via* Doppelstrangsequenzierung verifiziert. Parallel zur Expression der Transkriptvariante 2 wurden die Transkriptvarianten 1 und 3 kloniert. Die korrespondierenden Vektoren werden als pFastBac™1-NMHC-2C1 respektive pFastBac™1-NMHC-2C2 bezeichnet. Für die Darstellung der *splice*-Variante 1 wurde die DNA-Sequenz korrespondierend zu den Aminosäuren ASVSTVSY an der Position 292 in Schleife-1 inseriert. Für die Extension wurden durch ortsspezifische Mutagenese mit den Primern 5-InsertL1 und 3-InsertL1 (Tabelle 2.1) die Aminosäuren der Insertion integriert. Als *template* wurde das synthetische Originalplasmid verwendet. Die erfolgreiche Insertion wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Die Darstellung der *splice*-Variante 3 erfolgte durch die Insertion von 33 Aminosäuren an der Position 648 durch zwei unabhängige PCR-Klonierungen. Im ersten Schritt wurde die PCR mit der Primerkombination FWD-MYH14-3 Step1 und REV-MYH14-3 Step1 durchgeführt; die zweite Amplifikation mit dem Primerpaar FWD-MYH14-3 Step2/REV-MYH14-3 Step2 (Tabelle 2.1). Als *template* diente der Vektor der Transkriptvariante 1. Die Identität des dargestellten Genkonstrukts wurde durch Sequenzierung bestätigt.

3.1.3 Expression und Aufreinigung

Ausgangspunkt für die Expression und Aufreinigung des humanen nichtmuskulären Myosins-2C aus *Sf9*-Insektenzellen waren die Plasmide pFastBac™1-NMHC-2C0-2R, pFastBac™1-NMHC-2C1-2R sowie pFastBac™1-NMHC-2C2-2R. Nach der Transpositionsreaktion in das virale Genom wurde das Bacmid erfolgreich in *Sf9*-Zellen transfiziert. Das Bacmid beinhaltet die kodierende Gensequenz des zu exprimierenden Myosins unter der Kontrolle des starken Polyhedrin-Promotors (Abbildung 3.3). Zur heterologen Proteinproduktion wurden *Sf9*-Zellen mit rekombinantem Baculovirus infiziert und über einen Zeitraum von 72 Stunden kultiviert. Die Überexpression der NMHC-2C-Konstrukte wies 72 h *post infectionem* ein Expressionsmaximum auf. Die Aufreinigung erfolgte wie unter 2.2.3.5 beschrieben. Pro Liter *Sf9*-Suspensionskultur konnten zwischen 0,3 und 0,5 mg Protein homogen präpariert werden. Die Identität der dargestellten Myosine wurde durch Western-Blot gegen den His-tag sowie die massenspektroskopische Analyse bestätigt. Die Unterscheidung der einzelnen Isoformen war mit beiden Verfahren nicht möglich.

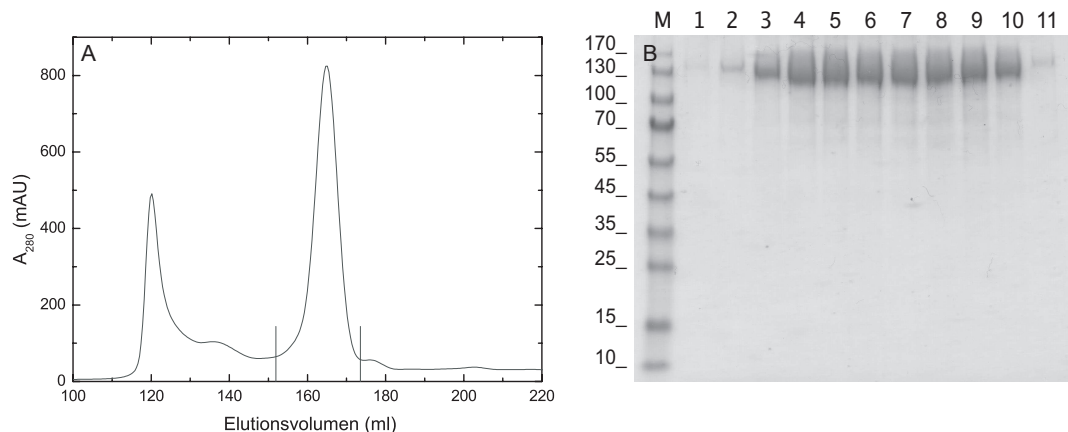


Abbildung 3.5: Darstellung des humanen nichtmuskulären Myosins-2C. A: Ausschnitt aus dem Elutionsprofil des NMHC-2C2s von der Säule Säule HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 PG. Das Myosin eluiert als homogener Peak ohne *tailing* und *fronting* bei einem Elutionsvolumen von ca. 165 ml. Fraktionen des 2. Peaks, gekennzeichnet durch die Markierungen, werden vereint, konzentriert und in funktionalen und kinetischen Studien eingesetzt. B: Fraktionen des Peaks 2 separiert durch SDS-PAGE auf einem Gradientengel (4-20%). Das Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 124 kDa kann homogen dargestellt werden.

3.1.4 Homologiemodellierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Homologiemodelle der Motordomänen aller *splice*-Varianten des nichtmuskulären Myosins-2C angefertigt, da experimentelle Röntgenstrukturen bislang nicht zugänglich sind. Die Homologiemodelle dienen der Interpretation der Struktur-Funktionsbeziehungen und als *targets* in *docking*-Studien niedermolekularer Liganden an das Myosin.

Für die Darstellung der Homologiemodelle der Isoformen des NMHC-2Cs, die sogenannten *targets*, wurden die Aminosäuren 1-799 (NMHC-2C0), 1-807 (NMHC-2C1) sowie 1-840 (NMHC-2C2), korrespondierend zur Motordomäne bis zum Ende der putativen Konverterdomäne des jeweiligen Myosins gewählt.

Das Prinzip der Homologiemodellierung basiert auf der Annahme, dass die Modellstruktur des *targets* auf der Basis bekannter *template*-Strukturen modelliert werden kann. Startpunkt der komparativen Modellierung war die Identifizierung bekannter, homologer Proteinstrukturen, die mit der *target*-Sequenz verwandt sind. Hierzu wurden in einem Protein-Protein-BLAST [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>] gegen die Proteindatenbank (PDB) homologe Proteine mit publizierten Kristallstrukturen ermittelt. Aus dieser Liste wurden relevante *template*-Strukturen für die homologiebasierte Modellierung selektiert. Auswahlkriterien waren hochaufgelöste Röntgen-Kristallstrukturen mit hoher Sequenzhomologie zum *target*, die sich in einem definierten, ADP gebundenen Nukleotidzustand befinden. Aufgrund der großen Konservierung der Aminosäuresequenz der *splice*-Varianten des nichtmuskulären Myosins-2C wurden die in Tabelle 3.1 aufgelisteten *templates* für die Homologiemodellierungen aller Isoformen selektiert.

Tabelle 3.1: *Templates* für die komparative Modellierung der Isoformen des humanen nichtmuskulären Myosins-2C

PDB-Code	Organismus	Myosin	Nukleotid-Zustand	Auflösung [Å]
1BR2	<i>Gg</i>	glattmuskuläres Myosin-2, Motordomäne	MgADP·AlF ₄	2,9
1DFL	<i>Ai</i>	glattmuskuläres Myosin-2, S1	MgADP·VO ₄	4,2
2JHR	<i>Dd</i>	Myosin-2, Motordomäne	MgADP·VO ₃ Pentabromopseudilin	2,8

Selektierte *templates* weisen zu den Aminosäuresequenzen der Isoformen des zytoplasmatischen Myosins-2C eine Sequenzabdeckung von 93-94% auf. Die sequenzielle Identität beträgt 46-75%. Die katalytisch relevanten Aminosäuren im Bereich der Nukleotidbindungstasche sind stark homolog. Die Konsensussequenzen von P-Schleife (GESGAGKT), Schalter-1 (NXNSSR) und Schalter-2 (DIXGFE) sind hoch konserviert. Für die N-terminale Extension des NMHC-2Cs, die eine Länge von 49 Aminosäuren aufweist, steht keine *template*-Struktur zur Verfügung. Sekundärstrukturvorhersagen weisen dem N-Terminus die Struktur eines *random coils* zu.

Für die Oberflächenschleifen-1 und -2 besteht ebenfalls eine geringe Sequenzabdeckung. Die expandierte Schleife-2 des NMHC-2C2s wird von den *template*-Strukturen nicht abgedeckt, da flexible Oberflächenschleifen in Kristallstrukturen meistens nicht aufgelöst sind.

Mit dem Programm MODELLER 9v6 [ESWAR *et al.* 2006] wurde ein *alignment* der *template*-Sequenzen erstellt und in einem weiteren Schritt die *target*-Sequenz mit den *template*-Sequenzen sequenziell verglichen. Die 3D-Koordinaten der in Tabelle 3.1 aufgelisteten Kristallstrukturen wurden zur Berechnung der Homologiemodelle herangezogen.

Für die *splice*-Varianten -2C1 und -2C2 des humanen nichtmuskulären Myosins-2C konnte mit dem Programm MODELLER 9v6 keine physikalisch sinnvolle Positionierung der Schleife-1 innerhalb des Modells erstellt werden. In Zusammenarbeit mit Krishna Chinthapudi (Institut für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) konnte eine akkurate Modellierung dieser Oberflächenschleife vorgenommen und die Gesamtstruktur des Modells optimiert werden. Hierzu wurden die 8 inserierten Aminosäuren ASVSTVSY der Schleife-1 zwischen den Aminosäuren P321 und G322 der Modelle der nichtmuskulären Myosine-2C1 bzw. -2C2 mit dem Programm *coot* [EMSLEY *et al.* 2010] geometrisch optimiert, mit dem Programm MODELLER 9v6

energieminimiert und final mit dem Programm *MolProbity* [DAVIS *et al.* 2007] validiert. Die expandierte Schleife-2-Region des nichtmuskulären Myosins-2C2 wurde durch das Programm MODELLER 9v6 sinnvoll positioniert. Manuell wurde eine lokale Nachoptimierung der Sekundärstrukturelemente mit dem Programm PyMOL [http://www.pymol.org] vorgenommen. Die Sekundärstruktur der Schleife-2 wurde mit dem Programm HNN [GEURMEUR 1997] vorhergesagt und konnte durch das Programm MODELLER 9v6 aufgrund fehlender *template*-Strukturen nicht sinnvoll modelliert werden. Abbildung 3.6 zeigt die Homologiemodelle der Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C.

Um die die Variationen der Schleife-2 zu verdeutlichen, wurden die elektrostatischen Potentiale der Oberflächenschleife-2 der nichtmuskulären Myosine-2C1 und -2C2 in Abbildung 3.7 dargestellt. NMHC-2C0 weist eine identische Schleife-2 wie NMHC-2C1 auf und wurde zur Vereinfachung nicht abgebildet. Die Oberflächendarstellung des Homologiemodells der Isoformen-2C2 illustriert eine weite Ausbreitung von Schleife-2, die sich über die Oberseite des Proteins erstreckt. Dabei repräsentieren rot kolorierte Bereiche eine negative Partiaalladung, während eine positive Partiaalladung blau dargestellt ist. Die Ladungsverteilung der Oberflächenschleife-2 ist in *splice*-Variante-2C1 kompakter als in -2C2, welche eine diffuse Ladungsverteilung aufweist.

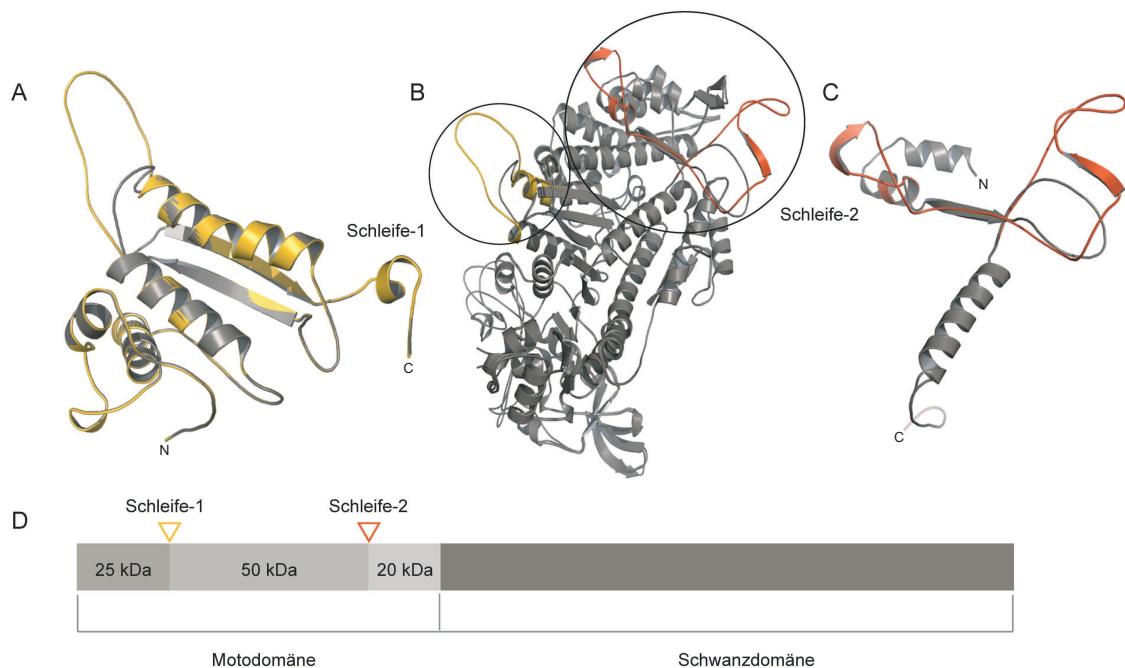


Abbildung 3.6: Komparative Modellierung der Motordomänen der Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2Cs. Die Motordomänen sind grau dargestellt, während die Oberflächenschleife-1 der Isoformen-2C1 und -2C2 gelb und Oberflächenschleife-2 der Isoform-2C2 rot dargestellt sind. B bildet die Superimposition der Motordomänen aller drei Isoformen ab. A und C sind Nahaufnahmen der expandierten Schleife-1 respektive Schleife-2 Region der Myosine. D stellt das Schema einer schweren Kette eines Myosins sowie die Lokalisation der Oberflächenschleife-1 zwischen der 25 kDa und der 50 kDa-Domäne und die Positionierung von Schleife-2 zwischen der 50 kDa und der 20 kDa-Domäne innerhalb der katalytischen Motordomäne dar.

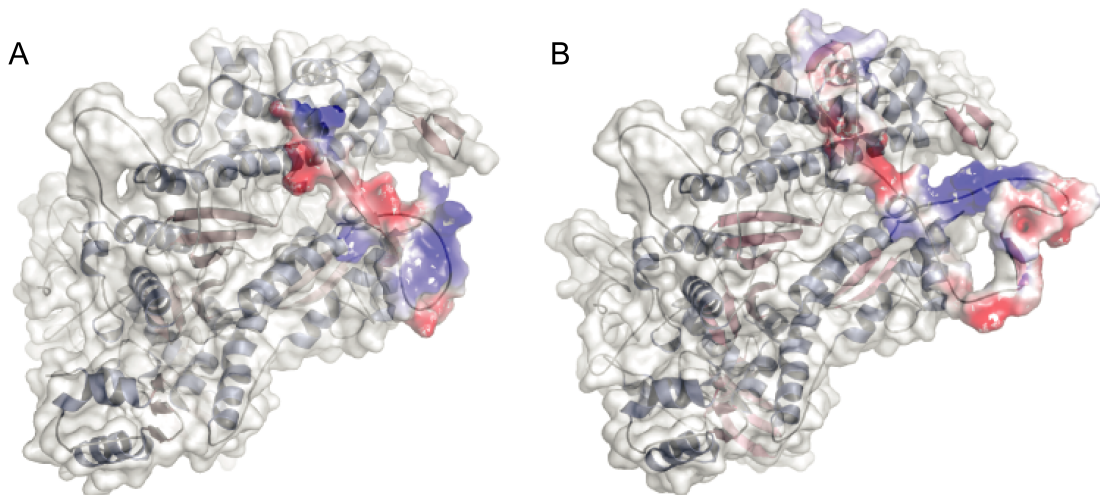


Abbildung 3.7: Oberflächenrepräsentation der Homologiemodelle der humanen nichtmuskulären Myosine-2C1(A) und -2C2 (B). Für die Oberflächenschleife-2 sind die elektrostatischen Potentiale dargestellt. Dabei repräsentiert eine rote Färbung eine negative Partialladung, während positive Partialladungen blau gekennzeichnet sind. NMHC-2C2 ist durch eine diffuse Ladungsverteilung gekennzeichnet, während NMHC-2C1 eine kompakte Ladungsverteilung aufweist.

3.1.5 Funktionale und kinetische Charakterisierung

3.1.6 Kinetische Charakterisierung

Die Interpretation der kinetischen Daten erfolgt auf der Grundlage der in Abschnitt 1.4 beschriebenen kinetischen Mechanismen für skelettmuskuläres Myosin-2. Die Interaktion von Myosin (M) mit ATP (T), ADP (D), F-Aktin (A) und Phosphat (P_i) ist in folgendem kinetischen Schema dargestellt.

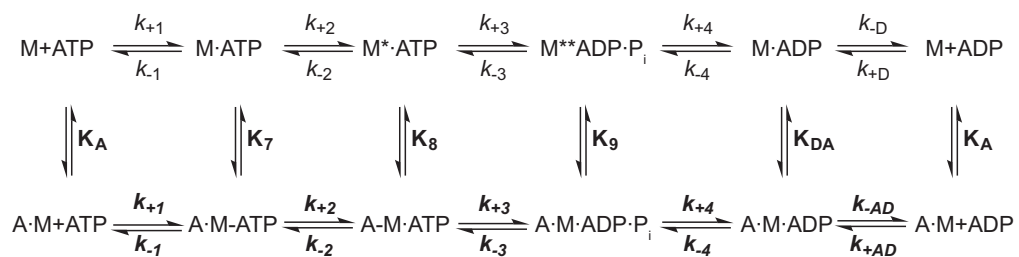


Abbildung 3.8: Kinetisches Modell des Aktomyosin ATPase-Zyklus. Im Rahmen dieser Arbeit beziehen sich alle Bezeichnungen der kinetischen Einzelschritte auf dieses Schema. Die obere Hälfte des Modells beschreibt die Interaktion zwischen Myosin und ATP sowie die Hydrolyse und Produktfreisetzung. Die untere Hälfte beschreibt die Einzelschritte der ATP-Bindung, Hydrolyse und Produktfreisetzung in der Gegenwart von F-Aktin. Mit einem Asterisk (*) sind unterschiedliche Zustände der intrinsischen Proteinfluoreszenz gekennzeichnet.

3.1.6.1 ATP-Titration

Für die kinetische Charakterisierung des ATPase-Zyklus der Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C wurde der Anteil an aktiven Motoren und somit die exakte Konzentration der Enzympräparation durch eine ATP-Titration (*active site*-Titration) bestimmt. Für die Fluoreszenztitration wurden $0,5 \mu\text{M}$ Myosin mit ansteigenden Konzentrationen an mantATP in einer *stopped-flow*-Apparatur gemischt.

In Abhängigkeit der mantATP-Konzentration ändern sich die relativen Amplituden der Fluoreszenztransienten. Die Erhöhung der relativen Amplituden bei der Bindung ansteigender Konzentrationen an mantATP erklärt sich durch eine erhöhte Anzahl von Myosinen, die ein Substratmolekül binden können. Bei vollständiger Substratsättigung geht die relative Amplitude in ein Plateau über.

Zur grafischen Darstellung wird die Abhängigkeit der relativen Amplitude von der mantATP-Konzentration aufgetragen (Abbildung 3.9). Die Anpassung linearer Regressionen an die Anfangssteigung sowie die Plateau-Phase der Messwerte definiert einen Schnittpunkt. Die Schnittpunktberechnung bestimmt den Anteil aktiver Motoren in den Enzympräparationen der Isoformen des NMHC-2Cs zu durchschnittlich 30-40%. Im Folgenden beziehen sich alle Konzentrationsangaben auf die aktive Myosin-Konzentration in den enzymatischen Assays.

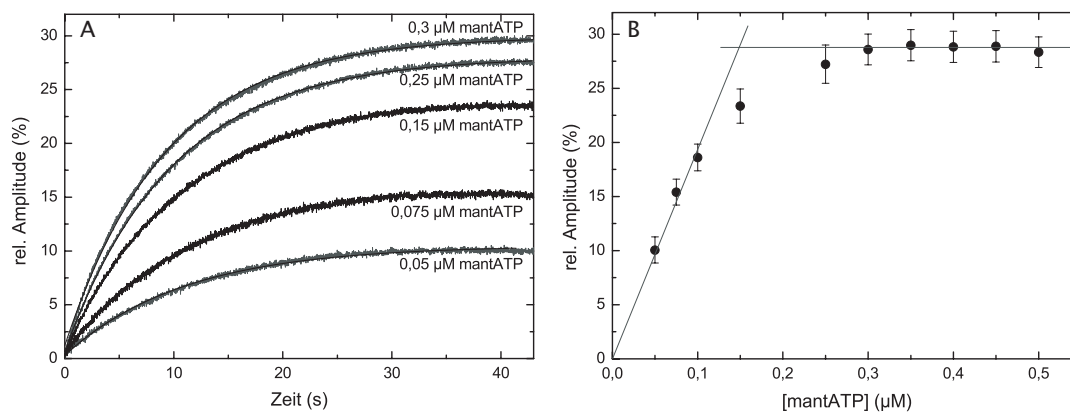


Abbildung 3.9: Amplitudentitration des NMHC-2C0s zur Bestimmung des Anteils an aktiven Motoren. A: Auftragung der relativen Amplituden bei verschiedenen mantATP-Konzentrationen als Funktion der Zeit. Die Transienten folgen einem einfach-exponentiellen Reaktionsverlauf. Die Fluoreszenz des mant-Fluorophors wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt und die Fluoreszenzemission durch einen KV 389-Filter zeitabhängig verfolgt. B: Die Abhängigkeit der relativen Amplitude von der mantATP-Konzentration bestimmt die Konzentration aktiver Motoren. Der Schnittpunkt der beiden Geraden liegt bei einer mantATP-Konzentration von $0,149 \mu\text{M}$. Bei einer eingesetzten Myosinkonzentration von $0,5 \mu\text{M}$ errechnet sich ein Anteil von $\approx 30\%$ aktiven Motoren.

3.1.7 Steady-state ATPase-Aktivität

Die katalytische ATPase-Aktivität der Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C in An- und Abwesenheit von F-Aktin wurden im Fließgleichgewicht mit dem unter 2.2.5.1 beschriebenen NADH-gekoppelten Enzymassay bestimmt. Abbildung 3.10 beschreibt die Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von der F-Aktinkonzentration. Die Approximation der Messwerte erfolgt mit dem Michaelis-Menten-Algorithmus.

Die ATPase-Aktivität der Isoformen des Myosins-2C zeigt im Konzentrationsbereich bis $140 \mu\text{M}$ F-Aktin keine Sättigung. Die Messung der enzymatischen Aktivität bei F-Aktinkonzentrationen $>140 \mu\text{M}$ ist aufgrund der hohen Viskosität des filamentösen Aktins nicht möglich. Daher können die maximale Katalysegeschwindigkeit bei Substratsättigung (k_{cat}) und der K_{app} -Wert nur geschätzt werden. Die in Tabelle 3.2 für k_{cat} aufgelisteten Katalysegeschwindigkeiten entsprechen den experimentell ermittelten ATPase-Aktivitäten bei einer F-Aktinkonzentration von $140 \mu\text{M}$.

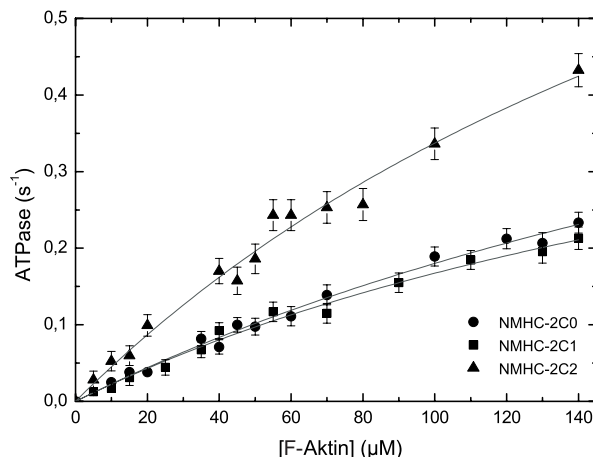


Abbildung 3.10: Aktin-aktivierte *steady-state* ATPase-Aktivität der Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C. Dargestellt ist die ATPase-Aktivität in Abhängigkeit von der F-Aktinkonzentration. Die basale Umsatzgeschwindigkeit wurde von den katalytischen Aktivitäten in Anwesenheit von Aktin subtrahiert.

K_{app} , die apparente Gleichgewichtskonstante K_M für Aktin, beträgt für die Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C mindestens $140 \mu\text{M}$. Für Aktinkonzentrationen bis maximal $30 \mu\text{M}$ können die Messwerte linear approximiert werden. Die Steigung der linearen Regression entspricht dem Quotienten k_{cat}/K_{app} , der Bindungskonstante 2. Ordnung für Aktin in Anwesenheit von ATP.

Sowohl die maximale Katalysegeschwindigkeit als auch die Bindungskonstante 2. Ordnung der Aktinbindung in Anwesenheit von ATP ist für NMHC-2C2 im Vergleich zu seinen beiden Isoformen um den Faktor 2 erhöht. Diese Isoform weist damit eine effektivere Kopplung zwischen der Aktin- und der Nukleotidbindungsregion auf. Im Vergleich mit skelettmuskulärem Myosin-2 des Kaninchens ($k_{cat}/K_{app} \approx 1,6$ [WAGNER 1981]) ist die Kopplungseffizienz für alle Isoformen des zytoplasmatischen Myosins-2C schwach. Die schwache Kopplungseffizienz bewirkt eine geringe Beschleunigung der ADP-Freisetzung durch die Aktinbindung und eine lange Population der ADP-bindenden Zustände des Myosin ATPase-Zyklus.

Tabelle 3.2 fasst die ermittelten Parameter der *steady-state* ATPase-Aktivität der Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C zusammen.

Tabelle 3.2: Parameter der basalen und Aktin-aktivierten *steady-state* ATPase-Aktivität des NMHC-2Cs

Konstante	Signal	NMHC-2C0 ¹	NMHC-2C1 ¹	NMHC-2C2 ¹
k_{basal} (s^{-1})	NADH-Assay	$0,064 \pm 0,01$	$0,079 \pm 0,01$	$0,082 \pm 0,01$
k_{cat} (s^{-1})	NADH-Assay ²	$>0,23$	$>0,21$	$>0,43$
K_{app} (μM)	NADH-Assay	>140	>140	>140
k_{cat}/K_{app} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	NADH-Assay ³	$0,00227 \pm 1,9\text{E-}4$	$0,00195 \pm 2,5\text{E-}4$	$0,0046 \pm 5,03\text{E-}4$

¹ Reaktionsbedingungen: $0,3 \mu\text{M}$ Myosin, 2mM ATP, ATPase-Puffer ohne KCl, $T = 25^\circ\text{C}$

² bei einer F-Aktinkonzentration von $140 \mu\text{M}$

³ grafisch aus der Anfangssteigung ermittelt

Alle Isoformen des NMHC-2Cs weisen eine vergleichbare basale ATPase-Aktivität von $\approx 0,07 \text{s}^{-1}$ auf. Glattmuskuläres und kardiales Myosin-2 aus dem Haushuhn ($k_{basal} = 0,06$ bzw. $0,04 \text{s}^{-1}$) sowie skelettmuskuläres Myosin des Kaninchens ($k_{basal} = 0,06 \text{s}^{-1}$) haben analoge basale katalytische Aktivitäten [BAGSHAW *et al.* 1974, MARSTON und TAYLOR 1980, SLEEP und TAYLOR 1976]. Im Vergleich mit den humanen nichtmuskulären Myosinen-2A und -2B ($k_{basal} = 0,013$ bzw. $0,007 \text{s}^{-1}$) sowie der korrespondierenden Isoformen des murinen Myosins-2C ($k_{basal} < 0,006\text{-}0,02 \text{s}^{-1}$) ist k_{basal} aller Isoformen des humanen zytoplasmatischen Myosins-2C deutlich erhöht [JANA *et al.* 2009, KOVÁCS *et al.* 2003, WANG *et al.* 2003].

Nichtmuskuläres sowie glattmuskuläres Myosin zeigen eine deutliche Abhängigkeit der ATPase-

Aktivität vom Phosphorylierungsstatus der leichten Ketten. Deshalb werden die kinetischen Parameter nach der Phosphorylierung der leichten Ketten mit den experimentell ermittelten kinetischen Parametern des humanen nichtmuskulären Myosins-2C verglichen. Durch die Verwendung des künstlichen Hebelarms befinden sich die dargestellten Fusionsproteine in einem konstitutiv aktiven Zustand und können mit den nativ phosphorylierten Pendanten verglichen werden.

Die maximale Umsatzgeschwindigkeit der Isoformen des humanen Myosins-2C steht in guter Übereinstimmung mit den korrespondierenden kinetischen Parametern der murinen Isoformen (NMHC-2C0 = $0,16 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$, NMHC-2C1 = $0,21 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ und NMHC-1C1C2 = $0,26 \pm 0,06 \text{ s}^{-1}$) [JANA *et al.* 2009].

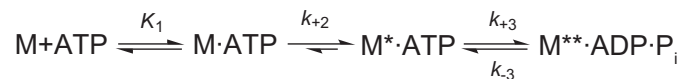
Abweichungen bestehen in der Gleichgewichtskonstante K_{app} : Die murinen Isoformen weisen K_{app} -Werte im Bereich zwischen $3,8 \mu\text{M}$ und $10,9 \mu\text{M}$ auf [JANA *et al.* 2009]. Im Kontrast dazu zeigt das humane Analogon im Konzentrationsbereich bis $140 \mu\text{M}$ F-Aktin keine Sättigung und K_{app} kann nur geschätzt werden.

Die maximale Umsatzgeschwindigkeit des humanen nichtmuskulären Myosins-2C liegt höher als die korrespondierenden kinetischen Parameter der menschlichen zytoplasmatischen Myosine-2A und -2B ($0,17 \pm 0,005 \text{ s}^{-1}$ und $0,13 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$) [KOVÁCS *et al.* 2003, WANG *et al.* 2003]. Glattmuskuläres und kardiales Myosin des Haushuhnes ($0,7 \text{ s}^{-1}$ und $4,2 \text{ s}^{-1}$) sowie skelettmuskuläres Myosin des Kaninchens (29 s^{-1}) weisen deutlich beschleunigte maximale Katalysegeschwindigkeiten auf [MARSTON und TAYLOR 1980, WAGNER 1981].

3.1.8 Interaktion zwischen Myosin und Aktomyosin mit ATP

3.1.8.1 Bestimmung der ATP-Bindung an Myosin

Die ATP-Bindung an Myosine, die ein nukleotidsensitives Tryptophan an der Position 512 aufweisen, führt zu einer Verstärkung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz. Das folgende Schema beschreibt die bimolekulare Reaktion und dient als Interpretationsgrundlage der experimentell bestimmten kinetischen Parameter.



Für die Interpretation der ermittelten Daten wird diesem Mechanismus zu Grunde gelegt, dass ATP schnell und irreversibel gebunden wird, während die Phosphatfreisetzung in Abwesenheit von Aktin sehr langsam ist. Daher wird die Reaktion als Zwei-Schritt-Mechanismus interpretiert, in dem der irreversible Schritt der ATP-Bindung von einer reversiblen Hydrolysereaktion gefolgt wird. Der Schritt der ATP-Bindung setzt sich zusammen aus einer diffusionskontrollierten Formation eines Kollisionskomplexes (Gleichgewichtskonstante K_1), gefolgt von einer fast irreversiblen Isomerisierung (Geschwindigkeitskonstante k_{+2}), die mit einer Konformationsumwandlung und einer simultanen Erhöhung der Tryptophanfluoreszenz verbunden ist [BAGSHAW und TRENTHAM 1974, CRUZ und OSTAP 2009].

Die Interaktion der Isoformen des humanen nichtmuskulären Myosins-2C mit ATP wurde transienkinetisch analysiert. Für die Bestimmung wurden $0,5 \mu\text{M}$ Myosin und ATP in einem Konzentrationsbereich von $2,5 \mu\text{M}$ bis maximal $1,5 \text{ mM}$ eingesetzt. Ein Anstieg des Fluoreszenzsignals wurde nach der Anregung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz bei einer Wellenlänge von 297 nm und der Emission durch einen 320 nm Langpassfilter spektroskopisch verfolgt. Die Messwerte können einfach-exponentiell approximiert werden.

Die lineare Regression der Messdaten im Konzentrationsbereich bis $17,5 \mu\text{M}$ ATP bestimmt die apparente Bindungskonstante zweiter Ordnung ($K_1 k_{+2}$) der ATP-Bindung an Myosin (siehe Abbildung 3.11,B). Bei Substratkonzentrationen oberhalb von $20 \mu\text{M}$ ATP weichen die ermittelten Ratenkonstanten von der Linearität ab und folgen einem hyperbolen Verlauf. Dieser Sättigungsbereich wird bei Myosinen der Klasse-2 der ATP-Hydrolyse ($k_{+3} + k_{-3}$) zugeordnet und repräsentiert die Summe der Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion. Abbildung 3.11,A stellt exemplarisch für NMHC-2C2 die Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} von

der ATP-Konzentration sowie einen transienten Fluoreszenzanstieg der ATP-Bindung an Myosin dar. Die korrespondierenden kinetischen Parameter der Interaktion der Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C mit ATP sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

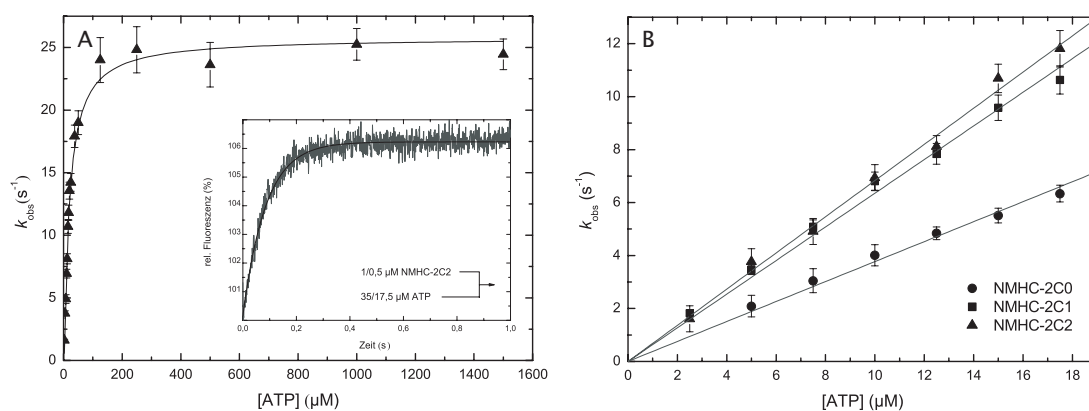


Abbildung 3.11: ATP-Bindung an die Isoformen des humanen zytoplasmatischen Myosins-2C. A: Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten des NMHC-2C2 von der ATP-Konzentration. Die Miniatur repräsentiert exemplarisch einen Transienten der Titration. B: Die ermittelten Raten folgen bei niedrigen ATP-Konzentrationen einem linearen Zusammenhang. Die Anpassung einer Geraden an individuelle Messreihen definiert die apparente ATP-Bindungskonstante zweiter Ordnung (K_1k_{+2}) an Myosin.

Das Nukleotid-Analogon mantATP zeigt einen Fluoreszenzanstieg bei der Bindung an Myosin. Bei der Mischung der Reaktanten unter Bedingungen *pseudo*-erster Ordnung wurde der Fluoreszenzanstieg in einer *stopped-flow*-Apparatur im Konzentrationsbereich von $0,5 \mu\text{M}$ bis maximal $20 \mu\text{M}$ mantATP ermittelt. Eine einfach-exponentielle Regression mit Steigung (*lag*-Phase) approximiert die Messwerte (Abbildung 3.46,A), wobei der Ursprung der Steigung nicht weiter untersucht wurde. Die Abhängigkeit der bestimmten Ratenkonstanten (k_{obs}) von der mantATP-Konzentration ist im beobachteten Konzentrationsbereich linear und führt zur apparenten Bindungskonstante 2. Ordnung K_1k_{+2} der mantATP-Bindung an Myosin (Abbildung 3.46,B). Die ermittelten Assoziationskonstanten sind in guter Übereinstimmung mit den experimentell über das intrinsische Tryptophansignal bestimmten Parametern und in Tabelle 3.3 aufgeführt.

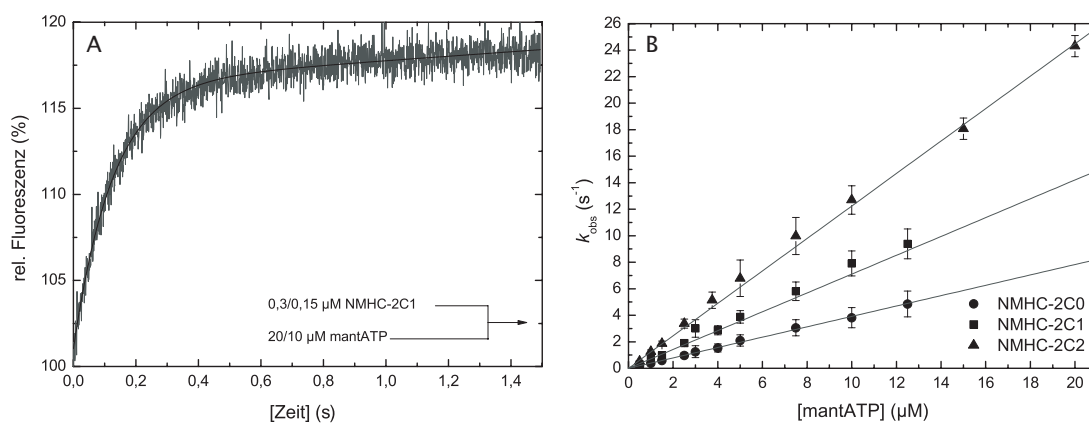
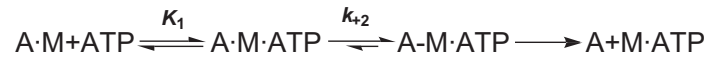


Abbildung 3.12: Kinetik der mantATP-Bindung an Myosin. A: Fluoreszenzänderung bei der Bindung von mantATP an NMHC-2C1. Der Transient weist eine relative Amplitude von 17,55% und eine Geschwindigkeitskonstante $k_{obs} = 7,85 \text{ s}^{-1}$ auf. B: Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von der mantATP-Konzentration. Die ermittelten Raten folgen bei niedrigen mantATP-Konzentrationen einem linearen Zusammenhang. Die lineare Regression individueller Messreihen definiert die apparente mantATP-Bindungskonstante zweiter Ordnung K_1k_{+2} an Myosin.

3.1.8.2 ATP-Bindung an Aktomyosin

Die ATP-Bindung an Aktomyosin verringert die Aktin-Affinität von Myosin: Als Konsequenz dissoziiert der Aktomyosin-Komplex. Die Reaktion erfolgt mindestens nach einem Zwei-Schritt-Mechanismus: Zuerst formiert sich ein unspezifischer Kollisionskomplex (Gleichgewichtskonstante K_1), der in einem schnellen Gleichgewicht mit nukleotidfreiem Aktomyosin steht. Des Weiteren isomerisiert der ternäre Kollisionskomplex zum Zustand A-M-ATP (Geschwindigkeitskonstante k_{+2}), der schnell dissoziiert [MILLAR und GEEVES 1983, SIEMANKOWSKI und WHITE 1984]. Die Isomerisierung limitiert die maximale Dissoziationsgeschwindigkeit.



Die ATP-Bindung an Aktomyosin wurde durch die ATP-induzierte Dissoziation des Myosins von filamentösem Pyren-Aktin ermittelt.

Die Pyrenfluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt und die Fluoreszenzemission durch einen KV 389-Filter verfolgt. Die detektierten Fluoreszenzsignale folgen einem einfach exponentiellen Verlauf, welcher bei Isoform-2C0 eine zusätzliche Steigung aufweist. Die Steigung wurde bei der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt. Ein möglicher Ursprung dieser *lag*-Phase könnte eine Isomerisierung zwischen dem geschlossenen Aktomyosin-Zustand, der kein Nukleotid binden kann und einem offenen Zustand, der hierzu in der Lage ist, sein. Des Weiteren können Nukleotidkontaminationen zu diesem Verhalten führen.

Die beobachteten Ratenkonstanten weisen eine hyperbole Abhängigkeit von der ATP-Konzentration auf. Abbildung 3.46 beschreibt exemplarisch einen Reaktionsverlauf für das nichtmuskuläre Myosin-2C1. Aus der Approximation der Daten können die Parameter $1/K_1$ und bei saturierenden ATP-Konzentrationen die maximale Geschwindigkeitskonstante der Isomerisierung k_{+2} ermittelt werden.

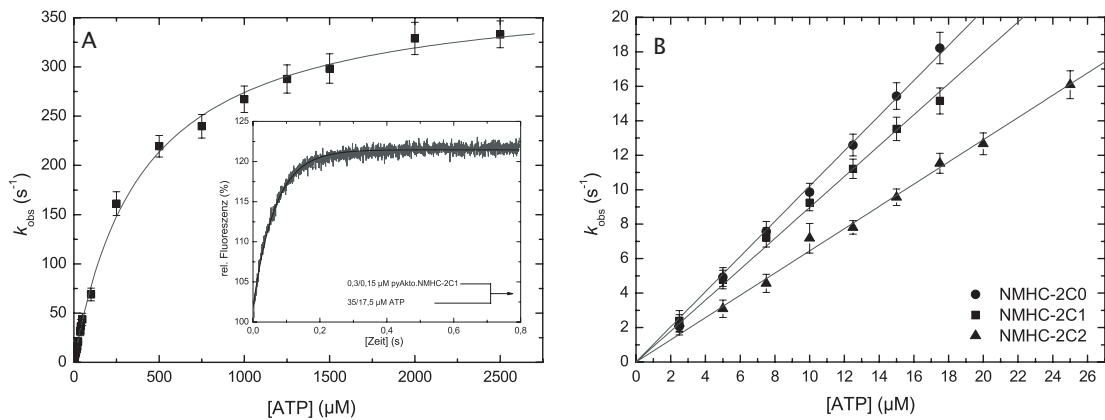


Abbildung 3.13: Kinetik der ATP-Bindung an Aktomyosin. A: Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten des NMHC-2C1 von der ATP-Konzentration. Der eingefügte Graph stellt exemplarisch einen Transienten der korrespondierenden Titration dar. B: Die individuell ermittelten Ratenkonstanten der Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C folgen bei niedrigen ATP-Konzentrationen einem linearen Zusammenhang. Die lineare Approximation individueller Messreihen definiert die apparente Bindungskonstante zweiter Ordnung ($K_1 k_{+2}$) der ATP-Bindung an Aktomyosin.

Zusammenfassend stellt Tabelle 3.3 alle Parameter der Interaktion zwischen Myosin sowie Aktomyosin mit ATP dar.

Tabelle 3.3: Kinetische Parameter der Interaktion zwischen Myosin sowie Aktomyosin mit ATP

Konstante	Signal	NMHC-2C0	NMHC-2C1	NMHC-2C2
K_1k_{+2} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Tryptophan	$0,37 \pm 0,008$	$0,66 \pm 0,013$	$0,68 \pm 0,008$
K_1k_{+2} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	mantATP	$0,39 \pm 0,004$	$0,71 \pm 0,014$	$1,23 \pm 0,020$
$k_{+3}+k_{-3}$ (s^{-1})	Tryptophan	$34,69 \pm 0,750$	$29,53 \pm 0,570$	$25,79 \pm 0,500$
$1/K_1$ (μM)	Tryptophan	$74,87 \pm 4,000$	$29,97 \pm 3,300$	$16,14 \pm 1,980$
\mathbf{K}_1k_{+2} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Pyren-Aktin	$1,02 \pm 0,010$	$0,89 \pm 0,010$	$0,64 \pm 0,010$
k_{+2} (s^{-1})	Pyren-Aktin	$516,87 \pm 9,980$	$382,32 \pm 6,400$	$416,98 \pm 13,54$
$\mathbf{1}/\mathbf{K}_1$ (μM)	Pyren-Aktin	$483,34 \pm 31,80$	$394,07 \pm 25,09$	$484,42 \pm 57,76$

Die ATP-Bindung an Myosin sowie Aktomyosin ist durch die expandierten Oberflächenschleifen der Isoformen-2C1 und -2C2 geprägt. Die ATP-Bindung an Myosin steigt leicht mit der Länge der Oberflächenschleifen an, während die ATP-Bindung an Aktomyosin inverses Verhalten aufweist. Dabei ist die erhöhte ATP-Bindungskonstante 2. Ordnung in der Abwesenheit von Aktin wahrscheinlich durch die expandierte Schleife-1 dominiert. Dieses Verhalten wurde bereits für glattmuskuläres Myosin beschrieben [ROVNER *et al.* 1997, SWEENEY *et al.* 1998]. Die ATP-Bindungskonstanten sind im Vergleich zu anderen Myosinen der Klasse-2 identisch. Lediglich glattmuskuläres und skelettmuskuläres Myosin weisen mit $1,8 - 3,2 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erhöhte Assoziationskonstanten auf [BAGSHAW *et al.* 1974, CREMO und GEEVES 1998, MARSTON und TAYLOR 1980, RITCHIE *et al.* 1993]. In Anwesenheit von F-Aktin weisen die Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C ATP-Bindungskonstanten 2. Ordnung auf, die zwischen denen des NMHC-2A ($0,14 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und des kardialen Myosins liegen ($4 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [KOVÁCS *et al.* 2003, MARSTON und TAYLOR 1980].

Die Hydrolyse erfolgt für die Transkriptvarianten des NMHC-2Cs mit einer Geschwindigkeit von $\approx 30 \text{ s}^{-1}$. Diese Geschwindigkeit ist gegenüber der Hydrolysegeschwindigkeit des kardialen und skelettmuskulären Myosins-2 (82 s^{-1} bzw. 130 s^{-1}) erniedrigt [MARSTON und TAYLOR 1980, RITCHIE *et al.* 1993]. NMHC-2A, NMHC-2B und glattmuskuläres Myosin weisen im Vergleich zu NMHC-2C ähnliche Maximalgeschwindigkeiten auf ($14 - 20 \text{ s}^{-1}$) [KOVÁCS *et al.* 2003, WANG *et al.* 2003].

$1/K_1$ sinkt für die Isoformen des nichtmuskulären Myosins in der Reihenfolge NMHC-2C0 > NMHC-2C1 > NMHC-2C2 von initialen $\approx 74 \mu\text{M}$ auf $\approx 16 \mu\text{M}$. $\mathbf{1}/\mathbf{K}_1$ ist für die Isoformen des NMHC-2Cs konstant ($> 400 \mu\text{M}$) und korreliert mit NMHC-2B ($> 400 \mu\text{M}$) [WANG *et al.* 2003]). Damit ist $\mathbf{1}/\mathbf{K}_1$ dieser Isoformen im Vergleich zu NMHC-2A ($\approx 900 \mu\text{M}$) und skelettmuskulärem Myosin-2 ($2000 \mu\text{M}$) reduziert [KOVÁCS *et al.* 2003, MILLAR und GEEVES 1983]. Die Geschwindigkeit der Isomerisierung k_{+2} liegt für die *splice*-Varianten des NMHC-2Cs zwischen $\approx 400 \text{ s}^{-1}$ und $\approx 500 \text{ s}^{-1}$. NMHC-2C weist damit intermittierendes Verhalten im Vergleich zu den nichtmuskulären Myosinen -2B und -2A ($\approx 150 - 190 \text{ s}^{-1}$) und der Gruppe der kardialen, glattmuskulären und skelettmuskulären Myosine ($\approx 1500 - 5000 \text{ s}^{-1}$) auf [KOVÁCS *et al.* 2003, MARSTON und TAYLOR 1980, MILLAR und GEEVES 1983, WANG *et al.* 2003].

3.1.9 Interaktion zwischen Myosin und ADP

3.1.9.1 MantADP-Bindung an Myosin

Das ADP-Analogon mantADP zeigt einen Fluoreszenzanstieg bei der Bindung an Myosin. Die Transienten der schnellen Mischung der Reaktanten in einer *stopped-flow*-Apparatur folgen einem einfach-exponentiellen Reaktionsverlauf mit *lag*-Phase, deren Ursprung nicht weiter untersucht wurde. Im experimentellen Konzentrationsbereich besteht eine lineare Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) von der mantADP-Konzentration (Abbildung 3.14,B). Die lineare Regression individueller Messreihen definiert die apparente Assoziationskonstante 2. Ordnung (k_{+D}) der mantADP-Bindung an Myosin. Die Ordinate repräsentiert die mantADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-D} . Die kinetischen Parameter der Interaktion zwischen Myosin und mantADP sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

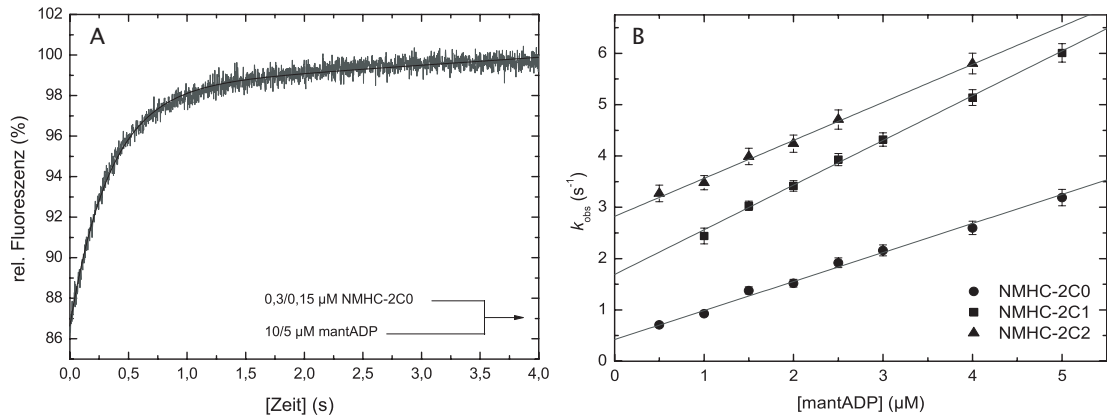


Abbildung 3.14: Interaktion der Isoformen des NMHC-2Cs mit mantADP. A: Das Fluoreszenzsignal der Bindung von $5\ \mu\text{M}$ mantADP an $0,15\ \mu\text{M}$ NMHC-2C0 wurde bei einer Wellenlänge von $297\ \text{nm}$ angeregt und die Fluoreszenzemission nach FRET durch einen KV 389-Filter verfolgt. Der abgebildete Transient weist eine Amplitude von $12,26\%$ und eine beobachtete Geschwindigkeitskonstante $k_{obs} = 2,91\ \text{s}^{-1}$ auf. B: Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von der mantADP-Konzentration. Die ermittelten Raten folgen im Konzentrationsbereich zwischen $0,5\ \mu\text{M}$ und $5\ \mu\text{M}$ mantADP einem linearen Zusammenhang. Die lineare Regression individueller Messreihen bestimmt die apparente mantADP-Bindungskonstante zweiter Ordnung (k_{+D}) von Myosin. Die Ordinaten repräsentieren die korrespondierenden Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{-D}).

3.1.9.2 Bestimmung der ADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-D}

Die mantADP-Dissoziationskonstante von Myosin wurde durch ein weiteres Experiment verifiziert. Dabei wurden $0,15\ \mu\text{M}$ Myosin mit $5\text{--}10\ \mu\text{M}$ mantADP präinkubiert und mit einem Überschuss ($1000\ \mu\text{M}$) ATP gemischt. Die Rate der beobachteten Fluoreszenzniedrigung wird in diesem Experiment durch die mantADP-Dissoziation von Myosin determiniert. Die Reaktionsverläufe werden mit einer einfach-exponentiellen Regression beschrieben und definieren die Geschwindigkeitskonstanten der ADP-Dissoziation. Die direkt bestimmten Dissoziationsraten sind in guter Übereinstimmung mit den experimentell aus den Bindungsexperimenten ermittelten kinetischen Parametern und in Tabelle 3.4 tabelliert.

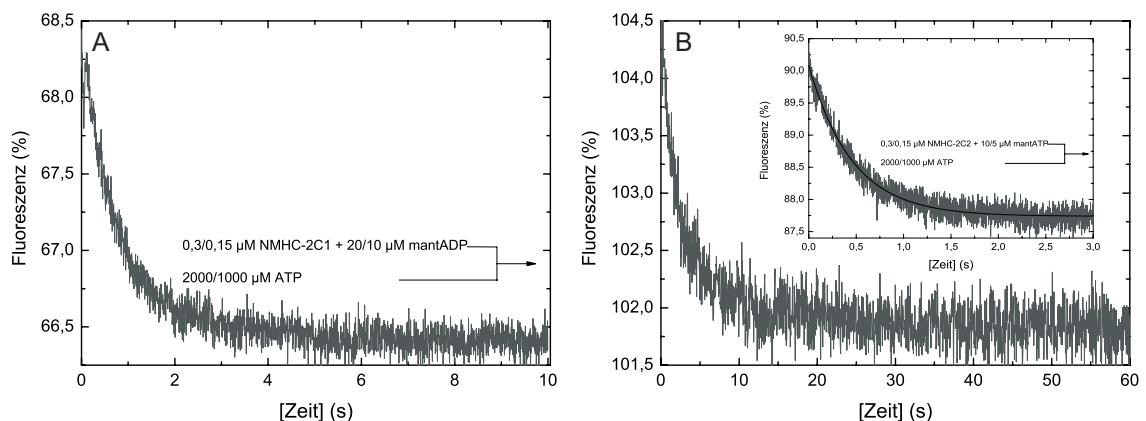


Abbildung 3.15: ADP-Dissoziation von Myosin. Dissoziation von mantADP aus dem Myosin-ADP-Komplex induziert durch einen Überschuss an ATP. Das Fluoreszenzsignal wurde für das NMHC-2C0 bei einer Wellenlänge von $297\ \text{nm}$, für NMHC-2C1 und -2C2 bei $365\ \text{nm}$ angeregt und die Fluoreszenzemission durch einen KV 389-Filter detektiert. Die Messwerte werden mono-exponentiell approximiert. A beschreibt den Fluoreszenzverlauf für das humane nichtmuskuläre Myosin-2C1. B stellt analoge Reaktionsverläufe für die humanen nichtmuskulären Myosine-2C0 und -2C2 (Miniatur) dar.

3.1.9.3 Bestimmung der Dissoziationsgleichgewichtskonstante K_D

Die ADP-Dissoziationsgleichgewichtskonstante von Myosin, K_D , kann aus dem Quotienten k_{-D}/k_{+D} berechnet werden und beträgt zwischen $0,85 \pm 0,124 \mu\text{M}$ für NMHC-2C0 und $3,87 \pm 0,241 \mu\text{M}$ für NMHC-2C2. NMHC-2C1 weist mit $1,9 \pm 0,112 \mu\text{M}$ intermittierendes Verhalten auf.

K_D wurde für die Transkriptvarianten des NMHC-2Cs durch ein weiteres unabhängiges Experiment direkt bestimmt. Dabei wurde $0,083\text{-}0,16 \mu\text{M}$ Myosin mit steigenden ADP-Konzentrationen ($0\text{-}10 \mu\text{M}$) präinkubiert und der Komplex schnell mit einem Überschuss an ATP ($0,1\text{-}0,5 \text{mM}$) in einer *stopped-flow*-Apparatur gemischt. Die intrinsische Tryptophanfluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 297nm angeregt und die Fluoreszenzemission durch einen WG 320-Filter zeitabhängig detektiert. In Abwesenheit von ADP können die Reaktionsverläufe mit einer einfachen-exponentiellen Regression beschrieben werden, während sie in Anwesenheit von ADP einen biphasischen Verlauf aufweisen und durch die Summe zweier Exponentialfunktionen approximiert werden (Abbildung 3.16,B). Dabei repräsentiert die schnelle Phase die ATP-Bindung an nukleotidfreies Myosin, während die langsame Phase dem Prozess der ATP-induzierten ADP-Dissoziation von Myosin zugeordnet wird. Mit ansteigenden ADP-Konzentrationen nimmt die Amplitude der schnellen Phase ab, während die Amplitude der langsamen Phase zunimmt. Die relative Amplitude der langsamen Phase kann über folgenden Formalismus berechnet werden:

$$A_{rel} = \frac{A_{langsam}}{A_{schnell} + A_{langsam}} \quad (3.1)$$

Die relative Amplitude der langsamen Phase weist eine hyperbolische Abhängigkeit von der ADP-Konzentration auf und ist in Abbildung 3.16 exemplarisch für NMHC-2C2 dargestellt. Eine Approximation der Daten bestimmt die Dissoziationsgleichgewichtskonstante K_D . Tabelle 3.4 fasst die Parameter der Interaktion der Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C mit ADP zusammen.

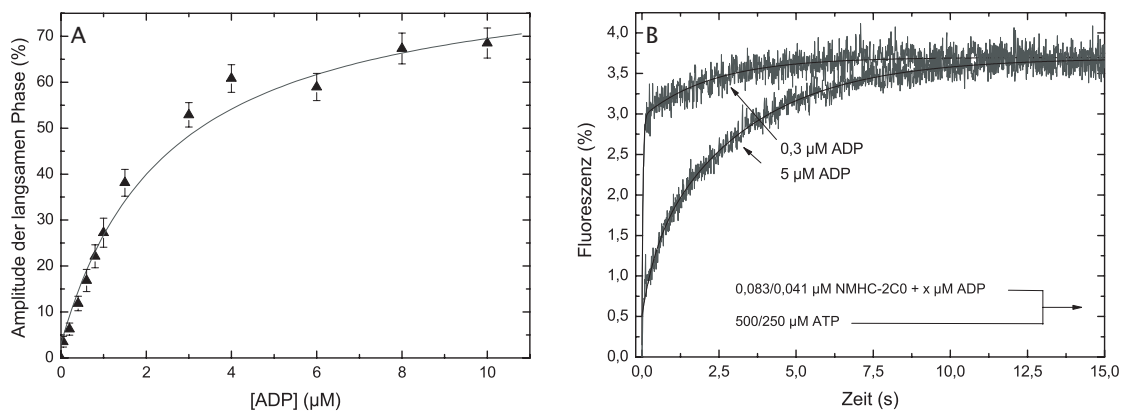


Abbildung 3.16: Bestimmung der Dissoziationsgleichgewichtskonstante K_D . A: Aufgetragen ist die Zunahme der relativen Amplitude der langsamen Phase des NMHC-2C2 in Abhängigkeit von der ADP-Konzentration. B: Transienten der Reaktion des nichtmuskulären Myosins-2C0 in Anwesenheit von $0,3 \mu\text{M}$ ADP sowie $5 \mu\text{M}$ ADP mit einem Überschuss an ATP.

Tabelle 3.4: Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Interaktion zwischen Myosin und ADP

Konstante	Signal	NMHC-2C0	NMHC-2C1	NMHC-2C2
k_{+D} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	mantADP	$0,54 \pm 0,020$	$0,87 \pm 0,020$	$0,73 \pm 0,030$
k_{-D} (s^{-1})	mantADP ¹	$0,46 \pm 0,050$	$1,66 \pm 0,060$	$2,83 \pm 0,060$
k_{-D} (s^{-1})	mantADP ²	$0,422 \pm 0,002$	$1,25 \pm 0,020$	$2,17 \pm 0,020$
K_D (μM)	k_{-D}/k_{+D}	$0,85 \pm 0,124$	$1,9 \pm 0,112$	$3,87 \pm 0,241$
K_D (μM)	Tryptophan	$0,98 \pm 0,180$	$1,98 \pm 0,410$	$2,508 \pm 0,630$

¹ Ordinate der k_{obs} versus mantADP Auftragung

² ATP-chasing-Experiment

Die apparenten ADP-Bindungskonstanten 2. Ordnung der Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C sind vergleichbar mit den korrespondierenden Parametern der zytoplasmatischen Myosine-2A und -2B ($\approx 0,55$ - $0,81 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [KOVÁCS *et al.* 2003, WANG *et al.* 2003]. Damit weisen nichtmuskuläre Myosine der Klasse-2 insgesamt niedrigere ADP-Bindungskonstanten als glattmuskuläres und skelettmuskuläres Myosin-2 ($\approx 1,1$ - $1,7 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) auf [BAGSHAW *et al.* 1974, CREMO und GEEVES 1998, SLEEP und TAYLOR 1976, TRYBUS und TAYLOR 1982].

Die Geschwindigkeitskonstanten der ADP-Dissoziation der nichtmuskulären Myosine-2A, -2B und -2C0 sind mit $\approx 0,5 \text{ s}^{-1}$ identisch [KOVÁCS *et al.* 2003, WANG *et al.* 2003]. Für NMHC-2C bewirkt eine expandierte Schleife-1 eine 3fache Erhöhung der Dissoziationsgeschwindigkeit, die durch eine verlängerte Schleife-2 zusätzlich beschleunigt wird. Die Isoformen-2C1 und -2C2 weisen somit komparable ADP-Dissoziationsgeschwindigkeiten wie glattmuskuläres, kardiales und skelettmuskuläres Myosin ($0,9$ - $2,5 \text{ s}^{-1}$) auf [CREMO und GEEVES 1998, MARSTON und TAYLOR 1980, TRYBUS und TAYLOR 1982].

Die relativ konstanten ADP-Assoziationsraten in Kombination mit variierenden ADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten des NMHC-2Cs beeinflussen die ADP-Affinitäten der Myosine. Alle Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C weisen ADP-Dissoziationsgleichgewichtskonstanten im sub- bzw. mikromolaren Bereich auf. Die ADP-Affinitäten sinken in der Reihenfolge NMHC-2C0>NMHC-2C1>NMHC-2C2. Damit weisen NMHC-2C1 und NMHC-2C2 vergleichbare bzw. niedrigere ADP-Affinitäten als skelettmuskuläres Myosin-2 ($2 \mu\text{M}$) auf [CREMO und GEEVES 1998]. NMHC-2C0 weist eine geringere ADP-Affinität als kardiales Myosin und nichtmuskuläres Myosin-2B ($0,33$ - $0,65 \mu\text{M}$) und eine höhere Affinität als glattmuskuläres Myosin und nichtmuskuläres Myosin-2A ($\approx 1,2$ - $1,5 \mu\text{M}$) auf [CREMO und GEEVES 1998, KOVÁCS *et al.* 2003, SIEMANKOWSKI und WHITE 1984, WANG *et al.* 2003].

3.1.10 Interaktion zwischen Aktomyosin und ADP

3.1.10.1 MantADP-Bindung an Aktomyosin

Die Interaktion zwischen Aktomyosin und ADP wurde durch die Beobachtung des Fluoreszenzanstiegs bei der mantADP-Bindung an Aktomyosin charakterisiert. Die Transienten weisen für NMHC-2C0 und -2C1 einen doppelt-exponentiellen Reaktionsverlauf auf, der transiente Fluoreszenzanstiegs des NMHC-2C2s wird einfach-exponentiell approximiert. Im Falle einer biphasischen Regression wurde die langsame Phase bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Abbildung 3.17 beschreibt die lineare Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von der mantADP-Konzentration und repräsentiert ausgewählte Transienten. Die kinetischen Parameter der Interaktion zwischen ADP und Aktomyosin sind in Tabelle 3.4 aufgelistet.

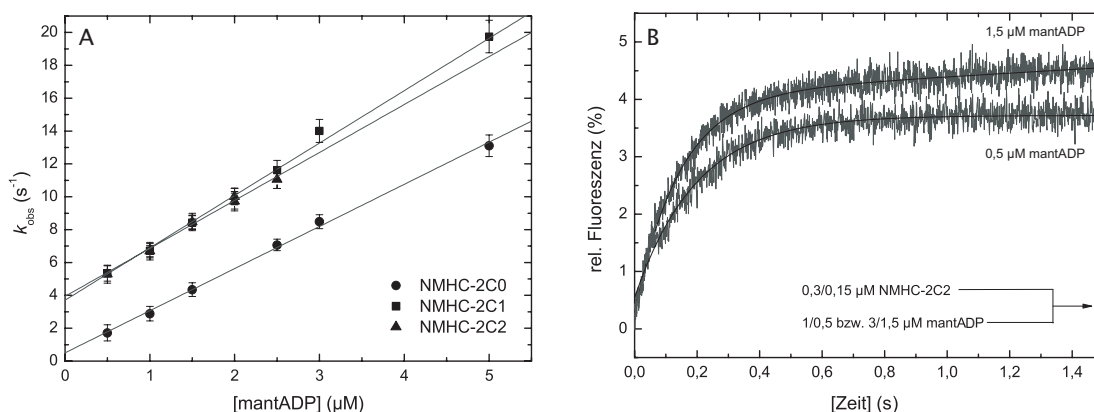


Abbildung 3.17: Bindung von mantADP an Aktomyosin. A: Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstante k_{obs} von der mantADP-Konzentration. Die lineare Regression individueller Messreihen bestimmt die apparente mantADP-Bindungskonstante k_{+AD} . Die Ordinaten repräsentieren die korrespondierenden Dissoziationsraten. B: Fluoreszenzanstieg bei der Bindung von $0,5 \mu\text{M}$ bzw. $1,5 \mu\text{M}$ mantADP an Aktomyosin. Die Transienten folgen einem mono-exponentiellen Verlauf. Bei der Bindung von $0,5 \mu\text{M}$ mantADP an Aktomyosin beträgt die Amplitude $3,17\%$ und die Geschwindigkeitskonstante $k_{obs} = 5,05 \text{ s}^{-1}$; bei der Bindung von $1,5 \mu\text{M}$ mantADP an Aktomyosin beträgt die Amplitude $3,78\%$, die Geschwindigkeitskonstante $k_{obs} = 6,98 \text{ s}^{-1}$.

3.1.10.2 ADP-Dissoziation von Aktomyosin

Die Dissoziation von mantADP aus dem Komplex mit Aktomyosin wurde durch einen Überschuss an ATP induziert. Für den Versuch wurden $0,3 \mu\text{M}$ Aktomyosin mit $2-5 \mu\text{M}$ mantADP präinkubiert und schnell mit einem Überschuss ($1-2 \text{ mM}$) ATP gemischt. Eine Erniedrigung des optischen Signals wurde nach der Fluoreszenzanregung bei 365 nm bzw. 297 nm durch einen KV 389-Filter detektiert. Transienten der Reaktion folgen einem mono-exponentiellen Verlauf und sind in Abbildung 3.18 dargestellt. Die ermittelten Ratenkonstanten k_{-AD} der mantADP-Dissoziation von Aktomyosin sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

3.1.10.3 ADP-Dissoziationsgleichgewichtskonstante von Aktomyosin

Die Affinitätskonstante von Aktomyosin für ADP (K_{AD}) wurde neben der Berechnung aus dem Quotienten k_{-AD}/k_{+AD} direkt durch die Messung der ATP-induzierten Dissoziation von Myosin und Pyren-Aktin in Gegenwart von ADP bestimmt.

Aufgrund der hohen ADP-Affinitäten der Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C wurden die Reaktionsbedingungen so gewählt, dass die Rate der ADP-Dissoziation im Vergleich zur ATP-Bindungsrate niedrig ist. Pyren-Aktomyosin ($0,066-0,083 \mu\text{M}$) wurde mit variierenden ADP-Konzentrationen präinkubiert und in einer *stopped-flow*-Apparatur schnell mit einem Überschuss

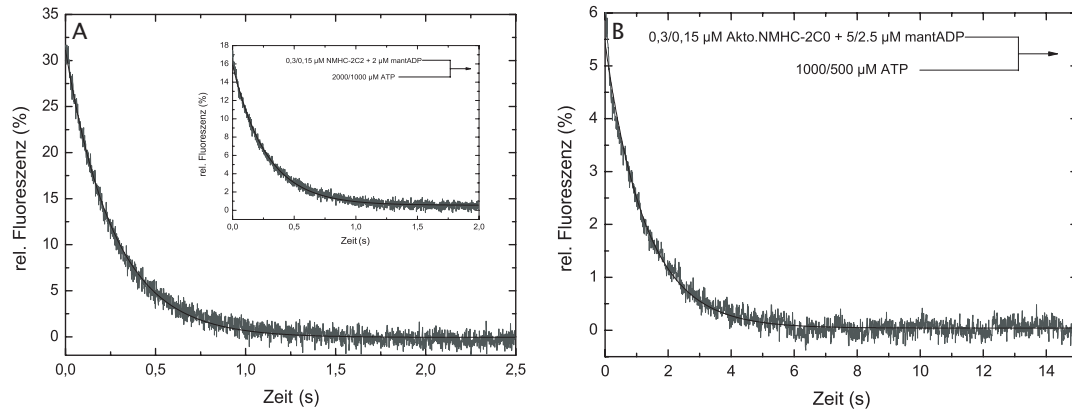


Abbildung 3.18: ATP-induzierte Dissoziation von mantADP aus dem Aktomyosin-Komplex. A: Transient der Reaktion des NMHC-2C1 ($k_{AD} = 3,74 \pm 0,017 \text{ s}^{-1}$). Miniatur: analoge Reaktion des NMHC-2C2 ($k_{AD} = 3,66 \pm 0,015 \text{ s}^{-1}$) B: Fluoreszenzniedrigung bei der Dissoziation des Aktomyosin-mantADP-Komplexes des NMHC-2C0. Der Transient weist eine Amplitude von $-5,38\%$ und eine ADP-Dissoziationsrate k_{AD} von $0,78 \pm 0,005 \text{ s}^{-1}$ auf.

an ATP (1 mM) gemischt. Die Fluoreszenzintensität der Transienten steigt durch die ATP-induzierte Dissoziation von Myosin und Pyren-Aktin als eine Funktion der Zeit. Die Reaktionsverläufe werden durch eine doppelt-exponentielle Regression beschrieben. Dabei entspricht die Ratenkonstante der schnellen Phase der ATP-Bindung an die Fraktion an nukleotidfreiem Pyren-Aktomyosin. Die langsame Rate repräsentiert die ADP-Freisetzung. Bei hohen ADP-Konzentrationen ist der Pyren-Aktomyosin-Komplex mit ADP gesättigt und der Transient wird von der langsamen Rate dominiert. Die Affinität von Aktomyosin zu ADP wird durch folgenden Algorithmus ermittelt:

$$A_{langsam} = \frac{[ADP]}{K_{AD} + [ADP]} \quad (3.2)$$

Die Abhängigkeit der relativen Amplitude der langsamen Phase von der ADP-Konzentration folgt einem hyperbolischen Verlauf und ist in Abbildung 3.19 exemplarisch für NMHC-2C1 dargestellt. In Tabelle 3.5 sind die kinetischen Konstanten der Interaktion zwischen Aktomyosin und ADP aufgeführt.

Tabelle 3.5: Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Interaktion zwischen Aktomyosin und ADP

Konstante	Signal	NMHC-2C0	NMHC-2C1	NMHC-2C2
k_{+AD} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	mantADP	$2,56 \pm 0,060$	$3,18 \pm 0,109$	$2,91 \pm 0,190$
k_{AD} (s^{-1})	mantADP ¹	$0,5 \pm 0,160$	$3,7 \pm 0,310$	$3,94 \pm 0,350$
k_{AD} (s^{-1})	mantADP ²	$0,78 \pm 0,005$	$3,74 \pm 0,017$	$3,66 \pm 0,015$
K_{AD} (μM)	k_{AD}/k_{+AD}	$0,19 \pm 0,067$	$1,16 \pm 0,137$	$1,35 \pm 0,208$
K_{AD} (μM)	Pyren-Aktin	$0,43 \pm 0,070$	$1,04 \pm 0,170$	$2,03 \pm 0,400$

¹ Ordinate der k_{obs} versus mantADP Auftragung

² ATP-chasing-Experiment

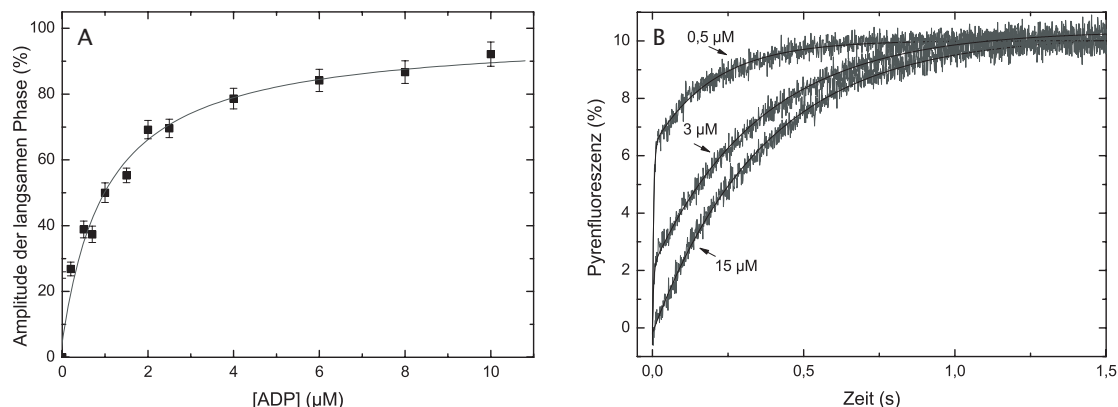


Abbildung 3.19: Bestimmung der ADP-Affinitätskonstante (K_{AD}) von Aktomyosin. Abbildung A repräsentiert exemplarisch den Anstieg der relativen Amplitude der langsamen Phase des Akto-NMHC-2C1-Komplexes in Abhängigkeit von der ADP-Konzentration. B: Transienten der Reaktion zwischen $0,25 \mu\text{M}$ Akto-NMHC-2C2 in Gegenwart von $0,5 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$ und $15 \mu\text{M}$ ADP mit $1000 \mu\text{M}$ ATP. Die Messwerte werden durch eine bi-exponentielle Regression approximiert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die ADP-Bindungskonstante 2. Ordnung an nichtmuskuläres Myosin-2C in An- und Abwesenheit von F-Aktin für alle Isoformen gleich und somit unabhängig von den Insertionen der Oberflächenschleifen-1 und -2 ist. In Analogie zu den nichtmuskulären Myosinen-2B und -2A ($\approx 2,41 - 2,72 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) weisen alle Isoformen des zytoplasmatischen Myosins-2C vergleichbare Bindungskonstanten auf [KOVÁCS *et al.* 2003, WANG *et al.* 2003].

Die ADP-Dissoziation von Akto-NMHC-2C1 und Akto-NMHC-2C2 erfolgt im Vergleich zu Akto-NMHC-2C0 $\approx 4 - 7$ fach schneller. Dieser Geschwindigkeitsunterschied ist durch die Insertion von 8 Aminosäuren in der Schleife-1 Region dominiert. Ein Einfluss einer expandierten Schleife-1 auf die ADP-Dissoziation von Aktomyosin wurde unter anderem für glattmuskuläres Myosin-2 sowie chimäres Myosin-1b beschrieben [CLARK *et al.* 2005, SWEENEY *et al.* 1998]. Die additive Insertion in Schleife-2 der Isoform-2C2 hat keinen Einfluss auf die ADP-Dissoziationsgeschwindigkeit von Aktomyosin.

Im Vergleich zu NMHC-2C0 weist NMHC-2B0 mit $k_{AD} \approx 0,38 \text{ s}^{-1}$ eine vergleichbare Geschwindigkeitskonstante der ADP-Dissoziation auf [WANG *et al.* 2003]. Die ADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten von NMHC-2C1 und NMHC-2C2 liegen zwischen den korrespondierenden kinetischen Konstanten von NMHC-2A und glattmuskulärem Myosin-2 ($k_{AD} \approx 1,72 - 15 \text{ s}^{-1}$) [KOVÁCS *et al.* 2003, MARSTON und TAYLOR 1980, WAGNER 1981]. In Analogie dazu weisen kardiales und skelettmuskuläres Myosin-2 mit $k_{AD} > 150 - 500 \text{ s}^{-1}$ deutlich erhöhte ADP-Dissoziationsgeschwindigkeiten auf [MARSTON und TAYLOR 1980, TRYBUS und TAYLOR 1982].

Die gesteigerten ADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten in Kombination mit konstanten Bindungsraten resultieren in Variationen der ADP-Affinität von Aktomyosin: Die ADP-Affinität sinkt, bedingt durch eine beschleunigte ADP-Dissoziationsgeschwindigkeit, in der Reihenfolge NMHC-2C0 > NMHC-2C1 > NMHC-2C2 um den Faktor ≈ 7 von $\approx 0,195 \mu\text{M}$ auf $\approx 1,35 \mu\text{M}$. Korrespondierende ADP-Affinitäten weisen auch die nichtmuskulären Myosine-2B und -2A ($\approx 0,13 - 1,4 \mu\text{M}$) auf [KOVÁCS *et al.* 2003, WANG *et al.* 2003]. Das skelettmuskuläre Pendant weist mit $K_{AD} > 120 \mu\text{M}$ eine deutlich reduzierte ADP-Affinität auf [RITCHIE *et al.* 1993].

3.1.11 Einfluss der freien Magnesiumionenkonzentration auf die Interaktion zwischen Aktomyosin und ADP

Der Einfluss der freien Magnesiumionenkonzentration auf die ADP-Kinetik wurde bisher für Myosine der Klassen-1 und -5 beschrieben [DÜRRWANG *et al.* 2006, FUJITA-BECKER *et al.* 2005, ROSENFELD *et al.* 2005, TAFT *et al.* 2008]. Im Rahmen der transientenkinetischen Charakterisierung der Isoformen des humanen nichtmuskulären Myosins wurde der Einfluss der freien Magnesiumionenkonzentration auf die ADP-Kinetik von Aktomyosin analysiert.

Der Einfluss der freien Magnesiumionenkonzentration auf die Bindung von mantADP an Aktomyosin wurde exemplarisch für Isoform NMHC-2C0 des nichtmuskulären Myosins-2C analysiert. Der Versuch wurde analog zu Abschnitt 3.1.10.1 in der Gegenwart von 1-20 mM MgCl₂ durchgeführt. Transienten der mantADP-Bindung an Aktomyosin werden bei Mg²⁺-Konzentration von 20- und 5 mM doppelt-exponentiell, in der Gegenwart von 1 mM MgCl₂ mono-exponentiell approximiert. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten sind linear von der mantADP-Konzentration abhängig (Abbildung 3.20,B). Eine lineare Regression individueller Messreihen bestimmt die apparente mantADP-Bindungskonstante 2. Ordnung an Aktomyosin bei 20 mM freien Magnesiumionen zu $2,21 \pm 0,05 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, bei 5 mM freien Mg²⁺-Ionen zu $2,53 \pm 0,06 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und bei 1 mM freien Magnesiumionen zu $2,68 \pm 0,05 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die korrespondierenden Dissoziationskonstanten liegen bei $0,46 \pm 0,04 \text{s}^{-1}$, $0,6 \pm 0,04 \text{s}^{-1}$ und $0,9 \pm 0,05 \text{s}^{-1}$. Tabelle 3.6 stellt den Einfluss der freien Mg²⁺-Konzentration auf die ADP-Kinetik von Akto·NMHC-2C0 vergleichend zusammen.

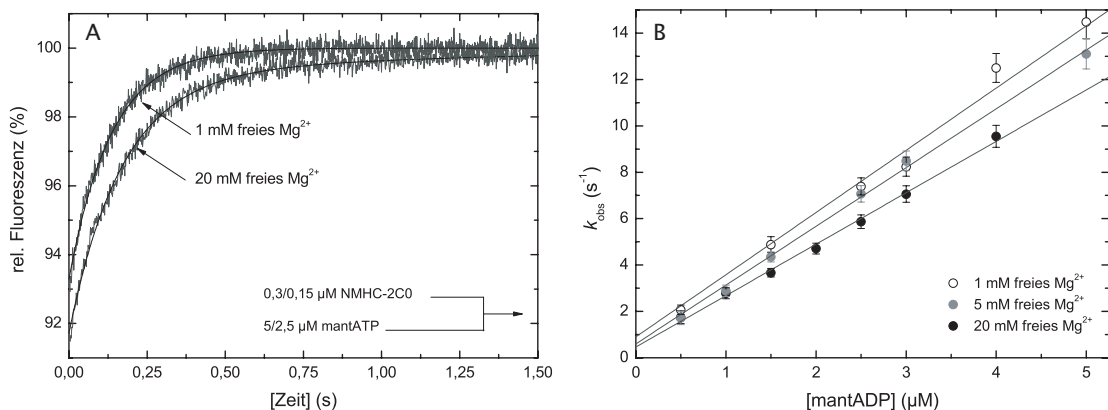


Abbildung 3.20: MantADP-Bindung an Aktomyosin in Abhängigkeit von der freien Magnesiumionenkonzentration. A: Transienten der Bindung von $2,5 \mu\text{M}$ mantADP an $0,15 \mu\text{M}$ Akto-NMHC-2C0 bei 1- und 20 mM freien Mg²⁺-Konzentrationen. Die Transienten werden bei einer Mg²⁺-Konzentration von 1 mM durch einen mono-exponentiellen Reaktionsverlauf beschrieben, in der Gegenwart von 20 mM freien Magnesiumionen durch einen biphasischen. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt und die Fluoreszenzemission durch einen KV 389 Filter zeitabhängig aufgezeichnet. B: Lineare Abhängigkeit der beobachteten Ratenkonstanten k_{obs} von der mantADP-Konzentration in der Gegenwart unterschiedlicher Mg²⁺-Ionenkonzentrationen an freien Mg²⁺-Ionen.

Der Einfluss der freien Magnesiumionenkonzentration auf die ADP-Dissoziation aus dem Aktomyosin-Komplex (k_{AD}) wurde für die Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C analysiert. Dabei wurden $0,3 \mu\text{M}$ Aktomyosin mit $2-5 \mu\text{M}$ mantADP inkubiert und der ternäre Komplex mit einem Überschuss (1-2 mM) ATP dissoziiert. Die Raten der mantADP-Freisetzung sinken dabei mit steigender Konzentration an freien Magnesiumionen. Abbildung 3.21 stellt die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit von der freien Mg²⁺-Konzentration für die Isoformen des humanen zytoplasmatischen Myosins-2C dar. Die Approximation der Daten erfolgt nach folgendem Algorithmus:

$$k_{-AD} = \frac{k_{min} \cdot \frac{[Mg^{2+}]}{K_i} + k_{max}}{\frac{[Mg^{2+}]}{K_i} + 1} \quad (3.3)$$

Dabei repräsentieren k_{min} und k_{max} die ADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten bei 0 mM respektive saturierenden freien Mg^{2+} -Konzentrationen; $K_i [Mg_{frei}^{2+}]$ entspricht der inhibitorischen Gleichgewichtskonstante der ADP-Dissoziation. Die freie Magnesiumionenkonzentration wird mit dem Programm MAXCHELATOR [maxchelator.stanford.edu] errechnet: Dabei werden eine konstante Temperatur von 20°C, ein konstanter pH-Wert von 7,0 sowie eine konstante Ionenstärke von 0,1 festgelegt. Die Konzentrationen von Mg^{2+} -Ionen, mantADP sowie ATP werden den jeweiligen Reaktionsbedingungen angepasst.

Für NMHC-2C0 sinkt k_{obs} in Abhängigkeit von der freien Mg^{2+} -Konzentration im Konzentrationsbereich zwischen $\approx 0,01$ - 20 mM von $\approx 1,76 s^{-1}$ auf $\approx 0,62 s^{-1}$, für NMHC-2C1 von $\approx 9,87 s^{-1}$ auf $\approx 2,56 s^{-1}$ und für NMHC-2C2 von maximal $\approx 9,63 s^{-1}$ auf $\approx 3 s^{-1}$. Dadurch ergeben sich für NMHC-20, -2C1 und -2C2 Faktoren der Regulation von 2,83, 3,85 und 3,21. $K_i [Mg_{frei}^{2+}]$ beträgt $710 \pm 145 \mu M$, $1050 \pm 280 \mu M$ und $560 \pm 39 \mu M$.

Ein vergleichbares Verhalten wurde im Rahmen dieser Arbeit auch für die humanen nichtmuskulären Myosine-2A, -2B und einer Mutante des nichtmuskulären Myosins-2A, die durch die Mutation A454S der Schalter-2 Konsensussequenz gekennzeichnet ist. Diese Myosine weisen apparente Inhibierungskonstanten $K_i [Mg_{frei}^{2+}]$ von $\approx 446 \mu M$, $947 \mu M$ und $1169 \mu M$ im physiologischen Konzentrationsbereich auf. Dabei bewirkt die Mutation in Schalter-2 eine 5fache Reduktion der ADP-Dissoziationsgeschwindigkeit von Aktomyosin im Vergleich zum Wildtyp und belegt den Einfluss des Schalterelements auf die ADP- und Magnesiumkoordination. Die inhibitorischen Konstanten für die Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C sind in Tabelle 3.6 aufgeführt.

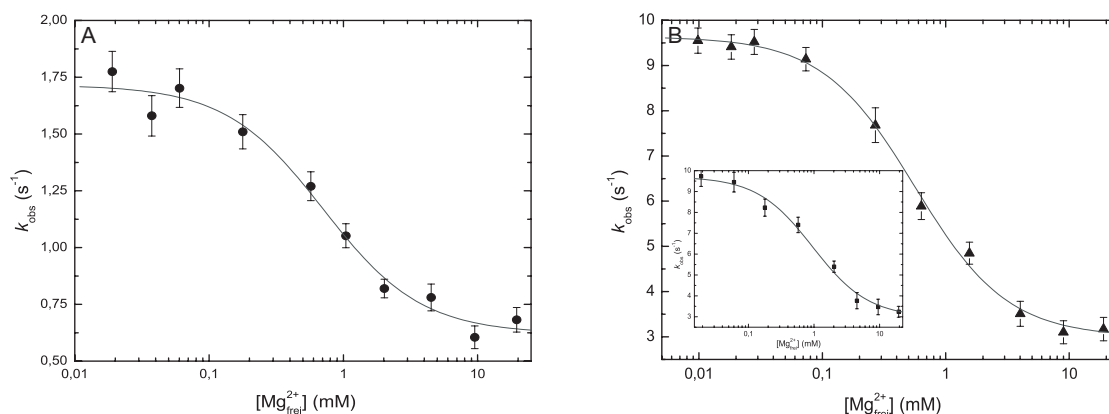


Abbildung 3.21: ATP-induzierte Dissoziation von mantADP aus dem Aktomyosin-Komplex in Abhängigkeit von der freien Magnesiumionenkonzentration. A: Abhängigkeit der ADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{AD}) des NMHC-2C0 von der freien Magnesiumionenkonzentration. B präsentiert die magnesiumsensitive ADP-Dissoziation von Akto-NMHC-2C2; die Miniatur repräsentiert die analoge Reaktion des nichtmuskulären Myosins-2C1.

Tabelle 3.6: Einfluss der freien Magnesiumionenkonzentration auf die ADP-Kinetik von Akto-NMHC-2C0

Konstante	Signal	1 mM freies Mg^{2+}	5 mM freies Mg^{2+}	20 mM freies Mg^{2+}
$k_{+AD} (\mu M^{-1} s^{-1})$	mantADP	$2,68 \pm 0,05$	$2,53 \pm 0,06$	$2,21 \pm 0,05$
$k_{-AD} (s^{-1})$	mantADP ¹	$0,9 \pm 0,05$	$0,6 \pm 0,04$	$0,46 \pm 0,04$
$k_{AD} (s^{-1})$	mantADP ²	$\approx 1,020$	$\approx 0,730$	$\approx 0,630$
$K_{AD} (\mu M)$	k_{-AD}/k_{+AD}	$\approx 0,335$	$\approx 0,237$	$\approx 0,208$
$K_i [Mg_{frei}^{2+}] (mM)$	mantADP ³	$0,71 \pm 0,145$	$1,05 \pm 0,280$	$0,56 \pm 0,039$

¹ Ordinate der k_{obs} versus mantADP Auftragung

² ATP-chasing-Experiment, angegebene Daten wurden der Regression entnommen

³ ATP-chasing-Experiment, variierende Konzentrationen an freien Mg^{2+} -Ionen

Zusammenfassend kann für NMHC-2C0 resümiert werden, dass die freie Magnesiumionenkonzentration die ADP-Bindung an Aktomyosin nicht wesentlich beeinflusst. Die Dissoziationsgeschwin-

digkeitskonstanten von Aktomyosin, ermittelt über die Ordinaten, werden zwischen 1 und 20 mM freien Mg^{2+} -Ionen um den Faktor ≈ 2 erniedrigt. Die Erhöhung der freien Magnesiumionenkonzentration von 1 mM auf 20 mM resultiert in einer 40%igen Reduktion von K_{AD} .

Die ADP-Dissoziation von Aktomyosin ist für die Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C magnesiumsensitiv und moduliert die Reaktion im Konzentrationsbereich zwischen 0,01 - 20 mM durchschnittlich 3,3fach. Eine Erhöhung der freien Magnesiumionenkonzentration resultiert in einer Verlängerung der aktungebundenen Zustände des Myosin ATPase-Zyklus und hat direkte Konsequenzen auf die *duty ratio* der Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C.

In Analogie zu nichtmuskulärem Myosin-2C weisen auch die zytoplasmatischen Myosine-2A und -2B diesen Modulationsmechanismus auf.

3.1.12 Interaktion zwischen Myosin und Myosin·ADP mit F-Aktin

3.1.12.1 Aktinbindung an Myosin

Die Bestimmung der Ratenkonstanten der Aktinbindung und -dissoziation von Myosin ermöglicht die Kalkulation der Aktin-Dissoziationsgleichgewichtskonstante des Aktomyosin-Komplexes K_A . Die Bindung und Dissoziation von Pyren-Aktin an die Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C wurde in An- und Abwesenheit (siehe Abschnitt 3.1.12.4) von Nukleotid bestimmt. Dabei wird die Bindungsreaktion in Abwesenheit von Nukleotid nach folgendem Ein-Schritt-Mechanismus interpretiert, der durch einen *quench* der Pyren-Fluoreszenz gekennzeichnet ist.



Die Assoziationsraten in Abwesenheit von Nukleotid wurden bestimmt, indem Myosin mit variierenden Konzentrationen an Pyren-Aktin gemischt und die Änderung der Pyren-Fluoreszenz detektiert wurde. In Abwesenheit von Nukleotid können die Transienten doppelt-exponentiell approximiert werden. Dabei weist die schnelle Phase eine lineare Abhängigkeit von der Pyren-Aktinkonzentration auf. Der Ursprung der langsamen Phase wurde nicht analysiert und in der Auswertung nicht berücksichtigt. Abbildung 3.22 bildet die Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Isoformen des NMHC-2Cs von der Pyren-Aktinkonzentration sowie ausgewählte Transienten der Reaktionen ab. Transientenkinetische Parameter der Interaktion zwischen Myosin und F-Aktin sind in Tabelle 3.7 aufgeführt.

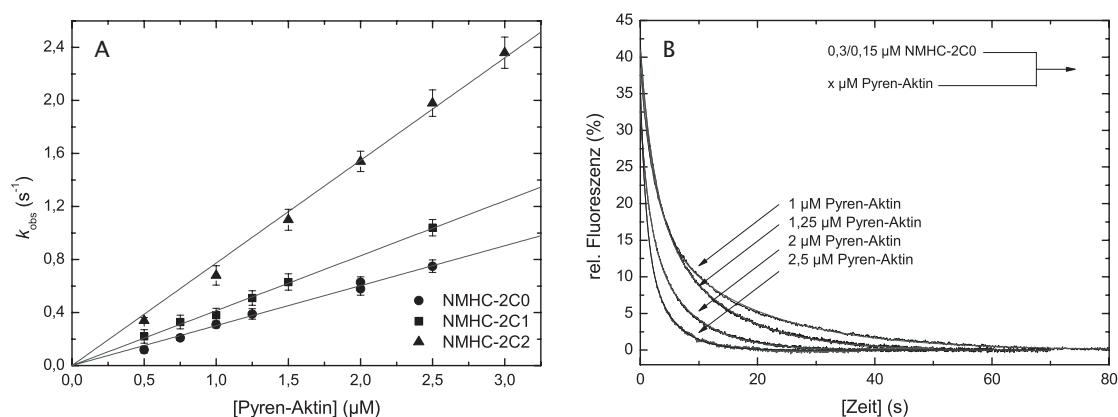


Abbildung 3.22: Interaktion zwischen Myosin und Pyren-Aktin. A: Lineare Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstante k_{obs} von der Pyren-Aktinkonzentration. B: Fluoreszenzerniedrigung bei der Mischung von 0,15 μM NMHC-2C0 mit verschiedenen Konzentration an Pyren-Aktin. Die Messwerte werden durch einen doppelt-exponentiellen Verlauf beschrieben und die Geschwindigkeitskonstanten der schnellen Phase ausgewertet.

3.1.12.2 Dissoziation von Pyren-Aktin aus dem Aktomyosin-Komplex

Die Dissoziation von Pyren-Aktin aus dem Aktomyosin-Komplex wurde durch einen Überschuss an unmarkiertem F-Aktin induziert. Der Anstieg der Pyren-Fluoreszenz wurde durch die Reaktion von $0,15 \mu\text{M}$ Pyren-Aktomyosin mit $20 \mu\text{M}$ F-Aktin bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und der Detektion des Emissionssignals durch einen KV 389-Emissionsfilter ermittelt. Die Messwerte weisen, wie bereits bei der Assoziationsreaktion beobachtet, ein biphasisches Verhalten auf und werden mit einer Exponentialfunktion zweiter Ordnung approximiert. Die gemessene Geschwindigkeitskonstante k_{obs} der schnellen Phase repräsentiert k_{-A} . Die langsame Phase wurde nicht weiter untersucht und bei der Auswertung vernachlässigt. Abbildung 3.23 beschreibt den transienten Fluoreszenzanstieg der Dissoziation von Pyren-Aktin aus dem Aktomyosin-Komplex. Um das *bleaching* des Fluoreszenzsignals zu minimieren, wurden bei der Datenakquisition die *shutter*-Funktion des *stopped-flow*-Spektralphotometers eingesetzt. Ratenkonstanten der Reaktion sind in Tabelle 3.7 aufgeführt.

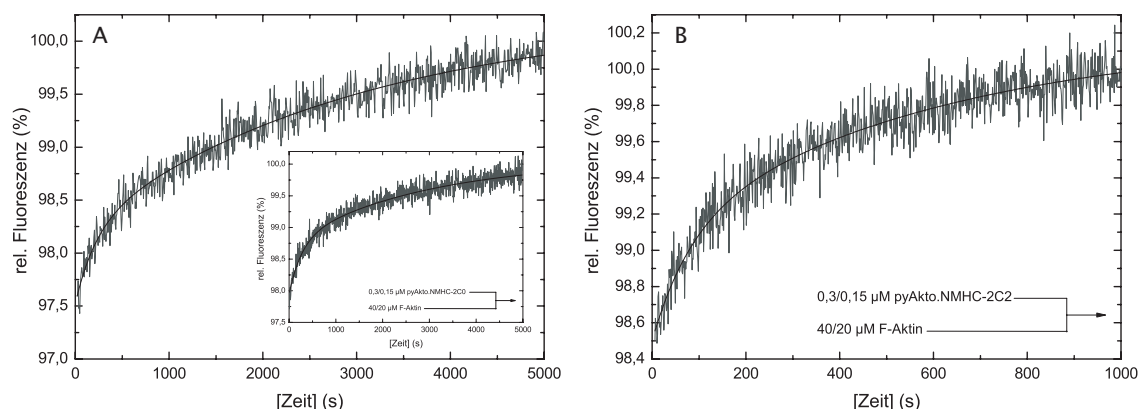


Abbildung 3.23: Dissoziation von Pyren-Aktin aus dem Aktomyosin-Komplex. A: Fluoreszenzerhöhung durch die Pyren-Aktindissoziation aus dem Komplex mit NMHC-2C1 indiziert durch einen Überschuss an unmarkiertem F-Aktin. Die eingefügte Grafik zeigt den analogen Versuch für NMHC-2C0. B stellt die korrespondierende Reaktion für NMHC-2C2 dar.

3.1.12.3 Bestimmung der Aktin-Affinitätskonstante K_A

Die Affinitätskonstante K_A wird für die Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C aus den korrespondierenden Dissoziations- und Assoziationsratenkonstanten kalkuliert. Alle Isoformen sind mit Affinitätskonstanten zwischen $15 - 20 \text{ nM}$ hoch affin für F-Aktin.

Um diese hohe Affinität zu überprüfen, wurde in einem unabhängigen Experiment die Bindung von Pyren-Aktin an Myosin in Abwesenheit von Nukleotid durch eine modifizierte Fluoreszenztitration nach KURZAWA und GEEVES [1996] und GEEVES und JEFFRIES [1988] direkt bestimmt. Hierzu wurden $30 - 50 \text{ nM}$ Pyren-Aktin mit steigenden Konzentrationen an Myosin präinkubiert und der Aktomyosin-Komplex durch das schnelle Mischen mit $10 \mu\text{M}$ ATP dissoziiert. Der Anstieg der Pyren-Fluoreszenz wurde spektroskopisch verfolgt. Die Transienten weisen einen monoexponentiellen Reaktionsverlauf und eine konstante Geschwindigkeitskonstante k_{obs} von $\approx 5 \text{ s}^{-1}$ auf (Abbildung 3.24,B). Eine Auftragung der Amplituden *versus* der Myosin-Konzentration wird mit einer quadratischen Bindungsisotherme approximiert und ist für NMHC-2C1 exemplarisch in Abbildung 3.24,B dargestellt. Die Regression der Daten definiert die Gleichgewichtskonstante der Aktin-Dissoziation K_A . Die Affinität des nichtmuskulären Myosins-2C und seiner Isoformen für Pyren-Aktin, berechnet aus den Dissoziations- und Assoziationsraten ist in guter Übereinstimmung mit den experimentell bestimmten Affinitätskonstanten aus den Titrationsexperimenten. Tabelle 3.7 fasst die kinetischen Parameter der Interaktion zwischen Myosin und F-Aktin vergleichend zusammen.

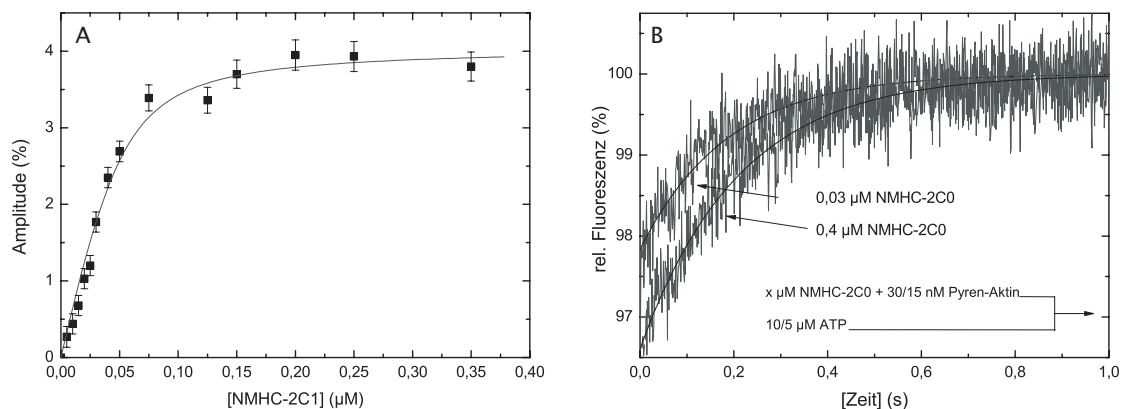
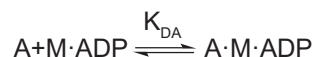


Abbildung 3.24: Bestimmung der Aktin-Affinität des nichtmuskulären Myosins-2C. A: Die Abhängigkeit der Amplitude des Pyren-Aktins von der Myosin-Konzentration wird durch eine quadratische Regression approximiert und bestimmt K_A zu $\approx 0,0105 \mu\text{M}$. B: Anstieg der Pyren-Fluoreszenz bei der Reaktion von $0,03 \mu\text{M}$ bzw. $0,7 \mu\text{M}$ NMHC-2C0 in Anwesenheit von 30 nM Pyren-Aktin mit $10 \mu\text{M}$ ATP. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} betragen $\approx 5 \text{ s}^{-1}$; die Amplitude steigt von $2,16\%$ auf $3,27\%$.

3.1.12.4 Aktinbindung an Myosin in der Gegenwart von ADP

Die Aktinbindung an Myosin in der Anwesenheit von ADP wurde nach folgendem bimolekularem Schema interpretiert.



Die Bindung von Pyren-markiertem F-Aktin an Myosin in Gegenwart eines Überschusses an ADP wurde durch den *quench* der Pyren-Fluoreszenz analysiert. Das Pyren-Signal wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt und das optische Signal durch einen KV 389-Filter spektroskopisch detektiert. Die gemessenen Transienten folgen einem bi-exponentiellen Reaktionsverlauf (Abbildung 3.25,B). Die Abhängigkeit der apparenten Geschwindigkeitskonstante k_{obs} der schnellen Phase weist eine lineare Abhängigkeit von der Pyren-Aktinkonzentration auf (Abbildung 3.25,A); auf die Untersuchung der langsamen Phase wurde verzichtet. Die lineare Regression individueller Messreihen definiert die apparente Aktinbindungskonstante 2. Ordnung in Anwesenheit von ADP, k_{+DA} . Eine Auflistung der Assoziationskonstanten der drei Isoformen des NMHC-2Cs befindet sich in Tabelle 3.7.

3.1.12.5 Dissoziation von Pyren-Aktin aus dem Aktomyosin-Komplex in Gegenwart von ADP

Die Verdrängung von Pyren-Aktin aus dem Aktomyosin-ADP-Komplex mittels eines Überschusses an unmarkiertem F-Aktin wurde direkt ermittelt. Für den Versuch wurden $0,15 \mu\text{M}$ Pyren-Aktomyosin mit $20 \mu\text{M}$ F-Aktin in der Gegenwart von $250 - 500 \mu\text{M}$ ADP in einer *stopped-flow*-Apparatur gemischt. Die Anregung der Pyren-Fluoreszenz erfolgte bei einer Wellenlänge von 365 nm und die Detektion der Fluoreszenzemission durch einen KV 389-Filter. Die Transienten können durch einen doppelt-exponentiellen Reaktionsverlauf beschrieben werden, wobei die Geschwindigkeitskonstante k_{obs} der schnellen Phase k_{-DA} repräsentiert. Der Ursprung der zweiten Phase wurde nicht weiter untersucht. Die Dissoziationsratenkonstanten sind in Tabelle 3.7 aufgeführt; Abbildung 3.26 bildet die entsprechenden Transienten ab.

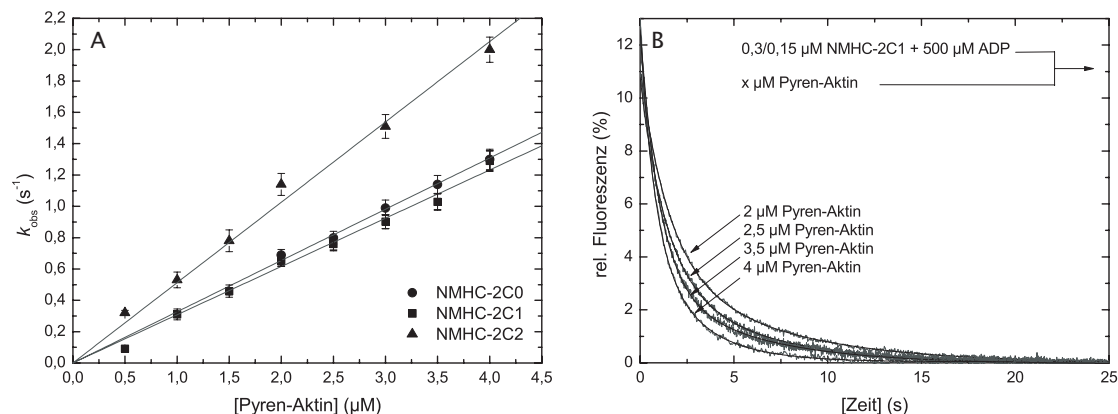


Abbildung 3.25: Interaktion zwischen Myosin und F-Aktin in Gegenwart von Nukleotid. A: Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} von der Pyren-Aktinkonzentration bei der Reaktion von 0,15 μM Myosin-ADP mit variierenden Konzentrationen an Pyren-Aktin. Durch die lineare Approximation ergeben sich apparente Bindungskonstanten 2. Ordnung (k_{+DA}) von $0,327 \pm 0,003 \mu M^{-1} s^{-1}$ für NMHC-2C0, $0,308 \pm 0,006 \mu M^{-1} s^{-1}$ für NMHC-2C1 sowie $0,512 \pm 0,011 \mu M^{-1} s^{-1}$ für NMHC-2C2. B: Transienten der Reaktion des NMHC-2C1 mit Pyren-Aktin in Gegenwart von ADP. Im gewählten Beispiel steigen die apparenten Geschwindigkeitskonstanten von $k_{obs} = 0,65 s^{-1}$ auf $1,27 s^{-1}$ an.

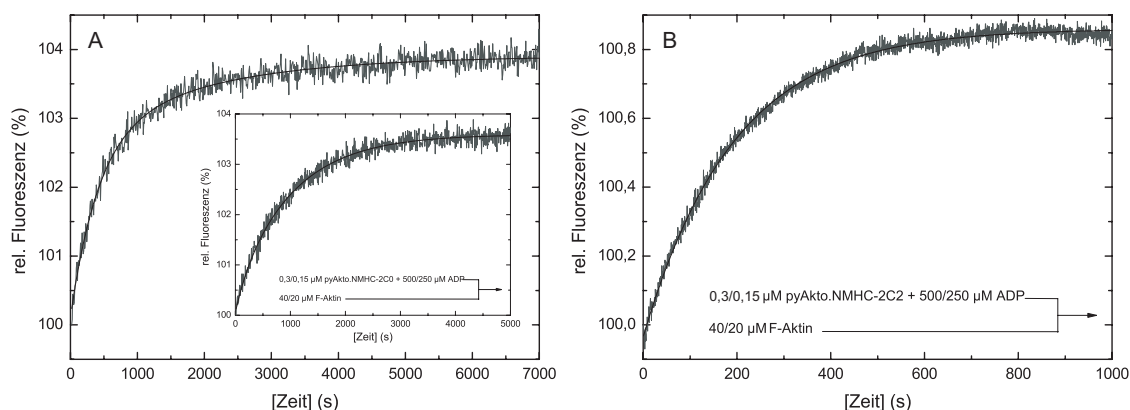


Abbildung 3.26: Interaktion zwischen F-Aktin und dem Pyren-Aktomyosin-ADP-Komplex. A: Fluoreszenzerhöhung durch die Dissoziation von Pyren-Aktin aus dem Akto-NMHC-2C1-ADP-Komplex durch einen Überschuss an unmarkiertem F-Aktin. Die Miniatur beschreibt die korrespondierende Reaktion des NMHC-2C0; B die analoge Reaktion für NMHC-2C2.

3.1.12.6 Affinitätskonstante in Gegenwart von ADP

Die Bestimmung der Ratenkonstanten der Aktinbindung und -dissoziation von Myosin erlaubt die Kalkulation der Aktomyosin Dissoziationsgleichgewichtskonstanten K_{DA} .

Die Affinitätskonstante der Interaktion zwischen Myosin und F-Aktin in den stark bindenden Zuständen wurde in Anwesenheit von Nukleotid durch eine Fluoreszenztitration direkt bestimmt. Dabei wurden 30 nM Pyren-Aktin mit ansteigenden Myosin-Konzentrationen in der Gegenwart von 30 μM ADP präinkubiert und in einer *stopped-flow*-Apparatur mit 300 μM ATP gemischt. Der Anstieg der Pyren-Fluoreszenz wurde zeitabhängig verfolgt. Die Transienten weisen einen mono-exponentiellen Reaktionsverlauf mit Geschwindigkeitskonstanten $k_{obs} \approx 2 s^{-1}$ auf, wobei die Amplituden der Transienten in Abhängigkeit von der Myosin-Konzentration ansteigt (Abbildung 3.27). Eine Auftragung der Amplituden gegen die Myosin-Konzentration wird durch eine quadratischen Regression nach KURZAWA und GEEVES [1996] sowie GEEVES und JEFFRIES [1988] beschrieben. Abbildung 3.27,A beschreibt exemplarisch die Fluoreszenztitration für das NMHC-2C2, Tabelle fasst 3.7 alle kinetischen Parameter der Interaktion zwischen nichtmuskulärem Myosin-2C und F-Aktin in An- und Abwesenheit von ADP zusammen.

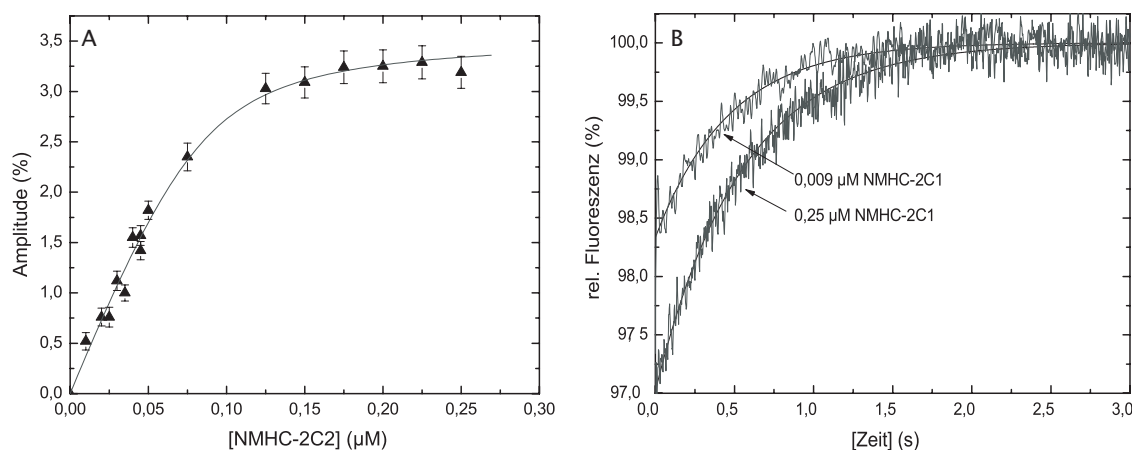


Abbildung 3.27: Aktin-Affinität des nichtmuskulären Myosins-2C in der Gegenwart von ADP. A: Abhängigkeit der Amplitude des Pyren-Aktins in der Gegenwart von ADP bei der Bindung an NMHC-2C2 von der Myosin-Konzentration. Die Fluoreszenztitration wurde durch eine quadratische Regression approximiert. B: Ausgewählte Transienten der Reaktion von 0,009 μM bzw. 0,25 μM NMHC-2C1 in der Anwesenheit von 30 nM Pyren-Aktin und 30 μM ADP mit 300 μM ATP. Die Transienten weisen bei einer Myosin-Konzentration von 0,009 μM eine Amplitude von 2% und eine Ratenkonstante von 2,09 s^{-1} auf. Bei einer Konzentration von 0,25 μM Myosin beträgt die Amplitude 3% und die Geschwindigkeitskonstante 1,84 s^{-1} . Zur besseren Darstellung wurden die Transienten mit dem *adjacent-averaging* Algorithmus geglättet.

Tabelle 3.7: Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Interaktion zwischen Myosin sowie Myosin-ADP mit F-Aktin

Konstante	Signal	NMHC-2C0	NMHC-2C1	NMHC-2C2
k_{+A} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Pyren-Aktin	$0,301 \pm 0,03$	$0,414 \pm 0,03$	$0,774 \pm 0,04$
k_{-A} (s^{-1})	Pyren-Aktin	$0,0037 \pm 0,00045$	$0,00453 \pm 0,00033$	$0,01226 \pm 0,00248$
K_A (μM)	k_{-A}/k_{+A}	$\approx 0,0122$	$\approx 0,0109$	$\approx 0,015$
K_A (μM)	Amplituden	$\approx 0,00452$	$\approx 0,0105$	$\approx 0,0212$
k_{+DA} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Pyren-Aktin	$0,327 \pm 0,003$	$0,308 \pm 0,0056$	$0,512 \pm 0,011$
k_{-DA} (s^{-1})	Pyren-Aktin	$0,005 \pm 0,00042$	$0,00242 \pm 0,00015$	$0,006 \pm 0,0005$
k_{-DA} (s^{-1})	$K_{DA} \cdot k_{+DA}$	$\approx 0,0062$	$\approx 0,0064$	$\approx 0,00547$
K_{DA} (μM)	k_{-DA}/k_{+DA}	$\approx 0,0152$	$\approx 0,0078$	$\approx 0,0115$
K_{DA} (μM)	Amplituden	$\approx 0,019$	$\approx 0,0208$	$\approx 0,0107$
<i>Kopplung</i>	K_{DA}/K_A	$\approx 4,2$	$\approx 1,98$	$\approx 0,5$

Die Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C weisen Aktinbindungskonstanten 2. Ordnung (k_{+A}) auf, die in der Reihenfolge $\text{NMHC-2C0} \approx \text{NMHC-2C1} < \text{NMHC-2C2}$ ansteigen. Diese Tendenz korreliert mit der Anwesenheit einer expandierten Schleife-2 in Isoform NMHC-2C2. Ein analoges Verhalten wird in Anwesenheit von ADP beobachtet. In beiden Fällen ist die Bindungskonstante um 60-100% erhöht.

Im Vergleich zu anderen Myosinen der Klasse-2 weisen die Isoformen des menschlichen nichtmuskulären Myosins-2C komparable kinetische Parameter k_{+A} zu den nichtmuskulären Myosinen-2B und -2A ($\approx 0,36$ - $0,73 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) auf [KOVÁCS *et al.* 2003, WANG *et al.* 2003]. Mit $k_{+A} = 12 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ist die Aktinbindungskonstante des kardialen Myosins-2 deutlich erhöht [MARSTON und TAYLOR 1980].

In der Anwesenheit von ADP weisen glattmuskuläres Myosin-2 und die nichtmuskulären Myosine-2A und -2B analoge Aktinbindungseigenschaften mit $k_{+DA} \approx 0,19$ - $0,26 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ auf [CREMO und GEEVES 1998, KOVÁCS *et al.* 2003, WANG *et al.* 2003]. Mit $\approx 0,3$ - $0,5 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ist die apparente Aktinbindungskonstante in der Anwesenheit von Nukleotid für zytoplasmatisches Myosin-2C erhöht. Die Aktindissoziation in Abwesenheit von ADP ist für NMHC-2C2 im Vergleich zu seinen Isoformen um den Faktor ≈ 3 - 4 beschleunigt. In der Anwesenheit von ADP weist Isoform NMHC-2C1

mit $\approx 0,0024 \text{ s}^{-1}$ eine $\approx 2,5$ fach erniedrigte Dissoziationsgeschwindigkeit auf.

Korrespondierende Dissoziationsgeschwindigkeiten in Abwesenheit von ADP weisen auch die nicht-muskulären Myosine-2B und -2A ($k_{DA} < 0,001 - 0,007 \text{ s}^{-1}$) auf [KOVÁCS *et al.* 2003, WANG *et al.* 2003].

In der Anwesenheit von ADP weisen die Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C analoge Geschwindigkeiten der Aktindissoziation wie das nichtmuskuläre Myosin-2A ($\approx 0,004 \text{ s}^{-1}$) auf [KOVÁCS *et al.* 2003]. Divergierendes Verhalten zeigt nichtmuskuläres Myosin-2B mit $k_{DA} < 0,0003 \text{ s}^{-1}$ [WANG *et al.* 2003]: Die Geschwindigkeit der Aktindissoziation ist im Vergleich zu den Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C um den Faktor ≈ 21 verlangsamt.

Sowohl die direkte Bestimmung als auch die Berechnung der Gleichgewichtskonstanten der Aktindissoziation der Transkriptvarianten des zytoplasmatischen Myosins-2C in An- und Abwesenheit von ADP deuten auf eine nukleotidunabhängige, hohe Affinität im nanomolaren Bereich hin. In Analogie verhält sich NMHC-2A ($K_A < 10 \text{ nM}$, $K_{DA} \approx 20 \text{ nM}$) und glattmuskuläres Myosin-2 ($K_A < 3,5 \text{ nM}$, $K_{DA} \approx 24 \text{ nM}$) [CREMO und GEEVES 1998, KOVÁCS *et al.* 2003]. Different verhält sich NMHC-2B mit Aktin-Affinitäten zwischen 1-3 nM in Ab- und Anwesenheit von ADP [WANG *et al.* 2003]. Im Kontrast dazu wird die Aktin-Affinität des kardialen und skelettmuskulären Myosins in der Abwesenheit von ADP von initialen $K_A \approx 6 - 33 \text{ nM}$ in der Anwesenheit von ADP auf K_{DA} -Werte zwischen 0,1-1 μM erniedrigt [CREMO und GEEVES 1998, RITCHIE *et al.* 1993, SIEMANKOWSKI und WHITE 1984].

Die thermodynamische Kopplung sinkt in der Reihenfolge NMHC-2C0>NMHC-2C1>NMHC-2C2 von $\approx 4,2$ auf $\approx 0,5$ ab. Glattmuskuläres Myosin-2, NMHC-2A und NMHC-2B weisen mit Kopplungskonstanten zwischen 4,2-0,4 ähnliches Verhalten auf [KOVÁCS *et al.* 2003, WANG *et al.* 2003]. Im Gegensatz dazu betragen die thermodynamischen Kopplungskonstanten des kardialen und skelettmuskulären Myosins-2 zwischen 15 und 30 [KOVÁCS *et al.* 2003].

3.1.13 Funktionale Charakterisierung

Für alle Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C wurde der *in vitro*-Motilitätsassay zur Ermittlung der Bewegungsgeschwindigkeit, wie unter 2.2.5.4 beschrieben, bei einer Temperatur von 30°C durchgeführt. Die Magnesiumkonzentration im Assay-Puffer wurde auf 1 mM eingestellt. Abbildung 3.28 beschreibt die Histogramme der Trajektorienverteilungen.

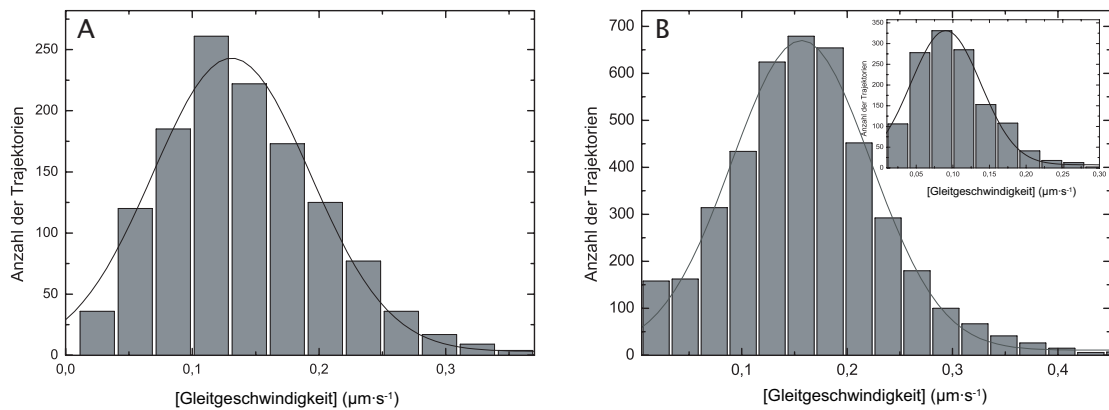


Abbildung 3.28: *In vitro*-Motilitätsassay. A: Histogramm der Trajektorienverteilung des NMHC-2C1. B: Analoges Versuchs für das NMHC-2C2. Die Miniatur beschreibt die mittlere Bewegungsgeschwindigkeit für das NMHC-2C0.

Die mittlere Bewegungsgeschwindigkeit steigt für die Isoformen des humanen nicht-muskulären Myosins-2C in der Reihenfolge NMHC-2C0<NMHC-2C1<NMHC-2C2 von $0,0903 \pm 0,047 < 0,130 \pm 0,062 < 0,156 \pm 0,066 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ an. Die korrespondierenden Halbwertsbreiten betragen $\approx 0,048 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, $0,062 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ bzw. $0,066 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Die Progression der Bewegungsgeschwindigkeit korreliert mit der Länge der Oberflächenschleifen und ist konsistent mit der Annahme, dass Schleife-1 die ADP-Freisetzung von Aktomyosin und somit die *in vitro* Bewegungsgeschwindigkeit

determiniert [KELLEY *et al.* 1993, LÉGUILLETTE *et al.* 2005, ROVNER *et al.* 1997]. Für NMHC-2C2 bewirkt eine expandierte Oberflächenschleife-2 eine beschleunigte Bewegungsgeschwindigkeit im Vergleich zu NMHC-2C1.

Analoge Experimente für die murinen Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C weisen Bewegungsgeschwindigkeiten zwischen $0,04 - 0,09 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ auf [JANA *et al.* 2009].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von freien Magnesiumionenkonzentrationen auf die ADP-Dissoziation und ADP-Bindung an Aktomyosin analysiert. Exemplarisch für die nichtmuskulären Myosine wurde für NMHC-2A der Einfluss der divalenten Kationen auf die Bewegungsgeschwindigkeit im *in vitro*-Motilitätsassay untersucht. Für diesen Versuch wurde nichtmuskuläres Myosin-2A selektiert, da es unter den gegebenen Versuchsbedingungen die höchste Bewegungsgeschwindigkeit aufweist. Wie bereits für die ADP-Dissoziation von Akto-NMHC-2A beobachtet, wird auch die *in vitro*-Motilität des nichtmuskulären Myosins durch ansteigende Konzentrationen an freien Magnesiumionen um den Faktor 3 inhibiert. Der $K_i [Mg_{frei}^{2+}]$ liegt mit $\approx 97,16 \mu\text{M}$ im physiologischen Konzentrationsbereich. Die inhibitorische Gleichgewichtskonstante der Bewegungsgeschwindigkeit ist im Vergleich zur analogen Konstante der ADP-Dissoziation von Aktomyosin um den Faktor 4 erniedrigt.

3.2 Myosin-6

Myosin-6 ist ein unkonventionelles Myosin, das durch eine retrograde Bewegungsrichtung zum Minus-Ende von Aktin-Filamenten gekennzeichnet ist. *In vivo* interagiert Myosin-6 mit dem kortikalen Aktin-Netzwerk beispielsweise bei Vorgängen des Vesikel- und Organellentransports und der Mechanotransduktion [CHIBALINA *et al.* 2009, SPUDICH und SIVARAMAKRISHNAN 2010]. Von pathologischer Relevanz ist die Beteiligung von Myosin-6 an der Entwicklung und Erhaltung der strukturellen Integrität der Stereozilien des Innenohrs sowie der Pathogenese des Ovarial- und Prostatakarzinoms [DUNN *et al.* 2006, SELF *et al.* 1999, YOSHIDA *et al.* 2004].

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Darstellung und kinetische Charakterisierung des humanen Myosins-6. Das Expressionskonstrukt, bestehend aus den Aminosäuren 1 - 816 des Myosins-6, fusioniert mit einem artifiziellen Hebelarm, wurde im Baculovirus/*Sf9*-System produziert und durch säulenchromatographische Techniken homogen präpariert.

Die relevanten Einzelschritte des Myosin ATPase-Zyklus wurden sowohl im Fließgleichgewicht als auch transientenkinetisch analysiert. Die Interpretation der ermittelten kinetischen Parameter erfolgt auf der Basis der unter 1.4 beschriebenen Modelle. Die vergleichende Gegenüberstellung der experimentellen kinetischen Parametern mit den bereits publizierten Konstanten eines porcinen Pendants soll zum Verständnis der Kinetik von Klasse-6 Myosinen beitragen.

3.2.1 Klonierung, Expression und Darstellung

Für die kinetische Charakterisierung wurde ein Expressionskonstrukt, bestehend aus den Aminosäuren 1-816 des humanen Myosins-6, fusioniert mit einem künstlichen Hebelarm (2R), kloniert. Dabei wurden die Spektrin-Wiederholungen des α -Aktinins aus *Dictyostelium discoideum* mit dem distalen Part des *uniquen* Inserts des Myosins fusioniert. Die Fusion des Proteins mit einem künstlichen Hebelarm erlaubt die Studie motiler Eigenschaften ohne die kinetischen Charakteristika des Motors zu verändern [ANSON *et al.* 1996]. Die Strategie eines künstlichen Hebelarms wurde bereits erfolgreich für Myosine der Klassen-2, -5, -6 und -11 demonstriert [ANSON *et al.* 1996, DÜRRWANG *et al.* 2006, ITO *et al.* 2003, LIAO *et al.* 2009, RUFF *et al.* 2001, TAFT *et al.* 2008]. Ein C-terminaler His₈-tag ermöglicht die Aufreinigung des rekombinanten Proteins durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie.

Ausgehend von dem Vektor pDONR201TM-2RH8 wurde die cDNA-Sequenz des artifiziellen Hebelarms durch Restriktionsspaltung mit der Endonuklease *Xba*I in den Vektor pFastBacTM Dual kloniert. Die cDNA, korrespondierend zu den Aminosäuren 1 - 816 des humanen Myosins-6, wurde durch PCR auf dem Plasmid pEGFP-C2-Myosin6 (von Thomas Baboolal, Institute of Molecular and Cellular Biology, University of Leeds, Großbritannien) mit dem Primerpaar FWD-

MYO6/REV-MYO6 (Tabelle 2.1) amplifiziert und in den Vektor pJet 1.2 ligiert. Durch die PCR wird das Amplikon von Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *EcoRI* flankiert. Aus dem Vektor pJet 1.2-Myo6 wurde die DNA-Sequenz der Myosin-Motordomäne nach Restriktion mit *EcoRI* in den Vektor pFastBac™ Dual-2RH8 ligiert. Die *in frame*-Fusion der cDNA-Sequenzen des Myosins und des Hebelarms erfolgt durch PCR. Mit der Primerkombination FWD-MYO6-Mut/REV-MYO6-Mut (Tabelle 2.1) wurden durch Mutagenese überzählige Basenpaare zwischen den cDNA-Sequenzen deletiert. Die Klonierung wurde durch die Ligation des PCR-Produktes abgeschlossen. In dem Transfektor steht das Expressionskonstrukt unter der Kontrolle des starken Polyhedrin-Promotors. Der modulare Aufbau des Expressionskonstrukts ist schematisch in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Identität des Vektors pFastBac™ Dual-M6-2RH8 wurde per Sequenzierung bestätigt.

Der Transfektor wurde erfolgreich in der Transpositionsreaktion zur Herstellung des rekombinanten Bacmids eingesetzt und dieses in der Sekundärzellkultur für die heterologe Proteinproduktion in *Sf9*-Insektenzellen transfiziert. Für die Darstellung des rekombinanten Proteins wurde eine Aufreinigungsstrategie etabliert. Standardmäßig erfolgte die Präparation des humanen Myosins-6 aus 10 L *Sf9*-Insektenzellkultur in Analogie zu Abschnitt 2.2.3.5. Die Identität des dargestellten Proteins wurde im Western-Blot mit Antikörpern gegen das Myosin-6 und den *His₈-tag* sowie massenspektroskopisch nachgewiesen. Abbildung 3.29 stellt einen Ausschnitt des Elutionsprofils einer Gelfiltration sowie ein SDS-Gel und einen Western-Blot der Aufreinigung des Myosins dar.

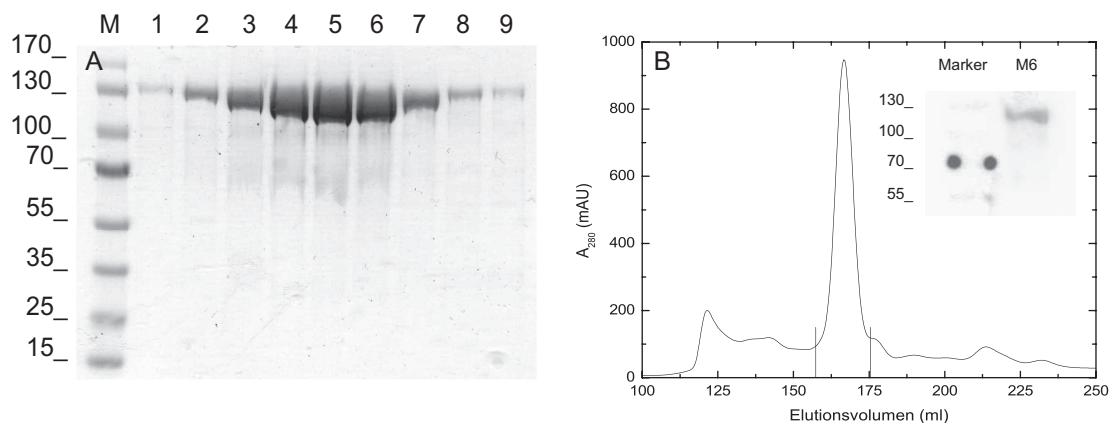


Abbildung 3.29: Darstellung des humanen Myosins-6. A: SDS-PAGE von Proben des Hauptpeaks der Gelfiltration. B: Ausschnitt aus dem Elutionsprofil der Gelfiltration bei der Präparation des humanen Myosins. Das Fusionsprotein hat ein Molekulargewicht von ≈ 120 kDa und eluiert bei einem Elutionsvolumen von 165 ml. Mit den Markierungen ist der Hauptpeak gekennzeichnet. Proben des Peaks werden vereint und für die kinetische Charakterisierung eingesetzt. Miniatur: Western-Blot des Myosins mit einem Myosin-6 spezifischen Antikörper.

3.2.2 Kinetische Charakterisierung des humanen Myosin-6

3.2.2.1 *Steady-state* ATPase-Aktivität

Die ATPase-Aktivität des humanen Myosins-6 im Fließgleichgewicht wurde, wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben, durchgeführt. Abbildung 3.30,A beschreibt die Abhängigkeit der katalytischen Aktivität des Myosins von der F-Aktinkonzentration. Für die Darstellung wurde die basale ATPase-Aktivität von der Katalysegeschwindigkeit in Anwesenheit von F-Aktin subtrahiert. Die Approximation der Messwerte erfolgt mit dem Michaelis-Menten-Algorithmus. Abbildung 3.30,B beschreibt exemplarisch den linearen Reaktionsverlauf bei einer F-Aktinkonzentration von $70 \mu\text{M}$.

Die Parameter der *steady-state* ATPase-Aktivität des humanen Myosins-6 sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst und den korrespondierenden Parametern des porcinen Myosins-6 gegenübergestellt.

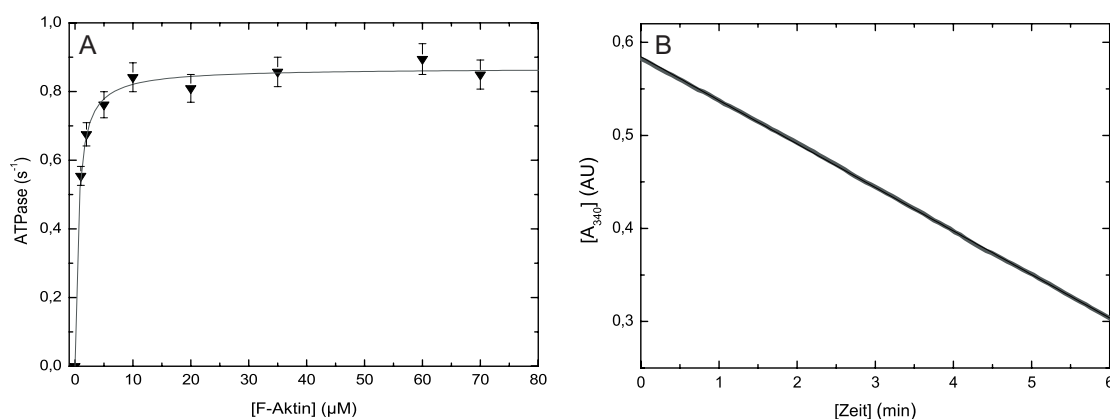


Abbildung 3.30: *Steady-state* ATPase-Aktivität des humanen Myosins-6. Die basale ATPase-Aktivität wurde von der Umsatzgeschwindigkeit in Gegenwart von F-Aktin subtrahiert. Der Michaelis-Menten-Algorithmus bestimmt für das humane Myosin-6 eine Maximalgeschwindigkeit k_{cat} von $0,868 \pm 0,011 \text{ s}^{-1}$ und K_{app} zu $0,578 \pm 0,066 \text{ } \mu\text{M}$. B: Exemplarischer Reaktionsverlauf bei einer F-Aktinkonzentration von $70 \text{ } \mu\text{M}$. Die lineare Approximation der Daten bestimmt $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ zu $-0,055 \text{ AU}/\text{min}$.

Dabei kennzeichnen die Zusätze T406E und T406A des porcinen Myosins Mutanten, die den Phosphorylierungsstatus der schweren Kette imitieren. Die schwere Kette des Myosins-6 wird *in vivo* wahrscheinlich an der Position T406, in der sogenannten TEDS-*site*, phosphoryliert. Die Mutante T406A repräsentiert dabei einen konstitutiv aktiven Zustand des Myosins, während die Mutante T406E den unphosphorylierten Status imitiert [CRUZ *et al.* 2001].

Tabelle 3.8: Parameter der basalen und Aktin-aktivierten *steady-state* ATPase-Aktivität

Konstante	Signal	<i>Hs</i> Myosin-6 ¹	<i>Ss</i> Myosin-6 T406E ²	<i>Ss</i> Myosin-6 T406A ²
k_{basal} (s^{-1})	NADH-Assay	$0,036 \pm 0,004$	$< 0,1$	$< 0,1$
k_{cat} (s^{-1})	NADH-Assay	$0,868 \pm 0,011$	$8,3 \pm 0,2$	$9,1 \pm 0,8$
K_{app} (μM)	NADH-Assay	$0,578 \pm 0,066$	$2,8 \pm 0,3$	$17,6 \pm 2,0$
k_{cat}/K_{app} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_{app} ³	$1,502 \pm 0,192$	$2,96 \pm 0,39$	$0,51 \pm 0,10$

¹ Reaktionsbedingungen: ATPase-Puffer ohne KCl, 2 mM ATP, $0,3 \text{ } \mu\text{M}$ Myosin, $T = 25^\circ\text{C}$

² CRUZ *et al.* [2001]; Reaktionsbedingungen: 10 mM Imidazol pH 7,0, 1 mM MgCl_2 , 2 mM ATP, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 50 mM KCl, $T = 25^\circ\text{C}$

³ berechnet

Ein Anstieg der F-Aktinkonzentration von 0 auf $80 \text{ } \mu\text{M}$ resultiert für das humane Myosin-6 in einer ≈ 24 -fachen Erhöhung der enzymatischen Aktivität. Der erhaltene Maximalwert k_{cat} von $0,868 \pm 0,011 \text{ s}^{-1}$ ist in guter Übereinstimmung mit der von WELLS *et al.* [1999]¹ für *Ss* Myosin-6 publizierten maximalen Katalysegeschwindigkeit von $0,8 \text{ s}^{-1}$. Im Kontrast dazu beschreiben CRUZ *et al.* [2001] für *Ss* Myosin-6 T406E und T406A maximale Umsatzgeschwindigkeiten von $8,3 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$ bzw. $9,1 \pm 0,88 \text{ s}^{-1}$.

Die basalen ATPase-Aktivitäten sind für die humane und die porcinen Isoformen mit $< 0,1 \text{ s}^{-1}$ vergleichbar. Im Falle des menschlichen Myosins wird die maximale ATPase-Aktivität durch F-Aktin mit einem Faktor von ≈ 24 weniger aktiviert als die porcinen Pendanten (≈ 100 -fach).

Die apparente Gleichgewichtskonstante K_M für Aktin, K_{app} , liegt für das humane Myosin-6 mit $0,578 \pm 0,066 \text{ } \mu\text{M}$ leicht unter den publizierten Konstanten für *Ss* Myosin-6 mit $3 \text{ } \mu\text{M}$ [WELLS *et al.* 1999] bzw. $2,8 \pm 0,3 \text{ } \mu\text{M}$ und $17,6 \pm 2,0 \text{ } \mu\text{M}$ für *Ss* Myosin-6 T406E und *Ss* Myosin-6 T406A [CRUZ *et al.* 2001].

Die Bindungskonstante 2. Ordnung der Aktinbindung in Anwesenheit von ATP beträgt für *Hs* Myosin-6 $1,502 \pm 0,192 \text{ } \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Damit ist die Kopplungseffizienz der menschlichen Isoform im Vergleich zu *Ss* Myosin-6 T406A um den Faktor 3 erhöht und zu *Ss* Myosin-6 T406E halbiert.

¹Reaktionsbedingungen: 20 mM KCl, $T = 25^\circ\text{C}$

3.2.2.2 Transientenkinetische Charakterisierung des humanen Myosins-6

3.2.2.3 Interaktion zwischen Myosin-6 und ATP

In Abwesenheit von Aktin wurde die ATP-Bindung an Myosin durch den transienten Anstieg der mantATP-Fluoreszenz bei der Bindung an Myosin bestimmt. Dabei wurde das ATP-Analogon 2'-desoxy-mantATP eingesetzt. Die Fluoreszenz des ATP-Analogons wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt und die Fluoreszenzemission durch einen KV 389-Filter zeitabhängig detektiert. Die Fluoreszenztransienten können einfach-exponentiell approximiert werden. Exemplarisch ist ein Transient in Abbildung 3.31,B dargestellt. Die Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von der 2'-desoxy-mantATP-Konzentration ist in Abbildung 3.31,A abgebildet. Eine lineare Regression der Daten definiert die Bindungskonstante 2. Ordnung K_1k_{+2} der ATP-Bindung an Myosin zu $0,049 \pm 0,007 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$; Die Ordinate definiert die Dissoziationsratenkonstante k_{-2} zu $0,45 \pm 0,006 \text{s}^{-1}$.

Myosin-6 weist im Vergleich zu skelettmuskulärem Myosin-2 keine Tryptophan-Reste an den Positionen W510 und W595 auf. An korrespondierenden Positionen weist humanes Myosin-6 die Aminosäuren Val503 und Phe593 auf. Dies macht transientenkinetische Studien unter Verwendung der intrinsischen Proteinfluoreszenz unmöglich. Dieses Verhalten wurde bereits für porcines Myosin-6 beschrieben [CRUZ *et al.* 2001]. Die Bestimmung der Hydrolysegeschwindigkeit $k_{+3}+k_{-3}$ sowie $1/K_1$, der Dissoziationsgleichgewichtskonstante des Myosin·ATP-Kollisionskomplexes, ist deshalb nicht möglich. Tabelle 3.9 fasst die kinetischen Parameter der Interaktion zwischen Myosin-6 und ATP zusammen.

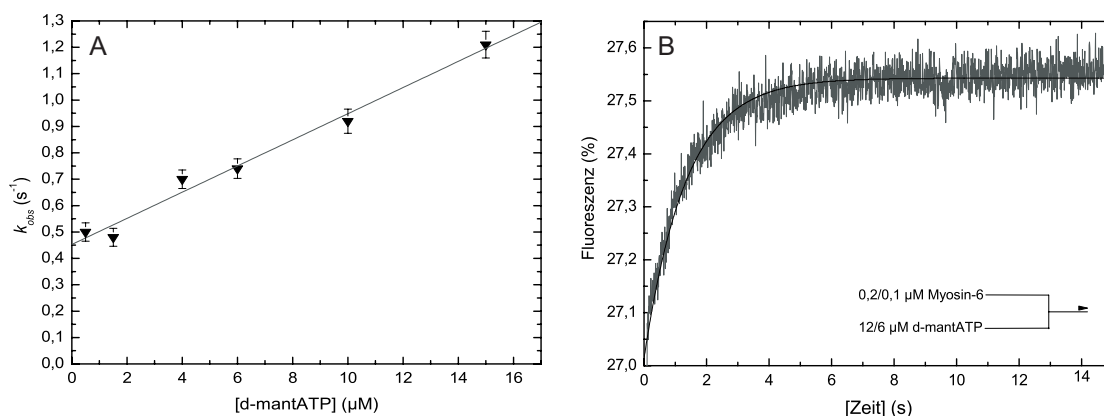
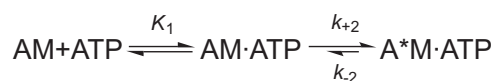


Abbildung 3.31: Interaktion zwischen Myosin und ATP. A: Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} von der 2'-desoxy-mantATP-Konzentration. Die lineare Regression der Messwerte definiert die apparente Bindungskonstante 2. Ordnung K_1k_{+2} zu $0,049 \pm 0,007 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und k_{-2} zu $0,45 \pm 0,006 \text{s}^{-1}$. B: Fluoreszenzverlauf bei der Mischung von $0,2 \mu\text{M}$ Myosin-6 mit $6 \mu\text{M}$ 2'-desoxy-mantATP. Der Transient weist eine Amplitude von $0,53\%$ und eine Rate von $0,74 \text{s}^{-1}$ auf.

3.2.2.4 Interaktion zwischen Aktomyosin-6 und ATP

Die Interaktion zwischen Aktomyosin-6 und ATP wurde durch die Dissoziation des Pyren-Aktomyosin-Komplexes durch einen Überschuss an ATP analysiert. Die Reaktion wurde nach folgendem Schema interpretiert.



Die ATP-Bindung an den Pyren-Aktomyosinkomplex resultiert in einer Erhöhung der Pyren-Fluoreszenz, die durch eine mono-exponentielle Regression beschrieben werden kann und exem-

plarisch in Abbildung 3.32,B dargestellt ist. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt und das optische Signal durch einen KV 389-Filter zeitabhängig verfolgt.

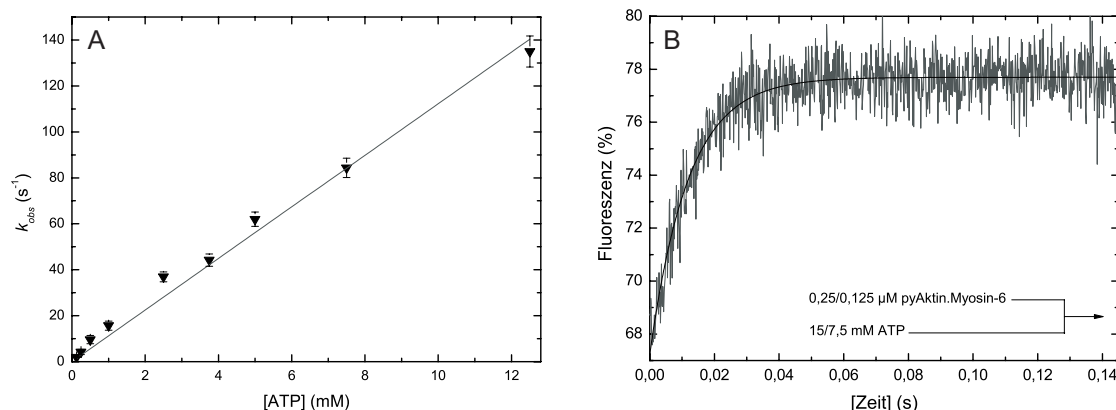


Abbildung 3.32: Bestimmung der ATP-Bindung an Aktomyosin. A: Die Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} von der ATP-Konzentration ist im beobachteten Konzentrationsbereich linear und definiert die apparente ATP-Bindungskonstante zweiter Ordnung $K_1 k_{+2}$ zu $11,22 \pm 0,297 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$. B: Exemplarischer Transient der Bindung von 7,5 mM ATP an 0,125 μ M Pyren-Aktomyosin. Der Reaktionsverlauf kann einfach-exponentiell approximiert werden und weist eine Amplitude von 10,47 % sowie eine beobachtete Geschwindigkeitskonstante k_{obs} von $84,31 \text{ s}^{-1}$ auf.

Im Konzentrationsbereich bis 12,5 mM ATP folgen die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} einem linearen Verlauf (Abbildung 3.32,A). Die lineare Approximation definiert die Bindungskonstante 2. Ordnung der ATP-Bindung an Aktomyosin $K_1 k_{+2}$ zu $11,22 \pm 0,297 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Um den Einfluss der freien Magnesiumionenkonzentration auf die ATP-Bindung an Aktomyosin zu untersuchen, wurde der analoge Versuch in der Anwesenheit von 1 mM MgCl_2 im MOPS-Experimentalpuffer durchgeführt. Unter diesen Versuchsbedingungen beträgt die Bindungskonstante 2. Ordnung der ATP-Bindung an Aktomyosin $K_1 k_{+2} = 11,91 \pm 0,465 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die Konzentration an freien Magnesiumionen hat unter diesen Versuchsbedingungen keinen Einfluss auf die ATP-Bindung an Aktomyosin.

Die maximale Rate der ATP-induzierten Dissoziation (k_{+2}), korrespondierend der Isomerisierung des Aktomyosin-ATP-Komplexes, beträgt $> 140 \text{ s}^{-1}$. $1/K_1$, die Dissoziationsgleichgewichtskonstante des Aktomyosin-ATP-Komplexes beträgt für das humane Myosin-6 $\gg 12 \text{ mM}$.

Die kinetischen Parameter der Interaktion zwischen Aktomyosin und ATP sind in Tabelle 3.9 tabelliert und den kinetischen Parametern von *Ss* Myosin-6 gegenübergestellt.

Tabelle 3.9: Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Interaktion zwischen Myosin sowie Aktomyosin mit ATP

Konstante	Signal	<i>Hs</i> Myosin-6	<i>Ss</i> Myosin-6 T406E ²	<i>Ss</i> Myosin-6 T406A ²
$K_1 k_{+2}$ ($\mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	desoxy-mantATP	$0,049 \pm 0,007$	$0,27 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,04$
k_{-2} (s^{-1})	desoxy-mantATP ¹	$0,45 \pm 0,006$	$3,9 \pm 0,30$	$4,0 \pm 0,30$
$K_1 k_{+2}$ ($\text{mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	Pyren-Aktin	$11,22 \pm 0,297$	$18,2 \pm 0,20$	$15,2 \pm 0,40$
k_{+2} (s^{-1})	Pyren-Aktin	> 140	> 250	> 250
$1/K_1$ (mM)	Pyren-Aktin	$\gg 12$	$\gg 14$	$\gg 14$

¹ Ordinate des k_{obs} versus desoxy-mantATP Diagramms

² CRUZ *et al.* [2001]

Im Vergleich zu porcinem Myosin-6 ist humanes Myosin-6 durch eine erniedrigte ATP-Bindungskonstante 2. Ordnung sowohl in An- als auch in Abwesenheit von F-Aktin gekennzeichnet. Dabei weist das menschliche Homolog eine um den Faktor $\approx 3-6$ erniedrigte Bindungskonstante in Abwesenheit von F-Aktin auf. In der Anwesenheit von Aktin beträgt der Unterschied 35-60 %. Gemeinsam ist allen Myosinen der Klasse-6 eine sehr niedrige ATP-Bindungskonstante an den

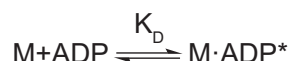
Aktomyosin-Komplex. Vergleichbares Verhalten ist bislang nur für *Rr* MYR1, ein Klasse-1 Myosin beschrieben ($K_1 k_{+2} = 23 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [COLUCCIO und GEEVES 1999].

Konsens besteht in einer reversiblen Isomerisierung des Myosin-ATP-Komplexes zwischen den Klasse-6 Myosinen unterschiedlicher Spezies. Im Kontrast zu *Ss* Myosin-6 verläuft die Rückreaktion der Isomerisierung k_{-2} im humanen Pendant mit ≈ 9 fach reduzierter Geschwindigkeit ab.

Die Isomerisierungsgeschwindigkeit k_{+2} ist in der humanen Isoform $\approx 1,8$ fach langsamer als in der porcinen. In beiden Spezies ist die Gleichgewichtskonstante der ATP-Dissoziation des Aktomyosin-ATP-Komplexes mit $\gg 12$ -14 mM sehr hoch.

3.2.2.5 Interaktion zwischen Myosin-6 sowie Aktomyosin-6 mit ADP

Die Interaktion zwischen Myosin und ADP wurde durch die Verwendung des fluoreszenten ADP-Analogons mantADP studiert und nach folgendem Schema interpretiert.



Die Bindung von mantADP an Myosin resultiert in einer Fluoreszenzerhöhung, die mit einem einfach-exponentiellen Verlauf approximiert werden kann (Abbildung 3.33,B). Die Fluoreszenz der mant-Gruppe wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt und die Fluoreszenzemission durch einen KV 389-Filter zeitabhängig detektiert.

Um den Einfluss der freien Magnesiumionenkonzentration auf die mantADP-Bindung an Myosin zu charakterisieren, wurden analoge Versuche in der Gegenwart von 1 mM bzw. 5 mM MgCl_2 im MOPS-Experimentalpuffer durchgeführt. Unter beiden Versuchsbedingungen weisen die beobachteten Ratenkonstanten k_{obs} eine lineare Abhängigkeit von der mantADP-Konzentration auf (Abbildung 3.33,A). Die lineare Regression approximiert die apparente Bindungskonstante 2. Ordnung der mantADP-Bindung an Myosin zu $0,15 \pm 0,009 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (1 mM MgCl_2) bzw. $0,144 \pm 0,006 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (5 mM MgCl_2). Die Ordinaten repräsentieren die korrespondierenden Dissoziationsratenkonstanten. In der Gegenwart von 1 mM MgCl_2 dissoziiert ADP mit einer Geschwindigkeit k_D von $0,53 \pm 0,023 \text{ s}^{-1}$ respektive $0,284 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ in der Anwesenheit von 5 mM MgCl_2 von Myosin.

Die Bestimmung der Bindungs- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten erlaubt die Kalkulation der Dissoziationsgleichgewichtskonstanten, K_D , über den Formalismus k_{-D}/k_{+D} . In der Gegenwart von 1 mM MgCl_2 beträgt $K_D = 3,53 \pm 0,029 \mu\text{M}$ und $1,97 \pm 0,152 \mu\text{M}$ in der Anwesenheit von 5 mM MgCl_2 .

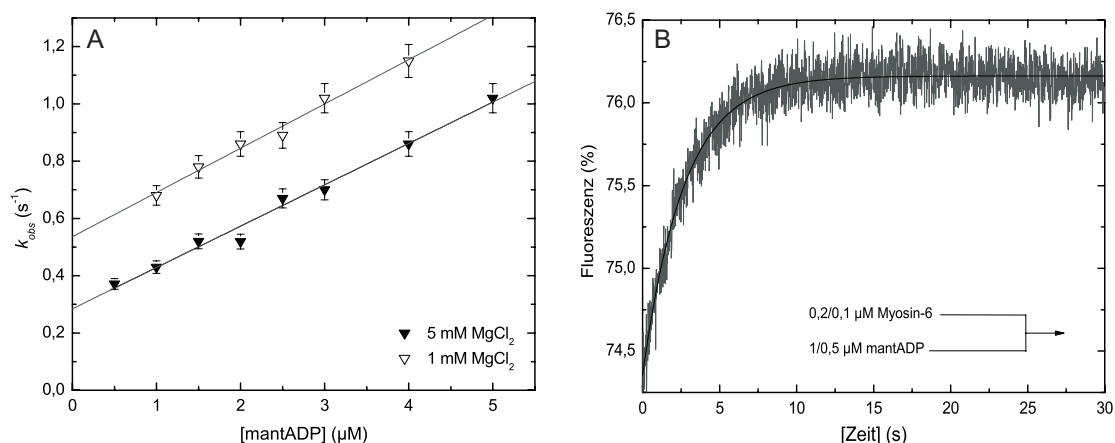


Abbildung 3.33: MantADP-Bindung an Myosin-6. A: Lineare Abhängigkeit der ermittelten Ratenkonstanten von der mantADP-Konzentration in der Gegenwart von 1 mM und 5 mM MgCl_2 . B: Verlauf des Fluoreszenzsignals bei der schnellen Mischung von $0,1 \mu\text{M}$ Myosin-6 und ansteigenden Konzentrationen an mantADP in einer *stopped-flow*-Apparatur bei einer Magnesiumionenkonzentration von 5 mM. Der Fluoreszenzverlauf kann mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung approximiert werden und weist eine Amplitude von 1,8% sowie eine Geschwindigkeitskonstante von $0,37 \text{ s}^{-1}$ auf.

Die ADP-Bindung an Aktomyosin wurde magnesiumabhängig ermittelt. Interpretationsgrundlage der Reaktion ist das folgende Schema.

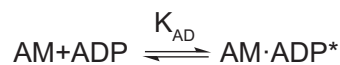


Abbildung 3.34,B beschreibt exemplarisch einen Transienten der Reaktion zwischen $0,1 \mu\text{M}$ Aktomyosin und $3 \mu\text{M}$ mantADP. Die detektierten Reaktionsverläufe können durch eine einfach exponentielle Regression mit *lag*-Phase approximiert werden. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} weisen eine lineare Abhängigkeit von der mantADP-Konzentration auf und sind in Abbildung 3.34,A dargestellt. Die lineare Approximation individueller Messreihen definiert die ADP-Bindungskonstante 2. Ordnung k_{+AD} zu $0,22 \pm 0,007 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ in der Anwesenheit von 1 mM MgCl_2 und $0,2 \pm 0,01 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ in der Anwesenheit von 5 mM MgCl_2 . Die korrespondierenden Ordinaten repräsentieren die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{-AD} zu $0,59 \pm 0,019 \text{ s}^{-1}$ und $0,16 \pm 0,019 \text{ s}^{-1}$ in der Gegenwart von 1 mM respektive 5 mM MgCl_2 . Über den Formalismus $k_{-AD}/k_{+AD} = K_{AD}$ kann die Gleichgewichtskonstante der ADP-Dissoziation von Aktomyosin zu $2,68 \pm 0,175 \mu\text{M}$ respektive $0,8 \pm 0,21 \mu\text{M}$ in der Gegenwart von 1 mM bzw. 5 mM MgCl_2 kalkuliert werden. Die Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten der Interaktion zwischen Myosin und Aktomyosin mit ADP sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst.

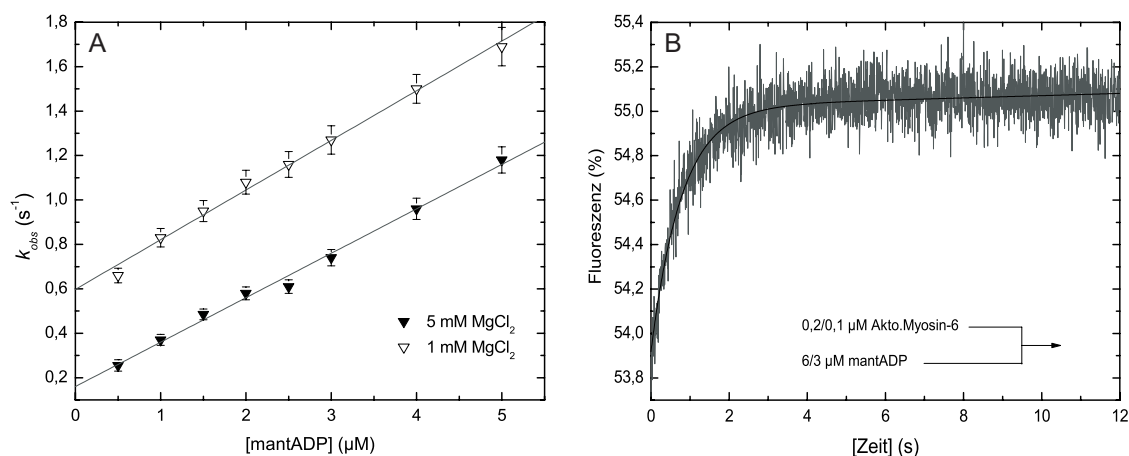


Abbildung 3.34: MantADP-Bindung an Aktomyosin. B: Auftragung der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten *versus* der mantADP-Konzentration. Die geschlossenen Rauten repräsentieren die Raten bei 5 mM MgCl_2 während die offenen Rauten die apparenten Geschwindigkeitskonstanten in Anwesenheit von 1 mM MgCl_2 kennzeichnen. B: Exemplarischer Transient bei der Bindung von $3 \mu\text{M}$ mantADP an $0,1 \mu\text{M}$ Aktomyosin in Anwesenheit von 1 mM MgCl_2 . Der Transient folgt einem einfach-exponentiellen Reaktionsverlauf mit *lag*-Phase: die Amplitude beträgt $1,1\%$, die Geschwindigkeitskonstante $1,27 \text{ s}^{-1}$. Die Fluoreszenz des mant-Fluorophors wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt und die Fluoreszenzemission durch einen KV 389-Filter zeitabhängig verfolgt.

Die ADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante von Aktomyosin bzw. Myosin wurden durch unabhängige Experimente verifiziert. Zur direkten Bestimmung von k_{-D} wurde die Verdrängung von mantADP aus dem Myosin·ADP-Komplex durch einen Überschuss an ATP fluoreszenzspektroskopisch detektiert. Die Fluoreszenz des mant-Fluorophors wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt und die Emission durch einen KV 389-Filter zeitlich verfolgt (Abbildung 3.35). In diesen Versuchen wurde Myosin in einem Konzentrationsbereich zwischen $0,1 \mu\text{M}$ und $0,25 \mu\text{M}$ eingesetzt. Die Konzentration des mant- oder 2'-desoxy-mantADPs betrug zwischen $10 \mu\text{M}$ und $20 \mu\text{M}$, während die ATP-Konzentration konstant bei 1 mM lag.

Auch in diesem Versuch wurde der Einfluss der freien Magnesiumionenkonzentration auf die ADP-Dissoziationsgeschwindigkeit analysiert. Exemplarisch wurden die Versuche in der Gegenwart von 1 mM MgCl_2 und 5 mM MgCl_2 durchgeführt. Die Transienten können in beiden Fällen mit einem einfach-exponentiellen Reaktionsverlauf beschrieben werden (Abbildung 3.35,A). Die Geschwindigkeitskonstante der ADP-Dissoziation k_{-D} beträgt in der Gegenwart von 1 mM MgCl_2

$0,392 \pm 0,005 \text{ s}^{-1}$ sowie $0,229 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$ in der Gegenwart von 5 mM MgCl_2 . Die kinetischen Parameter der direkten Bestimmung der ADP-Dissoziation von Myosin korrelieren mit den indirekt über die Bindungstitration ermittelten Parametern. Die ADP-Dissoziation von Myosin wurde zudem unter Verwendung des 2'-desoxy-mantADP-Analogons analysiert. Dabei beträgt die Dissoziationsgeschwindigkeit von Myosin $0,248 \pm 0,004 \text{ s}^{-1}$ in der Gegenwart von 5 mM MgCl_2 .

Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{AD} wurde analog zu k_{D} bestimmt. Die Proteinkonzentration betrug $0,1 - 0,25 \mu\text{M}$ Aktomyosin; mant-Nukleotide wurden im Konzentrationsbereich zwischen $10 \mu\text{M}$ und $20 \mu\text{M}$ eingesetzt. Die Fluoreszenzverläufe folgen einen mono-exponentiellen Verlauf (Abbildung 3.35,A). Die Geschwindigkeitskonstanten liegen für das humane Myosin-6 bei $k_{AD} = 0,863 \pm 0,022 \text{ s}^{-1}$ bzw. $0,441 \pm 0,001 \text{ s}^{-1}$ in der Gegenwart von 1 mM respektive 5 mM MgCl_2 . Die Verwendung des 2'-desoxy-mantADP-Analogons resultiert in einer Geschwindigkeitskonstante der ADP-Dissoziation $k_{AD} = 0,288 \pm 0,006 \text{ s}^{-1}$ in der Gegenwart von 5 mM MgCl_2 .

Die Magnesiumsensitivität der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{AD} wurde im Konzentrationsbereich zwischen $\approx 0,005 - 20 \text{ mM}$ freien Magnesiumionen analysiert. Myosin-6 weist eine magnesiumsensitive Geschwindigkeitskonstante der ADP-Dissoziation (k_{AD}) auf: Die detektierten Ratenkonstanten weisen eine sigmoidale Abhängigkeit von der freien Magnesiumionenkonzentration auf und sind in Abbildung 3.35,A dargestellt. Die apparente Inhibierkonstante $K_i [\text{Mg}_{\text{frei}}^{2+}]$ liegt mit $\approx 137 \mu\text{M}$ im physiologischen Konzentrationsbereich.

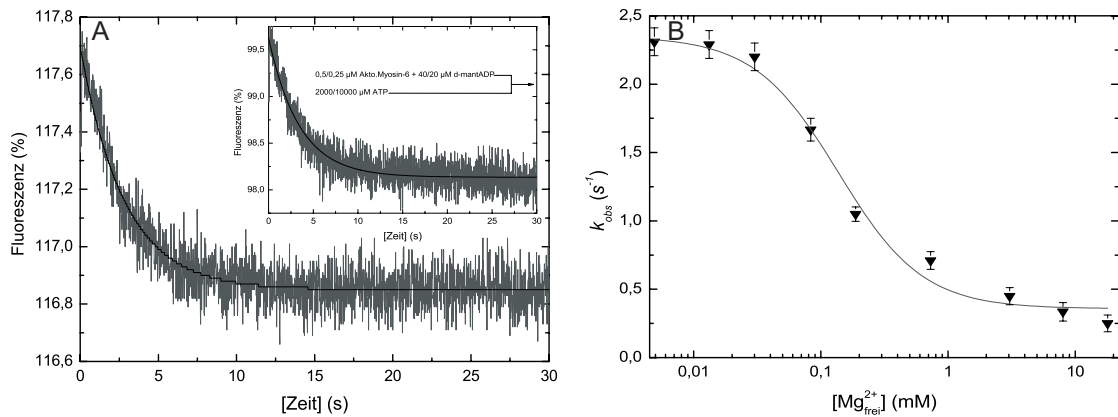


Abbildung 3.35: A: Dissoziation von mantADP bzw. 2'-desoxy-mantADP aus dem Komplex mit Myosin und Aktomyosin (Miniatur) bei MgCl_2 -Konzentrationen von 1 mM respektive 5 mM durch einen Überschuss an ATP. B: Abhängigkeit von k_{AD} von der freien Magnesiumionenkonzentration. Die Dissoziationsgeschwindigkeit von mantADP aus dem Aktomyosin-Komplex wird durch steigende Konzentrationen an freien Magnesiumionen inhibiert. Der K_i -Wert liegt mit $\approx 137 \mu\text{M}$ im physiologischen Bereich.

Tabelle 3.10 fasst die kinetischen Konstanten der Interaktion zwischen Myosin-6 sowie Aktomyosin-6 mit ADP im Vergleich mit Ss Myosin-6 zusammen.

Tabelle 3.10: Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Interaktion zwischen Myosin-6 sowie Aktomyosin-6 mit ADP

Konstante	Signal	<i>Hs</i> Myosin-6 ¹	<i>Hs</i> Myosin-6 ²	<i>Ss</i> Myosin-6 T406E ⁴	<i>Ss</i> Myosin-6 T406A ⁴
k_{+D} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	mantADP	$0,15 \pm 0,009$	$0,144 \pm 0,006$	$1,06 \pm 0,1$	$0,26 \pm 0,04$
k_{-D} (s^{-1})	mantADP ³	$0,53 \pm 0,023$	$0,284 \pm 0,010$		
k_{-D} (s^{-1})	mantADP ⁵	$0,392 \pm 0,005$	$0,229 \pm 0,002$	$6,4 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,2$
K_D (μM)	k_{-D}/k_{+D}	$3,53 \pm 0,029$	$1,97 \pm 0,152$	$6,0 \pm 0,6$	$21,5 \pm 3,3$
k_{+AD} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	mantADP	$0,22 \pm 0,007$	$0,2 \pm 0,010$	$0,6 \pm 0,1$	$0,18 \pm 0,03$
k_{-AD} (s^{-1})	mantADP ³	$0,59 \pm 0,019$	$0,16 \pm 0,019$		
k_{-AD} (s^{-1})	mantADP ⁵	$0,863 \pm 0,022$	$0,441 \pm 0,012$	$5,6 \pm 0,1$	$5,4 \pm 0,2$
K_{AD} (μM)	k_{-AD}/k_{+AD}	$2,68 \pm 0,175$	$0,8 \pm 0,210$	$8,8 \pm 1,4$	30 ± 5

¹ 1 mM MgCl₂² 5 mM MgCl₂³ Ordinate des k_{obs} versus mantADP Diagramms⁴ CRUZ *et al.* [2001], desoxy-mantADP⁵ ATP-*chasing*-Experiment

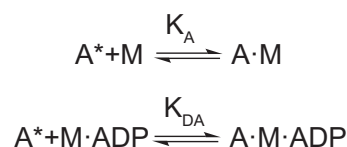
Die ADP-Bindung an humanes Myosin-6 ist in An- und Abwesenheit von F-Aktin mit Bindungskonstanten zwischen $0,14 - 0,22 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ konstant. *Ss* Myosin-6 T406A weist mit $\approx 0,18 - 0,26 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ vergleichbare ADP-Bindungseigenschaften auf, während *Ss* Myosin-6 T406E mit $\approx 0,6 - 1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ durch erhöhte Bindungskonstanten gekennzeichnet ist.

Die ADP-Bindung an humanes Myosin-6 in An- und Abwesenheit von F-Aktin zeigt keine Magnesiumsensitivität. Im Kontrast dazu weisen die ADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten des humanen Myosin-6 sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von F-Aktin eine Abhängigkeit von der freien Magnesiumionenkonzentration auf: k_{-AD} wird um den Faktor 7 mit ansteigenden Konzentrationen an freien Magnesiumionen erniedrigt. Die apparente Inhibierkonstante $K_i [Mg_{frei}^{2+}]$ liegt mit $\approx 137 \mu\text{M}$ im physiologischen Konzentrationsbereich.

Im Vergleich zu porcinem Myosin-6 sind die Dissoziationsgeschwindigkeiten der humanen Isoform in Abwesenheit von F-Aktin bei vergleichbaren Magnesiumionenkonzentrationen um den Faktor ≈ 16 erniedrigt. In der Gegenwart von F-Aktin verringert sich dieser Faktor auf ≈ 9 . Die ADP-Dissoziation von Myosin-6 bzw. Aktomyosin-6 beider Spezies wird durch F-Aktin kaum beeinflusst. Reduzierte Geschwindigkeitskonstanten der ADP-Dissoziation von Myosin und Aktomyosin tragen zu stark erniedrigten Dissoziationsgleichgewichtskonstanten K_D und K_{AD} der humanen im Vergleich zur porcinen Isoform bei. Die Erhöhung der Konzentration an freien Magnesiumionen verstärkt diesen Effekt. Im Vergleich zur porcinen Isoform T406A weist humanes Myosin-6 eine bis zu ≈ 40 fach erhöhte ADP-Affinität in der Gegenwart von F-Aktin auf.

3.2.2.6 Interaktion zwischen Myosin-6 sowie Myosin-ADP mit F-Aktin

Die Bindung von Myosin an Pyren-markiertes F-Aktin in An- und Abwesenheit von Nukleotid resultiert in einem *quench* der Pyren-Fluoreszenz nach folgendem Schema.



Der zeitliche Verlauf dieser Reaktion ist mono-exponentiell und exemplarisch in Abbildung 3.36,B dargestellt. Die Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) in An- und Abwesenheit von ADP ist linear und in Abbildung 3.36,A repräsentiert. Eine lineare Approximation individueller Messreihen definiert die apparente Bindungskonstante 2. Ordnung der Aktinbindung an Myosin in Ab- und Anwesenheit von ADP, k_{+A} bzw. k_{+DA} , zu $2,38 \pm 0,081 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respektive $0,26 \pm 0,011 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

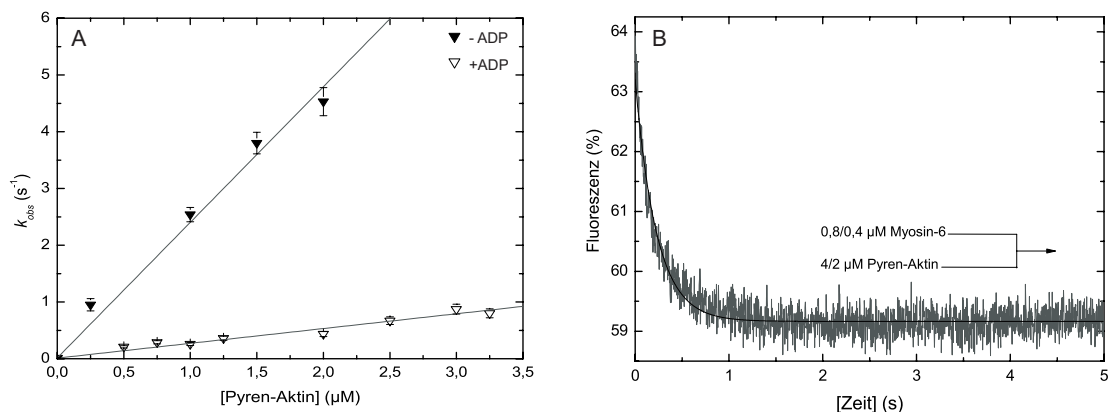


Abbildung 3.36: Interaktion zwischen Myosin und Myosin-ADP mit F-Aktin. A: Lineare Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) von der Pyren-Aktinkonzentration. Für den Versuch wurde ein konstantes Pyren-Aktin:Myosin-Verhältnis von 5:1 aufrechterhalten. Die Pyren-Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt und die Emission durch einen KV 389-Filter zeitabhängig detektiert. B: Exemplarischer Verlauf des optischen Signals bei der Mischung von $2 \mu M$ Pyren-Aktin mit $0,4 \mu M$ Myosin-6 in einer *stopped-flow*-Apparatur. Der Transient weist eine Amplitude von 4 % und eine Geschwindigkeitskonstante von $0,226 s^{-1}$ auf.

Die korrespondierenden Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten wurden bestimmt, indem Pyren-Aktomyosin in der Ab- bzw. Anwesenheit von ADP mit einem Überschuss an unmarkiertem F-Aktin in einer *stopped-flow*-Apparatur gemischt wurde. Die Pyren-Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt und die Fluoreszenzemission durch einen KV 389-Filter detektiert. Wie in Abbildung 3.37 dargestellt, kann der transiente Fluoreszenzanstieg mit einer mono-exponentiellen Regression beschrieben werden. Deren Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}) repräsentiert die Gleichgewichtskonstante der Aktindissoziation in Ab- bzw. Anwesenheit von ADP, k_A und k_{DA} .

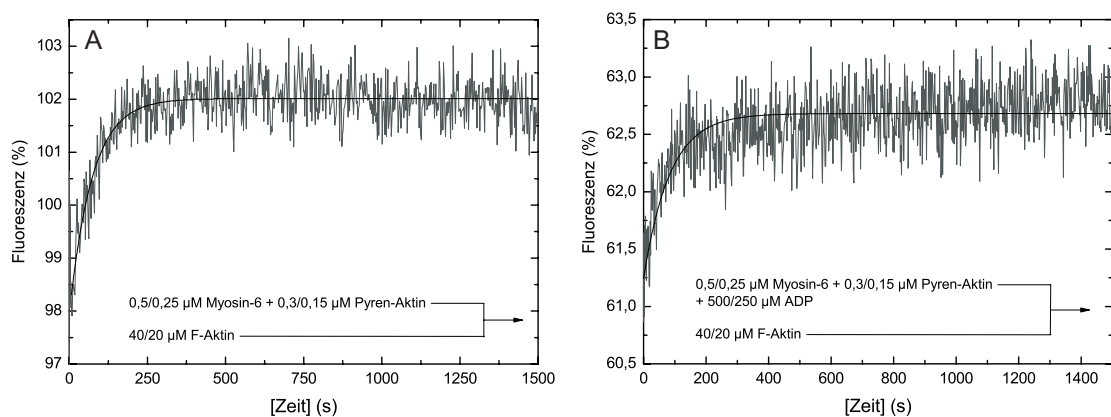


Abbildung 3.37: Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Aktindissoziation. Die Dissoziation von Pyren-Aktin aus dem Pyren-Aktomyosin-Komplex wurde durch die Konkurrenz zwischen Aktomyosin (A) bzw. Aktomyosin-ADP (B) mit einem 80fachen Überschuss an unmarkiertem F-Aktin transientenkinetisch bestimmt.

Aus den Dissoziations- und Bindungsgeschwindigkeitskonstanten können die Dissoziationsgleichgewichtskonstanten K_A und K_{DA} kalkuliert werden. Für das humane Myosin-6 wird die Gleichgewichtskonstante der Aktindissoziation des Aktomyosin-Komplexes K_A zu $\approx 5,75 nM$ und die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation des Aktomyosin-ADP-Komplexes K_{DA} zu $\approx 40,7 nM$ berechnet. Alle kinetischen Parameter der Interaktion zwischen Myosin sowie Myosin-ADP mit F-Aktin sind in Tabelle 3.11 aufgelistet und den korrespondierenden Parametern des porcinen Analogs gegenübergestellt.

Tabelle 3.11: Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Interaktion zwischen Myosin-6 und Myosin-6·ADP mit F-Aktin

Konstante	Signal	<i>Hs</i> Myosin-6 ¹	<i>Ss</i> Myosin-6 T406E ²	<i>Ss</i> Myosin-6 T406A ²
k_{+A} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Pyren-Aktin	$2,38 \pm 0,081$	$5,4 \pm 0,2$	$6,8 \pm 0,2$
k_{-A} (s^{-1})	Pyren-Aktin	$\approx 0,0137$	$0,005 \pm 0,004$	$0,004 \pm 0,002$
K_A (nM)	k_{-A}/k_{+A}	$\approx 5,75$	$0,9 \pm 0,7$	$0,6 \pm 0,3$
k_{+DA} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Pyren-Aktin	$0,26 \pm 0,010$	$0,9 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$
k_{-DA} (s^{-1})	Pyren-Aktin	$\approx 0,011$	$0,06 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,03$
K_{DA} (nM)	k_{-DA}/k_{+DA}	$\approx 40,7$	67 ± 34	47 ± 21

¹ MOPS-Experimentalpuffer, 0 mM KCl, 10 mM DTT² CRUZ *et al.* [2001]

Durch die Gegenüberstellung der kinetischen Parameter des humanen und porcinen Myosins-6 fällt auf, dass die Aktinbindungskonstanten der humanen Isoform in Ab- und Anwesenheit von ADP um den Faktor ≈ 3 -5 erniedrigt sind. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-A} der humanen Isoform ist um den Faktor ≈ 3 erhöht. Durch diesen Kontrast erniedrigt sich die Aktin-Affinität des menschlichen Klasse-6 Myosins um den Faktor ≈ 5 auf 4,87 nM. In der Anwesenheit eines Überschusses an ADP verhält sich *Hs* Myosin-6 konträr: Die Dissoziationsgeschwindigkeit k_{-DA} ist im Vergleich zu den porcinen Pendanten um den Faktor ≈ 7 erniedrigt. Eine reduzierte Geschwindigkeitskonstante der Aktindissoziation in Kombination mit einer niedrigen Aktinbindungskonstante k_{+DA} resultiert in einer Dissoziationsgleichgewichtskonstanten, die mit ≈ 40 nM vergleichbar mit den porcinen Analogons ist. ADP erniedrigt die Aktin-Affinitäten des humanen Myosins ≈ 10 fach, verursacht durch eine 10fach reduzierte Aktinbindungskonstante.

3.3 Myosin-7a

Im zellulären Kontext übernimmt Myosin-7a strukturelle Aufgaben und partizipiert am Transport von Organellen und Molekülen. Dysfunktionen des Myosins resultieren in auditorischen und visuellen Defekten [LIU *et al.* 1999, 1997, PETIT 2001]. Im Gegensatz zu Myosin-7b gibt es derzeit keine umfassenden kinetischen und funktionalen Studien eines Myosins-7a aus Säugetieren.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Darstellung sowie funktionale und kinetische Charakterisierung des humanen Myosins-7a. Das Expressionskonstrukt wurde durch *molecular modeling* entworfen, kloniert, im Baculovirus/*Sf9*-System produziert und durch säulenchromatographische Techniken homogen aufgereinigt. Das rekombinante Protein wurde funktional untersucht und die Einzelschritte des Myosin ATPase-Zyklus im Fließgleichgewicht sowie transientenkinetisch aufgeklärt. Für die Interpretation der ermittelten kinetischen Parameter wurden diese den publizierten kinetischen Konstanten von verschiedenen Myosinen der Klasse-7 gegenübergestellt. Die Analyse und Interpretation der Messergebnisse erfolgt auf der Basis der unter 1.4 beschriebenen Modelle.

3.3.1 Klonierung, Produktion und Darstellung des Myosins-7a

Für die kinetische und funktionale Charakterisierung des humanen Myosins-7a wurde ein Expressionskonstrukt durch *molecular modeling* entworfen, in dem die Motordomäne des Myosins an ihrem C-Terminus konsekutiv mit einem künstlichem Hebelarm, bestehend aus zwei rigiden α -Aktinin-Einheiten aus *Dictyostelium discoideum*, einem EYFP-Fluoreszenzmarker sowie einem His₈-tag fusioniert wurde. Der artifizielle Hebelarm ermöglicht die Untersuchung motiler Prozesse im *in vitro*-Motilitätsassay und interferiert nicht mit der kinetischen Charakterisierung [ANSON *et al.* 1996, DÜRRWANG *et al.* 2006, LIAO *et al.* 2009]. Der His₈-tag ermöglicht die säulenchromatographische Aufreinigung des Expressionskonstruktes durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie.

Die Darstellung des Transfervektors pDESTTM8-M7-2R-EYFP erfolgt über die Zwischenklonierung der Motordomäne des Myosins-7a in den Vektor pGEM[®]-T-Easy. Die Amplifikation der Motordomäne des humanen Myosins wird mit dem Primerpaar 5Myo7aHis8/3Myo7aHis8 (Tabelle 2.1) auf dem Plasmid pCMV-Sport6-Myo7a (von David S. Williams, Departments of Pharmacology and Neurosciences, USCD School of Medicine, La Jolla, CA, USA) realisiert. Die PCR amplifiziert die Basen 267-2508, korrespondierend zu den Aminosäuren 1 bis 747, des menschlichen Myosins. Das Amplifikat wird in den Vektor pGEM[®]-T Easy ligiert.

Im Folgenden wird aus diesem Vektor die Motordomäne mit den Primern 5REC-M7MDH8 und 3REC-M7MDH8 (Tabelle 2.1) amplifiziert. Das Amplikon enthält die notwendigen Rekombinationssequenzen für die BP-Reaktion sowie eine *Xho*I-Schnittstelle am 3'-Ende für die *in frame*-Fusion mit dem künstlichen Hebelarm und dem EYFP-Fluoreszenzmarker.

Das PCR-Produkt wird in der BP-Reaktion in den *entry*-Vektor pDONRTM201 rekombiniert. Die Fusion mit der 2R-EYFP-Einheit erfolgt durch die Insertion dieser DNA-Kassette aus dem Vektor mit pDONRTM201-2R-EYFPH8 durch Restriktion mit *Xho*I und Ligation. Durch die LR-Reaktion wird das Expressionskonstrukt in den Transfervektor pDESTTM8 rekombiniert. In diesem Vektor steht das Genkonstrukt unter der Kontrolle des starken Polyhedrin-Promotors. Die Identität des Expressionskonstruktes wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die folgende Abbildung beschreibt schematisch den modularen Aufbau des Fusionskonstruktes.



Abbildung 3.38: Schematischer Aufbau des Expressionskonstruktes bestehend aus der Motordomäne des humanen Myosins-7a fusioniert mit dem künstlichen Hebelarm (2R) und einem EYFP-Fluoreszenzmarker. Auf die Abbildung des C-terminalen His₈-tags wurde verzichtet. Für die Expression steht das Genkonstrukt unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promotors.

Der Vektor pDEST™8-M7-2R-EYFP konnte erfolgreich in der Transpositionsreaktion zur Darstellung von rekombinatem Bacmid eingesetzt werden. Das Bacmid wurde in der Sekundärzellkultur effizient in *Sf9*-Insektenzellen transfiziert.

Die Präparation des rekombinanten Myosins-7a erfolgte standardmäßig aus 20 L einer *Sf9*-Suspensionskultur nach dem unter 2.2.3.5 beschriebenen Verfahren. Abweichend davon wurde das Volumen der eingesetzten Puffer verdoppelt. Pro Liter *Sf9*-Kultur konnten 0,15-0,25 mg rekombinantes Fusionsprotein isoliert werden. Die Identität des dargestellten, 142 kDa-Proteins wurde im Western-Blot durch die Verwendung von Antikörpern gegen die Motordomäne des Myosins-7a und den His₈-tag sowie durch die massenspektroskopische Analyse nachgewiesen. Abbildung 3.39 beschreibt die zeitabhängige Produktion von M7-2R-EYFP in *Sf9*-Zellen sowie das Aufreinigungsprofil des Fusionsproteins im Anschluss an die Gelfiltration. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird das Fusionskonstrukt M7-2R-EYFP als Myosin-7a bezeichnet.

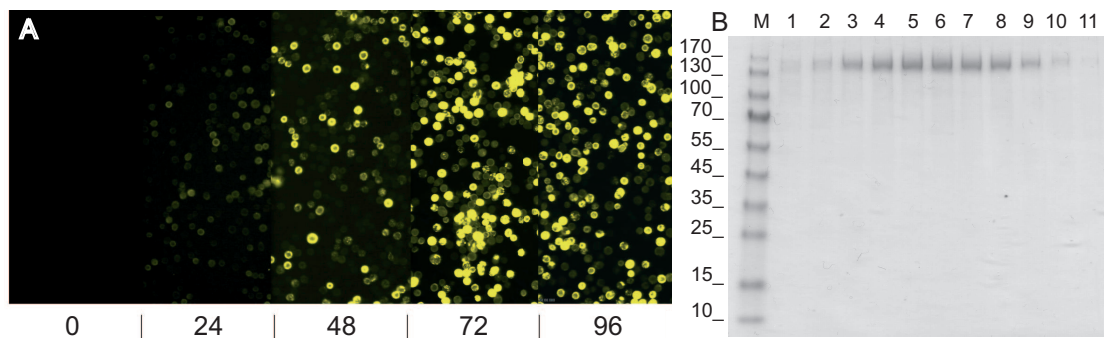


Abbildung 3.39: Produktion und Darstellung des humanen Myosins-7a. A: Produktion von M7-2R-EYFP in *Sf9*-Zellen. Die Aufnahmen wurden 0, 24, 48, 72 und 96 h *post infectionem* bei einer 10fachen Vergrößerung aufgenommen. Zur Visualisierung wurde die EYFP-Fluoreszenz angeregt. B: Aufreinigungsprofil des Myosin-7a-Fusionskonstruktes nach der Gelfiltration.

3.3.2 Kinetische Charakterisierung des humanen Myosins-7a

3.3.2.1 ATP-Titration

Grundlage der kinetischen Charakterisierung des humanen Myosins-7a war die Bestimmung des Anteils aktiver Motoren in der Enzympräparation durch eine ATP- oder *active site*-Titration. Die *active site*-Titration wurde durchgeführt, indem $0,5 \mu\text{M}$ Myosin mit substöchiometrischen Konzentrationen an mantATP gemischt und die Änderung des Fluoreszenzsignals zeitabhängig verfolgt wurde. Die Fluoreszenz des mant-Fluorophors wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt und die Fluoreszenzemission durch einen KV 389-Filter spektroskopisch detektiert. Die Fluoreszenzverläufe folgen einem einfach-exponentiellen Verlauf und sind exemplarisch in Abbildung 3.40,A dargestellt. Die Abhängigkeit der relativen Amplitude der Fluoreszenztransienten von der mantATP-Konzentration ist in Abbildung 3.40,B abgebildet. Die Auswertung erfolgt, indem die Messwerte der Anfangssteigung sowie der Plateau-Phase linear approximiert werden. Aus dem Schnittpunkt der Geraden wird unter Kenntnis der eingesetzten Enzymkonzentration der Anteil an aktiven Motoren zu $\approx 50\%$ bestimmt.

Im Rahmen dieser Arbeit beziehen sich alle Berechnungen und Angaben auf die Konzentration an aktivem Myosin in den enzymatischen Assays.

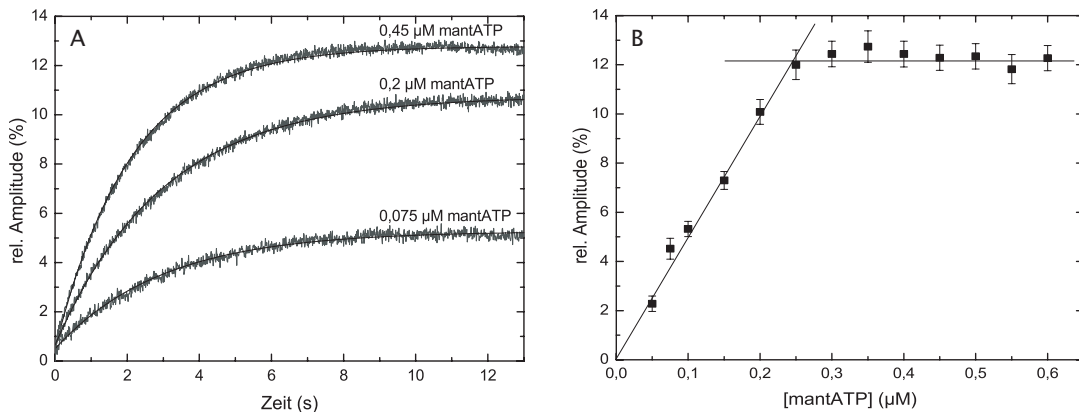


Abbildung 3.40: Amplitudentitration. A: Transienten der schnellen Mischung von $0,5 \mu\text{M}$ Myosin-7a mit mantATP. B: Auftragung der relativen Amplitude gegen die mantATP-Konzentration. Der Schnittpunkt der angepassten Geraden bestimmt die Anzahl an aktiven Motoren zu $\approx 50\%$.

3.3.2.2 *Steady-state* ATPase-Aktivität

Die enzymatische Aktivität des humanen Myosins-7a in Ab- und Anwesenheit von F-Aktin wurde im Fließgleichgewicht durch den unter 2.2.5.1 beschriebenen NADH-gekoppelten Enzymassay bestimmt. Bei Studien der basalen ATPase-Aktivität betrug die eingesetzte Myosin-Konzentration $0,5 \mu\text{M}$, bei der Bestimmung der Aktin-aktivierten Katalysegeschwindigkeit $0,15 \mu\text{M}$. F-Aktin wurde in einem Konzentrationsbereich von 0 - $100 \mu\text{M}$ eingesetzt.

Abbildung 3.41 beschreibt die ATPase-Aktivität des Myosins als eine Funktion der F-Aktinkonzentration. Für die Darstellung wurde die basale ATPase-Aktivität von der Gesamtaktivität subtrahiert und die Messwerte durch eine Hyperbel gemäß der Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben.

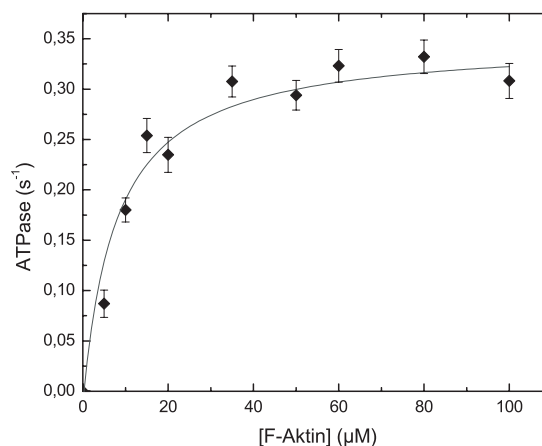


Abbildung 3.41: *Steady-state* ATPase-Aktivität des humanen Myosins-7a. Die Messwerte der Aktin-aktivierten ATPase-Aktivität wurden um die basale ATPase-Aktivität korrigiert. Die Approximation mit dem Michaelis-Menten-Algorithmus definiert die Maximalgeschwindigkeit (k_{cat}) zu $0,348 \pm 0,025 \text{ s}^{-1}$ und die apparente Gleichgewichtskonstante K_M für Aktin, K_{app} , zu $8,3 \pm 2,58 \mu\text{M}$.

Die Parameter der *steady-state* ATPase-Aktivität des humanen Myosins-7a sind in Tabelle 3.12 aufgelistet. Der Wert für die basale Aktivität wurde durch die ATP-abhängige Titration der basalen Umsatzgeschwindigkeit (Abbildung 3.42,B) ermittelt.

Ein Anstieg der F-Aktinkonzentration von 0 - $100 \mu\text{M}$ resultiert in einer ≈ 8 fachen Erhöhung der enzymatischen Aktivität. Der erhaltene Maximalwert $k_{cat} = 0,348 \pm 0,025 \text{ s}^{-1}$ ist in guter Übereinstimmung mit den aus anderen Studien publizierten Maximalgeschwindigkeiten von $0,53 \text{ s}^{-1}$

für *Rr* Myosin-7a [INOUE und IKEBE 2003] sowie $0,45 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$ für *Hs* Myosin-7a [WATANABE *et al.* 2008]. Die K_{app} -Werte sowie die Konstanten der basalen ATPase-Aktivität korrelieren mit den publizierten kinetischen Parametern und sind als Referenz mit in Tabelle 3.12 aufgeführt. Die Bindungskonstante 2. Ordnung der Aktinbindung in Anwesenheit von ATP beträgt $0,042 \pm 0,016 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Diese schwache Kopplungseffizienz bewirkt eine geringe Beschleunigung der ADP-Freisetzung durch die Aktinbindung und eine lange Population der ADP-bindenden Zustände des Myosin ATPase-Zyklus.

Tabelle 3.12: Parameter der basalen und Aktin-aktivierten *steady-state* ATPase-Aktivität

Konstante	Signal	<i>Hs</i> Myosin-7a ¹	<i>Hs</i> Myosin-7a ²
k_{basal} (s^{-1})	NADH-Assay	$0,045 \pm 0,003$	$0,05 \pm 0,01$
k_{cat} (s^{-1})	NADH-Assay	$0,348 \pm 0,025$	$0,45 \pm 0,05$
K_{app} (μM)	NADH-Assay	$8,3 \pm 2,580$	$12,8 \pm 2,90$
k_{cat}/K_{app} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_{app} ³	$0,042 \pm 0,016$	$0,035 \pm 0,011$

¹ Alle Messungen wurden in KCl-freiem ATPase-Puffer in einem *plate-reader* bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt

² WATANABE *et al.* [2008]: Reaktionsbedingungen: 20 mM MOPS-KOH pH 7,5, 2 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 50 mM KCl, 20 U/ml PK, 2 mM PEP, 0,2 mg/ml Calmodulin, T = 25 °C

³ berechnet

Zusätzlich wurde die ATP-Abhängigkeit der basalen und Aktin-aktivierten *steady-state* ATPase-Aktivität bestimmt. Abbildungen 3.42 beschreibt die Abhängigkeit der Katalysegeschwindigkeit von der ATP-Konzentration. Die korrespondierenden kinetischen Parameter sind in Tabelle 3.13 aufgelistet.

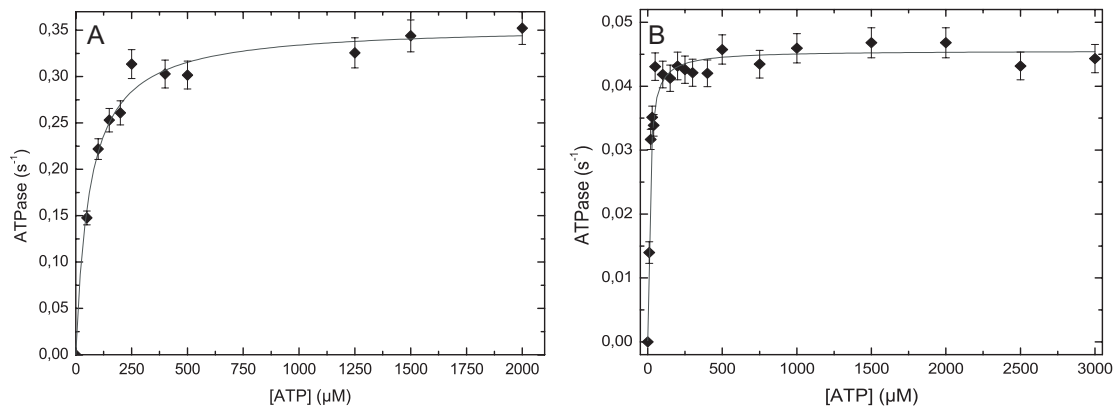


Abbildung 3.42: ATP-Abhängigkeit der *steady-state* ATPase-Aktivität in An (A)- und Abwesenheit (B) von $70 \mu\text{M}$ F-Aktin. Die eingesetzte Myosin-Konzentration betrug in Abwesenheit von F-Aktin $0,5 \mu\text{M}$ und $0,25 \mu\text{M}$ in Anwesenheit von filamentösem Aktin. Die Assays wurden in KCl-freiem ATPase-Puffer bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt.

Ein Anstieg der ATP-Konzentration von 0 - 3 mM resultiert in einer $\approx 4,5$ fachen Erhöhung der basalen enzymatischen Aktivität des humanen Myosins-7a (Abbildung 3.42, B). Studien mit *Rr* Myosin-7a zeigen eine geringe Affinität ($K_{app,ATP} = 154 \mu\text{M}$) von Myosin-7a für ATP [INOUE und IKEBE 2003]. Im Kontrast dazu weist die humane Referenz eine um den Faktor ≈ 10 erniedrigte Affinitätskonstante für ATP auf.

Der Einfluss von ATP auf die Aktin-aktivierte ATPase-Aktivität resultiert in einer ≈ 35 fachen Erhöhung der enzymatischen Aktivität im Konzentrationsbereich zwischen 0 - 2 mM ATP (Abbildung 3.42, A). In Gegenwart von F-Aktin beträgt $K_{app,ATP}$ für *Rr* Myosin-7a $231 \mu\text{M}$ [INOUE und IKEBE 2003]. Diese Tendenz konnte für die humane Isoform, die eine um den Faktor ≈ 4 reduzierte ATP-Affinitätskonstante aufweist, nicht beobachtet werden. Tabelle 3.13 fasst die kinetischen Pa-

parameter der ATP-Abhängigkeit der basalen und Aktin-aktivierten *steady-state* ATPase-Aktivität für das humane Myosin-7a zusammen.

Tabelle 3.13: ATP-Abhängigkeit der basalen und Aktin-aktivierten *steady-state* ATPase-Aktivität

Konstante	Signal	<i>Hs</i> Myosin-7a ¹	<i>Rr</i> Myosin-7a ²
k_{cat} , basal (s ⁻¹)	NADH-Assay	0,045 ± 0,003	0,04
$K_{app,ATP}$, basal (μM)	NADH-Assay	11,69 ± 1,770	154
k_{cat} , Aktin (s ⁻¹)	NADH-Assay	0,35 ± 0,008	0,46
$K_{app,ATP}$, Aktin (μM)	NADH-Assay	62,65 ± 7,089	231

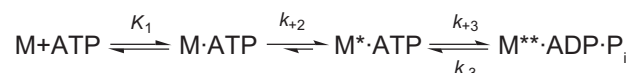
¹ Alle Messungen wurden in KCl-freiem ATPase-Puffer in einem *plate-reader* bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt

² INOUE und IKEBE [2003]; Reaktionsbedingungen: 20 mM Imidazol pH 7,0, 50 mM KCl, 2 mM MgCl, variierende Mg²⁺ ATP-Konzentrationen, 100 μM F-Aktin, 1 mM EGTA, 20 U/ml PK, 3 mM PEP, T = 25 °C

3.3.3 Transientenkinetische Charakterisierung des Myosins-7a

3.3.3.1 Interaktion zwischen Myosin-7a und ATP

In Abwesenheit von Aktin wird die Interaktion zwischen Myosin und ATP nach folgendem Mechanismus interpretiert.



Die Interaktion zwischen ATP und Myosin-7a wurde durch den transienten Fluoreszenzanstieg bei der ATP-Bindung an Myosin charakterisiert. Die intrinsische Tryptophanfluoreszenz des Myosins wurde bei einer Wellenlänge von 297 nm angeregt und die Fluoreszenzemission durch einen WG 320-Filter zeitabhängig detektiert. Abbildung 3.43 stellt die Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von der ATP-Konzentration dar. Für Myosin-7a definiert die Regression der Daten eine Bindungskonstante 2. Ordnung $K_1 k_{+2}$ von $0,85 \pm 0,019 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ sowie einen Maximalwert $k_{+3} + k_{-3}$ von $23,09 \pm 0,738 \text{s}^{-1}$. Bei Myosinen der Klasse-7 ist der Ursprung des Anstiegs der Tryptophanfluoreszenz bei der ATP-Bindung unklar und wird einer Isomerisierung des Proteins bei der Nukleotidbindung (k_2) und/oder der ATP-Hydrolyse ($k_{+3} + k_{-3}$) zugeordnet. Für *Drosophila melanogaster* Myosin-7b wird $k_{+3} + k_{-3}$ der ATP-Hydrolyse, mit möglichen Anteilen von k_{+2} , zugewiesen [YANG *et al.* 2005] und wird im Folgenden als Interpretationsgrundlage der Kinetik des humanen Myosins-7a angenommen.

Neben der Bestimmung der ATP-Bindung durch intrinsische Proteinfluoreszenz wurde das fluoreszierende Nukleotid-Analogon mantATP zur Bestimmung der Assoziationskonstante zweiter Ordnung $K_1 k_{+2}$ der ATP-Bindung an Myosin eingesetzt. Die Bindung von mantATP an Myosin unter Versuchsbedingungen *pseudo*-erster Ordnung führt zu einem Fluoreszenzanstieg, der durch eine einfach-exponentielle Regression beschrieben werden kann (Abbildung 3.44,A). Der Versuch wurde durchgeführt, indem 0,0625 μM Myosin mit ansteigenden Konzentrationen an mantATP schnell gemischt wurde. Die Fluoreszenz des mant-Fluorophors wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt und die Fluoreszenzemission durch einen KV 389-Filter verfolgt. Mit $K_1 k_{+2} = 0,85 \pm 0,0192 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $1,15 \pm 0,012 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ sind die experimentell ermittelten ATP-Bindungskonstanten zweiter Ordnung in guter Übereinstimmung und zusammen mit weiteren kinetischen Parametern der Interaktion zwischen Myosin und ATP in Tabelle 3.14 aufgelistet.

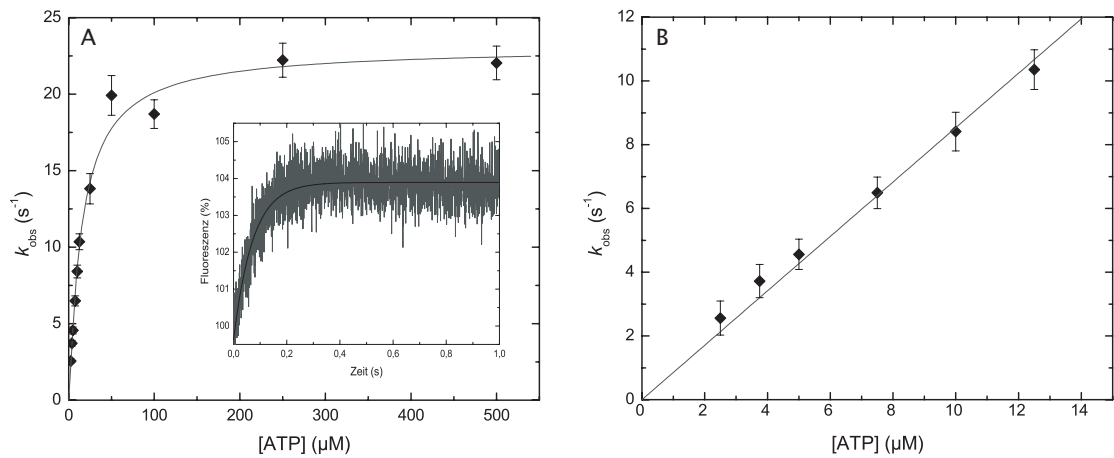


Abbildung 3.43: ATP-Bindung an Myosin-7a. A: Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von der ATP-Konzentration. Die apparenten Ratenkonstanten weisen einen Maximalwert von $23,09 \pm 0,738 \text{ s}^{-1}$ auf. Miniatur: Exemplarischer Verlauf des Fluoreszenzsignals bei der Mischung von $0,25 \mu\text{M}$ Myosin-7a mit $25 \mu\text{M}$ ATP. Der abgebildete Transient konnte mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung beschrieben werden und weist eine Amplitude von 3,8% und eine Geschwindigkeitskonstante von $13,82 \text{ s}^{-1}$ auf. B: Lineare Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von der ATP-Konzentration. Die lineare Approximation definiert $K_1 k_{+2}$ zu $0,85 \pm 0,019 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

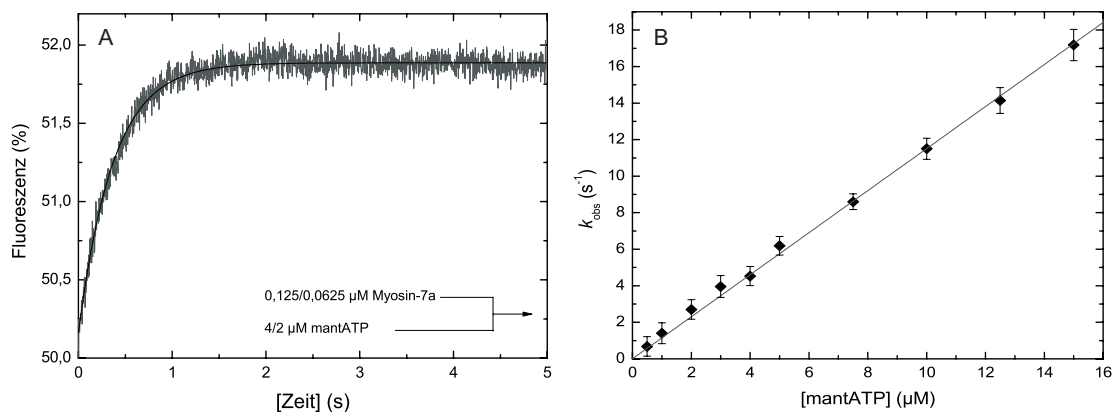


Abbildung 3.44: MantATP-Bindung an Myosin-7a. A: Exemplarischer Fluoreszenzverlauf der mantATP-Bindung an das humane Myosin. B: Die Abhängigkeit der beobachteten Ratenkonstanten k_{obs} von der mantATP-Konzentration ist im beobachteten Konzentrationsbereich linear und definiert die apparente ATP-Bindungskonstante zweiter Ordnung $K_1 k_{+2}$ zu $1,15 \pm 0,012 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

3.3.3.2 Interaktion zwischen Aktomyosin-7a und ATP

Die Interaktion zwischen Aktomyosin und ATP wurde durch die Erniedrigung des Lichtstreusignals bei der schnellen Mischung von $0,125 \mu\text{M}$ Aktomyosin mit ansteigenden ATP-Konzentrationen charakterisiert. Dazu wurde das Lichtstreusignal mit einer Wellenlänge von 320 nm angeregt und im rechtem Winkel zum Anregungslicht detektiert. Die Transienten folgen einem mono-exponentiellen Verlauf mit einer *lag*-Phase, deren Ursprung nicht weiter untersucht und in der Auswertung nicht berücksichtigt wurde (Abbildung 3.45,A, Miniatur). Ein möglicher Ursprung diese *lag*-Phase könnte die Isomerisierung zwischen dem geschlossenen Aktomyosin-Zustand, der kein Nukleotid binden kann, und dem offenen Zustand, der zur Nukleotidbindung befähigt ist, sein. Alternativ könnte kontaminierendes Nukleotid zu diesem Verhalten führen [CRUZ und OSTAP 2009].

Die Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstante k_{obs} von der ATP-Konzentration ist in Abbildung 3.45,B dargestellt. Im Konzentrationsbereich bis $12,5 \mu\text{M}$ ATP können die Geschwindigkeitskonstanten mit einer linearen Regression approximiert werden (Abbildung 3.45,B), welche die apparente Assoziationskonstante 2. Ordnung der ATP-Bindung an Aktomyosin $K_1 k_{+2}$ zu $0,443 \pm 0,012 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ definiert. Bei höheren ATP-Konzentrationen divergieren die Geschwindigkeitskonstanten von der Linearität und folgen einem hyperbolen Zusammenhang, der einen Maximalwert k_{+2} von $186,01 \pm 5,7 \text{ s}^{-1}$ aufweist und in Abbildung 3.45,A abgebildet ist.

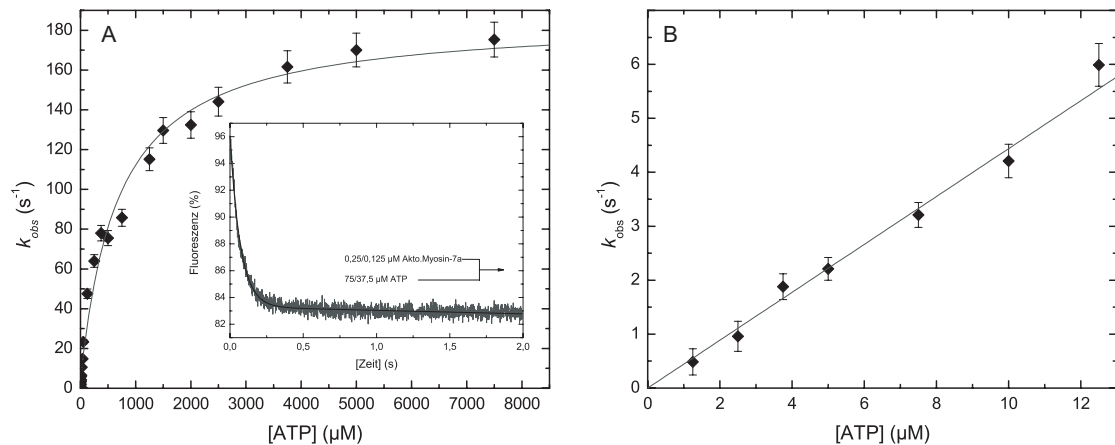


Abbildung 3.45: ATP-Bindung an Aktomyosin. A: Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von der ATP-Konzentration. Miniatur: Exemplarischer Transient der ATP-Bindung an Aktomyosin. Der Reaktionsverlauf wird einfach-exponentiell mit einer *lag*-Phase approximiert. B: Die Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} von der ATP-Konzentration ist im beobachteten Konzentrationsbereich linear und definiert die apparente Bindungskonstante zweiter Ordnung $K_1 k_{+2}$ der ATP-Bindung an Aktomyosin zu $0,43 \pm 0,012 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Zur direkten Charakterisierung der Interaktion zwischen Aktomyosin und ATP wurde die mantATP-Bindung an Aktomyosin untersucht. Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Interaktion des fluoreszierenden ATP-Analogons mit Aktomyosin können im Konzentrationsbereich bis $12,5 \mu\text{M}$ linear approximiert werden (Abbildung 3.46,B). Die Transienten folgen, wie bereits bei der Messung des Lichtstreusignals beobachtet, einem mono-exponentiellen Reaktionsverlauf mit *lag*-Phase.

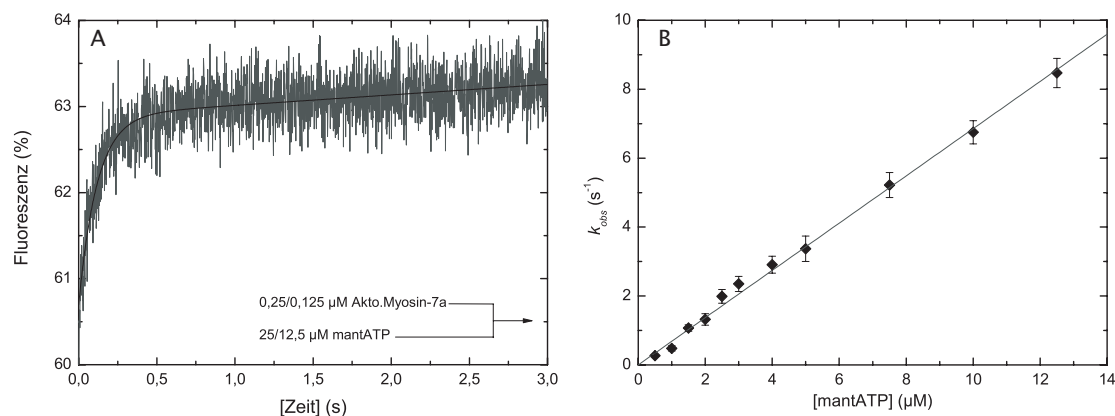


Abbildung 3.46: MantATP-Bindung an Aktomyosin. A: Fluoreszenzerhöhung bei der Bindung von 12,5 µM mantATP an 0,125 µM Aktomyosin. Der Reaktionsverlauf wird durch eine einfach-exponentielle Regression mit *lag*-Phase beschrieben. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 297 nm angeregt und die Fluoreszenzemission nach FRET durch einen KV 389-Filter detektiert. B: Abhängigkeit der beobachteten Ratenkonstanten k_{obs} von der mantATP-Konzentration. Die lineare Regression definiert die apparente Assoziationskonstante zweiter Ordnung K_1k_{+2} der mantATP-Bindung an Aktomyosin zu $0,68 \pm 0,008 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Die Ergebnisse der transientenkinetischen Charakterisierung der Interaktion zwischen Myosin sowie Aktomyosin mit ATP sind in Tabelle 3.14 aufgeführt und den kinetischen Konstanten für *Drosophila melanogaster* Myosin-7a gegenübergestellt.

Tabelle 3.14: Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Interaktion zwischen Myosin und Aktomyosin mit ATP

Konstante	Signal	<i>Hs</i> Myosin-7a	<i>Dm</i> Myosin-7a ¹
K_1k_{+2} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Tryptophan	$0,85 \pm 0,019$	$2,6 \pm 0,2$
K_1k_{+2} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	mantATP	$1,15 \pm 0,012$	$3,4 \pm 0,2$
$k_{+3}+k_{-3}$ (s^{-1})	Tryptophan	$23,09 \pm 0,738$	$12,6 \pm 0,9$
$1/K_1$ (μM)	Tryptophan	$13,69 \pm 2,840$	
K_1k_{+2} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	mantATP	$0,68 \pm 0,008$	$0,47 \pm 0,02$
K_1k_{+2} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Lichtstreuung	$0,443 \pm 0,012$	$0,35 \pm 0,04$
k_{+2} (s^{-1})	Lichtstreuung	$186,01 \pm 5,7$	> 200
$1/K_1$ (μM)	Lichtstreuung	$681,19 \pm 5,63$	

¹ WATANABE *et al.* [2006]

Die Bindungskonstante 2. Ordnung für ATP, K_1k_{+2} , ist für humanes Myosin-7a im Vergleich zu Myosin-7a der Fruchtfliege ≈ 3 fach erniedrigt. Im Kontrast dazu sind die Assoziationskonstanten 2. Ordnung in der Gegenwart von F-Aktin nahezu identisch. *Dm* Myosin-7a hydrolysiert ATP mit $12,6 \pm 0,9 \text{ s}^{-1}$, einer um den Faktor ≈ 2 reduzierten Geschwindigkeit im Vergleich zum humanen Homolog. Für beide Myosine ist die Geschwindigkeitskonstante der Isomerisierung des stark in den schwach aktinbindenden Aktomyosin-ATP-Komplex (k_{+2}) mit Geschwindigkeitskonstanten von $\approx 200 \text{ s}^{-1}$ nahezu identisch.

3.3.3.3 Interaktion zwischen Myosin-7a und ADP

Die Interaktion zwischen ADP und Myosin wurde durch die schnelle Mischung von $0,125 \mu\text{M}$ Myosin-7a mit ansteigenden Konzentrationen an mantADP analysiert. Dabei ist die mantADP-Bindungsreaktion an Myosin durch eine Fluoreszenzerhöhung des ADP-Analogons gekennzeichnet und wird auf der Basis des folgenden Schemas interpretiert.



Die Fluoreszenz des mant-Fluorophors wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt und die Fluoreszenzemission durch einen KV 389-Filter detektiert. Die Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} von der mantADP-Konzentration ist im beobachteten Konzentrationsbereich linear (Abbildung 3.47,B). Die lineare Regression definiert die Bindungskonstante zweiter Ordnung der mantADP-Bindung an Myosin (k_{+D}) zu $0,98 \pm 0,052 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die Ordinate repräsentiert die korrespondierende Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{-D}) und beträgt $0,27 \pm 0,013 \text{s}^{-1}$. Über den Formalismus $k_{-D}/k_{+D} = K_D$ wird die Gleichgewichtskonstante der ADP-Dissoziation zu $0,27 \pm 0,027 \mu\text{M}$ errechnet.

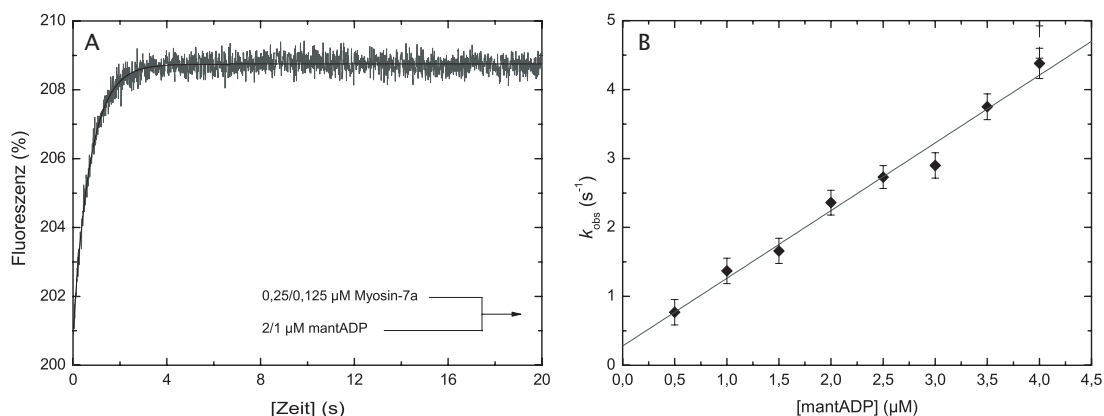


Abbildung 3.47: MantADP-Bindung an Myosin-7a. A: Verlauf des Fluoreszenzsignals bei der schnellen Mischung des Myosins mit mantADP in einer *stopped-flow*-Apparatur. Der Fluoreszenzverlauf wird mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung approximiert und weist eine Amplitude von 7,84 % und eine Geschwindigkeitskonstante von $1,37 \text{s}^{-1}$ auf. B: Lineare Abhängigkeit der ermittelten Ratenkonstanten von der mantADP-Konzentration.

Die ADP-Dissoziation von Myosin-7a wurde durch die Verdrängung von mantADP aus dem Myosin·ADP-Komplex durch einen Überschuss an ATP bestimmt. Zusätzlich wurde k_{-D} durch die Veränderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz bei der ATP-Bindung an Myosin·ADP analysiert. Die Transienten können in beiden Fällen mit einer einfach-exponentiellen Regression beschrieben werden (Abbildung 3.48). Die Dissoziationsratenkonstante k_{-D} beträgt $0,198 \pm 0,002 \text{s}^{-1}$ (mantADP) respektive $0,3 \pm 0,002 \text{s}^{-1}$ (Tryptophan).

Neben der Berechnung der Gleichgewichtskonstante der ADP-Dissoziation, K_D , wurde die Konstante experimentell durch eine Fluoreszenztitration bestimmt. Dafür wurden $0,2 \mu\text{M}$ Myosin mit $0-9 \mu\text{M}$ ADP präinkubiert und schnell mit $100 \mu\text{M}$ ATP in einer *stopped-flow*-Apparatur gemischt. Die Tryptophanfluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 297 nm angeregt und die Fluoreszenzemission durch einen WG 320-Filter verfolgt. In Abwesenheit von ADP werden die Fluoreszenztransienten einfach-exponentiell approximiert; in der Anwesenheit von ADP doppelt-exponentiell.

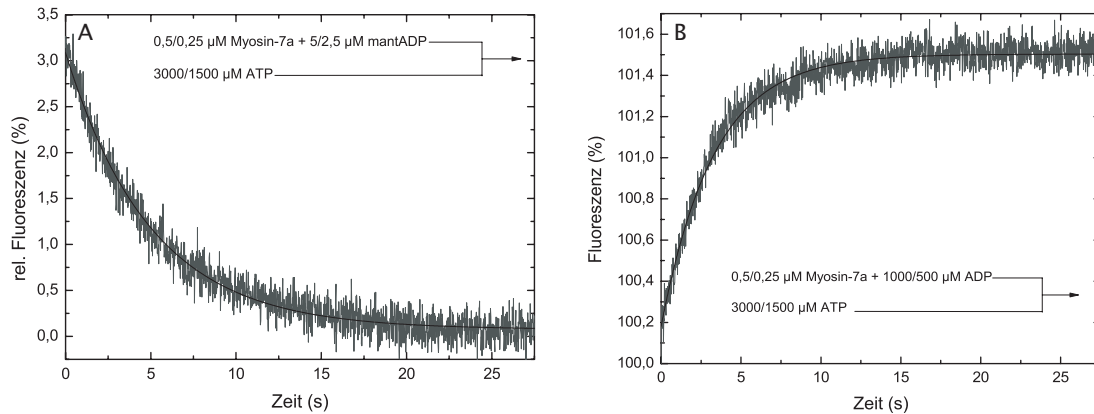


Abbildung 3.48: ADP-Dissoziation von Myosin-7a. A: Verlauf des Fluoreszenzsignals bei der schnellen Mischung des Myosin-mantADP-Komplexes mit einem Überschuss an ATP bei der Anregungswellenlänge von 297 nm. Der Transient kann durch eine Exponentialfunktion erster Ordnung beschrieben werden und weist eine Amplitude von 3% und eine Geschwindigkeitskonstante von $0,198 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$ auf. B: Bestimmung der ADP-Dissoziation von Myosin durch die Veränderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz bei der ATP-Bindung an den Myosin-ADP-Komplex. Der abgebildete Transient kann mono-exponentiell approximiert werden und weist eine Amplitude von 1,3% und eine Geschwindigkeitskonstante von $0,3 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$ auf.

Die Abhängigkeit der relativen Amplitude der langsamen Phase von der ADP-Konzentration weist einen hyperbolen Verlauf auf und ist in Abbildung 3.49 abgebildet. Aus der Regression der Daten wird K_D zu $0,52 \pm 0,09 \mu\text{M}$ bestimmt. Damit sind der experimentell bestimmte und der kalkulierte Wert der ADP-Dissoziationsgleichgewichtskonstante in guter Übereinstimmung. Alle kinetischen Parameter der Interaktion zwischen Myosin-7a und ADP sind in Tabelle 3.15 aufgeführt.

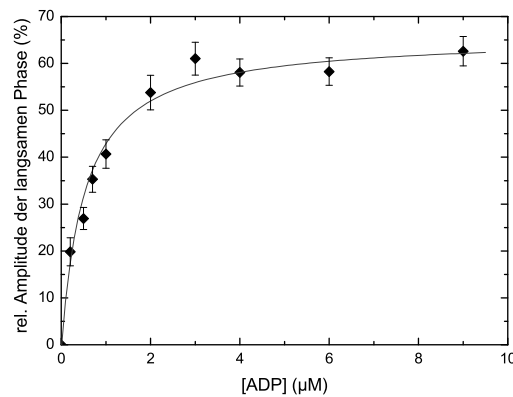


Abbildung 3.49: Bestimmung der Dissoziationsgleichgewichtskonstante K_D von Myosin-7a. Die relative Amplitude der langsamen Phase weist eine hyperbole Abhängigkeit von der ADP-Konzentration auf und definiert K_D zu $0,52 \pm 0,09 \text{ s}^{-1}$.

Aus der tabellarischen Zusammenfassung wird ersichtlich, dass humanes Myosin-7a im Vergleich zu *Dm* Myosin-7a eine ≈ 4 fach reduzierte ADP-Bindungskonstante aufweist, während die ADP-Dissoziation der humanen Isoform um den Faktor $\approx 6 - 11$ reduziert ist. Die Gleichgewichtskonstante der ADP-Dissoziation liegt für beide Myosine in submikromolaren Bereich.

Tabelle 3.15: Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Interaktion zwischen Myosin und ADP

Konstante	Signal	<i>Hs</i> Myosin-7a	<i>Dm</i> Myosin-7a ³
k_{+D} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	mantADP	$0,98 \pm 0,052$	$3,7 \pm 0,1$
k_{-D} (s^{-1})	mantADP ¹	$0,27 \pm 0,013$	$1,8 \pm 0,3$
k_{-D} (s^{-1})	mantADP ²	$0,198 \pm 0,002$	$2,3 \pm 0,1$
k_{-D} (s^{-1})	Tryptophan	$0,3 \pm 0,002$	
K_D (μM)	k_{-D}/k_{+D}	$0,27 \pm 0,027$	$0,62 \pm 0,03$
K_D (μM)	Tryptophan	$0,52 \pm 0,090$	

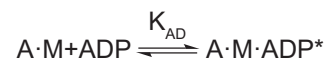
¹ Ordinate der k_{obs} versus mantADP Auftragung

² ATP-*chasing*-Experiment

³ WATANABE *et al.* [2006]

3.3.3.4 Interaktion zwischen Aktomyosin-7a und ADP

Die Interaktion zwischen ADP und dem Aktomyosin-Komplex wurde durch die Reaktion des fluorophoren Nukleotid-Analogons mantADP mit Aktomyosin analysiert. Die mantADP-Bindung an den Aktomyosin-Komplex resultiert in einer Fluoreszenzerhöhung und wird nach folgendem bimolekularen Schema interpretiert.



Die Transienten der schnellen Mischung der Reaktanten folgen bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm einem doppelt-exponentiellen Reaktionsverlauf (Abbildung 3.50,A). Die Abhängigkeit der schnellen und der langsamen Ratenkonstanten *versus* der mantADP-Konzentration ist im beobachteten Konzentrationsbereich linear. Der Ursprung der langsamen Phase wurde nicht näher untersucht und im Folgenden nicht weiter berücksichtigt.

Eine lineare Regression der Messwerte der schnellen Phase definiert die Bindungskonstante 2. Ordnung k_{+AD} der mantADP-Bindung an Aktomyosin zu $1,78 \pm 0,04 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die Ordinate definiert die korrespondierende Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-AD} zu $0,59 \pm 0,26 \text{s}^{-1}$ (Abbildung 3.50,B).

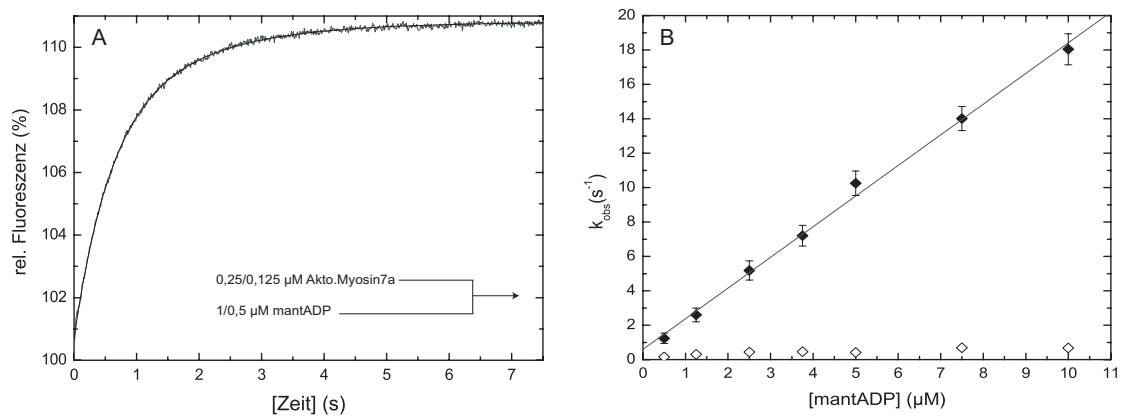


Abbildung 3.50: MantADP-Bindung an Aktomyosin. A: Transient der Bindung von $0,5 \mu\text{M}$ mantADP an $0,125 \mu\text{M}$ Aktomyosin. Der Reaktionsverlauf wird doppelt-exponentiell approximiert. B: Auftragung der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten *versus* der mantADP-Konzentration. Die geschlossenen Rauten repräsentieren die Raten der schnellen Phase während die offenen Rauten die Raten der langsamen Phase kennzeichnen.

Die Dissoziation von ADP aus dem Komplex mit Aktomyosin wurde durch zwei weitere Experimente ermittelt. Die direkte Bestimmung der mantADP-Dissoziation aus dem Aktomyosin-Komplex erfolgt durch einen Überschuss an ATP (Abbildung 3.52,A). In diesem Versuch wurde die intrinsische Proteinfluoreszenz bei einer Wellenlänge von 297 nm angeregt und die Fluoreszenzemission nach FRET durch einen KV 389-Filter zeitabhängig verfolgt. Der detektierte Reaktionsfortgang folgt einem einfach-exponentiellen Verlauf, dessen Geschwindigkeitskonstante $0,32 \pm 0,009 \text{ s}^{-1}$ beträgt und der Geschwindigkeitskonstante der ADP-Dissoziation k_{AD} entspricht.

In einem zweiten Experiment wurde die Änderung des Lichtstreuensignals bei der schnellen Mischung des Aktomyosin-ADP-Komplexes mit einem Überschuss an ATP detektiert (Abbildung 3.51,B). Die Lichtstreuung wurde bei einer Wellenlänge von 320 nm angeregt und die Änderung des Lichtstreuensignals im rechten Winkel zum Anregungslicht detektiert. Der Abfall des Lichtstreuensignals konnte mit einer Exponentialfunktion 1. Ordnung approximiert werden. Die Dissoziationskonstante k_{AD} beträgt in diesem Experiment $0,48 \pm 0,003 \text{ s}^{-1}$. WATANABE *et al.* [2008]² bestimmten für das humane Myosin-7a durch die Verwendung des Lichtstreuensignals die ADP-Dissoziation von Aktomyosin zu einen Wert von $0,56 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$. Dieser korreliert mit den in der vorliegenden Arbeit bestimmten analogen kinetischen Konstanten.

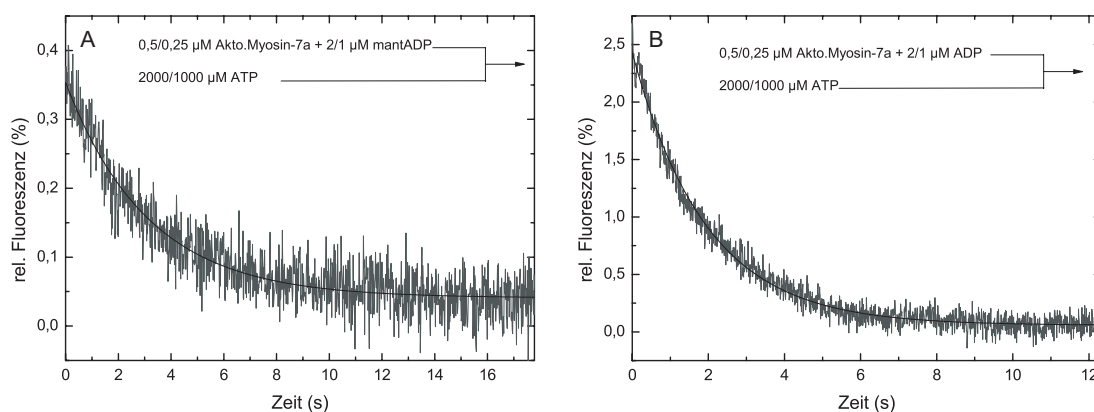


Abbildung 3.51: ADP-Dissoziation von Aktomyosin. A: Dissoziation von mantADP aus dem Aktomyosin-ADP-Komplex durch einen Überschuss an ATP. Der Fluoreszenztransient weist eine Amplitude von -0,3% und eine Geschwindigkeitskonstante von $k_{obs} = 0,32 \pm 0,009 \text{ s}^{-1}$ auf. B: Bestimmung von k_{AD} unter Verwendung des Lichtstreuensignals. Der abgebildete Transient weist eine Amplitude von -2,3% und eine Geschwindigkeitskonstante von $k_{obs} = 0,48 \pm 0,003 \text{ s}^{-1}$ auf.

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss der freien Magnesiumionenkonzentration auf die Dissoziation von mantADP aus dem Aktomyosin-ADP-Komplex untersucht. Der Versuch wurde durchgeführt, in dem $0,125 \mu\text{M}$ Aktomyosin-7a mit $1 \mu\text{M}$ mantADP in Gegenwart variierender MgCl_2 -Konzentrationen präinkubiert und schnell mit 1 mM ATP in einer *stopped-flow*-Apparatur gemischt wurden. Die Konzentration an freien Magnesiumionen wurde durch das Programm MAX-CHELATOR [maxchelator.stanford.edu] berechnet. Für die Kalkulation wurde eine konstante Temperatur von 20°C , ein konstanter pH-Wert von 7,0 sowie eine konstante Ionenstärke von 0,1 definiert. Die Abhängigkeit der Dissoziationsratenkonstante k_{obs} von der freien Magnesiumionenkonzentration ist in Abbildung 3.52 dargestellt. Tabelle 3.16 fasst die kinetischen Konstanten der Interaktion zwischen Aktomyosin und ADP zusammen.

²Reaktionsbedingungen: 20 mM MOPS-KOH pH 7,5, 2 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,2 mg/ml Calmodulin, $T = 25^\circ\text{C}$

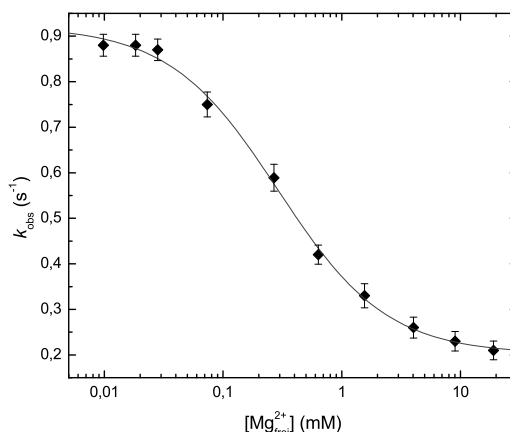


Abbildung 3.52: Abhängigkeit der ADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten von der freien Magnesiumionenkonzentration. Die Dissoziation von mantADP aus dem Aktomyosin-Komplex wird mit zunehmender Konzentration an freien Magnesiumionen verlangsamt. Der K_i -Wert liegt mit $\approx 290 \mu\text{M}$ im physiologischen Bereich freier Magnesiumionenkonzentrationen.

Die Daten folgen einem sigmoidalen Kurvenverlauf; die apparente Inhibierungskonstante $K_i [Mg_{frei}^{2+}]$ liegt mit $291 \pm 28 \mu\text{M}$ im Bereich physiologischer Mg^{2+} -Konzentrationen. Myosin-7a weist im untersuchten Konzentrationsbereich eine maximale ADP-Dissoziationsrate von $0,921 \text{ s}^{-1}$ und eine minimale Dissoziationsrate von $0,2 \text{ s}^{-1}$ auf. Damit beträgt der Faktor der Modulation $\approx 4,6$.

Tabelle 3.16: Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Interaktion zwischen Aktomyosin und ADP

Konstante	Signal	<i>Hs</i> Myosin-7a	<i>Dm</i> Myosin-7a ³
k_{+AD} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	mantADP	$1,78 \pm 0,040$	$4,7 \pm 0,2$
k_{-AD} (s^{-1})	mantADP ¹	$0,59 \pm 0,026$	$2,3 \pm 0,5$
k_{-AD} (s^{-1})	mantADP ²	$0,32 \pm 0,009$	$2,1 \pm 0,5$
k_{-AD} (s^{-1})	Lichtstreuung	$0,48 \pm 0,003$	$1,86 \pm 0,03$
$K_i [Mg_{frei}^{2+}]$ (mM)	mantADP ²	$0,291 \pm 0,028$	
K_{AD} (μM)	k_{-AD}/k_{+AD}	$0,33 \pm 0,022$	$0,4 \pm 0,04$

¹ Ordinate der k_{obs} versus mantADP Auftragung

² ATP-chasing-Experiment

³ WATANABE *et al.* [2006]

Dm Myosin-7a weist im Vergleich zur humanen Isoform eine $\approx 3,5$ fache höhere ADP-Bindungskonstante 2. Ordnung k_{+AD} und eine um den Faktor 4-7 erhöhte Dissoziationskonstante k_{-AD} auf. Die Gleichgewichtskonstante der ADP-Dissoziation liegen für beide Isoformen im submikromolaren Bereich.

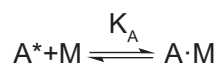
Für das menschliche Klasse-7 Myosin liegt die Geschwindigkeitskonstante der ADP-Dissoziation k_{-AD} mit $0,5 \text{ s}^{-1}$ im Bereich der maximalen ATPase-Aktivität ($k_{cat} = 0,348 \pm 0,025 \text{ s}^{-1}$) und stellt den ratenlimitierenden Schritt des ATPase-Zyklus dar.

Unter Standardversuchsbedingungen lässt sich durch den Vergleich der Ratenkonstanten der ADP-Dissoziation von Aktomyosin·ADP mit der maximalen *steady-state* Umsatzgeschwindigkeit die ungefähre *duty ratio* des Motors berechnen. Humanes Myosin-7a weist unter diesen Versuchsbedingungen einen *duty cycle* von $\approx 0,726$ auf. Im Vergleich zu *Dm* Myosin-7a [WATANABE *et al.* 2006, YANG *et al.* 2006], *Dm* Myosin-7b [YANG *et al.* 2005] sowie *Mm* Myosin-7b [HENN

und CRUZ 2005], die sich durch *duty ratios* zwischen 0,8-0,9 auszeichnen, ist die Zeitdauer der aktungebundenen Zustände der humanen Isoform erniedrigt.

3.3.3.5 Interaktion zwischen Myosin-7a und F-Aktin

Die Interaktion zwischen Myosin und Pyren-Aktin resultiert in einer Erniedrigung der Pyren-Fluoreszenz. Die Reaktion wird nach folgendem Schema interpretiert, wobei A* den stark fluoreszenten Zustand des Pyren-Aktins repräsentiert. Für die transientenkinetischen Studien wurden die Proben mit 0,1 U/ml Apyrase mindestens 15 min bei Raumtemperatur präinkubiert, um die Reaktanten von kontaminierendem Nukleotid zu befreien.



Die Interaktion zwischen Myosin-7a und Pyren-Aktin wurde durch eine Fluoreszenztitration nach der Methode von CRUZ *et al.* [2001] und KAMBARA *et al.* [2006] charakterisiert. Dabei wurde ein konstantes Myosin:Aktin-Verhältnis von 1:5-1:7,5 aufrechterhalten. Abbildung 3.53,A beschreibt die Abhängigkeit der beobachteten Ratenkonstanten k_{obs} von der Pyren-Aktinkonzentration. Über den beobachteten Konzentrationsbereich können die Messwerte durch eine lineare Regression beschrieben werden, deren Steigung die Assoziationskonstante 2. Ordnung der Aktinbindung an Myosin zu $3,167 \pm 0,06 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bestimmt.

Die Dissoziationskonstante k_{-A} wurde in einem separaten Experiment ermittelt, in dem der Pyren-Aktomyosin-Komplex mit einem Überschuss an unmarkiertem F-Aktin schnell in einer *stopped-flow*-Apparatur gemischt wurde. Der Reaktionsverlauf kann mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung approximiert werden und definiert die Geschwindigkeitskonstante der Aktindissoziation k_{-A} (Abbildung 3.53,B). Diese beträgt für das humane Myosin-7a $0,002 \pm 0,00004 \text{s}^{-1}$. Über den Formalismus $k_{-A}/k_{+A} = K_A$ wird die Dissoziationsgleichgewichtskonstante zu $0,63 \pm 0,024 \text{nM}$ berechnet.

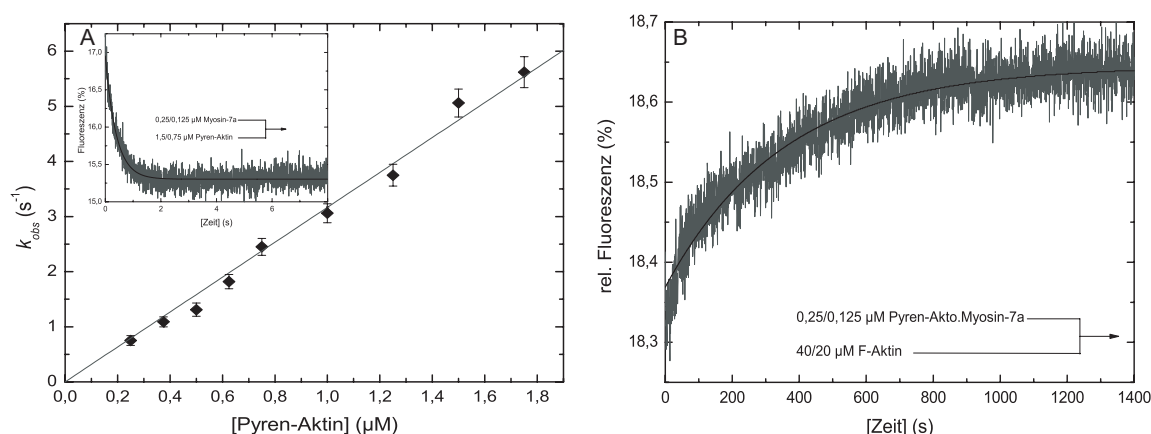
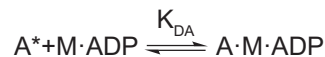


Abbildung 3.53: Interaktion zwischen Myosin und F-Aktin: A: Pyren-Aktinbindung an Myosin-7a. Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) von der Pyren-Aktinkonzentration. Die Messwerte folgen einem linearen Zusammenhang. Die Bindungskonstante 2. Ordnung beträgt $k_{+A} = 3,167 \pm 0,06 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die eingefügte Miniatur zeigt exemplarisch einen Transienten der Reaktion. Dessen Amplitude beträgt 1,7% und die Geschwindigkeitskonstante $2,56 \text{s}^{-1}$. B: Bestimmung von k_{-A} durch die Verdrängung von Pyren-Aktin aus dem Komplex mit Myosin durch einen Überschuss an unmarkiertem F-Aktin. Die Amplitude des Transienten beträgt 0,27% und die beobachtete Geschwindigkeitskonstante $k_{-A} = 0,002 \pm 0,00004 \text{s}^{-1}$.

3.3.3.6 Interaktion zwischen Myosin-7a-ADP und F-Aktin

Die Interaktion des Myosin-ADP-Komplexes mit F-Aktin wurde auf der Basis des folgenden bimolekularen Mechanismus interpretiert. Dabei kennzeichnet A^* den stark fluoreszenten Zustand von Pyren-Aktin.



Wie bereits bei der Analyse der Interaktion zwischen Myosin und Aktin (Abschnitt 3.3.3.5) beschrieben, wurde auch in diesem Versuch ein konstantes Myosin:Aktin-Verhältnis von 1:5 - 1:7,5 aufrechterhalten. Für den Versuch wurden $0,125 \mu\text{M}$ Myosin-7a mit $50 \mu\text{M}$ ADP präinkubiert und der Komplex schnell mit Pyren-Aktin in einer *stopped-flow*-Apparatur gemischt. Die Erniedrigung des Fluoreszenzsignals bei der Bindung von Pyren-Aktin wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt und die Fluoreszenzemission durch einen KV 389-Filter zeitabhängig verfolgt. Die Fluoreszenztransienten folgen einem einfach-exponentiellen Reaktionsverlauf. Abbildung 3.54,A beschreibt die Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von der Pyren-Aktinkonzentration. Die Daten folgen im untersuchten Konzentrationsbereich einem linearen Verlauf. Die lineare Approximation bestimmt die Aktinbindungskonstante 2. Ordnung zu $1,34 \pm 0,033 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Die Dissoziation von Pyren-Aktin und Myosin in der Gegenwart von ADP wurde analysiert, indem die Konkurrenz zwischen Aktomyosin-ADP mit einem 80fachen Überschuss an unmarkiertem F-Aktin transientenkinetisch bestimmt wurde. Bei dieser Reaktion ist die Dissoziation von Pyren-Aktin und Myosin der ratenlimitierende Schritt. In der Gegenwart von ADP folgt der Transient einem einfach-exponentiellen Reaktionsverlauf. Bei der Regression der Messwerte wurden die ersten 10 Sekunden der Reaktion vernachlässigt, da der schnelle Anstieg des Messsignals wahrscheinlich ein Mischartefakt darstellt (Abbildung 3.54,B).

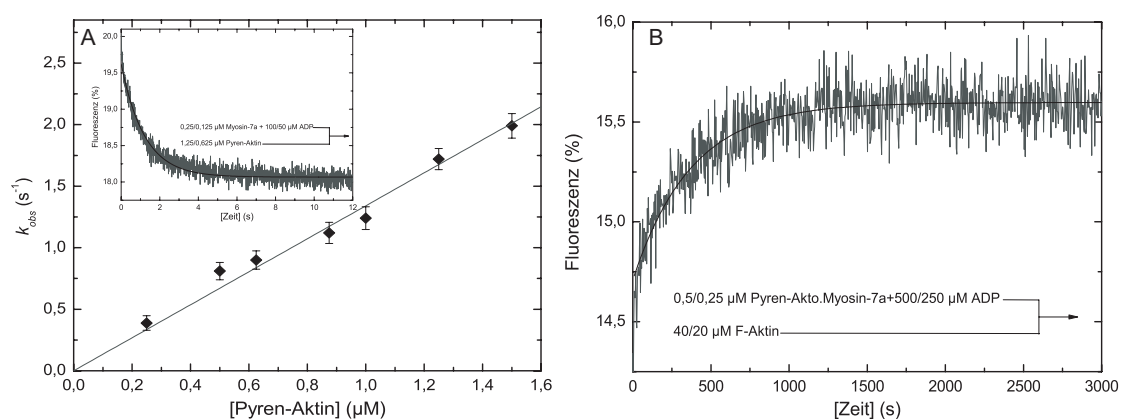


Abbildung 3.54: Interaktion zwischen Myosin und F-Aktin in der Gegenwart von ADP. A: Bestimmung der Bindung von Pyren-Aktin an Myosin-7a in der Gegenwart von ADP. Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) von der Pyren-Aktinkonzentration. Die Messwerte folgen einem linearen Zusammenhang. Die Aktinbindungskonstante 2. Ordnung k_{+DA} beträgt $1,34 \pm 0,033 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Die eingefügte Miniatur zeigt exemplarisch einen Transienten der Reaktion. Dessen Amplitude beträgt $-1,54\%$ und die Geschwindigkeitskonstante $0,82 \text{ s}^{-1}$. B: Bestimmung von k_{-DA} durch die Verdrängung von Pyren-Aktin aus dem Komplex mit Myosin-ADP durch einen Überschuss an unmarkiertem F-Aktin. Die Amplitude des Fluoreszenzsignals beträgt $0,88\%$ und die beobachtete Geschwindigkeitskonstante $k_{obs} = 0,0026 \pm 0,00011 \text{ s}^{-1}$.

Aus den Bindungs- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten kann durch den Formalismus $k_{-DA}/k_{+DA} = K_{DA}$ die Gleichgewichtskonstante der Aktindissoziation kalkuliert werden. Diese beträgt für das humane Myosin-7a $2 \pm 0,131 \text{ nM}$.

Alle kinetischen Parameter der Interaktion zwischen Myosin und F-Aktin in Ab- und Anwesenheit von Nukleotid sind in Tabelle 3.17 zusammengefasst und den korrespondierenden Daten für *Drosophila melanogaster* Myosin-7a gegenübergestellt.

Tabelle 3.17: Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Interaktion zwischen Myosin und Myosin-ADP mit F-Aktin

Konstante	Signal	<i>Hs</i> Myosin-7a ¹	<i>Dm</i> Myosin-7a ²
k_{+A} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Pyren-Aktin	$3,167 \pm 0,060$	$0,88 \pm 0,03$
k_{-A} (s^{-1})	Pyren-Aktin	$0,002 \pm 0,00004$	$< 0,0043$
K_A (nM)	k_{-A}/k_{+A}	$0,63 \pm 0,024$	4,8
k_{+DA} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Pyren-Aktin	$1,34 \pm 0,033$	$0,32 \pm 0,02$
k_{-DA} (s^{-1})	Pyren-Aktin	$0,0026 \pm 0,00011$	$< 0,03$
K_{DA} (nM)	k_{-DA}/k_{+DA}	$2 \pm 0,131$	94

¹ MOPS-Experimentalpuffer mit 10 mM DTT² WATANABE *et al.* [2006]

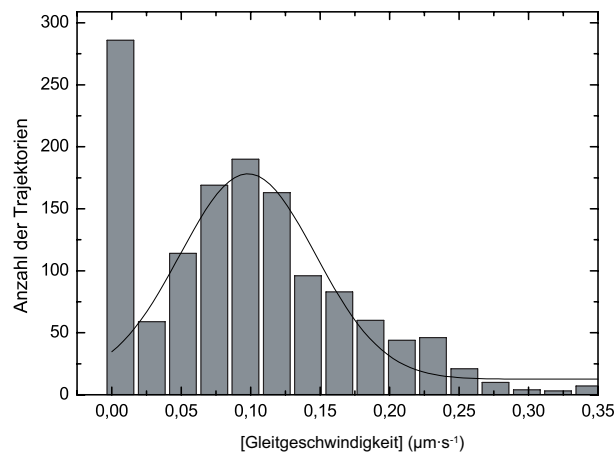
Humanes Myosin-7a weist im Vergleich zu Myosin-7a der Fruchtfliege in An- und Abwesenheit von Nukleotid ≈ 4 fach beschleunigte Aktinbindungsraten auf. Beide Spezies haben in der Abwesenheit von ADP identische Aktindissoziationsgeschwindigkeitskonstanten, während in der Gegenwart von Nukleotid die Aktindissoziation von *Dm* Myosin-7a um den Faktor 10 beschleunigt ist.

Diese Differenzen resultieren in einer ≈ 8 fach erhöhten Aktin-Affinität des humanen Myosins im nukleotidfreien Zustand. Große Differenzen bestehen in den Aktin-Affinitäten in Anwesenheit von saturierenden ADP-Konzentrationen. Im Vergleich zu humanem Myosin-7a ist die Gleichgewichtskonstante der Aktindissoziation von *Dm* Myosin-7a ≈ 50 fach erhöht.

3.3.4 *In vitro* Motilität

Die Fusion der Motordomäne des humanen Myosins-7a mit einem artifiziiellen Hebelarm ermöglicht die Bestimmung der *in vitro*-Bewegungsgeschwindigkeit.

Die Probenvorbereitung für den Gleitassay erfolgte wie unter 2.2.5.4 beschrieben. Die Bestimmung der *in vitro*-Gleitgeschwindigkeit von Aktin-Filamenten über eine mit Myosin dekorierte Nitrozelluloseoberfläche erfolgt bei einer Temperatur von 30 °C in der Gegenwart von 1 mM MgCl₂ im Assay-Puffer. Abbildung 3.55 beschreibt die Geschwindigkeitsverteilung der ermittelten Trajektorien.

Abbildung 3.55: Bestimmung der *in vitro*-Bewegungsgeschwindigkeit des humanen Myosins-7a. Bei einer Temperatur von 30 °C beträgt die mittlere Bewegungsgeschwindigkeit von $97 \pm 3,5 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$.

Das humane Myosin-Fusionsprotein ist funktional kompetent und weist eine mittlere Bewegungsgeschwindigkeit von $97 \pm 3,5 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$ bei einer Halbwertsbreite von $48,8 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$ auf. In der Auswertung werden die statischen Aktin-Filamente, die keine Bewegung aufweisen, nicht berücksichtigt.

WATANABE *et al.* [2008] und UDOVICHENKO *et al.* [2002] beschreiben für humanes sowie murines

Myosin-7a mittlere Bewegungsgeschwindigkeiten von ≈ 2 -190 nm·s⁻¹. Damit liegt die im Rahmen dieser Arbeit experimentell bestimmte Bewegungsgeschwindigkeit im mittleren Spektrum.

3.4 Myosin-Effektoren

Neben physiologischen Regulationsmechanismen der Myosinaktivität durch die Phosphorylierung der schweren und leichten Ketten oder die Modulation der Aktivität durch Schwankungen der freien Magnesiumionenkonzentration besteht die Möglichkeit, die enzymatische Aktivität durch niedermolekulare Effektoren gezielt zu beeinflussen. Ein Fokus funktionaler, regulatorischer und zellbiologischer Studien liegt auf dem Einsatz spezifischer Effektoren der Myosin-Aktivität. Basis dieser Interaktion ist die Frage der molekularen Beziehung einer chemischen Verbindung (Ligand) mit einem Protein (Rezeptor).

Mittels computerbasierter Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit Liganden auf potentiell effektorisches Verhalten gegenüber humanen Myosin-Motordomänen der Klassen-2, -6 und -7 identifiziert und deren Wechselwirkung und Spezifität in *in vitro*-Experimenten überprüft.

Computerchemische Verfahren wurden eingesetzt, um in *docking*-Studien potentielle Interaktionen zwischen den Wechselwirkungspartnern Myosin und einem niedermolekularen Effektor zu charakterisieren. *In silico* können Bindungsregionen und Bindungsmodi der binären Komplexe identifiziert werden. Eine empirische *scoring*-Funktion approximiert die freie Bindungsenthalpie ΔG_{bind}^{frei} und gibt Hinweise zur Energetik der Wechselwirkung.

Für die *docking*-Experimente wurden Homologiemodelle der Motordomänen der humanen nicht-muskulären Myosine-2A, -2B und -2C analog zu Abschnitt 3.1.4 angefertigt. Dabei wurden für NMHC-2A und NMHC-2B die selben *template*-Strukturen wie für NMHC-2C verwendet. Das Homologiemodell des humanen Myosins-7a wurde von Krishna Chinthalapudi (Institut für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt. *Docking*-Studien an Myosin-6 wurden unter Verwendung der publizierten Kristallstruktur von *Ss* Myosin-6 (PDB-Code: 2V26, [MÉNÉTREY *et al.* 2005]) durchgeführt. Die Homologie zwischen der porcinen und der humanen Isoform beträgt $\approx 97\%$ im Bereich der Motordomäne.

In silico-Experimente wurden mit dem Programm AutoDock4.2 [<http://autodock.scripps.edu/>] ausgeführt. Die entsprechenden *input-files* für Liganden und Rezeptoren wurden erstellt und das *screening* automatisiert durchgeführt. Durch das gitterbasierte Verfahren wurden in separaten Experimenten die bekannte PBP-Bindungstasche [FEDOROV *et al.* 2009], die Blebbistatin-Bindungsstelle [ALLINGHAM *et al.* 2005] sowie im *blind docking* das gesamte Protein für die Bindung des Liganden definiert.

Aus einer Wirkstoffbibliothek wurden 26 Verbindungen sowie bereits publizierte Myosin-Effektoren in Homologiemodelle der humanen zytoplasmatischen Myosine-2A, -2B, -2C0 und -7a sowie die Kristallstruktur von *Ss* Myosin-6 *gedockt*. Bei den Verbindungen der Wirkstoffbibliothek handelt es sich um Pseudilin-, Indolphenol- und Carbazol-Derivate (Abbildung 3.56). Die Gruppe der Pseudiline umfasst die Verbindungen Kin70 und PCP, die Carbazole die Liganden Kin79-Kin101. Kin77 stellt das einzige Indolphenol-Derivat dar. Als Referenzen wurden die Myosin-Effektoren BDM, Blebbistatin, BTS, EMD 57033, Prodan, TFP sowie das TFP-Derivat TBP und das kardioprotektive Polyphenol Resveratrol [YOSHIDA *et al.* 2007] verwendet.

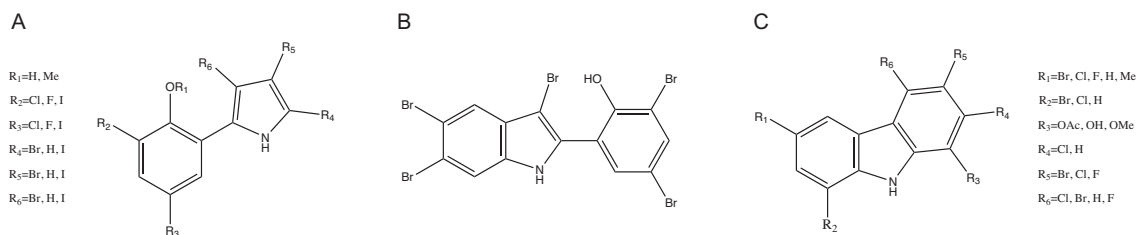


Abbildung 3.56: Allgemeine Strukturformel der Substanzklassen der Pseudiline (A) und der Carbazole (C). B stellt das einzige Indolphenol-Derivat Kin77 dar. R_x repräsentiert einen Substituenten.

Die graphische Analyse der Positionierung der Liganden am Rezeptor sowie der Bindungsmodi erfolgt mit dem Programm PyMOL [<http://www.pymol.org/>]. Tabellen 3.18 und 3.19 stellen die Ergebnisse der *in silico*-Experimente vergleichend zusammen.

Das *blind docking* der Leitsubstanzen an die Rezeptoren weist ein Spektrum der approximierten freien Bindungsenergien ΔG_{bind}^{frei} von $-4,37$ kcal/mol bis $-9,84$ kcal/mol auf. Die approximierten freien Bindungsenergien des *blind dockings* des Inhibitors BDM weisen auf eine schwache Wechselwirkung der niedermolekularen Verbindung mit den Rezeptor-Strukturen hin und stellen die untere Grenze des Spektrums freier Bindungsenergien dar. Die obere Grenze wird durch die Verbindung Kin77 gebildet, die mit sehr starker Affinität mit allen Myosinen *in silico* wechselwirkt. Bei der visuellen Analyse der *docking*-Ergebnisse fällt auf, dass Kin77 bevorzugt im Spalt zwischen der oberen und unteren 50 kDa-Domäne, in räumlicher Nähe zur Blebbistatin-Bindungsstelle lokalisiert. Weitere Bindungsloki wurden proximal der Nukleotidbindungstasche und des Konverters identifiziert. Exemplarisch ist das Ergebnis des globalen *dockings* der Verbindung Kin77 an nichtmuskuläres Myosin-2A in Abbildung 3.57 dargestellt.

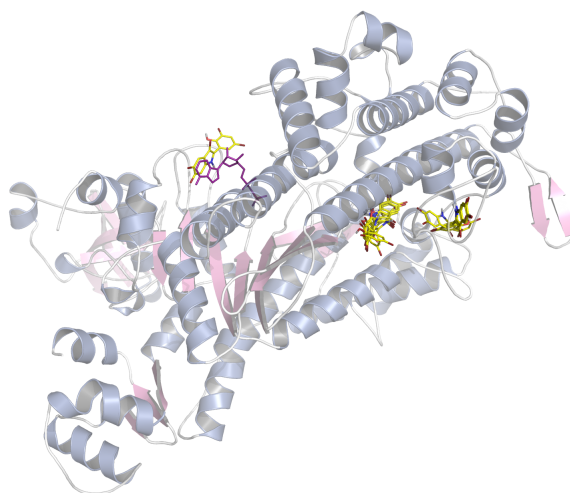


Abbildung 3.57: Übersicht der Bindungsmodi- und -loki des Liganden Kin77 (gelb) an den Rezeptor nichtmuskuläres Myosin-2A. Der natürliche Ligand ADP ist in magenta dargestellt. Für das zytoplasmatische Myosin-2A bindet Kin77 bevorzugt in der Aktin-Bindungsspalte sowie der Nukleotidbindungstasche. Die approximierten freien Bindungsenergien ΔG_{bind}^{frei} liegen zwischen $-7,84$ kcal/mol und $-9,70$ kcal/mol.

Die Wechselwirkung eines Liganden mit dem aktiven Zentrum des Myosins ist unwahrscheinlich. Eine präferierte Bindungsstelle der Verbindung Kin77, einem Indolphenol-Derivat, ist auf Grund seiner chemischen Eigenschaften in die beschriebene PBP-Bindungstasche wahrscheinlich. Lokale *docking*-Experimente in die PBP-Bindungsstelle unterstützen diese Vermutung und weisen

erniedrigte Bindungsenergien auf (Tabelle 3.19).

Blind docking des Liganden EMD 57033 an die *target*-Strukturen weist ebenfalls eine bevorzugte Bindung in räumlicher Nähe der beschriebenen Blebbistatin-Bindungsstelle auf (Abbildung 3.59). Im Modell des humanen Myosins-7a bindet der Inhibitor zudem in der Nukleotidbindungsstelle, im Modell des NMHC-2Bs in räumlicher Nähe des Konverters.

Für den Inhibitor Blebbistatin wurde im *blind docking* die Lokalisation für alle Myosine im Bereich der Aktin-Bindungsspalte sowie der Nukleotidbindungstasche identifiziert. Gezieltes *docking* des Liganden Blebbistatin in die publizierte Bindungsstelle liefern im Vergleich zum *blind docking* leicht erniedrigte Bindungsenergien. Die Konformationsanalyse weist einen alternativen Bindungsmodus im Vergleich zur publizierten Kristallstruktur auf (Abbildung 3.18).

Docking aller Liganden in die publizierte PBP-Bindungstasche aller Rezeptoren resultiert für die Pseudilin-Derivate Kin70 und PCP sowie die meisten Carbazole in verringerten Bindungsenergien. Dies korreliert mit der Vermutung, dass die Derivate der Leitsubstanz PBP sowie Carbazole bevorzugt in der beschriebenen Bindungstasche lokalisiert sind. Eine Ausnahme stellt der Rezeptor Myosin-7a dar, bei dem das lokale *docking* der Pseudilin- und Carbazol-Derivate in die PBP-Bindungstasche *in silico* für die meisten Liganden mit einer Affinitätsniedrigung verbunden ist. Dies deutet auf eine lokale, myosinspezifische Differenz der Bindungstasche hin. Insgesamt spreizen lokale *docking*-Studien in die PBP-Bindungstasche die Skala der approximierten freien Bindungsenergien von -4,47 kcal/mol auf -10,85 kcal/mol auf.

Auf der Basis der *docking*-Experimente wurden ausgewählte Substanzen exemplarisch *in vitro* in funktionalen Experimenten zur Analyse ihrer effektorischen Potenz auf die Aktin-aktivierte *steady-state* ATPase-Aktivität von humanen Myosin-Motordomänen getestet.

In den ATPase-Assays wurde Myosin im Konzentrationsbereich zwischen 200 und 600 nM eingesetzt; die Inhibitorkonzentration wurde zwischen 0,2 und 150 μM variiert. Effektoren sind in hohen Konzentrationen in 90% DMSO löslich: Um Interferenzen sowie den Einfluss des Lösungsmittels auf die Messungen der enzymatischen Aktivität zu minimieren und die Daten vergleichbar zu machen, wurden alle Ansätze mit 5% DMSO supplementiert. Die Inkubation mit dem Effektor erfolgt über einen Zeitraum von 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde nach der Inkubation durch die Zugabe von ATP initiiert und über einen Zeitraum von maximal 55 Minuten bei einer Temperatur von 25 °C detektiert. Die F-Aktinkonzentration betrug konstant 30 μM , als Puffer wurde ATPase-Puffer ohne KCl verwendet.

Blebbistatin, ein bekannter Myosin-2 Inhibitor [STRAIGHT *et al.* 2003] hat einen inhibitorischen Effekt auf das humane nichtmuskuläre Myosin-2C: Mit einem IC_{50} -Wert von $2 \pm 0,287 \mu\text{M}$ wird die Geschwindigkeit des Myosins um den Faktor 8 reduziert (Abbildung 3.58). Im Vergleich zum beschriebenen inhibitorischen Effekt auf die nichtmuskulären Myosine-2A und -2B ($\text{IC}_{50} = 5,1 \mu\text{M}$ respektive 1,8 μM) weist das zytoplasmatische Myosin-2C analoges Verhalten auf [ALLINGHAM *et al.* 2005]. Glattmuskuläres Myosin-2 ($\text{IC}_{50} = 79,9 \mu\text{M}$) wird durch Blebbistatin im Vergleich zu anderen Klasse-2 Myosinen bei erhöhten Effektorkonzentrationen inhibiert. Die größte inhibitorische Potenz weist Blebbistatin mit einem IC_{50} -Wert von 0,5 μM für skelettmuskuläres Myosin-2 auf [ALLINGHAM *et al.* 2005]. Niedrige Affinitäten weist der Inhibitor für Myosine der Klassen-1, -5 und -10 ($\text{IC}_{50} > 150 \mu\text{M}$) auf [ALLINGHAM *et al.* 2005].

EMD 57033 zeichnet sich in den *docking*-Studien durch eine sehr starke Affinität zu den selektierten Rezeptoren auf. Der Effekt von EMD 57033 wurde exemplarisch auf humanes nichtmuskuläres Myosin-2C0 sowie Myosin-6 (Abbildung 3.59) getestet. Dabei aktiviert die Substanz die *steady state* ATPase-Aktivität um den Faktor 1,6-2. Der AC_{50} -Wert liegt bei $99,33 \pm 18,51 \mu\text{M}$ respektive $20,15 \pm 3,15 \mu\text{M}$. Damit korreliert die kalkulierte Bindungsaffinität nicht mit dem Ausmaß des modulatorischen Effektes.

Für Kin70, Kin77 sowie die Verbindungen Resveratrol und TFP konnten im untersuchten Konzentrationsbereich *in vitro* kein signifikanter Einfluss auf die Aktin-aktivierte ATPase-Affinität humaner Myosin-Motordomänen bestimmt werden. Im Falle des TFP korreliert dies mit der Ver-

mutung, dass der Inhibitor als Calcium-Antagonist an die leichte Kette Calmodulin bindet [PATEL *et al.* 2000]. Im Kontrast zu Studien von PATEL *et al.* [2000] publizierten SELLERS *et al.* [2003], dass TFP ein Myosin-5 HMM-Konstrukt, dem die Bindungsstellen für Calmodulin fehlt, in dem selben Maße inhibiert wird wie ein analoges Konstrukt mit gebundenem Calmodulin. Daher wird ein Effekt von TFP auf die Motordomäne von Myosin-5 diskutiert.

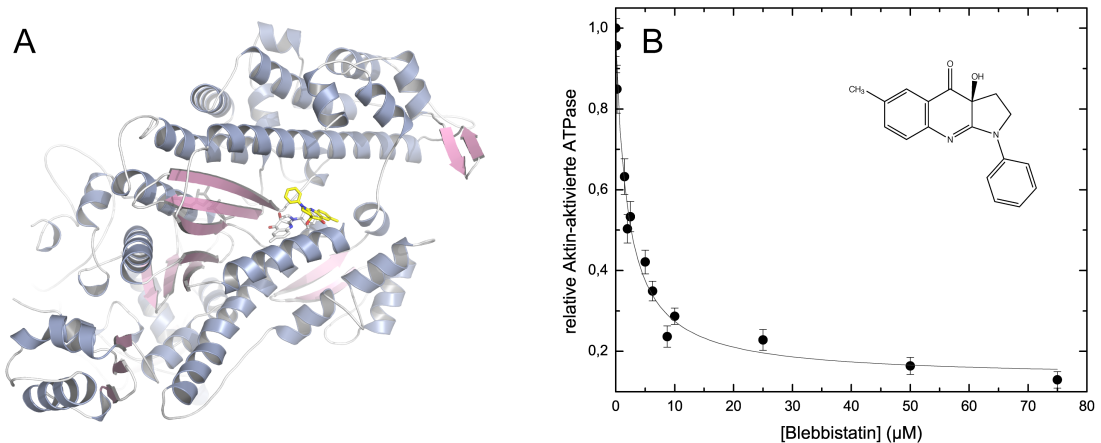


Abbildung 3.58: Inhibition des nichtmuskulären Myosins-2C0 durch Blebbistatin. A: *Docking* des Blebbistatins in die von STRAIGHT *et al.* [2003] publizierte Blebbistatin-Bindungsstelle des nichtmuskulären Myosins-2C0. Die Referenz (PDB-Code 1YV3) ist in weiß, das *docking*-Ergebnis in gelb dargestellt. B: Einfluss von Blebbistatin auf die *steady-state* Aktin-aktivierte ATPase-Aktivität des zytoplasmatischen Myosins-2C0. Die ATPase-Aktivität des Myosins wird durch Blebbistatin um den Faktor 8 reduziert. Der IC₅₀-Wert beträgt $2 \pm 0,287 \mu\text{M}$.

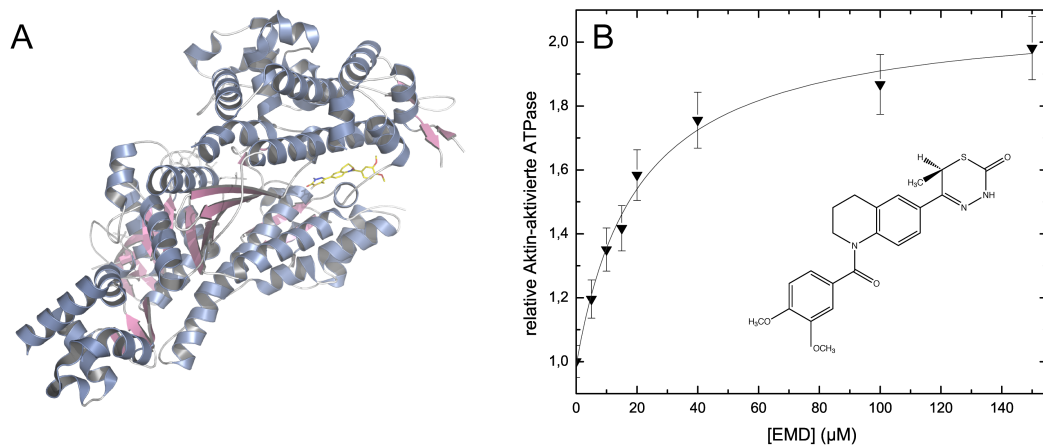


Abbildung 3.59: Interaktion zwischen Myosin-6 und EMD 57033. A: *Blind docking* des Liganden EMD 57033 an *Ss* Myosin-6. Der Ligand bindet in räumlicher Nähe der Blebbistatin-Bindungstasche und ist in gelb dargestellt. B: Einfluss von EMD 57033 auf die *steady-state* Aktin-aktivierte ATPase-Aktivität des humanen Myosins-6. Die ATPase-Aktivität des Myosins wird durch EMD 57033 leicht erhöht. Der IC₅₀-Wert beträgt $20,15 \pm 3,15 \mu\text{M}$.

Tabelle 3.18: Approximierte freie Bindungsenergien des *blind dockings* von Liganden an Myosin-Motordomänen

Ligand	ΔG_{bind}^{frei} [kcal/mol] ¹				
	<i>Hs</i> NMHC-2A ²	<i>Hs</i> NMHC-2B ²	<i>Hs</i> NMHC-2C0 ²	<i>Ss</i> Myosin-6 ³	<i>Hs</i> Myosin-7a ²
BDM	-4,37	-5,50	-5,31	-5,08	-4,39
Blebbistatin	-8,55	-7,82	-7,48	-8,26	-7,82
BTS	-6,91	-6,03	-6,79	-7,45	-6,33
EMD 57033	-9,20	-7,69	-7,78	-7,87	-8,74
Kin70	-7,93	-7,17	-7,00	-7,54	-7,15
Kin77	-9,70	-8,15	-8,39	-9,84	-8,71
Kin79	-8,07	-7,38	-7,36	-7,83	-6,83
Kin80	-8,81	-8,16	-8,01	-8,32	-7,85
Kin81	-8,24	-7,35	-7,47	-8,06	-7,27
Kin82	-6,55	-5,75	-5,76	-6,15	-6,36
Kin83	-6,90	-6,25	-6,51	-6,16	-6,11
Kin84	-6,73	-6,40	-6,49	-6,73	-7,15
Kin85	-8,23	-7,76	-7,30	-8,14	-7,43
Kin86	-7,68	-7,53	-7,61	-8,33	-7,73
Kin87	-8,19	-7,91	-7,32	-8,48	-7,86
Kin88	-6,85	-6,36	-6,00	-6,21	-6,38
Kin89	-6,95	-6,45	-6,57	-6,22	-6,21
Kin90	-6,59	-6,31	-6,18	-6,12	-6,52
Kin91	-6,83	-6,09	-5,86	-6,14	-5,87
Kin92	-6,42	-6,25	-5,82	-6,06	-6,13
Kin93	-6,77	-6,04	-5,88	-5,97	-6,26
Kin94	-7,87	-7,84	-7,29	-7,99	-7,46
Kin95	-7,81	-7,52	-7,34	-7,59	-7,30
Kin96	-7,62	-6,88	-7,06	-7,57	-6,91
Kin97	-7,86	-7,09	-6,84	-7,39	-7,68
Kin98	-7,80	-7,19	-7,40	-7,66	-6,97
Kin99	-8,05	-7,14	-7,44	-7,90	-7,35
Kin100	-7,83	-7,24	-7,17	-7,79	-7,19
Kin101	-7,70	-7,23	-7,00	-7,82	-7,25
PCP	-7,32	-6,85	-6,58	-7,44	-7,04
Prodan	-6,48	-6,03	-7,05	-6,56	-6,09
Resveratrol	-6,99	-7,86	-8,02	-6,58	-6,76
TBP	-6,20	-5,80	-5,55	-6,12	-6,07
TFP	-7,05	-6,13	-6,37	-6,89	-6,36

¹ approximierte freie Bindungsenergie der besten Konformation ermittelt durch *blind docking*² Homologiemodelle³ PDP-Code 2V26, MÉNÉTREY *et al.* [2005]

Tabelle 3.19: Approximierte freie Bindungsenergien des lokalen *dockings* von Liganden in die BPB-Bindungstasche sowie Blebbistatin in die Blebbistatin-Bindungsstelle von Myosin-Motordomänen

Ligand	ΔG_{bind}^{frei} [kcal/mol] ¹				
	<i>Hs</i> NMHC-2A ²	<i>Hs</i> NMHC-2B ²	<i>Hs</i> NMHC-2C0 ²	<i>Ss</i> Myosin-6 ³	<i>Hs</i> Myosin-7a ²
BDM	-4,57	-4,86	-4,70	-4,61	-4,47
Blebbistatin	-9,04	-8,80	-7,84	-8,86	-7,60
Blebbistatin ⁴	-8,83	-8,42	-7,73	-8,87	-8,62
BTS	-7,42	-7,76	-6,94	-7,79	-7,13
EMD 57033	-10,85	-9,69	-10,28	-9,70	-8,39
Kin70	-8,36	-8,19	-7,88	-8,49	-7,39
Kin77	-10,65	-9,77	-9,66	-10,46	-8,98
Kin79	-8,81	-8,52	-8,23	-8,51	-6,85
Kin80	-9,21	-9,31	-8,49	-9,18	-6,80
Kin81	-8,95	-8,69	-8,04	-8,62	-6,77
Kin82	-6,85	-6,95	-6,64	-6,38	-6,14
Kin83	-6,95	-6,65	-6,51	-6,71	-6,45
Kin84	-7,48	-7,35	-7,24	-7,00	-6,54
Kin85	-9,06	-8,52	-8,19	-8,92	-6,51
Kin86	-9,00	-8,77	-8,64	-8,96	-7,42
Kin87	-9,40	-9,11	-8,67	-9,25	-7,37
Kin88	-6,82	-6,91	-7,04	-7,13	-6,26
Kin89	-6,91	-6,97	-6,70	-6,79	-6,46
Kin90	-6,73	-6,85	-6,84	-6,97	-6,00
Kin91	-6,80	-6,99	-6,57	-6,72	-6,24
Kin92	-6,86	-6,89	-6,37	-6,35	-5,99
Kin93	-6,98	-6,59	-6,46	-6,60	-6,02
Kin94	-8,46	-8,88	-7,91	-8,34	-6,65
Kin95	-8,54	-8,58	-8,57	-8,38	-7,11
Kin96	-8,32	-8,34	-7,64	-8,03	-7,41
Kin97	-8,44	-7,98	-7,89	-8,08	-7,76
Kin98	-8,64	-8,10	-7,96	-8,43	-6,64
Kin99	-8,84	-8,11	-8,25	-8,50	-7,31
Kin100	-8,80	-8,37	-7,61	-8,34	-6,57
Kin101	-8,59	-8,38	-7,85	-8,30	-6,85
PCP	-8,06	-7,43	-7,59	-8,17	-6,59
Prodan	-7,39	-7,76	-6,19	-7,29	-5,88
Resveratrol	-7,52	-7,18	-6,93	-7,73	-7,03
TBP	-6,24	-6,17	-6,14	-6,36	-5,50
TFP	-8,47	-7,63	-7,60	-8,88	-7,18

¹ approximierte freie Bindungsenergie der besten Konformation ermittelt durch lokales *docking* in die BPB-Bindungstasche [FEDOROV *et al.* 2009]

² Homologiemodelle

³ PDP-Code 2V26, MÉNÉTREY *et al.* [2005]

⁴ lokales *docking* in die publizierte Blebbistatin-Bindungstasche [ALLINGHAM *et al.* 2005]

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Nichtmuskuläres Myosin-2C

Strukturelle und enzymatische Eigenschaften werden als charakteristisch für Myosine der Klasse-2 angenommen: diese beinhalten die Fähigkeit zur Ausbildung von dicken Filamenten, in denen unabhängige Motordomänen unabhängig voneinander arbeiten können, eine ratenlimitierende Phosphat-Dissoziation und eine niedrige *duty ratio*. Für Myosine aus kontraktile Geweben wie der Muskulatur sind diese Eigenschaften essentiell und gewährleisten, dass individuelle Motoren eines dicken Filaments nur einen kurzen Zeitraum zur Krafterzeugung in den kraftgenerierenden Zuständen verbringen und bei der andauernden Kontraktion nicht miteinander interferieren [ROSENFELD *et al.* 2003].

Nichtmuskuläre Myosine der Klasse-2 sind in zelluläre Prozesse, die Kraft und Translokation erfordern involviert: Beispiele sind die Erhaltung der Zellmorphologie sowie der kortikalen Spannung und die Zytokinese [CONTI und ADELSTEIN 2008, VICENTE-MANZANARES *et al.* 2009]. Detaillierte kinetische Untersuchungen der nichtmuskulären Myosine-2A und -2B liegen bereits vor [KOVÁCS *et al.* 2003, ROSENFELD *et al.* 2003, WANG *et al.* 2003]; die kinetischen und funktionalen Eigenschaften von NMHC-2C sind weitgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die kinetischen Eigenschaften aller bekannten Isoformen des humanen nichtmuskulären Myosins-2C analysiert. Die kinetische Untersuchung sollte dazu beitragen, den Einfluss der variablen Oberflächenschleifen des Motors mit dessen kinetischen Eigenschaften in Relation zu setzen und die spezifischen Attribute der Isoformen des bisher wenig charakterisierten Motors zu studieren.

Für die kinetische und funktionale Analyse wurden die Motordomänen aller Isoformen des humanen nichtmuskulären Myosins-2C fusioniert mit einem künstlichen Hebelarm kloniert, heterolog mit dem Baculovirus/*Sf9*-Expressionssystem produziert und ein Protokoll für die homogene Darstellung etabliert. Die Ergebnisse der transientenkinetischen Analyse sind in Tabelle 4.1 präsentiert.

***Steady-state* ATPase-Aktivität**

Die basale *steady-state* ATPase-Aktivität der Isoformen NMHC-2C1 und -2C2 des zytoplasmatischen Myosins-2C ist um 25 % gegenüber NMHC-2C0 erhöht. In der Anwesenheit von Aktin weisen NMHC-2C0 und -2C1 identische Maximalgeschwindigkeiten k_{cat} ¹ auf, während die Aktivität von NMHC-2C2 mit $\approx 0,4 s^{-1}$ verdoppelt ist. Die Kopplungseffizienz k_{cat}/K_{app} der Isoform-2C2 ist im Vergleich zu den anderen Transkriptvarianten um den Faktor 2 erhöht. Dies deutet auf eine effektive Kopplung zwischen der Nukleotid- und der Aktinbindungsregion in Isoform NMHC-2C2 hin. K_{app} , die apparente Gleichgewichtskonstante K_M für Aktin, beträgt für alle Isoformen $> 140 \mu M$.

¹bei einer F-Aktinkonzentration von $140 \mu M$

Die experimentell bestimmten kinetischen Konstanten der *steady-state* Kinetik sind in guter Übereinstimmung mit den korrespondierenden kinetischen Parametern des murinen NMHC-2Cs. Die murinen Konstrukte weisen nach der Phosphorylierung der leichten Kette *steady-state* ATPase-Aktivitäten von $0,16 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$, $0,21 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ bzw. $0,26 \pm 0,06 \text{ s}^{-1}$ auf [JANA *et al.* 2009]. Im murinen und im humanen NMHC-2C2 führt eine expandierte Schleife-2 zu einer Erhöhung der maximalen *steady-state* ATPase-Aktivität. Ein Einfluss von Schleife-2 auf K_M konnte nicht beobachtet werden.

Studien von PATO *et al.* [1996] konnten für NMHC-2B0 und NMHC-2B1 moderate Änderungen der *steady-state* ATPase-Aktivität in Abhängigkeit von der Länge der Oberflächenschleife-1 detektieren und spekulieren über alternative funktionale Konsequenzen des Inserts als die Modulation der *steady-state* ATPase-Aktivität und der *in vitro*-Motilität. In Analogie stehen Analysen von BOBKOV *et al.* [1996], die ebenfalls keinen Einfluss von Schleife-1 auf K_M und k_{cat} der Aktin-aktivierten ATPase-Aktivität von *Oc* HMM beobachten konnten und damit im Kontrast zu Studien an nativen und chimären glattmuskulären Myosin [ROVNER *et al.* 1997, SWEENEY *et al.* 1998].

Transientenkinetische Analyse

Die transientenkinetische Analyse der Isoformen des humanen nichtmuskulären Myosins-2C deutet auf eine Modulation der ATP-Kinetik durch die expandierten Oberflächenschleifen-1 und -2 hin. Die ATP-Bindungskonstante 2. Ordnung $K_1 k_{+2}$ wird durch die 8 Aminosäuren Extension in Schleife-1 verdoppelt und durch eine expandierte Schleife-2 Region zusätzlich beschleunigt.

Die Hydrolysegeschwindigkeit $k_{+3} + k_{-3}$ sinkt leicht mit der Anzahl an Insertionen in der schweren Kette des humanen nichtmuskulären Myosins-2C in der Reihenfolge NMHC-2C0 > NMHC-2C1 > NMHC-2C2 von $\approx 35 \text{ s}^{-1}$ auf 25 s^{-1} . In dieser Reihenfolge fällt auch $1/K_1$ von $\approx 75 \mu\text{M}$ auf $16 \mu\text{M}$. Der Einfluss von Schleife-1 auf die ATP-Kinetik wurde bereits von SWEENEY *et al.* [1998] beschrieben: In Analogie zu Studien an chimärem glattmuskulärem Myosin sinkt die apparente Dissoziationskonstante in der Anwesenheit einer expandierten Schleife-1 Region. Im Kontrast zu dieser Studie weist nichtmuskuläres Myosin-2C eine Verlangsamung der Hydrolysegeschwindigkeit in Abhängigkeit von expandierten Schleife-1 und Schleife-2 Regionen auf.

In der Anwesenheit von F-Aktin sinkt $K_1 k_{+2}$ in der Reihenfolge NMHC-2C0 > NMHC-2C1 > NMHC-2C2. Die Parameter k_{+2} und $1/K_1$ sind für die *splice*-Varianten des zytoplasmatischen Myosins-2C konstant.

Eine expandierte Schleife-1 der Isoformen-2C1 und -2C2 resultiert in einer leichten Erhöhung der ADP-Bindungskonstante und einer beschleunigten ADP-Dissoziation. Die ADP-Dissoziation von NMHC-2C2 ist durch eine verlängerte Schleife-2 zusätzlich beschleunigt. Die Dissoziationskinetik von NMHC-2C1 und -2C2 ist um den Faktor 3,6 respektive 6,5 im Vergleich zu NMHC-2C0 erhöht. Die Modulation der ADP-Bindungs- und Dissoziationskinetik resultiert in starken Veränderungen der Dissoziationsgleichgewichtskonstanten: Die größten Unterschiede werden zwischen den Isoformen-2C0 und -2C2 beobachtet. NMHC-2C2 weist eine 5fach erhöhte Gleichgewichtskonstante der ADP-Dissoziation (K_D) auf; NMHC-2C1 zeigt intermittierendes Verhalten. In der Anwesenheit von F-Aktin wird die Diskrepanz zwischen -2C0 und -2C2 verstärkt und resultiert in einer ≈ 7 fachen Erhöhung von K_{AD} . NMHC-2C1 zeigt wiederum intermittierendes Verhalten.

In Anwesenheit von F-Aktin sind die ADP-Bindungsraten der drei Isoformen konstant ($k_{+AD} \approx 3 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), während die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten der Transkriptvarianten-2C1 und -2C2 im Vergleich zu -2C0 ≈ 7 fach beschleunigt sind. Eine expandierte Schleife-2 Region hat keinen Einfluss auf die ADP-Dissoziationskinetik von Aktomyosin. Determinante der ADP-Dissoziationskinetik von Aktomyosin ist Schleife-1.

F-Aktin aktiviert mit einem Faktor der kinetischen Kopplung von 1,7-3 die ADP-Dissoziation nicht effektiv. Die thermodynamische Kopplung K_{AD}/K_D ist für alle drei Isoformen < 1 und damit sehr schwach. Nach der Definition von NYITRAI und GEEVES [2004] fallen alle Isoformen des humanen nichtmuskulären Myosins-2C mit einer kinetischen Kopplung < 5 in die Kategorie der Spannungssensoren, die sich durch eine schwache thermodynamische Kopplung zwischen den Affinitäten zu ADP und F-Aktin auszeichnen.

Durch den Vergleich der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{AD}) mit der maximalen Umsatzgeschwindigkeit des zytoplasmatischen Myosins-2C kann gefolgert werden, dass die ADP-Dissoziation von Aktomyosin nicht den ratenlimitierenden Schritt des ATPase-Zyklus darstellt.

Der Vergleich der kinetischen Kopplung des nichtmuskulären Myosins-2C mit den korrespondierenden Konstanten der zytoplasmatischen Myosine-2A und -2B deutet darauf hin, dass NMHC-2C sich komparabel zu NMHC-2A verhält. Nichtmuskuläres Myosin-2A ist durch eine 2,8fache Aktivierung der ADP-Dissoziation durch F-Aktin gekennzeichnet und weist mit $\approx 0,1$ einen kurzen *duty cycle* auf [KOVÁCS *et al.* 2003]. NMHC-2A weist im Vergleich zu NMHC-2B im zellulären Kontext dynamische Eigenschaften auf: NMHC-2B ist durch eine hohe *duty ratio* ($0,82 \pm 0,16$) sowie eine ADP-Dissoziation von Aktomyosin gekennzeichnet, die nicht durch F-Aktin beschleunigt wird [ROSENFELD *et al.* 2003]. Die kinetischen Eigenschaften des NMHC-2Bs deuten auf eine zelluläre Funktion bei Prozessen der Spannungsgenerierung und -aufrechterhaltung hin [EL-MEZGUELDI und BAGSHAW 2008].

In Analogie zu glattmuskulärem Myosin-2 sowie nichtmuskulärem Myosin-2B weisen die Isoformen des humanen nichtmuskulären Myosins-2C1 und -2C2 expandierte Schleife-1 Regionen auf. Im Vergleich zu NMHC-2C0 verlängern 8 Aminosäuren die Oberflächenschleife-1. Phasisches glattmuskuläres Myosin-2 ist durch eine Insertion von 7 Aminosäuren in der Schleife-1 Region gekennzeichnet, während das tonische Korrespondant diese Insertion nicht aufweist [ROVNER *et al.* 1997]. Die Insertion resultiert für glattmuskuläres Myosin in einer erhöhten enzymatischen Aktivität und *in vitro*-Motilität und korreliert mit einer modulierten ADP-Dissoziationseigenschaften und einer beschleunigten *shortening velocity* des phasischen im Vergleich zur tonischen Muskulatur. Mechanische Studien beschreiben, dass die expandierten Schleife-1 in phasischem Muskelmyosin keine Auswirkungen auf die *step size* sowie die isometrische Kraftentwicklung des Myosins hat, während die Lebensdauer der aktinbindenden Zustände verlängert sind. Die verlängerte Lebensdauer der stark aktinbindenden Zustände wird durch eine verlangsamte ADP-Dissoziation sowie eine reduzierten ATP-Bindungskonstante verursacht [LAUZON *et al.* 1998].

In Analogie stehen Experimente an chimären Myosinen von SWEENEY *et al.* [1998], die ebenfalls eine modulierte ADP-Dissoziationskinetik, *in vitro*-Motilität und ATPase-Aktivität in Abhängigkeit von Schleife-1 aufweisen. SWEENEY *et al.* [1998] schlagen ein Modell vor, in dem die ADP-Freisetzung durch die Flexibilität der Schleife-1 determiniert wird und die Oberflächenschleife das Öffnen der Nukleotidbindungstasche moduliert, wenn ADP gebunden ist. Kürzere Schleife-1-Regionen würden nach dieser Hypothese den Zugang zur Nukleotidbindungstasche behindern und die ADP-Bindung fördern [SWEENEY *et al.* 1998].

Die Aktin-Kinetik der Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C ist durch die Anwesenheit der expandierten Schleife-2 Region des NMHC-2C2 beeinflusst. Während NMHC-2C0 und -2C1 identische Aktinbindungskonstanten in der An- und Abwesenheit von ADP aufweisen, sind die korrespondierenden Konstanten von Isoform-2C2 erhöht. Dieses Attribut ist der veränderten Wechselwirkung zwischen der expandierten Schleife-2 Region und F-Aktin zuzuschreiben. Die Aktinbindung an Myosin erfolgt nach einem Prozess, der sich aus drei Schritten zusammensetzt [GEEVES und CONIBEAR 1995]. Dabei ist die Ausbildung des Kollisionskomplexes zwischen Myosin und F-Aktin durch elektrostatische Wechselwirkungen gekennzeichnet. Spekulativ kann auf der Basis der erstellten Homologiemodelle gefolgert werden, dass die diffuse Ladungsverteilung des nichtmuskulären Myosins-2C2 zu einer geringeren Kompensation der Partialladungen führt und die elektrostatische Interaktion mit F-Aktin fördert. Die Ausbildung des A- und des R-Zustands sind durch stereospezifische hydrophobe und ionische Interaktionen sowie strukturelle Veränderungen gekennzeichnet. Im Falle des NMHC-2C2 könnte die 33 Aminosäure-Insertion in Schleife-2 mit der zusätzlichen Ausbildung eines β -Faltblatts die Interaktion mit dem negativ geladenen N-Terminus von Aktin fördern und zu einer beschleunigten Aktinbindungskonstante beitragen.

Die Dissoziationsgeschwindigkeit k_{A} ist in Isoform-2C2 um den Faktor 3-4 in Respekt zu NMHC-2C1 und -2C0 beschleunigt. Die thermodynamische Kopplung sinkt um dem Faktor 8 in der Reihenfolge NMHC-2C0 > NMHC-2C1 > NMHC-2C2 von $\approx 4,2$ auf 0,5.

Nichtmuskuläres Myosin-2C weist eine magnesiumsensitive ADP-Dissoziationskinetik von Aktomyosin auf

Exemplarisch wurde der Einfluss der freien Magnesiumionenkonzentration auf die ADP-Bindung an Aktomyosin bestimmt. Dabei zeigt die ADP-Assoziationskonstante 2. Ordnung im experimentellen Konzentrationsbereich eine geringe Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration. Im experimentellen Konzentrationsbereich zwischen 1 mM und 20 mM freien Magnesiumionen wird die ADP-Bindungskonstante um 18% erniedrigt.

Zusätzlich zur Modulation der ADP-Kinetik der Isoformen des nichtmuskulären Myosins durch die Variabilität der Oberflächenschleifen wird die ADP-Dissoziationskinetik durch die Konzentration an freien Magnesiumionen reguliert: Hohe Konzentrationen an freien Magnesiumionen reduzieren die ADP-Dissoziation von Aktomyosin für alle Isoformen um den Faktor 2,8-3,8 im Konzentrationsbereich zwischen $\approx 0,01$ -20 mM freien Mg^{2+} -Ionen. Die apparente Inhibierungskonstante $K_i [Mg_{frei}^{2+}]$ liegt mit 0,56-1,05 mM im physiologischen Bereich freier Mg^{2+} -Konzentrationen. Physiologische Variationen der freien Magnesiumionenkonzentration zwischen 0,2-2 mM haben den größten Einfluss auf die ADP-Dissoziationskinetik von Aktomyosin. Auf der Basis des oberen und unteren Limits der freien Magnesiumionenkonzentrationen lassen sich minimale und maximale *duty ratios* für die Isoformen des zytoplasmatischen Myosins-2C definieren. Dabei zeigt sich, dass die einzelnen Isoformen spezifische Bereiche an *duty ratios* aufweisen: NMHC-2C0 weist eine magnesiumsensitive *duty ratio* von 0,3-0,1, NMHC-2C2 von 0,12-0,04 und NMHC-2C1 von 0,06-0,02 auf.

Konventionelle muskuläre Myosine der Klasse-2 assemblieren zu langen bipolaren Filamenten und weisen *duty ratios* im Bereich von 0,03-0,04 auf. Dieser geringe *duty cycle* gewährleistet, dass die Myosinköpfe im Anschluss an ihren Kraftschlag die Motoren, die mit ihrem Kraftschlag beginnen, nicht behindern [ROSENFELD *et al.* 2005].

Im Kontrast formen nichtmuskuläre Myosine kurze bipolare Filamente *in vitro*. Diese Filamente bestehen aus weniger als 28 Myosinen und sind 20-30fach kürzer als die Filamente des Herz- und Skelettmuskels [ROSENFELD *et al.* 2003, VERKHOVSKY und BORISY 1993]. Die Architektur dieser Filamente deutet darauf hin, dass mindestens 6 Myosin-Motordomänen mit einem Aktin-Filament interagieren können. Ein *duty cycle* größer als 0,17 würde demnach eine kontinuierliche Interaktion des NMHC-2C mit demselben Aktin-Filament ermöglichen. Die Assemblierung des nichtmuskulären Myosins zu minifilamentären Strukturen resultiert in einer effektiv erhöhten *duty ratio*. Die unterschiedlichen *duty ratios* der Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C ermöglicht es den konventionellen Myosinen in einem weiten Kontext von zeitlichen, mechanischen und funktionalen Faktoren zu arbeiten und trägt zur funktionalen Diversität bei. Die geringe Größe der Filamente nichtmuskulärer Myosine repräsentiert die Adaption der Motoren an die Ansprüche der zytoplasmatischen Kontraktilität und der Erhaltung der kortikalen Spannung [ROSENFELD *et al.* 2003].

Einschränkend muss erwähnt werden, dass alle experimentellen Versuche unter *unloaded* Bedingungen durchgeführt wurden. Spekulativ kann vermutet werden, dass die Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C eine weitere Erhöhung der *duty ratio* unter lastenabhängigen Konditionen aufweisen. Myosin-2 Motoren mit einem geringen *duty cycle* können unter starken Kräften zu Motoren mit hoher *duty ratio* werden: Starke Kräfte können die Raten, mit denen die Intermediate die stark bindenden Zustände verlassen, verlangsamen [CRUZ und OSTAP 2004].

Für nichtmuskuläre Myosine der Klasse-2 sind hohe *duty ratios* Voraussetzung für einen kontinuierlichen Kontakt mit einem Aktin-Filament. Studien an NMHC-2B beschreiben eine signifikant höhere *duty ratio* ($0,82 \pm 0,16$ [ROSENFELD *et al.* 2003]) als für anderen Myosine der Klasse-2, die zwischen den *duty ratios* von skelettmuskulärem Myosin-2 (0,02-0,04) und der prozessiven Motoren Myosin-5 und -6 (0,7-0,8) liegt [CRUZ *et al.* 2001, 1999, ROSENFELD *et al.* 2003]. Im Kontrast dazu konnte kein verlängerter *duty cycle* für nichtmuskuläres Myosin-2A gezeigt werden, das nur einen geringen Anteil (*duty cycle* $\approx 0,1$) des ATPase-Zyklus in einem stark aktinbindenden Zustand vorliegt [KOVÁCS *et al.* 2003].

Der *duty cycle* der Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C wird maßgeblich durch die freie Magnesiumionenkonzentration determiniert. Als Kollektiv ist es diesem Motor auch unter Bedin-

gungen geringer freier Magnesiumionenkonzentrationen möglich, durch eine effektiv hohe *duty ratio* eine kontinuierliche Interaktion mit einem Aktin-Filament zu gewährleisten.

Im zellulären Kontext werden lokale, hohe Konzentrationen von Myosinen der Klasse-2 durch die Assemblierung der Motoren in Filamente und der Inkorporation dieser Filamente in aktinhaltige Strukturen wie Stressfasern oder Sarkomeren erreicht [CRUZ und OSTAP 2004]. Experimentell kann dieses Verhalten *in vitro* durch die Abhängigkeit der Gleitgeschwindigkeit als eine Funktion der Myosin-Dichte demonstriert werden [CRUZ und OSTAP 2004].

Funktionale Analyse

Die funktionale Kompetenz der dargestellten Fusionsproteine und der Einfluss der Oberflächenschleifen wird im *in vitro*-Motilitätsassay sichtbar. Die Gleitgeschwindigkeit wird maßgeblich durch die Rate der ADP-Dissoziation determiniert [LAUZON *et al.* 1998, ROVNER *et al.* 1997, SPUDICH 1994] und korreliert mit der Länge respektive der Flexibilität von Schleife-1 [SWEENEY *et al.* 1998]. Die Interaktion von Myosin mit F-Aktin und ATP bestimmen die funktionalen Eigenschaften des Motors, da die Aktinbindung notwendig für die Aktivierung der Myosin ATPase ist und die ADP-Dissoziation die maximale Gleitgeschwindigkeit limitiert [GOODSON *et al.* 1999]. Erwartungsgemäß steigt die Gleitgeschwindigkeit der Isoformen des zytoplasmatischen Myosins-2C mit der Länge der Oberflächenschleifen an: NMHC-2C0 weist eine reduzierte Gleitgeschwindigkeit ($\approx 90 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$) im Vergleich zu NMHC-2C1 und -2C2 ($\approx 130\text{-}160 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$) auf. Eine expandierte Schleife-2 Region in NMHC-2C2 resultiert in einer 20 %igen Erhöhung der Bewegungsgeschwindigkeit.

Funktionale Studien von PATO *et al.* [1996] beschrieben für das NMHC-2B1 im Vergleich zu NMHC-2B0 eine Erhöhung der Gleitgeschwindigkeit um 20%. Das beobachtete Verhalten des humanen nichtmuskulären Myosins-2C steht im Kontrast zu den Beobachtungen von JANA *et al.* [2009], die für murines NMHC-2C nach der Phosphorylierung der leichten Kette Bewegungsgeschwindigkeiten von $\approx 40\text{-}90 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$ beschreiben. Dabei ist die Gleitgeschwindigkeit eines Konstruktes mit expandierten Oberflächenschleifen-1 und -2 im Vergleich zu einem Konstrukt, das nur die Insertion in Schleife-1 aufweist, verlangsamt. Ein Charakteristikum des murinen zytoplasmatischen Myosins-2C ist, dass Isoformen mit einer verlängerten Schleife-2 nicht vom Phosphorylierungsstatus der leichten Kette abhängig und konstitutiv aktiv sind [JANA *et al.* 2009]. Dieses Verhalten konnte mit den dargestellten Fusionsproteinen in der vorliegenden Arbeit nicht analysiert werden.

Die Magnesiumsensitivität der *in vitro* Bewegungsgeschwindigkeit konnte im Rahmen dieser Arbeit für ein analoges Konstrukt des nichtmuskulären Myosins-2A gezeigt werden und impliziert den determinierenden Effekt einer magnesiumsensitiven ADP-Dissoziation auf die Bewegungsgeschwindigkeit.

Für nichtmuskuläres Myosin-2B ist beschrieben, dass beide Motordomänen des Dimers simultan an filamentöses Aktin binden können und der Linearmotor prozessives Verhalten aufweist [NORSTROM und ROCK 2009]. Aufgrund der stark reduzierten *duty ratio* der Isoformen des humanen nichtmuskulären Myosins-2C, auch bei hohen freien Magnesiumionenkonzentrationen, ist ein prozessives Verhalten unwahrscheinlich.

Zusammenfassung

Die alternativ *gespleißten* Oberflächenschleifen-1 und -2 sind wichtige Modulatoren der Myosinaktivität und prägen individuelle Elementarschritte des Myosin ATPase-Zyklus der Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C. Die kinetischen Eigenschaften eines Myosins sind die Kombination vieler hochdynamischer, strikt regulierter kinetischer Einzelschritte sowie struktureller Variationen, die zur funktionalen und kinetischen Spezialisierung der Motoren beitragen.

Zusammenfassend ist der ATPase-Zyklus der Isoformen des humanen nichtmuskulären Myosins-2C durch eine hohe Affinität zu F-Aktin in An- und Abwesenheit von Nukleotid gekennzeichnet. Transientenkinetische Studien in der Abwesenheit von Nukleotid weisen auf eine 4fach reduzierte Affinität der Isoform NMHC-2C2 für filamentöses Aktin hin. Dieses Attribut wird der verlängerten

Schleife-2 zugeordnet.

Die ADP-Bindung an die drei Transkriptvarianten des zytoplasmatischen Myosins-2C ist schnell und resultiert in einer hohen ADP-Affinität. Die ADP-Assoziation zeigt geringfügige Differenzen in Abhängigkeit von den expandierten Oberflächenschleifen. Im Kontrast ist die ADP-Dissoziation in der An- und Abwesenheit von F-Aktin stark von den expandierten Schleifenregionen-1 und -2 abhängig. Die größten Unterschiede werden dabei zwischen den Isoformen-2C0 und -2C2 beobachtet: NMHC-2C2 zeigt eine 5fache Erhöhung in K_D und eine 7fache Erhöhung in K_{AD} . NMHC-2C1 weist intermittierendes Verhalten auf. Die ADP-Dissoziationsgeschwindigkeit der Isoformen wird nur geringfügig in Anwesenheit von saturierenden F-Aktinkonzentrationen beschleunigt.

Veränderungen der freien Magnesiumionenkonzentration im physiologischen Konzentrationsbereich (0,2 bis 2 mM) resultieren in drastischen Veränderungen der ADP-Dissoziationskinetiken von Aktomyosin und respektive der *duty ratio* der jeweiligen Isoform.

Die Formation von kurzen biopolaren Filamenten *in vitro* repräsentiert die Adaption der Motoren an die Ansprüche der zytoplasmatischen Kontraktilität und der Erhaltung der kortikalen Spannung. Die Aufrechterhaltung der Spannung des Zytoskeletts ist essentiell für regulatorische Prozesse wie die Zellteilung, Zellmotilität und Polarität einer Zelle. Die Magnesiumsensitivität ermöglicht eine flexible Regulation der Aktin-Interaktion in einer zeitlichen und mechanischen Manier und ist Basis funktionaler und regulatorischer Mechanismen der Isoformen des nichtmuskulären Myosins-2C.

Tabelle 4.1: Kinetische Konstanten des humanen nichtmuskulären Myosins-2C

Konstante ^{1,2}	Signal	NMHC-2C0	NMHC-2C1	NMHC-2C2
k_{basal} (s ⁻¹)	NADH-Assay ⁷	0,064 ± 0,01	0,079 ± 0,01	0,082 ± 0,01
k_{cat} (s ⁻¹)	NADH-Assay ^{3,7}	>0,23	>0,212	>0,432
K_{app} (μM)	NADH-Assay ⁷	>140	>140	>140
k_{cat}/K_{app} (μM ⁻¹ s ⁻¹)	NADH-Assay ^{4,7}	0,00227 ± 0,00019	0,00195 ± 0,00025	0,0046 ± 0,000503
$K_1 k_{+2}$ (μM ⁻¹ s ⁻¹)	Tryptophan	0,37 ± 0,008	0,66 ± 0,013	0,68 ± 0,008
$K_1 k_{+2}$ (μM ⁻¹ s ⁻¹)	mantATP	0,39 ± 0,004	0,71 ± 0,014	1,23 ± 0,020
$k_{+3} + k_{-3}$ (s ⁻¹)	Tryptophan	34,69 ± 0,750	29,53 ± 0,570	25,79 ± 0,500
$1/K_1$ (μM)	Tryptophan	74,87 ± 4,000	29,97 ± 3,300	16,14 ± 1,980
$K_1 k_{+2}$ (μM ⁻¹ s ⁻¹)	Pyren-Aktin	1,02 ± 0,010	0,89 ± 0,010	0,64 ± 0,010
k_{+2} (s ⁻¹)	Pyren-Aktin	516,87 ± 9,980	382,32 ± 6,400	416,98 ± 13,54
$1/K_1$ (μM)	Pyren-Aktin	483,34 ± 31,80	394,07 ± 25,09	484,42 ± 57,76
k_{+D} (μM ⁻¹ s ⁻¹)	mantADP	0,54 ± 0,020	0,87 ± 0,020	0,73 ± 0,030
k_{-D} (s ⁻¹)	mantADP ⁵	0,46 ± 0,050	1,66 ± 0,060	2,83 ± 0,060
k_{-D} (s ⁻¹)	mantADP ⁶	0,422 ± 0,002	1,25 ± 0,020	2,17 ± 0,020
K_D (μM)	k_{-D}/k_{+D}	0,85 ± 0,124	1,9 ± 0,112	3,87 ± 0,241
K_D (μM)	Tryptophan	0,98 ± 0,180	1,98 ± 0,410	2,508 ± 0,630
k_{+AD} (μM ⁻¹ s ⁻¹)	mantADP	2,56 ± 0,060	3,18 ± 0,109	2,91 ± 0,190
k_{-AD} (s ⁻¹)	mantADP ⁵	0,5 ± 0,160	3,7 ± 0,310	3,94 ± 0,350
k_{-AD} (s ⁻¹)	mantADP ⁶	0,78 ± 0,005	3,74 ± 0,017	3,66 ± 0,015
$K_i [Mg_{free}^{2+}]$ (mM)	mantADP ⁶	0,71 ± 0,145	1,05 ± 0,280	0,56 ± 0,039
K_{AD} (μM)	k_{-AD}/k_{+AD}	0,19 ± 0,067	1,16 ± 0,137	1,35 ± 0,208
K_{AD} (μM)	Pyren-Aktin	0,43 ± 0,070	1,04 ± 0,170	2,03 ± 0,400
<i>Kopplung</i>	K_{AD}/K_D	≈ 0,43	≈ 0,52	≈ 0,8
k_{+A} (μM ⁻¹ s ⁻¹)	Pyren-Aktin	0,301 ± 0,03	0,414 ± 0,03	0,774 ± 0,04
k_{-A} (s ⁻¹)	Pyren-Aktin	0,0037 ± 0,00045	0,00453 ± 0,00033	0,01226 ± 0,00048
k_{-A} (s ⁻¹)	$K_A \cdot k_{+A}$	≈ 0,00136	≈ 0,00434	≈ 0,0164
K_A (μM)	k_{-A}/k_{+A}	≈ 0,0122	≈ 0,0109	≈ 0,015
K_A (μM)	Amplituden	≈ 0,00452	≈ 0,0105	≈ 0,0212
k_{+DA} (μM ⁻¹ s ⁻¹)	Pyren-Aktin	0,327 ± 0,003	0,308 ± 0,0056	0,512 ± 0,011
k_{-DA} (s ⁻¹)	Pyren-Aktin	0,005 ± 0,00042	0,00242 ± 0,00015	0,006 ± 0,0005
k_{-DA} (s ⁻¹)	$K_{DA} \cdot k_{+DA}$	≈ 0,0062	≈ 0,0064	≈ 0,00547
K_{DA} (μM)	k_{-DA}/k_{+DA}	≈ 0,0152	≈ 0,0078	≈ 0,0115
K_{DA} (μM)	Amplituden	≈ 0,019	≈ 0,0208	≈ 0,0107
<i>Kopplung</i>	K_{DA}/K_A	≈ 4,2	≈ 1,98	≈ 0,5
Max. <i>duty ratio</i>	T_{stark}/T_{total} ⁸	≈ 0,3	0,06	0,12
Min. <i>duty ratio</i>	T_{stark}/T_{total} ⁸	≈ 0,1	0,02	0,04

¹ Die Kennzeichnung der kinetischen Konstanten beziehen sich auf Schema 3.8² 20°C, 20 mM MOPS pH 7,0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂³ bei einer F-Aktinkonzentration von 140 μM⁴ graphisch aus der Anfangssteigung ermittelt⁵ Ordinate der k_{obs} versus mantADP Auftragung⁶ ATP-chasing-Experiment⁷ 25°C, 25 mM HEPES pH 7,4, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT⁸ Max./Min. *duty ratio* wurden aus den Raten der ADP-Dissoziation in der Gegenwart von 5 mM/0,02 mM MgCl₂ berechnet

4.2 Myosin-6

In der vorliegenden Arbeit wurden die kinetischen Eigenschaften der Motordomäne des humanen Myosins-6 analysiert. Die kinetischen Studien sollen dazu beitragen, isoformspezifische Unterschiede im ATPase-Zyklus von Myosinen der Klasse-6 zu analysieren.

Für die Charakterisierung des menschlichen Klasse-6 Myosins wurde ein Konstrukt verwendet, das sich aus der Motordomäne sowie dem proximalen Teil der Nackenregion des Myosins, fusioniert mit einem künstlichen Hebelarm, zusammensetzt.

Im Folgenden werden die im *steady-state* Zustand und transientenkinetisch zugänglichen Schritte des ATPase-Zyklus des humanen Myosins-6 diskutiert. Eine Zusammenstellung der kinetischen Konstanten des unkonventionellen Motors ist in Tabelle 4.2 aufgeführt.

Steady-state ATPase-Aktivität

Die *steady-state* Kinetik des humanen Myosins-6 ist durch eine ≈ 24 fache Aktivierung der basalen Aktivität durch F-Aktin gekennzeichnet. Die katalytische Aktivität des Myosins wird von einem basalen Niveau k_{basal} von $0,036 \pm 0,004 \text{ s}^{-1}$ auf maximal $k_{cat} = 0,868 \pm 0,011 \text{ s}^{-1}$ erhöht. F-Aktin aktiviert die basale Katalysegeschwindigkeit effektiv; K_{app} , die apparente Gleichgewichtskonstante K_M für Aktin, liegt mit $0,578 \pm 0,066 \mu\text{M}$ sehr niedrig. Die Kopplungseffizienz k_{cat}/K_{app} beträgt $1,502 \pm 0,1918 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Kopplungskonstanten der prozessiven Motoren *Hs* nichtmuskuläres Myosin-2B und *Gg* Myosin-5a liegen zwischen $\approx 0,0022 - 11 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [CRUZ *et al.* 1999, WANG *et al.* 2003].

Transientenkinetische Analyse

Humanes Myosin-6 ist mit $K_1 k_{+2} = 0,049 \pm 0,007 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $K_1 k_{+2} = 11,22 \pm 0,297 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von F-Aktin durch niedrige apparente ATP-Bindungskonstanten 2. Ordnung gekennzeichnet. Durch die Anwesenheit von F-Aktin wird diese schwache Bindungskonstante weiter erniedrigt. Die ATP-Bindungskonstante $K_1 k_{+2}$ ist 50-100fach niedriger als für andere kinetisch charakterisierte Myosine, mit Ausnahme von *MYR1*, Myosin-1 α aus der Rattenleber, das mit $K_1 k_{+2} \approx 17 - 23 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ähnliche Bindungseigenschaften aufweist [COLUCCIO und GEEVES 1999, GEEVES *et al.* 2000].

Ein weiteres Charakteristikum des Klasse-6 Myosins ist eine partiell reversible Isomerisierung des Myosin-ATP-Komplexes mit $k_{-2} = 0,45 \pm 0,006 \text{ s}^{-1}$ in der Abwesenheit von F-Aktin. Die Isomerisierung des Aktomyosin-ATP-Komplexes weist eine Maximalgeschwindigkeit k_{+2} von $> 140 \text{ s}^{-1}$ auf. Die Konformationsänderung verläuft damit im Vergleich zum prozessiven *Gg* Myosin-5a ($k_{+2} = 870 \text{ s}^{-1}$) langsam [CRUZ *et al.* 1999].

Die Gleichgewichtskonstante der ATP-Dissoziation von Aktomyosin-ATP, $1/K_1$, beträgt $\gg 12 \text{ mM}$. Diese große Konstante trägt entscheidend dazu bei, dass Myosin-6 sein Substrat ATP langsam und schwach bindet.

Myosin und Aktomyosin weisen vergleichbare ADP-Bindungskonstanten 2. Ordnung im Bereich von $\approx 0,2 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ auf. F-Aktin affiziert weder die Assoziations- noch die Dissoziationseigenschaften von ADP. Konträres Verhalten weisen beispielsweise muskuläre Myosine der Klasse-2 auf, bei denen die Anwesenheit von F-Aktin zu einer >200 fachen Beschleunigung der ADP-Dissoziation führt [TRYBUS und TAYLOR 1982]. Die kinetische Kopplung k_{-AD}/k_{-D} ist für Myosin-6 ≈ 1 und $k_{-D} \approx k_{-AD}$. Dieses Verhalten trägt zu einer zeitlichen Verlängerung des stark aktinegebundenen Aktomyosin-ADP-Zustands bei. Analoges Verhalten weist beispielsweise nichtmuskuläres Myosin-2A auf [KOVÁCS *et al.* 2003]. Der Aktin-aktivierte Myosin-6 ATPase-Zyklus wird durch die ADP-Dissoziation von Aktomyosin ratenlimitiert; der Aktomyosin-ADP-Zustand ist das dominante Intermediat des Zyklus.

Als Konsequenz der ADP-Assoziations- und Dissoziationskinetik sind die Dissoziationsgleichgewichtskonstanten K_D und K_{AD} mit $3,53 \pm 0,029 \mu\text{M}$ und $2,68 \pm 0,175 \mu\text{M}$ identisch. Die thermodynamische Kopplung zwischen den ADP-Affinitäten in An- und Abwesenheit von F-Aktin K_{AD}/K_D beträgt $\approx 0,75$. Dieses Verhalten impliziert eine schwache thermodynamische Kopplung zwischen den Zuständen; eine Bindung des Myosin-ADP-Komplexes an F-Aktin resultiert in einer marginalen Erniedrigung der ADP-Affinität.

Die Ratenkonstante der ADP-Bindung an Aktomyosin k_{+AD} ist ≈ 20 mal größer als die korrespondierende Ratenkonstante der ATP-Bindung $K_1 k_{+2}$. Ein hohes Verhältnis der ADP- zu ATP-Bindungsgeschwindigkeit ist eine Eigenschaft prozessiver Myosine. In Analogie dazu weisen *Gg* Myosin-5a [CRUZ *et al.* 1999] und *Ss* Myosin-6 [CRUZ *et al.* 2001] ein $k_{+AD}/K_1 k_{+2}$ -Verhältnis von 13 respektive 33 auf. Durch diese Eigenschaft wird der stark aktinbindende Aktomyosin-ADP-Komplex unter physiologischen Nukleotidkonzentrationen stabilisiert.

Die strukturelle Grundlage des kinetischen Verhaltens der humanen Isoform ist in Analogie zum porcinen Homolog wahrscheinlich die *unique* Insertion: Die Insertion 1 determiniert die kinetischen Eigenschaften einer langsamen ADP-Dissoziation und eines langlebigen Rigor-Zustands [MÉNÉTREY *et al.* 2005]. Das Insert 1 trägt somit zu den kinetischen Voraussetzungen einer langsamen ATP-Bindung im Vergleich zur ADP-Bindung und eines potenziell prozessiven Verhaltens des humanen Motors sowie dessen funktionaler Eigenschaft eines Ankers bei [MÉNÉTREY *et al.* 2005].

Für die Mutanten T406A und T406E des porcinen Myosins-6 wird eine ratenlimitierende ADP-Dissoziation von Aktomyosin beschrieben [CRUZ *et al.* 2001]. Die *duty ratios* der Mutanten erfüllen die Voraussetzungen für ein potentiell prozessives Verhalten.

Für das humane Fusionskonstrukt ist die Geschwindigkeitskonstante der ADP-Dissoziation ($k_{-AD} = 0,59 \pm 0,019$ respektive $0,86283 \pm 0,022 \text{ s}^{-1}$) langsamer oder identisch mit der *steady-state* ATPase-Aktivität ($k_{cat} = 0,868 \pm 0,011 \text{ s}^{-1}$). Die Berechnung des *duty cycles* ergibt ≈ 1 . Dieses Verhalten würde implizieren, dass der Motor sich permanent in stark aktinbindenden Zuständen befinden würde.

Die Bestimmung der maximalen ATPase-Aktivität des humanen Myosins ist mit der Unsicherheit belegt, dass die experimentelle Bestimmung der Konzentration an aktivem Enzym in der Myosinpräparation nicht möglich ist. Daher kann die eingesetzte Myosinkonzentration der *steady-state*-Bedingungen sowohl über- als auch unterschätzt sein und basiert auf der photometrischen Konzentrationsbestimmung. Zudem konnten unterschiedliche Temperatursensitivitäten der Einzelschritte des Myosin ATPase-Zyklus sowie die Verwendung unterschiedliche Pufferbedingungen der *steady-state*- und transientenkinetischen Charakterisierung diese Diskrepanz bedingen. Bei der Durchführung transientenkinetischer Versuche wurde mit einem großen Überschuss an Substrat gearbeitet, um den Effekt der Unsicherheit der exakten Enzymkonzentration zu minimieren.

Studien an Myosin-1 und Myosin-5 weisen darauf hin, dass die Konzentration von freien Magnesiumionen die ADP-Kinetik dieser Myosine moduliert [DÜRRWANG *et al.* 2006, FUJITA-BECKER *et al.* 2005, ROSENFELD *et al.* 2005, TAFT *et al.* 2008]. ROSENFELD *et al.* [2005] spekulieren, dass der vorgeschlagene Regulationsmechanismus auch auf Myosine der Klasse-6, die durch eine ratenlimitierende ADP-Dissoziation gekennzeichnet sind, übertragbar ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig der Mechanismus der Regulation eines Klasse-6 Myosins durch die Konzentration an freien Magnesiumionen gezeigt. Während die ADP-Bindung an Myosin und Aktomyosin weitgehend unabhängig von der Konzentration an freien Magnesiumionen ist, zeigen die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten eine Magnesiumsensitivität. Die ADP-Dissoziation aus dem stark aktinbindenden, ternären Aktomyosin-ADP-Komplex wird durch physiologische Konzentrationen an freien Magnesiumionen um den Faktor ≈ 7 inhibiert. Die apparente Inhibierungskonstante liegt mit $K_i [Mg_{frei}^{2+}] = 137 \pm 6 \mu\text{M}$ im physiologischen Konzentrationsbereich. Diese Produktinhibition resultiert in einer zeitlichen Expansion der stark aktinbindenden Zustände und resultiert in erniedrigten Dissoziationsgleichgewichtskonstanten K_{AD} und K_D .

Damit verbunden sind Änderungen der *duty ratio* und die Regulation eines potentiell prozessiven Verhaltens. Wahrscheinlich führt im Falle des Myosins-6 eine hohe Magnesiumionenkonzentration zu einer verringerten ATPase-Aktivität sowie *in vitro*-Gleitgeschwindigkeit. Myosin-6 folgt einem ähnlichen kinetischen Schema wie Myosin-5. Dieses Schema beinhaltet eine lastenabhängige ADP-

Dissoziation, die mit einer zusätzlichen Bewegung des Hebelarms assoziiert ist. Daher kann spekuliert werden, dass eine *strain-sensitive* Isomerisierung, die zu einer schnellen ADP-Dissoziation führt, mit der Dissoziation von Mg^{2+} gekoppelt ist [ROSENFELD *et al.* 2005].

Die Aktinbindungskonstanten 2. Ordnung weisen für das unkonventionelle Klasse-6 Myosin eine starke Abhängigkeit vom Nukleotidzustand auf. In der Anwesenheit von ADP ist die Aktinbindungskonstante um den Faktor ≈ 10 erniedrigt. Different verhalten sich die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten, die keine Abhängigkeit vom Nukleotidzustand aufweisen. Aus der Berechnung der Aktin-Affinitäten wird ersichtlich, dass die Anwesenheit von ADP die Aktin-Affinitätskonstante um den Faktor 10 auf $K_{DA} \approx 40,7$ nM erhöht. In Abwesenheit von ADP ist *Hs* Myosin-6 mit $K_A \approx 5,75$ nM hoch Aktin-affin. Die thermodynamische Kopplung K_{DA}/K_A weist einen Faktor von $\approx 8,35$ auf. Im Vergleich zu den prozessiven Myosinen *Gg* Myosin-5a ($K_A=3,3$ nM, $K_{DA}= 44$ nM [HANNEMANN *et al.* 2005]) und *Dm* Myosin-7b ($K_A=35$ nM, $K_{DA}= 34$ nM [YANG *et al.* 2005]) weist Myosin-6 vergleichbare Aktin-Affinitäten auf. Hohe Affinitäten für filamentöses Aktin, auch in der Gegenwart von ADP, sind Charakteristika von prozessiven Myosinen. Diese kinetische Eigenschaft verhindert die Dissoziation des Aktomyosin-ADP-Komplexes und verlängert die Dauer des stark aktin gebundenen Intermediats.

Die Diskrepanz in den Parametern der thermodynamischen Kopplung ist darauf zurückzuführen, dass nicht alle relevanten Schritte des Myosin-6 ATPase-Zyklus transientenkinetisch zugänglich sind. Für *Ss* Myosin-6 wird eine Diskrepanz der Kopplungskonstanten von ≈ 50 beschrieben [CRUZ *et al.* 2001]. Auf der Basis von Cryo-EM-Studien wird für Myosin-6 angenommen, dass eine Isomerisierung des Aktomyosin-ADP-Zustandes, ähnlich wie in Myosin-5 erfolgt [CRUZ *et al.* 2001, WELLS *et al.* 1999]. Dieser mögliche Mechanismus wird bei der Berechnung der thermodynamischen Konsistenz nicht berücksichtigt [CRUZ *et al.* 2001]. Eine weitere Ursache der Diskrepanz der thermodynamischen Kopplungskonstanten könnte in der Verwendung unterschiedlicher Salzkonzentrationen im Experimentalpuffer bei der Bestimmung der kinetischen Konstanten der Aktin- und ADP-Kinetik liegen.

Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass die kinetischen Konstanten des humanen Myosins-6 die enzymatischen Voraussetzung für ein potentiell prozessives Verhalten aufweisen. Kontrovers wird die Formation von Myosin-6-Dimeren diskutiert. Natives Myosin-6 liegt in einer monomeren Form vor und zeigt kein prozessives Verhalten in Laserfallen-Experimenten [LISTER *et al.* 2004]. Die Bindung von Cargos oder die Assemblierung an Aktin-Filamenten könnten eine dimere Form des Proteins *in vivo* stabilisieren [EL-MEZGUELDI und BAGSHAW 2008].

Humanes Myosin-6 ist ein Motor mit einer hohen *duty ratio*, der überwiegend die stark aktinbindenden Zustände (AM-ADP und AM) besetzt. Die Aktin-aktivierte ATPase-Aktivität des Klasse-6 Myosins ist durch eine ratenlimitierende Dissoziation von Aktomyosin gekennzeichnet. Eine wichtige Determinante für Prozessivität ist ein niedriger K_{app} -Wert. Ein weiteres Charakteristikum des Klasse-6 Myosins ist eine sehr niedrige ATP-Bindungskonstante K_1k_{+2} an Aktomyosin. Die schwache ATP-Bindung resultiert in einer weiteren Erhöhung der *duty ratio*. Die ADP-Kinetik des Myosins wird kaum durch die Anwesenheit von F-Aktin beeinflusst. Die Kombination dieser kinetischen Eigenschaften trägt zu einem hohen *duty cycle* des unkonventionellen Klasse-6 Myosins bei.

Kinetische Konstanten des humanen Myosins-6

Tabelle 4.2: Kinetische Parameter des humanen Myosins-6

Konstante	Signal	<i>Hs</i> Myosin-6 ³
k_{basal} (s ⁻¹)	NADH-Assay	0,036 ± 0,004
k_{cat} (s ⁻¹)	NADH-Assay	0,868 ± 0,011
K_{app} (μM)	NADH-Assay	0,578 ± 0,066
k_{cat}/K_{app} (μM ⁻¹ s ⁻¹)	k_{cat}/K_{app}	1,502 ± 0,192
$K_I k_{+2}$ (μM ⁻¹ s ⁻¹)	desoxy-mantATP	0,049 ± 0,007
k_{-2} (s ⁻¹)	desoxy-mantATP	0,45 ± 0,006
$K_I k_{+2}$ (mM ⁻¹ s ⁻¹)	Pyren-Aktin	11,22 ± 0,297
k_{+2} (s ⁻¹)	Pyren-Aktin	> 140
$1/K_I$ (mM)	Pyren-Aktin	≫ 12
k_{+D} (μM ⁻¹ s ⁻¹)	mantADP	0,15 ± 0,009
k_{-D} (s ⁻¹)	mantADP ¹	0,53 ± 0,023
k_{-D} (s ⁻¹)	mantADP ²	0,392 ± 0,005
K_D (μM)	k_{-D}/k_{+D}	3,53 ± 0,029
k_{+AD} (μM ⁻¹ s ⁻¹)	mantADP	0,22 ± 0,007
k_{-AD} (s ⁻¹)	mantADP ¹	0,59 ± 0,019
k_{-AD} (s ⁻¹)	mantADP ²	0,862 ± 0,022
K_{AD} (μM)	k_{-AD}/k_{+AD}	2,68 ± 0,175
$K_i [Mg_{frei}^{2+}]$ (mM)	mantADP ²	0,137 ± 0,06
<i>Kopplung</i>	K_{AD}/K_D	≈ 0,758
k_{+A} (μM ⁻¹ s ⁻¹)	Pyren-Aktin	2,38 ± 0,081 ⁴
k_{-A} (s ⁻¹)	Pyren-Aktin	≈ 0,0137 ⁴
K_A (nM)	k_{-A}/k_{+A}	≈ 5,75 ⁴
k_{+DA} (μM ⁻¹ s ⁻¹)	Pyren-Aktin	0,26 ± 0,011 ⁴
k_{-DA} (s ⁻¹)	Pyren-Aktin	≈ 0,011 ⁴
K_{DA} (nM)	k_{-DA}/k_{+DA}	≈ 40,7 ⁴
<i>Kopplung</i>	K_{DA}/K_A	≈ 8,35 ⁴

¹ Ordinate des k_{obs} versus mantADP Diagramms² ATP-*chasing*-Experiment³ bei 5 mM MgCl₂⁴ MOPS-Experimentalpuffer, 0 mM KCl, 10 mM DTT

4.3 Myosin-7a

Myosin-7a ist ein unkonventionelles Myosin, das in auditorische und visuelle Prozesse involviert ist. In den Haarzellen des Innenohrs und der Retina partizipiert Myosin-7a beispielsweise an der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der Stereozilien und am Transport von Melanosomen [HASSON *et al.* 1997, LIU *et al.* 1998].

In der vorliegenden Arbeit wurden die kinetischen und funktionalen Eigenschaften eines verkürzten Myosinkonstruktes, bestehend aus der Motordomäne des humanen Myosins-7a, fusioniert mit einem künstlichen Hebelarm und einem EYFP-Fluoreszenzmarker analysiert.

Das Expressionskonstrukt wurde durch *molecular modeling* entworfen, kloniert und mit dem Baculovirus/*Sf9*-System heterolog produziert. Für die Darstellung des Fusionsproteins wurde eine Aufreinigungsstrategie etabliert und das Myosin homogen präpariert.

Das rekombinante Myosin wurde für die umfassende kinetische Charakterisierung der relevanten Schritte des Myosin ATPase-Zyklus eingesetzt und die funktionale Kompetenz des dargestellten Konstruktes im *in vitro*-Motilitätsassay gezeigt. Im Rahmen der kinetischen Analyse wurde zum ersten Mal eine Modulation der ADP-Dissoziationskinetik eines Klasse-7 Myosins durch variierende Konzentration an freien Magnesiumionen gezeigt.

Im Folgenden werden die Parameter der *steady-state* und transientenkinetischen Analyse des humanen Myosins-7a den kinetischen Konstanten anderer Klasse-7 Myosine gegenübergestellt, um klassenspezifische Unterschiede und Gemeinsamkeiten darzustellen. Tabelle 4.3 fasst alle kinetischen Konstanten des humanen Klasse-7 Myosins zusammen.

Steady-state ATPase-Aktivität

Die basale *steady-state* ATPase-Aktivität des humanen Myosins-7a, k_{basal} , wird durch Aktin von einer initialen Katalysegeschwindigkeit von $0,045 \pm 0,003 \text{ s}^{-1}$ um den Faktor ≈ 8 auf eine Maximalgeschwindigkeit k_{cat} von $0,348 \pm 0,025 \text{ s}^{-1}$ aktiviert.

Mit Ausnahme von *Mm* Myosin-7a ($k_{basal} = 0,5 \text{ s}^{-1}$) [UDOVICHENKO *et al.* 2002] weisen alle bisher charakterisierten Myosine der Klasse-7 basale *steady-state* Katalysegeschwindigkeiten von $0,02 - 0,05 \text{ s}^{-1}$ auf [HENN und CRUZ 2005, INOUE und IKEBE 2003, WATANABE *et al.* 2006, YANG *et al.* 2006, 2005].

Die maximale Umsatzgeschwindigkeit des menschlichen Myosins ist vergleichbar mit publizierten kinetischen Parametern von $0,53 \text{ s}^{-1}$ für *Rr* Myosin-7a [INOUE und IKEBE 2003] sowie $0,45 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$ für *Hs* Myosin-7a [WATANABE *et al.* 2008]. Im Kontrast dazu weisen Myosin-7a und -7b aus *Drosophila melanogaster* maximale Umsatzgeschwindigkeiten von $1,72 - 8,4 \text{ s}^{-1}$ auf [WATANABE *et al.* 2006, YANG *et al.* 2006, 2005].

Die apparente Gleichgewichtskonstante für Aktin, K_{app} , beträgt für das humane Myosin-7a $8,3 \pm 2,58 \mu\text{M}$. Eine vergleichbare Affinität weist auch murines Myosin-7a ($7 \pm 1,8 \mu\text{M}$) [UDOVICHENKO *et al.* 2002] auf, während *Rr* Myosin-7a und *Dm* Myosin-7b erhöhte Affinitätskonstanten von $32,7 \mu\text{M}$ [INOUE und IKEBE 2003] bzw. $39 \pm 5 \mu\text{M}$ YANG *et al.* [2005] aufweisen. Konträr verhalten sich murines Myosin-7b [HENN und CRUZ 2005] sowie *Dm* Myosin-7a [YANG *et al.* 2006] mit Aktin-Affinitäten von $0,66 \pm 0,08 \mu\text{M}$ bzw. $1,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$.

Die geringe Kopplungseffizienz der humanen Isoform $k_{cat}/K_{app} = 0,042 \pm 0,016 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ repräsentiert die Rate der Myosin-ADP·P_i-Bindung an F-Aktin und lässt auf eine schwache Kopplung zwischen der Nukleotidbindungsstelle und der Aktinbindungsregion schließen.

Die Gleichgewichtskonstante der basalen ATPase-Aktivität für ATP ist im Gegensatz zu *Rr* Myosin-7a [INOUE und IKEBE 2003] für *Hs* Myosin-7a um den Faktor ≈ 13 erniedrigt. In der Anwesenheit von saturierenden Konzentrationen an F-Aktin weist das humane Myosin-7a eine $\approx 3,5$ fach reduzierte Gleichgewichtskonstante im Kontrast zu Myosin-7a der Ratte auf [INOUE und IKEBE 2003].

Transientenkinetische Analyse

Das Substrat ATP bindet mit Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung von $0,85 \pm 0,019 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $0,68 \pm 0,008 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ an Myosin respektive Aktomyosin. Die Geschwindigkeitskonstante der ATP-Hydrolyse $k_{+3}+k_{-3}$ beträgt $23,09 \pm 0,738 \text{s}^{-1}$ und führt zu einer schnellen Bindung des Myosin·ADP·P_i-Komplexes an F-Aktin und erhöht die Zeitdauer der aktinbindenden Zustände. Die Isomerisierung des Aktomyosin·ATP-Komplexes vom stark in den schwach aktinbindenden Zustand, k_{+2} , verläuft für humanes Myosin-7a mit einer Geschwindigkeit von $186,01 \pm 5,7 \text{s}^{-1}$. Im Kontrast dazu weisen *Oc* skelettmuskuläres Myosin-2 ($\approx 5000 \text{s}^{-1}$) [MILLAR und GEEVES 1983] oder *Mm* Myosin-7b [HENN und CRUZ 2005] mit $942 \pm 35 \text{s}^{-1}$ sowie das prozessive Myosin *Gg* Myosin-5a [CRUZ *et al.* 1999] mit 870s^{-1} schnelle Isomerisierungsgeschwindigkeiten auf. Unter physiologischen Nukleotidkonzentrationen von $\approx 1\text{-}2 \text{mM}$ ATP beträgt die Isomerisierungsgeschwindigkeit k_{+2} für das humane Myosin-7a $\approx 90\text{-}130 \text{s}^{-1}$. Diese reduzierte Isomerisierungsgeschwindigkeit limitiert die Dissoziationsgeschwindigkeit des Aktomyosin·ATP-Komplexes und trägt zu einer Verlängerung des stark aktinbindenden Zustandes bei.

Die Gleichgewichtskonstanten der ATP-Dissoziation des Myosin- bzw. Aktomyosin·ATP-Komplexes $1/K_1$ bzw. $1/K_1$ betragen $13,69 \pm 2,84 \mu\text{M}$ bzw. $681,19 \pm 5,63 \mu\text{M}$.

Die ADP-Kinetik des Klasse-7-Myosins ist durch die schnelle ADP-Bindung in der An- und Abwesenheit von F-Aktin gekennzeichnet ($k_{+D} = 0,98 \pm 0,052 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{+AD} = 1,78 \pm 0,04 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Transientenkinetische Analysen weisen für humanes Myosin-7a eine ADP-Dissoziationsgeschwindigkeit von $0,198 \pm 0,04 \text{s}^{-1}$ auf. Die Geschwindigkeitskonstante der ADP-Freisetzung von Aktomyosin beträgt $0,32 \pm 0,009 \text{s}^{-1}$. Die Beschleunigung der ADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten durch Aktin (k_{-AD}/k_{-D}) ist mit einem kinetischen Kopplungsfaktor von 2,4 sehr niedrig: Die Gegenwart von F-Aktin führt zu keiner effektiven Beschleunigung der ADP-Dissoziation von Myosin. Dieses Verhalten steht im Widerspruch zu skelettmuskulärem Myosin, bei dem sich Nukleotid und Aktin allosterisch verdrängen und die Affinitäten des Myosins für den jeweils anderen Bindungspartner mehr als >100fach erniedrigen [NYITRAI und GEEVES 2004].

Im zellulären Kontext ermöglicht ein prolongierter Aktomyosin·ADP-Zustand die Spannungsgenerierung und -ausübung. Diese Eigenschaft korreliert mit der Partizipation des humanen Klasse-7 Myosins bei der lokalen Ausübung von Spannungs Kräften und der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der Stereozilien der Haarzellen des Innenohrs durch die Vernetzung von Transmembranproteinen mit Aktinbündeln [BOËDA *et al.* 2002, PETIT 2001, WILLIAMS 2002].

Bei doppelköpfigen Myosinen der Klasse-5 und -6 ist ein ausgedehnter Aktomyosin·ADP-Zustand für einen prozessiven Bewegungsmechanismus notwendig und ermöglicht den Transport von biologischen Cargos [CRUZ *et al.* 2001, 1999].

Für Myosin-7a wird die Ausbildung von Dimeren kontrovers diskutiert. Während natives Myosin-7a durch das Vorhandensein einer SAH-Domäne nicht zur Dimerisierung befähigt ist, ist die Formation von Dimeren *in vivo*, vermittelt beispielsweise durch akzessorische Proteine, denkbar. Ein solches Modell der Dimerisierung wird auch für Myosine der Klassen-6 und -10 diskutiert [KNIGHT *et al.* 2005, PECKHAM und KNIGHT 2009, SWEENEY und HOUDUSSE 2007]. Für den Fall einer *in vivo* Dimerisierung des humanen Klasse-7 Myosins würde es die kinetischen Voraussetzungen für prozessives Verhalten aufweisen.

Die ADP-Dissoziationsgeschwindigkeit aus dem Aktomyosin·ADP-Komplex k_{-AD} liegt im Bereich der maximalen *steady-state* ATPase-Aktivität und stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Myosin ATPase-Zyklus dar. Eine ratenlimitierende ADP-Dissoziation eines Klasse-7 Myosins ist konsistent mit den kinetischen Studien an *Mm* Myosin-7b [HENN und CRUZ 2005] und *Dm* Myosin-7a [WATANABE *et al.* 2006]. Durch die langsame ADP-Freisetzung verbleibt das Myosin einen Großteil des ATPase-Zyklus in den stark aktinbindenden Zuständen. Dieses Charakteristikum ist die Basis einer hohen *duty ratio*.

Die ADP-Affinitäten des *Hs* Myosins-7a in der An- und Abwesenheit von F-Aktin liegen bei $\approx 0,3\text{-}0,6 \mu\text{M}$ und sind niedriger als die physiologische ADP-Konzentration ($10\text{-}50 \mu\text{M}$) [NYITRAI und GEEVES 2004]. Diese niedrigen Konstanten implizieren, dass ein Anteil des Myosins in der Gegenwart von ADP und ATP im Myosin·ADP-Zustand beziehungsweise in einer stark aktinbindenden Form vorliegt ($k_{+AD}/K_1 k_{+2} \approx 4$).

Unter physiologischen Konditionen ist die ATP-Bindung im Vergleich zur ADP-Bindung bedingt

durch die zellulären Nukleotidkonzentrationen wahrscheinlich bevorzugt.

Die kinetischen Charakteristika einer hohen ADP-Affinität des Aktomyosin-Komplexes in Verbindung mit einer langsamen ADP-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{AD} trägt zu einer schwachen Aktin/ADP-Kopplung bei und resultiert in einer Prolongation des Aktomyosin-ADP-Zustandes und somit in einer hohen *duty ratio*.

Der Vergleich der Raten der ADP-Dissoziation von Aktomyosin-ADP mit der maximalen Umsatzgeschwindigkeit k_{cat} der *steady-state* ATPase gibt ein Maß für den zeitlichen Anteil, den sich die Motoren im stark bindenden Aktomyosin-ADP-Zustand befinden und folglich die ungefähre *duty ratio*. Myosin-7a weist, wie alle bisher charakterisierten Myosine der Klasse-7, mit $\approx 0,7$ (bei 5 mM $MgCl_2$) eine hohe *duty ratio* auf. Für *Drosophila melanogaster* Myosin-7a sind *duty ratios* zwischen 0,88-0,9 [WATANABE *et al.* 2006, YANG *et al.* 2006] publiziert. Für *Dm* Myosin-7b sowie murines Myosin-7b beträgt die *duty ratio* $\approx 0,8$ [HENN und CRUZ 2005, YANG *et al.* 2005].

Der hohe *duty cycle* des humanen Myosins-7a in Kombination mit der langsamen ATPase-Aktivität qualifiziert den Motor zur lokaler Spannungsausübung im zellulären Kontext.

Die hohe *duty ratio* von Myosin-7a könnte es dem Motor ermöglichen, in der Gegenwart hoher ATP-Konzentrationen, in einem prozessiven Mechanismus Cargos entlang eines mikrofilamentösen *tracks* zu transportieren [EL-AMRAOUI *et al.* 2008].

Die Aktinbindungskonstanten 2. Ordnung für Myosin sowie Myosin-ADP sind mit $k_{+A} = 3,167 \pm 0,00 \mu M^{-1} s^{-1}$ und $k_{+DA} = 1,34 \pm 0,033 \mu M^{-1} s^{-1}$ hoch. Konträres Verhalten weisen die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{-A} und k_{-DA} auf, die mit $0,002 \pm 0,00004 s^{-1}$ und $0,00268 \pm 0,00011 s^{-1}$ nahezu identisch und sehr niedrig sind. Die Kombination einer hohen Aktinbindungskonstante mit einer niedrigen Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante bestimmt die hohe Aktin-Affinität des humanen Myosins-7a in An- und Abwesenheit von ADP. Die Gleichgewichtskonstanten der Aktindissoziation liegen mit $K_A = 0,63 \pm 0,0245 nM$ und $K_{DA} = 2 \pm 0,131 nM$ niedrig. Die Eigenschaft einer hohen Aktin-Affinität korreliert mit der hohen *duty ratio* des Myosins-7a. Myosine mit hoher *duty ratio* sind in der Regel durch eine hohe Aktin-Affinität in An- und Abwesenheit von ADP gekennzeichnet. Diese Eigenschaft führt zu einer verzögerten Dissoziation des Aktomyosin-ADP-Komplexes und verlängert die Zeitdauer des stark aktinbindenden Zustands.

Ein Charakteristikum des *Hs* Myosins-7a sind schwache thermodynamische Kopplungen zwischen den Aktin- und ADP-Dissoziationsgleichgewichtskonstanten. Das Verhältnis K_{AD}/K_D beträgt $\approx 1,2$; K_{DA}/K_A beträgt $\approx 3,17$. Diese schwache Aktin/ADP-Kopplung resultiert in einer langsamen ADP-Dissoziationsgeschwindigkeit, die nicht effektiv durch die Anwesenheit von F-Aktin beschleunigt wird. Zudem impliziert dieser Wert, dass ADP auch in der Gegenwart von F-Aktin simultan an Myosin bindet und erklärt die starke ADP-Affinität des Aktomyosin-Komplexes.

Mit Kopplungskonstanten < 5 fällt das humane Myosin-7a nach der Definition von NYITRAI und GEEVES [2004] in die Gruppe von Myosinen, die funktionale Aufgaben als Spannungssensoren aufweisen. Diese Definition trifft für das humane Myosin zu.

Die hohe Aktin-Affinität und die schwache thermodynamische Kopplung zwischen der ADP- und der Aktinbindung sind konsistent mit einer Funktion des Myosins-7a in der Verankerung von Cargos am Aktin-Zytoskelett [HENN und CRUZ 2005]. Entsprechende Domänen für die Bindung von Adhäsionskomplexen [TUXWORTH *et al.* 2001] und Membranproteinen [ETOURNAY *et al.* 2005] sind in der Schwanzregion von nativem Myosin-7a enthalten [HENN und CRUZ 2005].

Unter idealen Versuchsbedingungen muss die thermodynamische Kopplung, das Produkt der Gleichgewichtskonstanten, 1 sein. Dies ist für die kinetische Analyse des humanen Myosins-7a nicht realisiert. Abweichungen der thermodynamischen Konsistenz sind beispielsweise auch für Myosine der Klassen-5 (Thermodynamische Kopplung $\approx 0,0022$ [CRUZ *et al.* 1999]) und -6 (≈ 50 [CRUZ *et al.* 2001]) beschrieben. Diese Diskrepanzen resultieren beispielsweise aus der Unzugänglichkeit einzelner Intermediate des Myosin ATPase-Zyklus sowie im Falle der Myosine-5 und -6 durch die Isomerisierung des Aktomyosin-ADP-Zustands [CRUZ *et al.* 2001, 1999].

Funktionale Analyse

Die experimentell bestimmte *in vitro*-Gleitgeschwindigkeit für humanes Myosin-7a beträgt $\approx 97 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$ und belegt die funktionale Kompetenz des dargestellten Fusionsproteins. Funktionale Studien von WATANABE *et al.* [2008] und UDOVICHENKO *et al.* [2002] an humanem und murinem Myosin-7a weisen mittlere Bewegungsgeschwindigkeiten von $2,7 \pm 0,5 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$ respektive $190 \pm 40 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$ auf. Für *Rr* Myosin-7a beträgt die Gleitgeschwindigkeit $160 \pm 20 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$ [INOUE und IKEBE 2003]. Ein künstlich dimerisiertes HMM-Fragment von *Drosophila melanogaster* Myosin-7a weist neben prozessivem Verhalten eine Gleitgeschwindigkeit von $72 \pm 20 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$ auf [YANG *et al.* 2006].

Die Motoraktivität von Myosin-7a wird durch freie Magnesiumionen reguliert

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für *Hs* Myosin-7a erstmalig die Regulation der Motoraktivität durch die freie Magnesiumionenkonzentration beschrieben. Für Myosine der Klassen-1 und -5 ist die Inhibition der ADP-Dissoziation in Anwesenheit von hohen Konzentrationen an freien Magnesiumionen bekannt [DÜRRWANG *et al.* 2006, FUJITA-BECKER *et al.* 2005, ROSENFELD *et al.* 2005, TAFT *et al.* 2008].

Aufgrund der kinetischen Eigenschaften des Klasse-7 Myosins ist der Motor ein Kandidat für eine magnesiumsensitive ADP-Dissoziation. ROSENFELD *et al.* postulieren, dass Myosine, die dem gleichen kinetischen Schema wie Myosin-5 folgen, magnesiumsensitiv sind. Dieses Schema beinhaltet einen lastenabhängigen ADP-Dissoziationsschritt, der mit einer zusätzlichen Bewegung des Hebelarms assoziiert ist. Dieser wurde von HENN und CRUZ [2005] auf der Basis der kinetischen Charakterisierung von *Mm* Myosin-7b postuliert.

Experimentell konnte im Rahmen dieser Arbeit für das humane Myosin-7a gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen an freien Magnesiumionen die ADP-Freisetzung von Aktomyosin um den Faktor $\approx 4,6$ von maximal $0,921 \text{ s}^{-1}$ auf minimal $0,2 \text{ s}^{-1}$ inhibieren. Die Inhibierungskonstante liegt mit $K_i [\text{Mg}_{\text{frei}}^{2+}] \approx 290 \mu\text{M}$ im Bereich physiologischer Mg^{2+} -Konzentrationen.

Für Myosin-7a kann spekuliert werden, dass aufgrund der ratenlimitierenden ADP-Dissoziation die *steady-state* ATPase-Aktivität ebenfalls magnesiumsensitiv ist. Experimentelle Studien mit *Hs* Myosin-6 sowie den humanen nichtmuskulären Myosin-2A, -2B und -2C konnte im Rahmen dieser Arbeit keinen gravierenden Einfluss der freien Magnesiumionenkonzentration auf die ADP-Bindungskonstanten zeigen. Im Konsens würden physiologische Schwankungen der freien Magnesiumionenkonzentration in graduellen Veränderungen der ADP-Affinität von Myosin-7a bzw. Aktomyosin-7a resultieren, die mit der Konzentration an freien Magnesiumionen steigen.

Die ADP-Dissoziation von Aktomyosin ist die Determinante der *in vitro*-Motilität. Daher kann spekuliert werden, dass die Bewegungsgeschwindigkeit von Aktin-Filamenten über eine mit Myosin-7a dekorierte Nitrozelluloseoberfläche mit steigenden freien Mg^{2+} -Konzentrationen verlangsamt wird. Im zellulären Kontext wurde in den Außensegmenten der Photorezeptoren von Vertebraten eine statische freie Magnesiumionenkonzentration von $0,68 \pm 0,06 \text{ mM}$ bestimmt, die keiner dynamischen Fluktuation unterliegt [CHEN *et al.* 2003]. Eine statische, illuminationsinsensitive Magnesiumionenkonzentration von $1,7 \text{ mM}$ wurde auch in *Balanus* Photorezeptoren beschrieben [RYDQVIST und BROWN 1986]. Unter dieser Voraussetzung würde der *duty cycle* des humanen Myosins-7a $\approx 0,7$ betragen und eine prozessive Bewegung eines Myosin-Dimers ermöglichen. Eine prozessive, magnesiumsensitive Bewegung würde mit der retinalen Funktionen des Myosins bei der Verteilung von Melanosomen in RPE-Zellen [LIU *et al.* 1998], dem Transfer von Phagosomen von der apikalen Region zum Zellkörper der RPE-Zellen [GIBBS *et al.* 2003] sowie dem Transport von Opsin von den Innen- zu den Außensegmenten der Photorezeptorzellen [LIU *et al.* 1999] ermöglichen.

Für die zellulären Aufgaben des Myosins-7 am Hörprozess könnte die Konzentration an freien Magnesiumionen relevant sein. Die Magnesiumionenkonzentration hat bei der Pathologie des Innenohrs eine wichtige Aufgabe. Ein therapeutischer sowie prophylaktischer Effekt von hohen Magnesiumionenkonzentrationen konnte bei der lärminduzierten traumatischen Innenohrschädigung bei Meerschweinchen und Menschen gezeigt werden [ATTIAS *et al.* 1994, SCHEIBE *et al.* 2001]. Obwohl die Mg^{2+} -Konzentration keinen Einfluss auf die Packung von Aktin-Filamenten in den Stereozilien

hat [TILNEY *et al.* 1980], könnten Schwankungen der freien Magnesiumionenkonzentration die Dekoration der Aktin-Filamente mit Myosin beeinflussen und somit die Organisation und strukturelle Integrität der Stereozilien modulieren.

Myosin-7a weist die kinetischen Voraussetzungen für die Funktion als Spannungssensor und Transporter auf

Der ATPase-Zyklus des humanen Myosins-7a ist durch eine langsame *steady-state* ATPase-Aktivität gekennzeichnet, die bei niedrigen F-Aktinkonzentrationen aktiviert wird. Der ratenlimitierende Schritt des Zyklus ist die ADP-Dissoziation von Aktomyosin, welche die Zeitdauer der stark bindenden Aktomyosin-ADP-Zustände verlängert. Hohe Affinitäten für Aktin auch in der Gegenwart von ADP sowie eine hohe Affinität für ADP in An- und Abwesenheit von Aktin charakterisieren den ATPase-Zyklus. Schwache thermodynamische Kopplungen ermöglichen eine starke und simultane Bindung von Myosin, Aktin und ADP. Die lange Verweildauer des Myosins in den stark aktinbindenden Zuständen trägt zu einer hohen *duty ratio* des Motors bei. Eine magnesiumsensitive ADP-Dissoziationskinetik moduliert die ADP-Affinitäten und den *duty cycle* des menschlichen Myosins und ist konsistent mit den Transportfunktionen und strukturellen Aufgaben des Motors. Diese kinetischen Voraussetzungen ermöglichen dem unkonventionellen Myosin die funktionalen Eigenschaften der Spannungsgenerierung und -ausübung sowie der Verankerung von Frachten am Aktin-Zytoskelett. Pathologisch relevant sind diese funktionalen Eigenschaften bei der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der Stereozilien.

Myosin-7a weist die kinetischen Voraussetzungen für prozessives Verhalten auf

Dm Myosin-7b sowie andere Myosine der Klasse-7 weisen prozessives Verhalten auf [YANG *et al.* 2006]. Kinetische Voraussetzungen für Prozessivität sind eine hohe *duty ratio*, eine ratenlimitierende ADP-Dissoziation aus dem Aktomyosinkomplex, eine hohe Aktin-Affinität in An- und Abwesenheit von Nukleotid sowie eine lange Verweildauer in den stark aktinbindenden Zuständen. Eine hinreichende Bedingung ist ein niedriger K_{app} -Wert.

Die kinetischen Voraussetzungen für Prozessivität sind für das humane Myosin-7a realisiert und würden eine prozessive Bewegung eines dimeren Myosins-7a *in vivo* erlauben. Prozessivität würde mit der Funktion des unkonventionellen Myosins am Transport von Opsin und Melanosomen korrelieren [LIU *et al.* 1998, 1999].

Kinetische Konstanten des humanen Myosins-7a

Tabelle 4.3: Kinetische Parameter des humanen Myosins-7a

Konstante	Signal	Myosin-7a
k_{basal} (s^{-1})	NADH-Assay	$0,045 \pm 0,003$
k_{cat} (s^{-1})	NADH-Assay	$0,348 \pm 0,025$
K_{app} (μM)	NADH-Assay	$8,3 \pm 2,580$
k_{cat}/K_{app} ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat}/K_{app}	$0,042 \pm 0,016$
k_{cat} , basal (s^{-1})	NADH-Assay	$0,045 \pm 0,003$
K_{app} , basal (μM)	NADH-Assay	$11,69 \pm 1,770$
k_{cat} , Aktin (s^{-1})	NADH-Assay	$0,35 \pm 0,008$
K_{app} , Aktin (μM)	NADH-Assay	$62,65 \pm 7,089$
$K_1 k_{+2}$ ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	Tryptophan	$0,85 \pm 0,019$
$K_1 k_{+2}$ ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	mantATP	$1,15 \pm 0,012$
$k_{+3} + k_{-3}$ (s^{-1})	Tryptophan	$23,09 \pm 0,738$
$1/K_1$ (μM)	Tryptophan	$13,69 \pm 2,840$
$K_1 k_{+2}$ ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	mantATP	$0,68 \pm 0,008$
$K_1 k_{+2}$ ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	Lichtstreuung	$0,443 \pm 0,012$
k_{+2} (s^{-1})	Lichtstreuung	$186,01 \pm 5,70$
$1/K_1$ (μM)	Lichtstreuung	$681,19 \pm 5,63$
k_{+D} ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	mantADP	$0,98 \pm 0,052$
k_{-D} (s^{-1})	mantADP ¹	$0,27 \pm 0,013$
k_{-D} (s^{-1})	mantADP ²	$0,198 \pm 0,002$
k_{-D} (s^{-1})	Tryptophan	$0,3 \pm 0,002$
K_D (μM)	k_{-D}/k_{+D}	$0,27 \pm 0,027$
K_D (μM)	Tryptophan	$0,52 \pm 0,090$
k_{+AD} ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	mantADP	$1,78 \pm 0,040$
k_{-AD} (s^{-1})	mantADP ¹	$0,59 \pm 0,026$
k_{-AD} (s^{-1})	mantADP ²	$0,32 \pm 0,009$
k_{-AD} (s^{-1})	Lichtstreuung	$0,48 \pm 0,003$
$K_i [Mg_{frei}^{2+}]$ (mM)	mantADP ²	$0,291 \pm 0,028$
K_{AD} (μM)	k_{-AD}/k_{+AD}	$0,33 \pm 0,022$
<i>Kopplung</i>	K_{AD}/K_D	$\approx 1,2$
k_{+A} ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	Pyren-Aktin ⁴	$3,167 \pm 0,060$
k_{-A} (s^{-1})	Pyren-Aktin ⁴	$0,002 \pm 0,00004$
K_A (nM)	k_{-A}/k_{+A}	$0,63 \pm 0,024$
k_{+DA} ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	Pyren-Aktin ⁴	$1,34 \pm 0,033$
k_{-DA} (s^{-1})	Pyren-Aktin ⁴	$0,0026 \pm 0,00011$
K_{DA} (nM)	k_{-DA}/k_{+DA}	$2 \pm 0,131$
<i>Kopplung</i>	K_{DA}/K_A	$\approx 3,17$
<i>duty ratio</i> ³		$\approx 0,726$

¹ Ordinate der k_{obs} versus mantADP Auftragung² ATP-chasing-Experiment³ bei 5 mM MgCl₂⁴ MOPS-Experimentalpuffer mit 10 mM DTT

4.4 Myosin-Effektoren

Die Identifikation von selektiven und effizienten Myosin-Effektoren stellt einen aktuellen Forschungsschwerpunkt dar, da diese Verbindungen ein hohes therapeutisches Potential in der Behandlung von Krankheiten haben. Inhibitoren des glattmuskulären Myosins könnten beispielsweise als Vaso- und Bronchiodilatoren eingesetzt werden. Die Aktivierung von skelettmuskulärem und kardialen Myosin könnte relevant für die Therapie von Krankheiten, die mit Muskelschwäche und Herzinsuffizienz assoziiert sind, sein. Ein Einsatz von spezifischen Myosin-Effektoren in der Therapie von Krebserkrankungen ist denkbar, da konventionelle und unkonventionelle Myosine in Prozessen wie Mitose, Zellteilung, Motilität und Zelladhäsion involviert sind.

Neben den klinischen Aspekten haben Myosin-Effektoren in experimentellen Studien der Grundlagenforschung Relevanz, beispielsweise bei der Aufklärung von Regulationsmechanismen sowie in biochemischen Assays um die Eigenschaften eines Myosins im zellulären Kontext zu studieren. Ein Beispiel eines solchen Effektors ist der Myosin-Inhibitor Blebbistatin, der erfolgreich in kinetischen, zellulären und regulatorischen Studien zur Inhibition von Myosinen der Klasse-2 eingesetzt wurde und maßgeblich zum Verständnis der funktionalen Eigenschaften der Myosine *in vivo* beigetragen hat [RAMAMURTHY *et al.* 2004, SI *et al.* 2010, TAKÁCS *et al.* 2010, WATANABE *et al.* 2010]. Diese molekularen Eigenschaften sind für die gezielte Modulation zellulärer Regulationsmechanismen und somit in der Therapie von Erkrankungen fundamental.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue potentielle Effektoren der Myosin-Motordomäne untersucht. Die Verbindungen wurden durch kombinatorische Chemie entworfen, synthetisiert und stehen im Institut zur Verfügung. Alle Verbindungen sind Pyrrol- bzw. Indol-Derivate und werden als Pseudiline bzw. Carbazole bezeichnet. Aus dieser Wirkstoffbibliothek wurden 26 Verbindungen sowie bereits publizierte Myosin-Effektoren durch *blind docking* in Homologiemodelle der humanen nichtmuskulären Myosine-2A, -2B und 2C0 sowie das menschliche Myosin-7a und die Kristallstruktur von *Ss* Myosin-6 [MÉNÉTREY *et al.* 2005] *gedockt*. Zudem wurden alle Verbindungen durch lokales *docking* in die publizierte PBP-Bindungsstelle [FEDOROV *et al.* 2009] sowie Blebbistatin in die beschriebene Blebbistatin-Bindungsstelle [ALLINGHAM *et al.* 2005] *gedockt*.

Der Einsatz ausgewählter Verbindungen in biochemischen Assays zur Bestimmung der ATPase-Aktivität des Myosins unter *steady-state*-Bedingungen dient der Verifikation der *docking*-Experimente.

Bei der visuellen Analyse der computerchemischen *docking*-Studien ist auffällig, dass viele Effektoren eine Bindungstendenz zur Spalte zwischen der oberen und unteren 50 kDa-Domäne sowie zur Nukleotidbindungsstelle haben. Diese Tendenz korreliert mit der leichten Zugänglichkeit dieser strukturellen Einheiten für die nativen Liganden. Daher sind die aus *docking* Studien approximierten freien Bindungsenergien relativ fehlerbehaftet und müssen im Falle des Myosins, basierend auf strukturellen Kenntnissen, interpretiert und selektiert werden. Beispielsweise ist eine Bindung des Liganden in die Nukleotidbindungsstelle des Myosins unwahrscheinlich; eine Bindung von PBP- und Carbazol-Derivaten an die beschriebene Bindungsstelle hingegen wahrscheinlich.

Ein Vergleich der freien Bindungsenergien des globalen und des lokalen *dockings* weisen eine Spreizung der Bindungsenergien des lokalen *dockings* hin. An den Beispielen der Carbazole, Kin70, Kin77 und des PBP-Derivates PCP ist dies auf eine bevorzugte Bindung des Liganden in die publizierte Bindungstasche korreliert. Konträr verhalten sich die approximierten freien Bindungsenergien für das humane Myosin-7a, die sich im lokalen *docking* durch leicht erhöhte Bindungsenergien auszeichnen. Ein möglicher Ursprung dieser Diskrepanz könnte eine myosin-spezifische Bindungstasche sein, die mit der Bindung von Carbazol- und Pseudilin-Derivaten interferiert.

Die *in silico*-Studien weisen darauf hin, dass sich die Verbindungen EMD 57033 und Kin77 durch eine hohe Affinität zu den Myosin-Motordomänen auszeichnen. Die Testung dieser Substanzen wies einen leicht aktivierenden Effekt von EMD 57033 auf die Aktin-aktivierte *steady-state* ATPase-Aktivität der humanen zytoplasmatischen Myosine-2C0 und -6 auf; ein Effekt von Kin77 auf das nichtmuskuläre Myosin-2A und Myosin-6 konnte nicht quantifiziert werden.

Im Kontrast zu der Verbindung EMD 57033 weist Blebbistatin beim gezielten *docking* in die bekannte Bindungsstelle reduzierte Affinitäten auf. In experimentellen Studien mit nichtmuskulärem

Myosin-2C reduziert der Inhibitor die Aktin-aktivierte *steady-state* ATPase-Aktivität 8fach. Diskrepanz besteht in den theoretischen *in silico* Berechnungen der Bindungsmodi zu der experimentellen Struktur des Blebbistatins in der Bindungstasche: Der *in silico* Bindungsmodus in der Blebbistatin-Bindungstasche variiert im Vergleich zum experimentell bestimmten. In *docking*-Studien von KOVÁCS *et al.* [2004] wurde die Blebbistatin-Bindungsstelle in einer Entfernung von $\approx 20\text{\AA}$ zur experimentellen Bindungsposition ermittelt. In dieser Studie wurde die Bindungsstelle zwischen der Aktin-Bindungsregion und der Schalter-1/Schalter-2-Region beschrieben [KOVÁCS *et al.* 2004].

Mit Ausnahme von Blebbistatin weist der Effektor EMD 57033 AC_{50} -Werte im hohen mikromolaren Bereich auf. Ein effektorisches Potenzial der Liganden Resveratrol, TFP, Kin70 und Kin77 konnte im experimentellen Konzentrationsbereich auf selektierte Myosin-Motordomänen nicht quantifiziert werden. Da es sich bei diesen Substanzen um Leitsubstanzen handelt, kann zukünftig durch die chemische Modifikation der Liganden die Effizienz und das Affinitätsspektrum des Effektors zum Protein deutlich variiert werden. Auf Seiten des Protein können durch Mutationsstudien die Struktur-Wirkungsbeziehungen der Leitsubstanz analysiert und diese Erkenntnisse in einer neuen Generation von Effektoren realisiert und somit die Selektivität der Liganden prädiktiv optimiert werden. Der Effektor EMD 57033 ist ein Kandidaten für einen solchen Optimierungsprozess.

Bei den durchgeführten *in silico*-Experimenten wird vernachlässigt, dass Myosin ein hochdynamisches Enzym ist: Allosterische Effekte werden über den Bereich der Motordomäne translatiert und resultieren in globalen Veränderungen. Ein generell methodischer Nachteil der durchgeführten *docking*-Studie besteht in dem Verfahren, in dem das Protein als rigides Objekt angesehen wird, während der Ligand partiell flexibel ist. Diese methodische Einschränkung könnte die Diskrepanz zwischen den theoretischen Bindungsaffinitäten und den experimentell bestimmten Effekten erklären.

Zusammenfassend kann resümiert werden, dass theoretische, computerchemische Verfahren keine direkte Interpretation der approximierten freien Bindungsenergien zulassen. Ein methodischer Nachteil liegt im gewählten *docking*-Verfahren, das nur die molekularen Aspekte am Ende einer komplexen Reaktionskette betrachtet und auf eine lokale oder globale Bindungsstelle reduziert. Dabei wird vernachlässigt, dass die Bindung eines Effektors an einen Rezeptor einen hochdynamischer Vorgang darstellt, der mit der Ausbildung eines *induced fits* korreliert ist.

Generell erlaubt das *in silico* Verfahren auf Grund der Bindungsenergien keine Unterscheidung, ob eine Substanz potenziell inhibitorische oder aktivatorische Effekte besitzt. Beispiele hierfür sind der Inhibitor Blebbistatin und der Aktivator EMD 57033.

Die Problematik, dass die Testung von Effektoren auf die *steady-state* ATPase-Aktivität nichtmuskulärer Myosine auf Grund der sehr langsamen Katalysegeschwindigkeit schwierig ist, erfordert ein sensitiveres Verfahren zu Bestimmung des Aktivitätsspektrums einer Leitsubstanz mit einem niedrigen Wirkspektrum. Neben der sehr langsamen ATPase-Aktivität der verwendeten Myosine im Fließgleichgewicht kommt für Liganden wie Resveratrol und EMD 57033 eine starke Absorption im Bereich der NADH-Absorption hinzu, die kinetische Studien nur eingeschränkt zulässt und die Bewertung der Validität der Messergebnisse erschwert.

Um die Aktivität des Myosins selektiv und effizient zu beeinflussen, müssen zukünftig mehr Verbindungen in einen automatisierten *high throughput-screening* getestet werden und das Limit der experimentellen Sensitivität erhöht werden. Dies könnte beispielsweise durch die Verwendung eines gekoppelten, kontinuierlichen Enzymassays erfolgen, der die Phosphat-Freisetzung bei der ATP-Hydrolyse in einem fluorimetrischen Verfahren erlaubt.

Literaturverzeichnis

- ADATO, A., V. MICHEL, Y. KIKKAWA, J. REINERS, K. N. ALAGRAMAM, *et al.*, (2005) Interactions in the network of Usher syndrome type 1 proteins. *Hum Mol Genet* **14**: 347–56.
- ALLINGHAM, J. S., R. SMITH, und I. RAYMENT, (2005) The structural basis of blebbistatin inhibition and specificity for myosin II. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 378–9.
- ALTHAUS, K., und A. GREINACHER, (2009) MYH9-related platelet disorders. *Semin Thromb Hemost* **35**: 189–203.
- ANDO, T., N. KODERA, E. TAKAI, D. MARUYAMA, K. SAITO, *et al.*, (2001) A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 12468–72.
- ANSON, M., M. A. GEEVES, S. E. KURZAWA, und D. J. MANSTEIN, (1996) Myosin motors with artificial lever arms. *EMBO J* **15**: 6069–74.
- ATTIAS, J., G. WEISZ, S. ALMOG, A. SHAHAR, M. WIENER, *et al.*, (1994) Oral magnesium intake reduces permanent hearing loss induced by noise exposure. *Am J Otolaryngol* **15**: 26–32.
- AVRAHAM, K. B., T. HASSON, T. SOBE, B. BALSARA, J. R. TESTA, *et al.*, (1997) Characterization of unconventional MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice. *Hum Mol Genet* **6**: 1225–31.
- AVRAHAM, K. B., T. HASSON, K. P. STEEL, D. M. KINGSLEY, L. B. RUSSELL, *et al.*, (1995) The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nat Genet* **11**: 369–75.
- BAGSHAW, C. R., J. F. ECCLESTON, F. ECKSTEIN, R. S. GOODY, H. GUTFREUND, *et al.*, (1974) The magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase of myosin. Two-step processes of adenosine triphosphate association and adenosine diphosphate dissociation. *Biochem J* **141**: 351–64.
- BAGSHAW, C. R., und D. R. TRENTHAM, (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.
- BAHLOUL, A., G. CHEVREUX, A. L. WELLS, D. MARTIN, J. NOLT, *et al.*, (2004) The unique insert in myosin VI is a structural calcium-calmodulin binding site. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 4787–92.
- BÁLINT, M., I. WOLF, A. TARCSAFALVI, J. GERGELY, und F. A. SRÉTER, (1978) Location of SH-1 and SH-2 in the heavy chain segment of heavy meromyosin. *Arch Biochem Biophys* **190**: 793–9.
- BATRA, R., M. A. GEEVES, und D. J. MANSTEIN, (1999) Kinetic analysis of Dictyostelium discoideum myosin motor domains with glycine-to-alanine mutations in the reactive thiol region. *Biochemistry* **38**: 6126–34.
- BAUER, C. B., P. A. KUHLMAN, C. R. BAGSHAW, und I. RAYMENT, (1997) X-ray crystal structure and solution fluorescence characterization of Mg₂'(3')-O-(N-methylanthraniloyl)

- nucleotides bound to the Dictyostelium discoideum myosin motor domain. *J Mol Biol* **274**: 394–407.
- BEMENT, W. M., und M. S. MOOSEKER, (1995) TEDS rule: a molecular rationale for differential regulation of myosins by phosphorylation of the heavy chain head. *Cell Motil Cytoskeleton* **31**: 87–92.
- BERG, J. S., B. C. POWELL, und R. E. CHENEY, (2001) A millennial myosin census. *Mol Biol Cell* **12**: 780–94.
- BHATIA-DEY, N., M. TAIRA, M. A. CONTI, H. NOORUDDIN, und R. S. ADELSTEIN, (1998) Differential expression of non-muscle myosin heavy chain genes during *Xenopus* embryogenesis. *Mech Dev* **78**: 33–6.
- BOBKOV, A. A., E. A. BOBKOVA, S. H. LIN, und E. REISLER, (1996) The role of surface loops (residues 204-216 and 627-646) in the motor function of the myosin head. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 2285–9.
- BOËDA, B., A. EL-AMRAOUI, A. BAHLOUL, R. GOODYEAR, L. DAVIET, *et al.*, (2002) Myosin VIIa, harmonin and cadherin 23, three Usher I gene products that cooperate to shape the sensory hair cell bundle. *EMBO J* **21**: 6689–99.
- BOLZ, H. J., (2009) Genetics of Usher syndrome. *Ophthalmologie* **106**: 496–504.
- BONNE, G., L. CARRIER, P. RICHARD, B. HAINQUE, und K. SCHWARTZ, (1998) Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects. *Circ Res* **83**: 580–93.
- BORDOLI, L., F. KIEFER, K. ARNOLD, P. BENKERT, J. BATTEY, *et al.*, (2009) Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat Protoc* **4**: 1–13.
- BRIDGMAN, P. C., (1999) Myosin Va movements in normal and dilute-lethal axons provide support for a dual filament motor complex. *J Cell Biol* **146**: 1045–60.
- BRYANT, Z., D. ALTMAN, und J. A. SPUDICH, (2007) The power stroke of myosin VI and the basis of reverse directionality. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 772–7.
- BUSS, F., S. D. ARDEN, M. LINDSAY, J. P. LUZIO, und J. KENDRICK-JONES, (2001) Myosin VI isoform localized to clathrin-coated vesicles with a role in clathrin-mediated endocytosis. *EMBO J* **20**: 3676–84.
- BUSS, F., J. KENDRICK-JONES, C. LIONNE, A. E. KNIGHT, G. P. CÔTÉ, *et al.*, (1998) The localization of myosin VI at the golgi complex and leading edge of fibroblasts and its phosphorylation and recruitment into membrane ruffles of A431 cells after growth factor stimulation. *J Cell Biol* **143**: 1535–45.
- CHANCE, B., Q. H. GIBSON, R. H. EISENHARDT, und K. K. LONBERG-HOLM, (1964) Rapid Mixing and Sampling Techniques. *Science* **146**: 1697–1699.
- CHEN, C., K. NAKATANI, und Y. KOUTALOS, (2003) Free magnesium concentration in salamander photoreceptor outer segments. *J Physiol (Lond)* **553**: 125–35.
- CHENEY, R. E., und M. S. MOOSEKER, (1992) Unconventional myosins. *Curr Opin Cell Biol* **4**: 27–35.
- CHEUNG, A., J. A. DANTZIG, S. HOLLINGWORTH, S. M. BAYLOR, Y. E. GOLDMAN, *et al.*, (2002) A small-molecule inhibitor of skeletal muscle myosin II. *Nat Cell Biol* **4**: 83–8.
- CHIBALINA, M. V., C. PURI, J. KENDRICK-JONES, und F. BUSS, (2009) Potential roles of myosin VI in cell motility. *Biochem Soc Trans* **37**: 966–70.
- CLARK, R., M. A. ANSARI, S. DASH, M. A. GEEVES, und L. M. COLUCCIO, (2005) Loop 1 of transducer region in mammalian class I myosin, Myo1b, modulates actin affinity, ATPase activity, and nucleotide access. *J Biol Chem* **280**: 30935–42.

- CLELAND, W. W., (2009) Enzyme Kinetics. In T. P. Begley, Editor, *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. Wiley-Interscience.
- COLUCCIO, L. M., und M. A. GEEVES, (1999) Transient kinetic analysis of the 130-kDa myosin I (MYR-1 gene product) from rat liver. A myosin I designed for maintenance of tension? *J Biol Chem* **274**: 21575–80.
- CONIBEAR, P. B., C. R. BAGSHAW, P. G. FAJER, M. KOVÁCS, und A. MÁLNÁSI-CSIZMADIA, (2003) Myosin cleft movement and its coupling to actomyosin dissociation. *Nat Struct Biol* **10**: 831–5.
- CONTI, M. A., und R. S. ADELSTEIN, (2008) Nonmuscle myosin II moves in new directions. *J Cell Sci* **121**: 11–8.
- CONTI, M. A., S. KAWAMOTO, und R. A. ADELSTEIN, (2008) Non-Muscle Myosin II. In L. A. Colluccio, Editor, *Myosins Myosins: A Superfamily of Molecular Motors*, volume 7 of *Proteins and Cell Regulation*. Springer Netherlands, 223–264. DOI: 10.1007/978-1-4020-6519-4.
- COPE, M. J., J. WHISSTOCK, I. RAYMENT, und J. KENDRICK-JONES, (1996) Conservation within the myosin motor domain: implications for structure and function. *Structure* **4**: 969–87.
- COUREUX, P.-D., H. L. SWEENEY, und A. HOUDUSSE, (2004) Three myosin V structures delineate essential features of chemo-mechanical transduction. *EMBO J* **23**: 4527–37.
- COUREUX, P.-D., A. L. WELLS, J. MÉNÉTREY, C. M. YENGO, C. A. MORRIS, *et al.*, (2003) A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide. *Nature* **425**: 419–23.
- CRAMER, L. P., (1999) Organization and polarity of actin filament networks in cells: implications for the mechanism of myosin-based cell motility. *Biochem Soc Symp* **65**: 173–205.
- CRAMER, L. P., und T. J. MITCHISON, (1995) Myosin is involved in postmitotic cell spreading. *J Cell Biol* **131**: 179–89.
- CREMO, C. R., und M. A. GEEVES, (1998) Interaction of actin and ADP with the head domain of smooth muscle myosin: implications for strain-dependent ADP release in smooth muscle. *Biochemistry* **37**: 1969–78.
- CRIDDLE, A. H., M. A. GEEVES, und T. JEFFRIES, (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.
- CRUZ, E. M. D. L., und E. M. OSTAP, (2004) Relating biochemistry and function in the myosin superfamily. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 61–7.
- CRUZ, E. M. D. L., und E. M. OSTAP, (2009) Kinetic and equilibrium analysis of the myosin ATPase. *Meth Enzymol* **455**: 157–92.
- CRUZ, E. M. D. L., E. M. OSTAP, und H. L. SWEENEY, (2001) Kinetic mechanism and regulation of myosin VI. *J Biol Chem* **276**: 32373–81.
- CRUZ, E. M. D. L., A. L. WELLS, S. S. ROSENFELD, E. M. OSTAP, und H. L. SWEENEY, (1999) The kinetic mechanism of myosin V. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 13726–31.
- DAVIS, I. W., A. LEAVER-FAY, V. B. CHEN, J. N. BLOCK, G. J. KAPRAL, *et al.*, (2007) Mol-Probity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* **35**: W375–83.
- DIJK, J. V., M. FURCH, C. LAFONT, D. J. MANSTEIN, und P. CHAUSSEPIED, (1999) Functional characterization of the secondary actin binding site of myosin II. *Biochemistry* **38**: 15078–85.
- DOMINGUEZ, R., Y. FREYZON, K. M. TRYBUS, und C. COHEN, (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.

- DONAUDY, F., R. SNOECKX, M. PFISTER, H.-P. ZENNER, N. BLIN, *et al.*, (2004) Nonmuscle myosin heavy-chain gene MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4). *Am J Hum Genet* **74**: 770–6.
- DUNN, T. A., S. CHEN, D. A. FAITH, J. L. HICKS, E. A. PLATZ, *et al.*, (2006) A novel role of myosin VI in human prostate cancer. *Am J Pathol* **169**: 1843–54.
- DÜRRWANG, U., S. FUJITA-BECKER, M. ERENT, F. J. KULL, G. TSIIVALIARIS, *et al.*, (2006) Dictyostelium myosin-IE is a fast molecular motor involved in phagocytosis. *J Cell Sci* **119**: 550–8.
- ECCLESTON, J. F., E. GRATTON, und D. M. JAMESON, (1987) Interaction of a fluorescent analogue of GDP with elongation factor Tu: steady-state and time-resolved fluorescence studies. *Biochemistry* **26**: 3902–7.
- EDDINGER, T. J., und D. P. MEER, (2007) Myosin II isoforms in smooth muscle: heterogeneity and function. *Am J Physiol, Cell Physiol* **293**: C493–508.
- EL-AMRAOUI, A., A. BAHLOUL, und C. PETIT, (2008) Myosin VII. In L. A. Colluccio, Editor, *Myosins Myosins: A Superfamily of Molecular Motors*, volume 7 of *Proteins and Cell Regulation*. Springer Netherlands, 353–374. DOI: 10.1007/978-1-4020-6519-4.
- EL-AMRAOUI, A., und C. PETIT, (2005) Usher I syndrome: unravelling the mechanisms that underlie the cohesion of the growing hair bundle in inner ear sensory cells. *J Cell Sci* **118**: 4593–603.
- EL-AMRAOUI, A., J.-S. SCHONN, P. KÜSSEL-ANDERMANN, S. BLANCHARD, C. DESNOS, *et al.*, (2002) MyRIP, a novel Rab effector, enables myosin VIIa recruitment to retinal melanosomes. *EMBO Rep* **3**: 463–70.
- EL-MEZGUELDI, M., und C. R. BAGSHAW, (2008) The Myosin Family: Biochemical and Kinetic Properties. In L. A. Colluccio, Editor, *Myosins Myosins: A Superfamily of Molecular Motors*, volume 7 of *Proteins and Cell Regulation*. Springer Netherlands, 55–94. DOI: 10.1007/978-1-4020-6519-4.
- EMSLEY, P., B. LOHKAMP, W. G. SCOTT, und K. COWTAN, (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 486–501.
- ESWAR, N., B. WEBB, M. A. MARTI-RENOM, M. S. MADHUSUDHAN, D. ERAMIAN, *et al.*, (2006) Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics* **Chapter 5**: Unit 5.6.
- ETOURNAY, R., A. EL-AMRAOUI, A. BAHLOUL, S. BLANCHARD, I. ROUX, *et al.*, (2005) PHR1, an integral membrane protein of the inner ear sensory cells, directly interacts with myosin 1c and myosin VIIa. *J Cell Sci* **118**: 2891–9.
- FEDOROV, R., M. BÖHL, G. TSIIVALIARIS, F. K. HARTMANN, M. H. TAFT, *et al.*, (2009) The mechanism of pentabromopseudilin inhibition of myosin motor activity. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 80–8.
- FERSHT, A., (1985) *Enzyme Structure and Mechanism*. W.H. Freeman und Company, 2nd edition.
- FISHER, A. J., C. A. SMITH, J. B. THODEN, R. SMITH, K. SUTOH, *et al.*, (1995) X-ray structures of the myosin motor domain of Dictyostelium discoideum complexed with MgADP.BeFx and MgADP.AIF4-. *Biochemistry* **34**: 8960–72.
- FOTH, B. J., M. C. GOEDECKE, und D. SOLDATI, (2006) New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 3681–6.
- FRIEDMAN, T. B., J. R. SELLERS, und K. B. AVRAHAM, (1999) Unconventional myosins and the genetics of hearing loss. *Am J Med Genet* **89**: 147–57.

- FUJITA-BECKER, S., U. DÜRRWANG, M. ERENT, R. J. CLARK, M. A. GEEVES, *et al.*, (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.
- FUJITA-BECKER, S., G. TSIIVALIARIS, R. OHKURA, T. SHIMADA, D. J. MANSTEIN, *et al.*, (2006) Functional characterization of the N-terminal region of myosin-2. *J Biol Chem* **281**: 36102–9.
- FUJIWARA, K., und T. D. POLLARD, (1976) Fluorescent antibody localization of myosin in the cytoplasm, cleavage furrow, and mitotic spindle of human cells. *J Cell Biol* **71**: 848–75.
- FURCH, M., S. FUJITA-BECKER, M. A. GEEVES, K. C. HOLMES, und D. J. MANSTEIN, (1999) Role of the salt-bridge between switch-1 and switch-2 of Dictyostelium myosin. *J Mol Biol* **290**: 797–809.
- FURCH, M., M. A. GEEVES, und D. J. MANSTEIN, (1998) Modulation of actin affinity and actomyosin adenosine triphosphatase by charge changes in the myosin motor domain. *Biochemistry* **37**: 6317–26.
- FURCH, M., B. REMMEL, M. A. GEEVES, und D. J. MANSTEIN, (2000) Stabilization of the actomyosin complex by negative charges on myosin. *Biochemistry* **39**: 11602–8.
- GEEVES, M. A., und P. B. CONIBEAR, (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., R. FEDOROV, und D. J. MANSTEIN, (2005) Molecular mechanism of actomyosin-based motility. *Cell Mol Life Sci* **62**: 1462–77.
- GEEVES, M. A., R. S. GOODY, und H. GUTFREUND, (1984) Kinetics of acto-S1 interaction as a guide to a model for the crossbridge cycle. *J Muscle Res Cell Motil* **5**: 351–61.
- GEEVES, M. A., und K. C. HOLMES, (1999) Structural mechanism of muscle contraction. *Annu Rev Biochem* **68**: 687–728.
- GEEVES, M. A., und T. E. JEFFRIES, (1988) The effect of nucleotide upon a specific isomerization of actomyosin subfragment 1. *Biochem J* **256**: 41–6.
- GEEVES, M. A., C. PERREAULT-MICALE, und L. M. COLUCCIO, (2000) Kinetic analyses of a truncated mammalian myosin I suggest a novel isomerization event preceding nucleotide binding. *J Biol Chem* **275**: 21624–30.
- GEURMEUR, Y., (1997) *Combinaison de classifieurs statistiques, Application a la prediction de structure secondaire des proteines*. Ph.D. thesis, Universität Paris, Frankreich.
- GIBBS, D., J. KITAMOTO, und D. S. WILLIAMS, (2003) Abnormal phagocytosis by retinal pigmented epithelium that lacks myosin VIIa, the Usher syndrome 1B protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 6481–6.
- GOLOMB, E., X. MA, S. S. JANA, Y. A. PRESTON, S. KAWAMOTO, *et al.*, (2004) Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *J Biol Chem* **279**: 2800–8.
- GOODEY, N. M., und S. J. BENKOVIC, (2008) Allosteric regulation and catalysis emerge via a common route. *Nat Chem Biol* **4**: 474–82.
- GOODSON, H. V., H. M. WARRICK, und J. A. SPUDICH, (1999) Specialized conservation of surface loops of myosin: evidence that loops are involved in determining functional characteristics. *J Mol Biol* **287**: 173–85.
- GOODY, R. S., (2003) The missing link in the muscle cross-bridge cycle. *Nat Struct Biol* **10**: 773–5.
- HALSTEAD, M. F., K. AJTAI, A. R. PENHEITER, J. D. SPENCER, Y. ZHENG, *et al.*, (2007) An unusual transduction pathway in human tonic smooth muscle myosin. *Biophys J* **93**: 3555–66.

- HANDBUCH BD BIOSCIENCES, (2003) *BD BaculoGold™ Baculovirus Expression System, Innovative Solutions for Proteomics*. Becton Dickinson Co., www.bdbiosciences.com.
- HANNEMANN, D. E., W. CAO, A. O. OLIVARES, J. P. ROBBLEE, und E. M. D. L. CRUZ, (2005) Magnesium, ADP, and actin binding linkage of myosin V: evidence for multiple myosin V-ADP and actomyosin V-ADP states. *Biochemistry* **44**: 8826–40.
- HASSAN, A. K., S. T. AMEEN, B. SAAD, und S. M. AL-ARAGI, (2009) Potentiometric sensors for the determination of trifluoperazine hydrochloride in pharmaceutical preparations. *Anal Sci* **25**: 1295–9.
- HASSON, T., P. G. GILLESPIE, J. A. GARCIA, R. B. MACDONALD, Y. ZHAO, *et al.*, (1997) Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. *J Cell Biol* **137**: 1287–307.
- HASSON, T., M. B. HEINTZELMAN, J. SANTOS-SACCHI, D. P. COREY, und M. S. MOOSEKER, (1995) Expression in cochlea and retina of myosin VIIa, the gene product defective in Usher syndrome type 1B. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9815–9.
- HEINRICH UND PETRIDES, Editor, (2006) *Biochemie und Pathobiochemie (Springer-Lehrbuch) (German Edition)*. Springer, 8., völlig neu bearb. Aufl. edition.
- HENN, A., und E. M. D. L. CRUZ, (2005) Vertebrate myosin VIIb is a high duty ratio motor adapted for generating and maintaining tension. *J Biol Chem* **280**: 39665–76.
- HODGE, T., und M. J. COPE, (2000) A myosin family tree. *J Cell Sci* **113 Pt 19**: 3353–4.
- HOLMES, K. C., (2008) Myosin Structure. In L. A. Colluccio, Editor, *Myosins Myosins: A Superfamily of Molecular Motors*, volume 7 of *Proteins and Cell Regulation*. Springer Netherlands, 35–54. DOI: 10.1007/978-1-4020-6519-4.
- HOPPE, W., W. LOHMANN, H. MARKL, und H. ZIEGLER, Editors, (1982) *Biophysik (German Edition)*. Springer, 2., völlig neubearb. Aufl. edition.
- HOWARD, J., (1997) Molecular motors: structural adaptations to cellular functions. *Nature* **389**: 561–7.
- HU, A., F. WANG, und J. R. SELLERS, (2002) Mutations in human nonmuscle myosin IIA found in patients with May-Hegglin anomaly and Fechtner syndrome result in impaired enzymatic function. *J Biol Chem* **277**: 46512–7.
- HUANG, H.-D., T.-Y. LEE, S.-W. TZENG, und J.-T. HORNG, (2005) KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites. *Nucleic Acids Res* **33**: W226–9.
- INOUE, A., und M. IKEBE, (2003) Characterization of the motor activity of mammalian myosin VIIA. *J Biol Chem* **278**: 5478–87.
- INOUE, A., J. SAITO, R. IKEBE, und M. IKEBE, (2002) Myosin IXb is a single-headed minus-end-directed processive motor. *Nat Cell Biol* **4**: 302–6.
- ITO, K., T. KASHIYAMA, K. SHIMADA, A. YAMAGUCHI, J. YA AWATA, *et al.*, (2003) Recombinant motor domain constructs of Chara corallina myosin display fast motility and high ATPase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **312**: 958–64.
- ITOH, K., und R. S. ADELSTEIN, (1995) Neuronal cell expression of inserted isoforms of vertebrate nonmuscle myosin heavy chain II-B. *J Biol Chem* **270**: 14533–40.
- JAIJO, T., E. ALLER, M. BENEYTO, C. NAJERA, C. GRAZIANO, *et al.*, (2007) MYO7A mutation screening in Usher syndrome type I patients from diverse origins. *J Med Genet* **44**: e71.
- JANA, S. S., S. KAWAMOTO, und R. S. ADELSTEIN, (2006) A specific isoform of nonmuscle myosin II-C is required for cytokinesis in a tumor cell line. *J Biol Chem* **281**: 24662–70.
- JANA, S. S., K.-Y. KIM, J. MAO, S. KAWAMOTO, J. R. SELLERS, *et al.*, (2009) An alternatively spliced isoform of non-muscle myosin II-C is not regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem* **284**: 11563–71.

- JOHNSON, K. A., (2009) Transient State Enzyme Kinetics. In T. P. Begley, Editor, *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, 4 Volume Set. Wiley-Interscience.
- JOU, C. J., K. W. SPITZER, und M. TRISTANI-FIROUZI, (2010) Blebbistatin effectively uncouples the excitation-contraction process in zebrafish embryonic heart. *Cell Physiol Biochem* **25**: 419–24.
- KAMBARA, T., S. KOMABA, und M. IKEBE, (2006) Human myosin III is a motor having an extremely high affinity for actin. *J Biol Chem* **281**: 37291–301.
- KELLER, M., D. OSSWALD, und S. BRINK, (2005) Familiäre hypertrophe Kardiomyopathie: Genetik und molekulare Mechanismen. *Schweiz Med Forum* **5**: 90–93.
- KELLEY, C. A., M. TAKAHASHI, J. H. YU, und R. S. ADELSTEIN, (1993) An insert of seven amino acids confers functional differences between smooth muscle myosins from the intestines and vasculature. *J Biol Chem* **268**: 12848–54.
- KIEHART, D. P., J. D. FRANKE, M. K. CHEE, R. A. MONTAGUE, T.-L. CHEN, *et al.*, (2004) Drosophila crinkled, mutations of which disrupt morphogenesis and cause lethality, encodes fly myosin VIIA. *Genetics* **168**: 1337–52.
- KIM, K.-Y., S. KAWAMOTO, J. BAO, J. R. SELLERS, und R. S. ADELSTEIN, (2008) The B2 alternatively spliced isoform of nonmuscle myosin II-B lacks actin-activated MgATPase activity and in vitro motility. *Biochem Biophys Res Commun* **369**: 124–34.
- KINTSES, B., M. GYIMESI, D. S. PEARSON, M. A. GEEVES, W. ZENG, *et al.*, (2007) Reversible movement of switch 1 loop of myosin determines actin interaction. *EMBO J* **26**: 265–74.
- KLICHE, W., S. FUJITA-BECKER, M. KOLLMAR, D. J. MANSTEIN, und F. J. KULL, (2001) Structure of a genetically engineered molecular motor. *EMBO J* **20**: 40–6.
- KNIGHT, P. J., K. THIRUMURUGAN, Y. XU, F. WANG, A. P. KALVERDA, *et al.*, (2005) The predicted coiled-coil domain of myosin 10 forms a novel elongated domain that lengthens the head. *J Biol Chem* **280**: 34702–8.
- KOLLMAR, M., U. DÜRRWANG, W. KLICHE, D. J. MANSTEIN, und F. J. KULL, (2002) Crystal structure of the motor domain of a class-I myosin. *EMBO J* **21**: 2517–25.
- KOLOMEISKY, A. B., und M. E. FISHER, (2007) Molecular motors: a theorist’s perspective. *Annu Rev Phys Chem* **58**: 675–95.
- KOPPOLE, S., J. C. SMITH, und S. FISCHER, (2006) Simulations of the myosin II motor reveal a nucleotide-state sensing element that controls the recovery stroke. *J Mol Biol* **361**: 604–16.
- KOUYAMA, T., und K. MIHASHI, (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.
- KOVÁCS, M., J. TÓTH, C. HETÉNYI, A. MÁLNÁSI-CSIZMADIA, und J. R. SELLERS, (2004) Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J Biol Chem* **279**: 35557–63.
- KOVÁCS, M., F. WANG, A. HU, Y. ZHANG, und J. R. SELLERS, (2003) Functional divergence of human cytoplasmic myosin II: kinetic characterization of the non-muscle IIA isoform. *J Biol Chem* **278**: 38132–40.
- KRAFT, T., und B. BRENNER, (1997) Force enhancement without changes in cross-bridge turnover kinetics: the effect of EMD 57033. *Biophys J* **72**: 272–81.
- KRENDEL, M., und M. S. MOOSEKER, (2005) Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)* **20**: 239–51.
- KURZAWA, S. E., und M. A. GEEVES, (1996) A novel stopped-flow method for measuring the affinity of actin for myosin head fragments using microgram quantities of protein. *J Muscle Res Cell Motil* **17**: 669–76.

- KÜSSEL-ANDERMANN, P., A. EL-AMRAOUI, S. SAFIEDDINE, J. P. HARDELIN, S. NOUAÏLLE, *et al.*, (2000) Unconventional myosin VIIA is a novel A-kinase-anchoring protein. *J Biol Chem* **275**: 29654–9.
- KÜSSEL-ANDERMANN, P., A. EL-AMRAOUI, S. SAFIEDDINE, S. NOUAÏLLE, I. PERFETTINI, *et al.*, (2000) Vezatin, a novel transmembrane protein, bridges myosin VIIA to the cadherin-catenins complex. *EMBO J* **19**: 6020–9.
- LANGFORD, G. M., (1995) Actin- and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. *Curr Opin Cell Biol* **7**: 82–8.
- LAUZON, A. M., M. J. TYSKA, A. S. ROVNER, Y. FREYZON, D. M. WARSHAW, *et al.*, (1998) A 7-amino-acid insert in the heavy chain nucleotide binding loop alters the kinetics of smooth muscle myosin in the laser trap. *J Muscle Res Cell Motil* **19**: 825–37.
- LÉGUILLETTE, R., F. R. GIL, N. ZITOUNI, S. LAJOIE-KADOCH, A. SOBIESZEK, *et al.*, (2005) (+)Insert smooth muscle myosin heavy chain (SM-B) isoform expression in human tissues. *Am J Physiol, Cell Physiol* **289**: C1277–85.
- LI, Y., A. K. LALWANI, und A. N. MHATRE, (2008) Alternative splice variants of MYH9. *DNA Cell Biol* **27**: 117–25.
- LIAO, J.-C., M. W. ELTING, S. L. DELP, J. A. SPUDICH, und Z. BRYANT, (2009) Engineered myosin VI motors reveal minimal structural determinants of directionality and processivity. *J Mol Biol* **392**: 862–7.
- LIM, J. I., M. SABOURI-GHOMI, M. MACHACEK, C. M. WATERMAN, und G. DANUSER, (2010) Protrusion and actin assembly are coupled to the organization of lamellar contractile structures. *Experimental cell research* .
- LISTER, I., S. SCHMITZ, M. WALKER, J. TRINICK, F. BUSS, *et al.*, (2004) A monomeric myosin VI with a large working stroke. *EMBO J* **23**: 1729–38.
- LIU, X., B. ONDEK, und D. S. WILLIAMS, (1998) Mutant myosin VIIa causes defective melanosome distribution in the RPE of shaker-1 mice. *Nat Genet* **19**: 117–8.
- LIU, X., I. P. UDOVICHENKO, S. D. BROWN, K. P. STEEL, und D. S. WILLIAMS, (1999) Myosin VIIa participates in opsin transport through the photoreceptor cilium. *J Neurosci* **19**: 6267–74.
- LIU, X. Z., J. WALSH, P. MBURU, J. KENDRICK-JONES, M. J. COPE, *et al.*, (1997) Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet* **16**: 188–90.
- LYMN, R. W., und E. W. TAYLOR, (1971) Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* **10**: 4617–24.
- MALLIK, R., und S. P. GROSS, (2004) Molecular motors: strategies to get along. *Curr Biol* **14**: R971–82.
- MANSTEIN, D. J., (2004) Molecular engineering of myosin. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* **359**: 1907–12.
- MARON, B. J., (2002) Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *JAMA* **287**: 1308–20.
- MARSTON, S. B., und E. W. TAYLOR, (1980) Comparison of the myosin and actomyosin ATPase mechanisms of the four types of vertebrate muscles. *J Mol Biol* **139**: 573–600.
- MARTI-RENO, M. A., (2003) Modeling Protein Structure from Its Sequence. In *Curr. Protoc. Bioinform.. John Wiley and Sons, Inc.*, 5.1.1.–5.1.32.
- MEHTA, A. D., R. S. ROCK, M. RIEF, J. A. SPUDICH, M. S. MOOSEKER, *et al.*, (1999) Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature* **400**: 590–3.

- MELCHIONDA, S., N. AHITUV, L. BISCEGLIA, T. SOBE, F. GLASER, *et al.*, (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.
- MÉNASCHE, G., A. FISCHER, und G. DE SAINT BASILE, (2002) Griscelli syndrome types 1 and 2. *Am J Hum Genet* **71**: 1237–8; author reply 1238.
- MÉNÉTREY, J., A. BAHLOUL, A. L. WELLS, C. M. YENGO, C. A. MORRIS, *et al.*, (2005) The structure of the myosin VI motor reveals the mechanism of directionality reversal. *Nature* **435**: 779–85.
- MILLAR, N. C., und M. A. GEEVES, (1983) The limiting rate of the ATP-mediated dissociation of actin from rabbit skeletal muscle myosin subfragment 1. *FEBS Lett* **160**: 141–8.
- MILLAR, N. C., und M. A. GEEVES, (1988) Protein fluorescence changes associated with ATP and adenosine 5'-[gamma-thio]triphosphate binding to skeletal muscle myosin subfragment 1 and actomyosin subfragment 1. *Biochem J* **249**: 735–43.
- MILLIGAN, R. A., und P. F. FLICKER, (1987) Structural relationships of actin, myosin, and tropomyosin revealed by cryo-electron microscopy. *J Cell Biol* **105**: 29–39.
- MOOSEKER, M. S., und B. J. FOTH, (2008) The Structural and Functional Diversity of the Myosin Family of Actin-Based Molecular Motors. In L. A. Colluccio, Editor, *Myosins Myosins: A Superfamily of Molecular Motors*, volume 7 of *Proteins and Cell Regulation*. Springer Netherlands, 1–34.
- MORANO, I., G. X. CHAI, L. G. BALTAS, V. LAMOUNIER-ZEPTER, G. LUTSCH, *et al.*, (2000) Smooth-muscle contraction without smooth-muscle myosin. *Nat Cell Biol* **2**: 371–5.
- MORNET, D., P. PANTEL, E. AUDEMARD, und R. KASSAB, (1979) The limited tryptic cleavage of chymotryptic S-1: an approach to the characterization of the actin site in myosin heads. *Biochem Biophys Res Commun* **89**: 925–32.
- MORRIS, C. A., A. L. WELLS, Z. YANG, L.-Q. CHEN, C. V. BALDACCHINO, *et al.*, (2003) Calcium functionally uncouples the heads of myosin VI. *J Biol Chem* **278**: 23324–30.
- MURPHY, C. I., und H. PIWNICA-WORMS, (1995) Overview of the baculovirus expression system. *Current Protocols in Protein Science* .
- MURPHY, C. T., und J. A. SPUDICH, (2000) Variable surface loops and myosin activity: accessories to a motor. *J Muscle Res Cell Motil* **21**: 139–51.
- NACCACHE, S. N., T. HASSON, und A. HOROWITZ, (2006) Binding of internalized receptors to the PDZ domain of GIPC/synectin recruits myosin VI to endocytic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 12735–40.
- NORSTROM, M., und R. S. ROCK, (2009) Non-muscle Myosin IIb Is A Processive Actin-based Motor. *Biophys J* **96**: 141a – 141a.
- NYITRAI, M., und M. A. GEEVES, (2004) Adenosine diphosphate and strain sensitivity in myosin motors. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* **359**: 1867–77.
- O'CONNELL, C. B., und M. S. MOOSEKER, (2003) Native Myosin-IXb is a plus-, not a minus-end-directed motor. *Nat Cell Biol* **5**: 171–2.
- O'CONNELL, C. B., M. J. TYSKA, und M. S. MOOSEKER, (2007) Myosin at work: motor adaptations for a variety of cellular functions. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 615–30.
- ONISHI, H., N. MOCHIZUKI, und M. F. MORALES, (2004) On the myosin catalysis of ATP hydrolysis. *Biochemistry* **43**: 3757–63.
- ONISHI, H., M. F. MORALES, S. KOJIMA, K. KATOH, und K. FUJIWARA, (1997) Functional transitions in myosin: role of highly conserved Gly and Glu residues in the active site. *Biochemistry* **36**: 3767–72.

- OSTAP, E. M., (2002) 2,3-Butanedione monoxime (BDM) as a myosin inhibitor. *J Muscle Res Cell Motil* **23**: 305–8.
- PARK, H., A. LI, L.-Q. CHEN, A. HOUDUSSE, P. R. SELVIN, *et al.*, (2007) The unique insert at the end of the myosin VI motor is the sole determinant of directionality. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 778–83.
- PATEL, H., S. S. MARGOSSIAN, und P. D. CHANTLER, (2000) Locking regulatory myosin in the off-state with trifluoperazine. *J Biol Chem* **275**: 4880–8.
- PATO, M. D., J. R. SELLERS, Y. A. PRESTON, E. V. HARVEY, und R. S. ADELSTEIN, (1996) Baculovirus expression of chicken nonmuscle heavy meromyosin II-B. Characterization of alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem* **271**: 2689–95.
- PECKHAM, M., und P. KNIGHT, (2009) When a predicted coiled coil is really a single α -helix, in myosins and other proteins. *Soft Matter* **5**: 2943–2503.
- PETIT, C., (2001) Usher syndrome: from genetics to pathogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2**: 271–97.
- RAMAMURTHY, B., C. M. YENGO, A. F. STRAIGHT, T. J. MITCHISON, und H. L. SWEENEY, (2004) Kinetic mechanism of blebbistatin inhibition of nonmuscle myosin IIb. *Biochemistry* **43**: 14832–9.
- RAYMENT, I., W. R. RYPNIEWSKI, K. SCHMIDT-BÄSE, R. SMITH, D. R. TOMCHICK, *et al.*, (1993) Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* **261**: 50–8.
- REUBOLD, T. F., S. ESCHENBURG, A. BECKER, F. J. KULL, und D. J. MANSTEIN, (2003) A structural model for actin-induced nucleotide release in myosin. *Nat Struct Biol* **10**: 826–30.
- RIEF, M., R. S. ROCK, A. D. MEHTA, M. S. MOOSEKER, R. E. CHENEY, *et al.*, (2000) Myosin-V stepping kinetics: a molecular model for processivity. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 9482–6.
- RITCHIE, M. D., M. A. GEEVES, S. K. WOODWARD, und D. J. MANSTEIN, (1993) Kinetic characterization of a cytoplasmic myosin motor domain expressed in *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8619–23.
- ROBERTS, R., I. LISTER, S. SCHMITZ, M. WALKER, C. VEIGEL, *et al.*, (2004) Myosin VI: cellular functions and motor properties. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* **359**: 1931–44.
- ROCHLIN, M. W., K. ITOH, R. S. ADELSTEIN, und P. C. BRIDGMAN, (1995) Localization of myosin II A and B isoforms in cultured neurons. *J Cell Sci* **108** (Pt 12): 3661–70.
- ROSENFELD, S. S., A. HOUDUSSE, und H. L. SWEENEY, (2005) Magnesium regulates ADP dissociation from myosin V. *J Biol Chem* **280**: 6072–9.
- ROSENFELD, S. S., J. XING, L.-Q. CHEN, und H. L. SWEENEY, (2003) Myosin IIb is unconventionally conventional. *J Biol Chem* **278**: 27449–55.
- ROVNER, A. S., Y. FREYZON, und K. M. TRYBUS, (1997) An insert in the motor domain determines the functional properties of expressed smooth muscle myosin isoforms. *J Muscle Res Cell Motil* **18**: 103–10.
- RUFF, C., M. FURCH, B. BRENNER, D. J. MANSTEIN, und E. MEYHÖFER, (2001) Single-molecule tracking of myosins with genetically engineered amplifier domains. *Nat Struct Biol* **8**: 226–9.
- RUPPEL, K. M., und J. A. SPUDICH, (1996) Structure-function analysis of the motor domain of myosin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**: 543–73.
- RYDQVIST, B., und H. M. BROWN, (1986) Intracellular free Mg^{2+} in *Balanus* photoreceptor measured with eriochrome blue. *Acta Physiol Scand* **127**: 499–506.

- SAEZ, C. G., J. C. MYERS, T. B. SHOWS, und L. A. LEINWAND, (1990) Human nonmuscle myosin heavy chain mRNA: generation of diversity through alternative polyadenylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 1164–8.
- SAKAMOTO, T., M. R. WEBB, E. FORGACS, H. D. WHITE, und J. R. SELLERS, (2008) Direct observation of the mechanochemical coupling in myosin Va during processive movement. *Nature* **455**: 128–32.
- SAMBROOK, J., (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition (3 Volume Set)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd edition.
- SANAL, O., F. ERSOY, I. TEZCAN, A. METIN, L. YEL, *et al.*, (2002) Griscelli disease: genotype-phenotype correlation in an array of clinical heterogeneity. *J Clin Immunol* **22**: 237–43.
- SCHEIBE, F., H. HAUPT, B. MAZUREK, und O. KÖNIG, (2001) Therapeutic effect of magnesium on noise-induced hearing loss. *Noise Health* **3**: 79–84.
- SCHLIWA, M., und G. WOEHLEKE, (2003) Molecular motors. *Nature* **422**: 759–65.
- SCHRÖDER, R. R., D. J. MANSTEIN, W. JAHN, H. HOLDEN, I. RAYMENT, *et al.*, (1993) Three-dimensional atomic model of F-actin decorated with Dictyostelium myosin S1. *Nature* **364**: 171–4.
- SELF, T., T. SOBE, N. G. COPELAND, N. A. JENKINS, K. B. AVRAHAM, *et al.*, (1999) Role of myosin VI in the differentiation of cochlear hair cells. *Dev Biol* **214**: 331–41.
- SELLERS, J. R., (2000) Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* **1496**: 3–22.
- SELLERS, J. R., F. WANG, und P. D. CHANTLER, (2003) Trifluoperazine inhibits the MgATPase activity and in vitro motility of conventional and unconventional myosins. *J Muscle Res Cell Motil* **24**: 579–85.
- SELLERS, J. R., und L. S. WEISMAN, (2008) Myosin V. In L. A. Colluccio, Editor, *Myosins Myosins: A Superfamily of Molecular Motors*, volume 7 of *Proteins and Cell Regulation*. Springer Netherlands, 289–323. DOI: 10.1007/978-1-4020-6519-4.
- SHAW, M. A., E. M. OSTAP, und Y. E. GOLDMAN, (2003) Mechanism of inhibition of skeletal muscle actomyosin by N-benzyl-p-toluenesulfonamide. *Biochemistry* **42**: 6128–35.
- SI, J., Y. GE, S. ZHUANG, und R. GONG, (2010) Inhibiting nonmuscle myosin II impedes inflammatory infiltration and ameliorates progressive renal disease. *Lab Invest* **90**: 448–58.
- SIEMANKOWSKI, R. F., und H. D. WHITE, (1984) Kinetics of the interaction between actin, ADP, and cardiac myosin-S1. *J Biol Chem* **259**: 5045–53.
- SLEEP, J. A., und E. W. TAYLOR, (1976) Intermediate states of actomyosin adenosine triphosphatase. *Biochemistry* **15**: 5813–7.
- SMITH, C. A., und I. RAYMENT, (1996) Active site comparisons highlight structural similarities between myosin and other P-loop proteins. *Biophys J* **70**: 1590–602.
- SPUDICH, J. A., (1994) How molecular motors work. *Nature* **372**: 515–8.
- SPUDICH, J. A., (2001) The myosin swinging cross-bridge model. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 387–92.
- SPUDICH, J. A., und S. SIVARAMAKRISHNAN, (2010) Myosin VI: an innovative motor that challenged the swinging lever arm hypothesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 128–37.
- STRAIGHT, A. F., A. CHEUNG, J. LIMOUZE, I. CHEN, N. J. WESTWOOD, *et al.*, (2003) Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor. *Science* **299**: 1743–7.
- SWEENEY, H. L., und A. HOUDUSSE, (2007) What can myosin VI do in cells? *Curr Opin Cell Biol* **19**: 57–66.
- SWEENEY, H. L., H. PARK, A. B. ZONG, Z. YANG, P. R. SELVIN, *et al.*, (2007) How myosin VI coordinates its heads during processive movement. *EMBO J* **26**: 2682–92.

- SWEENEY, H. L., S. S. ROSENFELD, F. BROWN, L. FAUST, J. SMITH, *et al.*, (1998) Kinetic tuning of myosin via a flexible loop adjacent to the nucleotide binding pocket. *J Biol Chem* **273**: 6262–70.
- SZENT-GYÖRGYI, A. G., (2004) The early history of the biochemistry of muscle contraction. *J Gen Physiol* **123**: 631–41.
- TAFT, M. H., F. K. HARTMANN, A. RUMP, H. KELLER, I. CHIZHOV, *et al.*, (2008) Dictyostelium myosin-5b is a conditional processive motor. *J Biol Chem* **283**: 26902–10.
- TAKÁCS, B., N. BILLINGTON, M. GYIMESI, B. KINTSES, A. MÁLNÁSI-CSIZMADIA, *et al.*, (2010) Myosin complexed with ADP and blebbistatin reversibly adopts a conformation resembling the start point of the working stroke. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 6799–804.
- TAKAHASHI, M., S. KAWAMOTO, und R. S. ADELSTEIN, (1992) Evidence for inserted sequences in the head region of nonmuscle myosin specific to the nervous system. Cloning of the cDNA encoding the myosin heavy chain-B isoform of vertebrate nonmuscle myosin. *J Biol Chem* **267**: 17864–71.
- TILNEY, L. G., D. J. DEROSIER, und M. J. MULROY, (1980) The organization of actin filaments in the stereocilia of cochlear hair cells. *J Cell Biol* **86**: 244–59.
- TITUS, M. A., (2003) Caveat experimenter—is your myosin really inhibited? *Nat Cell Biol* **5**: 95.
- TODOROV, P. T., R. E. HARDISTY, und S. D. BROWN, (2001) Myosin VIIA is specifically associated with calmodulin and microtubule-associated protein-2B (MAP-2B). *Biochem J* **354**: 267–74.
- TRENTHAM, D. R., R. G. BARDSLEY, J. F. ECCLESTON, und A. G. WEEDS, (1972) Elementary processes of the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase activity of heavy mero-myosin. 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**: 587–94.
- TRYBUS, K. M., (2000) Biochemical studies of myosin. *Methods* **22**: 327–35.
- TRYBUS, K. M., und E. W. TAYLOR, (1982) Transient kinetics of adenosine 5'-diphosphate and adenosine 5'-(beta, gamma-imidotriphosphate) binding to subfragment 1 and actosubfragment 1. *Biochemistry* **21**: 1284–94.
- TSIAVALIARIS, G., S. FUJITA-BECKER, und D. J. MANSTEIN, (2004) Molecular engineering of a backwards-moving myosin motor. *Nature* **427**: 558–61.
- TUXWORTH, R. I., I. WEBER, D. WESSELS, G. C. ADDICKS, D. R. SOLL, *et al.*, (2001) A role for myosin VII in dynamic cell adhesion. *Curr Biol* **11**: 318–29.
- UDOVICHENKO, I. P., D. GIBBS, und D. S. WILLIAMS, (2002) Actin-based motor properties of native myosin VIIa. *J Cell Sci* **115**: 445–50.
- UEMURA, S., H. HIGUCHI, A. O. OLIVARES, E. M. D. L. CRUZ, und S. ISHIWATA, (2004) Mechanochemical coupling of two substeps in a single myosin V motor. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 877–83.
- UYEDA, T. Q., P. D. ABRAMSON, und J. A. SPUDICH, (1996) The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement. *Proc Natl Acad Sci USA* **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., (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* **112**: 467–80.

- VALE, R. D., und R. A. MILLIGAN, (2000) The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* **288**: 88–95.
- VEIGEL, C., L. M. COLUCCIO, J. D. JONTES, J. C. SPARROW, R. A. MILLIGAN, *et al.*, (1999) The motor protein myosin-I produces its working stroke in two steps. *Nature* **398**: 530–3.
- VEIGEL, C., S. SCHMITZ, F. WANG, und J. R. SELLERS, (2005) Load-dependent kinetics of myosin-V can explain its high processivity. *Nat Cell Biol* **7**: 861–9.
- VEIGEL, C., F. WANG, M. L. BARTOO, J. R. SELLERS, und J. E. MOLLOY, (2002) The gated gait of the processive molecular motor, myosin V. *Nat Cell Biol* **4**: 59–65.
- VERKHOVSKY, A. B., und G. G. BORISY, (1993) Non-sarcomeric mode of myosin II organization in the fibroblast lamellum. *J Cell Biol* **123**: 637–52.
- VICENTE-MANZANARES, M., X. MA, R. S. ADELSTEIN, und A. R. HORWITZ, (2009) Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 778–90.
- VOLKMANN, N., und D. HANEIN, (2000) Actomyosin: law and order in motility. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 26–34.
- VREUGDE, S., C. FERRAI, A. MILUZIO, E. HAUBEN, P. C. MARCHISIO, *et al.*, (2006) Nuclear myosin VI enhances RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell* **23**: 749–55.
- WAGNER, P. D., (1981) Formation and characterization of myosin hybrids containing essential light chains and heavy chains from different muscle myosins. *J Biol Chem* **256**: 2493–8.
- WALKER, M. L., S. A. BURGESS, J. R. SELLERS, F. WANG, J. A. HAMMER, *et al.*, (2000) Two-headed binding of a processive myosin to F-actin. *Nature* **405**: 804–7.
- WANG, F., M. KOVACS, A. HU, J. LIMOUZE, E. V. HARVEY, *et al.*, (2003) Kinetic mechanism of non-muscle myosin IIB: functional adaptations for tension generation and maintenance. *J Biol Chem* **278**: 27439–48.
- WATANABE, M., M. YUMOTO, H. TANAKA, H. H. WANG, T. KATAYAMA, *et al.*, (2010) Blebbistatin, a myosin II inhibitor, suppresses contraction and disrupts contractile filaments organization of skinned taenia cecum from guinea pig. *Am J Physiol, Cell Physiol* **298**: C1118–26.
- WATANABE, S., R. IKEBE, und M. IKEBE, (2006) Drosophila myosin VIIA is a high duty ratio motor with a unique kinetic mechanism. *J Biol Chem* **281**: 7151–60.
- WATANABE, S., N. UMEKI, R. IKEBE, und M. IKEBE, (2008) Impacts of Usher syndrome type IB mutations on human myosin VIIa motor function. *Biochemistry* **47**: 9505–13.
- WEIL, D., G. LEVY, I. SAHLY, F. LEVI-ACOBAS, S. BLANCHARD, *et al.*, (1996) Human myosin VIIA responsible for the Usher 1B syndrome: a predicted membrane-associated motor protein expressed in developing sensory epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3232–7.
- WELLS, A. L., A. W. LIN, L. Q. CHEN, D. SAFER, S. M. CAIN, *et al.*, (1999) Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature* **401**: 505–8.
- WHITE, H. D., B. BELKNAP, und M. R. WEBB, (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.
- WHITE, J., J. A. LEE, N. SHAH, und C. H. ORCHARD, (1993) Differential effects of the optical isomers of EMD 53998 on contraction and cytoplasmic Ca²⁺ in isolated ferret cardiac muscle. *Circ Res* **73**: 61–70.
- WILLIAMS, D. S., (2002) Transport to the photoreceptor outer segment by myosin VIIa and kinesin II. *Vision Res* **42**: 455–62.
- XIANG, Z., (2006) Advances in homology protein structure modeling. *Curr Protein Pept Sci* **7**: 217–27.

- YAMAMOTO, K., und T. SEKINE, (1979) Interaction of myosin subfragment-1 with actin. III. Effect of cleavage of the subfragment-1 heavy chain on its interaction with actin. *J Biochem* **86**: 1869–81.
- YANG, Y., T. G. BABOOLAL, V. SITHTHANANDAN, M. CHEN, M. L. WALKER, *et al.*, (2009) A FERM domain autoregulates Drosophila myosin 7a activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 4189–94.
- YANG, Y., M. KOVÁCS, T. SAKAMOTO, F. ZHANG, D. P. KIEHART, *et al.*, (2006) Dimerized Drosophila myosin VIIa: a processive motor. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 5746–51.
- YANG, Y., M. KOVÁCS, Q. XU, J. B. ANDERSON, und J. R. SELLERS, (2005) Myosin VIIB from Drosophila is a high duty ratio motor. *J Biol Chem* **280**: 32061–8.
- YENGO, C. M., L. CHRIN, A. S. ROVNER, und C. L. BERGER, (1999) Intrinsic tryptophan fluorescence identifies specific conformational changes at the actomyosin interface upon actin binding and ADP release. *Biochemistry* **38**: 14515–23.
- YENGO, C. M., L. R. CHRIN, A. S. ROVNER, und C. L. BERGER, (2000) Tryptophan 512 is sensitive to conformational changes in the rigid relay loop of smooth muscle myosin during the MgATPase cycle. *J Biol Chem* **275**: 25481–7.
- YOSHIDA, H., W. CHENG, J. HUNG, D. MONTELL, E. GEISBRECHT, *et al.*, (2004) Lessons from border cell migration in the Drosophila ovary: A role for myosin VI in dissemination of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 8144–9.
- YOSHIDA, Y., T. SHIOI, und T. IZUMI, (2007) Resveratrol ameliorates experimental autoimmune myocarditis. *Circ J* **71**: 397–404.
- YOSHIMURA, M., K. HOMMA, J. SAITO, A. INOUE, R. IKEBE, *et al.*, (2001) Dual regulation of mammalian myosin VI motor function. *J Biol Chem* **276**: 39600–7.
- YUEN, S. L., O. OGUT, und F. V. BROZOVICH, (2009) Nonmuscle myosin is regulated during smooth muscle contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**: H191–9.

Präsentationen

Poster, Dezember 2009

ASCB 49th Annual Meeting, San Diego (CA), USA.

Effects of the Alternatively Spliced Surface Loops on the Kinetics of NMHC-2C

Poster, März 2010

Alpbach Workshop on Molecular Motors 2010; Alpbach, Österreich.

Effects of the Alternatively Spliced Surface Loops on the Kinetics of NMHC-2C

Lebenslauf

Sarah Maria Heißler

Anschrift

Theodor-Heuss-Ring 10
D-30627 Hannover

Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 7. Dezember 1981
Geburtsort: Würzburg, Deutschland
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung

- [08/1988 – 06/2001] Schulausbildung
Abitur am Kurt-Schwitters-Gymnasium Misburg, Hannover
- [10/2001 – 03/2007] Studium der Biochemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Schwerpunkte: Biophysikalische Chemie und Pharmakologie
- [10/2003 – 03/2005] Studium der Tiermedizin
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Abschluss: Vorphysikum
- [07/2006 – 02/2007] Diplomarbeit am Institut für Biophysikalische Chemie der
Medizinischen Hochschule Hannover
Thema: *Expression und Aufreinigung der humanen Mechanoproteine
Dynamin I und Myosin VIIa mit dem Baculovirus-Expressionssystem*
- [03/2007 – 05/2010] Promotion am Institut für Biophysikalische Chemie der
Medizinischen Hochschule Hannover
Thema: *Funktionsanalyse menschlicher Myosin-Motordomänen*