
**Molekulare Aspekte der
Krafterzeugung, Bewegung und Funktion von Myosinen
mittels Strukturaufklärung & Protein Engineering**

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

genehmigte Dissertation von

**Diplom-Biochemikerin Daniela Kathmann
geboren am 14.11.1980 in Hannover**

2010

Referent: Prof. Dr. Georgios Tsiavaliaris
Korreferent: Prof. Dr. Andreas Kirschning
Tag der Promotion: 15.03.2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01.01.2006-30.09.2009 am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. G. Tsiavaliaris angefertigt.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, Daniela Kathmann, die Arbeit selbständig verfasst zu haben.

Es wurden ausschließlich die angegebenen Hilfsmittel verwendet.

Gutachter:

Prof. Dr. Georgios Tsiavaliaris

Institut für Biophysikalische Chemie – Medizinische Hochschule Hannover

Prof. Dr. Andreas Kirschning

Institut für Organische Chemie – Leibniz Universität Hannover



Für meine Eltern

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Georgios Tsiavaliaris und Herrn Prof. Dr. Dietmar Manstein für die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover durchzuführen.

Für die Bereitstellung des spannenden Themas sowie für die hervorragende Betreuung gilt Herrn Prof. Dr. Georgios Tsiavaliaris mein besonderer Dank. Bedanken möchte ich mich auch für die Möglichkeit in die Proteinkristallisation einsteigen zu können.

Herrn Prof. Dr. Andreas Kirschning danke ich für die Übernahme des Korreferats.

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

Mein besonderer Dank gilt auch Claudia Thiel, die seit meiner Diplomarbeit mir im Laboralltag mit Ihren Tips weitergeholfen hat.

Den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Falk Hartmann, Agrani Rump, und Christian Waßmann danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und die tolle Arbeitsatmosphäre. Ich werde meine Promotionszeit immer in Erinnerung behalten.

Danken möchte ich Herrn Dr. Roman Fedorov für die tolle und intensive Einführung in die Welt der Proteinstrukturen. Mein Dank gilt auch Petra Baruch, die mir bei den Arbeiten mit Proteinkristallen mit Ihrer ruhigen Hand stets weitergeholfen hat.

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

Danken möchte ich auch Marieke, Meike, Maike und Lars, die stets Anteil an meiner Promotion genommen haben und wenn nötig für aufmunternde Worte und Aktionen gesorgt haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen lieben Eltern bedanken, die mich all die Jahre immer uneingeschränkt unterstützt haben und immer für mich da waren.

„Die Natur ist unerbittlich und unveränderlich, und es ist ihr gleichgültig, ob die verborgenen Gründe und Arten ihres Handelns dem Menschen verständlich sind oder nicht.“

Galileo Galilei

Summary

Loop-2 in the myosin motor domain is part of the actin binding interface. The initial weak binding of myosin to actin is an electrostatic interaction between positively charged lysine residues in loop-2 and negatively charged residues in subdomain-1 of actin. Charges in loop-2 of the myosin motor domain are known to affect the actin binding and actin dissociation kinetics and are responsible for maintaining a high affinity for actin in the weak binding states, thus preventing diffusion of the myosin head from the actin filament. In consequence, loop-2 appears to be a critical element of the acto.myosin interface throughout the ATPase cycle. Observed differences between *Dictyostelium* myosin-2, smHMM and myosin-5a imply that the role of loop-2 in dictating the kinetic and mechanical properties of myosin can be quite different between individual isoforms and classes. In order to prove this hypothesis, a single headed *Dd*myosin-5b construct was generated in which the original loop-2 was replaced by an engineered sequence containing 6 GKK repeats (K6), increasing the total net charge from +3 to +14. This construct was analyzed by *steady-state* and transient kinetics to determine the influence of charges on actin affinity, ADP release rate, and the coupling between the actin and nucleotide binding sites and compared with results obtained from an equivalent myosin-2 construct. The kinetic data show that the introduction of positive charges in loop-2 reduces the ADP release rates for myosin-2 (~7-fold) and myosin-5b (~2-fold) and increases the affinity for actin in the presence and absence of ADP. In addition the data indicate that the positive charges in loop-2 induce a stronger coupling between nucleotide and actin binding states in non-processive myosins than in processive ones. Therefore, communication between actin and nucleotide binding sites in processive myosins appears to be more tightly controlled by additional mechanisms. The crystal structure of the myosin-5b K6 mutant with a resolution up to 3 Å that has been solved in the present study supports the conclusions made.

Although the processive movement of myosins has been widely investigated, the structural and functional requirements that enable processive myosins to move in a *hand-over-hand* fashion along filamentous actin are still not fully understood. To get further insights into the molecular mechanism of myosin processivity, a dimeric class-5 based myosin motor (M5P) was designed in a structure-based protein engineering approach. The motor comprises the motor domain of myosin-5b from *D. discoideum*, a 13 nm rod shaped domain composed of two α -actinin repeats (2R) which acts as artificial lever, and a GCN4 derived dimerization domain (LZ). To examine whether the artificial dimeric lever region provides sufficient flexibility to support processive movement of M5P, normal mode analyses were performed. The results of the computational analysis revealed a high degree of flexibility in the 2R-LZ segment that is characterized by large scissoring (~9 nm) and tilting (~5 nm) movement around a clearly defined hinge region. The hinge region is located in-between the triple helix repeats of the artificial lever arm. Taking into account the size of the motor domains and the flexibility of M5P, the motor is predicted to move in steps along actin of up to 18 nm. An additional feature of processive myosins is a strain dependent release of ADP from the acto.myosin complex. The results of the kinetic experiments suggest a strain sensitive ADP-release that is comparable to that observed for native processive class-5 myosins. These results indicate that the internal strain in dimeric myosins is not dependent on the type of lever arm. For processive movement of a dimeric myosin a motor domain with a high duty ratio is essential and the lever arm and the dimerization domain have to be flexible enough to assist the processive movement.

Central to the mechanism of myosins are two conserved sequence motifs, switch-1 and switch-2, which contact nucleotide and Mg^{2+} at the rear of the nucleotide-binding pocket. They act as γ -phosphate sensors, thus controlling hydrolysis and product release. The movement of switch-2 from a 'closed' to an 'open' conformation is translated via the relay region into a rotation of the converter domain, which drives the force generating power stroke. It has been proposed that the exchange of S456 by a large amino acid would prevent the complete closing of switch-2 and therefore the full generation of the power stroke. To investigate the molecular details of this coupling mechanism, I have analyzed the structural consequences of the mutation S456Y in switch-2 of the myosin-2 motor domain from *D. discoideum*. It has already been shown that this mutation results in an inability of the motor to effectively bind ATP, a strongly decreased actin affinity in the ADP-bound state, and a reduced velocity in moving actin filaments. In this work I succeeded in solving the crystal structure of the S456Y-mutant in complex with Mg^{2+} .ADP.VO₄ that yielded a resolution of up to 2.4 Å. The overall crystal structure and conformation of the nucleotide binding region resembles that of the wild-type revealing that switch-2 indeed can adopt the 'closed' conformation. A published crystal structure of the mutant in complex with Mg.ADP.BeF_x (PDB 1w9J) reveals incomplete opening of Switch-2. From the two crystal structures the conclusion can be drawn that the complete 'opening' of switch-2 in this mutant is responsible for the full power stroke generation and not the complete 'closing' of this element.

Keywords: myosin, crystal structure, mechanism

Zusammenfassung

Schleife-2 in der Myosinmotordomäne ist Teil der Aktinbindungsregion. Die initiale schwache Bindung von Myosin an Aktin wird durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Lysin in Schleife-2 und negativ geladenen Aminosäuren in Subdomäne-1 des Aktins vermittelt. Es ist bekannt, dass Ladungen in Schleife-2 der Motordomäne die Aktinbindung und -dissoziation beeinflussen und eine hohe Aktinaffinität in den schwach an Aktin gebundenen Zuständen aufrechterhalten, folglich die Diffusion der Motordomäne vom Aktinfilament verhindern. Resultierend scheint Schleife-2 ein entscheidendes Element der Aktomyosininteraktion während des ATPase-Zyklus zu sein. Beobachtete Unterschiede zwischen *Dictyostelium* Myosin-2, smHMM und Myosin-5 implizieren verschiedene Rollen der Schleife-2 in der Festlegung kinetischer und mechanischer Eigenschaften des Myosins zwischen unterschiedlichen Isoformen und Klassen. Zur Überprüfung dieser These wurde ein monomeres *Dd*Myosin-5b-Konstrukt generiert, in dem die native Schleife-2 durch 6 GKK-Einheiten (K6) ersetzt wurde und die Nettoladung von +3 auf +14 erhöht wurde. Dieses Konstrukt wurde kinetisch untersucht, um den Einfluss der Ladungen auf die Aktinaffinität, die ADP-Freisetzung und die Kopplung zwischen Aktin- und Nukleotidbindungszuständen zu analysieren und mit Ergebnissen der äquivalenten *Dd*Myosin-2-Mutante zu vergleichen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Einführung positiver Ladungen in Schleife-2 die ADP-Freisetzung von Myosin-2 (~7) und von Myosin-5b (~2) reduziert und die Aktinaffinität in An- und Abwesenheit von ADP erhöht. Zusätzlich deuten die Ergebnisse an, dass die positiven Ladungen in Schleife-2 eine stärkere Kopplung zwischen Nukleotid- und Aktinbindungszuständen in nicht-prozessiven Myosinen als in prozessiven Myosinen verursachen. Daher scheint die Kommunikation zwischen der Aktinbindungsregion und der Nukleotidbindungsstelle in prozessiven Myosinen durch zusätzliche Mechanismen kontrolliert zu werden. Die hier gelöste Kristallstruktur von *Dd*Myosin-5b-K6 mit einer Auflösung von 3 Å unterstützt diese These.

Die prozessive Bewegung von Myosinen wurde in vielen Studien untersucht. Trotzdem sind die strukturellen und funktionalen Voraussetzungen, die prozessiven Myosinen ermöglichen sich in einem *hand-over-hand*-Mechanismus entlang des Aktinfilaments zu bewegen, nicht ausreichend verstanden. Um weitere Erkenntnisse in den molekularen Mechanismus der Prozessivität von Myosinen zu erlangen, wurde ein dimerer Klasse-5 Myosinmotor (M5P) durch struktur-basiertes *Protein engineering* konstruiert. Der M5P umfasst die Motordomäne von *Dd*Myosin-5b, eine 13 nm-stabförmige Domäne aus zwei α -Aktininunter-einheiten (2R), die als Hebelarm fungiert und eine GCN4-basierte Dimerisierungsregion (LZ). Um zu untersuchen, ob die künstliche dimere Hebelregion ausreichend flexibel ist zur Unterstützung prozessiver Bewegung von M5P, wurden *normal mode*-Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse der Berechnungen zeigten einen hohen Flexibilitätsgrad des 2R-LZ-Segments, der durch zwei große Bewegungen (~9 nm und ~5 nm) im 90°-Winkel zu einander um ein Gelenk charakterisiert ist. Diese Gelenkregion befindet sich zwischen den Tripelhelixelementen des Hebelarms. Werden die Größe der Motordomänen und die Flexibilität von M5P zusammen betrachtet, kann vorhergesagt werden, dass der Motor Schritte von bis zu 18 nm machen kann. Eine weitere Eigenschaft prozessiver Myosine ist die spannungsabhängige ADP-Freisetzung aus dem Akto-Myosin-Komplex. Ergebnisse kinetischer Experimente weisen auf eine spannungssensitive ADP-Freisetzung vergleichbar mit der in nativ prozessiven Klasse-5 Myosinen hin. Diese Ergebnisse deuten an, dass die intramolekulare Spannung nicht von der Art des Hebelarms abhängt. Für prozessive Bewegung dimerer Myosine sind eine Motordomäne mit einer hohen *duty ratio* gefolgt von einem Hebelarm und einer Dimerisierungsdomäne, die flexibel genug zur Unterstützung prozessiver Bewegung sind, Voraussetzung.

Wichtig für den Mechanismus von Myosinen sind zwei konservierte Sequenzmotive, Schalter-1 und Schalter-2, die das Nukleotid und Mg^{2+} in der Nukleotidbindungstasche koordinieren. Sie fungieren als γ -Phosphatsensor und kontrollieren folglich die Hydrolyse und Produktfreisetzung. Die Bewegung von Schalter-2 von einer „geschlossenen“ zu einer „offenen“ Konformation wird über die Relayhelix in eine Rotation des Konverters umgewandelt, die in einem Kraftschlag resultiert. Es wurde vorgeschlagen, dass der Austausch von S456 mit einem größeren Aminosäurerest das Schließen des Schalter-2 verhindern würde und folglich die volle Erzeugung des Kraftschlags. Um die molekularen Details dieses Kopplungsmechanismus zu untersuchen, habe ich die strukturellen Konsequenzen der Mutation S456Y in Schalter-2 der Motordomäne von *Dd*Myosin-2 untersucht. Es wurde bereits gezeigt, dass die Mutation eine effektive ATP-Bindung verhindert, die Aktinaffinität in Anwesenheit von ADP stark erniedrigt und eine reduzierte Geschwindigkeit der Bewegung von Aktinfilamenten aufweist. In dieser Arbeit wurde die Kristallstruktur der S456Y-Mutante im Komplex mit Mg^{2+} .ADP.VO₄ mit einer Auflösung von 2,4 Å gelöst. Die Kristallstruktur im Ganzen und die Nukleotidbindungstasche gleichen der Wildtypstruktur und zeigt, dass sich Schalter-2 komplett schließen kann. Eine veröffentlichte Struktur dieser Mutante im Komplex mit Mg^{2+} .ADP.BeF_x zeigte eine nicht vollständige Öffnung des Schalters. Anhand dieser beiden Strukturen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die vollständige Öffnung des Schalter-2 in dieser Mutante verantwortlich für einen kompletten Kraftschlag ist und nicht ein vollständiges Schließen dieses Elements.

Schlüsselwörter: Myosin, Kristallstruktur, Mechanismus



INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Molekulare Motoren	1
1.1.1. Myosine	2
1.1.2. Struktureller Aufbau der Myosinmotordomäne	3
1.1.2.1. Aktinbindungsregion und die Bindung an Aktin	5
1.1.2.2. Nukleotidbindungsregion	7
1.1.3. Strukturelles Modell des ATPase-Zyklus	8
1.1.4. Mechanismus der Prozessivität	14
1.1.5. <i>DdMyosin-5b</i>	15
1.1.6. <i>DdMyosin-2</i>	16
1.2. Röntgenstrukturanalyse von Proteinen	17
1.2.1. Theoretische Grundlagen der Röntgenstrukturanalyse	17
1.2.2. Analyse der B-Faktoren einer Proteinkristallstruktur	20
1.3. Zielsetzung der Arbeit	20
Abkürzungsverzeichnis	22
2. MATERIAL UND METHODEN	24
2.1. Material	24
2.1.1. Chemikalien	24
2.1.2. Geräte	27
2.1.3. Verbrauchsmaterialien	28
2.1.4. Antibiotika	29
2.1.5. Enzyme und Antikörper	29
2.1.6. Organismen	30
2.1.6.1. Bakterienstamm	30
2.1.6.2. Zelllinie	30
2.1.7. Oligonukleotide	30
2.2. Molekularbiologische Methoden	31
2.2.1. Klonierung von Plasmiden	31
2.2.1.1. Plasmidpräparation	31
2.2.1.2. Restriktionsspaltung	32

2.2.1.3.	Agarosegelelektrophorese	33
2.2.1.4.	Isolierung der DNA aus Agarosegelen	33
2.2.1.5.	Ligation linearer DNA	34
2.2.1.6.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	34
2.2.1.7.	DNA-Aufreinigung	35
2.3.	Mikrobiologische Methoden	36
2.3.1.	Transformation von <i>E.coli</i>	36
2.4.	Zellbiologische Methoden	37
2.4.1.	Transformation von <i>D.Discoideum</i>	37
2.4.2.	Kultivierung von <i>D. discoideum</i>	37
2.4.3.	Konservierung von <i>D. discoideum</i> Sporen	38
2.5.	Proteinbiochemische Methoden	39
2.5.1.	Proteinkonzentrationsbestimmung durch UV-Absorptions-messung bei 280 nm	39
2.5.2.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	39
2.5.3.	Western Blot	41
2.5.4.	Analytische Proteinpräparation	42
2.5.5.	Aufreinigung von Aktin aus Kaninchenmuskel	44
2.5.6.	Präparation von F-Aktin	45
2.5.7.	Präparation von Pyren-markiertem F-Aktin	46
2.5.8.	Präparative Aufreinigung rekombinanter Myosine aus <i>D. discoideum</i>	47
2.6.	Biophysikalische Methoden	52
2.6.1.	Kinetiken im Fließgleichgewicht	52
2.6.2.	Stopped-Flow-Messungen	53
2.7.	Röntgenkristallographische Methoden	55
2.7.1.	Proteinkristallisation	55
2.7.1.1.	Microseeding	57
2.7.1.2.	Einfrieren von Myosinkristallen zur Datensammlung	58
2.7.2.	Datensammlung und Datenverarbeitung	59
2.7.3.	Lösung und Optimierung der Struktur und Generierung eines Modells	60
2.7.3.1.	Molekularer Ersatz	60
2.7.3.2.	Optimierung des Modells und der Elektronendichtekarte	60
2.7.3.3.	Erstellen des Modells	61
2.7.3.4.	Interpretation der Struktur und Erstellen der Abbildungen	61
2.7.3.5.	Analyse der B-Faktoren	62
3.	ERGEBNISSE	63

3.1. Struktur-Funktionsuntersuchung der Schleife-2 in Myosinen	63
3.1.1. Darstellung des Expressionsvektors für <i>DdMyosin-5b-K6</i>	64
3.1.2. Kinetische Charakterisierung der <i>DdMyosin-5b-Schleife-2-Mutante</i>	65
3.1.2.1. Kinetiken von <i>DdMyosin-5b-K6</i> im Fließgleichgewicht	65
3.1.2.2. Interaktion von <i>DdMyosin-5b-K6</i> mit Aktin	68
3.1.2.3. Interaktion von <i>DdMyosin-5b-K6</i> mit Aktin in Anwesenheit von ADP	70
3.1.2.4. Interaktion von <i>DdMyosin-5b-K6</i> mit ADP	72
3.1.2.5. Interaktion von Akto.Myosin-5b-K6 mit ADP	74
3.1.2.6. Einfluss des K6-Motivs in Schleife-2 auf die Kopplung in <i>DdMyosin-5b</i> und <i>DdMyosin-2</i>	76
3.1.2.7. Messung der ADP-Dissoziation aus dem Akto.Myosin-Komplex von <i>DdMyosin5b-K6</i> mit verschiedenen Salzkonzentrationen	77
3.1.3. Röntgenstrukturanalyse der <i>DdMyosin-5b-K6-Mutante</i>	79
3.1.3.1. Kristallisation von <i>DdMyosin-5b-K6-2R</i>	79
3.1.3.2. Aufklärung der Kristallstruktur von <i>DdMyosin-5b-K6</i>	81
3.1.3.3. Analyse der Kristallstruktur von <i>DdMyosin-5b-K6</i>	82
3.1.3.4. Die Konformation des künstlichen Hebelarms	85
3.2. Struktur basiertes Protein Engineering eines künstlichen prozessiven Myosins	89
3.2.1. Molekulares Modelling eines prozessiven Motors	90
3.2.2. <i>Normal mode</i> Analyse	91
3.2.3. Darstellung des artifiziellen Myosin-5b-Dimers	93
3.2.4. Kinetik des Fließgleichgewichts von M5P	94
3.2.5. ATP-Bindung des künstlichen Myosin-5b-Dimers	96
3.2.6. ADP-Dissoziation aus dem ternären Komplex mit Akto.Myosin	97
3.2.7. 2'-deoxy-mantATP-Bindung an Akto.Myosin von M5P	99
3.3. Auswirkung des Schalter-2 auf den Kraftschlag	100
3.3.1. Kristallisation der <i>DdMyosin-2 S456Y-Mutante</i>	101
3.3.2. Aufklärung der Kristallstruktur der <i>DdMyosin-2 S456Y-Mutante</i>	101
3.3.3. Vergleich der Kristallstruktur von <i>DdMyosin-2-S456Y</i> mit <i>DdMyosin-2</i>	103
3.3.4. Kristallstruktur der Myosin-2 S456Y-Mutante im Komplex mit ADP.BeF _x	106
3.3.5. B-Faktoren-Analyse der Myosin-2 Wildtypstrukturen und deren Schalter-2-Mutanten	109
4. DISKUSSION	112
4.1. Struktur-Funktionsanalysen geben Einblicke in die Funktionsweise von Schleife-2	112
4.1.1. Änderungen der Nettoladung in Schleife-2 wirken sich auf die maximale ATPase-Geschwindigkeit von <i>DdMyosin-5b</i> und <i>DdMyosin-2</i> aus	113
4.1.2. Schleife-2 zeigt unterschiedliche Funktionen in Bezug auf den Kopplungsmechanismus von <i>DdMyosin-2</i> und <i>DdMyosin-5</i>	114

4.1.3.	Die Kristallstruktur von <i>DdMyosin-5b-K6-2R</i> zeigt die Motordomäne von <i>Dictyostelium Myosin-5b</i> in einer <i>rigor-like</i> -Konformation	116
4.2.	Strukturbasiertes <i>Protein Engineering</i> ermöglicht die Darstellung eines künstlichen prozessiven Motors	119
4.3.	Abhängigkeit der Modulation des Kraftschlags von Schalter-2	122
5.	LITERATUR	125
6.	PUBLIKATIONEN	135
7.	LEBENS LAUF	136

1. EINLEITUNG

1.1. Molekulare Motoren

Myosine zählen, neben Kinesinen und Dyneinen, zu der Gruppe der molekularen Motoren, die für Bewegungsvorgänge der eukaryotischen Zelle verantwortlich sind. Mitglieder dieser Klassen arbeiten nach dem gleichen grundlegenden Mechanismus. Sie sind in der Lage, die aus der ATP-Hydrolyse gewonnene Energie in gerichtete Bewegung entlang von Proteinfilamenten des Cytoskeletts umzusetzen. Motorproteine sind in der Zelle zum einen an Prozessen wie Transport von Organellen, Vesikeln und Membranen beteiligt, zum anderen spielen sie eine wichtige Rolle bei der Chromosomentrennung während der Zellteilung, der Zellbewegung und Veränderungen der Zellform, der Rotationsbewegung der eukaryotischen Cilien und prokaryotischer Flagellen sowie der Muskelkontraktion [Vale und Milligan, 2000]. Dyneine und Kinesine sind mikrotubuli-assoziierte Motorproteine [Vale, 1987; Karki und Holzbaur, 1999; Verhey und Rapoport, 2001], Myosine hingegen interagieren mit filamentösem Aktin [Milligan und Flicker, 1987].

Das erste Myosin, das Skelettmuskelmyosin, wurde bereits im 19. Jahrhundert entdeckt [Kühne, 1864]. Bis heute wurden im Menschen 39 Myosingene aus 12 verschiedenen Klassen identifiziert. Der Modellorganismus Maus verfügt beispielsweise über 26 Myosingene aus sieben Klassen, in *D. discoideum* sind es 13 Myosine aus fünf Klassen [Kollmar, 2006] und sogar in der Hefe *S. cerevisiae* existieren fünf Myosine aus drei verschiedenen Klassen [Brown, 1997].

Beim Menschen führen Mutationen in vielen der Myosingene zu schweren Krankheiten. Die genetisch bedingte familiäre hypertrophe Kardiomyopathie beruht auf einer Mutation in der β -kardialen Isoform von Myosin-II, die eine Myokardverdickung verursacht und zu plötzlichem Herzstillstand führen kann [Bonne *et al.*, 1998]. Die autosomal rezessiv vererbte Krankheit Usher 1, verursacht durch Mutationen in einem Gen für Myosin-7A, kennzeichnet sich durch angeborene Taubheit und langsamen Absterben der Photorezeptoren [Boeda *et al.*, 2002]. Des Weiteren können Punktmutationen in den Genen für Myosin-6 und Myosin-7A zu Taubheit und Störungen des Gleichgewichtsinns führen [Melchionda *et al.*, 2001; Tamagawa *et al.*, 2002] und Mutationen in den Genen der nicht-muskulären Myosine 2A

und 2B weisen eine Rolle in der Entstehung und des Wachstums von Tumoren auf [Betapudi *et al.*, 2006].

Grundlegende Mechanismen der Funktionalität von Myosinen und damit verbunden Myosin-abhängige Prozesse in der Zelle zu erforschen bietet die Möglichkeit durch Myosindefekte hervorgerufene Krankheiten zu verstehen. Daher ist die strukturelle und funktionelle Charakterisierung verschiedener Myosine die Basis zum Verständnis von Bewegung und Kraftentwicklung als auch zur Therapie myosinbedingter Krankheiten.

1.1.1. Myosine

Myosin aus der Skelettmuskulatur gehört zu den am besten charakterisierten Myosinen. Es gehört zu der Myosinklasse 2, die auch als konventionelle Myosine bezeichnet werden. Die weiteren identifizierten Myosine verschiedener eukaryotischer Zellen, die nicht der Klasse 2 angehören, werden als unkonventionelle Myosine bezeichnet [Kollmar, 2006]. Bis heute wurde die Familie der Myosine anhand von Sequenzvergleichen der konservierten Motor-domänen in 24 Klassen eingeteilt [Foth *et al.*, 2006]

Myosine aller Klassen zeigen den gleichen systematischen Aufbau. N-terminal weisen sie eine hochkonservierte globuläre Motordomäne, auch Myosinkopf genannt auf. Die Motordomäne ist zum einen für die ATP-Umsetzung verantwortlich, zum anderen vermittelt sie die Interaktion mit Aktin. Nach der Motordomäne folgt eine α -helikale Nackenregion mit ein oder mehreren IQ-Motiven. Die IQ-Motive haben die Sequenz (I/x)Qxx(Y/F/W)Rx(Y/F/W)xx(R/x) und sind Bindungsstellen für leichte Ketten und Calmoduline [Bähler und Rhoads, 2002; Kollmar *et al.*, 2006]. Es gibt sowohl regulatorische als auch die Nackendomäne stabilisierende leichte Ketten. Die stabilisierenden leichten Ketten unterstützen die stabförmige Struktur der Nackendomäne, so dass die aus der ATP-Hydrolyse gewonnene Energie in eine hebelartige Bewegung des Nackens, den sogenannten Kraftschlag (*power stroke*) umgesetzt werden kann. Dieser Mechanismus bildet die Basis für die Theorie des schwingenden Hebelarms (*swinging lever arm*), die die Nackenregion als steifen Hebelarm beschreibt, der Konformationsänderungen der ATP-Bindungs tasche verstärkt und die gerichtete Bewegung entlang des Aktinfilaments bewirkt [Holmes, 1997]. Die regulatorischen leichten Ketten hingegen haben Einfluss auf die Aktivität des Myosins, so wird beispielsweise die Aktivität von *Dd*Myosin-2 durch Bindung einer phosphorylierten leichten Kette aktiviert [de la Roche *et al.*, 2002].

Am C-terminalen Ende folgt die Schwanzdomäne, diese weist die geringste Sequenzhomologie innerhalb der Myosinfamilie auf. Manche dieser Domänen sind in der Lage superspiralisierte Strukturen auszubilden, die als Dimerisierungsregion für die Bildung doppelköpfiger Myosine fungieren [Sellers, 2000]. Andere Schwanzdomänen wiederum besitzen funktionale Untereinheiten, wie beispielweise SH3-Domänen, die spezifische Interaktionen mit prolinreichen Regionen vermitteln [Mayer und Gupta, 1996] oder FERM-Domänen, die Wechselwirkungen mit Membranproteinen ermöglichen [Chishti *et al.*, 1998]. Die zelluläre Lokalisation eines Myosins und seine Funktionen werden maßgeblich durch Strukturelemente in der Schwanzregion vermittelt [Krendel und Mooseker, 2005]

1.1.2. Struktureller Aufbau der Myosinmotordomäne

Myosine verschiedener Klassen weisen vielfältige Aufgaben in der Zelle und kinetisch und funktionell große Unterschiede auf. Trotz dieser Unterschiede ist die dreidimensionale Struktur der Motordomäne in allen Myosinklassen hochkonserviert [Berg *et al.*, 2001]. Um den Mechanismus der Kraft- und Bewegungsentwicklung erforschen zu können, sind insbesondere hochauflösende Strukturen der Myosine notwendig. Ein Myosin in seiner kompletten Länge, mit Motor-, Nacken- und Schwanzdomäne konnte bisher nicht kristallisiert werden. Aus diesem Grund werden für die Kristallisation rekombinant hergestellte bzw. proteolytisch gespaltene Motordomänen verwendet.

Es konnten Motordomänen verschiedener Klassen mit unterschiedlichen Nukleotidanaloga kristallisiert werden und die Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse gelöst werden. So konnte die Struktur der *Dd*Myosin-2-Motordomäne mit verschiedenen Nukleotiden und Nukleotidanaloga (ADP, ADP.BeF_x, ATP, ADP.VO₄, ADP.AIF₄) und ohne Nukleotid (apo) gelöst und daraus resultierend verschiedene Konformationen des ATPase-Zyklus aufgeklärt werden [Rayment *et al.*, 1993; Fisher *et al.*, 1995, Smith *et al.*, 1996; Gulick *et al.*, 1997; Bauer *et al.*, 2000]. Von Myosinen der Klasse 5 aus dem Huhn wurden Strukturen im nukleotidfreien Zustand sowie mit ADP und ADP.BeF_x kristallisiert. [Coureux *et al.*, 2003; Coureux *et al.*, 2004]. Bei der *Gg*Myosin-5-Struktur im nukleotidfreien Zustand gelang es, ein Konstrukt mit Motordomäne, Nackendomäne und gebundenen essentiellen leichten Ketten zu kristallisieren. Des Weiteren konnte die Struktur der Motordomäne von konventionellen Myosinen aus der Muschel [Houdusse *et al.*, 1999 und 2000], der glatten Muskulatur von Wirbeltieren [Dominguez *et al.*, 1998] und der Klasse 1 aus *Dictyostelium discoideum* [Kollmar, *et al.*, 2002] gelöst werden. Alle Myosinmotordomänen weisen einen sehr ähnlichen strukturellen Aufbau auf. Differenzen in der dreidimensionalen Struktur finden sich nahezu nur an flexib-

len Oberflächenstrukturen, in der Nukleotidbindungsregion und der Aktinbindungsregion. Variationen sind in der Länge, der Ladung oder der Aminosäurezusammensetzung dieser Regionen zu beobachten. Diese Differenzen treten in funktionell, kinetisch und mechanisch relevanten Regionen, die die Eigenschaften des Myosins determinieren, auf und stellen Anpassungen an die zellulären Aufgaben der Myosine dar [Vale und Milligan, 2000].

In Abbildung 1 ist die Struktur der *Dd*Myosin2-Motordomäne mit gebundenem Mg.ATP [Bauer *et al.*, 2000] dargestellt. Die üblichen Bezeichnungen der Domänen der Motordomäne resultieren aus dem tryptischen Verdau des Myosinkopfs von Myosin-2. Dabei entstehen ein 25 kDa-Fragment, die N-terminale Region (grün), ein C-terminales 20 kDa-Fragment bzw. die Konverterdomäne (blau) und ein 50 kDa-Proteinfragment. Das 50 kDa-Fragment (rot) wird in eine obere 50 kDa-Domäne und eine untere 50 kDa-Domäne unterteilt.

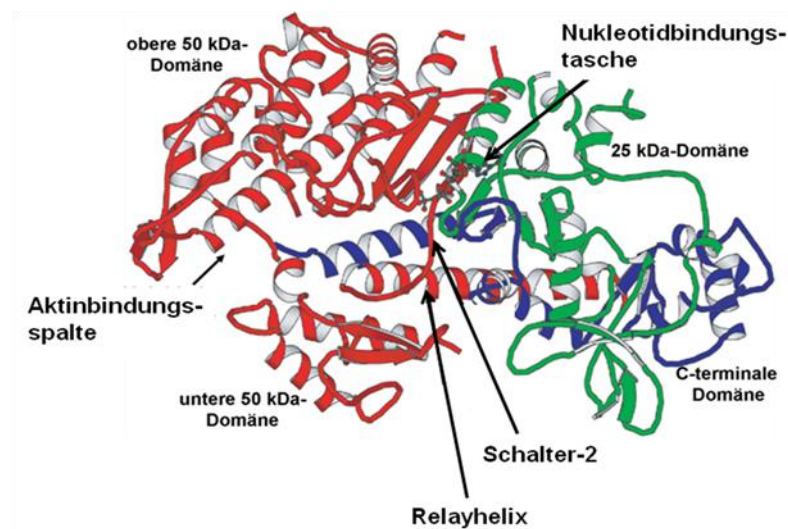


Abb. 1: Kristallstruktur der *Dd*Myosin2-Motordomäne im Mg.ATP-Zustand [PDB-Bank-Eintrag 1FMW, Bauer *et al.*, 2000]

Die 50 kDa-Domäne ist durch einen langen von der Oberfläche bis zur Nukleotidbindungstasche reichenden Spalt separiert, der die Aktinbindungsregion bildet. An der Oberfläche dieser Spalte befinden sich die Oberflächenschleifen Schleife-2 und die CM-Schleife, die eine Funktion in der Bindung an Aktin einnehmen [Geeves *et al.*, 2003]. Schleife-2 verbindet die 20 kDa-Domäne mit der 50-kDa-Domäne.

Die Relayhelix befindet sich in der unteren 50 kDa-Domäne und verbindet die Konverterdomäne mit der Nukleotidbindungsregion. Diese Helix ist zusammen mit dem Schalter-2 aus der Nukleotidbindungstasche eine wichtige strukturelle Komponente während des Kraftschlags.

Die N-terminale 25 kDa-Domäne ist über Schleife-1 mit der oberen 50 kDa-Domäne verbunden. Die obere 50 kDa-Domäne bildet eine zentrale β -Faltblattregion, bestehend aus sieben β -Faltblättern, aus. Die Myosinmotordomäne weist strukturell eine hohe Homologie zu Kinesinen, Dyneinen und G-Proteinen auf. Diese Proteine besitzen ebenfalls eine zentrale β -Faltblattregion.

Diese Struktur repräsentiert die Konformation nach dem Kraftschlag. In dieser Konformation sind die untere und obere 50 kDa-Domäne weit voneinander entfernt, Diese Anordnung der Aktinbindungsregion wird als „offen“ bezeichnet. Dies hat zur Folge dass, der Aktinbindungsspalte und damit die Interaktionselemente für die Aktinbindung weit voneinander entfernt sind und die Aktinbindung geschwächt ist.

1.1.2.1. Aktinbindungsregion und die Bindung an Aktin

Rekonstruktionen dreidimensionaler Kryoelektronenmikroskopieaufnahmen von Aktinfilamenten dekoriert mit Myosin zeigen, dass je eine Myosinmotordomäne an ein Aktinmonomer bindet [Rayment *et al.*, 1993; Holmes *et al.*, 2003; Schröder *et al.*, 1993]. In diesen Modellen wird deutlich, dass ein primärer Kontakt mit der Subdomäne 1 des einen Aktinmonomers und eine sekundäre Kontaktfläche mit Subdomäne 2 des folgenden Aktinmonomers existiert (siehe Abbildung 2) [Schröder *et al.*, 1993; van Dijk *et al.*, 1999]. Die primäre Aktinbindungsregion besteht aus mehreren Komponenten der Myosinmotordomäne. Zum einen aus Schleife-2, die die untere und obere 50 kDa-Domänen verbindet. Schleife-2 ist sowohl an der schwachen als auch an der starken Bindung zu Aktin beteiligt [Geeves *et al.*, 2005]. Die Konformationen dieser Oberflächenschleife sind sehr verschieden in den Myosinklassen [Geeves *et al.*, 2005]. Gemeinsam ist ihnen, dass Schleife-2 positiv geladene Aminosäuren aufweist, die mit der Subdomäne 1 des Aktins elektrostatische Wechselwirkungen der anfänglichen schwachen Bindung des Myosins an Aktin ausbilden [Sutoh *et al.*, 1991; Uyeda *et al.*, 1994; Furch *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 1995 und 1996; Wong *et al.*, 1999].

Zum anderen wird die Aktinbindungsregion von dem Helix-Schleife-Helix-Motiv der unteren 50 kDa-Domäne gebildet. Dieses Motiv weist hydrophobe Aminosäurereste auf, die flankiert werden von komplementären ionischen und polaren Aminosäuren und elektrostatische Wechselwirkungen aufweisen. In Mutationsstudien von *DdMyosin-2* konnte gezeigt werden, dass die Einführung einer negativen Ladung (Mutation Q532E) zu einer fünffach höheren Aktinaffinität führt [Furch *et al.*, 2000].

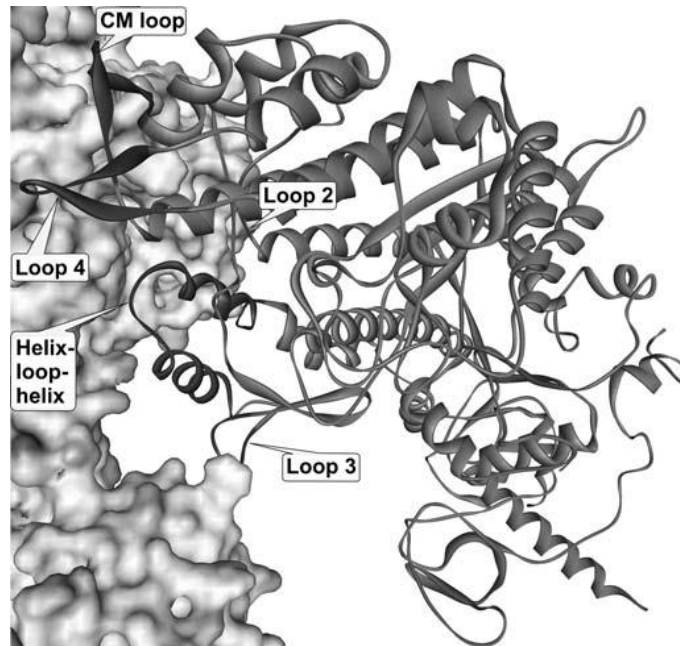


Abb. 2: Die Abbildung zeigt die Myosinmotordomäne (Ribbon-Darstellung) gebunden an ein Aktinfilament. Die Strukturelemente der Aktinbindungsregion in der Motordomäne sind Schleife-2, Schleife-3, Schleife-4, das Helix-Schleife-Helix-Motiv und die CM-Schleife [Geeves *et al.*, 2005]

Weiterhin sind die CM-Schleife und Schleife-4 der oberen 50 kDa-Domäne Teile der primären Aktinbindungsregion. In Falle von *DdMyosin-2* konnte in Mutationsstudien gezeigt werden, dass die Schleife-4 an der Stabilisierung des Akto.Myosin-Komplexes, insbesondere des schwach gebundenen Akto.Myosin-Komplexes, beteiligt ist [Gyimesi *et al.*, 2008]. Diese Schleife ist nicht hoch konserviert in den verschiedenen Myosinklassen, aber viele Myosine weisen negativ geladene Aminosäuren in dieser Schleife auf. Viele unkonventionelle Myosine haben eine längere Schleife-4, die ebenfalls an der Stabilisierung des Akto.Myosin-Komplexes beteiligt ist [Geeves *et al.*, 2005].

Die CM-Schleife liegt an der Oberfläche der Myosinmotordomäne und ist wichtig für die Myosinaktivität. Eine Gruppe hydrophober Aminosäuren in der CM-Schleife ist an der Aufrechterhaltung der starken Bindung an Aktin beteiligt. Mutationsstudien in dieser Region zeigten, dass durch die Entfernung der hydrophoben Aminosäuren die Nukleotidinteraktion nicht gestört ist, aber die Aktinmyosinrenzfläche lokal unterbrochen ist [Sasaki *et al.*, 1999].

Schleife-3 der oberen 50 kDa-Domäne befindet sich am unteren Ende der Aktinbindungsregion und bildet über elektrostatische Interaktionen eine sekundäre Aktinbindungsstelle zur Subdomäne 2 des tiefer gelegenen Aktinmoleküls des Filaments aus [van Dijk *et al.*, 1999].

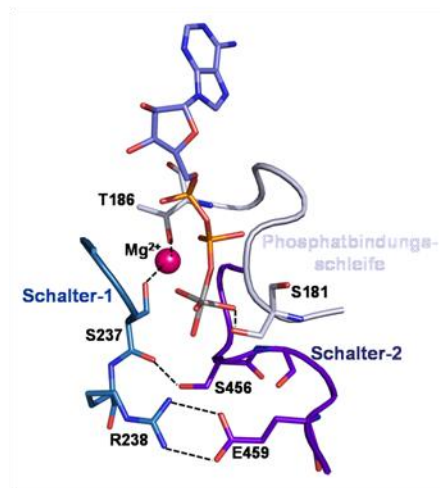
Die Interaktion zwischen Myosin und Aktin findet in drei Schritten statt [Geeves *et al.*, 1984]. Im ersten Schritt bildet sich ein Kollisionskomplex aus Aktin und Myosin der auf weitreichen-

den elektrostatischen Wechselwirkungen der positiv geladenen Oberflächenschleife Schleife-2 des Myosins mit dem negativ geladenen N-Terminus des Aktins basiert [Schröder *et al.*, 1993; Rayment *et al.*, 1993]. Aufgrund der elektrostatischen Interaktion ist die Bildung dieses ersten Komplex von der Ionenstärke abhängig [Furch *et al.*, 1998]. Die nachfolgende Isomerisierung (A-Zustand) führt zu spezifischen hydrophoben Wechselwirkungen, daraus folgt eine schwache Bindung des Aktins an Myosin, der (*A-state*). Beim abschließenden Übergang zum stark an Aktin gebundenen Zustand (*R-state*) schließt sich die Spalte zwischen der oberen und unteren 50 kDa-Domäne, so dass alle Interaktionen an der Aktomyosin-Grenzfläche ausgebildet werden können [Conibear *et al.*, 2003]. Diese Stärkung der Aktin-Myosin-Bindung schwächt gleichzeitig die Affinität des gebundenen Nukleotids.

1.1.2.2. Nukleotidbindungsregion

Die Nukleotidbindungsregion in Myosin weist sowohl von der Sequenz als auch von der atomaren Struktur her Ähnlichkeiten mit Kinesin, einem weiteren ATP-hydrolysierenden Motorprotein als auch mit G-Proteinen auf [Kull *et al.* 1996; Vale, 1996; Kull und Endow, 2002]. Die Nukleotidbindungstasche setzt sich aus drei Elementen zusammen, aus Schalter-1 (Aminosäuren N233-R238 von Myosin-2 aus *Dictyostelium discoideum*, die folgenden Nummerierungen beziehen sich auf *DdMyosin-2*), Schalter-2 (D454-E459) und der Phosphatbindungsschleife (G179-T186) [Cope *et al.* 1996] (siehe Abbildung 3).

Diese drei Strukturelemente interagieren während des ATPase-Zyklus sowohl mit dem Nukleotid als auch untereinander. Die Hauptkettenamide der Phosphatbindungsschleife bilden Wasserstoffbrückenbindungen zu den Sauerstoffatomen des α - und β -Phosphats des ATPs aus, während die γ -Phosphatgruppe sowohl mit der Phosphatbindungsschleife als auch mit den hoch konservierten Serinen des Schalter-1 interagiert. Im Übergangszustand der Hydrolyse wird ein Sauerstoff des γ -Phosphats an das Hauptkettenstickstoffatom des Gly457 aus Schalter-2 über eine Wasserstoffbrücke gebunden. Das Ser237 des Schalter-1 koordiniert zusätzlich das in der Nukleotidbindungstasche anwesende Magnesiumion [Shimada *et al.*, 1997; Reubold *et al.*, 2003]. Die katalytisch aktive Konformation der Nukleotidbindungstasche wird durch die Ausbildung einer Salzbrücke des Glu459 in Schalter-2 mit Arg238 des Schalter-1 stabilisiert [Furch *et al.*, 1999; Reubold *et al.*, 2003]. Myosinmutanten in denen die Bildung der Salzbrücke gestört ist, sind nicht zur ATP-Hydrolyse befähigt [Onishi *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 2003; Furch *et al.*, 1999].



	Konsensussequenz
Phosphatbindungsschleife	GESGAGKT
Schalter-1	NxNSSR
Schalter-2	DlxGFE

Abb. 3: Darstellung der Nukleotidbindungstasche von *DdMyosin-2* mit Schalter-1, Schalter-2 und der Phosphatbindungsschleife mit gebundenem Mg^{2+} .ADP.VO₄, welches ADP.P_i in der Nukleotidbindungstasche initiiert. Die Tabelle zeigt die Konsensussequenz der Strukturelemente der Nukleotidbindungstasche innerhalb der Myosinklassen.

Die Schalter der Nukleotidbindungstasche Schalter-1 und -2 können abhängig vom Nukleotidzustand jeweils in zwei Konformation vorliegen, in der offenen und geschlossenen Form [Spudich, 2001; Geeves *et al.*, 2005]. Schalter-2 gilt als geschlossen, wenn das hochkonservierte Gly457 über die Amidgruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zum γ -Phosphat ausbilden kann. Ist der Schalter zu weit entfernt, um diese Wechselwirkung aufzubauen, wird diese als offen bezeichnet. Schalter-1 wird als geschlossen angesehen, wenn die Seitenkette des Ser237 das Magnesiumion koordiniert. Geöffnet ist dieser Schalter, wenn die Koordination des Mg^{2+} nicht mehr ausgeführt werden kann [Reubold *et al.*, 2003].

1.1.3. Strukturelles Modell des ATPase-Zyklus

Die Myosinmotordomäne ist in der Lage ATP zu hydrolysieren und mit Aktinfilamenten zu interagieren. Dabei sind die ATP-Hydrolyse und die Bewegung entlang von Aktinfilamenten wie im Modell des Lymn-Taylor-Zyklus [Lymn, R.W. und Taylor, E.W. 1971] beschrieben aneinander gekoppelt. Das gegenwärtige Modell des ATPase-Zyklus beruht auf Kristallstrukturen von Myosinen in verschiedenen Zuständen des Zyklus und darauf basierenden Modellberechnungen [Rayment *et al.*, 1993; Reubold *et al.*, 2003; Geeves *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2005; Koppole *et al.*, 2007].

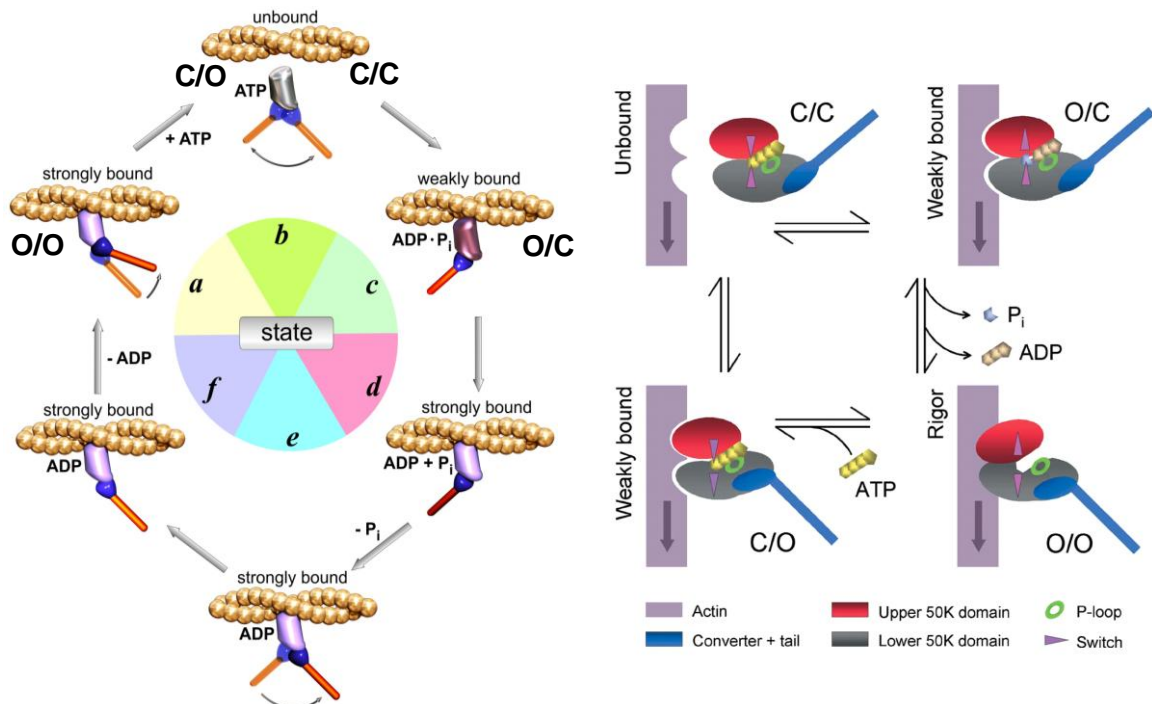


Abb. 4: (A) Schematische Darstellung des ATPase-Zyklus-Modells von Aktomyosin. ATP bindet an den *rigor*-Komplex (a). Dadurch dissoziiert Myosin und der Hebelarm schwingt zurück (b). Nach der Hydrolyse des ATP bindet Myosin in einem zweistufigen Prozess erst schwach, dann stark an Aktin (c, d). Durch die Bindung wird die Dissoziation des P_i induziert, was zum Kraftschlag führt (e). Die Dissoziation von ADP (f) führt zu einer zusätzlichen Hebelarmbewegung, wodurch der *rigor* Komplex wieder hergestellt wird [Geeves *et al.*, 2005]. (B) Schematische Darstellung der Konformation der Schalter-1 und Schalter-2 Elemente innerhalb der Nukleotidbindungstasche [Reubold *et al.*, 2003]. Die Konformationen werden entsprechend der Position der Schalterelemente bezeichnet, wobei C/C (*closed/closed*, geschlossen/geschlossen) bedeutet, dass beide Schalterelemente in Kontakt mit dem Nukleotid stehen, während sie in der O/O Konformation (*open/open*, offen/offen) die geöffnete Konformation der Nukleotidbindungstasche darstellen.

Der Startpunkt des Modells ist die stark an Aktin gebundene Myosinmotordomäne in Abwesenheit eines Nukleotids. Die Motordomäne befindet sich im sogenannten *rigor*-Zustand und die Schalter der Nukleotidbindungstasche Schalter-1 und Schalter-2 befinden sich in der offenen Konformation (O/O; Zustand a in Abbildung 4). Bindet nun Mg²⁺.ATP, ist dies gekoppelt mit dem Schließen des Schalter-1 (C/O-Konformation) und mit strukturellen Änderungen in der Aktinbindungsregion. Die Aktinbindungsspalte öffnet sich aufgrund einer Umordnung der zentralen β -Faltblätter um bis zu 20 Å [Coureux *et al.*, 2003, Reubold *et al.*, 2003]. Die Öffnung verringert die Kontaktfläche des Myosins zu Aktin und führt zu einer Schwächung der Affinität zu Aktin im *near-rigor*-Zustand [Conibear *et al.*, 2003] und folglich dissoziiert Myosin von Aktin (Zustand b). Das folgende teilweise Schließen des Schalter-2, führt zu einer Aktivierung der ATPase-Funktion und ist an eine 65°-Rotation der Konverter-

domäne gekoppelt. Teil der Konverterdomäne ist der Hebelarm, so dass durch die Rotation innerhalb der Motordomäne der Hebelarm in die Ausgangsposition für einen folgenden Kraftschlag zurückschwingt (*recovery stroke*) (Zustand b) [Geeves und Holmes, 1999]. Im Folgenden werden die Schalter der Nukleotidbindungstasche in die vollständig geschlossene Konformation gebracht, um ATP zu hydrolysieren (Konformation C/C), wodurch die Affinität zu Aktin wieder stärker wird und Myosin erst schwach und im Folgenden stark an Aktin bindet und sich der Schalter-1 wieder leicht öffnet (Zustand c und d, Konformation O/C). Diese Bindung resultiert in einer Rückrotation des Konverters, in Folge dessen das Aktinfilament an der Motordomäne entlang gleitet, der sogenannte Kraftschlag (*power-stroke*) (Zustand e). Gleichzeitig öffnet sich Schalter-1 vollständig, dies führt zu einer Freisetzung des Phosphats und Schalter-2 öffnet sich. Mg^{2+} .ADP dissoziiert und der *rigor*-Zustand wird wieder hergestellt (Konformation O/O). Dies ist mit einer zusätzlichen Bewegung des Hebelarms verbunden (Zustand f). Nach Erreichen des *rigor*-Zustands schließt sich Schalter-1 wieder und ATP kann gebunden werden (Konformation C/O) [Reubold *et al.*, 2003].

Der recovery stroke

Während des *recovery stroke* schwingt der Hebelarm des Myosins zurück in die Ausgangsposition für den folgenden Kraftschlag (*power stroke*). Diese Bewegung beinhaltet eine 65°-Rotation des Hebelarms, die an die Aktivierung der ATPase-Funktion ausgehend von konformationellen Änderungen in der Nukleotidbindungstasche und der Relayhelix bis zur Konverterdomäne, die den Hebelarm trägt, gekoppelt ist. Basierend auf Kristallstrukturen der Myosinmotordomänen vor und nach des Zurückschwingens des Hebelarms wurde ein Modell basierend auf molekularen kinematischen Berechnungen erstellt (Abbildung 5) [Fischer *et al.*, 2005].

In der ATP-Bindungstasche mit gebundenem ATP bewegt sich Schalter-2 (Aminosäuren 454-459 in *DdMyosin-2*) während des *recovery stroke* durchschnittlich um 2,5 Å von der offenen zur geschlossenen Form. Das Schließen des Schalter-2 findet in zwei Schritten statt. In der ersten Phase bewegen sich die Aminosäuren 454-457 des Schalters unter Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Amidgruppe von Gly457 und eines Sauerstoffs des γ -Phosphats des gebundenen ATPs [Koppole *et al.*, 2007]. Dabei verringert sich die Distanz zwischen diesen Atomen von 5 Å auf 3 Å. Dieser Teil des Schalters ist mit dem N-terminalen Teil der Relayhelix über eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Gly457/Ser456-Peptidgruppe und der Seitenkette des Asn475 der Relayhelix verbunden. Diese Bindung bleibt während des gesamten *recovery stroke* erhalten [Koppole *et al.*, 2006].

Durch die Bewegung des Schalter-2 Segments 454-457 in Richtung des Phosphats wird die N-terminale Hälfte der Relayhelix an der Position 475 gezogen. Da die Relayhelix über eine weitere Wasserstoffbrückenbindung (Phe481/Phe482 zu Phe652) an den dritten β -Faltblattstrang der zentralen β -Faltblätter fixiert ist [Fischer *et al.*, 2005], kommt es zu einer wippenartigen Bewegung der Relayhelix, bei der sich die Enden der Helix um 4 Å bewegen. Das C-terminale Ende der Relayhelix ist von der Konverterdomäne umschlossen, so dass diese Schwingung eine Zugkraft auf die Konverterregion ausübt. Dies führt zu einer Rotation des Konverters um 25° führt.

In der zweiten Phase des Übergangs des Schalter-2 von der offenen zur geschlossenen Form während des Zurückschwingens des Hebelarms, bewegen sich die Aminosäuren 458-459 dieses Schalters unter Ausbildung einer weiteren Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonylsauerstoff des Phe458 und der Amidgruppe des Ser181 der Phosphatbindungsschleife [Koppole *et al.*, 2007]. Dabei verringert sich die Distanz zwischen diesen Aminosäuren von 6 Å auf unter 3 Å. Die Seitenkette des Phe458 ist umgeben von den hydrophoben Aminosäuren His572, Tyr573 und Ala574 der *Wedge*-Schleife. Diese hydrophobe Tasche wird während des gesamten Zyklus aufrechterhalten, so dass durch die Bewegung des Schalter-2-Segments auch die *Wedge*-Schleife sich um bis zu 4 Å bewegt. Die *Wedge*-Schleife stößt bei ihrer Bewegung in Richtung der Phosphatschleife gegen die Schleife, die die SH1- und SH2-Helix verbindet. Die SH1-Helix weicht mit einer längsgerichteten Translation um 3,5 Å verbunden mit einer Schwingung um 19° der *Wedge*-Schleife aus. Die mit der SH1-Helix kovalent gebundene Konverterdomäne reagiert auf die Bewegung der SH1-Helix mit einer weiteren Rotation um 40°. Diese Rotation ist so groß, dass die in die Konverterdomäne eingebettete Relayhelix sich partiell an der Aminosäure Phe486 entwindet. Dieser Teil Relayhelix ist am geringsten stabilisiert und dessen Entwindung resultiert in einer Beugung der Relayhelix an dieser Position [Koppole *et al.*, 2007].

Folglich ist in diesem Modell die Rotation um 65° der Konverterdomäne während des Zurückschwingens des Hebelarms in zwei Phasen an das Schließen des Schalter-2 in zwei Schritten gekoppelt [Koppole *et al.*, 2007].

Durch die Konformationsänderung des Schalter-2 wird zusätzlich die ATPase der Myosinmotordomäne aktiviert [Schwarzl *et al.*, 2006], so dass der ATP-Umsatz an das Zurückschwingen des Hebelarms und den folgenden Kraftschlag (*power stroke*) gekoppelt ist.

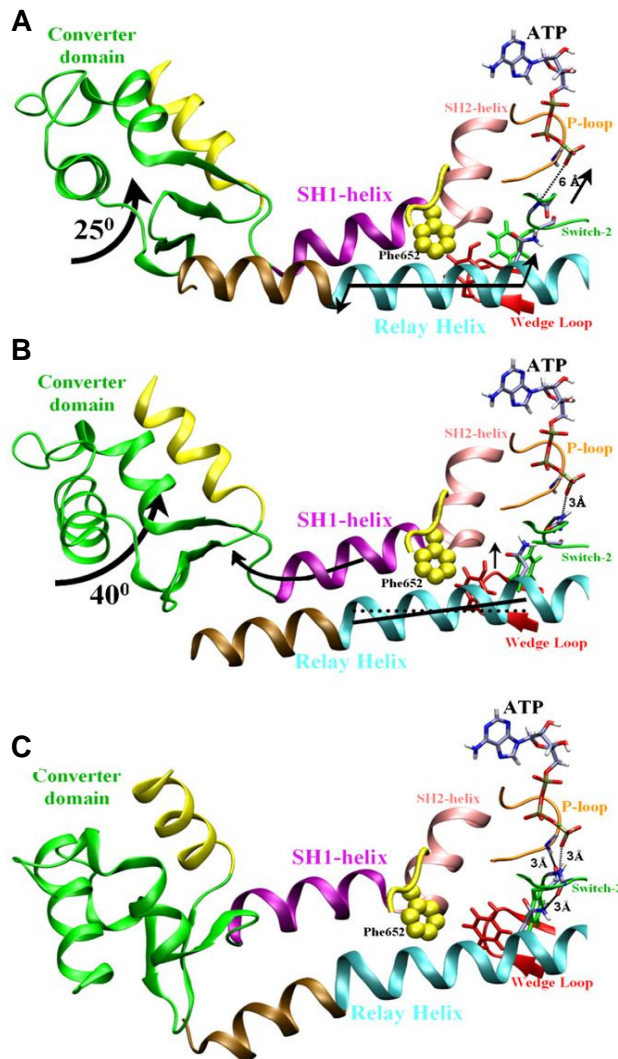


Abb. 5: Darstellung des Modells des Zurückschwingens des Hebelarms (*recovery stroke*). (A) Die Relayhelix ist gerade und der Schalter-2 ist geöffnet. Die Pfeile deuten die Wippbewegung der Relayhelix und die Rotation des Konverters während der ersten Phase des *recovery stroke* an. (B) Konformation nach der ersten Phase des *recovery stroke*. Die Aminosäuren 454-457 des Schalter-2 befinden sich bereits in der geschlossenen Konformation und die Relayhelix hat ihre neue Position nach der Wippbewegung eingenommen. Die Pfeile deuten die Bewegungen der SH1-Helix und der Wedge-Schleife an und die folgende Rotation des Konverters während der zweiten Phase des *recovery stroke*. (C) Konformation nach dem *recovery stroke*. Die Relayhelix ist geknickt und Schalter-2 ist geschlossen. [Koppole *et al.*, 2007]

Modell des Kraftschlags

Im Anschluss an den Prozess des Zurückschwingens des Hebelarms in die Ausgangsposition für einen Kraftschlag wird ATP in der Nukleotidbindungstasche hydrolysiert. $Mg^{2+} \cdot ADP \cdot P_i$ ist jetzt in der Nukleotidbindungstasche gebunden. Durch die nun stattfindende Bindung des Aktins wird die Dissoziation der Hydrolyse-Produkte erleichtert. Der erste Schließvorgang der Aktinbindungsspalte während der Aktinbindung führt zu einer Entfernung der Phosphatbindungsschleife vom Nukleotid um 5 Å. Diese Bewegung verursacht einen Bruch der drei Koordinationsbindungen der Phosphatschleife mit dem γ -Phosphat. Eine weitere Konformationsänderung der Aktinbindungsspalte führt zur ersten Öffnung des

Schalters-1 [Holmes und Schröder, 2003; Coureux *et al.*, 2003] und die Bindung zwischen Mg^{2+} und Ser236 des Schalters wird geschwächt [Yu *et al.*, 2007]. Schließlich erfolgt die beschleunigte Dissoziation des P_i -Restes [Siemankowski und White, 1984; White *et al.*, 1997]. Nach der Phosphatdissoziation folgt der Kraftschlag des Hebelarms zusammen mit einer verstärkten Bindung an Aktin [Malnasi-Czismadia *et al.*, 2005]. Dabei wird der Knick in der Relayhelix entfernt und die Konverterdomäne zusammen mit dem Hebelarm dreht sich um 60° in die entgegengesetzte Richtung des vorherigen Zurückschwingens des Hebelarms (*recovery stroke*) [Holmes *et al.*, 2004]. Dies führt zu der vollständigen Öffnung des Schalter-1, die in einem Bruch der Salzbrücke zwischen Schalter-1 und Schalter-2 der Nukleotidbindungstasche resultiert [Koppole *et al.*, 2006]. Im Falle von Myosin-2 ist der Kraftschlag mit einer Öffnung des Schalter-2 verbunden [Rayment *et al.*, 1993; Zeng *et al.*, 2004; Steffen und Sleep, 2004]. Die vollständige Öffnung dieses Schalters ermöglicht die Dissoziation des Mg^{2+} .ADP und damit verbunden die Rückkehr in den nukleotidfreien stark an Aktin gebundenen *rigor*-Zustand [Himmel *et al.*, 2002; Reubold *et al.*, 2003; Kintsjes *et al.*, 2007].

Die gelöste Struktur von GgMyosin-5 im nukleotidfreien Zustand zeigt eine *rigor-like*-Konformation vor, in der die Aktinbindungsspalte weiter geschlossen ist als in vergleichbaren Strukturen. Schalter-2 liegt in der geschlossenen Form vor, aber die Relayhelix ist gerade [Coureux *et al.*, 2003]. Diese Struktur zeigt, dass Schalter-2 auch in der *rigor-like*-Konformation geschlossen sein kann. Dies impliziert, dass die Begradigung der Relayhelix und der Kraftschlag auch ohne eine signifikante Öffnung des Schalters in Myosin-5 stattfinden kann [Holmes *et al.*, 2004]. Die Konformation einer geraden Relayhelix nach dem Kraftschlag ohne Öffnung des Schalters und mit Verbleiben der unteren 50K-Domäne in der geschlossenen Konformation ist über eine Drehung der zentralen β -Faltblätter möglich. Durch die Rotation des dritten Faltblatts und den angeschlossenen SH1- und SH2-Helices wird der Druck auf die Relayhelix geschwächt und diese kann sich begradigen ohne eine gleichzeitig stattfindende Öffnung des Schalter-2. Unter der Annahme, dass der Schließvorgang der Aktinbindungsspalte durch die Bindung von Aktin zu einer Drehung der zentralen β -Faltblätter führt, die ein Geraderichten der Relayhelix zur Folge hat, wäre die Aktinbindung ein Kontrollmechanismus des Kraftschlags [Holmes *et al.*, 2004].

1.1.4. Mechanismus der Prozessivität

Prozessive Bewegung ermöglicht einzelnen doppelköpfigen Myosinmolekülen, z.B. Myosine der Klasse 5 und 6, Distanzen von mehreren 100 nm entlang eines Aktinfilaments zurückzulegen ohne von dem Filament zu dissoziieren [Mehta *et al.*, 1999]. Diese Eigenschaft ermöglicht Myosinen ein Transport von beispielsweise Vesikeln oder Organellen über längere Entfernungen innerhalb der Zelle. Bisher wurde kein allgemeines Modell für die Prozessivität für Myosine aufgestellt, das alle mechanistischen und kinetischen Eigenschaften vereint.

Für prozessive Myosine der Klasse 5 bewegen sich in einem sogenannten *hand-over-hand* Mechanismus entlang von Aktinfilamenten bei dem immer eine Motordomäne an das Aktinfilament gebunden ist, während der zweite Kopf sich zu der nächsten Bindungsstelle entlang des Aktinfilaments bewegt. [Yildiz *et al.*, 2003; Warshaw *et al.*, 2005]. In Abbildung 6 ist ein allgemeines Basismodell der Prozessivität dargestellt. Zu Beginn sind beide Myosinmotor-domänen im ADP-Zustand an Aktin gebunden (Zustand 1), ADP dissoziiert von dem zurückliegenden Kopf (in der Abbildung türkis, Zustand 2). Die ADP-Freisetzung ist zugleich der geschwindigkeitslimitierende Schritt des ATPase-Zyklus. [De La Cruz *et al.*, 1999] Im Folgenden bindet ATP an den zurückliegenden Kopf und dieser dissoziiert von dem Aktinfilament. Anschließend führt der vordere Myosinkopf (in der Abbildung rosa) seinen Kraftschlag aus. Der an nicht an Aktin gebundene Kopf (in der Abbildung türkis) schwingt nach vorne und hydrolysiert ATP (Zustand 3). Der Hebelarm wird wieder in die Position gebracht, die es ermöglicht einen Kraftschlag auszuüben und bindet an der nächsten Bindungsstelle wieder an das Aktinfilament. Es folgt eine schnelle Phosphatfreisetzung [De La Cruz *et al.*, 1999] und das Myosinmolekül befindet sich wieder in der Ausgangsposition mit zwei im ADP-Zustand an Aktin gebundenen Motordomänen (Zustand 4).

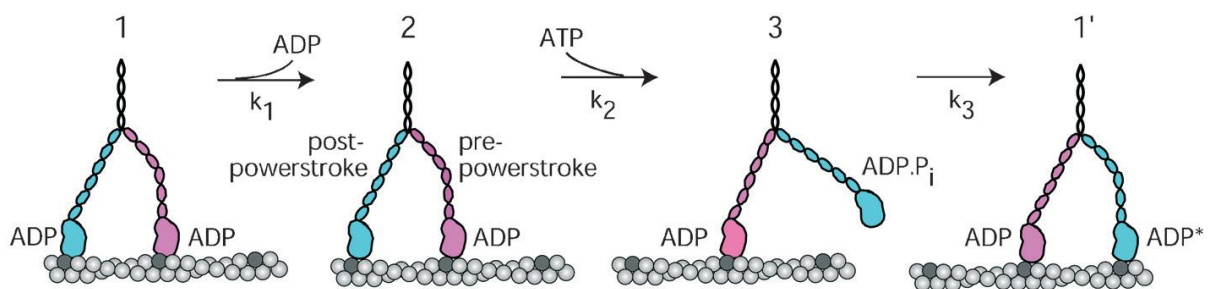


Abb. 6: Modell der Prozessivität von Myosin-5 [Trybus, 2008]

Myosin-5 weist mehrere Eigenschaften auf, die dieses Myosin für die prozessive Bewegung optimieren. Damit immer ein Kopf an Aktin gebunden ist, muss dieser Motor eine hohe *duty ratio* aufweisen, also dass die Motordomäne den größten Anteil des ATPase-Zyklus stark an

Aktin gebunden ist. Die hohe *duty ratio* resultiert daraus, dass die ADP-Freisetzung der ratenlimitierende Schritt ist [De La Cruz *et al.*, 1999]. Des Weiteren ist die hohe Aktinaffinität im ATP und ADP.P_i-Zustand entscheidend [Yengo *et al.*, 2002]. Die hohe Affinität erhöht die Wahrscheinlichkeit des nicht an Aktin gebundenen Myosinkopfs, die nächste Bindungsstelle zu finden [Hodges *et al.*, 2007; Krementsova *et al.*, 2006]. Zusätzlich unterstützt eine intramolekulare Spannung die Koordination der beiden Köpfe während der prozessiven Bewegung. Diese Spannung beeinflusst die Kinetiken der Motordomänen, der vordere Myosinkopf im ADP-gebundenen Zustand verbleibt so lange am Aktinfilament, bis der hintere Kopf sich zur nächsten Bindungsstelle entlang des Filaments bewegt hat [Rosenfeld und Sweeney, 2004; Purcell *et al.*, 2005; Veigel *et al.*, 2005].

Myosin-5 bewegt sich in 36 nm-Schritten entlang des Aktinfilaments. Dieser 36 nm-Schritt entspricht einer Windung des Aktinfilaments. Nach Veigel *et al.* setzt sich dieser aus zwei Phasen zusammen, einem Kraftschlag (20 + 5 nm) der an Aktin gebundenen Motordomäne und einer durch Diffusion angetriebenen Bewegung zur nächsten Bindungsstelle des Aktinfilaments der ungebundenen Motordomäne (10-16 nm). Zur Diskussion steht auch ein längerer Kraftschlag, da Ungenauigkeiten in den Messungen zur Unterschätzung der Schrittlänge führen können [Sleep *et al.*, 2005; Brenner, 2006]. Die Größe des gemessenen Kraftschlags weist Unterschiede je nach verwendeter Methode auf. So ist der gemessene Kraftschlag in Einzelmolekülmessungen kleiner als durch Proteinkristallographie und Studien an Muskelfasern gezeigt. Diese Unterschiede können durch spannungsinduzierte Unterschiede in der Wahrscheinlichkeit der Ausführung eines Kraftschlags in den Einzelmolekülmessungen liegen [Brenner *et al.*, 2006].

Des Weiteren wird in einigen Studien eine größere Rolle der Diffusion bei der prozessiven Bewegung angenommen [Shiroguchi und Kinosita, 2007; Okada *et al.*, 2007].

1.1.5. DdMyosin-5b

D. discoideum exprimiert zwei Myosine der Klasse-5: Myosin-5a und Myosin-5b [Hammer III. *et al.*, 1996; Kollmar, 2006]. DdMyosin-5b hat eine molekulare Masse von 258 kDa. Myosin-5b besteht aus einer N-terminalen Motordomäne, gefolgt von einer Nackenregion und einer C-terminalen Schwanzregion. Die Nackendomäne weist 6 IQ-Motive auf, an die leichte Ketten binden können. Für DdMyosin-5b sind diese noch nicht bekannt, jedoch wird angenommen, dass diese Calmodulin-ähnliche Strukturen aufweisen. Die Schwanzregion setzt

sich aus einer superspiralisierten Region (*coiled coil*), die eine Dimerisierung des Myosins ermöglicht, und einer globulären C-terminalen Domäne zusammen.

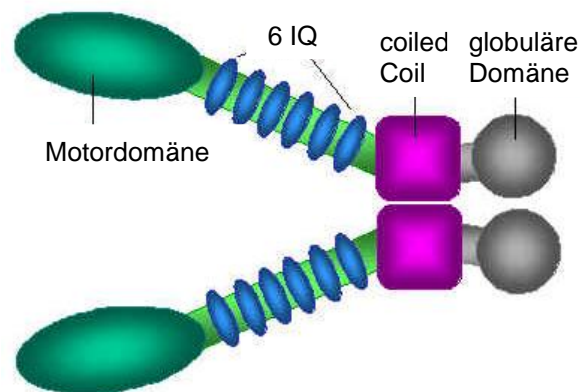


Abb. 7: Schematische Darstellung eines Myosin-5 [verändert nach <http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/Myosin%20V.htm>]

*Dd*Myosin-5 lokalisiert in der Zelle an der kontraktiven Vakuole und ist funktionell an der Osmoregulation der Zelle beteiligt [Jung *et al.*, 2009]. Dabei übernimmt Myosin-5b eine Aufgabe bei der kortikalen Assoziation und der Motilität der Membranen der kontraktiven Vakuole. Ergänzend zu dieser zellulären Funktion passen die nachgewiesenen prozessiven Eigenschaften des Motors. Wie auch andere Myosine der Klasse 5 zeigt auch *Dd*Myosin-5b kinetische Eigenschaften eines prozessiven Motors [Taft *et al.*, 2008]. Dazu gehören eine hohe Aktinaffinität in Anwesenheit von ADP, eine schnelle ATP-Hydrolyse sowie eine hohe maximale ATPase-Aktivität in Anwesenheit von Aktin, deren Geschwindigkeit durch die ADP-Dissoziation des Akto.Myosin.ADP-Komplexes limitiert ist. Die ADP-Dissoziation des Akto.Myosin.ADP-Komplexes wird durch die Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen reguliert, daraus resultierend besteht die Hypothese, dass die Prozessivität dieses Myosins modulierbar ist. Dieser Mechanismus der Regulation der Prozessivität ermöglicht *Dd*Myosin-5b, abhängig von der Konzentration der freien Mg^{2+} -Ionen, als prozessiver Motor oder nicht-prozessiver Motor in der Zelle zu agieren.

1.1.6. *Dd*Myosin-2

D. discoideum Myosin-2 gehört zu der Gruppe der nicht-muskulären konventionellen Myosine und besteht aus einer schweren Kette (243 kDa) an deren Nackenregion zwei leichte Ketten, eine regulatorische 18 kDa (RLC) und eine essentielle 16 kDa leichte Kette (ELC), binden können. Der strukturelle Aufbau ähnelt mit zwei globulären Kopfdomänen, an die

sich jeweils eine Nackenregion und eine α -helikale 188 nm lange dimere *coiled-coil*-Region anschließt [de la Roche *et al.*, 2001 und 2003]. Über die Schwanzregion ist Myosin-2 auch in der Lage bipolare Filamente auszubilden.



Abb. 8: Schematische Darstellung von Myosin-2 bestehend aus Motordomäne (großes Oval), leichten Ketten (kleines Oval) und der α -helikalen Schwanzdomäne (schwarze Linie) [de la Roche *et al.*, 2001]

In *Knock out*-Studien konnte gezeigt werden, dass Myosin-2 in *D. discoideum* an der Cytokinese, der Zellteilung, der Chemotaxis und der Sporogenese beteiligt ist und für das Wachstum in Suspensionskulturen benötigt wird [De Lozanne und Spudich *et al.*, 1987; Knecht *et al.*, 1988; Manstein *et al.*, 1989]. Die kinetischen Parameter gewährleisten, dass Myosin-2 den ATPase-Zyklus schnell durchlaufen werden kann [Ritchie *et al.*, 1993]. Aktin beeinflusst die ADP-Affinität des Myosins. Durch die Bindung von Aktin wird die Dissoziation des ADP aus dem Akto-Myosin-Komplex stark beschleunigt. Aufgrund dieser Eigenschaft gehört *DdMyosin-2* zu den „gekoppelten“ Myosinen. Aufgrund der schnellen ADP-Dissoziation sowie einer schnellen Isomerisierung des Akto-Myosin-ATP-Komplexes verweilt *DdMyosin-2* nur kurz am Aktinfilament. Durch die hohe Anzahl an Myosinköpfen in einem Filament, von denen immer einige an Aktin gebunden sind, wird die Dissoziation des Myosinfilaments von F-Aktin verhindert.

1.2. Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

1.2.1. Theoretische Grundlagen der Röntgenstrukturanalyse

Kenntnisse über das Zusammenspiel von Struktur und Funktion von Proteinen sind für das Verständnis der Aufgaben der Proteine in lebenden Organismen von großer Bedeutung. Dabei stellt die Röntgenstrukturanalyse die direkteste Methode zur Aufklärung dreidimensionaler Proteinstrukturen dar. Mit Hilfe der Röntgenstrahlung ist es möglich die dreidimensionale Struktur eines Proteins mit einer Auflösung von bis 1 Å und niedriger zu lösen. In

dieser Größenordnung ist es möglich atomare Strukturen aufzuklären, da beispielsweise kovalente Atombindungen im Bereich von 1-2 Å und starke polare Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen in Bereichen 2,5-3,5 Å liegen. Die erhaltenen Röntgenkristallstrukturen können Hinweise über die Aktivität und Aufgaben eines Proteins geben. Daraus werden beispielsweise Informationen über Mechanismen mit denen Proteine spezifische Substrate erkennen und binden und über konformationelle Änderungen, die diese vollziehen können, gewonnen.

Die dreidimensionale Struktur eines Proteins wird durch die Streuung der Röntgenstrahlung an dem Kristall des Proteins gelöst. Die Beugung erfolgt nach dem Braggschen Gesetz

$$2d \sin\theta = n \lambda$$

(mit d =Netzebenenabstand, θ =Beugungswinkel, λ =Wellenlänge)

Im Experiment werden die Beugungswinkel und die gemessenen Intensitäten des Reflexes einer Netzebene im reziproken Raum des Kristallgitters zugeordnet. Diese Netzebenen werden durch die Millerschen Indizes h , k und l gekennzeichnet. Die Intensität eines Reflexes ist abhängig von der atomaren Zusammensetzung des Moleküls in der Einheitszelle des Kristalls.

Der einzelne gebeugte Röntgenstrahl kann als periodische Fourier-Reihe beschrieben werden. Eine Summierung dieser Reihe über alle Intensitäten der Reflexe hkl ergibt den Strukturfaktor $\mathbf{F}(hkl)$.

$$I(hkl) = \mathbf{F}(hkl) \mathbf{F}^*(hkl) = F(hkl)^2$$

(mit $\mathbf{F}^*(hkl)$ = komplex konjugierter Strukturfaktor des Reflexes (hkl))

Da jeder Strukturfaktor $\mathbf{F}(hkl)$ eine gebeugte Welle beschreibt, ist der Strukturfaktor über die Frequenz, Amplitude und Phase definiert. Gemessen werden kann nur die Intensität $I(hkl)$ des Reflexes, die proportional zum Quadrat der Amplituden des komplexen Strukturfaktors $\mathbf{F}(hkl)$ ist.

Die für die Lösung der Proteinstruktur benötigte Elektronendichteverteilung $\rho(xyz)$ in der Einheitszelle des Kristalls berechnet sich jedoch als Fouriertransformation über die Strukturfaktoren $\mathbf{F}(hkl)$ aus allen symmetrisch unabhängigen Reflexen:

$$\begin{aligned} \rho(xyz) &= 1/V \sum \sum \sum \mathbf{F}(hkl) \cdot \exp(-2\pi i(hx+ky+lz)) \\ &= 1/V \sum \sum \sum F(hkl) \cdot \exp(i\alpha(hkl)) \cdot \exp(-2\pi i(hx+ky+lz)) \end{aligned}$$

(mit V =Volumen der Elementarzelle)

Summiert wird über h , k und l von $-\infty$ bis $+\infty$. Im Zweiten Schritt der Gleichung ist der komplexe Strukturfaktor $F(hkl)$ umgeschrieben in das Produkt aus seiner Amplitude $F(hkl)$ und dem zugehörigen Phasenterm $\exp(i\alpha(hkl))$. Die für die Berechnung der dreidimensionalen Elektronendichteverteilung benötigten Phasenwinkel $\alpha(hkl)$ sind jedoch nicht direkt bestimmbar und müssen auf andere Weise ermittelt werden.

Dies stellt das so genannte „Phasenproblem“ dar. Eine weit verbreitete Methode zur Lösung des Phasenproblems ist der Molekulare Ersatz [Rossmann und Blow; 1962; Rossmann, 2001]. Für den Molekularen Ersatz wird ein Beugungsdatensatz eines Kristalls des Proteins, dessen Struktur gelöst werden soll, und die Struktur eines homologen Proteins benötigt. Die Strukturdaten der gelösten Struktur eines homologen Proteins werden zur ersten Annäherung der Phasen der neuen Proteinstruktur verwendet. Die Phasenwinkel der atomaren und molekularen Strukturdaten hängen von der Position in der Einheitszelle ab. Um eine bekannte Proteinstruktur als Phasenmodell zu verwenden, müssen die Strukturen des Modells und des Zielproteins in der Einheitszelle des Zielproteins überlagert werden. Dafür werden die Patterson-Funktionen des Modells P_m und der Elektronendichte P_x überlagert wobei die gewünschte Orientierung mit den Rotationswinkel α , β und γ ermittelt wird. Im Anschluss wird die Translationsfunktion bestimmt anhand der das Modell entsprechend dem tatsächlichen Molekül in der Elementarzelle platziert wird.

Dieses erste Strukturmodell wird in weiteren Schritten unter Berücksichtigung der Stereochemie des Modells auf ideale Zielwerte hin optimiert und die thermischen und positionellen Parameter aller Atome so verändert, dass sich die aus dem aktuellen Modell berechneten Strukturfaktoramplituden $F_{\text{calc}}(hkl)$ den gemessenen $F_{\text{obs}}(hkl)$ angleichen. Größere Veränderungen und Erweiterungen müssen jedoch per Hand in einem graphischen Programm, wie beispielsweise „Coot 0.5.2“ [Emsley und Cowtan, 2004] vorgenommen werden. Diese beiden Schritte aus automatischer Verfeinerung und manueller Korrektur werden solange wiederholt, bis die Strukturfaktoramplituden in bestmöglicher Übereinstimmung sind. Ein Maß für die Qualität der verfeinerten Struktur ist der kristallographische R-Faktor R_{cryst} [Morris *et al.*, 1992]

$$R = \frac{\sum ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}||}{\sum ||F_{\text{obs}}|}$$

Zusätzlich wird der R-Faktor aus einer statistisch ausgewählten kleinen Teilmenge von Symmetrie-unabhängigen Reflexen, die nicht zur Verfeinerung der Struktur verwendet werden, berechnet. Dieser sogenannte freie R-Faktor stellt eine realistischere Abschätzung des Fehlers des Strukturmodells dar [Brünger, 1993]

1.2.2. Analyse der B-Faktoren einer Proteinkristallstruktur

Die Kristallstruktur stellt eine Momentaufnahme des Proteins dar, jedoch sind Proteinstrukturen nicht starr. Das Peptidrückgrat und vor allem die Seitenketten der Aminosäuren eines Proteins bewegen sich aufgrund thermischer und Brownscher Molekularbewegung um ihre Position. Die B-Faktoren der Kristallstruktur eines Proteins, auch Temperaturfaktoren genannt, sind ein Maß für diese positionelle Auslenkung des jeweiligen Atoms. Je höher der B-Faktor eines Atoms ist, desto größer ist die Oszillation des Atoms um seine Position und folglich desto größer sind die Bewegungsfreiheiten des Atoms und damit auch der jeweiligen Aminosäuren. Die B-Faktoren werden während der Verfeinerung des Strukturmodells an die experimentellen Daten angepasst.

Anhand der B-Faktoren in der Kristallstruktur ist es möglich Aussagen über Bewegungsfreiheiten innerhalb des Proteins zu treffen. Die Verteilung der B-Faktoren reflektiert die Flexibilität und Dynamik verschiedener Domänen des Proteins [Karplus *et al.*, 1985]. Diese Faktoren werden genutzt für Analysen der Wärmestabilität von Proteinen [Parthasarathy *et al.*, 2000], für die Untersuchung aktiver Zentren von Enzymen [Carugo *et al.*, 1998; Yuan *et al.*, 2003] und für Aussagen über dynamische Bewegungen einzelner Domänen des Proteins und des ganzen Proteins [Navizet *et al.*, 2004].

1.3. Zielsetzung der Arbeit

In der hier vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe struktureller und funktioneller Studien die Rolle der Schleife-2 in der Myosinmotordomäne untersucht werden. Die native Schleife-2 in *DdMyosin-5b* wurde durch 6 GKK-Motive (K6) ersetzt, die die Nettoladung in Schleife-2 um +11 erhöht. Diese Mutante wurde mit der korrespondierenden Mutante von *DdMyosin-2* verglichen. Anhand dieser „K6“-Mutanten sollte gezeigt werden, ob sich die Einführung einer identischen Schleife-2-Sequenz unterschiedlich auf die Aktin-aktivierte ATPase, die Aktinaffinitäten und die Kopplung zwischen der ADP- und Aktinbindung in *DdMyosin-5b* und *DdMyosin-2* auswirkt.

In einem Struktur-basierten *Protein Engineering* Ansatz wurde ein künstlicher prozessiver Motor dargestellt. Mit Hilfe von *Normal mode*-Analysen sollten Flexibilitäten und Bewegungsmöglichkeiten des Hebelarms berechnet werden und anhand dieser Aussagen über die Schrittgrößen getroffen werden. Des Weiteren sollten kinetische Experimente durchgeführt werden, die Einblicke über mögliche intramolekulare Spannungen zwischen Motordomänen des Dimers geben.

In den proteinkristallographischen Arbeiten wurde zum einen die Kristallstruktur einer Schalter-2 Mutante von *DdMyosin-2* mit einer Auflösung von 2,4 Å gelöst. Diese Kristallstruktur von *DdMyosin-2* sollte strukturelle Erklärungen für die durch die Mutation hervorgerufenen funktionalen und kinetischen Änderungen geben. Die Konformationsänderungen des Schalter-2 der Nukleotidbindungstasche beeinflussen über einen Kopplungsmechanismus den Kraftschlag des Myosins. Daher sollte die strukturelle Analyse der Auswirkungen dieser Mutation auch helfen, Einblicke in den Mechanismus des Kraftschlags zu erlangen.

Des Weiteren wurde erstmals die Struktur eines Klasse 5 Myosins aus *D.Discoideum* mit einer Auflösung von 3 Å gelöst und die Struktur von *DdMyosin-5b* mit dem oben erläuterten „K6“-Motiv in Schleife-2 und einem Hebelarm bestehend aus zwei α -Aktinin-Untereinheiten (2R) ohne gebundenes Nukleotid gelöst werden.

Abkürzungsverzeichnis

A	2'Desoxyadenosin-5'monophosphat
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	<i>base pairs</i> , Basenpaare
C	2'Desoxycytosin-5'monophosphat
C-	Carboxy-
CIAP	Calf Intestine Alkalic Phosphatase
C-term	C-terminales Ende
d	desoxy
<i>Dd</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
Da	Dalton
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EB	Elution Buffer
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
h	Stunden
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
His	Histidin
(His) ₈ -tag	His-Oktapeptid
k	Kilo
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAP	Laemmliauftragspuffer
LB	Luria Bertani
mantATP	N-Methylantraniloyl-ATP
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MPD	2-Methylpentan-1,3-diol
m	Mili
min	Minuten
n	nano
N-	Amino-
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduziert
NiNTA	Nickel-Nitrilacetat
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

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

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

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

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

Chemikalie	Hersteller
Aceton	J. T. Baker, Deventer, NE
Acrylamid: N,N'-Methylenbisacrylamid (30:0,8), 40%ig	Sigma-Aldrich, Steinheim
Adenosin-5'-diphosphat, Na-Salz (ADP)	Fluka Chemie, Buchs, CH
Adenosin-5'-triphosphat, Na-Salz (ATP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agar (Agar Bacteriological)	Oxoid Ltd., Basingstoke, UK
Agarose (TopVision LE GQ Agarose)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Benzamidin-Hydrochlorid	Merck, Darmstadt
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	J. T. Baker, Deventer, NE
Ethanol	J. T. Baker, Deventer, NE
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA, "Titriplex II")	Merck, Darmstadt
Ethylenglykol	Merck, Darmstadt

Ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure (EGTA, "Titriplex VI")	Merck, Darmstadt
Geneticin (G418-Sulfat)	Calbiochem, Darmstadt
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Guanidiniumhydrochlorid	Merck, Darmstadt
Salzsäure, 37 %ig	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt ("BactoYeast Extract")	Becton Dickinson, Sparks, USA
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Imidazol	BDH Laboratory Supplies, Poole,
Isopropanol (2-Propanol)	Merck, Darmstadt
K_2HPO_4	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
Kalilauge	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumacetat	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol (β -Mercaptoethanol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	J. T. Baker, Deventer, NE
$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	Merck, Darmstadt
$MgCl_2$ -Lösung, 4,9 mol/l, titriert	Sigma-Aldrich, Steinheim
$MnCl_2$	New England Biolabs, Beverly,
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Na_2CO_3	Merck, Darmstadt
Na_2HPO_4	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaF	Fluka Chemie, Buchs, CH
NaH_2PO_4	Merck, Darmstadt
$NaHCO_3$	Merck, Darmstadt
NaN_3	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt

Nickel-Nitriltriacetat-Säulenmaterial „superflow“ (Ni-NTA)	Qiagen, Hilden
NiSO ₄ · 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin-Lösung (1000 U/ml Penicillin, 200 µg/l Streptomycin)	Gibco, Paisley, UK
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
1,10-Phenanthrolin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenylmethylsulfonsäurefluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphoenolpyruvat (PEP)	Roche, Mannheim
Phosphorsäure, 85%	J. T. Baker, Deventer, NE
Proteose-Pepton	Oxoid Ltd., Basingstoke, UK
Polyethylenglykol 8000	Fluka Chemie, Buchs, CH
Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
N _α -Tosyl-L-Argininmethylesterhydrochlorid (TAME)	Sigma-Aldrich, Steinheim
N _α -Tosyl-L-Lysinchlormethylketonhydrochlorid (TLCK)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduziert (NADH)	Roche, Mannheim
N-Tosyl-L-Phenylalaninchlormethylketon (TPCK)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween-20	Merck, Darmstadt

2.1.2. Geräte

Gerät

FPLC-Anlage Äkta purifier 10
 Säulen: XK16/20
 Säulenmaterial Ni-NTA superflow
 Säulenmaterial ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel
 Anionenaustauschersäule HiTrap ResourceQ
 Gelfiltrationssäule HiLoad 26/60 superdex 200 PG
 Superloop 50 und 150 ml
 Sampleloop 7.8 ml
 Peristaltische Pumpe Minipuls 2
 Pipetten 2-1000µl
 Spannungsquelle Power-Pac 300
 SDS-PAGE Apparatur Mini-Protean
 Western-Blot-Apparatur Trans-Blot SD Semidry Trans-fer Cell
 Geldokumentationssystem Chemidoc
 Mikroskop CK 2
 Mikroskop CK 2
 Mikroskop SMZ 800
 PCR-Thermoblock Px 2

 Photometer DU 800

 Stopped-Flow Hi-Tech Scientific SF-61SX2
 Orbital Shaker
 Gyrotory Shaker G2 und G10
 Ultraschallgerät Sonoplus UW 2200
 Ultrazentrifuge Optima LE-80 K
 mit Rotoren 70 Ti und 45 Ti
 Ultrazentrifuge Optima Max
 mit Rotor TLA 120.1
 Zentrifuge Avanti J-20 XP
 mit Rotoren JLA 16.250 und JA 25.50
 Zentrifuge Avanti J-HC

Hersteller

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

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

mit Rotor TY.JS 4.2	USA
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

Tissue Culture Dish 100x20 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Dish 92x16 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Nunclon Delta Surface 24-well-Platten	Nunc, Wiesbaden
VIVASPIN Konzentratoren PES 20 ml 50000 Da	Sartorius, Göttingen
VIVASPIN Konzentratoren PES 4 ml 50000 Da	Sartorius, Göttingen
Visking Dialyseschlauch 36/32 Ø 27 mm	Serva, Heidelberg
PROTRAN Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher & Schnell
Extra Thick Blot Paper	Biorad, München
500 ml Bottle Top Filter w/45 mm Neck, 22 µm PES	Corning Inc.
Minisart single use syringe filter 0.45 µM	Sartorius, Göttingen
Spritzen Omnifex 10, 20 ml	Braun, Melsungen
Serologische Pipetten 5, 10, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Crychem Plate, 24 well, sitting drop	Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA
circular cover slides, 22 mm	Jena Bioscience, Jena
Bayer Silicon Grease, low viscosity	Jena Bioscience, Jena
MiTeGen Micro Mounts™ (small/medium/large Aperture Assortment)	MiTeGen, Ithaca, NY, USA
Magnetic Cryo Vials und Cryo Caps mit Data Matrix	WICOM, Heppenheim
Cryo Canes, 5 vial holder	Jena Bioscience, Jena

2.1.4. Antibiotika

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

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

2.1.5. Enzyme und Antikörper

Enzym/ Antikörper/ Protein	Hersteller
RNAse A	Serva, Heidelberg
Alkalische Phosphatase (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, CIAP)	Roche, Mannheim
Monoklonaler Maus IgG-Antikörper Anti-FLAG	Sigma
Monoklonaler Maus IgG-Antikörper Anti-(His) ₅ , 0,2 mg / ml, BSA-frei	Qiagen, Hilden
Ziege anti-Maus IgG, Peroxidase-gekoppelt	Biorad, München
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
	New England Biolabs, Frankfurt/Main
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Phusion TM High Fidelity DNA-Polymerase	Finnzymes
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.6. Organismen

2.1.6.1. Bakterienstamm

- XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg)

Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac

[F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]

2.1.6.2. Zelllinie

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

2.1.7. Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz
MJ-K6-fw	5'-CAA ATT TCT CAT TCA TTA AAG TGT TAT TCA ATG ATC CAA ACA TTG GTA AG-3'
MJ-K6 -rev	5'-GAA AAT TGT GAA CCA ACA GAA AGA AAG TTT GCA CCT TTC TGA GCT CGA C-3'
MJ-BsmI-fw	5'-GCT GAG AAT GCA AGA GAT TCA TTG-3'
dyn 1rn xba rv	5'-GGT AAA ACT TGA ATT ACC TCT AGA-3'

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Klonierung von Plasmiden

Alle verwendeten Vektoren für die Proteinexpression in *D. discoideum* basieren auf dem von Manstein *et al.* (1995b) entwickelten Vektor pDXA. Bestandteile dieses Vektors sind der starke konstitutive Aktinpromotor *act15* mit der darauf folgenden *multiple cloning site*, C- oder N-terminale Sequenzen für ein Affinitäts-*tag* (His- oder FLAG-*tag*) sowie das Resistenzgen für Geneticin zur Selektion positiver Transformanten. Neue Expressionsplasmide werden durch Ligation eines DNA-Inserts, z. B. ein DNA-Teil aus einem anderen Plasmid oder ein PCR-Fragment, mit einem Vektorplasmid hergestellt.

2.2.1.1. Plasmidpräparation

Für die Plasmidpräparation, sowohl im Mini- als auch im Midi- und Maximaßstab, aus *E. coli*, werden Materialien und Vorschriften der Firma Qiagen (Qiagen, Hilden) verwendet. Das verwendete Verfahren beruht auf einer Kombination der alkalischen Extraktionsmethode [Birnboim *et al.*, 1979] und anschließender säulenchromatischer Aufreinigung der DNA mit gleichzeitiger Abtrennung der Plasmid-DNA von chromosomaler DNA, RNA und Proteinen. Je nach Präparationsmaßstab werden leicht unterschiedliche Protokolle verwendet.

Minipräparation:

4 ml LB Medium mit Ampicillin versetzt werden mit einer *E. coli*-Kultur angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag werden die Zellen bei 3500 g pelletiert und in Puffer P1 resuspendiert. Durch fünfminütige Inkubation mit Puffer P2 wird der alkalische Zellaufschluss durchgeführt. Nach Zugabe von Puffer N3 (Neutralisation) und nachfolgender fünfminütiger Inkubation auf Eis werden die präzipitierten Proteine und chromosomale DNA durch zehnteilige Zentrifugation (13 000 rpm) abgetrennt. Das klare Ly-sat beinhaltet die Plasmid-DNA und wird auf eine QIAprep-spin-Säule gegeben, an die die Plasmid-DNA bindet und durch Waschen mit Puffer PE gereinigt wird. Durch Zugabe von Puffer EB wird die DNA eluiert.

Midi- und Maxipräparation:

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

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

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

2.2.1.2. Restriktionsspaltung

Restriktionsspaltungen von (Plasmid-)DNA werden für analytische und präparative Zwecke durchgeführt. Hierbei werden DNA-Fragmente aus Vektoren herausgeschnitten bzw. Vektoren linearisiert. Für eine Restriktionsspaltung werden, je nachdem ob es sich um einen analytischen oder präparativen Ansatz handelt, 0,5 bis 5 µg DNA, Puffer (Ansatzgröße: 10 bis 50 µl) und 5 bis 30 U Enzym eingesetzt. Der Spaltansatz wird 1 bis 4 Stunden oder über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert, anschließend mit 5 bis 25 µl DNA-Auftragspuffer für Agarosegele versetzt und auf einem Agarosegel analysiert.

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

2.2.1.3. Agarosegelelektrophorese

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

TAE-Puffer (1x)

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

Auftragspuffer für Agarosegele (MBI) 6x

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

GeneRuler 1 kb DNA-Leiter (MBI-Fermentas)

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

2.2.1.4. Isolierung der DNA aus Agarosegelen

Bei dem hier beschriebenen Verfahren handelt es sich um eine Abwandlung des QIAquick Gel Extraction Kit Protokolls der Firma Qiagen:

Das zu isolierende DNA-Fragment wird unter UV-Licht aus einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel ausgeschnitten und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt (max. 400 mg). Pro

100 mg Gel werden 300 µl Puffer QG zugegeben und das Gemisch bis zur vollständigen Auflösung des Gels bei 50°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Isopropanol/100 mg Gel wird der Ansatz auf eine QIAquick-spin-Säule überführt, eine Minute zentrifugiert (10.000 g) und auf der Säule mit 700 µl PE-Puffer gewaschen. Die DNA wird mit 30-50 µl EB-Puffer oder ddH₂O eluiert. Anschließend kann mit einer 1:100-Verdünnung mittels eines UV-Spektrums die Konzentration der erhaltenen DNA-Lösung bestimmt werden ($c = E_{260} \cdot 50 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$).

2.2.1.5. Ligation linearer DNA

Etwa 100 bis 400 ng linearisiertes Plasmid und Insert werden im molaren Verhältnis Rahmen:Insert ~ 1:1 bis 1:5 gemischt, mit 10x Ligasepuffer und 2 bis 10 U Ligase versetzt. Der Ansatz hat ein Gesamtvolumen von 10-20 µl und wird 1-2 Stunden bei 37°C (oder alternativ vier Stunden bei Raumtemperatur oder 16 Stunden bei 16°C) inkubiert. Die Gesamtmenge des Ligationsansatzes kann direkt zur Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt werden.

10x T4 DNA-Ligase-Puffer

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

2.2.1.6. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mittels *Polymerase Chain Reaction* (PCR) lässt sich DNA spezifisch *in vitro* amplifizieren. Die PCR wird im präparativen Maßstab für Klonierungen mit dem PCR-Produkt eingesetzt. Für Klonierungen ist eine geringe Fehlerrate der Polymerase sehr wichtig, deshalb werden hierfür *proofreading*-Polymerasen, wie beispielsweise die Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase. Diese Polymerase weist eine 5'→3' Polymeraseaktivität auf, sowie eine 3'→5' *proofreading*-Aktivität auf. Ein PCR-Ansatz hat normalerweise ein Volumen von 20 µl, ein Beispiel ist in Tabelle 1 angegeben. Die Bedingungen der PCR-Reaktion variieren sehr stark und sind abhängig vom eingesetzten Template, dem Primerpaar und dem verwendeten Enzym. Ein Beispiel für ein PCR-Programm ist in Tabelle 2 gezeigt.

Substanz	Ansatz
Template DNA	1 µl (< 50 ng)
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
5' Primer	1 µl
3' Primer	1 µl
5x HF-Buffer	5 µl
Phusion™ High Fidelity Polymerase	0,25 µl
dd H ₂ O	16,25 µl

Tab. 1: Beispiel eines PCR-Ansatzes

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
einleitende Denaturierung	98	120
Denaturierung	98	20
Annealing	50-60	30
Elongation	72	60
30 Zyklen		
abschließende Elongation	72	600
Endtemperatur	4	

Tab. 2: Beispiel eines PCR-Programms

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

2.2.1.7. DNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung von DNA nach Restriktionsspaltungen sowie von PCR-Produkten wird mit dem QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Mittels dieses Kits können DNA-Fragmente mit einer Größe von bis zu 10 kBp aufgereinigt und gleichzeitig Enzyme aus dem Ansatz entfernt werden. Für die Aufreinigung wird das PCR-Produkt oder der Restriktionsverdauansatz mit dem fünffachen Volumen an PB-Puffer versetzt und auf eine QIAquick Spin Säule gegeben. Es folgt eine Zentrifugation bei 16 000 g für eine Minute. Anschließend wird die Säule mit 600 µl PE-Puffer gewaschen, erneut eine Minute zentrifugiert und die gereinigte DNA mit 30 µl EB-Puffer eluiert. Die verwendeten Puffer sind Bestandteil des Purification Kits.

2.3. Mikrobiologische Methoden

2.3.1. Transformation von *E.coli*

Der in 2.1.6.1 angeführte *Escherichia coli*-Stamm wird für die Amplifikation der Plasmide benutzt. Dazu werden die kompetenten Bakterien (DMSO-Methode) mit einem Plasmid oder einen Ligationsansatz transformiert. Die Transformation erfolgt nach der Hitzeschockmethode. Bei dieser Methode werden ca. 200 µl Bakteriensuspension (-80°C) aufgetaut und mit 0,1-1 µg Plasmid-DNA 25 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt der sogenannte Hitzeschock, bei dem die Zellen für 50 sek. bei 42°C inkubiert und anschließend wieder auf Eis gestellt. Es werden 500 µl LB-Medium zugegeben und 1h bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden für 5 min. bei 2500 rpm pelletiert und auf einer LB-Agarplatte (bei Bedarf mit Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

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

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

LB_{Amp}-Agarplatten:

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

2.4. Zellbiologische Methoden

2.4.1. Transformation von *D. Discoideum*

Die Zellen (erläutert in 2.4.2) werden bei einer Dichte von $3-6 \times 10^6$ Zellen/ml durch Zentrifugation bei 1100 g für 5 Minuten pelletiert, zweimal mit kaltem Elektroporationspuffer (EP-Puffer) gewaschen und mit einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml in EP-Puffer resuspendiert. 800 µl der Zellsuspension werden in ein vorgekühltes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 20-30 µg DNA versetzt und auf Eis gestellt. Im Anschluss wird die Suspension in eine gekühlte 0,4 cm Elektroporationsküvette gegeben und nach 5 minütiger Inkubation auf Eis werden die abgesetzten Zellen aufgeschüttelt, die Küvette von außen getrocknet und sofort elektroporiert. Dafür wird das *Gene Pulser XCell Electroporation System* (Biorad, München) mit den Einstellungen 1,2 kV, 10 µF und 100 Ω mit einer Zeitkonstante von ca. 0,8 ms verwendet. Die Zellen werden erneut 10 Minuten auf Eis gekühlt. 200 µl bzw. 600 µl der Zellsuspension werden auf je eine Petrischale überführt und mit 11 ml Penicillin- und Streptomycinhaltigem HL5c-Medium versetzt. Nach ca. 24 Stunden wird das Medium gewechselt und zur Selektion der transformierten Zellen mit G418 (10 µg/ml) versetzt.

HL5c-Medium

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

EP-Puffer (Elektroporationspuffer)

3,8 g/l	NaH ₂ PO ₄ pH 6.3
17,1 g/l	Sucrose

2.4.2. Kultivierung von *D. discoideum*

D. discoideum-Zellen können in Zellkulturschalen oder in Schüttelkulturen bei 20°C kultiviert werden. Zur Verhinderung von Bakteriumwachstum werden dem Zellmedium HL5c 10 U/ml Penicillin und 10 µg/ml Streptomycin zugesetzt. Um auf transformierte Zellen Selektions-

druck auszuüben, wird dem Medium 10 µg/ml G418 (Geneticin) zugesetzt. Die in dieser Arbeit benutzten pDXA-Vektoren enthalten das *neoR*-Gen, so dass die Transformanten eine G418-resistenz aufweisen und mit G418 selektioniert werden können. Nicht transformierte Zellen AX3 Orf⁺-Zellen werden ohne Zugabe von G418 kultiviert.

In den Zellkulturschalen müssen die Zellen, wenn diese konfluent gewachsen sind, abgewaschen werden, um eine zu hohe Zelldichte zu verhindern. Durch Zugabe von frischem HL5c-Medium können die verbliebenen Zellen weiter kultiviert werden. Die abgewaschenen Zellen können beispielsweise für analytische Proteinpräparationen verwendet werden. Bei Bedarf ist es möglich, die Zellen für wenige Wochen bei 4°C zu lagern.

Für die präparative Proteinaufreinigung werden die Zellen in Erlenmeyerkolben (100 ml – 5l) in Schüttelkulturen angezogen. Die Kolben werden maximal bis zur Hälfte gefüllt und bei 180 rpm geschüttelt. Die Zellen werden dabei bei Dichten von 1×10^6 bis 1×10^7 Zellen/ml gehalten. Die verwendeten Wildtyp- und transformierten *D. discoideum*-Zellen haben eine Generationszeit von 8-24 Stunden.

2.4.3. Konservierung von *D. discoideum* Sporen

Rekombinante Zellen von *D. Discoideum* können in Form von Sporen bei -80 °C dauerhaft gelagert werden.

Für die Erzeugung dieser Sporen werden 50 bis 100 ml Zellsuspension einer Schüttelkultur mit einer Zelldichte von ungefähr 5×10^6 Zellen /ml durch Zentrifugation 1000 g für 4 min bei 4°C pelletiert. Die pelletierten Zellen werden dreimal mit MES-Puffer gewaschen und im Anschluss in 1ml MES-Puffer aufgenommen. Diese Zellsuspension wird auf einer MES-Agar-Platte ausplattiert und zunächst ohne Deckel getrocknet. Die Platten werden zwei Tage über Kopf bei 20 °C inkubiert. Der Fruchtkörper von *D. Discoideum* hat sich in dieser Zeit gebildet. Durch einen leichten Schlag der Platte auf eine Unterlage platzen die Fruchtkörper und die Sporen werden freigegeben. Diese fallen in den Deckel, werden in 500 bis 600 µl 10 % (v/v) 0,2 µm-filtrierten Glycerin aufgenommen und in 100 µl Aliquote aufgeteilt. Die Aliquote werden bei -80°C gelagert.

Um die Sporen wieder zum Keimen zu bringen, wird ein Aliquot aufgetaut und in eine Zellkulturschale mit 11 ml HL5c mit Penicillin und Streptomycin gegeben. Selektierendes Medium mit Geneticin wird erst nach 24 Stunden zugesetzt, um die Zellen nicht zu früh zusätzlichem Stress auszusetzen.

MES-Puffer

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

MES-Agar

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

2.5. Proteinbiochemische Methoden

2.5.1. Proteinkonzentrationsbestimmung durch UV-Absorptionsmessung bei 280 nm

Die Proteinkonzentration kann durch eine Messung der Lichtabsorption bei 280 nm bestimmt werden. Zur Absorption des Lichtes tragen im Wesentlichen die Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin bei. Der Extinktionskoeffizient eines Proteins wird daher mit Hilfe des Programms SEDNTERP anhand der Aminosäuresequenz des Proteins berechnet. Bei der Messung ist zu beachten, dass Pufferkomponenten die Absorption bei 280 nm beeinflussen können.

Bei Fusionsproteinen mit YFP (*yellow fluorescent protein*, gelb fluoreszierendes Protein) kann zusätzlich die Absorption des Fluorophors zur Konzentrationsbestimmung herangezogen werden. Zu beachten ist jedoch, dass das Fluorophor aufgrund der Anregbarkeit durch sichtbares Licht vor der Messung ausgebleichen sein kann.

2.5.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) [Laemmli, 1970] wird zum einen für die Überprüfung der Expression bei analytischen Proteinpräparationen und zum anderen zur Reinheitsbestimmung bei der Proteinaufreinigung eingesetzt. Das Analysegel besteht aus einem Trenngel und dem darauf auspolymerisierten Sammelgel. Die Zusammensetzung der Teilgele und der verwendeten Puffer sind unten angegeben. Es wird eine Minigel-

kammer der Firma Biorad benutzt. Die Proben werden vor dem Auftragen mit 6x Laemmli-p-robenauftragspuffer versetzt und 2-5 min. auf 95°C erhitzt. Der Gellauf erfolgt über ca. 1,5 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA oder bei einer konstanten Spannung von 200 V. Nach dem Lauf wird das Gel mit Coomassie-Färbelösung unter Aufkochen gefärbt und anschließend mit 6 % iger Essigsäure wieder entfärbt. Das Gel wird mit einem Videosystem dokumentiert oder eingescannt. Das Gel kann nach dem Lauf auch für einen Western Blot verwendet werden (siehe 2.5.3.).

Trenngel (10%); 10 ml Volumen:

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

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

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

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

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

Proteinstandard: BenchMark™ Protein Ladder, 220-10 kDa (Invitrogen):

enthält 15 Fragmente definierter Größe: 220, 160, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 kDa

Blot-Proteinstandard Prestained Protein Ladder, ~10-170 kDa (MBI Fermentas):

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

Laufpuffer (10x)

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

Coomassie-Färbelösung

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

Entfärbelösung

6 % (v/v)	Essigsäure
-----------	------------

Laemmliauftragspuffer (LAP) 6x

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

2.5.3. Western Blot

Zur Detektion rekombinanter Proteine werden Western-Blots nach dem Verfahren des Semi-Dry Blot angewandt. Dazu wird das Polyacrylamidgel nach der Gelelektrophorese mit zwei dicken Filterpapieren sowie eine Nitrozellulosemembran (PROTRAN Nitrocellulose Transfer Membran) in Größe des Gels für 5 Minuten in Blotpuffer gelegt. Auf das Blotgerät werden, entsprechend der Anordnung der Elektroden, ein Filterpapier, darauf die Nitrozellulosemembran, das Polyacrylamidgel und schließlich das zweite Filterpapier gelegt. Nach dem Schließen der Kammer werden 14 V Spannung für 45 min angelegt. Im Anschluss wird die Membran mit einer Lösung aus 2 % (w/v) Ponceau S in 3 % (w/v) TCA gefärbt, um die Effektivität des Protein-Transfers zu überprüfen. Zur anschließenden Entfärbung der Membran wird destilliertes Wasser verwendet. Die Membran wird nun für eine hal-

be Stunde in TBST-Puffer mit 5 % (w/v) Magermilchpulver inkubiert. Anschließend wird die Membran mit dem primären Antikörper in TBST-Puffer mit 5 % (w/v) Magermilchpulver inkubiert. Die Antikörperverdünnung ist spezifisch für den jeweiligen Antikörper und wird dementsprechend angepasst. Die Inkubation der Membran in der Antikörperlösung erfolgt unter Schütteln für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nach 3x10 min Waschen mit TBST-Puffer wird die Membran in TBST-Puffer mit 5 % (w/v) Magermilchpulver und dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Es folgen drei weitere Waschschritte zu je 10 min mit TBST-Puffer. Der Sekundärantikörper ist mit Peroxidase aus Meerrettich (*horseradish peroxidase*, HPR) konjugiert, die mittels einer Chemilumineszenzreaktion unter Verwendung eines Kits von PIERCE (Super Signal Dura West Extended Duration Substrate) nachgewiesen werden kann.

Blotpuffer

48 mM	Tris
39 mM	Glycin
0.03 %	SDS

TBST-Puffer

20 mM	Tris/HCl pH 7.5
137 mM	NaCl
0.05 % (v/v)	Tween-20

2.5.4. Analytische Proteinpräparation

Die analytische Protein-Mini-Präparation wird durchgeführt um transformierte *D. discoideum*-Zellkulturen auf die Expression des gewünschten Proteins zu untersuchen.

Für die Proteinpräparation wird das Medium einer konfluent gewachsenen Zellkulturschale abgenommen und anschließend die Zellen mit 1 ml Medium abgespült. Die Zellen werden pelletiert und mit 1 ml Lysis-Puffer gewaschen. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 500 µl Resuspensionspuffer resuspendiert. Anschließend wird die gleiche Menge Zell-Lysis-Puffer zugegeben und für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Für die Untersuchung der Expression rekombinanter Myosinkonstrukte wird nach einer 30 minütigen Zentrifugation bei 13 000 rpm bei 4°C der Überstand (cytosolische Fraktion) abgenommen und das Pellet (Zelltrümmer, Aktin, Myosin, rekombinante Myosinkonstrukte) mit 500 µl Lysis-Puffer resus-

pendiert und erneut pelletiert. Das rekombinante Myosin wird durch Homogenisierung mittels eines Mikropistills in 40 µl Extraktionspuffer aus dem Pellet extrahiert. Zur Verbesserung der Extraktion von Myosinkonstrukten mit hoher Aktinaffinität können dem Extraktionspuffer 100-500 mM KCl oder NaCl zugesetzt werden. Nach 20 minütiger Zentrifugation mit 13 000 rpm bei 4°C wird der Überstand mit Laemmliauftragspuffer versetzt, für 2 Minuten bei 95 °C erhitzt und 10 bis 20 µl auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Zur Überprüfung der Effektivität der Extraktion wird das Pellet nach der Extraktionszentrifugation in 40 µl dH₂O resuspendiert, ebenfalls mit Auftragspuffer versetzt und auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

Lysis-Puffer

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

Resuspensionpuffer = Lysis-Puffer mit:

2-5 U	alkalische Phosphatase
0,02 %	NaN ₃
Protease-Inhibitormischung 1 & 2	

Zell-Lysis-Puffer = Lysis-Puffer mit:

1 %	Triton X-100
Protease-Inhibitormischung 1 & 2	

Extraktionspuffer = Lysis-Puffer mit:

Protease-Inhibitormischung 1 & 2	
10 mM	ATP
12 mM	MgCl ₂

Proteaseinhibitormischung 1 (100x in Ethanol)

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

Proteaseinhibitormischung 2 (1.000x in Ethanol)

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

2.5.5. **Aufreinigung von Aktin aus Kaninchenmuskel**

Das in biochemischen Assays und kinetischen Experimenten verwendete Aktin wird aus Neuseeland-Kaninchen gewonnen. Aktin und Myosin-2 stellen einen sehr großen Gewichtsanteil des Muskelfleischs und können daher relativ einfach in großen Mengen aus Muskelgewebe aufgereinigt werden. Für die Präparation des Aktins und dessen Abtrennung von Myosin-2 wird ausgenutzt, dass Aktin bei hohen Salzkonzentrationen in der filamentösen Form (F-Aktin) vorliegt und Myosin-2 hingegen erst bei hohen Salzkonzentrationen präzipitiert [Spudich und Watt, 1971]. Die Präparation wird im Kühlraum bei 4°C durchgeführt und alle Puffer vorgekühlt.

Für die Präparation des Aktins wird ein Neuseeland-Kaninchen geschlachtet und das Muskelfleisch von Rücken und Beinen sofort nach der Präparation auf Eis gekühlt. Dazu wird es in Plastiktüten verpackt, ausgebreitet und etwa 30 Minuten auf Eis gekühlt. Die Sehnen werden möglichst entfernt und das zerkleinerte Fleisch gewogen und im Fleischwolf weiter zerkleinert. Alle folgenden Mengenangaben beziehen sich auf diese Masse. Das Homogenat wird in 3 l/kg Fleisch Guba-Straub-Puffer unter langsamen Rühren extrahiert. Unter kräftigen werden 12 l/kg Fleisch Wasser zugegeben und die Suspension durch ein Mulltuch filtriert. Der Aktin-haltige Rückstand wird in Carbonatpuffer A aufgenommen. Das Filtrat kann für eine Myosin-Aufreinigung verwendet werden. Der resuspendierte Rückstand wird 30 Minuten gerührt und erneut durch ein Mulltuch filtriert. Dieser Rückstand wird in 1 l Carbonatpuffer B aufgenommen und nach 10 min mit 10 l destilliertem, 20 °C warmen Wasser verdünnt. Die festen Bestandteile werden abfiltriert und mit 2,5 l Aceton versetzt, erneut filtriert und wieder mit Aceton versetzt. Nach erneutem Filtrieren wird das Aceton ein bis zwei Tage unter der Sterilwerkbank abgedampft und so das Aktinpulver getrocknet. Größere Gewebebestandteile werden abgeseibt und das gewonnene Aktin-haltige Acetonpulver bei -20 °C gelagert.

Guba-Straub-Puffer (pH 6,6)

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

Carbonatpuffer A

4 % (w/v)	NaHCO ₃
0,1 mM	CaCl ₂

Carbonatpuffer B

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

2.5.6. Präparation von F-Aktin

Aus dem in 2.5.5. gewonnen Acetonpulver wird durch wiederholtes Depolymerisieren und Polymerisieren reines F-Aktin gewonnen [Lehrer und Kerwar, 1972]. Hierfür wird ausgenutzt, dass Aktin bei niedriger Ionenstärke als monomeres G-Aktin und bei hoher Ionenstärke als polymeres F-Aktin vorliegt.

Für die Extraktion des G-Aktins werden 5 g Aceton-Pulver in 120 ml kaltem Aktinpuffer für 30 Minuten bei 4°C gerührt und die Fasern werden währenddessen mit einem Spatel zerkleinert. Die Suspension wird durch ein Mulltuch filtriert und gepresst, um die faserigen Bestandteile abzutrennen. Anschließend folgt eine Zentrifugation (1h, 70 000 g, 4°C, Beckmann Optima LE 80k Ultrazentrifuge, Rotor 70 Ti: 30 000 rpm) um die restlichen unlöslichen Bestandteile abzutrennen. Zur Abschätzung der Aktinmenge wird die Konzentration durch eine Absorptionsmessung bei 280 nm gemessen ($\epsilon_{280\text{nm}} = 46 \times 10^3 \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, 41,7 kDa). Aktin wird polymerisiert, in dem die Lösung auf eine Endkonzentration von 100 mM KCl und 2 mM MgCl₂ gebracht wird und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wird. Die Lösung sollte danach eine so hohe Viskosität aufweisen, dass Luftblasen in der Lösung nicht mehr aufsteigen. Durch erneute Zentrifugation wird das F-Aktin mittels Pelletieren isoliert (3 h, 70 000 g, 4°C). Ist das Pellet nicht vollständig klar, weist dies auf Verunreinigungen hin. Zum Depolymerisieren wird das F-Aktin-Pellet in 50-100 ml Depolymerisierungspuffer mit einem Glashomogenisator resuspendiert und über Nacht gegen 5 l dieses Puffers bei 4°C dialysiert. Durch die Dialyse wird das Salz entfernt und das F-Aktin depolymerisiert. Unlösliche Bestandteile werden durch eine folgende Zentrifugation (1 h, 70 000 g, 4°C) entfernt und die Konzentration des G-Aktins durch eine Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt.

Wird eine sehr hohe Reinheit des F-Aktins benötigt, wie beispielsweise für *in vitro* Motilitätssassays, wird das G-Aktin wie bereits beschrieben erneut ein bis zwei mal polymerisiert und depolymerisiert. Die abschließende Polymerisierung wird in dem für das Experiment gewünschten Puffer durchgeführt. G-Aktin kann auch durch Zugabe von 3 % Sucrose und 1 mM DTT bei -80°C gelagert werden.

Das zu polymerisierende G-Aktin wird mit 3 M KCl und 1 M MgCl₂ bis zu den Endkonzentrationen 100 mM KCl und 2 mM MgCl₂ versetzt und dadurch die Polymerisierung ausgelöst. Um lange Aktinfilamente zu erhalten, wird dieser Schritt über Nacht oder länger bei 4°C durchgeführt.

Aktinpuffer

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

Depolymerisierungspuffer

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

2.5.7. Präparation von Pyren-markiertem F-Aktin

Für kinetische Messungen der Aktin-Myosin-Interaktion wird fluoreszenzmarkiertes Aktin benötigt. Die Präparation von Pyren-markiertem F-Aktin (Py-Aktin) erfolgt nach einer Methode von Criddle *et al.* (1985). Dazu wird eine ca. 1 mg/ml konzentrierte F-Aktinlösung mit N-(1-pyrenyl)iodacetamid (5 mg/ml in DMF) in einem Verhältnis von ungefähr 0,9 % (v/v) Pyren/Aktin unter Rühren versetzt. Diese Lösung wird ca. 14 h bei Raumtemperatur im Dunkeln gerührt. Überschüssiger bzw. unlöslicher Farbstoff wird bei 8000 rpm 1h bei 4°C pelletiert. Im Anschluss wird das im Überstand enthaltene Pyren-Aktin für 3 h bei 70 000 rpm bei 4°C pelletiert und im Aktin-Resuspensionspuffer aufgenommen.

Die Bestimmung der Aktin-Konzentration sowie des Anteils an Pyren-markiertem Aktin ist durch Extinktionsmessung bei 280 nm möglich. Dabei muss jedoch die Absorption von Pyren bei 280 nm berücksichtigt werden (Kouyama und Mihashi, 1996). Die Pyren-Konzentration kann mithilfe des Absorptionsmaximums von Pyren bei 344 nm ($\epsilon_{344} = 23300 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) bestimmt werden. Daraufhin kann die Pyren-Absorption bei 280 nm unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten von Pyren bei 280 nm ($\epsilon_{280} = 22000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) berechnet und von der Gesamtabsorption subtrahiert werden. Der Markierungsgrad liegt in der Regel zwischen 60 und 85 %.

Aktin-Resuspensionspuffer:

5 mM	Tris/HCl pH 7.5
100 mM	KCl
2 mM	MgCl ₂
0.04 %	NaN ₃

2.5.8. Präparative Aufreinigung rekombinanter Myosine aus *D. discoideum*

Für die Aufreinigung von rekombinanten Myosinen aus *D. discoideum* im präparativen Maßstab wird im Wesentlichen entsprechend der analytischen Proteinpräparation vorgegangen (siehe Abschnitt 2.5.4.), wobei allerdings mehr Zellmaterial eingesetzt wird [Manstein *et al.*, 1995]. Im Anschluss an die Auftrennung unter Ausnutzung des *rigor*-Komplexes findet eine Affinitätsaufreinigung statt. Bei Bedarf werden weitere säulenchromatographische Trennverfahren angewandt.

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

Alle weiteren Schritte erfolgen bei 4°C oder auf Eis und werden durch die Analyse von Proben durch SDS-PAGE überprüft. Die vereinigten Zellpellets werden in 0,5 l kaltem PBS gewaschen und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wird das Nassgewicht der Zellen bestimmt (typischerweise zwischen 20 und 60 g aus 12 l Schüttelkultur) und das Pellet wird in 600 ml Lysepuffer vollständig resuspendiert. Zu der Suspension werden 300 ml Lysepuffer mit 1 % (w/v) Triton-X100, 15 µg / ml RNase A und 100 U alkalischer Phosphatase gegeben. Darin werden die Zellen durch Ultraschallbehandlung für 1 min mit dem Gerät Sonoplus der Firma Bandelin electronic, Berlin, aufgeschlossen (3/4 Zoll Spitze, 40% „power setting“, 50 % „duty cycle“). Das Lysat wird 45 min. lang unter Rühren auf Eis oder bei 4°C inkubiert, danach sollten unter dem Mikroskop keine intakten Zellen mehr sichtbar sein. Anschließend wird zentrifugiert (1 h, 16 000 rpm im Beckman JLA 16.250 Rotor. Die vereinigten Pellets, welche Aktinfilamente mit daran gebundenem Myosin enthalten, werden mit 60 – 100 ml Extraktionspuffer gewaschen und unter gleichen Bedingungen erneut 45 min lang zentrifugiert. Das Pellet wird in mindestens 1,6 ml Extraktions-

puffer pro Gramm Zellen mit 15 mM ATP mit Hilfe eines Glashomogenisators resuspendiert. Die Aktinfilamente werden durch Zentrifugation entfernt (1h, 25 000 rpm im Beckman JA 25.50 Rotor) und der Überstand wird nach Sterilfiltration durch einen Filter mit 0,45 µm Porengröße für die säulenchromatographische Auftrennung eingesetzt. Entsprechend dem verwendeten Affinitäts-tag wird der Extraktionsüberstand entweder (bei Konstrukten mit (His)₈-tag) auf eine selbst gepackte Ni-NTA-Säule (Nickel-Nitriltriacetat, Qiagen) oder (bei Konstrukten mit FLAG-tag) auf eine selbst gepackte α-FLAG-Säule (ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel, Sigma-Aldrich) aufgetragen. Es werden XK-16/20 Leersäulen der Firma Amersham Pharmacia mit einem Innendurchmesser von 1,6 cm und einer Füllhöhe von 5 bis 15 cm verwendet, so dass sich ein Säulenvolumen (*column volume*, CV) von 10 – 30 ml ergibt. Für den Betrieb der α-FLAG-Säule wird eine peristaltische Pumpe (Minipuls 2, Gilson) eingesetzt, alle anderen säulenchromatographischen Trennschritte werden mit dem Flüssigchromatographiesystem ÄKTApurifier 10 der Firma Amersham Biosciences durchgeführt.

Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Die Säule wird zunächst durch Spülen mit jeweils einem Volumen Imidazol- und Ni-NTA-Hochsalzpuffer und 10 Volumina Ni-NTA-Niedrigsalzpuffer äquilibriert. Die Proteinlösung wird mit Hilfe eines 50 oder 150 ml Superloops (Amersham Pharmacia) mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule geladen. Nach Waschen mit 10 CV Ni-NTA-Niedrigsalzpuffer und 5 CV Ni-NTA-Hochsalzpuffer sowie 5 CV Ni-NTA-Niedrigsalzpuffer mit 10 % Imidazolpuffer (entspricht 50 mM Imidazol) mit einer Flussrate von 3 ml/min wird das Protein durch einen Gradienten mit einem Anteil von 10 – 100 % Imidazolpuffer über 4-6 CV, welcher dem Ni-NTA-Niedrigsalzpuffer zugesetzt wird, bei einer Flussrate von 2 ml/min eluiert und in Fraktionen zu 1,5 ml aufgefangen. Die Fraktionen, die laut Analyse mittels SDS-PAGE das rekombinante Myosin enthalten, werden vereinigt und über Nacht gegen den für den nächsten Schritt erforderlichen Puffer dialysiert.

α-FLAG-Affinitätschromatographie

Vor der Benutzung wird die Säule mit mindestens 1 CV TBS, dann mit 3 CV 0.1 M Glycin-HCl, pH 3.5 und anschließend mit weiteren 5 CV TBS äquilibriert. Um optimale Bedingungen für die Bindung an das Säulenmaterial zu erreichen, wird der Salzgehalt der Proteinlösung zunächst auf 150-300 mM KCl eingestellt, dann wird die Lösung mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule geladen. Nach Waschen mit 15 CV FLAG-Waschpuffer wird das gebundene Protein durch kompetitive Verdrängung mit 4 CV FLAG-Elutionspuffer eluiert und es werden Fraktionen zu je 5 ml gesammelt. Nach

Analyse mittels SDS-PAGE werden die proteinhaltigen Fraktionen vereinigt und über Nacht gegen den Puffer, der für den nächsten Reinigungsschritt oder für das Einfrieren des Proteins benötigt wird, dialysiert.

Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)

Wird das Protein für die Kristallisation eingesetzt, ist eine höhere Reinheit erforderlich. In diesem Fall folgt als letzter Reinigungsschritt eine Gelfiltration. Dazu wird gegen 2 l Lagerpuffer mit 150-300 mM KCl über Nacht dialysiert. Für die Gelfiltration wird eine fertig gepackte Säule HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade (320 ml Bettvolumen), Amersham Biosciences, eingesetzt. Die Trennung erfolgt mit Lagerpuffer mit 150-300 mM KCl als Laufmittel bei einer Flussrate von 2 ml/min. Maximal 5 % des Säulenvolumens an Proteinlösung werden mit Hilfe eines 7,8 ml Sampleloops aufgetragen. Die Peaks werden in Fraktionen zu je 0,5 ml aufgefangen und nach Analyse mit SDS-PAGE entsprechend vereinigt.

Konzentrierung und Lagerung der Proteinlösung

Nach dem letzten Reinigungsschritt erfolgt abschließend eine Dialyse über Nacht gegen 2 l Lagerpuffer mit 3 % (w/v) Sucrose sowie ein Aufkonzentrieren der Probe mit Hilfe von Vivaspin Konzentratoren (MW cut-off = 50 kDa, Vivascience AG, Hannover). Für kinetische und funktionale Untersuchungen wird die Myosinlösung auf eine Konzentration von 2-4 mg/ml, für Kristallisationsansätze auf 7,5-15 mg/ml eingestellt. Soll das Myosin im *in vitro*-Motilitätsassay verwendet werden, wird die Salzkonzentration der Proteinlösung auf mindestens 150-300 mM KCl eingestellt und es werden 30 % (w/v) Sucrose zugesetzt. Abschließend wird das Protein in geeigneten Aliquots entweder in 0,2 ml Plastikreaktionsgefäßen (~40 µl) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

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

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

Lysepuffer:

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

Proteaseinhibitormischung 1 (100x in Ethanol):

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

Proteaseinhibitor 2 (1.000x in Ethanol);

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

Extraktionspuffer:

50 mM	HEPES, pH 7,3 / 8,0
30 mM	Kaliumacetat
15 mM	Magnesiumacetat
7 mM	2-Mercaptoethanol (frisch zugeben)
5 mM	Benzamidin (frisch zugeben)
(15 mM	ATP)
(0-500 mM	KCl)

Ni-NTA-Niedrigsalzpuffer:

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

Ni-NTA-Hochsalzpuffer:

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

Imidazolpuffer:

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

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

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

Glycin-HCl:

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

FLAG-Waschpuffer:

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

FLAG-Elutionspuffer:

50 mM	HEPES, pH 7,3
150 mM	Kaliumacetat
100-200 µg/ml	FLAG Peptid
3 mM	Benzamidin

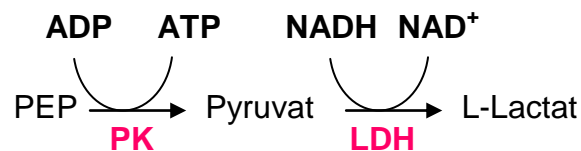
Lagerpuffer:

50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
0,5 mM	EDTA
0,2 mM	EGTA
1 mM	Magnesiumacetat
1 mM	Benzamidin
1 mM	DTT
150-300 mM	KCl
3 %	Sucrose

2.6. Biophysikalische Methoden

2.6.1. Kinetiken im Fließgleichgewicht

Die spektralen Eigenschaften der Edukte und Produkte bei der Umsetzung von ATP zu ADP katalysiert durch Myosin verändern sich nicht. Daher muss dieser Prozess für experimentelle Untersuchungen an eine Indikatorreaktion, die bei der Umsetzung chromophore Produkte abbaut oder produziert, gekoppelt werden. Grundlegend für die Kopplung ist, dass die Indikatorreaktion nicht geschwindigkeitsbestimmend sein darf, sondern immer die zu untersuchende Umsetzung von ATP zu ADP die Gesamtgeschwindigkeit limitiert. Hierzu wird die ATPase-Aktivität des Myosins (M) im Fließgleichgewicht mit Hilfe der Enzyme Pyruvatkinase (PK) und Laktatdehydrogenase (LDH), die den ATP-Verbrauch an die Oxidation von NADH zu NAD⁺ koppeln, gemessen [Trentham *et al.*, 1972; Furch *et al.*, 1998].



Die Oxidation des NADHs zu NAD⁺ wird durch die Messung der Lichtabsorption bei 340 nm verfolgt ($\epsilon_{340\text{nm},\text{NADH}} = 6220 \text{ L M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Die Messungen des Fließgleichgewichts der ATP-Hydrolyse werden bei 21°C durchgeführt. Die Zusammensetzung der Probenansätze ist unten angeführt. Alle Bestandteile werden gemischt, durch die Zugabe von ATP wird die Reaktion gestartet und die Lösung in eine Küvette überführt. Die Reaktion wird bis 600 s photometrisch verfolgt. Aus der zeitabhängigen linearen Abnahme der Absorption wird bei bekannten Konzentrationen der Reaktionspartner die Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse im Fließgleichgewicht berechnet. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes kann aus der gemessenen zeitlichen Abnahme der Absorption ΔA pro Minute die Änderung der NADH-Konzentration mit der Zeit berechnet werden. Die Änderung der NADH-Konzentration entspricht der Änderung der ATP-Konzentration.

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

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

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes:

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

2.6.2. Stopped-Flow-Messungen

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

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

Im Folgenden wird die in dieser Arbeit angewandte *Stopped-Flow*-Technik erläutert [Chance *et al.*, 1964; Eccleston *et al.*, 1987]. Ein *Stopped-Flow*-Gerät ist im Wesentlichen ein Spekt-

rometer mit einer zusätzlichen Einheit, die ein schnelles Mischen der Reaktanden zulässt. Die Apparatur ist schematisch in Abbildung 9 gezeigt.

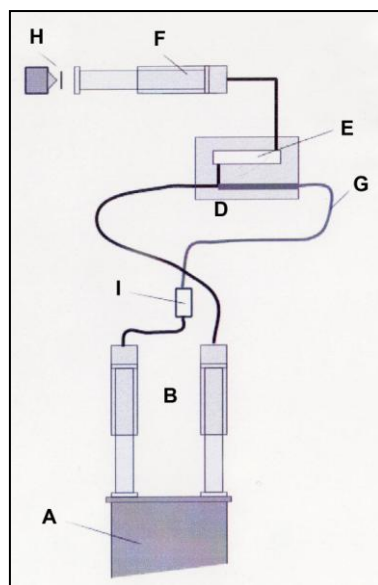


Abb. 9: Schematische Darstellung einer *Stopped-Flow*-Apparatur. Erläuterungen im Text [verändert nach: Applied Photophysics π^* -180 Spectrometer User Handbook, 2003].

In dieser Arbeit wird mit dem Hi-Tech Scientific SF-61SX2 *Stopped-Flow*-Gerät gearbeitet. Zwei Spritzen (B) werden aus Vorratsgefäßen mit den Reaktanden befüllt. Der Fluss durch flexible Verbindungsschläuche (G) und Konnektoren (I) zu oder aus diesen Spritzen wird durch Teflon-3-Wege-Ventile kontrolliert. Die Spritzenstempel werden synchron mittels eines pneumatischen Antriebs (A) bewegt. Die Druckluft drückt die Reaktanden in die Mischkammer (D) und von dort weiter in die Messzelle (E). Der Fluss der Reaktionslösung wird in der Stoppspritze (F) abgebremst. Der Kolben der Spritze löst bei diesem Vorgang über einen Mikroschalter (H) die Aufzeichnung des Signals mit Hilfe eines Photomultipliers aus. Ein externes Wasserbad erlaubt es, sowohl die Spritzen, als auch die Misch- und Messzellen zu temperieren. Die obere Auflösungsgrenze wird durch die Totzeit, also der Zeit zwischen dem Mischen der Lösungen und dem Auslösen der Aufzeichnung, bestimmt, die bei dem verwendeten Instrument zwischen 1,3 und 1,5 ms liegt. Es können also Reaktionen mit Geschwindigkeiten bis zu 650 s^{-1} beobachtet werden, schnellere Reaktionen sind bereits in der Totzeit vollständig abgelaufen.

Als optisches Signal wird die zeitliche Änderung der extrinsischen oder intrinsischen Fluoreszenz eines Reaktanden während der Reaktion verfolgt. Als Lichtquelle dient dazu eine 75 W Hg/Xe -Lampe. Das emittierte Licht wird durch einen Monochromator und einen

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

Das Signal des Photomultipliers wird elektronisch gefiltert und von einem PC aufgezeichnet. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses der Messungen und um Artefakte zu vermeiden, werden mindestens drei Messungen pro Lösung durchgeführt und anschließend gemittelt. Jeder Mischvorgang erfordert 35-50 µl von jeder der Lösungen. Die Reaktanden werden im Verhältnis 1:1 gemischt, ihre Konzentrationen halbieren sich also beim Mischen. Die Auswertung der Messungen, d.h. die Anpassung von Exponentialfunktionen an den Signalverlauf und die Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten und Amplituden wird sowohl mit der Software der Stopped-Flow-Apparatur (KinetAsyst 2.0) als auch mit dem Programm „Origin 7.0 bzw. 8.0“ durchgeführt.

2.7. Röntgenkristallographische Methoden

2.7.1. Proteinkristallisation

Voraussetzung für die Röntgenstrukturanalyse ist, dass das Protein kristallisiert werden kann, da die Röntgenstreuung von einem einzelnen Molekül zu schwach wäre um diese zu messen. In einem Proteinkristall existiert eine dreidimensionale geordnete, periodische Gitterstruktur der Proteinmoleküle, die zu einer Vergrößerung des Signals führt. Dabei ist die Ordnung innerhalb des Kristalls ein wichtiger Faktor. Ist die Ordnung hoch in dem Kristall führt die Brechung der Röntgenstrahlung zu einer hohen Auflösung der Struktur. Ist der Kristall nicht homogen und daraus resultierend nicht geordnet, ist es nicht möglich Brechungs-

muster mit einer hohen Auflösung zu erzielen. Um homogene gut streuende Kristalle zu bekommen, muss das Protein in hoher Reinheit in Lösung vorliegen [Rhodes, 2006].

Die häufigste verwendete Methode zur Kristallisation von Proteinen ist die der Dampfphasendiffusion [Ducruix, A. und Giege, R., 1999]. Das Protein ist dabei in einem wässrigen Puffer gelöst, in dem zusätzlich ein Präzipitant, beispielsweise Polyethylenglykol, Zucker oder Salze, gelöst ist.

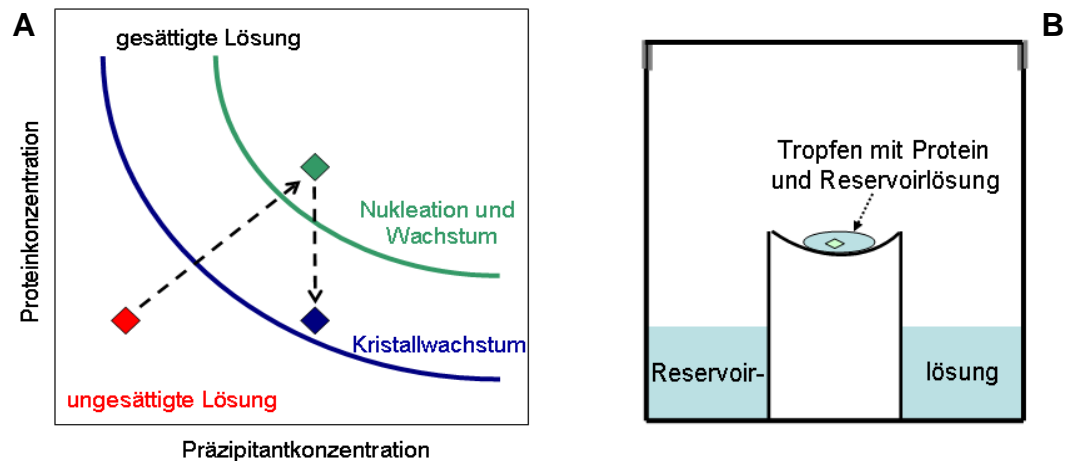


Abb. 10: (A) Phasendiagramm der Kristallisation durch Dampfphasendiffusion, (B) schematische Darstellung der *Sitting drop*-Methode

Die gängigsten Methoden für die Dampfdiffusion sind das *Hanging drop*-Verfahren und das *Sitting drop*-Verfahren. Bei dem *Sitting drop*-Verfahren wird ein Tropfen bestehend aus Proteinlösung und Reservoirolösung auf einem Podest umgeben von Reservoirolösung, platziert. Die Vertiefung wird abgedichtet, so dass sich ein Gleichgewicht zwischen Tropfen und Reservoirolösung mittels Dampfdiffusion ausbilden kann (siehe Abbildung 10B). Evaporation und Kondensation in diesem geschlossenen System führen zu einem Wassertransfer aus dem Tropfen in die Reservoirolösung bis die Puffer- und Präzipitantkonzentration in dem Tropfen und der Reservoirolösung gleich sind. Dadurch steigt die Protein- und Fällungsmittelkonzentration im Tropfen und werden langsam in die Nukleations- und Kristallwachstumsphase angehoben, ohne dass die Konzentrationen zu hoch werden und das Protein präzipitiert anstatt zu kristallisieren (siehe Phasendiagramm in Abbildung 10A). Sind die Konzentrationen im Bereich der Nukleationsphase bilden sich Kristallisationskeime. Dadurch sinkt die Proteinkonzentration in der Lösung und es findet eine Phasenverschiebung in den Bereich des Kristallwachstums statt. Bei diesen Konzentrationsbedingungen des Proteins und des Fällungsmittels liegen ideale Bedingungen für das Wachstum der Kristalle vor.

Zur Kristallisation wurde ausschließlich das sogenannte „*sitting drop*“-Verfahren angewendet. Für diese Technik werden je 1 µl Protein- und Reservoirlösung auf einer Erhöhung in einer Vertiefung einer 24-well-Linbroplatte gemischt. In die Vertiefung werden 500-1000 µl Reservoirlösung pipettiert und mittels eines Deckgläschen, die mit viskoser Siliconpaste befestigt werden, versiegelt, damit der Äquilibrierungsvorgang durch Dampfdiffusion in einem geschlossenen System stattfindet.

Alle Arbeitsschritte wurden mit vorgekühlten Lösungen bei 4°C durchgeführt. Für die Kristallisation vom Myosin-5b-K6 wurden folgende Lösungen verwendet.

Proteinlösung		Reservoirlösung	
50 mM	Tris-HCl pH 8	50 mM	Tris-HCl/HEPES pH 7.4-7.8
0.2 mM	EGTA	5 mM	MgCl ₂
0.5 mM	EDTA	1 mM	EGTA
1 mM	Mg-Acetat	5 mM	DTT
1 mM	DTT	2 %	MPD (2-Methylpentan-1,3-diol)
1 mM	Benzamidin	100 – 200 mM	NaF
3 %	Sucrose	10-12 %	PEG 8000
300 mM	KCl		
12-13 mg/ml	Myosin-5b-K6-Mutante		

2.7.1.1. Microseeding

Die Methode des *Microseedings* [Thaller *et al.*, 1981 und 1985] wird genutzt, um durch bereits vorhandene Kristallisationskeime ein Wachstum größerer und geordneter Proteinkristalle zu erzielen. Der Kristallisationsprozess besteht aus mehreren Schritten, Kristallisationskeimbildung und Kristallwachstum. Damit eine Keimbildung erfolgen kann, muss die Konzentration an Präzipitant häufig höher sein als für ein geordnetes dreidimensionales Kristallwachstum passend wäre. Um die Nukleationsbarriere zu umgehen, kann das *Microseeding* angewendet werden. Mit dieser Methode können Kristalle in Konditionen wachsen, die ideal für das Wachstum sind aber in denen keine spontane Kristallisationskeimbildung stattfinden würde.

Für diese Methode werden bereits vorhanden Kristalle des Proteins in Mikrokrystalle, die *Seeds*, zerkleinert. Die Kristallisationsansätze wurden wie in 2.7.1 beschrieben angesetzt.

Zusätzlich wurde nach der Zusammengabe der Reservoirlösung und der Proteinlösung eine Nadel erst durch die Lösung mit den Mikrokrystallen gezogen und anschließend bis zu dreimal durch den neuen Kristallisationsansatz. Dieser Ansatz wurde wie bereits beschrieben versiegelt und bei der gewünschten Temperatur inkubiert. Alle Arbeitsschritte erfolgen bei 4°C mit vorgekühlten Lösungen.

2.7.1.2. Einfrieren von Myosinkristallen zur Datensammlung

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Röntgenbeugungsdaten wurden an tiefgefrorenen Kristallen gemessen. Durch die Messung bei tiefen Temperaturen wird die Entstehung von Strahlenschäden am Kristall stark reduziert [Rodgers *et al.*, 1994].

Um die Proteinkristalle unbeschadet einzufrieren, muss die Bildung von kristallinem Eis in der umgebenden Mutterlauge des Kristalls verhindert werden. Dazu werden sogenannte Frostschutzmittel, wie beispielsweise Zuckerverbindungen, Alkohole, Ethylenglykol oder Polyethylenglykol zugesetzt, die ein glasartiges Frieren der umgebenden Lösungen bewirken [Garman und Schneider, 1997].

Um die Myosinkristalle schonend an die Einfrierbedingungen zu gewöhnen, erfolgt das Umsetzen der Kristalle in die Kryolösung schrittweise. Dazu werden die Reservoirlösung und die Kryolösung in folgenden Verhältnissen gemischt:

Reservoirlösung (μl)	Kryolösung (μl)
20	0
16	4
12	8
8	12
4	16
0	20

Der Kristall wird mittels einer kleinen Schlaufe (MiTeGen Micro Mounts™) aus dem Kristallisationsansatz rausgeholt und in die jeweilige Lösung (5 μl) überführt. In jeder Lösung wird der Kristall 4-5 Minuten inkubiert, bevor dieser in die nächste Lösung überführt wird. Nach dem der Kristall 5 Minuten in der Kryolösung inkubiert wird, wird dieser mit der kleinen Schlaufe in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wird die Kryoschlaufe mit Hilfe

eines Transfersystems in ein Dewargefäß mit flüssigem Stickstoff bis zur Vermessung gelagert.

Das Einfrieren der Myosinkristalle erfolgt bei 4°C mit vorgekühlten Lösungen. Für das Einfrieren von Myosin-5b-K6 wurden folgende Lösungen verwendet.

Reservoirlösung		Kryolösung	
50 mM	Tris-HCl/HEPES pH 7.4-7.8	50 mM	Tris-HCl/HEPES pH 7.4-7.8
5 mM	MgCl ₂	5 mM	MgCl ₂
1 mM	EGTA	1 mM	EGTA
5 mM	DTT	5 mM	DTT
2 %	MPD (2-Methylpentan-1,3-diol)	2 %	MPD (2-Methylpentan-1,3-diol)
100 – 200 mM	NaF	150 mM	NaF
10-12 %	PEG 8000	15 %	PEG 8000
		25 %	Ethylenglykol
		150 mM	NaCl

2.7.2. Datensammlung und Datenverarbeitung

Die Röntgenbeugungsdaten eines Proteinkristalls werden im Drehkristallverfahren aufgenommen. Dabei wird der Kristall stets unter einem Ausstrom von flüssigem Stickstoff gedreht, um die Beschädigung des Kristalls möglichst gering zu halten. Um welche Gradanzahl der Kristall in dem monochromatischen Röntgenstrahl rotiert wird, hängt von der Auflösung, der Spotgröße und der Größe der Einheitszelle ab. Die Aufnahme der Daten erfolgt mit der Oszillationskamera.

Alle dieser Arbeit zugrunde liegenden Beugungsdaten wurden mit monochromatischer Synchrotronstrahlung im Drehkristallverfahren bei tiefen Temperaturen mit einer Oszillationskamera [Arndt und Wonacott, 1977] aufgenommen.

Um die Qualität des Kristalls zu überprüfen, werden zwei *Images* im Abstand von 90° aufgenommen. Erreichen die Beugungsdaten eine ausreichende Auflösung wird der Kristall vermessen. Dazu werden im Abstand von 0,5-1° *Images* aufgenommen. Wichtige Parameter für die folgende Datenverarbeitung sind die Wellenlänge, der Abstand zum Detektor, der Detektortyp und die Koordinaten des Ursprungs. Nach der Aufnahme von 5-10° können diese Einzelbilder mit „XDS“ [Kabsch, 1993] verarbeitet werden und die Datensammlung anhand der vorhergesagten Raumgruppe optimiert werden. Dabei ist das Ziel, einen mög-

lichst kompletten Datensatz zu erreichen. Nach abgeschlossener Messung werden alle Einzelbilder mit „XDS“ verarbeitet. Mit „XDS“ kann die Raumgruppe, die Parameter der Einheitszelle und die maximale Auflösung ermittelt werden. „XSCALE“ wird im Anschluss verwendet, um die verarbeiteten Datensätze verschiedener Kristalle oder mehrere Datensätze eines Kristalls zu kombinieren.

Als letztes wird mit „XDSCONV“ der Datensatz in einem Format generiert, dass auch von „CNS“ und „CCP4“ gelesen werden kann.

2.7.3. Lösung und Optimierung der Struktur und Generierung eines Modells

2.7.3.1. Molekularer Ersatz

Eine Möglichkeit die Struktur von Proteinen zu lösen ist der Molekulare Ersatz. Für dieses Verfahren wurde im Falle der Myosin-5b-K6-2R-Struktur das Programm „AMoRe“ und im Falle von Myosin-2-S456Y das automatisierte Verfahren des Molekularen Ersatzes mittels „ARP/wARP“ verwendet. Beide Programme sind Bestandteil des Softwarepakets CCP4 [Collaborative Computational Project, Number 4, 1994]. Mit diesen Programmen werden ein erstes Modell der Proteinstruktur und eine Elektronendichtekarte generiert, die in Schritten optimiert werden.

2.7.3.2. Optimierung des Modells und der Elektronendichtekarte

Das Strukturmodell wird mit den Programmen „CNS-Solve 1.2“ [Brünger et al., 1998] oder „Refmac5“ [Murshudov et al., 1997] verfeinert. Für die Verfeinerung mit CNS wurden die Programmtemplates für „simulated annealing“ und Energieminimierung verwendet. Für das „simulated annealing“ werden die dynamischen Bewegungsmöglichkeiten der Drehwinkel der Aminosäuren und die experimentellen Phaseninformationen berücksichtigt. Dabei wird das Strukturmodell virtuell hohen Temperaturen ausgesetzt, um es aus möglichen lokalen Energieminima rauszuheben. Folgend wird das Modell virtuell langsam abgekühlt, dabei nimmt es die bevorzugte Konformation mit der geringsten Energie ein, die im Einklang mit den Beugungsdaten steht. Ausgeführt wird dabei das so genannte „slow cool“-Protokoll mit

einer Starttemperatur von 10 000 K bzw. 5000 oder 3000 K und einer Kühlrate von 25 K. 200 abschließende Berechnungsschritte zur Normalisierung der Geometrie werden durchgeführt gefolgt von 200 Stufen Energieminimierung mit dem Programmtemplate „minimize“ für „CNS-Solve 1.2“. Mit diesem Programm wird die Energie des Moleküls unter Berücksichtigung aller Energieparameter des Moleküls, wie Bindungs-, Winkel- und Konformationsenergien und Energien nichtkovalenter Interaktionen wie Wasserstoffbrückenbindungen minimiert. Die Elektronendichtekarte wurde im Anschluss anhand des neuen Strukturmodells und der Beugungsdaten mit „ARP/Warp“ verbessert.

Eine andere Möglichkeit für die Verfeinerung des Strukturmodells ist das Programm „Refmac5“ aus dem Softwarepaket „CCP4“. Mit diesem Programm werden das Strukturmodell und die Elektronendichtekarte in einem Schritt verfeinert.

Bei Strukturen mit relativ niedriger Auflösung von beispielsweise 3 Å entsteht häufig das Problem, dass sich in der Elektronendichtekarte Artefakte befinden, die eine vermeintliche Elektronendichte zeigen. Um diese Artefakte zu entfernen, kann mit „CNS Solve 1.2“ eine „*composite-omit map*“ berechnet werden, die diese Artefakte nicht mehr aufweist. Diese Karte zeigt jedoch insgesamt weniger strukturelle Details als eine normale Elektronendichtekarte, so dass für die folgenden Verfeinerungsschritte beider Karten berücksichtigt werden.

2.7.3.3. Erstellen des Modells

Das Strukturmodell wird mit dem graphischen Programm „Coot 0.5.2“ [Emsley *et al.*, 2004] in die erstellte Elektronendichtekarte eingepasst. Mit Hilfe dieses Programms werden auch Aminosäuren eingefügt, die aufgrund des Homologiemodells nicht vorhanden sind, aber deren Elektronendichte erkennbar ist. Des Weiteren wird die Geometrie der Aminosäuren anhand des Ramachandran-Plots und der Elektronendichte optimiert.

2.7.3.4. Interpretation der Struktur und Erstellen der Abbildungen

Die Struktur wurde mit dem Programm „Coot 0.5.2“ [Emsley *et al.*, 2004] analysiert. Die Abbildungen der Struktur wurden mit „Pymol“ [DeLano, 2008] und VMD [Humphrey *et al.*, 1996] zusammen mit PovRay erstellt.

2.7.3.5. Analyse der B-Faktoren

Eine Analyse der B-Faktoren, auch Temperaturfaktoren genannt, ermöglicht Aussagen über die Starrheit und Mobilität der Atome. Je höher der Faktor, desto höher die Mobilität des Atoms.

Um die B-Faktoren verschiedener Strukturen zu vergleichen, werden diese mit einem von Dr. Roman Fedorov geschriebenen Programm normiert. Die Strukturen mit normierten B-Faktoren werden mit "Pymol" [DeLano, 2008] dargestellt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Struktur-Funktionsuntersuchung der Schleife-2 in Myosinen

Die erste schwache Bindung von Myosin an Aktin wird durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Aminosäuren in der Schleife-2 des Myosins und negativ geladenen Aminosäureresten im N-terminalen Bereich des Aktins vermittelt. In Mutationsstudien konnte gezeigt werden, dass zum einen durch die Entfernung negativer Ladung am N-Terminus des Aktinmonomers [Miller *et al.*, 1995 und 1996; Wong *et al.*, 1999] als auch durch Veränderungen der Nettoladung in Schleife-2 die Aktinbindungseigenschaften des Myosins beeinflusst werden [Furch *et al.*, 1998 und 2000; Joel *et al.*, 2001 und 2003; Yengo *et al.*, 2004; Onishi *et al.*, 2006]. Die Mutationsstudien der Schleife-2 wurden mit *Dd*Myosin-2, *Gg*Myosin-5a, *Gg*Myosin aus der glatten Muskulatur (smHMM) und *Mm*Myosin-5a durchgeführt. Zum einen wurde durch eine Erhöhung der Nettoladung die Aktinaffinität des Myosins in den *Steady State* Kinetiken erhöht und durch eine Erniedrigung der Ladung die Aktinaffinität gesenkt [Onishi *et al.*, 2006]. Zum anderen wurde bei *Dd*Myosin-2 in diesen Mutationsstudien gezeigt, dass auch die maximale ATPase-Geschwindigkeit durch die zusätzliche Einführung positiver Ladungen in dieser Schleife erhöht ist [Furch *et al.*, 1998]. Bei smHMM und *Gg*Myosin-5a war dieser Effekt jedoch nicht zu beobachten [Joel *et al.*, 2003; Yengo *et al.*, 2004].

Um zu untersuchen, ob die unterschiedlichen Effekte der Änderung der Nettoladung der Schleife-2 in der maximalen ATPase-Geschwindigkeit auf der Zugehörigkeit der Klasse und der damit verbunden unterschiedlichen Motoreigenschaften der Myosine beruhen oder nur durch die Nettoladung in Schleife-2 beeinflusst werden, wurde in dieser Arbeit die native Schleife-2 des *Dd*Myosin-5b durch das „K6“-Motiv aus den Schleife-2-Studien an *Dd*Myosin-2 von Furch *et al.*, 1998 ersetzt. Des Weiteren werden die Aktinaffinitäten in An- und Abwesenheit von ADP und die ADP-Affinitäten in An- und Abwesenheit von Aktin analysiert. Anhand dieser Ergebnisse soll gezeigt werden, ob sich diese Mutation auch auf die Kopplung zwischen der Aktin- und ADP-Bindung in diesen verschiedenen Myosinen auswirkt.

1rn xba rv und pDXA-Myosin5b-2R-His als Template verlängert. Das erhaltene PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen BsmI und XhoI geschnitten und in den ebenfalls mit BsmI und XhoI geschnittenen pMyo5b-2R-His und pMyo5b-FLAG ligiert.

Anschließend wurde das Konstrukt in AX3-Orf⁺-Zellen transformiert, die Zellen auf Expression überprüft und das rekombinante Myosin aufgereinigt (siehe Kapitel 2.4.1.; 2.4.2.; 2.5.4. und 2.5.8.)

3.1.2. Kinetische Charakterisierung der *Dd*Myosin-5b-Schleife-2-Mutante

Der ATPase-Zyklus der Schleife-2-Mutante von *Dd*Myosin-5b wurde sowohl im Fließgleichgewicht als auch mit transientenkinetischen Methoden untersucht. Diese kinetische Charakterisierung soll zeigen, ob die Einführung des „K6“-Motivs in *Dd*Myosin-5b wie in *Dd*Myosin-2 zu einem Anstieg der Aktinaffinität führt und wie die Auswirkungen auf die kinetischen Parameter der Aktin-aktivierten ATPase sind. Des Weiteren wurde untersucht wie die Kopplung der ADP- und Aktinbindung in den verschiedenen Myosinen beeinflusst wird.

Die *Dd*Myosin-2-K6-Mutante beinhaltet als neben der Modifikation der Schleife-2 eine weitere Mutation in der Helix-Schleife-Helix-Region (in *Dd*Myosin-2 Aminosäuren S510-K546). Dieses Helix-Schleife-Helix-Motiv ist wie Schleife-2 ein Element der Aktinbindungsregion. Die Mutation Q532E in dieser Region führt in *Dd*Myosin zu einem Anstieg der Aktinaffinität [Furch *et al.*, 2000]. *Dd*Myosin-5b weist an dieser Position ein Glutamat auf. Aufgrund dessen wurde für den Vergleich mit *Dd*Myosin-2 die Doppelmutante *Dd*Myosin-2-K6-Q532E verwendet.

3.1.2.1. Kinetiken von *Dd*Myosin-5b-K6 im Fließgleichgewicht

Die Bestimmung der Aktin-aktivierten ATPase-Aktivität von Myosin im Fließgleichgewicht wird nach dem Formalismus der Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben [Michaelis und Menten, 1913]. Sofern ATP im Überschuss vorliegt wird das Gleichgewicht zwischen den Komplexen $M \cdot ADP \cdot P_i + \text{Aktin}$ und $A \cdot M \cdot ADP \cdot P_i$ nach folgendem Mechanismus beschrieben:

Die Schleife-2-Mutante hat eine um den Faktor 2 geringere maximale ATPase-Geschwindigkeit als der Wildtyp. Die Aktinaffinität K_{app} ist ebenfalls um den Faktor 2 reduziert.

In Tabelle 3 sind die ATPase-Parameter für *DdMyosin-2*, *DdMyosin-5b*, *GgMyosin-5* und smHMM und die jeweiligen Schleife-2-Mutanten gegenübergestellt. Die Gegenüberstellung zeigt, dass in allen Myosinisoformen durch eine Erhöhung der Nettoladung K_{app} erniedrigt wurde, folglich die Aktinaffinität gestiegen ist.

Von *GgMyosin-5* wurde auch eine Schleife-2-Mutante untersucht, in der die Nettoladung durch den Austausch dreier Lysine durch Alanine die Nettoladung der Schleife erniedrigt wurde. In dieser Mutante ist die Aktinaffinität um den Faktor 4 gesunken [Yengo *et al.*, 2004].

Der Einfluss der Änderungen der Nettoladung der Schleife-2 auf die maximale ATPase-Geschwindigkeit k_{cat} ist nicht in allen Myosinisoformen gleich. Die in dieser Arbeit untersuchte *DdMyosin-5b*-Mutante hat durch die Erhöhung der Nettoladung eine um den Faktor 2 verringerte maximale ATPase-Geschwindigkeit. Die gleiche Mutation in *DdMyosin-2* führte jedoch zu einer 1,5-fach beschleunigten maximalen ATPase-Geschwindigkeit.

Die maximale ATPase-Geschwindigkeit von *GgMyosin-5* und smHMM wurde durch Änderungen der Nettoladung in Schleife-2 hingegen nicht beeinflusst [Yengo *et al.*, 2004; Joel *et al.*, 2003].

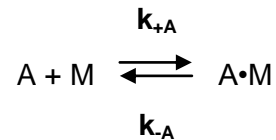
Myosin	basale ATPase (s^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	K_{app} (μM)	k_{cat}/K_{app} ($\mu M^{-1}s^{-1}$)
<i>DdMyosin-5b</i> *	$0,069 \pm 0,01$	$11,6 \pm 0,8$	27 ± 7	$0,43 \pm 0,05$
<i>DdMyosin-5b-K6</i>	$0,09 \pm 0,01$	$6,5 \pm 0,5$	$13,7 \pm 3$	$0,47 \pm 0,05$
<i>DdMyosin-2</i> [§]	$0,08 \pm 0,02$	$2,6 \pm 1$	102 ± 20	0,025
<i>DdMyosin-2Q532E-K6</i>	$0,05 \pm 0,01$	$3,8 \pm 0,5$	$4,7 \pm 0,9$	0,8
<i>GgMyosin-5</i> [#]	-	$14,1 \pm 1,1$	$2,2 \pm 0,6$	6,4
<i>GgMyosin-5-AAA</i> [#]	-	$13,6 \pm 1$	$8,8 \pm 1,4$	1,5
<i>GgMyosin-5-DEEK</i> [#]	-	$12,7 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,1$	21,2
smHMM [§]	-	$6,5 \pm 0,4$	48 ± 5	7,4
smHMM +3K [§]	-	$6,3 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,4$	1,9

* Taft, 2007, § Furch *et al.*, 1998; # Yengo *et al.*, 2004, § Joel *et al.*, 2003

Tab. 3: Parameter der ATPase-Aktivität von *DdMyosin-2*, *DdMyosin-5b*, *GgMyosin-5* und smHMM und deren Schleife-2-Mutanten

3.1.2.2. Interaktion von *DdMyosin-5b-K6* mit Aktin

Die Affinität von Myosin zu Aktin lässt sich aus der Messung der Aktinbindungs- und Aktin-dissoziationskonstante bestimmen. Die Reaktion ist in dem folgenden Schema dargestellt. M steht für Myosin, A für Aktin, die jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten sind mit k_x bezeichnet.



Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten waren im betrachteten Konzentrationsbereich linear abhängig von der Aktinkonzentration, und können daher als Reaktion pseudo 1.Ordnung betrachtet werden. [De La Cruz *et al.*, 1999].

Die Aktin-Bindung wurde über die Verringerung der Pyren-Fluoreszenz nach Bindung von Pyren-Aktin an Myosin gemessen. Der Reaktionsverlauf wurde mit einer Exponentialfunktion 1. Ordnung beschrieben und die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} wurden gegen die Pyren-Aktinkonzentration aufgetragen (siehe Abbildung 14A). Die Aktinbindung (k_{+A}) der *DdMyosin-5b-K6*-Mutante beträgt $9,7 \mu M^{-1}s^{-1}$ und ist folglich durch die Erhöhung der Nettoladung in Schleife-2 im Gegensatz zum Wildtyp um den Faktor 10 beschleunigt. Dieser Effekt konnte auch bei der korrespondierenden *DdMyosin-2-K6*-Mutante beobachtet werden, hier wurde die Aktinbindung um den Faktor 6 beschleunigt und beträgt $8,1 \mu M^{-1}s^{-1}$ [Furch *et al.*, 1998] (siehe Tabelle 14). Im Falle von *GgMyosin-5* wird die Aktinbindung bei Erhöhung der Nettoladung in Schleife-2 leicht beschleunigt. Die Geschwindigkeit der Bindung des Wildtyps ist sehr schnell und erreicht die durch Diffusion-limitierte Geschwindigkeit der Bindung [De La Cruz *et al.*, 1999], daher kann eine Erhöhung der Nettoladung in Schleife-2 die Rate nicht signifikant erhöhen [Yengo *et al.*, 2004]. Eine Verringerung der Nettoladung der Schleife-2 von *GgMyosin-5* führte zu einer um den Faktor 2 verlangsamteten Bindung an Aktin [Yengo *et al.*, 2004].

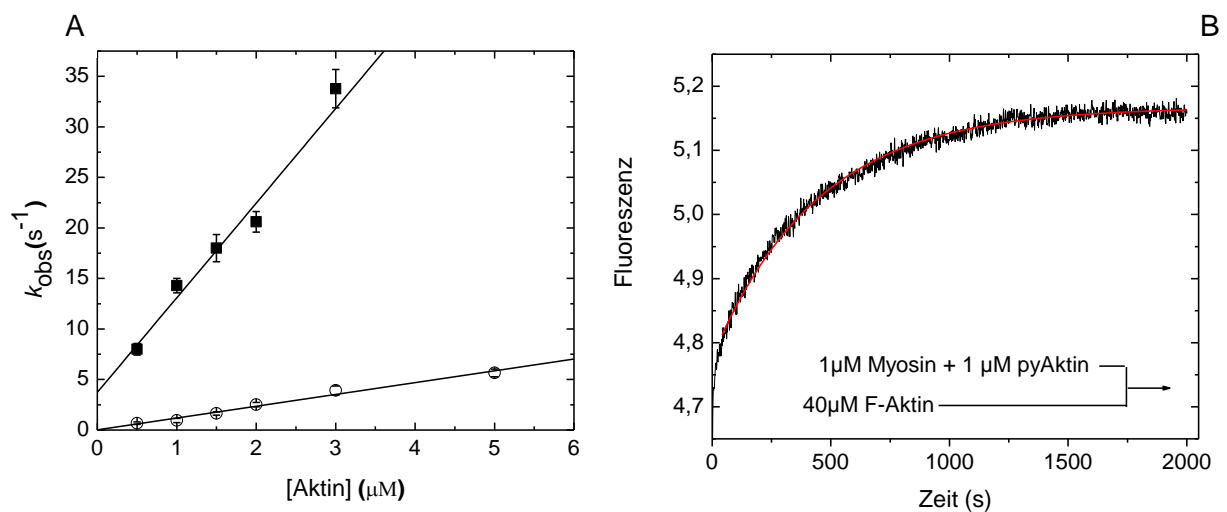


Abb. 14: (A) Pyren-Aktinbindung an Myosin-5b-K6 (■) und Myosin-5b (○) [Taft *et al.*, 2008]. Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) von der Pyren-Aktinkonzentration. An die Daten wurde eine Gerade angepasst deren Steigung die Bindungskonstante 2. Ordnung k_{+A} darstellt (B) Pyren-Aktindissoziation von Myosin-5b-K6. An den Kurvenverlauf wurde eine Exponentialfunktion 1. Ordnung angepasst, k_{obs} entspricht der Dissoziationskonstante von Pyren-Aktin aus dem Komplex mit Myosin k_{-A} .

Myosin	k_{+A} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{-A} (s^{-1})	K_A (nM)
<i>Dd</i> Myosin-5b *	$1,17 \pm 0,08$	$0,023 \pm 0,001$	20 ± 2
<i>Dd</i> Myosin-5b-K6	$9,7 \pm 0,21$	$0,002 \pm 0,0003$	$0,2 \pm 0,01$
<i>Dd</i> Myosin-2 [§]	1,34	0,0068	4,5
<i>Dd</i> Myosin-2-Q532E-K6 [§]	8,1	0,00018	0,02
<i>Gg</i> Myosin-5 [#]	90 ± 1	-	-
<i>Gg</i> Myosin-5-AAA [#]	38 ± 1	-	-
<i>Gg</i> Myosin-5-DEEK [#]	100 ± 1	-	-
<i>sm</i> HMM ^{**}	2,5	0,0011	0,44
<i>sm</i> HMM+3K ^{**}	7,3	0,00056	0,08

* Taft *et al.*, 2008, § Furch *et al.*, 2000; # Yengo *et al.*, 2004, ** Joel *et al.*, 2003

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

Tab. 4: Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Myosininteraktion mit Aktin

Die Dissoziation von Pyren-Aktin aus dem Akto.Myosin-Komplex wurde über die Verdrängung von Pyren-Aktin durch einen Überschuss an unmarkiertem Aktin gemessen. Durch die Verdrängung des Pyren-Aktins aus dem Komplex steigt die Fluoreszenz des Pyrens. An den beobachteten Fluoreszenzanstieg wurde eine Exponentialfunktion 1. Ordnung angepasst, deren Geschwindigkeitskonstante k_{obs} entspricht der Dissoziationskonstante (siehe Abbildung 14B). Die Pyren-Aktindissoziation aus dem Akto.Myosin-5b-K6-Komplex ist im Gegensatz zum Wildtyp um den Faktor 10 auf $0,002 \text{ s}^{-1}$ verlangsamt. Der gleiche Effekt wurde in Studien mit der korrespondierenden *DdMyosin-2*-Mutante beobachtet. Die Pyren-Aktindissoziation wurde 40-fach verlangsamt, in *DdMyosin-2* hatte die Einführung des K6-Motivs noch höhere Auswirkung auf die Dissoziation als im Falle von *DdMyosin-5b*.

Die Aktinaffinität K_A kann aus dem Quotienten k_{-A}/k_{+A} berechnet werden. Sowohl bei *DdMyosin-5b*, *DdMyosin-2* und smHMM wurde durch die Einführung zusätzlicher positiver Ladungen die Aktinaffinität erhöht (siehe Tabelle 4). Die Schleife-2-Mutante von *DdMyosin-5b* weist mit $K_A = 0,2 \text{ nM}$ eine 100fach höhere Aktinaffinität auf als der Wildtyp. In der korrespondierenden *DdMyosin-2*-Mutante konnte die Affinität um den Faktor 200 auf $K_A = 0,02 \text{ nM}$ erhöht werden, dies beruht im Wesentlichen auf einer Verlangsamung der Dissoziationsgeschwindigkeit. Die Erhöhung der Nettoladung in Schleife-2 des smHMM resultierte wie bereits in den *Dictyostelium*-Myosinen beobachtet in einer höheren Aktinaffinität. Die Affinität der Mutante ist $K_A = 0,08 \text{ nM}$ und um den Faktor 5 stärker als die Affinität des Wildtyps [Joel *et al.*, 2003].

3.1.2.3. Interaktion von *DdMyosin-5b-K6* mit Aktin in Anwesenheit von ADP

Die Affinität von Aktin zu Myosin-5b-K6 in Anwesenheit von ADP wurde analog zu der Aktinaffinität in Abwesenheit von ADP (siehe Kapitel 3.1.2.2.) gemessen. Der Reaktionsverlauf der Pyren-Aktin-Bindung an Myosin-5b-K6 in Anwesenheit von ADP wurde mit einer Exponentialfunktion 1. Ordnung beschrieben. Diese beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} wurden gegen die Pyren-Aktinkonzentration aufgetragen (siehe Abbildung 15A). Aus der Steigung wird die Bindungskonstante 2. Ordnung bestimmt.

Die Aktinbindung in Anwesenheit von ADP (k_{+DA}) der *DdMyosin-5b-K6*-Mutante ist um den Faktor 5 auf $4,84 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ beschleunigt. Da in früheren Studien k_{+DA} für die korrespondierende *DdMyosin-2-K6*-Mutante nicht ermittelt wurde, wurde diese Messung in dieser Arbeit

durchgeführt. In *Dd*Myosin-2 ist der Effekt des in Schleife-2 eingeführten „K6“-Motivs größer als in *Dd*Myosin-5b, k_{+DA} steigt um den Faktor 100 auf $14,6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ an. Eine beschleunigte Aktinbindung in Anwesenheit von ADP wurde auch bei *Gg*Myosin-5 beobachtet. Eine Erhöhung der Nettoladung in Schleife-2 führt zu einer um den Faktor 3 beschleunigten Bindung, während die Verringerung der Nettoladung in einer 5-fach verlangsamten Aktinbindung in Anwesenheit von ADP resultierte [Yengo *et al.*, 2004] (siehe Tabelle 5).

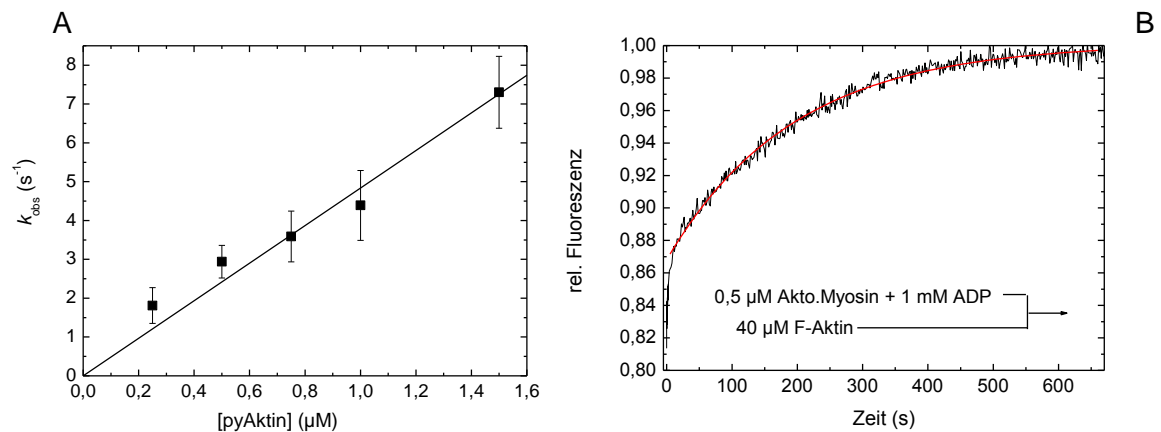


Abb. 15: (A) Pyren-Aktinbindung an Myosin-5b-K6 in Anwesenheit von ADP (■). Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) von der Pyren-Aktinkonzentration. An die Daten wurde eine Gerade angepasst deren Steigung die Bindungskonstante 2. Ordnung k_{+DA} darstellt (B) Pyren-Aktindissoziation von Myosin-5b-K6 in Anwesenheit von ADP. An den Kurvenverlauf wurde eine Exponentialfunktion 1. Ordnung angepasst, k_{obs} entspricht der Dissoziationskonstante von Pyren-Aktin aus dem Myosin-ADP-Komplex mit Myosin k_{-DA}

Myosin	$k_{+DA} (\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_{-DA} (\text{s}^{-1})$	$K_{DA} (\text{nM})$
<i>Dd</i> Myosin-5b *	$0,78 \pm 0,06$	$0,03 \pm 0,003$	$38,5 \pm 5$
<i>Dd</i> Myosin-5b-K6	$4,84 \pm 0,6$	$0,005 \pm 0,0006$	$1,03 \pm 0,1$
<i>Dd</i> Myosin-2	$0,14 \pm 0,01$	$0,011 \pm 0,0006$	$79,5 \pm 14$
<i>Dd</i> Myosin-2-Q532E-K6	$14,6 \pm 0,9$	$0,0024 \pm 0,0001$	$0,16 \pm 0,0001$
<i>Gg</i> Myosin-5 [#]	$5,5 \pm 0,1$	0,08	$14,5 \pm 0,1$
<i>Gg</i> Myosin-5-AAA [#]	$0,9 \pm 0,1$	0,08	$88,9 \pm 0,1$
<i>Gg</i> Myosin-5-DEEK [#]	$14,6 \pm 0,4$	0,04	$2,7 \pm 0,4$

* Taft *et al.*, 2008, [#] Yengo *et al.*, 2004

Reaktionsbedingungen: 20 mM MOPS, pH-Wert 7,0, 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl bei 20°C

Tab. 5: Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Myosininteraktion mit Aktin in Anwesenheit von ADP

Die Dissoziation von Aktin aus dem Akto.Myosin.ADP-Komplex (k_{DA}) wurde durch Verdrängung des Pyren-Aktins durch einen Überschuss an unmarkiertem F-Aktin aus dem Komplex gemessen. An den beobachteten Fluoreszenzanstieg wurde eine Exponentialfunktion 1. Ordnung angepasst, deren Rate der Dissoziationsgeschwindigkeit entspricht (siehe Abbildung 15B). Für *DdMyosin-5b-K6* wurde eine Dissoziationsgeschwindigkeit aus dem ADP.Akto.Myosin-Komplex von $0,005 \text{ s}^{-1}$ gemessen, diese ist um den Faktor 6 im Gegensatz zum Wildtyp verlangsamt (siehe Tabelle 5). Die Dissoziationsgeschwindigkeit in Anwesenheit von ADP (k_{DA}) der korrespondierenden *DdMyosin-2-K6*-Mutante wurde wie bereits auch k_{+DA} in dieser Arbeit gemessen. Die Pyren-Aktindissoziation aus dem ADP.Akto.Myosin-2-K6-Komplex ist um den Faktor 5 auf $0,00018 \text{ s}^{-1}$ im Gegensatz zum Wildtyp verlangsamt.

Vergleichend wurde durch die Erhöhung der Nettoladung in Schleife-2 von *GgMyosin-5a* die Dissoziationsgeschwindigkeit wesentlich geringer beeinflusst. k_{DA} wurde nur um den Faktor zwei verlangsamt.

Die Aktinaffinität in Anwesenheit von ADP K_{DA} wird aus dem Quotienten der Dissoziations- und Bindungskonstante k_{DA}/k_{+DA} berechnet. Sowohl bei *DdMyosin-5b*, *DdMyosin-2* und *GgMyosin-5a* wurde durch die Erhöhung der Nettoladung in Schleife-2 die Affinität erhöht (siehe Tabelle 5). Die Schleife-2-Mutante von *DdMyosin-5b* weist durch die Einführung des K6-Motivs eine 30fach höhere Aktinaffinität auf als der Wildtyp. In *DdMyosin-2* konnte die Affinität durch das K6-Motiv in Schleife-2 um den Faktor 500 erhöht werden.

3.1.2.4. Interaktion von *DdMyosin-5b-K6* mit ADP

Sowohl die Bindungs- als auch die Dissoziationskonstante von ADP für Myosin-5b-K6 wurde mit dem fluoreszenzmarkierten Nukleotidderivat mantADP gemessen.

Die Bindung von mantADP an Myosin wurde in einem ADP-Konzentrationsbereich von 1,25 bis $20 \mu\text{M}$ gemessen, in dem der Anstieg des Fluoreszenzsignals von mantADP durch die Bindung an Myosin verfolgt wurde. Die beobachteten Reaktionen wurden mit einer Exponentialfunktion 2. Ordnung beschrieben. Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten der langsamen Phase zeigten eine lineare Abhängigkeit von der mantADP-Konzentration (siehe Abbildung 16A). Die Steigung der durch die Punkte gelegten Geraden entspricht der Bindungskonstanten 2. Ordnung für mantADP an Myosin. So beträgt für Myosin-5b-K6 $k_{+mD} = 0,077 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Für Myosin-5b Wildtyp ist $k_{+mD} = 0,17 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die schnellere Phase zeigte

keine Abhängigkeit von der mantADP-Konzentration und wird dem Isomerisierungsschritt nach der Bindung des mantADP zugeordnet. Dieser zweistufige Mechanismus der ADP-Bindung wurde auch für den Wildtyp Myosin-5b beobachtet [Taft, 2008].

Aus dem y-Achsenabschnitt kann durch Extrapolation der Geraden die Dissoziationskonstante für mantADP von Myosin bestimmt werden. Für *Dd*Myosin-5b-K6 lag die so bestimmte Dissoziationskonstante bei $k_{mD} = 0,9 \text{ s}^{-1}$.

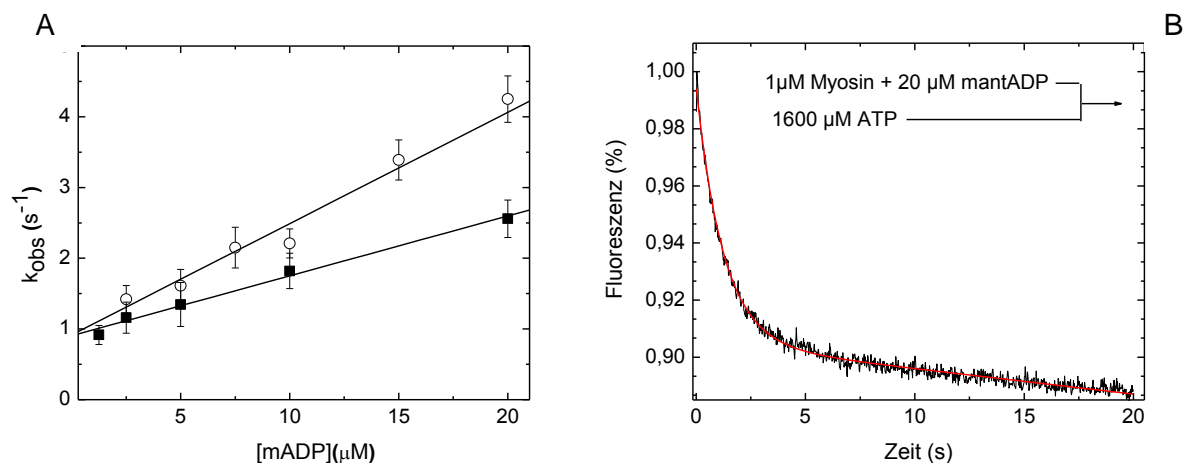


Abb. 16: Bindung und Dissoziation von mantADP. (A) zeigt die lineare Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) der Bindung von mantADP an Myosin-5b-K6 (■) und Myosin-5b (○)[Taft *et al.*, 2008] von der ADP-Konzentration. Die Steigung der Geraden ergibt die Bindungskonstante 2. Ordnung (k_{+mD}). (B) mantADP-Dissoziation von Myosin-5b-K6, dargestellt ist die Abnahme der mant-Fluoreszenz nach Mischen des Komplexes aus 1 μM Myosin und 20 μM mantADP mit 1600 μM ATP. Die Fluoreszenzabnahme erfolgt exponentiell 1. Ordnung und die beobachtete Geschwindigkeitskonstante entspricht der mantADP-Dissoziation von Myosin (k_{mD})

Die Dissoziationsgeschwindigkeit von mantADP wurde zusätzlich direkt bestimmt, in dem mantADP durch Mischen mit einem Überschuss an ATP aus dem mantADP-Myosin-Komplex verdrängt wurde. Die beobachtete Geschwindigkeit des Fluoreszenzabfalls entspricht der Dissoziationsgeschwindigkeit von mantADP k_{mD} (siehe Abbildung 16B). Die Messungen ergaben eine Dissoziationskonstante von $k_{mD} = 0,81 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$ für Myosin-5b-K6. Diese Konstante ist nahezu identisch mit der des Wildtyps von Myosin-5b mit $k_{mD} = 0,92 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$ und entspricht auch der aus der ADP-Bindung ermittelten Dissoziationsgeschwindigkeit von $0,9 \text{ s}^{-1}$.

Aus den ermittelten Bindungs- und Dissoziationskonstante von mantADP für Myosin kann die Affinität von mantADP für Myosin aus dem Quotienten k_{mD}/k_{+mD} berechnet werden. Für

Myosin-5b-K6 wurde eine Gleichgewichtskonstante $K_D = 9,5 \mu\text{M}$ und für Myosin-5b $K_D = 5,4 \mu\text{M}$ berechnet.

Diese Messungen zeigten, dass auch im Fall vom *Dd*Myosin-5b die Einführung positiver Ladungen in Schleife-2 nahezu keinen Effekt auf die ADP-Affinität hat. Dies entspricht den bereits durchgeführten Untersuchungen der korrespondierenden *Dd*Myosin-2-Mutante. Im Falle von *Dd*Myosin-2 weist der Wildtyp eine Gleichgewichtskonstante von $K_D = 1,6 \mu\text{M}$ und die korrespondierende Schleife-2 Mutante eine Konstante von $K_D = 1,7 \mu\text{M}$ [Furch *et al.*, 2000]

3.1.2.5. Interaktion von Akto.Myosin-5b-K6 mit ADP

Die Bindungskonstante 2.Ordnung als auch die Dissoziationskonstante von ADP für den Akto.Myosin-5b-K6-Komplex und der korrespondierenden Schleife-2-Mutante in *Dd*Myosin-2 wurden analog zu den Geschwindigkeitskonstanten in Abwesenheit von Aktin gemessen (siehe Abschnitt 3.1.2.4.)

Die Bindung von ADP an Akto.Myosin wurde in einem ADP-Konzentrationsbereich von 2,5 bis 20 μM gemessen, in dem der Anstieg des Fluoreszenzsignals von mantADP durch die Bindung an Akto.Myosin verfolgt wurde. Messungen bei höheren mantADP-Konzentrationen waren aufgrund des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses nicht möglich. Die beobachteten Reaktionen wurden an eine Exponentialfunktion 1. Ordnung angepasst. Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten zeigten eine lineare Abhängigkeit von der ADP-Konzentration (siehe Abbildung 17A). Die Steigung der durch die Punkte gelegten Geraden entspricht der Bindungskonstanten 2. Ordnung für mantADP an Akto.Myosin. Sie beträgt für *Dd*Myosin-5b-K6 $k_{+AD} = 1,2 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Für Myosin-5b Wildtyp ist $k_{+AD} = 4,8 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die mantADP-Bindung an Aktomyosin ist durch die Einführung der positiven Ladungen um den Faktor vier langsamer. Diese Messung wurde auch für *Dd*Myosin-2-K6-Mutante durchgeführt. Die ADP-Bindung an *Dd*Myosin-2-K6 in Anwesenheit von Aktin wurde durch die Mutation um den Faktor zwei langsamer.

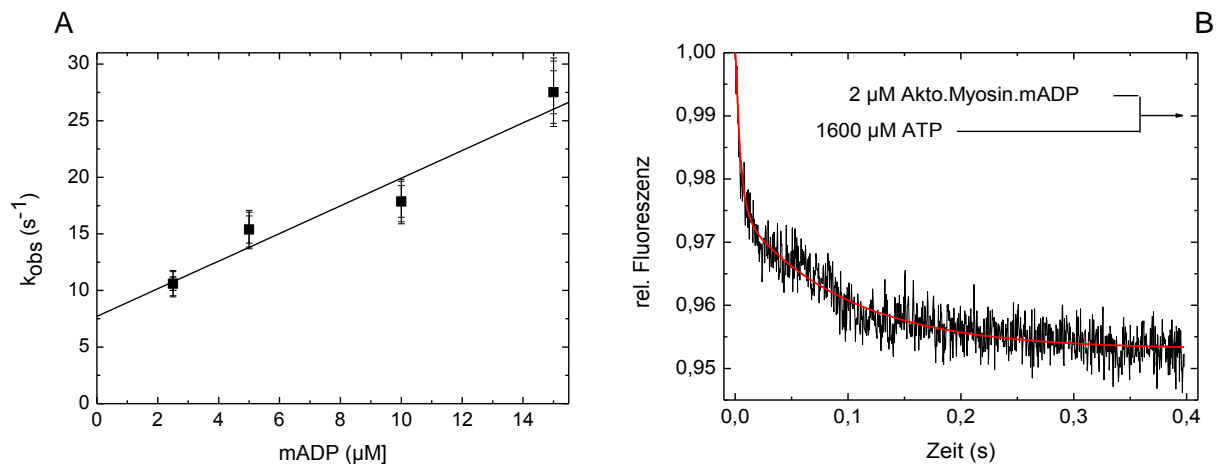


Abb. 17: Bindung und Dissoziation von ADP an Akto.Myosin. (A) zeigt die lineare Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) der Bindung von ADP an Akto.Myosin-5b-K6 von der mADP-Konzentration. Die Steigung der Geraden ergibt die Bindungskonstante 2. Ordnung (k_{+AD}). (B) mantADP-Dissoziation von Akto.Myosin-5b-K6, dargestellt ist die Abnahme der mant-Fluoreszenz nach Mischen des Komplexes aus 2 μM Akto.Myosin mit gebundenem mantADP mit 1600 μM ATP. Die Fluoreszenzabnahme erfolgt exponentiell 1. Ordnung und die beobachtete Geschwindigkeitskonstante entspricht der mantADP-Dissoziation von Akto.Myosin (k_{AD})

Die Dissoziation von ADP aus dem ternären Komplex mit Akto.Myosin wurde direkt gemessen, in dem mADP mit einem Überschuss ATP aus dem Akto.Myosin-Komplex verdrängt wurde (siehe Abbildung 17B). Durch Anpassung einer Exponentialfunktion 1. Ordnung an den beobachteten Verlauf des Fluoreszenzabfalls von mantADP wurde die Dissoziationskonstante k_{AD} bestimmt. Die Rate entspricht der Dissoziationsgeschwindigkeit, für Myosin-5b-K6 ist diese 10,6 s^{-1} . Im Vergleich zum Wildtyp ist die Dissoziationskonstante leicht erniedrigt. k_{AD} wurde auch für die korrespondierende Schleife-2-Mutante bestimmt. Für *Dd*Myosin-2 ist k_{AD} durch die Mutation in Schleife-2 von 138 s^{-1} auf 17,6 s^{-1} erniedrigt worden (siehe Tabelle 6). Joel *et al.* beobachteten ebenfalls eine Erniedrigung von k_{AD} durch die Einführung positiver Ladungen in Schleife-2 von smHMM [Joel *et al.*, 2003].

Interessanterweise wurde im Falle von *Gg*Myosin-5 k_{AD} nur durch eine Erhöhung der Ladung in dieser Oberflächenschleife beeinflusst. Die Bestimmung von k_{AD} über die ATP-induzierte Dissoziation von Pyren-Aktin wurde eine sehr leichte Erniedrigung von k_{AD} von 15 s^{-1} auf 12 s^{-1} der *Gg*Myosin-5-DEEK-Mutante gemessen [Yengo *et al.*, 2004].

Myosin	k_{+AD} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{-AD} (s^{-1})	K_{AD} (nM)
<i>Dd</i> Myosin-5b *	$4,0 \pm 0,7$	$21,6 \pm 6$	$5,4 \pm 2$
<i>Dd</i> Myosin-5b-K6	$1,2 \pm 0,13$	$10,6 \pm 2$	$8,8 \pm 2$
<i>Dd</i> Myosin-2 [§]	$0,76 \pm 0,09$	138 ± 10	182 ± 28
<i>Dd</i> Myosin-2-Q532E-K6	$0,4 \pm 0,05$	$17,6 \pm 6$	44 ± 10
<i>Gg</i> Myosin-5 [#]	-	$15,1 \pm 0,2$	-
<i>Gg</i> Myosin-5-AAA [#]	-	$15,5 \pm 0,1$	-
<i>Gg</i> Myosin-5-DEEK [#]	-	$12 \pm 0,8$	-

* Taft *et al.*, 2008, [#] Yengo *et al.*, 2004, [§] Diensthuber, 2009

Reaktionsbedingungen: 20 mM MOPS, pH-Wert 7,0, 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl bei 20°C

Tab. 6: Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Myosininteraktion mit ADP in Anwesenheit von Aktin

3.1.2.6. Einfluss des K6-Motivs in Schleife-2 auf die Kopplung in *Dd*Myosin-5b und *Dd*Myosin-2

Die Kopplung zwischen der Aktin- und ADP-Bindung weist große Unterschiede zwischen den Myosinen auf [De La Cruz und Ostap, 2004; Nyitrai und Geeves, 2004; Dürrwang *et al.*, 2005]. Schnelles Muskelmyosin und *Dd*Myosin-2 zeigen eine starke negative Kopplung. Die Bindung von Aktin schwächt die ADP-Affinität und die Bindung von ADP erniedrigt die Aktin-affinität. Im Gegensatz dazu zeigen *Gg*Myosin-5 und einige Klasse-1 Myosine eine sehr schwache Aktin/ADP-Kopplung, die aus einer hohen ADP-Affinität des Aktomyosinkomplexes sowie einer langsamen ADP-Dissoziationsgeschwindigkeit hervorgeht.

Der Einfluss von Aktin auf die ADP-Affinität wird durch K_{AD}/K_D berechnet und der Einfluss von ADP auf die Aktinbindung über K_{DA}/K_A . Die Kopplungskonstanten sind in Tabelle 7 dargestellt.

Myosin	K_{AD}/K_D	K_{DA}/K_A
<i>DdMyosin-5b</i>	1	1,9
<i>DdMyosin-5b-K6</i>	0,9	5,1
<i>DdMyosin-2</i>	114	17,7
<i>DdMyosin-2-Q532EK6</i>	26	8

Tab. 7: Kopplungskonstanten von *DdMyosin-5b* und *DdMyosin-2* und deren Schleife-2-Mutanten

Durch die Einführung des „K6“-Motivs in *DdMyosin-2* und *DdMyosin-5b* wurden die Kopplungen unterschiedlich beeinflusst. Im Falle von *DdMyosin-5b* wurde die schwache Kopplung der Aktinbindung auf die ADP-Affinität nicht beeinflusst, für den Wildtyp ist $K_{AD}/K_D = 1$, für die Mutante ist $K_{AD}/K_D = 0,9$. Umgekehrt wurde der Einfluss von ADP auf die Aktinaffinität um den Faktor 2,5 gestärkt K_{DA}/K_A steigt von 1,9 auf 5,1 an. Die starke Kopplung in *DdMyosin-2* wurde durch die Mutation in Schleife-2 geschwächt. Die Kopplung der ADP-Bindung K_{AD}/K_D wurde um den Faktor 4 von 114 auf 26 erniedrigt, die Kopplung der Aktinbindung um den Faktor 2 von 17,7 auf 8.

Aus diesen Konstanten kann auch die thermodynamische Kopplung berechnet werden. Dies gibt Aufschluss darüber, ob die gemessenen Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten ein geschlossenes System definieren, in dem keine weiteren Zwischenzustände bestimmend sind. Diese thermodynamische Kopplung setzt voraus, dass $K_{AD}/K_D = K_{DA}/K_A$ ist. Für Myosin-5b unterscheiden diese sich um den Faktor 2, im Falle der Schleife-2-Mutante um den Faktor 6. Die Kopplungen von Myosin-2 weichen ebenfalls um den Faktor 6 voneinander ab und die der Myosin-2-K6-Mutante um den Faktor 3 ab. Geringe Abweichungen können auf messbedingten Fehlern bei den Bestimmungen der Konstanten beruhen.

3.1.2.7. **Messung der ADP-Dissoziation aus dem Akto-Myosin-Komplex von *DdMyosin5b-K6* mit verschiedenen Salzkonzentrationen**

Im *in vitro*-Motilitätsassay der *DdMyosin-5b-K6*-Mutante konnte gezeigt werden, dass die Geschwindigkeit dieser Mutante sowohl über die Konzentration an freien Magnesiumionen beeinflusst werden kann, als auch über Salzkonzentration [Amrute-Nayak *et al.*, 2009]. Die maximale Geschwindigkeit im *in vitro* Motilitätsassay wurde in Anwesenheit von 0,04 mM freien Magnesiumionen und 100 mM KCl gemessen, keine Motilität zeigte das Konstrukt bei 1,9 mM freien Magnesium und 25 mM KCl. Da k_{AD} , die Dissoziation von ADP aus dem

Komplex mit Akto.Myosin, der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in nativen Myosin-5b ist und diese Dissoziation auch durch die Konzentration an freien Magnesiumionen beeinflusst wird [Taft et al., 2008], wurde die Salzabhängigkeit von k_{AD} für die Schleife-2 Mutante *Dd*Myosin-5b-K6 untersucht.

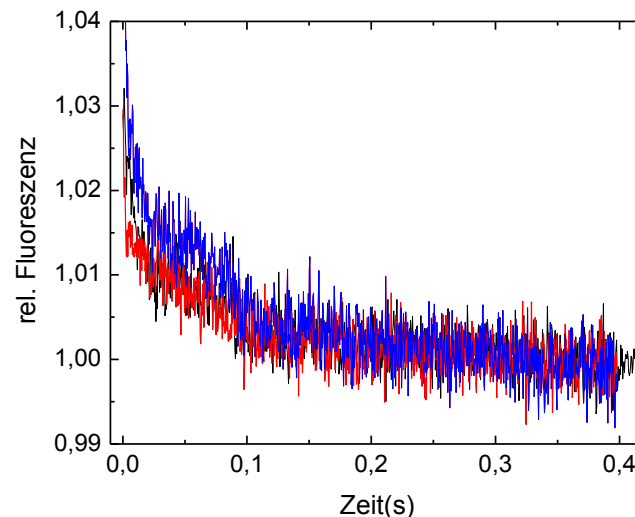


Abb. 18: mantADP-Dissoziation von Akto.Myosin-5b-K6, dargestellt ist die Abnahme der mant-Fluoreszenz nach Mischen des Komplexes aus 2 μ M Akto.Myosin mit gebundenem mantADP mit 1600 μ M ATP. Die Fluoreszenzabnahme erfolgt exponentiell 1. Ordnung und die beobachtete Geschwindigkeitskonstante entspricht der mantADP-Dissoziation von Akto.Myosin (k_{AD}). In blau ist die Messung in Anwesenheit von 25 mM KCl, in schwarz die Messung mit 100 mM KCl und in rot die Messung in Anwesenheit von 300 mM KCl abgebildet. Die Reaktionsbedingungen waren abgesehen von der KCl-Konzentration konstant (Reaktionsbedingungen: 20 mM MOPS, pH-Wert 7,0, 5 mM $MgCl_2$, 25/100/300 mM KCl bei 20°C)

Die Messung wurde wie in 3.1.2.5. erläutert durchgeführt, nur dass die KCl-Konzentrationen bei konstanter Magnesiumkonzentration variiert wurden. Es wurden Messung bei 25 mM KCl, 100 mM KCl und 300 mM KCl durchgeführt, die in Abbildung 18 dargestellt sind. Anhand dieser Messungen konnte jedoch keine Änderung von k_{AD} mit steigenden Salzkonzentrationen festgestellt werden.

Diese Messung steht im Gegensatz zu Beobachtungen in Schleife-2 Studien von smHMM. In dieser Untersuchung konnte eine Salzabhängigkeit von k_{AD} der Schleife-2-Mutante gemessen werden [Joel et al., 2003]. k_{AD} wurde mit steigenden KCl-Konzentrationen schneller.

3.1.3. Röntgenstrukturanalyse der *DdMyosin-5b-K6-Mutante*

Aufklärungen der röntgenkristallographischen Strukturen der Myosinmotordomänen ermöglichen die funktionalen und kinetischen Eigenschaften von Myosinen strukturell zu erklären. Diese Strukturen helfen das Verständnis der molekularen Grundlagen des ATPase-Zyklus und des Mechanismus des Kraftschlags zu vertiefen. Für diese Aspekte ist es zum einen wichtig die Struktur eines Myosins in verschiedenen Zwischenstufen des ATPase-Zyklus mittels unterschiedlicher Nukleotidanaloga interpretieren zu können. Zum anderen ist es wichtig, Motordomänenstrukturen verschiedener Myosine miteinander vergleichen zu können, um klassenspezifische funktionale und kinetische Unterschiede auf einer strukturellen Basis definieren zu können. Bisher konnte nur ein prozessives Myosin der Klasse 5, *GgMyosin-5a*, kristallisiert werden [Coureux *et al.*, 2003 und 2004]. Um weitere strukturelle Einblicke in prozessive Myosine der Klasse 5 zu bekommen wurde bereits in der Vergangenheit versucht *DdMyosin-5b* zu kristallisieren. Jedoch wuchsen keine Kristalle, die einen vollständigen Datensatz mit ausreichender Auflösung ermöglichen würden [Taft *et al.*, 2007]. Aufgrund dessen wurden Kristallisationsansätze mit der Schleife-2-Mutante von *DdMyosin-5b* durchgeführt.

3.1.3.1. Kristallisation von *DdMyosin-5b-K6-2R*

Es wurden Kristallisationsansätze der Schleife-2-Mutante von *DdMyosin-5b* mit dem Mg^{2+} -ADP- P_i -Analogon Mg^{2+} .ADP.VO₄ und ohne Nukleotid, in der sogenannten *apo*-Form, des Motordomänenkonstrukts mit künstlichen Hebelarm (2R) [Anson *et al.*, 1996; Kliche *et al.*, 2001] angesetzt. Dabei wurde das *sitting drop*-Verfahren angewandt (siehe Abschnitt 2.7.1). Im ersten Schritt wurden die PEG 8000-Konzentration von 10-12 % und der pH-Wert im Bereich von 7,4 -7,6 variiert. Die weiteren Reservoirbestandteile (50 mM HEPES/Tris-HCl pH 7,4-7,6, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM EGTA, 2 % MPD, 140 mM NaF) wurden konstant gelassen. Die Tropfen wurden im Verhältnis 1:1 der Proteinlösung mit einer Konzentration von 13 mg/ml Myosin und der Reservoirlösung gemischt. Die Kristallisation erfolgte bei 5°C. Nach 5 Tagen wuchsen in zwei Konditionen (10 % PEG, HEPES pH 7,4 und 12 % PEG, Tris-HCl pH 7,6) hauchfeine Kristallnadeln der Schleife-2-Mutante in der nukleotidfreien Form (siehe Abbildung 19A). Von der *DdMyosin-5b*-Mutante im Komplex mit Mg^{2+} .ADP.VO₄ wuchsen keine Kristalle. Die Kristallnadeln der *DdMyosin-5b*-Mutante im nukleotidfreien Zustand wurden für ein *Microseeding* [Thaller *et al.*, 1981, 1985] mit den Pufferbedingungen 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM EGTA, 2 % MPD, 10 und 11 % PEG8000 und 100-200 mM NaF verwendet. Durch das *Microseeding* wuchsen in

allen Konditionen Kristallnadeln. In den Konditionen 11% PEG 8000, Tris-HCl pH 7,8 und 10 % PEG, Tris-HCl pH 7,6, 4°C bildeten sich nach zwei Wochen breitere und dickere Kristalle (siehe Abbildung 19B). Nach zwei weiteren Runden *Microseeding* wuchsen Kristalle, die gerade in allen drei Dimensionen ausreichend groß genug waren, um am Synchrotron in Grenoble am Messplatz ID23-2 vermessen zu werden (siehe Abbildung 19C).

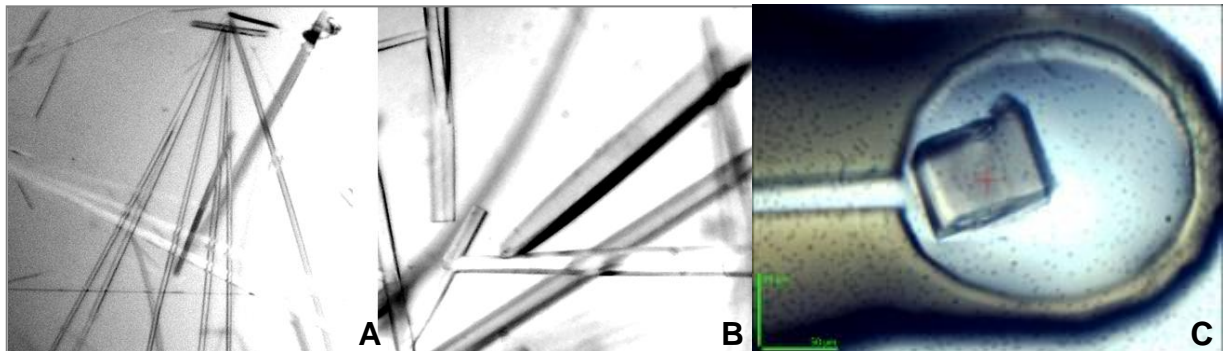


Abb. 19: Dargestellt sind in (A) feine nadelförmige Kristalle vor dem *Microseeding*, in (B) die breiteren und dickeren Kristalle nach dem ersten *Microseeding*. (C) Aufnahme eines Teilstücks des Myosin-5b K6-Kristalls am ESRF-ID23-2

Es wurden Beugungsdatensätze der Synchrotronstrahlung mit einer Wellenlänge von 0,87260 Å von zwei Kristallen von Dr. Roman Fedorov aufgenommen. Diese Daten wurden mit dem Softwarepaket XDS [Kabsch, 1993] bearbeitet und zusammen skaliert. Die Auflösung betrug 3 Å.

Die Kristalle konnten durch die Datenverarbeitung der zentriert monoklinen Raumgruppe C2 zugeordnet werden. In Tabelle 8 sind die statistischen Parameter des vermessenen Kristalls dargestellt. Auffällig ist, dass der sogenannte Wilson-Faktor, ein Faktor der den Temperaturfaktor des ganzen Proteins darstellt, der prozessierten Daten mit 80 Å² sehr hoch ist. Dieser hohe Wert zeigt, dass die internen Abweichungen der Molekülposition innerhalb der Einheitszelle relativ groß sind.

	Myosin-5b-K6
Raumgruppe	C2
Parameter der Einheitszelle a/b/c/ α/ β/ γ [Å bzw. °]	142,75/74,57/137,97/90/106,87/90
Wellenlänge [Å]	0,8726
Auflösung [Å]	3,0
gemessene Reflexionen	583965
einmalige Reflexionen	27970

Tab. 8: Überblick der Statistiken des Kristalls Myosin-5b-K6

3.1.3.2. **Aufklärung der Kristallstruktur von *DdMyosin-5b-K6***

Die Struktur der Motordomäne mit einem artifiziellen Hebelarm der *DdMyosin-5b-K6*-Mutante konnte mittels Molekularen Ersatz mit der homologen Struktur von *GgMyosin-5a* im nukleotidfreien Zustand [Coureux *et al.*, 2003; PDB-Eintrag 1OE9] gelöst werden. Dazu wurde die Software „AmoRe“ [Navaza, 1994] aus dem Softwarepaket „CCP4“ [Collaborative Computational Project, Number 4, 1994] verwendet. Mit Hilfe dieses Programms wurden aus den bearbeiteten Daten ein erstes Modell der Struktur und eine Elektronendichtekarte generiert. In dem graphischen Programm „Coot 0.5.2“ wurde das Strukturmodell mit Hilfe der Elektronendichtekarte verfeinert. Dabei wurden, wenn Elektronendichte erkennbar war, aufgrund des Modells fehlende Aminosäuren ergänzt. Mit Hilfe der gelösten Struktur des künstlichen Hebelarms (2R) aus der Struktur *DdMyosin-2-2R* [Kliche *et al.*, 2001] wurde der Hebelarm in mehreren Schritten an die Motordomäne angefügt. Nach der Verfeinerung anhand der Elektronendichtekarte folgten die Optimierungsschritte „*simulated annealing*“ und Energieminimierung mittels „CNS Solve 1.2“ und die Generierung einer neuen Elektronendichtekarte. Aufgrund der geringen Auflösung von 3 Å befanden sich in der normalen Elektronendichtekarte viele Elektronendichteartefakte, die nicht die tatsächliche Elektronendichte basierend auf den Streuungsdaten wiedergeben. Um diese Artefakte möglichst zu beseitigen wurde mit „CNS Solve 1.2“ eine „*composite-omit map*“ berechnet, die diese Artefakte nicht mehr aufweist. Diese Karte zeigt jedoch insgesamt weniger strukturelle Details als eine normale Elektronendichtekarte. Daher wurden in den folgenden Verfeinerungen des Strukturmodells beide Elektronendichtekarten berücksichtigt.

Die abschließenden R-Faktoren R und R_{free} liegen bei 37,8 % und 47,9 %. In Tabelle 9 sind die Statistiken der Struktur nach der Verfeinerung wiedergegeben. Es konnten nicht alle Bereiche der Struktur aufgelöst werden. Für die Regionen der Oberflächenschleife Schleife-1 und Schleife-2, ein Bereich des Konverters und das C-terminale Ende des Hebelarms konnte kein C_{α} -Atom-Rückgrat durch die Elektronendichte gelegt werden. Schleife-1 und Schleife-2 sind sehr flexible Regionen an der Oberfläche der Myosinmotordomäne. Aufgrund der hohen Flexibilität sind diese sehr häufig in Myosinmotordomänenstrukturen nicht aufgelöst, so beispielsweise auch in den Strukturen des *GgMyosin-5a* [Coureux *et al.*, 2003 und 2004]. Anhand dieser Kristallstruktur können erstmals Aussagen über die Konformation eines *DdMyosin-5b* in der *apo*-Form getroffen werden.

	Myosin-5b-K6
Auflösungsbereich [Å]	10-3
Anzahl der Aminosäuren	922
Anzahl der Proteinatome	7450
Anzahl der Wassermoleküle	22
R/R _{free} [%]	37,77/47,93
Abweichung rmsd Bindungen [Å]	0,009118
Abweichung rmsd Winkel [°]	1,86031

Tab. 9: Überblick der Statistiken der Verfeinerung der Myosin-5b-K6-Struktur

3.1.3.3. Analyse der Kristallstruktur von *Dd*Myosin-5b-K6

*Dd*Myosin-5b-K6 wurde im nukleotidfreien Zustand kristallisiert. Für die Analyse dieser Struktur wurde zum einen die *Gg*Myosin-5a im nukleotidfreien Zustand herangezogen [Coureux *et al.*, 2003; PDB-Eintrag 1OE9]. Diese Struktur liegt in einer *rigor-like*-Konformation vor in der die Aktinbindungsspalte weiter geschlossen ist als vorher in anderen Strukturen beobachtet wurde, und die Position des Hebelarms mit der angenommenen Position des Hebelarms im sogenannten *rigor*-Zustand, dem stark an Aktin gebundenen Zustand in Abwesenheit eines gebundenen Nukleotids, entspricht.

Des Weiteren wurde für den Vergleich eine *Gg*Myosin-5a-Struktur mit Mg²⁺.ADP.BeF_x hinzugezogen [Coureux *et al.*, 2004; PDB-Eintrag 1W7J]. Diese liegt in einer sogenannten *near-rigor*-Konformation vor. Die Aktinbindungsspalte ist weiter geöffnet und die Konformation der Nukleotidbindungstasche und der Relayhelix entspricht der Konformation nach dem Kraftschlag. Der Vergleich der *Dd*Myosin-5b-K6-Struktur im nukleotidfreien Zustand zeigt, dass die Aktinbindungsspalte in der Struktur des Myosin-5b-K6 auch wie in der Struktur des *Gg*Myosin-5a in der *rigor-like*-Konformation nahezu geschlossen ist (siehe Abbildung 20). Der Abstand des Prolins des „Helix-Schleife-Helix“-Motivs der Aktinbindungsregion zur Helix, der oberen 50 kDa-Domäne die sich an der Aktinbindungsregion befindet, beträgt sowohl in der Myosin-5b-K6-Struktur als auch in der Myosin-5a *rigor-like*-Struktur 11 Å, in der Myosin-5a-Struktur im Komplex mit Mg²⁺.ADP.BeF_x hingegen 18 Å. Dies deutet darauf hin, dass auch *Dd*Myosin-5b-K6 die Konformation der Motordomäne des stark an Aktin gebundenen Zustands reflektiert.

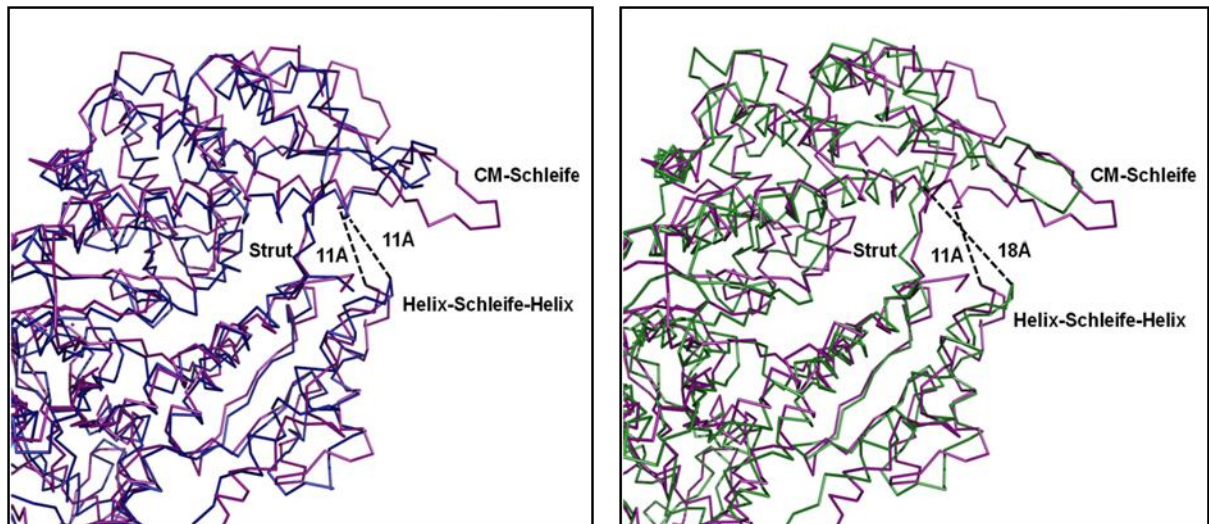


Abb. 20: (A) Vergleich der *DdMyosin-5b-K6*-Struktur im nukleotidfreien Zustand (lila) mit *GgMyosin-5a* im nukleotidfreien Zustand (dunkelblau). (B) Vergleich der *DdMyosin-5b-K6*-Struktur im nukleotidfreien Zustand (lila) mit *GgMyosin-5a* im Komplex mit Mg^{2+} .ADP.BeF_x (dunkelgrün). Für diese Ansicht wurde die untere 50 kDa-Domäne der Myosine übereinander gelagert.

Weitere Eigenschaften der *rigor-like*-Konformation ist eine andere Anordnung der Nukleotidbindungsregion und der zentralen β -Faltblattregion. Die Nukleotidbindungsregion nimmt in der *rigor-like*-Struktur eine in noch keinem anderen Myosin beobachtete Konformation. Vor allem die neu beobachtete Interaktion zwischen Schalter-2 und der Phosphatbindungsschleife führt zu einer Schwächung der Nukleotidaffinität [Coureux *et al.*, 2003]. Des Weiteren interagiert Schalter-2 mit der SH1-Helix und trägt dadurch zur Stabilisierung dieser Region bei [Coureux *et al.*, 2004].

Die Nukleotidbindungselemente der Struktur von *DdMyosin-5b* weisen eine ähnliche Konformation wie in der *GgMyosin-5a rigor-like*-Struktur. Schalter-1 ist nahezu unverändert. Schalter-2 hingegen zeigt in der *DdMyosin-5b-K6*-Struktur eine veränderte Konformation, in der die Stabilisierung der SH1-Helix nicht mehr gegeben ist. Jedoch ist auch diese Konformation wie bereits in der *GgMyosin-5a*-Struktur beobachtet, nicht eindeutig der geschlossenen oder offenen Position des Schalters zuzuordnen. Die Phosphatbindungsschleife, der P-Schleife, zeigt wie der Schalter-2 eine andere Konformation. Diese Schleife ist in der *DdMyosin-5b-K6*-Struktur etwas verschoben, so dass sie weiter entfernt ist von Schalter-2. Die veränderten Konformationen des Schalters-2 und der Phosphatbindungsschleife in der Struktur der *DdMyosin-5b*-Mutante im Gegensatz zu der Struktur von *GgMyosin-5a* können zum einen auf der Mutation in Schleife-2 beruhen oder auf Myosiniformspezifischen Änderung der Anordnung dieser Elemente.

Die Nukleotidbindungselemente der *DdMyosin-5b-K6*-Struktur weisen ähnliche Merkmale auf, wie in der nukleotidfreien Kristallstruktur von *GgMyosin-5a* und unterscheidet sich von

der GgMyosin-5a-Struktur mit Mg^{2+} .ADP.BeF_x als Nukleotidanalogen (siehe Abbildung 21). In der Abbildung ist zusätzlich die Relayhelix dargestellt. Diese nimmt in allen drei Strukturen eine gerade Konformation ein.

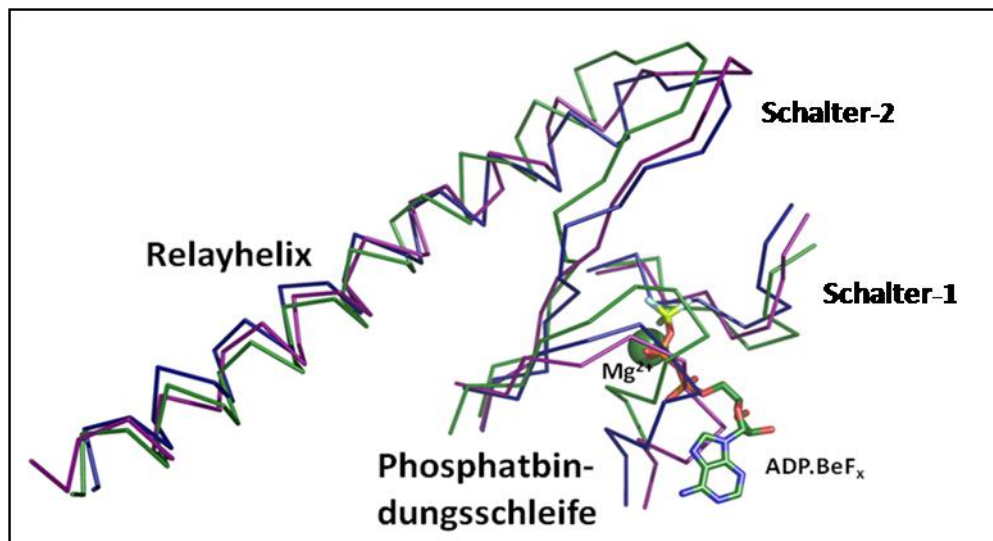


Abb. 21: Darstellung der Nukleotidbindungstasche und der Relayhelix der *DdMyosin-5b-K6*-Struktur im nukleotidfreien Zustand (lila) mit *GgMyosin-5a* im nukleotidfreien Zustand (dunkelblau) und mit *GgMyosin-5a* im Komplex mit Mg^{2+} .ADP.BeF_x (dunkelgrün). Für diese Ansicht wurde die untere 50 kDa-Domäne der Myosine übereinander gelagert.

Neben der stärker geschlossenen Aktinbindungsspalte und der Konformation der Nukleotidbindungselemente weist die *rigor-like*-Konformation in *GgMyosin-5a* eine Verzerrung der β -Faltblätter 5-7 der zentralen β -Faltblätter der Motordomäne, die die Bewegung der oberen 50 kDa-Domäne erlaubt [Coureux *et al.*, 2004]. Dadurch übernehmen die zentralen β -Faltblätter eine Rolle bei der Positionierung der Domänen zueinander und unterstützen das Schließen der Aktinbindungsspalte. Die β -Faltblätter 5-7 in der *DdMyosin-5b*-Struktur nehmen eine ähnliche Konformation ein wie in der Kristallstruktur von *GgMyosin-5a* in der *Apo*-Form beobachtet (siehe Abbildung 22). Jedoch sind auch diese Verzerrungen der drei β -Faltblätter nicht komplett identisch zu dieser Struktur. Diese Unterschiede können wie bereits erwähnt durch die unterschiedlichen Myosinisoformen oder durch die Einführung des „K6“-Motivs in Schleife-2.

Diese Beobachtung weist zusammen mit der weit geschlossenen Aktinbindungsspalte und der Konformation der Nukleotidbindungstasche auf eine *rigor-like*-Konformation der nukleotidfreien *DdMyosin-5b-K6*-Struktur hin.



Abb. 22: Vergleich der β -Faltblätter 5-7 der *DdMyosin-5b-K6*-Struktur im nukleotidfreien Zustand (lila) mit *GgMyosin-5a* im nukleotidfreien Zustand (dunkelblau) und mit *GgMyosin-5a* im Komplex mit Mg^{2+} .ADP.BeF_x (dunkelgrün). Für diese Ansicht wurde die untere 50 kDa-Domäne der Myosine übereinander gelagert.

3.1.3.4. Die Konformation des künstlichen Hebelarms

Ein weiterer wichtiger Aspekt von Myosinstrukturen ist die Position des Hebelarms. Anhand der Stellung des Hebelarms kann eingeordnet werden, ob die Motordomäne sich in der Konformation vor oder nach dem Kraftschlag befindet. Ist die Motordomäne für die Ausführung des Kraftschlags ausgerichtet, zeigt der Hebelarm nach oben. Nach dem Kraftschlag befindet sich der Hebelarm in einer Position, in der der Hebelarm nach unten zeigt.

Für die Analyse der Hebelarmposition der *Myosin-5b-K6*-Struktur wurden drei Strukturen der Motordomäne mit Nackenregion des Myosins der gestreiften Muskulatur aus der Muschel herangezogen [Houdusse *et al.*, 2000; PDB-Einträge 1DFK, 1DFL und 1B7T], die verschiedene Konformationen des Hebelarms aufweisen. Die Muschelmyosin-Motordomänen Struktur mit Mg^{2+} .ADP.VO₄ als Nukleotidanalogen repräsentiert den Übergangszustand mit Mg^{2+} .ADP.P_i in der Nukleotidbindungstasche, der dem schwach an Aktin gebundenem Zustand sehr nahe kommt ist. Der Hebelarm zeigt in dieser Struktur nach oben. Die nukleotidfreie Struktur befindet sich in der *near-rigor*-Konformation. Diese unterscheidet sich in der Konformation der Aktin- und Nukleotidbindungsregion von der wirklich stark an Aktin gebundenen Konformation. Jedoch sollten die Konformationen der Relayhelix, der SH1-Helix, des Konverters und des Hebelarms nahezu der des *rigor*-Zustands entsprechen. Die dritte

Struktur befindet sich im nicht an Aktin gebundenen ADP-Zustand nach dem Kraftschlag. Der Hebelarm zeigt hier nach unten.

In Abbildung 23 ist die *DdMyosin-5b-K6*-Struktur diesen drei Konformationen des Muschelmyosins gegenübergestellt. Der künstliche Hebelarm der Myosin-5b-K6-Struktur zeigt am Übergang Konverter-Hebelarm eine ähnliche Konformation wie der natürliche Hebelarm des Muschelmyosins in der *near-rigor*-Konformation ohne Nukleotid.

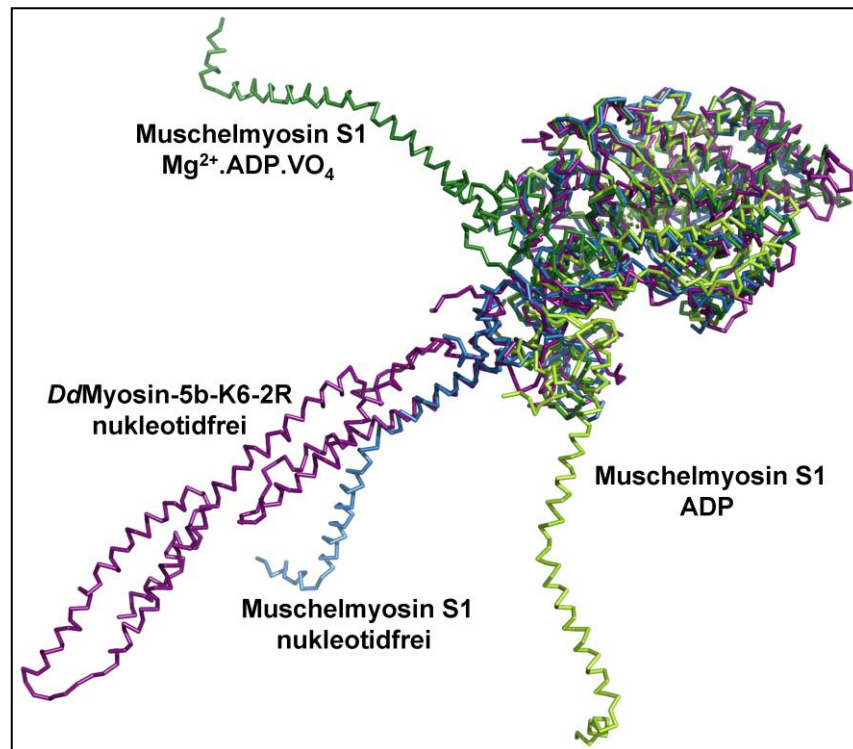


Abb. 23: Vergleich der Hebelarmpositionen der Strukturen des Muschelmyosins der gestreiften Muskulatur mit *DdMyosin-5b-K6-2R*. Die Strukturen des Muschelmyosins spiegeln drei Zustände wider, S1 mit $Mg^{2+}.ADP.VO_4$ [PDB-Eintrag 1DFL] als Nukleotidanalogen repräsentiert den Übergangszustand der ATP-Hydrolyse vor dem Kraftschlag. Der nukleotidfreie Zustand des Muschelmyosins ist in der *near-rigor*-Konformation und weist Ähnlichkeiten *rigor*-Zustand auf [blau, PDB-Eintrag 1DFK]. Der ADP-Zustand des Myosins reflektiert die Hebelarmposition nach dem Kraftschlag [hellgrün, PDB-Eintrag 1B7T]. Die Hebelarmposition der Struktur von *DdMyosin-5b-K6-2R* im nukleotidfreien Zustand (lila) ist ähnlich der *near-rigor*-Position des Muschelmyosinhebelarms.

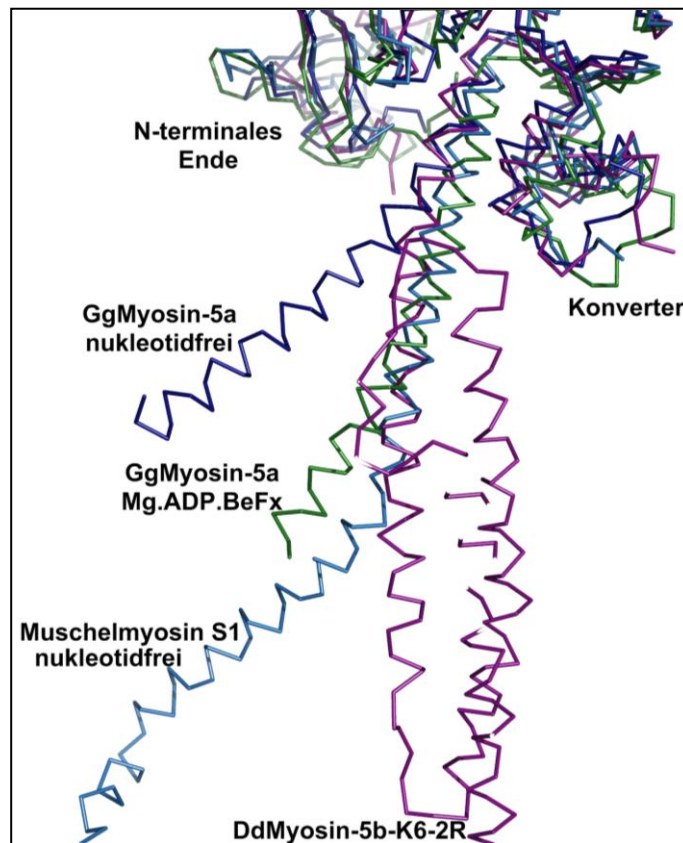


Abb. 24: Gegenüberstellung der Positionen der Hebelarme von *DdMyosin-5b-K6-2R* (lila), Muschelmyosin S1 in der nukleotidfreien *near-rigor*-Konformation (hellblau, PDB-Eintrag 1DFK), *GgMyosin-5a* nukleotidfrei in der *rigor-like*-Konformation (dunkelblau, PDB-Eintrag 1OE9) und *GgMyosin-5a* im Komplex mit Mg^{2+} .ADP.BeF_x in der *near-rigor*-Konformation (grün, PDB-Eintrag 1W7J)

In früheren Studien wurde festgestellt, dass die Position des Hebelarms abhängig von der Myosinisoform und dem Konstrukt trotz gleichen Nukleotidzustand variiert [Houdusse *et al.*, 2000]. Diese Beobachtung wurde auch im Fall des künstlichen Hebelarms der *DdMyosin-5b-K6*-Struktur im Vergleich mit *GgMyosin-5a* und dem Myosin aus der Muschel gemacht (Abbildung 24). Die gebundenen leichten Ketten der natürlichen Hebelarme wurden aus der Abbildung rausgehalten. Besonders auffällig ist, dass die Position des künstlichen Hebelarms von *DdMyosin-5b-K6* der Position des Muschelmyosin im nukleotidfreien Zustand und der des *GgMyosin-5a* im Komplex mit Mg^{2+} .ADP.BeF_x und nicht der Hebelarmposition der Kristallstruktur von *GgMyosin-5a* (siehe Abbildung 24). Der Hebelarm von *GgMyosin-5a* in der *rigor-like*-Konformation unterscheidet sich in seiner Konformation um 25° von den drei anderen. Der künstliche Hebelarm hat eine stabförmige Konformation, da sich die drei Helices jeder α -Aktinin-Untereinheit gegenseitig stabilisieren. Dieser Hebelarm weist eine gewisse Flexibilität am Übergang der Untereinheiten zueinander (siehe Kapitel 3.2.2) Die natürlichen Hebelarme, sowohl von *GgMyosin-5a* als auch vom dem Muskelmyosin aus der

Muschel, haben leichte Ketten gebunden, die Einfluss auf die Konformation des Hebelarms haben.

Kliche *et al.*, 2001 lösten bereits die Struktur von *DdMyosin-2* mit diesem künstlichen Hebelarm bestehend aus zwei α -Aktinin-Untereinheiten (2R). Dieses Motordomänen-2R-Konstrukt wurde im Komplex mit Mg^{2+} .ADP kristallisiert und die Struktur repräsentiert die Konformation des Motors nach dem Kraftschlag. Der 2R-Hebelarm zeigt folglich nach unten. In Abbildung 25 werden die Strukturen von *DdMyosin-2* und *DdMyosin-5b-K6* mit dem Hebelarm aus zwei α -Aktinin-Untereinheiten gegenübergestellt.

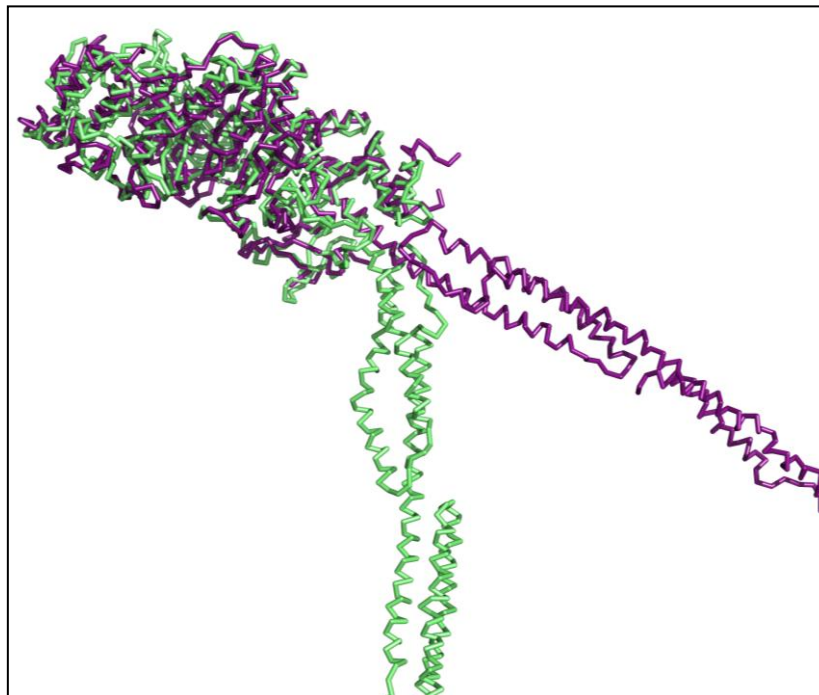


Abb. 25: Vergleich des künstlichen Hebelarms in der Struktur ohne Nucleotid von *DdMyosin-5b-K6*-2R (lila) und der *DdMyosin-2*-2R-Struktur im Komplex mit Mg^{2+} .ADP (grün) [PDB-Eintrag 1G8X; Kliche *et al.*, 2001]

Der aus zwei α -Aktinin-Untereinheiten bestehende Hebelarm nimmt aufgrund der unterschiedlichen Nucleotidzustände der Motordomänen verschiedenen Konformationen ein. Im Mg^{2+} .ADP-Zustand zeigt der Hebelarm nach unten (in Abbildung 24 grün), während dieser im nukleotidfreien Zustand gerade aus der Motordomäne rausgeht (in Abbildung 24 lila). Diese beiden Strukturen zeigen, dass der Hebelarm abgesehen von der Nucleotidbedingten Konformation am Übergang Motordomäne-Hebelarm die gleiche Drehung aufweist. Würden diese Strukturen die gleiche Hebelarmposition darstellen, wäre der künstliche Hebelarm in beiden Strukturen identisch.

3.2. Struktur basiertes *Protein Engineering* eines künstlichen prozessiven Myosins

Prozessive dimere Myosine, wie Myosine der Klasse 5, zeichnen sich durch eine hohe *duty ratio* aus und führen in einem so genannten *hand-over-hand*-Mechanismus mehrere aufeinanderfolgende Schritte auf dem Aktinfilament aus [Mehta *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 2000]. Diese prozessive Bewegung entlang eines Aktinfilaments werden *in vivo* für Transportprozesse über längere Distanzen innerhalb der Zelle genutzt [Desnos *et al.*, 2007].

Verschiedene Modelle werden für die Beschreibung der prozessiven Bewegung eines Myosins postuliert, die die Koordination der Köpfe während dieser Bewegung durch intramolekulare Spannung beschreiben [Rief *et al.*, 2000; Veigel *et al.*, 2002; Purcell *et al.*, 2005]. Jedoch sind die minimalen strukturellen, mechanistischen und kinetischen Parameter, die eine prozessive Bewegung ermöglichen, bisher nicht vollständig definiert.

Um die minimalen Voraussetzungen für prozessive Bewegungen eines Myosins genauer definieren zu können, wurde mittels eines Struktur-basierten *Protein Engineering*-Ansatzes ein Modell eines künstlichen prozessiven Myosins gebildet [Diensthuber, 2009]. Myosine wurden bereits erfolgreich mittels des *Protein-Engineering*-Ansatzes spezifisch in ihren Eigenschaften, wie Substratspezifität [Furch *et al.*, 1998], Motilität [Ruff *et al.*, 2001] oder Direktionalität der Bewegung entlang eines Aktinfilaments [Tsiavaliaris *et al.*, 2004] verändert. Die Motordomäne von *DdMyosin-5b*, welche als Monomer bereits kinetisch und funktional beschrieben und deren prozessives Verhalten postuliert wurde [Taft *et al.*, 2008], wurde als Motorkomponente eingesetzt. An diese Motordomäne wurde ein 13 nm langer künstlicher Hebelarm für die Kraftentwicklung bestehend aus zwei Wiederholungen des *Dda*-Aktinins (2R) [Anson *et al.*, 1996] angehängt, der die natürliche Nackendomäne eines Myosins mit optional gebundenen leichten Ketten ersetzt. Für die spontane Dimerisierung des künstlichen Myosins wurde ein 30 Aminosäuren-Segment des GCN4-Leucin-Zippers (LZ), ein Transkriptionsfaktor aus *Saccharomyces cerevisiae* [O'Shea *et al.*, 1991] C-terminal an das 2R-Segment angefügt (siehe Abbildung 26A) [Amrute-Nayak *et al.*, 2009]. Dieses künstliche Dimer wird in folgenden Abschnitten als M5P bezeichnet.

Die funktionellen und kinetischen Untersuchungen von M5P sollten zeigen, ob allein die Motordomäne eines Myosins prozessives Verhalten bestimmt und wie entscheidend die Wahl des Hebelarms für die Prozessivität ist. In dieser Arbeit wurden mittels *Normal mode*-Analysen die Flexibilität des Hebelarms und die daraus theoretisch resultierenden Schrittweiten des künstlichen Motors analysiert. Des Weiteren wurden kinetische Eigenschaften

des Dimers bestimmt um Auswirkungen einer möglichen intramolekularer Spannung zwischen den Motordomänen auf die Kinetiken feststellen zu können.

3.2.1. Molekulares Modelling eines prozessiven Motors

Für die *in silico*-Konstruktion von M5P wurden als Basis die Strukturen der DdMyosin-2-Motordomäne mit artifiziellem Hebelarm [M765-2R, Kliche *et al.*, 2001; PDB-Eintrag 1G8X] und des GCN4 Leucin-Zipper [O'Shea *et al.*, 1991; PDB-Eintrag 2ZTA] verwendet [Diensthuber, 2009]. Bei der Konstruktion des Übergangs vom künstlichen Hebelarm (2R) zum Leucin-Zipper-Segment, der Dimerisierungsregion, wurde beachtet die α -helikale Struktur nicht zu unterbrechen.

Für weitere *in silico*-Analysen wurde ein Strukturmodell von M5P erstellt. Dazu wurde die Geometrie des Modells im Übergangsbereich mit dem Programm „CNS Solve 1.2“ [Brünger *et al.*, 1998] optimiert. Im ersten Schritt wurden die Aminosäuren 999-1029 in 200 Zyklen mit dem Programmteil „*model_minimize*“, ohne auf experimentellen Daten zu basieren, mit „*harmonic restraints*“ energieminiert. Im Anschluss wurde die erhaltene Geometrie der Aminosäuren anhand des Ramachandran-Plots mit dem Programm „Coot 0.5.2“ [Emsley *et al.* 2004] optimiert. Das so erhaltene Modell ist in Abbildung 26A dargestellt. Diese Abbildung zeigt die im Übergangsbereich des artifiziiellen Hebelarms zum Leucin-Zipper miteinander agierenden Aminosäuren, deren Interaktionen eine stabile Ausbildung eines dimeren Myosin-5b ermöglichen (siehe Abbildung 26B).

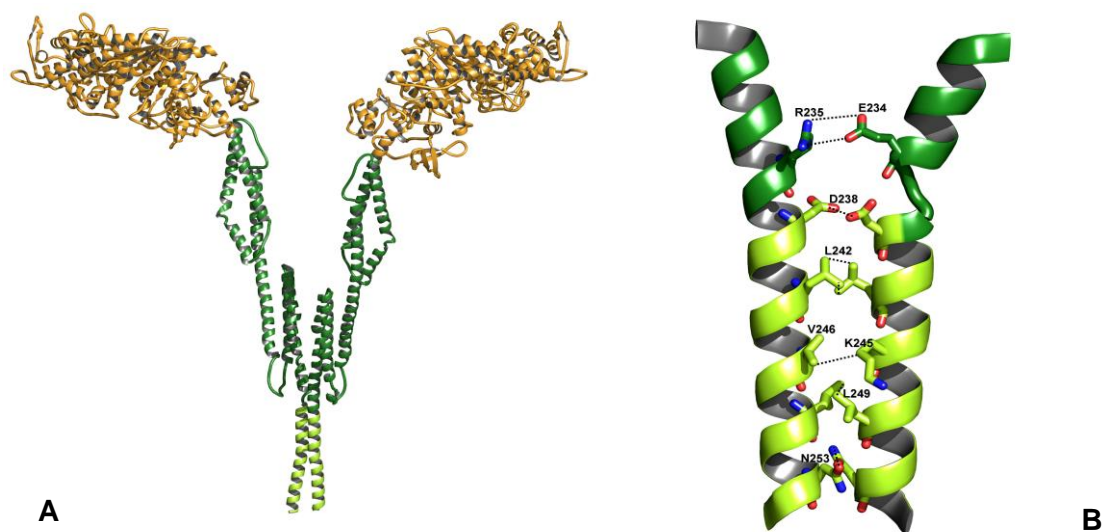


Abb. 26: Modell des M5P, (A) dargestellt sind in hellorange die Myosinmotordomänen, in dunkelgrün der artifizielle Hebelarm (2R) und in Limone der 30 Aminosäuren umfassende Teil des GCN4-Leucin-Zippers des Modells. (B) Gezeigt werden die Aminosäuren, die am konstruierten Übergang der α -Aktinin-Moleküle des künstlichen Hebelarms zum Leucin-Zipper, durch ihre Interaktionen zur Bildung und Stabilisierung des Dimers beitragen.

3.2.2. *Normal mode Analyse*

Die *Normal mode* Analyse ist eine geeignete Methode, um die Dynamik in Proteinen zu untersuchen. Dieser Ansatz basiert auf der Annahme, dass die Vibrationsschwingungen mit den niedrigsten Frequenzen die größten Bewegungen in einem Protein beschreiben und daher auch diejenigen sind, die funktionell relevant sind [Hollup *et al.*, 2005]. Für die Analyse wurde der Server „*Norwegian Bioinformatics Platform*“ (<http://www.bioinfo.no/tools/normalmodes>) verwendet [Hollup *et al.*, 2005], dessen Berechnung der *normal modes* die Methode nach Hinsen nutzt [Hinsen, 1998]. Für die Berechnungen werden nur die C_{α} -Atome der Proteine genutzt, denen die Masse der gesamten Aminosäure zugeschrieben werden, die sie repräsentieren. Für Proteine, die weniger als 1200 Aminosäuren enthalten, werden die ersten 200 *modes* berechnet. Die ersten 6 entsprechen der Rotation und Translation des gesamten Systems und werden für diese Analysen ignoriert. Der erste *mode* mit der niedrigsten Frequenz der relevant ist, ist daher der siebte.

Die *Normal mode* Analyse wurde in diesem Fall durchgeführt, um Aussagen über mögliche Flexibilitäten der Konformation und mögliche Bewegungen einzelner Domänen des M5P treffen zu können und ob diese ausreichend für eine prozessive Bewegung des Dimers sind. Die zwei aussagekräftigsten Ergebnisse der Moden mit den niedrigsten Frequenzen zeigten, dass der 2R-Hebelarm nicht wie beschrieben ein starrer Hebelarm ist, sondern eine flexible Region (Lys121-Val125) aufweist, die eine Art Gelenk im Hebelarm bildet (Abbildung 27).

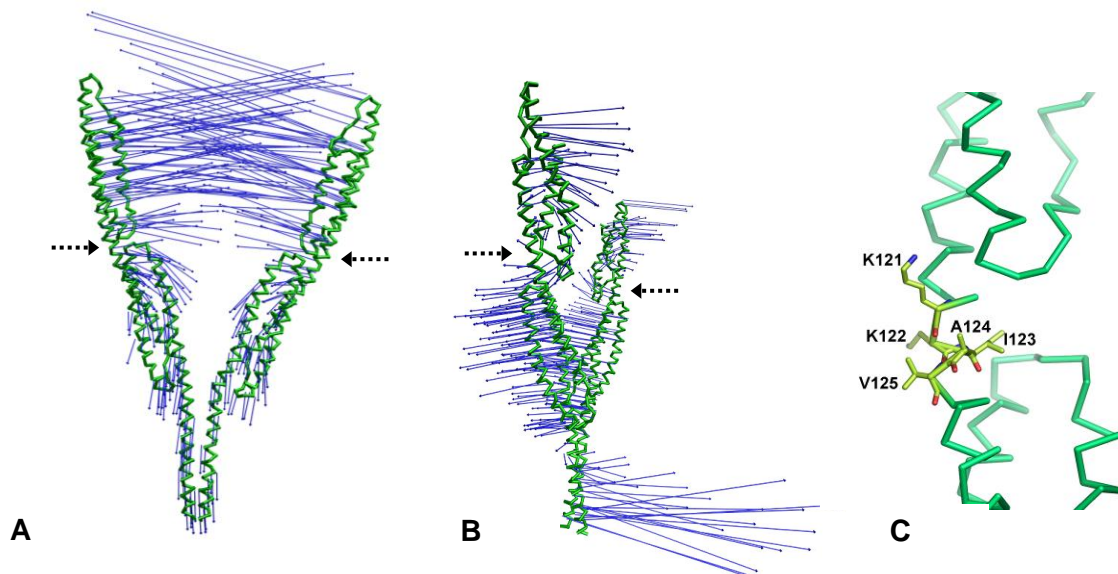


Abb. 27: Darstellung der Ergebnisse der *Normal Mode*-Analyse, in grün wird das 2R-LZ-Segment dargestellt, in blau die Vektoren, die die Flexibilität und die damit verbundenen möglichen Bewegungen zeigen. (A) und (B) zeigen verschiedene Modi der Analyse, die schwarzen Pfeile zeigen die flexible Region an, die die Bewegung ermöglicht, (C) zeigt die flexible Region des 2R-Hebelarms detaillierter

Dieses „Gelenk“ befindet sich am Übergang vom ersten α -Aktinin-Molekül zum zweiten α -Aktinin-Molekül. An diesem Übergang ist die Windung der α -Helix mit den Aminosäuren KKIAV (Lys121-Val125) nicht durch Interaktionen mit benachbarten α -Helices stabilisiert und ist daher keine starre Region sondern weist die Flexibilität einer isolierten Helix auf. Die Seitenketten der Aminosäuren dieser Windung sind zusätzlich nicht an signifikanten Interaktionen beteiligt, die eine spezifische Konformation der Windung stabilisieren und die Flexibilität einschränken würden (siehe Abbildung 27). Diese Aspekte erklären die Bewegungsmöglichkeiten des Gelenks in zwei senkrecht zueinander stehenden Richtungen, wobei eine Richtung eine Bewegung um 10 nm jedes oberen 2R-Segments erlaubt und die andere eine 5 nm-Bewegung im 90°-Winkel zur ersten Richtung ermöglicht. Dieses Modell zeigt, dass diese Flexibilitäten dem artifiziellen Motor Schrittweiten bis zu 18 nm ermöglichen. In Abbil-

Abbildung 28 sind zur Veranschaulichung der Flexibilitäten von M5P verschiedene Zwischenzustände der durch die *Normal mode*-Analysen berechneten Bewegungsmöglichkeiten abgebildet.

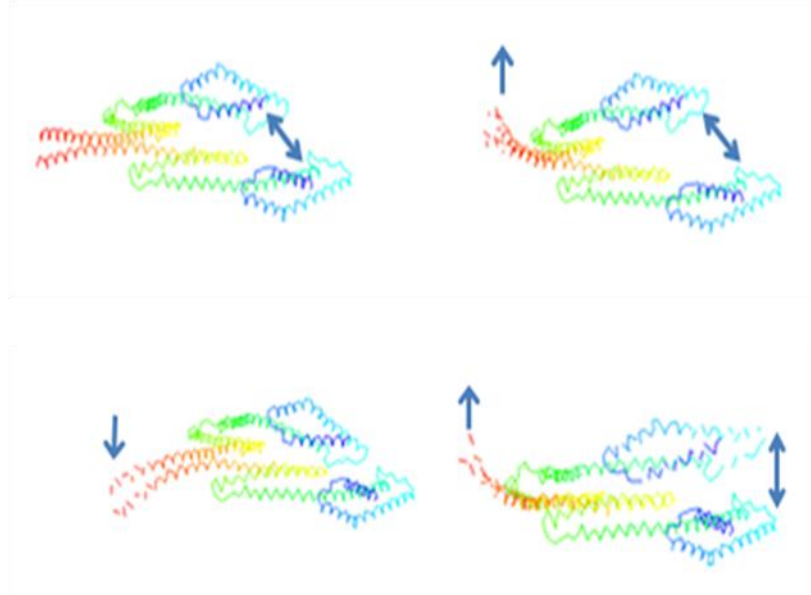


Abb. 28: Darstellung der durch die *Normal mode*-Analysen der berechneten Bewegungsmöglichkeiten von M5P

3.2.3. Darstellung des artifiziellen Myosin-5b-Dimers

Der Expressionsvektor des artifiziellen dimeren Myosin-5b-2R-LZ (M5P) wurde kloniert [Diensthuber, 2008] und das rekombinante Protein wie in 2.5.8. beschrieben in *Dictyostelium discoideum* exprimiert und über eine FLAG-Affinitätschromatographie aufgereinigt (siehe Abbildung 29). Die Eluatfraktionen wurden vereinigt, gegen Lagerpuffer mit 300 mM Kaliumchlorid über Nacht dialysiert und aufkonzentriert. Das erhaltene Protein wurde aufgrund der hohen Reinheit nach der FLAG-Affinitäts-Säule keinen weiteren Aufreinigungsschritten unterzogen. Das konzentrierte Protein wurde in 3 % und 30 % Sucrose in 20-50 µl Aliquoten bei -80°C eingefroren und für die Charakterisierung des Dimers verwendet. Mittels analytischer Ultrazentrifugation wurde gezeigt, dass dieses Konstrukt als Dimer vorliegt [Amrute-Nayak *et al.*, 2010].

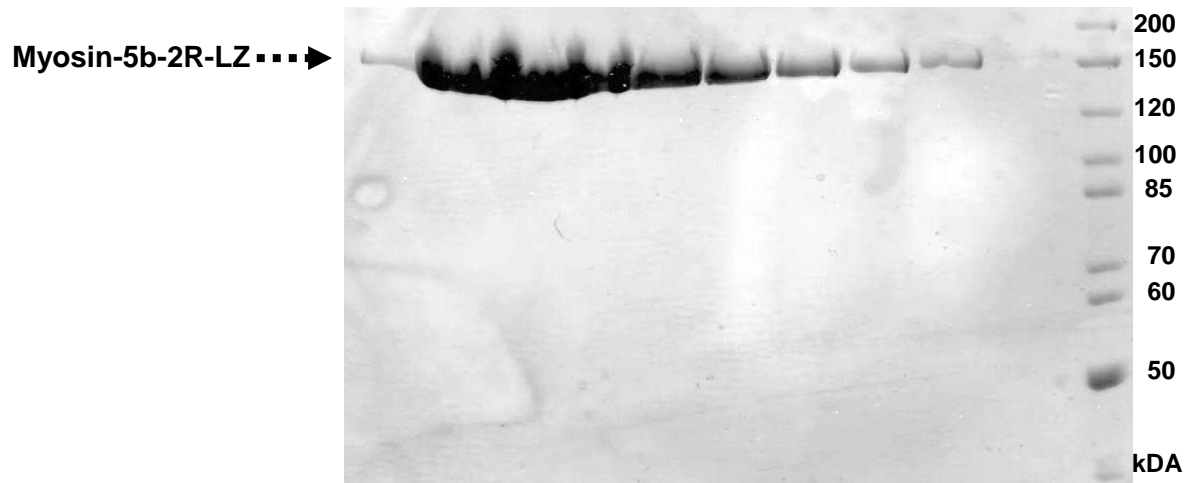


Abb. 29: Coomassie-gefärbtes 10 %iges SDS-Gel der Eluatfraktionen der Aufreinigung von Myosin-5b-2R-LZ mittels FLAG-Affinitätschromatographie. Die Fraktionen wurden vereinigt, dialysiert und aufkonzentriert

3.2.4. Kinetik des Fließgleichgewichts von M5P

Zum Nachweis der ATPase-Aktivität und damit verbunden der Funktionalität des Myosin-5b-Dimers wurden die Parameter des Fließgleichgewichts der ATPase von M5P mit dem in 2.6.1 beschriebenen NADH-gekoppelten Assay untersucht. Die ATPase-Aktivität wurde in Abwesenheit von Aktin und in Aktinkonzentrationsbereichen von 2.5 - 70 μM Aktin gemessen. Durch Anpassung einer Hyperbel an die gemessenen ATP-Umsatzgeschwindigkeiten wurden die apparente Gleichgewichtskonstante (K_{app}) und die maximale Aktinaktivierte ATP-Umsatzgeschwindigkeit (k_{cat}) für M5P ermittelt und der monomeren Myosin-5b-Motordomäne gegenübergestellt (siehe Abbildung 30).

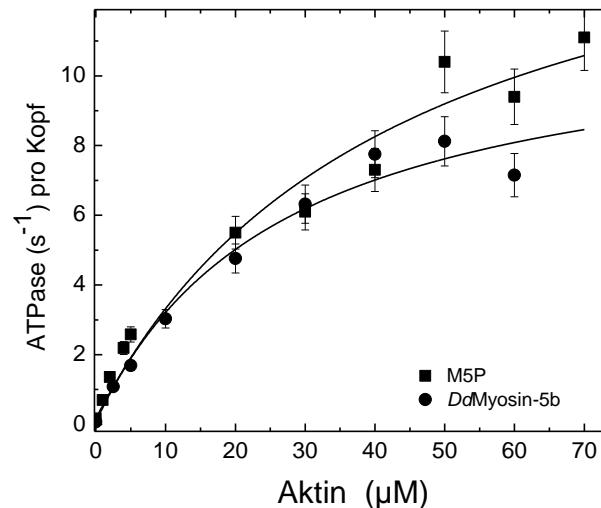


Abb. 30: Messung der Aktin-aktivierten ATPase-Aktivität von M5P, zum Vergleich wurden die Messungen des Myosin-5b-Monomers [Taft *et al.*, 2008] in die Darstellung integriert

Die kinetischen Parameter sind in Tabelle 10 zusammengefasst und zeigen, dass keine großen Differenzen zwischen dem Monomer und dem künstlichen Dimer des Myosin-5b vorhanden sind. Die basale ATPase, die ATPase-Aktivität in Abwesenheit von Aktin, ist leicht gestiegen von $0,069 \text{ s}^{-1}$ auf $0,17 \text{ s}^{-1}$. Die apparente Gleichgewichtskonstante ist leicht schwächer, K_{app} ist von 27 μM des Monomers auf 36 μM des Dimers angestiegen. Die maximale Geschwindigkeit ist von $11,6 \text{ s}^{-1}$ auf $15,9 \text{ s}^{-1}$ ebenfalls leicht angestiegen. Auch die Bindungskonstante 2. Ordnung (k_{cat}/K_{app}) ist aufgrund der kaum veränderten Maximalgeschwindigkeit und Aktinaffinität gleich.

Myosin	basale ATPase (s^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	K_{app} (μM)	k_{cat}/K_{app} ($\text{μM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Aktivierung
<i>DdMyosin-5b</i> *	0.069 ± 0.01	11.6 ± 0.8	27 ± 7	0.43 ± 0.05	167
M5P	0.17 ± 0.01	15.9 ± 0.8	36 ± 4	0.44 ± 0.05	158

* Taft *et al.*, 2008

Tab. 10: Parameter der ATPase-Aktivität von M5P und der Myosin-5b-Motordomäne

3.2.5. ATP-Bindung des künstlichen Myosin-5b-Dimers

Neben der Kinetik im Fließgleichgewicht wurde auch die Bindung von ATP an M5P gemessen. Die Bindung von ATP wurde über den Anstieg der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz ermittelt. Der Fluoreszenzanstieg erfolgte nach einer Exponentialfunktion 1. Ordnung und die daraus bestimmte Geschwindigkeitskonstante wurde gegen die ATP-Konzentration aufgetragen (siehe Abbildung 31)

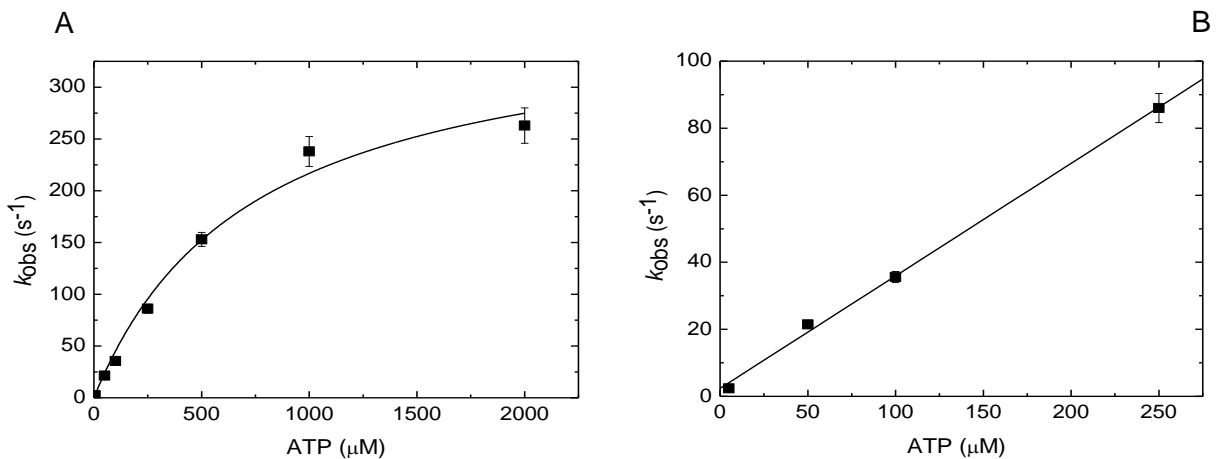
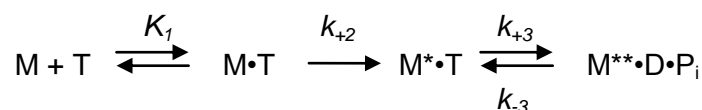


Abb. 31: ATP-Bindung an M5P, (A) Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} von der ATP-Konzentration, bei hohen ATP-Konzentrationen bis 2 mM können die Daten hyperbolisch zur Bestimmung der Maximalgeschwindigkeit angepasst werden. (B) Im Bereich der niedrigen ATP-Konzentrationen bis 250 μM ATP wurde eine Gerade an die Geschwindigkeiten angepasst.

Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten bis zu einer ATP-Konzentration von 2 mM wurden entsprechend einem Zwei-Schritt-Mechanismus angepasst [Bagshaw und Trentham, 1974; Malnasi-Csizmadia *et al.*, 2001]. Der schnellen Bildung eines Kollisionskomplexes ($M \cdot T$) mit der Gleichgewichtskonstanten K_1 folgt die schnelle und fast vollständig irreversible Isomerisierung (Geschwindigkeitskonstante k_{+2}). Für *Dd*Myosin-5b ist die intrinsische Fluoreszenzänderung bei der ATP-Bindung dem Hydrolyseschritt zugeordnet [Ritchie *et al.*, 1993; Kurzawa *et al.*, 1997]. Der nachfolgende Reaktionsmechanismus zeigt in Anlehnung an Bagshaw und Trentham die Schritte bei der Interaktion von Myosin mit ATP [Malnasi-Csizmadia *et al.*, 2001; Bagshaw und Trentham, 1974].



Aus der Auftragung der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten gegen die ATP-Konzentration konnten K_1 und k_{+2} bestimmt werden. Bei ATP-Konzentrationen bis 250 μM stieg k_{obs} linear an. Die Bindungskonstante 2. Ordnung $K_1 k_{+2}$ wurde aus der Steigung der

Geraden ermittelt. Sie beträgt $0,33 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Für das monomere Myosin-5b wurde eine Bindungskonstante 2. Ordnung von $0,47 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bestimmt [Taft *et al.*, 2008].

Bei höheren ATP-Konzentrationen im Bereich bis zu 2 mM ATP näherten sich die gemessenen Geschwindigkeiten einem Sättigungswert und waren nicht mehr linear von der ATP-Konzentration abhängig. Durch Anpassung einer Hyperbel ($k_{\text{obs}} = k_{\text{max}}[\text{ATP}]/([\text{ATP}] + K_1)$) an diese Sättigungskurve konnte ein Maximalwert bestimmt werden, der dem reversiblen Hydrolyseschritt entspricht [Marston und Taylor, 1980; Taft, 2008]. $k_{+3} + k_{-3}$ für das dimere Myosin-5b beträgt 376 s^{-1} und ist kaum verändert im Vergleich zum monomeren Myosin-5b mit einer Hydrolysegeschwindigkeit von 410 s^{-1} . Die kinetischen Parameter der ATP-Bindung in Abwesenheit von Aktin an Myosin-5b als Dimer und Monomer unterscheiden sich nur minimal.

In Tabelle 11 sind die kinetischen Konstanten des monomeren und dimeren Myosin-5b gegenübergestellt.

Myosin	$K_1 k_{+2} (\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_{+3} + k_{-3} (\text{s}^{-1})$
Myosin-5b Monomer*	$0,47 \pm 0,02$	376 ± 32
M5P	$0,33 \pm 0,02$	410 ± 18

* Taft *et al.*, 2008

Reaktionsbedingungen: 20 mM MOPS, pH-Wert 7,0, 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl bei 20°C

Tab. 11: Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der ATP-Bindung an Myosin-5b als Monomer und Dimer

3.2.6. ADP-Dissoziation aus dem ternären Komplex mit Akto.Myosin

Die ADP-Dissoziation aus dem ternären Komplex mit Akto.Myosin k_{AD} ist der geschwindigkeitslimitierende Schritt des ATPase-Zyklus prozessiver Myosine [De La Cruz *et al.*, 1999]. Es wurden experimentelle Hinweise erhalten, dass die intramolekulare Spannung zwischen den beiden Köpfen des Dimers die ADP-Dissoziation von Akto.Myosin beeinflusst. Die ADP-Dissoziation aus dem hinteren Kopf wird durch vorwärtsgerichtete intramolekulare Spannung beschleunigt, die des vorderen Kopf durch rückwärtsgerichtete intramolekulare Spannung verlangsamt [Rosenfeld *et al.*, 2005]. Forgacs *et al.* zeigten hingegen, dass nur die

ADP-Dissoziation des vorderen Kopfes durch intramolekulare Spannung beeinflusst wird, während die Dissoziation des hinteren Kopfes nicht beeinflusst wird [Forgacs *et al.*, 2008]. Um Hinweise zu bekommen, ob in M5P eine intramolekulare Spannung aufgebaut werden kann, wurde k_{AD} bestimmt. Die Messung wurde wie in Kapitel 3.1.2.5. erläutert durchgeführt und ist in Abbildung 32 dargestellt.

Die Messung zeigte einen exponentiellen Verlauf 2. Ordnung aus dem zwei Dissoziationskonstanten ermittelt werden konnten. Die schnellere Rate beträgt $30,2 \text{ s}^{-1}$ mit einer Signalamplitude von ca. 1%, die langsamere Rate beträgt $1,97 \text{ s}^{-1}$ mit einer Signalamplitude von ca. 2%. Die Messung von k_{AD} des Myosin-5b-Monomers ergab eine Dissoziationskonstante mit $21,6 \text{ s}^{-1}$ und wies keine zwei Phasen auf [Taft *et al.*, 2008]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass in M5P eine intramolekulare Spannung zwischen den Motordomänen aufgebaut werden kann, die die ADP-Dissoziation von Akto.Myosin beeinflusst.

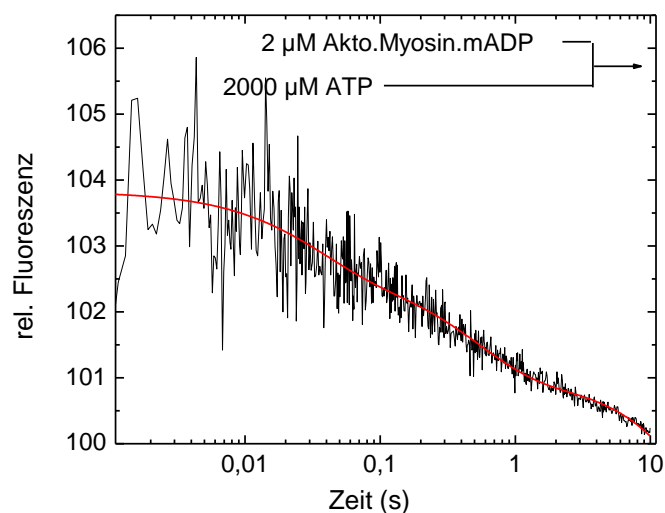


Abb. 32: mantADP-Dissoziation aus dem Akto.Myosin-Komplex von M5P, dargestellt ist die Abnahme der mant-Fluoreszenz nach Mischen des Komplexes aus $2 \mu\text{M}$ Akto.Myosin mit gebundenem mantADP mit $2000 \mu\text{M}$ ATP. Die Fluoreszenzabnahme wurde logarithmisch bei 297 nm über das FRET-Signal verfolgt und verlief exponentiell 2. Ordnung. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten entsprechen der mantADP-Dissoziation von Akto.Myosin (k_{AD}) der beiden Köpfe des Dimers

3.2.7. 2'-deoxy-mantATP-Bindung an Akto.Myosin von M5P

Das monomere *Dd*Myosin-5b weist eine hohe *duty ratio* auf, die zum einen auf einer langsamen ADP-Freisetzung von Akto.Myosin beruht und zum anderen auf einer langsamen ATP-induzierten Dissoziation des Aktins von Myosin [Taft *et al.*, 2008]. Für Myosin-5 wurde eine Verlangsamung der ATP-Bindung des vorderen Kopf aufgrund intramolekularer Spannung vorgeschlagen [Forgacs *et al.*, 2008]. Dieser Effekt würde auch zu einer höheren Prozessivität des Myosins beitragen. Dies könnte nahelegen, dass eine intramolekulare Spannung zwischen den Motordomänen von M5P auch die Bindung von ATP an Akto.Myosin beeinflusst.

Dazu wurde die Bindung von 2'-deoxy-mant-ATP an Akto.Myosin gemessen (siehe Abbildung 33).

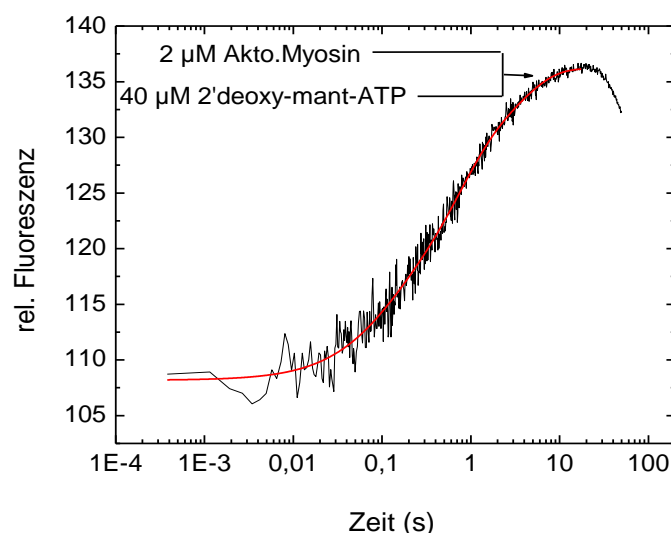


Abb. 33: 2'-deoxy-mant-ATP-Bindung an M5P im Komplex mit Aktin. Detektiert wurde der Fluoreszenzanstieg des 2'-deoxy-mant-ATPs nach Bindung an Akto.Myosin über das FRET-Signal bei 295 nm. Die Messung zeigt einen exponentiellen Verlauf 2. Ordnung

Die Bindung von 2'-deoxy-mant-ATP an den Akto.Myosin-Zustand von M5P zeigt einen exponentiellen Verlauf 2. Ordnung mit einer schnellen Rate von $4,5 \text{ s}^{-1}$ mit einer Signalamplitude von ca. 9 % und einer langsamen Rate von $0,5 \text{ s}^{-1}$ mit einer Signalamplitude von ca. 11 %. Die ATP-Bindung des künstlichen Dimers in Abwesenheit von Aktin zeigte nur eine Phase (siehe Kapitel 3.2.5). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass auch die ATP-Bindung an Akto.Myosin durch eine intramolekulare Spannung zwischen den Motordomänen von M5P beeinflusst werden könnte.

3.3. Auswirkung des Schalter-2 auf den Kraftschlag

Schalter-2 bildet zusammen mit Schalter-1 und der Phosphatbindungsschleife die Nukleotidbindungstasche der Myosinmotordomäne und ist an der Koordination des Nukleotids und Mg^{2+} beteiligt [Rayment *et al.*, 1993]. Basierend auf Mutationsstudien wurde eine Beteiligung des Schalter-2 an der Produktfreisetzung vorgeschlagen [Sasaki *et al.*, 1998]. In theoretischen Berechnungen wurde der Einfluss des Schalter-2 auf das Zurückschwingen des Hebelarms in die Ausgangsposition für einen neuen Kraftschlag, den sogenannten *recovery stroke*, gezeigt [Koppole *et al.*, 2007]. Der Schalter liegt in der offenen bzw. der geschlossenen Form vor. Während des Schließens dieses Schalters wird die Konformation der Relayhelix und damit verbunden die Rotation der Konverterdomäne geändert. Dies führt zum Zurückschwingen des Hebelarms in die Ausgangsposition des Kraftschlags [Koppole *et al.*, 2007].

*Dd*Myosin-2 ist durch eine niedrige *duty ratio* gekennzeichnet und wird nicht durch Mg^{2+} reguliert. Viele Myosine, die in Schalter-2 ein Tyrosin besitzen, wie beispielsweise *Dd*Myosin-5b und *Dd*Myosin-1E, werden durch Mg^{2+} -Ionen reguliert und weisen eine hohe *duty ratio* auf [Taft *et al.*, 2008, Diensthuber, 2009]. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass Schalter-2 in diesen Myosinen Einfluss auf die Produktdissoziation, Mg^{2+} -Sensitivität und die *duty ratio* hat. Dieses Verhalten konnte auch bei *Dd*Myosin-2 gezeigt werden [Diensthuber, 2009]. Der Austausch des S456 gegen ein Tyrosin führt bei Myosin-2 zu einer Mg^{2+} -sensitiven ADP-Dissoziation.

Des Weiteren wurde die ATP-Bindung um den Faktor drei verringert und die ATP-induzierte Dissoziation des Aktomyosinkomplex ist 20 fach reduziert. Die Mutation in Schalter-2 reduzierte auch die Geschwindigkeit des Motors in *in vitro* Motilitätsassay um den Faktor acht [Hartmann, 2009]. Dieser Effekt wurde auch in Experimenten mit einer korrespondierenden Mutante S456L in *Dd*Myosin-2 beobachtet [Murphy *et al.*, 2001]. Murphy *et al.* stellten die Hypothese auf, dass die gemessene reduzierte Motilität und die verringerte Schrittweite auf ein nicht vollständiges Schließen des Schalter-2 und einem daraus resultierend ein verringerten Kraftschlag basieren.

Um strukturelle Erklärungen für die kinetischen und funktionellen Veränderungen durch die Einführung der Mutation zu bekommen, wurde in dieser Arbeit die Kristallstruktur der Schalter-2-Mutante *Dd*Myosin-2- S456Y mit Mg^{2+} .ADP.VO₄ als Nukleotidanalogen gelöst. Diese Struktur repräsentiert den Zustand vor dem Kraftschlag und zeigt, ob sich Schalter-2 durch die Einführung des Tyrosins noch schließen kann.

3.3.1. Kristallisation der *DdMyosin-2 S456Y*-Mutante

Die Motordomäne der *DdMyosin-2 S456Y*-Mutante konnte als SSB-Fusionskonstrukt [Fedorov *et al.*, 2009] in 50 mM HEPES pH 7.4, 140 mM NaCl, 11 % MME-PEG 5000, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM EGTA und 2 % MPD im sogenannten „*sitting drop*“-Verfahren bei 5 °C als Mg²⁺.ADP.VO₄-Komplex in Zusammenarbeit mit Dr. Ralph Diensthuber kristallisiert werden.

Die zur Strukturaufklärung der *DdMyosin-2* Schalter-2 Mutante verwendeten Beugungsdaten wurden im Drehkristallverfahren bei tiefen Temperaturen gemessen. Es wurden zwei Datensätze eines Kristalls am ESRF in Grenoble von Dr. Roman Fedorov am Messplatz ID23-1 mit einer Wellenlänge von 1,00905 Å mit einer Auflösung von 2,4 Å aufgenommen und die erhaltenen Beugungsdaten mit dem Software-Paket XDS [Kabsch, 1993] bearbeitet. Die Kristalle konnten durch die Datenverarbeitung der zentriert orthorhombischen Raumgruppe C222₁ zugeordnet werden. In Tabelle 12 wird ein Überblick über die statistischen Parameter dieses Kristalls gegeben.

	Myosin-2-S456Y mit Mg ²⁺ .ADP.VO ₄
Raumgruppe	C222 ₁
Parameter der Einheitszelle a/b/c/ α/ β/ γ [Å bzw. °]	89,6/147,4/153,9/90/90/90
Wellenlänge [Å]	1,00905
Auflösung [Å]	2,4
gemessene Reflexionen	259557
einmalige Reflexionen	49256

Tab. 12: Überblick der Statistiken des Kristalls Myosin-2-S456Y mit Mg²⁺.ADP.VO₄ als Nukleotidanalogen

3.3.2. Aufklärung der Kristallstruktur der *DdMyosin-2 S456Y*-Mutante

Die Struktur der Motordomäne der *DdMyosin-2 S456Y*-Mutante im Komplex mit Mg²⁺.ADP.VO₄ konnte mittels Molekularen Ersatz mit der bereits existierenden Struktur von *DdMyosin-2* als Komplex mit Mg²⁺.ADP.VO₄ [PDB-Eintrag 1VOM von Smith *et al.* 1996] gelöst werden. Diese Methode wurde mit der Software „CCP4“ [Collaborative Computational Project, Number 4, 1994] und dessen Programm „ARP/wARP“ zur automatischen Erstellung

eines Strukturmodells ausgehend von den mit „XDS“ bearbeiteten Daten durchgeführt. Mit „ARP/wARP“ wurde aus den Beugungsdaten neben dem Strukturmodell eine Elektronendichtekarte generiert. Dieses Strukturmodell wurde mit dem Programm „CNS-Solve 1.2“ verfeinert (mittels der Programmtemplates „simulated annealing“ und „minimize“). Im Anschluss wurde die Elektronendichtekarte mit „ARP/wARP“ verfeinert. Unter Anwendung eines graphischen Computerprogramms [Coot 0.5.2, Emsley *et al.* 2004] wurde das aktuelle Strukturmodell anhand der berechneten Elektronendichtekarte verfeinert. Zum Schluss wurden mit dem Programm „SHELXL“ [Sheldrick und Schneider, 1997; Sheldrick, 2008] Wassermoleküle in die Struktur eingefügt und die Geometrie der Aminosäuren mittels des Ramachandran-Plots überprüft und gegebenenfalls optimiert.

Durch die Verfeinerungszyklen konnten der kristallographische R-Faktor und der freie R-Faktor in dem Auflösungsbereich von 8-2,4 Å von 29,18 % bzw. 33,82 % auf 19,85 % bzw. 24 % verbessert werden. Die R-Faktoren waren von Beginn an gut, da das für den molekularen Ersatz verwendete Modell in der Aminosäuresequenz bis auf eine Aminosäure identisch zu der Mutante ist. In der folgenden Tabelle sind die statistischen Eigenschaften der Struktur nach der abschließenden Verfeinerung dargestellt.

	Myosin-2-S456Y mit Mg ²⁺ .ADP.VO ₄
Auflösungsbereich [Å]	8-2,4
Anzahl der Aminosäuren	693
Anzahl der Proteinatome	5542
Anzahl der Wassermoleküle	324
R/R _{free} [%]	19,85/24
Abweichung rmsd Bindungen [Å]	0,008658
Abweichung rmsd Winkel [°]	1,373

Tab. 13: Überblick der Statistiken der Verfeinerung der Myosin-2-S456Y-Struktur mit Mg²⁺.ADP.VO₄ als Nukleotidanalogen

Die Endstruktur (siehe Abbildung 33) beinhaltet 5542 Atome (ohne Wasserstoffatome), diese entsprechen den Aminosäuren 2-693 der Motordomäne der DdMyosin-2 S456Y-Mutante, sowie 324 Wassermoleküle, ein Magnesiumion, ein ADP-Molekül und ein Vanadat-Ion. Die Konverterregion der Motordomäne konnte aufgrund sehr lückenhafter Elektronendichten nicht aufgelöst werden.

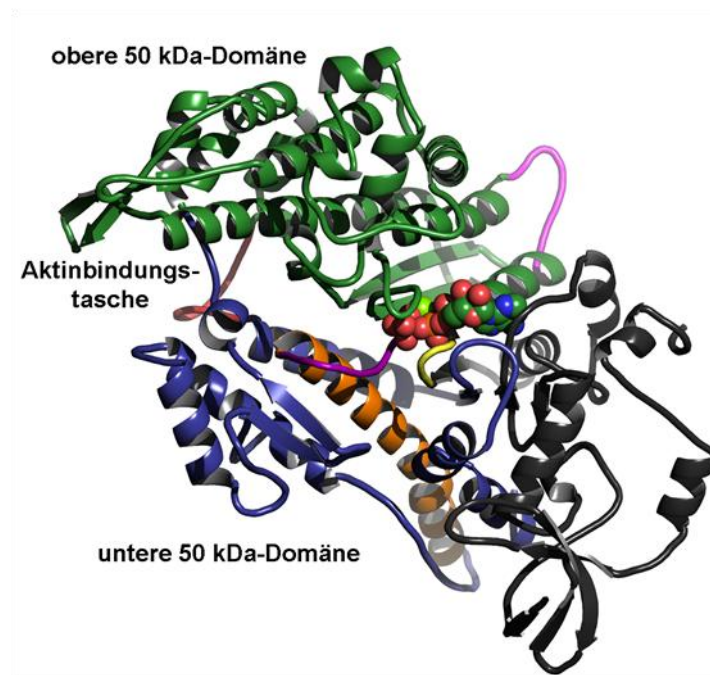


Abb. 34: Überblick der Struktur der Motordomäne von *DdMyosin-2* S456Y im Komplex mit Mg·ADP·VO₄, dargestellt ist die obere 50 kDa-Domäne in grün, die untere 50 kDa-Domäne in blau, die Relayhelix in orange, Schleife-1 in Magenta, Schleife-2 in rot, Schalter-2 in violett und die Phosphatbindungsschleife in gelb.

3.3.3. Vergleich der Kristallstruktur von *DdMyosin-2-S456Y* mit *DdMyosin-2*

Die Struktur der *DdMyosin-2* S456Y-Mutante repräsentiert mit gebundenen Mg²⁺·ADP·VO₄ wie die Struktur des *DdMyosin-2* Wildtyps [Smith *et al.*, 1996] den Übergangszustand der ATP-Hydrolyse in der Konformation vor dem Kraftschlag (siehe Abbildung 35). Die Konformation vor dem Kraftschlag zeichnet sich durch eine nahezu geschlossene Aktinbindungsregion, durch die geschlossene Konformation des Switch-2 und einer geknickten Relay-Helix aus (siehe Abbildung 35).

Das Vanadat-Ion ahmt in diesem Komplex durch seine trigonal bipyramidale Koordination die Konformation des γ -Phosphats für den Phosphoryltransfer während des Übergangszustands nach. Da es gleichzeitig als Inhibitor der ATPase-Aktivität wirkt [Goodno, 1979], konnte ein langlebiger Myosin. Mg²⁺·ADP·VO₄ -Komplex ausgebildet werden, der kristallisiert werden kann.

Im Vergleich mit der Wildtypstruktur der *DdMyosin-2*-Motordomäne mit gebundenem Mg²⁺·ADP·VO₄ weist die S456Y-Mutante keine großen globalen Veränderungen in der

Struktur auf. Es sind vor allem lokale Änderungen ausgehend von der Mutation zu erkennen. Allgemein ist auffällig, dass in der Wildtypstruktur die Konverterdomäne bis Arg747 aufgelöst werden konnte, während hingegen die Struktur der Mutante nur bis Pro693 gelöst wurde. In der Kristallstruktur der S456Y-Mutante wurde jedoch die Konformation der Schleife-1 (Ala200 - Val210) aufgelöst, in der Wildtypstruktur ist der Bereich von Ala204 - Ser208 delokalisiert.

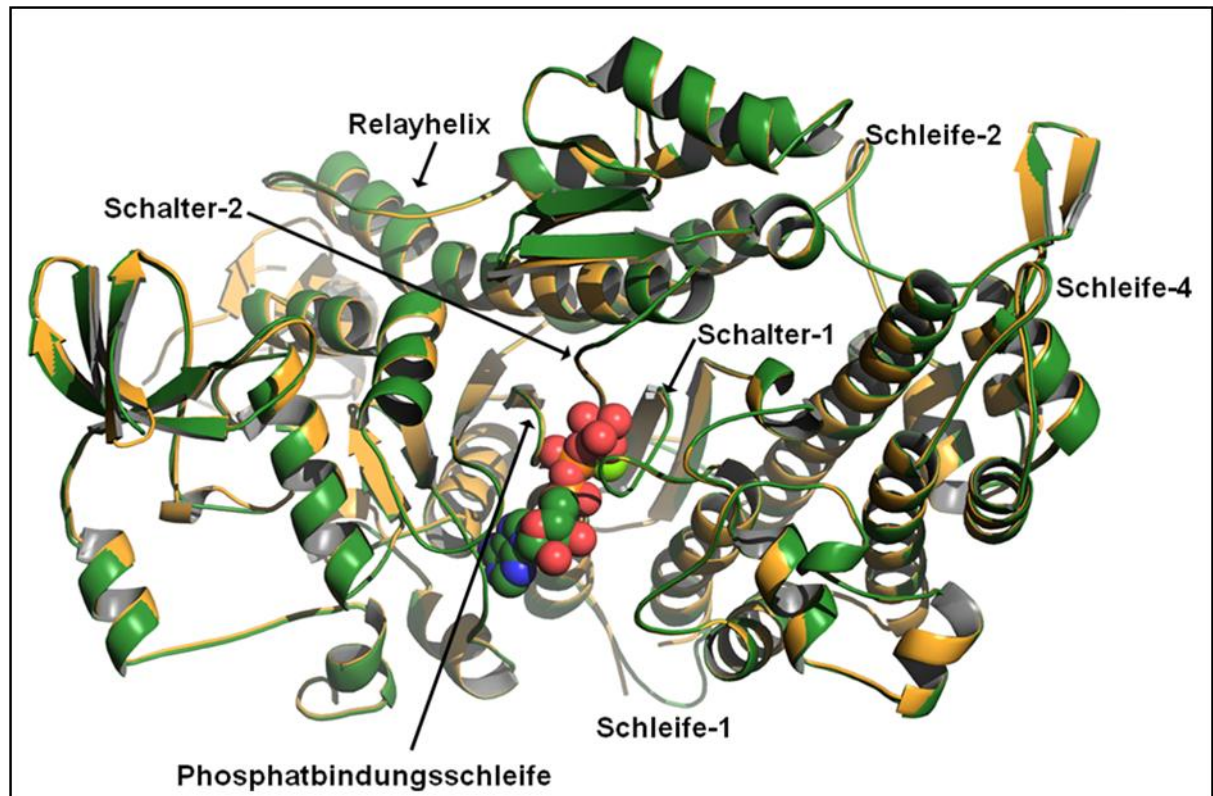


Abb. 35: Überblick der Motordomänen *Dd*-Myosin-2-S456Y (grün) im Vergleich mit *Dd*-Myosin-2 (gelb) [Rayment, 1996, PDB-Eintrag 1VOM] mit gebundenem Mg·ADP·VO₄

Die größten lokalen Änderungen sind in der Nähe der S456Y-Mutation zu erkennen (siehe Abbildung 36). Die eingeführte Aminosäure Tyrosin besitzt eine wesentliche größere Seitenkette als Serin, führt jedoch nicht zu einer Beeinflussung der C_α-Kette des Schalter-2. Das eingeführte Tyrosin belegt den Raum zwischen den Aminosäuren Phe239, Leu262, Ile471 und Tyr634 (siehe Abbildung 36). Das native Serin bildet mit Ser237 eine Wasserstoffbrückenbindung aus, diese fehlt aufgrund der anderen Orientierung des eingeführten Tyrosins. Diese fehlende Wasserstoffbrückenbindung führt zu einer Destabilisierung der Konformation des Ser237, dass an der Koordination des Magnesiumions in der Nukleotidbindungstasche beteiligt ist. Dadurch ist auch die Bindung und Koordination aber nicht die Position des Magnesiumions beeinflusst.

Der große Phenylring führt jedoch zu einer Verschiebung des Leu262, das Peptidrückgrat ist um 0.8 Å und dessen Seitenkette um 2.5 Å in Richtung der Aktinbindungsregion verschoben, so dass die Entfernung zum Nukleotid größer wird.

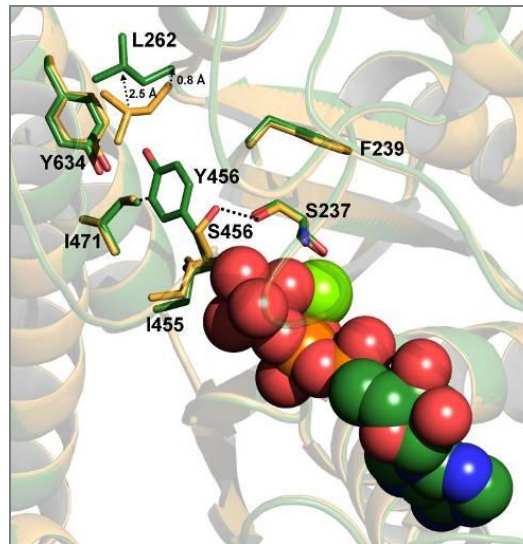


Abb. 36: Umgebung der Mutation S456Y im Vergleich zum Wildtyp. Die Mutante ist in dunkelgrün dargestellt, der Wildtyp in gelb.

Leu262 befindet sich am C-terminalen Ende des β 7-Faltblatts. In der Struktur des Wildtyps interagiert Leu262 indirekt über ein Wassermolekül mit Gln637 in einer räumlich benachbarten Helix. In der Struktur der Mutante existiert dieses Wassermolekül an dieser Position aufgrund der Verschiebung des Leu262 nicht mehr und Gln637 und Leu262 interagieren nicht miteinander. Daraus resultiert eine Konformationsänderung der Seitenkette des Gln637 in die Richtung der Schleife-2, diese ruft wiederum eine Neuorientierung des in der Helix benachbarten Glu636 hervor. Glu636 weist ionische Wechselwirkungen mit Lys623 in Schleife-2 auf. Diese ionischen Wechselwirkungen werden durch die Neuorientierung des Glu636 beeinflusst und verändern die Konformation der Schleife -2. Vor allem ist die Peptidkette der Aminosäuren Lys622, Lys623, Gly624 und Ala625 beeinflusst. Diese wird um 0.5-1 Å verschoben.

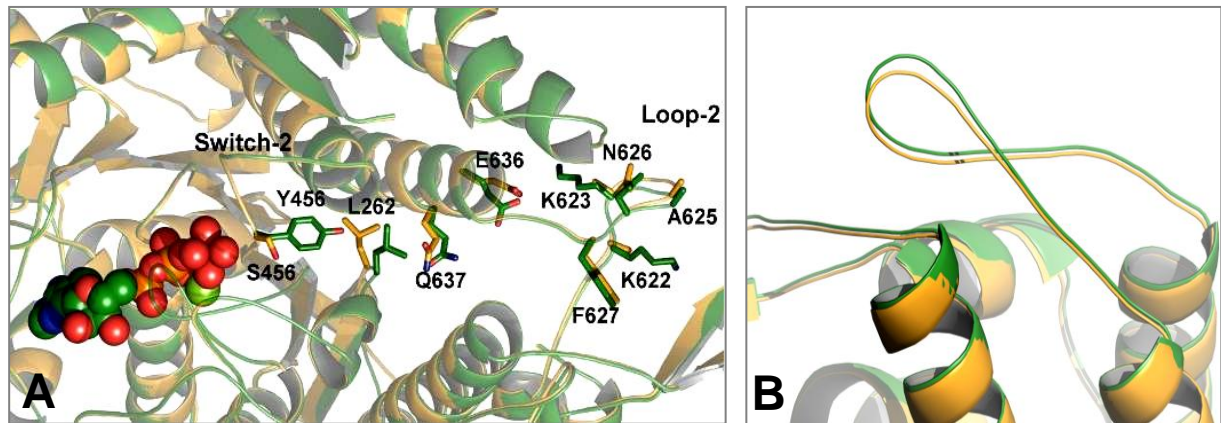


Abb. 37: Myosin-2 Wildtyp (gelb) und Myosin-2 S456Y-Mutante (grün), (A) Darstellung der Auswirkungen der Einführung des Tyrosins in Schalter-2 bis zu Schleife-2, (B) zeigt die Verschiebung von Schleife-4 in der S456Y-Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp

Die Mutation in der Schalter-2-Region hat nicht nur Einfluss auf Schleife-2 der Aktinbindungsregion sondern auch auf Schleife-4 (Gly362 - Gly366). Schleife-4 ist wie Schleife-2 ein Teil der Aktinbindungsregion und spielt eine wichtige Rolle in der Stabilisierung des Akto.Myosin-Komplexes [Gyimesi *et al.*, 2008]. Das Peptidrückgrat der Aminosäuren Gly362, Gly364, Glu365 und Gly366 ist um 0.8 Å verschoben, das Peptidrückgrat von Ala363 um 1.8 Å nach außen verschoben (siehe Abbildung 37).

3.3.4. Kristallstruktur der Myosin-2 S456Y-Mutante im Komplex mit ADP.BeF_x

Um konkretere Aussagen über die durch die Einführung des Tyrosins strukturellen Auswirkungen treffen zu können und die kinetischen und funktionalen Veränderungen detailliert erklären zu können, wurde zusätzlich die in der RCSB Protein Data Bank veröffentlichte Struktur dieser Mutante im Komplex mit Mg²⁺.ADP.BeF_x [PDB 1W9I] herangezogen. Diese Struktur repräsentiert im Gegensatz zu der in dieser Arbeit gelösten Struktur die Konformation der Myosinmotordomäne nach dem Kraftschlag und gibt neue Einblicke in die durch die Mutation hervorgerufenen funktionalen und kinetischen Veränderungen.

Die Einführung des Tyrosins in Schalter-2 in der Mg²⁺.ADP.BeF_x-Konformation ruft andere Veränderungen in der näheren Umgebung der Mutation hervor als in der Mg²⁺.ADP.VO₄-Konformation. Die Ursache liegt in den unterschiedlichen Konformationen des Schalter-2 in

diesen Strukturen. In der hier vorliegenden offenen Konformation wird die C_α-Kette der Aminosäuren I455-E459 des Schalter-2 durch die Einführung des Tyrosins um bis zu 1,8 Å verschoben, der Schalter ist nicht vollständig geöffnet (Abbildung 38). Auffällig ist, dass durch die Verschiebung nicht die Position des Nukleotids beeinflusst ist, aber die des Magnesiumions. Das Magnesiumion ist leicht in Richtung des Nukleotids verschoben. In der offenen Form des Schalter-2 hat das eingeführte Tyrosin mehr Raum, so dass keine Verschiebung des Leucin 262 aufgrund sterischer Hinderung wie in der Myosin-2 Struktur in Komplex mit Mg²⁺.ADP.VO₄ auftritt (siehe Abbildung 36 und 38). Der Abstand des Tyrosins456 zum Leucin 262 ist 5 Å.

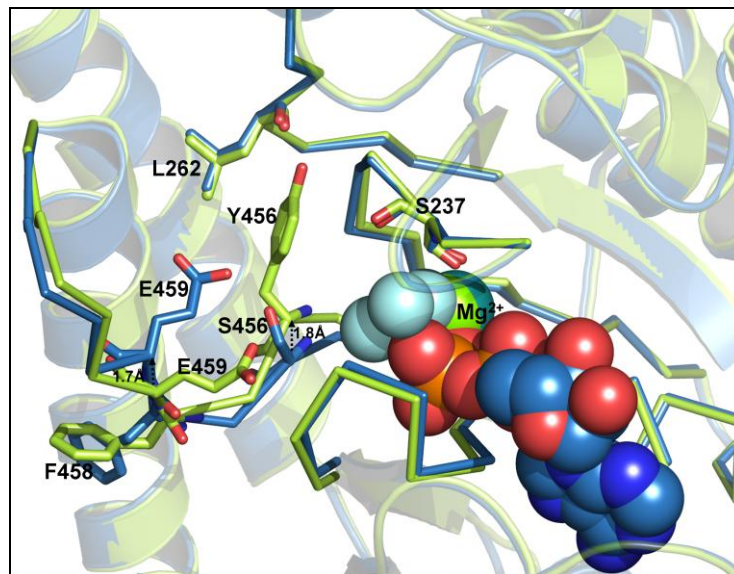


Abb. 38: Umgebung der Mutation S456Y in Komplex mit Mg²⁺.ADP.BeF_x (Limone) im Vergleich zum Wildtyp (blau).

Durch die Mutation ist der Schalter-2 nicht vollständig geöffnet. Diese neue Konformation des Schalters spiegelt sich auch in der Relayhelix wider. Vor dem Kraftschlag knickt die Relayhelix zum C-terminalen Ende hin ab während die Helix nach dem Kraftschlag gerade ist. In der Struktur der S456Y-Mutante in Komplex mit Mg²⁺.ADP.BeF_x knickt die Relayhelix auch leicht ab und nimmt, wie der Schalter-2, eine Konformation ein, die nicht der vor dem Kraftschlag entspricht. Beide Strukturelemente nehmen eine Art „Zwischenkonformation“ ein (siehe Abbildung 39)

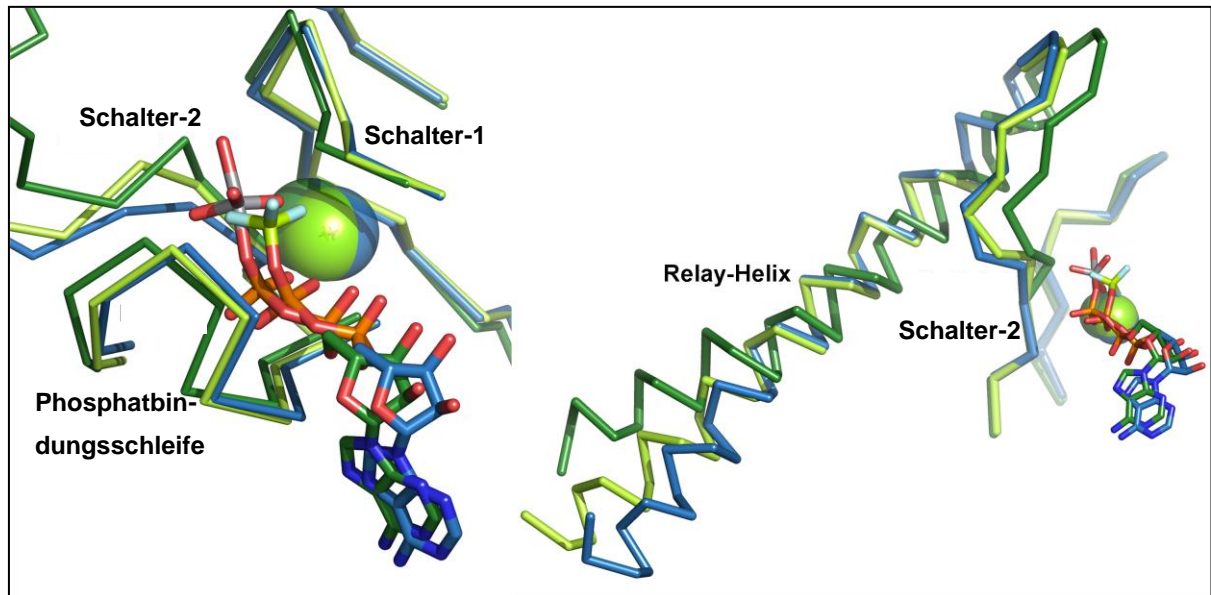


Abb. 39: Schalter-2 und Relayhelix der S456Y-Mutante in Komplex mit Mg^{2+} .ADP.BeF_x (Limone) und in Komplex Mg^{2+} .ADP.VO₄ (dunkelgrün) im Vergleich zum Wildtyp im Komplex mit Mg^{2+} .ADP.BeF_x (blau).

Im Vergleich der Strukturen der S456Y-Mutante und des Wildtyps in Komplex mit Mg^{2+} .ADP.VO₄ sind auch Unterschiede in der Aktinbindungsregion durch die Mutation entstanden. Diese Beeinflussungen sind teilweise auch in den Strukturen in Komplex mit Mg^{2+} .ADP.BeF_x wiederzufinden. Zu Veränderungen in Schleife-2 können keine Aussagen gemacht werden, da diese nur in der Struktur der Schalter-2-Mutante aufgelöst ist. Genauso wie bereits in den anderen Kristallstrukturen diese Mutante beobachtet, ist die Konformation der Schleife-4 beeinflusst. Dieser ist im Gegensatz zum Wildtyp um bis 2,9 Å verschoben (siehe Abbildung 40). Zusätzlich sind in der Konformation mit Mg^{2+} .ADP.BeF_x die CM-Schleife und das Helix-Schleife-Helix-Motiv der Aktinbindungsregion durch die Mutation verändert. Die Schleife (Val534-Ala538) des Helix-Schleife-Helix-Motivs ist um 3-4 Å verschoben (siehe Abbildung 40). Auch Gly401 der CM-Schleife ist um 3 Å verschoben (Abbildung 40).

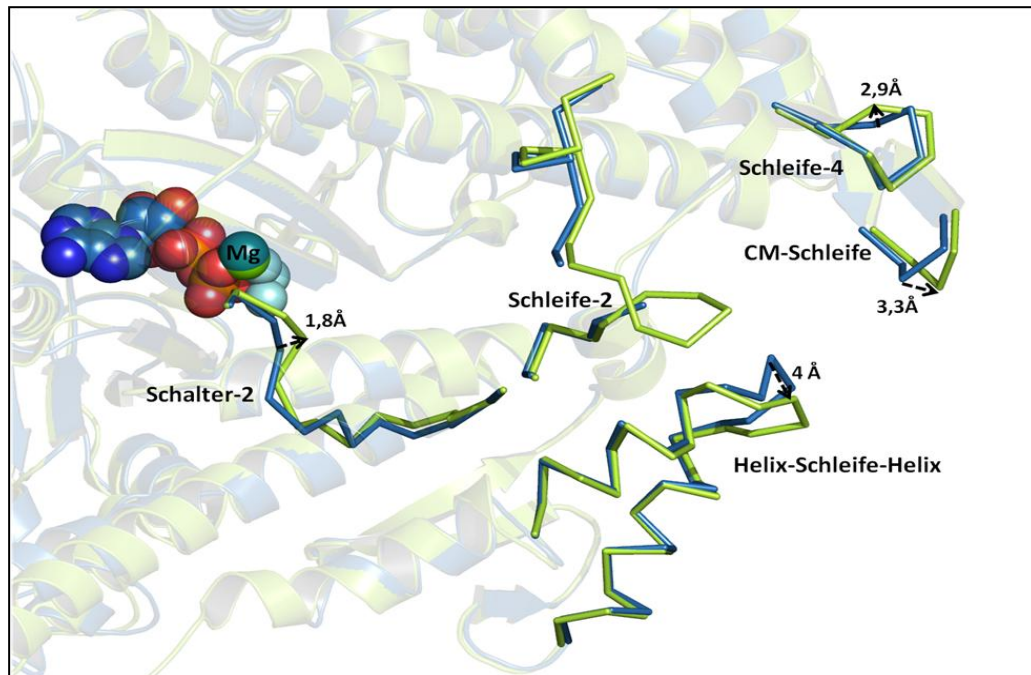


Abb. 40: Schleife-2, Schleife-4, Helix-Schleife-Helix-Motiv, CM-Schleife und Schalter-2 der Mg^{2+} .ADP.BeF_x DdMyosin-2-Struktur (blau) und der Mg^{2+} .ADP.BeF_x DdMyosin-2 S456Y-Mutante (limone)

3.3.5. B-Faktoren-Analyse der Myosin-2 Wildtypstrukturen und deren Schalter-2-Mutanten

Die Verteilung der B-Faktoren innerhalb einer Proteinstruktur ermöglicht Aussagen über Flexibilitäten und Dynamiken des Proteins. In diesem Fall wurden die normierten B-Faktoren der Kristallstrukturen analysiert, um Auswirkungen der Mutation in Schalter-2 von Myosin-2 auf die Bewegungsfreiheit der Aminosäuren verschiedener Domänen der Myosinmotordomäne zu untersuchen. Dafür wurden jeweils Wildtyp und Mutante in der Konformation vor und nach dem Kraftschlag gegenübergestellt (siehe Abbildung 41).

In allen analysierten Strukturen weisen Aminosäuren in Oberflächenregionen der Motordomäne, wie beispielsweise die Oberflächenschleifen Schleife-1 und Schleife -2, höhere B-Faktoren auf als Aminosäuren im Innern der Motordomäne. Die hohen B-Faktoren zeigen die größere Bewegungsfreiheit dieser Aminosäuren. Im Falle von Schleife-1 in Konformation nach dem Kraftschlag, ist die Flexibilität der Aminosäuren der Schleife zu groß, um die Konformation der Schleife mittels Röntgenstreuungsexperimenten aufzulösen (Abbildung

41D). Das Innere der Motordomäne besteht hauptsächlich aus hochgeordneten Sekundärstrukturen wie β -Faltblätter und α -Helices. Diese hochgeordneten Strukturen sind durch beispielsweise hydrophobe Interaktionen oder Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert und in ihrer Bewegungsfreiheit eingeschränkt. Dies spiegelt sich in den niedrigeren B-Faktoren wider (siehe Abbildung 41).

Auffällig ist, dass im direkten Umfeld der Mutation weder in der Konformation vor noch in der Konformation nach dem Kraftschlag sich die B-Faktoren kaum verändern. Die strukturellen Betrachtungen zeigten bereits, dass die Einführung des Tyrosins in Schalter-2 nicht zu großen Konformationsänderungen in der näheren Umgebung führt und keine Sekundärstrukturen zerstört. Daraus resultierend ändern sich auch die B-Faktoren nicht. Jedoch hat der Austausch dieser einen Aminosäure entscheidende Auswirkungen auf weiter entfernte Regionen in der Myosinmotordomäne.

Im Vergleich der Konformationen vor und nach dem Kraftschlag ist zu erkennen, dass sowohl in den Wildtypstrukturen als auch in den S456Y-Strukturen das C-terminale Ende der Relayhelix höhere B-Faktoren aufweist als die N-terminale Hälfte der Relayhelix. Der C-terminale Teil der Helix ist daher flexibler als das N-terminale Ende. Weiterhin sind die B-Faktoren des C-terminalen Teils der Relayhelix nach dem Kraftschlag höher als vor dem Kraftschlag. Die Mutation in Schalter-2 wirkt sich unterschiedlich auf die Relayhelix aus. In der Konformation vor dem Kraftschlag sind die B-Faktoren am C-terminalen Ende der Helix der Mutante etwas niedriger als in der Wildtypstruktur. Folglich wird die Bewegungsfreiheit der Relayhelix eingeschränkt. In der Konformation nach dem Kraftschlag wirkt sich die Mutation gegenteilig aus. Die B-Faktoren sind durch die Mutation in Schalter-2 am C-terminalen Ende der Relayhelix im Gegensatz zum Wildtyp deutlich erhöht, folglich die Mobilität verstärkt. Diese Beobachtung ergänzt sich mit denen der strukturellen Analyse der Mg^{2+} .ADP.BeF_x-Konformation. Durch die Einführung des Tyrosins in Schalter-2 nimmt die Relayhelix keine gerade Konformation an, sondern bleibt leicht geknickt. Die Helix nimmt eine Konformation zwischen der vor und nach dem Kraftschlag ein. Dies ist möglich durch die größere Bewegungsfreiheit des C-terminalen Endes der Relayhelix.

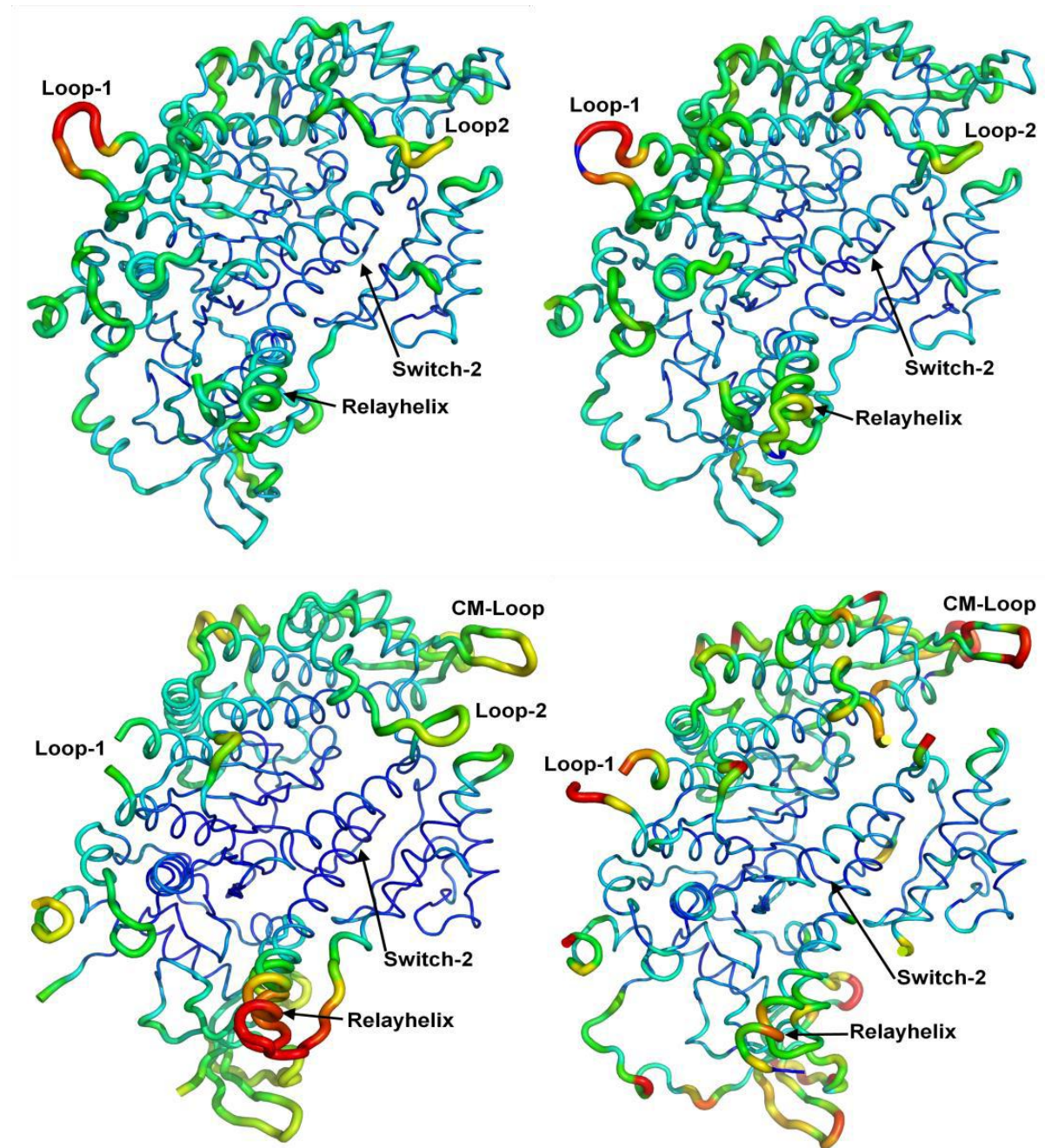


Abb. 41: Darstellung der normierten B-Faktoren. (A) Myosin-2-S456Y im Komplex mit Mg^{2+} .ADP.VO₄, (B) Myosin-2-Wildtyp im Komplex mit Mg^{2+} .ADP.VO₄, (C) Myosin-2-S456Y im Komplex mit Mg^{2+} .ADP.BeF_x, (D) Myosin-2-Wildtyp im Komplex mit Mg^{2+} .ADP.BeF_x. Blau repräsentiert niedrige B-Faktoren, rot hohe B-Faktoren.

4. DISKUSSION

4.1. Struktur-Funktionsanalysen geben Einblicke in die Funktionsweise von Schleife-2

Schleife-2 der Myosinmotordomäne vermittelt die erste schwache Bindung an das Aktinfilament. Dabei gehen positiv geladene Aminosäuren der Schleife-2 elektrostatische Wechselwirkungen mit negativ geladenen Aminosäuren am N-Terminus der Aktinuntereinheit ein. Es wurde bereits gezeigt, dass eine Erhöhung der Nettoladung in dieser Oberflächenschleife die schwache Bindung an Aktin verstärkt und eine Erniedrigung der Nettoladung zu einer Schwächung der Aktinaffinität führt [Furch *et al.*, 1998 und 2000; Joel *et al.*, 2001 und 2003; Yengo *et al.*, 2004; Onishi *et al.*, 2006]. Die Ergebnisse aus den Mutationsstudien mit verschiedenen Myosinen zeigten jedoch unterschiedliche Auswirkungen auf die maximale Geschwindigkeit der Aktin-aktivierten ATPase der einzelnen Motoren. So wurde durch Erhöhung der Nettoladung in Schleife-2 in *DdMyosin-2* bei einer gleichzeitigen Verlängerung der Sequenz von Schleife-2 sowohl die Aktinaffinität als auch die maximale Geschwindigkeit der Aktin-aktivierten ATPase erhöht [Furch *et al.*, 1998]. Eine Erhöhung der Maximalgeschwindigkeit durch Einführung zusätzlicher positiver Ladungen in Schleife-2 wurde jedoch nicht für *GgMyosin-5* und *smHMM* beobachtet [Yengo *et al.*, 2004; Joel *et al.*, 2001 und 2003]. In diesen Studien wurde zum einen eine Erhöhung der Affinitäten zu Aktin beobachtet und zum anderen konnte gezeigt werden, dass die Geschwindigkeit der ADP-Freisetzung aus dem Akto-Myosin-Komplex durch die eingeführten positiven Aminosäurereste verringert wurde.

Um zu untersuchen, ob die beobachteten Unterschiede auf der Zugehörigkeit der Klasse und der damit verbunden unterschiedlichen Motoreigenschaften der Myosine beruhen oder durch die Länge, Position der Ladungen, und Gesamtnettoladung der Schleife-2 beeinflusst werden, wurde in dieser Arbeit die native Schleife-2 des *DdMyosin-5b* durch das „K6“-Motiv (FNDPNIGKKGAR(GKK)₅GRAQKGAN) aus den Schleife-2-Studien an *DdMyosin-2* von Furch *et al.*, 1998 ersetzt. Anhand beider Myosinmotordomänenkonstrukte mit identischer Schleife-2 aber unterschiedlichen kinetischen und funktionellen Eigenschaften sollte gezeigt werden, wie sich die Mutationen auf die Kopplung zwischen den Aktin- und ADP-Bindungszuständen auswirken, um Aussagen über die Rolle von Schleife-2 als ein Struktur-

element zur Steuerung prozessiven und nicht-prozessiven Verhaltens in einzelnen Myosinklassen und Myosinisoformen zu treffen

4.1.1. Änderungen der Nettoladung in Schleife-2 wirken sich auf die maximale ATPase-Geschwindigkeit von *DdMyosin-5b* und *DdMyosin-2* aus

Der Einfluss der Änderungen der Nettoladung der Schleife-2 auf die Aktin-aktivierte ATPase und deren Maximalgeschwindigkeit unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Myosinisoformen (siehe Tabelle 14). Durch eine Erhöhung der Nettoladung wurde in allen untersuchten Myosinisoformen K_{app} erniedrigt, unabhängig von der Aktinaffinität des Wildtyps.

Myosin	k_{cat} (s ⁻¹)	K_{app} (μM)
<i>DdMyosin-5b</i> * (+3)	11,6 ± 0,8	27 ± 7
<i>DdMyosin-5b-K6</i> (+14)	6,5 ± 0,5	13,7 ± 3
<i>DdMyosin-2</i> [§] (+2)	2,6 ± 1	102 ± 20
<i>DdMyosin-2-Q532E-K6</i> (+14)	3,8 ± 0,5	4,7 ± 0,9
<i>GgMyosin-5</i> [#] (+5)	14,1 ± 1,1	2,2 ± 0,6
<i>GgMyosin-5-AAA</i> [#] (+2)	13,6 ± 1	8,8 ± 1,4
<i>GgMyosin-5-DEEK</i> [#] (+7)	12,7 ± 0,3	0,6 ± 0,1
<i>smHMM</i> [§] (+3)	6,5 ± 0,4	48 ± 5
<i>smHMM +3K</i> [§] (+6)	6,3 ± 0,2	3,3 ± 0,4

* Taft *et al.*, 2007, § Furch *et al.*, 1998; # Yengo *et al.*, 2004, § Joel *et al.*, 2003

Tab. 14: Parameter der ATPase-Aktivität

Jedoch zeigen die verschiedenen Myosinisoformen unterschiedliche Effekte durch die Erhöhung der Nettoladung in der maximalen Aktin-aktivierten ATPase-Geschwindigkeit k_{cat} . k_{cat} wurde in *GgMyosin-5a* und *smHMM* kaum durch die Mutation beeinflusst. In *DdMyosin-2* wurde k_{cat} durch die Einführung 12 positiver Ladungen erhöht, in *DdMyosin-5b* hingegen durch die Einführung des gleichen Sequenzmotivs erniedrigt (siehe Tabelle 14). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Einflüsse auf die maximalen Geschwindigkeiten der Aktin-aktivierten ATPase nicht in allen Myosinisoformen gleich sind. Auffällig ist, dass in Myosinen

mit einer höheren Aktinaffinität keine Beschleunigung der maximalen Geschwindigkeit durch die Erhöhung der Nettoladung in Schleife-2 erreicht wird.

4.1.2. Schleife-2 zeigt unterschiedliche Funktionen in Bezug auf den Kopplungsmechanismus von *DdMyosin-2* und *DdMyosin-5*

In früheren Studien mit *GgMyosin-5* wurde gezeigt, dass durch eine Erhöhung der Nettoladung in Schleife-2 die Aktinaffinität in Anwesenheit von ADP K_{DA} um den Faktor 5 gestärkt wird. Die Aktinbindung in Abwesenheit von ADP ist sehr schnell und erreicht die durch Diffusion limitierte Geschwindigkeit der Bindung [De La Cruz *et al.*, 1999], daher wird die Geschwindigkeit durch eine weitere Erhöhung der positiven Ladungen in Schleife-2 nicht signifikant erhöht [Yengo *et al.*, 2004].

In *DdMyosin-5b-K6* wurde durch die Erhöhung der Ladung in Schleife-2 durch die Einführung des „K6-Motivs“ die Affinität zu Aktin sowohl in An- wie auch in Abwesenheit von ADP erhöht. Die Affinitätskonstante in Abwesenheit von ADP (K_A) war von 20 nM auf 0,2 nM gesunken und in Anwesenheit von ADP (K_{DA}) um den Faktor 37 von 38,5 nM auf 1,03 nM erniedrigt. Die transientenkinetischen Messungen mit der analogen Mutation in *DdMyosin-2* zeigten ebenfalls einen Anstieg der Aktinaffinitäten in An- und Abwesenheit von ADP. So wurde K_A durch die Einführung des „K6“-Motivs von 4,5 nM auf 0,02 nM 225fach erhöht, die Affinität in Anwesenheit von ADP K_{DA} wurde um den Faktor 500 von 79,5 nM auf 0,16 nM erhöht. Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass das Ersetzen der Schleife-2 durch ein positiv geladenes künstliches Strukturmotiv unterschiedlich starke Auswirkungen auf die Aktinaffinitäten der beiden Myosine hat. Darüber hinaus wurden entgegengesetzte Auswirkungen in Bezug auf die Kopplung zwischen den Aktinbindungs- und ADP-Bindungszuständen bei den einzelnen Myosinen beobachtet. Ein Maß für dieses Kopplungsverhalten stellt das Verhältnis der Gleichgewichtskonstanten zwischen den Aktin-gebundenen Zuständen des Myosins in An- und Abwesenheit von Nukleotid (K_{DA}/K_A) bzw. den Nukleotidzuständen in An- und Abwesenheit von Aktin (K_{AD}/K_D). Die Größe des Verhältnisses, welches Werte zwischen <1 , 1 und >1 annehmen kann, bestimmt die Stärke der Kopplung und damit die Eigenschaften des Motors nukleotidabhängig auf die Aktininteraktion zu reagieren. Die Kopplung in *DdMyosin-5b* wird durch die Mutation von $K_{DA}/K_A = 1,9$ auf $K_{DA}/K_A = 5,1$ leicht verstärkt. *DdMyosin-2-K6* zeigt einen Wert für K_{DA}/K_A von 8 welcher 2-fach niedriger ist als der Wert,

welcher für das Wildtyp-Myosin bestimmt wurde. Beide Mutanten zeigen demnach sehr ähnliches Kopplungsverhalten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Gleichgewichtskonstante K_{DA} , wie bereits erwähnt, unterschiedlich in den Myosinen verändert ist.

Die Erhöhung der Nettoladung in der Schleife-2 beeinflusst zusätzlich die ADP-Dissoziation aus dem Aktomyosinkomplex k_{AD} in verschiedenen Myosinisoformen. In allen Isoformen wurde eine langsamere ADP-Dissoziation aus dem Aktomyosinkomplex gemessen. In GgMyosin-5a war dieser Effekt mit einer Verringerung von 15 s^{-1} auf 12 s^{-1} sehr gering [Yengo *et al.*, 2004]. In DdMyosin-5b wurde durch die Einführung des „K6“-Motivs k_{AD} von $21,6\text{ s}^{-1}$ um den Faktor zwei auf $10,6\text{ s}^{-1}$ verringert. Im Falle von DdMyosin-5b, einem prozessiven Myosin ist k_{AD} der geschwindigkeitslimitierende Schritt des ATPase-Zyklus [Taft *et al.*, 2008]. Durch die Erhöhung der Nettoladung in Schleife-2 um +12 wird dieser limitierende Schritt verlangsamt. Daraus resultierend ist auch die maximale Aktin-aktivierte ATPase-Geschwindigkeit k_{cat} dieser Mutante reduziert (siehe 4.1.1). Diese beiden Eigenschaften der Mutante spiegeln sich in der reduzierten Geschwindigkeit im *in vitro* Motilitätsassay wider [Hartmann, 2009].

Der größte Effekt einer Erhöhung der Nettoladung in Schleife-2 wurde für die korrespondierende DdMyosin-2-K6-Mutante gemessen. k_{AD} wurde von 138 s^{-1} auf $17,6\text{ s}^{-1}$ verringert. In DdMyosin-2 ist k_{AD} nicht der geschwindigkeitslimitierende Schritt des ATPase-Zyklus und die verlangsamte Dissoziationsgeschwindigkeit des ADP von Akto.Myosin führt daher nicht zu einer Verringerung der maximalen Aktin-aktivierten ATPase-Geschwindigkeit wie in DdMyosin-5b.

Für DdMyosin-5b-K6 und DdMyosin-2-K6 wurde k_{+AD} , die Bindungskonstante von ADP an Akto.Myosin ermittelt, um K_{AD} , die Affinität von Akto.Myosin zu ADP, berechnen zu können. Daraus resultierend sollten weitere Aussagen über die Kopplung der ADP-Affinität an die Aktinbindung getroffen werden können. k_{+AD} wurde sowohl in DdMyosin-2 als auch in DdMyosin-5b durch die Einführung des „K6“-Motivs um den Faktor 2 bzw. Faktor 4 beschleunigt. DdMyosin-5b-K6 zeigt eine verringerte Affinität von $K_{AD} = 8,8\text{ nM}$, DdMyosin-2 jedoch eine deutlich erhöhte Affinität. K_{AD} wurde durch die Einführung des „K6“-Motivs von 182 nM auf 44 nM verringert.

Die Kopplung der ADP-Affinität an die Aktinbindung kann über den Quotienten K_{AD}/K_D ermittelt werden. Die in dieser Arbeit analysierten Schleife-2 Mutanten mit einer identischen Schleife-2 zeigen unterschiedliche Auswirkungen auf die Kopplung. DdMyosin-5b weist eine schwache Kopplung auf ($K_{AD}/K_D = 1$), die durch die Einführung des „K6“-Motivs nicht ver-

ändert wurde ($K_{AD}/K_D = 0,9$). *DdMyosin-2* weist mit $K_{AD}/K_D = 114$ eine sehr starke Kopplung auf, die durch Modifikation der Schleife-2 um den Faktor 4 ($K_{AD}/K_D = 26$) geschwächt wurde. Die Erhöhung der Nettoladung durch die Einführung der gleichen Aminosäuresequenz in Schleife-2 hatte keinen Einfluss auf die schwache Kopplung K_{AD}/K_D von *DdMyosin-5b*, jedoch schwächte diese die starke Kopplung in *DdMyosin-2* ab.

Diese Änderungen der Kopplung der ADP-Affinität an die Aktinbindung als auch der Aktinaffinität an die ADP-Bindung in *DdMyosin-2* und *DdMyosin-5b* deuten an, dass positive Ladungen in Schleife-2 eine stärkere Kopplung in nicht-prozessiven Myosinen hervorrufen als in prozessiven Myosinen.

Diese Beobachtungen bestätigen die strukturellen Betrachtungen, dass eine Kommunikation zwischen der Aktinbindungsregion und der Nukleotidbindungstasche besteht [Geeves und Holmes, 1999; Houdusse und Sweeney, 2001]. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Modifikationen der Schleife-2 nicht nur die Aktinbindungseigenschaften verändert werden, sondern auch die Kopplung der ADP- und Aktinbindung zu einander. Eine schwache Kopplung der ADP/Aktin-Bindung ist eine Eigenschaft prozessiver Myosine [De La Cruz *et al.*, 1999; Rosenfeld und Sweeney, 2004]. Dies legt Nahe, dass Modifikationen der Nettoladung in Schleife-2 auch Einfluss auf die Prozessivität von Myosinen haben. Die Experimente von Hodges *et al.*, 2007 in denen eine Erhöhung der Nettoladung in Schleife-2 die Laufweite des prozessiven GgMyosin-5a verlängerte, unterstützen diese These.

4.1.3. Die Kristallstruktur von *DdMyosin-5b-K6-2R* zeigt die Motordomäne von *Dictyostelium Myosin-5b* in einer *rigor-like* Konformation

Es sind drei Kristallstrukturen der Motordomäne von GgMyosin-5a in der Literatur bekannt, die wesentliche Einblicke in die Funktionsweise prozessiver Myosinmotoren geben und experimentelle Ergebnisse aus funktionellen Untersuchungen strukturell erklären (Coureux *et al.* 2003, 2004). Mitglieder der Myosin-5 Klasse aus verschiedenen Organismen und Isoformen zeigen jedoch zum Teil sehr unterschiedliche kinetische Eigenschaften, die nicht mit den bekannten Strukturen in Einklang zu bringen sind. Um die Unterschiede auf molekularer Ebene zu verstehen sind weitere hochaufgelöste Strukturen notwendig. In der folgenden Arbeit konnte die Kristallstruktur eines weiteren Klasse-5 Mitglieds gelöst werden. Aus 48

unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen und mehr als 900 Kristallisationsansätzen unter Verbesserung der Reinigungsbedingungen konnten in einem Ansatz ausreichend große Kristalle der Myosin-5b Motordomäne mit der künstlichen Schleife-2 in der *apo*-Form gezüchtet werden, die eine Auflösung von 3 Å an der Mikrofokus-Röntgenanlage ID23-2 in Grenoble erreichten. Problematisch an diesen Kristallen waren die unterschiedlichen Schichtdicken des Kristalls in allen drei Dimensionen, wodurch sich die Qualität der Daten bei unterschiedlichen Winkeleinstellungen stark unterschied. Des Weiteren zeigte die Prozessierung der Röntgendaten, dass diese einen sehr hohen Wilson-Faktor aufweisen. Dies könnte zum einen auf Fluktuationen der Position des Moleküls innerhalb der Einheitszelle des Kristalls hindeuten zum anderen könnte das Molekül selbst durch eine hohe Flexibilität gekennzeichnet sein. Aufgrund dieser Faktoren, wurden bei der Erstellung des Strukturmodells keine besseren R-Faktoren ($R = 37,8\%$ und $R_{\text{free}} = 47,9\%$) erreicht. Trotz der mäßigen Qualität der Daten konnten erstmals Aussagen über die Konformation von *Dd*Myosin-5b-K6 mit artifiziellen Hebelarm (2R) getroffen werden.

Die gelöste Struktur des *Dd*Myosin-5b-K6 mit künstlichem Hebelarm wurde mit der *Gg*Myosin-5a-Struktur ohne gebundenem Nukleotid in der *rigor-like* Konformation und der *Gg*Myosin-5a Struktur im Komplex mit dem Nukleotidanalogen $\text{Mg}^{2+}.\text{ADP}.\text{BeF}_x$ in der *near-rigor* Konformation verglichen [Coureux *et al.*, 2003 und 2004]. Die Motordomäne der *Dd*Myosin-5b-Struktur weist eine der *Gg*Myosin-5a Struktur vergleichbare *rigor-like*-Konformation auf, in der die Aktinbindungsspalte in einer geschlossenen Geometrie vorliegt. Neben dieser Konserviertheit sind Unterschiede in der Nukleotidbindungsregion, der Hebelarmposition und in der Kerngerüststruktur der β -Faltblätter zu erkennen. So weisen der Schalter-2 und die Phosphatbindungsschleife der Nukleotidbindungsregion der *Dd*Myosin-5b-K6-Struktur eine leicht veränderte Konformation auf und Schalter-2 ist in keiner stabilisierenden Konformation zur SH-1-Helix positioniert. Die β -Faltblätter 5 bis 7 in der *Dd*Myosin-5b-K6-Struktur sind verzerrt, aber weisen dabei eine Konformation auf, die zwischen der des nukleotidfreien Zustands und der des $\text{Mg}^{2+}.\text{ADP}.\text{BeF}_x$ Zustands des *Gg*Myosin-5a liegt. Diese Unterschiede können zum einen darauf beruhen, dass hier verschiedenen Myosinisoformen miteinander verglichen werden, zum anderen kann auch die künstliche Schleife-2 diese Veränderungen hervorrufen. Die Ergebnisse zeigen, dass die *Dd*Myosin-5b-K6-Struktur ohne gebundenes Nukleotid wie *Gg*Myosin-5a eine *rigor-like*-Konformation einnehmen kann. Dieser Zustand spiegelt die Konformation der Motordomäne im an Aktin gebundenen Zustand wider.

Der künstliche Hebelarm der Myosin-5b-K6-Struktur weist eine Position auf, die der *near-rigor*-Position der nativen Hebelarme von *Gg*Myosin-5a und dem Myosin aus der gestreiften

Muskulatur der Muschel entspricht und nicht der *rigor-like*-Konformation des GgMyosin-5a. Jedoch sind die Positionen des Hebelarms von GgMyosin-5a in der *rigor-like* und der *near-rigor*-Konformation sehr ähnlich. Die Position des Hebelarms variiert trotz des gleichen Nucleotidzustands in den verschiedenen Myosinisoformen und auch abhängig von dem verwendeten Myosinkonstrukt [Houdusse *et al.*, 2000]. Das für die Kristallisation verwendete DdMyosin-5b-K6-Konstrukt besitzt einen künstlichen Hebelarm bestehend aus zwei α -Aktinin-Untereinheiten. Die Abweichung der Hebelarmposition von der des *rigor-like*-Zustands beruht höchstwahrscheinlich auf der Verwendung des künstlichen Hebelarms, dessen Konformation nicht durch die Bindung leichter Ketten beeinflusst wird.

Um verbesserte Daten mit ausreichender Auflösung und ausreichender Qualität für die Strukturlösung von DdMyosin-5b-K6 zu erhalten, muss die Kristallisation dieses Myosinkonstrukts weiter optimiert werden. Durch weiteres *Microseeding* könnte eine gleichmäßige Schichtdecke des Kristalls in alle drei Raumrichtungen erreicht werden, so dass die Qualität der Daten in allen drei Dimensionen gleich ist. Erst durch verbesserte R- und B-Faktoren lassen sich genauere Aussagen über die Position einzelner Aminosäuren in den aktiven Bereichen der Motordomäne fällen, die Rückschlüsse auf den Hydrolysemechanismus dieses Motors erlauben.

4.2. Strukturbasiertes *Protein Engineering* ermöglicht die Darstellung eines künstlichen prozessiven Motors

In dieser Arbeit wurden die Eigenschaften des künstlichen prozessiven Motors M5P in Bezug auf die Flexibilität des Hebelarms und Funktionalität genauer untersucht. Der artifizielle Motor wurde aus drei Bausteinen, einer *DdMyosin-5b*-Motordomäne, zwei α -Aktinin-Einheiten als artifiziellen Hebelarm und einer Dimerisierungsdomäne, dem Leucin-Zipper, aufgebaut [Diensthuber, 2009]. Die Dimerisierung des künstlichen Motors konnte zum einen durch Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichtszentrifugationsexperimente mittels einer analytischen Ultrazentrifuge nachgewiesen werden. Zum anderen konnte durch Photobleichexperimente auf Einzelmolekülebene gezeigt werden, dass dieser Motor auch im nanomolaren Bereich als Dimer vorliegt [Amrute-Nayak *et al.*, 2009]. In Einzelmolekülmessungen wurde gezeigt, dass dieser künstliche Nanomotor zu prozessiver Bewegung entlang eines Aktinfilaments befähigt ist. Die mittlere Laufweite in diesem Prozessivitätsassay betrug 700 nm.

Als Monomer ist die *duty ratio* der Myosin-5b-Motordomäne abhängig von der Konzentration an freien Magnesiumionen [Taft *et al.*, 2008]. Diese Abhängigkeit ließ vermuten, dass die Prozessivität des dimeren Konstrukts sich mit der Konzentration an freien Magnesiumionen unterscheidet. Diese Vermutung wurde mittels des Prozessivitätsassay bestätigt [Amrute-Nayak *et al.*, 2009]. Bei niedrigen ($[Mg^{2+}] < 0,5$ mM) Konzentrationen wurden keinen prozessiven Bewegungen beobachtet, bei hohen Konzentrationen ($[Mg^{2+}] = 10$ mM) verhielt sich der Motor ausschließlich prozessiv. Dies ermöglicht eine Regulation der Laufweiten des artifiziellen Nanomotors entlang des Aktinfilaments.

Anhand von *Normal mode*-Analysen, wurde in dieser Arbeit vorhergesagt, dass der künstliche Hebelarm bestehend aus den zwei α -Aktinin-Einheiten, nicht wie bisher angenommen ein starrer Hebelarm ist. Der Hebelarm besitzt eine flexible Region am Übergang der beiden α -Aktinin-Untereinheiten, die wie ein Gelenk agiert (siehe Kapitel 3.2.2. Abbildung 27). Dieses Gelenk ermöglicht Schrittweiten von bis zu 18 nm. Diese Vorhersagen wurden durch Messungen der Schrittweiten des künstlichen Dimers in der optischen Falle während der prozessiven Bewegung bestätigt. Es wurden Schrittweiten von 4-17 nm gemessen mit Schwerpunkten bei 5 und 10 nm. Diese Schrittweiten des artifiziellen prozessiven Motors bestätigen nicht nur die Vorhersagen der *Normal mode*-Analyse, sondern reflektieren auch die Abstände der Aktinuntereinheiten innerhalb des Filaments wider (siehe Abbildung 42). In Experimenten mit diesem künstlichen Hebelarm in Verbindung mit der Motordomäne von *DdMyosin-2* wurden Schrittweiten von 7 bis 8 nm gemessen [Ruff *et al.*, 2001], die auch in

den hier gemessenen Bereichen liegen. Die gemessenen Schrittweiten zeigen, dass der artifizielle Motor auf der Diffusions-vermittelten Suche nach der nächsten Bindungsstelle entlang des Aktinfilaments sich auch um das Filament rotieren kann. Diese Rotationsbewegung kann weder im Prozessivitätsassay noch in der optischen Falle aufgelöst werden. Jedoch ermöglicht die Flexibilität des künstlichen Hebelarms dem Motor an benachbarte Aktinuntereinheiten beider miteinander verflochtenen Aktinpolymerstränge des Filaments zu binden. Dass Myosine mit kurzem Nacken auf der Suche nach der Bindung an die Untereinheit eines Aktinfilaments um die Achse rotieren können, wurde bereits in Sakamoto *et al.*, 2005 demonstriert. Durch die Wahl des Hebelarms ist es möglich, Einfluss auf die Schrittweite des prozessiven Myosins zu nehmen, da diese proportional zur Länge des Hebelarms ist [Ruff *et al.*, 2001; Purcell *et al.*, 2002; Sakamoto *et al.*, 2003 und 2005, Brenner, 2006].

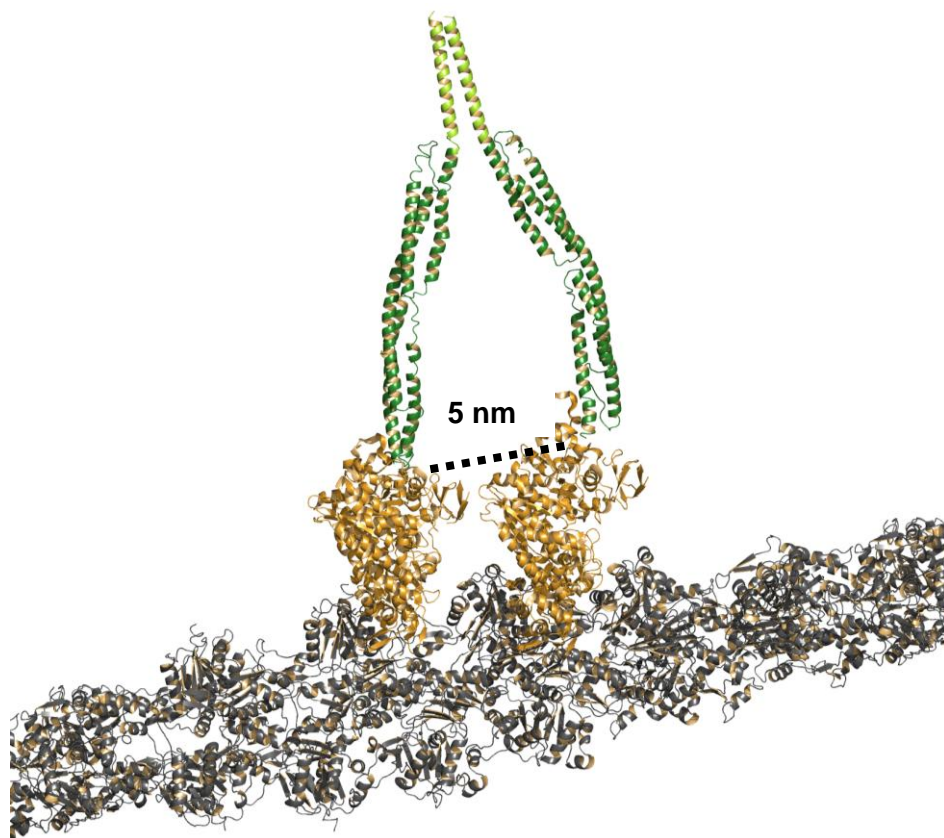


Abb. 42: Dargestellt ist der artifizielle prozessive Motor gebunden an ein Aktinfilament (abgebildet ist in schwarz das Aktinfilament, in goldgelb die Motordomänen, in dunkelgrün die künstlichen Hebelarme, in hellgrün die Dimerisierungsregion)

Mit diesem Konstrukt konnten die minimalen Anforderungen für prozessive Bewegung eines Myosins definiert werden [Diensthuber, 2009]. Zum einen muss eine Motordomäne mit den kinetischen Eigenschaften eine hohe *duty ratio* aufweisen. Dadurch wird die kinetische Basis für Prozessivität gelegt. Des Weiteren wird ein Hebelarm für den Kraftschlag benötigt.

Der kraftproduzierende Hebel muss flexibel genug sein, damit sich die Motordomänen in einer richtigen Orientierung zu den Untereinheiten des Aktinfilaments bewegen können. Dies ermöglicht eine effiziente Bindung und ermöglicht erst eine prozessive Bewegung. Jedoch darf dieser Hebelarm keine zu hohe Flexibilität aufweisen, diese würde eine effiziente Kraftübertragung während des Kraftschlags verhindern. Durch den Einsatz eines artifiziellen Hebelarms wurde gezeigt, dass gebundene leichte Ketten in der Nackenregion des Myosins keine Voraussetzung für eine prozessive Form der Bewegung sind. Viele Modelle der Prozessivität basieren auf der Annahme, dass eine interne Spannung für die Koordination der Myosinköpfe während der prozessiven Bewegung verantwortlich ist. Die intramolekulare Spannung beeinflusst die ADP-Freisetzung prozessiver Myosine vom dem Akto-Myosin-Komplex [Veigel *et al.*, 2002]. Die ADP-Dissoziation aus dem hinteren Kopf wird durch vorwärtsgerichtete intramolekulare Spannung beschleunigt, die des vorderen Kopf durch rückwärtsgerichtete intramolekulare Spannung verlangsamt [Rosenfeld *et al.*, 2005]. Experimente zur Ermittlung der ADP-Freisetzung aus dem Akto-Myosin-Komplex mit dem artifiziellen Motor zeigen einen zweiphasigen Prozess auf, der nahelegt, dass auch innerhalb des artifiziellen Motors die Motordomänen sich im Aktin-gebundenen Zustand gegenseitig beeinflussen, vermutlich durch intramolekulare Spannung. Folge hiervon ist, dass ADP von den einzelnen Motordomänen unterschiedlich schnell freigesetzt wird.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass diese Spannung unabhängig von der Art des Hebelarms ist. Diese These wird durch eine kürzlich veröffentlichte Studie an Myosin-6 unterstützt [Liao *et al.*, 2009]. In dieser Arbeit wurde ebenfalls gezeigt, dass Prozessivität eines dimeren Myosins ohne Optimierung des Hebelarms möglich ist. Liao *et al.* zeigten zusätzlich, dass die Direktionalität prozessiver Bewegung nur von einem α -helikalen Strukturelement im Anschluss des Konverters bestimmt wird.

Diese Studie ergänzt die bislang erzielten Möglichkeiten maßgeschneiderte Motoren zu konstruieren um einen weiteren Aspekt: Struktur-basiertes molekulares Modellieren erlaubt es Voraussagen über die Mechanismen der Bewegung auf molekularer Ebene zu treffen, um künstliche Motoren auf die jeweilige Funktion gezielt anzupassen. Auf diese Weise ließen sich in Zukunft Aktin-basierte Bewegungen auf Mikrochips gezielt durch die Wahl des Motors und der *Engineering*-Strategie regulieren und kontrollieren [Amrute-Nayak *et al.*, 2009].

4.3. Abhängigkeit der Modulation des Kraftschlags von Schalter-2

Schalter-2 ist in allen Myosinklassen hoch konserviert und bildet zusammen mit Schalter-1 und der Phosphatbindungsschleife die Nukleotidbindungstasche. Dieser Schalter in der Nukleotidbindungstasche liegt in zwei Konformationen vor: Vor dem Kraftschlag des Myosins ist der Schalter geschlossen, nach dem Kraftschlag ist dieser geöffnet. Der Schließvorgang findet in zwei Schritten statt, an die der *recovery stroke* und die Aktivierung der ATPase-Funktion gekoppelt sind [Koppole *et al.*, 2007]. Die erneute Öffnung des Schalter-2 findet gleichzeitig mit der Produktdissoziation nach der Hydrolyse und dem damit verbundenen Kraftschlag (*power stroke*) des Myosins statt. Mit Hilfe der Mutationsanalyse und Kristallstrukturermittlung wurde im Folgenden die Funktion von Schalter-2 in Bezug auf Nukleotidbindungsverhalten und Kraftschlag von Myosin-2 untersucht.

In kinetischen Studien einer Mutante von *DdMyosin-2* in der S456 in dem Schalter-2 gegen ein Tyrosin ausgetauscht wurde, wurde gezeigt, dass zum einen die Interaktion mit ATP im Vergleich zum Wildtyp stark verlangsamt ist. So ist die ATP-Bindung und die folgende Isomerisierung des Komplexes verlangsamt [Diensthuber, 2009]. Zum anderen ist die Aktinaffinität in Anwesenheit von ADP reduziert und die ADP-Affinität in Anwesenheit von Aktin aufgrund einer beschleunigten ADP-Dissoziation erniedrigt. Des Weiteren bewegte die S456Y-Mutante im *in vitro* Motilitätsassay Aktinfilamente mit reduzierter Geschwindigkeit [Hartmann, 2009].

In einer Studie von Murphy *et al.*, 2001 wurde eine Myosin-2 Mutante, in der S456 zu einem Leucin mutiert wurde, ebenfalls kinetisch und funktional analysiert. Die S456L-Mutante zeigte ebenso eine verringerte Geschwindigkeit in Motilitätsassays und zudem eine verringerte Schrittweite in Experimenten in der optischen Laserfalle. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch die Einführung des größeren Aminosäurerestes ein vollständiges Schließen des Schalters-2 verhindert wird [Murphy *et al.*, 2001; Koppole *et al.*, 2007]. Die Bewegungen dieses Schalters sind über die Relayregion und dem Konverter an den Kraftschlag des Myosins gekoppelt. Ein unvollendeter Schließvorgang dieses Schalters würde die vollständige Erzeugung des Kraftschlags verhindern und die Schrittweite des Myosins verringern. Da sowohl die Seitenkette des Leucins als auch die des Tyrosins größer sind als die des Serins, kann angenommen werden, dass die strukturellen und funktionalen Auswirkungen in der S456Y-Mutante ähnlich der S456L-Mutation sind. Um diese

veränderten kinetischen und funktionalen Eigenschaften strukturell zu erklären wurde die Struktur der Motordomäne der S456Y-Mutante im Komplex mit Mg^{2+} .ADP.VO₄ gelöst und analysiert.

Die Struktur des *Dd*Myosin-2 Wildtyps repräsentiert mit gebundenen Mg^{2+} .ADP.VO₄ den Übergangszustand der ATP-Hydrolyse vor dem Kraftschlag [Smith *et al.*, 1996]. In dieser Konformation ist der Schalter-2 der Nukleotidbindungstasche geschlossen und die Relayhelix ist zum C-terminalen Ende abgeknickt. Die Struktur der S456Y-Mutante im Komplex mit Mg^{2+} .ADP.VO₄ zeigte im Vergleich mit dem Wildtyp keine Veränderungen in der Konformation der Nukleotidbindungsregion und nur geringe Veränderungen in der Aktinbindungsregion. Die Analyse dieser Struktur widerlegt jedoch die These, dass durch die Einführung des größeren Aminosäurerestes ein Schließen des Schalters-2 verhindert wird. Diese in dieser Arbeit gelöste Struktur zeigt wie der Wildtyp im Mg^{2+} .ADP.VO₄-Zustand einen geschlossenen Schalter-2. Auch die Relayhelix ist in der Struktur der Mutante in der geknickten Konformation, die vor dem Kraftschlag vorliegt.

Um obige Aussage zu bekräftigen, konnte eine in der RCSB Protein Data Bank veröffentlichte Struktur derselben Myosin-2 Mutante im Komplex mit Mg^{2+} .ADP.BeF_x [PDB 1W9I] zur weiteren strukturellen Analyse herangezogen werden. Diese Struktur repräsentiert die Konformation der Myosinmotordomäne nach dem Kraftschlag. Im Gegensatz zur Mg^{2+} .ADP.BeF_x-Struktur des Wildtyps, in der Schalter-2 geöffnet vorliegt und die Relayhelix eine gerade Konformation einnimmt ist die Konformationen des Schalter-2 in der Mutante nicht vollständig geöffnet und die Relayhelix geknickt. Bei der Bindung von ATP an Myosin befinden sich alle Elemente der Nukleotidbindungstasche, Phosphatbindungsschleife, Schalter-1 und Schalter-2, in offenen Zuständen. Da durch die S456Y-Mutation Schalter-2 nicht vollständig geöffnet werden kann, befindet sich die Nukleotidbindungstasche nicht in der idealen Konformation für eine schnelle ATP-Bindung und folglich ist die ATP-Bindung und Isomerisierung des Komplexes erschwert. Die Veränderungen in der Aktinbindungsregion sind in den Strukturen vor und nach dem Kraftschlag ähnlich und reflektieren wie bereits erwähnt die veränderten Aktinbindungseigenschaften dieser Mutante. Die Mutation S456Y führt zu einer Erhöhung der basalen und Aktin-aktivierten ATPase-Aktivität [Diensthuber, 2009]. Der Effekt der erhöhten basalen ATPase wurde auch durch die Mutation S456L hervorgerufen [Murphy *et al.*, 2001]. Der Anstieg der ATPase-Aktivität wird auf eine durch die Mutation hervorgerufene beschleunigte Phosphatfreisetzung zurückgeführt. Die gesteigerte ATPase-Aktivität und die gleichzeitig verringerte Motilität aufgrund einer geringeren Schrittweite während des Kraftschlags zeigen, dass die S456Y-Mutation in Schalter-2 die Kopplung der ATPase-Aktivität an einen vollständig ausgeführten Kraftschlag aufhebt.

Dadurch ist die Hydrolyse des ATPs nicht mehr mit einer effektiven Bewegung des Myosins entlang eines Aktinfilaments verbunden.

Die strukturellen Analysen der S456Y-Mutante ergeben auch eine Erklärung für die verringerte Schrittweite und der damit verbundenen geringeren Motilität des Myosins. Die Struktur der Schalter-2-Mutante im Komplex mit Mg^{2+} .ADP.VO₄ zeigt, dass die Konformationen des Schalter-2 und der Relayhelix vor dem Kraftschlag identisch zu denen des Wildtyps sind. Schalter-2 ist vollständig geschlossen. Die Konformation des Schalter-2 und der Relayhelix nach dem Kraftschlag entsprechen nicht der des Wildtyps. Durch die Einführung eines großen Aminosäurerestes nimmt der Schalter nicht mehr vollständig die offene Konformation ein und damit verbunden wird die Relayhelix nicht komplett begradigt. Diese Ergebnisse zeigen das der verringerte Kraftschlag der S456Y-Mutante nicht, wie in Murphy *et al.* und Koppole *et al.* diskutiert, auf einem unvollständigen Schließvorgangs des Schalter-2 beruht, sondern auf einer unvollendeten Öffnung dieses Schalters.

Die strukturellen Betrachtungen der Mutation S456Y in Schalter-2 zeigen, dass die Öffnung dieses Schalters und damit verbunden die Streckung der Relayhelix Voraussetzung für die vollständige Ausführung eines Kraftschlags in dieser Mutante sind.

5. LITERATUR

Amrute-Nayak, M., Diensthuber, R.P., Steffen, W., Kathmann, D., Hartmann, F.K., Fedorov, R., Urbanke, C. Manstein, D.J., Brenner, B. und Tsiavaliaris, G. (2010) Targeted optimization of a protein nanomachine for operation in microfluidic devices. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 312-316

Anson, M., Geeves, M. A., Kurzawa, S. E. und Manstein, D. J. (1996). Myosin motors with artificial lever arms. *Embo J* **15**, 6069-6074

Arndt, U. W. und Wonacott, A. J. (1977) *The Rotation Method in Crystallography*. Amsterdam: North-Holland.

Bagshaw, C. R., Trentham, D. R. (1974). The characterization of myosin-product complexes and of product release steps during the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase reaction. *Biochem J* **141**, 331-349

Bähler, M und Rhoads, A. (2002) Calmodulin signaling via the IQ motif. *FEBS Lett* **20**, 107-113

Bauer, C.B., Holden, H.M., Thoden, J.B., Smith, R. und Rayment, I. (2000) X-ray structures of the apo and MgATP-bound states of Dictyostelium discoideum myosin motor domain. *J Biol Chem* **275**, 38494-38499

Berg, S.J., Powell, B.C. und Cheney, R.E. (2001) A Millennial Myosin Census. *Mol Biol Cell* **12**, 780-794

Betapudi, V., Licate, L.S. und Egelhoff, T.T. (2006) Distinct roles of nonmuscle myosin II isoforms in the regulation of MDA-MB-231 breast cancer cell spreading and migration. *Cancer Res* **66**, 4725-4733

Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**(6), 1513-23

Boeda, B., El-Amraoui, A., Bahloul, A., Goodyear, R., Daviet, L., Blanchard, S., Perfettini, I., Fath, K.R., Shorte, S., Reiners, J., Houdusse, A., Legrain, P., Wolfrum, U., Richardson, G und Petit, C. (2002) Myosin VIIa, harmonin and cadherin, three *Usher 1* gene products that cooperate to shape the sensory hair cell bundle. *EMBO J* **21**, 6689-6699

Bonne, G., Carrier, L., Richard, P., Hainque, B. und Schwartz, K. (1998) *Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects*. *Circ Res* **83**, 580-593

Brenner, B. (2006) The stroke size of myosins: a reevaluation. *J Muscle Res Cell Motil* **27**, 173-87.

Brown, S.S. (1997) Myosins in yeast. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 44-48.

Brünger, A.T. (1993) Assessment of Phase Accuracy by Cross Validation: the Free R Value. *Methods and Applications*. *Acta Cryst* **D49**, 24-36

Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. und Warren, G.L. (1998). Crystallography & NMR System: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination. *Acta Cryst* **D54**, 905-921

Carugo, O., Argos und Argos, P. (1998) Accessibility to internal cavities and ligand binding sites monitored by protein crystallographic thermal factors. *Proteins* **31**, 201-213

Chishti, A.H., Kim, A.C., Marfatia, S.M., Lutchman, M., Hanspal, M., Jindal, H., Liu, S.C., Low, P.S., Rouleau, G.A., Mohandas, N., Chasis, J.A., Conboy, J.G., Gascard, P., Takakuwa, Y., Huang, S.C., Benz, E.J. Jr., Bretscher, A., Fehon, R.G., Gusella, J.F., Ramesh, V., Solomon, F., Marchesi, V.T., Tsukita, S., Arpin, M., Louvard, D., Tomks, N.K., Anderson, J.M., Fanning, A.S., Bryant, P.J., Woods, D.F. und Hoover, K.B. (1998) The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem Sci* **23**, 281-282

Chance, B., Eisenhardt, R. M., Gibson, Q. H., Lonberg-Holm, K. K. (1964). Rapid mixing and sampling techniques in biochemistry. New York: *Academic Press*. p 89-102

Collaborative Computational Project, Number 4. (1994) The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst* **D50**, 760-763

Conibear, P.B., Bagshaw, C.R., Fajer, P.G., Kovacs, M und Malnasi-Csizmadia, A. (2003) Myosin cleft movement and its coupling to actomyosin dissociation. *Nat Struct Biol* **10**, 831-835

Cope, M.J., Whisstock, J., Rayment, I. und Kendrick-Jones, J. (1996). Conservation within the myosin motor domain: implications for structure and function. *Structure* **4**, 969-987

Coureux, P.-D., Wells, A.L., Menetrey, J., Yengo, C.M., Morris, C.A., Sweeney, H.L. und Houdusse, A. (2003) A Structural State of the Myosin V Motor without Bound Nucleotide. *Nature* **425**, 419

Coureux, P.-D., Sweeney, H.L. und Houdusse, A. (2004) Three Myosin V Structures Delineate Essential Features of Chemo-Mechanical Transduction. *Embo J.* **23**, 4527

Criddle, A.H., Geeves, M.A. und Jefries T. (1985). The use of actin labelled with N-(1-pyrenyl)iodoacetamide to study the interaction of actin with myosin subfragments and troponin/tropomyosin. *Biochem J* **232**, 343-349

De La Cruz, E.M., Wells, A.L., Rosenfeld, S.S., Ostap, E.M. und Sweeney, H.L. (1999). The kinetic mechanism of myosin V. *Proc Nat Acad Sci USA* **96**, 13726-13731

De La Cruz, E.M. und Ostap, E.M. (2004) Relating biochemistry and function in the myosin superfamily. *Curr Opin Cell Biol* **16** (1), 61-67

DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System. (2008) DeLano Scientific LLC, Palo Alto, CA, USA

De la Roche, M.A. und Côté, G.P. (2001). Regulation of *Dictyostelium* Myosin I and II. *Biochim Biophys Acta* **1525**, 245-261

De la Roche, M.A., Smith, J.L., Betapudi, V., Egelhoof, T.T. und Côté, G.P. (2002). Signaling pathways regulating *Dictyostelium* Myosin II. *J Muscle Res Cell Motil* **23**, 703-718

De Lozanne, A. und Spudich, J.A. (1987) Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* **236**, 1086-1091

Desnos, C., Huet, S. und Darchen, F. (2007) 'Should I stay or should I go?' myosin V function in organelle trafficking. *Biol Cell* **99**, 411-23

Diensthuber, R.P., (2009) Struktur-Funktionsanalysen prozessiver und nicht-prozessiver Myosine

-
- Dominguez, R., Freyzon, Y., Trybus, K.M. und Cohen, C. (1998) Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain: visualization of the pre-power stroke state. *Cell (Cambridge, Mass.)* **94**, 559-571
- Ducruix, A. und Giege, R. (1999) Crystallisation of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach. *Oxford University Press*
- Dürrwang, U., Fujita-Becker, S., Erent, M., Kull, F.J., Tsiavaliaris, G., Geeves, M. A. und Manstein, D.J. (2006) Dictyostelium myosin-1E is a fast molecular motor involved in phagocytosis. *J Cell Sci* **119**, 550-558
- Eccleston, J. F., Gratton, E., Jameson, D. M. (1987). Interaction of a fluorescent analogue of GDP with elongation factor Tu: steady-state and time-resolved fluorescence studies. *Biochemistry* **26**(13), 3902-7
- Emsley, P. und Cowtan, K. (2004). Coot: Model-Building Tools for Molecular Graphics. *Acta Cryst* **D60**, 2126-2132
- Fedorov, R., Böhl, M., Tsiavaliaris, G., Hartmann, F.K., Taft, M.H., Baruch, P., Brenner, B., Martin, R., Knölker, H.J., Gutzeit, H.O. und Manstein, D.J. (2009) The mechanism of pentabromopseudilin inhibition of myosin motor activity. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 80-88
- Fisher, A.J., Smith, C.A., Thoden, J.B., Smith, R., Sutoh, K., Holden, H.M., Rayment, I. (1995) X-ray structures of the myosin motor domain of Dictyostelium discoideum complexed with MgADP.BeFx and MgADP.AlF₄⁻. *Biochemistry* **34**: 8960-8972
- Fischer, S., Windshügel, B., Horak, D., Holmes K.C. und Smith, J.C. (2005) Structural mechanism of the recovery stroke in the myosin motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 6873-6878
- Forgacs, E., Cartwright, S., Sakamoto, T., Sellers, J.R., Corrie, J.E.T., Webb, M.R. und White, H.D. (2008) Kinetics of ADP Dissociation from the trail and lead heads of actomyosin V following the power stroke. *J Biol Chem* **283**, 766-773
- Foth, B.J. Goedecke, M.C. und Soldati, D. (2006) New insights into myosin evolution and classification. *Proc Nat Acad Sci USA* **103**, 3681-3686
- Furch, M., Geeves, M. A. und Manstein, D. J. (1998). Modulation of actin affinity and actomyosin adenosine triphosphatase by charge changes in the myosin motor domain. *Biochemistry* **37**(18), 6317-6326
- Furch, M., Fujita-Becker, S., Geeves, M. A., Holmes, K.C. und Manstein, D. J. (1999) Role of the salt-bridge between switch-1 und switch-2 of Dictyostelium myosin. *J Mol Biol* **290**, 797-809
- Furch, M., Rimmel, B. Geeves, M. A. und Manstein, D. J. (2000). Stabilization of the Actomyosin Complex by Negative Charges on Myosin. *Biochemistry* **39**, 11602-11608
- Garman, E.F. und Schneider, T.R. (1997) Macromolecular Cryocrystallography. *J Appl Cryst* **30**, 211-237
- Geevs, M.A., Goody, R.S. und Gutfreund, H. (1984) Kinetics of Acto-S1 interaction as a guide to model for the cross-bridge cycle. *J Muscle Res Cell M* **5**, 351-361
- Geeves, M.A. und Holmes, K. C. (1999) Structural mechanism of muscle contraction. *Annu Rev Biochem* **68**, 687-728
- Geeves, M. A., Fedorov, R. und Manstein, D. J. (2005). Molecular mechanism of actomyosin-based motility. *Cell Mol Life Sci* **62**, 1462-1477
-

-
- Goodno, C.C. (1979). Inhibition of myosin ATPase by vanadate ion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76** (6), 2620-2624
- Gulick, A.M., Bauer, C.B., Thoden, J.B. und Rayment, I. (1997) X-ray structures of the MgADP, MgATPgammaS, and MgAMPPNP complexes of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain. *Biochemistry* **36**, 11619-11628
- Gyimesi, M., Tsaturyan, A.K., Kellermayer, M.S.Z. und Malnasi-Csizmadia, A. (2008). Kinetic Characterization of the Function of Myosin Loop 4 in the Actin-Myosin Interaction. *Biochemistry* **47**, 283-291
- Hammer III, J. A. und Jung, G. (1996). The sequence of the dictyostelium myo J heavy chain gene predicts a novel, dimeric, unconventional myosin with a heavy chain molecular mass of 258 kDa. *J Biol Chem* **271**, 7120-7127
- Hartmann, F.A.K. (2009) Molekulare Grundlagen der Regulation und Modulation der Motorfunktion von Myosinen
- Himmel, D.M., Gourinath, S., Reshetnikova, L., Shen, Y., Szent-Gyorgyi, A.G. und Cohen, C. (2002) Crystallographic findings on the internally uncoupled and near-rigor states of myosin: further insights into the mechanics of the motor. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 12645-12650
- Hinsen, K. (1998). Analysis of domain motions by approximate normal mode calculations. *Protein*, **33**, 417-429
- Hodges, A.R., Kremontsova, E.B. und Trybus, K.M. (2007) Engineering the processive run length of Myosin V. *J Biol Chem* **282**, 27192-27197
- Holmes, K.C. (1997) The swinging lever arm hypothesis of muscle contraction. *Curr Biol* **7**, R112-118
- Holmes, K.C., Schröder, R.R., Sweeney, H.L. und Houdusse, A. (2004) The structure of the rigor complex and its implications for the power stroke. *Phil Trans R Soc B* **359**, 1819-1828
- Holmes, K. C., Angert, I., Kull, F. J., Jahn, W. und Schröder R. R. (2003) Electron cryo-microscopy shows how strong binding of myosin to actin releases nucleotide. *Nature* **425**, 423–427
- Holmes, K.C. und Schröder, R.R. (2003) Switch 1 opens on strong binding to actin. Molecular and cellular aspects of muscle contraction. *Adv Exp Med Biol* **538**, 159-166
- Hollup, S.M., Salensminde, G. und Reuter, N. (2005). WEBnm@: a web application for normal mode analyses of proteins. *BMC Bioinformatics* **6**:52
- Houdusse, A., Kalabokis, V.N., Himmel, D., Szent-Gyorgyi, A.G. und Cohen, C. (1999) Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: a novel conformation of the myosin head. *Cell (Cambridge, Mass.)* **97**, 459-470
- Houdusse, A., Szent-Gyorgyi, A.G. und Cohen, C. (2000) Three conformational states of scallop myosin S1. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 11238-11243
- Houdusse, A. und Sweeney, H.L. (2001) Myosin motors: missing structures and hidden springs. *Curr Opin Struct Biol* **11** (2), 182-194
- Humphrey, W., Dalke, A. und Schulten, K. (1996) "VMD - Visual Molecular Dynamics", *J. Molec. Graphics* **14**, 33-38
- Joel, P.B., Trybus, K.M. und Sweeney, H.L. (2001). Two Conserved Lysines at the 50/20-kDa Junction of Myosin Are Necessary for Triggering Actin Activation. *J Biol Chem* **276**, 2998–3003
- Joel, P.B., Trybus, K.M. und Sweeney, H.L. (2003). Addition of Lysines to the 50/20 kDa Junction of Myosin Strengthens Weak Binding to Actin without Affecting the Maximum ATPase Activity. *Biochemistry* **42**, 9160-9166
-

-
- Jung, G., Titus, M.A. und Hammer III, J.A. (2009) The *Dictyostelium* type V myosin MyoJ is responsible for the cortical association and motility of contractile vacuole membranes. *J Cell Biol* **186** (4), 555-570
- Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Applied Cryst* **26**, 795-800
- Karki, S. und Holzbauer, E.L. (1999) Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 45-53
- Karplus, P.A. und Schulz G.E. (1985) Prediction of chain flexibility in proteins – a tool for the selection of peptide antigens. *Naturwissenschaften* **72**, 212-213
- Kintses, B., Gyimesi, M., Pearson, D.S., Geeves, M.A., Zeng, W., Bagshaw, C.R. und Malnasi-Csizmadia, A. (2007) Reversible movement of switch 1 loop of myosin determines actin interaction. *EMBO J* **26**, 265-274
- Kliche, W., Fujita-Becker, S., Kollmar, M., Manstein, D.J. und Kull, F.J. (2001) Structure of a genetically engineered molecular motor. *EMBO J* **20**, 40-46
- Knecht, D.A. und Loomis, W.F. (1988). Developmental Consequences of the Lack of Myosin Heavy Chain in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol* **128**, 178-184
- Kollmar, M., Durrwang, U., Kliche, W., Manstein, D.J. und Kull, F.J. (2002) Crystal structure of the motor domain of a class-I myosin. *EMBO J.* **21**, 2517-2525
- Kollmar, M. (2006). Thirteen is enough: the myosins of *Dictyostelium discoideum* and their light chains. *BMC Genomics* **7**(183)
- Koppole, S., Smith, J.C. und Fischer, S. (2007) The Structural Coupling between ATPase Activation and Recovery Stroke in the Myosin II Motor. *Structure* **15**, 825-837
- Koppole, S., Smith, J.C. und Fischer, S. (2006) Simulations of the myosin II motor reveal a nucleotide-state sensing element that controls the recovery stroke. *J Mol Biol* **361**, 604-616
- Kouyama, T. und Mihashi, K. (1996). Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. *Eur. J.Biochem.* **114**, 33-38
- Krementsova, E.B., Hodges, A.R., Lu, H. und Trybus, K.M. (2006) Processivity of chimeric class V myosins. *J Biol Chem* **281**, 6097-6086
- Krendel, M. und Mooseker, M.S. (2005) Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)* **20**, 239-251
- Kühne, W. (1864) Untersuchungen über das Protoplasma und die Contractilität. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig
- Kull, F.J., Sablin, E.P., Lau, R., Fletterick, R.J. und Vale, R.D. (1996) Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature* **380**, 550-555
- Kull, F.J. und Endow, S.A. (2002) Kinesin: switch I und II and the motor mechanism. *J Cell Sci* **115**, 15-23
- Kurzawa, S. E., Manstein, D. J. und Geeves, M. A. (1997). *Dictyostelium discoideum* myosin II: characterization of functional myosin motor fragments. *Biochemistry*, **36**, 317-323
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

-
- Lehrer, S.S. und Kerwar, G. (1972) Intrinsic fluorescence of actin. *Biochemistry* **11**, 1211-1217
- Liao, J-C., Elting, M.W., Delp, S.L., Spudich, J.A. und Bryant, Z. (2009) Engineered Myosin VI Motors Reveal Minimal Structural Determinants of Directionality and Processivity. *J Mol Biol* **392** (44), 862-867
- Lohkamp, B., Emsley, P. und Cowtan, K. (2005). Coot News. *CCP4 Newsletter* **42**, Contribution 7
- Lymn, R.W. und Taylor, E.W. (1971) Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* **10**, 4617-4624
- Malnasi-Csizmadia, A., Pearson, D. S., Kovacs, M., Woolley, R. J., Geeves, M. A. und Bagshaw, C. R. (2001). Kinetic resolution of a conformational transition and the ATP hydrolysis step using relaxation methods with a Dictyostelium Myosin II mutant containing a single tryptophan residue. *Biochemistry* **40**, 12727-37
- Malnasi-Csizmadia, A., Dickens, J.L., Zeng, W. und Bagshaw, C. R. (2005) Switch movements and the myosin crossbridge stroke. *J Muscle Res Cell Motil* **26**, 31-37
- Manstein, D.J., Ruppel, K.M. und Spudich, J.A. (1989a). Expression and characterization of a functional myosin head fragment in *Dictyostelium discoideum*. *Science*, **246**, 656-658
- Manstein, D.J., Titus, M.A., De Lozanne, A. und Spudich, J.A. (1989b). Gene replacement in Dictyostelium: generation of myosin null mutants. *EMBO J* **8**, 923-932
- Manstein, D. J. und Hunt, D. M. (1995). Overexpression of myosin motor domains in Dictyostelium: screening of transformants and purification of the affinity tagged protein. *J Muscle Res Cell Motil* **16**, 325-332
- Marston, S. B. und Taylor, E. W. (1980). Comparison of the myosin and actomyosin ATPase mechanisms of the four types of vertebrate muscles. *J Mol Biol* **139**, 573-600.
- Mayer, B.J. und Gupta, R. (1998) Functions of SH2 und SH3 domains. *Curr Top Microbiol Immunol* **228**, 1-22
- Mehta, A. D., Rock, R. S., Rief, M., Spudich, J. A., Mooseker, M. S. und Cheney, R. E. (1999) Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature* **400**, 590-3.
- Melchionda, S., Ahituv, N., Bisceglia, L., Sobe, T., Glaser, F., Rabionet, R., Arbones, M.L., Notarangelo, A., Di Iorio, E., Carella, M., Zelante, L., Estivill, X., Avraham, K.B. und Gasparini, P. (2001) MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's Waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet* **400** (6744), 590-593
- Michaelis, L. Und Menten, M.L. (1913) *Biochem Z* **49**, 333—369
- Miller, C.J., Cheung, P., White, P. und Reisler, E. (1995) Actin's View of Actomyosin Interface. *Biophys J* **68**, 50-54
- Miller, C.J., Wong, W.W., Bobkova, E., Rubenstein, P.A. und Reisler, E. (1996) Mutation analysis of the role of the N terminus of actin in actomyosin interactions. Comparison with other mutant actin and implications for the cross-bridge cycle. *Biochemistry* **35** (51), 16557-16565
- Milligan, R.A. und Flicker, P.F. (1987) Structural relationship of actin, myosin, and tropomyosin revealed by cryo-electron microscopy. *J Cell Biol* **105** (1), 29-39
- Murphy, C.T., Rock, R.S. und Spudich, J.A. (2001) A myosin II mutation uncouples ATPase activity from motility and shortens step size. *Nat Cell Biol* **3**, 311-315
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A. und Dodson, E.J. (1997) Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Cryst* **D53**, 240-255
-

-
- Navaza, J. (1994) *AMoRe*: an automated package for molecular replacement. *Acta Cryst* **A50**, 157-163
- Navizet, I., Lavery, R. und Jernigan, R.L. (2004) Myosin Flexibility: Structural Domains and Collective Vibrations. *Proteins* **54**, 384-393
- Nyitrai, M. Und Geeves, M.A. (2004) Adenosine diphosphate and strain sensitivity in myosin motors. *Phil Trans R Soc B* **359**, 1867-1877
- Okada, T., Tanaka, H., Iwane, A.H., Kitamura, K., Ikebe, M. und Yanagida, T. (2007) The diffusive search mechanism of processive myosin class-V motor involves directional steps along actin subunits. *Biochem Biophys Res Commun* **354**, 379-384
- Onishi, H., Mikhailenko, S.V. und Morales, M.F. (2006). Toward understanding actin activation of myosin ATPase: The role of myosin surface loops. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 6136-6141
- O'Shea, E. K., Klemm, J. D., Kim, P. S. und Alber, T. (1991). X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* **254**, 539-544
- Parthasarathy, S. und Murthy, M.R.N. (2000) Protein thermal stability: insights from atomic displacement parameters (B values). *Protein* **13**, 9-13
- Purcell, T. J., Morris, C., Spudich, J. A. und Sweeney, H. L. (2002) Role of the lever arm in the processive stepping of myosin V. *Proc Natl Acad Sci USA*. **99** (22), 14159-14164
- Purcell, T. J., Sweeney, H. L., und Spudich, J. A. (2005) A force-dependent state controls the coordination of processive myosin V. *Proc Natl Acad Sci USA*. **102**, 13873-8
- Rayment, I., Rypniewski, W.R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D.R., Benning, M.M., Winkelmann, D.A., Wesenberg, G. und Holden, H.M. (1993) Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science*, **261**, 50-58
- Rayment, I., Holden, H. M., Whittaker, M., Yohn, C. B., Lorenz, M. und Holmes, K. C. (1993) Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* **261**, 58-65
- Reubold, T. F., Eschenburg, S., Becker, A., Kull, F. J. und Manstein, D. J. (2003). A structural model for actin-induced nucleotide release in myosin. *Nat Struct Biol* **10**, 826 – 830
- Rhodes, G. (2006) *Crystallography Made Crystal Clear*. Academic Press
- Rief, M., Rock, R.S., Mehta, A.D., Mooseker, M.S., Cheney, R.E. und Spudich, J.A. (2000) Myosin-V stepping kinetics: a molecular model for processivity. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 9482-9486
- Ritchie, M. D., Geeves, M. A., Woodward, S. K. und Manstein, D. J. (1993). Kinetic characterization of a cytoplasmic myosin motor domain expressed in *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **90**, 8619-8623
- Rodgers, D.W. (1994). Cryocrystallography. *Structure* **2** (12), 1135-1140
- Rosenfeld, S. S., und Sweeney, H. L. (2004) A model of myosin V processivity. *J Biol Chem*. **279**, 40100-11
- Rosenfeld, S. S., Houdusse, A. und Sweeney, H. L. (2005) Magnesium Regulates ADP Dissociation from Myosin. *J Biol Chem* **280**, 6072-6079
- Rossmann, M.G. (2001) Molecular Replacement – historical background. *Acta Cryst* **D57**, 1360-1366
- Rossmann, M.G. und Blow, D.M. (1962) The Detection of Sub-Units Within the Crystallographic Asymmetric Unit. *Acta Cryst* **15**, 24-31
-

-
- Ruff, C., Furch, M., Brenner, B., Manstein, D.J. und Meyhofer, E. (2001) Single-molecule tracking of myosins with genetically engineered amplifier domains. *Nat Struct Biol* **8**, 226-229
- Sakamoto, T., Wang, F., Schmitz, S., Xu, Y., Xu, Q., Molloy, J.E., Veigel, C. und Sellers, J.R. (2003) Neck Length and Processivity of Myosin V.. *Biochemistry* **44**, 16203-16210
- Sakamoto, T., Yildiz, A., Selvin, P.R. und Sellers, J.R. (2005) Step-size is determined by neck length in myosin V. *J Biol Chem* **278**, 29201-29207
- Sasaki, N., Shimada, T. und Sutoh, K. (1998) Mutational analysis of the switch II loop of *Dictyostelium* myosin II. *J Biol Chem*, **273**, 20334-20340
- Sasaki, N., Asukagawa, H., Yasuda, R., Hiratsuka, T. und Sutoh, K. (1999) Deletion of the myopathy loop of *Dictyostelium* myosin II and its impact on motor functions. *J Biol Chem* **274**, 37840–37844
- Schröder, R. R., Manstein, D. J., Jahn, W., Holden, H., Rayment, I. und Holmes, K. C. (1993) Three-dimensional atomic model of F-actin decorated with *Dictyostelium* myosin S1. *Nature* **364**, 171–174
- Schwarzl, S.M., Smith, J.C. und Stefan Fischer (2006) Insights into the Chemomechanical Coupling of the Myosin Motor from Simulation of Its ATP Hydrolysis Mechanism. *Biochemistry* **45**, 5830-5847
- Sellers, J. R. (2000) Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* **1496**, 3-22
- Sheldrick, G.M. (2008). A short history of SHELX. *Acta Cryst* **A64**, 112-122
- Sheldrick, G.M. und Schneider, T.R. (1997) SHELXL: high resolution refinement. *Methods Enzymol* **277**, 319-343
- Shimada, T., Sasaki, N., Ohkura, R und Sutoh, K. (1997) Alanine scanning mutagenesis of the switch I region in the ATPase site of *Dictyostelium discoideum* myosin II. *Biochemistry* **36** (46), 14037-14043
- Siemankowski, R.F. und White, H.D. (1984) Kinetics of the interaction between actin, ADP, and cardiac myosin-S1. *J Biol Chem* **259**, 5045-5053
- Shiroguchi, K. Und Kinoshita Jr., K. (2007) Myosin V Walks by Lever Action and Brownian Motion. *Science* **316**, 1208-1212
- Sleep, J., Irving, M., and Burton, K. (2005) The ATP hydrolysis and phosphate release steps control the time course of force development in rabbit skeletal muscle. *J Physiol.* **563**, 671-8
- Smith, C.A. und Rayment, I. (1996). X-ray structure of the magnesium(II).ADP.vanadate complex of the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain to 1.9 Å resolution. *Biochemistry* **35**, 5404-5417
- Spudich, J. A. und Watt, S. (1971). The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J Biol Chem* **246**, 4866-4871
- Spudich, J.A. (2001) The myosin swinging cross-bridge model. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 387-392
- Steffen, W. und Sleep, J. (2004) Repriming the actomyosin crossbridge cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 12904-12909
- Sutoh, K., Ando, M., Sutoh, K. Und Toyoshina, Y.Y. (1991) Site-directed mutations of *Dictyostelium* actin: disruption of a negative charge cluster at the N terminus. *Proc Natl Acad Sci USA* **88** (17), 7711-7714
- Sweeney, H.L., Park, H., Zong, A.B., Yang, Z., Selvin, P.R. und Rosenfeld, S.S. (2007) How Myosin VI coordinates its heads during processive movement. *EMBO J* **26** (11), 2682-2692
-

-
- Taft, M.H., Hartmann, F.K., Rump, A., Keller, H., Chizhov, I., Manstein, D.J. und Tsiavaliaris, G. (2008). Dictyostelium myosin-5b is a conditional processive motor. *J Biol Chem* **283**, 26902-26910
- Taft, M.H. (2007) Mechanismus und Regulation eines prozessiven Klasse V Myosins
- Tamagawa, Y., Ishikawa, K., Ishida, T., Kitamura, K., Makino, S., Tsuru, T. und Ichimura, K. (2002) Phenotype of DFNA11: a nonsyndromic hearing loss caused by a myosin VIIa mutation. *Laryngoscope* **112**, 292-297
- Thaller, C., Weaver, L.H., Eichele, G., Wilson, E., Karlsson, R. und Jansonics, J.N. (1981). Repeated Seeding Technique for Growing Large Single Crystals of Proteins. *J Mol Biol* **174**, 465-469
- Thaller, C., Eichele, G., Weaver, L.H., Wilson, E., Karlsson, R. und Jansonics, J.N. (1985) Diffraction methods for biological macromolecules. Seed enlargement and repeated seeding. *Methods Enzym* **114**, 132-135
- Trentham, D. R., Bardsley, R. G., Eccleston, J. F., und Weeds, A. G. (1972). Elementary processes of the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase activity of heavy meromyosin. A transient kinetic approach to the study of kinases and adenosine triphosphatases and a colorimetric inorganic phosphate assay in situ. *Biochem J* **126**, 635-644
- Trybus, K.M. (2008) Myosin V from head to tail. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1378-1389
- Tsiavaliaris, G., Fujita-Becker, S. und Manstein, D.J. (2004) Molecular engineering of a backwards-moving myosin motor. *Nature* **427**, 558-561
- Uyeda, T.Q., Abramson, P.D. und Spudich, J.A. (1994) Enzymatic Activities correlate with chimeric substitutions at the actin-binding face of myosin. *Nature* **368**, 567-569
- Vale, R.D. (1987) Intracellular transport using microtubule-based motors. *Annu Rev Cell Biol* **3** 347-378
- Vale, R.D. (1996) Switches, latches, and amplifiers: common themes of G proteins and molecular motors. *J Cell Biol* **135**, 291-302
- Vale, R.D. und Milligan, R.A. (2000) The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* **288** (5463), 88-95
- Van Dijk, J., Furch, M., Lafont, C., Manstein, D. J. und Chaussepied, P. (1999). Functional characterization of the secondary actin binding site of myosin II. *Biochemistry* **38**, 15078-15085
- Veigel, C., Wang, F., Bartoo, M.L., Sellers, J.R. und Molloy, J.E. (2002) The gated gait of the processive molecular motor, myosin V. *Nat Cell Biol* **4**, 59-65
- Veigel, C., Schmitz, S., Wang, F., und Sellers, J. R. (2005) Load-dependent kinetics of myosin-V can explain its high processivity. *Nat Cell Biol.* **7**, 861-9
- Verhey, K.J. und Rapoport, T.A. (2001) Kinesin carries the signal. *Trends Biochem Sci* **26**, 545-550
- Walker, M.L., Burgess, S.A., Sellers, J.R., Wang, F., Hammer, J.A., 3rd, Trinick, J. und Knight, P.J. (2000) Two-headed binding of a processive myosin to F-actin. *Nature* **405**, 804-807
- Warshaw, D.M., Kennedy, G.G., Work, S.S., Kremntsova, E.B., Beck, S. und Trybus, K.M. (2005) Differential Labeling of Myosin V Heads with Quantum Dots Allows Direct Visualization of Hand-Over-Hand Processivity. *Biophys J* **88**, L30-32
- White, H.D., Belknap, B. Und Webb, M.R. (1997) Kinetics of nucleoside triphosphate cleavage and phosphate release steps by associated rabbit skeletal actomyosin, measured using a novel fluorescent probe for phosphate. *Biochemistry* **36**, 11828-11836
-

-
- Wong, W.W., Doyle, T.C. und Reisler E. (1999) Nonspecific Weak Actomyosin Interactions: Relocation of Charged Residues in Subdomain 1 of Actin Does Not Alter Actomyosin Function. *Biochemistry* **38**, 1365-1370
- Yengo, C.M., De La Cruz, E.M., Safer, D., Ostap, E.M. und Sweeney, H.L. (2002). Kinetic Characterization of the weak binding states of myosin V. *Biochemistry* **41**, 8508-8517
- Yengo, C.M. und Sweeney, H.L. (2004). Functional Role of Loop 2 in Myosin V. *Biochemistry* **43**, 2605-2612
- Yildiz, A., Forkey, J.N., McKinney, S.A., Ha, T., Goldman, Y.E. und Selvin, P.R. (2003) Myosin V Walks Hand-Over-Hand: Single Fluorophore Imaging with 1.5-nm Localization. *Science* **300**, 2061-2065
- Yu, H., Yang, Y., und Cui, Q. (2007) Mechanochemical coupling in the myosin motor domain.I. Insights from equilibrium active-site simulations. *PLoS Comput Biol* **3**, 21
- Yuan, Z., Zhao, J. und Wang, Z.X. (2003) Flexibility analysis of enzyme active sites by crystallographic temperature factors. *Protein* **16**, 109-114
- Zeng, W., Connibear, P.B., Dickens, J.L., Cowie, R.A., Wakelin, S., Malnasi-Csizmadia, A., Bagshaw, C.R. (2004) Dynamics of actomyosin interactions in relation to the cross-bridge cycle. *Phil Trans R Soc B* **359**, 1843-1855

6. *Publikationen*

Targeted optimization of a protein nanomachine for operation in biohybrid devices

Amrute-Nayak, M; Diensthuber, RP; Steffen, W; Kathmann, D; Fedorov, R; Hartmann, FK; Urbanke, C; Manstein, DJ; Brenner, B; Tsiavaliaris, G.

Angewandte Chemie International Edition **49**, 312-316

Molecular Mechanism of Pentachloropseudilin Mediated Inhibition of Myosin Motor Activity

Chinthalapudi, K., Taft, M.H., Hartmann, F.K., Fedorov, R., Kathmann, D., Martin, R., Knölker, H-J., Coluccio, L.M., Tsiavaliaris, G., Gutzeit, H.O., Manstein, D.M.

Manuskript in Vorbereitung

Switch-2 dependent modulation of the myosin power stroke

Daniela Kathmann, Ralph P. Diensthuber, Falk K. Hartmann, Roman Fedorov, Dietmar J. Manstein, and Georgios Tsiavaliaris

Manuskript in Vorbereitung

7. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kathmann
Vorname: Daniela
Geburtstag: 14.11.1980
Geburtsort: Hannover, Germany
Adresse: Pfarrlandplatz 5, 30451 Hannover
Nationalität: deutsch
Familienstatus: ledig

Ausbildung

06/2000 Abitur am Ulrichsgymnasium Norden, Abiturnote 1,8
10/2000 – 04/2005 Biochemiestudium an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover und der Medizinischen Hochschule Hannover
04/2005 – 10/2005 Diplomarbeit am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover
Thema: Strukturelle und funktionelle Untersuchung des Fokaladhäsionsprotein β -Parvin
12/2005 Diplom in Biochemie an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Note: Sehr gut

Berufserfahrung

04/2003 - 06/2003 Studentische Hilfskraft am Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover, Biochemiepraktikum für Medizinstudenten
10/2003 -12/2003 Studentische Hilfskraft am Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover, Biochemiepraktikum für Medizinstudenten
10/2004 -12/2004 Studentische Hilfskraft am Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover, Biochemiepraktikum für Biochemiker
seit 01/2006 Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Georgios Tsiavaliaris im Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover