

# **Mechano-chemische Kopplung von Myosin V**

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von

Dipl.-Biochem. Aike Torben Schweda  
geboren am 17.09.1981 in Wilhelmshaven

2010

Referent: Prof. Dr. med. Bernhard Brenner

Korreferent: Prof. Dr. rer.nat. Walter Müller

Tag der Promotion: 18.11.2010

## Zusammenfassung

Myosine sind Motorproteine, die zahlreiche intrazelluläre Transportvorgänge vermitteln. Myosin V ist ein dimeres Molekül, das sich durch wechselseitige Bindung seiner beiden Köpfe an Aktin-Filamente prozessiv fortbewegt. Die Energie hierfür gewinnt es aus der Hydrolyse von ATP zu ADP und anorganischem Phosphat. Die prozessive Bewegung ist zum einen möglich durch eine lange Verweilzeit der Myosin-Köpfe am Aktin. Diese wird erreicht durch Adaption des kinetischen Zyklus des Myosins an die prozessive Bewegung: Das Myosin verweilt lange in fest an Aktin gebundenen Zuständen. Dies sind der ADP-gebundene und der nukleotidfreie Zustand. Zum anderen werden die Köpfe durch intramolekulare Wechselwirkungen koordiniert: Wirkt auf den Hebelarm eines Myosinkopfs eine Kraft entgegen der Richtung der Bewegung des Moleküls, so wird die Freisetzung von ADP stark verlangsamt. Dies führt dazu, dass ein vorderer Kopf auf dem Aktin-Filament gleichsam auf den nachfolgenden wartet.

Bisher nicht geklärt ist, wieso die Kinetik des ADP-Zustands des Myosins stark abhängig von anliegenden Kräften ist bzw. wie die Vermittlung zwischen dem Einwirken mechanischer Kräfte und der Reaktionskinetik der Nukleotidbindungstasche funktioniert.

Außerdem ist nicht bekannt, wie genau mechanische Ereignisse im Reaktionszyklus von Myosin V (der zweigeteilte Kraftschlag) und biochemische Ereignisse aneinander gekoppelt sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein einzelköpfiges Myosin V-Molekül in Sf9-Zellen mit Hilfe eines Baculovirus-Systems exprimiert und mit Hilfe einer optischen Falle untersucht.

Es wurde, um Änderungen der mechanischen Eigenschaften des Myosins darzustellen, ein neuer experimenteller Aufbau für sogenannte Drei-Kugel-Experimente in der optischen Falle entwickelt. Entgegen bisheriger Arbeiten wurde das dort aufgespannte Aktin-Filament nicht mehr lateral über eine Biotin-/Neutravidin-Bindung an Latexkugeln gebunden sondern senkrecht zur Oberfläche der Kugel über das Aktin-bindende Protein Gelsolin. Die Steifheit der Verbindung konnte so um den Faktor vier verbessert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der verbesserten Aktin-Hantel gezeigt, dass im katalytischen Zyklus parallel zum zweiten Teil des Kraftschlags eine Erhöhung der Steifheit des Moleküls auftritt. Diese Erhöhung der Steifheit um etwa 30% geht mit dem zweiten Kraftschlag einher, nicht jedoch mit der ADP-Freisetzung. Dies könnte mit Hilfe eines durch Fisher et al., 2005 beschriebenen "Wippen"-Mechanismus erklären, warum die Kinetik des "weicheren" Zustands vor dem zweiten Kraftschlag stärker durch am Motor anliegenden Kräfte beeinflusst wird, als die des steiferen Zustands nach dem zweiten Kraftschlag.

Es wurde zudem gezeigt, dass die Freisetzung ADP vor dem zweiten Kraftschlag von Myosin V erfolgt und somit zwei nukleotidfreie Zustände vor bzw. nach dem zweiten Kraftschlag existieren müssen.

Für den ersten Kraftschlag von Myosin V, der mit der Freisetzung von Phosphat einhergehen soll, wurde gezeigt, dass die Ausführung des Kraftschlags nicht allein durch die Freisetzung von Phosphat aus der Nukleotidbindungstasche limitiert wird, sondern vermutlich primär durch die Dauer der Aktinbindung des ADP-/Phosphatzustands des Myosins. Es konnte gezeigt werden, dass selbst bei verminderter Temperatur, in Gegenwart von Phosphationen und unter Verwendung einer Myosin-Mutante mit stark verlangsamer Phosphatfreisetzung kein sogenannter initialer Bindezustand darstellbar ist, in dem das Myosin zwar bereits an Aktin gebunden vorliegt aber noch nicht den ersten Kraftschlag ausgeführt hat.

**Schlagworte:** Myosin V, Steifheit, ADP-Freisetzung

## **Abstract**

Myosin V is a molecular motor, which is able to move processively along actin filaments via a hand-over-hand-mechanism. The special features of ADP-release of the myosins ATPase-cycle allow this processive movement: First, ADP-release from the myosin head is slow. For that reason, the myosin stays most time of its catalytic cycle in its ADP-state, which is strongly bound to actin. Second, the myosin heads are coordinated by intramolecular strain within the myosin-dimer: If on the one hand the leading head of walking myosin V is pulled backwards by its trailing head, the rate of ADP-release of the leading head is reduced. So the leading head is forced to wait for the release of the trailing head from actin. On the other hand, the rate of ADP-release of an unstrained head or a head which is strained in direction of myosin movement is not affected or slightly increased, respectively. This head-to-head-communication leads to a coordination of the myosin heads supporting the processive movement of the molecule.

It is not known, why mechanical forces applied to the myosins lever arm may interfere with the kinetics of the nucleotide binding pocket. Furthermore it remains unclear, how mechanical events within the catalytic cycle of myosin (first and second power stroke) are correlated with myosin kinetics.

So in this study single-headed myosin V was expressed using a baculovirus expression system and studied in an optical trap setup. To improve the actin-dumbbell used in a three-bead-configuration described by Finer et al. (1994) the attachment of actin to one of the trapped latex beads was modified as follows: The actin filament was not bound laterally to the bead like in previous studies but fixed via an end-on-link using the actin-binding protein gelsolin. The stiffness of this modified link was increased by a factor of five in comparison to the lateral neutravidin-link.

Using this improved actin-dumbbell it was possible to detect an increase in stiffness of myosin V. This increase in stiffness coincides with the second power stroke but not with ADP-release. ADP-release, instead, is shown to occur before the second power stroke. Using the seesaw-mechanism described by Fisher et al. (2005) changes in stiffness could explain why the kinetics of the myosin state prior to the second power stroke are highly dependent on mechanical forces applied to the myosins lever arm, while kinetics of the rigor-state following the second power stroke are not.

For the first power stroke which is thought to be associated with phosphate release it was shown that phosphate release is not a limiting step for the first power stroke of myosin V. It was not possible to detect an initial binding state of the myosin prior to the power stroke even in a myosin V mutant with very slow rates of phosphate release. So the lifetime of an initial binding state can only be limited by actin-binding and -dissociation of the myosin while phosphate release is not or less relevant for the limitation of the lifetime of the initial binding state.

**key words:** myosin V, stiffness, ADP-release

<b>1. Einleitung</b>	1
<b>2. Ergebnis</b>	10
<b>3. Diskussion</b>	30
<b>4. Material und Methoden</b>	42
<b>5. Danksagungen</b>	62
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	63
<b>Anhang</b>	70

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Motormoleküle und Myosinfamilie	1
1.2. Myosin V	2
1.2.1. Struktur von Myosin V	3
1.2.2. ATPase-Zyklus von Myosin V	4
1.3. Zielsetzung	8
<b>2. Ergebnis</b>	<b>10</b>
2.1. Expression von Myosin V-Motormolekülen in Sf9-Zellen	10
2.2. Orientierungsspezifische Anheftung eines Aktinfilaments an eine Latexkugel	12
2.2.1. Beobachtung von Myosin-Bewegungsvorgängen in der optischen Falle	12
2.2.2. Verbesserung der Aktin-Latexkugel-Verbindung in einer Aktin-Hantel	13
2.3. Änderung der mechanischen Eigenschaften von Myosin V im ATPase- Zyklus und ihre Verbindung zu kinetischen Parametern	15
2.3.1. Die Steifheit von Myosins V erhöht sich nach dem zweiten Kraftschlag	15
2.3.2. Der zweite Kraftschlag von Myosin V folgt nach der ADP-Freisetzung	19
2.3.2. Die Freisetzung von Phosphat limitiert nicht die Ausführung des ersten Kraftschlags	22
<b>3. Diskussion</b>	<b>30</b>
3.1. Verbesserung der Gelsolin-Hantel	30
3.2. Der zweite Kraftschlag vom Myosin V erfolgt der nach der ADP-Freisetzung und geht mit einer Erhöhung der mechanischen Steifheit von Myosin V einher	30
3.3. Die Freisetzung von Phosphat limitiert nicht allein die Ausführung des Kraftschlags	35
3.4. Ausblick	40
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>42</b>
4.1. Material	42
4.1.1. Chemikalien	42
4.1.2. Proteine	44
4.1.2.1. Restriktionsenzyme	44
4.1.2.2. sonstige Proteine	44
4.1.3. Nukleinsäuren	44
4.1.3.1. Plasmide	44
4.1.3.2 Oligonukleotide	44
4.1.4. Puffer und Lösungen	44
4.1.5. Organismen	45
4.1.5.1. Bakterien	45
4.1.5.2. Eukaryotische Zelllinien	45
4.1.5.3. Verwendete Tierspezies	45
4.1.6. sonstige Produkte, Dienstleistungen	45
4.1.7. Software	46
4.1.8. Geräte	46
4.2. Methoden	47
4.2.1. Biochemische Methoden	47
4.2.1.1. RNA-Isolierung	47
4.2.1.2. DNA-Isolierung	47
4.2.1.3. Isolierung von Aktin aus Skelettmuskel	48
4.2.1.4. Isolierung von Gelsolin und Kopplung an Latexkugeln	48
4.2.1.5. Aufreinigung von FLAG-markiertem Myosin	49
4.2.1.6. Agarosegelelektrophorese	50
4.2.1.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
4.2.1.8. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran (Western Blot)	50
4.2.1.9. Beschichtung von Latexkugeln mit Neutraavidin	51

4.2.2. Molekularbiologische Methoden	51
4.2.2.1. Bakterienkultur	51
4.2.2.2. Klonierung von Plasmiden	51
4.2.2.3. Generierung von Bacmiden	52
4.2.2.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)	54
4.2.2.5. Reverse Transkription	54
4.2.2.6. Mutagenese	54
4.2.3. Zellkultur	55
4.2.3.1. Kultur von Sf9-Zellen	55
4.2.3.2. Transfektion von Sf9-Zellen	55
4.2.3.3. Vermehrung von Baculoviren und Proteinexpression	56
4.2.4. Experimente in der optische Falle	56
4.2.4.1. Experimenteller Aufbau	56
4.2.4.2. Auswertung	57
<b>5. Danksagungen</b>	<b>62</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>63</b>
<b>Anhang</b>	<b>70</b>
Verwendete Programme	70
Generierte Vektoren	75

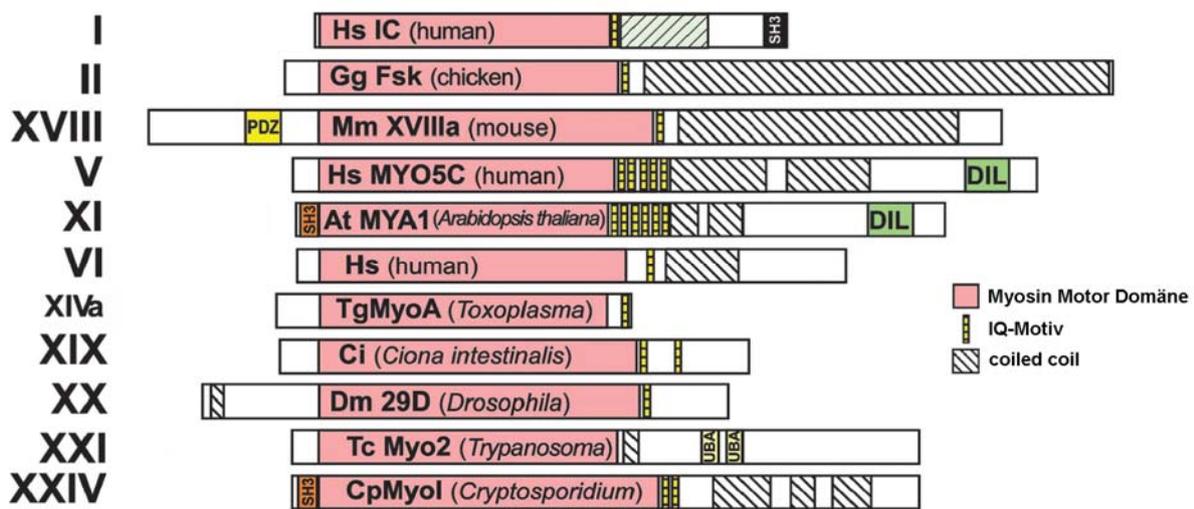
## Verwendete Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CTP	Cytosintriphosphat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxiribonucleic Acid, Desoxiribonukleinsäure
etc.	et cetera
evtl.	eventuell
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanodintriphosphat
MCS	multiple cloning site
o.g.	oben genannt
OD	optische Dichte
Pi	anorganisches Phosphat ( $\text{PO}_4^{3-}$ )
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
TTP	Thymidintriphosphat
u.a.	unter anderem
u.g.	unten genannt
UV	ultraviolett
z.B.	zum Beispiel

# 1. Einleitung

## 1.1. Motorproteine und Myosinfamilie

Motorproteine sind eine Gruppe von Proteinen, die ATP-abhängig Bewegungs- und Transportvorgänge in Zellen vermitteln. Zu ihnen gehören drei Motortypen: Die Kinesine, Dyneine und Myosine. Kinesine und Dyneine bewegen sich dabei entlang von Mikrotubuli, Myosine an Aktin-Filamenten.



**Abbildung 1.1.1.:** Ausgewählte Myosin-Klassen (verändert nach Foth *et al.* (2006)). Allen Myosinen gemeinsam ist die Struktur aus N-terminalem konserviertem Kopf (Motor-Domäne), dem Hals (i.d.R. mit an IQ-Motiven gebunden leichten Ketten) und C-terminalem klassenspezifischem Schwanz.

Die Familie der Myosine umfasst 24 bekannte Klassen (Foth *et al.* (2006), Abb.1.1.1). Alle Myosine bestehen aus einem N-terminalen Kopf, der die ATPase-Domäne enthält, Aktin bindet und die Kraft oder Bewegung generiert. Zudem trägt jedes Myosin einen klassenspezifischen Schwanz, der im Gegensatz zur Motordomäne zwischen den Klassen hoch variabel in seiner Sequenz ist.

Die bekannteste Klasse, sind die Myosine II, welche die Muskelkontraktion vermitteln. Es existieren jedoch auch nicht-muskuläre Myosine der Klasse II, die in Cytokinese, Phagozytose und Entwicklung von Zellpolarität involviert sind (Yutzey *et al.* (1994), Guo und Kemphues (1996), Stossel und Hartwig (1976)). Myosine der Klasse I vermitteln z.B. Endozytose (Geli und Riezman (1996)), den Aufbau von Mikrovilli (Mooseker und Tilny (1975)) und die Funktion von Stereocilien (Gillespie *et al.* (1993)). Die Myosine der Klasse VI unterscheiden sich von allen anderen Klassen darin, dass sie sich aufgrund einer strukturellen Veränderung in der Verankerung ihres Hebelarms an der katalytischen Domäne zum Minus-Ende von Aktin-Filamenten bewegen (Menetry *et al.* (2005)). Sie sind verantwortlich für den Transport von Vesikeln, die Verschiebung von Aktinfilamenten, die

Funktion von Haarzellen der Cochlea (Self *et al.* (1999)) und spielen eine Rolle bei der Entwicklung von Prostatakrebs (Dunn *et al.* (2006)). Für Myosin VII ist bekannt, dass Mutationen in seiner Sequenz zum Usher-Syndrom führen, dessen Symptome Taubheit von Geburt an und etwa ab dem zehnten Lebensjahr einsetzende Erblindung sind. Verantwortlich hierfür ist das Unvermögen der Zellen mit einem defekten Myosin VII Zilien auszubilden (Weil *et al.* (1995)). Schließlich gehört zu den bekanntesten Myosin-Klassen auch das Myosin der Klasse V, da es das klassische Beispiel eines prozessiven Myosin-Motors darstellt (Sakamoto *et al.* (2000), Rief *et al.* (2000)). Prozessiv sind Proteine, die ihre katalytische Funktion wiederholt ausführen können, ohne sich von ihrem Substrat zu lösen. Im Falle der Myosine kann ein prozessives Myosin sich also über weite Strecken an einem Aktin-Filament bewegen. Die meisten Myosine sind wenig bis nicht prozessiv.

## 1.2. Myosin V

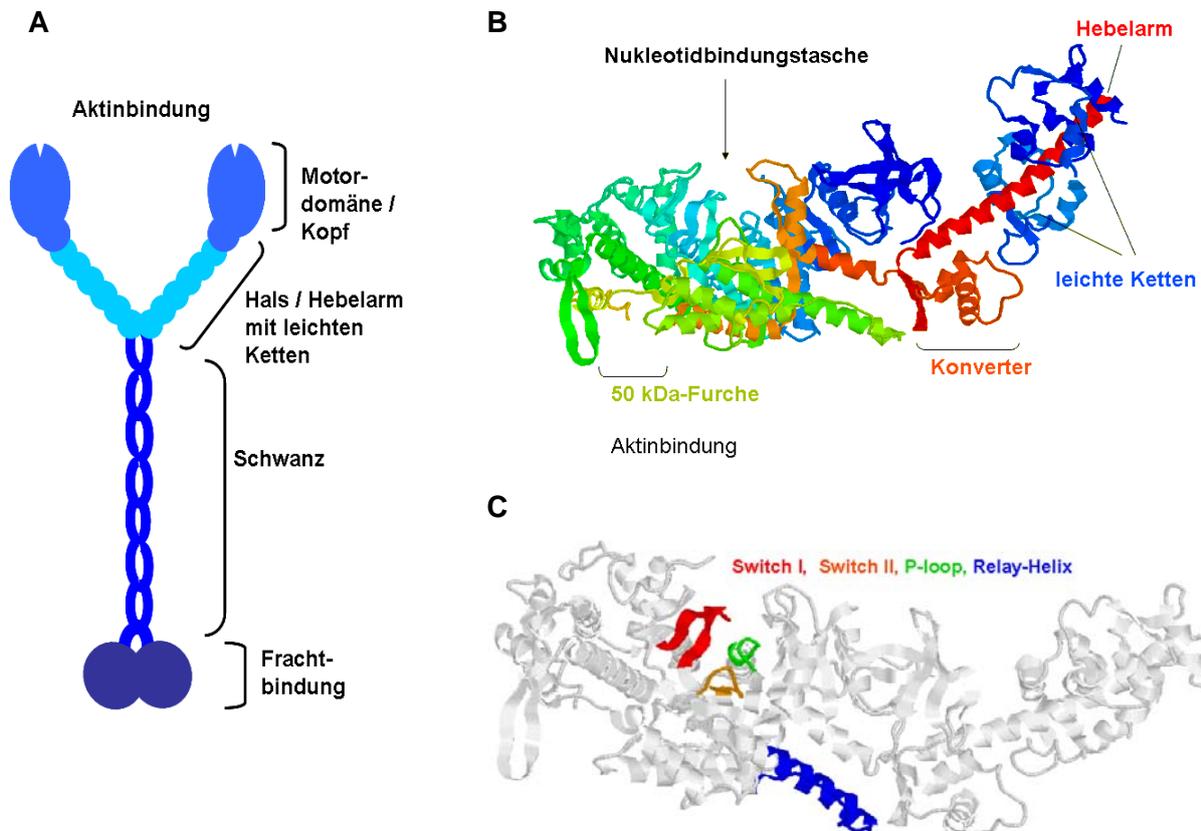
Das erste Myosin der Klasse V wurde zuerst als ungewöhnliches Calmodulin-bindendes Protein von Larson *et al.* (1990) identifiziert. Es wurde durch Espindola *et al.* (1992) als dem Myosin II ähnlich beschrieben und ist aufgrund seiner ungewöhnlichen kinetischen Eigenschaften als prozessiver Motor heute ein gut untersuchtes jedoch nicht vollständig verstandenes Molekül.

Myosin V ist in zahlreiche zelluläre Transportvorgänge involviert. So ist bekannt, dass es mRNA transportieren kann (z.B. Sil und Herskowitz (1996), Takizawa *et al.* (1997)).

Außerdem sind Klasse V-Myosine in den Transport von Membranen und Organellen involviert. Es ist bekannt, dass Myosin V an der Verteilung der Vakuole auf die Tochterzellen bei der Zellteilung von Hefen mitwirkt (Catlett und Weisman (1998)) und den Transport von sekretorischen Vesikeln vermittelt (Govindan *et al.* (1995), Lillie und Brown (1994)). Es ist ferner am Transport von Golgi-Apparat (Rossanese *et al.* (2001)), Peroxisomen (Hoepfner *et al.* (2001)) und Mitochondrien (Itoh *et al.* (2002)) beteiligt und für den Transport von Melanosomen verantwortlich.

Klinisch relevant sind Mutationen des Myosins V, da sie beim Menschen zum Griscelli-Syndrom führen können. Das Griscelli-Syndrom zeichnet sich durch Verteilungsstörungen von Melanosomen aus, weshalb Patienten in der Regel silbrig-weißes Haar haben. Zudem können neurologische und immunologische Störungen auftreten, die ebenfalls auf gestörten intrazellulären Transport zurückzuführen sind: So wird vermutet, dass Myosin V u.a. bei der korrekten Verteilung und/oder Fixierung des endoplasmatischen Retikulums in Purkinje-Zellen mitwirkt, was deren Calcium-Hömoostase stören könnte (Takagishi *et al.* (1996)). Ein analoger Phänotyp zum humanen Griscelli-Syndrom findet sich auch bei Ratten. Hier jedoch tritt meist nur eine hellere Fellfärbung auf (sog. dilute-Phänotyp).

### 1.2.1. Struktur von Myosin V



**Abb. 1.2.1. Myosin V-Struktur** **A** Schema des Myosin V-Proteinkomplexes, **B+C** Myosin V-Fragment (Motordomäne und Beginn des Hebelarms) (Struktur nach Coureux *et al.* (2004) (ADP-BeF<sub>x</sub>-Struktur))

Myosin V ist ein Proteinkomplex aus insgesamt 14 Komponenten. Die sogenannte schwere Kette (etwa 210 kDa) des Myosins besteht aus den Domänen Kopf oder Motordomäne, Hals, Schwanz und Frachtbindedomäne (s. Abb. 1.2.1.). Die globulären Motordomänen binden an Aktin, katalysieren die Spaltung von ATP und setzen die daraus freigesetzte Energie in Bewegung um (Cheney *et al.* (1993)). Ihnen folgt C-terminal der  $\alpha$ -helicale Hals des Myosins, der den festen Hebelarm beim Kraftschlag bildet und in der sogenannten Konverterregion entspringt (Coureux *et al.* (2003 und 2004), Burgess *et al.* (2002)). An den Hebelarm sind über sogenannte IQ-Motive der Myosin-Sequenz die leichten Ketten gebunden. Dies sind pro schwerer Kette je fünf Calmoduline und beim Myosin V des Huhns eine regulatorische leichte Kette (Abb. 1.2.1.) (Wang *et al.* (2000), Espindola *et al.* (2000)). Bei anderen Spezies wurden stattdessen auch Myosin V-Komplexe mit sechs Calmodulinen pro schwerer Kette gefunden. Dem Hals folgt C-terminal der Schwanz, in dem die beiden schweren Ketten über ein coiled coil dimerisieren. Dieser wird von globulären Bereichen unterbrochen und der Frachtbindedomäne abgeschlossen. In Analogie zum Subfragment 1 eines Papain-Verdau von Myosin II (Wolodko und Kay (1975)) wird ein einzelköpfiges Molekül Myosin V-S1

genannt (Abb. 1.2.1.). Es besteht aus der katalytischen Domäne (dem Kopf) und dem Hals des Myosins mit den gebundenen leichten Ketten.

### 1.2.2. ATPase-Zyklus von Myosin V

Myosin V ist ein prozessiver Motor, der sich über einige Mikrometer in 36 nm-Schritten prozessiv an Aktin-Filamenten entlang bewegen kann (Mehta *et al.* (1999b)). Durch abwechselnde Bindung der Myosinköpfe kann es fortwährend mit einem Kopf an das Filament gebunden bleiben (Walker *et al.* (2000), Yildiz *et al.* (2003)). Zudem liegt es den größten Teil seines katalytischen Zyklus in fest an Aktin gebundener Form vor, die "duty ratio" (der Anteil stark Aktin-gebundener Zustände am katalytischen Zyklus) ist etwa 0,7 (De La Cruz (1999)) bis 0,85 (Forgacs *et al.* (2009)). Zentraler Schritt des katalytischen Zyklus ist die langsame Abgabe von ADP, die sicherstellt, dass das Myosin lange fest an Aktin gebunden vorliegt. Die schwach an Aktin gebundenen Zustände hingegen, in denen das Myosin ATP oder ADP und Phosphat gebunden hat, werden schnell durchlaufen. So ist eine prozessive Bewegung möglich, die jedoch darüber hinaus noch durch intramolekulare Koordinationsmechanismen weiter verbessert wird.

Innerhalb der Motordomäne sind folgende strukturelle Elemente für die Funktion des Myosins relevant (vgl. Abb. 1.2.1.):

Die sogenannte Konverterregion liegt am Ansatzpunkt des Halses an der katalytischen Domäne. Sie setzt vermutlich die Energie aus der Hydrolyse des ATP in eine Bewegung des Hebelarms um. Am gegenüber liegenden Ende des Myosins befindet sich die Aktin-Bindestelle des Myosins. Sie wird von zwei zusammen etwa 50 kDa schwere Domänen U50 und L50 gebildet. Diese verändern im Zuge und ATP-Hydrolyse ihre Position zueinander und verändern dadurch die Aktin-Affinität der Motordomäne (Abb. 1.2.3.). Zwischen beiden besteht eine Furche, die im ATP- und ADP/Phosphat-gebundenen Zustand des Myosins geöffnet wird, in Aktin-gebundenen Zuständen hingegen geschlossen ist (Coureux *et al.* (2004)). Die dabei auftretende Verschiebung der beiden Domänen gegeneinander beeinflusst nicht nur die Aktin-Bindestelle, sondern auch die Nukleotidbindungstasche und den

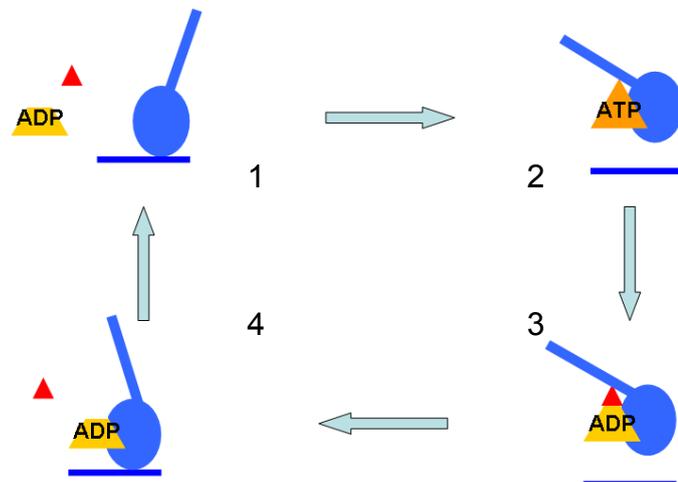


Abb. 1.2.2. ATPase-Zyklus von Myosin V am Beispiel eines einzelnen Kopfes. Blau: Myosin V-S1/Aktin, rot: Phosphat-Ion.

Konverter mit dem Hebelarm. Das bedeutet, dass über die Verschiebung von U50- und L50-Domäne gegeneinander sich diese Elemente gegenseitig beeinflussen können.

In der Nukleotidbindestelle des Myosins sind drei Sequenzbereiche an der Koordination des Nukleotids beteiligt: Switch I, Switch II und der P-loop (Abb. 1.2.1.C). Die Übertragung der Konformationsänderungen dieser Elemente wird über die sogenannte Relay-Helix auf den Konverter und damit den Hebelarm des Myosins übertragen.

Dabei wird vermutet, dass die Relay-Helix sich um einen festen Punkt innerhalb des Myosinkopfes ähnlich einer "Wippe" dreht und so Konformationsänderungen der Nukleotidbindungstasche auf den Hebelarm überträgt und ggf. umgekehrt (s.u.) (Fischer *et al.* (2005) und Malnasi-Csizmadia *et al.* (2007)).

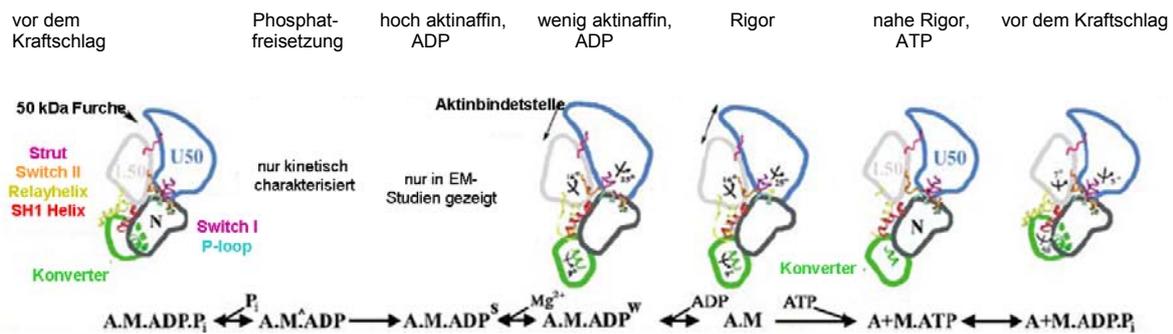
#### *Nukleotidfreier (Rigor-analoger) Zustand (Abb. 1.2.2. Zustand 1)*

In Abwesenheit von ATP liegt Myosin V stark gebunden an Aktin-Filamente vor. Der Hebelarm befindet sich in der Position nach dem Kraftschlag. (vgl. Abb. 1.2.2.). Die Furche zwischen den U50- und L50-Domänen ist geschlossen, die Nukleotidbindungstasche ist leer.

#### *ATP-gebundener Zustand (Abb. 1.2.2. Zustand 2)*

Die Bindung von ATP bewirkt Konformationsänderungen im Myosinkopf, die die Dissoziation von Aktin bewirken und zudem für das "Zurückschwingen" des Hebelarms sorgen. Es wird vermutet, dass das Schließen der Nukleotidbindungstasche nach der ATP-Bindung mit der Hydrolyse des ATP und dem Zurückschwingen des Hebelarms einhergeht. Zudem wird dabei die 50 kDa-Furche geöffnet, was mit einer Verminderung der Aktin-Affinität des Myosins einhergeht (Coureux *et al.* (2004), Steffen und Sleep, (2004)). Die Bindung von ATP erfordert größere strukturelle Änderungen der Nukleotidbindungstasche, insbesondere, um Platz für den  $\gamma$ -Phosphatrest des ATP zu schaffen. Dies bewirkt u.a. vermutlich eine Störung der Interaktion von zwei Elementen der Nukleotidbindungstasche, Switch I und P-loop (Abb. 1.2.4.C, Coureux *et al.* (2004)). Im ATP-gebundenen Zustand sind die beiden nun an der Koordination des Nukleotids beteiligt. Es wird vermutet, dass die Uorientierung des P-loops für eine Rotation des Konverters sorgt, der seinerseits die Position des Hebelarms bestimmt (Cecchini *et al.* (2008)). Außerdem erzwingt die ATP-Bindung durch die Konformationsänderungen der Nukleotidbindungstasche wahrscheinlich ein Öffnen der Furche zwischen den zuvor genannten 50 kDa-Subdomänen. So bewirkt die ATP-Bindung vermutlich eine Schwächung der Interaktion von Aktin und Myosin und damit die Dissoziation des Myosins vom Aktin-Filament (Coureux *et al.* (2004)). Ohne Bindung an Aktin erfolgt nun die Hydrolyse von ATP (gezeigt für Myosin II in (Malnasi-Csizmadia *et al.* (2007) und Yu *et al.* (2007)). Dazu erfolgt eine Änderung der Konformation eines weiteren Elements der Nukleotidbindungstasche, Switch II. Dies führt dazu, dass die Furche zwischen U50 und L50-

Domäne wieder partiell geschlossen werden kann, was seinerseits die korrekte Positionierung eines zur Hydrolyse erforderlichen Wassermoleküls (Coureux *et al.* (2004)) ermöglicht. Außerdem wird vermutet, dass zwischen den Hebelarmpositionen vor bzw. nach dem ersten Kraftschlag ein Gleichgewicht besteht, der Hebelarm also gleichsam zwischen beiden Positionen wechseln kann. Dieses Gleichgewicht wird durch die ATP-Hydrolyse vermutlich stark in Richtung der Hebelarmposition vor dem Kraftschlag verschoben, der Hebelarm also gewissermaßen in dieser Position arretiert (Malnasi-Csizmadia *et al.* (2007)).



**Abb. 1.2.3. Strukturelle Veränderungen im ATPase-Zyklus von Myosin V** (verändert nach: Coureux *et al.* (2004)).

ADP/Phosphat-gebundener Zustand (Abb. 1.2.2. Zustand 3)

Das Myosin befindet sich nach der Hydrolyse in einem nicht oder nur schwach an Aktin gebundenen Zustand, der noch keinen Kraftschlag ausgeführt hat. Dieser Zustand wird vermutlich durch die Bindung von ADP und Phosphat in einer Konfiguration stabilisiert, die den Kraftschlag verhindert (Malnasi-Csizmadia *et al.* (2007) und Yu *et al.* (2007)). Bei der erneuten Bindung an Aktin wird die Furche zwischen U50- und L50-Domäne geschlossen. Bei Myosin II bewirkt dies eine Destabilisierung des Phosphatrestes in der Nukleotidbindungstasche (Kraft *et al.* (1992)). Dadurch kommt es dann zur Freigabe des Phosphats und zu einer Umlagerung des Hebelarms, die das Ende des Hebelarms um 16 nm bzw. 20 nm bewegt (erster Kraftschlag) je nachdem, ob ein einzelköpfiges oder doppelköpfiges Myosin verwendet wurde (Veigel *et al.* (2002), Sellers und Veigel (2010)). Diese Prozesse sind sehr schnell und daher bisher nicht aufgelöst (die Geschwindigkeitskonstante der Phosphatfreisetzung beträgt ca.  $200 \text{ s}^{-1}$  (Rosenfeld und Sweeney (2004)). Strukturdaten legen jedoch nahe, dass das Schließen der Furche zwischen U50- und L50-Domäne bei der Aktin-Bindung konformationelle Änderungen in der Nukleotidbindungstasche bewirkt. Dort vermutet man, dass Switch II als Sensor für die Abgabe des Phosphatrestes fungiert und über die sogenannten Relay-Helix und den Konverter die Phosphatfreigabe mit dem Kraftschlag verknüpft (Coureux *et al.* (2004)).

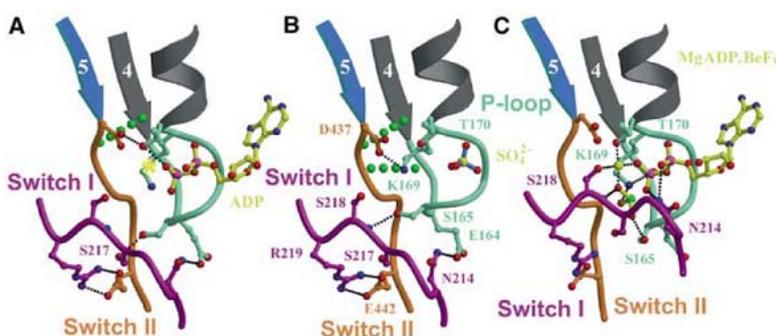
### ADP-Zustand (Abb. 1.2.2. Zustand 4)

Im nun nur noch ADP-gebundenen Myosin kann Switch I zwei verschiedene Konformationen einnehmen (Coureux *et al.* (2004)). Diese Konformationsänderung reguliert möglicherweise die Freigabe des Magnesiumions, das als Kofaktor bei der Hydrolyse benötigt wird (Cheney *et al.* (1993)). Auch einige kinetische Studien wie z.B. jene von Hannemann *et al.* (2005) legen die Existenz zweier ADP-Zustände nahe, die sich wahrscheinlich in der Besetzung des Myosins durch Magnesium unterscheiden.

Das Myosin setzt nun ADP relativ langsam frei (Aktin-aktiviert  $15 \text{ s}^{-1}$  (De La Cruz *et al.* (1999)). Dabei führt es einen zweiten, kleineren Kraftschlag von etwa 5 nm aus (Veigel *et al.* (2002)). Die Freisetzung von ADP ist zentraler regulatorischer Schritt des kinetischen Zyklus, da er stark abhängig ist von am Hebelarm des Myosins anliegenden Kräften: Liegt eine dem Kraftschlag entgegenwirkende Kraft an, so wird die Freisetzung von ADP stark verlangsamt, bei den Kraftschlag unterstützenden Kräften hingegen beschleunigt (Veigel *et al.* (2005), Rosenfeld *et al.* (2005)).

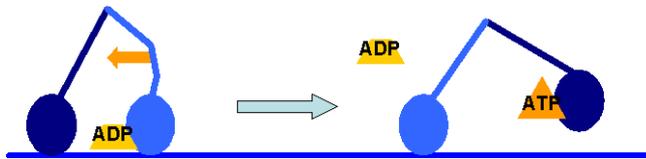
Über diesen Mechanismus wird eine Koordination der beiden Köpfe des Myosin-Dimers erreicht (Abb. 1.2.5.): Der vorangehende Myosin-Kopf wird durch den anderen Kopf entgegen seiner Bewegungsrichtung verformt. Er wartet aufgrund der dadurch verlangsamten ADP-Freisetzung gleichsam auf den hinteren Kopf. Myosin V ist daher aufgrund der ohnehin langsamen ADP-Freisetzung nicht nur einen hohen Anteil der Zeit eines katalytischen Zyklus fest an Aktin gebunden (duty ratio 0,85 (Forgacs *et al.* (2009))). Vielmehr wird seine prozessive Bewegung auch durch die wechselseitige Koordination der Köpfe verbessert.

Die Freisetzung von ADP wird vermutlich durch die beim ersten Kraftschlag verursachte Verschiebung der 50 kDa-Domänen gegeneinander erreicht. Dies führt nämlich dazu, dass in der Nukleotidbindungstasche Switch I und der P-loop einander angenähert werden.



**Abb. 1.2.4. Strukturelle Veränderungen in der Nukleotidbindestelle von Myosin V** (verändert nach: Coureux *et al.* 2004). **A** ADP-gebundener Zustand, **B** nukleotidfreies Myosin V, **C** ADP-BeF<sub>3</sub>- (analog ADP-/ Phosphat-) gebundener Zustand

Zusammen mit Switch II wird der P-loop dadurch in einer Konformation stabilisiert, die die Bindung von ADP an das Myosin destabilisiert (Coureux *et al.* (2004)) und so dessen Freisetzung bewirken könnte. Wurde ADP freigegeben, befindet sich das Myosin wieder im Rigor-analogen Zustand.



**Abb. 1.2.5. Koordination der Myosin V-Köpfe.** Bei einem an Aktin gebundenen Dimer werden beide Köpfe deformiert. Bei dem Kraftschlag entgegen wirkender Kräfte am Hebelarm des Myosins wird dadurch die Freisetzung von ADP verlangsamt (links). Der vorangehende Kopf „wartet“ daher auf den folgenden, was eine Koordination der Köpfe und verbesserte Prozessivität bewirkt.

### 1.3. Zielsetzung

Myosine sind biochemisch-kinetisch, kristallographisch und mechanisch (Schrittgröße, Kraft) bereits gut untersucht. Die Verbindung der drei Felder aber ist in den meisten Fällen unklar. So ist zwar bekannt, welche biochemischen Zustände des Myosins den in mechanischen Untersuchungen gefundenen etwa entsprechen, doch die Beziehung zwischen den Übergängen von Nukleotidzuständen und dazugehörigen strukturellen Änderungen sind unklar. Fraglich ist z.B. welche zeitliche Korrelation es zwischen Phosphatfreisetzung und dem (ersten) Kraftschlag gibt. Ebenfalls unbekannt ist die Koordination von ADP-Freisetzung und dem damit assoziierten zweiten Kraftschlag einiger Myosine.

Zudem ändert sich die Konformation eines Myosins in seinem katalytischen Zyklus zum Teil dramatisch. Zur Zeit ist nicht bekannt, ob die unterschiedlichen Konformationen eines Myosins sich in ihren mechanischen Eigenschaften unterscheiden, doch angesichts der erheblichen konformationellen Änderungen zwischen verschiedenen Myosinzuständen ist dies zu erwarten. So ist nämlich bekannt, dass sich bestimmte Prozesse abhängig von anliegenden mechanischen Kräften beeinflussen lassen. Wie zuvor ausgeführt, kann die Geschwindigkeit der Freisetzung von ADP abhängig von der Richtung anliegender Kräfte sein. Es wäre somit denkbar, dass sich auch die mechanischen Eigenschaften eines Myosins bei verschiedenen anliegenden Kräften unterscheiden, z.B. je nachdem in welcher Richtung Kräfte auf das Molekül wirken. Zudem wäre denkbar, dass Myosin-Zustände, die unterschiedlich sensitiv auf mechanische Deformation reagieren, sich bei solch einer Deformation auch mechanisch unterschiedlich verhalten. Gegenwärtig wird vereinfachend angenommen, dass solche Unterschiede in den mechanischen Eigenschaften nicht relevant sind.

Zahlreiche Resultate z.B. aus der Muskelfasermechanik aber müssten neu interpretiert werden, wenn die mechanische Verformbarkeit von Myosin-Köpfen nicht unabhängig von ihrer Konformation ist: Steifheitsmessungen an Muskelfasern gehen davon aus, dass die mechanische Steifheit einer Faser proportional zur Zahl der an Aktin fest gebundenen Myosinköpfe ist. Dies stimmt jedoch nur, wenn die Steifheit eines Myosin-Kopfes sich in seinem kinetischen Zyklus nie ändert.

Ziel dieser Arbeit ist daher zum einen die Übergänge zwischen verschiedenen Myosin-Konformationen zu charakterisieren und aufzuklären, ob und wie sie mit kinetischen

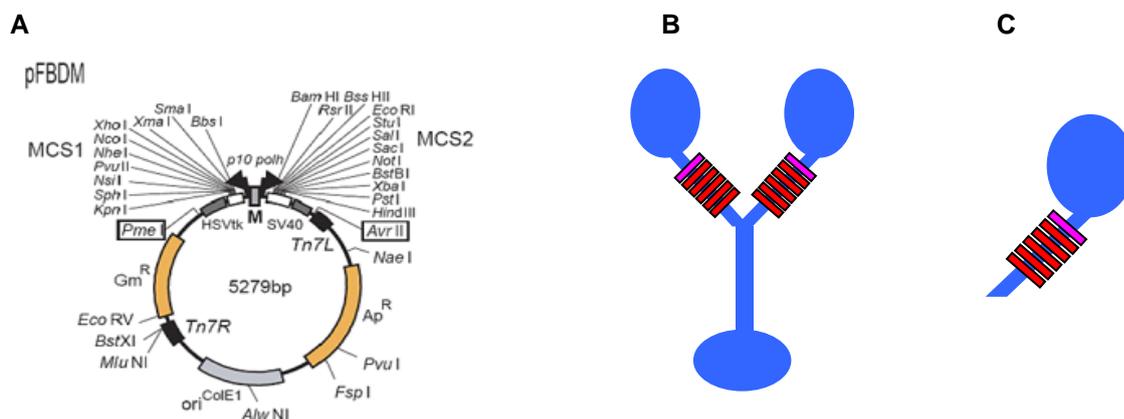
Parametern korrelieren. Zum anderen sollen die mechanischen Eigenschaften von Myosinen in verschiedenen Zuständen charakterisiert werden, um entsprechend der zuvor genannten Fragestellung mögliche Unterschiede zwischen ihnen zu detektieren. Ferner sollen Reaktionsschritte des katalytischen Zyklus von Myosin V identifiziert werden, die mit möglichen Änderungen mechanischer Eigenschaften assoziiert sind.

Dazu soll als Modell das zuvor beschriebene Myosin V dienen, da es relativ langsam arbeitet. Da es einen langen Hebelarm hat, sind dessen große Bewegungen zudem leichter detektierbar. Außerdem sind mehr Details seines katalytischen Zyklus beobachtbar (insbesondere der zweite Kraftschlag) als bei anderen Myosinen.

## 2. Ergebnis

### 2.1. Expression von Myosin V-Motormolekülen in Sf9-Zellen

Um ein einzelköpfiges Myosin-V-Konstrukt zu erhalten, wurde das verkürzte Protein in Sf9-Zellen exprimiert. Die Expression von Myosin V-Molekülen erfolgte mit Hilfe eines Baculovirus-Systems (nach Berger *et al.* (2004), s. 4.2.2.3.), das zur Expression von Protein-komplexen konstruiert wurde: Im Vektor pFBDM (Abb. 2.1.1) werden zwei codierende Sequenzen unter Kontrolle von zwei baculoviralen Promotoren eingebracht. Die Expressionskassette kann über die Restriktionsschnittstellen *AvrI* und *PmeI* aus dem Vektor geschnitten und in einen weiteren pFBDM-Vektor über *NruI* und *SpeI*, welche die gleichen Sequenzüberhänge generieren, ligiert werden. So ist die Expression von mehreren Proteinen mit nur einem Virus möglich.



**Abbildung 2.1.1.** **A** Vektor pFBDM (Berger *et al.* 2004), **B** Myosin V (schematisch), **C** Myosin V-S1 (Subfragment 1, schematisch)

Hier wurde zunächst die für das einzelköpfige MyosinV-Subfragment 1 (Myosin V-S1, s. 1.2.1., Aminosäuren 1-909, Abb. 2.1.1) codierende mRNA nach 4.2.1.1. aus dem Gehirn eines einen Tag alten Kükens isoliert und mit einem oligo-dT-Primer revers transkribiert (4.2.2.5.). Die cDNA wurde mit den sequenzspezifischen DNA-Oligonukleotiden 5'-ATGTCGACGCCATGGCCGCTCCGAG-3' und 5'-ATGCGGCCGCGCCCCCGCGCCATGCCGC-3' per PCR (4.2.2.4.) amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen für *Sall* und *NotI* in den Vektor pFBDM unter Kontrolle eines Polyhedrin-Promotors überführt (vgl. Abb. 2.1.1., für eine Vektorkarte s. Anhang). An das 3'-Ende der Myosin V-DNA wurde über die *NotI*-Schnittstelle ein für das FLAG-Peptid codierender Adapter aus 5'-GGCCGCTTGATTACAAGGATGACGACGATAAGTAGC-3' und 5'-CGAACTAATGTTCTACTGCTGCTATTTCATCGCCGG-3' ligiert (4.2.2.2.). Es wurde dann die DNA codierend für eGFP (Zhang *et al.* (1996)) per PCR mit den Primern 5'-CATCGCGCGGCCGCTGGTGAGCAAGGGCGAGG-3' und 5'-GCGCGGCCGCTAGATCCGGTGGATCC-3' amplifiziert und über die eingeführte *NotI*-

Schnittstelle zwischen MyosinV- und FLAG-Peptid-codierender DNA ligiert. Die korrekte Sequenz der DNAs wurde per Sequenzierung überprüft (4.1.6.).

Zur Co-Expression der leichten Ketten des Myosins V wurden die codierende Sequenz von Calmodulin (CaM) (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Klon IRAT p970E0516D6) und der regulatorischen leichten Kette LC23sa (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Klon RZPD p9811D10269D5) ebenfalls in einen pFBDM-Vektor überführt (4.2.2.2):

CaM: p10-Promotor, Restriktionsschnittstelle SmaI

LC23sa: Polyhedrin-Promotor, Restriktionsschnittstellen EcoRI, XbaI

Die codierenden Sequenzen der leichten Ketten CaM und LC23sa wurden dann über AvrII und PmeI aus dem Vektor ausgeschnitten und über NruI und SpeI in den Myosin V-codierenden Vektor überführt (die DNA-Überhänge von AvrI und SpeI sowie PmeI und NruI sind dabei kompatibel) (4.2.2.2). Der erhaltene Vektor (s. Anhang) wurde nach 4.2.2.3. in das Genom eines Baculovirus überführt und die Virus-codierende DNA präpariert (4.2.1.2). Die DNA wurde dann in Sf9-Zellen transfiziert (4.2.3.2) und nach fünf Tagen das Virus im Überstand geerntet. Das Virus wurde nun über drei Generationen vermehrt (4.2.3.3.) und schließlich 1 Liter einer Sf9-Zellkultur mit dem erhaltenen Virus infiziert (4.2.3.3.).

Die Kontrolle der Expression erfolgte über Western-Blot mit einem FLAG-spezifischen und einem Calmodulin-spezifischen Antikörper (4.2.1.8.) im Zelllysät. Die maximale Proteinausbeute wurde am dritten Tag nach Infektion erreicht.

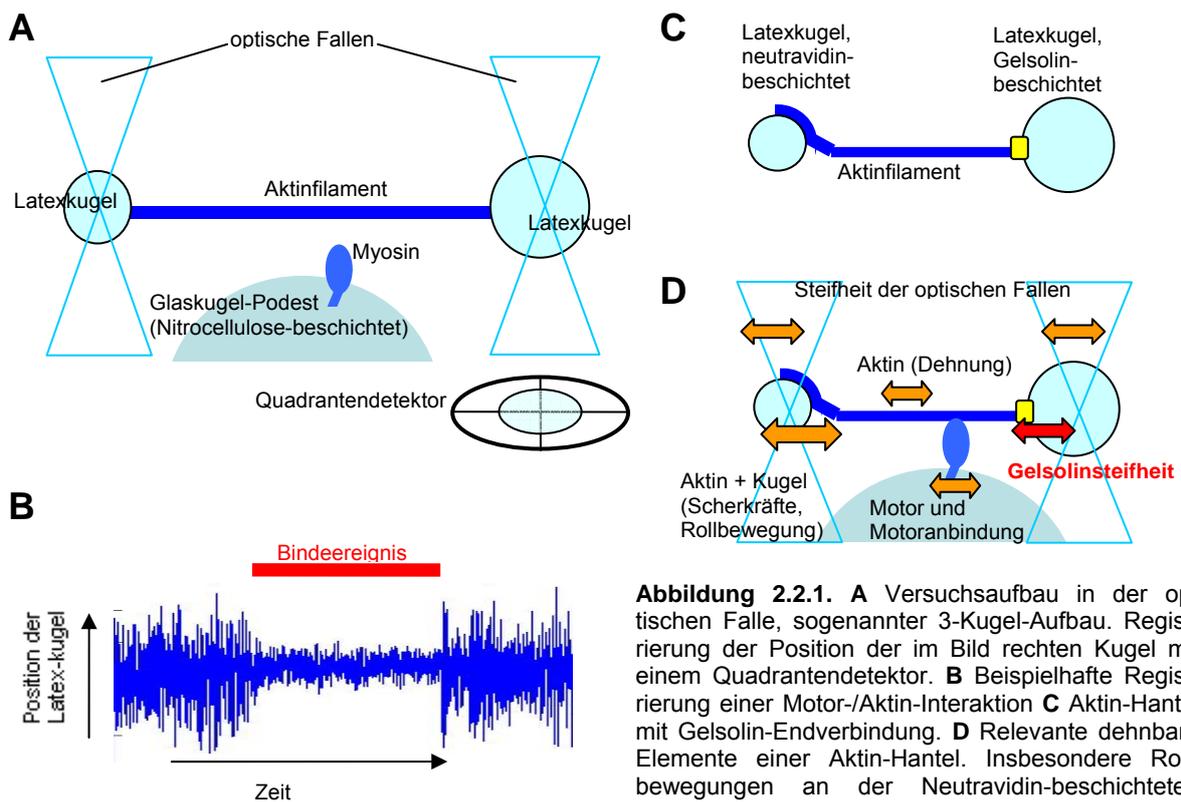
Die Zellen wurden daher drei Tage nach der Infektion geerntet und das Myosin nach 4.2.1.5. aufgereinigt. Es zeigte sich im Eluat der FLAG-Säule das aufgereinigte Protein (Abb. 2.1.2.). Die Myosin V-haltigen Fraktionen wurden vereint und bei -80°C gelagert.



## 2.2. Orientierungsspezifische Anheftung eines Aktinfilaments an eine Latexkugel

### 2.2.1. Beobachtung von Myosin-Bewegungsvorgängen in der optischen Falle

Um mechanische Eigenschaften von Motormolekülen zu bestimmen, können die von ihnen verursachten Kräfte und Bewegungen mit Hilfe einer Laserfalle untersucht werden. Dabei wird üblicherweise ein Versuchsaufbau mit 3 Kugeln verwendet (Abb. 2.2.1.): In eine Messkammer mit einem Volumen von 10  $\mu\text{l}$ , an deren Boden Nitrocellulose-beschichtete Glaskugeln fixiert wurden, wird eine Myosin-haltige Lösung eingespült und das Myosin unspezifisch an die Glaskugeln gebunden. Außerdem werden biotinyliertes F-Aktin und Neutravidin-beschichtete Latexkugeln in die Kammer gespült. Die Latexkugeln werden mit Hilfe zweier optischer Fallen gehalten. Das Aktin wird an den zwei Kugeln über die Neutravidin-/Biotin-Bindung fixiert und gespannt.



**Abbildung 2.2.1.** A Versuchsaufbau in der optischen Falle, sogenannter 3-Kugel-Aufbau. Registrierung der Position der im Bild rechten Kugel mit einem Quadrantendetektor. B Beispielhafte Registrierung einer Motor-/Aktin-Interaktion C Aktin-Hantel mit Gelsolin-Endverbindung. D Relevante dehnbare Elemente einer Aktin-Hantel. Insbesondere Rollbewegungen an der Neutravidin-beschichteten Kugel limitieren die Steifheit der Verbindung.

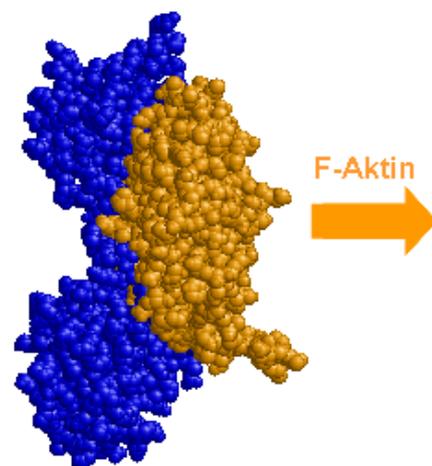
Die nun entstandene sogenannte Aktin-"Hantel" wird dann über ein Motormolekül auf einer am Boden der Messkammer liegenden Glaskugel positioniert und die Interaktion des Motors mit dem Filament über Veränderungen der Bewegung der Latexkugeln in der Laserfalle untersucht. Die Position der Kugeln wird über einen Quadrantendetektor registriert. Interaktionen des Motors mit dem Aktinfilament können über Veränderungen der Bewegungen

der Latexkugeln identifiziert werden (s. Abb. 2.2.1.B): Bindet der molekulare Motor an die Aktin-Hantel, werden deren Bewegungen eingeschränkt und das Rauschen des Positionssignals der Hantel wird reduziert.

In diesem durch *Finer et al.* (1994) beschriebenen Aufbau ist biotinyliertes Aktin lateral an zwei Neutravidin-beschichteten Latexkugeln gebunden. Dies erlaubt jedoch an der Verbindung zwischen Aktin-Filament und der Latexkugel Bewegungsfreiheiten durch Rollen der Kugel in der Laserfalle. Außerdem limitiert der Widerstand des Aktins gegen ein Verbiegen senkrecht zum Filament die maximale Steifheit der Verbindung. So wird die mechanische Festigkeit der Verbindung des Aktins an die Latexkugel in der Laserfalle „aufgeweicht“. Um Bindevorgänge von Myosinen an das gespannte Filament dazustellen, ist jedoch eine möglichst steife Verbindung aller Elemente der Aktin-Hantel optimal. Sind diese nämlich so wenig dehnbar, dass ihr Beitrag zur Dehnbarkeit des gesamten Systems vernachlässigt werden kann, wird die Fluktuation der freien Hantel durch die niedrige Steifheit der optischen Falle bestimmt, die Fluktuation der gebundenen Hantel aber durch die viel höhere Steifheit des Motormoleküls. Somit bestimmt das Verhältnis dieser Steifheiten das Verhältnis der Varianzen des Positionsrauschens von freier Hantel und gebundener Hantel. Ist der Unterschied zwischen beiden besonders groß, ist die Detektion der Bindeereignisse optimal möglich (eine beispielhafte Motor-Interaktion mit der Aktin-Hantel zeigt Abb. 2.2.1.B). Gleiches gilt für Veränderungen der Steifheit des Systems während eines Myosin-Bindeereignisses: Erst wenn alle beteiligten Elemente der Aktin-Hantel eine ausreichend hohe Steifheit haben, können Veränderungen der Steifheit des Myosins detektiert werden. Solche Änderungen der Steifheit des Motors im Verlauf eines Bindeereignisses konnten in bisherigen Arbeiten, die alle ohne die im Folgenden eingeführte Modifikation gemacht wurden, nicht beobachtet werden. Ziel der Arbeit ist daher zunächst eine Erhöhung der Verbindungs-Steifheit der Aktin-Hantel, um mögliche Veränderungen in der Motorsteifheit detektieren zu können.

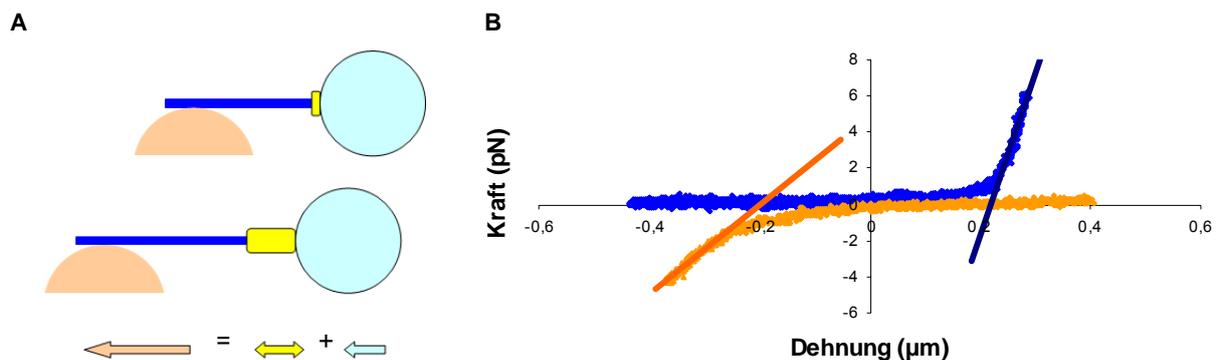
### 2.2.2. Verbesserung der Aktin-Latexkugel-Verbindung in einer Aktin-Hantel

Gelsolin ist ein Aktin-bindendes Protein, das sich zwischen die Monomere eines Aktin-Filaments „schiebt“ und das verbleibende Filamentbruchstück am Plus-Ende fest bindet (s. Abb. 2.2.2.). Über diese Aktin-Gelsolinbindung ist eine Befestigung eines Aktin-Filaments an Latexkugeln möglich (*Suzuki et*



**Abb. 2.2.2.** Die an der Aktinbindung beteiligten Domänen 1-3 von Gelsolin (blau) mit einem Aktin-Monomer (orange). Struktur nach *Nag et al.* (2009)

al. (1996)), die zudem immer spezifisch am Plus-Ende des Filaments erfolgt. Es wurde daher Gelsolin kovalent an Latexkugeln gebunden und mit Hilfe der Gelsolin-beschichteten Kugeln eine Aktin-Hantel konstruiert (nach 4.2.1.5. und 4.2.5.1). Diese Hantel weist also auf einer Seite eine Aktin-/Gelsolin-Endverbindung an der in der optischen Falle fixierten Kugel auf. Die Orientierung der Bindung ist sehr spezifisch, ein falsch orientiertes Filament wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet.



**Abb. 2.2.3.** **A** Experimenteller Aufbau, **B** Kraft-Dehnungskurve für eine Gelsolin-Verbindung (blau) und eine laterale Neutravidin-Verbindung (orange) von Aktin an eine Latexkugel. Der Aufbau des Experiments erfolgte wie in Abb. 2.2.1, jedoch wurde die Aktinhantel mit Neutravidin am Glaskugelpodest fixiert. Bei Auslenkung der Glaskugel folgen die über Aktin gekoppelten Latexkugeln in der optischen Falle der Bewegung. Dabei wird die Verbindung zwischen Aktin und Latexkugel gedehnt. Die Auslenkung der Latexkugeln aus der optischen Falle ist daher um die Dehnung des Gelsolins vermindert. Aus der Steigung der Auftragung der wirkenden Kraft gegen die Dehnung der Aktin-/Latexkugelverbindung ergibt sich die Steifheit dieser Verbindung. Im linearen Teil der Kurve ist die mittlere Steifheit für die Gelsolin-Verbindung  $0,110 \pm 0,033$  pN/nm, für die laterale Neutravidin-Verbindung  $0,026 \pm 0,004$  pN/nm.

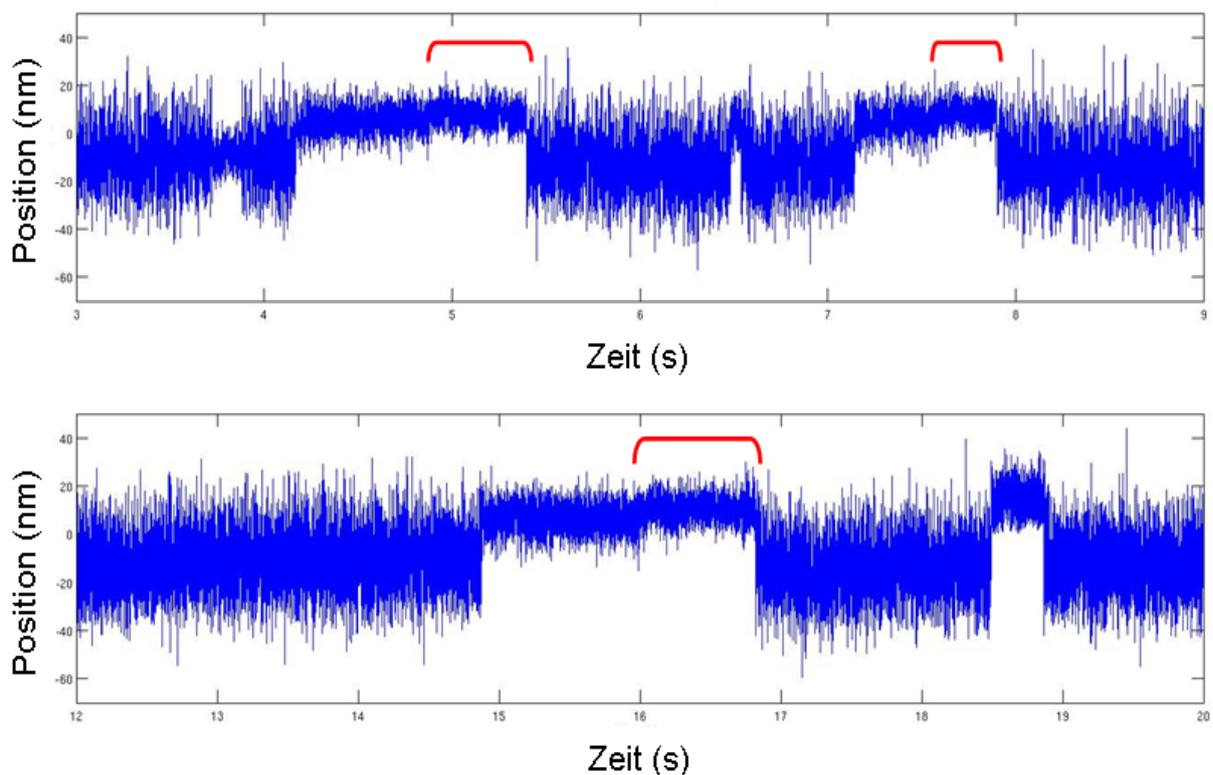
Um die Steifheit dieser Verbindung zu bestimmen, wurde der in Abb. 2.2.1.A skizzierte Aufbau verwendet. Jedoch wurde das Motormolekül durch Neutravidin ersetzt. Die Neutravidin-/Biotin-Bindung ist sehr fest (im Vergleich: 160 pN/nm für Avidin/Biotin, 257 pN/nm für Streptavidin/Biotin, Moy *et al.* (1994)) und ihre Dehnbarkeit im Rahmen der in dieser Methode verwendeten Kräfte daher vernachlässigbar. Gleiches gilt für die Dehnbarkeit des Aktin-Filaments entlang der Filamentachse: Dessen Steifheit ist so groß ( $\sim 60$  pN/nm, Kojima *et al.* (1994)), dass eine Dehnbarkeit des Aktins ebenfalls vernachlässigt werden kann. Die Steifheit der optischen Falle kann über die Fluktuation der gefangenen Kugel in der Falle gemessen werden (vgl. 4.2.4.2) und betrug etwa  $0,07$  pN/nm für beide Kugeln. Einzige Unbekannte ist daher die Steifheit der Aktin-Latexkugel-Verbindung. Wenn nun die Glaskugel über eine Auslenkung der Messkammer bewegt wird, werden die Latexkugeln dieser Bewegung folgen. Bei idealer Steifheit der Aktin-Latexkugel-Verbindung wird dies mit gleicher Geschwindigkeit geschehen bzw. nur noch beeinflusst durch die Steifheit der optischen Falle. Ist die Verbindung des Aktins an die Latexkugel jedoch dehnbar, folgt die Kugel in der optischen Falle der vorgegebenen Bewegung nur teilweise, da ein Teil der Auslenkung durch Dehnung der Verbindung kompensiert wird.

Durch wechselseitiges Ziehen an den Kugeln in der optischen Falle kann daher die Steifheit beider Enden der Aktin-Hantel bestimmt werden (vgl. 4.2.4.2) (Abb. 2.2.3.). Sie wurde hier für die Neutravidin-/Biotin-Verbindung zu  $0,026 \pm 0,04$  pN/nm und für die Gelsolin-Verbindung zu  $0,110 \pm 0,033$  pN/nm bestimmt. Damit ist die Aktin-Endverbindung über Gelsolin der lateralen Neutravidin-/Biotin-Kopplung deutlich überlegen und erlaubt, wie im Folgenden gezeigt wird, die Darstellung bisher unbekannter mechanischer Veränderungen des Myosin-Moleküls in seinem katalytischen Zyklus.

### 2.3. Änderung der mechanischen Eigenschaften von Myosin V im ATPase-Zyklus und ihre Korrelation mit kinetischen Parametern

#### 2.3.1. Die Steifheit von Myosins V erhöht sich nach dem zweiten Kraftschlag

Wie bereits unter 2.2. beschrieben wurde in der optischen Falle ein zwischen zwei Latexkugeln aufgespanntes Aktin-Filament über ein Glaskugelpodest mit einem Motormolekül gebracht (vgl. Abb. 2.2.1.A). Um sicherzustellen, dass immer nur ein Motormolekül mit dem Filament interagiert, wurde die Motordichte so gewählt, dass bei nur etwa 30% der angesteuerten Glaskugel-Podeste ein Motor gefunden wurde: Bei einer solchen Motordichte

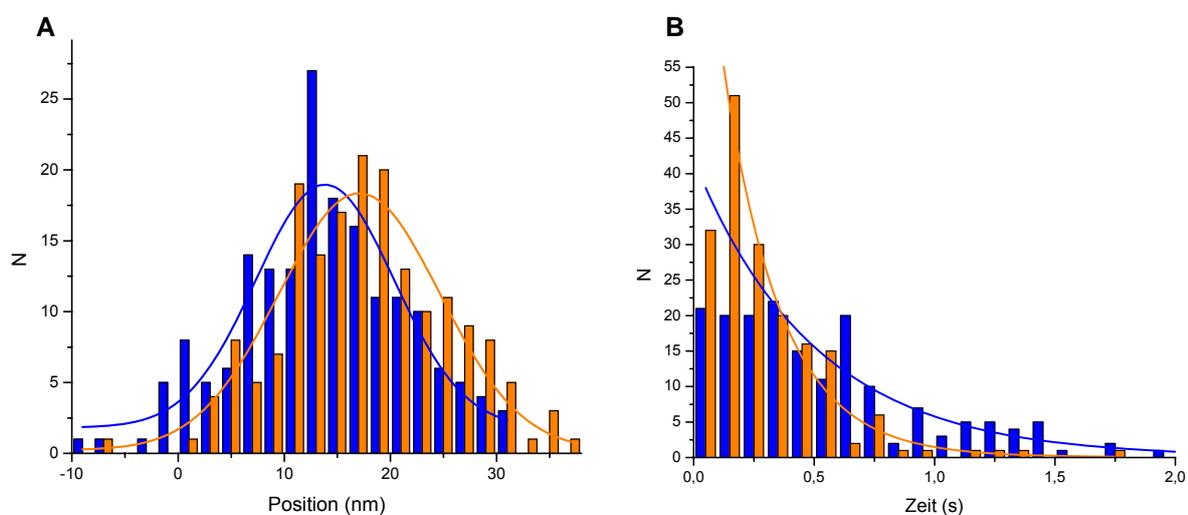


**Abb. 2.3.1:** Nach dem Subschritt von Myosin V sinkt die Varianz des Positionssignals. Die Abbildung zeigt zwei beispielhafte Aufnahmen der Position einer Latexkugel mit Gelsolin-Verbindung in einer sog. Aktin-Hantel, die mit einem Myosin-Molekül interagiert (vgl. auch Abb. 2.3.2). Es ist ein klarer Subschritt des Myosin V sichtbar, wie er auch durch Veigel et al. (2002) beschrieben wurde. Im Gegensatz zur Arbeit von Veigel et al. zeigt sich hier jedoch eine Verringerung der Amplitude des Rauschens des Positionssignals, die auf die verbesserte Aktin-Endverbindung zurückzuführen ist (siehe Abschnitt 2.2.2.).

tragen nur etwa 10% der Kugeln mehr als einen Motor. Die Wahrscheinlichkeit, zwei Motoren auf einer Glaskugel zu finden, die außerdem noch gleichzeitig mit dem Aktin-Filament interagieren können, ist dann hinreichend gering, um die Interaktionen einzelner Motor-moleküle zuverlässig beobachten zu können.

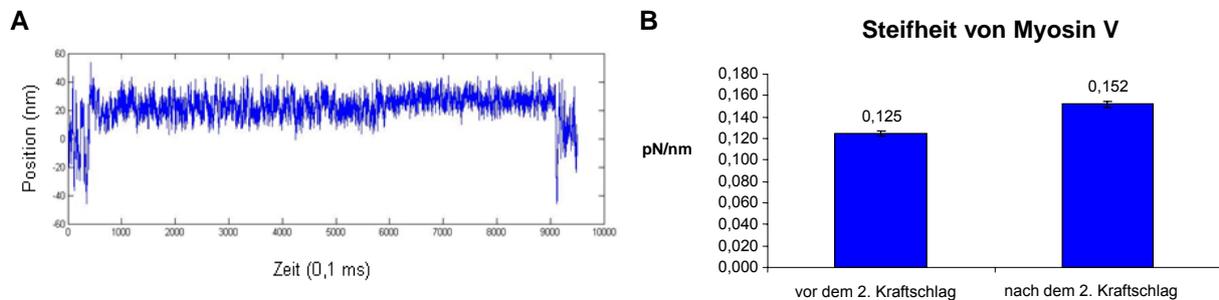
Dabei zeigte sich, dass wie zuvor beschrieben Bindeereignisse des Motorproteins an Aktin auftraten. Die Bindeereignisse können über die Reduktion der Varianz des Positionsrauschens der in der optischen Falle gefangenen Kugel identifiziert werden (vgl. Abb. 2.3.1.). Während eines Bindevorgangs wurde eine Verschiebung der Aktin-Hantel beobachtet (rot markiert in Abb. 2.3.1.). Hierbei handelt es sich um den schon durch Veigel *et al.* (2002) beschriebenen Subschritt oder zweiten Kraftschlag von Myosin V. Es wurde nun die mittlere Position der Hantel in den beiden Zuständen vor und nach dem zweiten Kraftschlag im Vergleich zur freien Aktin-Hantel bestimmt. Die Verteilung der Positionen vor und nach dem zweiten Kraftschlag zeigt Abb. 2.3.2.. Die mittlere Position vor dem zweiten Kraftschlag war gegenüber der freien Aktin-Hantel um  $14,6 \pm 0,5$  nm verschoben. Es wird davon ausgegangen, dass bei zufällig verteilter Bindung des Myosins an Aktin und dessen folgendem Kraftschlag der Betrag dieser Verschiebung genau dem Betrag des ersten Kraftschlags entspricht (Finer *et al.* (1994), Veigel *et al.* (2002)). Nach dem zweiten Kraftschlag ist die gebundene gegenüber der freien Aktin-Hantel um  $18,3 \pm 0,5$  nm verschoben und der zweite Kraftschlag damit  $3,7$  nm groß (Abb. 2.3.2). Beide Werte entsprechen dabei im Rahmen der Messgenauigkeit der Methode den zuvor gefundenen (Veigel *et al.* (2002, 2010)).

Überraschenderweise zeigt sich jedoch noch eine weitere Veränderung des Signals: Bei der Hantel mit verbesserter einseitiger Aktin-Endverbindung zeigte sich, dass bei dem



**Abb. 2.3.2. A Häufigkeitsverteilung der Position einer Aktinhantel vor (blau) und nach (orange) dem Subschritt eines gebundenen Myosin V-S1-Fragments.** Die Position einer Myosin-gebundenen Hantel folgt einer Gauss-Verteilung, die gegenüber der freien Hantel vor dem Subschritt um  $14,6 \pm 0,5$  nm bzw.  $18,3 \pm 0,5$  nm danach verschoben ist. Der Subschritt ist somit  $3,7$  nm groß. **B Dauer der Zustände vor und nach dem Subschritt.** Beide Zustände folgen einer exponentiell abklingenden Verteilung. Dies geschieht mit der charakteristischen Dauer des Zustands, in diesem Fall  $510 \pm 80$  ms vor und  $170 \pm 10$  ms nach dem Subschritt.

beobachteten Subschritt nicht nur die Hantel beim zweiten Kraftschlag um etwa 3,7 nm verschoben wird, sondern dass sich dabei außerdem die Varianz des Positionssignals der Hantel verringert. Das bedeutet, dass sich die Steifheit des Systems erhöht (Abb. 2.3.1 und 2.3.3). Die Varianz  $\sigma^2$  des Signals ist nämlich über  $\sigma^2 = kT/S$  mit der Steifheit  $S$  des Systems verknüpft (vgl. 4.2.4.2, Gleichverteilungssatz, nach Svoboda und Block (1994)).

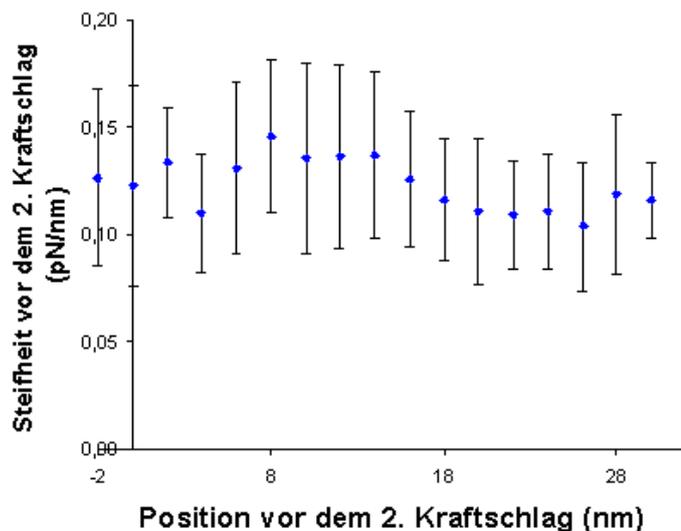


**Abb. 2.3.3. Anstieg der Steifheit von Myosin V mit dem Subschritt.** **A** Die Varianz des Positionssignals von Bindeereignissen in der optischen Falle reduziert sich von etwa  $35 \pm 0,7 \text{ nm}^2$  auf  $30 \pm 0,8 \text{ nm}^2$ . **B** Dies bedeutet eine Erhöhung der Steifheit des Systems von  $0,125 \pm 0,002 \text{ pN/nm}$  auf  $0,152 \pm 0,003 \text{ pN/nm}$ . Diese Steifheitserhöhung geschieht zeitgleich mit dem 3,7 nm-Subschritt des Myosins.

Da jedoch die einzige Komponente im Aktin-Myosin-System, die sich hier verändert, das Myosin ist, muss diese Steifheitsänderung auf Veränderungen des Myosins zurückzuführen sein. Um auszuschließen, dass die größere Auslenkung des Systems aus Hantel und Motor gegenüber seiner Gleichgewichtsposition zu der erhöhten Steifheit führt, ohne dass diese auf Veränderungen im Myosin-Molekül zurückzuführen wäre, wurde überprüft, ob die Steifheit des Systems im Bereich der beobachteten Auslenkungen abhängig von der Position der Aktin-Hantel in der optischen Falle ist. Es müsste, wenn der Anstieg der Steifheit ein Artefakt der größeren Auslenkung der Hantel wäre, die Steifheit vergleichbarer Zustände des Myosins mit steigender Auslenkung der Hantel um etwa 20% pro etwa 4 nm (entsprechend einem Subschritt) ansteigen. Dies wurde aber nicht beobachtet (vgl. Abb. 2.3.4).

Es folgt also daraus, dass die Steifheit des Myosins um 20% von  $0,125 \pm 0,002 \text{ pN/nm}$  vor dem Subschritt zu  $0,152 \pm 0,003 \text{ pN/nm}$  nach dem Subschritt anstieg.

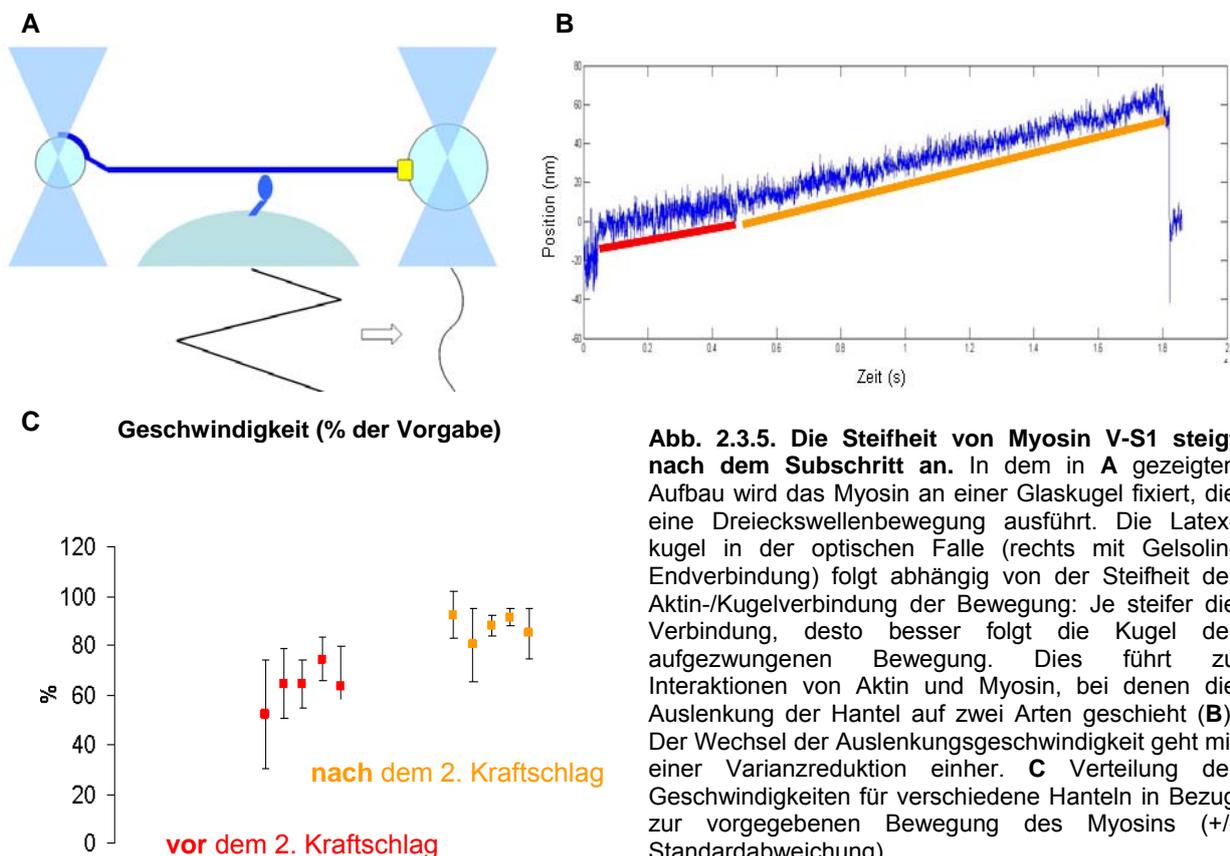
Ein Problem der Bestimmung der Steifheit aus der Varianz des Positionssignals der Aktin-Hantel ist, dass das Hintergrundrauschen (hauptsächlich elektronisches Rau-



**Abb. 2.3.4.** Die Steifheit des Myosin-Motors steigt nicht systematisch mit zunehmender Auslenkung der Aktinhantel aus der Gleichgewichtslage an. Der beobachtete Steifheitsanstieg nach dem 3,7 nm-Subschritt (Abb. 2.3.3.) des Myosins muss also Resultat einer Änderung der Motoreigenschaften sein.

schen) das Ergebnis verfälscht. Außerdem liegt die Steifheit der Gelsolinverbindung der Aktin-Hantel bei ebenfalls etwa  $0,1 \text{ pN/nm}$ , so dass eine Korrektur hierfür erforderlich ist. Um also die Steifheitsänderung genauer bestimmen zu können, wurde folgender Ansatz gewählt: Während der Interaktionen des Motors mit dem Filament wurde der Motor bzw. der Boden der Messkammer, an der der Motor über eine Glaskugel fixiert ist, entlang des Filaments bewegt (Abb. 2.3.5.A). Wie zuvor in 2.2.2. bzw. 4.2.4.2 beschrieben kann aus dem Vergleich der vorgegebenen Auslenkung und der Bewegung der nachfolgenden Latexkugel in der Laserfalle auf die Steifheit der Verbindung zwischen beiden Kugeln geschlossen werden. Ist die Verbindung zwischen ausgelenkter Glaskugel und der Bewegung folgender Latexkugel perfekt steif, würden beide Bewegungen parallel verlaufen. Gäbe es jedoch ein dehnbare Element zwischen den beiden Kugeln, würde dies nachgeben und die Bewegung der nachfolgenden Latexkugel in Abhängigkeit von der Steifheit der Verbindung um einen bestimmten Betrag verringert.

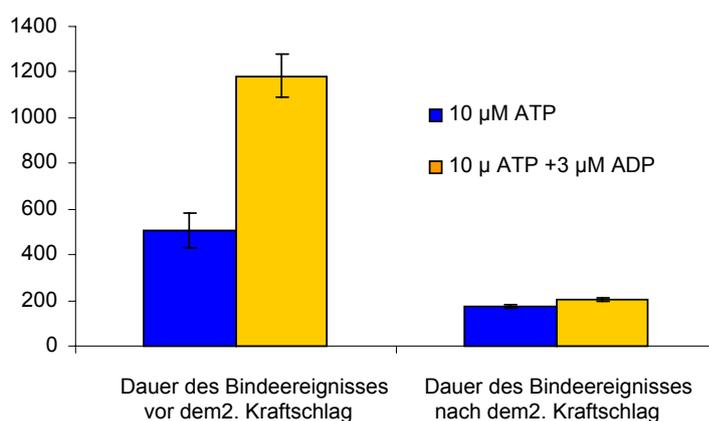
Und tatsächlich zeigen sich Motor-Interaktionen, bei denen wie in Abb. 2.3.5.B+C gezeigt die über das Myosin und Aktin gekoppelte Latexkugel der vorgegebenen Bewegung auf zweierlei Weise folgt: Zunächst folgt die gekoppelte Latexkugel mit etwa 70% der vorgegebenen Geschwindigkeit der Glaskugel. Das heißt 30% der vorgegebenen Bewegung werden durch ein Nachgeben dehnbare Elemente zwischen den beiden Kugeln kompensiert. Dann kommt es zu schon zuvor beobachteter Varianzreduktion und außerdem zu einer sprunghaften Veränderung der Bewegung der Latexkugel in der optischen Falle. Die Geschwindigkeit der



Kugel steigt auf etwa 90% der vorgegebenen Geschwindigkeit. Die mittlere Steifheit des Motors ergibt sich nach dieser Methode (4.2.4.2.) zu  $0,067 \pm 0,009$  pN/nm vor dem Subschritt und  $0,094 \pm 0,006$  pN/nm nach dem Subschritt. Der Steifheitsanstieg beträgt nach dieser Methode etwa 40%, die absoluten Werte liegen jedoch unter den zuvor bestimmten. Die zweite verwendete Methode wird zwar nicht durch elektronisches Rauschen der Registrierung gestört, doch ist die bestimmte Steifheit stark von einer genau bekannten Steifheit aller anderen beteiligten Elemente abhängig. Insbesondere die Steifheit der Gelsolin-Verbindung ist hier kritisch, da sie in einer ähnlichen Größenordnung wie die des Motors liegt. Eine systematische Über- oder Unterschätzung der Gelsolinsteifheit würde daher auch die hier bestimmten Werte stark beeinflussen. Die absolute Steifheit des Motormoleküls kann daher auch hier nicht bestimmt werden. Da jedoch innerhalb eines Bindeereignisses eine interne Normierung für jedes Motormolekül möglich ist, muss es zu einer relativen Steifheitserhöhung im Bereich von 20-40% kommen, wenn Myosin V seinen zweiten Kraftschlag ausführt.

### 2.3.2. Der zweite Kraftschlag von Myosin V folgt nach der ADP-Freisetzung

Frühere Arbeiten zeigten, dass ADP-Freisetzung und der zweite Kraftschlag miteinander korrelieren (De La Cruz *et al.* (1999), Veigel *et al.* (2002)). Wie genau jedoch dies der Fall ist, insbesondere ob es eine definierte Reihenfolge der Schritte gibt, ist nicht geklärt. Um zu prüfen, wie zweiter Kraftschlag und Steifheitsveränderung mit der Freisetzung von ADP verknüpft sind, wurden Experimente wie zuvor in Gegenwart von  $10 \mu\text{M}$  ATP jedoch zusätzlich  $3 \mu\text{M}$  ADP wiederholt. Auch hier zeigte sich die beobachtete Steifheitsveränderung, jedoch war die Dauer des Bindeereignisses vor dem zweiten Kraftschlag etwa verdoppelt (Abb. 2.3.7.). Die Dauer des Bindeereignisses nach dem zweiten Kraftschlag war hingegen kaum verändert. Daraus lässt sich zweierlei schließen: Erstens wird die Ausführung des zweiten Kraftschlags durch die Freisetzung von ADP offenbar limitiert und zweitens zeigt sich, dass ADP zumindest bei geringer ADP-Konzentration nur vor dem



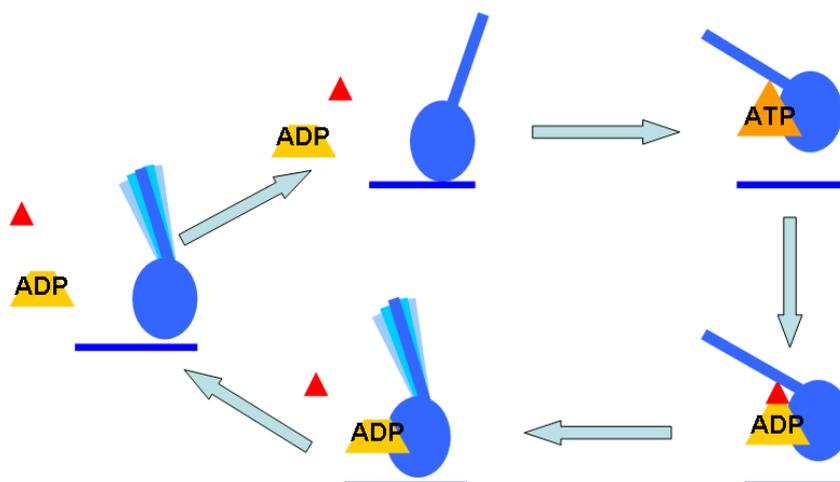
**Abb. 2.3.7. Inhibition von Myosin V mit ADP.** Bei einem Experiment in der Laserfalle wurden die Dauer der Myosinzustände vor und nach dem 2. Kraftschlag in Gegenwart von  $10 \mu\text{M}$  ATP sowie ggf. zusätzlichen  $3 \mu\text{M}$  ADP bestimmt. Die Dauer des Zustands vor dem zweiten Kraftschlag ist in Gegenwart von ADP etwa verdoppelt gegenüber der Kontrolle, die Dauer nach dem zweiten Kraftschlag unverändert. ADP bindet hier folglich an den Zustand des Myosins vor dem zweiten Kraftschlag, nicht jedoch an den Zustand danach. Rückschritte in den Zustand vor den zweiten Kraftschlag Subschritt wurden nicht beobachtet.

zweiten Kraftschlag an ein Myosin zurückbindet.

Daher muss, so zeigen die hier beobachteten Motor-Interaktionen, ein ADP-freies Zeitfenster vor dem zweiten Kraftschlag existieren: Hat das Myosin ADP mit der üblichen Rate abgegeben, wird es einige Zeit dauern, bis ein neues ADP-Molekül in die leere Nukleotidbindungstasche bindet. Da das Myosin aber keine Rückwärtsschritte zeigte, sondern längere Zeit im Zustand vor dem zweiten Kraftschlag verblieb, folgt, dass zwischen ADP-Abgabe und Subschriff eben jenes Zeitfenster existieren muss, in dem Abgabe und Bindung eines neuen ADP-Nukleotids möglich ist. Das Myosin bleibt in dieser Zeit in einem Zustand, der (zumindest im Rahmen der hier zugänglichen Parameter Hebelarmposition und Steifheit) dem davor gelegenen ADP-gebundenen Zustand gleicht. Ferner scheint nur in diesem Zustand ein erneutes Binden von ADP unter den hier gewählten Bedingungen möglich. Wurde hingegen die Konformationsänderung zum nukleotidfreien Zustand (d.h. der hier beobachtete zweite Kraftschlag mit Steifheitsveränderung) durchlaufen, kann ADP nicht (oder nur schwer) an das Myosin binden.

Bei einer solchen Konstellation muss die ADP-Abgabe also bevorzugt vor dem zweiten Kraftschlag stattfinden, da eben jenes zuvor genannte Zeitfenster vor dem zweiten Kraftschlag existieren muss, in dem eine Dissoziation und erneute Bindung von ADP erfolgen kann. Ferner ist offensichtlich die Abgabe des ADP Voraussetzung, um die Konformationsänderung (den zweiten Kraftschlag) zu ermöglichen, da diese in Gegenwart von ADP verzögert eintritt. Soweit auflösbar (d.h. im Bereich einiger ms), tritt die Änderung der Steifheit des Motors damit ebenfalls nicht mit der ADP-Freisetzung auf, sondern zusammen mit dem zweiten Kraftschlag. Eine Bindung von ADP nach dem Kraftschlag kann für höhere ADP-Konzentrationen nicht ausgeschlossen werden. Da jedoch in vivo stets ATP in hohem Überschuss gegenüber freiem ADP vorliegt (Williams *et al.* (1993)), dürfte dies ohnehin nicht relevant sein.

Es ergibt sich also für die Freisetzung von ADP und die darauf folgende Konformationsänderung folgendes Bild (Abb.2.3.8.):

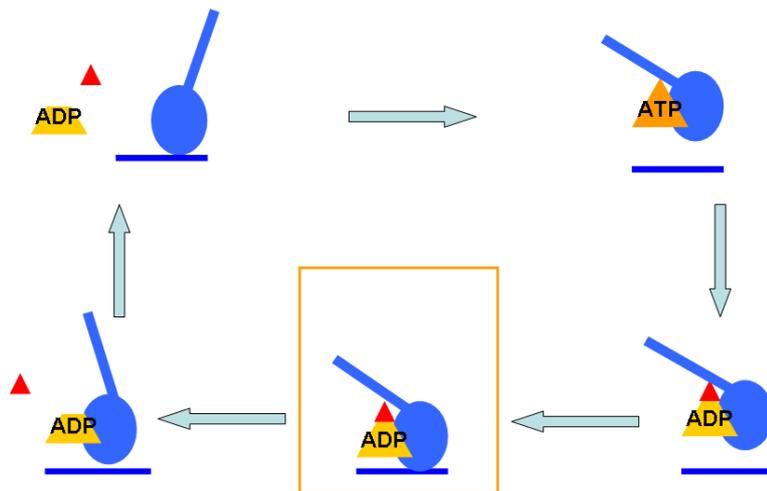


**Abb. 2.3.8. Modifizierter kinetischer Zyklus von Myosin V.** In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich die Steifheit des Myosins V bei seinem zweiten Kraftschlag um 30% erhöht. Außerdem wurde gezeigt, dass ADP das Molekül vor dem zweiten Kraftschlag verlassen muss und somit zwei verschiedene nukleotidfreie Zustände existieren, die sich in Hebelarmposition und Steifheit unterscheiden.

Nach Bindung des Myosins an Aktin und Freisetzung des Phosphats wird zunächst ADP abgegeben. Erst danach folgt der zweite Kraftschlag des Myosins von etwa 3,7 nm. Bei diesem Kraftschlag erhöht sich die Steifheit des Moleküls um etwa 30 %.

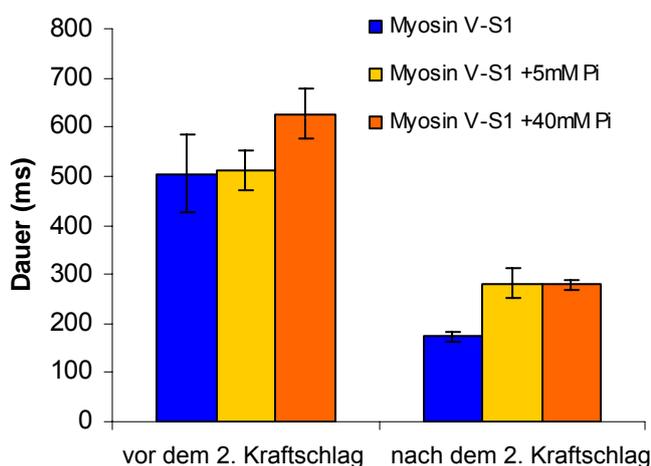
Es müssen daher zwei nukleotidfreie Zustände des Myosins existieren (vor und nach dem zweiten Kraftschlag). Diese unterscheiden sich hinsichtlich Hebelarmposition und Steifheit des Moleküls.

### 2.3.2. Die Freisetzung von Phosphat limitiert nicht allein die Ausführung des ersten Kraftschlags



**Abb. 2.3.9. Kinetisches Schema von Myosin V.** Nach Hydrolyse des ATP muss das Myosin an Aktin binden und um eine Bewegung zu initiieren danach einen Kraftschlag ausführen. Damit assoziiert ist vermutlich die Freisetzung des Phosphatrestes (rot) aus der Nukleotid-Bindungs-tasche. Fraglich ist jedoch, wie lange der gebundene Zustand vor dem Kraftschlag besteht und ob dieser charakterisiert werden kann, um die genaue Schrittgröße des Myosins V zu bestimmen.

Nach der Charakterisierung des Subschritts von Myosin V liegt es nahe, nun den ersten, größeren Kraftschlag des Moleküls zu untersuchen. Dieser soll mit der Freisetzung von Phosphat nach der Hydrolyse des ATP einhergehen. Fraglich ist aber wie zuvor, wann das Phosphat in Relation zum Kraftschlag und zur Aktin-Bindung des Myosins freigesetzt wird. Es muss einen fest an Aktin gebundenen Zustand geben, in dem der Kraftschlag des Myosins noch nicht ausgeführt wurde (vgl. Abb 2.3.9.). Nur dann ist mit dem Kraftschlag eine Verschiebung des Filaments möglich, andernfalls würde sich das Myosin ohne Verschiebung



**Abb. 2.3.10. Einfluss von Phosphat-Ionen auf Myosin V-S1.** Die Dauer des Zustands vor dem zweiten Kraftschlag ist in Gegenwart von 40 mM Phosphat leicht, jedoch nicht signifikant erhöht. Die Dauer des nukleotidfreien Zustands nach dem zweiten Kraftschlag in Gegenwart von 5 und 40 mM Phosphat erhöht. Dies ist möglicherweise auf Bindung von Phosphat-Ionen in die leere Bindungstasche zu erklären, die die Bindung von ATP blockieren.

des Aktin-Filaments wieder von diesem lösen. Nicht geklärt ist jedoch, wie Aktin-Bindung und Kraftschlag zeitlich koordiniert sind und wie die Freisetzung des Phosphatrestes mit ihnen assoziiert ist.

Alle bisherigen Messungen des Kraftschlages beruhen wie bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben auf der mittleren Verschiebung der gebundenen Aktin-Hantel gegenüber der Ruhelage (Finer *et al.* (1994)): Die Verteilung aller Bindeereignisse über die Hantel entspricht der Positionsverteilung der freien Hantel verschoben um den Betrag des Kraftschlages des Myosins.

Dies ist tatsächlich aber nur dann der Fall, wenn der Kraftschlag des Myosins nicht

von anliegenden Kräften beeinflusst wird. Insbesondere bei dem Kraftschlag entgegenwirkenden Kräften erscheint das unwahrscheinlich, da er bei sehr hohen Kräften sogar umgekehrt werden kann (Veigel *et al.* (2010)). Die Darstellung des initialen Bindezustands würde daher auch die Frage nach der tatsächlichen Größe des Myosin-Kraftschlags beantworten.

Problem bei der Darstellung dieses Zustands ist, dass er sehr kurzlebig ist. Da er mit der Freisetzung von Phosphat einhergehen soll (welche für Myosine im Bereich von einigen  $100 \text{ s}^{-1}$  liegt (z.B. Myosin V: ca.  $200 \text{ s}^{-1}$ , Rosenfeld und Sweeney (2004)), würde die Dauer des initialen Bindezustands für Myosin V im Bereich weniger ms liegen. Es ist bekannt, dass Myosin Phosphat in Abwesenheit von Aktin nur langsam freigibt. Dagegen wird die Phosphatfreigabe durch Bindung des Myosins an Aktin beschleunigt und muss damit nach einer ersten Bindung des Myosins an Aktin erfolgen (Malnasi-Csizmadia *et al.* (2007) und Yu *et al.* (2007), De La Cruz *et al.* (1999)). Es wäre somit möglich, dass eine Stabilisierung des initialen Bindezustands durch Verlängerung des ADP-/ Phosphat-gebundenen Zustands des Myosins möglich ist.

Um den initialen Bindezustand zu verlängern und die Ausführung des ersten Kraftschlags zu verzögern, wurde zunächst versucht, ihn durch eine Rückbindung von Phosphat-Ionen so weit zu stabilisieren, dass er in der optischen Falle detektierbar wird.

Daher wurden Myosin V-S1-Moleküle wie zuvor in der optischen Falle untersucht, nun jedoch in Gegenwart von bis zu 40 mM Phosphat-Ionen. Dabei zeigte sich, dass es zu einem geringfügigen Anstieg der Dauer des nukleotidfreien Zustands nach dem zweiten Kraftschlag kam (Abb. 2.3.10). Die Ursache hierfür ist vermutlich eine Besetzung der leeren Nukleotidbindungstasche durch Phosphat-Ionen. Dies verhindert die Bindung von ATP in der Nukleotidbindungstasche und verlängert so den nukleotidfreien Zustand nach dem zweiten Kraftschlag. Erfolgt jedoch eine Bindung des Phosphats an das Myosin vor dem zweiten Kraftschlag, so hat dies offenbar keine signifikanten Auswirkungen auf die Freisetzung von ADP und die Ausführung des zweiten Kraftschlags.

Ein initialer Bindezustand vor dem ersten Kraftschlag konnte jedoch nicht beobachtet werden. Denkbar wäre jedoch, dass der Kraftschlag sehr schnell auf die Abgabe des aus der ATP-Hydrolyse stammenden Phosphatrestes erfolgt. Eine Rückbindung von Phosphat an den ADP-gebundenen Zustand des Myosins nach dem ersten Kraftschlag würde dann nicht in den initialen ADP-/Phosphat-Zustand zurückführen, da eine Umkehrung des Kraftschlags hierfür erforderlich wäre. Dies aber ist für alle Myosine nur unter Aufwendung artifiziell hoher äußerer Kräfte möglich und erfolgt niemals spontan (entsprechende Experimente für Myosin V wurden von Veigel *et al.* (2010) und Clemen *et al.* (2005) durchgeführt).

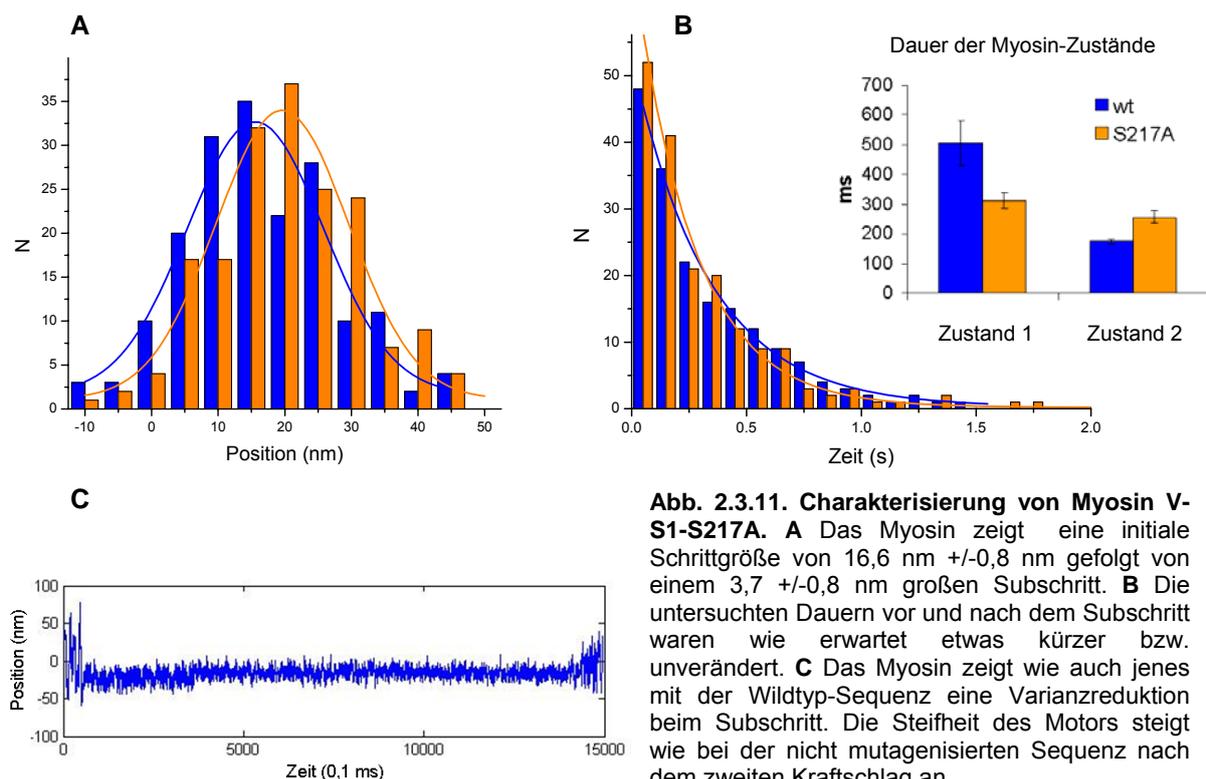
Zur Verlängerung des initialen Bindezustands wäre es also erforderlich, die primäre Phosphatabgabe nach der ATP-Hydrolyse zu verlangsamen. Dazu wäre denkbar, die Temperatur

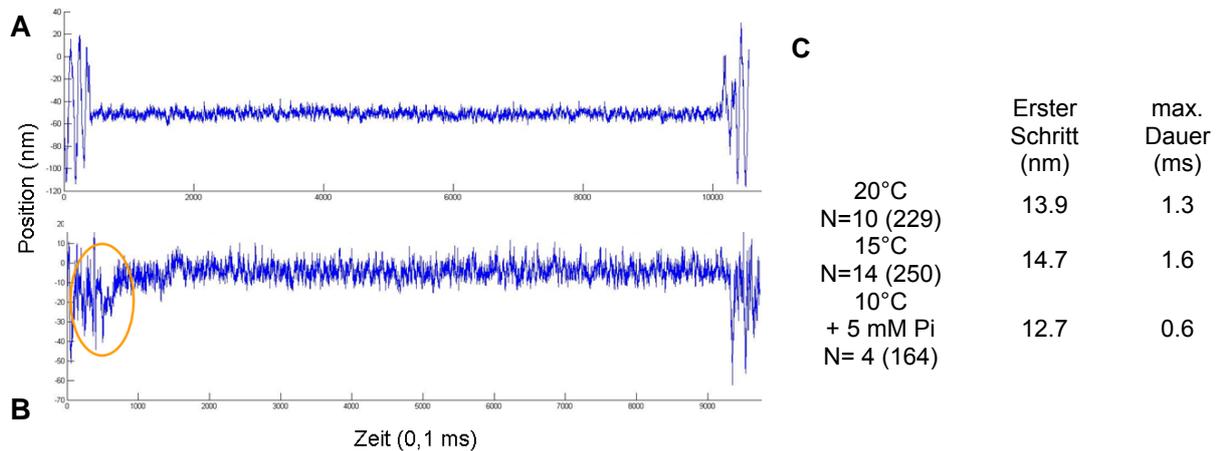
bei der Reaktion zu reduzieren oder aber ein Myosin mit ohnehin langsamer Phosphatfreigabe einzusetzen. Eine Myosin V-Mutante mit dieser Eigenschaft wurde (2009) durch Forgacs *et al.* beschrieben.

Diese Mutante, bei der Serin217 zu Alanin verändert wurde, weist eine um den Faktor zehn verlangsamte Freisetzung von Phosphat und eine ebenfalls verlangsamte (aktinfreie) Hydrolyserate auf. Alle übrigen kinetischen Parameter sind nicht oder nur wenig gegenüber dem Wildtyp-Protein verändert. So ist die Freisetzung von ADP z.B. um nur etwa den Faktor zwei beschleunigt.

Unter der Annahme, die Phosphatfreisetzung limitiere die Ausführung des ersten Kraftschlags, wie das beim zweiten Kraftschlag für ADP der Fall ist, ist eine verlängerte Dauer des initialen Bindestands zu erwarten, die der Dauer des ADP-/ Phosphat-Zustands entspricht. Anhand der kinetischen Messungen in der Arbeit von Forgacs *et al.* (2009) wäre eine Dauer im Bereich von etwa 80 ms zu erwarten.

Die Sequenz von Myosin V-S1 wurde mit den Primern 5'-GCCAAAACAACGAGGAATGACAACGCCAGTCGCTTTGGGAAATAC-3' und 5'-CTTTTTGGGCCCAAGTGTCATCC-3' sowie 5'-GTATTTCCCAAAGCGACTGGCGTTGTCATTCCTCGTTGTTTTGGC-3' und 5'-CAAAGGCCTACGTCGACGCCATGG-3' nach 4.2.2.6. mutagenisiert und der Erfolg der Mutagenese per Sequenzierung überprüft (das mutagenisierte Codon ist unterstrichen). Es wurde ein Bacmid nach 4.2.2.3 generiert, das mutagenisierte Protein analog dem Wildtyp-Protein exprimiert (4.2.3.2., 4.2.3.3., 4.2.1.5.) und in vergleichbarer Ausbeute und Reinheit aufgereinigt. Die Charakterisierung des erhaltenen Proteins in der optischen Falle ergab (Abb. 2.3.11.):





**Abb. 2.3.12. Versuch der Darstellung des initialen Bindezustands mit Myosin V-S217A.** **A** typisches Bindeereignis (10°C, 40 mM Phosphat) **B** potentieller initialer Bindezustand (markiert). Die Zeitauflösung der Methode lässt jedoch nicht zu, solche Ereignisse sicher von zufälligen Schwankungen der Position (wie in der Abbildung zu vor und nach dem Bindeereignis) zu unterscheiden. **C** Abschätzung der Dauer des initialen Bindezustands. Die Abschätzung erfolgt unter Annahme einer exponentiellen Verteilung der Dauer der Bindeereignisse. Aus der Anzahl der beobachteten potentiellen initialen Bindezustände im Bezug zur beobachteten Anzahl von Bindeereignissen ergibt sich eine Dauer von höchstens etwa 1 ms.

Myosin V-S1 (S217A) hat wie erwartet eine um etwa den Faktor 2 beschleunigte Rate der ADP-Freisetzung. Es zeigt den gleichen ca. 3,5 nm großen Subschritt oder zweiten Kraftschlag wie das Wildtyp-Protein. Der Subschritt geht außerdem mit der gleichen Steifheitserhöhung von etwa 20% einher. Allerdings zeigten sich keine initialen Bindezustände, für die aus der von Forgacs *et al.* (2009) gemessenen Phosphat-Freisetzungsrates von ca.  $16 \text{ s}^{-1}$  eine Dauer zuvor genannten 80 ms zu erwarten wären.

Um sicherzustellen, dass dieser Zustand nicht gerade im Bereich der zeitlichen Auflösung der verwendeten Methode liegt, wurde die Temperatur während der Messung auf 15 bzw. 10°C reduziert und zudem wie zuvor beim Wildtyp-Protein mit bis zu 40 mM Phosphat im Medium versucht, eine Rückbindung des Phosphats und damit möglicherweise eine Verlängerung des initialen Bindezustands zu bewirken. Die Zugabe von 40 mM Phosphat bewirkte wie auch beim Wildtyp-Protein eine geringfügige Verlängerung der Dauer des Zustands nach dem zweiten Kraftschlag.

Es war jedoch nicht möglich, einen initialen Bindezustand vor dem ersten Kraftschlag zweifelsfrei zu detektieren (2.3.12.A). Sehr selten wurden Kandidaten für diesen Zustand beobachtet (2.3.12.B). Da jedoch Schwankungen im Positionssignal der Hantel ein ähnliches Bild erzeugen können (Abb. 2.3.12.B. kurze Plateaus am Anfang und Ende der Registrierung) wie ein potentieller initialer Bindezustand, kann nicht sicher belegt werden, dass es sich hier tatsächlich um diesen Zustand handelt. Allerdings kann aus der Anzahl der beobachteten möglichen initialen Bindezustände die maximale Dauer dieses Zustands zu etwa 1 ms abgeschätzt werden (Abb.2.3.12.C). Hierbei wird eine Verteilung der Verweildauer in diesem Zustand angenommen, die mit der Dauer  $\tau$  des Zustands exponentiell abnimmt:

$$N = N_0 e^{\frac{t}{\tau}}$$

Handelt es sich bei den beobachteten initialen Bindezuständen aber um zufällige Schwankungen im Positionsrauschen der freien Hantel, liegt die tatsächliche Dauer noch möglicherweise weit unter 1 ms.

Da möglicherweise eine Verlangsamung des Übergangs vom initialen Bindezustand in den fest gebundenen Zustand auftreten könnte, wenn ein anderes Nukleotid oder nur schwer hydrolysierbares ATP-Analogon verwendet wird, wurden Messungen der S217A-Mutante in Gegenwart von CTP, TTP und GTP ausgeführt, in Gegenwart des langsam hydrolysierbaren ATP-Analogons ATP $\gamma$ S (Goody und Hofmann (1980), Bagshaw *et al.* (1974a+b)) sowie unter Zusatz des Myosin-Inhibitors 2,3-Butandion-Monoxim (BDM) (Herrmann *et al.* (1992)), der den ADP-/Phosphat-Zustand stabilisieren soll (Regnier *et al.* (1995)). Das Ergebnis dieser Messungen zeigt Tabelle 1.

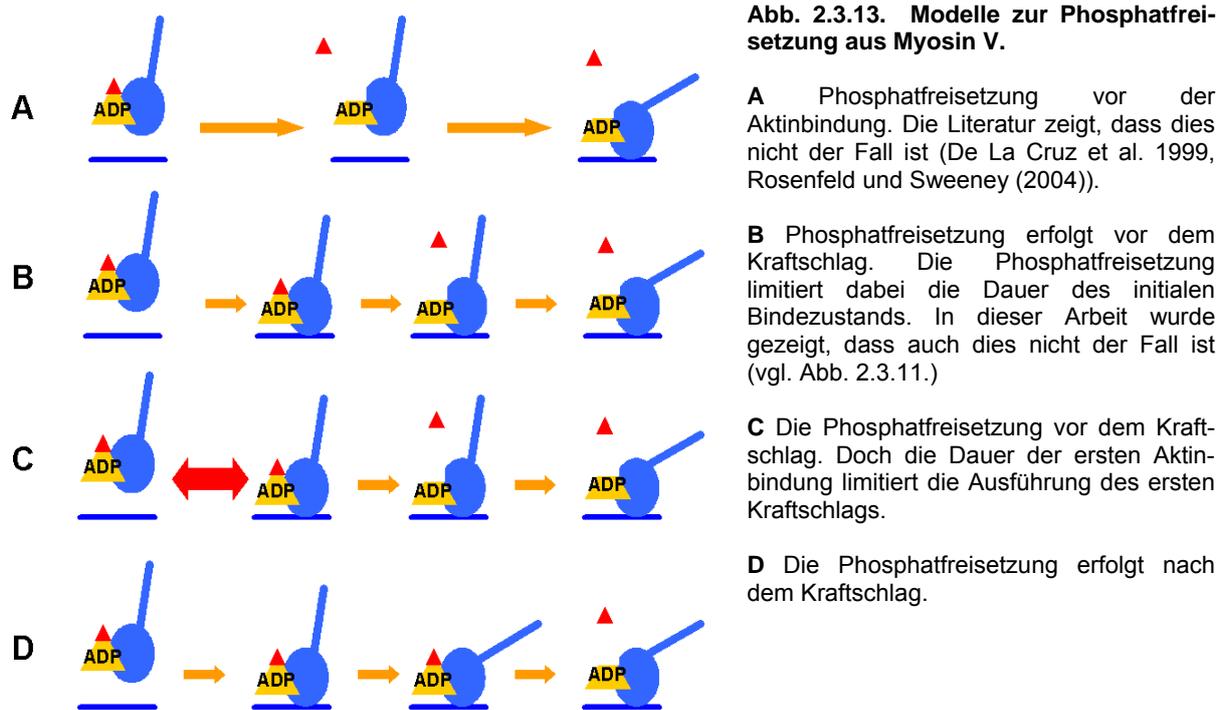
CTP und TTP fungieren als Substrat für Myosin V, es wurden Subschritte mit Varianzreduktion beobachtet und die mittlere Verschiebung der gebundenen Hantel vor dem Subschritt erscheint in der zu erwartenden Größenordnung. In Gegenwart von GTP bindet Myosin fest und sehr lange an Aktin und zeigt keine Subschritte.

ATP $\gamma$ S bewirkt mehrere Bindeereignisse ohne Verschiebung der Position der Hantel und ohne Subschritte. Diese Ereignisse hatten eine Dauer, die der des Bindezustands nach dem zweiten Kraftschlag in Gegenwart von normalem ATP entspricht (etwa 200 ms). Vermutlich bindet ATP $\gamma$ S somit nur mit einer normalem ATP vergleichbaren Geschwindigkeit an Myosin und bewirkt dessen Dissoziation von Aktin, wird jedoch nicht hydrolysiert. Die beobachteten Bindeereignisse stellen somit wahrscheinlich Myosin im nukleotidfreien Rigorzustand dar, das durch Bindung von ATP $\gamma$ S vom Aktin abdissoziiert.

In Gegenwart von BDM werden Subschritte beobachtet, der erste Kraftschlag scheint kleiner. In allen Fällen aber wurden wie zuvor keine zweifelsfrei identifizierbaren initialen Bindezustände von sicher detektierbarer Dauer beobachtet.

	erster Kraftschlag (mittlere Verschiebung)	Subschritt	initialer Bindezustand sichtbar
CTP	~14 nm	~3 nm	-
TTP	~11 nm	~3 nm	-
GTP	-	-	-
ATP $\gamma$ S	-	-	-
ATP+BDM	~2 nm	~3 nm	-

**Tabelle 1:** Test von unkonventionellen Nukleotiden und einem Inhibitor an Myosin V



Daraus folgt, dass bei den hier beschriebenen Experimenten in der optischen Falle die Dauer des initialen Bindestands nicht durch die in Lösung gemessenen Geschwindigkeitskonstanten für die Freisetzung des Phosphats aus dem Myosin bestimmt wird. Für den Zeitpunkt der Phosphatfreisetzung und seine Korrelation mit Aktinbindung und Kraftschlag des Myosins ergeben sich nun folgende mögliche Szenarien (Abb. 2.3.13.):

(A) Phosphat verlässt das Myosin vor der Bindung an Aktin

Es ist bekannt, dass der Phosphatrest nicht vor der Bindung an Aktin abgegeben wird (gezeigt für Myosin II in Malnasi-Csizmadia *et al.* (2007) und Yu *et al.* (2007), kinetische Daten für Myosin V: De La Cruz *et al.* (1999), Rosenfeld und Sweeney (2004)). Andernfalls könnte es keine durch Aktin aktivierte schnelle Phosphatfreisetzung geben. Erst durch die Aktin-Bindung wird also die Bindung des Phosphatrestes in der Nukleotidbindungstasche destabilisiert und damit Phosphat schneller freigesetzt. Die durch Aktin aktivierbare schnellere Phosphatfreisetzung muss daher nach Beginn einer ersten Interaktion von Myosin mit Aktin erfolgen.

(B) Phosphat wird nach der Aktin-Bindung aber vor dem Kraftschlag abgegeben (limitiert durch Phosphatfreigabe)

Unter Berücksichtigung der hier erhaltenen Resultate kann die Phosphatfreisetzung nicht der limitierende Faktor für die Ausführung des Kraftschlags sein. Sonst entspräche die Dauer des initialen Bindestands mindestens der der Phosphatfreisetzung (Abb. 2.3.13.B).

(C) Phosphat wird nach der Aktin-Bindung aber vor dem Kraftschlag abgegeben (limitiert durch die Dauer des initialen Bindezustands)

Es wäre möglich, dass ADP-/Phosphat-gebundenes Myosin sehr kurzlebig an Aktin bindet (im Bereich von zuvor bestimmter maximaler Dauer des initialen Bindezustands von etwa 1 ms). Nur dann, wenn der Phosphatrest zufällig die Bindungstasche innerhalb der Zeit, die das Myosin an Aktin gebunden ist, verlässt, würde das Myosin seinen Kraftschlag ausführen können. Andernfalls würde es ohne einen Kraftschlag auszuführen wieder vom Myosin abdissoziieren. In diesem Fall aber gäbe es zwei limitierende Vorgänge für die Ausführung des Kraftschlags: Die Dissoziation des Myosins vom Aktin und die Freisetzung von Phosphat. Da die Geschwindigkeit der Phosphatfreisetzung unter der hier gefundenen Zerfallsrate eines initialen Akto-Myosin-Komplexes liegt, muss ein großer Teil der initialen Bindezustände wieder zerfallen, bevor das Phosphat abgegeben werden kann. In den verbleibenden Fällen, in denen das Phosphat vorher zufällig das Myosin verlässt, käme es zum Kraftschlag. Es würde dann für Wildtyp-Myosin V unter Berücksichtigung der Phosphatfreisetzungsrates von etwa  $200 \text{ s}^{-1}$  (Rosenfeld und Sweeney (2004)) im Rahmen der hier verwendeten Methode nur höchstens jeder sechste Bindevorgang des Myosins an Aktin zu einem Kraftschlag führen können, dessen Resultat dann als Bindeereignis in der optischen Falle beobachtet werden kann. Die übrigen würden im Rahmen der Dauer der ersten Aktin-Bindung des Myosins ihren Phosphatrest nicht abgeben können und wieder vom Aktin abdissoziieren. Für die Mutante S217A dürfte dann bei einer Phosphatfreisetzungsrates von nur  $16 \text{ s}^{-1}$  sogar nur einer von achtzig Bindevorgängen zu einem Kraftschlag gefolgt von einem längeren, d.h. beobachtbaren Bindeereignis führen. Bei einem deutlich weniger als 1 ms dauernden initialen Bindezustand wäre die Zahl der „produktiven“ Bindeereignisse noch geringer.

Eine daraus resultierende Verringerung der Binderate an Aktin wurde nicht beobachtet, kann jedoch auch nicht mit der verwendeten Methode verlässlich bestimmt werden. Die Häufigkeit der Interaktion von Aktin und Myosin ist hier nämlich in hohem Maße abhängig von der räumlichen Orientierung von Aktin und Myosin zueinander und damit nicht zwischen verschiedenen Motormolekülen vergleichbar.

(D) Phosphat wird nach dem Kraftschlag freigegeben.

Schließlich wäre denkbar, dass der Phosphatrest erst nach dem Kraftschlag das Myosin verlässt. Dies würde bedeuten, dass der Kraftschlag des Myosins ausschließlich durch die Aktin-Bindung initiiert und limitiert würde. In diesem Fall müsste, um phosphatabhängige Effekte bei Myosin V und anderen Myosinen zu erklären (z.B. die reduzierte generierbare Kraft in Muskelfasern (Cooke und Pate, (1985)) oder eine verringerte Maximalkraft bei Myosin V (Kad *et al.* (2008)), der Zustand des Myosins nach dem ersten Kraftschlag durch

die Bindung von Phosphat verändert werden oder das Myosin in den vorherigen ADP-Phosphat-Zustand zurückkehren. Letzteres aber wäre mit einer Umkehrung des ersten Kraftschlags verbunden und wird nur bei dem Kraftschlag entgegenwirkenden, artifiziell hohen Kräften beobachtet (Sellers und Veigel (2010)). Denkbar wären daher einer Veränderung der Aktin-Affinität und/oder ADP-Freisetzungsrates im Zustand nach dem ersten Kraftschlag je nachdem, ob sich noch ein Phosphat-Rest in der Bindungstasche befindet oder nicht. Derartige Effekte wurden bisher jedoch nicht beobachtet.

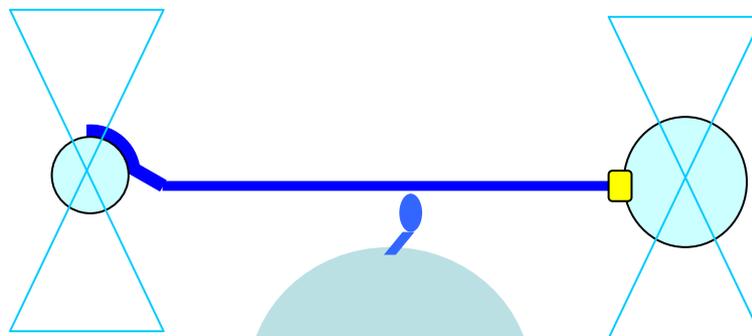
Daher scheint es wahrscheinlich, dass Modell C zutrifft. Die Freisetzung des Phosphat-Restes aus einem Myosin nach der ATP-Hydrolyse ist für die Ausführung des Kraftschlags nicht der allein limitierende Schritt. Vielmehr scheint eine Kombination aus Dissoziationsrate des Myosins im ADP-/Phosphat-Zustand vom Aktin und nachfolgender Phosphatfreisetzung die Ausführung des Kraftschlages zu limitieren. Die Dauer des initialen Bindezustands des Myosins an Aktin wird dabei primär durch dessen Dissoziationsgeschwindigkeit limitiert und nicht von der Freisetzung von Phosphat.

### 3. Diskussion:

#### 3.1. Verbesserung der Gelsolinhandtel

Die Verbindung des Aktin-Filaments an die Latexkugel in einer Aktin-Handtel zur Manipulation in der optischen Falle wurde in dieser Arbeit über das Aktin-bindende Protein Gelsolin vermittelt. Dies führt dazu, dass an einer Seite der Handtel das Aktin nicht mehr lateral an eine Latexkugel gebunden wird, sondern ein Ende des Filaments senkrecht zur Kugeloberfläche steht (Abb. 3.1.1.). Die Steifheit der Verbindung wurde zu 0,110 pN/nm bestimmt, während die konventionelle laterale Anbindung über Neutravidin nur eine Steifheit von 0,024 pN/nm aufwies. Unter der Annahme, die Dehnbarkeit von Aktin sei vernachlässigbar (Steifheit:  $\sim 60$  pN/nm, Kojima *et al.*, 1994), bedeutet dies, dass durch diese Verbesserung Steifheitsunterschiede im Bereich von einigen zehntel pN/nm auflösbar werden, die mit einer konventionellen Aktin-Anbindung nicht detektierbar wären

Die neue Anbindung über Gelsolin erlaubt also die Darstellung von Änderungen der Steifheit von Motormolekülen, die nämlich im Bereich jener weniger zehntel pN/nm liegen (z.B: 0,2 pN/nm für Myosin V, Veigel *et al.* (2002)). Die Gelsolin-Verbindung ist daher der lateralen Biotin-/Neutravidin-Anbindung deutlich überlegen.



**Abb. 3.1.1. Schema des modifizierten experimentellen Aufbaus in der optischen Falle.** Eine Kugel (hier: rechts) wurde im Gegensatz zu bisherigen Experimenten andere Gruppen nicht mehr lateral an Aktin gebunden sondern mit Hilfe von Gelsolin an das Ende eines Aktin-Filaments.

#### 3.2. Der zweite Kraftschlag vom Myosin V erfolgt nach der ADP-Freisetzung und geht mit einer Erhöhung der mechanischen Steifheit von Myosin V einher

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem gezeigt, dass die Steifheit von Myosin V sich während seines katalytischen Zyklus ändert: Bei Experimenten in der optischen Falle wurde mit zwei verschiedenen Ansätzen gezeigt, dass sich die Steifheit des Myosins mit dem von ihm ausgeführten zweiten Kraftschlag um etwa 20-40% erhöht. Die Steifheit des Myosins wurde hier zu  $0,125 \pm 0,002$  pN/nm vor und  $0,152 \pm 0,003$  pN/nm nach dem zweiten

Kraftschlag bestimmt (2.3.1.). Die Dauer der Zustände vor und nach dem Kraftschlag sowie die Größe der ausgeführten Schritte des Myosins waren dabei jenen in Experimenten anderer Arbeitsgruppen vergleichbar (Veigel *et al.* (2002, 2003)). Die Bestimmung der Steifheit ist in hohem Maße von den Steifheiten der Elemente der verwendeten Aktin-Hantel abhängig. Die Steifheit der konventionellen lateralen Anbindung zudem stark von der Vorspannung der Hantel. Im Rahmen der Unwägbarkeiten der verwendeten Methode passen die hier bestimmten Steifheiten daher gut zu denen anderer Gruppen (Veigel *et al.* (2002), Myosin V: 0,2 pN/nm).

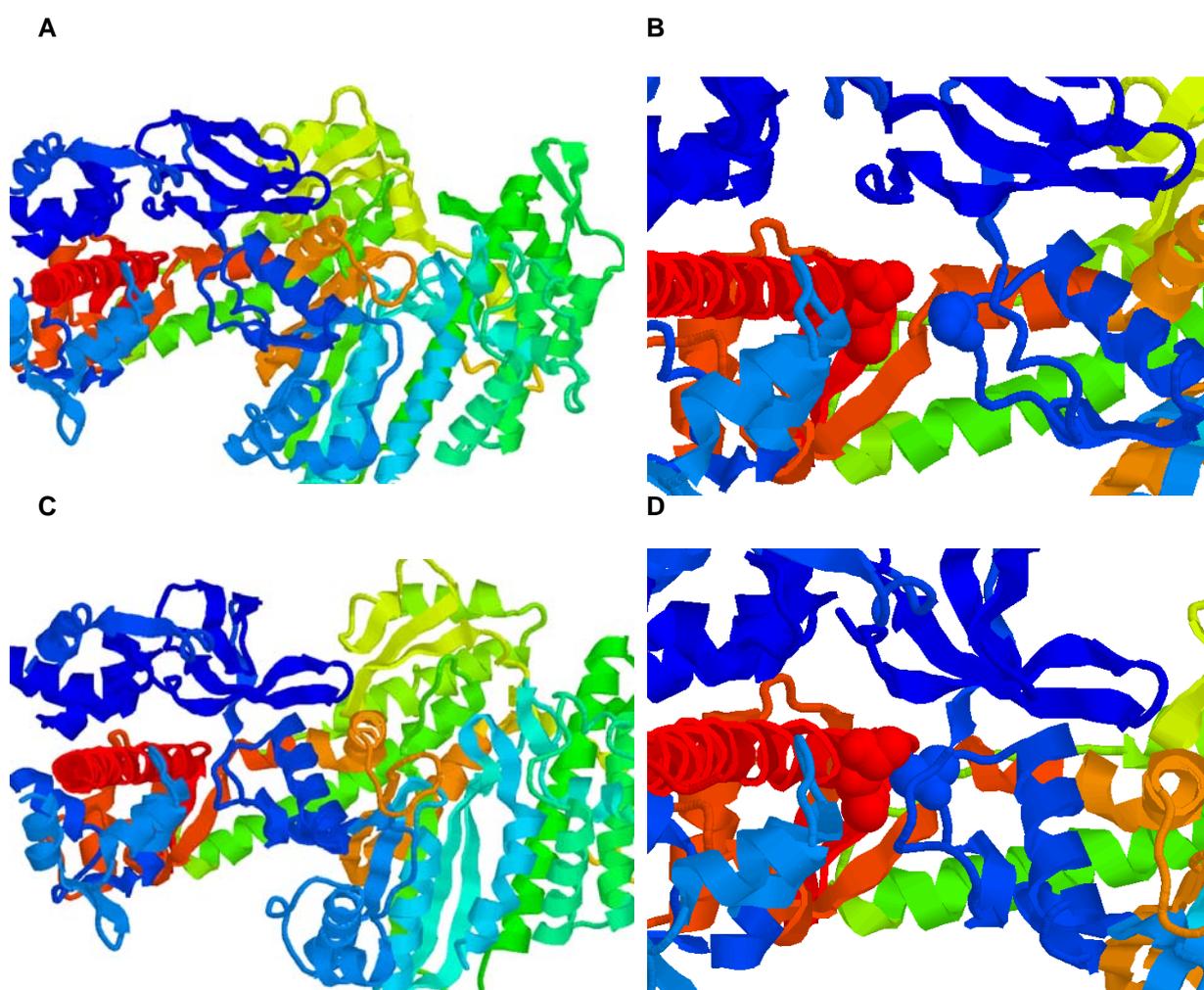
Bisher war bekannt, das Myosin V seinen Kraftschlag in zwei Schritten ausführt: Einem 16 nm großen ersten Kraftschlag und einem kleineren zweiten Kraftschlag von etwa 5 nm (Veigel *et al.* (2002), Sellers und Veigel (2010)). Der erste Kraftschlag ist so schnell, dass er bisher nicht direkt beobachtet werden konnte und es wird daher vermutet, er sei mit der Freisetzung des Phosphats aus der Nukleotidbindungstasche assoziiert, welches mit einer Geschwindigkeitskonstante von etwa  $200 \text{ s}^{-1}$  geschieht (Rosenfeld und Sweeney (2004)). Die charakteristische Dauer des Zustands vor dem zweiten Kraftschlag liegt im Bereich der Dauer des ADP-gebundenen Zustands, so dass davon ausgegangen wird, der zweite Kraftschlag sei mit der ADP-Freisetzung assoziiert (Veigel *et al.* (2002), De La Cruz *et al.* (1999)).

Zudem ist bekannt, dass sowohl die Freisetzung von ADP als auch die Ausführung des zweiten Kraftschlags durch am Hebelarm des Myosins anliegende Kräfte stark beeinflusst werden. Die daraus resultierende Asymmetrie der ADP-Freisetzung soll die prozessive Bewegung von Myosin V erlauben bzw. verbessern (Rief *et al.* (2000), Rosenfeld und Sweeney (2004), Rosenfeld *et al.* (2005)): So konnten Veigel *et al.* (2003) zeigen, dass die Dauer des Zustands vor dem zweiten Kraftschlag durch den Kraftschlag unterstützende Kräfte verkürzt wird, durch dem Kraftschlag entgegenwirkende Kräfte dagegen verlängert. Rief *et al.* (2000) und Purcell *et al.* (2005), konnten zeigen, dass die Kinetik eines Myosins V unter großen Kräften, die entgegen der Myosin-Bewegungsrichtung wirken, verlangsamt wird. Auch andere kinetische Studien konnten zeigen, dass die ADP-Freisetzung durch dem Kraftschlag entgegengerichtete Kräfte verlangsamt und durch den Kraftschlag unterstützende Kräfte beschleunigt wird (Forgacs *et al.* (2008), Oguchi *et al.*, (2008)). Rosenfeld *et al.* (2005) konnten zudem zeigen, dass die Anwesenheit von Magnesium in der Nukleotidbindungstasche ebenfalls die ADP-Freisetzungsrates verändert und möglicherweise auch selbst abhängig ist von anliegenden Kräften. Der Zustand des Myosins V vor seinem zweiten Kraftschlag und die damit assoziierte Freisetzung von ADP sind also in hohem Maße beeinflusst durch am Hebelarm anliegende Kräfte.

Für den nukleotidfreien Rigor-analogen Zustand von Myosin V wurden in zuvor genannten Arbeiten keine oder nur sehr geringe Abhängigkeiten der Kinetik (insbesondere der ATP-

Bindung) von äußeren Kräften gefunden (Forgacs *et al.* (2008), Oguchi *et al.* (2008), Veigel *et al.* (2003)).

Die hier gefundene Steifheitsänderung erklärt möglicherweise, wie eine Kommunikation von Hebelarm und Motormechanik mit der Nukleotidbindungstasche und damit der biochemischen Kinetik des Myosins möglich sein könnte und weshalb eine Kraftabhängigkeit der Kinetik fast ausschließlich im ADP-Zustand auftritt: Es wird davon ausgegangen, dass die relativ kleinen Konformationsänderungen der Nukleotidbindungstasche während der Hydrolyse von ATP und der Freisetzung der Reaktionsprodukte über die sogenannte Konverter-Region des Myosins in den großen Kraftschlag des Halses übersetzt werden (Coureux *et al.* (2004)). Weiterhin wird angenommen, dass der Hals des Myosins weitgehend als fester Hebel agiert. Studien an muskulärem Myosin II legen nahe, dass der Konverter die Steifheit des Myosins stark beeinflusst (Seebohm *et al.* (2009)), somit möglicherweise der flexibelste Teil der Myosinstruktur ist und dessen Steifheit maßgeblich bestimmt.



**Abb. 3.2.1.** **A** ADP-Phosphat-Zustand von Myosin V (Kristallstruktur in Gegenwart ADP-BeF, Coureux *et al.*, 2004). Zwischen Hebelarm (rote Helix) und einem Teil des Motors (blau) besteht kein Kontakt. **B** zeigt exemplarisch hervorgehoben Ser78 (blau) und Ala757/Tyr756 (rot). Diese Bereiche treten im nukleotidfreien Zustand **C** in direkten Kontakt, die van-der-Waals-Radien der zuvor genannten Aminosäuren und weiterer berühren einander (**D**).

Fischer *et al.* haben zudem 2005 in Simulationen zum Kraftschlag von Myosin II gezeigt, dass die Relay-Helix (vgl. Abschnitt 1.2.1. und Abb. 1.2.1) als eine Art „Wippe“ fungiert, deren Bewegung den Konverter und darüber den Hebelarm auf der einen Seite und die Nukleotidbindungstasche auf der anderen Seite beeinflusst. Die Arbeiten von Kintsjes *et al.* (2008) und Malnasi-Csizmadia *et al.* (2007) haben dies experimentell u.a. durch Mutation jener Aminosäuren, die den Angelpunkt der „Wippe“ bilden, überprüft und Hinweise gefunden, dass Veränderungen dieser Aminosäuren kritisch für die Kinetik der ATP-Bindung und vor allem der des Kraftschlags sind.

Wenn also Myosine (und auch Myosin V) über einen solchen strukturellen Mechanismus funktionieren, würde das mit den hier gezeigten Daten bedeuten, dass die Relay-Helix-/Konverter-Einheit im Zustand des Myosins vor dem zweiten Kraftschlag beweglicher sein muss (da das Molekül wie hier gezeigt weniger steif ist) und nach dem zweiten Kraftschlag weniger beweglich. Unter der Voraussetzung, die Steifheit der „Wippe“ sei relativ hoch und die Steifheit des gesamten Myosins dominiert durch die Elastizität der „Aufhängung“ der „Wippe“, d.h. ihre Beweglichkeit gegen andere Elemente des Moleküls, würde daraus folgen: Vor dem zweiten Kraftschlag wäre eine Kommunikation zwischen Hebelarm und Nukleotidbindungstasche möglich. Wirken Kräfte auf den Hebelarm, würden diese direkt in Veränderungen in der Nukleotidbindungstasche übersetzt. Nach dem zweiten Kraftschlag würde das System aus Hebelarm, Konverter und der Relay-Helix-„Wippe“ in irgendeiner Form „arretiert“ und die Übertragung von auf den Hebelarm einwirkenden Kräften auf die Nukleotidbindungstasche unterbunden. Fraglich wäre dann, wie eine Arretierung der „Wippe“ möglich wäre. Es könnte einerseits zu einer Veränderung der Elastizität im Bereich der „Aufhängung“ der Wippe kommen. Hier wäre denkbar, dass minimale Veränderungen der Nukleotidbindungstasche zu strukturellen Veränderungen der Motordomäne entlang der Relay-Helix führen, die ihrerseits die Beweglichkeit der Helix innerhalb der Motordomäne beeinflussen. Alternativ wäre denkbar, dass das System aus Relay-Helix, Konverter und Wippe über andere Interaktionen mit der Motordomäne seine Beweglichkeit verändert:

Hier zeigen strukturelle Daten von Myosin V eine Möglichkeit zur Arretierung des Systems aus Hebelarm, Konverter und Relay-Helix auf (Abb. 3.2.1, nach Coureux *et al.* (2003, 2004)): Beim Übergang vom ADP-/Phosphat-gebundenen Zustand vor dem ersten Kraftschlag zum nukleotidfreien Rigorzustand nach dem zweiten Kraftschlag entsteht ein direkter Kontakt zwischen Motordomäne und Hebelarm, der Hebelarm schlägt gewissermaßen an der Motordomäne an und wird dann ggf. zusätzlich durch schwache Wechselwirkungen an die Motordomäne gebunden. Für den ADP-Zustand zwischen erstem und zweitem Kraftschlag wurde zwar ebenfalls versucht, eine Struktur darzustellen (Coureux *et al.* (2004)), diese unterscheidet sich in der Hebelarmposition jedoch nicht von der nukleotidfreien Struktur nach dem zweiten Kraftschlag. Da der Kristall in der Arbeit durch nukleotidfreie Kristallisation und

nachfolgendes Einspülen von ADP generiert wurde, ist jedoch davon auszugehen, dass diese Struktur nicht den ADP-Zustand vor dem zweiten Kraftschlag darstellt, sondern in diesem Zustand der Hebelarm tatsächlich eine Position zwischen den gezeigten Extremen einnehmen müsste. Dann aber würde die Beweglichkeit des Hebelarms und damit die Steifheit des Myosins sich in den Strukturen vor und nach dem zweiten Kraftschlag je nach Kontakt des Hebelarms zur Motordomäne unterscheiden. Vor dem zweiten Kraftschlag würde der Hebelarm nicht an der Motordomäne anliegen und wäre beweglicher. Am Hebelarm angreifende Kräfte könnten entlang der Relay-Helix auf die Nukleotidbindungstasche übertragen werden. Nach dem zweiten Kraftschlag würde der Hebelarm direkt an der Motordomäne anliegen und seine Beweglichkeit reduziert, die Steifheit des Myosins wäre erhöht. Nun wäre die Steifheit des Moleküls durch andere Elemente des Kopfes oder eine interne Verformung des Hebelarms bestimmt. Eine Übertragung mechanischer Veränderungen auf die Nukleotidbindungstasche über den „Wippe“-Mechanismus würde unterbunden. Dies entspricht sowohl den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen zur Steifheitsänderung von Myosin V als auch bekannter Daten zu Kinetik des Myosins.

Auch für andere Myosine wie z.B. Myosin II gibt es Hinweise, dass sie vermutlich in Verbindung mit der Freisetzung von ADP einen zweiten Kraftschlag ausführen, der kleiner ist als der erste, der mit der Phosphat-Freisetzung assoziiert ist (Veigel *et al.* (2003)). Es wäre daher denkbar, dass Steifheitsänderungen im katalytischen Zyklus auch bei anderen Myosinen auftreten und die Kinetik unterschiedlich steifer Zustände evtl. in unterschiedlicher Art reguliert werden. Ferner sind Schlussfolgerungen aus der Muskelfasermechanik ggf. zu überdenken, da dort angenommen wird, die Steifheit einer Muskelfaser sei direkt proportional zur Zahl der an Aktin fest gebundenen Myosin-Köpfe. Dies ist jedoch nur dann richtig, wenn das muskuläre Myosin II seine Steifheit im katalytischen Zyklus nicht ändert. Gäbe es auch dort nicht vernachlässigbare Änderungen der Myosin-Steifheit in seinem katalytischen Zyklus, müsste die Interpretation dieser Arbeiten ggf. modifiziert werden.

Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Freisetzung von ADP dem Kraftschlag vorausgehen muss (vgl. 3.3.2.). Eine Korrelation von ADP-Freisetzung und zweitem Kraftschlag wurde bereits in den Arbeiten von Veigel *et al.* (2002) und De La Cruz *et al.* (1999) vermutet, da die Zeitkonstanten für beide Vorgänge einander ähneln. Die zeitliche Abfolge zwischen beiden Ereignissen jedoch wurde bisher nicht bestimmt, in vielen Arbeiten wird jedoch postuliert, dass die ADP-Freisetzung dem zweiten Kraftschlag folgt oder gleichzeitig mit ihm stattfindet (z.B. Veigel *et al.* (2002)). Die Inhibition der Konformationsumwandlung mit ADP in dieser Arbeit zeigte jedoch, dass der zweite Kraftschlag und auch die damit verbundene Steifheitserhöhung erst nach der Freisetzung von ADP stattfinden können. Dies würde zudem das zuvor beschriebene Modell stützen, nach dem der

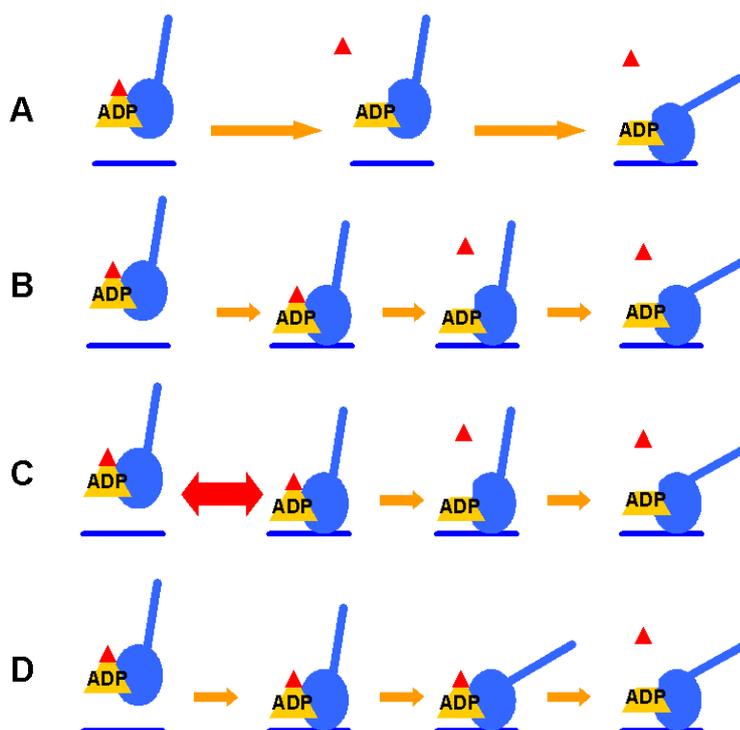
„weichere“ erste Zustand des Myosins aufgrund seiner leichten Deformierbarkeit eine stark Last-abhängige Kinetik zeigt, während dies für den steiferen Rigor-Zustand nach dem zweiten Kraftschlag nicht zutrifft. Würde ADP nach dem Kraftschlag abgegeben, müsste ein anderer Mechanismus die asymmetrische Kinetik erklären.

Ein Wechsel vom Rigor-analogen Zustand zurück in den vorherigen wurde hier nicht beobachtet, so dass der zweite Kraftschlag auch nicht mit der Bindung von ADP reversibel sein kann. Eine fest geregelte Abfolge zwischen ADP-Freisetzung und zweitem Kraftschlag kann auch hier nicht endgültig bewiesen werden, doch zeigen die erhobenen Daten, dass bevorzugt der zweite Kraftschlag der ADP-Freisetzung folgen muss und nicht umgekehrt.

### 3.3. Die Freisetzung von Phosphat limitiert nicht allein die Ausführung des Kraftschlags

Myosin bindet nach der Hydrolyse des ATP an Aktin und vollführt unter Abgabe von anorganischem Phosphat seinen ersten Kraftschlag. Dabei blieb bisher unklar, in welcher Reihenfolge Phosphat-Abgabe und Kraftschlag stattfinden und ob das ein Ereignis das Vorgehen des jeweils anderen voraussetzt.

Bekannt ist für Myosin II, dass ATP vor der Bindung des Myosins an Aktin hydrolysiert wird (Malnasi-Csizmadia *et al.* (2007) und Yu *et al.* (2007)). Es wird daher und weil die Phosphat-freisetzung von Myosin V durch Aktin aktivierbar ist (De La Cruz *et al.* (1999)), davon ausgegangen, dass dies auch der Fall für Myosin V ist. Vor der Bindung an Aktin liegt das Myosin beladen mit ADP und Phosphat vor. Das Phosphat-Ion bleibt vor der



**Abb. 3.3.1 Modelle zur Phosphatfreisetzung aus Myosin V.**

**A** Phosphat-Freisetzung vor der Aktin-Bindung. Die Literatur zeigt, dass dies nicht der Fall ist (De La Cruz *et al.* (1999), Rosenfeld und Sweeney (2004)).

**B** Phosphat-Freisetzung erfolgt vor dem Kraftschlag. Die Phosphat-Freisetzung limitiert dabei die Dauer des initialen Bindestands. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch dies nicht der Fall ist (vgl. Abb. 2.3.11.)

**C** Die Phosphat-Freisetzung erfolgt vor dem Kraftschlag, doch die Dauer der ersten Aktin-Bindung limitiert die Ausführung des ersten Kraftschlags. Die daraus resultierende stark verringerte Aktin-Binderate für die Mutante S217A wurde zwar nicht beobachtet, sie ist jedoch im Rahmen der Messungen in der optischen Falle auch nicht zuverlässig bestimmbar.

**D** Die Phosphat-Freisetzung erfolgt nach dem Kraftschlag.

Bindung an Aktin in der Nukleotidbindungstasche fest gebunden, da es durch die Strukturelemente Switch I, Switch II und den P-Loop stabilisiert wird (Coureux *et al.* (2004)). Diese drei Sequenzen innerhalb des Myosinkopfes koordinieren den  $\gamma$ -Phosphatrest des ATP und verändern ihre Position während des katalytischen Zyklus. Bei der Bindung des Myosins an Aktin führen strukturelle Veränderungen der Aktin-Bindestelle und damit einhergehende Konformationsänderungen der Nukleotidbindungstasche dazu, dass dem Phosphatrest ein

Weg aus der Nukleotidbindungstasche hinaus geöffnet und seine Bindung in der Nukleotidbindungstasche destabilisiert wird. Hier wird eine entsprechende Verschiebung von Switch I diskutiert (Holmes *et al.* (2004)). Daher kann das  $\gamma$ -Phosphat erst nach der Ausbildung der ersten Bindung des Myosins an Aktin das Molekül verlassen (Abb. 3.3.1.A trifft daher nicht zu) (Coureux *et al.* (2004), Sweeney *et al.* (1998)). Es kommt dann möglicherweise gleichzeitig mit diesen Prozessen oder aber danach zum Kraftschlag (Rosenfeld und Sweeney (2004)).

In dieser Arbeit wurde die zeitliche Abfolge zwischen diesen Schritten mit der durch Forgacs *et al.* (2009) beschriebenen Mutante S217A von Myosin V untersucht. Es muss einen initialen Bindezustand des Myosins geben, in dem zum einen das Phosphat-Ion das Molekül noch nicht verlassen hat (da erst die Aktin-Bindung die Bindung des Phosphat-Ions in der Nukleotidbindungstasche destabilisiert). Zum anderen darf der Kraftschlag vor der Aktin-Bindung noch nicht ausgeführt worden sein, da sonst keine Generierung von Kraft oder Bewegung entlang des Aktin-Filaments durch das Myosin möglich wäre. Somit bleiben folgende Möglichkeiten der Relation von Phosphat-Freisetzung und Kraftschlag:

1. (Abb. 3.3.1.B) Die Freisetzung von Phosphat limitiert den Kraftschlag.
2. (Abb. 3.3.1.C) Die Dauer des initialen Bindezustands limitiert den Kraftschlag.
3. (Abb. 3.3.1.D) Die Freisetzung von Phosphat erfolgt nach dem Kraftschlag und ist möglicherweise unabhängig von der Ausführung des Kraftschlags.

Die Myosin V-S217A weist eine Phosphat-Freisetzungsrate von  $16 \text{ s}^{-1}$  auf (Forgacs *et al.* (2009)), so dass also die Dauer des Phosphat-beladenen Myosinzustandes im Bereich von 80 ms liegen sollte. Ist es korrekt, dass der Kraftschlag zusammen mit oder nach der Freisetzung des Phosphats stattfindet, so sollte also der initiale Bindezustand vor dem Kraftschlag darstellbar sein (Abb. 3.3.1.B).

Tatsächlich aber wurden in dieser Arbeit keine Hinweise auf einen initialen Bindezustand gefunden, der zuvor genannten Kriterien genügt. Alle möglicherweise gefundenen Zustände dieser Art sind im Rahmen der Zeitauflösung der Messmethode nicht zweifelsfrei als initialer Bindezustand zu identifizieren. Daraus folgt jedoch, dass die Dauer dieses Zustands im Bereich von wenigen Millisekunden oder noch darunter liegen muss.

Das bedeutet für die Koordination von Phosphat-Freisetzung und Kraftschlag, dass die Freisetzung von Phosphat möglicherweise nicht mit der Ausführung des Kraftschlags korreliert oder aber nicht der dafür allein limitierende Faktor ist. Dies erlaubt also zwei mögliche Szenarien für die Beziehung von Hebelarm-Bewegung und Phosphat-Freisetzung: Erstens wäre denkbar, dass ausschließlich die Bindung an Aktin den Kraftschlag auslöst und die Freisetzung von Phosphat zu einem späteren Zeitpunkt stattfinden kann (Modell D (nach Abb. 3.3.1)).

Zweitens könnte Phosphat zwar vor dem Kraftschlag freigesetzt werden, jedoch die Dauer des initialen Bindezustands durch die Dauer der Aktin-Bindung des Myosins in diesem Zustand limitiert werden. Es würde dann Myosin mehrmals jeweils nur sehr kurz an Aktin binden und nur, wenn zufällig das Phosphat-Ion in diesem Zeitfenster das Molekül verlässt, seinen Kraftschlag ausführen und deutlich fester und länger an Aktin binden (Modell C in Abb. 3.3.1). Hierfür spricht, dass Baker *et al.* (2002) in Gegenwart von Phosphat-Ionen festgestellt haben, dass Myosin II im Gegensatz zu Experimenten ohne zusätzliches Phosphat in der umgebenden Lösung sehr viele, sehr kurze Bindeereignisse zeigt, die als initiale Bindezustände ohne folgenden Kraftschlag interpretiert wurden. Diese Arbeit würde durch die hier gezeigten Experimente gestützt.

In beiden Fällen wäre aber die Dauer des initialen Bindezustand vor dem Kraftschlag eines Myosins von Veränderungen der Kinetik der Phosphatfreigabe unbeeinflusst und kann nicht in der optischen Falle sichtbar gemacht werden. Im ersten Fall (Phosphat wird nach dem ersten Kraftschlag freigesetzt) limitiert und initiiert ausschließlich die Aktin-Bindung den ersten Kraftschlag, was bedeutet, er würde nur durch eine erhebliche Verlangsamung der Konformationsänderung oder eine Messmethode mit deutlich besserer zeitlicher Auflösung sichtbar. Im zweiten Fall (primär limitiert die Dauer der ersten Aktin-Bindung des Myosins den initialen Bindezustand) würde die schnelle Abdissoziation des Myosins im ADP-/Phosphat-gebundenen Zustand vom Aktin-Filament eine Darstellung unmöglich machen, sofern nicht die Aktinaffinität dieses Zustands erhöht und so seine Bindung an Aktin verlängert werden könnte.

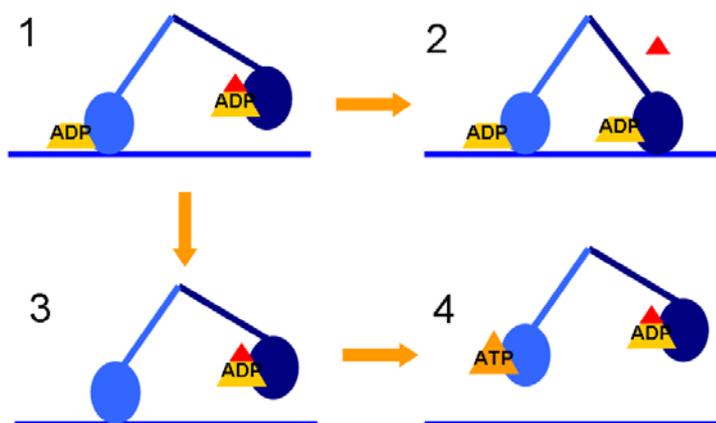
Fraglich wäre dann jedoch, wie die Auswirkungen, die Phosphatzugabe in anderen Arbeiten hatte, in beiden Fällen erklärt werden können.

In der Arbeit von Forgacs *et al.* (2009), in der auch die in dieser Arbeit verwendete S217A-Mutante generiert wurde, wurde festgestellt, dass neben der verlangsamten Phosphatfreisetzung die ADP-Freisetzung moderat beschleunigt war und die Prozessivität des Myosins bei hohen ATP-Konzentrationen verloren ging.

In Modell D müsste die längere Gegenwart des Phosphat-Ions in der Nukleotidbindungs-tasche nach dem ersten Kraftschlag für die geringere Prozessivität verantwortlich sein. Es wäre denkbar, dass die Gegenwart des Phosphat-Ions die Bindung von ADP in der

Nukleotidbindungstasche durch elektrostatische Abstoßung destabilisiert und so möglicherweise den entscheidenden Regulationsschritt des Myosins V, die lastabhängig reduzierte ADP-Freisetzung, ausschaltet. Damit würde einer prozessiven Bewegung des Myosin entgegengewirkt. Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich, da eine phosphatabhängige Beschleunigung der ADP-Freisetzung bisher nicht beschrieben wurde.

In Modell C würde durch die längere Verweildauer des Phosphats in der Nukleotidbindungstasche das Myosin nach einem initialen Bindeereignis sehr viel häufiger wieder schnell vom Aktin abdissoziieren (vgl. dazu Abb. 3.3.2). Die Häufigkeit produktiver Bindeereignisse, d.h. solcher mit einem Kraftschlag und folgender fester Aktin-Bindung, würde reduziert. Für ein sich prozessiv bewegendes Myosin würde dies bedeuten, der vorangehende Kopf könnte weitaus seltener an Aktin binden und damit der folgende Kopf mit höherer Wahrscheinlichkeit sein ADP verlieren, ATP binden und das gesamte Molekül sich vom Aktin lösen (Abb. 3.2.3).



**Abb. 3.3.2. Prozessive Bewegung von Myosin V.**

Bei schneller Phosphat-Freisetzung und langsamer ADP-Freisetzung aus dem vorangehenden Myosin-Kopf bleibt das Myosin an Aktin gebunden (Übergang 1=>2). Bindet der Kopf aufgrund einer langsamen Phosphat-Freisetzung nur selten fest an Aktin, vermag der hintere Kopf in der Zwischenzeit sein ADP verlieren und ATP binden. Dies beendet den prozessiven Lauf und beide Köpfe lösen sich von Aktin (Übergang 1=>3=>4). rot: Phosphat-Ion, dunkel: vorangehender Kopf, hell: nachfolgender Kopf

Sellers und Veigel (2010) konnten zudem möglicherweise den ersten Kraftschlag von Myosin V zeigen, indem sie das Molekül nach dem Bindevorgang an Aktin sehr schnell mit hohen Kräften entgegen des Kraftschlags "zurückzogen". Unter diesen Bedingungen wechselt das Myosin zwischen zwei Zuständen, zwischen denen es einen Kraftschlag von etwa 16 nm ausführt. Die Zugabe von Phosphat verkürzte dort die Zeit, die das Myosin an Aktin gebunden war. Die dortige Schlussfolgerung war, dass die Rückbindung von Phosphat zu einem schwächer gebundenen Zustand führt, der leichter vom Aktin abdissoziiert. Dies würde dafür sprechen, dass eine Rückbindung von Phosphat an das Myosin möglich ist und dessen Bindung an Aktin destabilisiert, wenn es sich in der Konformation vor dem ersten Kraftschlag befindet.

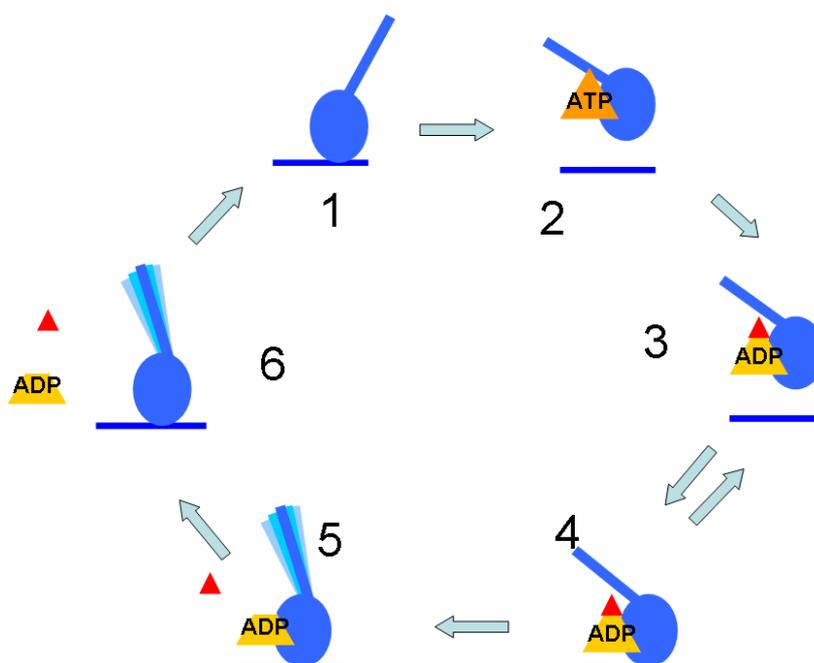
Grundsätzliches Problem der Studie von Sellers und Veigel ist jedoch, dass die erzwungene Deformation mit artifiziell hohen Kräften zwar offenbar den Hebelarm in seine Konfiguration vor dem Kraftschlag zwingen kann. Der erhaltene Zustand ist jedoch möglicherweise nicht mit dem „normalen“ ADP/Phosphat-gebundenen Zustand nach Durchlauf eines katalytischen Zyklus identisch und ist daher nicht vergleichbar. Wenn aber durch mechanische

Deformation des Myosin in einen Zustand versetzt werden kann, der dem tatsächlichen ADP-/Phosphat-Zustand vor dem ersten Kraftschlag weitgehend entspricht, so spricht dies für das Modell C (Abb. 3.3.1. (die Aktinbindung limitiert den initialen Bindezustand)).

Es erscheint somit wahrscheinlich, dass Myosin V sich wie in Modell C (Abb. 3.3.1) verhält: Nach einer kurzen ersten Interaktion mit Aktin wird die Bindung von Phosphat in der Nukleotidbindungstasche destabilisiert. Verlässt es nicht schnell genug den Myosinkopf, dissoziiert dieser wieder von Aktin ab. Verlässt der Phosphatrest jedoch zufällig schnell die Nukleotidbindungstasche, kommt es zum Kraftschlag des Myosins und einer festen Bindung an Aktin.

Zusammen mit den Resultaten zum zweiten Kraftschlag und der ADP-Freisetzung ergibt sich daher folgende Modifikation des katalytischen Zyklus von Myosin V (Abb. 3.3.3):

Die Ausführung des ersten Kraftschlags wird am stärksten limitiert durch die Dauer der Aktin-Bindung des ersten ADP-/Phosphat-gebundenen Zustands von Myosin. Die Dauer dieses Zustands liegt im Bereich von maximal wenigen Millisekunden. Das bedeutet, ein Myosin im ADP-/Phosphat-Zustand wird häufig an Aktin binden und ohne Ausführung eines Kraftschlags wieder abdissoziieren, wenn nicht binnen der kurzen Zeit dieser ersten Interaktion der Phosphatrest das Molekül verlässt und die Ausführung des Kraftschlags erlaubt. Nach dem ersten Kraftschlag befindet sich das Myosin in einem ADP-gebundenen Zustand mit einer Steifheit von etwa 0,12 pN/nm. Bewegungen des in dieser Struktur flexibleren Hebelarms beeinflussen über Konverter und Relay-Helix die Freisetzung von ADP aus der Nukleotidbindungstasche. Nach der Freisetzung von ADP existiert vorübergehend ein hier neu identifizierter, nukleotidfreier Zustand, der sich in Hebelarmposition und Steifheit nicht vom ADP-Zustand unterscheidet. Das bedeutet, es kommt erst mit einer kurzen Verzögerung nach der Freisetzung von ADP zum zweiten Kraftschlag, wobei die Steifheit des Myosins auf



**Abb. 3.3.3. Modifizierter katalytischer Zyklus von Myosin V.** Wie in dieser Arbeit beschrieben wurde, wird der Übergang 4-5 durch die Dauer des Zustands 4 limitiert, nicht jedoch durch die Freisetzung von Phosphat. Die Phosphat-Freisetzung erfolgt vermutlich mit oder vor dem Kraftschlag. Der Zustand 4 ist jedoch nicht langlebig genug, um in dieser Arbeit direkt detektiert werden zu können. Die Steifheit des Myosins erhöht sich mit dem zweiten Kraftschlag (Übergang 6-1). Die ADP-Freisetzung erfolgt davor, der nukleotidfreie Zustand 6 muss daher gegenüber bisherigen Modellen neu eingeführt werden.

etwa 0,15 pN/nm ansteigt. Der nun erreichte, ebenfalls nukleotidfreie Zustand schränkt aufgrund verstärkter Interaktion zwischen dem System aus Hebelarm, Konverter und Relay-Helix mit der umgebenden Motordomäne die Bewegungen dieses Systems ein. Dadurch wird die Verformbarkeit des Myosins vermindert, d.h. die Steifheit des Moleküls steigt an und wird nun wahrscheinlich primär durch die Steifheit des Hebelarms selbst und der übrigen Elemente der Motordomäne bestimmt. Daher haben auf den Hebelarm wirkende Kräfte nun einen geringeren Einfluss auf die Nukleotidbindungstasche.

### 3.4. Ausblick

Im Anschluss an diese Arbeit wäre zu prüfen, inwieweit andere Myosine ebenfalls Steifheitsänderungen in ihrem katalytischen Zyklus zeigen und ob und wie diese mit den Prozessen der ATP-Hydrolyse und ADP- oder Phosphatfreisetzung korrelieren. Für Myosin V wäre interessant, die optische Falle mit einem TIRF-Mikroskop zu kombinieren. In einem TIRF-Mikroskop wird ein Laserstrahl an einer Glasoberfläche totalreflektiert. An dem Punkt, an dem der Laser reflektiert wird, entsteht ein schwaches elektromagnetisches Wechselfeld, das einzelne Fluorophormoleküle in der Nähe einer Glasoberfläche anregen kann und so deren Detektion erlaubt. Daher können mit einem TIRF-Mikroskop einzelne Fluorophore in der Nähe von Oberflächen detektiert werden. Es wäre dann für Myosin V möglich, neben den mechanischen Ereignissen auch die Besetzung der Nukleotidbindungstasche mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden parallel zu untersuchen. Da dann direkt die Anwesenheit eines Nukleotids in der Nukleotidbindungstasche detektiert werden kann, könnte eine zeitliche Korrelation von mechanischen Ereignissen mit Nukleotid-Bindung oder -Freisetzung direkt gezeigt werden.

Die Hypothese, dass die Ausführung des Kraftschlags zuerst durch die Dauer der initialen Bindung des Myosins an Aktin limitiert wird, könnte durch eine Darstellung dieser initialen Bindezustände ohne folgenden Kraftschlag getestet werden. Insbesondere für die in dieser Arbeit verwendete Mutante S217A müsste dieser Zustand sehr viel häufiger auftreten. Hierzu allerdings müsste die Zeitauflösung der verwendeten Darstellungsmethode verbessert werden. Innerhalb der optischen Falle wäre es ggf. möglich eine Aktin-Hantel mit deutlich kleineren Latexkugeln zu konstruieren. Diese würden in der optischen Falle Eigenbewegungen mit einer höheren Frequenz ausführen und daher schnellere Prozesse auflösbar machen. Problematisch bei der Verwendung kleinerer Kugeln ist jedoch, dass diese in einem Lichtmikroskop u.U. nicht mehr sichtbar gemacht werden können. Außerdem müsste die Wellenlänge des verwendeten Lasers der optischen Falle reduziert werden (zur Zeit: 1064 nm), da nur Objekte, die kleiner als die Wellenlänge des verwendeten Lasers sind, effizient in einer optischen Falle gehalten werden. Kleinere Wellenlängen im sichtbaren oder

gar ultravioletten Bereich würden allerdings die verwendeten Proteine schädigen. Die Verwendung kürzerwelligen Lichts hoher Intensität ist daher problematisch, ggf. sogar unmöglich.

Als alternative Methode könnte ein Rasterkraftmikroskop (atomic force microscope (AFM)) mit besonders kleinen Sensoren genutzt werden: An eine nanoskopisch kleine Nadel würde ein Myosin-Molekül geheftet und über ein Aktin-Filament gebracht. Die durch den Motor entlang des Filaments generierten Kräfte würden zu einer messbaren Verbiegung der Nadel führen. Die zeitliche Auflösung der Methode (welche durch die Eigenfrequenz der Fluktuationen der verwendeten Nadeln limitiert wird) ist jedoch zur Zeit nicht besser als die optischer Fallen. Zudem eignet sie sich nur zur Detektion von Kräften, die senkrecht zu einer Oberfläche (hier: zum Aktin-Filament) wirken. Die Detektion der Kräfte, die von einem Motormolekül generiert werden, dass sich entlang eines Aktin-Filaments bewegt sind daher zur Zeit nicht darstellbar. Systeme mit einer deutlich besseren Zeitauflösung und der Möglichkeit der Detektion der von Motormolekülen generierten Kräfte werden jedoch gerade entwickelt (Tim Scholz und Massimo Antognozzi, Manuskript in Vorbereitung).

Um den zuvor beschriebenen Mechanismus zu testen, nach dem die Relay-Helix eine Art "Wippe" bildet, deren Enden Hebelarm und Nukleotidbindungstasche über eine Auslenkung der "Wippe" miteinander kommunizieren, wäre zudem denkbar, MyosinV-Analoga jener in Malnasi-Csizmadia *et al.* (2007) für Myosin II beschriebenen Mutanten auf Steifheitsänderungen hin zu untersuchen. Dort wurden Mutationen jener Aminosäuren, die den Fixpunkt bilden, um den sich die Relay-Helix dreht, mutiert und ein negativer Einfluss der Mutationen auf die Ausführung des Kraftschlags festgestellt. Träfe der "Wippe"-Mechanismus wie in dieser Arbeit vorgestellt zu, wären für Myosin V-analoga Mutationen deutliche Änderungen der mit dem zweiten Kraftschlag assoziierten Steifheitsänderung zu erwarten.

Interessant für Myosin V wäre zudem, den initialen Bindezustand vor einem Kraftschlag auf anderem Wege darzustellen. Einerseits wäre denkbar, eine Methode mit besserer Zeitauflösung einzusetzen. Eine deutlich verbesserte Zeitauslösung gelänge evtl. ebenfalls mit zuvor genanntem Rasterkraftmikroskop. Alternativ wäre denkbar, nach Möglichkeiten zu suchen den initialen Bindezustand zu stabilisieren. Möglich wäre z.B. die kovalente Anbindung eines Myosins an Aktin mit Hilfe eines induzierbaren chemischen Crosslinks. Dies aber müsste orientierungsspezifisch geschehen, was bei einem Myosin im Rigorzustand möglich wäre. Allerdings ist ein solches mit kovalent gebundenen Myosin-Molekülen dekoriertes Aktin-Filament wahrscheinlich nur schwer in den Versuchsaufbau in der optischen Falle einzufügen und auch der Hebelarm des Myosins in einem solchen Aufbau schwer an einer Unterlage fixierbar. Alternativ könnten Myosin-Inhibitoren zu Einsatz kommen, die die Aktin-Bindung des initialen Bindezustands stabilisieren. Für Blebbistatin

wird ein solcher Mechanismus vermutet (Takacs *et al.*, 2010). Da der Inhibitor im Idealfall dabei jedoch nicht mit dem katalytischen Zyklus interferieren soll, müssten dazu ggf. auch Mutanten geschaffen werden, bei denen die Kommunikation von Aktin-Bindedomäne und Nukleotidbindungstasche verschlechtert bzw. unterbunden wird.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, in der höchsten vom Hersteller beziehbaren Reinheitsstufe bezogen.

Aceton	Baker
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid (AEBSF)	Applichem
Agar	Applichem
Agarose	Sigma
Aprotinin	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma
Benzamidin	Sigma
2,3-Butandion-Monoxim (BDM)	Sigma
CaCl <sub>2</sub>	Merck
Cellfectin	Invitrogen
Coomassie R 350	GE Healthcare
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
E64	
1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimid (EDC)	Sigma
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma
Essigsäure	Baker
Ethanol	Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Fischgelantine	Sigma
FLAG-Peptid	invitrogen
Glycerol	Sigma

---

Glycin	Merck
HCl	Merck
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma
Imidazol	Sigma
Isopropanol	Baker
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Kaliumacetat	Merck
KCl	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
KOH	Merck
LB-Medium	Sigma
Magermilchpulver	BioRad
Magnesiumacetat	Sigma
Metanol	Baker
MgCl <sub>2</sub>	Sigma
MgSO <sub>4</sub>	Sigma
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Sigma
NaCl	Merck
NaCO <sub>3</sub>	Merck
NaN <sub>3</sub>	Sigma
NaOH	Merck
Natriumborat	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka
Neutravidin	Sigma
Nukleotide (CTP, GTP, TTP)	Invitrogen
Polyethylenglykol	Sigma
RbCl	Fluka
Sucrose	Sigma
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Triethanolamin	Fluka
Tris	Sigma
Triton X	Roche

---

Trizol	Invitrogen
Tween	Sigma

#### 4.1.2. Proteine

##### 4.1.2.1. Restriktionsenzyme

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma Fermentas bezogen.

##### 4.1.2.2. sonstige Proteine

RNAse	Sigma
T4-Ligase	Promega
alkalische Phosphatase	Fermentas
Phusion DNA-Polymerase	Finnzymes
Calmodulin	Sigma
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
Casein	Sigma

#### 4.1.3. Nukleinsäuren

##### 4.1.3.1. Plasmide

pFBDM	Berger et al., 2004
-------	---------------------

##### 4.1.3.2. Oligonukleotide

DNA-Oligonukleotide wurden durch die Firma Operon synthetisiert und über PAGE aufgereinigt.

#### 4.1.4. Puffer und Lösungen

Lysepuffer (DNA-Präparation), 2x	0,14 M NaOH, 1% SDS, 25 mM EDTA
TE-Puffer	15 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA
G-Aktinpuffer	2 mM Tris HCl pH 8.0, 0,2 mM Na <sub>2</sub> ATP, 0,2 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,005% NaN <sub>3</sub> , 0,5 mM DTT

Puffer GS	300 mM KCl, 0.1 mM AEBSF, 50 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 100 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7.0
TAE-Puffer	0,04 M Tris-Acetat pH 8,0, 1 mM EDTA
TBS	150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 7,4

#### 4.1.5. Organismen und Kulturmedien

##### 4.1.5.1. Bakterien

Escherichia coli XL-1-blue (Stratagene, Heidelberg)	K12-Derivat, recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]
Escherichia coli DH10Bac	K12-Derivat, Genotyp: F- <i>mcrA</i> <sub>(mrr-hsdRMS-mcrBC)</sub> f80/lacZ_M15 <sub>lacX74</sub> recA1 endA1 araD139 <sub>(ara, leu)</sub> 7697 galU galK l- rpsL nupG/ bMON14272/ pMON7124
LB-Medium	Sigma

##### 4.1.5.2. Eukaryotische Zelllinien

Sf9	Ovargewebe aus <i>Spodoptera frugiperda</i> , Vaughn, J.L. <i>et al.</i> (1977)
Medium SF 900	Gibco

##### 4.1.5.3. Verwendete Tierspezies

Gallus gallus	Oryctolagus cuniculus
---------------	-----------------------

##### 4.1.6. sonstige Produkte, Dienstleistungen

anti-FLAG-Agarose	Sigma
Biotin-beschichtete Latex-Kugeln 0,8 μm	Polyscience
Carboxylierte Latex-Kugeln 1 μm	Polyscience
DNA-Sequenzierung	GATC biotech
Super Signal West Dura Trial Kit	Thermo Scientific

Filterpapier	Whatman
Glaskugeln, 1,5 µm	Bangs Laboratories
High Pure PCR Cleanup Micro Kit	Roche

#### **4.1.7. Software**

Matlab	MathWorks
--------	-----------

#### **4.1.8. Geräte**

Biofuge primo R	Heraeus
Ultrazentrifuge TL-100	Beckmann
Ultrazentrifuge LE 80 K	Beckmann
FPLC	GE Healthcare
Agarosegelkammer	BioRad
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf
Schüttel-Inkubator	Binder
Geldokumentation	Biostep
Zellschüttler	New Brunswick Scientific
Sterilwerkbank	Thermo Scientific
Ultraschall-Inkubator	Bandelin
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin
Western Blot-Kammer	BioRad

## 4.2. Methoden

### 4.2.1. Biochemische Methoden

#### 4.2.1.1. RNA-Isolierung

100 mg Gewebe wurden mit 1 ml Trizol-Reagenz homogenisiert. Es wurde für 10 Minuten bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf Raumtemperatur erwärmt und mit 200 µl Chloroform gemischt und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde die wässrige Phase abgenommen und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach zehnmütiger Fällung der Nukleinsäuren bei Raumtemperatur wurden diese abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die isolierte RNA wurde in 50 µl durch DEPC-Behandlung RNase-freiem Wasser aufgenommen und ggf. bei –80°C gelagert.

#### 4.2.1.2. DNA-Isolierung

##### A Isolierung von Plasmid-DNA

1 ml Bakteriensuspension wurden zentrifugiert und das Bakterienpellet in 100 µl Wasser mit 2 µg/ml RNase aufgenommen. Die Suspension wurde mit 100 µl 2x Lysepuffer versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde dann mit 50 µl einer 2 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung genomische DNA (2 Minuten bei Raumtemperatur) gefällt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 14.000 g wurde der Überstand mit 50 µl einer 3 M Kaliumacetatlösung (pH 4,0) versetzt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C wurde die Plasmid-DNA aus dem Überstand durch Zugabe von 600 µl Ethanol bei –20°C gefällt, das Pellet nach Zentrifugation mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Zur Präparation größerer DNA-Mengen wurden ggf. zehnfache Volumina aller Lösungen eingesetzt. In diesem Fall wurde vor der Ethanolfällung jedoch die DNA durch Zugabe von 600 µl einer 30% PEG-Lösung bei 4°C für 1 Stunde gefällt, die DNA in TE-Puffer mit 200 mM NaCl resuspendiert und dann wie zuvor weiter verfahren. Die DNA wurde bei –20°C gelagert.

##### B Isolierung von Bacmid-DNA

4 ml Bakteriensuspension wurden zentrifugiert und das Bakterienpellet in 300 µl Wasser mit 2 µg/ml RNase aufgenommen. Die Suspension wurde mit 300 µl 2x Lysepuffer versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde dann mit 300 µl einer 3 M Kaliumacetatlösung (pH 5) versetzt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C wurde die Plasmid-DNA durch

Zugabe von 800 µl Isopropanol bei 4°C gefällt, das Pellet nach Zentrifugation mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Bacmid-DNA wurde durch Inkubation bei 95°C für 5 Minuten sterilisiert und bei 4°C gelagert.

#### **4.2.1.3 Isolierung von Aktin aus Skelettmuskel**

(modifiziert nach: Spudich and Watt (1971))

Präparation von Aktin-Aceton-Pulver

Die Rückenmuskulatur eines 4-6 Monate alten Kaninchens wurde auf Eis präpariert, mit einem Fleischwolf zerkleinert und das Myosin durch Inkubation (10 Minuten, 4°C) in 1l Puffer GS (300 mM KCl, 0.1 mM AEBSF, 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0) extrahiert. Der Rückstand wurde abfiltriert, für 5 Minuten in 4°C kaltem Wasser gerührt und erneut abfiltriert. Es wurde zwei Mal in 2 l 0,4% NaCO<sub>3</sub> resuspendiert und abfiltriert, dann zwei Mal mit 1 l 4°C kaltem Wasser gewaschen. Der Rückstand wurde nun in 1-2 l 4°C kaltem Aceton resuspendiert, 10 Minuten gerührt und abfiltriert. Der Vorgang wurde 5-8 Mal wiederholt, bis das Filtrat wasserfrei ist. Das Aktin-Aceton-Pulver wurde bei Raumtemperatur getrocknet und bei -20°C gelagert.

Präparation von G-Aktin aus Aktin-Aceton-Pulver

1 g Aktin-Aceton-Pulver wurde in 20 ml G-Aktin-Puffer resuspendiert und 30 Minuten unter Rühren bei 4°C inkubiert. Das Aktin-Aceton-Pulver wurde bei 100.000 g und 4°C für 30 Minuten abzentrifugiert. Im Überstand wurde durch Zugabe von 0,7 mM Magnesiumacetat und 10 mM Kaliumacetat Aktin für 30 Minuten bei Raumtemperatur polymerisiert. Das erhaltene F-Aktin wurde abzentrifugiert (60 Minuten, 100.000 g, 4°C) und in 5 ml G-Aktinpuffer resuspendiert. Nach Depolymerisation des Aktins für 3 Stunden bei 4°C wurde erneut für 30 Minuten zentrifugiert, und der Polymerisations-/ Depolymerisationszyklus wie zuvor wiederholt. Nach Depolymerisation in 1 ml G-Aktin-Puffer wurde erneut für 30 Minuten zentrifugiert (100.000 g, 4°C), der Überstand mit 50% Glycerol versetzt und bei -20°C gelagert.

#### **4.2.1.4. Isolierung von Gelsolin und Kopplung an Latexkugeln**

A Gelsolinaufreinigung aus Schweineblut

70 ml Schweineblut wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 15 Minuten bei 5000 g zentrifugiert. Dem Überstand wurden 50 mM Tris pH 8,0, 1mM DTT, 1 mM AEBSF und 10 µM E64 zugesetzt. Es wurde dann gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugesetzt, bis ein Ammoniumsulfatanteil von 35% erreicht war und für 20 Minuten bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation

wurde im Überstand auf 50% Ammoniumsulfat erhöht und erneut wie zuvor zentrifugiert. Das Pellet wurde nun mit 50% Ammoniumsulfat in 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EGTA gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EGTA, 45 mM NaCl, 1 mM DTT und 0,1 mM AEBSF aufgenommen und für 16 Stunden gegen diesen Puffer dialysiert.

Nach der Dialyse wurde die Proteinlösung auf eine DE52-Säule geladen und mit dem zuvor genannten Dialysepuffer gespült. Es wurde dann mit 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 mM EGTA, 30 mM NaCl, 1 mM DTT gespült und mit 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 30 mM NaCl, 1 mM DTT eluiert. Die Gelsolin-haltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (4.2.1.8.) identifiziert und das Protein bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### B Beschichtung von Latexkugeln mit Gelsolin und Serumalbumin

250  $\mu\text{l}$  einer Suspension von 1  $\mu\text{m}$  durchmessende Latexkugeln (2,6% w/v) wurden fünf Mal mit 50 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 4,5 gewaschen und nach jedem Waschschrift für 10 Minuten bei 6000 g abzentrifugiert. Die Kugeln wurden dann in 200  $\mu\text{l}$  des gleichen Puffers resuspendiert und mit 1% EDC versetzt. Die Kugeln wurden nun für 2 Stunden unter regelmäßigem Wenden des Reaktionsgefäßes bei Raumtemperatur inkubiert und dann wie zuvor abzentrifugiert. Dann wurden sie fünf Mal mit 0,1 M Natriumborat pH 8,5 gewaschen und schließlich in 500  $\mu\text{l}$  0,1 M Natriumborat pH 8,5, 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,1 mM ATP aufgenommen. Es wurden dann im gleichen Puffer 100  $\mu\text{l}$  1,8 mg/ml BSA, 0,1 mg/ml Gelsolin, 0,1 mg/ml G-Aktin und 0,1 mg/ml Rhodamin-markiertes BSA zugesetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur wiederum unter regelmäßigem Wenden des Reaktionsgefäßes inkubiert. Es wurden die Kugeln mit 20 mM HEPES pH 7,0 mit 1% Tween gewaschen, gefolgt von fünf Waschschriften mit 20 mM HEPES pH 7,0 mit 0,045% Fischgelatine. Die Kugeln wurden in 100  $\mu\text{l}$  dieses Puffers aufgenommen und bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 4.2.1.5 Aufreinigung von FLAG-markiertem Myosin

Die Zellen einer infizierten Sf9-Zellkultur (i.d.R. 1 Liter) wurden 72 Stunden nach Infektion abzentrifugiert (10 Minuten, 500 g,  $4^\circ\text{C}$ ), mit PBS gewaschen und durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen aufgeschlossen. Das Pellet wurde dann in 50 mM HEPES pH 7,3, 200 mM NaCl, 5 mM ATP, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 1 mM AEBSF resuspendiert und zur Trennung evtl. vorhandener Akto-Myosin-Komplexe 20 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  unter Rühren inkubiert. Nach Zentrifugation bei 50.000g und  $4^\circ\text{C}$  für 10 Minuten wurde der Überstand auf 5 ml einer mit anti-FLAG-Antikörper (invitrogen) beschichtete Säule geladen. Die Säule wurde mit zehnfachem Säulenvolumen 50 mM HEPES pH 7,3, 200 mM NaCl, 5 mM ATP, 10

mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1 mM AEBSF gewaschen und anschließend mit 50 mM HEPES pH 7,3, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA. Mit diesem Puffer mit zusätzlich 0,3 mg/ml FLAG-Peptid wurde das Myosin von der Säule eluiert und zur Entfernung des FLAG-Peptids gegen 50 mM HEPES pH 7,3, 200 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT bei 4°C dialysiert. Die Lösung wurde mit 35% Sucrose und 10 mM DTT versetzt und bei -80°C gelagert.

#### **4.2.1.6. Agarosegelelektrophorese**

Die aufzutrennende DNA wurde in folgendem Puffer aufgenommen:

0,1 M EDTA, 0,25% Bromphenolblau, 40% Sucrose, pH 7,0

Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte auf einem 1,0% bis 1,5% Agarosegel in TAE-Puffer und für eine Stunde bei 80 V. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und in TAE-Puffer entfärbt.

#### **4.2.1.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Es wurde ein Trenngel aus 7 bis 12% Acrylamid und 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS mit 0,3% APS und 0,06% TEMED polymerisiert und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgenommen und ein Trenngel aus 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS und 4% Acrylamid aufgegossen und ebenfalls mit APS und TEMED polymerisiert.

Die aufzutrennende Proteinlösung wurde in 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 50% Glycerol, 5% β-Mercaptoethanol und 0,01% Bromphenolblau aufgenommen und auf das Gel aufgetragen. Die Proteine wurden bei konstanten 15 mA und nach Eintritt der Proben in das Trenngel 25 mA aufgetrennt, der Laufpuffer war 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS. Das Gel wurde mittels 0,1% Coomassie R 350 in 10% Methanol und 10% Essigsäure gefärbt und in 10% Methanol entfärbt.

#### **4.2.1.8. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran (Western Blot)**

Zwei Filterpapierstreifen wurden mit 25 mM Tris, 192 M Glycin, 10% Methanol getränkt und ein Gel aus 4.2.1.7. aufgelegt. Es wurde dann eine Nitrocellulosemembran und zwei weitere puffergetränkte Filterpapiere aufgelegt und für 5 Stunden bei 30 V die Proteine auf die Membran transferiert. Nach dem Transfer wurde die Membran mit 0,03 % Ponceau S gefärbt, der Proteinstandard markiert und mit Wasser wieder entfärbt. Es wurde dann die Membran mit 3% Magermilch in TBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur blockiert und drei Mal mit TBS gewaschen. Der Primärantikörper wurde in TBS für 2 Stunden bei 4°C auf die Membran gegeben und

erneut mit TBS gewaschen, gefolgt vom Sekundärantikörper, ebenfalls in TBS für 2 Stunden bei 4°C. Die Membran wurde mit TBS drei Mal gewaschen und mit dem Super Signal West Dura Trial Kit entwickelt.

#### **4.2.1.9. Beschichtung von Latexkugeln mit Neutravidin**

Die Kugeln wurden 1:8 in 50 mM Kaliumphosphat pH 7,0 aufgenommen und für 10 Minuten bei 6000 g abzentrifugiert. Danach wurden sie in 100 µl des gleichen Puffers aufgenommen und 10 ml 1 M Glycin und 15 µl 5 mg/ml Neutravidin zugesetzt. Es wurde bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert und die Kugeln dann sechs Mal in zuvor benutztem Phosphatpuffer gewaschen. Die Kugeln wurden schließlich in 200 µl dieses Puffers mit 0,01% Natriumazid resuspendiert und bei 4°C gelagert.

### **4.2.2. Molekularbiologische Methoden**

#### **4.2.2.1. Bakterienkultur**

Alle Bakterien der Spezies *Escherichia coli* wurden bei 37°C und 200 rpm in LB-Medium (nach Herstellervorschrift) kultiviert. Ggf. wurden zur Selektion folgende Antibiotika zugesetzt:

Ampicillin 75 µg/ml

Kanamycin 50 µg/ml

Tetrazyklin 10 µg/ml

Gentamycin 7 µg/ml

Antibiotika wurden in einer 1000fachen sterilfiltrierten wässrigen Lösung eingesetzt (Tetrazyklin wurde in Ethanol gelöst). Agarose-Platten wurden mit 20 g/l Agar in LB-Medium erstellt.

Bakterienkulturen wurden zur Lagerung bei -80°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 bis 0,4 herangezogen und mit 20% Glycerol versetzt.

Alle verwendeten Lösungen und Medien wurden autoklaviert und steril verpackt bei 4°C gelagert.

#### **4.2.2.2. Klonierung von Plasmiden**

Die Klonierung von Plasmid-DNA erfolgte mit nach 4.2.1.2 aufgereinigter DNA.

A Restriktionsschnitte

Restriktionsschnitte erfolgten mit dem nach Herstellerangaben empfohlenen mitgelieferten Puffer. Der Restriktionsverdau erfolgte zur Restriktionsanalyse (ca. 200 ng DNA, Reaktionsvolumen 20 µl, Enzym und Temperatur nach Herstellervorgaben, 1 Stunde) oder präparativ (ca. 1 µg DNA, Reaktionsvolumen 50 µl, Enzym und Tem-

peratur nach Herstellervorgaben, 2 Stunden). Nach der Reaktion wurden die DNA-Fragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt und das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt.

Bei der Klonierung von Plasmiden wurde die DNA mit dem High Pure PCR Cleanup Micro Kit nach Herstellervorschrift aus dem Gel aufgereinigt.

Zur Restriktionsanalyse wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und im UV-Licht analysiert.

#### B Ligation

Die Ligation erfolgte mit T4-Ligase und wurde nach Hersteller-Angaben durchgeführt (15 Stunden bei 15°C oder 3 Stunden bei Raumtemperatur). Die Ligase wurde nach der Reaktion für zehn Minuten bei 85°C hitzeinaktiviert.

#### C Transformation

Escherichia coli XL-1-blue wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 bis 0,4 in LB-Medium mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> und 10 µg/ml Tetrazyklin bei 37°C herangezogen. Die Bakterien wurden für 10 Minuten bei 4°C und 2000 g zentrifugiert und das Pellet in 100 ml 4°C kaltem 30 mM Kaliumacetat pH 5,8, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 15% Glycerol resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde in 10 ml 4°C kaltem 10 mM MOPS pH 6,5, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl, 15% Glycerol resuspendiert und die Bakterien zu 100 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

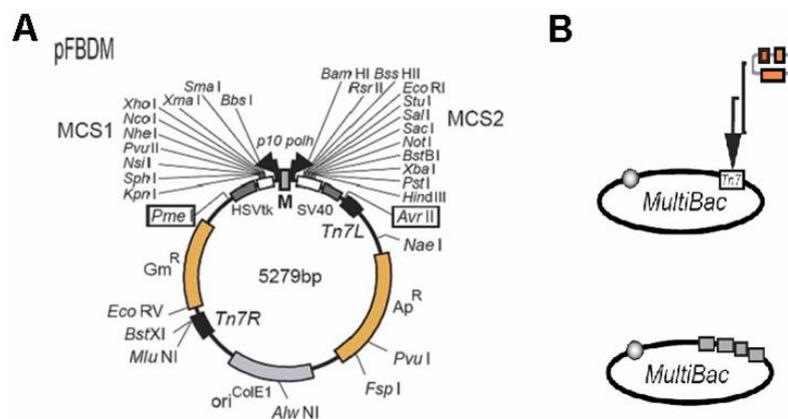
Zur Transformation wurden 100 µl Bakteriensuspension ein Ligationsansatz oder 10 ng Plasmid-DNA zugesetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es erfolgte dann ein Hitzeschock für 40 Sekunden bei 42°C, nach dem die Bakterien erneut auf Eis für 2 Minuten gekühlt und dann in S.O.C.-Medium überführt wurden. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde die Bakteriensuspension auf antibiotikahaltige Agarplatten ausgebracht und bei 37°C über Nacht inkubiert. Einzelne Klone wurden in LB-Medium überführt und nach 4.2.2.1 kultiviert und ggf. gelagert. Die Plasmid-DNA wurde nach 4.2.1.2 isoliert und per Restriktionsanalyse (4.2.2.2.A) oder DNA-Sequenzierung auf ihre Identität überprüft.

#### 4.2.2.3. Generierung von Bacmiden

##### Übersicht zum Expressionssystem

Die Expression von Myosinmolekülen wurde in einem Insektenzell-/ Baculovirus-system ausgeführt. Hier wurden Sf9-Zellen aus Spodoptera frugiperda und das Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus verwendet.

Die hierfür erforderlichen Vektoren wurden durch Berger et al. (2004) generiert und beschrieben. Zunächst wird in diesem System die für das zu exprimierende Protein codierende Sequenz in den Vektor pFBDM eingefügt, wo es dann unter Kontrolle eines der viralen Promotoren p10 oder polh ist. Diese kontrollieren üblicherweise die Gene für Polyhedrin und das Mikrotubuli-assoziierte Protein p10, welche beide spät im Verlauf der Infektion stark aktiviert werden. In den gleichen Vektor kann unter der Kontrolle des zweiten Promotors ein weiteres Protein eingefügt werden und es besteht zudem die Option die gesamte Sequenz mit Promotoren und Zielprotein-codierender DNA aus dem Vektor über die Restriktionsenzyme AvrII und PmeI auszuschneiden und über zwei weitere Restriktionsschnittstellen für NruI und SpeI wieder in diesen einzufügen (vgl. Abb 4.2.1). Da die beiden Enzymypaare gleiche Sequenzüberhänge generieren, aber nicht identische Sequenzen erkennen, kann dieser Vorgang mehrfach wiederholt werden und so mehrere codierende Sequenzen in den Vektor eingeführt und mit einem einzigen Baculovirus gleichzeitig exprimiert werden. Über Tn7-Transposition werden die codierenden Sequenzen als Block in ein Baculovirengenom eingeführt, das schließlich in Sf9-Zellen transfiziert wird. Der dann erhaltene Virus kann dann nach Vermehrung über mehrere Generationen verwendet werden, alle eingeführten Proteine gleichzeitig zu exprimieren.



**Abb. 4.2.1. Vektoren zum Baculovirusexpressionssystem aus Berger et al. (2004).** Die codierenden Sequenzen werden in die Sequenzbereiche MCS 1 und MCS 2 des Vektors pFBDM (A) kloniert und über Tn7-Transposition in ein Baculovirengenom überführt (B).

#### Generierung von Bacmiden

Der E.coli-Stamm DH10 MultiBac (beschrieben in Berger et al., 2004) trägt die codierende DNA für das Baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (Laborstamm) als Bacmid. Die Herstellung eines für ein mit Hilfe des Virus zu codierenden Proteins (s. auch: 4.2.3.3.) wurde über Tn7-Transposition erreicht: Ein Zielprotein-codierendes Plasmid mit entsprechenden Sequenzen

(pFBDM-Derivat) wurde nach 4.2.2.2. in den Bacmid-codierenden Stamm transformiert, wo es über Tn7-Transposition in das dort vorhandene  $\beta$ -Galaktosidase-Gen eingeführt wird. Abweichend vom zuvor genannten Transformationprotokoll wurden die Bakterien jedoch 5 Stunden in S.O.C.-Medium kultiviert und dann auf Agarplatten mit 50  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin, 7  $\mu\text{g/ml}$  Gentamicin, 10  $\mu\text{g/ml}$  Tetracyclin, 100  $\mu\text{g/ml}$  X-Gal und 40  $\mu\text{g/ml}$  IPTG ausgebracht. Ohne Transposition exprimieren die Bakterien  $\beta$ -Galaktosidase und werden in Gegenwart von X-Gal blau gefärbt. Farblose Kolonien wurden daher nach 48 Stunden nach 4.2.2.1. in Medium überführt und in Gegenwart von Kanamycin, Tetrazyklin und Gentamycin kultiviert. Die Bacmid-DNA wurde nach 4.2.1.2. isoliert und durch PCR (4.2.2.4.) mit den Primern M13forw (5'-GTTTCCAGTCACGAC-3') oder M13rev (5'-CAGCAAACAGCTATGAC-3') (deren Sequenz die Tn7-Transpositionsstelle flankieren) und einem für die codierende Sequenz des Zielproteins spezifischen Primer analysiert: Ein spezifisches PCR-Produkt wurde nur nach erfolgreicher Transposition erhalten.

#### 4.2.2.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Es wurde DNA mit der Phusion DNA-Polymerase (Finnzymes) nach Herstellerangaben amplifiziert (s. Tabelle). Die eingesetzten Primer wurden bei den vom Hersteller angegebenen Schmelztemperaturen der Oligonukleotide eingesetzt. Wichen die Temperaturen voneinander ab, wurde eine optimale Temperatur für die Reaktion experimentell bestimmt. Das Reaktionsvolumen betrug 50  $\mu\text{l}$ . Zur Klonierung eingesetzte PCR-Produkte wurden nach der Amplifikation mit dem High Pure PCR Cleanup Micro Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte auf einem Agarosegel in TAE-Puffer.

Denaturierung	98°C	30 s	
Denaturierung	98°C	20 s	
Hybridisierung der Primer	nach Herstellervorschlag	20 s	30x
Verlängerung der DNA	72°C	15 bis 30 s pro 1000 bp	
finale Verlängerung	72°C	300 s	

#### 4.2.2.5. Reverse Transkription

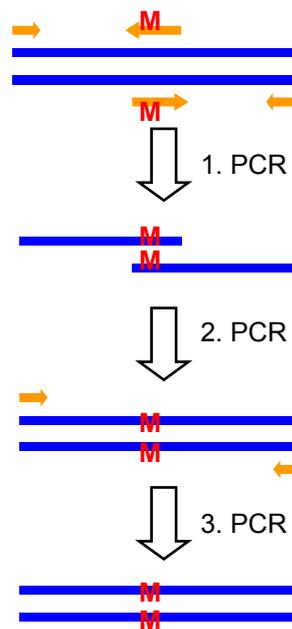
Eine Reverse Transkription wurde mit dem Cells-to-cDNA-Reverse-Transcription-Kit der Firma Ambion nach Herstellervorgaben ausgeführt.

#### 4.2.2.6. Mutagenese

Die Strategie zur Mutagenese ist in Abb. 4.2.2. illustriert. Zunächst wurden zwei DNA-Sequenzen nach 4.2.2.4. amplifiziert, in die die gewünschte Mutation über die

Primer eingeführt wurde. Die Produkte wurden mit dem High Pure PCR Cleanup Micro Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und in einer erneuten PCR fusioniert. Dabei wurde folgendes Programm verwendet:

Denaturierung	98°C	30 s	
Denaturierung	98°C	20 s	
Hybridisierung	58°C	120 s	15x
Verlängerung der DNA	72°C	240 s	
finale Verlängerung	72°C	600 s	



Die Ausbeute dieser Fusions-PCR ist gering. Daher wurde das entstandene Mutageneseprodukt nach 4.2.2.4. erneut amplifiziert und nach 4.2.2.2. in die Wildtypsequenz kloniert. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft.

**Abb. 4.2.2. Mutagenese durch Fusions-PCR:** In einer ersten PCR werden zwei DNA-Sequenzen, die jeweils die durch die Primer eingeführte Mutation trugen, generiert. Die entstandenen PCR-Produkte wurden in einer zweiten PCR fusioniert. Die Ausbeute dieser Fusion ist sehr schlecht, weshalb eine dritte Amplifikation der mutagenisierten DNA erforderlich ist.

### 4.2.3. Zellkultur

#### 4.2.3.1. Kultur von Sf9-Zellen

Die Zelllinie Sf9 aus *Spodoptera frugiperda* wurden in Suspensionskultur bei 27°C und 85 rpm sowie einer Dichte von 0,6 bis  $4,0 \times 10^6$  Zellen/ml kultiviert. Zur Lagerung wurden die Zellen in 4°C kaltes Medium mit 10% DMSO überführt (mit einer Dichte von  $2 \times 10^7$ /ml), langsam abgekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 4.2.3.2. Transfektion von Sf9-Zellen

Die Transfektion erfolgte mit Cellfectin.  $9 \times 10^5$  Zellen wurden in 2,5 cm-Kulturschalen mit 2,5 ml Medium ausgesät. 1 µg Bacmid-DNA wurde in 100 µl Medium gelöst und 6 µl Cellfectin-Reagenz in weiteren 100 µl. Die Lösungen wurden gemischt und 30

Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das DNA-Cellfectin-Gemisch auf die ausgesäten Zellen getropft nach 5 Stunden das Medium erneuert.

#### **4.2.3.3. Vermehrung von Baculoviren und Proteinexpression**

Ein Baculovirus wurde 4 bzw. 7 Tage nach der Infektion bzw. Transfektion im Zellkultur-Überstand geerntet. Mit dem Überstand wurde das etwa zehnfache Volumen ( Zelldichte  $1 \times 10^6$ /ml) erneut infiziert und so nach einer Transfektion der Virus über drei Generationen vermehrt. Zur Proteinexpression wurden 0,5 bis 1 Liter Zellkultur mit einer Dichte von  $1,6 \times 10^6$ /ml mit virushaltigem Zellkulturüberstand infiziert und die Zellen 72 Stunden nach Infektion geerntet. Die Kontrolle der Infektion erfolgte über die Kontrolle des Zellwachstums (welches nach einer Infektion abbrach) oder die Detektion der exprimierten Proteine (Western Blot, 4.2.1.8.).

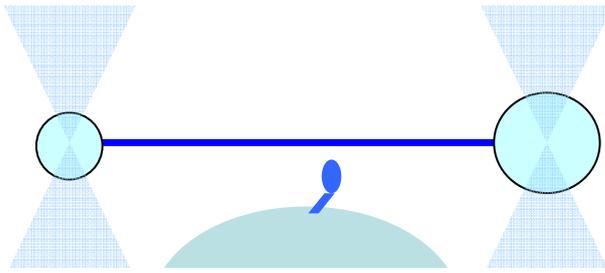
#### **4.2.4. Experimente in der optischen Falle**

Fällt auf eine dielektrische Kugel ein fokussierter Lichtstrahl und ist die Kugel kleiner oder gleich der Wellenlänge des eingestrahnten Lichts, so kommt es zu einer Wechselwirkung der Kugel mit dem eingestrahnten Licht: In der Kugel wird ein elektrischer Dipol induziert, der mit dem induzierenden elektrischen Feld wechselwirkt und eine Beschleunigung der Kugel zum Ort höchster Lichtintensität bewirkt. Die Kugel wird somit im Fokus des einfallenden Strahles festgehalten. (Ashkin et al., 1986). Werden nun an Latexkugeln Biomoleküle gebunden, ist es so möglich, diese mit der optischen Falle zu manipulieren und z.B. durch molekulare Motoren verursachte Bewegungsvorgänge oder durch sie generierte Kräfte direkt zu beobachten.

##### **4.2.4.1. Experimenteller Aufbau**

Hier wird der Versuchsaufbau modifiziert nach Finer et al. (1994) verwendet, in dem ein Aktinfilament zwischen zwei Latexkugeln gespannt wird. Auf einer Seite wird das Aktin über das aktinbindende Protein Gelsolin an der Kugel fixiert, auf der anderen Seite wird es über eine Biotin-/Neutravidin-Bindung fixiert. Dazu werden biotinyliertes Aktin und Neutravidin-beschichtete Kugeln verwendet. Eine Unterscheidung der Seiten dieser sog. Hantel erfolgt über unterschiedliche Größen der verwendeten Kugeln (Gelsolin-beschichtet:  $1 \mu\text{m}$ , Neutravidin-beschichtet:  $0,8 \mu\text{m}$ ).

Auf einer dritten Kugel an Glas am Boden der Messkammer wird über Nitrocellulose unspezifisch das untersuchte Myosin gebunden, es ergibt sich der in Abb. 4.2.3. schematisch gezeigte Aufbau.



**Abb. 4.2.3. Schematischer Aufbau von Experimenten in der optischen Falle (3-Kugel-Aufbau).** Ein Aktinfilament wird zwischen zwei Latexkugeln aufgespannt und über eine Glaskugel gebracht, an der ein Myosinmolekül fixiert ist. Die Position einer Kugel der sog. Aktin-Hantel wird mit einem Quadranten-Detektor registriert.

#### Ausführung:

Die in der optischen Falle verwendeten Deckgläser wurden mit 0,01% 1,5  $\mu\text{m}$  durchmessenden Glaskugeln und 0,1% Nitrocellulose in Amylacetat beschichtet. Dazu wurden die Glaskugeln in Aceton im Ultraschallbad vereinzelt und zwei Mal mit Aceton gewaschen. Sie wurden dann abzentrifugiert und in der Nitrocellulose/Amylacetat-Lösung aufgenommen. Die Suspension wurde auf die Deckgläser aufgetragen und bei Raumtemperatur getrocknet.

Aus zwei Deckgläsern und doppelseitigem Klebestreifen wurde eine etwa 20  $\mu\text{l}$  fassende Kammer gefertigt. In die Kammer wurde etwa 10  $\mu\text{g/ml}$  Myosin eingespült und für 2 Minuten bei Raumtemperatur unspezifisch an die Nitrocellulose-Oberfläche gebunden. Es wurde dann für 2 Minuten mit 1 mg/ml BSA die Oberfläche blockiert und F-Aktin gekoppelt an Gelsolin-beschichtete Latexkugeln (1 $\mu\text{m}$ ) (s. 4.2.1.4.), sowie Neutravidin-beschichtete Kugeln (0,8  $\mu\text{m}$ ) (4.2.1.9.) in folgendem Puffer eingespült: 25 mM HEPES pH 7,4, 100 mM KCl, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM EGTA, 10 mM DTT, 2 mg/ml Glucose, 10 U/ $\mu\text{l}$  Glucose-oxidase, 200 U/ $\mu\text{l}$  Katalase, sowie ggf. 10 mg/ml Creatinphosphat, 10 U/ml Creatinkinase. Optimale Konzentrationen für die Kugeln wurden experimentell bei jeder Präparation neu bestimmt.

Mit Hilfe der optischen Falle wurde nun eine Kugel mit einem einzelnen Aktin-Filament gefangen und in einer zweiten Falle eine Neutravidin-beschichtete Kugel (siehe 4.2.1.9.). Das Aktin wurde an die Neutravidin-Kugel gebunden und die so entstandene Hantel durch Verschieben des Fokus des Laserstrahles gespannt. Dann wurde sie über eine Glaskugel am Boden der Messkammer gebracht. Die Position der Latexkugeln wurde mit einem Quadrantendetektor registriert (Aufnahmefrequenz: 10 kHz). Die Temperatur wurde, sofern nicht anders angegeben, bei 20°C konstant gehalten

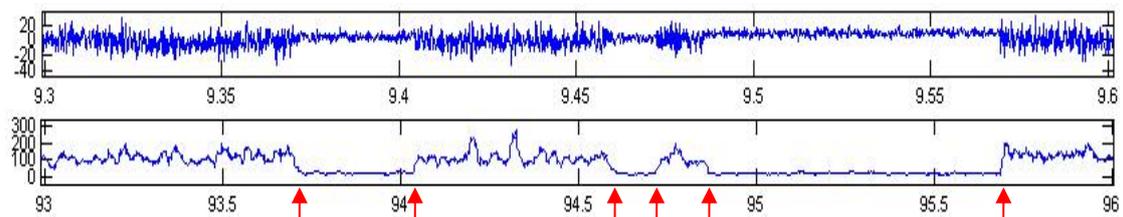
#### 4.2.4.2. Auswertung

Die Matlab-basierten Programme, die die Bindeereigniserkennung durch Varianzanalyse und die Bestimmung der Fallensteifheit durchführen, wurden durch W.

Walter und W. Steffen geschrieben und ggf. durch den Autor dieser Arbeit modifiziert (s. Anhang).

#### Detektion von Bindeereignissen

Die freie Hantel im zuvor beschriebenen Versuchsaufbau zeigt aufgrund der Braunschen Molekularbewegung der Lösungsmittelmoleküle ein Hintergrundrauschen des Positionssignals. Kommt es zu Interaktionen mit einem Myosin, so werden die möglichen Auslenkungen der Hantel eingeschränkt, die Amplitude des Rauschens sinkt. Ein Beispiel für solche Aktin-Myosin-Interaktionen zeigt Abb. 4.2.4. Die Bestimmung von Anfang und Ende einer Aktin-Myosin-Interaktion erfolgte über die Verringerung der Varianz des Signals bei Bindung eines Myosins. Es wurde die Varianz in einem Fenster von 50-200 Datenpunkten (5-20 ms) bestimmt und zwei deutlich getrennte Varianz-Populationen erhalten. Die Population kleinerer Varianz bestimmte die Gesamtpopulation an Myosin-Bindeereignissen. Der Kraftschlag des Myosins ergibt sich aus der Differenz der Mittelwerte der Position von Myosin-gebundener und nicht-gebundener Hantel. Die Häufigkeitsverteilung der Verweilzeiten des Myosins am Aktin folgt einer Exponentialverteilung, die mit der sogenannten Lebensdauer des Akto-Myosinkomplexes abnimmt.



**Abb. 4.2.4. Beispielhafte Registrierung.** Oben: Position der Aktin-Hantel in der optischen Falle, unten: Varianz des Positionssignals. Die Varianzreduktion gegenüber der freien Aktin-Hantel wird als Kriterium zur Bestimmung von Anfang und Ende eines Bindevorgangs (rote Pfeile) verwendet.

#### Bestimmung der Fallensteifheit

Eine Kugel in der optischen Falle führt eine Brownsche Molekularbewegung aus. Für sie gilt nach dem Gleichverteilungssatz (Svoboda und Block (1994)):

$$\frac{1}{2}kT = \frac{1}{2}S\sigma^2$$

$$\sigma^2 = \frac{kT}{S}$$

mit

$\sigma^2$  mittlere quadratische Verschiebung des Teilchens bzw. Varianz der Position

k Boltzman-Konstante

T Temperatur

S Federkonstante des Systems, hier: Steifheit der Falle

Bestimmung der Verbindungssteifheit Aktin/Latexkugel

Im in 2.2. beschriebenen Aufbau gilt:

F: auf das Gelsolin einwirkende Kraft

$S_F$ : Steifheit der optischen Falle

$S_G$ : Steifheit des Gelsolins

$x_F$ : Auslenkung der Latexkugel aus dem Zentrum optischen Falle

d: Strecke, um die das Gelsolin durch äußere Kräfte gedehnt wird

x: vorgegebene Auslenkung der Kugel am Boden der Messkammer

$v_F$ : Geschwindigkeit der in der optischen Falle gehaltenen Latexkugel

v: vorgegebene Bewegungsgeschwindigkeit

Es ist

$$F = S_F x_F$$

$$d = x - x_F$$

Aus der Auftragung Kraft gegen die Dehnung des Gelsolins (sogenannte Kraft-Dehnungskurve) ergibt sich als Steigung im linearen Bereich der Kurve die Steifheit des Gelsolins (vgl. 2.2.).

Bestimmung der Steifheit des Myosin-Motors

Der Aufbau des Experiments erfolgt wie in Abb. 4.2.3. Zur Bestimmung der Steifheit des Systems wird die Glaskugel in der Mitte in einer Dreieckswelle bewegt. Die Kugel in der Falle folgt der Bewegung in Abhängigkeit von der Dehnbarkeit der Elemente der Verbindung von Glas- und Latexkugel.

Annahmen: Die Dehnbarkeit der nicht relevanten Steifheiten (Aktinsteifheit entlang der Filamentachse, Biotin-/Neutravidin-Bindungen) ist so klein, d.h. die betreffenden Steifheiten so groß, dass sie vernachlässigbar sind. Es gilt dann:

F: auf den Motor einwirkende Kraft

$S_F$ : Steifheit der optischen Falle

$S_M$ : Steifheit des Myosins

$x_F$ : Auslenkung der Latexkugel aus dem Zentrum optischen Falle

d: Strecke, um die das Myosin durch äußere Kräfte verformt wird

x: vorgegebene Auslenkung des Motors

$v_F$ : Geschwindigkeit der in der optischen Falle gehaltenen Latexkugel

v: vorgegebene Bewegungsgeschwindigkeit

$$F = S_F x_F$$

$$S_M = F / d$$

$$d = x - x_F$$

Daraus ergibt sich:

$$S_M = S_F v / (v - v_F)$$

Sind weitere nachgiebige Elemente, wie z.B. die in der Arbeit eingeführte Gelsolin-  
verbindung, zu berücksichtigen, ist

$$d = x - x_F + d_{\text{Gelsolin}}$$

$$S_M = S_F v / (v - v_F (1 - S_F / S_{\text{Gelsolin}}))$$

## 6. Danksagungen

Ich danke PD Dr. Walter Steffen und Prof. Dr. Bernhard Brenner für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit und viele hilfreiche Diskussionen.

Vielen Dank an Prof. Dr. Walter Müller für die Übernahme des Korreferats und Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo und PD Dr. Heiner Wolfes für die Begutachtung bzw. Prüfung meiner Arbeit.

Ich danke Dipl. biochem. Sarah Heissler und Hella Scharnhorst für viele hilfreiche Tipps im Umgang mit Baculoviren und Insektenzellen.

Ich danke Dr. Tim Scholz für die Betreuung im Labor, Dr. Wilhelm Walter für die Bereitstellung von MatLab-Programm-Rohlingen, Dr. Anne Bergfeld, Dr. Marc Reboll, PD Dr. Mahtab Nourbakhsh, Dipl. biochem. Maïke Hinrichs, Dipl. biotechnol. Nils Hahn und Dipl. biochem. Wiebke Schaper für allerlei Tipps zu molekularbiologischen Methoden und hilfreiche Diskussionen, sowie cand. biol. Vincent Behrens für technische Unterstützung.

Ein großer Dank außerdem an alle, die mich im Labor und außerhalb davon bei der Durchführung meiner Arbeit unterstützt haben.

## 6. Literaturverzeichnis

- Ali, M.Y., H. Lu, C.S. Bookwalter, D.M. Warshaw, and K.M. Trybus. 2008. Myosin V and Kinesin act as tethers to enhance each others' processivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:4691-6.
- Bagshaw, C.R., J.F. Eccleston, F. Eckstein, R.S. Goody, H. Gutfreund, and D.R. Trentham. 1974a. The magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase of myosin. Two-step processes of adenosine triphosphate association and adenosine diphosphate dissociation. *Biochem J.* 141:351-64.
- Bagshaw, C.R., and D.R. Trentham. 1974b. The characterization of myosin-product complexes and of product-release steps during the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase reaction. *Biochem J.* 141:331-49.
- Baker, J.E., C. Brosseau, P.B. Joel, and D.M. Warshaw. 2002. The biochemical kinetics underlying actin movement generated by one and many skeletal muscle myosin molecules. *Biophys J.* 82:2134-47.
- Baker, J.E., E.B. Krementsova, G.G. Kennedy, A. Armstrong, K.M. Trybus, and D.M. Warshaw. 2004. Myosin V processivity: multiple kinetic pathways for head-to-head coordination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:5542-6.
- Barman, T., M. Brune, C. Lionne, N. Piroddi, C. Poggesi, R. Stehle, C. Tesi, F. Travers, and M.R. Webb. 1998. ATPase and shortening rates in frog fast skeletal myofibrils by time-resolved measurements of protein-bound and free Pi. *Biophys J.* 74:3120-30.
- Berger, I., D.J. Fitzgerald, and T.J. Richmond. 2004. Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. *Nat Biotechnol.* 22:1583-7.
- Brenner, B. 2006. The stroke size of myosins: a reevaluation. *J Muscle Res Cell Motil.* 27:173-87.
- Burgess, S., M. Walker, F. Wang, J.R. Sellers, H.D. White, P.J. Knight, and J. Trinick. 2002. The prepower stroke conformation of myosin V. *J Cell Biol.* 159:983-91.
- Cappello, G., P. Pierobon, C. Symonds, L. Busoni, J.C. Gebhardt, M. Rief, and J. Prost. 2007. Myosin V stepping mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:15328-33.
- Catlett, N.L., and L.S. Weisman. 1998. The terminal tail region of a yeast myosin-V mediates its attachment to vacuole membranes and sites of polarized growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:14799-804.
- Cecchini, M., A. Houdusse, and M. Karplus. 2008. Allosteric communication in myosin V: from small conformational changes to large directed movements. *PLoS Comput Biol.* 4:e1000129.
- Chang, W., R.F. Zaarour, S. Reck-Peterson, J. Rinn, R.H. Singer, M. Snyder, P. Novick, and M.S. Mooseker. 2008. Myo2p, a class V myosin in budding yeast, associates with a large ribonucleic acid-protein complex that contains mRNAs and subunits of the RNA-processing body. *Rna.* 14:491-502.
- Cheney, R.E., M.K. O'Shea, J.E. Heuser, M.V. Coelho, J.S. Wolenski, E.M. Espreafico, P. Forscher, R.E. Larson, and M.S. Mooseker. 1993. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell.* 75:13-23.
- Clemen, A.E., M. Vilfan, J. Jaud, J. Zhang, M. Barmann, and M. Rief. 2005. Force-dependent stepping kinetics of myosin-V. *Biophys J.* 88:4402-10.
- Cooke, R., and E. Pate. 1985. The effects of ADP and phosphate on the contraction of muscle fibers. *Biophys J.* 48:789-98.
- Cope, M.J., J. Whisstock, I. Rayment, and J. Kendrick-Jones. 1996. Conservation within the myosin motor domain: implications for structure and function. *Structure.* 4:969-87.

- Coureux, P.D., H.L. Sweeney, and A. Houdusse. 2004. Three myosin V structures delineate essential features of chemo-mechanical transduction. *Embo J.* 23:4527-37.
- Coureux, P.D., A.L. Wells, J. Menetrey, C.M. Yengo, C.A. Morris, H.L. Sweeney, and A. Houdusse. 2003. A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide. *Nature.* 425:419-23.
- Cross, R.A. 2006. Myosin's mechanical ratchet. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:8911-2.
- Dantzig, J.A., Y.E. Goldman, N.C. Millar, J. Lactis, and E. Homsher. 1992. Reversal of the cross-bridge force-generating transition by photogeneration of phosphate in rabbit psoas muscle fibres. *J Physiol.* 451:247-78.
- De La Cruz, E.M., H.L. Sweeney, and E.M. Ostap. 2000a. ADP inhibition of myosin V ATPase activity. *Biophys J.* 79:1524-9.
- De La Cruz, E.M., A.L. Wells, S.S. Rosenfeld, E.M. Ostap, and H.L. Sweeney. 1999. The kinetic mechanism of myosin V. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:13726-31.
- Desnos, C., S. Huet, I. Fanget, C. Chapuis, C. Bottiger, V. Racine, J.B. Sibarita, J.P. Henry, and F. Darchen. 2007b. Myosin va mediates docking of secretory granules at the plasma membrane. *J Neurosci.* 27:10636-45.
- Deville, R.E., and E. Vanden-Eijnden. 2008b. Regularity and synchrony in motor proteins. *Bull Math Biol.* 70:484-516.
- Dunn, A.R., and J.A. Spudich. 2007. Dynamics of the unbound head during myosin V processive translocation. *Nat Struct Mol Biol.* 14:246-8.
- Dunn, T.A., S. Chen, D.A. Faith, J.L. Hicks, E.A. Platz, Y. Chen, C.M. Ewing, J. Sauvageot, W.B. Isaacs, A.M. De Marzo, and J. Luo. 2006. A novel role of myosin VI in human prostate cancer. *Am J Pathol.* 169:1843-54.
- Espindola, F.S., D.M. Suter, L.B. Partata, T. Cao, J.S. Wolenski, R.E. Cheney, S.M. King, and M.S. Mooseker. 2000. The light chain composition of chicken brain myosin-Va: calmodulin, myosin-II essential light chains, and 8-kDa dynein light chain/PIN. *Cell Motil Cytoskeleton.* 47:269-81.
- Espreafico, E.M., R.E. Cheney, M. Matteoli, A.A. Nascimento, P.V. De Camilli, R.E. Larson, and M.S. Mooseker. 1992. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J Cell Biol.* 119:1541-57.
- Evans, L.L., A.J. Lee, P.C. Bridgman, and M.S. Mooseker. 1998. Vesicle-associated brain myosin-V can be activated to catalyze actin-based transport. *J Cell Sci.* 111 (Pt 14):2055-66.
- Finer, J.T., A.D. Mehta, and J.A. Spudich. 1995. Characterization of single actin-myosin interactions. *Biophys J.* 68:291S-296S; discussion 296S-297S.
- Finer, J.T., R.M. Simmons, and J.A. Spudich. 1994. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature.* 368:113-9.
- Fischer, S., B. Windshugel, D. Horak, K.C. Holmes, and J.C. Smith. 2005. Structural mechanism of the recovery stroke in the myosin molecular motor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:6873-8.
- Forgacs, E., S. Cartwright, M. Kovacs, T. Sakamoto, J.R. Sellers, J.E. Corrie, M.R. Webb, and H.D. White. 2006. Kinetic mechanism of myosinV-S1 using a new fluorescent ATP analogue. *Biochemistry.* 45:13035-45.
- Forgacs, E., S. Cartwright, T. Sakamoto, J.R. Sellers, J.E. Corrie, M.R. Webb, and H.D. White. 2008. Kinetics of ADP dissociation from the trail and lead heads of actomyosin V following the power stroke. *J Biol Chem.* 283:766-73.

- Forgacs, E., T. Sakamoto, S. Cartwright, B. Belknap, M. Kovacs, J. Toth, M.R. Webb, J.R. Sellers, and H.D. White. 2009. Switch 1 mutation S217A converts myosin V into a low duty ratio motor. *J Biol Chem.* 284:2138-49.
- Foth, B.J., M.C. Goedecke, and D. Soldati. 2006. New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:3681-6.
- Gebhardt, J.C., A.E. Clemen, J. Jaud, and M. Rief. 2006. Myosin-V is a mechanical ratchet. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:8680-5.
- Geli, M.I., and H. Riezman. 1996. Role of type I myosins in receptor-mediated endocytosis in yeast. *Science.* 272:533-5.
- Gillespie, P.G., M.C. Wagner, and A.J. Hudspeth. 1993. Identification of a 120 kd hair-bundle myosin located near stereociliary tips. *Neuron.* 11:581-94.
- Goody, R.S., and W. Hofmann. 1980. Stereochemical aspects of the interaction of myosin and actomyosin with nucleotides. *J Muscle Res Cell Motil.* 1:101-15.
- Govindan, B., R. Bowser, and P. Novick. 1995. The role of Myo2, a yeast class V myosin, in vesicular transport. *J Cell Biol.* 128:1055-68.
- Guo, S., and K.J. Kemphues. 1996. A non-muscle myosin required for embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 382:455-8.
- Hannemann, D.E., W. Cao, A.O. Olivares, J.P. Robblee, and E.M. De La Cruz. 2005. Magnesium, ADP, and actin binding linkage of myosin V: evidence for multiple myosin V-ADP and actomyosin V-ADP states. *Biochemistry.* 44:8826-40.
- Herrmann, C., J. Wray, F. Travers, and T. Barman. 1992. Effect of 2,3-butanedione monoxime on myosin and myofibrillar ATPases. An example of an uncompetitive inhibitor. *Biochemistry.* 31:12227-32.
- Hodge, T., and M.J. Cope. 2000. A myosin family tree. *J Cell Sci.* 113 Pt 19:3353-4.
- Hoepfner, D., M. van den Berg, P. Philippsen, H.F. Tabak, and E.H. Hettema. 2001. A role for Vps1p, actin, and the Myo2p motor in peroxisome abundance and inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 155:979-90.
- Holmes, K.C., R.R. Schroder, H.L. Sweeney, and A. Houdusse. 2004. The structure of the rigor complex and its implications for the power stroke. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 359:1819-28.
- Huxley, A.F. 1957. Muscle structure and theories of contraction. *Prog Biophys Biophys Chem.* 7:255-318.
- Ishijima, A., H. Kojima, T. Funatsu, M. Tokunaga, H. Higuchi, H. Tanaka, and T. Yanagida. 1998. Simultaneous observation of individual ATPase and mechanical events by a single myosin molecule during interaction with actin. *Cell.* 92:161-71.
- Itoh, T., A. Watabe, E.A. Toh, and Y. Matsui. 2002. Complex formation with Ypt11p, a rab-type small GTPase, is essential to facilitate the function of Myo2p, a class V myosin, in mitochondrial distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 22:7744-57.
- Kad, N.M., K.M. Trybus, and D.M. Warshaw. 2008. Load and Pi control flux through the branched kinetic cycle of myosin V. *J Biol Chem.* 283:17477-84.
- Kintses, B., Z. Yang, and A. Malnasi-Csizmadia. 2008. Experimental investigation of the seesaw mechanism of the relay region that moves the myosin lever arm. *J Biol Chem.* 283:34121-8.

- Knight, A.E., C. Veigel, C. Chambers, and J.E. Molloy. 2001. Analysis of single-molecule mechanical recordings: application to acto-myosin interactions. *Prog Biophys Mol Biol.* 77:45-72.
- Kojima, H., A. Ishijima, and T. Yanagida. 1994. Direct measurement of stiffness of single actin filaments with and without tropomyosin by in vitro nanomanipulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:12962-6.
- Komori, T., S. Nishikawa, T. Ariga, A.H. Iwane, and T. Yanagida. 2008. Measurement system for simultaneous observation of myosin V chemical and mechanical events. *Biosystems.* 93:48-57.
- Komori, T., S. Nishikawa, T. Ariga, A.H. Iwane, and T. Yanagida. 2009. Simultaneous measurement of nucleotide occupancy and mechanical displacement in Myosin-v, a processive molecular motor. *Biophys J.* 96:L4-6.
- Kraft, T., L.C. Yu, H.J. Kuhn, and B. Brenner. 1992. Effect of Ca<sup>2+</sup> on weak cross-bridge interaction with actin in the presence of adenosine 5'-[gamma-thio]triphosphate). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:11362-6.
- Langford, G.M. 2002. Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. *Traffic.* 3:859-65.
- Larson, R.E., F.S. Espindola, and E.M. Espreafico. 1990. Calmodulin-binding proteins and calcium/calmodulin-regulated enzyme activities associated with brain actomyosin. *J Neurochem.* 54:1288-94.
- Lillie, S.H., and S.S. Brown. 1994. Immunofluorescence localization of the unconventional myosin, Myo2p, and the putative kinesin-related protein, Smy1p, to the same regions of polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 125:825-42.
- Liu, J., D.W. Taylor, E.B. Kremenstova, K.M. Trybus, and K.A. Taylor. 2006. Three-dimensional structure of the myosin V inhibited state by cryoelectron tomography. *Nature.* 442:208-11.
- Malnasi-Csizmadia, A., J. Toth, D.S. Pearson, C. Hetenyi, L. Nyitray, M.A. Geeves, C.R. Bagshaw, and M. Kovacs. 2007. Selective perturbation of the myosin recovery stroke by point mutations at the base of the lever arm affects ATP hydrolysis and phosphate release. *J Biol Chem.* 282:17658-64.
- Mehta, A.D., M. Rief, J.A. Spudich, D.A. Smith, and R.M. Simmons. 1999a. Single-molecule biomechanics with optical methods. *Science.* 283:1689-95.
- Mehta, A.D., R.S. Rock, M. Rief, J.A. Spudich, M.S. Mooseker, and R.E. Cheney. 1999b. Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature.* 400:590-3.
- Menetrey, J., A. Bahloul, A.L. Wells, C.M. Yengo, C.A. Morris, H.L. Sweeney, and A. Houdusse. 2005. The structure of the myosin VI motor reveals the mechanism of directionality reversal. *Nature.* 435:779-85.
- Moore, J.R., E.B. Kremenstova, K.M. Trybus, and D.M. Warshaw. 2001. Myosin V exhibits a high duty cycle and large unitary displacement. *J Cell Biol.* 155:625-35.
- Moore, J.R., E.B. Kremenstova, K.M. Trybus, and D.M. Warshaw. 2004. Does the myosin V neck region act as a lever? *J Muscle Res Cell Motil.* 25:29-35.
- Mooseker, M.S., and L.G. Tilney. 1975. Organization of an actin filament-membrane complex. Filament polarity and membrane attachment in the microvilli of intestinal epithelial cells. *J Cell Biol.* 67:725-43.
- Moy, V.T., E.L. Florin, and H.E. Gaub. 1994. Intermolecular forces and energies between ligands and receptors. *Science.* 266:257-9.
- Naber, N., T.J. Purcell, E. Pate, and R. Cooke. 2007. Dynamics of the nucleotide pocket of myosin measured by spin-labeled nucleotides. *Biophys J.* 92:172-84.

- Nag, S., Q. Ma, H. Wang, S. Chumnarnsilpa, W.L. Lee, M. Larsson, B. Kannan, M. Hernandez-Valladares, L.D. Burnnick, and R.C. Robinson. 2009. Ca<sup>2+</sup> binding by domain 2 plays a critical role in the activation and stabilization of gelsolin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:13713-8.
- Nascimento, A.A., R.G. Amaral, J.C. Bizario, R.E. Larson, and E.M. Espreafico. 1997. Subcellular localization of myosin-V in the B16 melanoma cells, a wild-type cell line for the dilute gene. *Mol Biol Cell*. 8:1971-88.
- Nascimento, A.A., R.E. Cheney, S.B. Tauhata, R.E. Larson, and M.S. Mooseker. 1996. Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V. *J Biol Chem*. 271:17561-9.
- Oguchi, Y., S.V. Mikhailenko, T. Ohki, A.O. Olivares, E.M. De La Cruz, and S. Ishiwata. 2008. Load-dependent ADP binding to myosins V and VI: implications for subunit coordination and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:7714-9.
- Purcell, T.J., C. Morris, J.A. Spudich, and H.L. Sweeney. 2002. Role of the lever arm in the processive stepping of myosin V. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:14159-64.
- Purcell, T.J., H.L. Sweeney, and J.A. Spudich. 2005. A force-dependent state controls the coordination of processive myosin V. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:13873-8.
- Regnier, M., C. Morris, and E. Homsher. 1995. Regulation of the cross-bridge transition from a weakly to strongly bound state in skinned rabbit muscle fibers. *Am J Physiol*. 269:C1532-9.
- Rief, M., R.S. Rock, A.D. Mehta, M.S. Mooseker, R.E. Cheney, and J.A. Spudich. 2000. Myosin-V stepping kinetics: a molecular model for processivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:9482-6.
- Rosenfeld, S.S., A. Houdusse, and H.L. Sweeney. 2005. Magnesium regulates ADP dissociation from myosin V. *J Biol Chem*. 280:6072-9.
- Rosenfeld, S.S., and H.L. Sweeney. 2004. A model of myosin V processivity. *J Biol Chem*. 279:40100-11.
- Rossanese, O.W., C.A. Reinke, B.J. Bevis, A.T. Hammond, I.B. Sears, J. O'Connor, and B.S. Glick. 2001. A role for actin, Cdc1p, and Myo2p in the inheritance of late Golgi elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. 153:47-62.
- Sakamoto, T., I. Amitani, E. Yokota, and T. Ando. 2000. Direct observation of processive movement by individual myosin V molecules. *Biochem Biophys Res Commun*. 272:586-90.
- Sakamoto, T., F. Wang, S. Schmitz, Y. Xu, Q. Xu, J.E. Molloy, C. Veigel, and J.R. Sellers. 2003. Neck length and processivity of myosin V. *J Biol Chem*. 278:29201-7.
- Sakamoto, T., M.R. Webb, E. Forgacs, H.D. White, and J.R. Sellers. 2008. Direct observation of the mechanochemical coupling in myosin Va during processive movement. *Nature*. 455:128-32.
- Sakamoto, T., A. Yildez, P.R. Selvin, and J.R. Sellers. 2005b. Step-size is determined by neck length in myosin V. *Biochemistry*. 44:16203-10.
- Seebohm, B., F. Matinmehr, J. Kohler, A. Francino, F. Navarro-Lopez, A. Perrot, C. Ozcelik, W.J. McKenna, B. Brenner, and T. Kraft. 2009. Cardiomyopathy mutations reveal variable region of myosin converter as major element of cross-bridge compliance. *Biophys J*. 97:806-24.
- Self, T., T. Sobe, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, K.B. Avraham, and K.P. Steel. 1999. Role of myosin VI in the differentiation of cochlear hair cells. *Dev Biol*. 214:331-41.
- Sellers, J.R., and C. Veigel. Direct observation of the myosin-Va power stroke and its reversal. *Nat Struct Mol Biol*. 17:590-5.

- Shiroguchi, K., and K. Kinosita, Jr. 2007. Myosin V walks by lever action and Brownian motion. *Science*. 316:1208-12.
- Sil, A., and I. Herskowitz. 1996. Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene. *Cell*. 84:711-22.
- Snyder, G.E., T. Sakamoto, J.A. Hammer, 3rd, J.R. Sellers, and P.R. Selvin. 2004. Nanometer localization of single green fluorescent proteins: evidence that myosin V walks hand-over-hand via telemark configuration. *Biophys J*. 87:1776-83.
- Spudich, J.A. 2001. The myosin swinging cross-bridge model. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:387-92.
- Spudich, J.A., and S. Watt. 1971. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J Biol Chem*. 246:4866-71.
- Steffen, W., and J. Sleep. 2004a. Repriming the actomyosin crossbridge cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:12904-9.
- Steffen, W., and J. Sleep. 2004b. Using optical tweezers to relate the chemical and mechanical cross-bridge cycles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 359:1857-65.
- Stossel, T.P., and J.H. Hartwig. 1976. Interactions of actin, myosin, and a new actin-binding protein of rabbit pulmonary macrophages. II. Role in cytoplasmic movement and phagocytosis. *J Cell Biol*. 68:602-19.
- Sun, M., J.L. Oakes, S.K. Ananthanarayanan, K.H. Hawley, R.Y. Tsien, S.R. Adams, and C.M. Yengo. 2006. Dynamics of the upper 50-kDa domain of myosin V examined with fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem*. 281:5711-7.
- Suzuki, N., H. Miyata, S. Ishiwata, and K. Kinosita, Jr. 1996. Preparation of bead-tailed actin filaments: estimation of the torque produced by the sliding force in an in vitro motility assay. *Biophys J*. 70:401-8.
- Svoboda, K., and S.M. Block. 1994. Biological applications of optical forces. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 23:247-85.
- Sweeney, H.L., and A. Houdusse. 2004. The motor mechanism of myosin V: insights for muscle contraction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 359:1829-41.
- Sweeney, H.L., S.S. Rosenfeld, F. Brown, L. Faust, J. Smith, J. Xing, L.A. Stein, and J.R. Sellers. 1998. Kinetic tuning of myosin via a flexible loop adjacent to the nucleotide binding pocket. *J Biol Chem*. 273:6262-70.
- Takacs, B., N. Billington, M. Gyimesi, B. Kintses, A. Malnasi-Csizmadia, P.J. Knight, and M. Kovacs. Myosin complexed with ADP and blebbistatin reversibly adopts a conformation resembling the start point of the working stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:6799-804.
- Takagi, Y., H. Shuman, and Y.E. Goldman. 2004. Coupling between phosphate release and force generation in muscle actomyosin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 359:1913-20.
- Takagishi, Y., S. Oda, S. Hayasaka, K. Dekker-Ohno, T. Shikata, M. Inouye, and H. Yamamura. 1996. The dilute-lethal (dl) gene attacks a Ca<sup>2+</sup> store in the dendritic spine of Purkinje cells in mice. *Neurosci Lett*. 215:169-72.
- Takizawa, P.A., A. Sil, J.R. Swedlow, I. Herskowitz, and R.D. Vale. 1997. Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature*. 389:90-3.
- Uemura, S., H. Higuchi, A.O. Olivares, E.M. De La Cruz, and S. Ishiwata. 2004. Mechanochemical coupling of two substeps in a single myosin V motor. *Nat Struct Mol Biol*. 11:877-83.

- Vale, R.D. 2003. Myosin V motor proteins: marching stepwise towards a mechanism. *J Cell Biol.* 163:445-50.
- Veigel, C., J.E. Molloy, S. Schmitz, and J. Kendrick-Jones. 2003. Load-dependent kinetics of force production by smooth muscle myosin measured with optical tweezers. *Nat Cell Biol.* 5:980-6.
- Veigel, C., S. Schmitz, F. Wang, and J.R. Sellers. 2005. Load-dependent kinetics of myosin-V can explain its high processivity. *Nat Cell Biol.* 7:861-9.
- Veigel, C., F. Wang, M.L. Bartoo, J.R. Sellers, and J.E. Molloy. 2002. The gated gait of the processive molecular motor, myosin V. *Nat Cell Biol.* 4:59-65.
- Vilfan, A. 2005. Influence of fluctuations in actin structure on myosin V step size. *J Chem Inf Model.* 45:1672-5.
- Volkman, N., H. Liu, L. Hazelwood, E.B. Kremntsova, S. Lowey, K.M. Trybus, and D. Hanein. 2005. The structural basis of myosin V processive movement as revealed by electron cryomicroscopy. *Mol Cell.* 19:595-605.
- Wagner, W., and J.A. Hammer, 3rd. 2003. Myosin V and the endoplasmic reticulum: the connection grows. *J Cell Biol.* 163:1193-6.
- Walker, M.L., S.A. Burgess, J.R. Sellers, F. Wang, J.A. Hammer, 3rd, J. Trinick, and P.J. Knight. 2000. Two-headed binding of a processive myosin to F-actin. *Nature.* 405:804-7.
- Wang, F., L. Chen, O. Arcucci, E.V. Harvey, B. Bowers, Y. Xu, J.A. Hammer, 3rd, and J.R. Sellers. 2000. Effect of ADP and ionic strength on the kinetic and motile properties of recombinant mouse myosin V. *J Biol Chem.* 275:4329-35.
- Wang, F., K. Thirumurugan, W.F. Stafford, J.A. Hammer, 3rd, P.J. Knight, and J.R. Sellers. 2004. Regulated conformation of myosin V. *J Biol Chem.* 279:2333-6.
- Warshaw, D.M., G.G. Kennedy, S.S. Work, E.B. Kremntsova, S. Beck, and K.M. Trybus. 2005. Differential labeling of myosin V heads with quantum dots allows direct visualization of hand-over-hand processivity. *Biophys J.* 88:L30-2.
- Weil, D., S. Blanchard, J. Kaplan, P. Guilford, F. Gibson, J. Walsh, P. Mburu, A. Varela, J. LeVilliers, M.D. Weston, and et al. 1995. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature.* 374:60-1.
- Williams, S.P., A.M. Fulton, and K.M. Brindle. 1993. Estimation of the intracellular free ADP concentration by <sup>19</sup>F NMR studies of fluorine-labeled yeast phosphoglycerate kinase in vivo. *Biochemistry.* 32:4895-902.
- Wolodko, W.T., and C.M. Kay. 1975. Rabbit cardiac myosin. II. Proteolytic fragmentation with insolubilized papain. *Can J Biochem.* 53:175-88.
- Yildiz, A., J.N. Forkey, S.A. McKinney, T. Ha, Y.E. Goldman, and P.R. Selvin. 2003. Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science.* 300:2061-5.
- Yin, H., D. Pruyne, T.C. Huffaker, and A. Bretscher. 2000. Myosin V orientates the mitotic spindle in yeast. *Nature.* 406:1013-5.

## Anhang

Verwendete Programme:

### MatLab-basiertes Programm zur Detektierung von Bindeereignissen und Subschritten

(W. J. Walter, W. Steffen, A.T. Schweda)

a Detektierung von Myosin-Bindeereignissen an einer Aktin-Hantel über die Reduktion der Varianz

b manuelle Festlegung der Position eines Subschrittes innerhalb des Bindeereignisses

c Ausgabe der mittleren Position der Hantel, der Varianz und Verweilzeit vor und nach dem Subschritt

```
clear all;
clc;
fnme=input('FILENAME: ','s');
fnmebin=fnme;
fid = fopen(fnmebin,'r','b');
offset=fread(fid,1,'int32'); a1=fread(fid,1,'int32');
nchan=fread(fid,1,'int32');
fs=fread(fid,1,'int32'); date=fread(fid,1,'uint32');
sc=fread(fid,1,'int32');
bl=fread(fid,1,'int32'); sl=fread(fid,1,'int32'); clear date sc bl

%reading the text header
off=fscanf(fid,'%1s',12); Zsum=fscanf(fid,'%1s',5);
off=fscanf(fid,'%1s',4);
call=fscanf(fid,'%f6.2',6); off=fscanf(fid,'%1s',4);
cal2=fscanf(fid,'%f6.2',6);

%extracts calibration
cal=[call,cal2]; cal=cal';
disp('cal = '), disp(cal);

% calibration control
if input(' accept calibration = 1 ; do not accept = 2 ') == 2,
    call=input(' call = ');
    cal2=input(' cal2 = ');
    cal=[call,cal2];
    cal=cal';
end

%docfile=fscanf(fid,'%1s',sl);
status=fseek(fid,offset,'bof');
c=fread(fid,'float32');
status=fclose('all');
clen=length(c);c=c';
b=reshape(c,nchan,clen/nchan);
b=b';
npts=clen/nchan;
clear c;
delta=1/fs;
time=delta*(npts-1);
t=(0:delta:time);
t=t';

% choice of best channel
bc=input(' channel ? ');

if size(cal)==[0,0],
    cal=1;
    disp('No calibration value!')
end

if bc == 1,
```

```

    b=-1*b;
end

position=b/(cal(bc,:));
x=position(:,bc);
q=x;
q=q';

% vector of the bead position
invx=x(length(x):-1:1); % inverse position vector for inverse variance analysis

% calculation of the variance vector v and the reverse variance vector invv
%N = input(' window size ? '); % N is the window size
N=50;
n=size(x,1);
f=zeros(N,1)+1/N;
m2=floor(N/2);
n2=ceil(N/2)-1;

v=filter2(f,x.^2)-filter2(f,x).^2;
v=v([zeros(1,m2)+m2+1,(m2+1):(n-n2),zeros(1,n2)+(n-n2)],:); % variance vector v

invv=filter2(f,invx.^2)-filter2(f,invx).^2;
invv=invv([zeros(1,m2)+m2+1,(m2+1):(n-n2),zeros(1,n2)+(n-n2)],:); % inverse
variance vector invv

% running average of variance vector and inverse variance vector
windowSize = 200;
v=filter(ones(1,windowSize)/windowSize,1,v);
w=v; % mean variance vector w

invv=filter(ones(1,windowSize)/windowSize,1,invv);
invw=invv'; % mean inverse variance vector invw

% threshold for events
p=(max(w)-min(w))/500;

varsteps=min(w):p:max(w);

figure(1),clf,
hist(w,varsteps);

[threshold]=ginput(1);
threshold=threshold(:,1);

% determine events
w=w';
w(w>threshold)=0;
w(w>0)=1;

invw(inv w>threshold)=0;
invw(inv w>0)=1;

w=w+invw(length(inv w):-1:1);
w(w>0)=1; % combined vector of variance analysis and inverse variance analysis:
all events = 1, all free dumbbell = 0

% kürzeste events nicht beachten
limit=20; % limit is the shortest event duration in [ms]

wdhl = diff(find(diff([-w(1) w ~w(end)])));
cw=cumsum(wdhl);
wert = w(cw);

indb = wert== 1 & wdhl>10*limit;

indv=[indb(2:end) indb(1)];

von=cw(indv);
bis=cw(indb);

if bis(:,1)<von(:,1), % ignoriert "halbe" events am Anfang oder Ende des
Datensatzes
    bis(:,1)=[];
    von(:,length(von))=[];
end

y=[1:1:length(w)].*0;

```

```

for i = 1 : length(von),
y(von(i)+1:bis(i))=1;
end
clear w
w=y;

wdhl = diff(find(diff([~w(1) w ~w(end)])));
cw=cumsum(wdhl);
wert = w(cw);
grp=wdhl(wert~=0 & wdhl>10*limit);

% Länge der events
eventlength=delta*grp';

% variance threshold
freiesrauschen=mean(v(w==0));
variancethreshold=freiesrauschen./threshold;

% threshold für Graph
thr=(v./v)*threshold;

% Varianz der events
eventvar=v(w==1);
eventvarx=[0 cumsum(grp)];
for i = 1 : numel(eventvarx)-1
    alleventsvar{i}=[eventvar(eventvarx(i)+1:eventvarx(i+1))];
    meaneventsvar{i}=[mean(eventvar(eventvarx(i)+1:eventvarx(i+1)))];
end
meaneventvarianz=[meaneventsvar{1,:}]';

varianzratio=freiesrauschen./meaneventvarianz;

varianzratio=varianzratio(eventlength>N.*delta);

% Nulllinie
nullinie=[1:1:length(von)]';
tt=[1:1:length(x)];

nullinie(1,:)=(mean(x(tt<von(:,1)))+mean(x(tt>bis(:,1)&tt<von(:,2))))./2;

for i=2:length(von)-1,
    nullinie(i,:)=(mean(x(tt>bis(:,i-1)&tt<von(:,i)))+mean(x(tt>bis(:,i)&tt<von(:,i+1))))./2;
end

nullinie(length(nullinie),:)=(mean(x(tt>bis(:,length(bis)-1)&tt<von(:,length(von))))+mean(x(tt>bis(:,length(bis))))) /2;

% displacement der events
eventdisp=q(w==1);
eventdispx=[0 cumsum(grp)];
for i = 1 : numel(eventdispx)-1
    alleventsdisp{i}=[eventdisp(eventdispx(i)+1:eventdispx(i+1))];
    meaneventsdisp{i}=[mean(eventdisp(eventdispx(i)+1:eventdispx(i+1)))];
end
meaneventdisplacement=[meaneventsdisp{1,:}]'-nullinie;

% Eventanfang und -ende
eventanfang=von;
eventende=bis;

% applying the variance threshold on event length, mean event displacement,
% and event begin and end
meaneventdisplacement(varianzratio<variancethreshold)=[];
eventlength(varianzratio<variancethreshold)=[];
von(varianzratio<variancethreshold)=[];
bis(varianzratio<variancethreshold)=[];
varianzratio(varianzratio<variancethreshold)=[];

clear subposition eventduration subpositionstart subpositionend
% display baseline-corrected data in 10 segments
figure(2), clf
subposition=[];
eventduration=[];
subpositionstart=[];
subpositionend=[];
disp='select substep-position:'
for i=1:(length(von)-1)

```

```

clear xs ys start stop
start=von(i)-400;
stop=bis(i)+400;
subplot(2,1,1);
plot(x(start:stop))
[xs ys]=ginput(1);
xs=von(i)+xs-400;
if xs>von(i)
subposition=[subposition; xs];
te=bis(i)-von(i);
eventduration=[eventduration; te];
subpositionstart=[subpositionstart; von(i)];
subpositionend=[subpositionend; bis(i)];
else
subposition=[subposition];
eventduration=[eventduration];
subpositionstart=[subpositionstart];
subpositionend=[subpositionend];
end
end

%Varianzverhältnis

% simple baseline correction
figure(1), clf, subplot(2,1,1), plot(x)
disp='select with mouse a region without events for base line correction'
[xt,yt]=ginput(2);
cor=mean(x(xt(1):xt(2)));
x=x-cor;
xmin=0; xmax=length(x); ymin=min(x); ymax=max(x);
subplot(2,1,2), plot(x), axis([xmin xmax ymin ymax])

subt=subposition;      % extract time point of substep

substepvar=[];
sta_1=subpositionstart;sto_1=subposition;sta_2=subposition;sto_2=subpositionend;
for i=1:length(subt)
aa=var(x(sta_1(i):sto_1(i))); bb=var(x(sta_2(i):sto_2(i))); aabb=aa/bb;
as=mean(x(sta_1(i):sto_1(i))); bs=mean(x(sta_2(i):sto_2(i))); abs=bs-as;
subvar=[aa bb aabb as bs abs];
substepvar=[substepvar; subvar];
end
mean_disp_substep=mean(substepvar(:,6))

steps1=[];
steps2=[];
stal=sta_1;stol=sto_1;
sta2=sta_2;sto2=sto_2;
for i=1:length(subt)
corst1=mean(x(stal(i):stol(i)));
step1=x(stal(i):stol(i))-corst1;
steps1=[steps1; step1];

corst2=mean(x(sta2(i):sto2(i)));
step2=x(sta2(i):sto2(i))-corst2;
steps2=[steps2; step2];
end

cal=cal(bc);

% calculate stiffness of 1st substep
bb=[steps1 steps1];
for i = 1:1;
stdv(i)=std(bb(:,i)),
stdnm(i)=stdv(i),
k(i)=1000*1.38e-23*293./((stdnm(i)*1e-9).^2);
end;
k
global z yyy ttt niter;lag=20; visc=0.001; r=[0.392e-6,0.505e-6]; niter=1;
ttt=[0:delta:lag*delta]';
figure(5),clf
for i=1:1
y=xcorr(bb(:,i),lag); yyy=y(lag+1:2*lag+1);      %take second half of correlation
subplot(2,1,1),plot(ttt,yyy,'x'),hold on
rls(1)=yyy(lag); rls(2)=yyy(1)-yyy(lag);
ij=find(yyy<rls(1)+rls(2)/2); thalf=ttt(ij(1)); rls(3)=0.69/thalf;

```

```

lamda(i,:)=fminsearch('experr2js2',rls);
clear yfit,yfit=lamda(i,1) +lamda(i,2)*exp(-lamda(i,3)*ttt);
plot(ttt,yfit,'g'),xlabel('seconds'),v=axis; yrange=v(4)-v(3);
tit=[fnme,' autocorrelation'];
if i==1,title(tit),end
lamda(i,3)
stiff(i)=lamda(i,3)*6*pi*r(i)*visc*1000 %*1000 for pN
stringstiff=['autocorrstiff = ',num2str(stiff(i))];
text(lag*0.6*delta,v(3)+yrange*.6,stringstiff)
noisestiff=['noisestiff = ',num2str(k(i))];
text(lag*0.6*delta,v(3)+yrange*.4,noisestiff)
end

% calculate stiffness of 2nd substep
bb=[steps2 steps2];
for i = 1:1;
    stdv(i)=std(bb(:,i)),
    stdnm(i)=stdv(i),
    k(i)=1000*1.38e-23*293./((stdnm(i)*1e-9).^2);
end;
k
global z yyy ttt niter;lag=20; visc=0.001; r=[0.392e-6,0.505e-6]; niter=1;
ttt=[0:delta:lag*delta]';
figure(5),
for i=1:1
y=xcorr(bb(:,i),lag); yyy=y(lag+1:2*lag+1); %take second half of correlation
subplot(2,1,2),plot(ttt,yyy,'x'),hold on
rls(1)=yyy(lag); rls(2)=yyy(1)-yyy(lag);
ij=find(yyy<rls(1)+rls(2)/2); thalf=ttt(ij(1)); rls(3)=0.69/thalf;
lamda(i,:)=fminsearch('experr2js2',rls);
clear yfit,yfit=lamda(i,1) +lamda(i,2)*exp(-lamda(i,3)*ttt);
plot(ttt,yfit,'g'),xlabel('seconds'),v=axis; yrange=v(4)-v(3);
tit=[fnme,' autocorrelation'];
if i==1,title(tit),end
lamda(i,3)
stiff(i)=lamda(i,3)*6*pi*r(i)*visc*1000 %*1000 for pN
stringstiff=['autocorrstiff = ',num2str(stiff(i))];
text(lag*0.6*delta,v(3)+yrange*.6,stringstiff)
noisestiff=['noisestiff = ',num2str(k(i))];
text(lag*0.6*delta,v(3)+yrange*.4,noisestiff)
end

% calculate steps/positions and variance ratio
clear subl stal sta2 step1nm step2nm stepvar1 stepvar2 diffstep varr steps
subl=length(subposition);
for i=1:subl
    step1nm(i)=mean(x(sta_1(i):sto_1(i)));
    step2nm(i)=mean(x(sta_2(i):sto_2(i)));
    stepvar1(i)=var(x(sta_1(i):sto_1(i)));
    stepvar2(i)=var(x(sta_2(i):sto_2(i)));
end

%Resultate

disp('position1 (nm) -position2 (nm) -substep (nm) -lifetime1 (s) -lifetime2 (s) -
variance1 (nm^2) -variance2 (nm^2) ')

ADPlifetime=(subposition-subpositionstart)*delta;
lifetime=(eventduration-(subposition-subpositionstart))*delta;
step1nm=step1nm';step2nm=step2nm';stepvar1=stepvar1';stepvar2=stepvar2';
diffstep=step2nm-step1nm;

result1=[step1nm step2nm diffstep ADPlifetime lifetime stepvar1 stepvar2]

```

## Generierte Vektoren

### pFBDM-MyoVS1-GFP-FLAG+CaM+hLC

codierte Proteine:

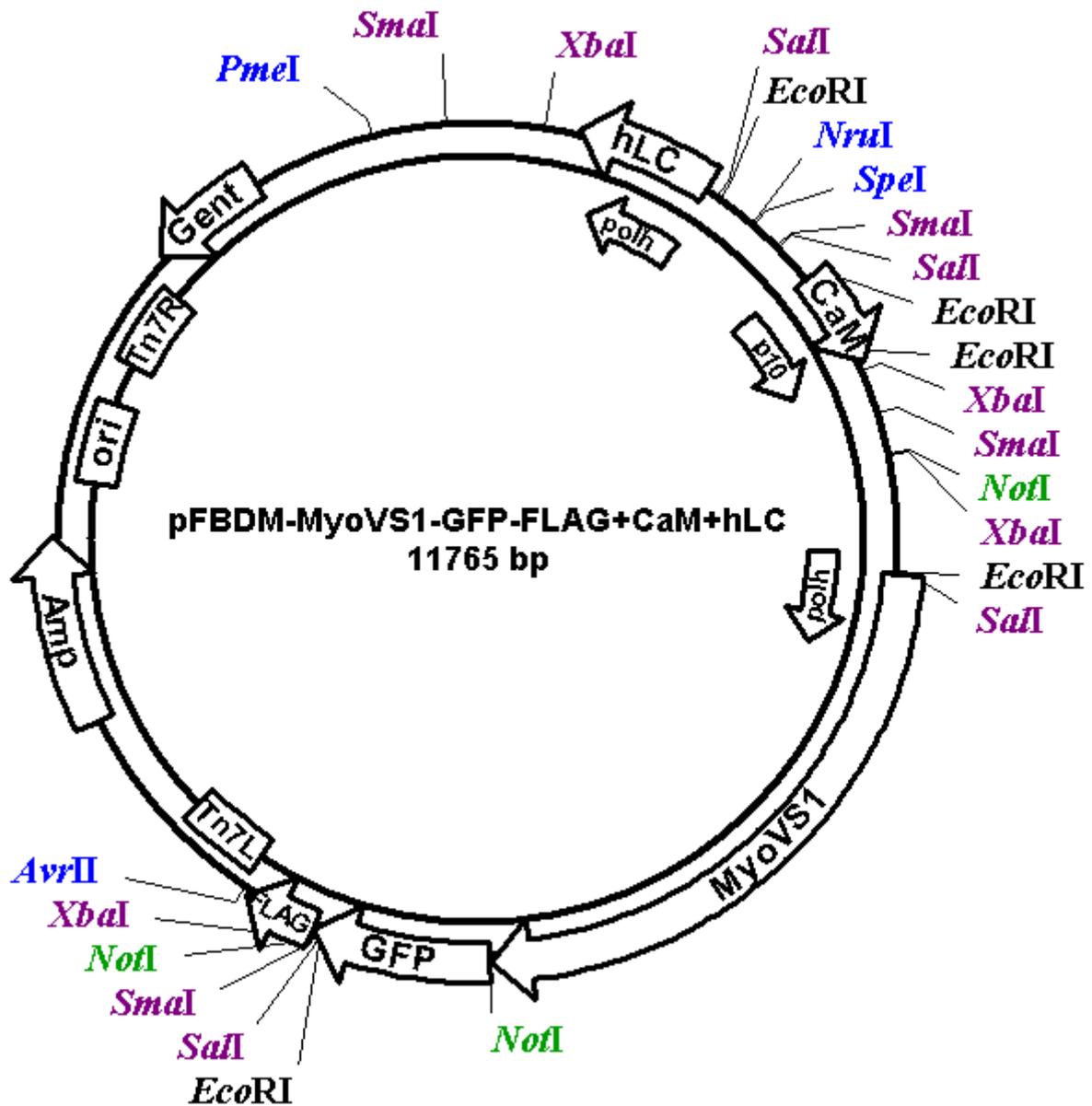
MyoV-S1: Myosin Va, Gallus gallus, AS 1-909, Accession-Nr. NP\_990631

GFP: eGFP (Zhang et al., 1996), Accession-Nr. AAB02572

FLAG-Peptid: DYKDDDDK

CaM: Calmodulin, Gallus gallus, Accession-Nr. AAA48653

hLC: regulatorische leichte Kette LC23sa, Homo sapiens



## Wissenschaftlicher Werdegang

Dipl. Biochem. Aike Torben Schweda

2000-2005	Studium der Biochemie an der Universität Hannover
2005	Diplomarbeit unter Leitung von PD Dr. Mahtab Noubakhsh im Institut für Pharmakologie, Medizinische Hochschule Hannover, zum Thema „Identifizierung der Interaktionsdomäne von NRF und NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren“.
2006-2010	Arbeit an der Promotion zum Thema „Mechano-chemische Kopplung von Myosin V“ im Insitut für Molekular- und Zellphysiologie (Medizinische Hochschule Hannover) unter Leitung von Prof. Dr. Bernhard Brenner

## Publikationen

Bartels M, **Schweda AT**, Dreikhausen U, Frank R, Resch K, Beil W, Nourbakhsh M; Peptide-mediated disruption of NF $\kappa$ B/NRF interaction inhibits IL-8 gene activation by IL-1 or Helicobacter pylori, Journal of Immunology, 2007 Dec 1;179(11):7605-13.