1 Zusammenfassung

Die Myosine bilden eine große Familie von Motorproteinen, die eine gemeinsame Domäne enthalten, über die sie an Aktin binden und die Energie, die bei der Hydrolyse von ATP frei wird, in eine Bewegung entlang des Aktinfilaments umwandeln. Von großem Interesse ist eine Charakterisierung der Eigenschaften von verschiedenen Mitgliedern dieser Proteinfamilie, da sie die Aufklärung ihrer physiologischen Funktionen erleichtert. Darüber hinaus kann damit das Verständnis des grundlegenden Mechanismus der Energieumwandlung durch den Aktomyosinkomplex erweitert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb neben der zellulären Lokalisierung auch die mechanischen und biochemischen Eigenschaften von Myosinen der Klasse I aus dem Modellorganismus *Dictyostelium discoideum* untersucht. Dafür wurden drei Myosine ausgewählt, die Abweichungen in der Domänenstruktur der Schwanzregion aufweisen. MyoB und MyoD enthalten zusätzlich zu einem Bereich, der an Membranen bindet, eine zweite Aktinbindungsstelle und eine SH3-Domäne. Dagegen endet die Schwanzdomäne von MyoE nach der membranbindenden Domäne. Diese Einteilung in zwei Unterklassen deutet bereits darauf hin, daß die Proteine unterschiedliche Funktionen in der Zelle ausüben könnten.

Die Lokalisierung von MyoD und MyoE wurde an Zellen untersucht, die ein Fusionsprotein des Myosins mit YFP exprimierten. Sie zeigten neben einer gleichmäßigen Verteilung im Cytoplasma und an der Plasmamembran eine Anreicherung der Proteine in dynamischen Regionen des Zellcortex. Während der Phagocytose von Hefezellen ist MyoE am phagocytotischen Becher konzentriert. Bei der Aufnahme von flüssigen Substanzen in die Zelle treten die Proteine in kronenförmigen Strukturen der Plasmamembran auf, aus denen Makropinosomen entstehen. Eine besondere Eigenschaft von MyoD wurde während der Zellteilung beobachtet. Im Verlauf des Zellzyklus unterliegt das Protein einer schnellen Umverteilung von den Rändern der Zelle in den Zellkern, wo es während der Zellteilung an der Kernhülle, die bei *D. discoideum* während der Zellteilung erhalten bleibt, und an mikrotubulireichen Strukturen lokalisiert ist. MyoD könnte während der Mitose eine Rolle bei der Trennung der Kernhülle zwischen den beiden Tochterkernen spielen. Mit diesem Ergebnis konnte ein deutlicher Hinweis auf eine Funktion eines Myosins der Klasse I bei der Zellteilung gewonnen werden.

Die Motoreigenschaften der drei Myosine der Klasse I wurden mit einer direkten funktionellen Methode charakterisiert. Dabei wird die Bewegungsgeschwindigkeit von fluoreszenzmarkierten Aktinfilamenten durch Myosinmoleküle gemessen, die an eine Oberfläche gebunden vorliegen. Für die Versuche wurden rekombinante Proteinkonstrukte verwendet, die aus der Motordomäne der Myosine und zwei Untereinheiten des Proteins α-Aktinin bestehen, die als künstlicher Hebelarm bei der Krafterzeugung für eine Bewegung entlang Aktin dienen können. Um die Regulation der Myosine I durch eine Phosphorylierung der Motordomäne an der TEDS-Stelle zu untersuchen, wurden die Proteine nach der Isolierung entweder mit λ-Phosphatase dephosphoryliert oder mit einer Myosin I-Kinase phosphoryliert. Daneben wurden Mutanten verwendet, bei denen das Serin an der TEDS-Stelle durch Alanin oder Glutaminsäure ersetzt wurde. Mit den erhaltenen Ergebnissen konnte

direkt nachgewiesen werden, daß für die vollständige Aktivität aller drei Myosine I eine negative Ladung an der TEDS-Position benötigt wird. Dabei wurden mit den Mutanten dieselben Resultate erzielt wie mit den enzymatisch modifizierten Proteinen. Auch eine effiziente Aktinaktivierung der ATPase-Aktivität der Myosine I erfordert bei allen drei untersuchten Proteinen eine Phosphorylierung an der TEDS-Stelle. Dadurch wird die Kopplungseffizienz zwischen der Aktinbindung und der Phosphatfreisetzung aus der Nukleotidbindungstasche bis zu 80fach erhöht. Zusätzlich wird der Aktomyosinkomplex stabilisiert, indem die Dissoziationsgeschwindigkeit von Aktin aus dem Komplex deutlich erniedrigt wird. Da die Geschwindigkeit der Aktinbindung nicht beeinflußt wird, wirkt die Regulation sehr wahrscheinlich auf die Isomerisierung des Aktomyosinkomplexes vom schwach gebundenen A-Zustand in den stark gebundenen R-Zustand, die mit dem Kraftschlag des Myosins verbunden ist.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß freie Magnesiumionen die Motorfunktion von MyoD inhibieren, indem sie die Dissoziation des Hydrolyseprodukts ADP aus dem Komplex mit Myosin hemmen. Die Gleichgewichtskonstante dieser inhibitorischen Reaktion liegt im Bereich der physiologischen Konzentration an freien Magnesiumionen in *D. discoideum* von etwa 0,5 mM. Damit wurde zum ersten Mal ein Regulationsmechanismus für ein Myosin durch bivalente Kationen beschrieben, der bisher nicht bekannt war. Diesem könnte jedoch eine Bedeutung auch in anderen Myosinklassen zukommen.

Die kinetische Charakterisierung des Myosin I-ATPase-Zyklus an Fragmenten der Myosine aus *D. discoideum*, die der Motordomäne entsprechen, führte zu dem Ergebnis, daß die Wechselwirkung mit ATP und Aktin denselben grundlegenden Mechanismen folgt, die schon für andere gut untersuchte Myosine beschrieben wurden. Unterschiede zwischen den drei Myosinen liegen jedoch in den Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten einzelner wichtiger Schritte des ATPase-Zyklus. Die ADP-Affinität für MyoB und MyoD wird wie bei Myosinen der Klasse II stark durch Aktin erniedrigt. Im Gegensatz dazu bleibt die ADP-Affinität für MyoE auch in der Anwesenheit von Aktin fast unverändert hoch. Daher ist die Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation aus dem Komplex von MyoE und Aktin deutlich langsamer als die aus dem Komplex von MyoB oder MyoD und Aktin. Weiterhin erfolgt die ADP-Dissoziation aus dem Aktomyosinkomplex von MyoE wahrscheinlich in zwei Schritten. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten liegt darin, daß das Myosin in zwei Konformationen auftritt, wenn es an Aktin gebunden ist. Die Isomerisierung zwischen diesen beiden Zuständen könnte dann eine Verbindung zwischen der Möglichkeit herstellen, daß ein Nukleotid in der Bindungstasche des Myosins binden kann, und einer Kraft, die auf das Myosin ausgeübt wird. Damit liegt ein Mechanismus dafür vor, wie ein Myosin, das mit einer Last beladen ist, länger an Aktin gebunden bleiben kann.

2 Einleitung

2.1 Molekulare Motoren

Bewegung ist eine der Eigenschaften, die Leben kennzeichnet. Die Untersuchung von Bewegungsvorgängen beschäftigt sich heute neben der Muskelkontraktion auch mit dem gerichteten Transport von Makromolekülen, Membranen oder Organellen im Cytoplasma von Zellen. Im Inneren von eukaryontischen Zellen werden die Bewegungen von molekularen Motoren angetrieben, die an Proteinfilamente binden und die chemische Energie, die bei der Hydrolyse von ATP entsteht, in eine gerichtete Bewegung entlang der Filamente umwandeln (Howard, 1997). Diese Motorproteine werden in drei Familien unterteilt, die Myosine, Kinesine und Dyneine, die sich sowohl in der Art der Filamente unterscheiden, mit denen sie in Wechselwirkung treten, als auch in der Richtung, in der sie sich an diesen Filamenten entlang bewegen. Die Myosine binden an Aktinfilamente, die Kinesine und Dyneine an Mikrotubuli.

Das Myosin, das in der Skelettmuskulatur vorkommt und dort einen Teil des kontraktilen Apparats bildet, war das erste Motorprotein, das entdeckt wurde. Zahlreiche andere Mitglieder der Myosinfamilie sind heute in anderen Organismen und in Zellen, die nicht zur Muskulatur gehören, bekannt. Diese Myosinmotoren sind an vielen verschiedenen biologischen Vorgängen beteiligt, zu denen neben der Muskelkontraktion, die Zellteilung, die Fortbewegung von Zellen, der Transport von Membranen, die Veränderung oder Stabilisierung der Zellgestalt und bestimmte Signalübertragungswege in der Zelle zählen.

Die Dyneine sind im Cytoplasma an dem Transport von Organellen sowie an der Mitose beteiligt. In Cilien und Geißeln erzeugen sie deren Bewegungen, indem sie mit benachbarten Mikrotubuli in Wechselwirkung treten und diese gegeneinander verschieben. Sie wandern zum Minus-Ende der Mikrotubuli und damit zum Centrosom hin.

Kinesine sind vielgestaltiger als Dyneine und die verschiedenen Proteine aus dieser Familie wirken beim Transport von Organellen, bei der Mitose und Meiose und dem Vesikeltransport in Axonen mit. Die meisten Kinesine treten als Dimere auf und sind prozessive Motoren, die sich zum Plus-Ende der Mikrotubuli bewegen. Ncd, ein Kinesin aus *D. melanogaster* unterscheidet sich jedoch von dem Kinesin aus Axonen sowohl durch die Richtung als auch durch die Geschwindigkeit seiner Bewegung an Mikrotubuli entlang. Das Ncd-Protein bewegt sich wesentlich langsamer zum Minus-Ende (Chandra *et al.*, 1993).

Mit der Möglichkeit verschiedene Kinesin- und Myosinmotoren zu vergleichen, bietet sich eine wertvolle Methode, die grundlegenden Mechanismen von Bewegungen genauer zu verstehen.

2.2 Proteinfamilie der Myosine

2.2.1 Einteilung in Klassen

Die Proteinfamilie der Myosine besteht aus molekularen Motoren, die eine gemeinsame Domäne besitzen, über die sie an Aktin binden und die Energie aus der Hydrolyse von ATP in eine Bewegung entlang eines Aktinfilaments umwandeln. Bis heute wurden sie mit Sequenzvergleichen dieser hochkonservierten Motordomäne in 18 Klassen eingeteilt, die sich auch in ihrer Gesamtstruktur unterscheiden. Ein phylogenetischer Stammbaum der Myosin-Proteinfamilie ist in der Abbildung 1.1 dargestellt.

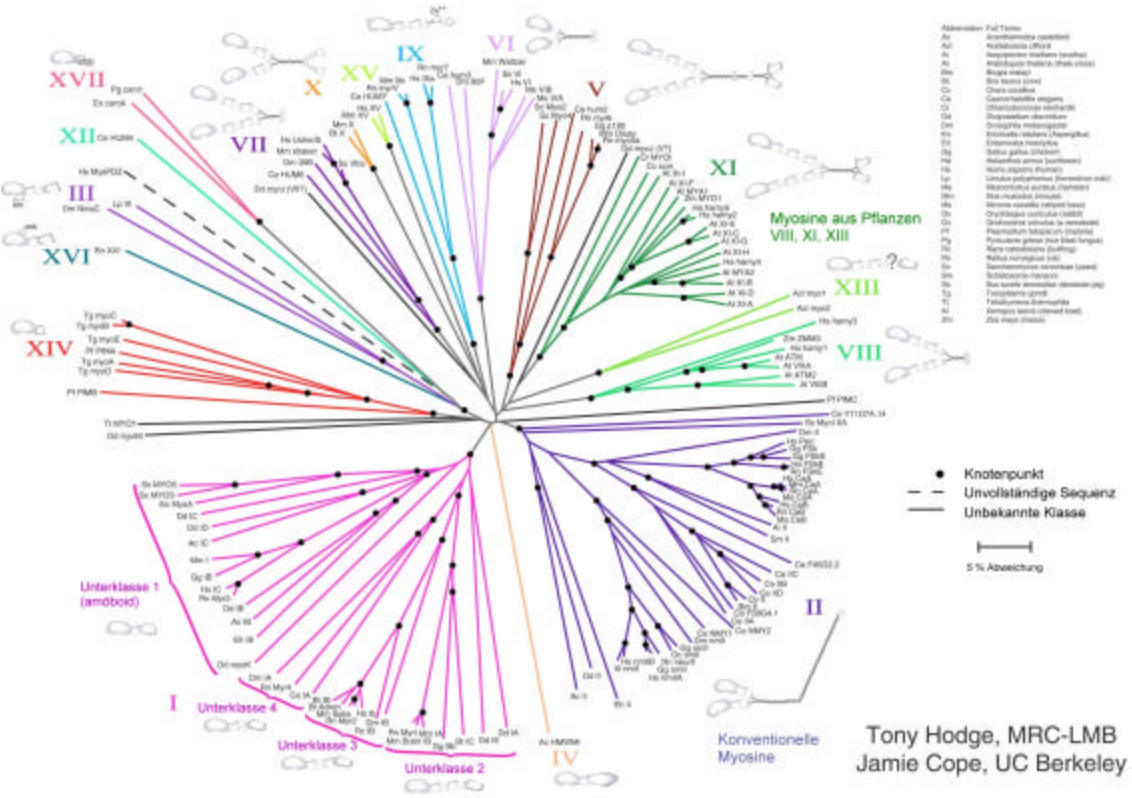


Abbildung 1.1: **Phylogenetischer Stammbaum der Myosin-Proteinfamilie.** Die Einteilung der Myosin-Proteinfamilie in Klassen beruht auf einem Sequenzvergleich der Motordomänen. Die Myosinklassen sind mit römischen Zahlen nummeriert. Die schematischen Zeichnungen der Myosinstruktur beruhen bei den Klassen I, II und V auf experimentellen Daten, bei den anderen Klassen nur auf Sequenzhomologien (verändert nach Hodge und Cope, 2000).

Bei der Einteilung gibt es einige Sonderfälle, die sich noch nicht in der Klassifizierung erfassen ließen, und zwei der festgelegten Klassen (IV und XII) enthalten jeweils nur ein Mitglied (Sellers, 2000; Hodge und Cope, 2000). In der Klasse II werden die konventionellen Myosine zusammengefaßt, die seit über 60 Jahren bekannt sind und in Muskeln und im

Cytoplasma der Zellen von Vertretern des Tierreichs vorkommen. Die Myosine der Klasse I wurden als nächste entdeckt und alle folgenden Klassen dann in der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert. Sie wurden den Myosinen aus Klasse II lange unter der Bezeichnung unkonventionelle Myosine gegenübergestellt.

2.2.2 Domänenstruktur von Myosinen

Myosine bestehen aus drei Domänen, die unterschiedliche Funktionen ausüben (Sellers, 2000). Über die Motor- oder Kopfdomäne findet die Wechselwirkung mit Aktin und ATP statt. Sie ist der Bereich, der zwischen Myosinen verschiedener Klassen am stärksten konserviert ist. Abweichungen treten hauptsächlich in Oberflächenstrukturen und am Aminoterminus auf.

Auf die Motordomäne folgt die Nackenregion, in der die Bindungsstellen für die leichten Ketten liegen, bei denen es sich um Proteine der Calmodulin-Familie handelt. Sie binden an eine Sequenz mit helikaler Struktur in der Nackendomäne, die als IQ-Motiv bezeichnet wird, da sie aus einer Konsensussequenz mit den Aminosäuren IQXXXRGXXXR besteht. Die Anzahl der IQ-Motive kann von null bis sechs variieren.

Die carboxyterminale Schwanzdomäne zeigt sowohl in ihrer Länge als auch in ihrer Sequenz die stärkste Vielfalt zwischen den verschiedenen Myosinklassen. Obwohl die Einteilung der Klassen über Unterschiede in der Sequenz der Motordomänen erfolgt, sind auch die Schwanzdomänen charakteristisch für eine bestimmte Myosinklasse. Ein Teil der Myosine besitzt eine carboxyterminale Region, die eine superspiralisierte Struktur ausbilden kann, was darauf hindeutet, daß diese Myosine wie die der Klasse II als Dimere vorliegen, während andere wie die Myosine der Klasse I Monomere sind. Die Schwanzdomänen von einigen Myosinen enthalten Strukturmotive, die auch in anderen Proteinen vorkommen, wie SH3- (SRC-Homologie 3-) Domänen, die bei Protein-Protein-Wechselwirkungen eine Rolle spielen, und RhoGAP-Domänen, die GTPasen aus der Rho-Familie aktivieren können. Dennoch ist über die Funktionen der Schwanzdomänen bisher wenig bekannt. Es wird angenommen, daß diese Region den Bindungspartner bei einem Transport durch ein Myosinmolekül festlegt oder der Verankerung der Motordomäne dient und so eine gezielte Wechselwirkung mit Aktin ermöglicht.

2.3 Myosin II

Die Myosine der Klasse II bestehen aus zwei schweren Ketten mit einem Molekulargewicht von jeweils 171 bis 244 kDa und zwei Paaren leichter Ketten. Die schweren Ketten enthalten die Motordomäne, zwei IQ-Motive in der Nackenregion und eine carboxyterminale Domäne, die eine superspiralisierte Struktur annehmen und homodimerisieren kann. Aufgrund dieser Dimerisierung der schweren Ketten besitzen Myosin II-Moleküle eine zweiköpfige Struktur. Sie können sich über die Schwanzdomänen weiter zusammenlagern und Filamente ausbilden. Durch proteolytische Spaltung werden Myosin II-Moleküle in einzelne funktionelle Domänen getrennt. Eine Schnittstelle am Übergang zwischen der Kopf- und der Schwanzdomäne erzeugt ein lösliches Fragment, das als Unterfragment 1 (S1) bezeichnet wird und ein langes, stabförmiges Dimer. S1 bindet Aktin und Nukleotide und enthält zwei leichte Ketten.

2.3.1 Mechanismus der Muskelkontraktion

Die Kontraktion von willkürlicher Muskulatur entsteht durch das ineinander Gleiten von zwei Arten überlappender Filamente, ohne daß sich deren Länge verändert (Huxley und Hanson, 1954; Huxley und Niedergerke, 1954). Die dicken Filamente bestehen aus dem Protein Myosin und die dünnen aus dem Protein Aktin. Sie sind in Sarkomeren organisiert, die jeweils einige Mikrometer lang sind und der Muskulatur ihr quergestreiftes Aussehen unter dem Mikroskop verleihen. Das Gleiten der dicken und dünnen Filamente wird durch sogenannte Querbrücken erzeugt, bei denen es sich um die Teile der Myosinmoleküle handelt, die aus dem Myosinfilament herausragen. Die Querbrücken, die bei den morphologischen Studien erkannt wurden, bestehen aus dem S1-Fragment der Myosin II-Moleküle. Sie treten mit den Aktinfilamenten in Wechselwirkung und transportieren diese durch eine Art rudernder Bewegung (Huxley, 1957; Huxley, 1958). Während dieses Vorgangs wird ATP zu ADP hydrolysiert, und die Hydrolyse von ATP liefert die benötigte Energie.

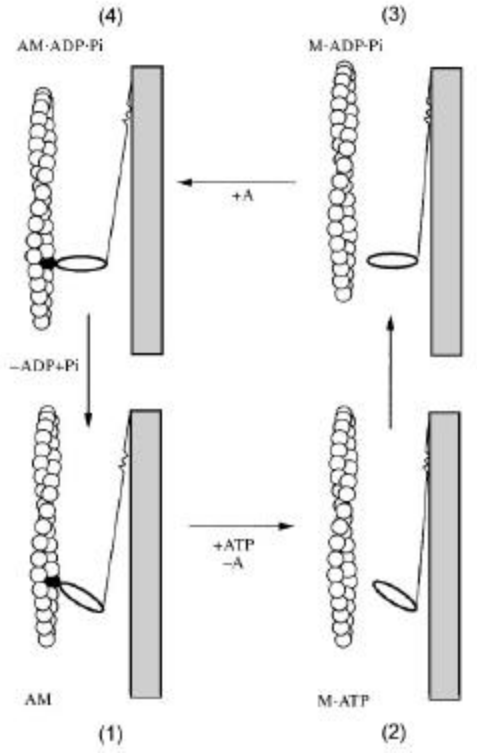


Abbildung 2.2: **Lymn-Taylor-Modell des Querbrückenzyklus (Lymn und Tylor, 1971).** (1) Die Myosinquerbrücke ist in der Rigorposition in einem Winkel von 45º an Aktin gebunden. (2) ATP bindet an Myosin, was zu einer schnellen Dissoziation des Aktomyosinkomplexes führt. (3) Nach der Hydrolyse von ATP zu ADP und P_i kehrt die Myosinquerbrücke in eine Stellung zurück, bei der sie um 90º abgewinkelt ist und bindet erneut an Aktin (4). Dadurch werden die Produkte der Hydrolyse freigesetzt und der Zustand 1 wird wieder erreicht. Während des letzten Schritts wird das Aktinfilament durch eine Konformationsänderung des Myosinmoleküls bewegt, die als Kraftschlag bezeichnet wird (nach Holmes und Geeves, 2000).

Mit dem Modell der schwingenden Querbrücken, das in der Abbildung 2.2 gezeigt ist, wurde ein molekularer Mechanismus der Muskelkontraktion beschrieben (Huxley, 1969; Lymn and Taylor, 1971). In der Abwesenheit von ATP ist die Myosinquerbrücke fest an ein Aktinfilament gebunden. Dieses Stadium wird als Rigorkomplex bezeichnet, da es sich um den Zustand handelt, in dem sich ein Muskel ohne Versorgung mit ATP befindet. Wenn Mg·ATP in der ATP-Bindungstasche von Myosin bindet, dissoziiert der Aktomyosinkomplex schnell. Eine Querbrücke kann also sowohl mit Aktin als auch mit ATP in Wechselwirkung treten, mit beiden zusammen jedoch nur vorübergehend. Myosin hydrolysiert dann das ATP-

Molekül und bildet einen stabilen Komplex mit den Produkten ADP und P_i. Durch Rückbindung von Aktin werden die Produkte der ATP-Hydrolyse freigesetzt, wobei es zu einer Konformationsänderung im Myosinmolekül kommt. Diese führt zu einer Bewegung des Aktinfilaments und wird deshalb als Kraftschlag bezeichnet. Die Umwandlung der chemischen Energie, die bei der Hydrolyse von ATP entsteht, in eine gerichtete mechanische Kraft findet somit bei der Produktfreisetzung statt und nicht beim eigentlichen Hydrolyseschritt selbst. Ohne die Anwesenheit von Aktin wird die ATPase-Aktivität durch die Produkte der Hydrolyse inhibiert.

Aufgrund der Ergebnisse von spektroskopischen und strukturellen Untersuchungen (Cooke, 1986) wurde das Modell der schwingenden Querbrücke zur Theorie des schwingenden Hebelarms weiterentwickelt, wonach der überwiegende Teil der Myosinquerbrücke mit gleichbleibender Geometrie an Aktin bindet, und sich nur der carboxyterminale Teil des Myosinmoleküls bewegt.

Um die Bewegung der Myosinquerbrücke zu untersuchen, wurde ein Modellsystem herangezogen, das als dekoriertes Aktinfilament bezeichnet wird und aus einem Aktinfilament besteht an dessen Aktinmoleküle Myosinquerbrücken gebunden sind. Bei Versuchen mit Myosin II aus glatter Muskulatur und mit Myosin I führte die Zugabe von ADP zu den dekorierten Aktinfilamenten zu einer Veränderung im Winkel des Hebelarms, die auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit hoher Auflösung beobachtet werden konnte (Jontes *et al.*, 1995; Whittaker *et al.*, 1995). Obwohl der größte Anteil der Bewegung des Hebelarms bei der Freisetzung von Phosphat zu erwarten wäre, weil dieser Schritt mit einer großen Veränderung der Freien Energie verbunden ist, könnte ein Teil der Bewegung bei der Bindung und Abgabe von ADP entstehen. Die Länge des Hebelarms kann verändert werden, indem die Zahl der Bindungsstellen für leichte Ketten erhöht oder erniedrigt wird (Uyeda *et al.*, 1996). Eine andere Möglichkeit besteht in der Verwendung eines künstlichen Hebelarms, der aus helikalen Strukturelementen des Proteins α-Aktinin besteht und an die Myosinmotordomäne angefügt werden kann (Anson *et al.*, 1996). Diese rekombinanten Myosine wurden in Messungen der *in vitro* Bewegung von Aktinfilamenten verwendet, bei denen isolierte Myosinquerbrücken an eine geeignete Oberfläche gebunden wurden und nach Zugabe von ATP Aktinfilamente bewegen konnten. Die Geschwindigkeit des Aktintransports in dieser Versuchsanordnung war proportional zur Länge des Hebelarms der Myosinkonstrukte.

2.3.2 Atomare Struktur von Myosin II

Die Struktur des S1-Fragments von Myosin II wurde mit Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt (Rayment *et al.*, 1993). Die Kopfdomäne des Moleküls enthält ein β-Faltblatt aus sieben Strängen, die über zahlreiche α-Helices verbunden sind. Durch die Helices wird eine tiefe Spalte gebildet, wobei die Aktinbindungsstellen und die Nukleotidbindungsstellen auf gegenüberliegenden Seiten des Faltblatts liegen. Die beiden Teile des Moleküls, die durch die Spalte getrennt sind, werden als obere 50 kDa-Domäne und untere 50 kDa-Domäne bezeichnet. Der carboxyterminale Bereich des S1-Fragments, der die Verbindung zu den Aktinfilamenten herstellt, wird auch als Nackenregion bezeichnet. Er besteht aus einer langen

α-Helix, die zwei leichte Ketten bindet. Die ATP-Bindungsstelle enthält das charakteristische Motiv der P-Schleife, das auch in G-Proteinen vorkommt.

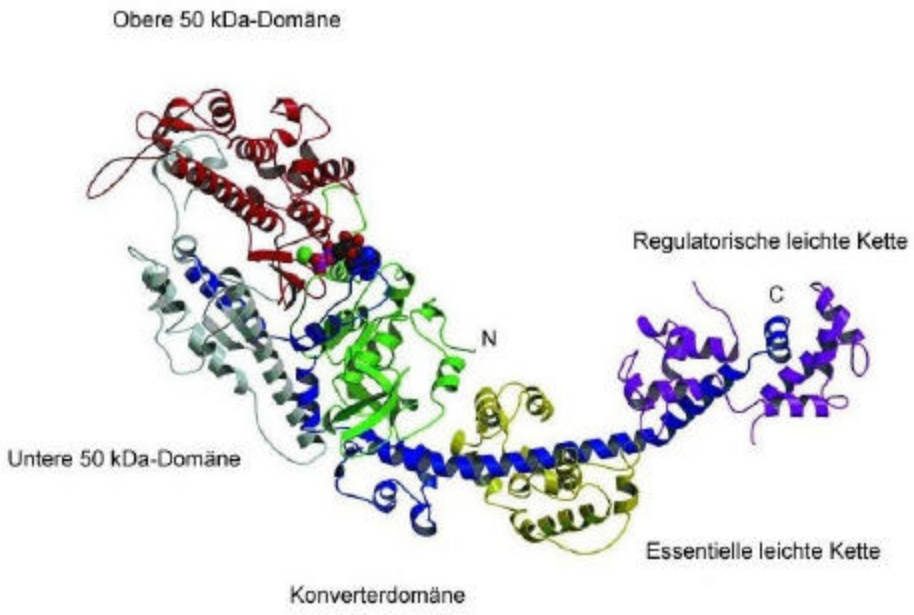


Abbildung 2.3: **Struktur des S1-Fragments von Myosin II aus der Skelettmuskulatur des Haushuhns (*Gallus gallus*).** S1 besteht aus einer länglichen Kopfdomäne, die von einem siebensträngigen β-Faltblatt gebildet wird, und einer carboxyterminalen, α-helikalen Nackendomäne. Die Nackenregion trägt die zwei leichten Ketten, die regulatorische leichte Kette (violett) und die essentielle leichte Kette (gelb). Die Fragmente, die durch proteolytische Spaltung entstehen, sind in den folgenden Farben dargestellt: das 25 kDa-Fragment in grün, das 50 kDa-Fragment in rot und das 20 kDa-Fragment in blau. Das 50 kDa-Fragment ist in zwei Domänen gegliedert, die obere 50 kDa- und die untere 50 kDa- oder aktinbindende Domäne. Die aktinbindende Domäne ist grau markiert. Alle drei Fragmente sind Teil des siebensträngigen β-Faltblattes. Zahlreiche α-Helices, die das β-Faltblatt umgeben, formen eine tiefe Spalte, die bis zur Aktinbindungsstelle reicht (Abbildung nach Geeves und Holmes, 1999).

Durch die Überlagerung der atomaren Strukturen von F-Aktin und S1 mit dreidimensionalen Rekonstruktionen der beiden Proteine, die durch Elektronenmikroskopie erhalten wurden, bekam man ein atomares Modell des Aktomyosinkomplexes (Kabsch *et al.*, 1990; Holmes *et al.*, 1990; Lorenz *et al.*, 1993; Rayment *et al.*, 1993). Dieses Modell zeigt die räumliche Orientierung des S1-Myosinfragments im aktiven Komplex. Die Querbrücke tritt in Wechselwirkung mit zwei Aktinmonomeren, die nebeneinander liegen. Die Aktinbindungsstellen und die Nukleotidbindungsstelle befinden sich auf gegenüberliegenden Seiten des β-Faltblatts und sind um 40 bis 50 Å voneinander getrennt. Diese Spalte im Myosinmolekül reicht von der ATP-Bindungstelle bis zur Aktinbindungsstelle, und mit großer Wahrscheinlichkeit vermittelt das Öffnen und Schließen der Spalte die Informationsübertragung zwischen beiden Regionen. Die lange α-Helix am Carboxyterminus von S1 befindet sich an einer sehr günstigen Stelle, um als Hebelarm zu dienen. Der Hebelarm ist mit dem Hauptteil des Moleküls über eine sogenannte Konverterdomäne

verbunden (Houdusse und Cohen, 1996), die distal zu einer unterbrochenen α-Helix mit zwei reaktiven Thiolgruppen (SH1 und SH2) liegt (Holmes, 1997).

2.3.3 Konformationen von Myosin II

Nach dem Lymn-Taylor-Schema liegt die Myosinquerbrücke in zwei Konformationen vor. Sie nimmt die erste Konformation ein, wenn sie mit Aktin in Wechselwirkung tritt, wobei die Produkte der ATP-Hydrolyse noch gebunden sind, und der Hebelarm sich in der Anfangsposition des Kraftschlags befindet. In der zweiten Konformation ist der Hebelarm nach der Freisetzung von Phosphat und ADP am Ende des Kraftschlags. Der Endzustand wird auch als starker Bindungszustand bezeichnet, da dann eine stabile Bindung von Myosin an Aktin vorliegt. Im Anfangszustand ist die Affinität zu Aktin gering, und man spricht deshalb von einem schwachen Bindungszustand (Geeves und Conibear, 1995). Kristallstruktur-analysen zeigten, daß beide Konformationen des Myosins auch unabhängig von Aktin vorkommen.

Die Kristallstruktur eines Fragments von Myosins II aus *D. discoideum*, das bis zur Aminosäure 761 reichte, wurde mit einer Reihe von ATP-Analoga gelöst, darunter ADP.BeF_x (Fisher *et al.*, 1995) und ADP.Vanadat (Smith und Rayment, 1996). Die Komplexe mit ADP.Vanadat sind Analoga für den Übergangszustand. Während der Zustand mit ADP.BeF_x den Myosinstrukturen ohne Nukleotid ähnelt, zeigt der Zustand mit ADP.Vanadat starke Veränderungen in der S1-Struktur. Die Bindungstasche für γ-Phosphat schließt sich und teilweise auch die Spalte zwischen der oberen und der unteren 50 kDa-Domäne. Diese Veränderungen sind mit großen Bewegungen in der carboxyterminalen Region verbunden. Die obere 50 kDa-Domäne und die Aktinbindungsdomäne drehen sich gegeneinander, wobei die Helix aus den Aminosäuren 648 bis 666 als Angelpunkt dient. Dadurch schließt sich die Nukleotidbindungstasche mit einer Bewegung von etwa 5 Å. Gleichzeitig schwingen das äußere Ende der langen Helix und die damit verbundene schleifenförmige Struktur nach außen und drehen sich. Die beiden verschiedenen Konformationen werden als offener und geschlossener Zustand bezeichnet.

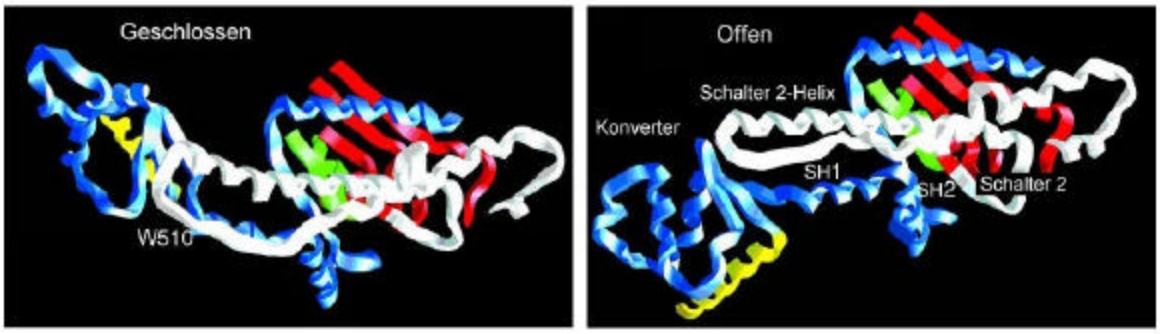


Abbildung 2.4: **Die ATP-Bindungsstelle in den zwei Konformationen, geschlossen und offen.** Die starke Veränderung in der Ausrichtung der Konverterdomäne (links) entsteht durch die nach Innen gerichtete Bewegung des Schalter 2-Elements (rechts), die zu einer Drehung der Schalter 2-Helix und der damit verbundenen Schalter 2-Schleife führt (nach Holmes und Geeves, 2000).

Für das folgende Modell wurde die Position des fehlende Hebelarms in den beiden Strukturen des Myosin II-Fragments von *D. discoideum* durch eine Überlagerung der Konverterdomäne mit der von Strukturen des Myosins aus dem Haushuhn modelliert. Dabei bewegt sich das Ende des Hebelarms um etwa 12 nm entlang der Achse des Aktinfilaments. Die Bewegung des Hebelarms ist eng mit dem Zustand der Nukleotidbindungstasche gekoppelt. Wenn die Bindungstasche geschlossen ist, befindet sich der Hebelarm in der oberen Position, was dem Anfangszustand des Kraftschlags entspricht, und bei offener Bindungstasche ist der Hebelarm gesenkt, was der Stellung am Ende des Kraftschlags entspricht.

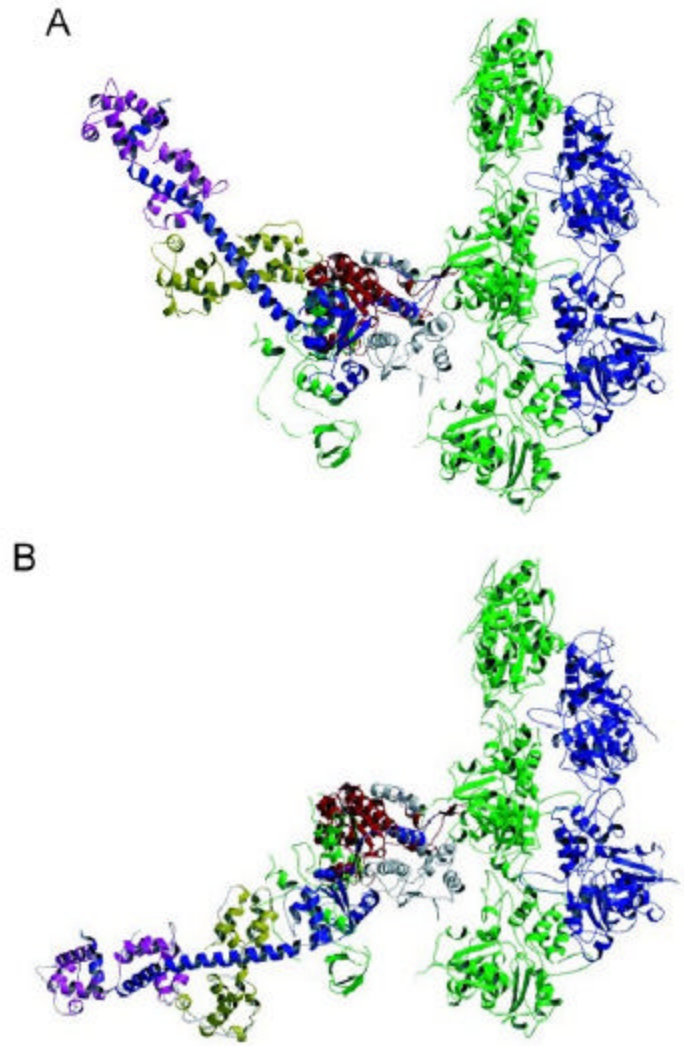


Abbildung 2.5: **(A) Der Anfangszustand des Kraftschlags.** Das Modell entstand aus den kristallographischen Daten der Motordomäne aus *D. discoideum*, die bis zur Aminosäure 761 reichte und mit ADP.Vanadat komplexiert war (Smith und Rayment, 1996). Der fehlende Hebelarm wurde aus den Daten der Struktur von S1 aus *G. gallus* durch die Überlagerung der Konverterdomänen ergänzt. **(B) Der Endzustand des Kraftschlags.** Dazu wurde die Kristallstruktur des Myosin II-Fragments aus *D. discoideum* verwendet, die mit ADP.BeF_x komplexiert war (Fisher *et al.*, 1995). Zwischen beiden Zuständen bewegt sich das Ende des Hebelarms um etwa 12 nm.

2.3.4 Myosin-Kinetik

Bei der Untersuchung der Kinetik enzymatischer Reaktionen unterscheidet man zwischen Steady State- (Fließgleichgewichts-) Kinetik und Transientenkinetik. Im Fließgleichgewicht bleiben die Konzentrationen der Zwischenprodukte einer Reaktion konstant, während sich die Konzentrationen der Ausgangsstoffe und Endprodukte verändern. Dies ist der Fall, wenn die Bildungsgeschwindigkeit und die Geschwindigkeit des Zerfalls der Zwischenprodukte gleich groß sind. Messungen der Steady State-ATPase von Myosin ermitteln sowohl die basale als auch die aktinaktivierte ATPase-Aktivität. Dagegen werden mit den Methoden der Transientenkinetik Reaktionen bis zur Einstellung des Fließgleichgewichts charakterisiert. Sie beschreiben Gleichgewichtseinstellungen, die innerhalb von wenigen Millisekunden abgeschlossen sind. Mit transientenkinetischen Methoden können Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten einzelner Schritte des Aktomyosinzyklus bestimmt werden.

2.3.4.1 Wechselwirkung von Nukleotiden mit Myosin

Alle Myosine, die bisher untersucht wurden, folgen demselben grundlegenden Mechanismus der ATP-Hydrolyse, der im Bagshaw-Trentham-Schema (Schema 2.1) beschrieben wird (Bagshaw und Trentham, 1974; Trentham *et al*., 1976).

$$\mathrm{M + ATP} \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{M{\cdot}ATP} \underset{k_{-2}}{\overset{k_{+2}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{M^{*}{\cdot}ATP} \underset{k_{-3}}{\overset{k_{+3}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{M^{**}{\cdot}ADP{\cdot}P_i}$$

$$\underset{k_{-4}}{\overset{k_{+4}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{M^{*}{\cdot}ADP{\cdot}P_i} \underset{k_{-5}}{\overset{k_{+5}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{M^{*}{\cdot}ADP + P_i} \underset{k_{-6}}{\overset{k_{+6}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{M{\cdot}ADP} \underset{k_{-7}}{\overset{k_{+7}}{\rightleftharpoons}} \mathrm{M + ADP}$$

Schema 2.1: **Wechselwirkung von Nukleotiden mit Myosin.** In diesem Schema steht M für das Myosinkopffragment, und die Sterne beziehen sich auf verschiedene Proteinkonformationen, die mit intrinsischer Proteinfluoreszenz nachgewiesen werden können.

Sie zeigen jedoch sowohl Unterschiede in der ATPase-Geschwindigkeit als auch in der Geschwindigkeit einzelner Schritte des ATPase-Zyklus (Jontes *et al*., 1997; Marston und Taylor, 1980; Ostap und Pollard, 1996; Ritchie *et al.*, 1993). Am besten beschrieben ist das S1-Fragment aus der Skelettmuskulatur des Kaninchens. Bei diesem Myosin bindet im ersten Schritt ATP in einem zweistufigen Prozeß, der durch Diffusion begrenzt wird. Darauf folgt eine schnelle, fast vollständig irreversible Konformationsänderung, die zu einem Anstieg der intrinsischen Proteinfluoreszenz führt (Schritt 2). Die reversible ATP-Hydrolyse ist von einem weiteren Anstieg der Fluoreszenz begleitet (Schritt 3). Die Produkte bleiben fest an das Protein gebunden und eine langsame Isomerisierung des Proteins (Schritt 4) wird benötigt bevor Phosphat schnell freigesetzt wird (Schritt 5). Eine Verminderung der Fluoreszenz

begleitet Schritt 4. Nach der Phosphatfreisetzung dissoziiert ADP in zwei Schritten von Myosin, die einer Umkehrung der ersten beiden Schritte entsprechen und mit einem weiteren Abfall der Fluoreszenz verbunden sind.

Nach diesem Schema entspricht der offene Konformationszustand dem Zustand M^*N, da er bei Kristallstrukturen beobachtet wurde, die ADP oder die Analoga AMP·PMP beziehungsweise ATPγS in der Nukleotidbindungstasche enthielten. Die Fluoreszenzveränderung, von der die Nukleotidbindung begleitet wird, beruht wahrscheinlich auf einer Bewegung von Tryptophan 113 oder Tryptophan 131 in der Nukleotidbindungstasche, da Myosine, denen diese Tryptophanreste fehlen nur eine geringe Änderung der Fluoreszenz bei der Nukleotidbindung zeigen (Ostap und Pollard, 1996; Ritchie *et al.*, 1993). Der geschlossene Zustand könnte dann mit dem Komplex $M^*ADP{\cdot}P_i$ oder dem Übergangszustand der Hydrolysereaktion übereinstimmen. Myosin II aus *D. discoideum* und aus dem Haushuhn zeigen beide eine Fluoreszenzveränderung, die den Hydrolyseschritt begleitet. Der Tryptophanrest 510 (501 bei *D. discoideum*) liegt in der Nähe der Verbindung zwischen der Schalter 2-Helix und der Konverterregion und dreht sich zwischen dem offenen und geschlossenen Zustand. Daher könnte die Fluoreszenzveränderung von der Bewegung dieses Tryptophans herrühren, die eine Bewegung von Schalter 2 und dem Hebelarm anzeigt.

Da Myosin im offenen Zustand nicht als ATPase wirkt, muß die konformationelle Änderung, die durch eine Veränderung in der intrinsischen Fluoreszenz angezeigt wird, der Hydrolyse vorausgehen. Daher wird Schritt 3 in zwei Ereignisse unterteilt, die konformationelle Veränderung (3a) und den Hydrolyseschritt (3b). Dabei ist $M^{**}ATP$ kein stabiler Zustand, sondern zerfällt schnell in einer der beiden Richtungen und zeigt somit viele Charakteristika eines Übergangszustands.

$$M^{*}{\cdot}ATP \overset{3a}{\rightleftharpoons} M^{**}{\cdot}ATP \overset{3b}{\rightleftharpoons} M^{**}{\cdot}ADP{\cdot}P_i$$

Schema 2.2: **Unterteilung von Schritt 3 in eine konformationelle Veränderung (3a) und den Hydrolyseschritt (3b).** $M^{**}ATP$ zeigt viele Charakteristika eines Übergangszustands.

Die kleine Änderung der Freien Energie bei diesem Schritt besteht aus großen ausgleichenden Änderungen der Enthalpie und Entropie, so daß trotz der kleinen Gesamtänderung von ΔG Energie bei diesem Schritt umgewandelt oder gespeichert werden kann (Kodama, 1985; Millar *et al.*, 1987).

2.3.4.2 Wechselwirkung von Nukleotiden mit dem Aktomyosinkomplex

Die ATP-induzierte Dissoziation des Aktomyosinkomplexes wird in Modellen beschrieben, die von Millar und Geeves (1983) und Siemankowski und White (1984) entwickelt wurden und im Schema 2.3 dargestellt sind.

$$A{\cdot}M + ATP \overset{\mathbf{K_1}}{\rightleftharpoons} A{\cdot}M{\cdot}ATP \overset{\mathbf{k_{+2}}}{\longrightarrow} A + M{\cdot}ATP$$

$$A{\cdot}M{\cdot}AD \overset{\mathbf{K_{AD}}}{\rightleftharpoons} A{\cdot}M + ADP$$

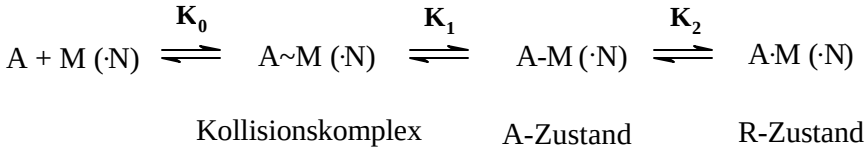
Schema 2.3: **Wechselwirkung von Nukleotiden mit dem Aktomyosinkomplex**. In diesem Schema stehen A für Aktin und M für das Myosinkopffragment.

Der erste Schritt ist die schnelle Einstellung eines Gleichgewichts zwischen A·M und ATP mit der Gleichgewichtskonstanten $\mathbf{K_1}$. Darauf folgt eine Isomerisierung des ternären Komplexes, von der die Geschwindigkeit der Aktindissoziation aus dem Komplex bestimmt wird. Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante für die ATP-induzierte Dissoziation ist durch die Gleichung $k_{obs} = [ATP]\mathbf{K_1}k_{+2}/(1 + \mathbf{K_1}[ATP])$ definiert.

In der Anwesenheit von ADP konkurrieren die beiden Nukleotide um die Bindung an Aktin. Bei einer schnellen Einstellung des Gleichgewichts zwischen A·M und dem ADP-gebundenen Zustand, ist k_{obs} für eine gleichbleibende ATP-Konzentration durch die Gleichung $k_{obs} = k_0/(1 + [ADP]/\mathbf{K_{AD}})$ gegeben, wobei k_0 die beobachtete Geschwindigkeitskonstante in der Abwesenheit von ADP ist und $\mathbf{K_{AD}}$ die Dissoziationskonstante von ADP as dem Aktomyosinkomplex (Siemankowski und White, 1984). Bei einer langsamen Dissoziation von ADP aus dem Komplex mit Aktomyosin wird bei der Zugabe eines Überschusses an ATP zu dem Komplex eine zweiphasige Reaktion beobachtet. Dabei entspricht die schnelle Phase der Bindungsgeschwindigkeit von ATP an den freien Aktomyosinkomplex. Die langsame Phase entsteht bei der Bindung von ATP an den Aktomyosinkomplex nach der Dissoziation von ADP. Dabei nimmt mit steigender ADP-Konzentration die Amplitude der schnellen Phase ab, während die Amplitude der langsamen Phase zunimmt. Wenn die Amplituden der beiden Phasen in Abhängigkeit von der ADP-Konzentration aufgetragen werden, kann $\mathbf{K_{AD}}$ durch Kurvenanpassung einer Hyperbel an die Werte erhalten werden. Für die schnelle Phase wird die Gleichung $y = A_{max}\, K_D/(\mathbf{K_{AD}} + x) - A_{min}$ verwendet und für die langsame Phase die Gleichung $y = A_{max}\, x/(\mathbf{K_{AD}} + x) - A_{min}$, wobei A_{min} für die niedrigste Aplitude steht und A_{max} für die höchste Amplitude. Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der langsamen Phase ist unabhängig von der ADP-Konzentration und gibt die Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation aus dem Aktomyosinkomplex an.

2.3.4.3 Wechselwirkung zwischen Aktin und Myosin

Die Bindung von Myosin an ein Aktinfilament kann kinetisch in mindestens drei Ereignisse unterteilt werden, die in Schema 2.4 dargestellt sind (Geeves und Conibear, 1995).



Schema 2.4: **Wechselwirkung zwischen Aktin und Myosin.**

Auf den Beginn der Komplexbildung, der größtenteils auf der Wechselwirkung von Ladungen beruht, folgen zwei Konformationsänderungen des Komplexes. Die erste ist mit der Ausbildung von stereospezifischen, hydrophoben Wechselwirkungen verbunden. Die zweite besteht aus einer großen Umlagerung des Akto·S1-Komplexes, da sowohl fluoreszierende Gruppen am Aktin als auch in der Nukleotidbindungstasche des Myosins die Veränderung gleichzeitig anzeigen (Taylor, 1991; Woodward *et al.*, 1991).

Diese drei Ereignisse sind am besten für Myosin in der Abwesenheit von Nukleotiden beschrieben. Sie scheinen ähnlich für M·ADP zu sein mit deutlichen Unterschieden in den Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten. M·ADP·P_i könnte in den gleichen drei Schritten an Aktin binden, wobei die Gleichgewichtskonstante für den letzten Schritt bis zur Dissoziation von P_i aus dem Komplex klein wäre. Die letzte konformationelle Veränderung wäre dann eng mit dem Kraftschlag des ATPase-Zyklus gekoppelt (Geeves *et al.*, 1984; Fortune *et al.*, 1991; Geeves, 1992). Ein Hauptmerkmal des Mechanismus ist, daß die Isomerisierung in Schritt 2 zu einer stärkeren Bindung von Myosin an Aktin und gleichzeitig zu einer schwächeren Bindung von Nukleotiden führt.

2.3.4.4 Steady State-ATPase

Wenn Myosin mit einem großen Überschuß an ATP versetzt wird, erfolgt die ATP-Hydrolyse im Zustand des Fließgleichgewichts. Die Reaktion zeigt dann ein Verhalten, das zuerst 1913 von Michaelis und Menten beschrieben wurden. Unter der Annahme, daß die Reaktion aus zwei Schritten besteht, die eine umkehrbare Bildung des Komplexes aus dem Enzym und dem Substrat und eine irreversible Reaktion unter der Freisetzung des Enzyms und des Produkts beinhalten, kann die Hydrolysereaktion mit der folgenden Gleichung ausgedrückt werden:

$$v = v_{max} \cdot [ATP] / (K_M[ATP] + [ATP])$$

Dabei steht K_M für die Michaelis-Menten-Konstante und v_{max} für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit. K_M ist eine Gleichgewichtskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes und v_{max} ist die Geschwindigkeit der Reaktion, die erreicht wird, wenn das Enzym völlig mit dem Substrat gesättigt ist. Ein Spezialfall der Reaktion ergibt sich, wenn $v = v_{max}/2$. Dann entspricht die Substratkonzentration dem Wert für K_M.

Obwohl die Hydrolyse von ATP durch Myosin eine Reaktion aus mehreren Reaktionsschritten ist, folgt sie einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die Konstanten K_M und v_{max} bestehen dann jedoch aus mehreren Geschwindigkeitskonstanten aufeinanderfolgender Einzelschritte. Wenn Myosin nicht an Aktin gebunden vorliegt, ist die Phosphat-Freisetzung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion. Die katalytische Aktivität bei ATP-Sättigung kann durch die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung k_{ATP} beschrieben werden, die dem Quotienten aus der Maximalgeschwindigkeit der Michaelis-Menten-Reaktion und der Konzentration an Myosinmotordomänen entspricht: $k_{ATP} = v_{max} / [M]$. Diese Konstante wird auch als Wechselzahl bezeichnet und gibt die Anzahl an ATP-Molekülen an, die von einer Myosinmotordomäne pro Sekunde hydrolysiert werden.

In der Gegenwart von Aktin wird die ATPase-Aktivität von Myosin aktiviert, indem die Freisetzung der Produkte stark beschleunigt wird. Um in den schnellen aktinaktivierten Querbrückenzyklus einzutreten, muß der Myosin-Nukleotidkomplex einen Kollisionskomplex mit Aktin bilden. Die Bildung und der Zerfall dieses Komplexes bilden ein Gleichgewicht, das dem übrigen ATPase-Zyklus vorgelagert ist. Wenn ein großer Überschuß an ATP vorliegt, folgt die Reaktion einer Michaelis-Menten-Kinetik und kann in dem Schema 2.5 und in der folgenden Gleichung zusammengefaßt werden:

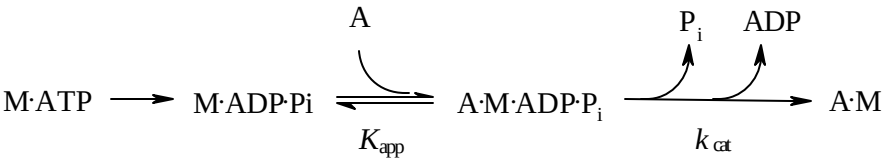
$$k_{ATP} = k_{cat} \cdot [\text{Aktin}] / (K_{app} + [\text{Aktin}])$$

Die ATPase-Aktivität k_{ATP} wird dann durch die kinetischen Parameter k_{cat} und K_{app} bestimmt. Die Konstante k_{cat} ist geschwindigkeitsbestimmend für den ATPase-Zyklus, und K_{app} entspricht der Michaelis-Menten-Konstanten für Aktin, die von der Dissoziationskonstanten des Myosin·ADP·Pi-Komplexes und Aktin abhängt.

Bei Aktinsättigung, wenn die Aktin-Konzentration sehr viel größer ist als K_{app}, entspricht k_{ATP} der Konstanten k_{cat}. Die direkte Messung der Maximalgeschwindigkeit ist jedoch schwierig, da die Sättigung bei vielen Myosinen erst bei sehr hohen Aktinkonzentrationen eintritt. Wenn die Aktinkonzentration viel kleiner als K_{app} ist, kann eine vereinfachte Gleichung verwendet werden:

$$k_{ATP} = (k_{cat} / K_{app}) \cdot [\text{Aktin}]$$

Das Verhältnis k_{cat} / K_{app} gibt die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung für die apparente Aktinbindung an.



Schema 2.5: **Vereinfachtes Reaktionsschema der aktinaktivierten ATPase-Aktivität von Myosin.** K_{app} entspricht der Michaelis-Menten-Konstanten für die Bindung von Aktin, k_{cat} der maximalen Geschwindigkeit.

2.4 Myosin I

Von Pollard und Korn wurde 1973 ein Myosin aus *Acanthamoeba castellanii* beschrieben, das im Gegensatz zu allen anderen bis dahin bekannten Myosinen als Monomer vorlag und sich nicht zu Filamenten zusammenlagerte. Es wurde deshalb als Myosin I bezeichnet (Pollard und Korn, 1973). Heute steht fest, daß es viele Isoformen von Myosin I gibt, und diese ubiquitär in Organismen vom Einzeller bis zum Menschen auftreten (Collucio, 1997).

Die Myosin I-Klasse wird in vier Unterklassen unterteilt, die sich am stärksten in der Länge und Sequenz ihrer Schwanzdomänen unterscheiden (Barylko *et al.*, 2000). Alle Myosine dieser Klasse besitzen in der carboxyterminalen Region eine TH1-Domäne, die positiv geladene Aminosäuren enthält und an anionische Phospholipide bindet. Die Schwanzdomäne der klassischen oder amöboiden Myosine I enthält daneben eine SH3-Domäne und eine TH2-Domäne, die reich an den Aminosäuren Glycin, Prolin und Alanin ist und ATP-unabhängig an Aktin binden kann.

2.4.1 Struktur der Myosin I-Motordomäne

Die Kristallstruktur der Motordomäne eines Myosins der Klasse I wurde von Kollmar *et al.* an MyoE aus *D. discoideum* gelöst (Kollmar *et al.*, 2002). Der Vergleich mit der Struktur der Motordomäne von Myosin II zeigt, daß sich die Kernstruktur und die Topologie dieser Proteine im wesentlichen gleichen, was der großen Sequenzhomologie von 49 % zwischen MyoE und Myosin II entspricht. Die Unterschiede treten in Bereichen von schleifenförmigen Oberflächenstrukturen und bei Resten auf, die den Kontakt zwischen den Bereichen herstellen, die für die Motorfunktion essentiell sind. Myosinen der Klasse I fehlt die SH3-ähnliche Domäne am Aminoterminus, die in Myosinen II enthalten ist. Die aminoterminale Region wird bei MyoE durch die Interaktion von polaren und geladenen Aminosäuren stabilisiert.

Die Aktinbindungsstelle von Myosin besteht aus mehreren Strukturen und Oberflächenschleifen (Milligan, 1996). Das Helix-Schleife-Helix-Motiv von MyoE, das zur primären Aktinbindungsstelle gehört, ähnelt dem von konventionellen Myosinen. Schleife 2, die neben der Wechselwirkung mit Aktin einen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Produktfreisetzung hat (Furch *et al.*, 1998; van Dijk *et al.*, 1999), besitzt in MyoE eine vollständig andere Konformation. Auch Schleife 3, die in der sekundären Aktinbindungsregion liegt und positiv geladene Reste enthält, ist ausgedehnter und hat eine andere Konformation. Die Schleife 4 ist ebenfalls länger und enthält viele geladene Aminosäuren. Die Nukleotidbindungsstelle ist zwischen allen Myosinen hoch konserviert. Auch zwischen MyoE und Myosin II sind Unterschiede auf nichtkonservierte Reste beschränkt.

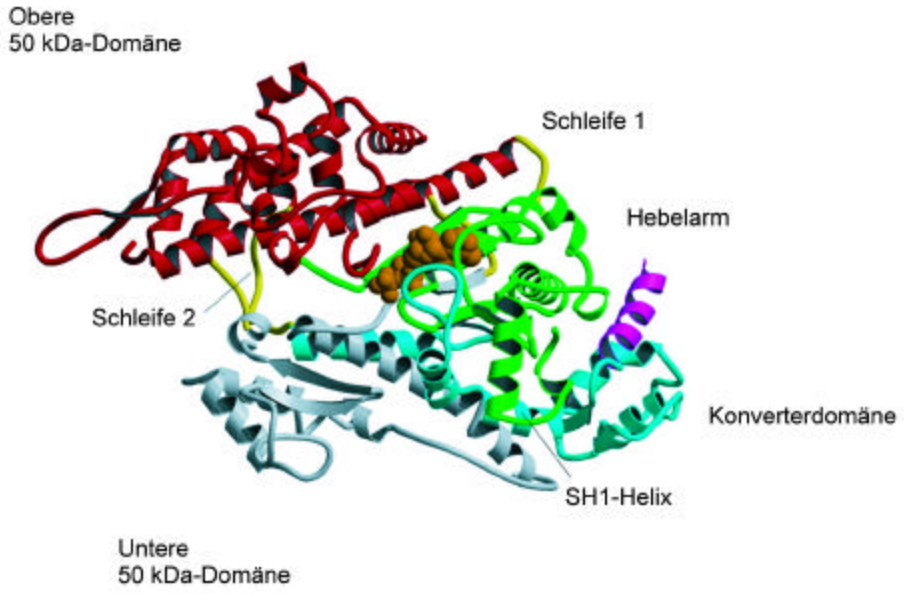


Abbildung 2.6: **Struktur der Motordomäne von MyoE, einem Myosin der Klasse I aus *D. discoideum*.** Dem aminoterminalen Bereich (grün) fehlt die SH3-ähnliche Domäne, die in konventionellen Myosinen vorkommt. Er enthält einen Teil der Nukleotidbindungsstelle und führt in die obere 50 kDa-Domäne (rot). Die untere 50 kDa-Domäne (grau) enthält Teile der Aktinbindungsregion, den Schalter 2 und die Übertragungsregion. Die carboxyterminale Domäne (blau) besteht aus der Konverterdomäne, dem Anfang des Hebelarms (violett) und einer langen α-Helix, die den Konverter mit der Schleife 2 in der Aktinbindungsstelle verbindet. MgADP·VO_4 ist in orange dargestellt (nach Kollmar *et al.*, 2002).

Die Funktion der Übertragungsregion von Myosin ist die Weiterleitung konformationeller Information zwischen der Aktinbindungsstelle, der Nukleotidbindungstelle und der Konverterdomäne. Größere Sequenzunterschiede zwischen Myosinen der Klassen I und II in der Übertragungsregion treten an der Stelle der Region auf, die sich abwinkelt, wenn sich der Schalter 2 in der geschlossenen Position befindet. Der Winkel ist in MyoE stärker ausgebildet, da zwischen dem Asparagin 616 und dem Threonin 418 an dieser Stelle der Übertragungsregion eine Wasserstoffbrückenbindung besteht, wodurch das α-C-Atom von Threonin 418 um 1,5 Å weiter in den Kern der Myosinstruktur bewegt wird. Da das carboxyterminale Ende der Übertragungsregion eng mit der Konverdomäne verbunden ist, führt das Abknicken zu einer Folgebewegung der Konverterdomäne. Verantwortlich für diese Kopplung sind hochkonservierte, hydrophobe Reste, die sich in der Übertragungsschleife und in der Konverterdomäne befinden. Hydrophobe Bindungen zwischen der ersten Wendung der Helix des Hebelarms und dem Aminoterminus stabilisieren zusätzlich die Konformation, in der sich der Hebelarm in der oberen Stellung befindet. In MyoE finden diese Wechselwirkungen zwischen Phenylalanin 686, Tyrosin 69 und Tyrosin 71 statt. Obwohl diese Reste bei Myosinen der Klasse I vollständig konserviert sind, fehlen ähnliche hydrophobe Wechselwirkungen bei Myosinen der Klasse II. Die stärkere Krümmung der Übertragungshelix und die zusätzlichen hydrophoben Kontakte zwischen dem Hebelarm und

der aminoterminalen Domäne führen dazu, daß es bei MyoE zu einer größeren Drehung des Hebelarms kommt als bei Myosinen der Klasse II. In einem Modell, das die Bindung von MyoE an ein Aktinfilament simuliert, reicht der Konverter von MyoE etwa 30° weiter nach oben als der Konverter von Myosin II in der geschlossenen Konformation. Deshalb könnte MyoE einen Kraftschlag ausführen, der 20 bis 30° größer als die Drehung um 60 bis 70° wäre, die vom Hebelarm des Myosin II-Moleküls durchlaufen wird. Einzelmolekülmessungen zur Bestimmung der Schrittgröße von Myosinen I unterstützen diese Hypothese eines größeren Kraftschlags und zeigen, daß deren Hebelarm eine Drehung von mindestens 100° während der Krafterzeugung ausführt (Köhler, Meyerhöfer und Bähler, Manuskript in Vorbereitung).

2.4.2 Funktionen von Myosin I

Ein großer Teil des Verständnisses der Funktionen von Myosinen der Klasse I beruht auf Untersuchungen an den einzelligen Organismen *A. castellanii* und *D. discoideum*. Versuche, bei denen Gene ausgeschaltet wurden, zeigten eine deutliche Verbindung zwischen der Aktivität dieser Myosine und dem Aktincytoskelett. Vertreter der Myosinklasse I scheinen auch eine Rolle beim Membransport sowie bei Endocytose und Exocytose zu spielen (Novak *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 1996; Novak und Titus, 1997).

Hinweise auf die Funktionen von Myosinen der Klasse I bei Wirbeltieren werden durch ihre zelluläre Lokalisierung gegeben. Zum Beispiel wird Myosin Iβ an den Verbindungen der Spitzen von Stereocilien der Haarzellen des Innenohrs gefunden, was diesen Motor mit der Bewegung von Ionenkanälen der Plasmamembran in Verbindung bringt (Gillespie und Corey, 1997). Es könnte dort eine Funktion bei der Adaption ausüben (Holt *et al.*, 2002). Myosin IC tritt in Phagosomen auf, wo es eine Rolle beim aktinabhängigen Abschnüren der Plasmamembran während der Phagocytose spielen könnte (Swanson *et al.*, 1999). Myosin Iα wurde in Endosomen lokalisiert und könnte dort an der Endocytose beteiligt sein (Raposo, 1999).

2.4.3 Regulation von Myosin I

Die Regulation von Myosinen der Klasse I schließt Interaktionen oder Modifikationen aller drei Myosindomänen ein. Die Myosine der Klasse I aus dem Einzeller *A. castellanii* benötigen eine Phosphorylierung der Motordomäne für die aktinaktivierte ATPase-Aktivität und für eine Bewegung entlang Aktinfilamenten (Hammer *et al.*, 1983; Albanesi *et al.*, 1983, Brzeska *et al.*, 1989, Brzeska *et al.*, 1999). In *D. discoideum* wurde bisher eine Aktivierung der ATPase-Aktivität durch eine Phosphorylierung nur für MyoD nachgewiesen (Lee und Cote, 1995; Lee *et al.*, 1996). Die Phosphorylierung erfolgt an einem Serin oder Threonin, das sich 16 Reste vor einer hochkonservierten Sequenz mit dem Konsensusmotiv DALAK befindet. Diese Position liegt in einer Oberflächenstruktur, die an der Aktinbindung beteiligt ist. Myosine der Klasse I aus mehrzelligen Organismen besitzen an der entsprechenden Stelle, ebenso wie Myosine der Klasse II, eine negativ geladene Aminosäure und sind deshalb ohne eine Phosphorylierung der Motordomäne enzymatisch und mechanisch aktiv. Da bei fast allen Myosinen an dieser Position entweder ein Threonin, ein Serin, eine Glutaminsäure oder eine Asparaginsäure vorliegt, wird die Phosphorylierungsstelle als TEDS-Stelle bezeichnet,

(Bement und Mooseker, 1995). Es wird angenommen, daß Myosine für ihre Aktivität eine negative Ladung an dieser Position benötigen, die entweder durch die negativ geladenen Seitenketten oder durch Phosphorylierung des Serin beziehungsweise Threonins vorliegen kann. Die Myosin I-Kinasen (MIHCKs) aus *A. castellanii* und *D. discoideum* gehören zur Proteinfamilie der p21-aktivierten Kinasen (PAK/Ste20-Kinasen), die mit den zellulären Vorgängen der Signalübertragung und der Neuordnung des Cytoskeletts in Verbindung gebracht werden (Lee *et al.*, 1996, Brzeska *et al.*, 1999).

Die ATPase-Aktivität und die Motorfunktion der meisten Isoformen von Myosin I werden durch eine Wechselwirkung zwischen der schweren Kette und den leichten Ketten reguliert. Die Nackendomäne von Myosin I kann bis zu sechs IQ-Motive enthalten, an die leichte Ketten binden. In den meisten Fällen bindet Apocalmodulin stabiler an die IQ-Motive der Myosine I als der Komplex aus Calcium und Calmodulin. Die Effekte von Calciumionen auf die ATPase-Aktivität von Myosinen der Klasse I sind jedoch nicht einheitlich. Calciumionen können die ATPase-Aktivität in der Gegenwart von Aktin steigern (Barylko *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1994), hemmen (Stöffler und Bähler, 1998; Coluccio und Geeves, 1999) oder unverändert lassen (Collins, 1990; Wolenski, 1993). Die Bewegung von Aktinfilamenten *in vitro* wird von Calciumionen inhibiert (Williams *et al.*, 1994; Collins, 1990; Wolenski, 1993). Die Freisetzung oder Umlagerung der leichten Ketten, die durch Calciumionen ausgelöst wird, könnte die Struktur der Nackendomäne von Myosin I so verändern, daß die Hebelarmbewegung gehemmt wird. Ein Modell der Wechselwirkung zwischen Calmodulin und dem IQ-Motiv läßt darauf schließen, daß die Nackendomäne in der Gegenwart von Calciumionen kompakter wird (Houdusse *et al.*, 1996).

Die Regulation der zellulären Funktionen von Myosin I könnte außerdem durch die gezielte Lokalisierung der Proteine in der Zelle und die Wechselwirkung mit bestimmten Bindungspartnern erfolgen. Die Mechanismen der Lokalisierung von Myosinen I sind nicht vollständig bekannt. Sie treten in fast allen Organellen und am häufigsten in spezialisierten Strukturen an der Zellperipherie auf. Eine Regulation der Myosine aus Klasse I findet vielleicht auch durch eine Phosphorylierung der Schwanzdomäne statt, da diese *in vitro* durch Proteinkinase C phosphoryliert werden können (Swanljung-Collins und Collins, 1992; Williams und Collucio, 1995). Diese Modifikation könnte die Wechselwirkung mit Calmodulin oder Phospholipidvesikeln beeinflussen.

2.5 Übersicht über andere Myosinklassen

Myosine spielen eine wichtige Rolle bei vielen zellulären Prozessen. In der Abbildung 2.7 sind die Funktionen, die von den Myosinen verschiedener Klassen ausgeübt werden könnten, an einer imaginären Zelle dargestellt. Dazu zählen neben dem Transport von Membranen und Organellen auch der Aufbau, die dynamische Verteilung und die Erhaltung aktinreicher Strukturen bei Vorgängen wie Endocytose und Zellbewegung. Auch an der Signaltransduktion könnten Myosine beteiligt sein. Die Bedeutung dieser Moleküle wird dadurch veranschaulicht, daß Mutationen in Myosingenen die Ursache von cardiovaskulären und neuronalen Krankheiten sein können (Mermall *et al.*,1998).

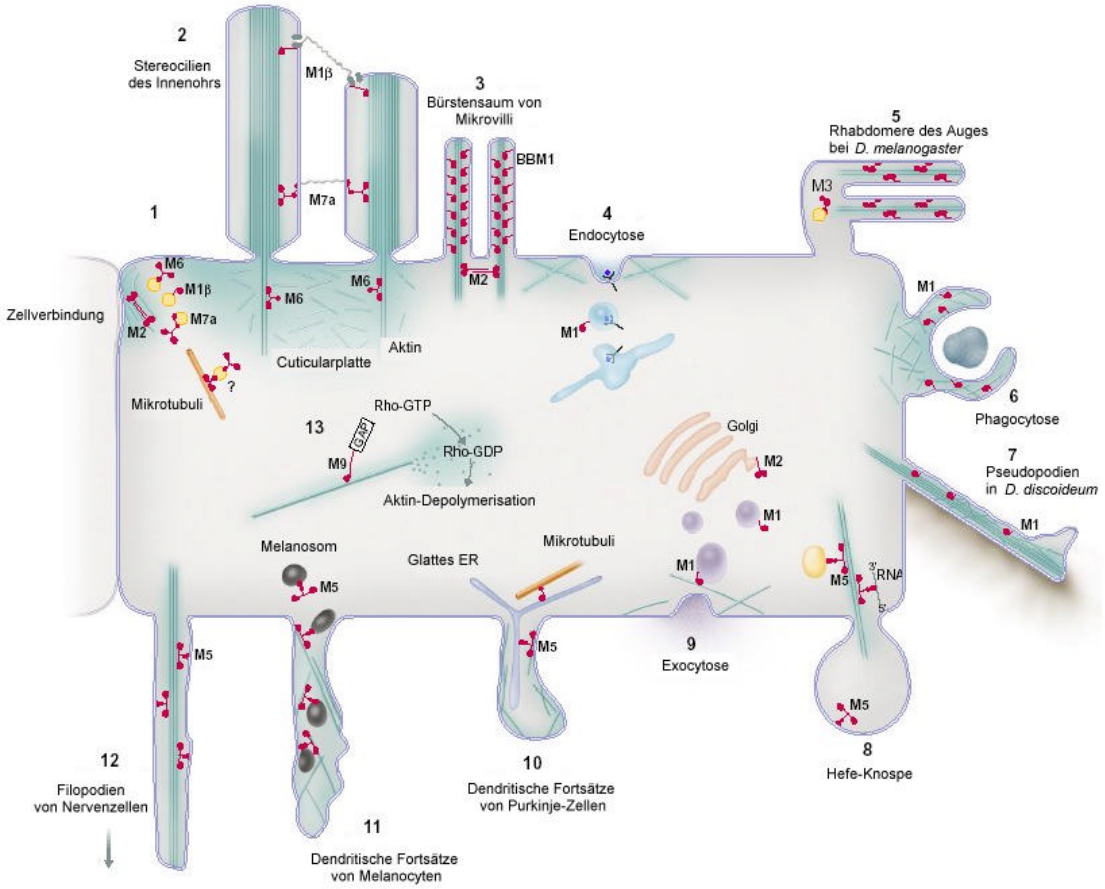


Abbildung 2.7: **Darstellung möglicher Funktionen von Myosinen an einer imaginären Zelle.** Myosine der Klassen I, VI und VII kommen in der Cuticularplatte vor, einer aktinreichen Struktur an der Basis von Stereocilien, und an den Aktinfilamenten, die Zellverbindungen umgeben (1). MIβ spielt eine Rolle bei der Adaption in den Stereocilien der Haarzellen des Innenohrs. Mitglieder der Myosinklassen VI und VII verankern oder stabilisieren Stereocilien (2). BBM I verbindet in intestinalen Mikrovilli das stabilisierende Aktinbündel mit der Plasmamembran. Myosin II könnte diese Aktinbündel der Mikrovilli quervernetzen (3). Myosine der Klasse I sind wahrscheinlich an der Endocytose in Hefe, in *D. discoideum* und in Zellen von Wirbeltieren beteiligt (4). NinaC, ein Myosin der Klasse III aus *Drosophila melanogaster* , wird für die Struktur der Rhabdomere und die Phototransduktion im Auge benötigt (5). Myosine I spielen eine Rolle bei der Phagocytose in *D. discoideum* und Makrophagen (6) und bei der Ausstülpung von Pseudopodien in *D. discoideum* (7). Myosine der Klasse V transportieren in Hefezellen Organellen und RNA (8). Myosin II könnte die Knospung von Vesikeln vom trans Golgi-Netzwerk fördern (9), und Myosin I ist in Hefe bei der Sekretion und in *D. discoideum* an der Exocytose beteiligt (9). Myosine V transportieren möglicherweise auch glattes ER durch die dendritischen Fortsätze von Purkinje Zellen (10) und Melanosomen durch die Fortsätze von Melanocyten (11). Myosine V könnten eine Rolle bei der die Erweiterung von Filopodien in Nervenzellen spielen (12). Myosine der Klasse IX inaktivieren möglicherweise über ihre RhoGAP-Domäne die GTPase Rho und könnten so an der Organisation des Aktinnetzwerks beteiligt sein (nach Mermall *et al*., 1998).

Bei der Bewegung von Zellorganellen spielen Myosine der Klasse V eine Rolle. Sie liegen als Dimere vor und besitzen mehrere Bindungsstellen für Calmodulin in der Nackenregion. Ein Myosin V aus dem Hühnergehirn (M5a) hat im Gegensatz zu anderen Myosinen, die biochemisch charakterisiert wurden, eine hohe Affinität für Aktin in der Gegenwart von ATP. Es könnte daher über eine lange Zeitspanne an Aktin gebunden bleiben und als prozessiver Motor beim Transport entlang Aktinfilamenten dienen (Cheney *et al.*, 1993; Nascimento *et al.*, 1996). Die Untersuchung der zellulären Verteilung von M5a zeigte, daß das Protein zeitweise an Organellen gebunden vorliegt, die sowohl mit Mikrotubuli als auch mit Aktinfilamenten kolokalisieren. Gebunden an diese Organellen könnte das Myosin V von Kinesin oder Dynein an Mikrotubuli entlang bewegt werden (Evans *et al.*, 1997). Auch Untersuchungen von Mäusen, die Mutationen in M5a besitzen, deuten auf Transportfunktionen dieses Myosins hin, zu denen die Bewegung von glattem endoplasmatischen Reticulum in Neuronen und von Pigmentgranula in Melanocyten zählen (Mercer, 1991). In Hefe wurde durch Mutationsstudien gezeigt, daß Myosine der Klasse V bei der Zellteilung für die Bewegung von Vesikeln und mRNA in die Tochterzelle benötigt werden (Harrer *et al.*,1994; Govindan *et al.*, 1995; Long *et al.*, 1997; Takizawa, 1997).

Gene von Myosinen der Klassen VI und VII sind bei bestimmten Formen von Taubheit betroffen. Bei Snells Waltzer-Mäusen degenerieren die neurosensorischen Epitheien der Cochlea und des Vestibulums kurzzeitig nach der Geburt (Avraham *et al.*, 1997). Als Genort wurde ein Myosin VI erkannt, das verstärkt in den Haarzellen der Cochlea vorkommt, spezialisierten Sinneszellen mit aktinreichen Stereocilien an der apikalen Domäne, die die Signaltransduktion beim Hören und bei der Gleichgewichtswahrnehmung ausführen. In den Haarzellen ist Myosin VI in der aktinreichen Cuticularplatte konzentriert, einer Struktur über die Stereocilien im Cytoplasma verankert werden, was auf eine Rolle bei der Stabilisierung der Stereocilien hinweist (Hasson *et al.*, 1997). Myosin VI wird auch in den meisten anderen Geweben und Zelltypen exprimiert. Dort tritt es im Golgi-Komplex und an Zellmembranen auf, wobei es eine Funktion beim Transport von Membranen ausüben könnte (Buss *et al.*, 1998). Myosin VI enthält zwei charakteristische Insertionen in der Motordomäne und eine Schwanzdomäne mit einem kurzen Bereich, der eine superspiralisierte Struktur ausbilden kann (Kellerman und Miller, 1992). Besonders interessant ist die Beobachtung, daß es sich an Aktinfilamenten in die entgegengesetzte Richtung als alle anderen bisher untersuchten Myosine bewegt.

Beim Menschen sind Mutationen in Myosin VII mit dem Usher Syndrom verbunden, einer autosomal rezessiven Erkrankung mit Verlust des Gehörs und einer Pigmentstörung der Retina, die zu einer fortschreitenden Blindheit führt. Dabei handelt es sich um die häufigste Form einer Taub-Blindheit (Weil *et al.*, 1995). Das Shaker 1-Gen von Mäusen kodiert ebenfalls für ein Myosin der Klasse VII. Mäuse, die homozygot für eines der Shaker 1-Allele sind, zeigen als Phänotyp Taubheit und Hyperaktivität, jedoch keine Pigmentstörung der Retina (Gibson *et al.*, 1995). Myosin VIIA kommt an Verbindungen aneinander liegender Stereocilien und in der Cuticularplatte vor. Es könnte daher Funktionen bei der Aufrechterhaltung der Struktur von Stereocilien und beim Membrantransport in den Haarzellen des Innenohrs haben. Das Protein tritt auch im Pigmentepithel der Retina und in Photorezeptorzellen auf, wo es eine Rolle bei der Phagocytose und beim Transport von Opsin

spielen könnte (Hasson *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1998). Auf die Motordomäne von Myosin VII folgen fünf IQ-Motive. Ein helikaler Bereich in der Schwanzdomäne führt zu einer Dimerisierung. Die Schwanzdomäne enthält außerdem zwei FERM-Domänen, die eine Rolle bei Wechselwirkungen mit Proteinen des Cytoskeletts spielen können, zwei MyTH4-Domänen und eine SH3-Domäne. Die Funktion der MyTH4-Domänen ist unbekannt.

Eine Beteiligung von unkonventionellen Myosinen an der Signaltransduktion erscheint wahrscheinlich für die Myosine, die Domänen besitzen, die entweder als enzymatische Regulatoren wirken können oder als Effektoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen in einer Vielzahl von Signalübertragungskaskaden. Mitglieder der Myosinklasse IX, die im Menschen und in der Ratte vorkommen, enthalten eine GTPase-aktivierende (GAP-) Domäne in der Schwanzregion, die die GTPase-Aktivität des Proteins Rho erhöht, indem sie die Umwandlung des aktiven RhoGTP Zustands in den inaktiven RhoGDP-Zustand beschleunigt. Myosin 9b ist ein aktiver Motor, obwohl es eines der langsamsten Myosine ist, die bisher charakterisiert wurden (Wirth *et al.*, 1996; Reinhard *et al.*, 1995).

2.6 Der Modellorganismus *Dictyostelium discoideum*

Dictyostelium discoideum ist im vegetativen Zustand eine einzellige Amöbe, die im Erdboden vorkommt und sich durch Phagocytose von Bakterien und Hefen ernährt (Raper, 1935). Die taxonomische Einordnung von *D. discoideum* ist bis heute nicht einheitlich, meist wird der Organismus jedoch der Klasse der Mycetozoa zugeordnet (Olive, 1975).

Bei Nahrungsmangel wird ein festgelegtes Differenzierungsprogramm ausgelöst, in dessen Verlauf sich die einzelnen Amöben in multizellulären Strukturen zusammenlagern. Im ersten Stadium dieses Entwicklungszyklus sekretieren die Zellen als Botenstoff zyklisches Adenosin-3´,5´-monophosphat (cAMP) (Gerisch und Wink, 1975). Sie bewegen sich chemotaktisch entlang des cAMP-Gradienten und bilden ein Aggregat, das aus etwa 10^5 Zellen besteht und eine Länge von 1 bis 2 mm haben kann. Es wird als Pseudoplasmodium bezeichnet. Nach der Aggregation beginnt eine Differenzierung in zwei Zelltypen, aus denen sich später die Sporen- bzw. Stielzellen entwickeln. In diesem Stadium ist das Zellaggregat lichtempfindlich und bewegt sich positiv phototaktisch zu einer günstigen Umgebung, wo der nächste Entwicklungsschritt, die Kulmination, eingeleitet wird. Während der Kulmination wird ein Fruchtkörper gebildet, der aus einer Basalplatte, einem Stiel und einem Sporenkopf besteht. Die Zellen des Stiels und der Basalplatte sind stark vakuolisiert, bilden eine Zellwand aus und sterben im Sporenträger ab. Die Sporenzellen bilden ebenfalls eine Zellwand, verlieren Wasser und werden metabolisch inaktiv (Loomis, 1975). Der Entwicklungszyklus von *D. discoideum* ist 24 bis 30 Stunden nach Beginn der Zusammenlagerung beendet. Bei Berührung des Sporenkopfs werden die Sporen freigesetzt und können unter geeigneten Bedingungen mit der Keimung beginnen, wobei einzelne Amöben freigesetzt werden.

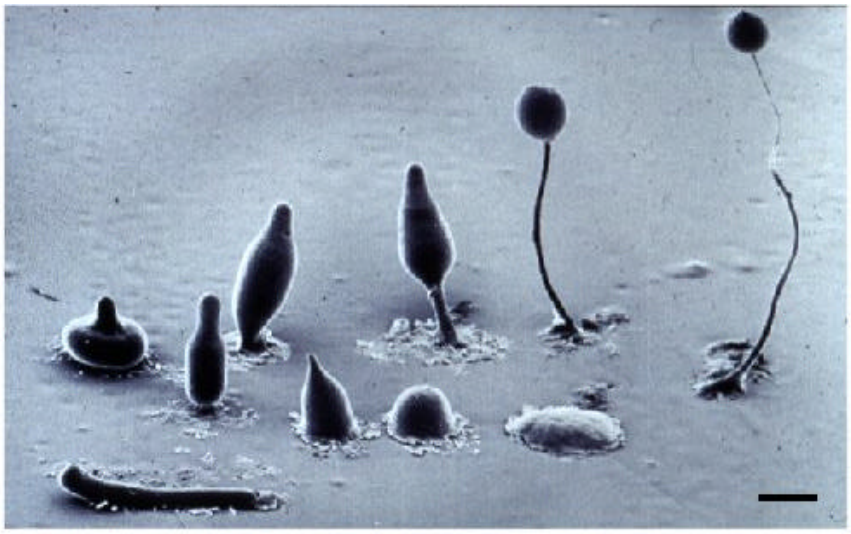


Abbildung 2.8: **Entwicklungszyklus von *D. discoideum*.** Bei Nahrungsmangel kann *D. discoideum* einen Entwicklungszyklus eingehen, in dem die Zellen aggregieren und einen vielzelligen Verband bilden. Einzelne Zellen beginnen cAMP auszusenden und regen damit benachbarte Zellen chemotaktisch zur Aggregation an. Das Aggregat aus etwa 10^5 Zellen bildet ein Pseudoplasmodium, das sich phototaktisch auf dem Substrat bewegt. In dieser Phase findet eine Differenzierung in zwei Zelltypen statt, aus denen sich später die Sporen- bzw. Stielzellen entwickeln. Nach etwa 18 h beginnt die Kulmination, bei der die Sporen vom wachsenden Stiel nach oben getragen werden. Der reife Sporenkopf setzt bei Berührung die Sporen frei, aus denen unter günstigen Nahrungsbedingungen die Amöben frei werden. Die elektronenmikroskopische Aufnahme stammt von L. Blanton, Technische Universität Texas. Der Größenstandard entspricht 0,5 mm.

D. discoideum ist als Modellorganismus sehr gut geeignet, um das Cytoskelett, seine Motoren und Bewegungsvorgänge im allgemeinen zu untersuchen. Die Organisation seines Cytoskeletts und damit verbundene Prozesse, wie Zellbewegung, Phagocytose und intrazellulärer Transport sind denen in höheren Organismen sehr ähnlich. Die Geschwindigkeiten der Phagocytose und Makropinocytose liegen jedoch zwei- bis zehnmal höher als die von anderen Zellen, die sich auf vergleichbare Weise ernähren, wie Makrophagen und neutrophilen Zellen. *D. discoideum* ist im Labor einfach zu kultivieren und bietet eine Kombination effektiver biochemischer und genetischer Methoden. Die gezielte Unterbrechung und Deletion von Genen durch homologe Rekombination kann mit hoher Effizienz durchgeführt werden (De Lozanne und Spudich, 1987; Manstein *et al.*, 1989). Daneben können rekombinante Proteine wie Myosinkopffragmente stark überexprimiert und mit guten Ausbeuten aus den Zellen isoliert werden (Manstein *et al.*, 1995). Wie die Untersuchungen an Myosin II, an Myosinen anderer Klassen und an Dynein und Kinesin zeigen, hat die Verwendung von *D. discoideum* entscheidend zum Verständnis dieser Motoren beigetragen. An *D. discoideum* kann darüber hinaus auch die Organisation des Cytoskeletts und der Membrantransport erforscht werden (Ma, 2001).

2.7 Myosine in *Dictyostelium discoideum*

Bisher wurden zwölf verschiedene Gene für schwere Ketten von Myosinen in *D. discoideum* beschrieben (Soldati *et al.*, 1999). Dabei handelt es sich um ein Myosin II, sieben Myosine der Klasse I (myoA-F und myoK) und vier andere unkonventionelle Myosine (myoH, myoI, myoJ und myoM). Die Sequenzen sind für alle diese Myosine vollständig mit Ausnahme von myoF und myoH. Die Domänenstruktur der bekannten Myosine aus *D. discoideum* ist in Abbildung 2.9 dargestellt.

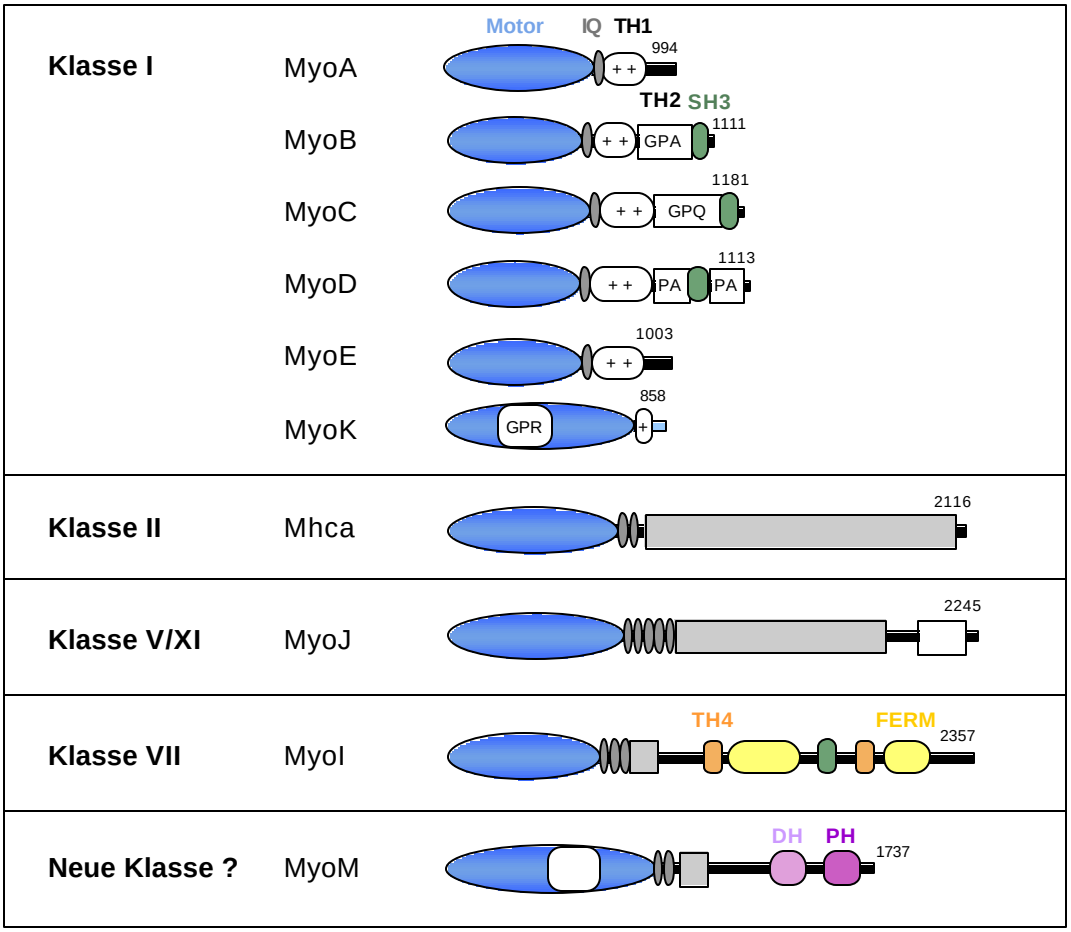


Abbildung 2.9: **Schematische Übersicht über die Domänenstruktur der Myosine aus *D. discoideum*.** Die Motordomäne ist blau dargestellt. Die Anzahl der IQ-Motive in der Nackenregion und Domänen in der Schwanzregion sind angegeben. Bereiche, die eine superspiralisierte Struktur ausbilden können, sind schraffiert dargestellt und kommen in Myosin II und nach Strukturvorhersagen auch bei MyoI, MyoJ und MyoM vor. Die Funktionen der TH1-, TH2- und SH3-Domänen sind im Text beschrieben. MyoK hat eine TH2-ähnliche Insertion in der Motordomäne. Die Funktionen der TH4- und FERM-Domänen von MyoI und der globulären C-terminalen Domäne von MyoJ sind noch unbekannt. MyoM enthält zwei Domänen mit Homologie zur Rho-Familie von Guaninnukleotid-Austausfaktoren (GEFs).

2.7.1 MyoA-E, MyoK (Klasse I)

Die größte Gruppe von Myosinen, die in *D. discoideum* vorkommt, bilden die Myosine der Klasse I. Von den sechs Mitgliedern dieser Klasse gehören MyoB, MyoC und MyoD zur Unterklasse 1, die auch als amöboide Myosine I bezeichnet werden. Sie enthalten in ihrer Schwanzregion neben einer TH1-Domäne, die an Membranen binden kann, zwei weitere Domänen, eine TH2- und eine SH3-Domäne. Die TH2-Domäne ist reich an den Aminosäuren Glycin, Prolin und Alanin oder Glutamin und kann ATP-unabhängig mit Aktin in Wechselwirkung treten. SH3-Domänen spielen in Proteinen anderer Familien eine Rolle bei Protein-Protein-Wechselwirkungen. MyoA und MyoE gehören zur Unterklasse 2 und haben eine kürzere Schwanzregion, die nur eine TH1-Domäne enthält. MyoK besitzt eine Insertion in der Kopfdomäne, die einer TH2-Domäne ähnelt, jedoch kein Bindungsmotiv für eine leichte Kette und eine sehr kurze Schwanzregion (Schwarz *et al.*, 1999).

MyoB und MyoD sind bei der Fortbewegung von *D. discoideum* an dem Rand der Zellen konzentriert, der in der Fortbewegungsrichtung liegt, was auf eine Funktion bei der Zellbewegung hindeutet (Fukui *et al.*, 1989; Morita *et al.*, 1996). Zellen, in denen ein einzelnes Myosin I-Gen ausgeschaltet ist, weisen nur geringe Defekte auf (Titus *et al.*, 1993; Wessels *et al.*, 1991; Peterson *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 1993). Die Geschwindigkeit der Phagocytose ist bei den Einzelmutanten von myoB und myoC erniedrigt, jedoch bei den myoA$^-$ und myoD$^-$-Zellen unverändert. Neben den Einzelmutanten wurden auch Doppel- und Dreifachmutanten untersucht (Novak *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 1996). In diesen Zellen sind mehrere Prozesse beeinträchtigt, wie die Aufnahme von flüssigem Medium durch Pinocytose, das Zellwachstum, der Entwicklungszyklus und die Internalisierung von Proteinen an der Zelloberfläche. Diese Störungen können auf einen frühen Defekt bei der Internalisierung von Vesikeln zurückzuführen sein. Dabei scheinen die Funktionen der Myosine zumindest teilweise zu überlappen. Die Untersuchung von Doppelmutanten (myoA$^-$/myoB$^-$ und myoB$^-$/myoC$^-$) lieferte Hinweise darauf, daß diese Myosine daran beteiligt sein könnten, die Stabilität des Zellkortex aufzubauen (Dai, 1999). Die SH3-Domäne amöboider Myosine I könnte für die gezielte Verteilung der Proteine in der Zelle und ihre Funktion eine Rolle spielen. Die SH3-Domäne von MyoB wird nicht für seine Lokalisierung benötigt, ist jedoch unerläßlich für seine Funktion *in vivo* (Novak und Titus, 1998). Auch MyoK scheint wie die anderen Myosine der Klasse I an der Zellbewegung und der Phagocytose beteiligt zu sein (Schwarz *et al.*, 2000).

2.7.2 Myosin II

D. discoideum enthält nur eine Isoform von Myosin II (Clark und Spudich, 1974). Das Protein ist während der Zellteilung an der Teilungsfurche der Zellen lokalisiert. Während der Fortbewegung tritt es im posterioren Bereich der Zellen und am Rand von Pseodopodien auf, die zurückgezogen werden (Fukui *et al.*, 1987; Moores *et al.*, 1996; Yumura *et al.*, 1997). Daher ist es an der Zellteilung und an Bewegungsvorgängen beteiligt. Wird das Myosin II-Gen inaktiviert, kommt es zu schweren Störungen bei der Zellteilung und der Entwicklung der Zellen. Die Myosin II-Nullzellen können sich nur teilen, wenn sie an einer Oberfläche angeheftet sind. In Suspension oder auf einer hydrophoben Oberfläche findet die Kernteilung,

jedoch keine Zellteilung statt, so daß große Zellen mit vielen Zellkernen entstehen (De Lozanne, 1987; Knecht und Loomis, 1987, Manstein, *et al.*, 1989).

2.7.3 MyoJ (Klasse V/XI)

MyoJ ähnelt strukturell den Myosinen der Klasse V, ist jedoch phylogenetisch am nächsten mit den Myosinen der Klasse XI aus *Arabidopsis thaliana* verwandt (Mooseker und Cheney, 1995). Seine Funktion wurde an Mutanten, denen das myoJ-Gen fehlte, untersucht (Peterson *et al.*, 1996). Weder beim Wachstums, der Endocytose, der Phagocytose oder der Entwicklung dieser Mutanten wurde jedoch eine Störung gefunden. Der Grund dafür könnte sein, daß eines der bisher nicht beschriebenen Myosine aus *D. discoideum* eine sehr ähnliche Funktion hat.

2.7.4 MyoI (Klasse VII)

Die Untersuchung der Funktion von MyoI in *D. discoideum* ergab, daß es an der Phagocytose beteiligt ist (Titus, 1999). Zellen, denen myoI fehlt zeigen eine Störung bei der Aufnahme fester Substanzen. Sie nehmen 80 % weniger Hefezellen auf als die Kontrollzellen. Dabei blieben andere Zellvorgänge, die auf Aktin beruhen, unverändert und die Zellen konnten weiterhin normale phagycotische Becher ausbilden, was auf eine Beteiligung von MyoI bei einem späten Schritt des Prozesses der Phagocytose hinweist

2.7.5 MyoM

MyoM konnte keiner der bisher bekannten Myosinklassen zugeordnet werden (Schwarz *et al.*, 1999). *In vitro* hatte die GEF-Domäne von MyoM eine selektive Aktivität für GTPasen aus der Rac1-Familie (Geissler *et al.*, 2000). Mutanten, denen myoM fehlt, zeigen keine phänotypischen Veränderungen (Oishi *et al.*, 2000). Die Überexpression der Schwanzdomäne von MyoM führte zu einer veränderten Zellmorphologie mit außergewöhnlich breiten Lamellipodien. Unter hypoosmotischen Bedingungen bildeten die Zellen starke aktinreiche Ausstülpungen, die an ihrer Spitze die MyoM-Schwanzdomäne enthielten.

2.8 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene Isoformen von Myosinen der Klasse I aus *D. discoideum* zu charakterisieren. Dafür wurden drei Myosine aus zwei Unterklassen ausgewählt, die Abweichungen in der Domänenstruktur der Schwanzregion aufweisen.

Hinweise auf die Funktionen dieser Myosine wurden bereits aus der Untersuchung von Zellinien erhalten, in denen ein oder mehrere Myosingene mit molekulargenetischen Methoden ausgeschaltet waren (Novak *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 1996). Daneben lag auch die Kristallstruktur der Motordomäne von MyoE vor (Kollmar *et al.*, 2002).

Für eine weitere Aufklärung der zellulären Prozesse, an denen die verschiedenen Isoformen beteiligt sind, und für die Beschreibung von speziellen Eigenschaften bei der Energieumwandlung durch den Aktomyosinkomplex, ist jedoch eine Untersuchung der mechanischen und biochemischen Merkmale der Proteine unerläßlich. Daher sollten die drei Myosine mit zellbiologischen und biochemischen Methoden analysiert werden.

Für die Visualisierung der dynamischen Verteilung der Myosine I in lebenden Zellen erschien die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Proteinen am besten geeignet zu sein. Deshalb sollten rekombinante Fusionsproteine der Myosine I mit YFP in *D. discoideum* exprimiert werden. Wichtige Informationen über die Motoreigenschaften eines Myosins können erhalten werden, indem die Geschwindigkeit der Bewegung von Aktinfilamenten in einem *in vitro* Versuchsaufbau gemessen wird. Auch die Charakterisierung der ATPase-Aktivität eines Myosins mit Methoden der Enzymkinetik liefert wertvolle Hinweise auf seine physiologische Funktion. Da dafür Proteinmengen im Bereich mehrerer Milligramm erfordert werden, sollten funktionelle rekombinante Proteinkonstrukte aus der Motordomäne der untersuchten Myosine in *D. discoideum* überexprimiert und aus den Zellen isoliert werden. Diese würden dann für kinetische Messungen im Fließgewichtszustand und mit Methoden der Transientenkinetik zur Verfügung stehen.

Mit einer Zusammenfassung der erhaltenen Daten sollte es dann möglich sein, spezielle Eigenschaften der einzelnen Myosine hervorzuheben, und so einen genaueren Einblick in die verschiedenen Funktionen von Myosinen der Klasse I zu gewinnen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Biomol (Ilvesheim), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Medienbestandteile für die Zellkultur stammten von der Firma Gibco/BRL (Eggenstein). Daneben wurden verwendet:

30 % (w/v) Acrylamid/ 0.8 % (w/v) Bisacrylamidlösung	BIOzym, Hess. Oldendorf
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	Roche, Mannheim
Adenosin-5'-diphosphat (ADP)	Roche, Mannheim
Bacto Hefeextrakt	Difco Laboratories, USA
Bacto Trypton	Difco Laboratories, USA
Bradford-Färbelösung	Bio-Rad, München
N-Carbobenzoxy-Prolin-Alanin (N-CBZ-Pro-Ala)	Sigma, Deisenhofen
Imidazol	BDH Lab. Supplies, GB
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Neomycinsulfat	Gibco BRL, Eggenstein
Nicotinamidadenindinukleotid (NADH)	Roche, Mannheim
Penicillin-Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
Pepstatin	Sigma, Deisenhofen
Phenylmethansulfonsäurefluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
Phosphoenolpyruvat (PEP)	Roche, Mannheim
Polyethylenglykol 6000 und 8000 (PEG)	Hampton Research, USA
Protease Pepton	Oxoid, GB
N-(1-Pyrenyl)iodoacetamid	Molecular Probes, NL
N_{α}-p-Tosyl-$_L$-Ariginin-methyl-ester-hydrochlorid (TAME)	Sigma, Deisenhofen
N_{α}-p-Tosyl-$_L$-Lysin-chlormethyl-keton (TLCK)	Sigma, Deisenhofen
N-Tosyl-$_L$-Phenylalanin-chlormethyl-keton (TPCK)	Sigma, Deisenhofen
(2,4,6-Trinitrophenyl)adenosin 5'-triphosphat (TNP-ATP)	Molecular Probes, NL
Phalloidin, Rodamin-Phalloidin	Prof. H. Faulstich, MPI für Zellbiologie, Ladenburg

3.1.2 Geräte

Elektroporationsapparatur:	
Gene Pulser II	Bio-Rad, München
Pulse Controller	Bio-Rad, München
FPLC-Anlage:	
AEKTA-Explorer	Pharmacia, Schweden

Kameras:	
Photonics Science Darkstar	TILL Photonics, Martinsried
CCD-Kamera Imago S-V6A	TILL Photonics, Martinsried
Mikroskope:	
Olympus B061	Olympus
Zeiss Axiovert 135	Zeiss, Oberkochen
Olympus IX70	Olympus
Leica TCS SP2 Konfokalmikroskop	Leica, Heidelberg
Objektive:	
Zeiss Plan-Apochromat 100× (NA 1,4)	Zeiss, Oberkochen
Zeiss Plan-Apochromat 63× (NA 1,32)	Zeiss, Oberkochen
Schüttler:	
Gyrotory Shaker G2, G10	New Brunswick Sci., USA
Innova 2300 Platform Shaker	New Brunswick Sci., USA
Spektrometer:	
Fluoreszenzspektrometer SLM 8000C	SLM Instruments, USA
DU-650 Spectrophotometer	Beckmann, Dreieich
Quarzküvetten	Hellma, Frankfurt/Main
Stopped-Flow-Gerät:	
SF-61DX	Hi-Tech, GB
Xe/Hg-Lampe (75 W)	Hamamatsu, Herrsching
Excitationsfilter (WG320, KV389, OG450)	Schott, Mainz
Ultraschall-Homogenisator Sonifier B-12,	Bronson Sonic Power, USA
Zentrifugen (Rotoren):	
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Biofuge 15R	Heraeus-Christ, Osterode
Ultrazentrifugen L5, L8, L70, LE80K	Beckman, Dreieich
(SW28, Ti70, Ti45)	Beckman, Dreieich
Avanti J25 (JA14, JA25, JLA16.25)	Beckman, Dreieich
Avanti J6-MI	Beckman, Dreieich
Zentrifuge J6-MI	Beckmann, Dreieich

3.1.3 Allgemeine Arbeitsmittel

Dialyseschläuche (Ausschlußgrenze 12-14 kDa)	neoLab, Heidelberg
Säulen für chromatographische Trennverfahren	Pharmacia, Schweden
Säulenmaterialien:	
Ni-NTA-Superflow	Qiagen, Hilden
SP	Tosoh, Japan
Q-Sepharose-Fast-Flow	Phamacia, Schweden
Vivaspin-Röhrchen (Ausschlußgrenze 30, 50 kDa)	Greiner, USA

3.1.4 Kits

Easy Pure DNA Purific ation Kit	Biozym, Hess. Oldendorf
ECL Kit	Amersham, Braunschweig

Qiagen PCR Purification Kit	Qiagen, Düsseldorf
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Düsseldorf
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Düsseldorf
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg

3.1.5 Oligodesoxyribonukleotide

Alle Oligodesoxyribonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen. DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma MediGene (Martinsried) durchgeführt.

Tabelle 3.1: **Verwendete Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz
IB-BamHI	GGATTTTATAATGGATCCTCAAAAAAAGTTCAAGCC
IB-XhoI	GCTTTTTGAATTTCTCGAGTACAATCGAAATCTTTC
ID-BamHI	AAAAAAAAGGATCCGCATATAAAAGTCAACATGGTG
ID-XhoI	GAATCTTTGAAGTTTATCTCGAGAGGTGAAAACCTTTCT
IE-BamHI	CTAGGATCCATTCCAAAGACAAAAGCAGAAGGTGTACC
IE-XhoI	GAATTAATGCTCGAGTTCTTGGCATTTCAAGC
IB-Cterm	CGTACTCGAGTTAATTATATTGTAAATAATTTGTTGGAGCCC
ID-Cterm	GACAACTCGAGTTAAACTCTTGGTGCCATTCC
SZ12	CGTTGTTCAGTTATTTCAGTACC
IE-Cterm	TTTCCTCGAGTTAATCTTTAAATTGGATTGTTG
SZ19	AGAAGCATTTGGTAATGC
SZ20	GGTTTCACGACGATTACCAGCACC
SZ21	CATTTGGTTTAATACAACG
SZ22	GGAAGCATTTGGTAATGC
SZ23	GGTTTCAACACGTGCACTTCTACC
SZ24	GGTTTGATACAACGAATG
SZ25	CCAAATGGTGAAAGAATTTC
SZ26	CGTTGTGAAGTTATTTCAGTACC
SZ27	CCAATCACTGGTCCCTTC
SZ28	GGTAGCAACACGTGCACTTCTACC
SZ30	CGTCGTGCTACCTATAACGTTCCACAAAAT
SZ31	CGTTGTGCTGTTATTTCAGTACCAATGG

Die verwendeten Oligonukleotide sind in 5‘-3‘ Richtung aufgeführt.

3.1.6 Molekulargewichtsmarker

DNA-Molekulargewichtsmarker:	
1 Kb Leiter	Stratagene, Heidelberg
Protein-Molekulargewichtsmarker:	
Benchtop	Gibco BRL, Eggenstein
Prestain	Gibco BRL, Eggenstein

3.1.7 Enzyme und andere Proteine

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von Stratagene (Heidelberg), Roche (Mannheim) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Daneben wurde verwendet:

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	Roche, Mannheim
Glukoseoxidase	Roche, Mannheim
Klenow-Fragment	Roche, Mannheim
Katalase	Roche, Mannheim
Lactat-Dehydrogenase (LDH)	Roche, Mannheim
Myosin I-Kinase (MIHCK)	Prof. E. Korn, National Institutes of Health, Bethesda, USA (Brzeska *et al.*, 1999)
Pfu DNA-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Pyruvat-Kinase (PK)	Roche, Mannheim
λ-Phosphatase	Biolabs, New England
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
RNase A	Roche, Mannheim
T4 DNA-Ligase	Roche, Mannheim
T4 DNA-Polymerase	Roche, Mannheim

3.1.8 Antikörper

Penta His-Antikörper	Quiagen, Düsseldorf
Maus-IgG, Anti-Coronin (mAK 176-2-5)	Dr. M. Maniak, MPI für Biochemie, Martinsried (Dehostos *et al.*, 1991)
Ziegen-IgG, Anti-(Maus-IgG), Cy3-konjugiert	Molecular Probes, Niederlande
Ziegen-IgG, Anti-(Kaninchen-IgG), HRP-konjugiert	Biorad, München
Ziegen-IgG, Anti-(Maus-IgG), HRP-konjugiert	Biorad, München

3.1.9 Plasmide

pBluescriptSK(+) II	Stratagene, Heidelberg (Alting-Mees und Short, 1989)
pDXA-3H	Prof. D. Manstein, Medizinische Hochschule Hannover (Manstein *et al.*, 1995)
pDXA-Hy	Prof. D. Manstein, Medizinische Hochschule Hannover (Knetsch und Manstein, Manuskript in Vorbereitung)

pDXA-EYFP-mcs	Prof. D. Manstein, Medizinische Hochschule Hannover (Knetsch und Manstein, Manuskript in Vorbereitung)
pDXA-mcs-EYFP	Prof. D. Manstein, Medizinische Hochschule Hannover (Knetsch und Manstein, Manuskript in Vorbereitung)
pDH12	Prof. D. Manstein, Medizinische Hochschule Hannover (Kurzawa *et al.*, 1997)
pDH12-2R	Prof. D. Manstein, Medizinische Hochschule Hannover (Kurzawa *et al.*, 1997)
pM790-2R-EYFP	Prof. D. Manstein, Medizinische Hochschule Hannover (Knetsch und Manstein, Manuskript in Vorbereitung)

3.1.10 Zellstämme

E.coli XL1blue	Stratagene, Heidelberg
Dictyostelium AX3-ORF$^+$	Prof. D. Manstein, Medizinische Hochschule Hannover

3.1.11 Allgemeine Lösungen

TAE-Puffer	40	mM	Tris
	20	mM	CH_3COOH
	2	mM	EDTA
TBE-Puffer	89	mM	Tris
	89	mM	Borsäure
	2	mM	EDTA
20 x SSC	3	M	NaCl
	0,3	M	tri-Natriumcitrat, pH-Wert 7,0
TBS	20	mM	Tris-HCl, pH-Wert 7,6
	137	mM	NaCl
TBST	20	mM	Tris-HCl, pH-Wert 7,6
	137	mM	NaCl
	0,05	%	Tween-20
PBS	80	mM	Na_2HPO_4, pH-Wert 7,4
	20	mM	NaH_2PO4
	100	mM	NaCl

3.1.12 Medien für die Kultivierung von *E. coli*

LB-Medium	10	g/l	Casein
	5	g/l	Bacto Hefeextrakt
	5	g/l	NaCl

Der pH-Wert wurde mit 5 N NaOH auf 7,5 eingestellt, und das Medium wurde 30 min bei 121 °C autoklaviert. Zur Selektion transformierter *E. coli* wurden 75 µg/ml Ampicillin zugefügt.

LB-Agar	15	g/l	Agar in LB-Medium

SOB-Medium	20	g/l	Bacto Trypton
	5	g/l	Bacto Hefeextrakt
	10	mM	NaCl
	2,5	mM	KCl

SOC-Medium 0,4% (w/v) Glucose in SOB- Medium

Das Medium wurde 30 min bei 121 °C autoklaviert und danach wurde 1 % einer sterilen Lösung von 1M $MgCl_2$, 1 M $MgSO_4$ zugefügt.

3.1.13 Medien und Lösungen für die Kultivierung von *D. discoideum*

HL5c-Medium	10	g/l	Protease-Pepton
	5g	/l	Bacto Hefeextract
	10	g/l	Glukose
	1,2	g/l	KH_2PO_4 (wasserfrei)
	0,4	g/l	Na_2HPO_4 (wasserfrei)

Der pH-Wert wurde mit 2 N NaOH auf 6,6 eingestellt und das Medium wurde 30 min bei 121 °C autoklaviert.

SM-AGAR	10	g/l	Glukose
	10	g/l	Bacto Pepton
	10	g/l	Bacto Hefeextrakt
	1	g/l	$Mg_2SO_4 \cdot 7\ H_2O$
	1,9	g/l	KH_2PO_4 (wasserfrei)
	1	g/l	K_2HPO_4 (wasserfrei)
	20	g/l	Bacto Agar

Der pH-Wert wurde mit 2 N NaOH auf 6,4 eingestellt und die Lösung wurde 30 min bei 121 °C autoklaviert.

MES-Puffer	20	mM	MES, pH-Wert 6,8
	0,2	mM	$CaCl_2$
	2,0	mM	$MgCl_2$
	Der pH-Wert wird mit 2 N NaOH auf 6,8 eingestellt. Die Lösung wird 30 min bei 121 °C autoklaviert.		
MES-Agar	20	g/l	Agar in MES-Puffer
Bonner-Lösung	0,6	g/l	NaCl
	0,75	g/l	KCl
	0,3	g/l	$CaCl_2$
	Die Lösung wird 30 min bei 121 °C autoklaviert.		
EP-Puffer	10	mM	Natriumphosphat, pH-Wert 6,3
	50	mM	Saccharose

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Die *E. coli* Bakterien wurden nach einer Transformation mit DNA oder zur Erhaltung von Einzelkolonien auf LB-Platten kultiviert. Zur Selektion transformierter Bakterien enthielten die Platten ein geeignetes Antibiotikum (75 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Kanamycin). Die Plattenkulturen wurden nach dem Ausstreichen der Bakterien über Kopf für mindestens 12 h bei 37 °C inkubiert. Plattenkulturen konnten bei 4 °C mehrere Wochen gelagert werden. Zur Herstellung von *E. coli* Flüssigkulturen wurden 3 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie einer Plattenkultur angeimpft und etwa 12 h bei 150-220 upm und 37 °C geschüttelt. Zum Anlegen größerer Flüssigkulturen wurden 150 ml LB-Medium mit 100 µl einer Flüssigkultur angeimpft und wie beschrieben geschüttelt. Bei Ampicillin-resistenten Stämmen wurde das Medium auf eine Ampicillin-Konzentration von 75 µg/ml eingestellt. Die Ermittlung der Zelldichten beim Bakterienwachstum erfolgte durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 600 nm.

Für die Konservierung der *E. coli* Stämme wurden in Kryoröhrchen 0,5 ml einer Übernachtkultur mit 0,5 ml 80 % (v/v) Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Transformation von *E. coli*

3.2.2.1 Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen

Zur Herstellung transformationskompetenter Zellen nach der $CaCl_2$-Methode wurden 50 ml LB-Medium mit 0,5 ml einer Übernachtkultur des gewünschten *E. coli*-Stamms angeimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C bei 220 upm geschüttelt, bis die Suspension eine OD_{600} von

0,4 bis 0,6 erreicht hatte (2-3 h). Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt und 10 min bei 3000 upm und 4 °C sedimentiert. Danach wurde das Zellsediment in 20 ml eiskaltem 100 mM $CaCl_2$ resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Es wurde nochmals 10 min zentrifugiert, und die Zellen wurden anschließend in 3 ml 100 mM $CaCl_2$ aufgenommen. Nach einer weiteren, mindestens einstündigen Inkubation auf Eis waren die Zellen kompetent. Die Zellen konnten 2 bis 3 Tage auf Eis gelagert oder nach Zugabe von Glycerin zu einer Endkonzentration von 20 % (v/v) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C konserviert werden.

3.2.2.2 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Transformation wurden 100 µl der kompetenten Zellsuspension mit Plasmid-DNA (1 ng) oder Ligationsansätzen (3 µl) für 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen 2 min bei 42 °C inkubiert, nochmals 2 min auf Eis gestellt und nach Zugabe von 100 µl SOC-Medium für 60 min bei 37 °C inkubiert. Von der Zellsuspension wurden je 10 bis 200 µl auf einer LB-Agarplatte mit 75 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Die nach der $CaCl_2$-Methode hergestellten kompetenten Zellen ergaben Transformationsausbeuten von etwa 1×10^7 Kolonien/µg DNA.

3.2.3 Kultivierung von *D. discoideum*

D. discoideum Zellen wurden entweder in Schüttelkultur (180 upm) oder auf Petrischalen in HL5c-Medium bei einer Temperatur von 21 °C kultiviert. Für die Selektion und das Wachstum von transformierten Zellen wurde dem Medium 10 bis 20 µg/ml G418 bzw. 4 µg/ml Blasticidin S zugefügt. In Schüttelkulturen wurden die Zellen bis zu einer Dichte von 4 bis 6×10^6 Zellen/ml angezogen. Ab 6×10^6 Zellen/ml beginnt die Wachstumskurve in die stationäre Phase überzugehen. Die Zelldichte in Suspension wurde mit Hilfe eines Hämacytometers bestimmt. Kulturen auf Petrischalen wurden bei Erreichen der Konfluenz mit HL5c-Medium abgespült und gegebenenfalls eine neue Petrischale angeimpft.

Für die Isolierung klonaler Zellinien wurden Zellen auf SM-Agarplatten (Durchmesser 14 cm) kultiviert. Dazu wurden 50 bis 100 µl Zellen mit 500 µl einer Suspension von *Klebsiella aerogenes* Bakterien in MES-Puffer vermischt und auf einer Agarplatte ausgestrichen. Nach ca. zwei Tagen zeigten sich die *D. discoideum* Kolonien als Plaques auf dem Bakterienrasen. Am Rand dieser Plaques befinden sich die vegetativen Zellen, die mit Hilfe eines Zahnstochers in andere Kulturen überführt werden können.

3.2.4 Synchronisieren des Zellzyklus von *D. discoideum*

Die Synchronisierung des Zellzyklus von *D. discoideum* wurde mit einer Kälteschock-Methode erzielt (Sutherland *et al.*, 2001). Die Zellen wurden bei 22 °C bis zu einer Dichte von 5 x 10^6 Zellen/ml gezogen. Dann wurde die Zellsuspension in frischem Medium auf eine Dichte von 1 x 10^6 Zellen/ml verdünnt und bei 10 °C 20 h inkubiert. Zellen aus dieser Suspension wurden auf Deckgläser übertragen und alle 30 min wurden Proben fixiert. Zellen in der Zellteilung wurden nach 2-3 h auf den Deckgläsern beobachtet.

3.2.5 Konservierung von *D. discoideum* Zellen

3.2.5.1 Einfrieren von *D. discoideum* Zellen

Zur Konservierung von *D. discoideum* Zellen wurden axenisch gewachsene Zellen geerntet, zweimal mit Bonner`s Lösung gewaschen und mit einer Dichte von $1{,}0 \times 10^8$ Zellen/ml in eiskaltem Einfriermedium (HL5c + 10 % (v/v) DMSO) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 1 ml Aliquots auf Einfrierröhrchen verteilt, die vorher auf Eis gehalten wurden. Die Zellen wurden dann zunächst bei -20 °C für 2 bis 4 h aufbewahrt, bevor sie bei -80 °C gelagert wurden. Um eingefrorene Zellen wieder anzuziehen, wurden sie auf Eis aufgetaut, zweimal mit kaltem HL5c-Medium gewaschen und in eine Petrischale mit HL5c-Medium überführt. Bei Transformanten wurde nach 24 h das Medium gewechselt und das entsprechende Antibiotikum zugegeben.

3.2.5.2 Konservierung von *D. discoideum* Sporen

Axenisch gewachsene *D. discoideum* Zellen wurden zweimal mit kaltem MES-Puffer gewaschen und mit einer Dichte von 1×10^8 resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 500 µl auf einer MES-Agarplatte (Durchmesser: 10 cm) ausgestrichen und in der Sterilbank für 10 min getrocknet. Die Agarplatten wurden auf den Kopf gestellt und die Zellen entwickelten sich innerhalb von 24 bis 48 h zu Fruchtkörpern. Die Sporen wurden durch Abklopfen im Deckel einer Petrischale gesammelt oder mit Hilfe eines kleinen Spatels geerntet. Die Sporen einer Agarplatte wurden in 500 µl 10 %iger Glycerin-Lösung suspendiert, in 150 µl Aliquots auf Einfrierröhrchen verteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Zum Animpfen wurde ein Aliquot bei Raumtemperatur aufgetaut und in eine Petrischale mit HL5c-Medium überführt.

3.2.6 Transformation von *D. discoideum*

Für die Transformation von *D. discoideum* wurden Zellen entweder aus einer Schüttelkultur oder von Petrischalen geerntet, zweimal in EP-Puffer gewaschen und bei einer Zelldichte von $1\text{-}2 \times 10^7$ Zellen/ml in demselben Puffer suspendiert. 800 µl dieser Zellsus-pension wurden mit 10-20 µg Plasmid-DNA gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Außer bei der Transformation von AX3-ORF$^+$-Zellen wurden der Transformationsmischung auch 10-20 µg des Plasmids pREP zugefügt. Die Cotransformation mit pREP verhindert die Ausschleusung der eingebrachten Plasmide aus transformierten *D. discoideum*-Zellen. Die Zellsuspension wird zur Transformation in eine gekühlte Elektroporationsküvette (0,4 cm) überführt, die in die Elektrodenkammer der *Gene-Pulser*-Apparatur geschoben wird. Der Elektroporationsimpuls erfolgte bei 1,2 kV, 25 µF und 600 Ω, was eine Zeitkonstante von etwa 0,8 ms ergab. Nach dem Impuls wurde der Transformationsansatz für 15 min auf Eis gekühlt und anschließend auf zwei Petrischalen mit je 10 ml HL5c-Medium verteilt. 18-24 h nach der Transformation wurde das Medium gegen das Selektionsmedium, das das entsprechende Antibiotikum enthielt, ausgetauscht. Das Selektionsmedium wurde täglich gewechselt, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Nach 5 bis 10 Tagen wurden in der Regel die ersten Kolonien sichtbar, die durch Absaugen mittels einer Pipettierhilfe auf Petrischalen

(4 cm Durchmesser) mit Selektionsmedium überführt wurden. Alternativ konnten die Kolonien auch mit einer Bakteriensuspension von *K. aerogenes* gemischt und auf SM-Agarplatten ausgestrichen werden.

3.3 Molekularbiologische Methoden

Die in Abschnitt 3.3 beschriebenen Methoden sind, sofern nicht anders vermerkt, dem Laborhandbuch von Maniatis *et al.* (1989) entnommen.

3.3.1 Präparation von Nukleinsäuren

3.3.1.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *D. discoideum*

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *D. discoideum* ging von 1×10^8 Zellen aus, die von Schüttel- oder Plattenkultur geerntet wurden. Die Zellen wurden zweimal in eiskaltem TE-Puffer gewaschen (1000 *g*, 4 °C, 7 min), in 2 ml TE-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 0,1 ml 30%iger Natrium-N-laurylsarkosin-Lösung lysiert. Bei den folgenden Extraktionsschritten wurden die Lösungen in Polypropylenröhrchen durchmischt und anschließend bei 1200 *g* und 4 °C für 7 min zentrifugiert. Die erste Extraktion des Zellysats erfolgte mit Phenol-Lösung. Die Phenol-Phase wurde nach der Trennung der Phasen mit 1ml TE-Puffer gewaschen. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden dann mit Phenol/Chloroform und anschließend mit Chloroform extrahiert. Danach wurde die wäßrige Phase mit 15 µl hitzebehandelter RNAase A-Lösung (10 mg/ml) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß wurden 10 µl einer Proteinase K-Lösung (5 mg/ml) zugefügt und nochmals 30 min bei 37 °C inkubiert. Es folgten zwei Extraktionsschritte mit je 3 ml Phenol/Chloroform bzw. Chloroform. Zur Fällung der genomischen DNA wurde die wäßrige Phase mit 0,1 Volumen 3 M Kaliumacetat-Lösung und 2,5 Volumen absolutem Ethanol versetzt und für mindestens 4 h bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 2500 *g* und 4 °C für 20 min wurde die sedimentierte DNA zweimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 bis 300 µl TE-Puffer gelöst. In der Regel konnten aus 1×10^8 Zellen 0,4 bis 0,6 mg genomischer DNA isoliert werden.

3.3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

3.3.1.2.1 Extraktion von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab

Die analytische Präparation von Plasmid-DNA wurde nach einer Vorschrift von Crouse *et al.* (1983) durchgeführt. Von einer Plattenkultur aus einem Transformationsansatz wurden jeweils 5 ml LB/Amp-Medium mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C kultiviert. 1,5 ml der Kultur wurden in ein Eppendorf-Gefäß überführt und die Bakterien 2 min in der Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Sediment in 200 µl STET-Puffer suspendiert. Anschließend wurden 16 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) zugegeben und die Bakterien für 90 s bei 100 °C aufgeschlossen. Durch eine 10-minütige Zentrifugation wurden die Zellfragmente und die chromosomale DNA sedimentiert. Zum Überstand wurden 200 µl 2-Propanol gegeben, gut gemischt und 30 min bei 4 °C in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Sediment wurde

zweimal mit je 400 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, 5 min im Vakuum getrocknet und in 50 µl TE-Puffer gelöst. Es folgte ein RNase A-Verdau von 10 min bei 65 °C. Die Plasmid-DNA wurde bis zur weiteren Verwendung in Restriktionsanalysen oder zur Sequenzierung bei -20 °C gelagert.

STET-Puffer	8	% (w/v)	Saccharose
	5	% (w/v)	Triton X-100
	50	mM	EDTA
	50	mM	Tris-HCl, pH-Wert 8,0

Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

3.3.1.2.2 Extraktion von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Die quantitative Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mit dem Plasmid-Midi-Kit von Qiagen (Quiagen, Düsseldorf) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Die Bakterien einer 100 ml Flüssigkultur wurden durch Zentrifugation bei 4000 *g* für 10 min sedimentiert und der Überstand dekantiert. Das Sediment wurde in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 4 ml Puffer P2 wurden die Bakterien 5 min bei Raumtemperatur lysiert, anschließend wurde durch Zugabe von 4 ml eiskaltem Puffer P3 und 10 min Inkubation auf Eis die Lyse abgebrochen. Die viskose Lösung wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und die Zelltrümmer mit der chromosomalen DNA sedimentiert (30000 *g*, 30 min, 4 °C). Der Überstand wurde in neue Zentrifugenröhrchen überführt und erneut 10 min bei den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf Qiagen tip-100 Säulen aufgetragen, die zuvor mit 5 ml Puffer QBT äquilibriert wurden. Die Säulen wurden zweimal mit je 10 ml Puffer QC gewaschen und die Plasmid-DNA anschließend mit 5 ml Puffer QF in ein Greiner-Röhrchen eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,7 Volumen 2-Propanol und Zentrifugation bei 30000 *g* und 4 °C für 30 min gefällt. Die präzipitierte Plasmid-DNA wurde in 100 bis 200 µl TE-Puffer gelöst und bei -20 °C gelagert. Aus einer 100 ml *E. coli*-Übernachtkultur wurden normalerweise zwischen 150 und 250 µg Plasmid-DNA isoliert.

P1-Puffer	50	mM	Tris-HCl, pH-Wert 8,0
	10	mM	EDTA
	100	µg/ml	RNase A
P2-Puffer	200	mM	NaOH
	1	% (w/v)	SDS
P3-Puffer	3	M	Kaliumacetat, pH-Wert 5,5
QBT-Puffer	750	mM	NaCl
	50	mM	MOPS, pH-Wert 7,0
	15	% (v/v)	Ethanol
	0,15	%(w/v)	Triton X-100

QC-Puffer	1	M	NaCl
	50	mM	MOPS, pH-Wert 7,0
	15	% (v/v)	Ethanol
QF-Puffer	1,25	M	NaCl
	50	mM	Tris-HCl, pH-Wert 8,0
	15	% (v/v)	Ethanol

3.3.2 Messung des Nukleinsäuregehalts von DNA-Lösungen

Nukleinsäuren absorbieren aufgrund der Spektralcharakteristika der in ihnen enthaltenen Basen Licht zwischen 250 nm und 270 nm Wellenlänge und zeigen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm. Konzentration und Reinheit von nukleinsäurehaltigen Lösungen wurden durch Messung eines Absorptionsspektrums zwischen 220 und 300 nm in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm in einem Beckmann DU-650 Spektralphotometer bestimmt. Für die Konzentration gilt folgende Beziehung:

$$1{,}0\ A_{260}\text{-Einheit} = 50\ \mu g/ml\ dsDNA = 33\ \mu g/ml\ ss\ DNA = 40\ \mu g/ml\ RNA$$

Der Quotient A_{260}/A_{280} gibt die Reinheit einer Nukleinsäurelösung an, er sollte zwischen 1,7 und 1,9 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigung mit Proteinen hin.

3.3.3 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

3.3.3.1 Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde hinsichtlich Pufferbedingungen und Reaktionstemperatur nach den Herstellerangaben durchgeführt. Für die Konstruktion von DNA-Plasmiden und zur Überprüfung von Transformanten wurde der Restriktionsverdau von 0,5 bis 10 µg Plasmid-DNA mit 5 bis 10 U der Restriktionsendonuklease in einem Volumen von 20 bis 50 µl für 1 h durchgeführt. Für weitere enzymatische Reaktionen unter anderen Pufferbedingungen wurde die DNA durch Phenolextraktion und Fällung mit 2-Propanol gereinigt.

3.3.3.2 5'-Dephosphorylierung von DNA

Die Entfernung endständiger Phosphatgruppen wurde durchgeführt, um eine Religation des hydrolisierten Vektors zu verhindern. Hierzu wurde alkalische Phosphatase aus Kälberdarm verwendet, die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend den Herstellerangaben gewählt. Anschließend wurde das Enzym durch Einstellen des Puffers auf 5 mM EDTA und 10-minütige Hitzedenaturierung bei 75 °C desaktiviert. Es folgten eine Phenolextraktion und eine Ethanolfällung.

3.3.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die enzymatische Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der T4 DNA-Ligase durchgeführt. Nicht kompatible, überstehende Enden wurden zuvor durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase geglättet. In einem Reaktionsvolumen von 10 µl wurden 20 bis 50 ng dephosphorylierte Vektor-DNA und ein 1- bis 3-facher molarer Überschuß der zu inserierenden DNA in Ligationspuffer mit 1 bis 5 U T4 DNA-Ligase versetzt. Die Inkubation wurde über Nacht bei 16 °C und anschließend 2 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Von dem Ligationsansatz wurden 3 µl direkt in eine Transformation nach der $CaCl_2$-Methode eingesetzt. Die Lagerung von Ligationsmischungen erfolgte bei -20 °C.

Ligationspuffer	50	mM	Tris-HCl, pH-Wert 7,6
	10	mM	$MgCl_2$
	10	mM	DTT
	1	mM	ATP
	5	% (w/v)	PEG 8000
	100	µg/ml	BSA

3.3.4 Die Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die spezifische *in vitro* Amplifikation von DNA-Sequenzen ausgehend von kleinsten Mengen an Vorlagenmolekülen (Mullis und Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988). Sie basiert auf dem Prinzip der Primer-Hybridisierung mit anschließender Polymerisationsreaktion und Denaturierung des entstandenen DNA-Stranges. Dies führt zur exponentiellen Amplifikation einer von zwei Primern begrenzten DNA-Sequenz über mehrere Zyklen hinweg. Jeder Zyklus setzt sich aus drei Schritten zusammen: Bei der Denaturierung (94 °C) werden aus der Matrize Einzelstränge erzeugt, an die sich im zweiten Schritt die Oligonukleotid-Primer anlagern können (T_m - 5 °C). Ausgehend von den Primern erfolgt im dritten Schritt die Polymerisationsreaktion. Katalysiert wird die DNA-Synthese durch hitzestabile DNA-Polymerasen. Die Wahl von Oligodesoxynukleotid-Primern erfolgte mit Hilfe ihre Schmelztemperatur. Diese läßt sich bei kurzen Oligodesoxynukleotiden nach folgender Formel berechnen:

$$T_m = (A+T) \times 2\ °C + (C+G) \times 4\ °C$$

Hierbei sind Temperaturen zwischen 50 °C und 60 °C günstig, da sie eine ausreichende Stringenz ermöglichen. Wichtig ist, daß sich die Schmelztemperaturen der beiden in der PCR-Reaktion eingesetzten Oligonukleotid-Primer um nicht mehr als 2 °C unterscheiden. Die Länge der Oligodesoxynukleotide lag im allgemeinen zwischen 18 und 25 Nukleotiden und für eine spezifische Anlagerung wurde als letzte Base ein G oder C gewählt, da diese stabilere Basenpaarungen eingehen.

Für die Durchführung einer PCR-Reaktion wurde in der Regel folgender Ansatz gewählt:

Matrizen-DNA:	0,1-1 pmol
Primer:	je ca. 300 pmol
Desoxynukleotidtriphosphate :	1 µM
Puffer:	10x Polymerase-Puffer
Polymerase:	1-5 U DNA-Polymerase

Danach wurde mit Wasser auf das gewünschte Reaktionsvolumen von 50 µl aufgefüllt. Für die einzelnen Schritte der PCR-Reaktion wurden die Temperaturen und Inkubationsdauern wie folgt gewählt:

Denaturierung:	92-95 °C
	2 min für die erste Stufe, 50 s für alle späteren Stufen
Anlagerung:	45-55 °C abhängig von Primerlänge und G/C-Gehalt
	1 min
DNA-Synthese:	68-72 °C
	2 min/ 1000 bp Plasmid Länge
	10 min bei der letzten Stufe

Die Anzahl der Zyklen betrug zwischen 20-30 und wurde dem jeweiligen Experiment angepaßt.

3.3.5 Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren

3.3.5.1 DNA-Agarosegele

Die Trennung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten erfolgte nach ihrer Größe in 0,7 bis 2,0 %igen Agarosegelen in TAE-Puffer. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen DNA-Auftragspuffer versetzt und bei 30 bis 100 V in Minigelen (Laufstrecke 8 cm) getrennt. Für DNA-Mengen >5 µg wurden Midigele (Laufstrecke 18 cm) über 12 bis 16 h bei 30 bis 40 V verwendet. Die DNA wurde durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Zur Abschätzung der Größe und Menge der DNA-Fragmente wurden DNA-Lösungen mit Fragmenten bekannter Größe mitgeführt.

DNA-Auftragspuffer	50	% (v/v)	Glycerin
	0,2	% (w/v)	SDS
	0,05	% (w/v)	Bromphenolblau
	0,05	% (w/v)	Xylencyanol
	in 1 x TAE-Puffer		

3.3.5.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Reinigung von DNA aus Agarosegelen wurde durchgeführt, um nach Restriktionen oder PCR ein gewünschtes Fragment zu isolieren. Hierzu wurde die DNA-Lösung gelelektrophoretisch nach Größe aufgetrennt und das gewünschte Fragment nach Färbung des Gels mit Ethidiumbromid unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Elution der

DNA aus der Agarose erfolgte mit dem PCR Purification Kit (Quiagen) nach den Angaben des Herstellers.

3.4 Herstellung von Expressionsplasmiden für rekombinante Myosin I-Proteinkonstrukte in *D. discoideum*

Zur Überexpression von rekombinanten MyoB-, MyoD- und MyoE-Proteinkonstrukten in *D. discoideum* wurden verschiedene Expressionsplasmide hergestellt. Die Proteinkonstrukte wurden mit einem Histidinpeptid fusioniert, das die Isolierung der rekombinanten Kopffragmente mit Ni-NTA-Affinitätschromatographie ermöglichen sollte. Als Ausgangsvektoren für die Herstellung der Expressionsplasmide dienten pDXA-3H (Manstein *et al.*, 1995), pDXA-Hy, pDXA-EYFP-mcs, pDXA-mcs-EYFP und pM790-2R-EYFP (Knetsch *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Mit diesen Vektoren können Proteine unter Kontrolle des Aktin 15-Promotors in *D. discoideum* exprimiert werden.

3.4.1 Plasmide für Myosin I-Kopffragmente

Zur Expression der Motordomänen von MyoB, MyoD und MyoE wurde mit Polymerase-Kettenreaktion jeweils ein Fragment des myoB-, myoD- und myoE-Gens isoliert, das die Aminosäuren 1-698 von MyoB und MyoE beziehungsweise die Aminosäuren 1-692 von MyoD kodierte. Als Matrize diente genomische DNA aus AX2-Zellen. Als Primer wurde jeweils ein Oligonukleotid verwendet, das komplementär zum 5´-Ende der kodierenden Myosin I-Sequenz war und mit dem durch PCR-Mutagenese gleichzeitig eine eine *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle am 5´-Ende der kodierenden Sequenz eingeführt wurde (IB-BamHI, ID-BamHI und IE-BamHI). Mit dem zweiten Oligonukleotid wurde eine eine *Xho*I-Restriktionschnittstelle an den Positionen nach den Kodons für die Aminosäuren 698 von MyoB und MyoE und der Aminosäure 692 von MyoD, erzeugt (IB-XhoI, ID-XhoI und IE-XhoI). Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit den Restriktionenzymen *Bam*HI und *Xho*I geschnitten und in den Expressionsvektor pDXA-3H kloniert. Dieser Vektor enthält nach dem Polylinkerbereich eine Sequenz, die für ein Octahistidinpeptid kodiert. Dabei entstanden die Plasmide pMB-01, pMD-01 und pME-01, die für das entsprechende Myosin I-Kopffragment mit einer carboxyterminalen Histidinmarkierung kodieren. Die Sequenzen dieser Plasmide wurden durch DNA-Sequenzierung von mindestens zwei unabhängig voneinander entstandenen Klonen überprüft. Dabei wurden Abweichungen zu den bereits beschriebenen Sequenzen gefunden: Austausch G73E, R207A und K365R in MyoB, fehlende Aminosäuren RIFG612-613 in MyoD und Austausch D26E, R48T, I77M, I137L, R138D, fehlende Aminosäuren F139 und Q140, N215D, L371I, S372I, I373N, V374C, H375T, R376T, G378K, T379G, zusätzliches P380, zusätzliche V427 und R428, K429E, zusätzliches N440, N498I, D604V, I681N, R683T in MyoE. Alle diese Veränderungen traten in zwei oder drei unabhängig voneinander entstandenen Klonen auf. Die publizierten Sequenzen (Jung *et al.*, 1989; Lee und Cote, 1993; Urrutia *et al.*, 1993) sind in der Genbank unter folgenden Nummern zu finden: MyoB: em:m26037, p34092; MyoD: em:116509, p34109 und MyoE: em:106801, p03479.

3.4.2 Plasmide für Fusionsproteine einer Myosin I-Motordomäne mit zwei α-Aktinin-Untereinheiten

Als Ausgangsmaterial für die Konstruktion von Plasmiden zur Expression von Fusionsproteinen der Motordomäne von MyoB, MyoD und MyoE mit zwei α-Aktinin-Untereinheiten und mit YFP dienten die Plasmide pMB-01, pMD-01und pME-01. Sie wurden mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Sph*I geschnitten. Für die Fusion mit zwei α-Aktinin-Untereinheiten und YFP wurde aus dem Plasmid pM790-2R-EYFP mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Sph*I ein Fragment ausgeschnitten, das für zwei α-Aktinin Untereinheiten, eine Verbindungssequenz aus zwölf Aminosäuren, EYFP und eine Octahistidinmarkierung kodiert. Dieses Fragment wurde in die Plasmide pMB-01, pMD-01 und p-ME-01, die mit denselben Enzymen geschnittenen waren, durch Ligation eingefügt. Dabei entstanden die Plasmide pMB-03, pMD-03 und pME-04.

3.4.3 Plasmide für Fusionsproteine von Myosinen I mit YFP

Die hergestellten Plasmide ermöglichten die Expression von Fusionsproteinen von MyoB, MyoD und MyoE mit YFP. Dabei wurden jeweils zwei Plasmide konstruiert, mit denen YFP entweder aminoterminal oder carboxyterminal an die Myosine der Klasse I angefügt wurde. Zur Herstellung dieser Konstrukte wurden über Polymerase-Kettenreaktion mit genomischer DNA aus AX2-Zellen als Matrize Sequenzen der myoB-, myoD- und myoE-Gene isoliert werden. Dabei wurden im Fall von myoB und myoD Oligonukleotide verwendet, die komplemetär zum 5´-Ende der kodierenden Myosin I-Sequenzen waren und mit denen durch Mutagenese gleichzeitig eine *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle eingeführt wurde (IB-BamHI, ID-BamHI). Bei myoE wurde ein Oligonukleotid verwendet, das komplementär zu einer *BsrG*I-Restriktionsschnittstelle war (SZ12) Als zweiter Primer dienten Oligonukleotide, die für das carboxyterminale Ende der Myosine I kodierten und mit denen nach den Kodons für die letzte Aminosäure eine *Xho*I-Restriktionschnittstelle erzeugt wurde (IB-Cterm, ID-Cterm, IE-Cterm). Die PCR-Produkte wurden mit *BamH*I und *Xho*I oder mit *BsrG*I und *Xho*I geschnitten und entweder in den Expressionsvektor pDXA-mcs-EYFP oder in den Vektor pDXA-EYFP-mcs (Knetsch *et al.*, Manuskript in Vorbereitung) kloniert. Dieser enthält DNA-Sequenzen, über die das Protein entweder N- oder C-terminal mit EYFP markiert wird. Die entstandenen Plasmide wurden durch Sequenzierung von jeweils mindestens zwei verschiedenen Klonen bestätigt. Dabei wurden in den Kopffragmenten, die in Kapitel 3.4.1 genannten Abweichungen zu den schon veröffentlichten Aminosäuresequenzen gefunden. In den Schwanzdomänen traten folgende Veränderungen auf: L826P bei MyoB; R698A und R841T bei MyoD und N733K, W826S, N887K, K995N, E996Q bei MyoE.

3.4.4 Plasmide für Myosine I

Für die Expression von MyoB, MyoD und MyoE mit einer aminoterminalen Heptahistidinmarkierung wurden die Sequenzen der Myosin I-Gene aus den Plasmiden pMB-02, pMD-02 und pME-06 mit den Restriktionsenzymen *BamH*I und *Xho*I ausgeschnitten und über diesselben Schnittstellen in den Vektor pDXA-Hy eingeführt. Dabei entstanden die Expressionsplasmide pMB-05, pMD-06 und pME-06.

3.4.5 Plasmide für Myosin I-Kopffragmente mit Mutationen an der TEDS-Stelle

Bei den Mutanten der MyoB-, MyoD- und MyoE-Kopffragmente wurde das Serin an der TEDS-Stelle entweder durch einen Glutaminsäurerest oder durch ein Alanin ersetzt. Bei MyoB und MyoD liegt die TEDS-Stelle an der Aminosäureposition 332, bei MyoE an der Aminosäureposition 334.

Für die Synthese der Plasmide, die für das MyoB-Kopffragment mit den Mutationen kodieren, diente das Plasmid pMB-01 als Ausgangsmaterial. Es wurde mit den Restriktionsenzymen *SnaB*I und *BsrG*I geschnitten. Das entstandene etwa 1,3 kBp große Fragment wurde durch Fragmente ersetzt, die jeweils eine der Mutationen enthielten. Diese Fragmente wurden durch PCR mit pMB-01 als Matrize erzeugt. In einer ersten PCR wurden als Primer jeweils ein Oligonukleotid verwendet, das für den Bereich der TEDS-Stelle kodiert und mit dem gleichzeitig die Mutation S332E beziehungsweise S332A eingeführt wurden (SZ20 und SZ30) und ein zweites Oligonukleotid, das komplementär zu einer *SnaB*I-Schnittstelle war (SZ19). Die dabei entstandenen Reaktionsprodukte wurden in einer zweiten PCR als Primer eingesetzt, wobei das Oligonukleotid SZ21 als Gegenprimer diente. Die Produkte dieser zweiten Amplifizierung wurden mit den Restriktionsenzymen *SnaB*I und und *BsrG*I geschnitten und in den Ausgangsvektor eingefügt. Es entstanden die Plasmide pMB-07 (für die S-E-Mutante) und pMB-08 (für die S-A-Mutante).

Bei der Synthese der Expressionsplasmide für die MyoD-Kopffragmente mit Mutationen an der TEDS-Stelle wurde eine entsprechende Strategie verwendet. Als Ausgangsplasmid und Matrize der PCR-Reaktionen diente dabei pMD-01. Als Oligonukleotide bei den PCR-Reaktionen wurden SZ22, SZ23 und SZ24 für das S332E-Konstrukt verwendet und SZ22, SZ28 und SZ24 für das S332A-Konstrukt. Die Produkte der zweiten PCR wurden mit den Restriktionsenzymen *SnaB*I und *BsrG*I geschnitten und über diese Schnittstellen in das Ausgangsplasmid pMD-01 eingesetzt, woraus die Plasmide pMD-08 (für die S-E-Mutante) und pMD-09 (für die S-A-Mutante) resultierten.

Auch die Expressionsplasmide für MyoE-Kopffragmente mit den Mutationen wurden über PCR-Mutagenese hergestellt. Als Matrize diente pME-01 und als Oligonukleotide wurden SZ25, SZ26 und SZ27 für das S334E-Konstrukt bzw. IE-BamHI, SZ31 und SZ27 für das S334A-Konstrukt verwendet. Die PCR-Produkte entweder mit *Xcm*I bzw. *BamH*I und *BsrG*I geschnitten und in das Ausgangsplasmid eingesetzt. Es entstanden die Plasmide pME-02 und pME-03.

Bei den allen entstandenen Plasmiden wurde die Einführung der Mutationen durch DNA-Sequenzierung überprüft.

3.4.6 Plasmide für Fusionsproteine einer Myosin I-Motordomäne und zwei α-Aktinin-Untereinheiten mit Mutationen an der TEDS-Stelle

Bei der Herstellung der Plasmide, die für die α-Aktinin-Fusionsproteine mit Mutationen an der TEDS-Stelle kodierten, wurden die Plasmide für die Kopffragmente mit den entsprechenden Mutationen als als Vorläuferkonstrukte verwendet. Sie wurden mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Sph*I geschnitten und ein Fragment aus dem Plasmid pM790-2R-EYFP wurde eingefügt.

Bei den entstandenen Plasmiden pMB-07, pMB-08, pMD-08, pMD-09, pME-02 und pME-03 wurde die Einführung der Mutation durch DNA-Sequenzierung überprüft.

3.4.7 Plasmide für Myosine I mit einer Mutation an der TEDS-Stelle

Von den MyoB-, MyoD- und MyoE-Fusionskonstrukten mit einem aminoterminalen Histidinpeptid sollten ebenfalls Mutanten exprimiert werden, bei denen das Serin an der TEDS-Position durch einen Glutamatrest ersetzt ist. Dabei wurde aus dem Plasmid pMB-05 mit den Restriktionsenzymen *SnaB*I und *BsrG*I ein Fragment entfernt und durch ein Fragment aus dem Plasmid, das für das MyoB-Kopffragment mit der S-E-Mutation kodierte, ersetzt. Aus den Plasmiden pMD-06 und pME-05 wurden Fragmente mit den Restriktionsenzymen *BamH*I und *BsrG*I ausgeschnitten und ebenfalls durch Sequenzen, die aus Plasmiden für die Kopffragmente mit S-E-Mutationen stammten, ersetzt.

3.5 Proteinchemische Methoden

3.5.1 Methoden zur Proteinaufreinigung

3.5.1.1 Präparation von Aktin aus dem Skelettmuskel von Kaninchen

Aktin wurde aus der Rücken- und Beinmuskulatur von Kaninchen isoliert. Das herauspräparierte Muskelfleisch von zwei frisch geschlachteten Tieren wurde sofort auf Eis gelegt und daraufhin mit einem handelsüblichen Fleischwolf zerkleinert und gewogen. Üblicherweiser werden dabei 1-1,3 kg Fleisch erhalten, die in 3 l Guba-Straub-Puffer unter 15minütigem Rühren bei 4 °C aufgeschlämmt wurden. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 5000 upm für 30 min, wobei Myosin in den Überstand überging. Das aktinhaltige Sediment wurde daraufhin für 30 min bei 4 °C in 5 l Carbonatpuffer A gerührt. Der Rückstand wurde durch ein feines Baumwolltuch gedrückt, in 1 l Carbonatpuffer B aufgenommen und für 10 min bei 4 °C gerührt. Daraufhin wurden 10 l Wasser mit einer Temperatur von 20 °C unter Rühren hinzugegeben und diese Suspension durch ein feinmaschiges Baumwolltuch filtriert. Der Rückstand wurde unter dem Abzug für 20 min in 2,5 l Aceton gerührt und erneut durch ein Baumwolltuch abfiltriert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt, bevor der Rückstand auf Filterpapier verteilt, ein bis zwei Tage im Abzug getrocknet wurde. Das von Geweberesten befreite Pulver kann bei –20 °C für mehrere Monate gelagert werden.

Guba-Straub-Puffer:	0,1	M	KH_2PO_4, pH-Wert 6,6
	0,05	M	K_2HPO_4
	0,3	M	KCl
Carbonatpuffer A:	4	% (w/v)	NaH_2CO_3
	0,1	mM	$CaCl_2$
Carbonatpuffer B:	10	mM	NaH_2CO_3
	10	mM	Na_2HCO_3
	0,1	mM	$CaCl_2$

Aus diesem Acetonpulver konnte nun nach einer Methode von Lehrer und Kerwar (1972) F-Aktin gewonnen werden. Hierzu wurden 5 g des Pulvers in 200 ml eiskaltem Suspensionspuffer aufgenommen und 30 min auf Eis gerührt. Die anschließende Filtration durch ein Baumwolltuch unter Vakuum trennt die Proteine Troponin und Tropomyosin von dem aktinhaltiges Filtrat, das im folgenden 1 h bei 4 °C und 30000 upm zentrifugiert wurde. Zur Polymerisation des Aktins wurde zum Überstand 3 M KCl und 1 M $MgCl_2$ bis zu einer Endkonzentration von 100 mM und 2 mM zugegeben und die Lösung zur vollständigen Polymerisation des Aktins für 1 h bei RT langsam gerührt. Aus dieser Lösung konnte nun filamentöses Aktin durch dreistündiges Zentrifugieren bei 4 °C und 30000 upm gewonnen werden. Das Aktinsediment wurde in 30-50 ml Depolymerisationspuffer aufgenommen und in einem Homogeniator vorsichtig homogenisiert und anschließend über Nacht bei 4 °C gegen denselben Puffer dialysiert. Am folgenden Tag wurde das Dialysat bei 4 °C für 1 h bei 8000 upm zentrifugiert, der Aktingehalt des Überstandes bestimmt und mit Depolymerisationspuffer auf 1 mg Aktin/ml Lösung eingestellt. Zur Polymerisation gab man wie zuvor KCl und $MgCl_2$ hinzu und ließ 1 h bei RT rühren. An dieser Stelle konnte nun mit dem Farbstoff Pyren fluoreszenzmarkiert werden. Aktin, das nicht markiert werden sollte, wurde nach erneuter dreistündiger Zentrifugation bei 30000 upm gewonnen. Das Sediment wurde anschließend in dem entsprechenden Experiment-Puffer aufgenommen und über Nacht gegen diesen dialysiert. Die Endkonzentration sollte ungefähr 100–200 µM betragen. Zur Entfernung von Verunreinigungen und von nicht homogenisiertem Aktin wurde die Aktinlösung für 5 min in der Eppendorfzentrifuge zentrifugiert. F-Aktin ließ sich bei 4 °C zwei Wochen lagern.

Suspensionspuffer:	10	mM	Tris, pH-Wert 8,0
	0,5	mM	ATP
	0,2	mM	$CaCl_2$
	1	mM	DTT
	4	% (w/v)	NaH_2CO_3
	0,1	mM	$CaCl_2$
Depolymerisationspuffer:	5	mM	Tris, pH-Wert 7,5
	0,2	mM	$CaCl_2$
	0,2	mM	ATP
	1	mM	NaN_3

Das Gleichgewicht zwischen der G- und F-Aktin-Form ist abhängig von der Konzentration der Aktinmonomere in Lösung. Sinkt diese unter einen Wert, der als kritische Konzentration bezeichnet wird, beginnt filamentöses Aktin zu deploymerisiern. Unter physiologischen Bedingungen liegt diese Konzentration unterhalb von 1 µM, durch die Anwesenheit von Phalloidin, einem Toxoid aus dem Grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloidis*) wird die kritische Konzentration weit herabgesetzt (Dancker *et al*, 1975). Phalloidin wird dabei von den Aktinfilamenten eingelagert, wobei ein Phalloidin-Molekül spezifisch von drei Aktinmonomeren gebunden wird (Steinmetz *et al*., 1998). Um eine 10 µM Stocklösung Phalloidin-stabilisiertes F-Aktin herzustellen wurden äquimolare Mengen beider Komponenten in dem Experiment-Puffer bei 4 °C über Nacht inkubiert.

3.5.1.2 Aufreinigung von Myosinkopffragmenten aus *D. discoideum* im analytischen Maßstab

Für die Optimierung der Extraktionsbedigungen und Abschätzung des Expressionsniveaus von rekombinanten Myosinkonstrukten in *D. discoideum*-Zellen wurde von Manstein und Hunt (1995) ein analytisches Extraktionsverfahren entwickelt. Dazu wurden 5×10^7 bis 1×10^8 Zellen aus Schüttelkulturen oder von Petrischalen geerntet und mit Bonner`s Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 600 µl Lysepuffer, dem zusätzlich 2-5 U alkalische Phosphatase und 20 µg/ml RNAase A hinzugegeben wurde, resupendiert und nach Zugabe von 600 µl Triton-X100-haltigem Lysepuffer (1 %) für 1 h auf Eis (oder 15 min bei RT) lysiert. Nach einer Zentrifugation bei 4 °C und 15000 upm für 30 min wurde das Sediment mit 500 µl Lysepuffer gewaschen, nochmals für 15 min wie zuvor zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Extraktion erfolgte dann durch Zugabe von 50 µl Lysepuffer unter Zusatz von 10 mM ATP und 12 mM. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 15000 upm wurde der Extrakt abgezogen und zur Analyse in einer SDS-Gelelektroporese mit Probenauftragspuffer versetzt.

3.5.1.3 Präparative Isolierung von Myosinkopffragmenten aus *D. discoideum*

Das im vorhergehenden Kapitel beschriebene Verfahren konnte mit entsprechenden Modifikationen zur präparativen Isolierung von Myosinkopffragmenten aus *D. discoideum* angewandt werden. Dabei wurde von 15-20 Litern einer Schüttelkultur von Myosinfragment überexpremierenden *D. discoideum* AX3-ORF$^+$ Zellen mit einer Zelldichte zwischen 6×10^6 und 1×10^7 Zellen/ml ausgegangen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1000 g geerntet und mit 1 Liter kalter PBS-Lösung, die 0,04 % NaN_3 enthielt, gewaschen. Die Zellen wurden in 4 Volumen Lysepuffer resupendiert. Infolge der hohen Proteasekonzentrationen innerhalb der Zellen wurden diesem Puffer verschiedene Proteaseinhibitoren hinzugegeben. Serinproteasen wie z.B. Trypsin und Chymotrypsin können durch die Zugabe von PMSF, Aspartatproteasen, wie z.B. Pepsin oder Renin, in Gegenwart von Pepstatin wirkungsvoll inhibiert werden; TAME dient als Substrat für die Proteasen Trypsin, Thrombin und Plasmin und TPCK für Trypsin und die Cysteinprotease Papain. Als weitere Inhibitoren wurden CBZ-Prolin-Alanin und Leupeptin zugegeben. Da hauptsächlich lysosomale Proteasen stören, kann durch milde Lysebedingungen das Zerstören der Lysosomen und somit die Freisetzung hoher Proteasekonzentrationen unterbunden werden. Dies wurde durch Zugabe von 2 Volumen Lysepuffer, der 1 % des Detergens Triton-X100 enthielt, nach einer Stunde auf Eis erreicht. Der Lyselösung wurden außerdem 15 mg/ml RNAse A, sowie 100 U alkalische Phosphatase hinzugegeben, um vorhandenes ATP zu hydrolysieren. Zur Unterstützung der Lyse wurde die Zellsuspension daraufhin 4-5mal für 5 s mit einem Ultraschallhomogenisator behandelt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 230 000 *g* für 60 min. Das Sediment wurde dann mit 60 bis 100 ml Extraktionspuffer (enthielt 7 mM Benzamidin) gewaschen und 45 min bei 230 000 *g* zentrifugiert.

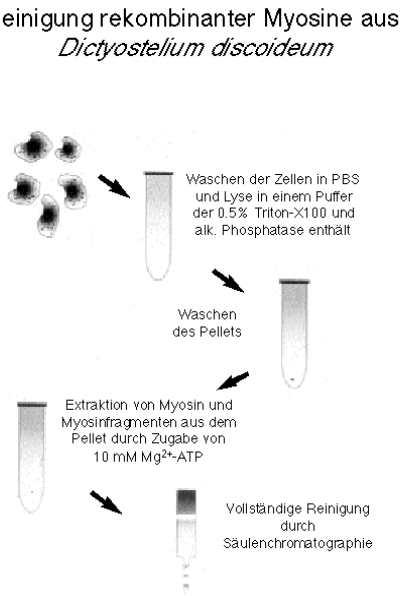


Abb. 3.1: **Schematische Darstellung des Verfahrens zur Isolierung von Myosinkopffragmenten.**

Die Extraktion des Myosinfragments aus dem Sediment, welches den unlöslichen Aktomyosinkomplex enthielt, erfolgte in 1,6 Volumen Extraktionspuffer mit 10 mM ATP mittels eines Dounce-Homogenisators. Die Suspension wurde 1h mit 500000 *g* bei 4 °C zentrifugiert. Die Extraktlösung, die das mit einem Poly-Histidinpeptid versehene Myosinfragment enthielt, wurde bei 4 °C mit einer Flußrate von 2 ml/min auf eine zuvor mit Niedrigsalzpuffer äquilibrierte Ni-NTA-Säule aufgetragen. Die Säule wurde aufeinanderfolgend mit Niedrigsalz-, Hochsalz- und Niedrigsalzpuffer, der 50 mM Imidazol enthielt, gewaschen, bis die Absorption des Durchflusses einen konstanten Wert erreicht hatte. Die Elution erfolgte mit einem linear aufsteigenden Imidazol-Gradienten von 50 mM bis 500 mM Imidazol mit einer Flußrate von 3 ml/min über 45 min. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 3 ml gesammelt und mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert. Fraktionen, die das reine Myosinfragment enthielten wurden vereinigt und über Nacht gegen 3-5 Liter Aufbewahrungspuffer dialysiert. Die Proteinlösung wurde auf eine Proteinkonzentration zwischen 5-25 mg/ml konzentriert, die mit der Bestimmung nach Bradford ermittelt wurde. Zur Aufbewahrung bei -80°C wurde die Proteinlösung mit 3% Trehalose oder Saccharose stabilisiert und in 100 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Lysepuffer:	50	mM	Tris, pH-Wert 8,0
	2	mM	EDTA
	0,2	mM	EGTA
	1	mM	DTT
	5	mM	Benzamidin
	0,02	%	NaN_3
	2	µg/ml	Pepstatin
	5	µg/ml	Leupeptin
	80	µg/ml	TPCK
	100	µg/ml	TAME
	2	mM	N-CBZ-Pro-Ala
	0,1	mM	PMSF
Extraktionspuffer:	50	mM	HEPES, pH-Wert 7,3
	30	mM	KAc
	10	mM	MgAc
	5	mM	Benzamidin
	0,1	mM	PMSF
Niedrigsalzpuffer:	50	mM	HEPES, pH-Wert 7,3
	30	mM	KAc
	5	mM	Benzamidin
Hochsalzpuffer:	50	mM	HEPES, pH-Wert 7,3
	300	mM	KAc
	5	mM	Benzamidin
Imidazol-Puffer:	500	mM	Imidazol, pH-Wert 7,3
	3	mM	Benzamidin
Aufbewahrungspuffer:	25	mM	HEPES, pH 7,3
	50	mM	KCl
	1	mM	$MgCl_2$
	0,5	mM	EDTA
	0,1	mM	EGTA
	1	mM	DTT
	3	mM	Benzamidin
	0,1	mM	PMSF
	3	%	Saccharose (Trehalose)

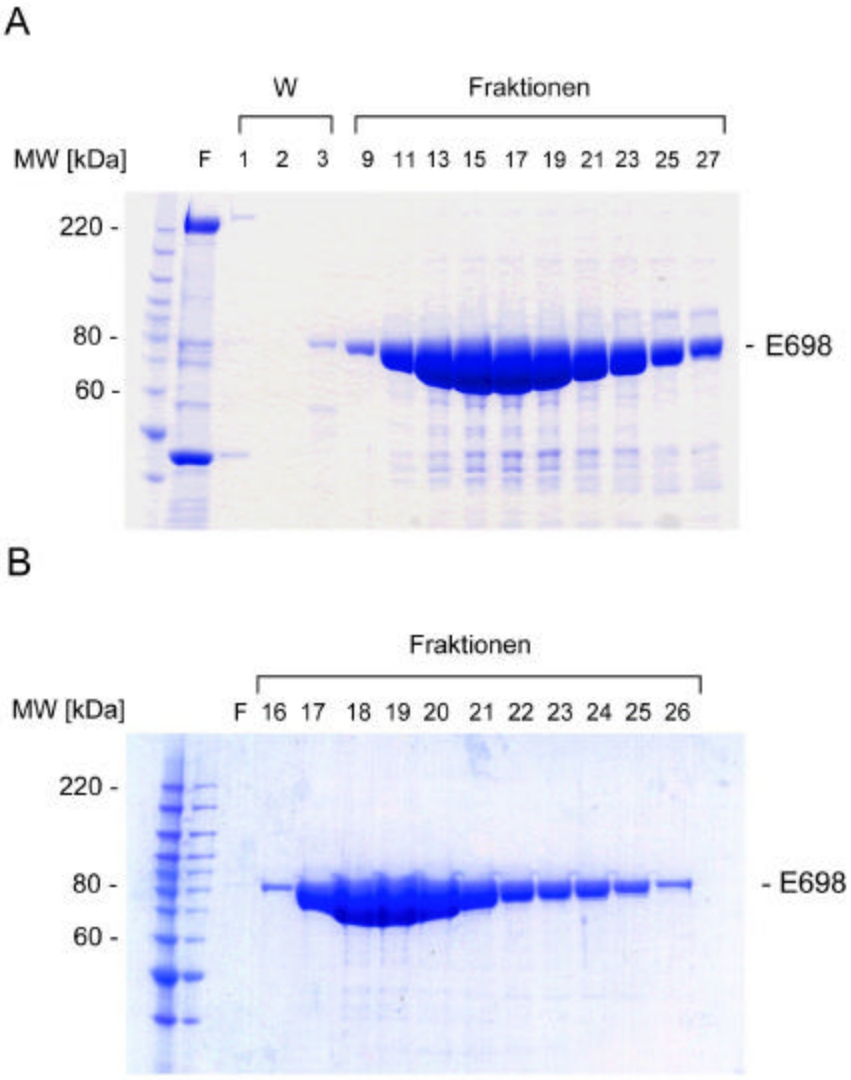


Abbildung 3.2: **SDS-Polyacrylamidgele nach verschiedenen Schritten der Isolierung von rekombinanten Myosin I-Kopffragmenten aus *D. discoideum*.** (A) Proteinfraktionen nach der Reinigung über Ni^{2+}-Ionen-Affinitätschromatographie. Der Überstand nach der Extraktion des Kopffragments aus dem Zellsediment mit ATP und Zentrifugation bei 500 000 g wurde auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen. (F) Durchfluß. Nach Reinigungsschritten mit steigender Salz- und Imidazolkonzentration (W1, W1, W3) wurde das rekombinante Myosin mit Imidazol von der Säule eluiert. Verschiedenen Fraktionen (9,11, usw.) wurden gesammelt und die enthaltenen Proteine durchSDS-PAGE und Färben mit Coomasie-Blau untersucht. (B) Proteinfraktionen nach der Reinigung über SP-Ionenaustauschchromatographie

3.5.2 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen nach ihrer Größe wurden SDS-Polyacrylamidgele verwendet (Laemmli, 1970). Eine gute Auflösung in dem Molekulargewichtsbereich zwischen 70 und 130 kDa wurde mit 10 %iger SDS-Polyacrylamidgelen

erhalten. Je nach Bedarf wurden entweder sogenannte Minigele mit einer Größe von ca. 5,5 × 8 cm für das Trenngel bzw. 2 × 8 cm für das Sammelgel oder Standardgele mit einer Größe von 12 × 17 cm für das Trenngel bzw. 3 × 17 cm für das Sammelgel eingesetzt. Deren Herstellung erfolgte durch radikalische Polymerisation des Acrylamids mit Quervernetzung durch N, N'-Methylenbisacrylamid.

Ansatz für 20 ml Trenngel (10 %):	6,7	ml	30%ige Acrylamid-Lösung
	5,0	ml	1,5 M Tris-HCl, pH-Wert 8,8
	0,2	ml	10%ige (w/v) SDS-Lösung
	7,9	ml	Wasser
Ansatz für 10 ml Sammelgel (5 %):	1,7	ml	30%ige Acrylamid-Lösung
	1,3	ml	1 M Tris-HCl, pH-Wert 6,8
	0,1	ml	10%ige (w/v) SDS-Lösung
	6,8	ml	Wasser

Die Komponenten wurden gemischt und die Polymerisation durch Zugabe von 8 µl TEMED und 0,2 ml 10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat-Lösung gestartet. Zur Vorbereitung der Proteinproben wurden diese mit Probenauftragspuffer versetzt. Es folgte eine Hitzedenaturierung bei 95 °C für 5 min im Heizblock. Die Gelelektrophorese der Minigele wurde bei einem konstanten Strom von 35 mA durchgeführt. Für Standardgele wurde eine konstante Stromstärke von 60 mA angelegt, was eine Anfangsspannung von 150 V ergab. Zur Molmassenabschätzung der Proteinbanden im Gel wurde als Größenstandard ein Gemisch von Markerproteinen eingesetzt. Die Proteinbanden in Polyacrylamidgelen wurden durch Inkubation in einer Coomassie-Färbelösung sichtbar gemacht. Polyacrylamidgele wurden mehrmalig für 20 bis 30 min in der Entfärbelösung geschwenkt, bis der Hintergrund weitgehend farblos und die Proteinbanden deutlich erkennbar waren. Nach dem Waschen in Wasser konnte das Gel in feuchtem Zustand photographiert werden. Anschließend wurde es in einer 3 %igen Glycerinlösung äquilibriert, mit der Geltrockenapparatur für 45 min auf 3MM Filter-Papier bei 70 °C im Vakuum getrocknet und in dieser Form aufbewahrt.

Probenauftragspuffer:	65	mM	Tris-HCl, pH-Wert 6,8
	10	% (v/v)	Glycerin
	100	mM	DTT
	2	% (w/v)	SDS
	0,01	% (w/v)	Bromphenolblau
Elektrodenpuffer:	25	mM	Tris
	192	mM	Glycin
	0,1	% (w/v)	SDS
30%ige Acrylamidlösung:	29,2	% (w/v)	Acrylamid
	0,8	% (w/v)	N,N'-Methylenbisacrylamid
Färbelösung:	0,25	% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R250
	9,20	% (v/v)	Essigsäure
	45,40	% (v/v)	Ethanol
	45,15	%	Wasser

Entfärbelösung:	10	% (v/v)	Essigsäure
	30	% (v/v)	Ethanol
	60	%	Wasser

3.5.3 Western-Blot

Durch die Western-Blot-Technik werden Proteinproben, die vorher durch eine SDSGelelektrophorese aufgetrennt wurden, elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Kyhse-Andersen, 1984). Der Nachweis der Proteine erfolgt dann durch Inkubation mit spezifischen Erst- und Zweitantikörpern und einer nachfolgenden Färbereaktion.

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde die Transfer-Einheit wie folgt zusammengebaut:

Anode der Apparatur
3MM-Filterpapiere, in Transferpuffer getränkt (3 Stück)
Nitrocellulosemembran, in Transferpuffer getränkt
Polyacrylamidgel
3MM-Filterpapiere, in Transferpuffer getränkt (3 Stück)
Kathode der Apparatur

Der elektrophoretische Transfer auf die Nitrocellulosemembran erfolgte 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 1,5 mA/cm² Gelfläche. Nach Beendigung des Transfers der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde die Membran zur Färbung der Proteinbanden für 5 min in eine Ponceau S-Färbelösung gelegt. Die Membran wurde zweimal mit Wasser gewaschen bis die Proteinbanden gut zu erkennen waren. Anschließend wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen 1 h bei RT TBST-MP inkubiert. Der Erstantikörper wurde in TBST-MP verdünnt und die Membran darin über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgten drei 10minütige Waschschritte mit TBST. Der Zweitantikörper wurde 1:10000 in TBST verdünnt und die Membran 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST gewaschen, kurz mit TBS gespült und für 10 min in TBS, das 1 M NaCl enthielt, inkubiert. Zum Schluß wurde dreimal 10 min mit TBS gewaschen. Die Detektion des Zweitantikörpers erfolgte mit Hilfe des ECL-Kits (Amersham) nach den Herstellerangaben.

Transferpuffer:	48	mM	Tris
	39	mM	Glycin
	0,037	% (w/v)	SDS
	8 %	(v/v)	Methanol
Ponceau S-Färbelösung:	0,2 %	(w/v)	PonceauS
	3 %	(w/v)	Trichloressigsäure
TBST-MP:	4 %	(w/v)	Milchpulver in TBST

3.5.4 Messung der Proteinkonzentration

3.5.4.1 Bestimmung der Myosinkonzentration nach Bradford

Zur Bestimmung der Myosinkonzentrationen wurden 50 µl der Proteinlösung mit 1 ml einer 25 %igen Bradford-Färbelösung (Bio-Rad, München) gemischt, 5 min inkubiert und die Absorption bei 595 nm im Spektralphotometer gemessen. Anhand einer Eichkurve, die mit verschiedenen Verdünnungen von BSA erstellt wurde, wurde dann die Proteinkonzentration ermittelt. Da die Anzahl der an das Protein gebundenen Coomassie Blue G-250 Moleküle proportional zur positiven Ladung des Proteins ist (Tal *et al.*, 1980), wurde unter Berücksichtigung der Anzahl an Arginin- und Lysinseitenketten im Myosin für Myosin II ein Korrekturfaktor von 1,5 verwendet.

3.5.4.2 Bestimmung der Myosinkonzentration durch Titration gegen ATP

Bei der genauen Bestimmung der Myosinkonzentration durch eine Titration gegen ATP wurde die Myosinlösung in einer Konzentration eingesetzt, die nach einer Bestimmung mit Bradford-Reagenz bei ungefähr 0,5 µM lag. Diese Lösung wurde in einem Stopped-Flow-Gerät mit ATP-Lösungen gemischt, deren Konzentrationen von 0,05 bis 3 µM reichten. Die Veränderung der intrinsischen Proteinfluoreszenz (siehe Kapitel 3.6) wurde aufgezeichnet. Die erhaltenen Daten wurden mit einer Exponentialfunktion ausgewertet und die Amplituden der Reaktionen wurden gegen die ATP-Konzentration aufgetragen. Die Schnittstelle von zwei Geraden durch die Daten ergibt die Myosinkonzentration.

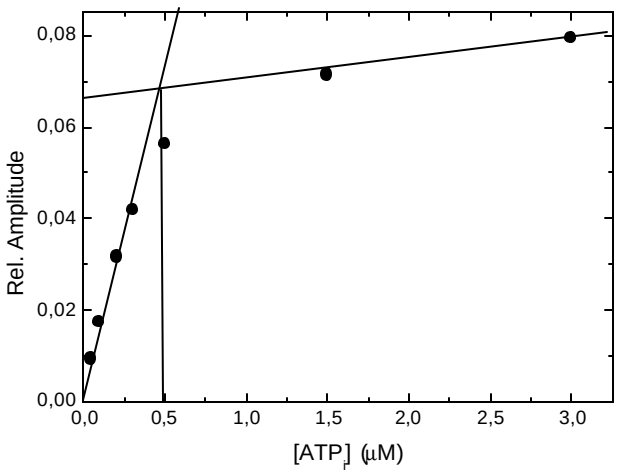


Abbildung 3.3: **Bestimmung der Myosinkonzentration durch Titration gegen ATP**. Dargestellt ist die Veränderung der relativen Amplitude der Fluoreszenzveränderung bei der Bindung von ATP an D692 in Abhängigkeit von verschiedenen ATP-Konzentrationen.

3.5.4.3 Photometrische Bestimmung der Aktin- und Pyren-Aktinkonzentration

Diese Methode erlaubt eine schnelle und einfache Abschätzung des Proteingehalts von Proben. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, daß die aromatischen Seitenketten der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin bei einer Wellenlänge von 280 nm ein

Absorptionsmaximum aufweisen (Layne, 1957). Unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes: $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$, mit E für die absorbierte Strahlung, c für die Konzentration in mol/l und d für die Schichtdicke der bestrahlten Lösung, kann bei bekanntem ε und d die Proteinkonzentration in der Lösung berechnet werden.

Der Extinktionskoeffizient einer 1 %igen Aktinlösung beträgt $\varepsilon^{1\%} = 11{,}08\ cm^{-1}$ (West *et al*, 1967). Es wurde ein Molekulargewicht von 42 kDa angenommen (Elzinga *et al.*, 1973). Die Absorption wurde im Bereich von 270 – 450 nm gegen Puffer als Referenz gemessen. Aufgrund der starken Lichtstreuung, die durch die Größe von Aktin hervorgerufen wurde, mußte eine Grundlinienkorrektur vorgenommen werden.

3.5.5 Konzentrierung von Proteinlösungen

Die Konzentrierung von Myosinlösungen erfolgte in Vivaspin-Konzentratoren mit geeigneter Ausschlußgrenze (Greiner, USA). Bei dieser Filtrations- und Anreicherungsmethode wird die einzuengende Flüssigkeit mittels Zentrifugation durch die Filtermembran gepreßt. Den Filter passieren nur Flüssigkeiten und darin gelöste Salze, während höhermolekulare Substanzen zurückgehalten werden. Die verwendeten Vivaspin-Konzentratoren hatten einen Filtereinsatz mit einem Ausschlußmolekulargewicht von 30 bzw. 50 kDa. Die Verwendung erfolgte nach den Herstellerangaben.

3.5.6 Farbstoffmarkierung

3.5.6.1 mant-markiertes ATP und ADP

Es wird eine Reihe von Nukleotiden verwendet, die durch fluorophore Gruppen an ihrem Ribosering markiert sind (Hiratsuka und Uchida, 1973; Hiratsuka, 1983). Die Synthese von mantATP wurde durch eine basenkatalysierte Veresterung von N-Methylisatosäure mit den 2‘- oder 3‘-OH Gruppen des Zuckers unter Freisetzung von CO_2 durchgeführt. In dem erhaltenen Produktgemisch aus 2‘- und 3‘-modifiziertem Nukleotid stehen beide Isomere in einem schnellen Gleichgewicht (Cremo *et al.*, 1990).

Bei der Synthese wurden 0,2 mmol ATP beziehungsweise ADP in 3 ml Wasser gelöst, auf 38 °C erwärmt und mit 0,1 M KOH auf den pH-Wert 9,6 eingestellt. 0,6 mmol N-Methylisatosäure wurden unter Rühren zugegeben. Während der 3-4 stündigen Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1 M KOH die Reaktionslösung ständig auf pH 9,6 gehalten. Nach Beendigung der Reaktion wurde mit Chloroform extrahiert (1 ml $CHCl_3$ pro mmol AXP) und die wäßige Phase nach Einstellen des pH-Wertes auf 7,5 auf eine Q-Sepharose-Säule, preäquilibriert mit 0,15 M TBK-Puffer, aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0,15-0,4 M TBK-Puffer (Gradientenvolumen 2 l). Die Produktfraktionen wurden im Vakuum unter mehrmaliger Zugabe von MeOH bei max. 40 °C eingeengt.

TPK-Puffer: in eine eisgekühlte, wäßrige 2 M Lösung von TE wurde CO_2 eingeleitet, bis der pH-Wert 7,5 betrug.

3.5.6.2 TNP-markiertes ATP

Dieses ATP-Analogon konnte von Molecular Probes bezogen werden. Die Synthese erfolgte durch eine nukleophile Substitution an dem durch drei Nitrogruppen aktivierten 2,4,6-Trinitrobenzol-1-sulfonat. Das Nukleotid liegt in einem pH-abhängigen Gleichgewicht zwischen den in Abbildung 3.4 dargestellten Strukturen vor (pKa 5,1).

3.5.6.3 Pyren-markiertes Aktin

Pyren-markiertes F-Aktin (Pyren-Aktin) wurde nach einer Methode von Criddle *et al.* (1985) hergestellt. Eine 1 mg/ml konzentrierte F-Aktinlösung wurde mit N-(1-pyrenyl)iodoacetamid (5 mg/ml in DMF) in einem Verhältnis von ca. 0,8 % (v/v) Pyren/Aktin unter Rühren versetzt. Die Lösung wurde 14 h bei RT im Dunkeln gerührt. Überschüssiger Farbstoff wurde daraufhin bei 8000 upm 1h bei 4 °C abzentrifugiert. Das erhaltene Aktinsediment wurde dann im experimentellen Puffer aufgenommen und gegen diesen über Nacht dialysiert. Um eventuell vorhandene Feststoffe zu entfernen, wurde das Dialysat 5 min bei 13000 upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert.

Die Konzentration von Pyren-Aktin wurde wie die von unmarkiertem Aktin bestimmt, wobei jedoch zusätzlich die Absorption von Pyren bei 280 nm berücksichtigt werden mußte. Dazu wurde zunächst die Pyren-Konzentration am Absorptionsmaximum bei 344 nm (ε_{344} = $2{,}33 \cdot 10^4$ $M^{-1}cm^{-1}$) bestimmt (Kouyama und Mihashi, 1981). Daraufhin konnte mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten bei 280 nm $\varepsilon_{280} = 2{,}2 \cdot 10^4$ $M^{-1}cm^{-1}$ (Criddle *et al.*, 1985) die Pyren-Absorption bei 280 nm errechnet und von der Gesamtabsorption subtrahiert werden. Der Anteil an markiertem Aktin lag zwischen 90-100 %.

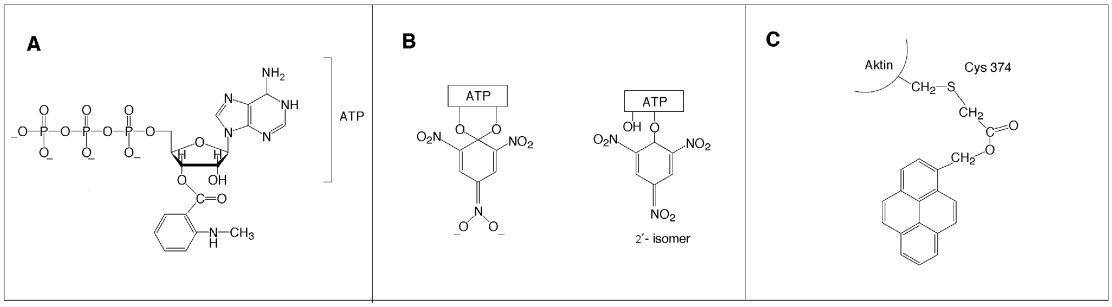


Abb. 3.4: Strukturformeln der verwendeten Farbstoffmoleküle. (A) 3'-*N*-methylanthraniloyladenosin-triphosphat. Dieses Isomer steht in einem 40:60 Verhältnis zur 2'-isomeren Form. $\lambda_{max,ex}$ 364 nm, $\lambda_{max,em}$ 450 nm (B) 2',3'-*O*-(2,4,6-Trinitrocyclohexadienyl)adenosin-5'-triphosphat TNP $\lambda_{max,ex}$ 406 nm, $\lambda_{max,em}$ 560 nm, (C) Pyren-Aktin $\lambda_{max,ex}$ 364 nm, $\lambda_{max,em}$ 407 nm

3.5.7 Phosphorylierung von Myosinen I mit MIHCK

Um die Myosin I-Proteinkonstrukte zu phosphorylieren wurde eine Myosin I-Kinase aus *A. castellanii* verwendet (Brzeska *et al.*, 1999). Diese wurde durch FLAG-Affinitätschromatographie isoliert. Die Konzentration des Enzyms betrug 0,54 mg/ml in

einem Puffer aus 50 mM NaCl, 50 % Glycerin, 10 mM Tris, pH-Wert 7,5 und 1 mM DTT. Die Autophosphorylierung der Kinase erfolgte durch Mischen gleicher Volumina an Kinase und Autophosphorylierungspuffer und einer Inkubation der Mischung 20 min bei 30 ºC. Danach wurden jeweils 0,5 mg der Myosinkonstrukte mit 10 µl der aktivierten Kinase 15-20 min in Phosphorylierungspuffer bei 30 ºC inkubiert.

Autophosphorylierungspuffer:	2	mM	EGTA
	100	mM	Imidazol, pH-Wert 7,0
	6	mM	$MgCl_2$
	4	mM	ATP
Phosphorylierungspuffer:	2	mM	ATP
	3	mM	$MgCl_2$
	30	mM	Imidazol, pH-Wert 7,0
	1	mM	EGTA
	bis 100	mM	NaCl

3.5.8 Dephosphorylierung von Myosinen I mit ?-Phosphatase

Die Dephosphorylierung von Myosinen I mit ?-Phosphatase (Biolabs) erfolgte nach den Herstellerangaben für 30 min bei 30 °C in ?-Phosphatase-Puffer.

?-Phosphatase-Puffer:	50	mM	Tris-HCl, pH-Wert 7,5
	0,1	mM	EDTA
	5	mM	DTT
	0,01	%	Brij 35
	2	mM	$MnCl_2$

3.6 Biophysikalische Methoden

3.6.1 Stopped-Flow-Messungen

Um Geschwindigkeiten chemischer Reaktionen bestimmen zu können, muß die zeitliche Änderung der Konzentration eines oder mehrerer Reaktionsteilnehmer gemessen werden. Entscheidend ist dabei, die Ausgangsstoffe möglichst schnell und homogen zu durchmischen, denn hierdurch werden die Anfangsbedingungen der kinetischen Gleichung festgelegt, durch die die jeweilige Reaktion beschrieben wird. Bei langsamen Reaktionen mit Halbwertszeiten von mindestens einigen Sekunden genügen konventionelle Fluoreszenzspektrometer, wie das SLM 8000 (SLM Instruments, USA). Die Reaktionslösung befindet sich dabei in einer 1 ml Quarzküvette und die Reaktion wird durch Zugabe eines Reaktanden gestartet. Durch Subtraktion des Pufferspektrums werden das Untergrundrauschen auch die Ramanstreuung in den Anregungs- und Emissionsspektren korrigiert.

Zur Untersuchung schneller Reaktionen mit Halbwertszeiten unter 1 s wurden besondere Methoden entwickelt, die sich in zwei Techniken unterscheiden lassen:

1. Schnelle Mischmethoden, zu denen die *continous-flow*, *stopped-flow* und *quenched-flow*-Methode gehören.
2. Relaxationsmethoden, zu denen Temperatursprung-, Drucksprung-, Konzentrationssprung-, elektrischer Feldsprung- und kernmagnetische Resonanzverfahren gehören

Im folgenden wird die in dieser Arbeit angewandte Stopped-Flow-Technik erläutert (Chance *et al*, 1964; Eccelston, 1987): Ein Stopped-Flow-Gerät ist ein Spektrometer mit einer zusätzlichen Einheit, die ein schnelles Mischen der Reaktanden zuläßt. Die Apparatur ist schematisch in der Abbildung 3.5 dargestellt.

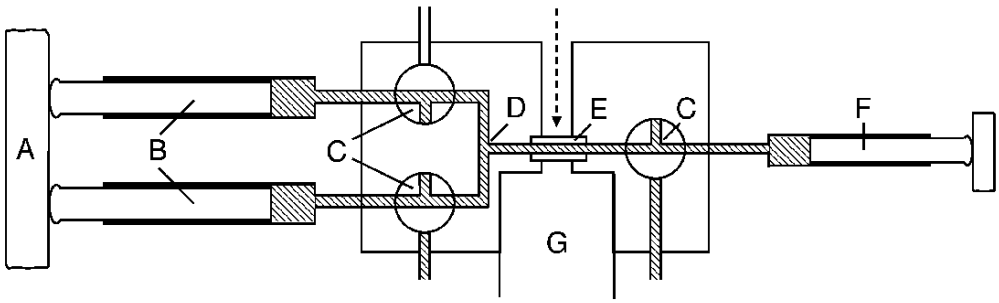


Abb. 3.5: **Schematische Darstellung einer Stopped-Flow-Apparatur.** Erläuterungen befinden sich im Text.

Zwei Spritzen (B) werden aus Vorratsgefäßen mit den Reaktanden befüllt. Der Fluß zu oder aus diesen Spritzen wird durch Teflon-3-Wege-Ventile (C) kontrolliert. Die Spritzenstempel werden synchron mittels eines pneumastischen Antriebs (A) bewegt. Die Druckluft drückt die Reaktanden in die Mischkammer (D) und von dort weiter in die Meßzelle (E). Bei dem verwendeten Gerät SF61-DX (Hi-Tech Scientific) handelte es sich um eine Quarzzelle mit einem 10 mm Excitationsweg und einem Emissionsfenster von 10 × 1,5 mm^2. Der Fluß der Reaktionslösung wird schließlich in der Stoppspritze (F) beendet. Der Kolben der Spritze löst bei diesem Vorgang über einen Mikroschalter die Aufzeichnung des Signals aus. Ein externes Wasserbad erlaubt es, sowohl die Spritzen, als auch die Misch- und Messzellen zu temperieren. Die Auflösungsgrenze wird durch die Totzeit, was die Zeit zwischen dem Mischen der Lösungen und dem Auslösen der Aufzeichnung ist, bestimmt. Sie liegt bei dem verwendeten Instrument bei etwa 2 ms.

Als optisches Signal wurde die zeitliche Änderung der extrinsischen oder intrinsischen Fluoreszenz eines Reaktanden während der Reaktion verfolgt. Als Lichtquelle diente dazu eine 75 W Xe/Hg-Lampe. Das emittierte Licht wurde durch einen Monochromator und einen Quarz-Lichtleiter zur Beobachtungszelle geleitet. Hier wurde das Licht zur Anregung einer

spezifischen Fluoreszenz genutzt. Das von dem Fluorophor emittierte Licht wurde mit Hilfe eines geeigneten Filters von der Anregungsstrahlung getrennt und über einen Photomultiplier detektiert (G). Für die Tryptophanfluoreszenz bedeutete wurde ein WG320-Filter verwendet, der nur Licht oberhalb von 320 nm durchläßt. Es wurde das eingestrahlte Licht (295 nm) herausgefiltert und nur das emittierte Licht bei 348 nm vom Photomultiplier detektiert. Die Fluoreszenz von Pyren-Aktin und die der mant-Nukleotide wurde bei 365 nm angeregt und das Emissionslicht nach Durchgang durch einen KV389-Filter aufgezeichnet. Die Fluoreszenz von TNP-ATP kann bei 406 nm angeregt und durch einen OG450-Emissionsfilter beobachtet werden.

Das Signal des Photomultipliers wurde elektronisch gefiltert (die verwendete Zeitkonstante betrug üblicherweise 5 % der Halbwertszeit der Reaktion) und von einem Computer aufgezeichnet. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses der Messungen wurden mindestens fünf Einzelmessungen pro Datenpunkt durchgeführt und gemittelt. Jeder Mischvorgang erforderte 50 µl jeder der beiden Lösungen. Die Reaktanden werden im Verhältnis 1:1 gemischt wobei sich ihre Konzentrationen beim Mischen also halbieren. Die Auswertung der Messungen mit Exponentialfunktionen wurde mit der Software von Hi-Tech Scientific durchgeführt.

3.6.2 Steady State-ATPase-Messung

Während der Umsetzung von ATP zu ADP durch Myosin bleiben die spektralen Eigenschaften von Edukten und Produkten unverändert. Aus diesem Grund muß dieser Prozess an eine Indikatorreaktion gekoppelt werden, die zum Verbrauch oder zur Bildung von chromophoren Produkten führt. Eine grundlegende Voraussetzung hierfür ist, daß keiner der sekundären Reaktionsschritte geschwindigkeitsbestimmend ist, sondern die Gesamtgeschwindigkeit durch den zu untersuchenden Reaktionsschritt limitiert wird.

In dieser Arbeit wurde ein kontinuierliches Testsystem verwendet. Die Bildung von ADP wurde über folgendes Hilfsenzymsystem an die spektroskopisch verfolgbare NADH-Oxidation gekoppelt (Berghäuser, 1975):

$$\mathrm{ATP} \xrightleftharpoons{\mathrm{M}} \mathrm{ADP} + \mathrm{P_i}$$

$$\mathrm{ADP} + \mathrm{PEP} \xrightleftharpoons{\mathrm{PK}} \mathrm{ATP} + \mathrm{Pyruvat}$$

$$\mathrm{Pyruvat} + \mathrm{NADH} \xrightleftharpoons{\mathrm{LDH}} \mathrm{Lactat} + \mathrm{NAD^+}$$

Abb. 3.6: Schematische Darstellung der ATPase-Messung. M steht für ein Myosinkopffragment, PEP für Phosphoenolpyruvat, PK für Pyruvatkinase und LDH für Laktatdehydrogenase.

Der Verlauf dieser Oxidation ist mit der Abnahme der NADH-Absorption bei 340 nm verbunden und konnte in einem Photometer (Beckmann 65) beobachtet werden. In der Abbildung 4.14 wird eine typische Aufnahme der Absorptionsabnahme am Beispiel von 1 µM D692 und 1 mM ATP gezeigt. Die lineare Kurvenanpassung an die stationäre Phase der zeitlichen Absorptionsänderung wurde mit der Software von Beckmann durchgeführt. Die Werte der ermittelten Steigung waren linear von der eingesetzten Myosinkonzentration im untersuchten Bereich von 0,5-2 µM abhängig. Die Werte der Steigungen wurden in die Einheit (s^{-1}) umgerechnet.

Die Messungen erfolgten bei 25 °C. Dabei wurde die ATP-haltigen Testlösung in einer Quarzküvette vorgelegt. Durch Zugabe des Myosinkopffragments in einer Konzentration zwischen 0,25 und 2 µM wurde die Reaktion gestartet und der Umsatz von NADH durch Absorptionsabnahme bei einer Wellenlänge von 340 nm wurde über 200-1000 s verfolgt. Um die Aktinaktivierung der Hydrolyse von ATP durch Myosin (k_{cat}) zu bestimmen, wurden die Messungen mit steigenden Konzentrationen an Aktin in einem Bereich von 0-60 µM durchgeführt.

Testlösung:	25	mM	HEPES, pH-Wert 7,4
	25	mM	KCl
	4	mM	$MgCl_2$
	0,5	mM	DTT
	0,5	mM	ATP
	0,2	mM	NADH
	0,5	mM	PEP
	0,02	mg/ml	LDH
	0,05	mg/ml	PK

3.6.3 *In vitro* Messung der Bewegung von Aktinfilamenten

Zur Bestimmung der Geschwindigkeit, mit der Aktinfilamente *in vitro* von Myosin bewegt werden, wurde nach einem Protokoll von Anson *et al.* (1992) verfahren. Die Durchführung des Versuchs erfolgte in einer transparenten Durchflußzelle. Dazu wurde ein 22 mm × 50 mm × 0,15 mm Deckglas über Abstandshalter kontaktfrei auf einem Objektträger befestigt. Zur besseren Haftung der Myosinkonstrukte auf der Glasoberfläche des Deckglases wurde diese mit einer Nitrocellulosemembran beschichtet. Dafür wurden 2 Tropfen einer Lösung von 1 % (v/v) Pyroxylin in 1 N Essigsäure-N-amylester vorsichtig auf die Wasseroberfläche einer randvoll gefüllten Becherschale mit einem Durchmesser von 14 cm gegeben. Die Wasseroberfläche wurde zuvor mit einem Parafilmstreifen, der langsam über die Wasserschicht gezogen wurde, von Staubpartikeln befreit. Nach etwa 30 min hatte sich ein homogener Film auf der Oberfläche ausgebildet. Während dieser Inkubationszeit wurde die Schale zum Schutz vor Verunreinigungen mit einem großen Becherglas überdeckt. Auf die so vorbereitete Nitrocellulose-Fläche wurden Deckgläser für einige Minuten gelegt und danach mit einer Pinzette aus dem Filmverband gelöst. Die beschichteten Deckgläser wurden für 2 h bei RT getrocknet und innerhalb von 12 h benutzt. Zur Konstruktion der Durchflußzelle wurden aus einem Deckglas zwei schmale Abstandshalter geschnitten (22 mm × 3 mm × 0,15

mm) und mit Schliffett parallel auf einem Objektträger plaziert. Darauf wurde ein mit Nitrocellulose beschichtetes Deckglas mit der Filmseite nach unten befestigt. Auf diese Weise hergestellte Durchflußzellen hatten einen etwa 22 mm langen, 12 mm breiten und 0,15 mm hohen Kanal mit einem Volumnen von ca. 40 µl.

Frisch isolierte Myosin-Konstrukte wurde in einer Konzentration von 40 µg/ml in AB-Puffer aufgenommen. Wurde ein Myosin untersucht, mußte die KCl-Konzentration auf 600 mM erhöht werden, um eine ausreichende Löslichkeit des Proteins zu erreichen. Nach Zugabe von 5 mg/ml F-Aktin und 5 bis 10 mM ATP, wurde 10 min mit 100000 upm bei 4 ºC in einer Beckmann Ultrazentrifuge zentrifugiert. Dadurch wurde nicht-funktionelles Myosin, das durch ATP nicht dissoziiert wird, entfernt. Die Durchflußzelle wurde in einem Neigungswinkel von etwa 30 º auf ein Filterpapier gestellt und mit 50 µl Myosin-haltiger Lösung durch den oberen Kanaleinlaß befüllt. Eine zweite Infusion erfolgte nach Drehen der Zelle um 180 º. Der Durchfluß der Lösung durch den Kanal wird durch Gravitation und Oberflächenspannung bewirkt. Nach 120 s wurde zur Blockierung verbliebener freier Bindungsstellen mit 100 µl 0,5 mg BSA in AB-Puffer gewaschen. Nach 60 s erfolgte ein weiterer Blockierungsschritt nicht-funktioneller Myosinköpfe durch Zugabe von 2 µM unmarkiertem F-Aktin in AB-Puffer, welches nach weiteren 60 s mit 2 mM ATP in BSA/AB-Puffer ausgewaschen wurde. Es wurde mehrmals mit BSA/AB-Puffer gewaschen, um ATP zu entfernen. Daraufhin konnte Rhodamin-Phalloidin- (RhPh-) markiertes F-Aktin (10-15 nm/AB-Puffer) im Rigor-Zustand binden. F-Aktin wurde über Nacht in einer 100 µM RhPh-Markierungslösung (0,1 mg RhPh in 750 µl MeOH) inkubiert. 100 µl dieser Lösung wurden daraufhin in 3 ml AB-Puffer verdünnt. Zu dieser 3 µM RhPh-Lösung wurde F-Aktin in einer Konzentration von 1- 2 µM hinzu gegeben und über Nacht im Dunkeln auf Eis inkubiert. 100 µl dieser Lösung wurden für 2 min in die Durchflußzelle gegeben und danach mit BSA/AB-Puffer gewaschen. Bis zur videomikroskopischen Untersuchung wurde die Zelle mit 100 µl BSA/AB-Puffer befüllt, dem zur Verminderung des Bleicheffekts zusätzlich pro ml 100 µg Glukoseoxidase, 18 µg Katalase, und 3 mg Glukose beigegeben wurde (Kishino und Yanagida, 1988).

AB-Puffer:	25	mM	HEPES, pH-Wert 7,5
	25	mM	KCl
	4	mM	$MgCl_2$
	5	mM	DTT
	1	mM	EGTA

Die Aktinbewegung wurde durch Zugabe von 100 µl der Antibleich-Lösung, die 2 mM ATP enthielt, gestartet und anhand der Rh/Ph-Fluoreszenz unter einem Zeiss Axiovert 135-Mikroskop durch 100× Objektiv (NA 1,3) (Zeiss) beobachtet. Die Reaktionstemperatur entsprach einer Raumtemperatur von 30 ºC. Die Rh/Ph-Fluoreszenz wurde durch grünes Licht (515 bis 560 nm) einer 100 W HBO Hg-Bogenlampe angeregt und oberhalb 590 nm beobachtet (Chroma Filterset). Videosequenzen wurden mit einer Photonocs Science Darkstar-Videokamera und einem Argus 20-Bildprozesor (Hamamatsu Photonics) aufgezeichnet.

3.7 Mikroskopische Methoden

3.7.1 Fixierung von *D. discoideum* Zellen

Die Fixierung der Zellen erfolgte durch Gefriersubstitution (Neuhaus *et al.*, 1998). Eine Zellsuspension mit einer Dichte von 2 x 10^6 bis 4 x 10^6 Zellen/ml in HL5c-Medium wurde auf Saphir-Deckgläser der Stärke 0 mit einem Durchmesser von 12 mm gebracht, worauf sich die Zellen innerhalb von 15 min anheften. Die Deckgläser wurden in HL5c-Medium gewaschen und zur Fixierung in Methanol, der auf -85 °C vorgekühlt war, überführt. In einem temperierbaren Gefäß wurden die Proben dann innerhalb von 30 bis 45 min von -85 °C auf -35 °C aufgewärmt. Bei dieser Behandlung wurden die Proteine durch Präzipitation fixiert und gleichzeitig die Plasmamembran für die anschließende Immunfluoreszenzfärbung permeabilisiert. Die Proben wurden aus dem Methanol genommen bei Raumtemperatur in PBS gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde 5 min in PBS-BSA (3 % (w/v) BSA in PBS) inkubiert.

3.7.2 Immunfluoreszenzfärbung von fixierten *D. discoideum* Zellen

Fixierte *D. discoideum* Zellen wurden mit einem Erstantikörper inkubiert. Der Antikörper-Antigen-Komplex wurde dann fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht, indem ein Zweitantikörper zugegeben wurde, der an den ersten Antikörper bindet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Die Deckgläser wurden in der Erstantikörperlösung 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit der Zweitantikörperlösung für 20-30 min. Danach wurden die Proben dreimal mit PBS gewaschen und zur Entsalzung mehrmals in Wasser getaucht, bevor sie in dem Einbettmedium auf Objektträgern fixiert wurden.

Einbettmedium: ProLong™ Mounting Medium (Molecular Probes), welches nach Herstellerangaben vor der Benutzung mit dem ProLong™ Antifade Reagenz (Molecular Probes) gemischt wurde.

3.7.3 Mikroskopie und Bildbearbeitung

Für die Epifluoreszenz-Mikroskopie von lebenden *D. discoideum* Zellen wurden diese in MES-Puffer gewaschen und in einer geeigneter Dichte in Borosilikatkammern (Lab-Tek®-Kammern von NalgeNunc) oder auf Deckgläser überführt. Die Epifluoreszenz-Aufnahmen wurden an einem Olympus IX 70-Mikroskop mit einem Zeiss 100 x Plan-Apochromat-Objektiv (NA 1,4) durchgeführt. Daran angeschlossen war eine 12-Bit CCD-Kamera Imago S-V6A (TILL Photonics, Martinsried). Die Steuerung der Kamera, des Monochromators und des Shutters sowie die Bildanalyse erfolgten mit dem Programm TILLvisION, Version 4 (TILL Photonics, Martinsried).

Die konfokalen Mikroskopieaufnahmen von fixierten Zellen erfolgten an einem Leica TCSSP2-Konfokalmikroskop mit einem Zeiss 63x Plan-Apochromat-Objektiv (NA 1,32). Konfokale optische Schnitte wurden mit einer Schrittweite von 0,2 bis 0,4 µm und 8facher Mittelung angefertigt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit dem Programm Imaris, Version 2.7 (Bitplane, Zürich).

4 Ergebnisse

4.1 Übersicht über die verwendeten Proteinkonstrukte

Für die Charakterisierung der zellulären Lokalisierung und der Motoreigenschaften der Myosine der Klasse I aus *D. discoideum* wurden verschiedene, rekombinante Proteinkonstrukte verwendet, die in der Abbildung 4.1 schematisch dargestellt sind.

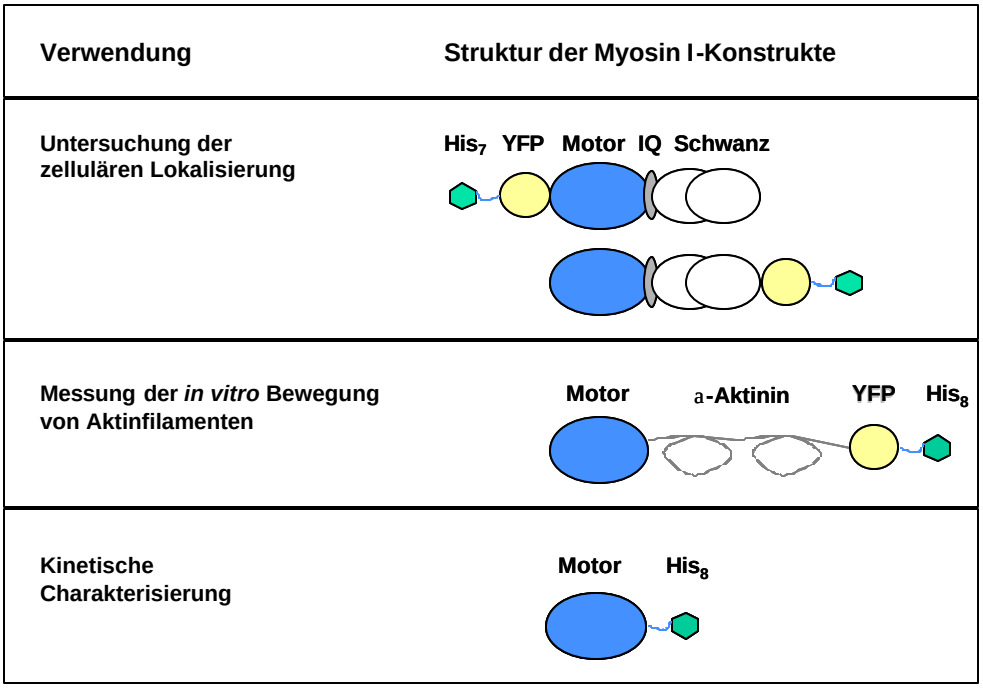


Abbildung 4.1: **Schematische Darstellung der verwendeten Myosin I-Proteinkonstrukte.** Für die Untersuchung der zellulären Lokalisierung wurden die Myosine I mit YFP (gelb) fusioniert. Die *in vitro* Messungen der Bewegung von Aktinfilamenten wurden mit rekombinanten Proteinkonstrukten durchgeführt, bei denen an die Motordomäne des Myosins carboxyterminal zwei Untereinheiten des Proteins α-Aktinin angefügt wurden, die als künstlicher Hebelarm dienen können. Für die kinetische Charakterisierung der Myosine I konnten Proteinfragmente verwendet werden, die der Motordomäne des Myosins (blau) entsprechen. Das Peptid aus sieben oder acht Histidinen (grün) ermöglicht die Isolierung der Proteine über Ni-NTA-Affinitätschromatographie.

Alle Plasmide, die zur Expression der Myosin I-Konstrukte verwendet wurden, sind in der Tabelle 4.1 aufgeführt. Ihre Herstellung ist im folgenden und ausführlich im Methodenteil in Kapitel 3.4 beschrieben.

Tabelle 4.1: **Übersicht über die verwendeten Expressionsplasmide**

Plasmid	Exprimiertes Protein	Eigenschaften des Proteins
pMB-01	B698[a]	MyoB-Kopffragment
pMB-02	YFP-MyoB[b]	MyoB mit aminoterminalem YFP
pMB-03	B698-2R[a]	MyoB-Kopffragment mit zwei α-Aktinin-Untereinheiten und YFP
pMB-04	B698S332E-2R[a]	MyoB-Kopffragment mit der Mutation S332E, zwei α-Aktinin-Untereinheiten und YFP
pMB-05	MyoB[b]	MyoB
pMB-06	MyoBS332E[b]	MyoB mit der Mutation S332E
pMB-07	B698S332E[a]	MyoB-Kopffragment mit der Mutation S332E
pMB-08	B698S332A[a]	MyoB-Kopffragment mit der Mutation S332A
pMB-09	B698S332A-2R[a]	MyoB-Kopffragment mit der Mutation S332A, zwei α-Aktinin-Untereinheiten und YFP
pMB-10	MyoB-YFP[a]	MyoB mit carboxyterminalem YFP
pMD-01	D692[a]	MyoD-Kopffragment
pMD-02	YFP-MyoD[b]	MyoD mit aminoterminalem YFP
pMD-03	D692-2R[a]	MyoD Kopffragment mit zwei α-Aktinin-Untereinheiten und YFP
pMD-04	D692S332A-2R[a]	MyoD-Kopffragment mit der Mutation S332A, zwei α-Aktinin-Untereinheiten und YFP
pMD-05	D692S332E-2R[a]	MyoD-Kopffragment mit der Mutation S332E, zwei α-Aktinin-Untereinheiten und YFP
pMD-06	MyoD[b]	MyoD
pMD-07	MyoDS332E[b]	MyoD mit der Mutation S332E
pMD-08	D692S332E[a]	MyoD-Kopffragment mit der Mutation S332E
pMD-09	D692S332A[a]	MyoD-Kopffragment mit der Mutation S332A
pMD-10	MyoD-YFP[a]	MyoD mit carboxyterminalem YFP
pME-01	E698[a]	MyoE-Kopffragment
pME-02	YFP-MyoE[b]	MyoE mit aminoterminalem YFP
pME-03	E698-2R[a]	MyoE-Kopffragment mit zwei α-Aktinin-Untereinheiten und YFP
pME-04	E698S334A-2R[a]	MyoE-Kopffragment mit der Mutation S334A, zwei α-Aktinin-Untereinheiten und YFP
pME-05	E698S334E-2R[a]	MyoE-Kopffragment mit der Mutation S334E, zwei α-Aktinin-Untereinheiten und YFP
pME-06	MyoE[b]	MyoE
pME-07	MyoES334E[b]	MyoE mit der Mutation S334E
pME-08	E698S334E[a]	MyoE-Kopffragment mit der Mutation S334E
pME-09	E698S334A[a]	MyoE-Kopffragment mit der Mutation S334A
pME-13	MyoE-YFP[a]	MyoE mit carboxyterminalem YFP

Die Klonierung der Expressionsplasmide ist ausführlich im Methodenteil in Kapitel 3.4 beschrieben.

[a] Das Protein enthält ein carboxyterminales Peptid aus acht Histidinresten

[b] Das Protein enthält ein aminoterminales Peptid aus sieben Histidinresten

Für die Visualisierung der zellulären Verteilung mit Fluoreszenzmikroskopie wurden die Myosine mit YFP (Yellow Fluorescent Protein) versehen. Dabei wurden von jedem der Proteine zwei verschiedene Konstrukte hergestellt, bei denen sich YFP entweder am Amino- oder am Carboxyterminus des Myosins befand. Die rekombinanten Proteine werden entsprechend der Stelle der Fusion mit dem Fluoreszenzmarker zum Beispiel als YFP-MyoB oder MyoB-YFP bezeichnet. Zur Expression der rekombinanten Proteine in *D. discoideum* wurden Plasmide kloniert, denen die Vektoren EYFP-pDXA oder pDXA-EYFP (Knetsch und Manstein, Manuskript in Vorbereitung) zu Grunde lagen. Mit diesen Plasmiden werden die Proteine unter Kontrolle des Aktin 15-Promotors exprimiert.

Um für die Messungen zur Charakterisierung der Motoreigenschaften der Klasse I-Myosine ausreichende Proteinmengen zur Verfügung zu haben, wurden zuerst verschiedene Plasmide hergestellt, mit denen die Myosine I in *D. discoideum* überexprimiert werden sollten. Da jedoch das Expressionsniveau der Gesamtproteine auch bei der Verwendung von extrachromosomalen Expressionplasmiden sehr gering war, wurden in den Versuchen funktionelle Proteinfragmente eingesetzt.

Für die *in vitro* Messung der Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten durch Myosin II aus *D. discoideum* wurden bereits rekombinante Proteinkonstrukte verwendet, bei denen an die Motordomäne des Myosins carboxyterminal zwei Untereinheiten des Proteins α-Aktinin angefügt waren (Anson *et al.*, 1996). Jede α-Aktinin-Untereinheit besteht aus etwa 120 Aminosäureresten und hat eine superspiralisierte Struktur aus drei α-Helices. Diese bildet eine sehr dichte und stabile Einheit von etwa 6 nm Länge (Parry *et al.*, 1992; Kliche *et al.*, 2001). Die α-Aktinin Untereinheiten können daher als künstlicher Hebelarm für die Krafterzeugung bei einer Bewegung des Proteinkonstrukts entlang Aktin dienen. Zusätzlich ermöglichen sie eine stabile Haftung der Myosinkonstrukte an einer Substratoberfläche und eine Orientierung der Motordomäne, die Bewegungsvorgänge erlaubt. Vergleichbare Proteinkonstrukte wurden daher für die *in vitro* Motilitätsversuche mit den Myosinen der Klasse I hergestellt. Ein weiterer Vorteil der verwendeten Konstrukte liegt darin, daß durch das Verkürzen der Proteine die zweite Aktinbindungsstelle entfällt, die in den Schwanzdomänen der längeren Isoformen, MyoB und MyoD, enthalten ist und bei den Messungen zu einer störenden Quervernetzung der Aktinfilamente führen kann. Die Proteinkonstrukte wurden am Carboxyterminus mit YFP markiert, um einen Nachweis mit Fluoreszenzmikroskopie zu ermöglichen. Sie werden mit dem Namen des Myosins, der Stelle der letzten Aminosäure der schweren Kette und der Abkürzung 2R für die beiden Untereinheiten von α-Aktinin zum Beispiel als D692-2R bezeichnet. Bei der Herstellung der Expressionsplasmide wurde das Plasmid pM790-2R-EYFP (Knetsch und Manstein, Manuskript in Vorbereitung) als Vektor verwendet. Dieser Vektor besitzt Sequenzen, über die an das exprimierte Protein am Carboxyterminus ein Peptid aus acht Histidinresten anfügt wird, das die Isolierung über Affinitätschromatographie an einer Chelatmatrix mit Ni^{2+}-Ionen ermöglicht.

Die kinetische Charakterisierung der Myosine I wurde mit Proteinfragmenten, die der katalytischen Motordomäne des Myosins entsprechen, durchgeführt. Ähnliche Proteinkonstrukte von Myosin II, die auch als Kopffragmente bezeichnet werden, wurden bereits mehrfach, erfolgreich für kinetische Messungen eingesetzt (Manstein und Hunt, 1995;

Ritchie *et al.*, 1993; Woodward *et al.*, 1991; Kurzawa *et al.*, 1997). Sie werden in *D. discoideum* stark exprimiert und können durch die Verfahren, die im Methodenteil in Kapitel 3.5.1 beschrieben sind, mit hoher Ausbeute aus den Zellen isoliert werden. Die Myosin I-Kopffragente werden mit dem Namen des Myosins und der Stelle der letzten Aminosäure der schweren Kette zum Beispiel als E698 bezeichnet. Als Basisvektor für die Herstellung der Plasmide diente pDXA-3H (Manstein und Hunt, 1995). Dieser Vektor besitzt ebenfalls Sequenzen, über die an das exprimierte Protein am Carboxyterminus ein Histidinpeptid anfügt wird.

Wie in der Einleitung beschrieben, wird die Aktivität von Myosinen der Klasse I aus *A. castellanii* durch eine Phosphorylierung der Motordomäne an der TEDS-Stelle reguliert (Hammer *et al.*, 1983; Brzeska *et al.*, 1989, Brzeska *et al.*, 1999). Auch die Aktinaktivierung der ATPase-Aktivität von MyoD ist abhängig von einer Phosphorylierung des Proteins (Lee und Cote, 1995; Lee *et al.*, 1996). Daher lag es nahe anzunehmen, daß auch die anderen Myosine I aus *D. discoideum* auf eine vergleichbare Weise reguliert werden. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz im Bereich der TEDS-Stelle ist in der Abbildung 4.2 dargestellt.

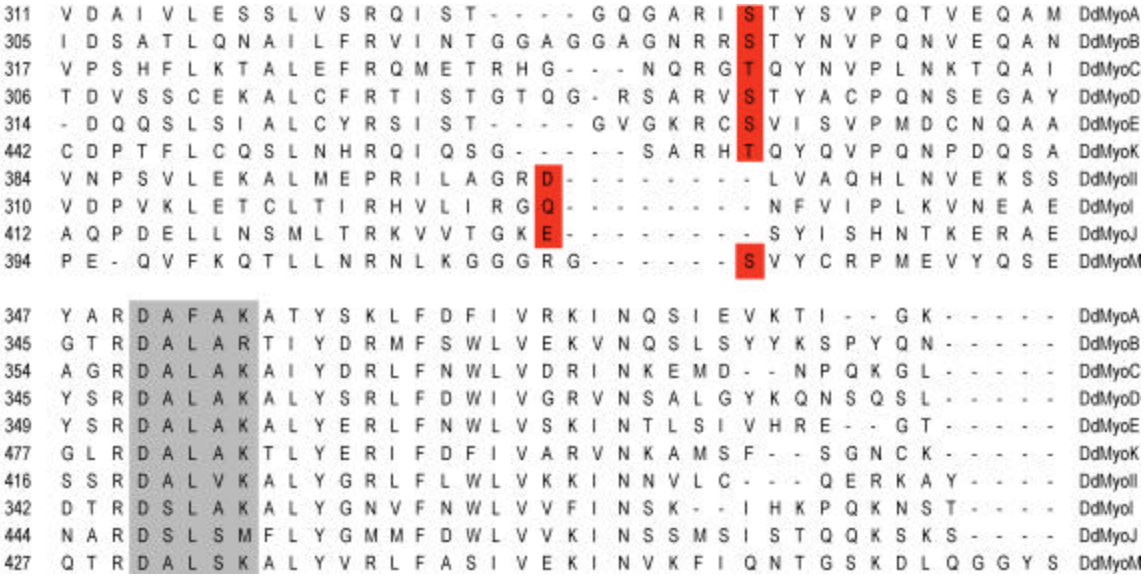


Abbildung 4.2: **Vergleich der Aminosäuresequenzen der Myosine aus *D. discoideum* im Bereich der TEDS-Stelle.** Die TEDS-Stelle, die rot markiert ist, befindet sich 16 Aminosäuren vor der hochkonservierten DALAK-Sequenz.

Er zeigt, daß alle drei charakterisierten Proteine MyoB, MyoD und MyoE an dieser Position ein phosphorylierbares Serin besitzen. Um die Regulation ihrer Motoraktivität durch eine Phosphorylierung an dieser Position genauer zu untersuchen und den molekularen Mechanismus dieser Regulation aufzuklären, wurden Mutanten der Proteinkonstrukte mit zwei α-Aktinin-Untereinheiten und der Kopffragmente hergestellt. Dabei wurde das Serin entweder durch ein Alanin oder durch eine Glutaminsäure ersetzt. Durch die Einführung eines Alanins sollte der unphosphorylierte Zustand des Proteins nachgeahmt werden, durch die

negativ geladene Aminosäure sollte der phosphorylierte Zustand nachgeahmt werden. Diese Methode wurde schon erfolgreich an Myosin IC aus *A. castellanii* (Wang *et al.*, 1998) und an Myosin VI aus Wirbeltieren (De La Cruz *et al.*, 2001) durchgeführt. Die Mutanten wurden in den *in vitro* Messungen der Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten und in den kinetischen Messungen verwendet und mit den Wildtypkonstrukten verglichen. Sie werden auch als S-E-Mutante oder S-A-Mutante bezeichnet.

4.2 Expression und Isolierung der rekombinanten Proteine

Mit den angegebenen Expressionsplasmiden wurden *D. discoideum* Zellen des Zellstamms AX3-orf$^+$ transformiert. Die Transformanten wurden unter Verwendung von Gentamycin in einer Konzentration von 10 bis 20 µg/ml als Selektionsmarker selektioniert, und monoklonale Zellinien wurden isoliert. Diese wurden mit dem Protokoll für analytische Reinigung von Myosinmotordomänen und mit Western Blot unter Verwendung eines anti-Histidin-Antikörpers auf Proteinexpression getestet.

Aus den Zellen mit hoher Proteinexpression wurden die rekombinanten Proteine wie beschrieben isoliert (Manstein und Hunt, 1995). Danach wurde eine weitere Reinigung durch Ionenaustausch-Chromatographie durchgeführt und das Protein am Ende gegen 25 mM HEPES, 0,5 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM MgAc, 1 mM Benzamidin und 3 % Saccharose dialysiert. Die Proteinlösung wurde aufkonzentriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei −78 °C gelagert. Die Menge an isoliertem Protein betrug im allgemeinen zwischen 10 und 25 mg.

4.3 Zelluläre Lokalisierung

4.3.1 Lokalisierung von MyoD in dynamischen Regionen des Aktincytoskeletts und an Membranen

Die zelluläre Lokalisierung der Myosine aus der Klasse I in *D. discoideum* wurde in einer Zusammenarbeit mit Dr. Muriel Erent (MPI für medizinische Forschung, Heidelberg) untersucht. Dazu wurden Zellen verwendet, von denen die beschriebenen rekombinanten Fusionsproteine mit YFP exprimiert wurden.

Die Untersuchung von lebenden Zellen mit Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 4.3) zeigte, daß YFP-MyoD neben einer Verteilung im gesamten Cytoplasma, angereichert in aktiven Regionen des Zellcortex auftritt. Dazu gehört zum Beispiel die Peripherie von Pseudopodien, die in der Bewegungsrichtung der Zellen ausgebildet werden. Bei der Aufnahme von flüssigem Medium in die Zellen ist das Protein in kronenförmigen Membranstrukturen konzentriert, aus denen Makropinosomen entstehen. Es liegt ebenfalls angereichert an den Kontaktstellen von Zellen vor. Das Protein zeigte sowohl bei der amino- als auch bei der carboxyterminalen Markierung mit YFP ein übereinstimmendes Lokalisierungsmuster.

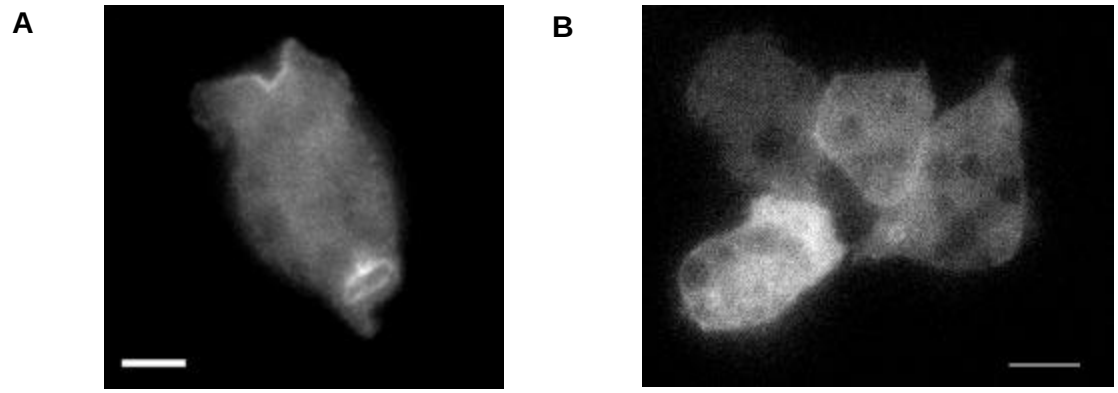


Abbildung 4.3: **Lokalisierung von YFP-MyoD.** Gezeigt sind Epifluoreszenzaufnahmen lebender Zellen, die YFP-MyoD exprimieren. (A) MyoD ist im gesamten Cytoplasma verteilt und liegt an den Rändern von Pseudopodien und in kronenförmigen Membranstrukturen angereichert vor. Der Größenmaßstab entspricht 4 µm. (B) MyoD ist auch an Stellen eines Zell-Zell-Kontakts konzentriert. Der Größenmaßstab entspricht 10 µm.

Auch mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie von fixierten Zellen wurde YFP-MyoD in den beschriebenen Bereichen sichtbar gemacht (Abbildung 4.4 a). Um die Lokalisierung von MyoD mit der von Coronin zu vergleichen, wurde Coronin mit einem anti-Coronin-Antikörper und einem Zweitantikörper, der mit dem Farbstoff Texas-Red gekoppelt war, angefärbt. Bei Coronin handelt es sich um ein aktinbindes Protein, das eine tragende Rolle bei der Regulation des Aktincytoskeletts zu spielen scheint (de Hostos *et al.*, 1991). Dabei wurden sehr ähnliche Verteilungen der beiden Proteine am Rand von Pseudopodien und an vesikulären Strukturen beobachtet, die sich jedoch nicht vollständig überlagerten (Abbildung 4.4 b). Wenn die DNA im Zellkern von Zellen, die sich in der Interphase befanden, mit dem Farbstoff DAPI angefärbt wurde, und die Lokalisierung des Zellkerns mit der Verteilung von YFP-MyoD überlagert wurde, konnte eine Lokalisierung von MyoD im Zellkern, ausgeschlossen werden (Abbildung 4.4 c).

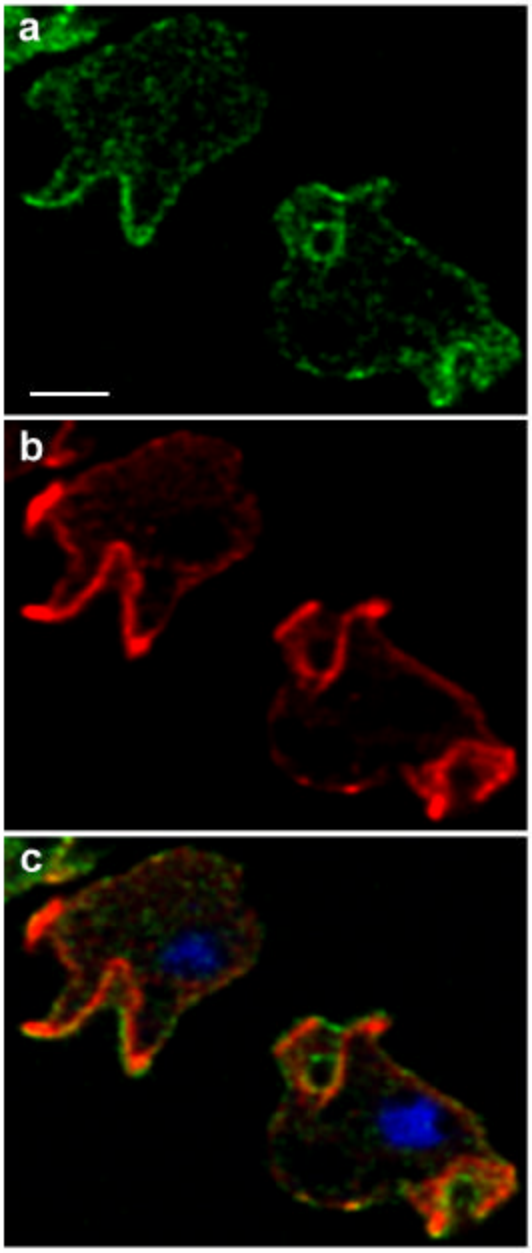


Abbildung 4.4: **Lokalisierung von YFP-MyoD in Zellen, die sich in der Interphase befinden.** Gezeigt ist ein optischer Schnitt einer konfokalen Mikroskopieaufnahme. (a) YFP-MyoD ist grün dargestellt. Es ist im gesamten Cytoplasma und im Zellcortex verteilt. An der Plasmamembran von Pseodopodien und an Vesikeln liegt es angereichert vor. (b) Coronin wurde mit einem anti-Coronin-Antikörper und einem Zweitantikörper, der mit dem Farbstoff Texas-Red gekoppelt war, angefärbt. Es ist in rot gezeigt. (c) Die DNA im Zellkern wurde mit dem Farbstoff DAPI angefärbt und ist in blau dargestellt. Die Überlagerung der Verteilungen von Coronin und YFP-MyoD zeigt eine teilweise Kolokalisierung der Proteine in den aktiven Regionen des Zellcortex und an Membranen. YFP-MyoD wurde während der Interphase nicht im Zellkern beobachtet. Der Größenmaßstab entspicht 10 µm.

4.3.2 Lokalisierung von MyoD im Zellkern während der Mitose

Bei der Mikroskopie von Zellen während der Zellteilung wurde eine schnelle Umverteilung von YFP-MyoD von den Zellrändern in den Kern beobachtet. In *D. discoideum* reicht der Spindelapparat während der Mitose über Lücken der Kernhülle durch den Zellkern, wobei die Kernhülle erhalten bleibt. Die Abbildung 4.5 zeigt die Veränderung der Lokalisierung von YFP-MyoD in einer Zelle während der Zellteilung in zeitlich aufeinanderfolgenden Fluoreszenzaufnahmen von der Anaphase bis zur vollständigen Trennung der Tochterzellen. Auch nach dem Ende der Zellteilung konnte YFP-MyoD noch über einen längeren Zeitraum im Zellkern beobachtet werden. Zusätzlich wurde eine filamentartige Struktur zwischen den beiden Zellkernen sichtbar.

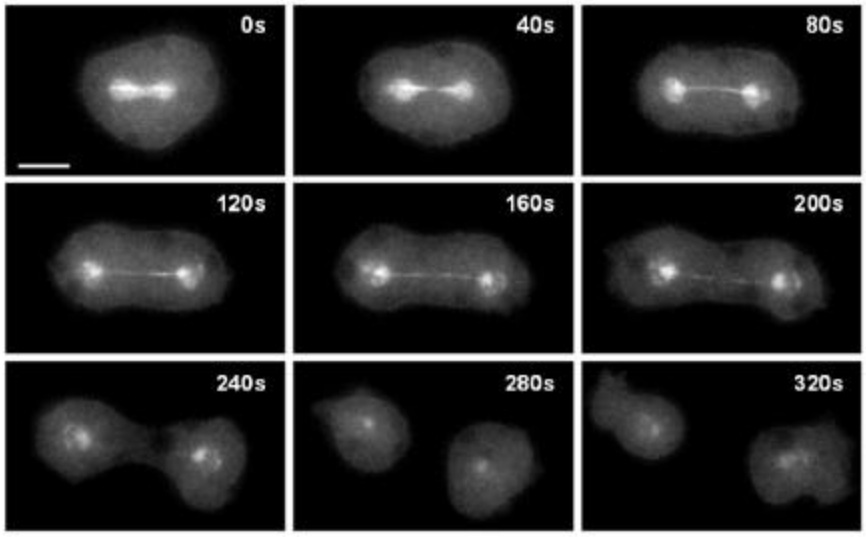


Abbildung 4.5: **Lokalisierung von YFP-MyoD während der Mitose.** Dargestellt ist eine Reihenfolge von Epifluoreszenzaufnahmen einer Zelle während der Zellteilung in zeitlicher Abfolge. Dabei wird YFP-MyoD vom Rand der Zelle in den Zellkern verlagert. Der Zeitpunkt der Aufnahmen ist in Sekunden angegeben. Der Größenmaßstab entspricht 4 µm.

Um diese Beobachtung zu bestätigen, wurde konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet. Zellen, die YFP-MyoD exprimierten, wurden in ihrem Zellzyklus synchronisiert und fixiert. Dann wurde Tubulin mit einem anti-Tubulin-Antikörper und einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper angefärbt. Die DNA der Zellen wurde mit dem Farbstoff DAPI markiert. Die Abbildung 4.6 zeigt vier verschiedene Stadien der Mitose, von der Metaphase bis zur späten Telophase. Jeweils ein optischer Schnitt ist dargestellt. Die Abbildung zeigt, daß die Umverteilung von MyoD schon zu Beginn der Mitose erfolgt. Während der verschiedenen Stadien der Mitose ist YFP-MyoD eindeutig im Nukleus lokalisiert. Dabei ist es in Bereichen konzentriert, die der Kernhülle und Teilen des Spindelapparats entsprechen könnten. Bei der Trennung der beiden Tochterkerne bleibt es in einer filamentartigen Struktur zwischen den Kernen angereichert. Bei der Markierung von

Tubulin werden die Spindelpole und der Spindelapparat sichtbar, der die DNA umgibt. Es wird ebenfalls eine filamentartige Struktur zwischen den Tochterkernen markiert. Die Überlagerung ergibt eine teilweise Kolokalisierung von YFP-MyoD und Tubulin an den Spindelpolen und an der filamentartigen Struktur. MyoD liegt jedoch stärker angereichert an der Kernhülle vor, als in den Bereichen der Mitosespindel.

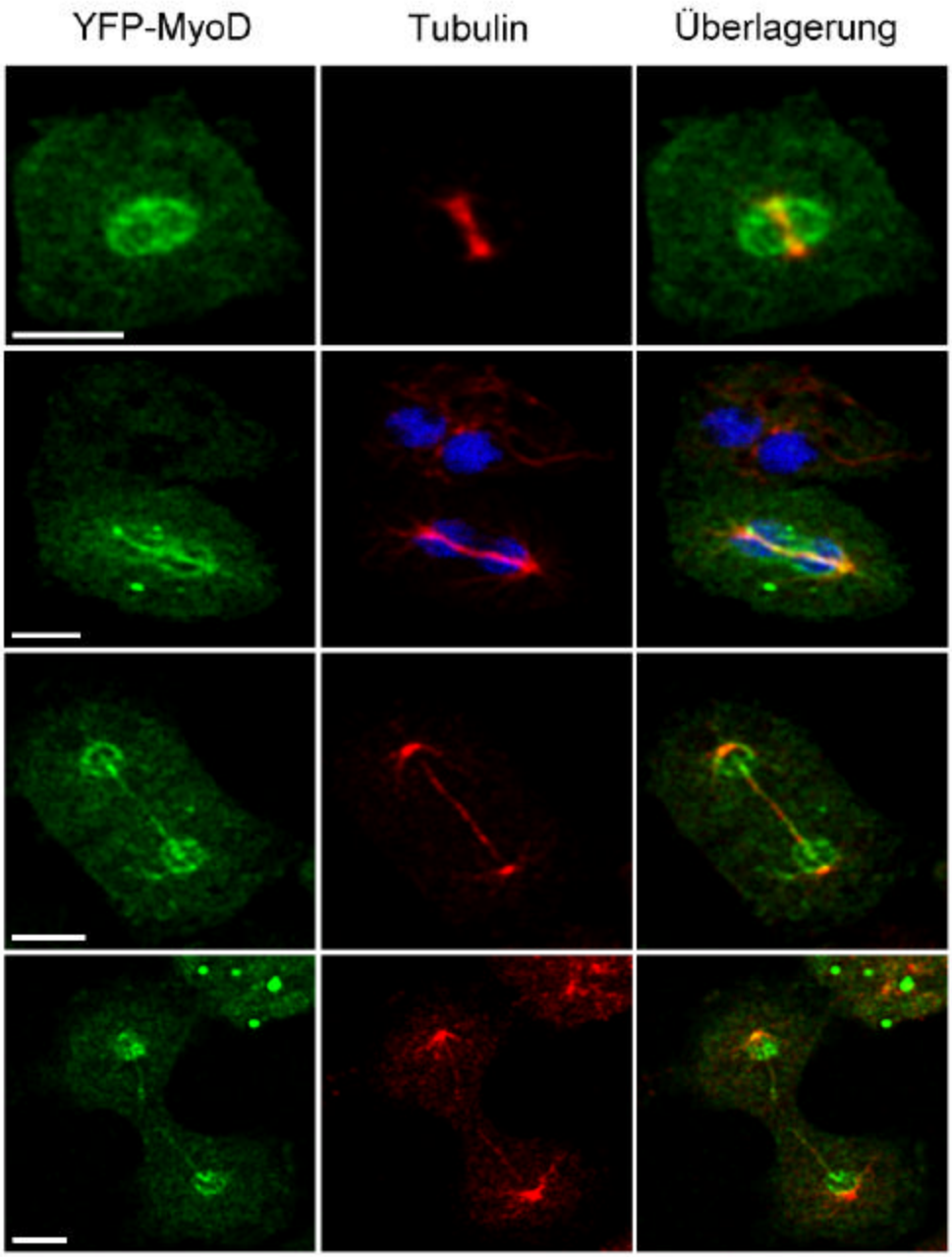


Abbildung 4.6: **Lokalisierung von YFP-MyoD während der Mitose.** Gezeigt sind konfokale Mikroskopieaufnahmen von verschiedenen Stadien der Mitose in zeitlicher Abfolge: (a) Metaphase, (b) frühe Anaphase, (c) späte Anaphase und (d) Telophase. YFP-MyoD ist in grün dargestellt. Tubulin wurde mit einem anti-Tubulin-Antikörper und einem Texas Red-gekoppelten Zweitantikörper angefärbt (rot), die DNA mit DAPI (blau). YFP-MyoD liegt an der Kernhülle vor und kolokalisiert mit Teilen des Spindelapparats. Der Größenstandard entspricht 4 µm.

4.3.3 Lokalisierung von MyoE in dynamischen Regionen des Aktincytoskeletts und an Vesikeln

Die Lokalisierung von YFP-MyoE wurde ebenfalls zuerst durch Epifluoreszenzmikroskopie in lebenden Zellen visualisiert. Die Abbildung 4.7 zeigt Bilder einer lebenden Zelle, die in zeitlicher Abfolge aufgenommen wurden. MyoE ist im gesamten Cytoplasma und an der Plasmamembran verteilt. Bei Zellen, die sich fortbewegen, ist es an der Peripherie von sich bildenden Pseudopodien und an dem Rand der Zellen, der in der Fortbewegungsrichtung liegt, konzentriert. Während der Aufnahme von flüssigem Medium in die Zellen wurde es an Makropinosomen sichtbar. Zwischen den beschrieben Bereichen findet eine schnelle Umverteilung von MyoE statt, das damit eine stark dynamische Lokalisierung aufweist. Bei der Untersuchung der Zellen, die YFP-MyoE exprimierten, konnte die Lokalisierung des Proteins im Zellkern sowohl in Zellen der Interphase als auch während der Mitose ausgeschlossen werden. Die Untersuchung von beiden Fusionsproteinen, bei denen sich YFP entweder am Amino- oder am Carboxyterminus befindet, ergab vollkommen übereinstimmende Ergebnisse.

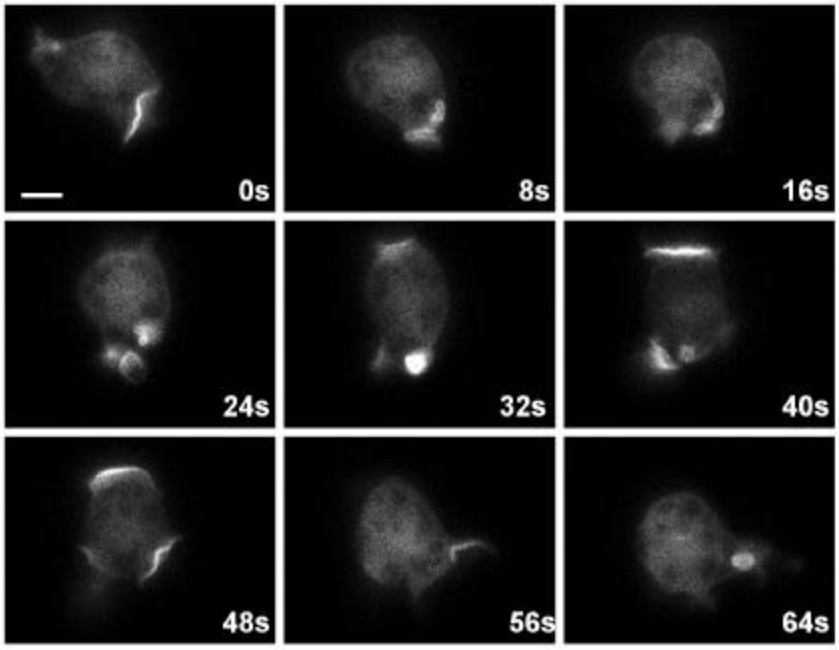


Abbildung 4.7: **Zelluläre Lokalisierung von MyoE.** Gezeigt ist eine Reihe von Epifluoreszenzaufnahmen einer lebenden Zelle, die YFP-MyoE exprimiert, in zeitlicher Abfolge. MyoE ist im gesamten Cytoplasma und an der Plasmamembran verteilt und liegt angereichert in kronenförmigen Membranstrukturen und an der Peripherie von sich bildenden Pseudopodien vor. Der Zeitpunkt der Aufnahmen ist in Sekunden angegeben. Der Größenmaßstab entspricht 10 µm

Um die Verteilung von MyoE während der Phagocytose zu bestimmen, wurden *D. discoideum* Zellen während der Aufnahme von Hefezellen mikroskopiert, die mit TRITC markiert waren. Die Abbildung 4.8 zeigt, daß MyoE an der becherförmigen Struktur angereichert ist, von der die phagocytierten Zellen umschlossen werden.

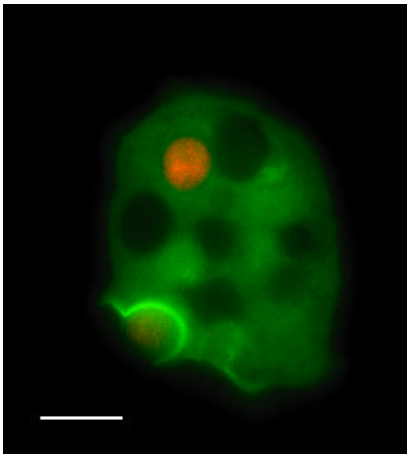


Abbildung 4.8: **Zelluläre Lokalisierung von MyoE bei der Phagozytose von Hefezellen.** YFP-MyoE ist in grün dargestellt, die TRITC-markierten Hefezellen sind in rot dargestellt. MyoE ist am phagocytotischen Becher angereichert. Der Größenmaßstab entspricht 5 µM.

Die Verteilung von YFP-MyoE wurde mit der von Aktin durch Epifluoreszenzaufnahmen von fixierten Zellen verglichen (Abbildung 4.9 A). Die Aktinfilamente in den Zellen konnten nach der Fixierung mit TRITC-markiertem Phalloidin angefärbt werden. Eine Kolokalisierung der beiden Proteine wird in den dynamischen Bereichen des Zellkortex nachgewiesen.

Konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen von YFP-MyoE im Vergleich mit Coronin zeigen eine teilweise Kolokalisierung der beiden Proteine in vesikulären Strukturen und an der Peripherie der Zellen, wobei die Verteilung der beiden Proteine jedoch wie bei YFP-MyoD und Coronin nicht vollständig übereinstimmt (Abbildung 4.9 B).

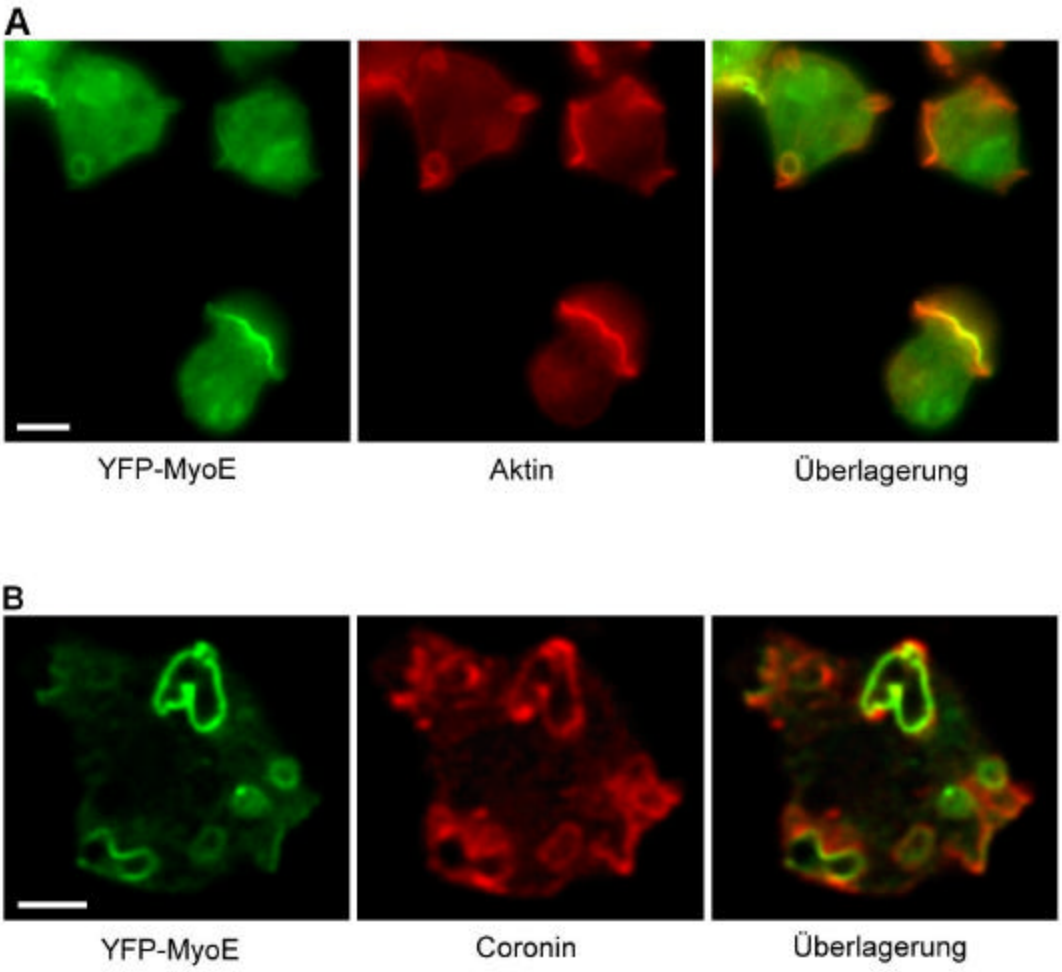


Abbildung 4.9: **Zelluläre Lokalisierung von MyoE im Vergleich mit Aktin und Coronin.** (A) Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Zellen, die YFP-MyoE exprimieren. Nach der Fixierung wurden die Aktinfilamente mit TRITC-Phalloidin angefärbt. YFP-MyoE ist in grün dargestellt, Aktin in rot. Die Abbildung zeigt eine teilweise Kolokalisierung der beiden Proteine in dynamischen Regionen des Zellcortex. Der Größenmaßstab entspricht 10 µm. (B) Konfokale Mikroskopie von YFP-MyoE und Coronin. Coronin wurde mit einem anti-Coronin-Antikörper und einem Texas Red-gekoppelten Zweitantikörper angefärbt. YFP-MyoE ist in grün dargestellt, Coronin in rot. Sichtbar ist eine ähnliche Verteilung der beiden Proteine, die jedoch nicht vollständig übereinstimmt. Der Größenmaßstab entspricht 3 µm.

4.4 *In vitro* Bewegung von Aktinfilamenten

Die Motorfunktion von Myosinen kann durch *in vitro* Messung der Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten untersucht werden. Bei diesen Versuchen transportieren Myosinmoleküle, die an eine Glasoberfläche gebunden sind, unter Verbrauch von ATP einzelne Aktinfilamente. Um die Bewegung sichtbar zu machen, werden die Aktinfilamente mit Rhodamin-Phalloidin fluoreszenzmarkiert. Die Geschwindigkeit der Bewegung ist abhängig von der Konzentration an ATP, dem pH-Wert der Reaktionslösung und den speziellen Eigenschaften des Myosins (Kron und Spudich, 1986). Das *in vitro* System ist daher besonders gut geeignet, um die Regulation eines Myosinmoleküls durch eine posttanslationelle Modifikation oder durch Bestandteile der Reaktionslösung zu untersuchen.

Für die Messungen wurden die beschriebenen Myosin I-Konstrukte verwendet, bei denen die Motordomänen mit zwei Untereinheiten des Proteins α-Aktinin verbunden waren, die als künstlicher Hebelarm bei der Krafterzeugung zur Bewegung der Aktinfilamente dienen können. In den Versuchen wurde zuerst die Auswirkung einer Phosphorylierung an der TEDS-Stelle der Myosinmotordomäne auf die Motorfunktion der Myosine analysiert. Danach konnte ein zweiter Regulationsmechanismus durch bivalente Kationen für MyoD charakterisiert werden.

Die Messungen der Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten wurden in einer Zusammenarbeit mit Dr. Setsuko Fujita-Becker (MPI für medizinische Forschung, Heidelberg) durchgeführt.

4.4.1 Aktivierung der Bewegung durch eine TEDS-Phosphorylierung

Da die untersuchten Myosine der Klasse I an der TEDS-Stelle ein phosphorylierbares Serin enthalten, wurde der Einfluß einer Phosporylierung der Motordomäne der Proteinkonstrukte auf die Motorfunktion ermittelt. Um die Proteine vollständig zu phosphorylieren oder zu dephosphorylieren, wurden sie nach der Isolierung aus *D. discoideum* entweder mit einer Myosin I-Kinase (MIHCK) aus *A. castellanii* (Brzeska *et al.*, 1999) oder mit λ-Phosphatase (Biolabs) behandelt. Daneben wurden auch die Mutanten, bei denen das Serin an der TEDS-Stelle entweder durch eine Glutaminsäure oder durch ein Alanin ersetzt war, mit den *in vitro* Messungen untersucht.

Die Bewegungen von jeweils 50 Aktinfilamenten wurden verfolgt und die Geschwindigkeiten bestimmt. Die Bewegungsgeschwindigkeiten werden in Histogrammen dargestellt, die in den Abbildungen 4.10 und 4.11 gezeigt sind. Die Mittelwerte der Bewegungsgeschwindigkeiten sind in der Tabelle 4.2 zusammengefaßt.

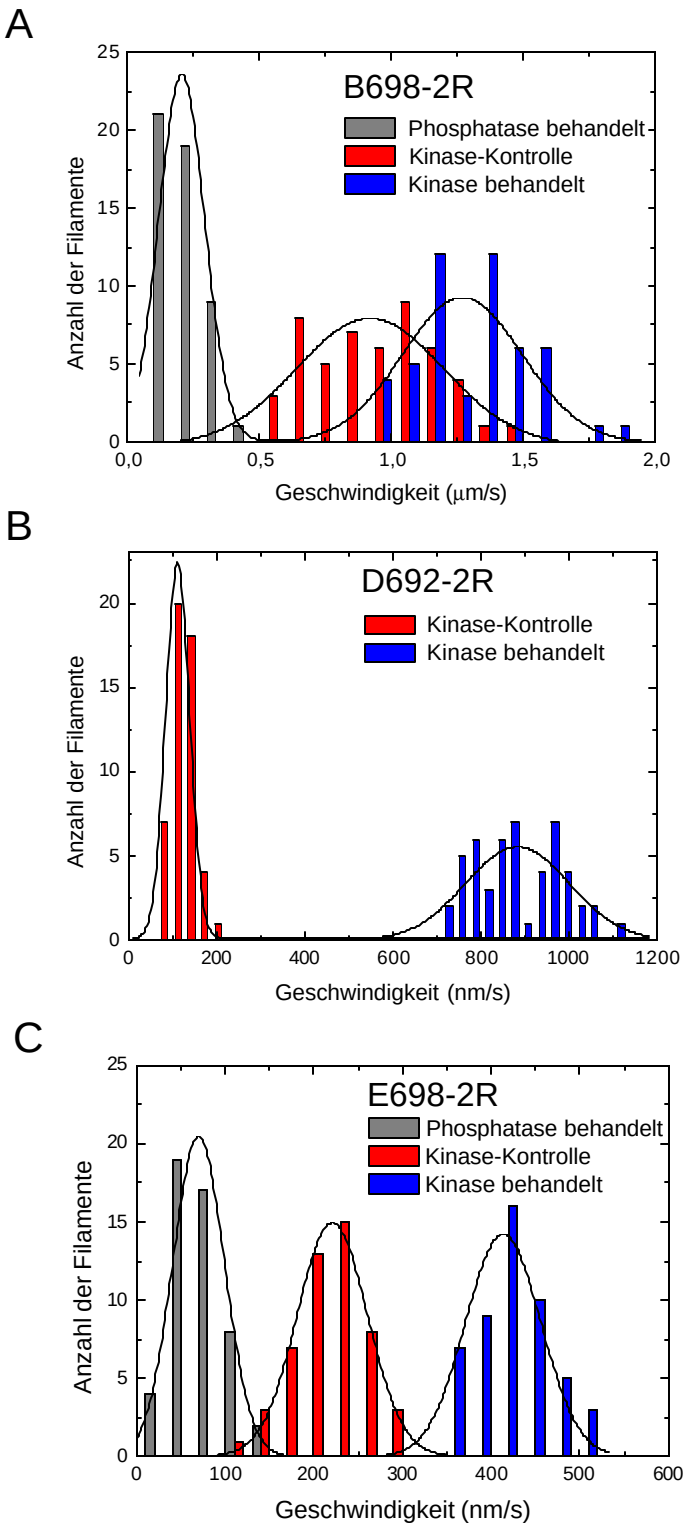


Abbildung 4.10: ***In vitro* Bewegung der Myosin I-Konstrukte.** Dargestellt sind Histogramme der ermittelten Durchschnittsgeschwindigkeiten der Aktinfilamentbewegung. Gezeigt sind (A) B698-2R, (B) D692-2R und (C) E698-2R jeweils mit Phosphatase behandelt (grau), die Kinase-Kontrolle (rot) und mit Kinase behandelt (blau). D692-2R zeigte nach der Phosphatase-Behandlung keine Bewegung mehr. Bei der Kontrollmessung wurden die Proteine den Bedingungen der Kinase-Behandlung ausgesetzt, jedoch ohne Enzymzugabe. An die Daten wurde jeweils eine Gaußfunktion angepaßt. Die Messungen erfolgten bei 30 °C.

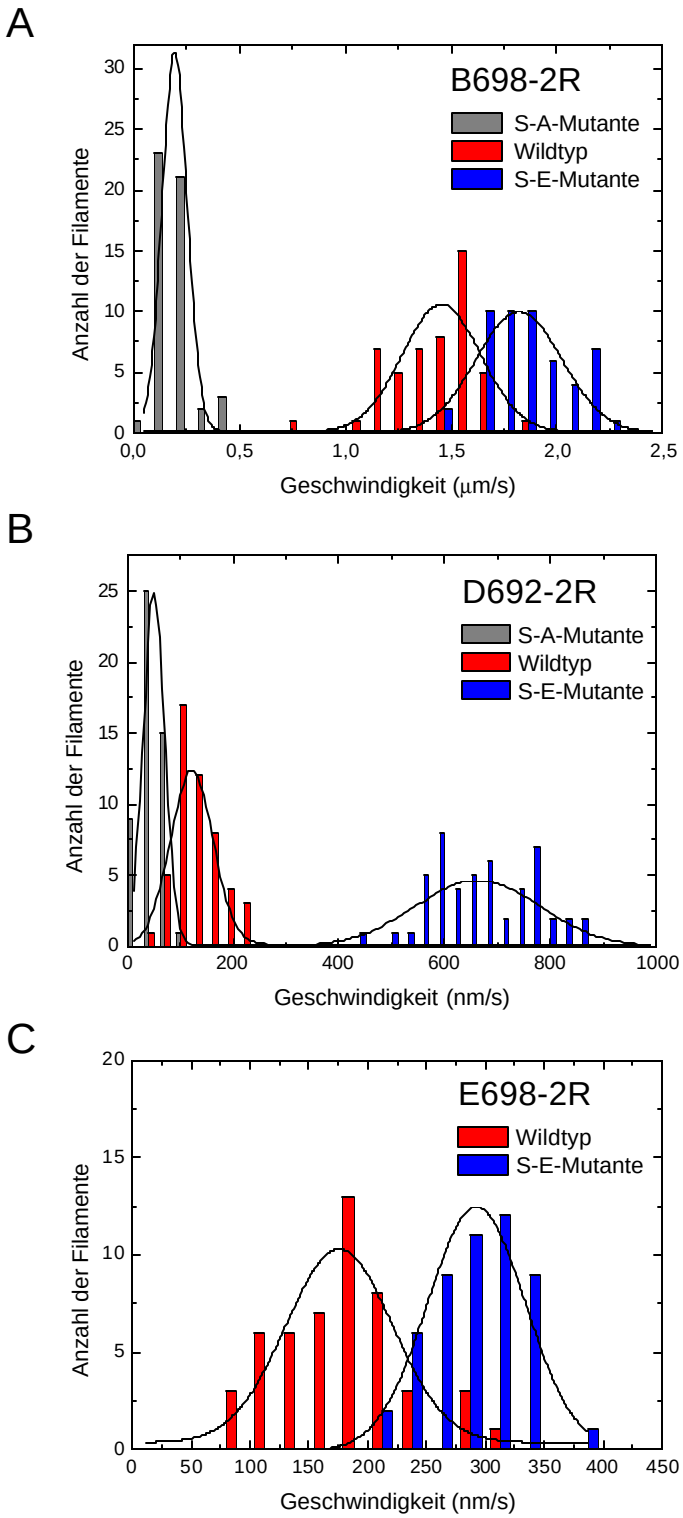


Abbildung 4.11: ***In vitro* Bewegung der Myosin I-Konstrukte mit Mutationen an der TEDS-Stelle.** Dargestellt sind (A) B698-2R, (B) D692-2R und (C) E698-2R jeweils die S-A-Mutante (grau), der Wildtyp (rot) und die S-E-Mutante (blau). Die S-A-Mutante von E698-2R zeigte keine meßbare Bewegung. Der Wildtyp entspricht dem Proteinkonstrukt nach der Isolierung aus *D. discoideum*. An die Daten wurde jeweils eine Gaußfunktion angepaßt. Die Messungen wurden bei 30 °C durchgeführt.

Tabelle 4.2 : ***In vitro*** **Bewegung von Aktinfilamenten**

	Mittlere Bewegungsgeschwindigkeit (µm/s) [a]		
	B698-2R	**D692-2R**	**E698-2R**
Wildtyp	1,41 ± 0,20 [b]	0,13 ± 0,04	0,18 ± 0,05
Phosphatase behandelt	0,23 ± 0,09	keine Bewegung	0,08 ± 0,03
Phophatase-Kontrolle [c]	0,87 ± 0,15	keine Bewegung	0,14 ± 0,05
Kinase behandelt	1,29 ± 0,21	0,89 ± 0,10	0,42 ± 0,04
Kinase-Kontrolle [c]	0,93 ± 0,23	0,12 ± 0,03	0,22 ± 0,04
S-A-Mutante	0,22 ± 0,20	0,05 ± 0,02	keine Bewegung
S-E-Mutante	1,85 ± 0,19	0,67 ± 0,09	0,29 ± 0,03

Reaktionsbedingungen: 25 mM Imidazol, pH-Wert 7,4; 25 mM KCl; 4 mM $MgCl_2$; 1 mM EGTA; 10 mM DTT. Die Temperatur betrug 30 °C.

[a] Die mittlere Bewegungsgeschwindigkeit von M765-2R betrug 0,29 ± 0,07 µm/s.

[b] Die angegebenen Fehler sind Standardabweichungen der Mittelwerte.

[c] Bei den Kontrollmessungen wurde das Protein jeweils den Reaktionsbedingungen der Behandlung mit Phosphatase- oder Kinase ausgesetzt, jedoch ohne Zugabe des Enzyms.

Die mittlere Geschwindigkeit, mit der das Wildtyp-Konstrukt von MyoB (B698-2R) Aktinfilamente bewegte, betrug 1,41 µm/s bei 30 ºC. Wurde das Protein denselben Bedingungen wie bei der Behandlung mit λ-Phosphatase ausgesetzt, ohne daß das Enzym selbst zugegeben wurde, erniedrigte sich die Geschwindigkeit der Aktinbewegung auf 0,87 µm/s. Eine Dephosphorylierung des Kostrukts mit λ-Phosphatase führte dann zu einer weiteren Erniedrigung der Geschwindigkeit auf 0,23 µm/s im Vergleich zu dieser Kontrollmessung. Auch bei der Kontrolle für die Kinase-Behandlung erniedrigte sich die Geschwindigkeit auf 0,93 µm/s. Durch die Behandlung mit der Kinase wurde die Geschwindigkeit dann relativ zu dieser Kontrolle auf 1,29 µm/s erhöht. Nach der Aufreinigung lag das Wildtypprotein also hauptsächlich in einem phosphorylierten Zustand neben unphosphoryliertem Protein vor. Die phosphorylierte Form transportierte Aktinfilamente etwa sechsmal schneller als die unphosphorylierte. Sehr ähnliche Ergebnisse wurden mit den Proteinen erhalten, bei denen das Serin der TEDS-Stelle durch Alanin oder Glutamat ersetzt war. Die Geschwindigkeit der S-A-Mutanten betrug 0,23 µm/s. Die aktivierte S-E-Mutante von MyoB zeigte eine etwa achtmal schnellere Bewegung von 1,85 µm/s.

Das Wildtyp-Konstrukt von MyoD (D692-2R) ergab eine Transportgeschwindigkeit von 0,13 µm/s. Nach der Behandlung mit λ-Phosphatase war wie in der Kontollmessung keine Bewegung mehr meßbar. Nach MIHCK Behandlung stieg die Geschwindigkeit auf 0,89 µm/s im Vergleich zu 0,12 µm/s in der Kontrollmessung. Das Wildtypprotein lag also nach der Aufreinigung hauptsächlich in einem nicht phosphorylierten Zustand vor. Auch für die Alanin-Mutante wurde mit 0,05 µm/s ein sehr niedriger Wert gemessen, der für die Glutamat-Mutanten mit 0,67 µm/s über 13mal höher lag.

Das Wildtyp-Konstrukt von MyoE (E698-2R) bewegte Aktinfilamente mit einer Geschwindigkeit von 0,18 µm/s. Nach der Dephosphorylierung betrug die Geschwindigkeit nur noch 0,08 µm/s und nach der Phosphorylierung stieg sie auf 0,42 µm/s. Auch das MyoE-Konstrukt war also nach der Aufreinigung teilweise phosphoryliert. Die S-A-Mutante zeigte keine meßbare Bewegung, die S-E-Mutante bewegte Aktinfilamente mit der Geschwindigkeit von 0,29 µm/s.

4.4.2 Inhibierung der Bewegung von MyoD durch divalente Kationen

Die *in vitro* Bewegung von Aktinfilamenten durch das MyoD-Konstrukt zeigte eine Abhängigkeit von der ATP- und Magnesiumionenkonzentration. Für die genaue Untersuchung dieser Regulation wurden die Mutanten mit einem Aminosäureaustausch an der TEDS-Stelle verwendet. Da in den vorhergehenden Versuchen gezeigt wurde, daß nach der Isolierung aus *D. discoideum* teilweise phosphorylierte Proteine vorlagen, war in den Messungen mit den Wildtypproteinen kein einheitliches Verhalten zu erwarten.

In den Versuchen wurde entweder die Konzentration an Magnesiumionen konstant bei einem Wert von 4 mM gehalten und die ATP-Konzentration in einem Bereich von 0 bis 20 mM erhöht, oder die ATP-Konzentration wurde auf den Wert von 10 mM eingestellt und die Mg^{2+}-Ionenkonzentration von 0 bis 20 mM variiert. Mit einer Erhöhung der ATP-Konzentration bei gleichbleibender Mg^{2+}-Ionenkonzentration stieg die Geschwindigkeit linear oder leicht sigmoidal an, bis äquimolare Mengen an ATP und Mg^{2+}-Ionen erreicht waren. Danach blieb die Bewegungsrate der Glutamat-Mutanten bis zu ATP-Konzentrationen von 20 mM konstant. Die Alanin-Mutante zeigte einen Abfall der Geschwindigkeit bei einer ATP-Konzentration von 20 mM, der darauf zurückgeführt werden kann, daß die Stabilität des Aktomyosinkomplexes bei hohen Ionenstärken abnimmt. Die Aktinaffinität der Alanin-Mutanten liegt deutlich niedriger als die der Glutamat-Mutanten (siehe Kapitel 4.5.2.10). Der Maximalwert der Geschwindigkeit lag für die Alanin-Mutante mit 0,35 µm/s etwa fünfmal niedriger als der für die Glutamat-Mutante ermittelte, der 1,70 µm/s betrug.

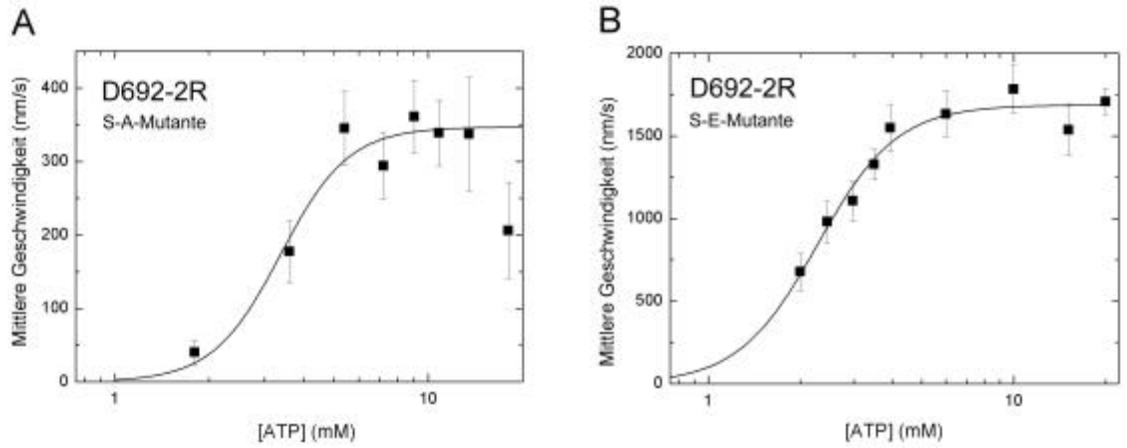


Abbildung 4.12: **ATP-Titration der Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten.** D692-2R (A) S-A-Mutante, (B) S-E-Mutante. Die Mg^{2+}-Ionenkonzentration betrug 4 mM. Die ATP-Konzentration ist logarithmisch aufgetragen und an die Daten wurde eine sigmoidale Funktion angepaßt.

Bei den Messungen mit variierender Magnesiumionenkonzentration fiel die Bewegungsgeschwindigkeit der Alanin-Mutanten von einem Maximalwert, der bei etwa 0,31 µm/s lag, bei Konzentrationen über 10 mM an Mg^{2+}-Ionen hyperbolisch ab. Die Bewegungsgeschwindigkeit der Glutamat-Mutanten stieg linear bis zu einer Mg^{2+}-Ionenkonzentration von etwa 2 mM an, wobei ein Maximalwert von etwa 1,7 µm/s erreicht wurde. Bei einer weiteren Erhöhung der Mg^{2+}-Ionenkonzentration blieb die Geschwindigkeit konstant bei diesem Maximalwert, bis sie nach Überschreiten äquimolarer Mengen von ATP und Mg^{2+}-Ionenwieder abfiel.

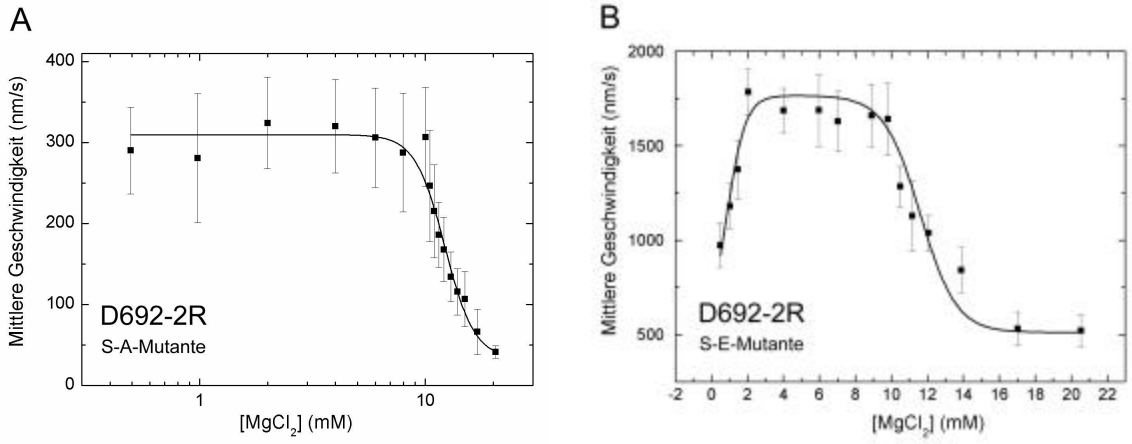


Abbildung 4.13: **Mg^{2+}-Ionentitration der Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten.** D692-2R (A) S-A-Mutante, (B) SE-Mutante. Die ATP-Konzentration betrug 10 mM. Die Mg^{2+}-Ionenkonzentration ist in (A) logarithmisch dargestellt

Neben der Inhibierung durch Magnesiumionen wurde auch eine Inhibierung bei der Zugabe von Calciumionen in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich beobachtet, die jedoch noch nicht detailliert untersucht wurde.

4.5 Kinetische Charakterisierung

Der Myosin I-ATPase-Zyklus wurde sowohl im Steady State (Fließgleichgewichtszustand) als auch mit transientenkinetischen Methoden charakterisiert. Mit den Messungen der Steady State-ATPase wurde sowohl die basale als auch die aktinaktivierte ATPase-Aktivität ermittelt. Die Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten wichtiger Schritte des Aktomyosin I-Zyklus wurden mit transientenkinetischen Messungen bestimmt. Die Regulationsmechanismen der Myosine I aus *D. discoideum* sollten auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. Alle kinetischen Messungen wurden mit Proteinfragmenten der Myosine durchgeführt, die aus der Motordomäne bestanden. Um die Regulation der Myosine I durch eine Phosphorylierung der Motordomäne weiter zu untersuchen, wurden für die kinetischen Messungen neben den Wildtyp-Proteinen die Mutanten verwendet, bei denen das Serin an der TEDS-Stelle entweder durch Alanin oder Glutaminsäure ersetzt war.

Als Kontrolle wurden die Messungen auch mit dem Kopffragment von Myosin II aus *D. discoideum*, das als M765 bezeichnet wird, durchgeführt und die erhaltenen Daten mit denen früherer Arbeiten verglichen, mit denen sie in guter Übereinstimmung standen (Kurzawa *et al.*, 1997; Furch *et al.*, 1999; Batra *et al.*, 1999).

4.5.1 Steady State-ATPase

Um die ATPase-Aktivität der Myosin I-Konstrukte zu messen, wurde die Umsetzung von ATP zu ADP und P_i durch nachfolgende enzymatische Reaktionen an die Oxidation von NADH gekoppelt. Die Abnahme der NADH-Absorption konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm beobachtet werden. In der Abbildung 4.14 ist der Verlauf der Absorption bei 340 nm während der Reaktion von 1 µM D692 mit 1 mM ATP dargestellt. In der Steady State-Phase ist die Geschwindigkeit der Reaktion linear von der Reaktionszeit abhängig, und aus der Steigung dieser Geraden kann die Geschwindigkeit des ATP-Verbrauchs berechnet werden.

Die ATPase-Aktivität, die für ein Myosin gemessen wird, wenn es nicht an Aktin gebunden vorliegt, wird als basale ATPase-Aktivität bezeichnet. Die basale Steady State-ATPase-Aktivität der Wildtyp-Kopffragmente betrug 0,08 s^{-1} für MyoB, 0,12 s^{-1} für MyoD und 0,04 s^{-1} für MyoE. Die Konstrukte, bei denen Mutationen an der TEDS-Stelle vorlagen, zeigten basale ATPase-Aktivitäten die sich nicht signifikant von denen der Wildtyp-Kopffragmente unterschieden.

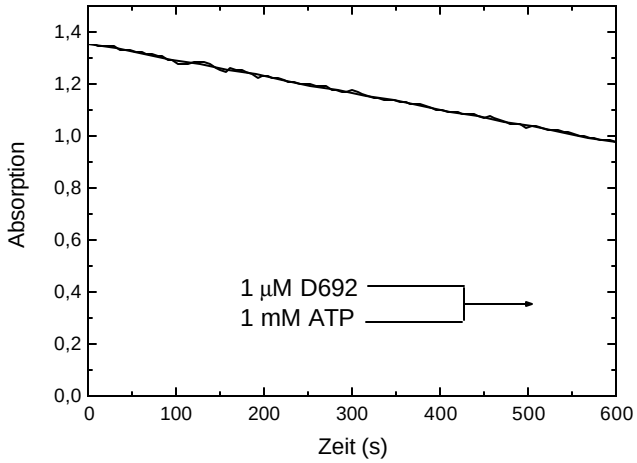


Abbildung 4.14: **Steady State-ATPase des MyoD-Kopffragments**. Dargestellt ist die NADH-Absorptionsveränderung während der Reaktion von 1 µM D698 mit 1 mM ATP. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Der lineare Bereich der Kurve wurde mit einer Geraden ausgewertet, und aus der Steigung dieser Geraden wurde die ATP-Umsatzgeschwindigkeit berechnet.

Um den Einfluß einer Phosphorylierung an der TEDS-Stelle auf die Aktin-Aktivierung der ATPase-Aktivität zu untersuchen, wurde neben der basalen ATPase-Aktivität auch die Aktivität bei einer Aktinkonzentration von 20 µM gemessen. Für das Wildtyp-Kopffragment von MyoB wurde ein Wert von 0,39 s^{-1} bei 20 µM Aktin bestimmt, was einer etwa dreifachen Aktivierung entsprach. Die basale ATPase-Aktivität der Alanin-Mutanten von 0,09 s^{-1} wurde bei 20 µM Aktin nur auf einen Wert von 0,11 s^{-1} um den Faktor 0,2 aktiviert. Im Gegensatz dazu zeigte die Glutamat-Mutante mit Werten von 0,16 s^{-1} für die basale ATPase und 0,68 s^{-1} bei 20 µM Aktin eine Aktivierung um den Faktor 3,3. Sie hatte damit eine 17mal höhere Aktivierung als die Alanin-Mutante.

Das Wildtyp-Kopffragment von MyoD zeigte eine Aktivierung um den Faktor 0,3 auf einen Wert von 0,17 s^{-1}. Auch die Alanin-Mutante wurde durch Aktin nur um den Faktor 0,3 erhöht. Im Gegensatz dazu wurde die Glutamat-Mutante um den Faktor 12 von einem Wert von 0,10 s^{-1} auf 1,34 s^{-1} aktiviert und hatte damit eine etwa 40mal höhere Aktivierung als die Alanin-Mutante.

Die ATP-Umsatzgeschwindigkeit des Wildtyp-Kopffragments von MyoE wurde um den Faktor acht auf 0,35 s^{-1} aktiviert. Für die Alanin-Mutante des MyoE-Kopffragments liegen keine Daten vor, da sie in *D. discoideum* nicht überexprimiert wurde, und die Proteinmenge, die für eine kinetische Charakterisierung benötigt wird, nicht isoliert werden konnte. Die Glutamat-Mutante wurde bei 20 µM Aktin 30-fach auf eine ATPase-Aktivität von 2,5 s^{-1} aktiviert.

Um die Maximalwerte der ATPase-Aktivität und die Kopplungseffizienz zwischen der Aktinbindung und der Produktfreisetzung zu bestimmen, wurden zusätzlich Messungen bei Aktinkonzentrationen in einem Bereich von 0 bis 60 µM durchgeführt. Die gemessenen

ATPase-Geschwindigkeiten wurden in Abhängigkeit von der Aktinkonzentration aufgetragen, und durch Anpassung einer Hyperbel wurden die Konstanten k_{cat}, K_{app} und k_{cat}/K_{app} erhalten, die von Michaelis-Menten-Parametern abgeleitet sind. Die Konstante k_{cat} gibt den berechneten Maximalwert der Geschwindigkeit an, und K_{app} entspricht der apparenten K_M für Aktin. Die Bindungskonstante 2. Ordnung für Aktin (k_{cat}/K_{app}) wurde durch Berechnung des Quotienten beider Werte erhalten. Sie ist ein Maß für die Kopplungseffizienz des untersuchten Myosins. Bei viel kleineren Aktinkonzentrationen als K_{app} konnten die Daten auch mit einer Geraden beschrieben werden, und k_{cat}/K_{app} wurde aus der Steigung dieser Geraden bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der Abbildung 4.15 und der Tabelle 4.3 dargestellt.

Die ATPase-Aktivität des Wildtyp-Kopffragments von MyoB wurde bei steigenden Aktinkonzentrationen hyperbolisch erhöht. Durch Auswertung der Daten mit der Michaelis-Menten-Gleichung wurden ein Maximalwert (k_{cat}) von 2,1 s^{-1} und eine K_{app} für Aktin von 175 µM ermittelt. Die Kopplungseffizienz (k_{cat}/K_{app}) betrug 0,012 $\mu M^{-1}s^{-1}$. Die ATPase-Geschwindigkeit der Alanin-Mutanten wurde in der Gegenwart von Aktinfilamenten nur so wenig erhöht, daß an die Daten keine Hyperbel angepaßt werden konnte. Eine lineare Regression ergab einen Wert von 0,002 $\mu M^{-1}s^{-1}$ für k_{cat}/K_{app}. Im Gegensatz dazu wurde die ATPase-Aktivität der Glutamat-Mutanten durch Aktinfilamente stärker als der Wildtyp auf einen Maximalwert von 3.1 s^{-1} mit einer K_{app} von 96 µM aktiviert. Die Kopplungseffizienz (k_{cat}/K_{app}) der S-E-Mutanten lag mit 0,032 $\mu M^{-1}s^{-1}$ dreimal höher als die des Wildtyps und 16mal höher als die der S-A-Mutanten. Aus den ermittelten Werten konnte geschlossen werden, daß das Wildtyp-Kopffragment von MyoB nach der Isolierung aus *D. discoideum* in einem teilweise phosphorylierten Zustand vorlag.

Die ATPase-Aktivität des Wildtyp-Konstrukts von MyoD zeigte keine Erhöhung der basalen Aktivität durch Aktin, die mit einer Hyperbel ausgewertet werden konnte. Eine lineare Regression ergab einen Wert von 0,004 $\mu M^{-1}s^{-1}$ für k_{cat}/K_{app}. Auch die Alanin-Mutante wurde nur sehr schwach aktiviert, k_{cat}/K_{app} betrug 0,001 $\mu M^{-1}s^{-1}$. Im Gegensatz dazu wurde die ATP-Umsatzgeschwindigkeit der Glutamat-Mutanten stark auf einen Höchstwert von 10,0 s^{-1} aktiviert mit einer K_{app} von 130 µM. Die Kopplungseffizienz der S-E-Mutanten (k_{cat}/K_{app}) betrug 0,007 $\mu M^{-1}s^{-1}$ und lag damit 20mal höher als die der Wildtyp-Form und 80mal höher als die der S-A-Mutanten.

Das Wildtyp-Kopffragment von MyoE wurde durch Aktin in seiner ATPase-Aktivität auf einen Maximalwert (k_{cat}) von 2,2 s^{-1} erhöht mit einem Wert von 118 µM für K_{app}. Die Kopplungseffizienz der Reaktion betrug 0,017 $\mu M^{-1}s^{-1}$. Die Geschwindigkeit der Glutamat-Mutanten wurde stärker als der Wildtyp bei der ATP-Hydrolyse aktiviert. Es wurde eine Umsatzgeschwindigkeit von 15,4 s^{-1} und eine K_{app} von 91 µM ermittelt. Damit betrug die Effizienz der Kopplung 0,17 $\mu M^{-1}s^{-1}$ und war im Vergleich zum Wildtyp zehnfach erhöht.

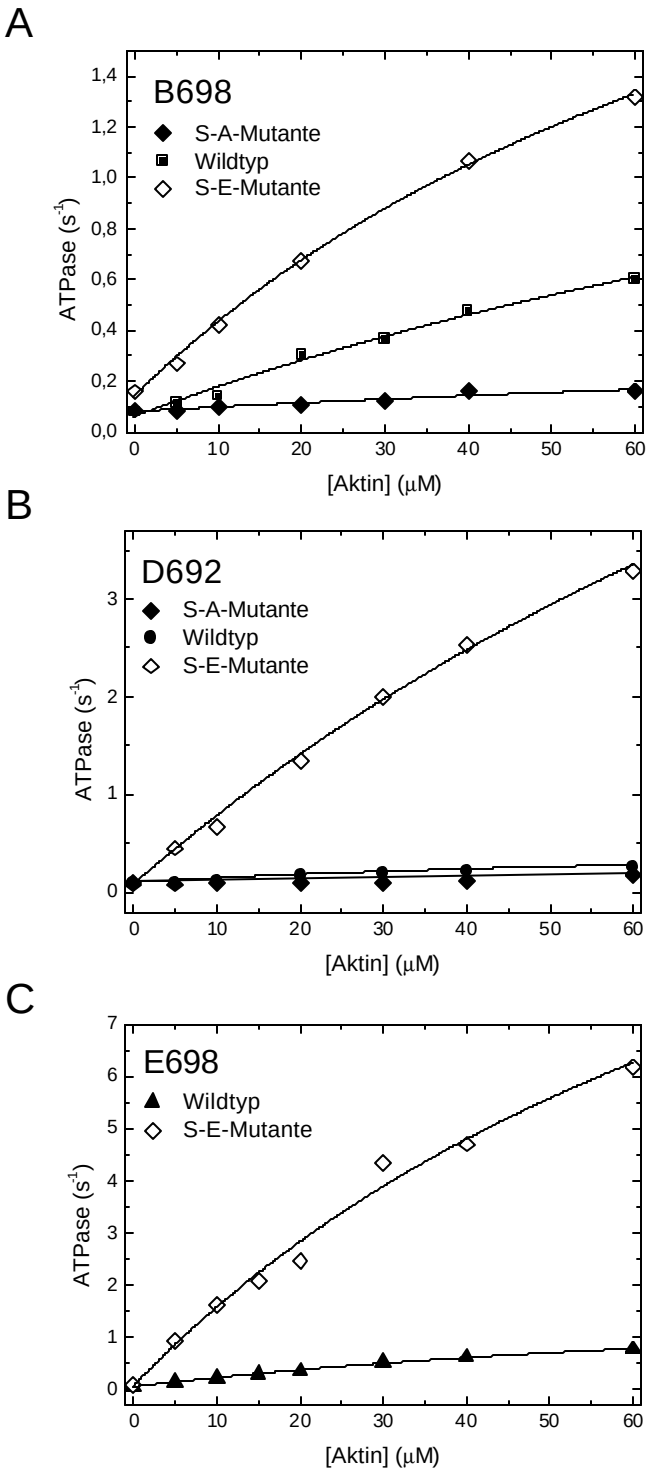


Abbildung 4.15: **Abhängigkeit der Steady State-ATPase-Aktivität der Myosin II-Kopffragmente von der Aktinkonzentration.** Die ATPase-Aktivität wurde in Abhängigkeit von der Aktinkonzentration aufgetragen und die Daten wurden durch eine Hyperbel ausgewertet. (A) B698 (?) S-A-Mutante, (¦) Wildtyp (?) S-E-Mutante; (B) D692 (?) S-A-Mutante, (?) Wildtyp, (?) S-E-Mutante; (C) E698 (?) Wildtyp, (?) S-E-Mutante. Eine S-A-Mutante von E698 konnte nicht aus *D. discoideum* isoliert werden.

Tabelle 4.3: **Steady State-Parameter der aktinaktivierten ATPase-Aktivität.**

		ATPase-Aktivität [a]			Michaelis-Menten-Parameter [b]		Kopplungs-effizienz [c]
		basal (s^{-1})	aktiviert (s^{-1})	Aktivierung	k_{cat} (s^{-1})	K_{app} (µM)	k_{cat}/K_{app} ($\mu M^{-1}s^{-1}$)
B698	S-A-Mutante	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,2	n. m.	n. m.	0,002
	Wildtyp	0,08 ± 0,01	0,30 ± 0,03	2,8	2,1 ± 1,1	175 ± 70	0,012
	S-E-Mutante	0,16 ± 0,02	0,68 ± 0,07	3,3	3,1 ± 0,4	96 ± 20	0,032
D692	S-A-Mutante	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,1	n. m.	n. m.	0,001
	Wildtyp	0,12 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,3	n. m.	n. m.	0,004
	S-E-Mutante	0,10 ± 0,02	1,34 ± 0,10	12,4	10,0 ± 3,0	130 ± 50	0,077
E698	Wildtyp	0,04 ± 0,01	0,35 ± 0,02	7,8	2,2 ± 0,2	118 ± 20	0,017
	S-E-Mutante	0,08 ± 0,01	2,50 ± 0,20	30,3	15,4 ± 5,0	91 ± 50	0,170
M765	Wildtyp	0,08 ± 0,01	0,68 ± 0,09	7,5	2,6 ± 0,4	73 ± 20	0,036

Reaktionsbedingungen: 25 mM HEPES, pH-Wert 7,4; 25 mM KCl und 25 mM $MgCl_2$.
Die Temperatur betrug 25 °C.
Eine S-A-Mutante von E692 konnte nicht aus *D. discoideum* isoliert werden.

[a] Die basale ATPase-Aktivität entspricht der ATP-Umsatzgeschwindigkeit ohne Aktin. Die aktinaktivierte ATPase-Aktivität wurde bei einem Wert von 20 µM F-Aktin bestimmt. Die Aktivierung bei 20 µM Aktin wurde berechnet als (aktivierte ATPase-basale ATPase)/basale ATPase.
[b] Die Werte für k_{cat} und K_{app} wurden durch Auswertung der Daten mit der Michaelis-Menten-Gleichung erhalten.
[c] Die Kopplungseffizienz (k_{cat}/K_{app}) wurde durch Berechnung des Quotienten beider Werte erhalten. Bei viel niedrigeren Aktinkonzentrationen als K_{app} konnte k_{cat}/K_{app} auch bei einer linearen Regression aus der Steigung der Geraden bestimmt werden.

4.5.2 Transientenkinetische Charakterisierung

Da durch transientenkinetische Methoden, der ATPase-Zyklus von Myosin in einzelne Schritte zerlegt werden kann, war es möglich, die molekularen Mechanismen der Regulation der Myosine I durch eine Phosphorylierung an der TEDS-Stelle und durch freie Magnesiumionen zu bestimmen.

Wie bei anderen kinetischen Untersuchungen von Myosinen der Klasse I (Ostap und Pollard, 1996; Jontes *et al.*, 1997; Collucio und Geeves, 1999; El Mezgueldi *et al.*, 2002) wurde auch bei der Interpretation der kinetischen Daten der Myosine I aus *D. discoideum* davon ausgegangen, daß die Wechselwirkung dieser Myosine mit Nukleotiden und Aktin denselben

grundlegenden Mechanismen folgt, die für das S1-Fragment von Muskelmyosinen beschrieben wurden (Ritchie *et al.*, 1993; Marston und Taylor, 1980). Deshalb wurde die Bindung von ATP an die Myosin I-Kopffragmente nach dem Modell analysiert, das in Schema 2.1 (Kapitel 2.3.4) gezeigt wird, und das auf Bagshaw *et al.* (1974) beruht. Die ATP-induzierte Dissoziation des Aktomyosinkomplexes wurde nach den Modellen interpretiert, die von Millar und Geeves (1983) und Siemankowski und White (1984) entwickelt wurden, und als Schema 2.3 in Kapitel 2.3.4 gezeigt sind. Die Bindung von Myosin an Aktin wurde mit dem Modell von Geeves und Conibear (1995) untersucht, das als Schema 2.4 in Kapitel 2.3.4 dargestellt ist.

Die Ergebnisse der transientenkinetischen Charakterisierung sind in den Tabellen 4.4 und 4.5 zusammengefaßt.

4.5.2.1 ATP-Bindung an Myosin I-Kopffragmente

Die Geschwindigkeit der ATP-Bindung an die Myosin I-Kopffragmente wurde durch Messung des Anstiegs der intrinsischen Proteinfluoreszenz nach der Zugabe eines Überschusses an ATP bestimmt. Abbildung 4.16 A zeigt die Fluoreszenzveränderung, die nach dem schnellen Mischen von 10 µM ATP mit 0,25 µM D698 im Stopped-Fow-Fluoreszenzspektrometer beobachtet wurde. Der transiente Fluoreszenzanstieg konnte mit einer Exponentialfunktion [$F = F_0 \cdot (1 - e^{-k_{obs}})$] mit einer beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) von 6,8 s^{-1} und einer Amplitude von 14 % beschrieben werden.

Bei niedrigen ATP-Konzentrationen von 1 bis 20 µM stieg k_{obs} linear in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration an. Die Bindungskonstante 2. Ordnung (K_1k_{+2}) wird durch die Steigung der Geraden definiert. Die ermittelten Werte betragen 1,97 $\mu M^{-1}s^{-1}$ für B698, 0,66 $\mu M^{-1}s^{-1}$ für D692 und 0,96 $\mu M^{-1}s^{-1}$ für E698. Bei hohen ATP-Konzentrationen waren die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von MyoD und MyoE nicht mehr linear von der ATP-Konzentration abhängig, sondern näherten sich einem Maximalwert an. Die Veränderung der intrinsischen Proteinfluoreszenz des MyoB-Kopffragments war deutlich kleiner als die der Kopffragmente von MyoD und MyoE und konnte deshalb im Bereich hoher ATP-Konzentrationen nicht mehr ausgewertet werden. Durch Anpassung einer Hyperbel an die k_{obs}-Werte von D692 und E698 wird ein Maximalwert (k_{max}) erhalten, der in diesem Fall der Geschwindigkeit des auf die ATP-Bindung folgenden Isomerisierungsschritts und nicht wie bei Myosinen der Klasse II der Geschwindigkeit des Hydrolyseschritts entspricht. Der Maximalwert von D692 liegt bei 640 $\mu M^{-1}s^{-1}$, der Wert von MyoE beträgt 900 $\mu M^{-1}s^{-1}$.

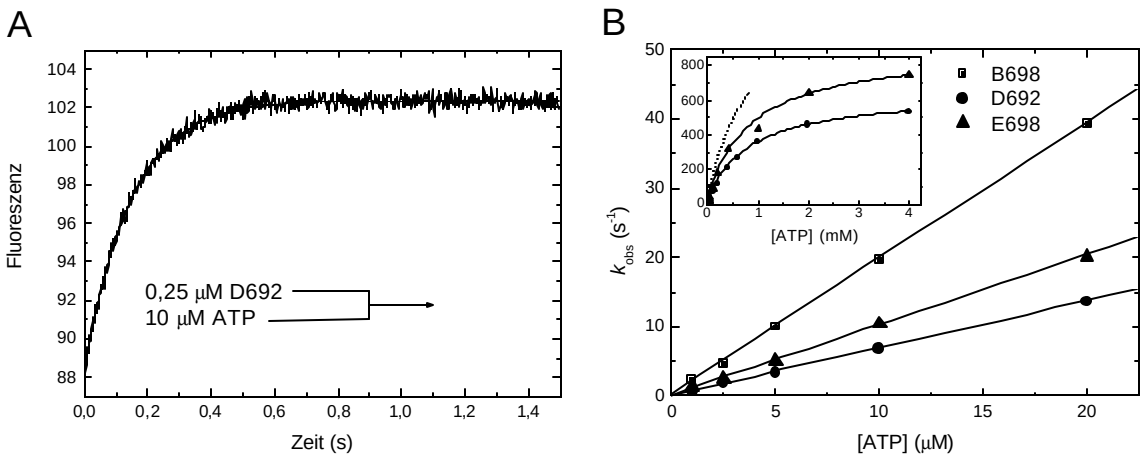


Abbildung 4.16: **ATP-Bindung an Myosin I-Kopffragmente.** (A) Veränderung der intrinsischen Proteinfluoreszenz bei der Bindung von 10 µM ATP an 0,25 µM D698 bei der Messung im Stopped-Fow-Fluoreszenzspektrometer. Die Fluoreszenz wurde bei 295 nm angeregt und die Emission durch einen WG 320-Filter verfolgt. Die Kurven wurden mit einer Exponentialfunktion 1. Ordnung ausgewertet. (B) Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) von (¦) B698, (?) D698 und (?) E698 von der ATP Konzentration. Bei niedrigen ATP-Konzentrationen im Bereich von 1 bis 20 µM konnte eine Gerade an die Werte angepaßt werden werden. Die Steigung der Geraden definiert die Bindungskonstante 2. Ordnung (K_1k_{+2}). Bei hohen ATP-Konzentrationen wurden die Daten mit einer Hyperbel ausgewertet, und ein Maximalwert (k_{max}) der Fluoreszenzveränderung wurde erhalten.

Es wurde ebenfalls die ATP-Bindung an die Myosin I-Kopffragmente mit einer Mutation an der TEDS-Stelle untersucht. Die erhaltenen Bindungskonstanten und Maximalwerte unterscheiden sich jedoch nicht signifikant von denen der Wildtypproteine und sind deshalb in der Tabelle 4.4 nicht angegeben.

4.5.2.2 ADP-Bindung an Myosin I-Kopffragmente

Auch die Reaktion bei der ADP-Bindung an die Myosin I-Kopffragmente wurde untersucht. Dabei wurde nur im Fall von MyoD und MyoE ein auswertbares Fluoreszenzsignal erhalten. Über den Bereich von 1 bis 25 µM ADP war k_{obs} linear von der ADP-Konzentration abhängig, und die Steigung einer Geraden durch die Meßwerte ergibt eine Bindungskonstante 2. Ordnung (k_{-6}/K_7) von 0,98 $\mu M^{-1}s^{-1}$ für D692 und 0,34 $\mu M^{-1}s^{-1}$ für E698. Die y-Achsenabschnitte werden durch die Daten nicht genau bestimmt, ergeben jedoch Werte für die Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation (k_{+6}) von etwa 0,2 s^{-1} für D692 und etwa 2,5 s^{-1} für E698.

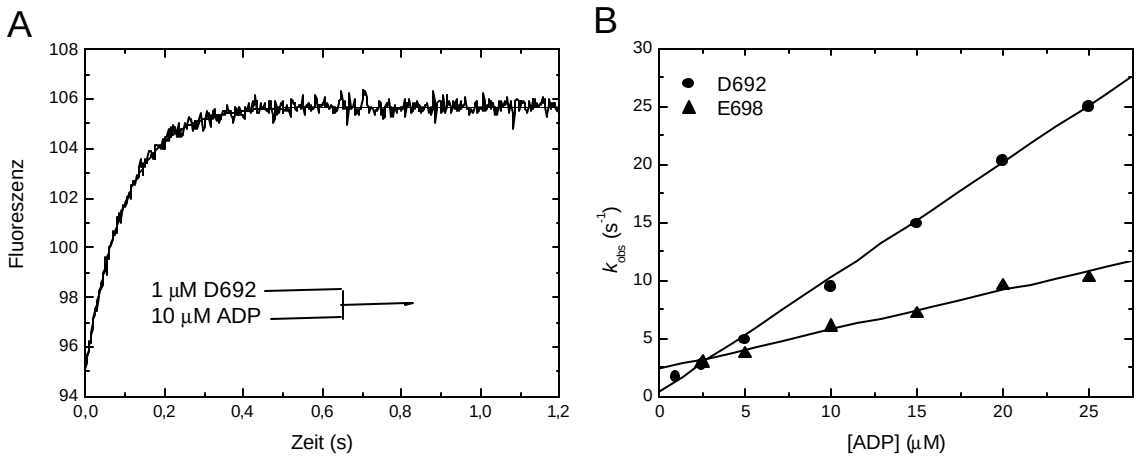


Abbildung 4.17: **ADP-Bindung an Myosin I-Kopffragmente.** (A) Veränderung der intrinsischen Proteinfluoreszenz beim Mischen von 10 µM ADP mit 1 µM D692. An die Daten wurde eine Exponentialfunktion angepaßt. (B) Abhängigkeit von k_{obs} von der ADP-Konzentration. An die Daten wurde eine Gerade angepaßt, deren die Steigung dem Wert für k_{-6}/K_7 entspricht.

Die ADP-Bindung an die Kopffragmente mit einer Mutation an der TEDS-Stelle zeigte keine signifikanten Abweichungen von den Alanin- zu den Glutamat-Mutanten. Die erhaltenen Werte sind deshalb nicht in der Tabelle 4.4 angegeben.

4.5.2.3 ADP-Dissoziation aus dem Komplex mit Myosin I-Kopffragmenten

Da die Bindung von ATP an die Myosin I-Konstrukte zu einer größeren Zunahme der intrinsischen Proteinfluoreszenz führte als die Bindung von ADP, konnte die Verdrängung von ADP aus der Nukleotidbindungsstelle durch einen Überschuß an ATP durch den Anstieg der Gesamtfluoreszenz verfolgt werden. Die Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation (k_{+6}) beträgt 0,70 s^{-1} für B698 und 0,60 s^{-1} für D692. Die ADP-Dissoziation von E698 erfolgt mit 3,13 s^{-1} etwa fünfmal schneller. Die ADP-Affinität der Myosin I-Kopffragmente (K_D) kann rechnerisch aus dem Quotienten $k_{+6}/(k_{-6}/K_7)$ ermittelt werden und beträgt 0,6 µM für D692 und 9,2 µM für E692. Sie ist in der Tabelle 4.4 in Klammern angegeben.

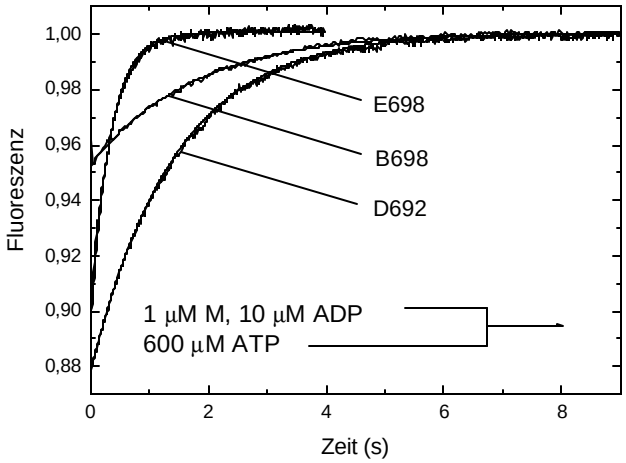


Abbildung 4.18: **ADP-Dissoziation aus dem Komplex mit Myosin I-Kopffragmenten.** Gezeigt ist die Veränderung der Tryptophanfluoreszenz im Stopped-Flow-Fluoreszenzspektrometer nach Mischen des Komplexes aus 10 µM ADP und 1 µM Myosinkopffragment mit 600 µM ATP. Die Fluoreszenz wurde bei 295 nm angeregt und durch einen WG 320-Filter aufgenommen. Die Daten wurden mit einer Exponentialfunktion ausgewertet und die k_{obs} ergibt den Wert für die Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation aus dem Komplex mit Myosin I-Kopffragmenten (k_{+6}).

Die Reaktion, die bei der Zugabe eines Überschusses an ATP zu den Kopffragmenten von MyoD und MyoE in der Gegenwart von 0 bis 20 µM beziehungsweise 0 bis 40 µM ADP beobachtet wurde, verlief zweiphasig und konnte mit einer Summe aus zwei Exponentialfunktionen ausgewertet werden. Die Amplituden beider Phasen waren abhängig von der ADP-Konzentration, wobei die Amplitude der schnellen Phase mit steigender ADP-Konzentration abnahm, und die Amplitude der langsamen Phase zunahm. Dieses Verhalten steht in Übereinstimmung mit einem Modell, in dem die schnelle Phase der Geschwindigkeit entspricht, mit der ATP an freies Myosinkopffragment bindet, und der langsame Prozeß die Geschwindigkeit ist, mit der ADP durch ATP aus dem Komplex mit dem Myosinkopffragment dissoziiert (k_{+6}). Sie bleibt unabhängig von der eingesetzten ATP-Konzentration, solange ATP im Überschuß vorliegt. Die Abhängigkeit der Amplituden von der ADP-Konzentration kann jeweils mit einer Hyperbel beschrieben werden. Der Mittelwert, beträgt 1,9 µM für D692 und 7,1 µM für E698. Diese Werte entsprechen der ADP-Affinität des Myosinkopffragments (K_D). Der Gesamtanstieg der Fluoreszenz von MyoB bei der Reaktion war zu klein, um zwei Phasen unterscheiden zu können. Die Messungen mit den TEDS-Stelle-Mutanten ergaben ADP-Affinitäten, die sich jeweils nicht signifikant voneinander unterscheiden.

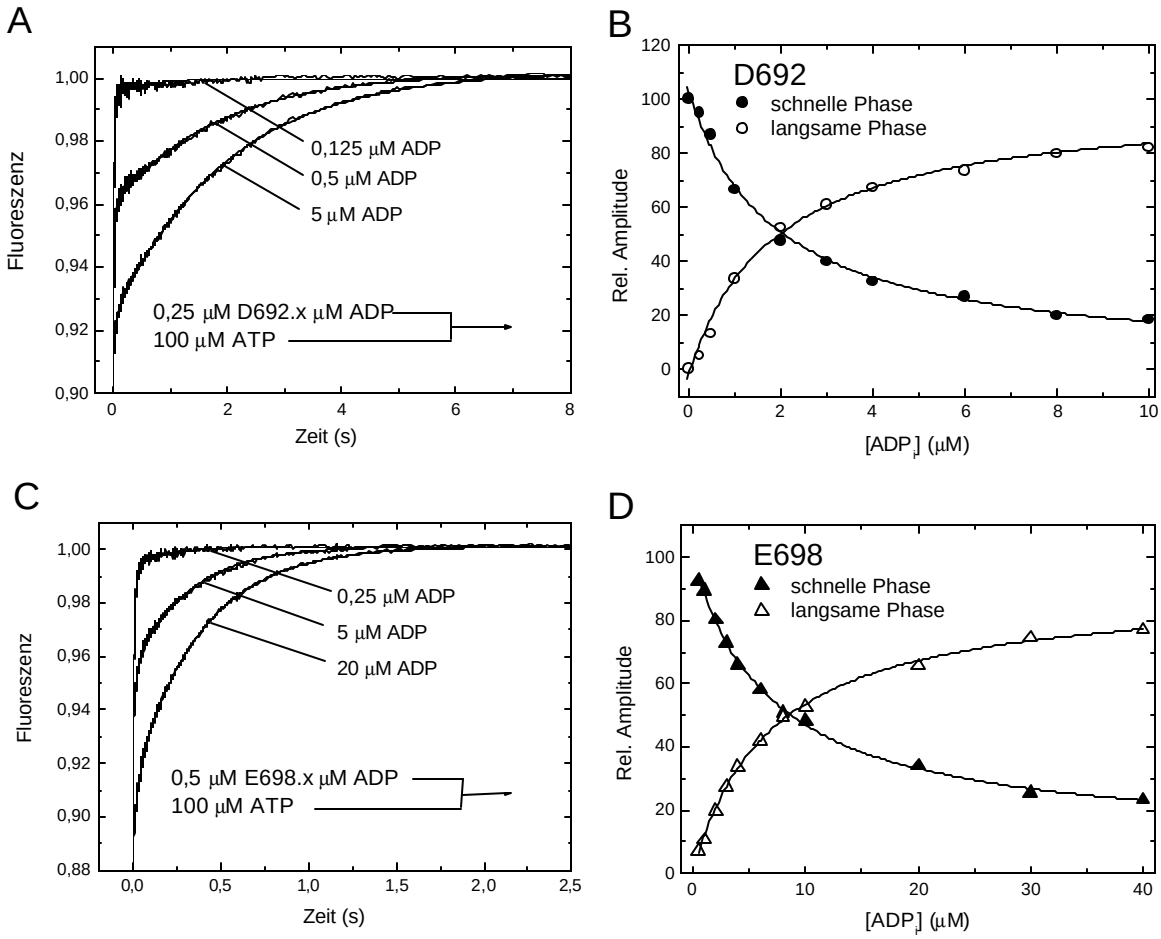


Abbildung 4.19: **ADP-Affinität des MyoD- und MyoE-Kopffragments.** Die Verdrängung von ADP durch ATP aus dem Myosinkomplex ergab zweiphasige Reaktionen. (A) Dargestellt sind die Reaktionen, die bei der Zugabe von 100 µM ATP zu 0,25 µM D692 im Komplex mit 0,125, 0,5 und 5 µM ADP erhalten wurden. Die Reaktionen wurden durch die Summe zweier Exponentialfunktionen ausgewertet. (B) Die Amplituden beider Exponentialfunktionen wurden in Abhängigkeit von der ADP-Konzentration aufgetragen. Die Daten für die schnelle (?) und die langsame (?) Reaktion von D692 wurden jeweils mit einer Hyperbel ausgewertet. (C) Gezeigt sind die Reaktionen, die bei der Zugabe von 100 µM ATP zu 0,5 µM E698 im Komplex mit 0,25, 5 und 20 µM ADP erhalten wurden. (D) Die Amplituden beider Exponentialfunktionen in Abhängigkeit von der ADP-Konzentration. Auch die Daten für die schnelle (?) und die langsame (?) Reaktion von E698 wurden jeweils durch eine Hyperbel ausgewertet.

4.5.2.4 Inhibierung der ADP-Dissoziation aus dem Komplex mit MyoD durch freie Magnesiumionen

Um den Schritt des ATP-Zyklus von MyoD zu bestimmen, der durch die Konzentration an Magnesiumionen reguliert wird, wurde die ADP-Dissoziation aus dem Komplex mit dem MyoD-Kopffragment bei verschiedenen Mg^{2+}-Ionenkonzentrationen bestimmt. Dabei wurde beobachtet, daß die Dissoziationsgeschwindigkeit mit zunehmender Mg^{2+}-Ionenkonzentration abnahm. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten wurden in Abhängigkeit von der Mg^{2+}-Ionenkonzentration dargestellt, und die Daten wurde mit einer Hyperbel ausgewertet (Abbildung 4.20). Dadurch wurde ein Wert für die Gleichgewichtskonstante der inhibitorischen Reaktion (K_i) von 0,44 mM erhalten.

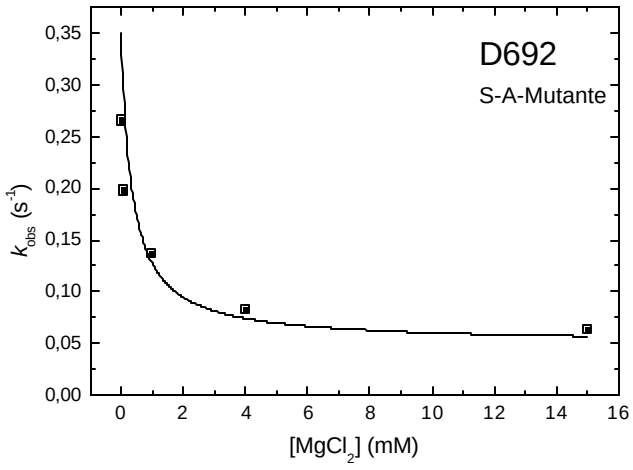


Abbildung 4.20 : **Inhibierung der ADP-Dissoziation aus dem Komplex mit D692 durch freie Mg^{2+}-Ionen.** Dargestellt sind die Werte für k_{obs}, die bei verschiedenen Konzentrationen an Mg^{2+}-Ionen gemessen wurden. Die Daten wurden mit einer Hyperbel ausgewertet. Dabei wurde für K_i ein Wert von 0,44 mM erhalten.

4.5.2.5 Bindung von farbstoffmarkierten Nukleotiden an Myosin I-Kopffragmente

Um die Wechselwirkung von Nukleotiden mit Myosin zu untersuchen, werden häufig auch Nukleotidderivate verwendet, die mit einer fluorophoren Gruppe versehen sind und bei Bindung an Myosin ihre Fluoreszenzeigenschaften verändern (Woodward *et al.*, 1991; Ritchie *et al.*, 1993; Cremo *et al.*, 1990). Dazu gehören mantATP und mantADP, bei denen an das Nukleotid eine N-Methylanthraniloyl- (mant-) Gruppe gebunden ist (Hiratsuka und Uchida, 1973; Hiratsuka, 1983). Bei kinetischen Messungen verhalten sich diese Nukleotide meist den Ursprungsnukleotiden ähnlich.

Da bei der ATP-Bindung an das MyoB-Kopffragment nur eine kleine Veränderung der intrinsischen Proteinfluoreszenz erfolgte, und die ADP-Bindung an das MyoB-Kopffragment keine meßbaren Signale ergab, wurden sowohl ATP-Bindung als auch die ADP-Bindung an die Myosin I-Kopffragmente zusätzlich mit mant-Nukleotiden untersucht.

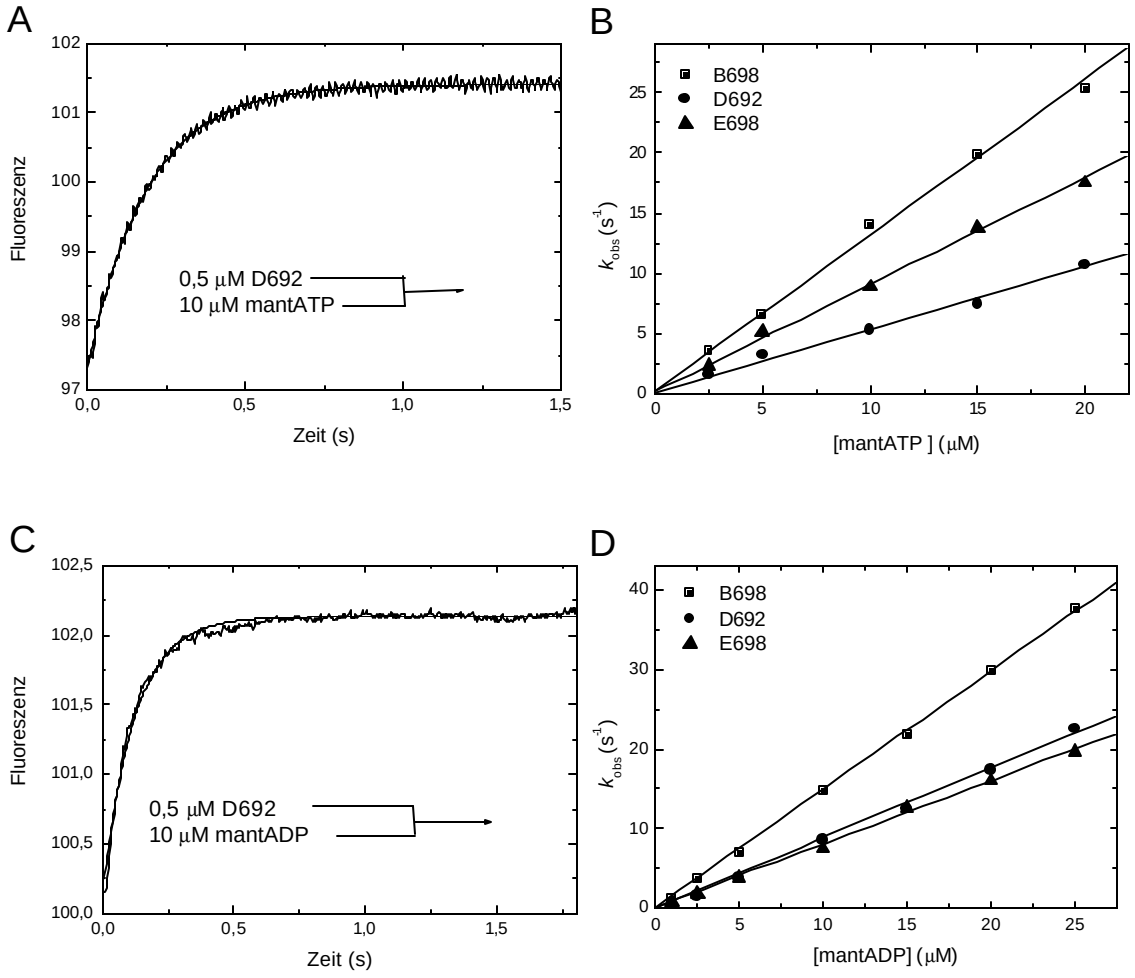


Abbildung 4.21: **mant-Nukleotid-Bindung an Myosin I-Kopffragmente.** (A) Fluoreszenzveränderung bei der Bindung von 10 µM mantATP an 0,5 µM D698 bei der Messung im Stopped-Flow-Fluoreszenzspektrometer. Die mant-Fluoreszenz wurde bei 365 nm angeregt und durch einen KV 389-Filter gemessen. (B) Darstellung von k_{obs} für die Bindung von mantATP an (¦) B698, (?) D698 und (?) E698 in Abhängigkeit von der mantATP-Konzentration. Die Steigung einer Geraden durch die Daten ergab die Bindungskonstante 2. Ordnung der mantATP-Bindung (K_1k_{+2}). (C) Fluoreszenzveränderung bei der Bindung von 10 µM mantADP an 0,5 µM D692. (D) Darstellung von k_{obs} der Bindung von mantADP an (¦) B698, (?) D698 und (?) E698 in Abhängigkeit von der mantADP-Konzentration. Die Steigung einer Geraden durch die Daten ergab die Bindungskonstante 2. Ordnung der mantADP-Bindung (k_{-6}/K_7).

Die mantATP-Bindung führte bei allen drei Myosin I-Kopffragmenten zu einem exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz der mant-Gruppe, die bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt wurde. Die Abbildung 4.21 A zeigt die Fluoreszenzveränderung bei der Zugabe von 10 µM mantATP zu 0,5 µM MyoD-Kopffragment. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten waren im Bereich 1 bis 25 µM linear von der mantATP-Konzentration abhängig und die Bindungskonstanten 2. Ordnung wurden aus den Steigungen der Geraden ermittelt (Abbildung 4.21 B). Der erhaltene Werte für die mantATP-Bindung (K_1k_{+2}) beträgt 1,30 $\mu M^{-1}s^{-1}$ für B698, 0,53 $\mu M^{-1}s^{-1}$ für D692 und 0,91 $\mu M^{-1}s^{-1}$ für E698. Diese Werte entsprechen denen für die ATP-Bindung.

Die Reaktion mit mantADP wurde in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 25 µM untersucht. Die Abbildung 4.21 C zeigt die Fluoreszenzveränderung bei der Zugabe von 10 µM mantADP zu 0,5 µM MyoD-Kopffragment. Die Steigungen von Geraden durch die beobachteten Geschindigkeitskonstanten ergeben die Bindungskonstanten 2. Ordnung (k_{-6}/K_7) (Abbildung 4.21 D). Sie betragen 1,48 $\mu M^{-1}s^{-1}$ für B698, 0,87 $\mu M^{-1}s^{-1}$ für D692 und 0,79 $\mu M^{-1}s^{-1}$ für E698. Zwischen der Alanin- und der Glutamat-Mutanten eines Myosin I-Kopffragmente wurde jeweils keine veränderte Bindung der fluorezenzmarkierten Nukleotide beobachtet.

Die Geschwindigkeit der mantADP-Dissoziation wurde durch die Verdrängung von mantADP aus dem Komplex mit den Myosin I-Kopffragmenten durch einen Überschuß an ATP bestimmt. Die Abbildung 4.22 zeigt die Reaktionen, die bei der Zugabe von 600 µM ATP zu einem Komplex aus 0,5 µM Myosin I-Kopffragment und 0,5 µM mantADP beobachtet wurden. Der transiente Abfall der mant-Fluoreszenz wurde mit einer Exponentialfunktion ausgewertet und der Wert von k_{obs} gibt die Dissoziationsgeschwindigkeit (k_{+6}) von mantADP an. Sie beträgt 0,01 s^{-1} für B698, 0,09 s^{-1} für D692 und 0,08 s^{-1} für E698 und liegt damit 6- bis 70-fach niedriger als die für ADP. Die mantADP-Affinität (K_D) wird aus dem Quotienten ($k_{+6}/(k_{-6}/K_7)$ berechnet und hat Werte von 0,006 µM für B698 und 0,1 µM für D692 und E698.

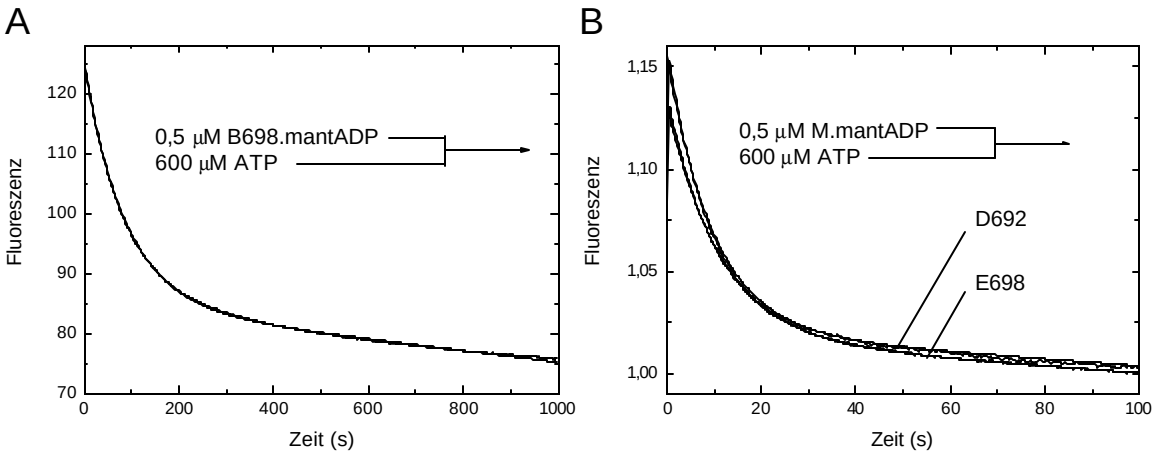


Abbildung 4.22: **mantADP-Dissoziation aus dem Komplex mit Myosin I-Kopffragmenten.** Dargestellt ist die Veränderung der mant-Fluoreszenz nach Mischen von 600 µM ATP mit dem Komplex aus 0,5 µM mantADP und dem Myosin I-Kopffragment im Stopped-Flow-Fluoreszenzspektrometer. (A) MyoB-Kopffragment, (B) MyoD- und MyoE-Kopffragment. Die beobachtete Reaktion wurde mit einer Exponentialfunktion ausgewertet und k_{obs} entspricht der Dissoziationsgeschwindigkeit von mantADP (k_{+6}).

4.5.2.6 ATP-induzierte Dissoziation des Aktomyosinkomplexes

Die ATP-Bindung an den Aktomyosinkomplex kann durch die Messung des exponentiellen Fluoreszenzanstiegs von Pyren-Aktin verfolgt werden, der eintritt, wenn der Komplex nach der Zugabe eines ATP-Überschusses zerfällt. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten waren im Konzentrationsbereich von 5 bis 25 µM linear von der ATP-Konzentration abhängig. Die Bindungskonstante 2. Ordnung ($\mathbf{K_1k_{+2}}$) wird durch die Steigung einer Geraden durch die Meßwerte angegeben und beträgt 1,11 $\mu M^{-1}s^{-1}$ für B698, 0,49 $\mu M^{-1}s^{-1}$ für D692 und 0,40 $\mu M^{-1}s^{-1}$ für E698. Bei hohen ATP-Werten (> 2 mM) näherten sich die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten einem Maximalwert an und konnten durch eine Hyperbel angepaßt werden, wobei der Maximalwert (k_{max}) den Wert von $\mathbf{k_{+2}}$ ergibt. Er liegt liegt höher als 1000 s^{-1} für B698, bei 960 s^{-1} für D692 und bei 750 s^{-1} für E698.

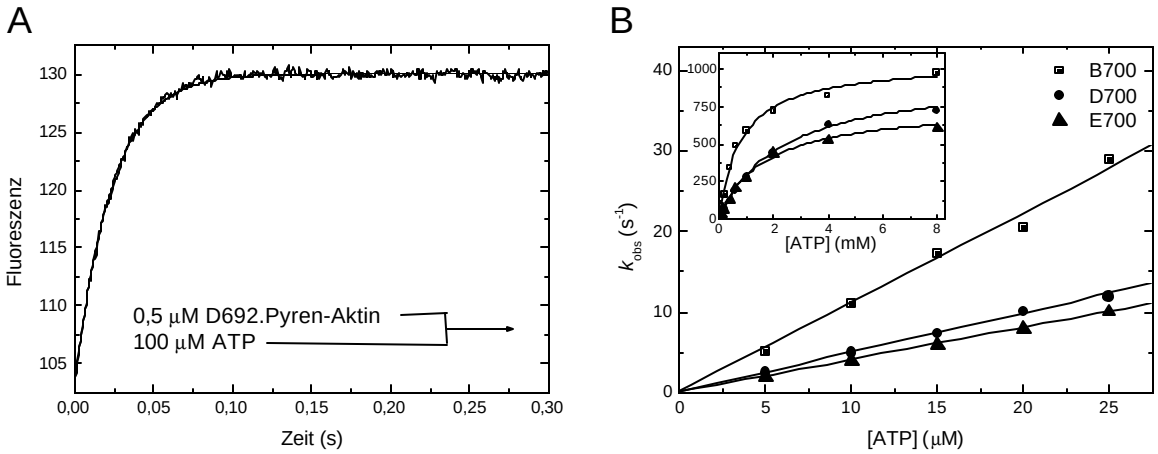


Abbildung 4.23: **ATP-induzierte Dissoziation des Aktomyosinkomplexes.** (A) Anstieg der Pyren-Fluoreszenz bei der Dissoziation eines Komplexes aus 0,5 µM Pyren-Aktin und D692 durch Mischen mit 100 µM ATP. (B) Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) für (●) B698, (▲) D698 und (■) E698 waren im Konzentrationsbereich von 5-25 µM linear von der ATP Konzentration abhängig. Die Bindungskonstanten 2. Ordnung ($\mathbf{K_1k_{+2}}$) wurden durch die Steigungen einer Geraden durch die Meßwerte gegeben. An die Daten in dem Konzentrationsbereich von 0,005-8 mM wurde eine Hyperbel angepaßt. Die Geschwindigkeitskonstanten des Isomerisierungsschritts ($\mathbf{k_{+2}}$) wurden durch die berechneten Maximalwerte gegeben.

Bei der ATP-induzierten Dissoziation von Acto·E698 war eine zweite langsamere Komponente sichtbar. Die langsame Phase, die bei ATP-Konzentrationen über 200 µM sichtbar wurde, hatte eine beobachtete Geschwindigkeitskonstante von ca. 30 s^{-1} und einen Anteil von etwa 20 % an der Gesamtamplitude.

Die Bindungskonstanten und Maximalwerte, die für die Myosin I-Kopffragmente mit einer Mutatation an der TEDS-Stelle gemessen wurden, unterschieden sich nicht aussagekräftig von denen der Wildtyp-Proteine.

4.5.2.7 ADP-Inhibierung der ATP-induzierten Dissoziation des Aktomyosinkomplexes

Die ADP-Affinität an den Aktomyosinkomplex ($\mathbf{K_{AD}}$) wurde mit der ADP-Inhibierung der ATP-induzierten Dissoziation des Aktomyosinkomplexes bestimmt. Es wurde der exponentielle Anstieg der Pyren-Fluoreszenz bei der Dissoziation des Komplexes aus Pyren-Aktin und Myosin verfolgt.

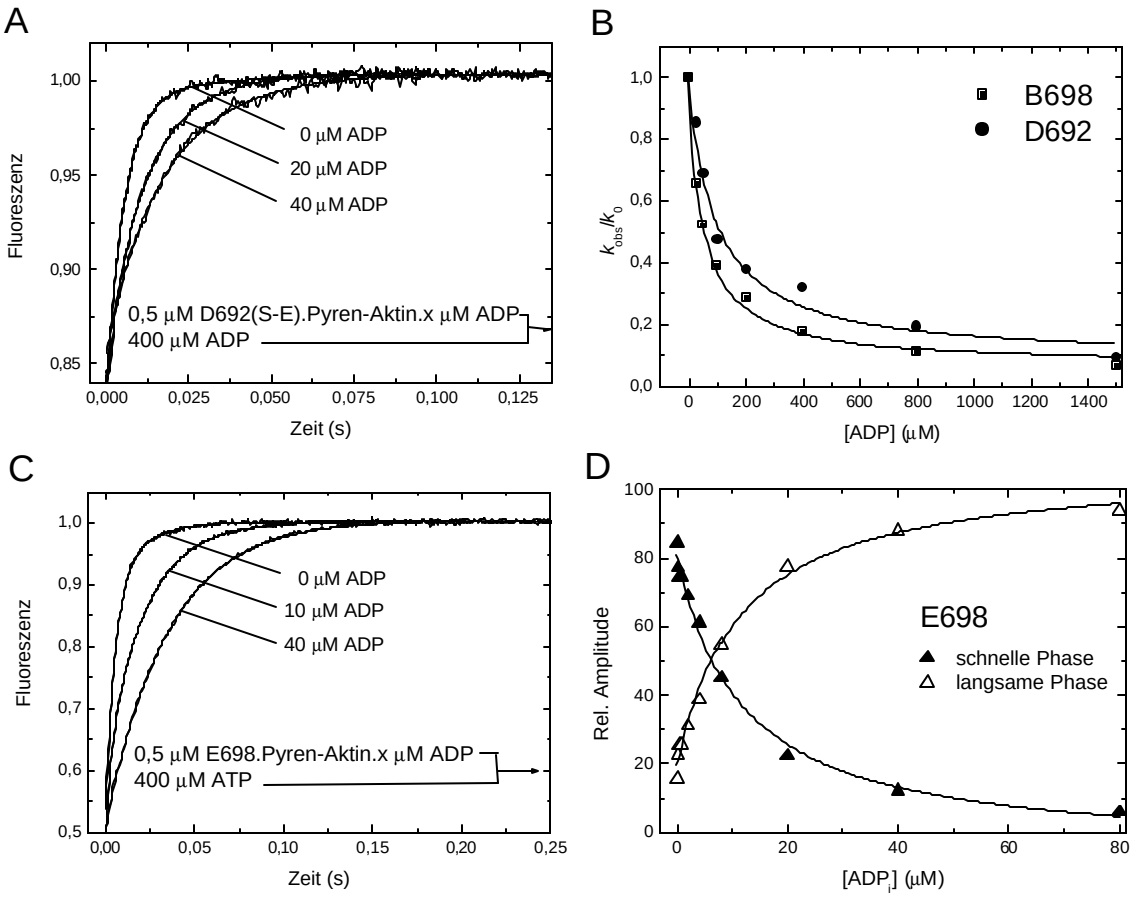


Abbildung 4.24: **ADP-Inhibierung der ATP-induzierten Dissoziation des Aktomyosinkomplexes**. (A) Die Dissoziationsreaktionen von 0,5 µM Acto·D692(S-E) im Komplex mit 0, 20 und 40 µM ADP waren einphasig und wurden durch eine Exponentialfunktion ausgewertet. (B) k_{obs}/k_0 wurde gegen die ADP-Konzentration aufgetragen, wobei k_0 der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten ohne ADP entsprach. $\mathbf{K_{AD}}$ wurde bestimmt, indem die Daten mit der Gleichung $k_{obs}/k_0 = 1/(1 + [ADP]/\mathbf{K_{AD}})$ angepaßt wurden. (C) Im Gegensatz dazu führte ADP im Komplex von E698 und Pyren-Aktin zu zweiphasigen Dissoziationsreaktionen. Dargestellt sind die beobachteten Fluoreszenzveränderungen bei der Reaktion von 0,5 µM E698, Pyren-Aktin und 0; 10; und 40 µM ADP mit 400 µM ATP. (D) Eine Summe von zwei Exponentialfunktionen wurde an die Daten angepaßt und die relativen Amplituden der beiden Prozesse wurden in Abhängigkeit von der ADP-Reaktion aufgetragen. An die Daten für den schnellen (?) und den langsamen (?) Prozeß wurde jeweils eine Hyperbel angepaßt und aus dem Mittelwert eine $\mathbf{K_{AD}}$ von 11 µM für E698 bestimmt.

Die Reaktionen der MyoB- und MyoD-Kopffragmente waren einphasig. Der Quotient k_{obs}/k_0 wurde gegen die ADP-Konzentration aufgetragen, und zur Bestimmung der ADP-Affinität wurde die Gleichung $k_{obs}/k_0 = 1/(1 + [ADP]/\mathbf{K_{AD}})$ an die Daten angepaßt. Die Konstante k_0 steht für die beobachtete Geschwindigkeitskonstante, die ohne ADP gemessen wird. Es wurde eine ADP-Affinität von 51 µM für B698 und 94 µM für D692 erhalten. Der Wert, der für die Glutamat-Mutante von D692 bestimmt wurde, beträgt 75 µM und der Wert für die Alanin-Mutante von D692 liegt bei 118 µM. Bei den Mutanten von B698 wurde keine signifikante Abweichung beobachtet. Bei den Wildtyp-Konstrukten und den Alanin-Mutanten von MyoB und MyoD kam es schon durch ADP-Bindung an den Aktomyosinkomplex zu einer Dissoziation, eine Beobachtung die auf eine niedrige Aktinaffinität dieser Konstrukte hindeutet.

Im Gegensatz dazu hatte die Gegenwart kleiner ADP-Mengen keinen Einfluß auf die Stabilität des Komplexes aus Aktin und dem MyoE-Kopffragment, sondern führte bei der ATP-induzierten Dissoziation des Komplexes zu zweiphasigen Reaktionen. Über einen Konzentrationsbereich von 0 bis 80 µM ADP waren die Werte für k_{obs} der beiden Phasen unabhängig von der ADP-Konzentration. Die schnelle Phase entspricht der Geschwindigkeitskonstanten, die ohne ADP beobachtet wird, und die langsame Phase entspricht der Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation aus dem Aktomyosinkomplex ($\mathbf{k_{-AD}}$). Die Geschwindigkeit der langamen Phase beträgt etwa 30 s^{-1}. Die Amplituden beider Phasen variieren mit der ADP-Konzentration, wobei die Amplitude der schnellen Phase mit zunehmender ADP-Konzentration abnimmt und die Amplitude der langsamen Phase zunimmt. Die Gesamtamplitude bleibt konstant, was in Übereinstimmung mit der geringen Dissoziation des Aktomyosinkomplexes durch ADP steht. Die relativen Amplituden wurden in Abhängigkeit von der ADP-Konzentration aufgetragen, und an die Daten wurde jeweils eine Hyperbel angepaßt. Beide Funktionen ergeben einen $\mathbf{K_{AD}}$-Wert von 11 µM für E698. Für die Glutamatmutante des MyoE-Kopffragments wurden dieselben Werte für $\mathbf{k_{-AD}}$ und $\mathbf{K_{AD}}$ bestimmt.

Tabelle 4.4: **Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten des Aktomyosin-ATPase-Zyklus**

Nukleotid	Konstante	**B698**	**D692**	**E698**	**M765**
		Nukleotidbindung an M			
ATP	K_1k_2 ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	1,97 ± 0,01	0,66 ± 0,01	0,96 ± 0,03	0,56 ± 0,03
	k_{max} (s^{-1})	n. m	640 ± 10	900 ± 30	30 ± 1
mantATP	K_1k_2 ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	1,30 ± 0,02	0,53 ± 0,02	0,91 ± 0,01	0,81 ± 0,02
ADP	k_{-6}/K_7 ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	n. m.	0,98 ± 0,02	0,34 ± 0,02	n. m.
	k_{+6} (s^{-1})	0,70 ± 0,003	0,60 ± 0,002	3,13 ± 0,03	n. m.
	K_D (μM) [a]	ca. 1	1,9 ± 0,3 (0,6)	7,1 ± 0,4 (9,2)	14 [b]
mantADP	k_{-6}/K_7 ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	1,48 ± 0,01	0,87 ± 0,01	0,79 ± 0,01	0,36 ± 0,004
	k_{+6} (s^{-1})	0,01 ± 0,001	0,09 ± 0,001	0,08 ± 0,001	1,5 ± 0,01
	K_D (μM)	0,006	0,10	0,10	4,17
		Nukleotidbindung an A·M			
ATP	$\mathbf{K_1k_{+2}}$ ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	1,11 ± 0,03	0,49 ± 0,01	0,40 ± 0,002	0,16 ± 0,002
	$\mathbf{k_{+2}}$ (s^{-1})	>1000	960 ± 20	750 ± 20	490 ± 20
ADP	$\mathbf{K_{AD}}$ (μM)	62 ± 5	94 ± 20	12 ± 2	253 ± 11
	$\mathbf{K_{AD}}/K_D$	ca. 50	49	1,7	18

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

[a] Angegeben ist der Messwert, der aus den zweiphasigen ADP-Dissoziationsreaktionen bei verschiedenen ADP-Konzentrationen bestimmt wurde. In Klammern ist der Wert angegeben, der aus dem Quotienten $[k_{+6}/(k_{-6}/K_7)]$ berechnet wurde. Der Wert für B698 wurde abgeschätzt, indem die Bindungskonstante für mantADP verwendet wurde.

[b] Batra *et al*., 1999

4.5.2.8 Aktinbindung an Myosin I-Kopffragmente

Die Geschwindigkeit der Aktin-Bindung an die Myosin I-Kopffragmente wurde gemessen, indem der exponentielle Abfall der Pyren-Fluoreszenz verfolgt wurde, der nach der Bindung von Pyren-Aktin an Myosin erfolgt. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) wurden gegen die Konzentration an Pyren-Aktin aufgetragen und die Werte für k_{obs} waren im Bereich der untersuchten Aktinkonzentrationen zwischen 0,5 und 2,5 µM linear von der Aktinkonzentration abhängig. Die Bindungskonstante 2. Ordnung ($\mathbf{k_{+A}}$) der Wildtyp-Konstrukte wurde aus der Steigung dieser Geraden bestimmt und betrug 1,06 $\mu M^{-1}s^{-1}$ für B698, 3,50 $\mu M^{-1}s^{-1}$ für D692 und 2,58 $\mu M^{-1}s^{-1}$ für E698. Die Glutamat-Mutanten von den MyoB- und MyoD-Kopffragmenten zeigen keine signifikante Abweichung von diesen Werten, während die S-E-Mutante von D692 mit 1,42 $\mu M^{-1}s^{-1}$ etwa dreimal langsamer an Aktin bindet als der Wildtyp und die S-A-Mutante mit 4,08 $\mu M^{-1}s^{-1}$ etwas schneller. Dieses Verhalten kann damit erklärt werden, daß es bei der Einführung eines negativen Restes an der TEDS-Stelle zu einer abstoßenden Wechselwirkung mit negativ geladenen Aminosäuren an der Oberfläche des Aktinmoleküls kommt.

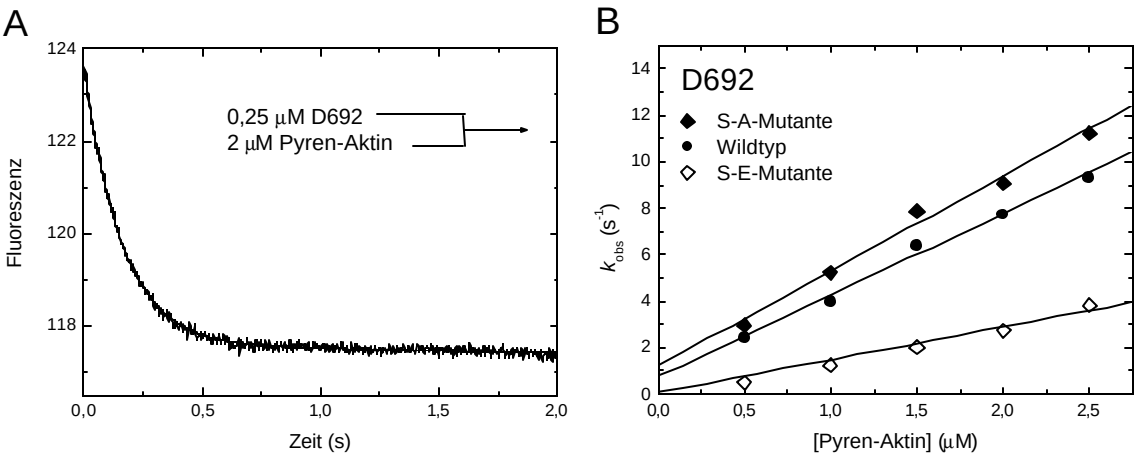


Abbildung 4.25: **Aktin-Bindung an MyoD-Kopffragmente** (A) Fluoreszenzveränderung bei der Reaktion von 2 µM Pyren-Aktin mit 0,25 µM D692. An die Daten wurde eine Exponentialfunktion angepaßt. (B) Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von der Konzentration an Pyren-Aktin. An die Daten wurde eine Gerade angepaßt, deren Steigung die Bindungskonstante 2. Ordnung ($\mathbf{k_{+A}}$) angibt. Die Symbole entsprechen D692 (?) S-A-Mutante, (•) Wildtyp und (?) S-E-Mutante.

4.5.2.9 Dissoziation des Aktomyosinkomplexes in der Abwesenheit von ATP

Die Geschwindigkeitskonstante für die Aktin-Dissoziation von den Myosin I-Kopffragmenten ($\mathbf{k_{-A}}$) wurde bestimmt, indem Pyren-Aktin aus dem Aktomyosinkomplex mit einem 40-fachen Überschuß an unmarkiertem Aktin verdrängt wurde. An die beobachtete Fluoreszenz-erhöhung konnte eine Exponentialfunktion angepaßt werden, und die beobachtete

Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}) entspricht $\mathbf{k_{-A}}$. Die Dissoziationskonstanten der Wildtyp-Kopffragmente betragen 4,7 ms^{-1} für B698, 43,0 ms^{-1} für D692 und 5,5 ms^{-1} für E698.

Aktin dissoziiert mit einer Geschwindigkeitskonstanten von 55,9 ms^{-1} etwa zwölfmal schneller von der S-A-Mutanten des MyoB-Kopffragments als von der S-E-Mutanten ($\mathbf{k_{-A}}$ = 4,7 ms^{-1}). Die Dissoziationskonstante der S-E-Mutanten unterscheidet sich nicht von der des Wildtyp-Konstrukts. Aktin dissoziierte auch von der S-A-Mutanten von D692 mit 87,2 ms^{-1} 32mal schneller als von der S-E-Mutanten ($\mathbf{k_{-A}}$ = 2,7 ms^{-1}) und etwa doppelt so schnell wie von dem Wildtyp-Konstrukt. Für MyoE wurde konnte keine Alanin-Mutante in *D. discoideum* überexprimiert werden. Aktin dissoziierte vom Wildtyp etwa viermal schneller als von Glutamat-Mutanten mit einem $\mathbf{k_{-A}}$-Wert von 1,5 ms^{-1}.

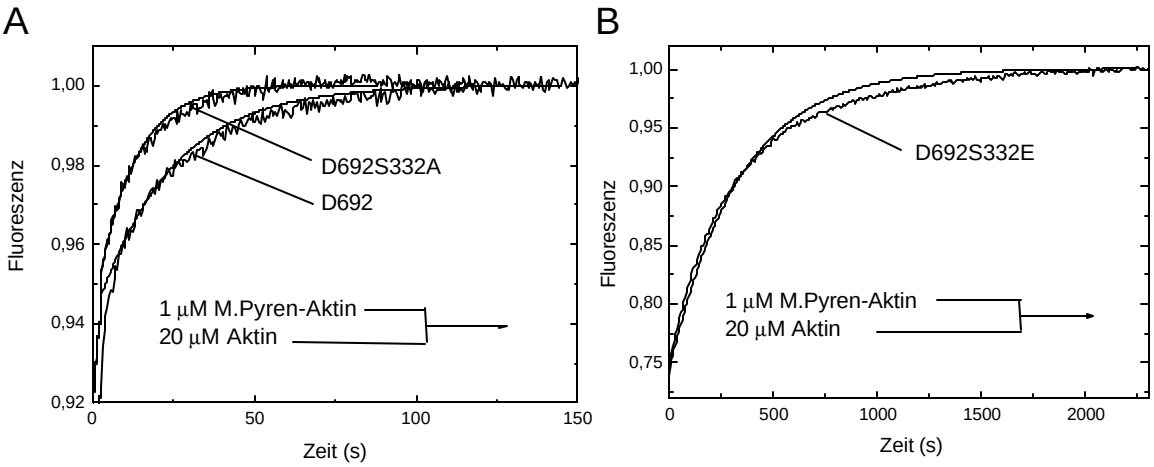


Abbildung 4.26: **Dissoziation von Aktin aus dem Komplex mit MyoD-Kopffragmenten.** Die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation ($\mathbf{k_{-A}}$) wurde aus der Geschwindigkeit der Fluoreszenzerhöhung bestimmt, wenn ein Überschuß an unmarkiertem Aktin zu einer Probe von 0,5 µM Pyren-Aktin im Komplex mit derselben Menge des entsprechenden MyosinI-Kopffragments gegeben wurde. An die Daten wurde eine Exponentialfunktion angepaßt, und k_{obs} entspricht $\mathbf{k_{-A}}$.

4.5.2.10 Aktinaffinität der Myosin I-Kopffragmente

Die Gleichgewichtskonstante ($\mathbf{K_A}$) für die Aktinbindung wurde aus dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten für die Dissoziationsreaktion mit dem für die Aktinbindung ($\mathbf{k_{-A}/k_{+A}}$) bestimmt. Die Werte sind in der Tabelle 4.5 angegeben. Eine Phosphorylierung an der TEDS-Stelle führte zu einer 13fach erhöhten Aktinaffinität an MyoB und einer elffach erhöhten Affinität an MyoD. Diese Erhöhung war das Resultat einer schnelleren Dissoziation von Aktin aus dem Aktomyosinkomplex, bei etwa gleichbleibender Bindungsgeschwindigkeit an die verschiedenen Mutanten der Myosin I-Kopffragmente.

Tabelle 4.5: **Aktinaffinität der Myosin I-Kopffragmente**

		$\mathbf{k_{+A}}$ ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	$\mathbf{k_{-A}}$ (ms^{-1})	$\mathbf{K_A}$ (nM)
B698	S-A-Mutante	1,13 ± 0,56	55,9 ± 6,5	49,5
	Wildtyp	1,06 ± 0,04	4,7 ± 0,1	4,4
	S-E-Mutante	1,10 ± 0,04	4,7 ± 0,1	3,9
D692	S-A-Mutante	4,08 ± 0,26	87,2 ± 1,9	21,1
	Wildtyp	3,50 ± 0,20	43,0 ± 0,7	12,3
	S-E-Mutante	1,42 ± 0,04	2,7 ± 0,2	1,9
E698	Wildtyp	2,58 ± 0,07	5,5 ± 0,1	2,1
	S-E-Mutante	2,92 ± 0,16	1,5 ± 0,1	0,5
M765	Wildtyp	0,75 ± 0,02	2,2 ± 0,2	2,2

5 Diskussion

Die Proteinfamilie der Myosine besteht aus einer vielfältigen Gruppe molekularer Motoren, die an wichtigen intrazellulären Prozessen beteiligt sind (Moosecker und Cheney, 1995; Sellers, 2000). Ein besseres Verständnis der mechanischen und biochemischen Eigenschaften von verschiedenen Mitgliedern der Myosinfamilie ist aus mehreren Gründen von großem Interesse. Die Charakterisierung dieser Eigenschaften erleichtert die Aufklärung der Funktion eines Myosins. So kann die unterschiedliche Physiologie von glatter und quergestreifter Muskulatur mit den kinetischen Eigenschaften ihrer Myosine erklärt werden. Darüber hinaus kann mit Hilfe der Charakterisierung einer Reihe von Myosinklassen das Verständnis des grundlegenden Mechanismus der Energieumwandlung durch den Aktomyosinkomplex verbessert werden.

Der Modellorganismus *D. discoideum* wurde bereits bei der Aufklärung der Struktur und der Funktionen von Myosin II sehr erfolgreich verwendet (Smith und Rayment, 1996, De Lozanne und Spudich, 1987; Pasternak und Spudich, 1989; Manstein *et al.*, 1989). Auch für die Charakterisierung von Myosinen anderer Klassen erwies sich dieser Einzeller als gut geeignet. Es konnte eine Reihe von Zellinien untersucht werden, in denen verschiedene Myosin-Gene ausgeschaltet waren (Novak *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 1996; Peterson *et al.*, 1996, Titus *et al.*, 1999, Geisler *et al.*, 2000). Die erste Kristallstruktur eines unkonventionellen Myosins wurde ebenfalls an einem Protein aus *D. discoideum*, an MyoE aus der Klasse I, gelöst (Kollmar *et al.*, 2002).

Obwohl mit diesen Daten Ergebnisse über die Struktur und Hinweise auf die Funktionen von Myosinen der Klasse I aus *D. discoideum* vorliegen, fehlt eine genaue Untersuchung ihrer mechanischen und biochemischen Eigenschaften. Deshalb war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, neben der Lokalisierung auch die Motorfunktionen von Myosinen der Klasse I mit verschiedenen Methoden zu charakterisieren. Dafür wurden drei Myosine aus zwei verschiedenen Untergruppen der Klasse I gewählt. MyoB und MyoD sind Mitglieder der Unterklasse 1 und besitzen in der Schwanzregion neben einer TH1-Domäne, die an Membranen bindet, zwei weitere Domänen. Die erste wird als TH2-Domäne bezeichnet und enthält eine ATP-unabhängige Aktinbindungsstelle, die zweite ist eine SH3-Domäne, über die eine Wechselwirkung mit Bindungspartnern stattfinden kann. Die Myosine der Unterklasse 1 werden auch als amöboide Myosine I bezeichnet, da sie zuerst in den Einzellern *A. castellanii* und *D. discoideum* beschrieben wurden. Im Gegensatz dazu ist MyoE ein Vertreter der Unterklasse 2 und hat eine kürzere Schwanzregion, die nach der TH1-Domäne endet und der die TH2- und die SH3-Domäne fehlen. Diese Unterschiede in der Struktur der Myosine deuten bereits darauf hin, daß sie unterschiedliche Funktionen in der Zelle ausüben könnten.

5.1 Lokalisierung und Funktion von MyoD und MyoE in dynamischen Regionen des Aktincytoskeletts und an Membranen

Die Lokalisierung von MyoD in *D. discoideum* wurde zuerst an lebenden Zellen untersucht, die YFP-MyoD exprimierten. In diesen Zellen ist das Protein im gesamten Cytoplasma und an der Plasmamembran verteilt und liegt angereichert in dynamischen Bereichen des Aktincytoskeletts vor. Während der Fortbewegung ist es an der Membran von aktinreichen Pseudopodien konzentriert, die in der Fortbewegungsrichtung ausgebildet werden. Es befindet sich auch im Zellcortex von Kontaktstellen zwischen den Zellen. Das Protein tritt ebenfalls an kronenförmigen Membranstrukturen auf und an den Vesikeln, die aus diesen Strukturen bei der Aufnahme von flüssigem Medium in die Zellen entstehen und als Makropinosomen bezeichnet werden. Mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie von fixierten Zellen wurde diese Lokalisierung von MyoD bestätigt und mit der von Coronin verglichen, einem aktinbindenden Protein, das eine Rolle bei der Organisation des Aktincytoskeletts spielt (de Hostos *et al.*, 1991). Beide Proteine habe eine sehr ähnliche Verteilung in aktinreichen Strukturen des Zellcortex und an Vesikeln, die sich jedoch nicht vollständig überlagert. Indem die Lokalisierung von MyoD mit der des Zellkerns verglichen wurde, konnte ausgeschlossen werden, daß das Protein im Zellstadium der Interphase im Nukleus vorkommt.

Auch die Lokalisierung von MyoE wurde durch Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen, die YFP-MyoE exprimierten, sichtbar gemacht. Dabei tritt MyoE ähnlich wie MyoD im gesamten Cytoplasma und an der Plasmamembran auf und ist an Vesikeln und an der Peripherie von sich bildenden Pseudopodien konzentriert. Während der Fortbewegung liegt es an dem Rand der Zellen vor, der sich in der Fortbewegungsrichtung befindet. Bilder von lebenden Zellen, die in zeitlicher Abfolge aufgenommen wurden, zeigen eine schnelle Umverteilung des Proteins zwischen den beschrieben Bereichen und damit eine dynamische Lokalisierung von MyoE. Bei der Phagocytose, die während der Aufnahme von Hefezellen untersucht wurde, ist MyoE an der becherförmigen Struktur angereichert, von der die phagocytierten Zellen umgeben werden. Immunfluoreszenzstudien im Vergleich zu Coronin zeigen eine teilweise Kolokalisierung der beiden Proteine an vesikulären Strukturen und an der Plasmamembran, wobei jedoch die Verteilung nicht vollständig übereinstimmt.

Für die Charakterisierung von MyoD und MyoE wurden jeweils zwei verschiedene Proteinkonstrukte verwendet, bei denen sich YFP entweder am Amino- oder am Carboxyterminus der Myosine befand und die Lokalisierung beider Konstrukte verglichen. Dabei wurden übereinstimmende Ergebnisse erhalten. So konnte ausgeschlossen werden, daß die Markierung der Proteine mit YFP die Lokalisierung in der Zelle beeinflußte.

Die beschriebenen Ergebnisse befinden sich in sehr guter Übereinstimmung mit denen, die bereits für MyoB und MyoD unter der Verwendung von spezifischen Antikörpern erhalten wurden (Fukui *et al.*, 1989; Jung *et al.*, 1993; Morita *et al.*, 1996). Von Neuhaus *et al.* konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß MyoB an frühe Endosomen gebunden vorliegt (Neuhaus *et al.*, 2000).

In anderen Organismen treten Myosine der Klasse I ebenfalls am häufigsten an spezialisierten Strukturen der Zellperipherie auf. Daneben können sie auch an Organellen lokalisiert sein. In

A. castellanii liegt Myosin IA im Cytoplasma vor, an der Plasmamembran von phagocytotischen Bechern und an kleineren endoplasmatischen Vesikeln. Myosin IB ist auch an der Plasmamembran und an der Membran großer Vakuolen lokalisiert, und Myosin IC tritt an der Membran der kontraktilen Vakuole auf (Baines *et al.*, 1992; Baines und Korn, 1990). Ein Myosin aus *Aspergillus nidulans* befindet sich im Cytoplasma und an der Spitze von wachsenden Hyphen (McGoldrick *et al.*, 1995). In Wirbeltieren tritt BBMI (Brush Border Myosin I) im Mikrovillisaum von Darmzellen auf und verbindet dort das Aktinbündel, das die Mikrovilli stabilisiert, mit der Plasmamembran (Matsudaira und Burgess, 1979; Fath *et al.*, 1993). Myosin Iα (Myr1) ist an der Plasmamembran von Zellfortsätzen lokalisiert, in der Teilungsfurche von Zellen während der Zellteilung und an Endosomen und Lysosomen (Ruppert *et al.*, 1995; Raposo *et al.*, 1999). Es kommt auch in Wachstumkegeln von Nervenzellen vor (Lewis und Brigman, 1996). Myosin Iβ (Myr2 oder Myosin 1C) wurde an der Plasmamembran, im Cytoplasma und an phagocytotischen Bechern gefunden. In den Haarzellen des Innenohrs verbindet es Calciumionenkanäle mit dem Aktinbündel der Stereocilien und könnte dort eine wichtige Rolle bei der Adaption spielen (Gillespie und Correy, 1997).

Andere Hinweise auf die Funktionen von Myosinen der Klasse I wurden erhalten, indem ein oder mehrere Myosingene in *D. discoideum* mit molekulargenetischen Methoden ausgeschaltet wurden, und dann verschiedene Vorgänge der zellulären und intrazellulären Bewegung untersucht wurden. Wenn nur ein einzelnes Myosin I-Gen fehlt, zeigen die Zellen nur geringe Defekte (Titus *et al.*, 1993; Wessels *et al.*, 1991; Peterson *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 1993). Zellen, denen myoB fehlt, haben eine erniedrigte Geschwindigkeit bei der Zellbewegung und der Phagocytose. In myoD⁻-Zellen sind diese Prozesse jedoch unverändert. Die Funktionen der Proteine scheinen also zumindest teilweise zu überlappen. Daher wurden neben den Einzelmutanten auch Doppel- und Dreifachmutanten untersucht (Novak *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 1996). In diesen Zellen sind mehrere Prozesse beeinträchtigt, die mit der beobachteten Lokalisierung der Myosine in Übereinstimmung stehen. Dazu gehören die Aufnahme von flüssigem Medium durch Pinocytose, das Zellwachstum, und die Internalisierung von Proteinen an der Zelloberfläche. Diese Störungen können auf einen frühen Defekt bei der Internalisierung von Vesikeln zurückzuführen sein. Die Doppelmutanten bilden außerdem mehr Filopodien und kronenförmig Membranstrukturen aus, so daß die Myosin I-Isoformen eine Rolle bei der Rückbildung von aktinreichen Strukturen spielen können.

Auch Untersuchung an Hefe zeigen, daß Myosine der Klasse I eine wichtige Rolle bei der Endocytose spielen (Geli *et al.*, 1996; Geli *et al.*, 1998). Bei *Aspergillus nidulans* wird durch die Expression einer Mutante des essentiellen Myosins I, in der das Serin der TEDS-Stelle durch Glutamat ersetzt wurde, ebenfalls die Endocytose konstitutiv aktiviert (Yamashita, 1998). Von Raposo *et al.* wurde eine Beteiligung von Myosinen der Klasse I an der Endocytose auch in Wirbeltieren nachgewiesen (Raposo *et al.*, 1999).

Die Mechanismen, mit denen Myosine gezielt zu bestimmten zellulären Kompartimenten und Strukturen transportiert werden, sind bisher noch unbekannt. An Myosin 1α (Myr1), einem Myosin der Klasse I, wurde jedoch gezeigt, daß an diesen Prozessen sowohl die Motordomäne als auch die Schwanzdomäne des Myosins beteiligt sind (Tang und Ostap,

2001). Obwohl einzelne Myosin-Isoformen häufig an verschiedenen Stellen in derselben Zelle auftreten, gibt es genug Unterschiede in der Lokalisierung, um einen unspezifischen Mechanismus der Proteinverteilung auszuschließen. Der gerichtete Transport der Proteine an ihren Zielort könnte durch Bindungspartner oder Rezeptoren erfolgen. Zwei mögliche Bindungspartner der SH3-Domäne, die in der Schwanzdomäne von Myosinen der amöboiden Unterklasse vorkommt, wurden bestimmt. Das erste ist ein lösliches Protein aus *A. castellanii*, das an die SH3 Domäne von Myosin IC bindet und mit diesem kolokalisiert (Xu *et al.*, 1995). Bei diesem könnte es sich um ein Adaptormolekül handeln, über das Myosin I mit einem anderen Protein in der Zielmembran in Wechselwirkung treten könnte. In Hefe kann Verprolin, ein aktinbindendes Protein, wahrscheinlich mit der SH3-Domäne von Myo3p und Myo5p in Wechselwirkung treten (Donelly *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1998).

5.2 Lokalisierung und Funktion von MyoD bei der Zellteilung

Bei der Mikroskopie von Zellen während der Zellteilung wurde eine starke Umverteilung von MyoD vom Zellrand in den Nukleus beobachtet. Die Veränderung der Lokalisierung wurde an lebenden Zellen in einer zeitlichen Abfolge von Fluoreszenzaufnahmen bei verschiedenen Stadien der Mitose, von der Anaphase bis zur vollständigen Trennung der Tochterzellen, verfolgt. Für eine genauere Untersuchung wurde konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie von Zellen in vier verschiedenen Stadien der Mitose verwendet, von der Metaphase bis zur späten Telophase. Die Umverteilung von MyoD erfolgt schon zu Beginn der Mitose, und während der verschiedenen Stadien ist das Protein eindeutig im Nukleus lokalisiert. Dabei ist es in Bereichen konzentriert, die der Kernhülle und Teilen des Spindelapparats entsprechen könnten. Nach der Trennung der beiden Tochterkerne bleibt MyoD in einer filamentartigen Struktur zwischen den Kernen angereichert. Bei einer Markierung von Tubulin wurden erwartungsgemäß die Spindelpole und der Spindelapparat sichtbar, und es wurde ebenfalls die filamentartige Struktur zwischen den Tochterkernen angefärbt. Die Überlagerung ergab eine teilweise Kolokalisierung von YFP-MyoD und Tubulin an den Spindelpolen und an der filamentartigen Struktur. MyoD liegt jedoch stärker angereichert an der Kernhülle vor, als in den Bereichen der Mitosespindel.

Bei der Untersuchung der Zellen, die YFP-MyoE exprimierten, konnte die Lokalisierung des Proteins im Zellkern sowohl in Zellen der Interphase als auch während der Mitose ausgeschlossen werden.

Die beschriebene Lokalisierung von MyoD während der Zellteilung ist überraschend, da Myosin ein aktinbindendes Motorprotein ist, und die Strukturen, die während der Zellteilung ausgebildet werden, reich an Mikrotubuli sind. Dennoch wird diese Beobachtung von einer Reihe von Ergebnissen gestützt. MyoD wird während der Interphase nicht im Zellkern beobachtet, sondern die Umverteilung des Proteins von den Zellrändern in den Kern findet nur während der Mitose statt. Auch wird die Kernhülle bei *D. discoideum* während der Zellteilung nicht vollständig aufgelöst, so daß weiterhin eine Barriere für die Aufnahme in den Zellkern erhalten bleibt. Damit kann eine unspezifische Anreicherung von MyoD im Gebiet des Spindelapparats ausgeschlossen werden, die in Zellen von Wirbeltieren für lösliche Proteine beobachtet wurde (Wang und Taylor, 1979; Inue *et al.*, 1979; Sanger *et al.*, 1989).

Die Untersuchung von MyoD auf eine Konsensussequenz für den Import in den Zellkern mit dem Programm SWISS-PROT von EXPASY Proteomicstools ergab in der Schwanzdomäne ein klassisches Motiv. Dabei handelt es sich um die Aminosäuresequenz KKRP (Aminosäuren 807-810). Der Gehalt an basischen Aminosäuren in MyoD beträgt 14,2 % und die angegebene Wahrscheinlichkeit für eine Lokalisierung des Proteins im Zellkern 60,9 %. Da in Zellen der Interphase keine Kolokalisierung von MyoD mit Mikrotubuli beobachtet wurde, könnte das Protein einer postranslationalen Modifikation unterliegen, die durch den Zellzyklus reguliert wird. Diese würde dann als Signal für die Kernlokalisierung von MyoD und die Wechselwirkung mit der Kernhülle und den mikrotubulireichen Strukturen dienen. Auch cytoplasmatisches Dynein, das an die Mikrotubuli des Spindelapparats bindet, zeigt während der Interphase keine Wechselwirkung mit Mikrotubuli (Pfarr *et al.*, 1990, Steurer *et al.*, 1990).

Es liegen erst wenige, andere Beschreibungen davon vor, daß Myosine an Strukturen auftreten, die eine Rolle bei der Mitose spielen. In Zellen von Wirbeltieren ist ein Myosin der Klasse I an der Teilungsfurche von Zellen lokalisiert (Breckler und Burnside, 1994). Eine bisher unbekannte Myosin I-Isoform wurde neben einer Verteilung an der Zellmembran ebenfalls im Zellkern lokalisiert (Nowak *et al.*, 1997). Ein Myosin II aus *Xenopus* wurde an Mikrotubuli der Interphase und an der Spindel der Metaphase lokalisiert. Von Evans *et al.* wurde gezeigt, daß Organellen, die an Myosin V gebunden sind, häufig sowohl an Mikrotubuli als auch an Aktinfilamenten auftreten (Evans *et al.*, 1997). Im Fall von Myosin V wurde auch eine Lokalisierung am Organisationszentrum von Mikrotubuli in Zellen der Interphase, am Spindelapparat und an der Teilungsfurche von Zellen während der Zellteilung beschrieben (Wu *et al.*, 1998).

Mit der Beobachtung von MyoD im Zellkern und der Kolokalisierung mit tubulinhaltigen Strukturen während der Zellteilung stellt sich die Frage nach der Funktion des Proteins in diesen Zellbereichen. Es könnte über die Schwanzdomäne mit den Membranen der Kernhülle oder der Kernlamina, die aus Intermediärfilamenten besteht, in Wechselwirkung treten. Die Motordomäne könnte an Aktinfilamente binden, die ebenfalls in den mikrotubulireichen Strukturen der Zellteilung vorkommen. So könnte es eine Rolle bei der Aufteilung der Kenhülle auf die beiden Tochterzellen spielen.

5.3 Motorfunktion

5.3.1 Aktivierung durch TEDS-Phosphorylierung

Die Motorfunktion der Myosine aus *D. discoideum* wurde mit einer direkten Methode charakterisiert, bei der die Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten durch Myosinmoleküle *in vitro* bestimmt werden konnte (Kron und Spudich, 1986). Dafür wurden rekombinante Myosin I-Konstrukte verwendet, bei denen an die Motordomäne zwei Untereinheiten des Proteins α-Aktinin mit superspiralisierter Struktur angefügt wurden. Die Geschwindigkeit der Bewegung ist neben der Konzentration an ATP und dem pH-Wert der Reaktionslösung von den speziellen Eigenschaften des Myosins abhängig. Damit ist das *in vitro* System besonders gut geeignet, um die Regulation eines Myosinmoleküls zu untersuchen.

Bei der Regulation der Motorfunktion von Myosinen der Klasse I aus *A. castellanii* und von Myosin VI aus Wirbeltieren spielt eine Phosphorylierung der Motordomäne eine wichtige Rolle (Hammer *et al.*, 1983; Albanesi *et al.*, 1983; Cote *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 2000; De La Cruz *et al.*, 2001). Diese Phosphorylierung erfolgt an einem Serin oder Threonin, das sich 16 Aminosäuren vor einer hochkonservierten Sequenz mit dem Konsensusmotiv DALAK befindet. Bei Myosinen der Klasse I aus Wirbeltieren liegt ebenso wie bei Myosinen der Klasse II an der entsprechenden Stelle eine negativ geladene Aminosäure vor. Da fast alle Myosine an dieser Position entweder ein Threonin, ein Serin, eine Glutaminsäure oder eine Asparaginsäure besitzen, wird sie als TEDS-Stelle bezeichnet (Bement und Mooseker, 1995). Eine negative Ladung an dieser Position scheint eine wichtige Rolle bei der Funktion von Myosinen zu spielen. Sie liegt in einer Oberflächenschleife, die an der Aktinbindung beteiligt ist. Die Funktion dieser Struktur ist von besonderem Interesse, da bei Patienten mit einer erblichen Cardiomyopathie eine Mutation in dieser Region der schweren Kette von β-Myosin des Herzmuskels auftritt. Biochemische Messungen an Myosin II, das diese Mutation besitzt, zeigen signifikante Veränderungen der mechanischen und biochemischen Funktion (Cuda et al., 1997; Roopnarine und Leinwand, 1998). Dennoch sind die genauen Schritte, die von der Mutation in dieser Oberflächenschleife beeinflußt werden, noch nicht bekannt.

Eine Sequenzanalyse der Myosine aus *D. discoideum* zeigt, daß alle Myosine der Klasse I an der TEDS-Stelle ein Serin oder Threonin besitzen. Somit ist es wahrscheinlich, daß ihre Motorfunktion durch eine Phosphorylierung dieser Aminosäuren reguliert wird. Es wurde jedoch nur für MyoD direkt nachgewiesen, daß die Aktinaktivierung der ATPase-Aktivität von einer Phosporylierung abhängig ist (Lee und Cote, 1995; Lee *et al.*, 1996). Um zu untersuchen, ob eine Phosphorylierung auch MyoB und MyoE aktiviert, und um den Mechanismus dieser Regulation aufzuklären, wurden die rekombinanten Fusionsproteine nach der Isolierung entweder mit λ-Phosphatase (Cohen und Cohen, 1989) oder mit Myosin I-Kinase (MIHCK) (Brzeska *et al.*, 1999) behandelt, um das Protein zu dephosphorylieren oder zu phosphorylieren. Daneben wurden in die Proteine an der TEDS-Stelle Mutationen eingeführt, durch die das Serin entweder durch ein Alanin oder eine Glutaminsäure ersetzt wurde. Durch Austausch des Serins gegen einen negativ geladenen Aminosäurerest sollte die Phosphorylierung an der entsprechenden Stelle nachgeahmt werden. Vergleichbare Mutanten wurden schon für die Untersuchung von Myosin IC aus *A. castellanii* und Myosin VI aus Wirbeltieren verwendet (Wang *et al.*, 1998; De La Cruz *et al.*, 2001). Dabei wurde für Myosin IC gezeigt, daß ein Glutamatrest die Phosphorylierung an der TEDS-Stelle effektiver nachahmt, als ein Aspartatrest, was an der Länge der negativ geladenen Seitenkette liegen kann. Daher wurden für die Charakterisierung der Myosine aus *D. discoideum* ebenfalls Glutamat-Mutanten verwendet.

Die dephosphorylierten MyoD- und MyoE-Proteinkonstrukte zeigten sehr niedrige Bewegungsgeschwindigkeiten von Aktinfilamenten in dem beschriebenen *in vitro* System. Es konnte keine Bewegung durch das MyoD-Konstrukt gemessen werden, und die Bewegung durch das MyoE-Konstrukt war sehr langsam (0,08 µm/s). Im Gegensatz dazu zeigte das MyoB-Konstrukt nach der Dephosphorylierung noch eine mittlere Bewegungsgeschwindigkeit von etwa 0,23 µm/s. Sehr ähnliche Ergebnisse wurden mit den Mutanten erhalten, bei denen das Serin der TEDS-Stelle durch ein Alanin ersetzt war.

Der Unterschied im Verhalten zwischen der dephosphorylierten Form von MyoB und den dephosphorylierten Formen von MyoD und MyoE deutet auf einen zweiten Regulationsmechanismus von MyoD und MyoE hin, der im nächsten Kapitel ausführlich besprochen wird.

Die Phosphorylierung der Myosin I-Proteinkonstrukte mit MIHCK erhöhte die Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten stark. Die phosphorylierte Form von MyoB und MyoE transportierte die Filamente etwa sechsmal beziehungsweise fünfmal schneller als die dephosphorylierte Form. Auch die Motorfunktion der Glutamat-Mutanten war gegenüber der der Alanin-Mutanten deutlich aktiviert, bei MyoB etwa achtmal und bei MyoD etwa 13mal. Die Geschwindigkeit der Glutamat-Mutanten von MyoE lag bei etwa 0,29 µm/s, während die der Alanin-Mutanten nicht meßbar war. Wenn die Wildtypkonstrukte nach der Isolierung aus den *D. discoideum* Zellen unverändert eingesetzt wurden, bewegten sie Aktinfilamente mit Geschwindigkeiten, die zwischen denen lagen, die nach der Behandlung mit den Enzymen erhalten wurden. Dieses Verhalten kann damit erklärt werden, daß die Proteine teilweise phosphoryliert vorlagen. Da bei der Bewegung der Aktinfilamente mehrere Myosinmoleküle an einem Aktinmolekül binden, stellt die gemessene Geschwindigkeit einen Mittelwert der Geschwindigkeiten einzelner Motoren dar.

Mit den erhaltenen Ergebnissen konnte direkt nachgewiesen werden, daß die Motorfunktion aller drei untersuchten Myosine I durch eine Phosphorylierung an der TEDS-Stelle aktiviert wird. Weiterhin wurde gezeigt, daß der unphosphorylierte und der phosphorylierte Zustand der Myosine durch die Einführung eines Alanins beziehungsweise einer Glutaminsäure effizient nachgeahmt werden konnten. Das Verhalten der entsprechenden Mutanten unterschied sich nicht signifikant von dem der unphosphorylierten und der phosphorylierten Form. Bemerkenswert ist auch die hohe Effizienz der Phosphorylierung der Myosine I aus *D. discoideum* mit einer Kinase aus *A. castellanii*, da diese Enzyme häufig sehr spezifisch für ein bestimmtes Substrat sind. Die Ergebnisse, die mit den unterschiedlichen methodischen Ansätzen erhalten wurden, stützen sich hervorragend.

Bei den aktivierten Formen von MyoB und MyoD handelt es sich um schnelle Myosinmotoren. Sie transportieren Aktinfilamente bis zu sechsmal schneller als die aktivierte Form von MyoE, dessen Geschwindigkeit der eines vergleichbaren Konstrukts von Myosin II aus *D. discoideum* entspricht. In früheren Untersuchungen an Skelettmuskelmyosin wurde gezeigt, daß die Bewegungsgeschwindigkeit durch die Geschwindigkeit der ADP-Freisetzung aus dem Aktomyosinkomplex bestimmt wird, da diese die Zeitdauer beeinflußt, während der Myosin im stark gebundenen Zustand an Aktin verbleibt (Siemankowski, 1985). Die niedrigere Geschwindigkeit von MyoE im Vergleich zu MyoB und MyoD steht in Übereinstimmung mit der langsameren ADP-Freisetzung aus dem Aktomyosinkomplex (vergleiche Kapitel 5.4.3).

Ähnliche Unterschiede können auch zwischen anderen Myosinen I aus den beiden Unterklassen 1 und 2 beobachtet werden. Die Myosine der Unterklasse 1 aus *A. castellanii* weisen hohe *in vitro* Bewegungsgeschwindigkeiten von Aktinfilamenten auf. Im Gegensatz dazu zeigen Myosine aus der Unterklasse 2, wie BBMI und Myr1 aus Wirbeltieren, eine langsame *in vitro* Bewegung von Aktinfilamenten (Collins *et al.*, 1990; Wolenski, 1993; Williams *et al.*, 1994). MyoE, das ein Mitglied der Unterklasse 2 aus einem amöboiden

Organismus ist, liegt mit seinen Eigenschaften zwischen den bisher bekannten Mitgliedern beider Unterklassen. Die Geschwindigkeit, mit der ein Myosin in dem *in vitro* System Aktinfilamente transportiert, gibt deutliche Hinweise auf die Prozesse, an denen es in einer Zelle beteiligt sein könnte. Die Myosine der Unterklasse 1 sind demnach gut dafür geeignet schnelle Bewegungen auszuführen. MyoB wurde mit einer Funktion bei dem Rücktransport früher Endosomen zur Plasmamembran in Verbindung gebracht (Neuhaus *et al.*, 2002). Die Motoreigenschaften von MyoB, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden, lassen es sehr gut als Motor bei diesem schnellen zellulären Prozeß geeignet erscheinen. Die Myosine der Unterklasse 2 mit langsamen Motoreigenschaften sind in Zellen von Wirbeltieren an der Aufrechterhaltung der Cortexspannung und der Stabilisierung von aktinreichen Strukturen beteiligt.

5.3.2 Inhibierung der Motorfunktion von MyoD durch divalente Kationen

Für MyoD wurde zum ersten Mal ein Regulationsmechanismus der Motorfunktion eines Myosins durch divalente Kationen beobachtet, der vorher nicht bekannt war. Dabei wird die *in vitro* Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten durch eine Erhöhung der Konzentration an freien Magnesiumionen inhibiert.

Für die genaue Untersuchung dieser Regulation wurden die Mutanten mit einem Aminosäureaustausch an der TEDS-Stelle verwendet. Da in den vorhergehenden Versuchen gezeigt wurde, daß nach der Isolierung aus *D. discoideum* teilweise phosphorylierte Proteine vorlagen, war in den Messungen zur Bewegungsgeschwindigkeit mit den Wildtypproteinen kein einheitliches Verhalten zu erwarten. Mit den Mutanten wurden jeweils zwei verschiedene Meßreihen durchgeführt. Zuerst wurde die Konzentration an Magnesiumionen bei einem konstanten Wert gehalten und die ATP-Konzentration erhöht. Dabei stieg die Geschwindigkeit mit der Erhöhung der ATP-Konzentration linear oder leicht sigmoidal an, bis äquimolare Mengen an ATP und Magnesiumionen erreicht waren. Danach blieb die Geschwindigkeit der Glutamat-Mutanten bis zur höchsten ATP-Konzentration von 20 mM konstant. Die Geschwindigkeit der Alanin-Mutanten blieb ebenfalls konstant bis zu einer Konzentration von 15 mM ATP und zeigte dann einen Abfall. Dieser ist wahrscheinlich auf eine Erniedrigung der Stabilität des Aktomyosinkomplexes bei hohen Ionenstärken zurückzuführen. Damit liegt bereits ein Hinweis darauf vor, daß die Aktinaffinität der Alanin-Mutanten niedriger liegt als die der Glutamat-Mutanten.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die ATP-Konzentration auf einen konstanten Wert eingestellt, und die Mg^{2+}-Ionenkonzentration wurde variiert. Bei den Messungen blieb die Geschwindigkeit der Alanin-Mutanten konstant, bis sie nach Überschreiten äquimolarer Mengen an ATP und Magnesiumionen abfiel. Die Geschwindigkeit der Glutamat-Mutanten erhöhte sich linear mit steigender Konzentration an Magnesiumionen, bis bei einer Konzentration von etwa 2 mM ein Maximalwert erreicht wurde. Bei einer weiteren Erhöhung blieb die Geschwindigkeit konstant bei diesem Maximalwert, bis sie nach Überschreiten äquimolarer Mengen an ATP und Magnesiumionen abfiel. In beiden Versuchsreihen wurden sehr ähnliche Maximalwerte der Geschwindigkeiten erhalten. Dabei lag der Maximalwert, der unter Verwendung der Glutamat-Mutanten erreicht wurde, etwa sechsmal höher als der Wert, der für die Alanin-Mutante bestimmt wurde. Wichtig ist, daß sich dieses Verhältnis nicht

signifikant von dem unterscheidet, das bei einer Mg^{2+}-Ionenkonzentration von 4 mM bestimmt wurde, die in den Messungen unter Standardbedingungen verwendet wurde.

Im Gegensatz zu MyoD veränderte sich bei MyoB die Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten nicht bei einer Variierung der ATP- oder Mg^{2+}-Ionenkonzentration. Besonders bemerkenswert ist, daß die maximalen Geschwindigkeiten, die mit den MyoD-Konstrukten erreicht wurden, den Werten entsprechen, die für die Konstrukte von MyoB gemessen wurden. Dieses Verhalten führte zu der Annahme, daß die Motorfunktion von MyoB nicht durch Magnesiumionen inhibiert wird. Bei der Untersuchung von MyoE wurde eine leichte Erhöhung der Bewegungsgeschwindigkeit beobachtet, wenn die ATP-Konzentration erhöht wird. Es könnte also sein, daß es demselben Regulationsmechanismus wie MyoD unterliegt. Eine genauere Untersuchung von MyoE ist ein wichtiges Ziel weiterer Versuche.

Um aufzuklären welcher Schritt des ATPase-Zyklus von MyoD durch die Konzentration an Magnesiumionen reguliert wird, wurde die Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation aus dem Komplex mit dem MyoD-Kopffragment bei verschiedenen Mg^{2+}-Ionenkonzentration bestimmt. Dabei wurde beobachtet, daß die Dissoziationsgeschwindigkeit mit zunehmender Konzentration an freien Mg^{2+}-Ionen abnimmt. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten wurden in Abhängigkeit von der Mg^{2+}-Ionenkonzentration dargestellt, und die Daten wurden mit einer Hyperbel ausgewertet. Dadurch wurde ein Wert für die Gleichgewichtskonstante der inhibitorischen Reaktion (K_i) von 0,44 mM erhalten.

Die Regulation kann damit erklärt werden, daß in der Nukleotidbindungstasche von Myosin ATP im Komplex mit einem Magnesiumion gebunden vorliegt. Nach der Hydrolyse von ATP werden bei Myosin II die Produkte ADP und P_i gleichzeitig mit dem Magnesiumion oder davor freigesetzt. Bei MyoD scheint für diese Freisetzung von ADP zuerst die Dissoziation des Magnesiumions aus dem Komplex erforderlich zu sein. Bei einer Erhöhung der Konzentration an freien Mg^{2+}-Ionen in der umgebenden Lösung wird das Mg^{2+}-Ion in die Bindungstasche zurückgedrängt und die Abgabe von ADP inhibiert.

Dieses Verhalten wurde bei Myosin II nicht beobachtet, könnte jedoch auch bei Myosinen der Klassen V und VI auftreten (Lee Sweeny, persönliche Mitteilung). Bei der beobachteten Regulation durch freie Mg^{2+}-Ionen handelt es sich also um einen Mechanismus, dem eine allgemeine Bedeutung in der Myosin-Proteinfamilie zukommen kann. In Zellen spielen bei der Signaltransduktion nicht Magnesium- sondern Calciumionen eine Schlüsselrolle. Da sich diese Ionen in Ladung und Größe jedoch ähneln, könnte in der Zelle die Inhibierung der Motoreigenschaften von Myosin I nicht durch Magnesiumionen, sondern durch Calciumionen bedingt werden. Die physiologischen Konzentrationen der beiden divalenten Kationen in *D. discoideum* liegen bei 0,6 mM im Fall von Mg^{2+}-Ionen und bei 0,44 mM bei Ca^{2+}-Ionen (Satre und Martin, 1985; Martin *et al.*, 1987). Die Gleichgewichtskonstante der Inhibierung durch Magnesiumionen, die in den Messungen der ADP-Dissoziation bestimmt wurde (K_i), liegt mit 0,44 mM in diesem Bereich.

5.4 Charakterisierung des Myosin I-ATPase-Zyklus

Um die Bewegungsvorgänge, an denen die untersuchten Myosine der Klasse I aus *D. discoideum* beteiligt sein können, weiter einzugrenzen, sollten die Motoreigenschaften der Proteine genauer analysiert werden. Dazu wurde der Myosin I-ATPase-Zyklus mit kinetischen Methoden charakterisiert. Die ATPase-Aktivität der Proteine wurde im Steady State gemessen, und die Aktivierung der ATPase-Geschwindigkeit durch Aktinfilamente bestimmt. Die Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten von wichtigen Schritten des Myosin I-ATPase-Zyklus wurden mit Methoden der Transientenkinetik ermittelt. Für die Messungen konnten rekombinante Proteinkonstrukte der Myosine verwendet werden, die aus der Motordomäne bestehen, und die im folgenden auch als Kopffragmente der Myosine bezeichnet werden. Um die Regulation der Proteine durch eine Phosphorylierung an der TEDS-Stelle weiter zu untersuchen und den molekularen Mechanismus dieser Regulation aufzuklären, wurden auch für die kinetischen Messungen Mutanten der Proteine verwendet, bei denen das Serin der TEDS-Stelle entweder durch Glutaminsäure oder durch Alanin ersetzt war.

5.4.1 Abhängigkeit der Aktinaktivierung der ATPase-Aktivität von der TEDS-Phosphorylierung

Die Steady State-ATPase-Aktivität eines Myosins, das nicht an Aktin gebunden vorliegt, wird als basale Steady State-ATPase-Aktivität bezeichnet. Die Werte, die für die verschiedenen Konstrukte der Myosine I aus *D. discoideum* bestimmt wurden, zeigen keine signifikanten Unterschiede. Im Fall der aktivierten Glutamat-Mutanten von MyoB und MyoE ist die Aktivität lediglich etwa zweifach erhöht.

Die Aktivierung der ATPase-Aktivität durch Aktin wurde durch einen Vergleich der basalen ATP-Umsatzgeschwindigkeit mit der Umsatzgeschwindigkeit bei einer Aktinkonzentration von 20 µM bestimmt. Die ATPase-Aktivitäten der Alanin-Mutanten von MyoB und MyoD wurden durch die Zugabe von Aktin lediglich um den Faktor 0,2 beziehungsweise um den Faktor 0,1 erhöht. Die Alanin-Mutante des MyoE-Kopffragments wurde nicht stark genug in *D. discoideum* überexprimiert, um die Proteinmenge isolieren zu können, die für eine kinetische Charakterisierung benötigt wird. Daher liegen für diese Mutante keine Daten vor. Die ATPase-Aktivitäten der Glutamat-Mutanten aller drei Isoformen wurden im Gegensatz zu den Alaninmutanten durch Aktinfilamente in einer Konzentration von 20 µM stark aktiviert. Die ATP-Umsatzgeschwindigkeit von B698 stieg dreifach an, die von D692 um den Faktor zwölf und die von E698 um den Faktor 30. Die Wildtypkonstrukte der Proteine zeigten Aktivierungen, die zwischen denen der beiden untersuchten Mutanten lagen. Die Kopffragmente der Myosine I lagen also nach der Isolierung aus *D. discoideum* teilweise phosphoryliert vor.

Um die Maximalwerte der ATPase-Aktivität zu bestimmen, und die Kopplung zwischen der Aktinbindung und der geschwindigkeitsbestimmenden Produktfreisetzung zu ermitteln, wurden die Messungen der ATPase-Aktivität über einen Bereich der Aktinkonzentration von 0 bis 60 µM durchgeführt. Die maximale ATPase-Aktivität (k_{cat}) des untersuchten Myosins und die apparente Michaelis-Menten-Konstante für Aktin (K_{app}) können erhalten werden, indem die Meßwerte mit der Michaelis-Menten-Gleichung ausgewertet werden. Der Quotient

dieser beiden Werte (k_{cat}/K_{app}) gibt dann die Kopplungseffizienz zwischen der Aktinbindung und der Produktfreisetzung an. Sie kann auch bestimmt werden, indem eine Gerade an die Meßdaten bei viel niedrigeren Aktinkonzentrationen als K_{app} angepaßt wird. Die Steigung dieser Geraden gibt dann den Wert von k_{cat}/K_{app} an.

Die ATPase-Aktivität der Alanin-Mutanten wurde bei steigender Aktinkonzentration nur sehr wenig erhöht, so daß mit der Michaelis-Menten-Gleichung keine Maximalwerte bestimmt werden konnten. Im Gegensatz dazu zeigte die ATPase-Aktivität der Glutamat-Mutanten der Myosine I eine starke Erhöhung mit zunehmender Aktinkonzentration, die mit der Michaelis-Menten-Gleichung ausgewertet werden konnte. Der Maximalwert der S-E-Mutanten von MyoB entsprach mit einem Umsatz von etwa 3 ATP je Sekunde dem Wert eines vergleichbaren Myosin II-Konstrukts. Die Werte der aktivierten Mutanten von MyoD und MyoE lagen noch etwa drei- bis fünfmal höher. Die Maximalwerte der ATPase-Aktivität zeigten keine Korrelation mit der gemessenen Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten. Auch bei Myosin II wurde bereits beschrieben, daß es keinen direkten Zusammenhang zwischen der ATPase-Aktivität und der *in vitro* Bewegung gibt (Spudich, 1984; Siemankowski *et al.*, 1985; Umemoto und Sellers, 1990). Am deutlichsten ist die Kopplungseffizienz der Glutamat-Mutanten gegenüber der Kopplungseffizienz der Alanin-Mutanten erhöht. Bei MyoB liegt sie 16mal höher, bei MyoD sogar 80mal höher.

Mit diesen Ergebnissen konnte zum ersten mal für alle drei untersuchten Myosine I aus *D. discoideum* bewiesen werden, daß eine effiziente Aktivierung der ATPase-Aktivität durch Aktin von einer Phosphorylierung der Motordomäne an der TEDS-Stelle abhängig ist. Ihre Eigenschaften entsprechen darin denen der der Myosine I aus *A. castellanii* (Hammer *et al.*, 1983; Albanesi *et al.*, 1983; Cote *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 2000, Ostap *et al.*, 2002). Die Steady State-ATPase-Geschwindigkeit von Myosin II aus der Skelettmuskulatur wird durch die Geschwindigkeit einer Isomerisierung vor der Phosphatfreisetzung bestimmt (Ma und Taylor, 1993). Diese Isomerisierung entspricht dem Übergang des schwachen zum starken Bindungszustand an Aktin. Derselbe Schritt könnte die Steady ATPase-Geschwindigkeit der untersuchten Myosine I begrenzen. Die Regulation beeinflußt dann sehr wahrscheinlich die Kopplung zwischen der Aktinbindung und der Phosphatfreisetzung. Bei einer Untersuchung von Myosin IC aus *A. castellanii* konnte gezeigt werden, daß die Phosphorylierung des Proteins die Geschwindigkeit der Phosphatfreisetzung erhöht (Ostap et al., 2002). Auch bei Myosin VI aus Wirbeltieren wird durch einen negativen Aminosäurerest an der TEDS-Stelle die Phosphatfreisetzung beschleunigt (De La Cruz *et al.*, 2001). Da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des ATPase-Zyklus dieses Myosins jedoch wie bei Myosinen der Klasse V, die sehr langsame ADP-Freisetzung aus dem Aktomyosinkomplex ist, wird durch die negative Ladung der Maximalwert der Steady State-ATPase nur wenig erhöht.

Die ATPase-Aktivitäten der aktivierten Formen der drei Myosine aus *D. discoideum* waren denen von Myosinen I der Unterklasse 1 wie Myosin IA, IB und IC aus *A. castellanii* und Myosin IC (Myo1e oder Myr3) aus der Ratte (Mezgueldi, 2002) vergleichbar. Sie liegen deutlich höher als die von Myosinen der Unterklasse 2 aus Wirbeltieren, wie BBMI und Myr1 (Collins *et al.*, 1990; Collucio und Geeves, 1999).

5.4.2 Erhöhung der Aktinaffinität durch TEDS-Phosphorylierung

Die Aktinbindungsregion von Myosin besteht aus einer Anzahl verschiedener Strukturelemente und schleifenförmiger Oberflächenstrukturen (Milligan, 1996). Dazu gehört die CM-Schleife, die am vorderen Ende der Motordomäne liegt und von großer Bedeutung für eine normale Aktivität des Myosinmoleküls ist. Punktmutationen an der Stelle der Aminosäure Arginin 403 des menschlichen β-Herzmuskelmyosins sind mit einer erblichen Hypertrophie des Herzmuskels verbunden (Geisterfer-Lowrance *et al.*, 1990). In der CM-Schleife liegt auch die TEDS-Stelle, deren Einfluß auf die Aktivität von Myosinen der Klasse I untersucht wurde. Daher lag die Vermutung nahe, daß die Phosphorylierung der TEDS-Stelle die Aktinaffinität der Proteine beeinflußt. Diese Annahme konnte jedoch in den Untersuchungen der phosphorylierten und unphosphorylierten Formen von *A. castellanii* Myosin IA und IB nicht bestätigt werden (Ostap *et al.*, 1996). Auch bei Myosin VI, das an der TEDS-Stelle ein phosphorylierbares Threonin besitzt, wurde keine Veränderung der Aktinaffinität zwischen Mutanten, bei denen dieses Threonin gegen Alanin oder Glutaminsäure ausgetauscht war, beschrieben (De La Cruz *et al.*, 2001).

Zum ersten mal wurde ein Unterschied zwischen der Aktinaffinität der Mutanten an der TEDS-Stelle bei den Myosinen I aus *D. discoideum* erkannt. Die Aktinaffinität eines Myosins wird durch die Geschwindigkeiten der Bindung von Aktin und der Dissoziation des Aktomyosinkomplexes bestimmt. Bei der Aktinbindung zeigten die Mutanten an der TEDS-Stelle keine signifikanten Unterschiede. Bei MyoD war die Geschwindigkeit der Aktinbindung der Alanin-Mutanten dreifach erhöht und damit etwas schneller als die der Glutamat-Mutanten. Die langsamere Bindung der Glutamat-Mutanten kann auf eine abstoßende Wechselwirkung bei der Bildung des schwach bindenden Aktinkomplexes zurückzuführen sein, bei der positiv geladene Aminosäuren des Myosins mit der negativ geladenen Oberfläche des Aktinmoleküls in Wechselwirkung treten. Das Wildtyp-Kopffragment von MyoD verhielt sich sehr ähnlich wie die Alanin-Mutante, was genauso wie die Messungen im Steady State darauf hindeutet, daß das Protein hauptsächlich unphosphoryliert vorlag. Ein deutlicher Unterschied wurde bei der Geschwindigkeit der Aktindissoziation aus dem Aktomyosinkomplex beobachtet. Sie wurde gemessen, indem fluoreszenzmarkiertes Aktin mit einem Überschuß an unmarkiertem Aktin aus dem Komplex verdrängt wurde. Dabei erfolgt die Dissoziation des Komplexes aus Aktin und der Alanin-Mutanten von MyoB und MyoD etwa 12mal beziehungsweise 30mal schneller als die des Komplexes aus Aktin und der Glutamat-Mutanten. Da die Alanin-Mutante von MyoE nicht isoliert werden konnte, liegen für sie keine Daten vor. Der Komplex aus Aktin und dem Wildtyp-Kopffragment dissoziierte jedoch auch dreimal schneller als der mit der Glutamat-Mutanten. Um einen Einfluß von ADP-Verunreinigungen auf die Geschwindigkeit der Aktinfreisetzung auszuschließen wurden die Messungen in der Gegenwart von Apyrase durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Phosphatase, die an Nukleotiden die endständige Phosphatgruppe abspaltet. Bei diesen Kontrollmessungen wurden keine signifikanten Abweichungen beobachtet. Die schnellere Dissoziation des Aktomyosinkomplexes führt zu einer niedrigeren Aktinaffinität der Alanin-Mutanten. Die Affinitäten der Aktomyosinkomplexe der Alanin-Mutanten von MyoB und MyoD liegen über 10mal niedriger als die der Glutamat-Mutanten.

Durch die erhaltenen Ergebnisse konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß die Phosphorylierung an der TEDS-Stelle den Aktomyosinkomplex stabilisiert. Die Geschwindigkeit der Dissoziation von Aktin aus dem Komplex wird erniedrigt, während die Geschwindigkeit der Aktinbindung ähnlich bleibt.

Die Bindung von Myosin und Aktin wird in einem Modell von Geeves, Goody und Gutfreund (Geeves und Connibear, 1995; Geeves und Holmes, 1999) in drei Schritte aufgelöst, die in Schema 5.1 dargestellt sind.

Schema 5.1

$$A + M(\cdot N) \overset{K_0}{\rightleftharpoons} A{\sim}M(\cdot N) \overset{K_1}{\rightleftharpoons} A\text{-}M(\cdot N) \overset{K_2}{\rightleftharpoons} A{\cdot}M(\cdot N)$$

Kollisionskomplex A-Zustand R-Zustand

Es wird angenommen, daß der Übergang vom A- zum R-Zustand mit dem Kraftschlag des Myosins verbunden ist. Er wird in Lösung durch die Erniedrigung der Pyren-Fluoreszenz nachgewiesen. Die Gleichgewichtskonstante $\mathbf{K_2}$ ist stark abhängig von dem gebundenen Nukleotid und wird durch das γ-Phosphat von ATP signifikant erniedrigt. Die Phosphorylierung der TEDS-Stelle beeinflußt nicht die Geschwindigkeit der Aktinbindung, die durch $\mathbf{K_0 k_{+1}}$ angegeben wird. Daher ist die Regulation der Phosphatfreisetzung sehr wahrscheinlich direkt mit dem Übergang vom A- in den R-Zustand verbunden.

Vergleichbare Effekte wurden bei der Einführung eines einzelnen negativen Rests in die Aktinbindungsstelle von Myosin II beobachtet (Furch *et al.*, 1999). Damit wird die Annahme gestützt, daß die CM-Oberfächenschleife, in der sich auch die TEDS-Stelle befindet, die elektrostatischen Wechselwirkungen mit Aktin stabilisiert. In der Kristallstruktur von MyoE war die CM-Schleife ein schlecht aufgelöster Bereich, dessen genaue Struktur nicht bestimmt werden konnte. Der Grund dafür kann eine hohe Flexibilität dieser Region sein. Da das zur Kristallisierung verwendete Protein nur eine niedrige Aktinaktivierung der ATPase-Aktivität aufwies, lag es nach der Isolierung aus *D. discoideum* wahrscheinlich fast vollständig dephosphoryliert vor. Eine Phosphorylierung der TEDS-Stelle könnte dann zu einer Stabilisierung der Konformation der CM-Schleife und damit zu einer höheren Aktin-Affinität führen.

5.4.3 Übersicht über den Myosin I-ATPase-Zyklus

5.4.3.1 Wechselwirkung von Nukleotiden mit Myosin I

Die Geschwindigkeit der ATP-Bindung an Myosin, die durch die Geschwindigkeitskonstante ($K_1 k_{+2}$) angeben wird, liegt bei den untersuchten Myosinen der Klasse I hoch. Sie ist mit der Geschwindigkeit der ATP-Bindung an Myosin II aus *D. discoideum* vergleichbar (Kurzawa *et al.*, 1997). Die Veränderung der intrinsischen Proteinfluoreszenz des MyoB-Kopffragments bei der ATP-Bindung war deutlich kleiner als die der Kopffragmente von MyoD und MyoE und konnte deshalb im Bereich hoher ATP-Konzentrationen nicht mehr ausgewertet werden. Durch Anpassung einer Hyperbel an die Werte von D692 und E698 wird ein Maximalwert

(k_{max}) erhalten, der in diesem Fall der Geschwindigkeit des Isomerisierungsschritts, der auf die ATP-Bindung folgt, entspricht und nicht wie bei Myosinen der Klasse II der Geschwindigkeit des Hydrolyseschritts.

Im Gegensatz zu Myosin II aus *D. discoideum* wurde auch bei der ADP-Bindung an die Kopffragmente der Myosine I eine Veränderung der intrinsischen Proteinfluoreszenz beobachtet. Dabei war jedoch die Amplitude der Fluoreszenzveränderung im Fall von MyoB zu gering, um ausgewertet werden zu können. Der Tryptophanrest, dessen Bewegung bei Myosin II die Nukleotidbindung anzeigt, ist Tryptophan 510 in Skelettmuskelmuskelmyosin und Tryptophan 501 in *D. discoideum* Myosin II. Er entspricht Tryptophan 532 in den drei untersuchten Myosinen I und ist somit bei allen drei Proteinen konserviert. Die Anzahl der Tryptophane im Kopffragment von MyoB liegt jedoch bei 11 im Gegensatz zu lediglich vier in den anderen beiden Myosinkopffragmenten, so daß die Veränderung der Tryptophanfluoreszenz eines einzelnen Rests eventuell schwerer zu detektieren ist. Die ADP-Affinität von MyoB und MyoD, die durch die Gleichgewichtskonstante K_D ausgedrückt wird, liegt etwa fünfmal höher als die von MyoE, und etwa zehnmal höher als die von *D. discoideum* Myosin II. Für die ADP-Affinität liegen keine Vergleichswerte von anderen Myosinen der Klasse I vor. Die Affinität für mantADP ist im Fall von MyoD und MyoE etwa siebenmal höher als die für ADP, wie es schon für andere gut charakterisierte Myosine der Klasse II beobachtet wurde. Die Affinität von MyoB ist 70mal höher, was durch die etwa 70mal langsamere Freisetzung von mantADP bedingt ist. Daß die Affinität von MyoB für mantADP stark erhöht ist, kann an einer Wechselwirkung der mant-Gruppe mit Aminosäureresten in der Nukleotidbindungstasche des Proteins liegen und hat wahrscheinlich keine physiologische Bedeutung.

Die Proteinkonstrukte mit einer Mutation an der TEDS-Stelle zeigten weder eine Veränderung bei der Nukleotidbindung noch bei der ADP-Affinität an die Myosin I-Kopffragmente. Diese Schritte des Myosin I-ATPase-Zyklus werden durch die Phosphorylierung also nicht reguliert.

5.4.3.2 Wechselwirkung von Nukleotiden mit dem Aktomyosin I-Komplex

Auch die Geschwindigkeiten der ATP-induzierten Dissoziation des Aktomyosinkomplexes ($\mathbf{K_1k_{+2}}$) sind bei allen drei untersuchten Myosinen hoch. Dabei liegt der Wert, der für MyoB erhalten wurde, zehnmal höher als der Wert von Myosin II aus *D. discoideum* und war der Geschwindigkeit von Skelettmuskelmyosin aus Kaninchen vergleichbar (Cremo und Geeves, 1998). Die Geschwindigkeiten der ATP-induzierten Dissoziation des Aktomyosinkomplexes von MyoD und MyoE ähneln den Werten, die für *A. castellanii* Myosin IA und IB und für BBM I bestimmt wurden. Sie liegen mehr als zehnmal höher als der Wert von Myr1, das das langsamste Myosin I darstellt, das bekannt ist (Ostap und Pollard, 1996; Jontes *et al.*, 1997; Collucio und Geeves, 1999).

Die ADP-Affinität an den Aktomyosinkomplex ($\mathbf{K_{AD}}$) von MyoB und MyoD unterscheidet sich deutlich von der ADP-Affinität an Akto·MyoE. Die Werte von MyoB und MyoD entsprechen den Werten, die für Myosin IA und IB aus *A. castellanii* bestimmt wurden (93 µM und 53 µM). Der Wert für $\mathbf{K_{AD}}$ von MyoE beträgt 11 µM und ist somit etwa fünfmal höher als der Wert von MyoB und etwa achtmal höher als der Wert von MyoD. Sie liegt

näher an den $\mathbf{K_{AD}}$-Werten der Myosine I aus Wirbeltieren, wie BBMI, Myr1 und Myosin IC (Myr3), die unter 10 µM liegen.

Die Pyren-Fluoreszenzsignale der ATP-induzierten Dissoziation waren im Fall der Kopffragmente von MyoB und MyoD einphasig, bei MyoE zweiphasig. Eine zweiphasige Reaktion wurde auch bei Myr1, einem Myosin I aus Ratte, beobachtet (Geeves, 2000). Eine Erklärung dafür könnte sein, daß das Myosin in zwei Konformationen vorliegt, wenn es an Aktin gebunden ist. Eine Konformation des Proteins kann schnell ATP binden, während die andere Konformation erst eine Isomerisierung eingehen muß, bevor sie ATP binden kann. In einer Modellvorstellung muß sich erst die Nukleotidbindungstasche öffnen, bevor sie ein Nukleotid aufnehmen kann. Dieses Öffnen der Nukleotidbindungstasche könnte mit einer ADP-induzierten Strukturveränderung in Zusammenhang stehen. Die Möglichkeit, daß Myosin I in zwei Konformationen an Aktin gebunden vorliegen kann, ist von großem Interesse. Sie könnte für die zweite Bewegung verantwortlich sein, die in Einzelmolekülmessungen mit Myr1 und BBMI beobachtet wurde (Veigel *et al.*, 1999). Auch in Elektronenmikroskopiestudien wurde eine Strukturveränderung bei der ADP-Freisetzung von BBMI sichtbar (Jontes *et al.*, 1995).

Die Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation aus dem Aktomyosinkomplex limitiert die Geschwindigkeit der Bewegung von Aktinfilamenten in dem verwendeten *in vitro* System (Siemankowski, 1985). ADP wird aus dem Aktomyosinkomplex von MyoE mit einem $\mathbf{k_{-AD}}$-Wert von etwa 30 s^{-1} langsamer freigesetzt als aus dem Aktomyosinkomplex von MyoB und MyoD, bei denen Messungen auf $\mathbf{k_{-AD}}$-Werte über 60-80 s^{-1} hinweisen. Dieses Verhalten steht damit in guter Übereinstimmung mit den gemessenen *in vitro* Bewegungsgeschwindigkeiten. Unter der Verwendung von Chimären-Proteinkonstrukten, von Myosin II wurde gezeigt, daß die Oberflächenschleife 1 an der Übergangsstelle der 25 kDa-Domäne in die 50 kDa-Domäne die Bewegungsgeschwindigkeit beeinflußt (Murphy und Spudich, 1998). In der Kristallstruktur der Motordomäne von MyoE wurde deutlich, daß die Schleife 1 von MyoE Unterschiede bezüglich der Länge und Konformation im Vergleich zu Myosin II aus *D. discoideum* aufweist. Sie ist kürzer als die von Myosin II und weniger flexibel. Diese größere Flexibilität von Myosinen II führt zu einer schnelleren Freisetzung von ADP (Sweeny, 1998). Die Affinität von ADP an MyoE (K_D) ist niedriger als die Affinität an MyoB und MyoD, wird jedoch durch Aktin nur wenig beeinflußt. Im Gegensatz dazu werden die Affinitäten von MyoB und MyoD in der Gegenwart von Aktin deutlich erniedrigt. Zusammen führen diese Effekte zu einem signifikanten Unterschied in der Kopplung zwischen der Aktinbindung und der ADP-Freisetzung, die bei MyoE etwa 30mal kleiner ist als bei MyoB und MyoD.

5.5 Resümee und Ausblick

Die Lokalisierung von MyoD und MyoE in *D. discoideum* lieferte deutliche Hinweise auf eine Funktion der Proteine bei zellulären Prozessen, die auf einem dynamischen Aktincytoskelett beruhen, wie der Bewegungen von Zellen, der Phagocytose und der Pinocytose. Diese Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen in sehr guter Übereinstimmung mit vorausgegangenen Veröffentlichungen, die sich mit der Rolle von Myosinen der Klasse I in *D. discoideum* beschäftigten (Novak *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 1996; Neuhaus *et al.*, 2000).

Auch in Wirbeltieren wurde eine Beteiligung von Myosinen der Klasse I an der Endocytose nachgewiesen (Raposo *et al.*, 1999). Dadurch wird deutlich, wie die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit an dem einzelligen Modellorganismus *D. discoideum* wichtige Einblicke in zelluläre Vorgänge in wesentlich komplexeren Organismen geben können. Darüber hinaus war es möglich mit der Lokalisierung von MyoD im Zellkern während der Mitose eine davor noch nicht charakterisierte Rolle eines Myosins I bei der Zellteilung zu beschreiben. Diese könnte in der Aufteilung der Kernhülle, die bei *D. discoideum* während der Zellteilung erhalten bleibt, auf die Tochterkerne liegen. Von besonders großem Interesse ist das Ergebnis, da auch in Fibroblasten ein bisher nicht genau bekanntes Myosin I im Nukleus lokalisiert wurde (Nowak *et al.*, 1997). Obwohl die Funktion eines Myosins I im Zellkern von Wirbeltieren noch ungeklärt ist, könnte sie dort in einer Wechselwirkung mit der Kernmatrix liegen. Für diese Struktur konnte nachgewiesen werden, daß sie Aktin enthält (Sahlas *et al.*, 1993). Das Signal, das den Kernimport von MyoD auslöst, wird höchst wahrscheinlich durch den Zellzyklus reguliert, da das Protein in der Interphase nicht im Nukleus auftritt. Dieses Signal zu identifizieren und mit Mutationsstudien zu analysieren, ist ein sehr interessantes, weiterführendes Thema anschließender Forschungsarbeiten.

Bei der Charakterisierung der Motorfunktion der Myosine I aus *D. discoideum* wurde für alle drei analysierten Proteine direkt nachgewiesen, daß sie eine Phosphorylierung der Motordomäne an der TEDS-Stelle benötigen, um ihre maximale Aktivität zu erreichen. Auch bei Myosinen der Klasse VI kommt dem untersuchten Regulationsmechanismus eine wichtige Bedeutung zu (De La Cruz *et al.*, 2001). Aus einem weiteren Grund ist die Rolle, die von der Oberflächenstruktur des Myosinmoleküls, in der sich die TEDS-Stelle befindet, bei der Motorfunktion von Myosin ausgeübt wird, ebenfalls von sehr großem Interesse. Punktmutationen an einem Arginin des menschlichen β-Herzmuskelmyosins, das sich in dieser Oberflächenstruktur befindet, führen zu einer erblichen Hypertrophie des Herzmuskels (Geisterfeld-Lowrance *et al.*, 1990).

Um die aktivierten Formen der Proteine untersuchen zu können, wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Sie wurden entweder mit einer Myosin I-Kinase aus *A. castellaini* phosphoryliert, oder an der TEDS-Stelle wurde durch eine Mutation eine negativ geladene Glutaminsäure eingeführt. Die Übereinstimmung der erhaltenen Ergebnisse zeigt, daß die Phosphorylierung effizient mit dieser Mutation nachgeahmt werden konnte. Da die Substratspezifität der Myosin I-Kinase die Verwendung bei anderen Myosinklassen stark einschränkt, steht damit eine Methode für die Charakterisierung weiterer Myosine zur Verfügung. Bei den Messungen mit den Myosinen aus *D. discoideum* konnte dann der Regulationsmechanismus einer Phosphorylierung an der TEDS-Stelle auch auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. Eine negative Ladung an der entsprechenden Position wird für eine effiziente Aktinaktivierung der ATPase-Aktivität der Myosine I benötigt. Dadurch wird die Kopplungseffizienz zwischen der Aktinbindung und der Freisetzung des Reaktionsprodukts Phosphat sehr stark erhöht. Weiterhin wurde zum ersten mal gezeigt, daß durch die Phosphorylierung der Aktomyosinkomplex deutlich stabilisiert wird, indem die Geschwindigkeit der Dissoziation von Aktin aus dem Komplex erniedrigt wird. Da die Geschwindigkeit der Aktinbindung nicht beeinflußt ist, wirkt die Regulation sehr wahrscheinlich auf den Übergang des Aktomyosinkomplexes von dem schwach gebundenen

A-Zustand in den stark gebundenen R-Zustand. Dieser Übergang ist mit dem Kraftschlag des Myosins verbunden.

Ein weiteres Ergebnis, das bei der Charakterisierung von MyoD erhalten wurde, war die Entdeckung eines vorher nicht beschriebenen Regulationsmechanismus der Motorfunktion eines Myosins. Dabei wirken freie Magnesiumionen inhibierend auf die Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten, indem die Dissoziation von ADP aus dem Komplex mit Myosin nach der Hydrolyse von ATP gehemmt wird. Die Gleichgewichtskonstante der Inhibierung wurde bestimmt und liegt bei einem Wert von 0,44 mM an Magnesiumionen. Da die Konzentration an freien Magnesiumionen in *D. discoideum* bei 0,6 mM liegt (Satre und Martin, 1985; Martin *et al.*, 1987) kann dieser Regulation durch Magnesiumionen eine wichtige physiologische Bedeutung zukommen. Bei der Signaltransduktion in Zellen spielen jedoch nicht Magnesiumionen, sondern Calciumionen häufig eine Schlüsselrolle. Dabei konnte ebenfalls ein Effekt von Calciumionen in einem physiologischen Konzentrationsbereich auf die Bewegung von MyoD beobachtet werden, der eine weitere Analyse sinnvoll erscheinen läßt. Die beschriebene Regulation der Motorfunktion durch divalente Kationen scheint ebenfalls einen Einfluß auf die Aktivität von Myosinen der Klassen V und VI zu zeigen (Lee Sweeny, persönliche Mitteilung) und könnte damit eine weite Bedeutung innerhalb der Myosinfamilie haben. Um diese Möglichkeit genauer zu untersuchen, bietet sich die Analyse von Myosinen anderer Klassen aus *D. discoideum* an, die mit denselben Methoden durchgeführt werden könnte.

Die Charakterisierung des ATPase-Zyklus der drei Myosine der Klasse I aus *D. discoideum* führte zu dem Ergebnis, daß die Wechselwirkung mit ATP und Aktin denselben grundlegenden Mechanismen folgt, die schon für andere sehr gut charakterisierte Myosine beschrieben wurden (Holmes und Geeves, 2000). Unterschiede lagen jedoch in den Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten einzelner Schritte des ATPase-Zyklus, die die Eigenschaften der Mitglieder der Unterklasse 1, MyoB und MyoD, deutlich gegen MyoE aus der Unterklasse 2 abgrenzen. Die Bewegungsgeschwindigkeit von Aktinfilamenten durch Myosin wird durch die Geschwindigkeit der ADP-Freisetzung aus dem Aktomyosinkomplex bestimmt (Siemankowski *et al.*, 1985). Die ADP-Affinität an MyoB und MyoD wird wie bei Myosinen der Klasse II stark durch Aktin erniedrigt. Im Gegensatz dazu bleibt die ADP-Affinität von MyoE auch in der Anwesenheit von Aktin fast unverändert hoch. Daher ist die Geschwindigkeit der ADP-Dissoziation aus dem Komplex von MyoE und Aktin deutlich langsamer als die aus dem Komplex von MyoB oder MyoD und Aktin. Weiterhin wurden deutliche Hinweise darauf erhalten, daß die ADP-Dissoziation aus dem Aktomyosinkomplex von MyoE in zwei Schritten erfolgen könnte. Darin ähneln die kinetischen Eigenschaften von MyoE denen der Myosine I aus Wirbeltieren, wie BBMI und Myr1 (Jontes *et al.*, 1997; Collucio und Geeves, 1999). Bei diesen Myosinen wird die zweistufige Dissoziation von ADP damit erkärt, daß das Myosin in zwei Konformationen vorliegen kann, wenn es an Aktin gebunden ist. Die Isomerisierung zwischen diesen beiden Zuständen könnte dann eine Verbindung zwischen der Möglichkeit, daß ein Nukleotid in der Bindungstasche des Myosins binden kann, und einer Kraft herstellen, die auf das Myosin ausgeübt wird. Damit liegt ein Mechanismus dafür vor, wie ein Myosin, das mit einer Last beladen ist, länger an Aktin gebunden bleibt.

6 Literaturverzeichnis

Adams, R. J. and Pollard, T. D. (1989). Binding of myosin I to membrane lipids. *Nature* **340**, 565-568.

Albanesi, J. P., Hammer III, J. A., and Korn, E. D. (1983). The interaction of F-actin with phosphorylated and unphosphorylated myosins IA and IB from *Acanthamoeba castellanii*. *J. Biol. Chem*. **16**, 10176-10181.

Alting-Mees, M. A. and Short, J. M. (1989). pBluescriptII: gene mapping vectors. *Nuc. Acid. Res.* **17**, 9494.

Anderson, B. L., Boldogh, I., Evangelista, M., Boone, C., Greene, L. A. and Pon, L. A. (1998). The Src homology domain (SH3) of yeast type I myosin, Myo5p, binds to verprolin an is required for targeting to sites of actin polarization. *J. Cell. Biol*., **141**, 1357-1370.

Anson, M. (1992). Temperature dependence and Arrhenius activation energy of F-actin velocity generated by in vitro by skeletal myosin. *J .Mol. Biol.* **260**, 492-505.

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

Avraham, K. B., Hasson, T., Steel, K. P., Kingsley, D. M., Russell, L. B., Mooseker, M. S., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (1995). The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nature Genetics* **11**, 369-375.

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

Baines, I. C. and Korn, E. D. (1990). Localisation of myosin IC and myosin II in *Acanthamoeba castellanii* by indirect immunofluorescence and immunogold electron microscopy. *J. Cell. Biol.* **111**, 1895-1904.

Baines, I. C., Brzeska, H., and Korn, E. D. (1992). Differential localization of *Acanthamoeba* myosin I isoforms. *J Cell Biol.* **5**, 1193-203.

Batra, R., Geeves, M. A., and Manstein, D. J. (1999). Kinetic analysis of *Dictyostelium discoideum* myosin motor domains with glycine-to-alanine mutations in the reactive thiol region. *Biochemistry* **38**, 6126-6134.

Barylko, B., Binns, D. D., and Albanesi, J. P. (2000). Regulation of the enzymatic and motor activities of myosin I. *Biochim. Biophys. Acta* **1496**, 23-35.

Barylko, B., Wagner, M., Reizes, O., and Albanesi, J. (1992). Purification and characterization of a mammalian myosin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 490-494.

Bement, W. M. and Mooseker, M.S. (1995). TEDS rule: A molecular rationale for differential regulation of myosin by phosphorylation of the heavy chain head. *Cell. Motil. Cytosk.* **31**, 87-92.

Berghäuser, J. (1975). Reactive arginine in adenylate kinase. *Biochim. Biophys. Acta* **397**, 370-376.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. **72**, 248-254.

Brzeska, H., Lynch, T. D., Martin, B., and Korn, E. D. (1989). The localization and sequence of the phosphorylation sites of Acanthamoeba myosins I. An improved method for locating the phosporylated amino acid. *J. Biol. Chem*. **263**, 19340-19348.

Brzeska, H., Lynch, T. D., and Korn, E. D. (1990). *Acanthamoeba* myosin I heavy chain kinase is activated by phosphatidylserin-enhanced phosphorylation. *J. Biol. Chem*. **265**, 3591-3594.

Brzeska, H., Lynch, T. D., Martin, Corigliano-Myrphy, A., B., and Korn, E. D. (1990). Substrate specificity of *Acanthamoeba* myosin I heavy chain kinase as determined with synthetic peptides. *J. Biol. Chem*. **265**, 16138-16144.

Brzeska, H., Young, R., Knaus, U., Korn, E. D. (1999). Myosin I heavy chain kinase: cloning of the full-length gene and acidic lipid-dependent activation by Rac and Cdc42. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2**, 394-399.

Buss, K., Kendrick-Jones, J., Lionne, C., Knight, A. E., Cote, G. P., and Luzio, J.P. (1998). The localization of myosin VI at the golgi complex and leading edge of fibroblasts and its phosphorylation and recruitment intomembrane ruffles of A431 cells after growth factor stimulation. *J. Cell. Biol*. 143, 1535-1545.

Buss, K. Luzio, J.P., and Kendrick-Jones J. (2002). Myosin VI, an actin motor for membrane traffic and cell migration. *Traffic* **12**, 851-858.

Chance, B. (1957). A simple relationship for a calculation of the "on" velocity constant in enzyme reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **71**, 130-136.

Chandra, R., Salmon, E. D., Erickson, H. P., Lockhart, A., and Endow, S. A. (1993). Structural and functional domains of the *Drosophila* ncd microtubule motor protein. *J. Biol. Chem*. **269**, 9005-9013.

Cheney, R. E., O'Shea, M. K., Heuser, J. E., Coelho, M. V., Wolenski, J. S., Espreafico, E. M., Forscher, P., Larson, R. E., and Mooseker, M. S. (1993). Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell* ***75***, 13-23.

Clarke, M. and Spudich, J. A. (1974). Biochemical and structural studies of actomyosin-like proteins from non-muscle cells. Isolation and characterization of myosin from amoebae of *Dictyostelium discoideum*. *J. Mol. Biol*. **86**, 209-222.

Cohen, P. T. and Cohen, P. Discovery of a protein phosphatase activity encoded in the genome of bacteriophage lambda. Probable identity with open reading frame 221. *Biochem. J.* **260**, 931-934.

Collins, K., Sellers, J. R., Matsudaira, P., (1990). Calmodulin dissociation regulates brush border myosin I mechanochemical activity *in vitro*. *J. Cell. Biol*. **110**, 1137-1147.

Coluccio, L. M. (1997). Myosin I, *Am. J. Physiol.* **273** C347-C359

Coluccio, L. M. and Geeves, M. A. (1999). Transient kinetic analysis of the 130-kDa myosin I (MYR-1 gene product) from rat liver. A myosin I designed for maintenance of tension? *J. Biol. Chem*. **274**, 21575-80.

Cooke, R. (1986). The mechanism of muscle contraction. *CRC. Cri.t Rev. Biochem*. **21**: 53-118.

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

Cremo, C. R., Neuron, J. M. und Yount, R. G. (1990). Interaction of myosin subfragment 1 with fluorescent ribose-modified nucleotides. A comparison of vanadate trapping and SH1-SH2 cross-linking. *Biochemistry* **29**, 3309-3319.

Cremo, C. R. and Geeves, M. A. (1998). Interaction of Actin and ADP with the head domain of smooth muscle myosin: implications for strain-dependent ADP Release in Smooth muscle. *Biochemistry* **37**, 1969-1978

Crouse, G. F., Frischauf, A. and Lehrach, H. (1983). An integrated and simplified approach to cloning into plasmids and single-stranded phages. *Methods. Enzymol.* **101**, 78-89.

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

Cuda, G., Fananapazir, L., Epstein, N. D., Sellers, J. R. (1997). The *in vitro* motility activity of beta-cardiac myosin depends on the nature of the bata-myosin heavy chain gene mutation in hypertrophic cardiomyopathy. *J. Muscle Res. Cell. Motil*. **18**, 275-283.

Dai, J., Ting-Beall, H. P., Hochmuth, R. M., Sheetz, M .P., and Titus, M. A. (1999). Myosin I contributes to the generation of resting cortical tension. *Biophys. J.* **2**,1168-76.

Dancker, P., Low, I., Hasselbalch, W. und Wieland, T. (1975). Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin. *Biochem. Biophys. Acta* **400**, 407-414.

De Hostos, E. L., Bradtke, B., Lottespeich, F., Guggenheim, R. and Gerisch, G. (1991). Coronin, an actin binding protein of *Dictyostelium discoideum* localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits. *EMBO J.* **10**, 4097-4104.

DeLozanne, A., Lewis, M., Spudich, J. A. und Leinwand, L. A. (1985). Cloning and charakterization of a nonmuscle myosin heavy chain cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 6807-6810.

DeLozanne, A. and Spudich, J. A. (1987). Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain by homologous recombination. *Science* **238**, 1086-1091.

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

De La Cruz, E. M., Ostap, E. M., and Sweeney, H. L. (2001). The kinetic mechanis of myosin VI. *J. Biol. Chem.* **276**, 32373-32381.

Donelli, S. F., Pocklington, M. J., Pallotta, D., and Orr, E. (1993). A prolin-rich protein, verprolin, involved in cytoskeletal organization and cellular growth in the yeast Saccharomyces cerevisiae, *Mol. Microbiol*. **10**, 585-596.

Dominguez, R., Freyzon, Y., Trybus, K. M. and Cohen, C. (1998). Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain - visualization of the pre-power stroke state. *Cell* **94**, 559-571.

Eccelston, J. F. (1987). In: Spectrophotometry and spectrofluorimetry (Harris, D. A. and Bashford, C. L. eds.), *IRL Press Oxford*, Washington DC.

Elzinga, M., Collins, J. H., Kuehl, W. M. and Adelstein R. S. (1973). Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **70**, 2687-2691.

El Mezgueldi, M., Tang, N., Rosenfeld, S. S., and Ostap, E. M. (2002). The kinetic mechanism of Myo1e (human Myosin-IC). *J. Biol. Chem.* **277**, 21514-21521.

Evans, L. L., Hammer, J., and Bridgman, P. C. (1997). Subcellular localization of myosin V in nerve growth cones and outgrowth from dilute-lethal neurons. *J. Cell. Sci.* **110**, 439-449.

Evans, L. L., Lee, A. J., Bridgman, P. C. and Mooseker, M. S. (1998). Vesicle-associated brain myosin-V can be activated to catalyze actin-based transport. *J. Cell. Sci.* **111**, 2055-2066.

Fath, K. R., Burgess, D. R. (1993). Golgi-derived vesicle from developing epithelial cells bind actin filaments and possess myosin-I as a cytoplasmically oriented peripheral membrane protein, *J. Cell. Biol.*, **120**, 117-128.

Fisher, A. J., Smith C. A., Thoden, J. B., Smith, R., Sutoh, K., Holden, H. M. and Rayment,I. (1995). X-ray structures of the myosin motor domain of *Dictyostelium discoideum* complexed with MgADP·BeF_x and MgADP·AlF_4^-. *Biochemistry* **34**, 8960-8972.

Fortune, N. S., Geeves, M. A., and Ranatunga, K.W. (1991). Tension responses to rapid pressure release in glycerinated rabbit muscle fibres. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA **88**, 7323-7327.

Fukui, Y., Lynch, T. J., Brzeska, H. and Korn, E. D. (1989). Myosin I is located at the leading edges of locomoting *Dictyostelium* amoebae. *Nature* **341**, 328-331.

Furch, M., Geeves, M. A., and Manstein, D. J. (1998). Modulation of actin affinity and actomyosin adenosine triphosphatase by charge changes in the myosin motor domain. *Biochemistry* **37**, 6317-26.

Furch, M., Fujita-Becker, S., Geeves, M. A., Holmes, K. C., and Manstein, D. J. (1999). Role of the salt-bridge between switch-1 and swith-2 of *Dictyostelium* myosin. *J. Mol. Biol*., **290**, 797-809

Geeves, M. A., Goody, R. S. and Gutfreund, H. (1984). Kinetics of acto-S1 interaction as a guide to a model for the cross-bridge cycle. *J. Muscle Res. Cell M.* **5**, 351-561.

Geeves, M. A. (1992). The actomyosin ATPase - a 2-state system. *Philos. Trans. R.. Soc. Lond*. **336**, 63-71.

Geeves, M. A. and Conibear, P. B. (1995). The role of three-state docking of myosin S1 with actin in force generation. *Biophys. J.* **68**, 194S-201S.

Geeves, M. A. and Holmes, K. C. (1999). Structural mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 687-728.

Geeves, M. A., Perreault-Micale, C., and Coluccio, L. M.. (2000). Kinetic analysis of a truncated mammalian myosin I suggests a novel isomerization event preceding nucleotide binding. *J. Biol. Chem.* **275**, 21624-21630

Geissler, H., Ullmann, R., and Soldati T. (2000). The tail domain of myosin M catalyses nucleotide exchange on Rac1 GTPases and can induce actin-driven surface protrusions. *Traffic* **5**, 399-410.

Geisterfer-Lowrance, A. A. T., Kass, S., Tanigawa, G., Vosberg, H. P., McKenna, W., Seidman, C. E. and Seidman, J. G. (1990). A molecular-basis for familial hypertrophic cardiomyopathy - a beta-cardiac myosin heavy-chain gene missense mutation. *Cell* **62**, 999-1006.

Geli, M. I. and Riezman H. (1996). Role of type I myosins in receptor-mediated endocytosis in yeast. *Science* **272**, 533-535.

Geli, M. I., Wesp, A., and Riezman, H. (1998). Distinct functions of calmodulin are required for the uptake step of receptor-mediated endocytosis in yeast - the type-I myosin myo5p is one of the calmodulin targets. *EMBO J.* **17**, 635-647.

Gerisch, G, and Wick, U. (1975). Intracellular oscillations and release of cyclic AMP from Dictyostelium cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **65**, 364-370.

Gibson, F., Walsh, J., Mburu, P., Varela, A., Brown, K.A., Antonio, M., Beisel, K.W., Steel, K.P., and Brown S.D. (1995). A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1. *Nature* **374**, 62-64.

Gillespie, P. G. and Corey, D. P. (1997). Myosin and adaptation by hair-cells. *Neuron* **19**, 955-958.

Govindan, B., Bowser, R., and Novick, P. (1995). The role of Myo2, a yeast class V myosin, in vesicular transport. *J. Cell. Biol.* **128**, 1055-1068.

Gulick, A. M., Bauer, C. B., Thoden, J. B. and Rayment, I. (1997). X-ray structures of the MgADP, MgATPγS, and MgAMPPNP complexes of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain. *Biochemistry* **36**, 11619-11628..

Hammer, J. A. III., Albanesi, J. P., and Korn, E. D. (1983). Purification and chracterization of a myosin I heavy chain kinase from *Acanthamoeba castellanii. J. Biol. Chem.* **258**, 10168-10175

Haarer, B. K., Petzold, A., Lillie, S. H. and Brown, S. S. (1994). Identification of MYO4, a second class V myosin gene in yeast. *J. Cell. Sci*. **107**, 1055-1064.

Hasson, T., Heintzelman, M.B., Santos-Sacchi, J., Corey, D.P. and Mooseker, M.S. (1995). Expression in cochlea and retina of myosin VIIa, the gene product defective in Usher syndrome type 1B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 9815-9819.

Hasson, T., Gillespie, P. G., Garcia, J. A., MacDonald, R. B., Zhao, Y. D., Yee, A. G., Mooseker, M. S., and Corey, D. P. (1997). Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. *J. Cell. Biol.* **137**, 1287-1307.

Hasson T. & Mooseker M.S. (1994) Porcine myosin-VI: characterization of a new mammalian unconventional myosin. *J. Cell. Biol.* 127: 425-440.

Hiratsuka, T. und Uchida, K. (1973). Preparation and properties of 2'(or 3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate, an analog of adenosine triphosphate. *Biochim. Biophys. Acta* **320**, 635-647.

Hiratsuka, T. (1976). Fluorescence properties of 2' (or 3')-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate and its use in the study of binding to heavy meromyosin ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* **453,** 293-297.

Hiratsuka, T. (1983). New ribose-modified fluorescent analogs of adenine and guanine nucleotides available as substrates for various enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*. **742**, 496-508.

Hodge, T., and Cope, M. J. (2000). A myosin family tree. *J. Cell. Sci.* **19**, 3353-4.

Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W., and Kabsch, W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**, 44-49.

Holmes, K. C. (1997). The swinging lever arm hypothesis of muscle contraction. *Curr. Biol.* **7**, R112 R118.

Holmes, K. C., and M. A. Geeves. 2000. The structural basis of muscle contraction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **355**, 419-31.

Holt, J. R., Gillespie, S. K., Provance, D.W. Jr., Shah, K., Shokat, K. M., Corey, D. P., Mercer, J. A., and Gillespie, P. G. (2002). A chemical-genetic strategy implicates myosin-1c in adaptation by hair cells. *Cell* **108**, 371-381

Houdusse A. and Cohen, C. (1996). Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2 Å resolution: implications for regulation. *Structure* **4**, 21-32

Howard, J. (1997). Molecular motors: structural adaptations to cellular functions. *Nature* **389**, 561-567.

Huxley, H. E. and Hanson, J. (1954). Changes in the cross striation of muscle during contration and stretch and their structural interpretation. *Nature* **173**, 973-975.

Huxley, A. F. and Niedergerke, R. C. (1954). Structural changes in muscle during contraction. Interference microscopy of living muscle. *Nature* **173**, 971-3.

Huxley, H. E. (1957). The double array of filaments in cross-striated muscle. *J. Biophys. Biochem. Cyt.* **3**.

Huxley, H.E. (1958) The contraction of muscle. Scientific American **199**: 66-82

Huxley, H. E. (1969). The mechanism of muscle contraction. *Science* **164**, 1356-1366.

Inue, S., Kiehart, D. P., Mabuchi, I., and Ellis G. W. (1979). Molecular mechanism of mitotic chromosome movement. in Pepe, F. A., Sanger, J. W., and Nachmias, V. T., Motility in cell functions. *Academic Press, New York* 301-311

Johnston, G. C., Prendergast, J. A., and Singer, R. A. (1991). The saccharomyces cerevisiae MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. *J. Cell. Biol.* **113**, 539-551

Jontes, J. D., Wilson-Kubalek, E. M. and Milligan, R. A. (1995). A 32 degree tail swing in brush border myosin I on ADP release. *Nature* **378,** 751-753.

Jontes, J. D., Milligan, R. A., Pollard, T. D., and Ostap, E. M. (1997). Kinetic characterization of brush border myosin-I ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94,** 14332-14337

Jung, G., Saxe, C. L. III, Kimmel, A. R., and Hammer, J. A. III (1989). *Dictyostelium discoideum* contains a gene encoding a myosin I heavy chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6186-6190.

Jung, G., Fukui, Y., Martin, B. and Hammer III, J. A. (1993). Sequence, expression pattern, intracellular localization, and targeted disruption of the *Dictyostelium* myosin ID heavy chain isoform. *J. Biol. Chem.* **268**, 14981-14990.

Jung, G., Wu, X.F., and Hammer III, J.A. (1996). *Dictyostelium* mutants lacking multiple classic myosin I isoforms reveal combinations of shared and distinct functions. *J. Cell. Biol.* **133**, 305-323.

Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F. und Holmes K. C. (1990). Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* **347**, 37-44.

Kliche, W., Fujita-Becker, S., Kollmar, M., Manstein, D. J., and Kull, J. F. (2001). Structure of a genetically engeneered molecular motor. *EMBO J.* **20**, 40-46.

Knecht, D. A., and Loomis, W. F. (1987). Antisense RNA inactivation of myosin heavy chain gene expression in *Dictyostelium discoideum*. *Science* **236**, 1081-1086.

Kodama, T., (1985). Themodynamic analysis of muscle ATPase mechanisms. *Physiol. Rev.* **65**, 467-551

Kollmar, M., Dürrwang, U., Kliche W., Manstein, D. M., and Kull, J. F., (2002). Christal structure of the motor domain of a class-I myosin. *EMBO J.* **21**, 2517-2525

Kron, S. J. und Spudich, J. A (1986). Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* **83**, 6272-6276.

Kurzawa, S. E., Manstein, D. J. und Geeves, M. A. (1997). *Dictyostelium discoideum* myosin II: characterization of functional myosin motor fragments. *Biochemistry* **36**, 317- 234.

Kyhse-Andersen, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatu without buffe tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **10**, 203-209.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Layne, E. (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in Enzymol.* **3** 447-456.

Lee, S. F. and Côté, G. P. (1993). Isolation and characterization of three *Dictyostelium* myosin-I isozymes. *J. Biol. Chem.* **268**, 20923-20929.

Lee, S. F. and Côté, G. P. (1995). Purification and characterization of a *Dictyostelium* protein kinase required for actin activation of the Mg2+ ATPase activity of *Dictyostelium* myosin ID. *J. Biol.Chem.* **270**, 11776-11782.

Lee, S. F., Egelhoff, T. T., Mahasneh, A. and Côté, G. P. (1996). Cloning and characterization of a *Dictyostelium* myosin I heavy chain kinase activated by Cdc42 and Rac. *J. Biol. Chem.* **271**, 27044-27048.

Lehrer, S. S. and Kerwar, G. (1972). Intrinsic fluorescence of actin. *Biochemistry* **11**, 1211-1217.

Lewis, A. K. and Bridgman, P. C. (1996). Mammalian myosin Iα is concentrated near the plasma membrane in nerve growth cones, *Cell Motil. Cytoskel.* **33**, 130-150.

Liu, X. Z., Ondek, B. and Williams D. S. (1998a). Mutant myosin VIIa causes defective melanosome distribution in the rpe of shaker-1 mice. *Nature Genetics* **19**, 117-118.

Liu, X. Z., Hope, C., Walsh, J., Newton, V., Ke, X. M., Liang, C. ., Xu, L. R., Zhou, J. M., Trump, D., Steel, K. P., Bundey, S. and Brown, S. D. M. (1998b). Mutations in the myosin VIIa gene cause a wide phenotypic spectrum, including atypical usher-syndrome. *Am. J. of Hum. Gen.* **63**, 909-912.

Long, R. M., Singer, R. H., Meng, X., Gonzales, I., Nasmyth, K., Jansen R. P. (1997). Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH mRNA. *Science* **277**, 383-387.

Loomis, W. (1975). *Dictyostelium discoideum*. A developmental system *Academic Press NY*

Lorenz, M., Popp, D. and Holmes, K. C. (1993). Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm. *J. Mol. Biol.* **234**, 826-36

Lymn, R. W. and Taylor, E. W. (1971). Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* **10**, 4617-4626.

Ma, Y. and Taylor, E. W. (1994). Comparison of the myosin and actomyosin ATPase mechanism of the four types of vertebrate muscles. *J. Mol. Biol*. **139**, 573-600.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Manstein, D. J., Titus, M. A., De Lozanne, A. and Spudich, J. A. (1989a). Gene replacement in *Dictyostelium*: generation of myosin null mutants. *EMBO J*. **8**, 923-932.

Manstein, D. J., Ruppel, K. M. and Spudich, J. A. (1989b). Expression and characterizationof a functional myosin head fragment in *Dictyostelium discoideum*. *Science* **246**, 656-658.

Manstein, D. J. and Hunt, D. M. (1995). Overexpression of myosin motor domains in *Dictyostelium*: screening of transformants and purification of the affinity tagged protein. *J. Muscle Res. Cell Motil*. **16**, 325-332.

Manstein, D. J., Schuster, H. P., Morandini, P. and Hunt, D. M. (1995). Cloning vectors for the production of proteins in *Dictyostelium discoideum*. *Gene* **162**, 129-134.

Marston, S. B. und Taylor, E. W. (1980). Comparison of the myosin and actomyosin ATPase mechanisms of the four types of vertebrate muscles. *J. Mol. Biol*. **139**, 573-600.

Martin, J. B., Foray, M. F., Klein, G., Satre, M. (1987). Identification of inositol hexaphosphate in 31P-NMR spectra of *Dictyostelium discoideum* amoeba. Relevance to intracellular pH determination. *Biochim. Biophys. Acta* **931**, 16-25.

Matsudaira, P. T. and Burgess, D. R. (1979). Identification and organization of the components in the isolated microvillus cytoskeleton, .*J Cell Biol*., **83**, 667-673.

McGoldrick, C. A., Gruver, C. and May, G. S. (1995). MyoA of *Aspergillus nidulans* encodes an essential myosin I required for secretion and polarized growth. *J. Cell Biol*.. **128**, 577-587.

Mercer, J. A., Seperack, P. K., Strobel, M. C., Copeland, N. G. and Jenkins N. A. (1991). Novel myosin heavy chain encoded by murine *dilute* coat colour locus. *Nature* **349**, 709-713.

Mermall V., McNally J.G. & Miller K.G. (1994) Transport of cytoplasmic particles catalysed by an unconventional myosin in living *Drosophila* embryos. Nature 369: 560-562.

Mermall, V., Post, P. L. and Mooseker, M. S. (1998). Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* **279**, 527-33.

Michaelis, L. and Menten, M.L. (1913). *Biochem. Z.* **49**, 333.

Millar, N. C. and Geeves, M. A. (1983). The limiting rate of the ATP-mediated dissociation of actin from rabbit skeletal muscle myosin subfragment 1. *FEBS Lett*. **160**, 141-148.

Millar, N. C., Howarth, J. V., and Gutfreund, H. (1987). A transient kinetic study of enthalpie changes during the reaction of Myosin subfragment I with ATP. *Biochem. J.* **248**, 683-690

Milligan, R.A. (1996). Protein-protein interactions in the rigor actomyosin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* **93**, 21-26.

Miyata, H., Bowers, B. and Korn, E.D. (1989). Plasma membrane association of *Acanthamoeba* myosin I. *J. Cell Biol.* **109**, 1519-1528.

Montell, C. and Rubin, G. M. (1988). The drosophila ninaC locus encodes two photoreceptor cell specific proteins with domains homologous to protein kinases and the myosin heavy chain head. *Cell* **52**, 757-772.

Mooseker, M. S. and Cheney, R. E. (1995). Unconventional Myosins. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **11**, 633-675.

Moores, S. L., Sabry, J. H., Spudich, J. A. (1996). Myosin dynamics in live *Dictyostelium* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. **93**, 443-446.

Morita, Y. S., Jung, G., Hammer III, J. A. and Fukui, Y. (1996). Localization of *Dictyostelium* myoB and myoD to filopodia and cell-cell contact sites using isoform-specific antibodies. *Eur. J. Cell. Biol.* **71**, 371-379.

Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155,** 335-350.

Murphy C. T. and Spudich J. A. (1999). The sequence of the myosin 50-20K loop affects myosin's affinity for actin throughout the actin-myosin ATPase cycle and its maximum ATPase activity. Biochemistry **38**, 3785-3792.

Murphy, C. T and Spudich, J. A. (1998). Dictyostelium myosin 25-50K loop substitutions specifically affect ADP release rates. *Biochemistry* **37** 6738-6744.

Nascimento, A. A. C., Cheney, R. E., Tauhata, S. B. F., Larson, R. E., and Mooseker, M. S. (1996.) Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V. *J. Biol. Chem.* **271**, 17561-17569.

Neuhaus, E. M., Horstmann, H., Almers, W., Maniak, M., and Soldati T. (1998). Ethane freezing/methanol-fixation of cell monolayers: a procedure for improved preservation of structure and antigenicity for light and electron microscopies. *J. Struct. Biol*. **121**, 326-342.

Neuhaus, E. M. and Soldati, T. (2000). A myosin I is involved in membrane recycling from early endosomes. *J. Cell. Biol*., **150**, 1013-1026.

Novak, K. D., Peterson, M. D., Reedy, M. C., and Titus, M.A. (1995). *Dictyostelium* myosin I double mutants exhibit conditional defects in pinocytosis. *J. Cell. Biol.* **131**, 1205-1221.

Novak, K. D. and Titus, M.A. (1997). Myosin-I overexpression impairs cell migration. *J. Cell. Biol.* **136**, 633-647

Novak, K. D. and Titus, M. A. (1998). The myosin-I SH3 domain and TEDS rule phosphorylation site are required for in vivo function. *Mol. Biol. Cell* **9**, 75-88.

Nowak, G., Pestic-Dragovich, L., Hozák, P., Philimonenko, A., Simerly, C., Schatten, G., and de Lanerolle, P. (1997). Evidence for the presence of myosin I in the nucleus. *J. Biol. Chem.* **272**, 17176-17181

Oishi, N., Adachi, H., and Sutoh, K. (2000). Novel *dictyostelium* unconventionl myosin, MyoM, ha a putative RhoGEF domain. *FEBS Lett.*, **474**, 16-22.

Olive, L. (1975). The mycetozoans. *Academic Press*, NY.

Ostap, E. M., Pollard T. D. (1996). Overlapping functions of myosin-I isoforms? *J. Cell. Biol.* **2**, 221-224.

Ostap, E. M. and Pollard, T. D. (1996). Biochemical kinetic characterization of the *Acanthamoeba* myosin-I ATPase. *J. Cell. Biol.* **6**, 1053-60.

Ostap, E. M., Lin, T., Rosenfeld, S. S., and Tang, N. (2002). Mechanism of regulation of *Acanthamoeba* Myosin-IC by heavy chain phosphorylation. *Biochemistry* **41**, 12450-12456

Parry, D. A. and Steinert, P. M. (1992). Intermediate filament structure. *Curr. Opin.Cell. Biol.*, **1**, 94-98.

Pasternak, C., Spudich, J. A., Elson, E. L. (1989). Capping of surface receptors and concomitant cortical tension are generated by conventional Myosin. *Nature* **342**, 549-551.

Peterson, M. D., Novak, K. D., Reedy, M. C., Ruman, J. I. and Titus, M. A. (1995). Molecular genetic analysis of myoC, a *Dictyostelium* myosin I. *J. Cell. Sci.* **108**, 1093-1103.

Peterson, M. D., Urioste, A. S., and Titus, M. A. (1996). Dictyostelium discoideum myoJ: a member of a broadly defined myosin V class or a class XI unconventional myosin ? *J. Muscle Res. Cell Motil.* **17**, 411-424.

Pfarr, C. M., Coue, M., Grissom,P. M., Hays, T. S., Porte, M. E., and McIntosh, J. R., (1990). Cytoplasmic dynein is locallized to kinetochores during mitosis. *Nature* **345**, 263-265.

Pollard, T. D. and Korn, E. D. (1973). Myosin I. Isolation from *Acanthamoeba castellanii* of an enzyme similar to muscle myosin. *Biol. Chem.* **248**, 4862-4690.

Porte, J. A. and Montell, C. (1993). Distinct Roles of the drosophila ninaC kinase and myosin domains related by systematic mutagenesis. *J. Cell. Biol.* **122**, 601-612.

Raper, K. B. (1935). *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mould from decaying forest leaves. *J. Agr. Res.* **50**, 135-147.

Raposo, G., Cordonnier, M. N., Tenza, D., Menichi, B., Durrbach, A., Louvard, D., and Coudrier, E. (1999). Association of myosin I alpha with endosomes and lysosomes in mammalian cells, *Mol. Biol. Cell* **10,** 1477-1494

Rayment, I., Holden, H. M., Whittaker, M., Yohn, C. B., Lorenz, M., Holmes, K. C. and Milligan, R. A. (1993a). Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* **261**, 58-65.

Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Bäse, K., Smith, R., Tomchick, D. R., Benning, M., Winkelmann, D. A., Wesenberg, G. and Holden, H. M. (1993b). Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* **261**, 50-58.

Reinhard, J., Scheel, A. A., Diekmann, D., Hall, A., Ruppert, C. and Bähler, M. (1995). A novel type of myosin implicated in signalling by rho family GTPases. *EMBO J.* **14**, 697-704.

Roopnarine, O. and Leinwand, L. A. (1998). Functional analysis of myosin mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopath. *Biophys. J.* **75**, 3023-3030.

Ritchie M. D., Geeves M. A., Woodward S. K. and Manstein D. J. (1993). Kinetic characterization of a cytoplasmic myosin motor domain expressed in Dictyosteliumdiscoideum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 8619-8623.

Ruppert, C., Godel, J., Muller, R. T., Kroschewski, R., Reinhard, J., and Bahler, M. (1995). Localization of the rat myosin I molecules myr 1 and myr 2 and in vivo targeting of their tail domains. *J. Cell Sci.* **108**, 3775-86.

Sahlas, D. J., Milankow, K., Park, P. C., and De Boni, U. (1993). Distribution of snRNPs, splicing factor SC-35 and actin in interphase nuclei: immunocytochemical evidence for differential distribution during changes in functional states. *J. Cell. Sci.* **105**, 347-357.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, B., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

Sanger, J. M., Mittal, B., Dome, J. S., and Sanger, J. W., (1989). Analysis of cell division using fluorescently labelled actin and myosin in PtK2 cells. *Cell Motil. Cytoskeleton.* **14**: 201-219.

Sasaki, N., Asukagawa, H., Yasuda, R., Hiratsuka, T., and Sutoh, K (1999). Deletion of the myopathy loop of *Dictyostelium* myosin II and its impacts on motor functions. *J. Biol. Chem*. **274**, 37840-37844

Satre, M. and Martin, J. B. (1985). 31P-nuclear magnetic resonance analysis of the intracellular pH in the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **132**, 140-146.

Schwarz, E. C., Neuhaus, E. M., Kistler, C., Henkel, A.W., and Soldati ,T. (2000). *Dictyostelium* myosin IK is involved in the maintenance of cortical tension and affects motility and phagocytosis. *J Cell Sci*. **113**, 621-633

Schwarz, E. C., Geissler, H. and Soldati, T. (1999). A potentially exhaustive screening strategy reveals two novel divergent myosins in *Dictyostelium*. *Cell. Biochem. Biophys*, in press.

Sellers, J.R. (2000). Myosins: a diverse superfamily. *Biochim. Biophys. Acta* **1496**, 3-22.

Sheetz, M. P., Chasan, R., Spudich, J. A. (1984). ATP-dependent movement of myosin *in vitro*: characterization of a quantitative assay. *J. Cell. Biol*. **99**, 1867-1871.

Siemankowski, R. F. and White, H. D. (1984). Kinetics of the interaction between actin, ADP, and cardiac myosin-S1. *J. Biol. Chem*. **259**, 5045-5053.

Siemankowski, R. F., Wiseman, M. O., and White, H. D. (1985). ADP dissociation from actomyosin subfragment 1 is sufficiently slow to limit the unloaded shortening velocity in vertebrate muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **82**, 658-662.

Smith, C. A. und Rayment, I. (1995). X-ray structure of the magnesium(II)-pyrophosphate complex of the truncated head of *Dictyostelium discoideum* myosin at 2.7 Å resolution. *Biochemistry* 34, 8973-8981.

Smith, C. A. and Rayment, I. (1996a). X-ray structure of the magnesium(II) ·ADP·vanadate complex of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain to 1.9 Å resolution. *Biochemistry* **35**, 5404-5417.

Soldati, T., Geissler, H. and Schwarz, E. C. (1999). How many is enough ? Exploring the myosin repertoire in the model eukaryote *Dictyostelium discoideum*. *Cell. Biochem. Biophys*. **30**,389-411.

Steinmetz, M. O., Stoffler, D., Muller, S. A., Jahn, W., Wolpensinger, B., Goldie, K. N., Engel, A., Faulstich, H. and Aebi U. (1998). Evaluating atomic models of F-actin with an undecagold-tagged phalloidin derivative. *J. Mol. Biol.* **276**, 1-6.

Steurer, E. R., Wordemann, L., Schroer, T. A., and Sleetz, M. P. (1990). Localization of cytoplasmic dynein to mitotic spindles and kinetochores. *Nature* **345**, 266-268.

Stöffler, H. E. and Bähler, M. (1998). The ATPase activity of myr3, a rat myosin-I, is allosterically inhibited by its own tail domain and by Ca^{2+}-binding to its light-chain calmodulin. *J. Biol. Chem.* **273**, 14605-14611

Stöffler, H. E., Ruppert, C., Reinhard, J. and Bähler, M. (1995). A novel mammalian myosin I from rat with an SH3 domain localizes to Con A-inducible, F-actin-rich structures at cell-cell contacts. *J. Cell Biol.* **129**, 819-830.

Sutherland, B. W., Spiegelman, G. B., Weeks, G. (2001) A Ras subfamily GTPase shows cell cycle-dependent nuclear localization. *EMBO Rep*. **11**, 1024-1028.

Swanljung-Collins, H.; Collins, J. H. (1992). Phosphorylation of brush border myosin I by protein kinase C is regulated by Ca^{2+}-stimulated binding of myosin I to phosphatidylserine concerted with calmodulin dissociation, *J. Biol. Chem*. **267,** 3445-3454.

Swanson, J. A., Johnston, M.T., Beningo, K., Post, P., Moosecker, M., Araki, N. (1999). A contractile activity that closes phagosomes in macrophages, *J. Cell Sci*. **112**, 307-316

Sweeney, H. L., Rosenfeld, S. S., Brown, F., Faust, L., Smith, J., Xing, J., Stein, L. A., and. Sellers, J. R. (1998). Kinetic tuning of myosin via a flexible loop adjacent to the nucleotide binding pocket. *J Biol. Chem.* **273**, 6262-70.

Takizawa, P. A., Sil, A., Swedlow, J. R., Herskowitz, I., Vale, R. D. (1997). Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature*, **389**, 90-93.

Tal, M., Silberstein, A. and Nusser, E. (1980). Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different enzymes? *J. Biol. Chem.* **260**, 9976-9980.

Tang, N. and Ostap, E. M. (2001). Motor domain dependent localization of myo1b (myr-1). *Current Biology* **11**, 1131-1135

Taylor, E. W. (1991). Kinetic Studies on the association and dissociation of myosin subfragment 1 and actin. *J. Biol. Chem.* **266**, 294-302

Titus, M. A., Wessels, D., Spudich., J. A. and Soll, D. (1993). The unconventional myosin endcoded by myoA gene plays a role in *Dictyostelium* motility. *Mol. Cell. Biol*. **12**, 3540-3547.

Titus, M. A. (1999). A class VII unconventional myosin is required for phagocytosis. *Curr Biol.* **22**, 1297-1303.

Trentham, D. R., Eccleston, J. F. and Bagshaw, C. R. (1976). Kinetic analysis of ATPase mechanisms. *Quart. Rew. Biophys.* **9**, 217-281.

Tribus, K. M., Kremetsova, and E., Freyzon, Y. (1999). Kinetic Characterization of a monomeric unconventinal myosin V construct. *J. Biol. Chem*. **274**, 27448-27456.

Umemoto, S. and Sellers, J. R. (1990). Characterization of in vitro motility assays using smooth muscle and cytoplasmic myosins. *J.Biol. Chem*., **265**, 14864-14869.

Urrutia, R. A., Jung, G., and Hammer, J. A., III. (1993) The *Dictyostelium* myosin I-E heavy chain gene encodes a truncated isoform that lacks sequences corresponding to the actin binding site in the tail. *Biochim. Biophys. Acta* **1173**, 225-229.

Uyeda, T. Q., Abramson, P. D. and Spudich, J. A. (1996). The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4459-4464.

Van Dijk, J., Furch, M., Lafont, C., Manstein, D. J., and Chaussepied, P. (1999). Functional characterization of the secondary actin binding site of myosin II. *Biochemistry* **38**, 15078-85.

Veigel, C., Coluccio, L. M., Jontes, J. D., Sparrow, J. C., Milligan, R. A., and Molloy J. E. (1999). The motor protein myosin-I produces its working stroke in two steps. *Nature.* **398**, 530-533.

Wang, Y.-L., and Taylor, D. L. (1979). Distribution of fluorescently labeled actin in living sea urgin eggs during early developement. *J. Cell Biol*., **82**, 672-679.

Wang, Z.-Y., Wang, F., Sellers, J. R., Korn, E. R., and Hammer, J. A. III. (1998). Analysis of the regulatory phosphorylation site in Acanthamoeba myosin IC by using site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA **95**, 152000-15205.

Weil, D., Blanchard, S., Kaplan, J., Guilford, P., Gibson, F., Walsh, J., Mburu, P., Varela, A., Levilliers, J., Weston, M.D. *et al*. (1995). Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* **374**, 60-61.

Wessels, D., Murray, J., Jung, G., Hammer, J. A., and Soll, D. R. (1991). Myosin IB null mutants of *Dictyostelium* exhibit abnormalities in movement. Cell Motil Cytoskeleton 20, 301-315.

West, J. J., Nagy, B. und Gergely, J. (1967). The effect of EDTA on spectral properties of ATP-, ADP-, and ITP-G-actin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **85**, 698-708.

Wirth, J. A., Jensen, K. A., Post, P. L., Bement, W. M. and Mooseker M. S. (1996). Human myosin-IXb, an unconventional myosin with a chimerin-like rho/rac GTPase-activating protein domain in its tail. *J. Cell Sci*. **109**, 653-661.

Whittaker, M., Wilson-Kubalek, E. M., Smith, J. E., Faust, L., Milligan, R. A. and Sweeney, H. L. (1995). A 35-Å movement of smooth muscle myosin on ADP release. *Nature* **378**, 748-751.

Williams, R. and Coluccio, L. M. (1994). Novel 130-kDa rat liver mosin-1 will translocate actin filaments, *Cell Motil. Cytoskel*. **27** , 41-48.

Williams, R. and Coluccio, L. M. (1995). Phosphorylation of myosin-I from rat liver by protein kinase C reduces calmodulin binding, *Biochem. Biophys Res. Commun.* **216**, 90-102**.**

Wolenski, J. S. , Hayden, S. M., Forscher, P., and Moosecker, M. S. (1993). Calcium-calmodulin and regulation of brush border myosin I Mg-ATPase and mechanochemistry, *J. Cell Biol*. **122,** 613-621.

Woodward, S. K., Eccleston, J. F. and Geeves, M. A. (1991). Kinetics of the interaction of 2'(3')-O-(N-methylanthraniloyl)-ATP with myosin subfragment 1 and actomyosin subfragment 1: characterization of two acto-S1-ADP complexes. *Biochemistry* **30**, 422-430.

Wu C., Lee S. F., Furmaniak-Kazmierczak E., Côté G. P., Thomas D. Y., and Leberer E. (1996). Activation of myosin-I by members of the Ste20p protein kinase family. *J. Biol. Chem*. **271**, 31787-31790.

Wu, C., Lytvyn, V., Thomas, D. Y., and Leberer, E. (1997). The phosphorylation site for Ste20p-like protein kinases is essential for the function of myosin-I in yeast. *J. Biol. Chem.* **272**, 30623-30626.

Wu, X. F., Kocher, B., Wei, Q. and Hammer III, J. A. (1998). Myosin Va associates with microtubule-rich domains in both interphase and dividing cells. *Cell Motil. Cytosk*. **40**, 286-303.

Xu, P., Zot, A. S. and Zot H. G. (1995). Identification of Acan125 as a myosin-I-binding protein present with myosin-I on cellular organelles *of Acanthamoeba.* J Biol Chem. 279, 25316-25319 . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 3685-3690.

Yamashita, R. A., May, G. S. (1998). Constitutive activation of endocytosis by mutatio of myoA, the myosin I gene of Aspergillus nidulans , *J. Biol. Chem*. **273**, 14644-14648.

Yumumura, S., Mori, H., and Fukui, Y. J. (1984). Localization of actin and myosin for the study of amoeboid movement in *Dictyostelium* using improved immunofluorescence. *J. Cell. Biol*. **99**, 894-899.

Yumumura, S. and Fukui, Y. J. (1985). Reversible cyclic AMP-dependent change in distribution of myosin thick filaments in *Dictyostelium. Nature* **314**, 194-196.

Yumura, S. and Uyeda, T. Q. P. (1997). Myosin II can be localized to the cleavage furrow and to the posterior region of *Dictyostelium* amoebae without control by phosphorylation of myosin heavy and light chains. *Cell Motil. Cytoskel.* **36**, 313-322.

7 Publikationen und Präsentationen

7.1 Publikationen

Kollmar, M., Dürrwang, U., Kliche, M., Manstein, D. J., and Kull, F. J. (2002). Crystal structure of the motor domain of a class-I myosin. *EMBO J.* **11**, 2517-25.

Dürrwang, U., Fujita-Becker, S., Erent, M., Zimmermann, S., Geeves, M. A., and Manstein, D. J. Functional Characterization of Members of the Myosin I Family from *Dictyostelium discoideum.* (Manuskript in Vorbereitung).

Erent, M., Fujita-Becker, S., Dürrwang, U., and Manstein, D. J. Localization and Functional Characterization of *Dictyostelium* MyoD. (Manuskript in Vorbereitung).

7.2 Präsentationen

Dürrwang, U., Fujita-Becker, S., Erent, M., Zimmermann, S., Geeves, M. A., and Manstein, D. J. Functional Characterization of Members of the Myosin I Family from *Dictyostelium discoideum.* Alpbach Workshop on Molecular Motors 2001; Alpbach, Österreich,1.-5. April, 2001

Dürrwang, U., Fujita-Becker, S., Erent, M., Zimmermann, S., Geeves, M. A., and Manstein, D. J. Functional Characterization of Members of the Myosin I Family from *Dictyostelium discoideum.* 46th Annual Meeting of the Biophysical Society; San Francisco, California; 23.-27. February, 2002

Dürrwang, U., Fujita-Becker, S., Erent, M., Zimmermann, S., Geeves, M. A., and Manstein, D. J. Functional Characterization of Members of the Myosin I Family from *Dictyostelium discoideum*; Structure and Function of Motor Proteins; Berlin; 10.-13. November, 2002

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A	Aktin
Å	Ångström
A. castellanii	*Acanthamoeba castellanii*
A·M	Aktomysoinkomplex oder Komplex aus Aktin und Myosinfragment
AMPPNP	Adenosin-5´-[β,γ-imodo]-triphosphat
A_{xxx}	Absorption bei einer Wellenlänge von xxx nm
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
C. elegans	*Cenorhabditis elegans*
D. discoideum	*Dictyostelium discoideum*
D. melanogaster	*Drosophila melanogaster*
CM	Kardiomyopathie
Da	Dalton
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EFMF	Ethan-Methanol-Cryofixierung
EGTA	Ethylenbis-(oxyethylennitrilo)-tetraacetat
F-Aktin	filamentöses Aktin
g	Gramm
G	Guanin

G-Aktin	globuläres Aktin
G. gallus	*Gallus gallus*
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazinoethansulfonsäure
k_{cat}	maximale aktinaktivierte ATPase-Aktivität
$\mathbf{k_{-A}}$	Geschwindigkeitskonstante der Aktindissoziation
$\mathbf{k_{+A}}$	Geschwindigkeitskonstante der Aktinbindung
$\mathbf{K_A}$	Gleichgewichtskonstante der Aktin-Affinität
$\mathbf{K_{AD}}$	Gleichgewichtskonstante der ADP-Affinität an den Aktomyosinkomplex
K_D	Gleichgewichtskonstante der ADP-Affinität an Myosin
K_{app}	apparente Michaelis-Menten-Konstante für Aktin
k_{obs}	beobachtete Geschwindigkeitskonstante
LDH	Lactat-Dehydrogenase
M	molar
mA	Milliampere
mant	2‘(3‘)-*O*-(N-methylanthraniloyl)
M·ATP	Komplex aus ATP und Myosin
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NADH	Nicotinamid-Adenindinukleotid (reduzierte Form)
NAD^+	Nicotinamid-Adenindinukleotid (oxidierte Form)
n. m.	nicht meßbar
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEP	Phosphpenolpyruvat
PK	Pyruvat-Kinase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P_i	Orthophosphat
PMSF	Phenylmethylensulfonylfluorid
Pyren	N-(1-pyrenyl)iodoacetamid
Pyren-Aktin	Pyren-markiertes Aktin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S1	Myosin Unterfragment 1
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH3	SRC-Homologie 3
T	Thymin
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TH1-Domäne	Homologie-1 Domäne in der Schwanzregion
TH2-Domäne	Homologie-2 Domäne in der Schwanzregion
TH4-Domäne	Homologie-4 Domäne in der Schwanzregion
TNP	2',3'-*O*-(2,4,6-Trinitrocyclohexadienyl)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Alkylphenylpolyethylenglykol
U	Units
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Wt	Wildtyp
YFP	Gelb-fluoreszierendes Protein
% (v/v)	Prozent (Volumen/Volumen)
% (w/v)	Prozent (Gewicht/Volumen)
% (w/w)	Prozent (Gewicht/Gewicht)

Die Aminosäuren wurden wie folgt abgekürzt:

A	Alanin
R	Arginin
N	Asparagin
D	Asparaginsäure
C	Cystein
Q	Glutamin
E	Glutaminsäure
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
K	Lysin
M	Methionin
F	Phenylalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptopan
Y	Tyrosin
V	Valin

9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1999 bis Dezember 2002 am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg in der Abteilung Biophysik durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Kenneth Holmes danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens meiner Arbeit, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Abteilung Biophysik und für die Möglichkeit an mehreren internationalen Kongressen über molekulare Motoren teilnehmen zu können.

Herrn Prof. Dr. Dr. Konrad Beyreuther danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dietmar Manstein danke ich sehr für die ausgesprochen gelungene Themenstellung und für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit mit vielen Anregungen und sehr hilfreichen Diskussionen. Die vielfältige Biologie der unkonventionellen Myosine habe ich als außergewöhnlich interessant empfunden.

Herrn Prof. Dr. Michael Geeves danke ich für seine Erklärungen zur Myosin-Kinetik und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Jon Kull danke ich für die Einführungen in die Struktur von Myosin und die Möglichkeit einer Zusammenarbeit bei der Aufklärung der Struktur von MyoE.

Mein besonderer Dank gilt:

Dr. Setsuko Fujita-Becker für die angenehme und kollegiale Zusammenarbeit nicht nur bei den Messungen der Bewegungsgeschwindigkeit von Myosinen.

Dr. Muriel Erent für die Durchführung der mikroskopischen Aufnahmen zur Untersuchung der Lokalisierung von Myosinen I in *D. discoideum.*

Dr. Martin Kollmar für die Aufklärung der ersten Kristallstruktur eines unkonventionellen Myosins.

Sabine Zimmermann für die außergewöhnlich engagierte technische Unterstützung bei der Herstellung der Myosin I-Expressionsplasmide.

Monika Reichert für die Unterstützung bei der Isolierung von Aktin und der Herstellung von Pyren-Aktin.

Dr. Georgios Tsiavaliaris, Thomas Reubold, Dr. Heike Nöthe, Dr. Hartmut Niemann, Dr. Boris Klockow und Dr. Werner Kliche für die unermüdliche Hilfsbereitschaft, die Einführung in neue Techniken und die vielen Diskussionen.

Dr. Claudia Kistler für die Unterstützung beim Fertigstellen der Arbeit.

Anke Hennemann für die Hilfe bei organisatorischen Fragen

Allen anderen Kollegen der Abteilung Biophysik für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbst durchgeführt habe und mich dabei keiner anderen als der genannten Quellen und Hilfen bedient habe.

Heidelberg, den 17.12.2002