

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Molekulare Motoren	3
2.2	Proteinfamilie der Myosine	4
2.2.1	Einteilung in Klassen	4
2.2.2	Domänenstruktur von Myosinen	5
2.3	Myosin II	5
2.3.1	Mechanismus der Muskelkontraktion	6
2.3.2	Atomare Struktur von Myosin II	7
2.3.3	Konformationen von Myosin II	9
2.3.4	Myosin-Kinetik	11
2.3.4.1	Wechselwirkung von Nukleotiden mit Myosin	11
2.3.4.2	Wechselwirkung von Nukleotiden mit dem Aktomyosinkomplex	12
2.3.4.3	Wechselwirkung zwischen Aktin und Myosin	13
2.3.4.4	Steady State-ATPase	14
2.4	Myosin I	16
2.4.1	Struktur der Myosin I-Motordomäne	16
2.4.2	Funktionen von Myosin I	18
2.4.3	Regulation von Myosin I	18
2.5	Übersicht über andere Myosinklassen	19
2.6	Der Modellorganismus <i>Dictyostelium discoideum</i>	22
2.7	Myosine in <i>Dictyostelium discoideum</i>	24
2.7.1	MyoA-E, MyoK (Klasse I)	25
2.7.2	Myosin II	25
2.7.3	MyoJ (Klasse V/XI)	25
2.7.4	MyoI (Klasse VII)	25
2.7.5	MyoM	25
2.8	Zielsetzung	27

3	Material und Methoden	28
3.1	Material	28
3.1.1	Chemikalien	28
3.1.2	Geräte	28
3.1.3	Allgemeine Arbeitsmittel	29
3.1.4	Kits	29
3.1.5	Oligodesoxyribonukleotide	30
3.1.6	Molekulargewichtsmarker	31
3.1.7	Enzyme und andere Proteine	31
3.1.8	Antikörper	31
3.1.9	Plasmide	31
3.1.10	Zellstämme	32
3.1.11	Allgemeine Lösungen	32
3.1.12	Medien für die Kultivierung von <i>E. coli</i>	33
3.1.13	Medien und Lösungen für die Kultivierung von <i>D. discoideum</i>	33
3.2	Zellbiologische Methoden	34
3.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	34
3.2.2	Transformation von <i>E. coli</i>	34
3.2.2.1	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Zellen	34
3.2.2.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	35
3.2.3	Kultivierung von <i>D. discoideum</i>	35
3.2.4	Synchronisieren des Zellzyklus von <i>D. discoideum</i>	35
3.2.5	Konservierung von <i>D. discoideum</i>	36
3.2.5.1	Konservierung von <i>D. discoideum</i> Zellen	36
3.2.5.2	Konservierung von <i>D. discoideum</i> Sporen	36
3.2.6	Transformation von <i>D. discoideum</i>	36
3.3	Molekularbiologische Methoden	37
3.3.1	Präparation von Nukleinsäuren	37
3.3.1.1	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>D. discoideum</i>	37
3.3.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	37
3.3.1.2.1	Extraktion von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab	37
3.3.1.2.2	Extraktion von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab	38
3.3.2	Messung des Nukleinsäuregehalts von DNA-Lösungen	39
3.3.3	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	39
3.3.3.1	Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen	39
3.3.3.2	5'-Dephosphorylierung von DNA	39
3.3.3.3	Ligation von DNA-Fragmenten	40
3.3.4	Die Polymerase-Kettenreaktion	40
3.3.5	Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren	41
3.3.5.1	DNA-Agarosegele	41
3.3.5.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	41

3.4	Herstellung von Expressionsplasmiden für Myosin I-Proteinkonstrukte in <i>D. discoideum</i>	42
3.4.1	Plasmide für Myosin I-Kopffragmente	42
3.4.2	Plasmide für Fusionsproteine einer Myosin I-Motordomäne mit zwei α -Aktinin-Untereinheiten	43
3.4.3	Plasmide für Fusionsproteine eines Myosins I mit YFP	43
3.4.4	Plasmide für Myosine I	43
3.4.5	Plasmide für Myosin I-Kopffragmente mit Mutationen an der TEDS-Stelle	44
3.4.6	Plasmide für Fusionsproteine einer Myosin I-Motordomäne mit zwei α -Aktinin-Untereinheiten und Mutationen an der TEDS-Stelle	44
3.4.7	Plasmide für Myosine I mit einer Mutation an der TEDS-Stelle	45
3.5	Proteinchemische Methoden	45
3.5.1	Methoden zur Proteinaufreinigung	45
3.5.1.1	Präparation von Aktin aus dem Skelettmuskel von Kaninchen	45
3.5.1.2	Aufreinigung von Myosinkopffragmenten aus <i>D. discoideum</i> im analytischen Maßstab	47
3.5.1.3	Präparative Isolierung von Myosinkopffragmenten aus <i>D. discoideum</i>	47
3.5.2	Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese	50
3.5.3	Western-Blot	52
3.5.4	Messung der Proteinkonzentration	53
3.5.4.1	Bestimmung der Myosinkonzentration nach Bradford	53
3.5.4.2	Bestimmung der Myosinkonzentration durch Titration gegen ATP	53
3.5.4.3	Photometrische Bestimmung der Aktin- und Pyren-Aktinkonzentration	53
3.5.5	Konzentrierung von Proteinlösungen	54
3.5.6	Farbstoffmarkierung	54
3.5.6.1	mant-markiertes ATP und ADP	54
3.5.6.2	TNP-markiertes ATP	55
3.5.6.3	Pyren-markiertes Aktin	55
3.5.7	Phosphorylierung von Myosin I mit MIHCK	55
3.5.8	Dephosphorylierung von Myosin I mit γ -Phosphatase	56
3.6	Biophysikalische Methoden	56
3.6.1	Stopped-Flow-Messungen	56
3.6.2	Steady State-ATPase-Messung	58
3.6.3	<i>In vitro</i> Messung der Bewegung von Aktinfilamenten	59

3.7	Mikroskopische Methoden	61
3.7.1	Fixierung von <i>D. discoideum</i> Zellen	61
3.7.2	Immunfluoreszenzfärbung von fixierten Zellen	61
3.7.3	Mikroskopie und Bildbearbeitung	61
4	Ergebnisse	62
4.1	Übersicht über die verwendeten Proteinkonstrukte	62
4.2	Expression und Isolierung der rekombinanten Proteine	66
4.3	Zelluläre Lokalisierung	66
4.3.1	Lokalisierung von MyoD in dynamischen Regionen des Aktincytoskeletts und an Membranen	66
4.3.2	Lokalisierung von MyoD im Zellkern während der Mitose	69
4.3.3	Lokalisierung von MyoE in dynamischen Regionen des Aktincytoskeletts und an Vesikeln	71
4.4	<i>In vitro</i> Bewegung von Aktinfilamenten	74
4.4.1	Aktivierung der Bewegung durch eine TEDS-Phosphorylierung	74
4.4.2	Inhibierung der Bewegung von MyoD durch divalente Kationen	78
4.5	Kinetische Charakterisierung	80
4.5.1	Steady State-ATPase	80
4.5.2	Transientenkinetische Charakterisierung	84
4.5.2.1	ATP-Bindung an Myosin I-Kopffragmente	85
4.5.2.2	ADP-Bindung an Myosin I-Kopffragmente	86
4.5.2.3	ADP-Dissoziation aus dem Komplex mit Myosin I-Kopffragmenten	87
4.5.2.4	Inhibierung der ADP-Dissoziation aus dem Komplex mit MyoD durch freie Magnesiumionen	90
4.5.2.5	Bindung von farbstoffmarkierten Nukleotiden an Myosin I-Kopffragmente	90
4.5.2.6	ATP-induzierte Dissoziation des Aktomyosinkomplexes	93
4.5.2.7	ADP-Inhibierung der ATP-induzierten Dissoziation des Aktomyosinkomplexes	94
4.5.2.8	Aktinbindung an Myosin I-Kopffragmente	98
4.5.2.9	Dissoziation des Aktomyosinkomplexes in der Abwesenheit von ATP	98
4.5.2.10	Aktinaffinität der Myosin I-Kopffragmente	99

5	Diskussion	101
5.1	Lokalisierung und Funktion von MyoD und MyoE in dynamischen Regionen des Aktincytoskeletts und an Membranen	102
5.2	Lokalisierung und Funktion von MyoD bei der Zellteilung	104
5.3	Motorfunktion	105
5.3.1	Aktivierung durch TEDS-Phosphorylierung	105
5.3.2	Inhibierung der Motorfunktion von MyoD durch divalente Kationen	108
5.4	Charakterisierung des Myosin I-ATPase-Zyklus	110
5.4.1	Abhängigkeit der Aktinaktivierung der ATPase-Aktivität von der TEDS-Phosphorylierung	110
5.4.2	Erhöhung der Aktinaffinität durch TEDS-Phosphorylierung	112
5.4.3	Übersicht über den Myosin I-ATPase-Zyklus	113
5.4.3.1	Wechselwirkung von Nukleotiden mit Myosin I	113
5.4.3.2	Wechselwirkung von Nukleotiden mit dem Aktomyosin I-Komplex	114
5.5	Resümee und Ausblick	115
6	Literaturverzeichnis	118
7	Publikationen und Präsentationen	132
8	Abkürzungsverzeichnis	133
Danksagung		