

# **Mechanische Charakterisierung einzelner Motorprotein-Moleküle mit Hilfe des Photonischen Kraftmikroskops**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.  
genehmigte Dissertation  
von

Dipl.-Biochem. Tim Scholz  
geboren am 28.09.1971 in Hameln  
Hannover 2002

Referent: Prof. Dr. W. Müller

Korreferent: Prof. Dr. B. Brenner

Tag der Promotion: 14. November 2002

*Christina und  
meiner Familie.*

## Zusammenfassung

Möchte man mechanische Eigenschaften wie die Elastizität und das geometrische Verhalten einzelner, an ihren Bindungspartner gebundener Motormoleküle bestimmen, kann man sich ihrer thermischen Fluktuationen bedienen. Die thermischen Fluktuationen von einzelnen Molekülen oder Molekülkomplexen werden von ihrer Gestalt und mechanischen Eigenschaften beeinflusst. Dieses Prinzip wird mit dem Photonischen Kraftmikroskop (PFM) ausgenutzt. Frisch aus Muskelfasern extrahierte Myosinmoleküle oder konventionelles Kinesin wurden in sehr geringer Dichte auf der Oberfläche von sehr kleinen Latexkugeln adsorbiert. Diese Mikrosphären wurden in einem fokussierten Laserstrahl gefangen und ihre Positionen in allen drei Raumrichtungen mit dem PFM registriert. Band ein auf einer Mikrosphäre adsorbiertes Motormolekül an seinen auf dem Boden der Versuchskammer immobilisierten Bindungspartner an, so ließen sich aus den Verteilungen der Kugelpositionen die mechanischen Eigenschaften von Myosin- bzw. Kinesinmolekülen bestimmen.

Die Elastizität und das geometrische Verhalten von einzelnen, an Aktin gebundenen Myosinmolekülen wurden in Abwesenheit von ATP ermittelt. Die Molekülsteifheit entlang der Molekülachse unterschied sich bei Kompression und Extension. Die durchschnittliche axiale Elastizität bei Extension wurde mit 0,03 bis 0,04 pN/nm bestimmt. Dies war 10fach höher als bei Kompression, bei der durchschnittlich Werte von etwa 0,004 pN/nm erhalten wurden. Die mit dem PFM gemessene Elastizität einzelner Myosinmoleküle war viel geringer als für die Elastizität des Myosinkopfes von Messungen an isolierten Muskelfasern ( $\sim 2$  pN/nm) und anderen Einzelmolekülexperimenten an Myosin Subfragment 1 oder schwerem Meromyosin erwartet wurde. Jedoch glich sie der Elastizität, die in Einzelmolekülstudien mit vollständigem Myosin auftraten. Dies deutet darauf hin, dass der Ursprung der beobachteten Flexibilität außerhalb des Myosinkopfes lag, wahrscheinlich am Übergang von Subfragment 2 zum leichten Meromyosin. Dies wurde von geometrischen Analysen der Anbindung von Myosin an Aktinfilamente unterstützt. Innerhalb des Myosinmoleküls wurde Drehen um einen  $\sim 90$  nm von der Aktinbindungsstelle entfernten Punkt beobachtet. Diese Region, Myosins Gelenk, wurde schon in früheren, elektronenmikroskopischen Untersuchungen als eine Biegestelle im Myosinmolekül beschrieben.

Die Elastizität einzelner, an Mikrotubuli gebundener Kinesinmoleküle änderte sich mit ihren biochemischen Zuständen. In Abwesenheit von ATP wurde die axiale Steifheit mit 0,04 pN/nm und mit 0,065 pN/nm bei vermutlich ein- bzw. zweiköpfigem Anbinden an Mikrotubuli gemessen. In Gegenwart von ATP oder der ATP-Analoga ATP $\gamma$ S und AMP-PNP stieg die beobachtete Molekülelastizität um mindestens 100 % auf Werte von 0,125 pN/nm, 0,15 pN/nm beziehungsweise 0,134 pN/nm an. Kinesin bog sich um einen Drehpunkt, der  $\sim 10$  nm von der Mikrotubulibindungsstelle entfernt lag. Etwa in diesem Bereich liegen Kinesins *neck linker* ( $\sim 10$  nm) und das Gelenk zwischen dem Nackenteil und dem Stiel ( $\sim 15$  nm). Die Flexibilität des *neck linkers* wurde schon früher als unterschiedlich in Ab- oder Anwesenheit von ATP beschrieben, so dass die hier beobachtete Elastizität von Kinesinmolekülen wohl dieser Region zuzuordnen ist.

## Abstract

To measure the mechanical properties like elasticity of single motor molecules freshly extracted full-length muscle myosin or conventional kinesin was adsorbed on the surface of microspheres at very low density. These microspheres were trapped in a focussed laser beam and their positions were recorded in all three dimensions with high time resolution using the Photonic Force Microscope.

After a single myosin molecule adsorbed on a microsphere bound in the absence of ATP to an actin filament which was immobilized on a glass surface, the stiffness of the tethering myosin molecule was calculated using the three-dimensional position distribution. The axial stiffness of a single tethering myosin molecule was found to be asymmetric in respect of compression or extension. An average axial stiffness away from the actin filament was found to be 0.03 to 0.04 pN/nm, which is 10 times stiffer than towards the actin filament, which was found to be only 0.004 pN/nm on average. This elasticity of full-length myosin molecules we found is much less than the elasticity of the myosin head derived from muscle fiber studies (~ 2 pN/nm) and other single molecule studies using myosin subfragment 1 or heavy meromyosin, but it is identical to other studies using full-length myosin molecules. We therefore consider the source of this high flexibility to be located outside the myosin head, most likely at the junction between myosin subfragment 2 and the light meromyosin. This idea could be supported by geometrical analysis. With full-length myosin molecules bending occurred at a pivot ~ 90 nm away from the actin binding side. From electron microscopy studies this region, called themyosin hinge, was previously described as one of the major bending points of the myosin molecule.

The elasticity of single kinsesin molecules tethered to microtubules was found to be dependent on the nucleotide state of kinesin. Without ATP an axial stiffness of 0.04 pN/nm or 0.065 pN/nm was observed, presumably related to one-headed and two-headed binding to the microtubules. In presence of ATP or the ATP analogues ATP $\gamma$ S and AMP-PNP stiffness increased by at least 100 % to values of 0.125 pN/nm, 0.15 pN/nm and 0.134 pN/nm, respectively. In addition, bending of kinesin molecules around a pivot point located ~ 10 nm away from the microtubule binding side has to be announced. The neck linker of kinesin is located ~ 10 nm away from the microtubule binding side while the neck-stalk hinge is located at a distance of 15 nm away from the microtubule binding side. Furthermore, the flexibility of the neck linker was previously found to be different with and without ATP. We therefore assume that the neck linker is the origin of the observed molecular elasticity.

## **Schlagwörter**

Myosin, Kinesin, Einzelmolekülmechanik

## **Keywords**

Molecular motors, Photonic Force Microscopy, Thermal noise analysis

## Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung	3
2.1	Motormoleküle	3
2.2	Das Aktomyosin-System	3
2.2.1	Myosin	3
2.2.2	Aktin	8
2.3	Das Kinesin-Mikrotubuli-System	9
2.3.1	Kinesin	9
2.3.2	Tubulin	13
2.4	Das Photonische Kraftmikroskop (PFM)	13
2.4.1	Grundlagen	13
2.4.2	Aufbau des Photonischen Kraftmikroskops	14
2.4.2.1	Optische Fallen	14
2.4.2.2	Detektion der Sondenposition in drei Dimensionen	15
2.4.2.3	Die <i>Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy</i>	16
2.5	Fragestellungen	16
3	Material und Methoden	23
3.1	Chemikalien	23
3.2	Myosinexperimente	23
3.2.1	Versuchstiere	23
3.2.2	Präparation von Myosin	23
3.2.2.1	Präparation von Muskelfaserbündeln	23
3.2.2.2	Präparation von Myosin aus einzelnen Muskelfasern	24
3.2.3	Präparation von Aktinfilamenten	24
3.2.3.1	Präparation von G-Aktin	24
3.2.3.2	Biotinylierung von G-Aktin	25
3.2.3.3	Darstellung von Aktinfilamenten	26
3.2.4	Der Myosin- <i>in vitro</i> Motilitätsassay	26
3.2.5	PFM - Versuche mit Myosin	27
3.3	Kinesinexperimente	29
3.3.1	Kinesin	29
3.3.2	Darstellung von polaritätsmarkierten, biotinylierten Mikrotubuli	30

3.3.3	Der Kinesin- <i>in vitro</i> Motilitätsassay	30
3.3.4	PFM - Versuche mit Kinesin	31
3.4	Datenaufnahme und -analyse	32
4	Ergebnisse	34
4.1	Experimente mit Myosinmolekülen	34
4.1.1	Elastizität einzelner, in Abwesenheit von ATP an Aktinfilamente gebundener Myosinmoleküle	34
4.1.2	Kontrollexperimente	44
4.1.3	Bestimmung der Verbindungslänge zwischen Myosin tragenden Mikrosphären und dem Boden der Probenkammer	46
4.1.4	Elastizität von Myosinmolekülen in Anwesenheit von ATP	49
4.2	Experimente mit einzelnen Kinesinmolekülen	51
4.2.1	Elastizität einzelner, in Abwesenheit von ATP an Mikrotubuli gebundener Kinesinmoleküle	53
4.2.2	Bestimmung der Verbindungslänge zwischen Kinesin tragenden Mikrosphären und dem Boden der Probenkammer	57
4.2.3	Elastizität einzelner Kinesinmoleküle in Anwesenheit von ATP	59
4.2.3	Elastizität einzelner Kinesinmoleküle in Gegenwart des ATP-Analogons ATP $\gamma$ S	62
4.2.4	Elastizität einzelner Kinesinmoleküle in Anwesenheit des ATP-Analogons AMP-PNP	64
5	Diskussion	67
5.1	Experimente mit Myosinmolekülen	67
5.2	Experimente mit einzelnen Kinesinmolekülen	79
5.3	Fazit und Ausblicke	92
6	Literaturverzeichnis	94
	Eigene Veröffentlichungen	105
	Eidesstattliche Erklärung	106
	Danksagung	107
	Wissenschaftlicher Werdegang	109

# 1 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-hydrochlorid
AMP-PNP	$\beta\gamma$ -Amidoadenosin-5'-phosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATP $\gamma$ S	$\beta\gamma$ -Sulfo-Adenosin-5'-triphosphat
Biotin-PEAC5-maleimide	6-{N'-[2-(N-Maleimido)ethyl]-N-piperazinylamido}hexyl-D-biotinamid-hydrochlorid
BSA	Rinderserumalbumin
CrP	Kreatinphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E64	N-[N-(L-3-Trans-carboxiran-2-carbonyl)-L-leucyl]-agmatin
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigacetat
EGTA	Bis-(aminoethyl)-glycolether-N,N,N',N'-tetraacetat
F-Aktin	filamentöses Aktin
FRET	Fluoreszenzresonanzenergietransfer Mikroskopie
g	Erdbeschleunigung
G-Aktin	globuläres Aktin
GSH	Glutathion
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulphonsäure
HMM	schweres Meromyosin
k	Boltzmann-Konstante ( $1,381 \cdot 10^{-23}$ J/K)
kD	Kilodalton
kHz	Kilohertz
LC	leichte Myosinkette
LMM	leichtes Meromyosin
MLC	leichte Myosinkette
MWCO	Molekulargewichtausschlussgrenze
MyHC	schwere Myosinkette
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PFM	Photonische(s) Kraftmikroskop/Kraftmikroskopie

P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid
Rh-Ph	Rhodamin-Phalloidin
rpm	Umdrehungen ( <i>rotations</i> ) pro Minute
RT	Raumtemperatur
S-1	Subfragment 1 des Myosins
S-2	Subfragment 2 des Myosins
T	Temperatur
TIRFM	<i>Total Internal Reflection Fluorescence Mikroskopy</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-B-isothiocyanat

## 2 Einleitung

### 2.1 Motormoleküle

Der intrazelluläre Transport, die Trennung der replizierten Chromosomen während der Zellteilung, das Schlagen von Flagellen und Zilien und die Muskelkontraktion vielzelliger Lebewesen sind Beispiele für Bewegungen von und in lebenden Organismen. Sie basieren auf der zyklischen Interaktion von Motorproteinen wie Myosin, Kinesin und Dynein mit Strukturproteinen des Zytoskeletts wie Aktin und Tubulin. Myosin, Kinesin und Dynein sind dabei mit verschiedenen Zugarten vergleichbar, die auf unterschiedlichen Arten von Schienen, Myosin auf Aktin-filamenten und Kinesin und Dynein auf Mikrotubuli, fahren. Die Motorproteine besitzen Enzymcharakter, da sie zur Bereitstellung der für die Bewegung benötigten Energie ATP hydrolysieren. Sie wandeln dessen chemische Energie gekoppelt mit eigenen Strukturänderungen in mechanische Arbeit und Wärme um. Mit Hilfe verschiedenster Techniken wurde und wird versucht aufzuklären, wie diese Strukturänderungen der Motorproteine während ihrer Arbeit aussehen und was ihre mechanischen Eigenschaften sind.

Verschiedene Familien von Motoren und Filamentsystemen des Zytoskeletts werden im folgenden kurz vorgestellt und deren Gestalt und Arbeitzyklen kurz beschrieben.

### 2.2 Das Aktomyosin-System

#### 2.2.1 Myosin

Die Familie der Myosine, der aktin-abhängigen Motormoleküle, umfasst inzwischen mindestens 18 verschiedene Klassen (Hodge und Cope, 2000; Mermall *et al.*, 1998; Mooseker und Cheney, 1995; Sellers, 2000; Wu *et al.*, 2000) und durch Methoden wie der DNA-Sequenzierung werden ständig neue Vertreter entdeckt. Die unterschiedlichen Myosinklassen, die teilweise bisher nur in bestimmten Tieren oder Pflanzen gefunden wurden, können sich dabei erheblich in Arbeitsweise und Aufbau wie z.B. der Schwanzregion oder der Anzahl der leichten Ketten unterscheiden (Mermall *et al.*, 1998; Sellers, 2000; Wu *et al.*, 2000). Allen Myosinen gemeinsam sind die Fähigkeit zur Aktinbindung und die ATPase-Aktivität, die von F-Aktin stimuliert werden kann.

Myosin II, das sogenannte konventionelle Myosin, war 1864 das erste Motormolekül, das entdeckt wurde. Es ist der Hauptbestandteil der dicken Filamente der quergestreiften Muskulatur. Beim Myosin II handelt es sich um ein hexameres Protein, das aus zwei schweren Ketten (MyHC, *myosin heavy chain*) und zwei Paaren unterschiedlicher leichter Ketten (MLC, *myosin light chain*), jeweils einer essentiellen und einer regulatorischen, LC1 und LC2, besteht. Die MyHC lassen sich in einen N-terminalen, länglichrunden Kopf und einen C-terminalen langen, fadenförmigen,  $\alpha$ -helikalen Schwanz unterteilen. Zwei dieser MyHC lagern sich mit dem Schwanz zu einer linksgedrehten Schraube, *coiled coil* genannt, zusammen und bilden eine stäbchenförmige Struktur mit zwei kugeligen Köpfchen (Abbildung 2.1). Diese Motordomäne genannten globulären Köpfe besitzen die für die Interaktion mit den Aktinfilamenten wichtigen Bindungsstellen, eine ATP-Bindungsstelle und die ATPase-Funktion. Dort wird ATP zu ADP und  $P_i$  gespalten und so die Energie für die Muskelarbeit geliefert. Im Nackenbereich der Köpfe befinden sich außerdem noch zwei Bindungsstellen, an denen die regulatorische und die essentielle leichte Kette gebunden sind. Das gesamte Molekül ist etwa 170 bis 180 nm lang (Elliott und Offer, 1978; Walker *et al.*, 1985). Auf das enzymatische Spaltprodukt S-1 (Lowey *et al.*, 1969), bestehend aus Kopf inklusive leichter Ketten, entfallen davon etwa 19 nm (Walker *et al.*, 1985). Durch das Aufklären der Kristallstruktur des Kopfteils des Myosinmoleküls inklusive der beiden leichten Ketten erhielt man noch detailliertere Aufschlüsse über die Struktur des Myosinmoleküls (Rayment *et al.*, 1993b). In Abbildung 2.1 ist ein Myosin II Molekül schematisch dargestellt. Ebenfalls angedeutet sind die Produkte, die durch enzymatische Spaltungen dargestellt werden können.

Für das Verständnis des Funktionsmechanismus des Myosins ist die Kopplung der ATP-Hydrolyse mit der mechanischen Arbeit entscheidend. Nach der Gleitfilamenttheorie (Huxley und Niedergerke, 1954; Huxley und Hanson, 1954) verkürzen sich die dicken Myosin- und dünnen Aktinfilamente bei der Muskelkontraktion nicht. Nach diesem Modell gleiten die Filamente bei der Kontraktion aneinander entlang. Dies soll durch zyklisches Anheften und Ablösen der als Querbrücken fungierenden Myosinköpfe an den Aktinfilamenten (Querbrückentheorie) unter ATP-Hydrolyse angetrieben werden (Huxley, 1957; Huxley und Niedergerke, 1954). Aufgrund von Röntgenbeugungsexperimenten an Muskelfasern (Reedy *et al.*, 1965) war eine an die ATP-Spaltung gekoppelte Konformationsänderung des Myosins postuliert worden (Huxley, 1969), ohne dass die Details genauer bekannt waren.

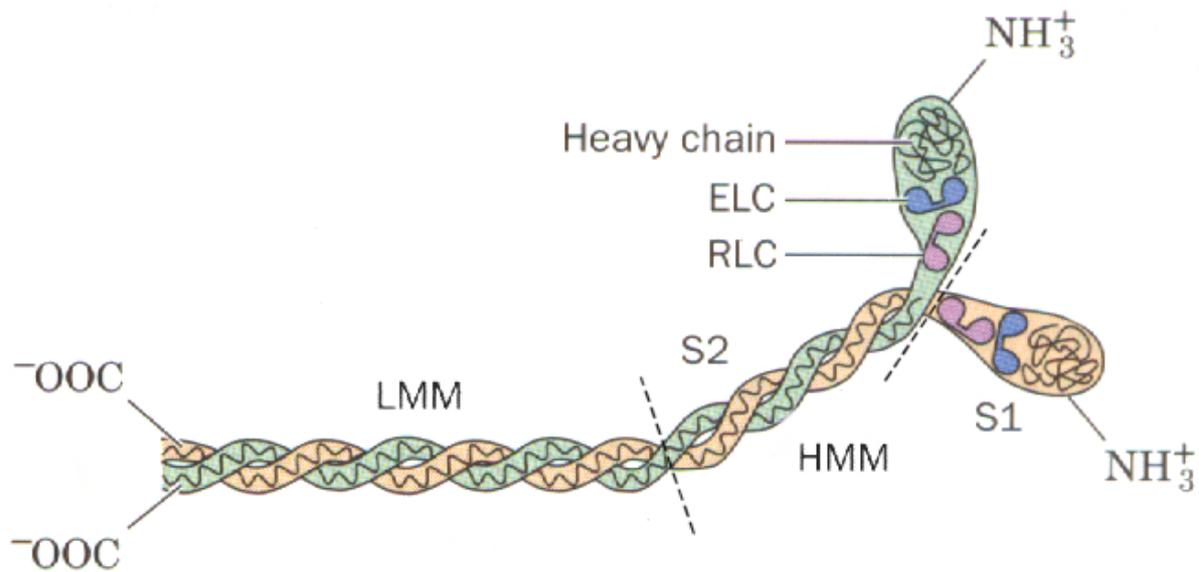


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines Myosin II Moleküls mit regulatorischer leichter Kette (RLC) und essentieller leichter Kette (ELC). Die enzymatischen Spaltprodukte S-1, S-2, HMM (schweres Meromyosin) und LMM (leichtes Meromyosin) und die Spaltstellen wurden eingezeichnet (verändert, aus Voet und Voet, 1995).

Aufbauend auf dem 1957 von A.F. Huxley vorgeschlagenen Modell haben sich seitdem zahlreiche Arbeiten mit der Erstellung von biochemischen Schemata der zyklischen ATP-Hydrolyse durch den Aktomyosin-Komplex beschäftigt. Durch kinetische Untersuchungen von Myosinköpfen in Lösung ergaben sich Schemata, die in mehreren Schritten das zyklische Anheften, Bewegen und Abdissoziieren eines Myosinkopfes an und von einem Aktinfilament, die dabei stattfindende Hydrolyse eines ATP-Moleküls und die Freigabe der Hydrolyseprodukte ADP und  $\text{P}_i$  verbanden (Lymn und Taylor, 1971). Dieses grundlegende Modell wurde seither um viele Aspekte wie zum Beispiel weitere Zwischenzustände (Eisenberg und Hill, 1985; Eisenberg *et al.*, 1980; Geeves, 1991; Geeves *et al.*, 1984; Stein *et al.*, 1979), Gleichgewichtskonstanten der Teilreaktionen und der Regulation der Aktinfilamente durch Calcium-Ionen erweitert. Ein reduziertes Schema, welches die Regulation der Aktinfilamente nicht berücksichtigt, ist in Abbildung 2.2 dargestellt. Der Arbeitszyklus eines Myosinmoleküls soll im folgenden vom Anbinden an ein Aktinfilament bis hin zum ATP-abhängigen Ablösen des Myosins in einem für diese Arbeit relevanten Rahmen beschrieben werden.

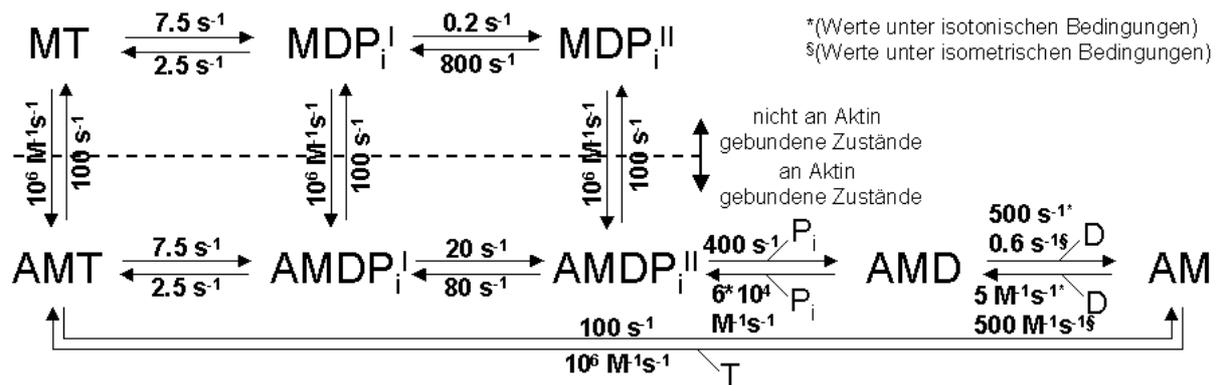


Abbildung 2.2: Reduziertes kinetisches Schema der Aktomyosin-ATPase (teilweise entnommen und erweitert nach Brenner und Chalovich, 1999) mit M = Myosin, A = F-Aktin, T = ATP und D = ADP. Die Ratenkonstanten sind jeweils für Hin- und Rückreaktionen an den entsprechenden Pfeilen angegeben. Die Ratenkonstante der ADP-Abgabe im Schritt AMD zu AM ist für isotonische und isometrische Bedingungen gesondert angegeben.

Ein Myosinmolekül hat in seiner Nukleotidbindungstasche ein Molekül ATP gebunden. Seine Affinität zu Aktin ist niedrig; es liegt in diesem ATP-Zustand zunächst überwiegend ungebunden vor („MT“ in Abbildung 2.2). Das ATP wird von der ATPase des Myosins zu ADP und Phosphat hydrolysiert. Die Wahrscheinlichkeit einer schwachen Bindung an Aktin ist für die Zustände vor oder nach der ATP-Hydrolyse praktisch gleich. Wenn Myosin an Aktin gebunden ist, kann nach Isomerisierung zu einem kurzlebigen, weiteren Zwischenzustand („ $AMDP_i^{II}$ “), in dem ADP und Phosphat in der Nukleotidbindungstasche enthalten sind, die schnelle Phosphatabgabe erfolgen. Dadurch geht das Myosinmolekül in eine stärkere Aktinbindung über, da seine Aktinaffinität nun hoch ist. Die Geschwindigkeit der anschließenden ADP-Abgabe ist stark anhängig von der Spannung, unter der die am Aktin gebundenen Myosinköpfe stehen. Unter isotonischen Bedingungen, also bei abnehmender Spannung der Querbrücke, geht die Abgabe des ADP schnell vonstatten. Unter isometrischen Bedingungen, also bei eingeschränkter Beweglichkeit der Querbrücke, bleibt die Spannung erhalten und die ADP-Abgabe läuft etwa um Faktor 1000 langsamer ab. Im nukleotidfreien Zustand ist der Myosinkopf fest an das Aktinfilament gebunden, seine Affinität zu Aktin ist am höchsten. Durch Aufnahme eines Moleküls ATP geht der Myosinkopf wieder in einen Zustand niedrigerer Aktinaffinität über. Ablösen des Myosins vom Aktinfilament wird möglich. Das Myosinmolekül ist wieder frei und kann erneut durch Anbinden an ein Aktinfilament seinen ATPase-Zyklus durchlaufen.

In Gegenwart oder Abwesenheit von ATP unterscheiden sich die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte im ATPase-Zyklus des Myosins. Myosin alleine kann nach der Hydrolyse des ATP das entstandene Phosphat nur sehr langsam abgeben. Unter isotonischen Bedingungen ist der Hydrolyseschritt des ATP geschwindigkeitsbestimmend. Er stellt den langsamsten Schritt, sowohl aktungebunden als auch frei in Lösung, dar und alle anschließenden Schritte, insbesondere die ADP-Abgabe, laufen schneller ab. Durchläuft das Myosin jedoch unter isometrischen Bedingungen seinen Arbeitszyklus, so ändert sich dies. Durch die Spannung, unter der die Querbrücke steht, verlangsamt sich die ADP-Abgabe, die nun geschwindigkeitslimitierend wird. Bei Mangel an ATP wird die Bindung eines neuen ATP-Moleküls geschwindigkeitsbestimmend und das Myosinmolekül verbringt den größten Teil seiner Zeit nukleotidfrei und fest an ein Aktinfilament gebunden im sogenannten Rigor-Zustand.

Wie schon bei der Beschreibung des ATPase-Zyklus des Myosins erwähnt, kann die Motordomäne des Myosins unterschiedlich stark an das Aktinfilament binden. Zu den schwach gebundenen Zuständen der Querbrücken niedriger Aktinaffinität gehören die, in denen der Myosinkopf ATP oder die ATP-Hydrolyseprodukte ADP und Phosphat gebunden hat. Enthält das Myosinmolekül der Querbrücke jedoch ein ADP-Molekül oder ist nukleotidfrei an Aktin angebunden, so liegen stark gebundene Zustände hoher Aktinaffinität vor (Greene und Eisenberg, 1980). Aus diesen Zuständen schwacher und fester Bindungen des Myosinkopfes an Aktin wurde in Verbindung mit der Klärung der Kristallstruktur des Myosinkopfes ein Modell entwickelt, welches die einzelnen Bindungsarten näher zu charakterisieren versucht (Rayment *et al.*, 1993a). Während der schwachen Bindungszustände des Myosinkopfes an einem Aktin-filament treten zunächst elektrostatische Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Aminosäuren eines Teils des Myosinkopfes mit negativ geladenen Aminosäuren des Aktins auf. Bei einem Übergang in eine feste Bindung werden zwischen diesem Teil des Myosins und Aktin hydrophobe Wechselwirkungen ausgebildet, wodurch das Myosinmolekül stereospezifisch bindet und ihm vom Aktinfilament die Laufrichtung vorgegeben wird. Durch Ausbildung weiterer Wechselwirkungen zwischen dem Myosinkopf und Aktin wird diese Bindung noch verfestigt. Durch Konformationsänderungen innerhalb des Myosinkopfes kommt es dabei zur Kraftgenerierung und zu Bewegung relativ zum Aktinfilament.

### 2.2.2 Aktin

Neben den Mikrotubuli und den Intermediärfilamenten stellen die Aktin- oder Mikrofilamente eine der Hauptgruppen der Zytoskelettfilamente dar. Bei den Aktinfilamenten, auch F- (filamentöses) Aktin genannt, handelt es sich um kabelartige Filamente mit einem Durchmesser von etwa 6 nm. Sie werden durch Polymerisation aus globulären Monomeren (G-Aktin) gebildet. Diese Aktin-Monomere besitzen eine tiefe Mulde, in der ATP oder ADP und ein  $Mg^{2+}$ -Ion gebunden sind. Diese Nukleotide spielen bei der Kontrolle von Polymerisation und Depolymerisation eine Rolle (Kabsch *et al.*, 1990). Jedes Aktinmonomer katalysiert die Hydrolyse eines Moleküls ATP während eines Polymerisations- und Depolymerisationszyklus. Allen Isoformen des Aktin gemein sind funktionelle Eigenschaften wie die Fähigkeit zur Selbstassoziation zu Filamenten und die Stimulation der ATPase-Aktivität des Myosins.

Die bei weitem am besten untersuchte Isoform ist die der Skelettmuskulatur von Vertebraten. Die nativen Aktinfilamente der Skelettmuskulatur bestehen hauptsächlich aus Aktin und den Regulatorproteinen Tropomyosin und Troponin C, I und T. Bei dem unter physiologischen Bedingungen in Muskeln vorkommenden F-Aktin handelt es sich um helikale, rechtsgängige Filamente (Moore *et al.*, 1970), die die Kernstruktur der sogenannten dünnen Filamente der Muskelsarkomere bilden. Die perlschnurartigen Filamente haben eine Periodizität von 72 nm, woraus sich eine Wiederholung gleicher Bereiche alle 36 nm ergibt. Zwei Aktin-Monomere sind dabei etwa 5.5 nm voneinander entfernt (Squire, 1981). Aktinfilamente sind polar und ihre beiden Enden sind strukturell unterschiedlich. Die Filamente wachsen am sogenannten Plus-Ende schneller als am sogenannten Minus-Ende.

Bei *in vitro*-Experimenten werden jedoch häufig durch Polymerisation von aufgereinigtem Aktin hergestellte, fluoreszenzmarkierte Aktinfilamente verwendet. Diese enthalten im Gegensatz zu nativen Aktinfilamenten in Muskelfasern keine anderen Proteine wie Nebulin oder die Regulatorproteine Tropomyosin und Troponin.

## 2.3 Das Kinesin-Mikrotubuli-System

### 2.3.1 Kinesin

Motorproteine der Kinesinfamilie sind Mikrotubuli-aktivierte ATPasen. Sie bewegen sich entlang von Mikrotubuli, filamentösen Strukturen des Zytoskellets, gebildet aus Protofilamenten, die durch Polymerisation von  $\alpha\beta$ -Tubulin-Heterodimeren entstehen. Das konventionelle Kinesin wurde ursprünglich in Riesenaxonen von Tintenfischen entdeckt, wo es für den anterograden Vesikeltransport zuständig ist (Vale, 1987). Allen Kinesinen gemeinsam ist eine etwa 340 Aminosäuren umfassende, N-terminale Region, die die Kopf- oder Motordomäne beinhaltet. Diese enthält die ATPase-Aktivität und die Bindungsstelle für Mikrotubuli und ist in der Lage, Bewegung zu produzieren (Stewart *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1990).

Kinesin ist ein 80 bis 100 nm langes Heterotetramer (Amos, 1987; Hirokawa *et al.*, 1989). Es wird von zwei schweren und zwei leichten Ketten gebildet (Berliner *et al.*, 1995; Block, 1998). Die schweren Ketten umfassen N-terminal die 10 nm langen Kopfdomänen, die über eine *coiled coil*, dem Stiel, mit dem C-terminalen, etwa 15 nm langen Schwanzteil verbunden sind, wo die leichten Ketten gebunden sind (Hirokawa *et al.*, 1989). Dieser Stiel wird etwa in seiner Mitte von einer prolinreichen Region unterbrochen und so in die *coil 1* (etwa 30 nm lang) und *coil 2* (etwa 20 nm lang) unterteilt (Amos, 1987; Hirokawa *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 1989). Auch zwischen dem die Kopfdomänen verbindenden, 5 nm langen Nackenteil (Kozielski *et al.*, 1997) und dem Stiel befindet sich ein Gelenk. Die Kopfdomänen sind über sogenannte *neck linker* mit den Nackenregionen verbunden. In Abbildung 2.3 ist ein Kinesinmolekül schematisch dargestellt.

Im Gegensatz zu Myosin II ist das konventionelle Kinesin ein prozessives Motormolekül. Das heißt, es kann Hunderte von 8 nm langen Schritten, entsprechend der Größe eines  $\alpha\beta$ -Tubulin-Heterodimers, entlang eines Mikrotubulus machen ohne von diesem abzu dissoziieren (Block *et al.*, 1990; Howard, 1996; Svoboda *et al.*, 1993). Vermutlich jeder Schritt ist dabei an die Hydrolyse eines Moleküls ATP gekoppelt (Coy *et al.*, 1999; Hua *et al.*, 1997; Schnitzer und Block, 1997). Diese Schritte sollen von Konformationsänderungen innerhalb des an einen Mikrotubulus gebunden Kinesinkopfes induziert werden. Diese Konformationsänderungen sollen erfolgen, während ATP am Kinesinkopf gebunden ist (Rice *et al.*, 1999).

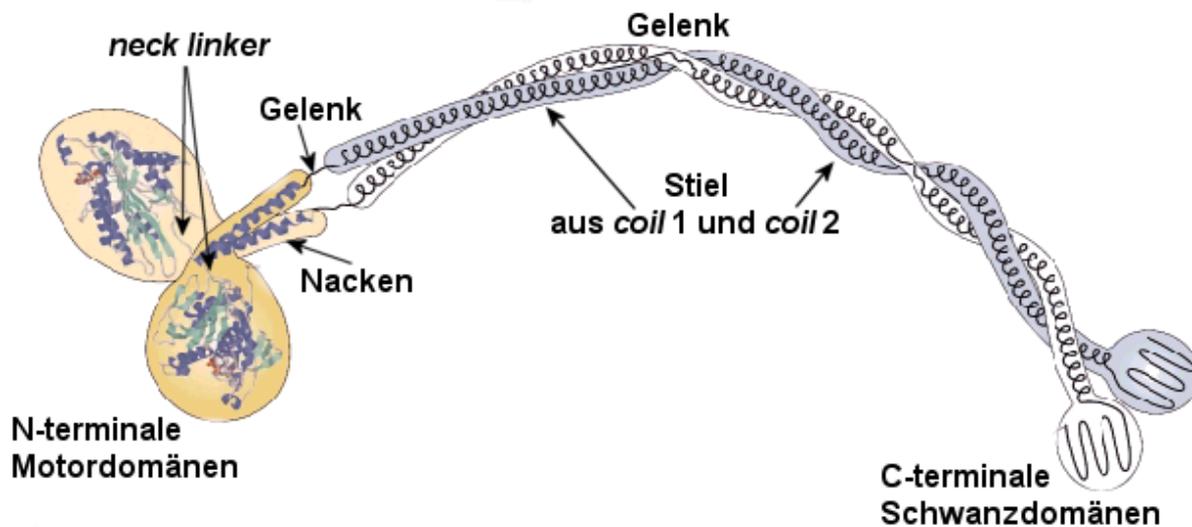


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines Kinesinmoleküls mit N-terminalen Motordomänen (gelb), Stiel und C-terminalen Schwanzdomänen (beides grau). Im Kopfbereich ist die Kristallstruktur des Kinesin-Dimers angedeutet (Kozielecki *et al.*, 1997) (verändert, aus Woehlike und Schliwa, 2000)

In Analogie zu den für das Aktomyosin-System erstellten ATPase-Schemata wurden auch zahlreiche Modelle für das Kinesin-Tubulin-System vorgeschlagen. Nachdem anfänglich häufig nur ein Kopf des Motormoleküls Kinesin berücksichtigt wurde (Jiang und Hackney, 1997; Ma und Taylor, 1997b; Sadhu und Taylor, 1992) gehen viele Autoren aufgrund des prozessiven Verhaltens dieses Motors mehr und mehr dazu über, auch den zweiten Kopf zu berücksichtigen (Hackney, 1994a; Hackney, 1994b; Hancock und Howard, 1999; Ma und Taylor, 1997a; Mandelkow und Johnson, 1998; Moyer *et al.*, 1998). Ein solches Schema relevanter Zwischenzustände, welches einen halben ATPase-Zyklus des zweiköpfigen Kinesins darstellt, ist in Abbildung 2.4 entwickelt worden. Es soll im folgenden anhand des natürlichen Arbeitszyklus des Kinesins, beginnend mit dem Binden des freien Kinesins an einen Mikrotubulus bis hin zum doppelköpfigen Anbinden bei ATP-Mangel, in Analogie zum Myosin Rigor-Zustand genannt, beschrieben werden.

Wie schon erwähnt ist eine der Aufgaben des Kinesins der intrazelluläre Transport von Vesikeln in die Peripherie von Nervenzellen. Die zu transportierenden Vesikel sind dabei an die C-terminale Schwanzdomäne gebunden. Im ungebundenen Zustand enthalten beide Kinesinköpfe jeweils ein ADP-Molekül. Im Gegensatz zu Myosin ist bei Kinesin der Zustand mit ADP durch geringe Affinität zum Bindungspartner gekennzeichnet. Abhängig von der Mikrotubulikonkonzentration bindet zunächst ein Kopf an einen Mikrotubulus, was die ADP-Abgabe dieses Kinesinkopfes

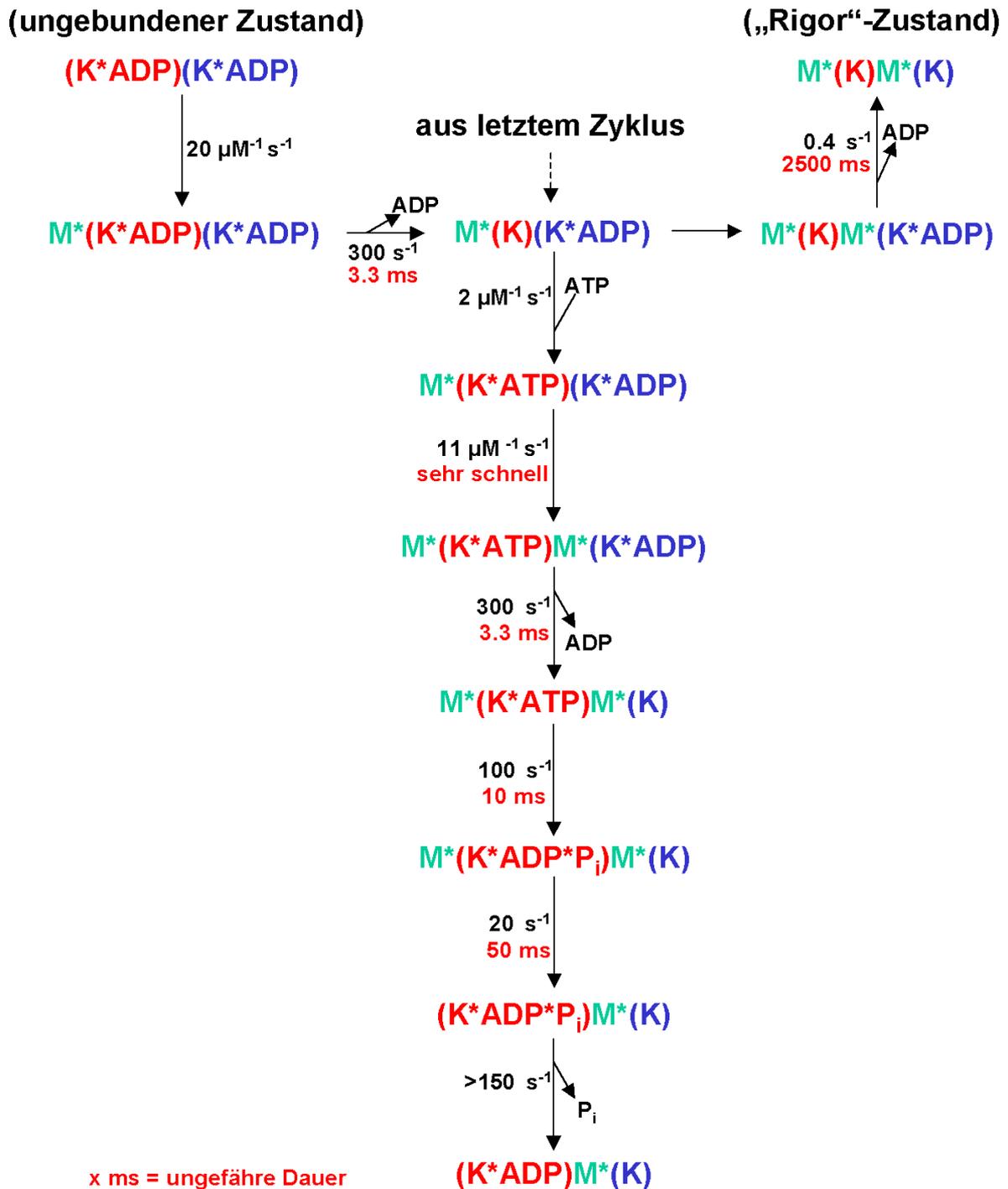


Abbildung 2.4: Reaktionsschema der Kinesin-ATPase (erweitert, nach Mandelkow und Johnson (1998) und Moyer *et al.* (1998)) mit M = Mikrotubulus, K = Kinesinkopf, und P<sub>i</sub> = Phosphat: Bindung eines Kinesinkopfes an einen Mikrotubulus ist durch M\* angedeutet. Der Übersichtlichkeit wegen sind die beiden Kinesinköpfe in unterschiedlichen Farben dargestellt. Die Ratenkonstanten einzelnen Teilreaktionen sind an den entsprechenden Pfeilen (in schwarz) angegeben, ebenso die sich daraus ergebenden Lebensdauern (rot) des vorhergehenden Zustands. Der mit beiden Köpfen an den Mikrotubulus gebundene, nukleotidfreie „Rigor“-Zustand und der ungebundene Zustand sind gesondert beschriftet.

sehr beschleunigt (Hackney, 1994a; Hackney, 1994b; Ma und Taylor, 1997a) und den gesamten ATP-Hydrolysezyklus etwa 10000fach beschleunigt (Hackney, 1994b). Nach erfolgter ADP-Freisetzung ist nun eine Kopfdomäne des Kinesinmoleküls fest an den Mikrotubulus gebunden, während die andere noch ADP gebunden hat und nicht an den Mikrotubulus gebunden ist (Hackney, 1994a; Hackney, 1994b). Der nukleotidfreie, fest gebundene Kopf ist nun wieder in der Lage ATP zu binden. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion läuft in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration ab. Nach diesem Reaktionsschritt ist der Kinesinkopf weiterhin fest an den Mikrotubulus gebunden, da sich, wie auch der nukleotidfreie Zustand, der ATP-Zustand des Kinesinkopfes durch eine hohe Affinität zu Mikrotubuli auszeichnet. Während dieser Kopf fest an den Mikrotubulus gebunden bleibt, bindet nun auch die zweite Motordomäne an das gleiche Protofilament des Mikrotubulus (Hoenger *et al.*, 2000) und gibt anschließend das von ihr gebundene ADP ab. Das Kinesinmolekül ist jetzt über zwei Köpfe fest an den Tubulus gebunden. Nach Hydrolyse des ATP zu ADP und Phosphat erniedrigt sich die Tubulin-Affinität dieses Kinesinkopfes und er löst sich von dem Mikrotubulus ab, während der andere Kopf fest gebunden bleibt. Anschließend wird das entstandene Phosphat schnell freigesetzt. Einer der beiden Köpfe des Kinesinmoleküls hat somit seinen mikrotubuli-stimulierten ATPase-Zyklus durchlaufen und der Zyklus des gesamten Moleküls wird nun von dem anderen Kopf vervollständigt. Ist nicht genug ATP in Nähe vorhanden, so bindet auch der zweite Kopf nach Freisetzung seines ADP fest an den Mikrotubulus. Das Kinesinmolekül befindet sich im Rigor-Zustand.

Wie schon für Myosin gezeigt ändern sich unter verschiedenen Bedingungen die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte auch im ATPase-Zyklus des Kinesins. In Abwesenheit von Mikrotubuli kann Kinesin das von ihm gebundene ADP nur sehr langsam abgeben. Hier ist die ADP-Dissoziation der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Hackney, 1994a). Die Anwesenheit von Mikrotubuli beschleunigt die ADP-Abgabe jedoch erheblich, was somit auch die ATPase Rate des Kinesins etwa 2000 bis 10000fach erhöhen kann (Hackney, 1994b; Johnson und Gilbert, 1995). Bei ausreichender ATP-Konzentration und in Anwesenheit von Mikrotubuli ist somit nicht mehr die ADP-Abgabe, sondern ein anderer Schritt geschwindigkeitsbestimmend. Dabei handelt es sich um das Ablösen des Kinesinkopfes vom Mikrotubulus nach erfolgter ATP-Hydrolyse (Gilbert *et al.*, 1995). Bei wenig oder keinem ATP in der Umgebung wird das Kinesinmolekül den größten Teil seiner Zeit nukleotidfrei,

wartend auf ein Molekül ATP verbringen. Dabei ist es entweder mit einem nukleotidfreien Kopf fest an einen Mikrotubulus gebunden während der andere Kopf noch ADP enthält und ungebunden ist, oder aber das Molekül bindet mit beiden Köpfen im Rigor-Zustand.

### 2.3.2 Tubulin

Mikrotubuli sind röhrenförmige Filamente des Zytoskeletts. Sie entstehen durch seitliches Aneinanderlagern von Protofilamenten, die durch Polymerisation aus  $\alpha\beta$ -Tubulin-Heterodimeren gebildet wurden. Mikrotubuli haben einen Außendurchmesser von etwa 24 nm und einen Innendurchmesser von etwa 18 nm. Jedes Tubulin-Monomer besitzt eine flache Mulde, in der GTP oder GDP und ein  $Mg^{2+}$ -Ion gebunden sind (Nogales *et al.*, 1998). Wie die Aktinfilamente sind auch Mikrotubuli polar. Wie bei den Aktinfilamenten wird das schnell wachsende Ende Plus- und das langsam wachsende Ende Minus-Ende genannt.

## 2.4 Das Photonische Kraftmikroskop (PFM)

### 2.4.1 Grundlagen

Das Photonische Kraftmikroskop wurde Ende der Neunziger Jahre am *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) in Heidelberg von der Gruppe Zellbiologie und Zellbiophysik um Heinrich Hörber entwickelt. Das in dieser Arbeit verwendete Photonische Kraftmikroskop stellt eine Weiterentwicklung dar, gebaut von Stephan Altmann, EMBL, Heidelberg. Mit dem Photonischen Kraftmikroskop können Oberflächen und Objekte in einem wässrigen Medium schonend von einer Sonde abgetastet und die bei der Interaktion zwischen Sonde und Probe wirkenden Kräfte gemessen werden. Während die Probe ein auf einer Oberfläche immobilisiertes Objekt oder die Oberfläche selbst ist, dient ein sehr kleines, kugelförmiges Partikel als Sonde. Diese Sonde wird in einem fokussierten Laserstrahl, einer sogenannten optischen Falle, nahe des Fokus gefangen (Ashkin *et al.*, 1986) und kann durch Bewegen des Brennpunktes manipuliert werden. Das Partikel wird jedoch durch die optische Falle nicht starr festgehalten, sondern kann nahe des Laserfokus in allen drei Raumrichtungen diffundieren. Die Brownsche Bewegung der Sonde wird während ihrer Interaktion mit der Probe verfolgt. Dies geschieht mit einem Detektionssystem, mit dem die dreidimensionalen Positionen des Partikels

aufgezeichnet werden (Florin *et al.*, 1997; Pralle *et al.*, 1999). Aus den Verteilungen der Positionen lassen sich im Folgenden die bei der Wechselwirkung zwischen Sonde und Probe wirkenden Kräfte bestimmen. Die Sonde des Photonischen Kraftmikroskops ist somit in allen drei Raumrichtungen gut und schnell beweglich und zeigt die entfernungsabhängigen Kräfte bei der Interaktionen zwischen Sonde und Probe an.

#### 2.4.2 Aufbau des Photonischen Kraftmikroskops

Wie schon erwähnt kombiniert das Photonische Kraftmikroskop eine optischen Falle, in der ein lichtbrechendes Partikel mittels eines fokussierten Laserstrahls nahe des Fokus gefangen werden kann, mit einem dreidimensionalen Detektionssystem, mit dem die dreidimensionalen Positionen des gefangenen Partikels aufgezeichnet werden. Außerdem beinhaltet das PFM noch auf der *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy* (TIRFM) basierende Elemente zur Beobachtung fluoreszenzmarkierter Proben. Im folgenden sollen kurz die diesen Elementen zugrunde liegenden Theorien erläutert werden.

##### 2.4.2.1 Optische Fallen

Kleine dielektrische Partikel mit Radien zwischen 25 nm und 100  $\mu$ m lassen sich durch einen fokussierten Laserstrahl nahe dessen Fokus festhalten und durch bewegen des Fokus manipulieren (Ashkin *et al.*, 1986). Voraussetzung hierfür ist, dass das Partikel lichtdurchlässig ist und sein Brechungsindex größer ist als der des umgebenen flüssigen Mediums. Die Kräfte, die in dieser optischen Falle auf das Partikel einwirken, setzen sich aus dem Impulsübertrag des gebrochenen Lichts auf das Partikel und der Wechselwirkung der durch das eingestrahlte Licht im Partikel induzierten Dipole mit dem Gradienten des elektrischen Feldes im Fokus des Lasers zusammen. Die Größe der Kräfte hängt von der Partikelgröße, seiner Polarisierbarkeit, der Differenz der Brechungsindizes und von der Wellenlänge des eingestrahnten Lichts ab.

### 2.4.2.2 Detektion der Sondenposition in drei Dimensionen

Bei der dreidimensionalen Bestimmung der Sondenpositionen wird die Tatsache ausgenutzt, dass ein in einer optischen Falle gefangenes Partikel das durchtretende Licht streut. Auf eine Ebene projiziert überlagert sich dieses in Vorwärtsrichtung gestreute Laserlicht mit dem ungestreuten Licht und es bildet sich ein Interferenzmuster. Gestreutes und ungestreutes Licht werden durch eine Kondensorlinse eingefangen und auf eine in der hinteren Brennebene dieser Linse positionierte Quadrantenphotodiode projiziert (schematisch in Abbildung 2.5 dargestellt). Befindet sich das Partikel in Ruhelage auf der optischen Achse der Laserfalle, so trifft auf jeden Quadranten ein Viertel der Lichtintensität. Weicht das Partikel seitlich von seiner Ruhelage ab, so verschiebt sich auch der von ihm erzeugte Interferenzfleck auf der Photodiode.

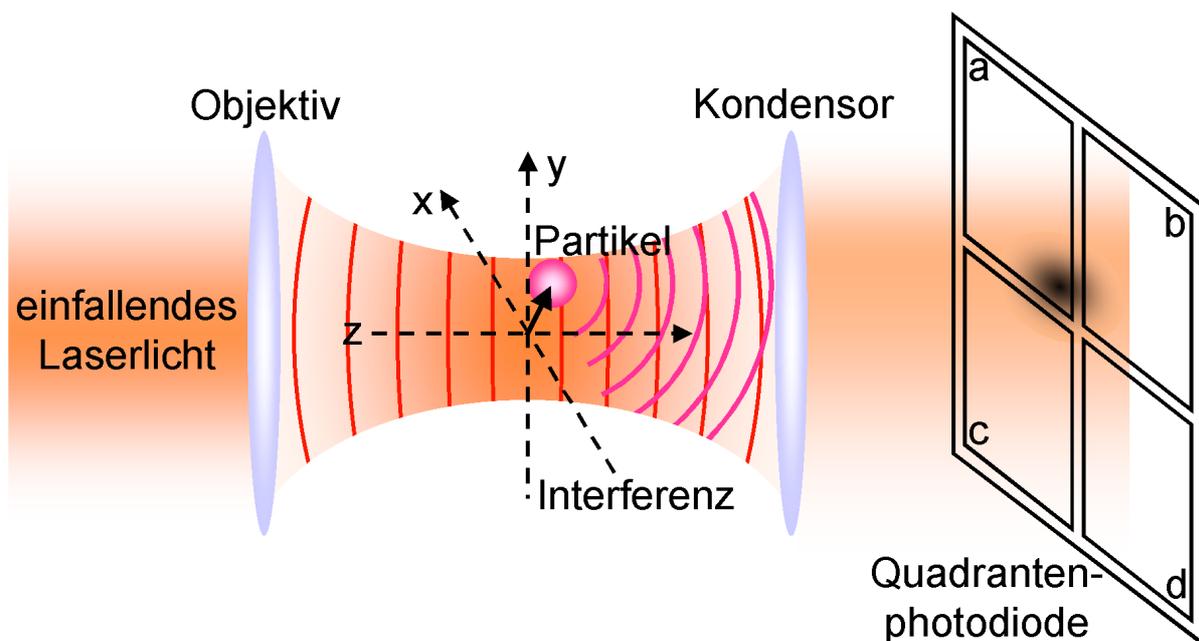


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der dreidimensionalen Positionsdetektion eines mit einem fokussierten Laserstrahl gefangenen Partikels (modifiziert nach Tischer (2000)): Das in Vorwärtsrichtung durch das Partikel gestreute Laserlicht (pinke Wellenfronten) und das ungestreute Licht, welches nicht durch das Partikel getreten ist (rote Wellenfronten), überlagern sich und bilden ein Interferenzmuster (schwarzer Fleck) auf einer in der hinteren Brennebene einer Kondensorlinse positionierten Quadrantenphotodiode. Die dadurch entlang der einzelnen Raumachsen entstehenden Lichtintensitäten lassen sich durch folgende Gleichungen beschreiben:  $I_x=(a+c)-(b+d)$ ;  $I_y=(a+b)-(c+d)$ ;  $I_z= a+b+c+d$  (Pralle *et al.*, 1999).

Die dabei auf den einzelnen Quadranten auftreffenden Lichtintensitäten lassen sich durch Bilden von Intensitätsdifferenzen zur seitlichen ein- oder zweidimensionalen Positionsbestimmung des Partikels benutzen (Allersma *et al.*, 1998; Finer *et al.*, 1994; Gittes und Schmidt, 1998). Neben den Helligkeitsverteilungen auf den einzelnen Quadranten der Photodiode lässt sich auch die Gesamtintensität des Lichts benutzen (siehe Abbildung 2.5). Sie spiegelt die axiale oder z-Position des Partikels wider (Pralle *et al.*, 1999). Die räumliche Auflösung einer solchen Positionsdetektion liegt im Nanometer-, die zeitliche Auflösung im Mikrosekundenbereich (Pralle *et al.*, 1999).

#### 2.4.2.3 Die Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy

Bei der *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy* handelt es sich um eine Art der Fluoreszenzmikroskopie, bei der die Anregung der Fluorophore nur in unmittelbarer Nähe einer Grenzschicht zweier Medien unterschiedlicher optischer Dichten erfolgt. Bei der Totalreflexion eines Lichtstrahls an der Grenzschicht eines optisch dichteren zu einem optisch dünneren Medium ist auch im optisch dünneren Medium Lichtintensität vorhanden (Watkins und Robertson, 1977). Als Lichtquelle dienen ein oder mehrere Laser, deren Strahlen dezentral durch ein Objektiv mit einer numerischen Appertur (NA) von mindestens 1,33 geführt werden. Die dadurch in einem sehr spitzen Winkel auf die Grenzschicht treffenden Strahlen werden an dieser total reflektiert und wieder von dem Objektiv eingefangen. Abhängig von der verwendeten Wellenlänge klingt die Lichtintensität mit zunehmender Entfernung von der Grenzschicht exponentiell ab. Dieses Feld der schnell abklingenden Lichtintensität wird auch als *evanescent field* bezeichnet.

## 2.5 Fragestellungen

In einem kontrahierenden Muskel gleiten die Myosin- und Aktinfilamente aneinander entlang, und seine Muskelfasern verkürzen sich. Wird diese Verkürzung gebremst oder unterbunden, wird Kraft entwickelt. Es ist weithin akzeptiert, dass die Kraftentwicklung oder Verkürzung von Muskelfasern von strukturellen Veränderungen innerhalb der an Aktin angebotenen Querbrücken herrühren. Die Querbrücken müssen also ein Element enthalten, welches elastisch verformt werden kann und so das Aufbauen von Spannung innerhalb der Querbrücke ermöglicht.

Obwohl viel über die Struktur von Myosin und seinem Bindungspartner Aktin durch elektronenmikroskopische Untersuchungen und Röntgenkristallographie wie auch über die Kinetik während ihrer Interaktion bekannt ist, bleibt der genaue Mechanismus der Kraftentwicklung auf molekularer Ebene bis heute unbekannt.

Es wird angenommen, dass Myosinmoleküle mindestens zwei flexible Regionen, eine jeweils zwischen den Kopfdomänen (S-1) und dem Schwanzteil und eine weitere etwa in der Mitte des Schwanzteils am Ende des Subfragments 2 (S-2) besitzt. Letztere Region wird auch Gelenk oder Scharnier (*hinge*) genannt. In dem Modell des Querbrückenzyklus (Huxley und Simmons, 1971; Huxley, 1969) wird postuliert, dass dieses Gelenk die Bewegung der Myosinköpfe weg von den Myosinfilamenten und so die Anheftung der Myosinköpfe an Aktinfilamente ermöglicht. Als mögliche Lokalisationen des elastischen Elements innerhalb des Myosinmoleküls werden verschiedene Molekülteile diskutiert. Es wurde vorgeschlagen, dass sich das elastische Element in Myosins Konverterdomäne am Übergang des globulären Teils des Myosinkopfes in die  $\alpha$ -Helix, dem sogenannten Hebelarm mit den Bindungsstellen für die leichten Myosinketten, befindet (Köhler *et al.*, 2002). Auch der Hebelarm selbst kommt als elastisches Element in Frage (Dobbie *et al.*, 1998; Irving *et al.*, 2000; Uyeda *et al.*, 1996). Alternativ wurden noch Myosins *hinge* Region am S-2-LMM-Übergang (Harrington *et al.*, 1990; Highsmith *et al.*, 1977; Sugi *et al.*, 1992) und die Aktinbindungsstelle (Huxley, 1974) diskutiert.

All diese Studien wurden an Muskelfasern durchgeführt. Experimente an Muskelfasern liefern ein gut messbares Signal. Messungen der Molekülelastizität an Muskelfasern beinhalten jedoch einige Probleme. Allen voran ist die unbekannte Anzahl von Myosinmolekülen in einer Muskelfaser zu nennen. Schätzungsweise handelt es sich dabei um mehr als  $10^{13}$  Myosinmoleküle, die zwar alle gleichzeitig, aber asynchron arbeiten. So kann es zu Mischpopulationen von Myosinmolekülen verschiedener Zwischenzustände mit eventuell unterschiedlichen Eigenschaften kommen. Da die Austrittsstellen von Myosinköpfen aus den Myosinfilamenten der Muskelfasern Abstände von 14,3 nm aufweisen, die Bindungsstellen auf den Aktinfilamenten sich aber alle 5,5 nm wiederholen, muss sich die Mehrheit der Myosinmoleküle mehr oder weniger verformen, um an die Aktinfilamente binden zu können. Das Resultat ist eine Mischpopulation von Myosinmolekülen unterschiedlicher Verformungsgrade. Auch beim Anbinden beider Köpfe eines Myosinmoleküls an ein Aktinfilament im nukleotidfreien Zustand müssen sich diese elastisch verformen, um Binden zu

können. Bei der Muskelkontraktion gleiten die Myosin- und Aktinfilamente aneinander entlang. Dabei interagieren die Myosinmoleküle zyklisch mit dem Aktinfilament. Auch während Myosinköpfe an Aktin gebunden sind bewegen sich die Filamente, und so kommt es auch dort zu einer sich ändernden Verformung der Myosinmoleküle. Es hat sich jedoch auch gezeigt, dass eine gewisse Dehnbarkeit auch in den Aktin- und Myosinfilamenten selbst lokalisiert ist (Higuchi *et al.*, 1995; Huxley *et al.*, 1994; Wakabayashi *et al.*, 1994), was direkte Messungen der Myosinsteifheit in Muskelfasern zusätzlich erschwert.

Bei Steifheitsmessungen an Muskelfasern werden gleichzeitig viele Myosinköpfe gedehnt. Daraus wird abgeschätzt, wie hoch die Elastizität eines einzelnen Myosinkopfes sein könnte. Aus all den angeführten Gründen sind solche Abschätzungen sehr ungenau. Es ist daher notwendig, die Elastizität von Myosin an einzelnen Molekülen zu messen und zu versuchen, die Lokalisation des elastischen Elements innerhalb des Moleküls zu bestimmen.

Bis heute wurden einige Versuche unternommen, die Elastizität von Myosin außerhalb von Muskelfasern zu messen. Dazu wurden Myosinmoleküle in synthetische Myosinfilamente inkorporiert (Ishijima *et al.*, 1998; Ishijima *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1998) oder es wurden Myosinfragmente wie HMM oder S-1 verwendet (Kitamura *et al.*, 1999; Mehta *et al.*, 1997; Molloy *et al.*, 1995; Nishizaka *et al.*, 1995; Nishizaka *et al.*, 2000; Veigel *et al.*, 1998). All diesen Studien (bis auf Kitamura *et al.*, 1999) war gemeinsam, dass die Myosinmoleküle in irgendeiner Weise auf einer Glassoberfläche immobilisiert wurden und mit an Mikrosphären oder dünnen Nadeln befestigten Aktinfilamenten interagierten. Die Steifheit der Aktomyosinkomplexe wurde indirekt von den in einer oder zwei Dimensionen aufgezeichneten Position der Mikrosphären oder Nadeln bestimmt.

Möchte man das elastische Verhalten einzelner, an ihren Bindungspartner gebundener Motormoleküle im dreidimensionalen Raum und mit ausreichender Zeitauflösung bestimmen, so kann man sich ihrer thermischen Fluktuationen bedienen. Die thermischen Fluktuationen von einzelnen Molekülen oder Molekülkomplexen werden von ihrer Gestalt und mechanischen Eigenschaften beeinflusst. In wässriger Lösung werden Teilchen ständig von den umgebenden Wassermolekülen kurzzeitig und aus zufälligen Richtungen angestoßen. Dabei werden Impulse auf das getroffene Teilchen übertragen. Das Teilchen diffundiert. Diese Diffusion wird Brownsche Bewegung genannt. Befindet sich das Teilchen im

thermischen Gleichgewicht mit einer Umgebung mit positionsabhängigen Unterschieden in der Energie,  $E(x)$ , so lassen sich seine Aufenthaltswahrscheinlichkeiten an den Orten verschiedener Energie mit einer Boltzmann-Verteilung beschreiben. Grundsätzlich tendieren Teilchen dazu, ein Niveau möglichst niedriger Energie einzunehmen. Getrieben durch die Kollisionen mit den umgebenen Molekülen jedoch verbringen sie einen Teil ihrer Zeit an anderen Orten mit höheren Energieniveaus. Die Wahrscheinlichkeit  $p_i$ , das Teilchen auf einem Niveau  $i$  mit der Energie  $E_i$  anzutreffen wird durch die Gleichung

$$p_i = \frac{1}{Z} \exp\left[-\frac{E_i}{kT}\right] \quad \text{mit} \quad Z = \sum_i \exp\left[-\frac{E_i}{kT}\right], \quad \text{Gleichung 2.1}$$

$k$  der Boltzmann-Konstante ( $1,381 \cdot 10^{-23}$  J/K) und  $T$  der absoluten Temperatur beschrieben. Kann man nun messtechnisch die Positionen des Teilchens über einen ausreichend langen Zeitraum erfassen, lässt sich eine Verteilung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten des Teilchens erstellen. Unter Verwendung von Boltzmanns Gesetz (Gleichung 2.1) erhält man aus der Verteilung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten die zugehörige Ortsabhängigkeit der Energieniveaus, in denen sich das Teilchen während der Messung befand. Ist die Ortsabhängigkeit der Energieniveaus im wesentlichen durch die mechanischen Eigenschaften des biologischen Teilchens bestimmt, so können aus diesen Ortsabhängigkeiten die mechanischen Eigenschaften wie Elastizität oder geometrisches Verhalten des biologischen Teilchens abgeleitet werden.

Dieses Prinzip lässt sich mit dem Photonischen Kraftmikroskop ausnutzen. Einzelne Moleküle von Motorproteinen werden auf kleinen, lichtbrechenden Mikrosphären befestigt. Bindet nun ein Motormolekül an seinen auf dem Kammerboden immobilisierten Bindungspartner, so werden die Fluktuationen der Mikrosphäre durch die elastischen Eigenschaften der Verbindung zum Kammerboden, also dem Komplex von Motormolekül und Filament, dominiert. Registriert man die Positionen der Mikrosphäre über einen ausreichend langen Zeitraum, so erhält man eine Verteilung seiner Aufenthaltswahrscheinlichkeiten, aus der man gemäß Gleichung 2.1 das Energieprofil der Verbindung ableiten kann. Unter der Annahme, dass sich die Verbindung zwischen Mikrosphäre und Glassoberfläche wie eine elastische Feder verhält und dem Hook'schen Gesetz

Kraft  $F = \kappa \cdot x$  (mit der Federkonstante  $\kappa$  und Auslenkung  $x$ ) Gleichung 2.2 folgt, kann man von dem aus der Verteilung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten

abgeleiteten Energieprofil Informationen über die mechanischen Eigenschaften des verbindenden Motormoleküls, wie zum Beispiel seine Federkonstante, ableiten. Diese Zusammenhänge zwischen Aufenthaltswahrscheinlichkeitsverteilung der Mikrosphärenpositionen, Energieprofil und Federkonstante des verbindenden Motormoleküls soll Abbildung 2.6 verdeutlichen. Aus der Gestalt der Positionsverteilung der über ein Motormolekül befestigten Mikrosphäre lässt sich außerdem noch die Länge des verbindenden Elements sowie die Lage möglicher flexibler Elemente innerhalb des Moleküls bestimmen.

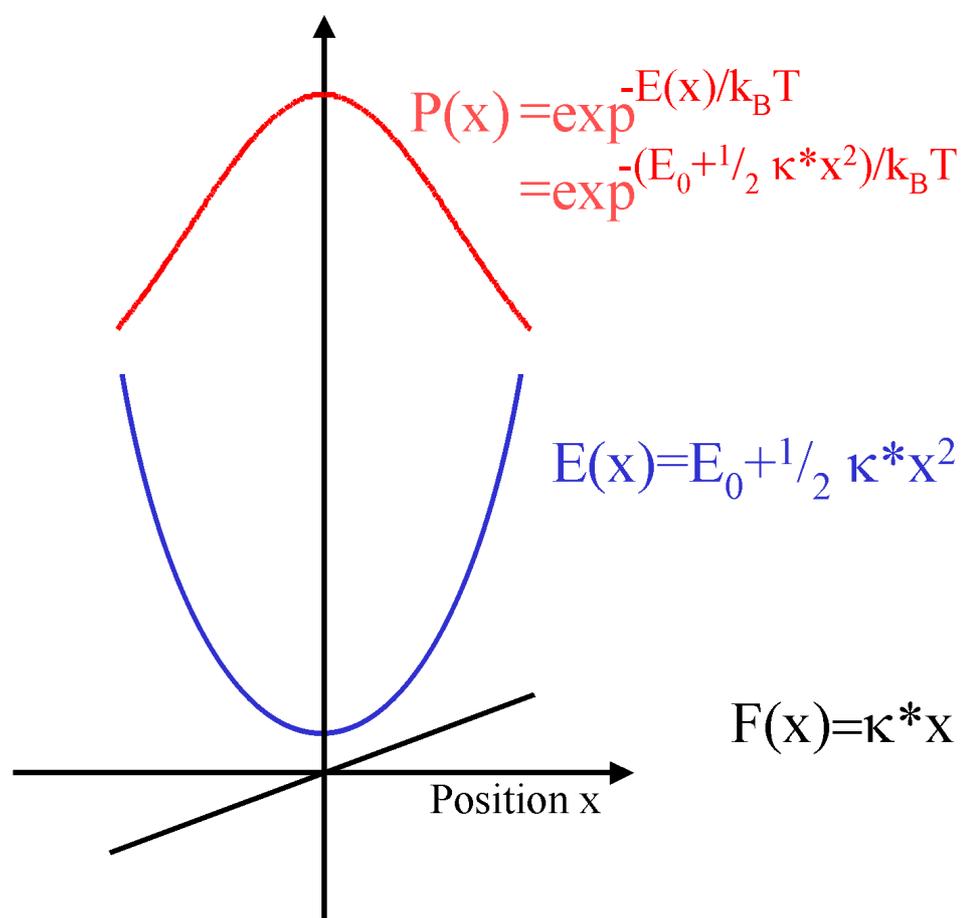


Abbildung 2.6: Gleichungen einer Feder mit linearer Elastizität. Die Kraft  $F$  (schwarz) in Abhängigkeit der Federauslenkung  $x$  wird durch das Hook'sche Gesetz beschrieben.  $\kappa$  bezeichnet die Federkonstante der Feder. Die blaue Parabel zeigt die zu den jeweiligen Positionen gehörende Energie der Feder. Die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Feder an den verschiedenen Positionen stellt eine Boltzmann Verteilung dar und ist in rot dargestellt.

Neben den mechanischen Eigenschaften von Myosin II ist es natürlich von grundsätzlichem Interesse, die Elastizitäten anderer Mechanoenzyme zu bestimmen

und aufzuklären, in welchen Molekülteilen deren elastische Elemente lokalisiert sind. Das Mechanoenzym Kinesin arbeitet nicht wie Myosin II in Verbänden vieler Moleküle, sondern transportiert als einzelnes, prozessives Molekül Lasten entlang von Mikrotubuli. Auch für Kinesin ist noch nicht geklärt worden, welcher Molekülteil als elastisches Element zur Bewegungs- und Kraftentwicklung verformt wird. Trotz in den letzten Jahren aufgeklärter Strukturen von Kinesins Motordomäne (Kozielski *et al.*, 1997; Kull *et al.*, 1996) und Tubulin (Nogales *et al.*, 1998) und vielen Informationen über die Kinetik während ihrer Interaktion, wurde der genaue Mechanismus der Bewegung von Kinesin entlang von Mikrotubuli auf molekularer Ebene bis heute noch nicht geklärt. Schon bei ersten elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Kinesinmolekülen wurde beobachtet, dass sich etwa in der Mitte des Kinesinstiels eine biegbare Region befindet (Amos, 1987; Hirokawa *et al.*, 1989). Diesem Gelenk wurde später eine Funktion bei der Regulation des Kinesinmoleküls zugeschrieben. Durch Bewegen um diese flexible Region soll es möglich sein, dass der Schwanzteil eines Kinesinmoleküls in Abwesenheit einer gebundenen Last an die Motordomänen anbindet und ein Fortschreiten des Kinesinmoleküls entlang des Mikrotubulus verhindert (Coy *et al.*, 1999; Cross und Scholey, 1999). Als elastische Elemente, die zur Kraftentwicklung verformt werden, wurden verschiedene Regionen des Kinesinmoleküls vorgeschlagen. Neben der Motordomäne (Hirose *et al.*, 1995) und dem Nackenteil des Kinesins wurde vor allem in der Verbindung zwischen diesen beiden Elementen, dem sogenannten *neck linker*, ein aussichtsreicher Kandidat für diese Funktion gefunden (Amos, 2000; Rice *et al.*, 1999; Sosa *et al.*, 2001). Auch wurden Konformationsänderungen an den Mikrotubuli beobachtet, die durch das Binden von Kinesinmolekülen induziert wurden (Hoenger *et al.*, 1995). Die Festigkeit der Bindung von Kinesin an Mikrotubuli kann sich mit dem gebundenen Nukleotid ändern (Higuchi *et al.*, 1997; Kawaguchi und Ishiwata, 2001; Uemura *et al.*, 2002) und der in Abwesenheit von ATP flexible *neck linker* zeigte sich nach Bindung von ATP immobilisiert und in Laufrichtung des Kinesins verlagert (Rice *et al.*, 1999).

Es stellen sich also folgende Fragen:

1. Lässt sich mit Hilfe des Photonischen Kraftmikroskops die Elastizität einzelner Myosin- und Kinesinmoleküle bestimmen?
2. Wie groß ist die Molekülelastizität von Myosin und Kinesin?
3. Lässt sich die erhaltene Molekülelastizität des Myosinmoleküls mit an Muskelfasern bestimmten Werten vergleichen?
4. Unterscheidet sich die Elastizität von verschiedenen biochemischen Zuständen der Mechanoenzyme? Ist sie abhängig von der Gegenwart und Art des gebundenen Nukleotids?
5. Lassen die erhaltenen Daten eine Bestimmung des biegbaren Molekülelements zu?
6. Welche Molekülregionen bestimmen die Elastizität der verschiedenen Motormoleküle?

Diese Fragen sollen in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Chemikalien von der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

#### 3.2 Myosinexperimente

##### 3.2.1 Versuchstiere

Für die Präparationen von Myosin aus Einzelfasern der *Musculi psoas majores* von Kaninchen wurde ein einjähriges weibliches Kaninchen der Rasse „Deutscher Widder“ mit einem Körpergewicht von etwa zwei Kilogramm verwendet.

##### 3.2.2 Präparation von Myosin

###### 3.2.2.1 Präparation von Muskelfaserbündeln

Das durch Genickschlag betäubte Kaninchen wurde durch Ausbluten (Eröffnen der *Arteriae carotes communes*) getötet. Nach Entfernen des Bauchfells und Eröffnen des Bauchraums wurden Teile der *Musculi psoas majores* entnommen. Hierzu wurden die Muskeln freipräpariert und Fett- und Bindegewebe entfernt, bevor Faserbündel von ca. 2-3 mm Durchmesser an den lateralen Rändern der Muskeln entnommen wurden. Die Faserbündel wurden in einer mit Sylgard ausgegossenen Plexiglaskammer aufgespannt, die mit Skinning Solution A (5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM Mg-acetat, 5 mM EGTA, 3 mM  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , 50 mM  $\text{Na}_2\text{CrP}$ , 8 mM  $\text{NaN}_3$ , 0,01 mM Leupeptin, 0,001 mg/ml Aprotinin, 0,01 mM Antipain, 0,01 mM E 64, 0,01 mM Pepstatin, 1 mM AEBSF, 10 mM Glutathion, 5 mM DTT, pH 7,0 bei 5°C, 0,5% Triton X-100) (Kraft *et al.*, 1995a; Kraft *et al.*, 1995b) aufgefüllt wurde, und für 30 Minuten bis zu einer Stunde bei 4°C gehäutet. Hierbei wurden die Zellmembranen des Faserbündels durch das Triton X-100 permeabilisiert. Nach Abgießen der Lösung wurde einmal mit Skinning Solution gespült und nun für jeweils 30 Minuten bis zu einer Stunde bei 4°C mit Skinning Solution (5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM Mg-acetat, 5 mM EGTA, 3 mM  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , 50 mM  $\text{Na}_2\text{CrP}$ , 8 mM  $\text{NaN}_3$ , 0,01 mM Leupeptin, 0,001 mg/ml Aprotinin, 0,01 mM Antipain, 0,01 mM E 64, 0,01 mM Pepstatin, 1 mM AEBSF, 10 mM Glutathion, 5 mM DTT, pH 7,0 bei 5°C) mit ansteigenden

Sucrosekonzentrationen (0,5 M; 1,0 M; 1,5 M) und abschließend für zwei Stunden bei einer Sucrosekonzentration von 2,0 M in der verschlossenen Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Faserbündel in 15-20 mm lange Stücke geschnitten, in flüssigem Propan eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

### *3.2.2.2 Präparation von Myosin aus einzelnen Muskelfasern*

Ein wie unter 3.2.2.1 eingefrorenes Faserbündel wurde in etwa 10 ml Skinning Solution auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde das Bündel in einer mit Sylgard ausgegossenen Plexiglaskammer unter Skinning Solution an beiden Enden fixiert und Einzelfasern mit einer feinen Pinzette in Längsrichtung herausgezogen (Yu und Brenner, 1989). Einzelne Muskelfasern wurden auf einer ausgezogenen und zugeschmolzenen Glaskapillare aufgespult und in einem Volumen von 5  $\mu$ l Myosin-Extraktionspuffer (500 mM NaCl, 10 mM Hepes, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM MgATP, 30 mM DTT) pro Faser 30 Minuten auf Eis extrahiert. Dann wurden die Glaskapillaren mit den Faserresten aus dem Extraktionspuffer entfernt und die Lösungen entweder im *in vitro* Motilitätsassay eingesetzt oder mit Latexbeads inkubiert, welche für PFM-Experimente benutzt wurden.

## 3.2.3 Präparation von Aktinfilamenten

### *3.2.3.1 Präparation von G-Aktin*

Die Präparation von G-Aktin wurde modifiziert auf der Grundlage einer Literaturvorgabe (Pardee und Spudich, 1982) durchgeführt. Etwa 300 g Rückenmuskulatur wurden einem Kaninchen entnommen und sofort auf Eis gelegt. Anschließend wurde das Muskelgewebe mit einem vorgekühlten Fleischwolf zerkleinert und Myosin 12 min unter mehrmaligem Umrühren mit einem Glasstab in einem 3fachen Volumen Extraktionslösung A (500 mM KCl, 100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM PMSF) extrahiert. Das Pellet aus einer Zentrifugation (8000 rpm, 4°C, in einer Kontron Centrifuge mit Rotor A6.9) wurde zweimal je 10 Minuten in einem gleichen Volumen wie bei der vorherigen Extraktion in Extraktionslösung B (500 mM KCl, 130 mM KHCO<sub>3</sub>) extrahiert. Zwischen den beiden Extraktionen wurde 15 Minuten (4000 rpm, 4°C, in einer Kontron Centrifuge mit Rotor A6.9) zentrifugiert. An das Aufnehmen des Pellets in einem Liter destilliertem Wasser und Einstellen des pH-

Wertes auf 8,6 schloss sich eine erneute Zentrifugation (4000 rpm, 4°C, in einer Kontron Centricon Kühlzentrifuge mit Rotor A6.9) an. Das daraus resultierende Pellet wurde drei- bis viermal mit destilliertem Wasser gewaschen, bis es gerade zu quellen begann, und nun viermal in etwa 4°C kaltem Aceton aufgenommen, ca. 15 Minuten stehen lassen und in einem doppelt gelegten Mulltuch ausdrückt. Das Aktin-Aceton-Pulver wurde in einer Petrischale ausgebreitet und über Nacht unter dem Abzug getrocknet, am nächsten Tag gewogen und bei -20°C eingefroren. 9 g des Aktin-Aceton-Pulvers wurden in 180 ml Extraktionslösung C (2 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,2 mM Na<sub>2</sub>ATP, 0,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,005 % NaN<sub>3</sub>, 0,5 mM DTT) auf Eis 30 Minuten unter Rühren extrahiert. Der Überstand der anschließenden 20 minütigen Zentrifugation in einer Kontron Centricon Kühlzentrifuge mit Rotor A8.24 bei 4°C und 20000 rpm wurde über Glaswolle filtriert und sein Volumen bestimmt. Durch Zugabe von festem KCl, MgCl<sub>2</sub>- und Na<sub>2</sub>ATP-Lösungen zum Überstand wurden zur Polymerisation des G-Aktins zu Filamenten Konzentrationen von 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM Na<sub>2</sub>ATP eingestellt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde festes KCl bis zu einer Endkonzentration von 600 mM zugegeben und unter gelegentlichem Rühren 30 Minuten inkubiert. Das entstandene F-Aktin wurde in der anschließenden, eine Stunde dauernden Zentrifugation bei 4°C mit 45000 rpm in einer Kontron Centricon Ultrazentrifuge mit Rotor TFT 70.38 als Pellet abgetrennt und nun in 27 ml Extraktionslösung C mit Hilfe eines vorgekühlten Dounce-Homogenisators resuspendiert. Es folgte eine Dialyse über Nacht gegen einen Liter Extraktionslösung C, die noch zweimal, ebenfalls über Nacht, wiederholt wurde. Am insgesamt 6. Tag der Präparation wurde bei 4°C mit 45000 rpm in einer Kontron Centricon Ultrazentrifuge mit Rotor TFT 70.38 für eine Stunde zentrifugiert und das vollständig depolymerisierte Aktin im Überstand erhalten. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Lösung tropfenweise in flüssigen Stickstoff gegeben und anschließend bei -80°C gelagert.

### 3.2.3.2 Biotinylierung von G-Aktin

Wie beschrieben (Ishijima *et al.*, 1998) wurde das in Extraktionslösung C eingefrorene G-Aktin zunächst in Aktin-Polymerisationspuffer (100 mM KCl, 10 mM Hepes, pH 7,0) mit 0,8 mg/ml Aktin polymerisiert und dabei zur Entfernung des in der Extraktionslösung C vorhandenen DTT über Nacht bei 4 °C gegen Aktin-

Polymerisationspuffer dialysiert (Dialyseschläuche mit MWCO 12 kD, Sigma). 1 mg Biotin-PEAC5-maleimide (Dojindo, Gerbu, Gaiberg, Deutschland) wurden in 150 µl DMSO gelöst und bei 25 °C mit der nun Aktinfilamente enthaltenden Lösung gemischt und für 60 Minuten bei 25 °C inkubiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation in einer Kontron Centricon Ultrazentrifuge mit Rotor TFT 70.38 bei 38000 rpm für eine Stunde bei 4 °C wurden die Filamente durch Resuspendieren in Aktin-Polymerisationspuffer gewaschen und nochmals für eine Stunde unter den gleichen Bedingungen wie vorher zentrifugiert. Nun wurden die Aktinfilamente wieder in Extraktionslösung C (ohne NaN<sub>3</sub>) zum Depolymerisieren aufgenommen und gegen diesen Puffer über Nacht bei 4 °C dialysiert (Dialyseschläuche mit MWCO 12 kD, Sigma). Am nächsten Tag wurden die nicht depolymerisierten Aktinfilamente durch eine Zentrifugation 32000 rpm für 70 Minuten bei 4 °C abgetrennt und das biotinylierte G-Aktin aus dem Überstand in Aliquots in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.2.3.3 *Darstellung von Aktinfilamenten*

Orientiert an gängiger Literatur (Harada *et al.*, 1987) wurden zur Polymerisation von G-Aktin zu Aktinfilamenten 2,5 µM G-Aktin zu einer Lösung von 100 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7,0 (Aktin-Polymerisationspuffer) und 5 µM TRITC-Phalloidin (Rh-Ph) zugegeben. Polymerisation fand über Nacht bei 4 °C statt. Ebenso erfolgte die Polymerisation von biotinyliertem Aktin zu fluoreszenzmarkierten Filamenten. Zur Darstellung von nicht markierten Aktinfilamenten wurden ebenfalls die oben beschriebenen Lösungen zusammengegeben, jedoch wurden anstelle der 5 µM TRITC-Phalloidin nur 5 µM Phalloidin zugesetzt.

### 3.2.4 Der Myosin- *in vitro* Motilitätsassay

Grundformen des *in vitro* Motilitätsassays wurden von der Literatur (Kron *et al.*, 1991; Thedinga *et al.*, 1999) übernommen und modifiziert. Für die Durchführung der *in vitro* Motilitätsassays wurden Durchflusskammern mit Kammervolumina von etwa 5 µl verwendet. Auf einen gereinigten, der Länge nach geviertelten Standardobjektträger wurden in einem Abstand von etwa 5 mm zwei Streifen doppelseitiges Klebeband parallel aufgeklebt, auf die ein gereinigtes Standarddeckglas gedrückt wurde. Diese Durchflusskammer wurde frisch mit 6 µl Assaypuffer AB/BSA (25 mM Imidazol, pH

7,4, 25 mM NaCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 10 mM DTT, 10 mg/ml D-Glukose, 10 U/ml Glukoseoxidase, 800 U/ml Katalase, 1 mg/ml BSA) und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch die Glasoberflächen mit BSA beschichtet wurden. Nun wurden 3 µl Myosinlösung eingespült. Nach einer Inkubationsdauer von 30 Sekunden wurde das nicht an die Oberfläche gebundene Probenmaterial mit 10 µl Assaypuffer AB/BSA ausgespült. Anschließend wurden 0,3 µl einer 1+9-Verdünnung einer Lösung von unmarkierten Aktinfilamenten in Assaypuffer AB (25 mM Imidazol, pH 7,4, 25 mM NaCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 10 mM DTT, 10 mg/ml D-Glukose, 10 U/ml Glukoseoxidase, 800 U/ml Katalase) eingespült. Nach 30 Sekunden wurde nochmals mit 10 µl Assaypuffer AB/BSA gespült und 0,3 µl 1+9-Verdünnung von fluoreszenzmarkierten Aktinfilamenten in Assaypuffer AB in die Kammer eingebracht. Nach nochmaligem Spülen mit Puffer AB/BSA wurde der Assay mit 10 µl Assaypuffer AB/BSA/ATP (25 mM Imidazol, pH 7,4, 25 mM NaCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 10 mM DTT, 10 mg/ml D-Glukose, 10 U/ml Glukoseoxidase, 800 U/ml Katalase, 1 mg/ml BSA, 2 mM MgATP) gestartet und untersucht.

Das Gleiten von sowohl biotinylierten als auch von unbiotinylierten TRITC-Phalloidin markierten Aktinfilamenten wurde mit einem *Total Internal Reflection Fluorescence Microscope* (TIRFM) (Axelrod, 1989) mit einem Ölimmersionsobjektiv (PlanApo, 100x, NA 1.40, Olympus, Japan) beobachtet. Das von den Aktinfilamenten emittierte Licht wurde über ein System bestehend aus einem Bildverstärker (VS4-1845, Video Scope), einer Hamamatsu ICCD-Kamera C 2400-87, einem Kontrollgerät Hamamatsu II Controller und einem Hamamatsu Argus-10 *Image Prozessor* Bildverarbeitungssystem einem Panasonic S-VHS-Videorecorder AG-7355-E zugeführt und aufgenommen. Zur Messung der Gleitgeschwindigkeiten von Aktinfilamenten wurden auf dem Videomonitor die Spitzen der Aktinfilamente manuell an unterschiedlichen Positionen während ihrer Wanderung markiert. Die Zeitdifferenzen und die dazugehörigen Wegstrecken wurden von dem Programm Mark-V (Sheetz *et al.*, 1986) aufgenommen und später durch ein Verrechnungsprogramm (geschrieben von E. Meyhöfer) in Geschwindigkeiten umgerechnet.

### 3.2.5 PFM - Versuche mit Myosin

Die Myosin-Versuche mit dem *Photonic Force Microscope* wurden in einer Durchflusskammer mit einem Kammervolumen von etwa 10 µl durchgeführt. Die

verwendeten Deckgläser (der Breite nach halbierte Gläser der Firma VWR Scientific, 22x60 mm) wurden vor dem Gebrauch in einer 2 %igen Hellmanex®II-Lösung (Hellma, Müllheim, Deutschland) im Ultraschallbad gereinigt und nach zweimaligem Spülen mit doppelt destilliertem Wasser über Nacht bei 70 °C getrocknet. Die Oberflächen der Durchflusskammer wurden mit dem Biotinbindungsprotein Neutravidin durch Einspülen einer Lösung von 1 mg/ml Neutravidin (Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande) in Assaypuffer AB 5 Minuten bei Raumtemperatur beschichtet. Anschließend wurde das in Lösung verbliebene Neutravidin mit 30 µl Assaypuffer AB ausgespült. Nun wurden 10fach in Assaypuffer AB verdünnte fluoreszenzmarkierte biotinylierte Aktinfilamente in die Kammer injiziert und auf den Oberflächen innerhalb von 30 Sekunden immobilisiert. Durch Spülen und Inkubation mit Assaypuffer AB/BSA für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden dann die Kammeroberflächen mit BSA gegen nicht-spezifische Adhäsionen blockiert.

Als Sonden für die Messungen mit dem *Photonic Force Microscope* wurden homogen gefärbte, rot fluoreszierende (580/605) Latexbeads (FluoSpheres, Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande) mit einem Durchmesser von 500 nm benutzt. Die carboxylat-modifizierten Latexbeads wurden vor Gebrauch für 15 Minuten bei 1-2 °C durch 20faches Verdünnen in Assaypuffer AB/BSA mit BSA beschichtet und so gegen nicht-spezifische Adhäsionen blockiert. Diese mit BSA beschichteten *beads* wurden zu Kontrollmessungen oder zur weiteren Beschichtung mit Myosinmolekülen verwendet. Dazu wurden 99 µl der *beads* bei 1-2 °C für 15 Minuten mit 1 µl einer 100fach in Myosin-Extraktionspuffer verdünnten Lösung von frisch extrahiertem Skelettmuskelmyosin (~0.1 nM Myosin und 0.1 % *beads*) inkubiert. Bei den Experimenten wurden die *beads* üblicherweise 100fach in dem jeweiligen Puffer verdünnt.

Einzelne Latexbeads wurden während der Experimente in einer optischen Falle mit einem *Super-low-noise* Laser einer Wellenlänge von 1064 nm (CrystaLaser, Reno, USA) nahe der unteren Kammeroberfläche gefangen. Nach einer anschließenden Kalibration der Detektorantwort etwa 2 µm oberhalb der Kammeroberfläche zur genauen Bestimmung der x-, y- und z-Positionen der gefangenen *beads* wurde die Sonde durch Bewegen der Probenkammer mittels eines piezoelektrischen Tisches (Queensgate, Torquay, England) oberhalb eines Aktinfilaments positioniert.

Die Positionen und Ausrichtungen der Aktinfilamente wurden mit einem in das PFM integrierten *Total Internal Reflection Fluorescence Microscope* (TIRFM) (Axelrod,

1989) mit einem Ölimmersionsobjektiv (PlanApo, 100x, NA 1.40, Olympus, Japan) bestimmt. Dabei wurden die Fluophore von einem frequenzgedoppelten Nd:YAG-Laser (Laser2000, Wessling, Deutschland) mit einer Wellenlänge von 532 nm angeregt. Das von den Aktinfilamenten emittierte Licht wurde über eine Orca ER ICCD-Kamera (Hamamatsu, Japan) mit zugehöriger *framegrabber*-Karte mit einem Computer aufgenommen. Es wurden für die Versuche Aktinfilamente ausgewählt, die keine Instabilität bezüglich der Anheftung an die Glasoberfläche zeigten und die zur besseren Auswertung der Ergebnisse eine möglichst ideale Ausrichtung entlang der x- oder y-Achse zeigten. Nun wurde der Fokus der optischen Falle über Bewegen des Objektivs durch einen Piezopositionierer (PI-foc, Physikinstrumente, Karlsruhe, Deutschland) näher an die Kammeroberfläche gebracht, um ein Anbinden des an der Sondenoberfläche gebundenen Motormoleküls an das Aktinfilament zu ermöglichen. Die Positionen des Latexbeads wurden dabei mit einer Zeitauflösung von 100 kHz beobachtet. Nach erfolgreichem Anbinden der Sonde an das Aktinfilament wurden mehrfach die Position der optischen Falle relativ zur Oberfläche um 100 nm längs und quer zum Aktinfilament durch Verschieben der Probenkammer verändert und die Sondenpositionen registriert.

### **3.3 Kinesinexperimente**

#### 3.3.1 Kinesin

Die zweiköpfigen Kinesinmoleküle wurden freundlicherweise von Jonathon Howard (Department of Physiology and Biophysics, University of Washington, jetzt Max Planck Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden) zur Verfügung gestellt. Das Gen für die vollständige schwere Kinesinkette von *Drosophila melanogaster* (Yang *et al.*, 1989) mit C-terminalem Histidin-*tag* wurde in ein pET5-Plasmid (Novagen, Madison, USA) eingebracht und in *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Novagen, Madison, USA) exprimiert (Hancock und Howard, 1998). Nach Lysieren der Zellen erfolgte eine Aufreinigung der Produkte über eine 40 ml Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarosesäule (Quiagen, Santa Clarita, USA). Die Reinheit der Kinesinmoleküle wurde durch eine anschließende Succrose-Dichtegradienten-Zentrifugation weiter erhöht, bevor die Moleküle in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden.

### 3.3.2 Darstellung von polaritätsmarkierten, biotinylierten Mikrotubuli

250 µg Tubulin (Rinderhirntubulin, ProduktNr. T238, Cytoskeleton) wurden in 25 µl Puffer MB0 (80 mM PIPES, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, pH 6,8) gelöst. 60 µg biotinyliertes Rinderhirntubulin (T333, Cytoskeleton) und 60 µg rhodaminmarkiertes Rinderhirntubulin (T331, Cytoskeleton) wurden in jeweils 10 µl aufgenommen. Alle Puffer wurden vor Gebrauch mit einem Filter der Porengröße 0,1 µm (Millex<sup>®</sup>-Filter, Millipore) gefiltert. Anschließend wurden die drei Tubulin-Lösungen separat für 35 Minuten in einer Beckman-Tischultrazentrifuge mit Rotor TLA100 bei 4 °C mit 70000 rpm zentrifugiert, um größere Tubulin-Aggregate und Verunreinigungen abzuzentrifugieren. Um sehr stark fluoreszierende Polymerisationskeime der Mikrotubuli, sogenannte *seeds*, zu erhalten, wurden nun zu 8 µl der Lösung des rhodaminmarkierten Rinderhirntubulins 4 µl des Puffers MB0-GTP (80 mM PIPES, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 4 mM GTP, pH 6,8) zugegeben und für 2 Minuten bei 37 °C inkubiert, wodurch die Polymerisation gestartet wurde. Nach diesen 2 Minuten wurden dann 23 µl Tubulinlösung, 9 µl biotinyliertes Tubulin und 25 µl Puffer MB0-GTP hinzugegeben. Die Polymerisation zu längeren Mikrotubuli fand 30 Minuten bei 37 °C statt und wurde durch Zugabe von 70 µl einer warmen 25 µM Taxol-Lösung (aus einer 10 mM Taxol-*stock*-Lösung in DMSO) in Puffer MB0 gestoppt. Durch die Polymerisation ausgehend von den stark fluoreszenzmarkierten *seeds* wurden die Mikrotubuli polarisationsmarkiert. Die *seeds* finden sich am langsam wachsenden Ende der Mikrotubuli, dem Minus-Ende, wieder, während das Plus-Ende schwächer markiert bleibt.

### 3.3.3 Der Kinesin- *in vitro* Motilitätsassay

Grundformen des *in vitro* Motilitätsassays wurden von der Literatur (Woehlke *et al.*, 1997) übernommen und modifiziert. Für die Durchführung der Kinesin- *in vitro* Motilitätsassays wurden Durchflusskammern mit Kammervolumina von etwa 10 µl verwendet. Die Kammern wurden so wie für Myosin- *in vitro* Motilitätsassays hergestellt und die verwendeten Deckgläser (der Breite nach halbierte Gläser der Firma VWR Scientific, 22x60 mm) wurden vor dem Gebrauch in einer 2 %igen Hellmanex<sup>®</sup> II-Lösung (Hellma, Müllheim, Deutschland) im Ultraschallbad gereinigt und nach zweimaligem Spülen mit doppelt destilliertem Wasser über Nacht bei 70 °C getrocknet. Die Durchflusskammer wurde frisch mit 10 µl Puffer MB1 (80 mM PIPES,

2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 50 mM KCl, 10 mM DTT, 10 mg/ml D-Glukose, 10 U/ml Glukoseoxidase, 800 U/ml Katalase, 1 mg/ml Casein, pH 6,8) und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch die Glasoberflächen mit Casein beschichtet wurden. Nun wurden 10 µl einer 1 nM Kinesinlösung in Puffer MB1 eingespült. Nach einer Inkubationsdauer von etwa 5 Minuten wurde das nicht an die Oberfläche adsorbierte Kinesin mit 30 µl Puffer MB1 ausgespült. Anschließend wurde eine 1+9-Verdünnung von fluoreszenzmarkierten, biotinylierten Mikrotubuli in Puffer MB1 mit 20 µM Taxol in die Kammer eingebracht. Nach nochmaligem Spülen mit 30 µl Puffer MB1 mit 20 µM Taxol wurde der Assay mit 10 µl MB1 mit 20 µM Taxol und 1 mM MgATP gestartet und untersucht.

Das Gleiten von fluoreszenzmarkierten biotinylierten Mikrotubuli wurde mit einem *Total Internal Reflection Fluorescence Microscope* (TIRFM) (Axelrod, 1989) mit einem Ölimmersionsobjektiv (PlanApo, 100x, NA 1.40, Olympus, Japan) beobachtet. Dabei wurden die Fluophore von einem frequenzdoppelten Nd:YAG-Laser (Laser2000, Wessling, Deutschland) mit einer Wellenlänge von 532 nm angeregt. Das von den Mikrotubuli emittierte Licht wurde über eine Orca ER ICCD-Kamera (Hamamatsu, Japan) mit zugehöriger *framegrabber*-Karte mit einem Computer aufgenommen und deren Gleitgeschwindigkeiten bestimmt.

### 3.3.4 PFM - Versuche mit Kinesin

Die Kinesin-Versuche mit dem *Photonic Force Microscope* wurden in Durchflusskammern mit Kammervolumina von etwa 10 µl durchgeführt. Die Oberflächen der Durchflusskammern wurden durch Einspülen einer Lösung von 0,1 mg/ml Neutraavidin (Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande) in Puffer MB0 5 Minuten bei Raumtemperatur mit Neutraavidin beschichtet. Nach Spülen mit 30 µl Puffer MB0 wurden nun in Puffer MB0 mit 20 µM Taxol 10fach verdünnte fluoreszenzmarkierte biotinylierte Mikrotubuli in die Kammer eingespült und auf den Oberflächen innerhalb von 30 Sekunden immobilisiert. Durch Spülen und Inkubation mit Puffer MB1 für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden dann die Kammeroberflächen mit Casein gegen nicht-spezifische Adhäsionen blockiert.

Als Sonden für die Messungen mit dem *Photonic Force Microscope* wurden homogen gefärbte, rot fluoreszierende (580/605) Latexbeads (FluoSpheres, Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande) mit einem Durchmesser von 500 nm

benutzt. Die carboxylat-modifizierten Latexbeads wurden vor Gebrauch für 15 Minuten durch 20faches Verdünnen in Puffer MB0 mit 1 mg/ml Casein bei 1-2 °C mit Casein beschichtet und so gegen nicht-spezifische Adhäsionen blockiert. Diese *beads* wurden zu Kontrollmessungen oder zur weiteren Beschichtung mit Kinesinmolekülen verwendet. Dazu wurden 20 µl der mit Casein beschichteten Mikrosphären bei 1-2 °C für 15 Minuten mit einer in Puffer MB1 verdünnten Kinesinlösung (~0.005 nM Kinesin und 0.1 % *beads*) und 1 µl 1M KCl inkubiert. Bei den Experimenten wurden die *beads* üblicherweise 100fach in dem jeweiligen Puffer verdünnt. Einzelne Latexbeads wurden während der Experimente in einer optischen Falle mit einem *Super-low-noise* Laser einer Wellenlänge von 1064 nm (CrystaLaser, Reno, USA) nahe der unteren Kammeroberfläche gefangen. Nach einer anschließenden Kalibration der Detektorantwort etwa 2 µm oberhalb der Kammeroberfläche zur genauen Bestimmung der x-, y- und z-Positionen der gefangenen *beads* wurde die Sonde durch Bewegen der Probenkammer mittels eines piezoelektrischen Tisches (Queensgate, Torquay, England) oberhalb eines einzelnen Mikrotubulus positioniert, dessen Position und Ausrichtung durch Fluoreszenzmikroskopie bestimmt wurde. Nun wurde der Fokus der optischen Falle über Bewegen des Objektivs durch einen Piezopositionierer (PI-foc, Physikinstrumente, Karlsruhe, Deutschland) näher an die Kammeroberfläche gebracht, um ein Anbinden des an der Sondenoberfläche gebundenen Kinesinmoleküls an den Mikrotubulus zu ermöglichen. Die Positionen des Latexbeads wurden dabei mit einer Zeitauflösung von 100 kHz beobachtet. Nach erfolgtem Anbinden der Sonde an den Mikrotubulus wurde mehrfach die Position der optischen Falle relativ zur Oberfläche um 100 nm längs und quer zum Mikrotubulus durch Verschieben der Probenkammer verändert und die Sondenpositionen registriert.

### **3.4 Datenaufnahme und -analyse**

Das von der in der optischen Falle gefangenen Mikrosphäre erzeugte Interferenzmuster wurde auf eine InGaAs-Quadranten Photo Diode (Hamamatsu, Japan) projiziert, und die von den Lichtintensitäten in den verschiedenen Quadranten resultierenden Differenzströme wurden über eine Datenaquisitionskarte (PCI-6110E, National Instruments, München, Deutschland) mit einem Computer aufgenommen. Kalibration der Positionssignale und deren Analyse wurde mit einem auf der

Auswertesoftware Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, USA) basierendes System, modifiziert von Stephan Altmann, EMBL Heidelberg, durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Experimente mit Myosinmolekülen

Die einzelnen Myosinextrakte wurden jeweils unmittelbar nach der Muskelfaserextraktion mittels des *in vitro* Motilitätsassays auf unversehrte Myosinfunktion getestet, bevor diese Myosinlösungen mit BSA beschichteten Latexbeads inkubiert und mit dem *Photonic Force Microscope* untersucht wurden. Ein Beispiel eines solchen *in vitro* Motilitätsassays ist in Abbildung 4.1 gezeigt. Fluoreszenzmarkierte, biotinylierte Aktinfilamente wurden von frisch extrahierten Myosinmolekülen, die auf dem BSA beschichteten Kammerboden adsorbiert waren, in Pfeilrichtung von Bild zu Bild bewegt. In zwei Fällen ist die jeweils zwischen den Einzelbildern ungefähr zurückgelegte Strecke durch weiße Punkte angedeutet.

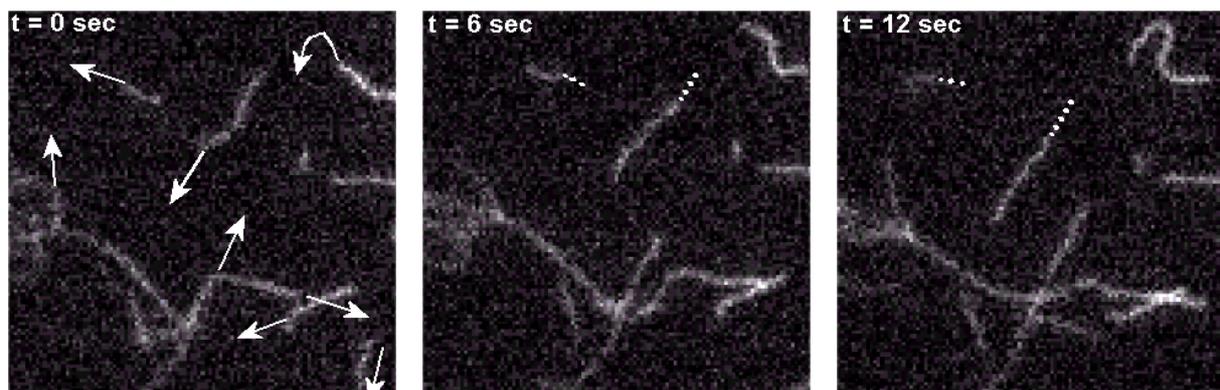


Abbildung 4.1: Beispiel eines Aktin-Gleitassays zur Kontrolle eines Myosinextrakts vor der Inkubation mit BSA vorbeschichteten Latexmikrosphären, aufgenommen mit dem im PFM integrierten TIRFM. Rhodaminmarkierte, biotinylierte Aktinfilamente wurden von frisch aus Muskelfasern extrahierten Myosinmolekülen (in Pfeilrichtung) bewegt. In zwei Fällen ist die jeweils zwischen den Einzelbildern ungefähr zurückgelegte Strecke durch weiße Punkte angedeutet.

#### 4.1.1 Elastizität einzelner, in Abwesenheit von ATP an Aktinfilamente gebundener Myosinmoleküle

Abbildung 4.2 zeigt eine Aufnahme eines fluoreszenzmarkierten Latexbeads (gelb) mit einem Durchmesser von 500 nm, auf dessen mit BSA beschichteter Oberfläche Myosin in sehr geringer Dichte adsorbiert war. Rhodamin-Phalloidin markierte, biotinylierte Aktinfilamente (rot) wurden auf dem mit Neutravidin beschichteten Boden der Versuchskammer vereinzelt immobilisiert. In Abwesenheit von ATP kam es zum

Anheften eines einzelnen Myosinmoleküls an ein Aktinfilament, in dessen Nähe das Latexbead mittels der optischen Pinzette des PFM gebracht wurde.

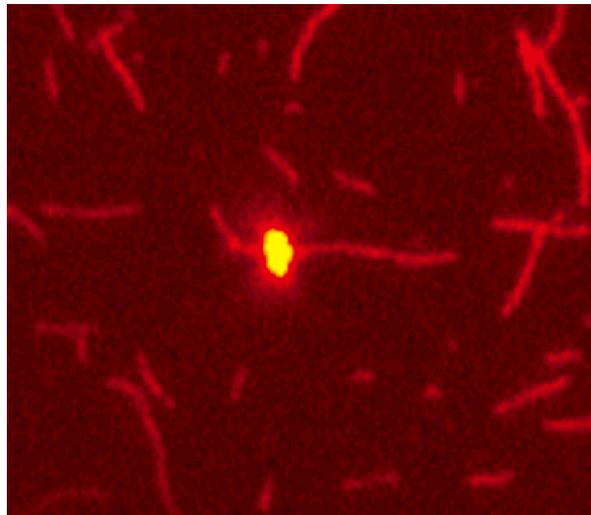


Abbildung 4.2: Bild eines fluoreszenzmarkierten Latexbeads (gelb) mit einem Durchmesser von 500 nm, auf dessen mit BSA beschichteter Oberfläche Myosin in sehr geringer Dichte adsorbiert war: Das Latexbead war in Abwesenheit von ATP fest an ein Rhodamin-Phalloidin markiertes, biotinyliertes Aktinfilament (rot), welches auf dem mit Neutravidin beschichteten Kammerboden immobilisiert war, angebunden. Die horizontalen und vertikalen Achsen des Bildes entsprechen in den folgenden Daten der x- beziehungsweise y-Achse.

Wie ebenfalls aus Abbildung 4.2 zu ersehen ist, wurden für die anschließenden Experimente mit dem Photonischen Kraftmikroskop nur solche Aktinfilamente ausgewählt, die entlang der horizontalen beziehungsweise der vertikalen Achse, entsprechend der x- und der y-Achsen in den aufgenommenen Daten, ausgerichtet waren. Es wurden auch nur Präparationen Myosin tragender Latexbeads für die Experimente mit dem PFM verwendet, von denen maximal die Hälfte von zwanzig *beads* in Abwesenheit von ATP an Aktinfilamente anbanden. Diese Auswahl der Latexbeadpräparationen sollte die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass pro *bead* die Anzahl von adsorbierten Myosinmolekülen im Mittel kleiner als eins war und somit Messungen an einzelnen Myosinmolekülen erst möglich wurden. Dies soll in der Diskussion ausführlicher beschrieben werden.

Vor dem Anbinden eines Myosinmoleküls auf der Beadoberfläche an ein Aktinfilament auf dem Kammerboden verteilten sich die Positionen des in der sehr schwachen Laserfalle gefangenen Latexbeads im dreidimensionalen Raum in der Form einer aufrecht stehenden Zigarre. Diese Gestalt wurde durch die thermischen

Fluktuationen des Latexbeads im Potential der Laserfalle vorgegeben und gilt gleichermaßen für Partikel mit und ohne Myosinmoleküle auf der Oberfläche. Ein Beispiel einer solchen dreidimensionalen Positionsverteilung ist auf der linken Seite der Abbildung 4.3 gezeigt. Dort ist eine Darstellung dieser zigarrenförmigen dreidimensionalen Positionsverteilung als (graue) Oberfläche von Positionen gleicher Wahrscheinlichkeit zu sehen. Auf der rechten Seite der Abbildung ist eine farbkodierte Darstellung eines Schnittes entlang der  $x$ -/ $z$ -Achse durch die der dreidimensionalen Positionsverteilung entsprechenden Energielandschaft gezeigt. Orte hoher Aufenthaltswahrscheinlichkeit sind hier blau, Orte höherer Energie und entsprechend niedriger Aufenthaltswahrscheinlichkeit rot dargestellt.

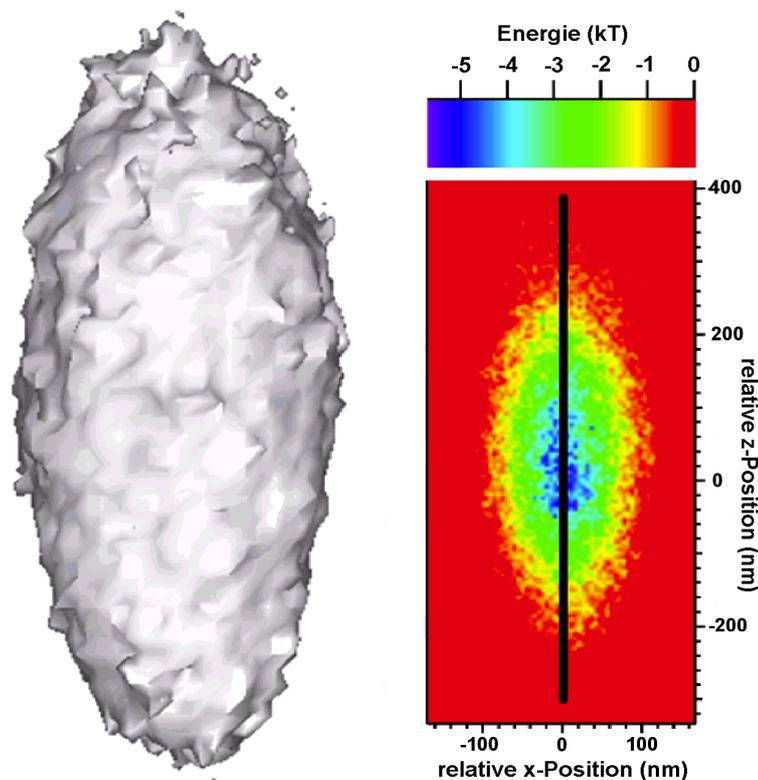


Abbildung 4.3: Darstellung der dreidimensionalen Positionsverteilung einer etwa 3  $\mu\text{m}$  oberhalb des Kammerbodens in einer schwachen Laserfalle gefangenen Mikrosphäre: Auf der linken Seite der Abbildung wurden Positionen gleicher Aufenthaltswahrscheinlichkeit als (graue) Oberfläche dargestellt. Die rechte Seite zeigt einen farbkodierten Schnitt durch die der dreidimensionalen Positionsverteilung entsprechenden Energielandschaft entlang der  $x$ -/ $z$ -Achse. Orte hoher Energie sind rot, Orte niedriger Energie blau dargestellt.

Rohdaten von mit dem Photonischen Kraftmikroskop registrierten Positionssignalen eines Latexbeads mit einem Myosinmolekül auf seiner Oberfläche sind in Abbildung

4.4 A gezeigt. Die Spannungssignale der Positionsdetektion sind für alle drei Raumachsen dargestellt. Zusätzlich wurde auch noch die relative Höhe (z-Position) des Fokus der Laserfalle aufgezeichnet. Während der ersten 20 Sekunden diffundierte das Latexbead ungebunden innerhalb des Potentials der Laserfalle umher und beschrieb die schon erwähnte zigarrenförmige Gestalt. Nach etwa 12 Sekunden wurde das *bead* im Fokus der optischen Falle entlang der z-Achse näher an den Boden der Versuchskammer bewegt. Vorher wurde das gefangene Partikel direkt oberhalb eines auf dem Kammerboden immobilisierten Aktinfilaments positioniert. Wie anhand der geringen Verkleinerung der Spannungssignale in z-Kanal zu sehen ist, berührte die gefangene Mikrosphäre nach etwa 20 Sekunden leicht den Untergrund, ohne jedoch an das dort befindliche Aktinfilament zu binden. Der Fokus der optischen Falle wurde nun, wie aus dem vierten Kanal in Abbildung 4.4 A ersichtlich ist, noch etwas näher an den Kammerboden gebracht. Nach insgesamt 32 Sekunden kam es zu einer drastischen Reduktion der Fluktuationen des z-Signals. Sowohl das x- als auch y-Signal waren davon nicht betroffen. Angemerkt sei hierbei, dass zum Zeitpunkt der Reduktion der Fluktuationen die z-Position des Fallenfokus nicht mehr verändert wurde. Die Verminderung der Fluktuationen des z-Signals repräsentiert das Anbinden des Myosin tragenden Latexbeads in ATP-freier Lösung an das Aktinfilament auf dem Kammerboden und wurde in Abbildung 4.4 B noch einmal vergrößert dargestellt. Die Zeitskala wurde gegenüber Abbildung 4.4 A verändert. Zusätzlich wurden noch die Federkonstanten der Fluktuationen des in der Laserfalle gefangenen Latexbeads entlang der z-Achse innerhalb von Zeitfenstern von jeweils 250 Millisekunden durch rote Kreuze angegeben. Ihre vertikalen Balken stellen 95 %-Wahrscheinlichkeitsintervalle der effektiven Federkonstanten dar. Mit der Reduktion des thermischen Rauschens der z-Position kam es zu einem signifikanten Anstieg der Elastizität, in diesem Fall um etwa Faktor vier von Werten um 0,003 pN/nm auf Werte von durchschnittlich etwa 0,014 pN/nm. Weder bei den x- noch bei den y-Steifheiten kam es zu solch starken Änderungen durch das Anbinden des Latexbeads an das Aktinfilament. Die größeren Fehler bei den z-Steifigkeiten nach Anbinden des *beads* in Vergleich zum ungebundenen Zustand resultieren aus einer Asymmetrie der Steifigkeit der Verbindung zwischen Latexbead und Oberfläche entlang der z-Achse. Diese Asymmetrie ist außerdem der Grund dafür, dass die in diesem Beispiel angegebenen durchschnittlichen Steifigkeitswerte nach Anbinden

des *beads* zu niedrig kalkuliert wurden, und sie soll zu einem späteren Zeitpunkt näher beschrieben werden.

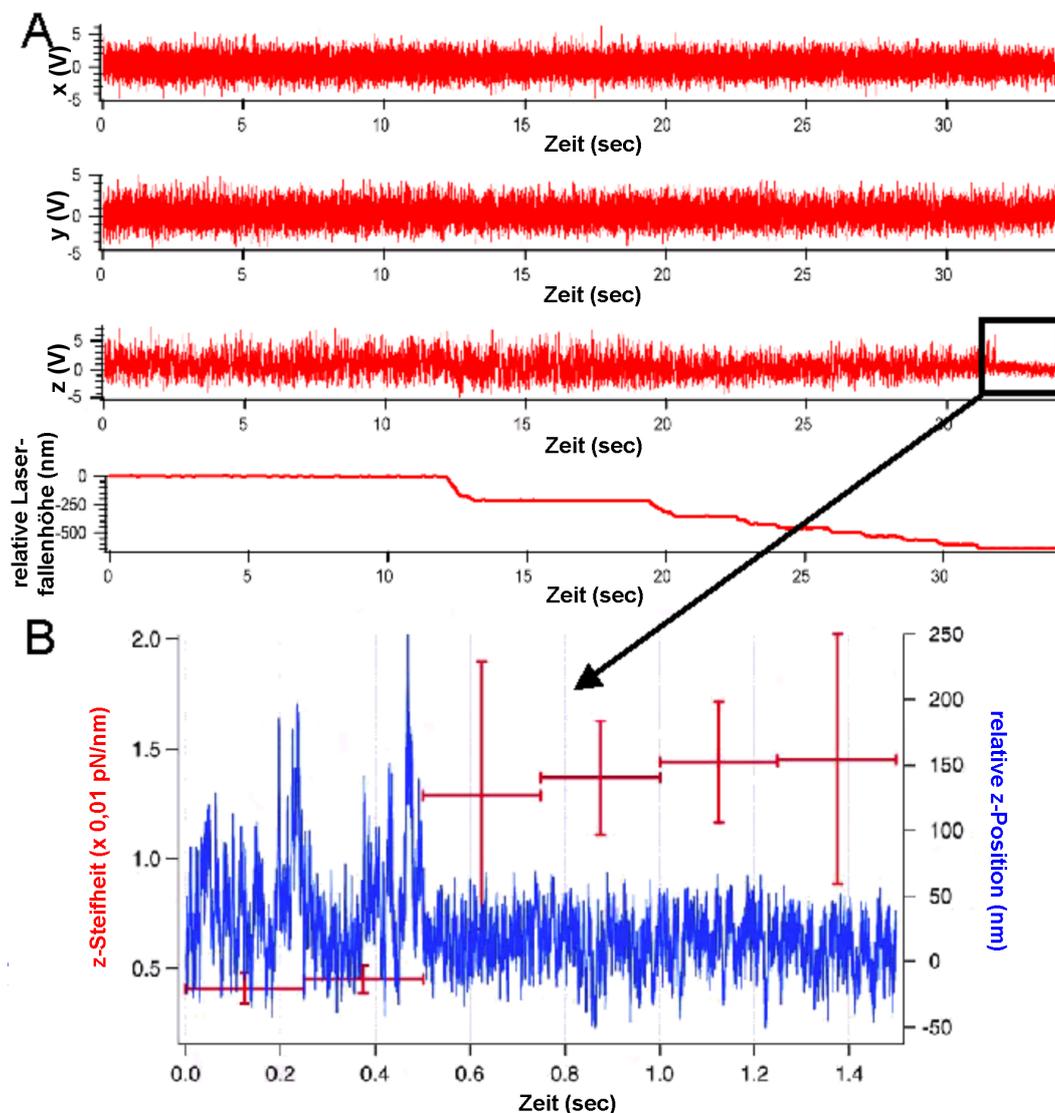


Abbildung 4.4: Rohdaten von mit dem Photonischen Kraftmikroskop aufgenommenen Positionssignalen eines Latexbeads mit einem Myosinmolekül auf seiner Oberfläche bei der Annäherung an ein Aktinfilament auf dem Kammerboden. A: Spannungssignale der Positionsdetektion für alle drei Raumachsen (Kanäle 1 bis 3) und die relative Höhe (z-Position) des Fokus der Laserfalle (Kanal 4). Nach etwa 20 Sekunden wurde das Latexbead leicht gegen das Aktinfilament gedrückt. Ungefähr 11 Sekunden später kam es zum Anbinden. B: Vergrößerte Darstellung des  $z$ -Signals während des Anbindens. Die Fluktuationen der Mikrosphäre entlang der  $z$ -Achse (blau) und die Steifheiten entlang der  $z$ -Achse innerhalb von 250 Millisekunden langen Zeitfenstern (rote Kreuze) sind gegen die Zeit aufgetragen. Die vertikalen Balken der Steifheiten stellen 95 %-Wahrscheinlichkeitsintervalle der effektiven Federkonstanten dar. Die Zeitskala wurde gegenüber A verändert.

Als das Latexbead über ein Myosinmolekül auf seiner Oberfläche an ein auf dem Kammerboden immobilisiertes Aktinfilament anband, wurde seine thermische Fluktuation im Vergleich zu seinen Fluktuationen in der schwachen Laserfalle stark eingeschränkt.

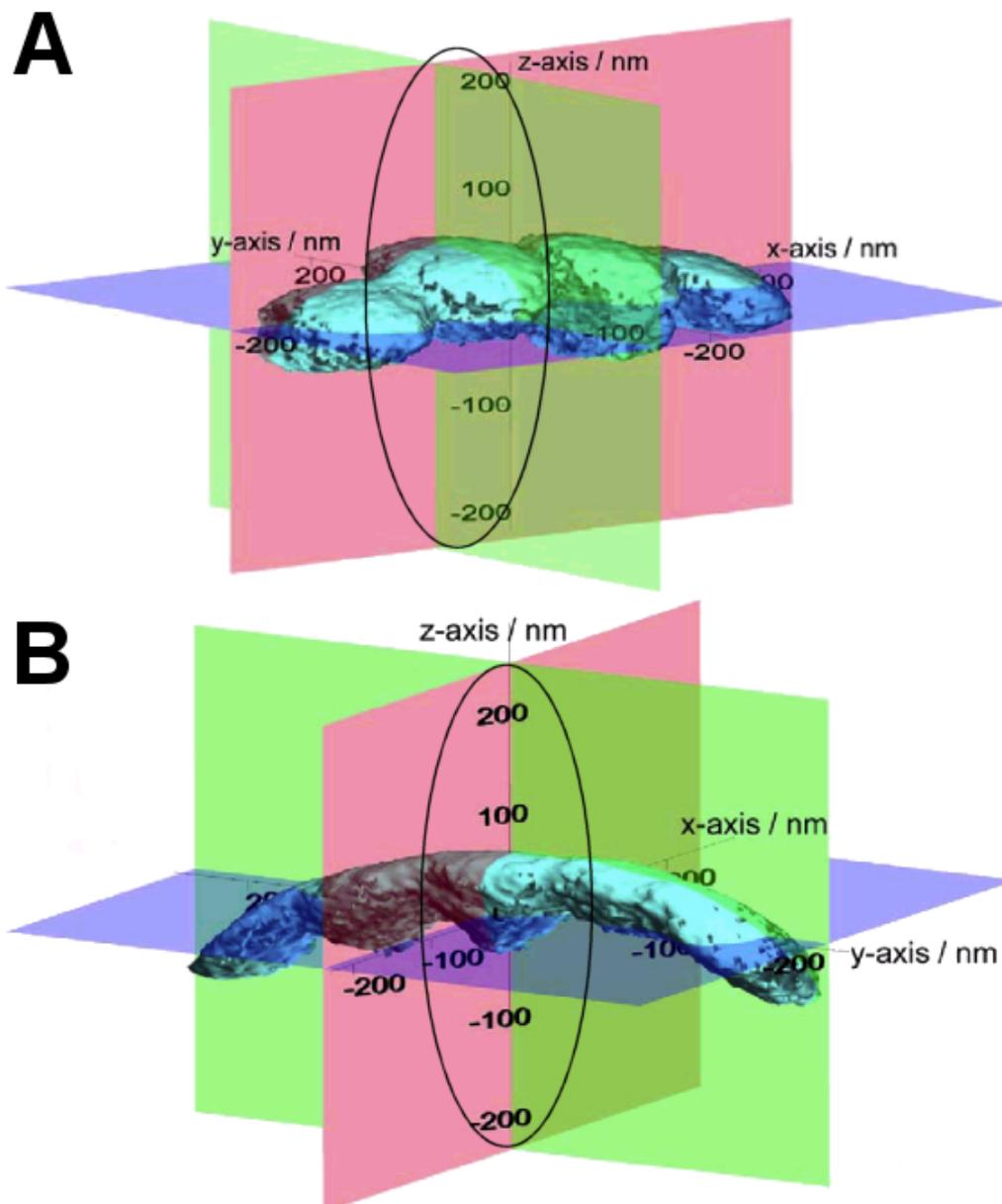


Abbildung 4.5: Türkisfarbene Wolken mit Oberflächen gleicher Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines in Abwesenheit von ATP über ein Myosinmolekül an Aktin gebundenen Latexbeads an vier beziehungsweise fünf verschiedenen Positionen sowohl entlang (A) als auch quer zum Aktinfilament (B). Das Aktinfilament war entlang der x-Achse auf dem Boden der Versuchskammer immobilisiert. Dies entspricht der rosa eingefärbten x/z-Ebene. Bei der grünen Ebene handelt es sich um die quer zum Aktinfilament verlaufende y/z-Ebene. Die x/y-Ebene ist in blau dargestellt. Zum Größenvergleich wurde die Aufenthaltswahrscheinlichkeitsverteilung eines ungebundenen Latexbeads jeweils als schwarze Ellipsen angedeutet.

Die Positionen gleicher Aufenthaltswahrscheinlichkeit bildeten nun die Gestalt eines Schirms, da die Bewegung des *beads* in axialer Richtung stärker eingeschränkt war als entlang der x- oder y-Achse. Die Elastizität der Verbindung zwischen Mikrosphäre und Aktinfilament wurde anhand der dreidimensionalen Aufenthaltswahrscheinlichkeitsverteilung des *beads* ermittelt, nachdem es an das Aktinfilament gebunden hatte. Abbildung 4.4 zeigt ein Beispiel eines an Aktin gebundenen Latexbeads als türkisfarbene Oberflächen gleicher Aufenthaltswahrscheinlichkeiten. Dreidimensionale Positionsverteilungen des an Aktin gebundenen *beads* an vier bzw. fünf verschiedenen Positionen sowohl entlang (A) als auch quer zum Aktinfilament (B) sind als einzelne Wolken dargestellt. Die einzelnen Positionen wurden wie unter 3.2.5 beschrieben durch Verschieben der Probenkammer um 100 nm entlang der x-beziehungsweise der y-Achse relativ zur Position des Latexbeads in der optischen Falle erhalten. Wie aus Abbildung 4.2 hervorging war das Aktinfilament entlang der x-Achse ausgerichtet. Dies entspricht in der Darstellung von Abbildung 4.5 der rosa eingefärbten x/z-Ebene. Bei der grünen Ebene handelt es sich um die quer zum Aktinfilament verlaufende y/z-Ebene. Die x/y-Ebene ist in blau dargestellt. Zum Größenvergleich zu den vor allem entlang der z-Achse stark eingeschränkten Positionsverteilungen des über ein Myosinmolekül an das Aktinfilament gebundenen Latexbeads wurden die Positionsverteilungen einer ungebundenen Mikrosphäre in der optischen Falle schematisch als Ellipsen angedeutet.

Aus diesen dreidimensionalen Positionsverteilungen des an Aktin gebundenen Latexbeads an den einzelnen Positionen relativ zum Aktinfilament lassen sich nun sowohl die Elastizität entlang der einzelnen Raumachsen als auch die Länge des Verbindungselements zwischen Mikrosphäre und Aktinfilament, also vermutlich des Myosinmoleküls, ermitteln. Hierzu wurden zweidimensionale Schnitte entlang der in Abbildung 4.5 rosa, grün und blau dargestellten Raumebenen durch die dreidimensionalen Aufenthaltswahrscheinlichkeitsverteilungen angefertigt. Ein Beispiel solcher farbkodierten, zweidimensionalen Schnitte entlang allen drei Raumebenen durch die in Abbildung 4.5 B vorgestellten dreidimensionalen Aufenthaltswahrscheinlichkeitsverteilungen ist in Abbildung 4.6 gezeigt. Wie schon in Abbildung 4.3 sind Orte hoher Aufenthaltswahrscheinlichkeit blau, Orte höherer Energie und entsprechend niedriger Aufenthaltswahrscheinlichkeit rot dargestellt.

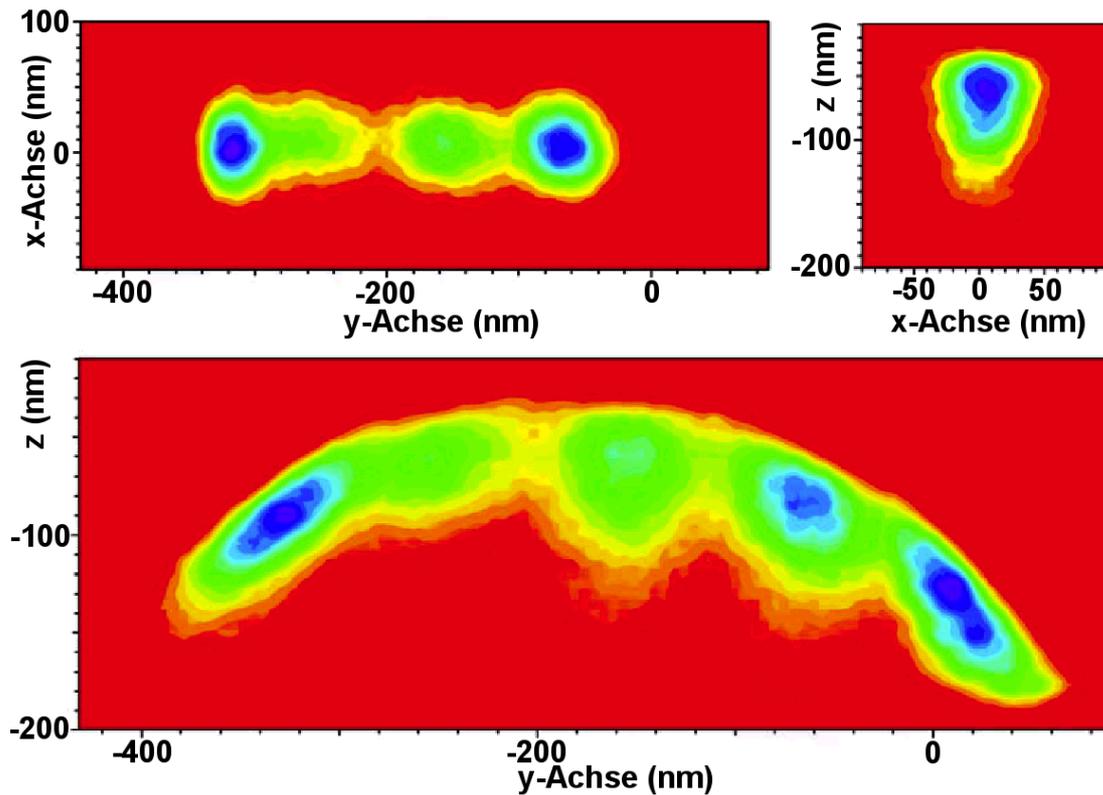


Abbildung 4.6: Farbkodierte, zweidimensionale Schnitte entlang der drei Raumebenen durch die in Abbildung 4.5 B vorgestellten dreidimensionalen Aufenthaltswahrscheinlichkeitsverteilungen eines in Abwesenheit von ATP über ein Myosinmolekül an ein Aktinfilament gebundenen Latexbeads. Orte hoher Aufenthaltswahrscheinlichkeit und entsprechend niedriger Energie sind blau, Orte höherer Energie und niedriger Aufenthaltswahrscheinlichkeit rot dargestellt.

Diese zweidimensionalen Aufenthaltswahrscheinlichkeitsverteilungen ließen sich nun noch weiter auf die gewünschte Raumachse reduzieren. Durch eindimensionale Schnitte entlang der gewünschten Richtung durch die gezeigten zweidimensionalen Aufenthaltswahrscheinlichkeitsverteilungen des in Abwesenheit von ATP über ein Myosinmolekül an ein Aktinfilament gebundenen Latexbeads erhielt man die eindimensionale Potentiallandschaft, in der sich die Mikrosphäre befand. Anhand dieser Potentiallandschaft ließ sich die Elastizität der Verbindung zwischen Latexbead und dem Aktinfilament auf dem Kammerboden entlang der entsprechenden Achse errechnen. Abbildung 4.7 A zeigt ein schon aus Abbildung 4.6 (rechts oben) bekanntes Beispiel einer zweidimensionalen Energielandschaft. Entlang der eingezeichneten schwarzen Linie durch das Zentrum der zweidimensionalen Verteilung verlief das in Abbildung 4.7 B dargestellte eindimensionale Potential. Diese schwarze Linie verlief in axialer Richtung entlang der z-Achse. Die Kammeroberfläche befand

sich in Abbildung 4.7 A unten, in Abbildung 4.7 B demnach links. Wie aus Abbildung 4.7 B ersichtlich ist, war das elastische Verhalten der Verbindung zwischen Aktinfilament und Latexbead hin zum Aktinfilament und von diesem weg, also bei Extension und Kompression, nicht identisch. Es ließ sich keine einzelne Federkonstante ausreichend genau an den gesamten Verlauf des Potentials anfitzen. Aus dem asymmetrischen, eindimensionalen Potential ergaben sich zwei verschiedene Federkonstanten in axialer Richtung für das verbindende Myosinmolekül, eine für die Kompression, also hin zum Aktinfilament, und eine für die Extension weg von der Kammeroberfläche. Aus dem in Abbildung 4.7 gezeigten Beispiel wurden Werte von  $0,05 \text{ pN/nm}$  ( $\pm 0,005 \text{ pN/nm}$ ) für Bewegungen des Latexbeads weg vom Aktinfilament und  $0,0022 \text{ pN/nm}$  ( $\pm 0,0002 \text{ pN/nm}$ ) für die Kompression des Myosinmoleküls errechnet. Dieses asymmetrische Verhalten der Molekülsteifigkeit des Myosins bei Kompression und Extension wurde sowohl für Beispiele gefunden, in denen das Latexbead quer zum Aktinfilament als auch längs dazu bewegt wurde. Signifikante Unterschiede in den Molekülelastizitäten bei Bewegung der Mikrosphäre längs und quer zum Aktinfilament wurde nicht beobachtet.

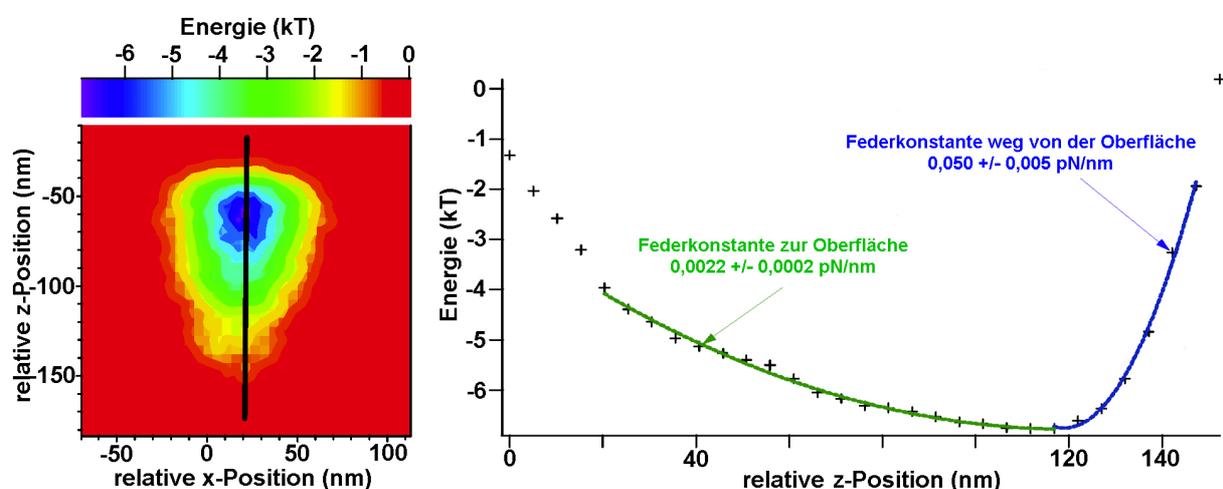


Abbildung 4.7 A: Farbgekodierte, zweidimensionale Darstellung einer Energielandschaft für ein in Abwesenheit von ATP über ein Myosinmolekül an ein Aktinfilament gebundenen Latexbead (siehe auch Abbildung 4.6 oben rechts): Entlang der schwarzen Linie durch das Zentrum der Energielandschaft verläuft das in B gezeigte Potential. An dieses Potential wurden zwei Federkonstanten für die Kompression und Extension der Verbindung zwischen Latexbead und Aktinfilament erhalten. Das Aktinfilament befand sich in der linken Abbildung „unten“, in der rechten Abbildung „links“.

Das Minimum des in Abbildung 4.7 B gezeigten Potentials, also der Ruheposition des Latexbeads, liegt bei einer Höhe von etwa 120 nm, was eine erste Abschätzung der Verbindungslänge zwischen *bead* und Kammeroberfläche zulässt. Eine ausführlichere Bestimmung der Verbindungslänge zwischen Latexbead und dem Kammerboden bzw. immobilisierten Aktinfilament unter Berücksichtigung einer kompletten Messreihe soll im Abschnitt 4.1.3 erfolgen.

Durchschnittlich wurde die axiale Elastizität von Myosinmolekülen bei Extension weg vom Aktinfilament, an das sie gebunden waren, mit 0,03 bis 0,04 pN/nm bestimmt. Eine Verteilung der in verschiedenen Messungen ( $n = 63$ ) gefundenen Molekülsteifheit bei Extension ist in Abbildung 4.8 dargestellt. In etwa 50 % der untersuchten Fälle wurden Werte von 0,03 bis 0,04 pN/nm gefunden. Selten wurden auch mit 0,01 pN/nm niedrigere oder mit bis zu 0,1 pN/nm größere axiale Steifheiten beobachtet.

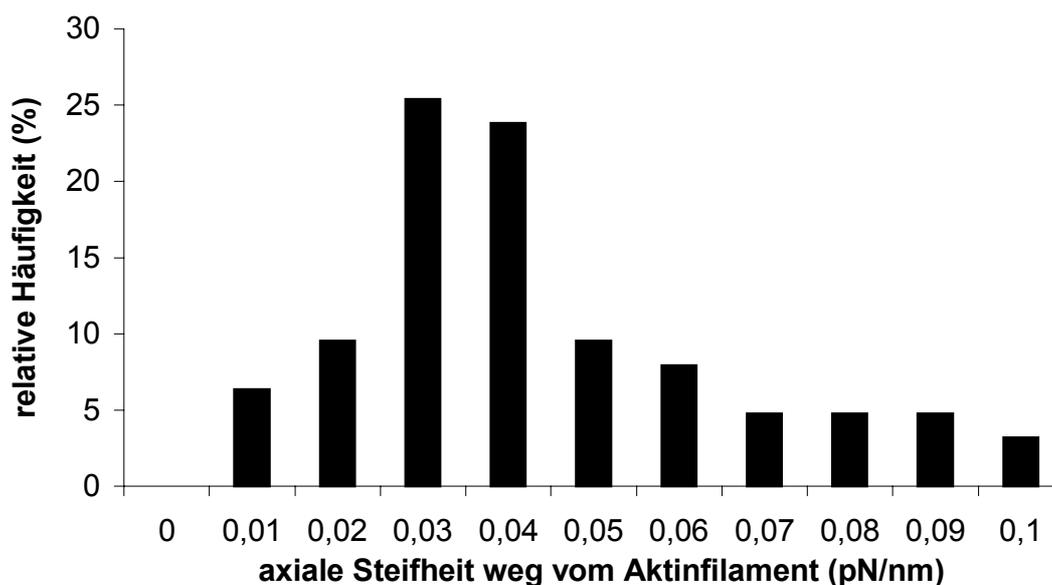


Abbildung 4.8: Verteilung der axialen Federkonstanten ( $n = 63$ ) von Myosinmolekülen bei Extension: Die Molekülelastizitäten wurden aus den dreidimensionalen Wahrscheinlichkeitsverteilungen von Myosin tragenden Latexbeads nach deren Anbinden an Aktinfilamente in Abwesenheit von ATP erhalten.

In Abbildung 4.7 B wurde schon ein Beispiel der Myosinsteifheit bei Kompression, also bei Beadbewegung hin zum Aktinfilament, vorgestellt. Dort wurde die Myosinelastizität bei Kompression mit 0,0022 pN/nm bestimmt. Im Durchschnitt lag

die Federkonstante von Myosinmolekülen bei Kompression bei 0,004 pN/nm. Ein Myosinmolekül verhält sich demnach etwa um Faktor 10 steifer bei Extension als bei Kompression.

#### 4.1.2 Kontrolleexperimente

Es bestand die Möglichkeit, dass durch das Biotinylieren der Aktinmonomere der Filamente das Anheften von Myosin an Aktin gestört oder gar unterbunden wurde oder sich die Gleitgeschwindigkeit der Aktinfilamente auf Myosinmolekülen veränderte. Deshalb wurden *in vitro* Motilitätsassays (siehe 3.2.4) sowohl mit biotinylierten als auch mit unbiotinylierten Aktinfilamenten auf Myosinmolekülen der gleichen Muskelfaserextraktion durchgeführt. Bei 19 °C wurden fluoreszenzmarkierte, biotinylierte Aktinfilamente durchschnittlich mit einer Geschwindigkeit von 2,78  $\mu\text{m}/\text{sec}$  (SD +/- 0,61  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) und fluoreszenzmarkierte, nicht biotinylierte Aktinfilamente durchschnittlich mit 2,77  $\mu\text{m}/\text{sec}$  (SD +/- 0,58  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) bewegt.

Um sicher zu stellen, dass das Binden von Latexbeads mit einzelnen Myosinmolekülen auf der Oberfläche an Aktinfilamente auch wirklich durch Interaktion der Myosinmoleküle mit den Aktinfilamenten auf dem Kammerboden zustande kam, wurde das ATP-abhängige Ablösen von zuvor gebundenen Latexbeads durch Zugabe von ATP-haltigen Puffer (AB/BSA/ATP) beobachtet. Innerhalb einer Minute nach Einspülen des ATP-haltigen Puffers löste sich der Großteil der an Aktinfilamenten gebundenen Latexbeads von diesen wieder ab, während einige wenige Latexbeads, zumeist nicht augenscheinlich an Aktinfilamenten gebunden, auf dem Kammerboden gebunden blieben.

Es wurde reproduzierbar kein Anbinden von myosinfreien, BSA beschichteten Latexbeads beobachtet, weder auf dem mit Neutraavidin und BSA beschichteten Kammerboden noch auf immobilisierten Aktinfilamenten. Ein Beispiel eines myosinfreien, BSA beschichteten Latexbeads, welches gegen den mit Neutraavidin und BSA beschichteten Kammerboden gedrückt wurde ohne zu binden, ist in Abbildung 4.9 dargestellt.

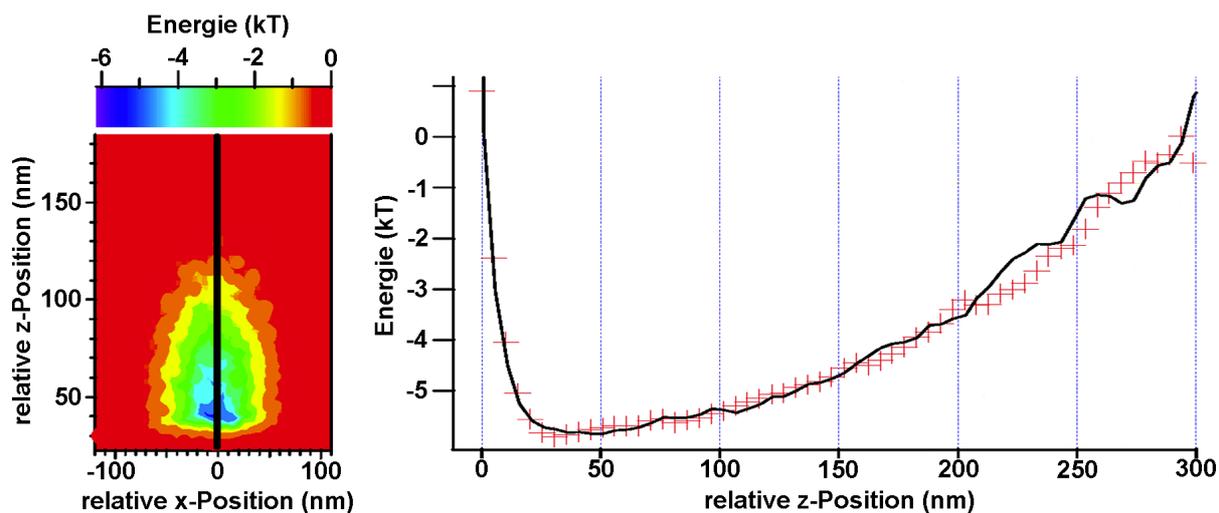


Abbildung 4.9: Zweidimensionaler, farbkodierter Schnitt entlang der  $x/z$ -Ebene durch die dreidimensionale Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines mit BSA beschichteten Latexbeads mit 500 nm Durchmesser, welches gegen eine mit Neutravidin und mit BSA beschichteten Glassoberfläche gedrückt wurde (links). Die sich aus der linken Aufenthaltswahrscheinlichkeitsverteilung ergebene Potentiallandschaft entlang der  $z$ -Achse ist rechts dargestellt.

Bei Verwendung von Latexbeads mit Myosinmolekülen in sehr geringer Dichte auf ihrer Oberfläche konnte in etwa neun von zehn Fällen kein Anbinden an eine mit Neutravidin und BSA beschichteten Kammeroberfläche beobachtet werden. Selten wurde ein Anbinden dieser Latexbeads an die Kammeroberfläche beobachtet, auch in Gegenwart von ATP. Eine solche Bindung eines Myosin tragenden Latexbeads an die Kammeroberfläche ist in Abbildung 4.10 dargestellt.

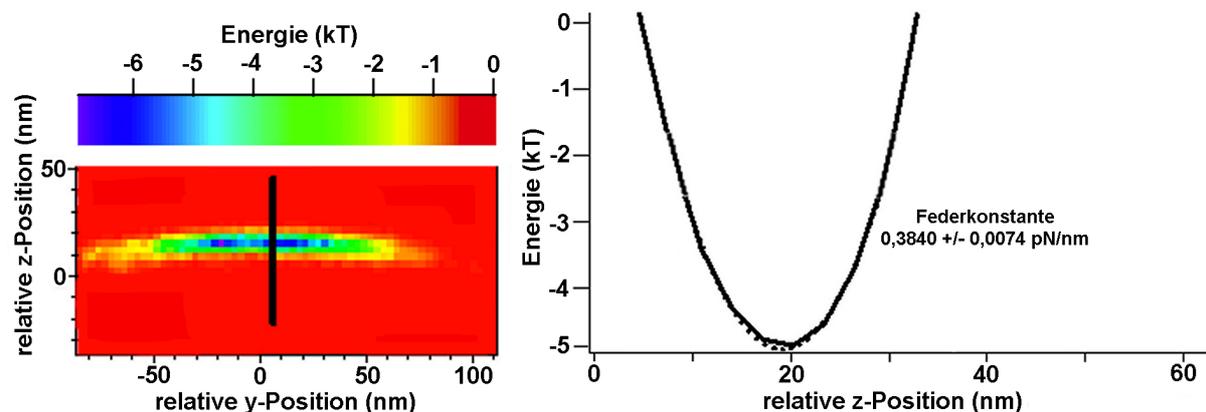


Abbildung 4.10: Verteilung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten entlang der  $y/z$ -Ebene (links) und daraus resultierende Positions-Energie-Beziehung mit errechneter Federkonstante (rechts) nach Anbinden eines Latexbeads mit Myosinmolekülen in sehr geringer Dichte auf seiner Oberfläche an eine mit Neutravidin und BSA beschichtete Kammeroberfläche.

Die Fluktuationen des gebundenen *beads* entlang der z-Achse waren auf Werte von etwa 10 nm beschränkt. Aus der Verteilung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten des *beads* ergab sich eine mittlere Federkonstante der Verbindung zwischen *bead* und Oberfläche von etwa 0,4 pN/nm. Dies war etwa eine Größenordnung steifer als für die Verbindung zwischen Myosin tragenden *beads* und Aktinfilamenten gefunden wurde. Auch wurde hier nicht das bei der Verbindung zwischen Myosin tragenden *beads* und Aktinfilamenten gefundene asymmetrische Verhalten der erhaltenen Federkonstanten in Bezug auf Kompression und Extension beobachtet.

#### 4.1.3 Bestimmung der Verbindungslänge zwischen Myosin tragenden Mikrosphären und dem Boden der Probenkammer

Um die effektive Länge der Verbindung zwischen Latexbead und dem Boden der Versuchskammer sowie die Lokalisation eines eventuell vorhandenen Drehpunktes innerhalb dieser Verbindung zu bestimmen, wurde die Position der Laserfalle mit dem darin gefangenen Latexbead relativ zu dem Aktinfilament, an das die Mikrosphäre über ein Myosinmolekül gebunden war, verändert. Von der Startposition, dem Ort des ersten Anbindens des Myosinmoleküls an Aktin, ausgehend wurde das *bead* mehrfach um 100 nm relativ sowohl längs als auch quer zur Achse des Aktinfilaments durch Verschieben der Versuchskammer bewegt. An jedem dieser Orte wurden die Fluktuationen der Mikrosphärenpositionen dreidimensional mit Hilfe des Photonischen Kraftmikroskops aufgenommen. Beispiele solcher dreidimensionalen Positionsmessungen eines über ein Myosinmolekül an Aktin gebundenen Latexbeads wurden schon in Abbildung 4.5 als türkisfarbene Oberflächen gleicher Aufenthaltswahrscheinlichkeit gezeigt. Ausgehend von diesem Beispiel wurden anhand eines zweidimensionalen Schnittes entlang der grünen y/z-Ebene durch die dreidimensionalen Positionsverteilungen bei Bewegung des Latexbeads quer zur Achse des Aktinfilaments (vorgestellt in Abbildung 4.6 unten) die Länge der *bead*-Oberflächen-Verbindung und die Lage des enthaltenen Drehpunktes bestimmt. Dabei wurde ein einfaches Modell einer starren Verbindung zwischen Mikrosphäre und Kammeroberfläche mit einem Gelenk und einem dehnbaren Element angenommen. Zum besseren Verständnis wurde das Vorgehen in Abbildung 4.11 skizziert.

Wie schon gezeigt verteilen sich die Positionen eines über ein Myosinmolekül an Aktin gebundenen Latexbeads schirmförmig, da seine Fluktuationen entlang der Verbindung zwischen *bead* und Oberfläche wesentlich stärker eingeschränkt waren als in anderen Richtungen. Auch die einzelnen Positionsverteilungen an den verschiedenen Laserfallenpositionen zusammengenommen bildeten einen Schirm. Dies ist aus Abbildung 4.5 und den daraus entstandenen zweidimensionalen Schnitten in Abbildung 4.6 und Abbildung 4.11 ersichtlich. Die Außenflächen der Positionsverteilungen ließen sich wie in Abbildung 4.11 skizziert von einem Kreisbogen erfassen. Das Zentrum dieses Kreises markiert den Punkt, um den sich die Verbindung zwischen Latexbead und Oberfläche drehte. Die in Abbildung 4.11 eingezeichneten gestrichelten Radien verlaufen durch die Zentren der einzelnen Positionsverteilungen und verbinden den Kreisbogen mit dem vermutlichen Drehpunkt. Es sei an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen, dass es sich bei den mit dem PFM gemessenen Positionen um die der Latexbeadmittelpunkte handelte. Aus diesem Grund wurden um die Schnittpunkte der ganz linken und rechten gestrichelten Radien mit dem Kreisbogen die Umrisse zweier Mikrosphären mit Durchmessern von 500 nm eingezeichnet.

Die zweidimensionale Aufenthaltswahrscheinlichkeitsverteilung auf der rechten Seite in Abbildung 4.11 zeigte an ihrer Unterseite eine Abflachung. Dort berührte die Mikrosphäre offensichtlich die Kammeroberfläche, was in einer zusätzlichen Beschränkung der Beadfluktuationen resultierte. Die unterste Stelle dieser Positionsverteilung befand sich demnach 250 nm oberhalb der Kammeroberfläche, was dem Radius des verwendeten Latexbeads von 500 nm Durchmesser entspricht. Dies soll durch den schwarzen Doppelpfeil verdeutlicht werden. Nun konnten die Abstände des gemeinsamen Drehpunktes der fünf einzelnen Positionsverteilungen zur Oberfläche der Versuchskammer als auch zur Oberfläche des Latexbeads (Abstand Kreisbogen-Drehpunkt minus Radius der verwendeten Mikrosphäre) bestimmt werden. Diese Abstände wurden als rote Doppelpfeile in Abbildung 4.11 eingezeichnet. In dem hier verwendeten Beispiel wurde die Länge der gesamten Verbindung zwischen Kammeroberfläche und Latexbead bei maximaler Extension mit etwa 163 nm bestimmt. In diesen 163 nm war ein etwa 46 nm langes Element der Verbindung enthalten, welches sich um einen etwa 117 nm von der Kammeroberfläche entfernten Drehpunkt bewegen konnte. In der Ruhelage der Verbindung, dem Minimum innerhalb der jeweiligen Energielandschaft der Beadpositionen, war

diese Verbindung etwa 30 nm kürzer als bei maximaler Extension, was den rotierbaren Anteil in seiner Ruheposition auf etwa 16 nm verkürzte.

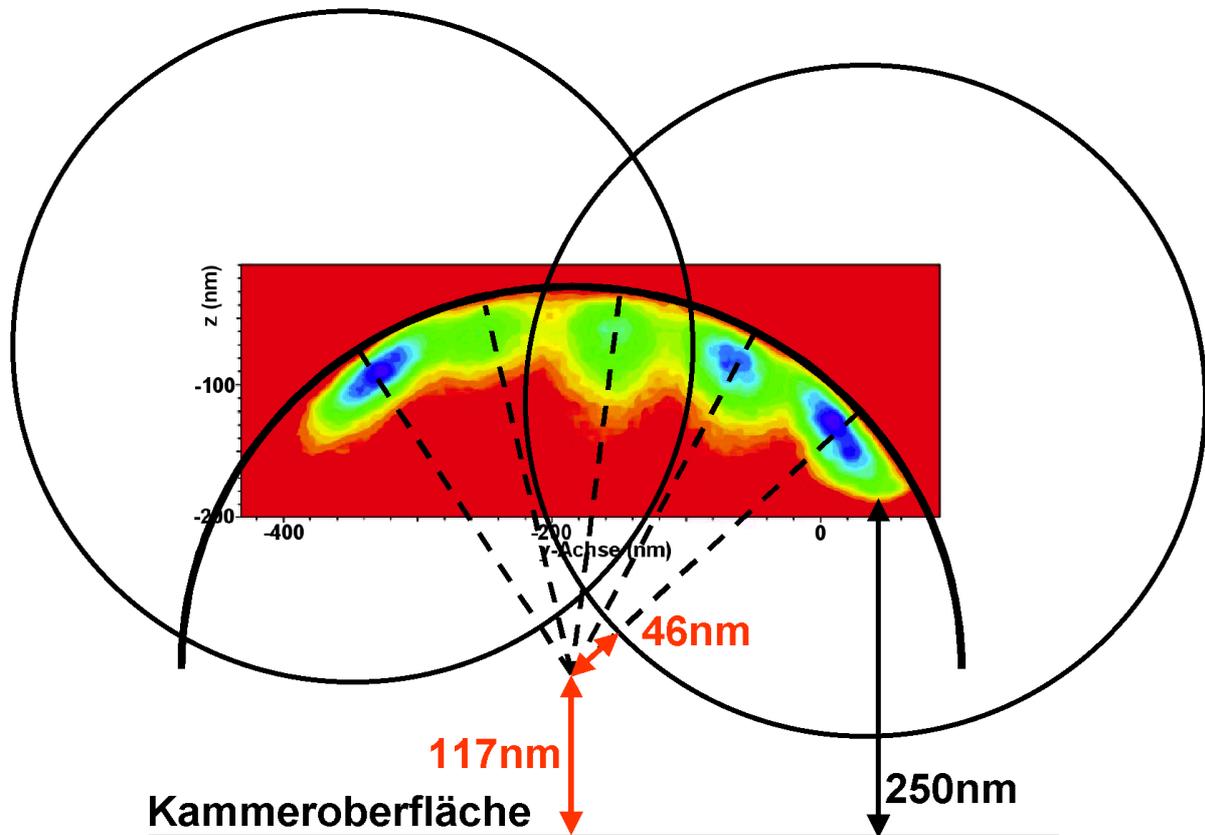


Abbildung 4.11: Bestimmung der Länge der Verbindung zwischen Kammeroberfläche und Mikrosphäre und der Lage des vermutlich darin enthaltenen Drehpunkts innerhalb des verbindenden Myosinmoleküls: Es wurden die schon in Abbildung 4.6 vorgestellten zweidimensionalen Aufenthaltswahrscheinlichkeitsverteilungen einer über ein Myosinmolekül an ein Aktinfilament gebundenen Mikrosphäre an fünf verschiedenen Positionen quer zu dem Aktinfilament verwendet. Die absolute Höhe über der Kammeroberfläche wurde von dem unteren Rand der ganz rechts dargestellten Verteilung bestimmt, wo das Latexbead schon den Boden der Versuchskammer berührte, was seine Positionsfluktuationen zusätzlich einschränkte. Dieser Punkt befand sich 250 nm oberhalb des Kammerbodens (schwarzer Doppelpfeil), da *beads* von 500 nm Durchmesser (schwarze Kreise) verwendet wurden. Die Höhe des erhaltenen Drehpunktes oberhalb der Kammeroberfläche und die Länge rotierbaren Teils der *bead*-Boden-Verbindung wurden durch rote Doppelpfeile dargestellt.

Im Mittel wurden die Gesamtverbindungslänge zwischen Latexbead und Kammeroberfläche bei maximaler Streckung der Verbindung mit etwa 159 nm (+/- 4 nm), in Ruhelage des Moleküls mit 129 nm, und die Länge des maximal gestreckten rotierbaren Teils der Verbindung mit etwa 50 nm (+/- 4 nm), in der Ruhelage etwa

20 nm, graphisch bestimmt. Der Drehpunkt innerhalb dieser Verbindung lag etwa 109 nm ( $\pm$  8 nm) oberhalb der Oberfläche. Es zeigte sich jedoch, dass der Einfluss der optischen Falle nicht an allen Fallenpositionen gleich war. Dadurch fanden sich die Mikrosphärenfluktuationen an den äußeren Fallenpositionen bei niedrigeren Höhen wieder, während die inneren Fluktuationen kaum betroffen waren. Einen kleinen Eindruck davon gibt die ganz linke Positionsverteilung in Abbildung 4.11. Der Schnitt durch diese Verteilungswolke, wie auch durch die ganz rechte, schien stärker gekippt gewesen zu sein als die Verteilungen in der Mitte. Als Folge davon lagen die Außenkanten nicht vollständig an dem zur Auswertung benutzten Halbkreis an, was zum Benutzen eines zu kleinen Halbkreis verleitet. Dadurch lag der über den Kreismittelpunkt bestimmte Drehpunkt innerhalb des verbindenden Moleküls zu weit oberhalb der Kammeroberfläche. Bei zusätzlich von Stephan Altmann, EMBL Heidelberg, durchgeführten Computersimulationen zeigte sich, dass bei rein geometrischer Bestimmung der Verbindungslänge zwischen Latexbead und Glasoberfläche die Höhe des Drehpunktes innerhalb des Myosinmoleküls und somit die Länge des unteren Molekülteils systematisch um etwa 20 nm überschätzt und die Länge des rotierbaren Teils des Moleküls um diesen Betrag unterschätzt wurde. Bei diesen Computersimulationen wurde ebenfalls mit dem hier vorgestellten, einfachen Modell mit einem Gelenk gearbeitet, und es wurde zusätzlich noch das nicht lineare Verhalten der Laserfalle berücksichtigt. Dadurch reduzierte sich die Höhe des Drehpunktes auf etwa 89 nm. Die Länge des maximal gestreckten rotierbaren Teils des Myosinmoleküls vergrößerte sich auf 70, im entspannten Zustand auf 40 nm.

#### 4.1.4 Elastizität von Myosinmolekülen in Anwesenheit von ATP

Wenn Latexbeads mit höher konzentrierten Myosinextrakten als für Einzelmolekülmessungen verwendet inkubiert wurden, konnte in Gegenwart von ATP gerichtete Bewegung dieser Mikrosphären mit vermutlich hoher Motormoleküldichte auf ihrer Oberfläche entlang von Aktinfilamenten beobachtet werden. Abbildung 4.12 zeigt eins von drei beobachteten Beispielen für die Bewegung eines mit viel Myosin beschichteten Latexbeads entlang eines Aktinfilaments in Gegenwart von 100  $\mu$ M ATP. Das Aktinfilament war wiederum entlang der x-Achse ausgerichtet.

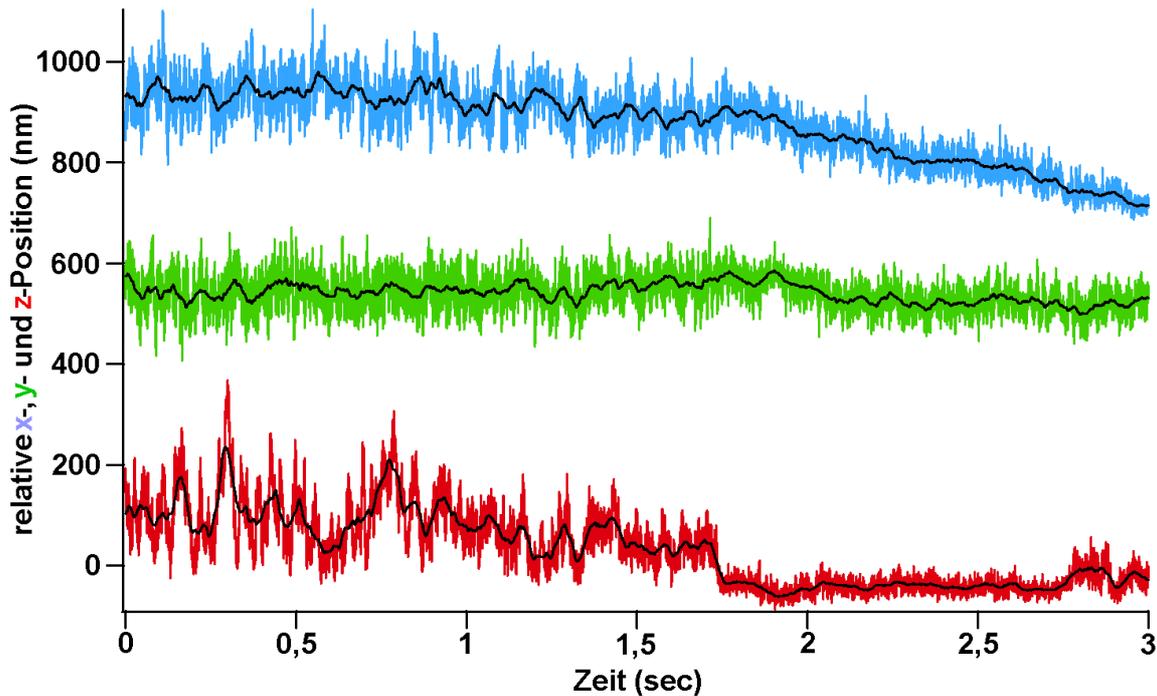


Abbildung 4.12: Bewegung eines mit viel Myosin beschichteten Latexbeads entlang eines parallel zur x-Achse verlaufenden, immobilisierten Aktinfilaments in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  ATP. Die relativen Positionssignale entlang der x-Achse sind in blau, entlang der y-Achse in grün und entlang der z-Achse in rot gegen die Zeit aufgetragen.

Wie in der Abbildung zu sehen ist, kam es zu einer Reduktion der Fluktuationen der Beadposition entlang der z-Achse (rote Signale) gleichzeitig oder direkt bevor sich die Position entlang der x-Achse zu ändern begann. Die Signale der y-Positionen zeigten nur kleine Änderungen.

In dem Zeitintervall zwischen 2,25 und 2,55 Sekunden änderten sich die Positionen der Mikrosphäre nicht. Die Positionssignale dieses Intervalls wurden zur Bestimmung der Federkonstanten der Verbindung zwischen Aktinfilament und Latexbead benutzt. Dies ist in Abbildung 4.13 dargestellt. Aufgrund des kurzen Zeitintervalls war die Anzahl der Datenpunkte niedrig und die Darstellung der zweidimensionalen Potentiallandschaft entsprechend grob gerastert. Die Analyse der Verbindungsteifheit ergab einen Wert von etwa 0,04 pN/nm.

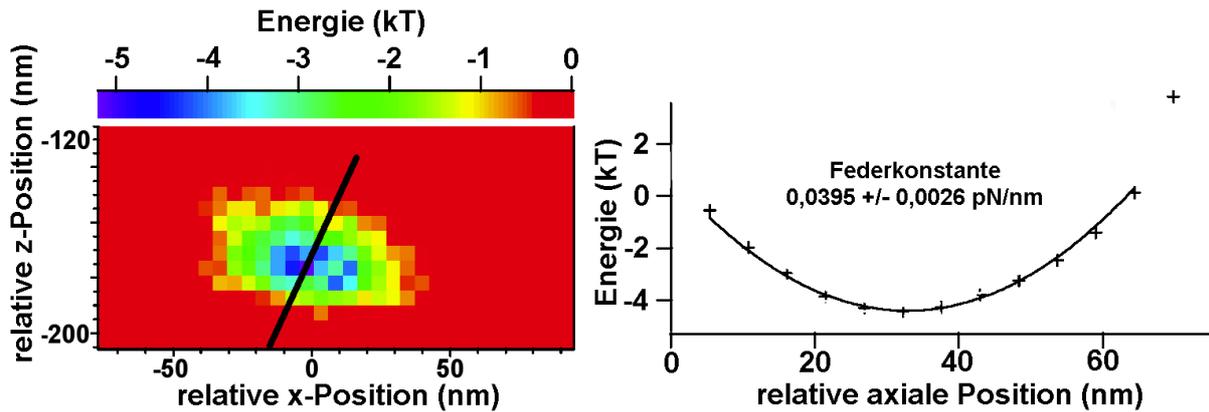


Abbildung 4.13: Verteilung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten entlang der x/z-Ebene (links) und daraus resultierende Positions-Energie-Beziehung mit errechneter Federkonstante (rechts) während einer Pause bei der Bewegung eines Latexbeads mit Myosinmolekülen in hoher Dichte auf seiner Oberfläche entlang eines Aktinfilaments in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  ATP.

## 4.2 Experimente mit einzelnen Kinesinmolekülen

Wie schon bei den Experimenten mit Myosinmolekülen beschrieben, wurden vor den eigentlichen Versuchen mit dem Photonischen Kraftmikroskop die einzelnen Aliquots der Kinesinpräparation mittels eines Mikrotubuligleitassays auf unversehrte Funktion getestet, bevor sie mit Casein beschichteten Latexbeads inkubiert wurden. Ein Beispiel eines solchen Gleitassays ist in Abbildung 4.14 gezeigt.

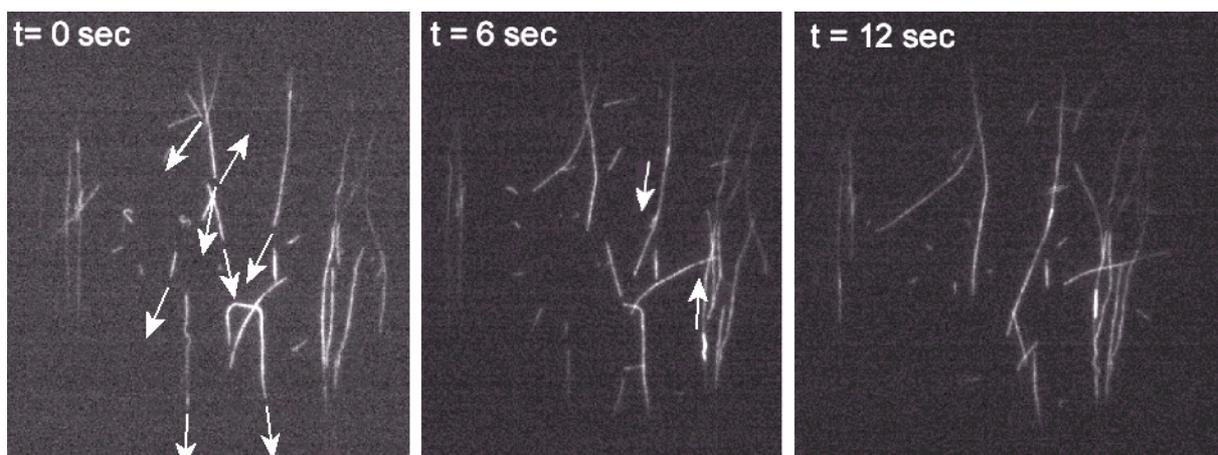


Abbildung 4.14: Beispiel eines Gleitassays zur Kontrolle der Kinesinpräparation vor der Inkubation mit Casein beschichteten Latexmikrosphären, aufgenommen mit dem im PFM integrierten TIRFM. TRITC (polaritäts)markierte, biotinylierte Mikrotubuli werden von Kinesinmolekülen, die auf dem Kammerboden adsorbiert sind, (in Pfeilrichtung wie teilweise angedeutet) bewegt. In der mittleren und rechten Abbildung werden Mikrotubuli in Richtung ihrer heller markierten Minus-Enden (seed) in Pfeilrichtung transportiert.

Fluoreszenzmarkierte, biotinylierte Mikrotubuli wurden von Kinesinmolekülen, die auf dem mit Casein beschichteten Kammerboden adsorbiert waren, in Gegenwart von 2 mM ATP in Pfeilrichtung von Bild zu Bild bewegt. Neben der unversehrten Funktion der verwendeten Kinesinmoleküle zeigt Abbildung 4.14 noch die Bewegungsrichtung der verwendeten Motormoleküle. Wie aus der Abbildung zu erkennen ist, wurden zwei bei  $t = 6$  sec mit Pfeilen markierten Mikrotubuli mit ihren heller markierten, langsamer wachsenden Minus-Enden voran bewegt. Der diesen *seeds* nachfolgende Teil der Mikrotubuli war länger als der den *seeds* vorauslaufende. Die am Kammerboden adsorbierten Kinesinmoleküle sind demnach wie auch native konventionelle Kinesinmoleküle Plus-Ende gerichtet.

Bei der Verwendung von caseinbeschichteten Latexbeads mit einem Durchmesser von 500 nm ohne Kinesinmoleküle auf der Oberfläche wurde kein Anbinden an Mikrotubuli oder den mit Neutravidin und Casein beschichteten Kammerboden beobachtet.

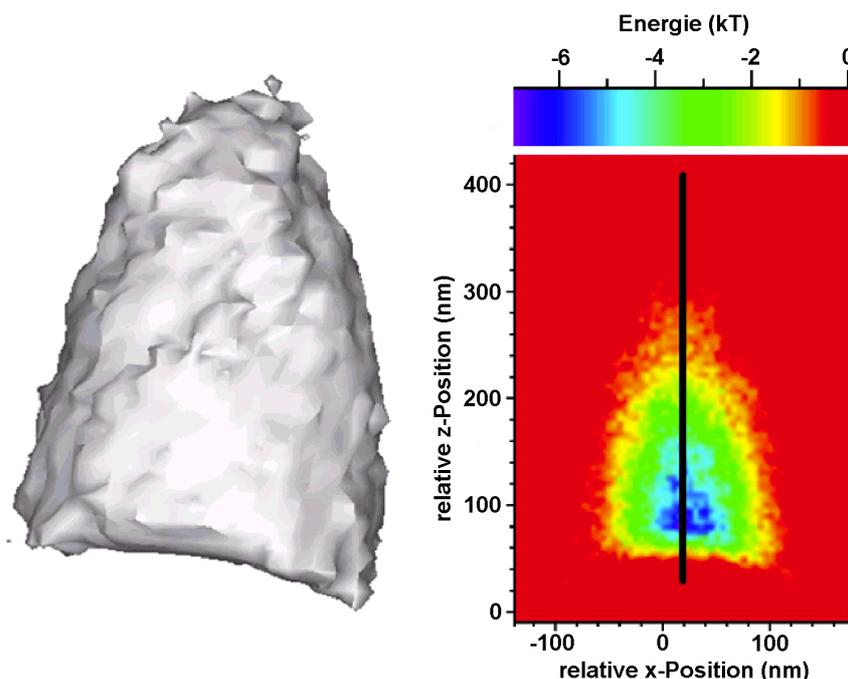


Abbildung 4.15: Darstellung der dreidimensionalen Positionsverteilung einer in einer schwachen Laserfalle gefangenen Mikrosphäre, die auf der Unterseite gegen den Boden der Versuchskammer gedrückt wird. Auf der linken Seite der Abbildung wurden Positionen gleicher Aufenthaltswahrscheinlichkeit als (graue) Oberfläche dargestellt. Die rechte Seite zeigt einen farbkodierten Schnitt durch die der dreidimensionalen Positionsverteilung entsprechenden Energielandschaft entlang der x-/z-Achse.

Bevor die in der optischen Falle gefangenen Mikrosphären den Boden oder einen Mikrotubulus berührten, verteilten sich die Positionen des in der sehr schwachen Laserfalle gefangenen Latexbeads im dreidimensionalen Raum in Form einer aufrecht stehenden Zigarre. Wurde die Laserfalle nun näher an den Kammerboden herangefahren, so wurde diese zigarrenförmige Verteilung an ihrer Unterseite durch die Glasoberfläche eingeschränkt. Ein Beispiel hierfür verdeutlicht Abbildung 4.15.

#### 4.2.1 Elastizität einzelner, in Abwesenheit von ATP an Mikrotubuli gebundener Kinesinmoleküle

In Abwesenheit von ATP und der Verwendung von Latexbeads mit Kinesinmolekülen in geringer Dichte auf der Oberfläche banden die Mikrosphären an auf dem Kammerboden befestigte Mikrotubuli. Als das Latexbead über ein Kinesinmolekül an einen Mikrotubulus anband, wurden seine thermische Fluktuationen im Vergleich zu den Fluktuationen in der schwachen Laserfalle stark eingeschränkt. Die Positionen gleicher Aufenthaltswahrscheinlichkeit bildeten nun die Gestalt eines Schirms, da die Bewegung des *beads* in axialer Richtung stärker eingeschränkt war als entlang der x- oder y-Achse. Abbildung 4.16 zeigt ein Beispiel solcher dreidimensionalen Aufenthaltswahrscheinlichkeiten eines gebundenen Latexbeads als türkisfarbene Oberflächen gleicher Aufenthaltswahrscheinlichkeiten. Dreidimensionale Positionsverteilungen des gebundenen *beads* an jeweils drei verschiedenen Orten sowohl entlang als auch quer zum Mikrotubulus sind als einzelne Wolken dargestellt. Der Mikrotubulus war entlang der x-Achse ausgerichtet. Die einzelnen Positionen wurden wie unter 3.3.4 beschrieben durch Verschieben der Probenkammer relativ zur Position der optischen Falle um 100 nm entlang der x- beziehungsweise der y-Achse erhalten. Zum Größenvergleich wurde außerdem die Größe der Positionsverteilung eines ungebundenen Latexbeads als Ellipse angedeutet.

Ein zweidimensionaler Schnitt entlang der rosa eingefärbten x/z-Ebene durch die dreidimensionalen Positionsverteilungen aus Abbildung 4.16 wurde zur weiteren Analyse der Steifheit der Verbindung zwischen Mikrosphäre und Mikrotubulus verwendet. Entlang der eingezeichneten schwarzen Linie durch die mittlere Position im linken Teil der Abbildung 4.17 ergab sich die im rechten Teil der Abbildung dargestellte Potentiallandschaft.

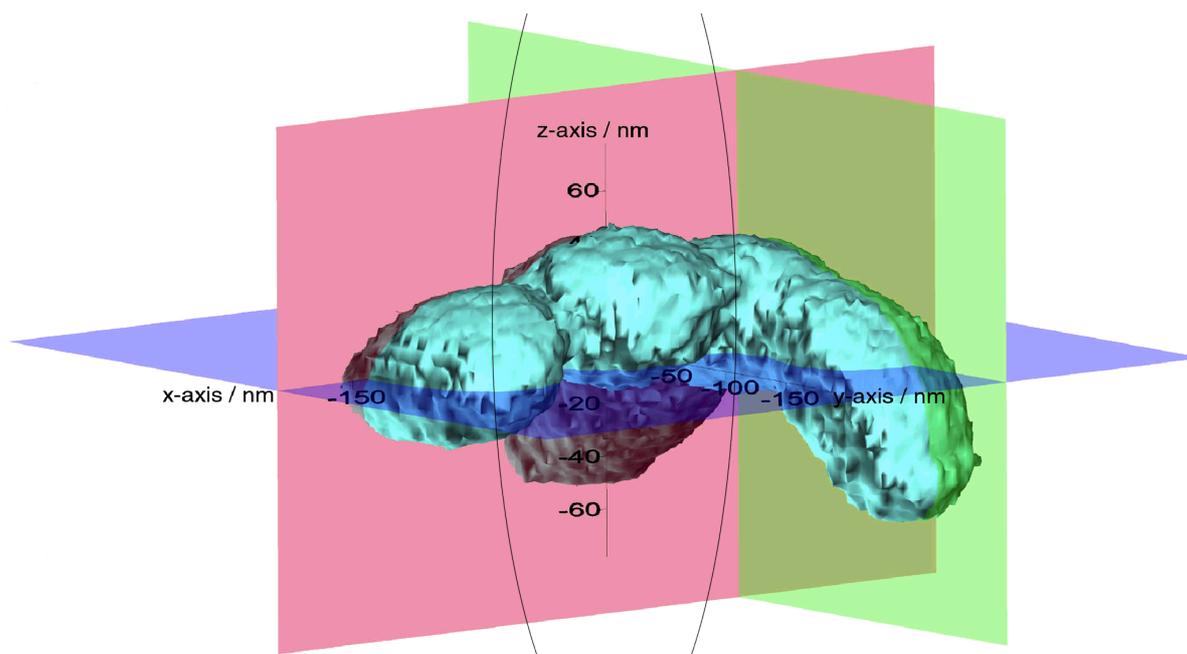


Abbildung 4.16: Türkisfarbene Wolken mit Oberflächen gleicher Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines in Abwesenheit von ATP über ein Kinesinmolekül an einen Mikrotubulus gebundenen Latexbeads an jeweils drei verschiedenen Positionen sowohl entlang als auch quer zum Mikrotubulus. Der Mikrotubulus war entlang der x-Achse auf dem Boden der Versuchskammer immobilisiert. Dies entsprach der rosa eingefärbten x/z-Ebene. Zum Vergleich wurde die Größe der Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines ungebundenen Latexbeads als Ausschnitt einer schwarzen Ellipse angedeutet.

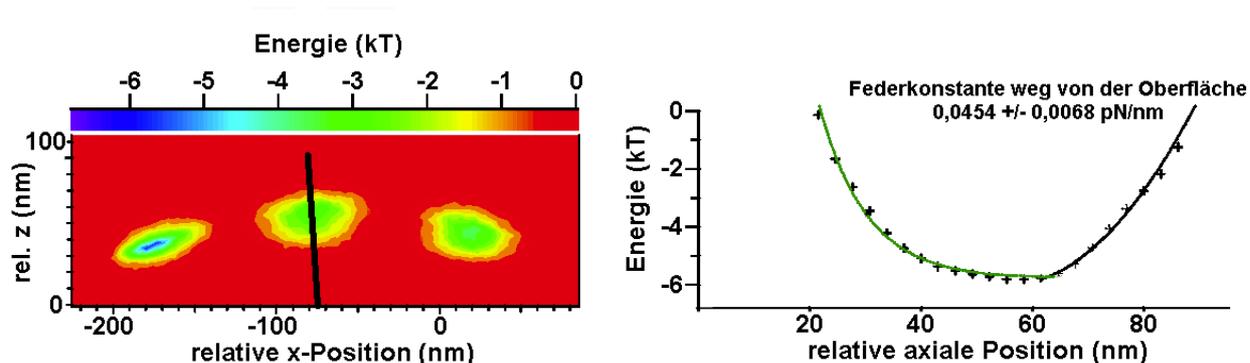


Abbildung 4.17: Farbkodierte, zweidimensionale Darstellung einer Energielandschaft für ein in Abwesenheit von ATP über ein Kinesinmolekül an einen Mikrotubulus gebundenen Latexbead (links). Entlang der schwarzen Linie durch das Zentrum der mittleren Positionsverteilung verlief das Rotationszentrum und das rechts gezeigte Potential. Anhand dieses Potentials wurde eine Federkonstanten für die Extension der Verbindung zwischen Latexbead und Mikrotubulus von  $0,0454 \text{ pN/nm}$  berechnet. Der Mikrotubulus befand sich in der linken Abbildung „unten“, in der rechten Abbildung „links“.

Es wurde eine Verbindungssteifheit von 0,0454 pN/nm ( $\pm$  0,0068 pN/nm) für die Extension, der Bewegungen des Latexbeads weg vom Mikrotubulus, ermittelt. Ein ausgeprägtes asymmetrisches Verhalten der Molekülsteifigkeit des Kinesins bei Kompression und Extension wurde im Gegensatz zu den Experimenten mit Myosinmolekülen nicht beobachtet. In anderen Experimenten wurden Steifheitswerte zwischen 0,04 und 0,075 pN/nm gemessen.

Die Verteilung der erhaltenen axialen Verbindungselastizitäten zwischen den Kinesin tragenden Latexbeads ( $n = 10$ ) und den Mikrotubuli auf dem Boden der Versuchskammer wurde in Abbildung 4.18 für die Extension der Verbindungen dargestellt. Es zeigte sich, dass Elastizitäten von etwa 0,04 pN/nm und 0,06 bis 0,065 pN/nm häufiger beobachtet wurden. Weichere Verbindungen als 0,04 pN/nm wurden in Abwesenheit von ATP nicht gemessen.

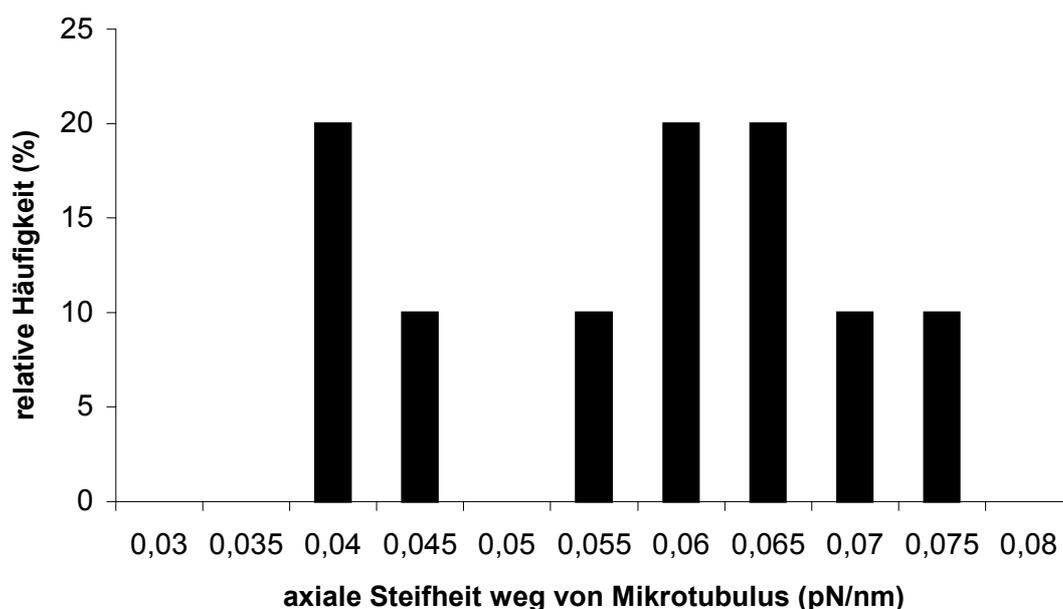


Abbildung 4.18: Verteilung der axialen Federkonstanten von Kinesinmolekülen bei Extension: Die Molekülelastizitäten wurden aus den dreidimensionalen Wahrscheinlichkeitsverteilungen von Kinesin tragenden Latexbeads ( $n = 10$ ) nach deren Anbinden in Abwesenheit von ATP an auf dem Boden immobilisierte Mikrotubuli erhalten.

Ein Hinweis auf das Auftreten unterschiedlicher Steifheiten verschiedener Moleküle wurde bei der Analyse des zeitlichen Verlaufs der axialen Elastizität vor und nach dem augenscheinlichen Anbinden des Kinesins an Mikrotubuli erhalten. Abbildung 4.19 zeigt eine solche Registrierung. Ein Kinesin tragendes Latexbead band nach

etwa einer Sekunde an ein auf dem Kammerboden immobilisierten Mikrotubulus an, um nach zwischenzeitlichem Ablösen erneut zu binden. Die dabei auftretenden axialen Federkonstanten wurden innerhalb der angegebenen vier Zeiträume analysiert. Die Zeitspannen mit starken Partikelfluktuationen wurden unter „1“ zusammengefasst. Die Elastizität des Zeitraums direkt nach augenscheinlicher Reduktion der Fluktuationen wurde mit „2“ bezeichnet. Nach erneutem Anbinden der Mikrosphäre an den Mikrotubulus wurden die Federkonstanten der Verbindung direkt nach dem Anbinden („3“) und etwa vier Sekunden später („4“) bestimmt.

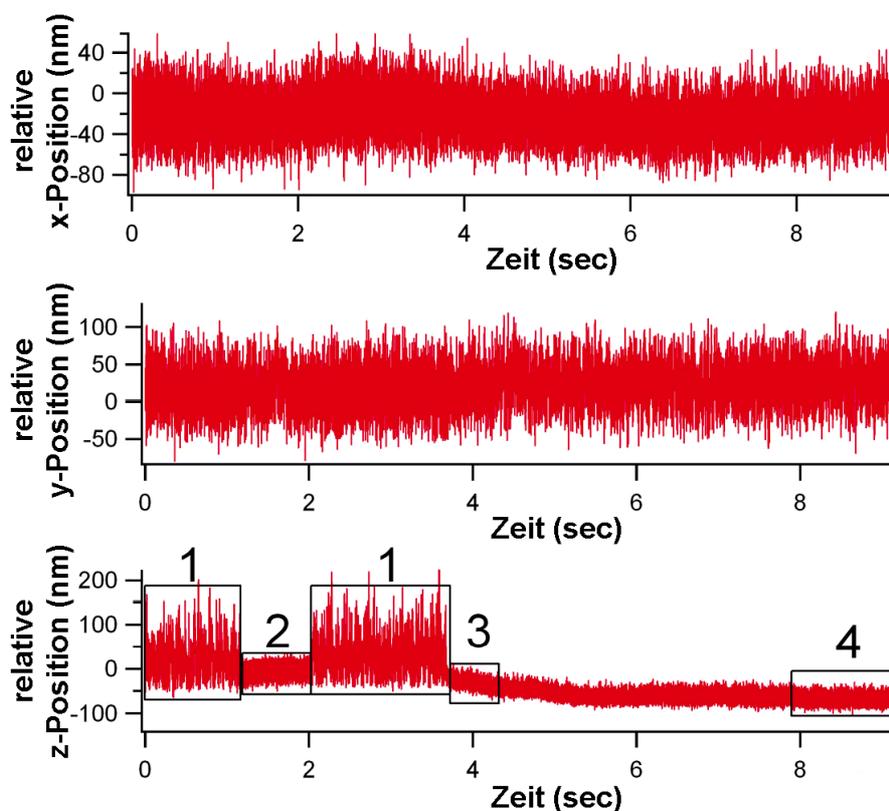


Abbildung 4.19: Positionsdaten eines Kinesin tragenden Latexbeads während des Anbindens an einen Mikrotubulus in Abwesenheit von ATP. Die axialen Elastizitäten während der Zeiträume 1 bis 4 wurden mit  $0,00128 \text{ pN/nm}$  ( $\pm 0,00024 \text{ pN/nm}$ ),  $0,0408 \text{ pN/nm}$  ( $\pm 0,0069 \text{ pN/nm}$ ),  $0,0405 \text{ pN/nm}$  ( $\pm 0,0078 \text{ pN/nm}$ ) beziehungsweise  $0,0666 \text{ pN/nm}$  ( $\pm 0,0112 \text{ pN/nm}$ ) bestimmt.

Die Analyse der Federkonstanten während der mit „1“ bezeichneten Zeiträume ergab eine axiale Elastizität von  $0,00128 \text{ pN/nm}$  ( $\pm 0,00024 \text{ pN/nm}$ ) und lag im Bereich der Steifheit der Laserfalle. Beim ersten kurzen sichtbaren Anbinden des *beads* an den Mikrotubulus („2“) wurde eine Federkonstante von  $0,0408 \text{ pN/nm}$  ( $\pm 0,0069 \text{ pN/nm}$ ), direkt nach dem zweiten sichtbaren Anbinden („3“) von

0,0405 pN/nm (+/- 0,0078 pN/nm) berechnet. Innerhalb der ersten zwei Sekunden nach dem zweiten sichtbaren Anbinden des Latexbeads änderte sich die Position des Partikels entlang der z-Achse. Etwa vier Sekunden nach dem zweiten Anbinden („4“) wurde mit 0,0666 pN/nm (+/- 0,0112 pN/nm) eine höhere Verbindungssteifigkeit gemessen.

#### 4.2.2 Bestimmung der Verbindungslänge zwischen Kinesin tragenden Mikrosphären und dem Boden der Probenkammer

Die Analyse der Verbindungslängen zwischen Kinesin tragenden Mikrosphären und dem Boden der Probenkammern erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie es schon bei den Myosinexperimenten beschrieben wurde. In einem weiteren Experiment lagen auch im Falle von Kinesinmolekülen als Verbindungselement zwischen Latexbead und Oberfläche die einzelnen schirmförmigen Aufenthaltsortverteilungen der gebundenen Mikrosphäre an vier verschiedenen Positionen quer zu einem Mikrotubulus mit ihren Außenflächen auf einer Kreisbahn. Dies ist in Abbildung 4.20 dargestellt. Sowohl an der rechten als auch an der linken Position der Laserfalle relativ zum Anbindungspunkt erkennt man, dass dort die Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Aufenthaltsorte des Latexbeads an ihrer Unterseite entlang einer geraden Linie eingeschränkt waren. Bei Verwendung von Latexbeads mit Radien von 250 nm und der Annahme, dass diese Einschränkungen vom Kontakt mit der Kammeroberfläche herrührten, ergab sich somit für den niedrigsten Punkt der Verteilungen eine absolute Höhe von 250 nm über dem Boden der Versuchskammer. Für die geometrische Analyse der Verbindung zwischen Mikrosphäre und Kammeroberfläche wurde ein einfaches Modell einer starren Verbindung mit einem Gelenk und einem dehnbaren Element angenommen. Aus den absoluten Höhen der Verteilungswolken konnten nun die Verbindungslängen bei maximaler Dehnung und in Ruhe, die Lage des Drehpunktes innerhalb dieser Verbindung und die Länge des rotierbaren Anteils bestimmt werden. In dem dargestellten Beispiel wurden eine Gesamtlänge der Verbindung zwischen Kammerboden und Latexbead von 90 nm und eine Länge des maximal gestreckten rotierbaren Teils der Verbindung von 37 nm erhalten. Dieser rotierbare Teil war in seiner entspannten Ruhelage um etwa 15 nm kürzer und drehte sich um einen 53 nm oberhalb der Kammeroberfläche befindlichen Punkt.

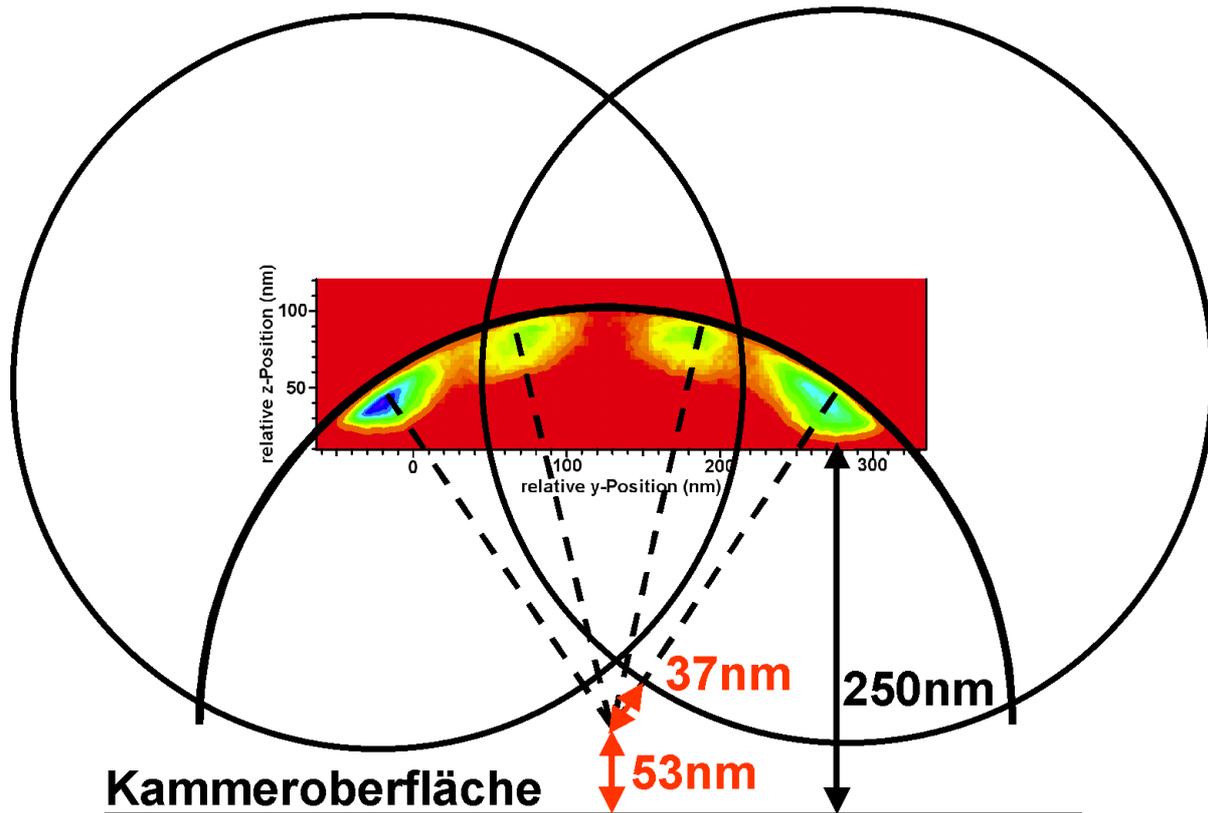


Abbildung 4.20: Bestimmung der Verbindungslänge zwischen Kammeroberfläche und Mikrosphäre sowie der Lage des vermutlich darin enthaltenen Drehpunktes innerhalb des verbindenden Kinesinmoleküls. Die Analyse erfolgte anhand eines zweidimensionalen Schnittes durch die Positionsverteilungen eines an einen Mikrotubulus gebundenen *beads* an vier verschiedenen Orten quer zum Mikrotubulus. Die absolute Höhe über der Kammeroberfläche wurde von dem unteren Rand der ganz rechts dargestellten Verteilung bestimmt, wo das Latexbead schon den Boden der Versuchskammer berührte, was seine Positionsfluktuationen zusätzlich einschränkte. Dieser Punkt befand sich 250 nm oberhalb des Kammerbodens (schwarzer Doppelpfeil), da *beads* von 500 nm Durchmesser (schwarze Kreise) verwendet wurden. Die Höhe des erhaltenen Drehpunktes oberhalb der Kammeroberfläche und die Länge rotierbaren Teils der *bead*-Boden-Verbindung wurden durch rote Doppelpfeile dargestellt.

Wie schon bei den Experimenten mit Myosinmolekülen beschrieben, war der Einfluss der optischen Falle nicht an allen Fallenpositionen gleich. Auch hier wurde die Höhe des Drehpunktes innerhalb des Kinesinmoleküls und somit die Lage des unteren Molekülteils systematisch um etwa 20 nm überschätzt und die Länge des rotierbaren Teils des Moleküls um diesen Betrag unterschätzt. Dadurch ergaben sich im Mittel eine Gesamtverbindungslänge zwischen Kinesin tragenden Latexbeads und der Kammeroberfläche von etwa 86 nm (+/- 3 nm) bei maximaler Streckung, in Ruhelage 71 nm, und eine Länge des maximal gestreckten rotierbaren Teils der

Verbindung von etwa 56 nm ( $\pm$  1 nm), in entspannter Ruhelage von 40 nm. Der Drehpunkt innerhalb dieser Verbindung lag etwa 30 nm ( $\pm$  2 nm) oberhalb der Glassoberfläche.

#### 4.2.3 Elastizität einzelner Kinesinmoleküle in Anwesenheit von ATP

Fluoreszenzmarkierte Mikrosphären mit Kinesinmolekülen in sehr geringer Dichte auf ihrer Oberfläche konnten in Gegenwart von ATP dabei beobachtet werden, wie sie mehrere Mikrometer lange Strecken auf Mikrotubuli zurücklegten, ohne von diesen abzu dissoziieren. Abbildung 4.21 zeigt ein solches „laufendes“ Latexbead. Diese Mikrosphäre lief in Gegenwart von 2 mM ATP in Pfeilrichtung entlang eines auf dem Kammerboden immobilisierten, fluoreszenzmarkierten Mikrotubulus auf eine weitere Mikrosphäre zu, die am Ende des Mikrotubulus fest gebunden war. Nach Erreichen dieser fest gebundenen Mikrosphäre nach etwa 9 Sekunden hielt das laufende *bead* kurz inne und löste sich dann von dem Mikrotubulus ab.

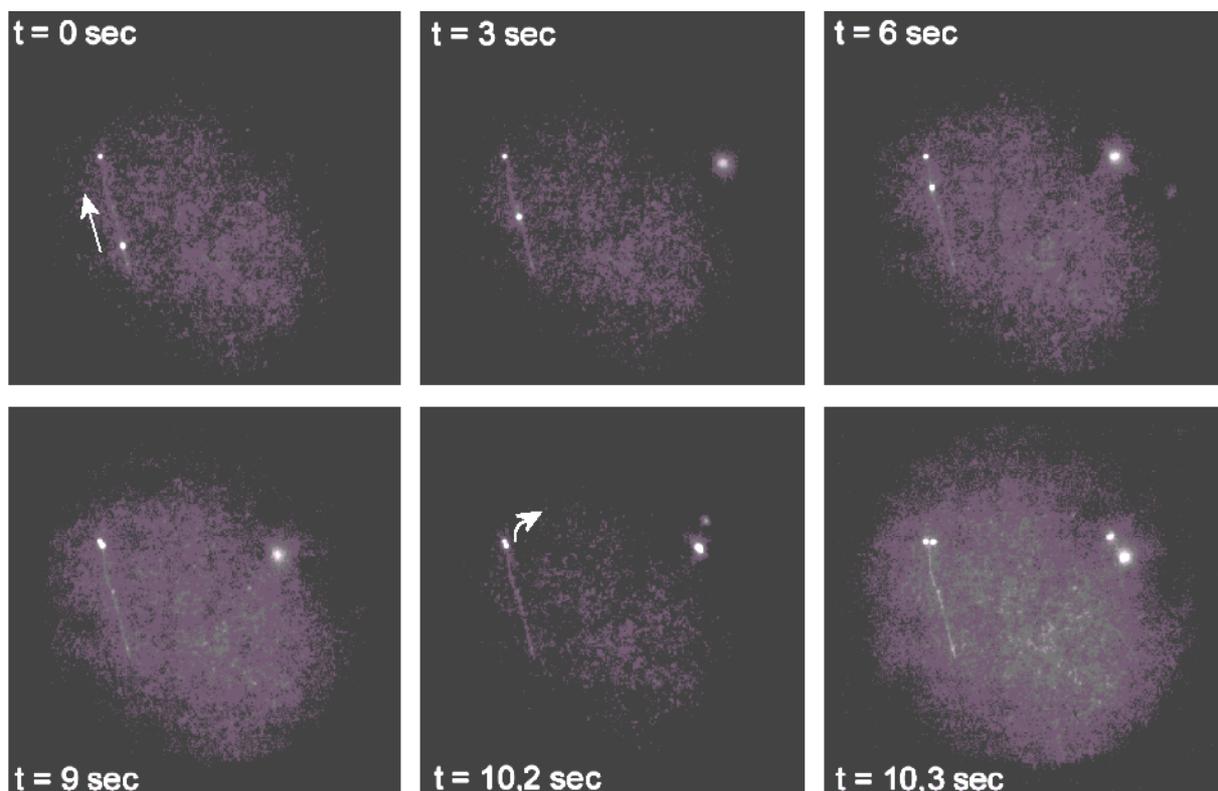


Abbildung 4.21: Bewegung einer fluoreszenzmarkierten Mikrosphäre mit Kinesinmolekülen in sehr geringer Dichte auf ihrer Oberfläche in Pfeilrichtung entlang eines fluoreszenzmarkierten Mikrotubulus in Gegenwart von 2 mM ATP. Am Ende des Mikrotubulus war ein weiteres *bead* gebunden. Nach Erreichen des gebundenen Latexbeads löste sich die laufende Mikrosphäre von dem Mikrotubulus ab.

Die Geschwindigkeiten der von Kinesinmolekülen transportierten Latexbeads entlang von Mikrotubuli wurden bei verschiedenen ATP-Konzentrationen bestimmt. Bei einer ATP-Konzentration von 2 mM wurden die Mikrosphären mit einer Geschwindigkeit von 600 nm/sec bewegt. Bei ATP-Konzentrationen von 2  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  wurden Geschwindigkeiten von 36 nm/sec beziehungsweise von 12 nm/sec beobachtet.

Bei einer ATP-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  wurde die in Abbildung 4.22 dargestellte Registrierung erhalten. Im Bildeinsatz oben links ist eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines hell gelben Latexbeads auf seinem Weg entlang des hier rot dargestellten Mikrotubulus gezeigt. Der Mikrotubulus war, wie auf diesem Bild zu sehen ist, entlang der x-Achse ausgerichtet. Die Positionssignale wurden für die x-, y- und z-Achse getrennt dargestellt. Während sich die y- und z-Positionen nicht systematisch veränderten, ist bei den rot gezeichneten x-Positionen eine von verschiedenen langen Pausen unterbrochene, gerichtete Bewegung entlang des Mikrotubulus zu sehen. Die Mikrosphäre war dabei im Mittel etwa 12 nm/sec schnell. Auch sind einige male Schritte von 8 nm Länge zu beobachten, z.B. vor und nach der längeren Bewegungspause zwischen 4 bis 7 Sekunden.

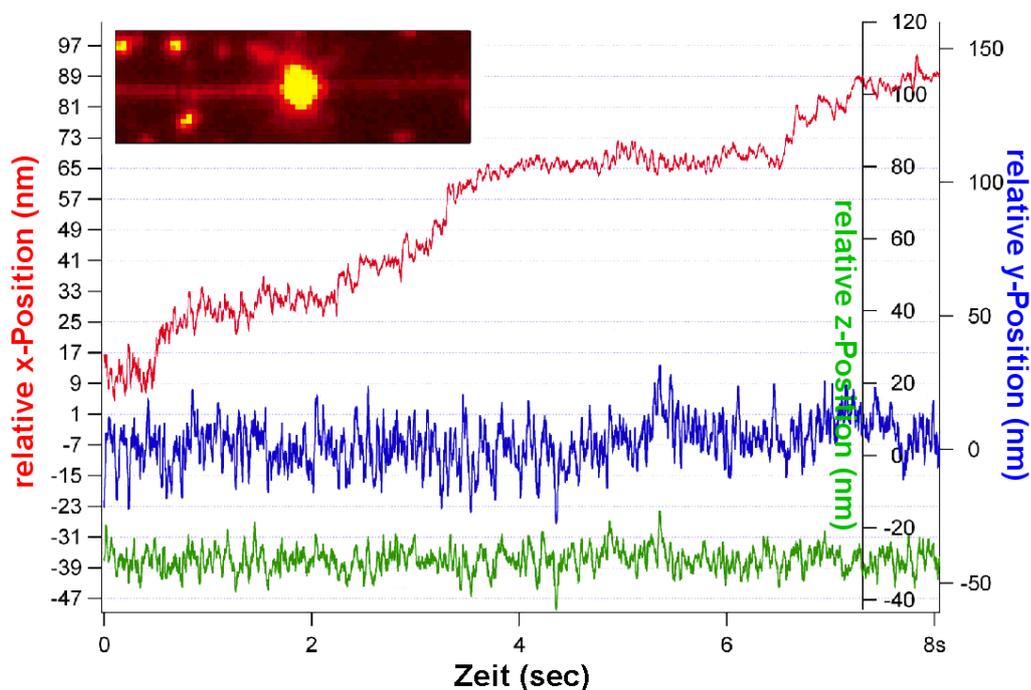


Abbildung 4.22: Dreidimensionale Positionsdaten während der Bewegung eines Latexbeads mit Kinesinmolekülen in sehr geringer Dichte auf seiner Oberfläche auf einem entlang der x-Achse ausgerichteten Mikrotubulus (siehe Fluoreszenzaufnahme im Bildeinsatz) in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  ATP.

Häufig wurde beobachtet, dass ein Kinesin tragendes Latexbead nicht sofort nach dem Anbinden an einen Mikrotubulus seine Position veränderte. Es blieb zuerst einige Sekunden an einer Stelle gebunden, bevor es sich gerichtet auf dem Mikrotubulus bewegte. Ein Beispiel hierfür veranschaulicht Abbildung 4.23.

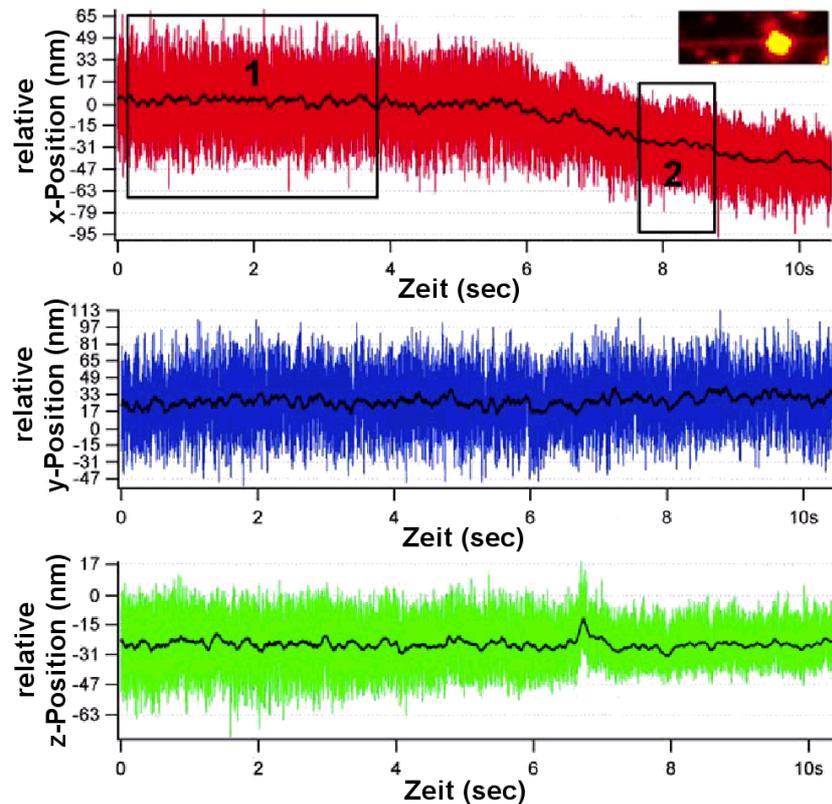


Abbildung 4.23: Dreidimensionale Positionsdaten während der Bewegung eines Latexbeads mit Kinesinmolekülen in sehr geringer Dichte auf seiner Oberfläche auf einem entlang der x-Achse ausgerichteten Mikrotubulus (siehe Fluoreszenzaufnahme im Bildeinsatz) in Gegenwart von  $1 \mu\text{M}$  ATP. Innerhalb der Zeiträume 1 und 2 wurde die axiale Elastizität der *bead*-Oberflächen-Verbindung mit  $0,065 \text{ pN/nm}$  ( $\pm 0,005 \text{ pN/nm}$ ) beziehungsweise  $0,125 \text{ pN/nm}$  ( $\pm 0,021 \text{ pN/nm}$ ) bestimmt.

Um zu prüfen, ob sich die axiale Elastizität der Verbindung zwischen *bead* und Oberfläche vor dem Loslaufen der Mikrosphäre und während der gerichteten Bewegung unterschieden, wurden die axialen Steifheiten während der Zeiträume 1 und 2 in Abbildung 4.23 bestimmt. Vor dem Loslaufen des *beads* wurde die Verbindungssteifheit mit  $0,065 \text{ pN/nm}$  ( $\pm 0,005 \text{ pN/nm}$ ) und während der Bewegung entlang des Mikrotubulus mit  $0,125 \text{ pN/nm}$  ( $\pm 0,021 \text{ pN/nm}$ ) bestimmt. Das Kinesin bewegte die Mikrosphäre dabei im Mittel mit einer Geschwindigkeit von  $11 \text{ nm/sec}$ .

#### 4.2.4 Elastizität einzelner Kinesinmoleküle in Gegenwart des ATP-Analogons $\text{ATP}\gamma\text{S}$

Kinesin hat in Gegenwart von ATP eine hohe Affinität zu Mikrotubuli. Wie unter 4.2.3 gezeigt wurde, bewegte sich das Motormolekül gerichtet entlang von Mikrotubuli und seine Elastizität war während der Bewegung größer als die Elastizität während Bindung an Mikrotubuli im ATP-freien Zustand. Um die mechanischen Eigenschaften von Kinesinmolekülen in ihrem ATP-gebundenen Zustand näher zu untersuchen, sollten die ATP-Analoga  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  und AMP-PNP verwendet werden. Während der Experimente mit Kinesin zeigte sich, dass Kinesin in der Lage war,  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  zu spalten und sich unter dessen Hydrolyse entlang von Mikrotubuli zu bewegen. Die Geschwindigkeit dieser Bewegung war deutlich langsamer als bei Verwendung von ATP und innerhalb des gemessenen Bereichs von der verwendeten  $\text{ATP}\gamma\text{S}$ -Konzentration weitgehend unabhängig. Die Latexbeads wurden von Kinesin in Gegenwart von 2 mM mit 16 nm/sec und bei 100  $\mu\text{M}$   $\text{ATP}\gamma\text{S}$  mit 14 nm/sec transportiert.

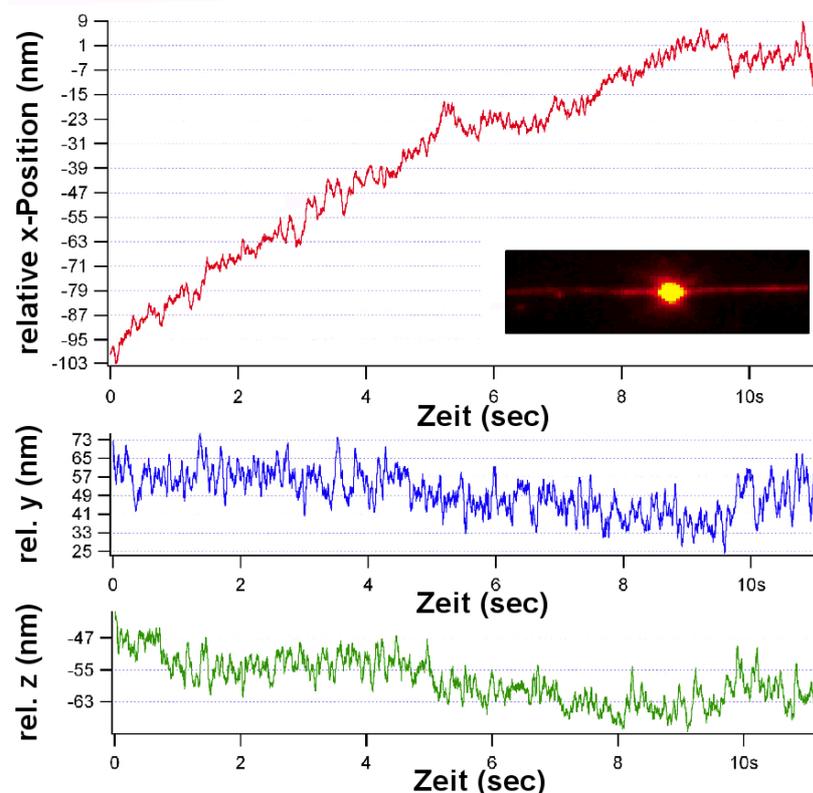


Abbildung 4.24: Dreidimensionale Positionsdaten während der Bewegung eines Latexbeads mit Kinesinmolekülen in sehr geringer Dichte auf seiner Oberfläche auf einem entlang der x-Achse ausgerichteten Mikrotubulus (siehe Fluoreszenzaufnahme im Bildeinsatz) in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$   $\text{ATP}\gamma\text{S}$ .

Die in Abbildung 4.24 dargestellte Registrierung wurde bei einer ATP $\gamma$ S-Konzentration von 100  $\mu$ M erhalten. Der Mikrotubulus war, wie auf der eingesetzten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme zu sehen ist, entlang der x-Achse ausgerichtet. Die rot gezeichneten Signale der x-Position des *beads* zeigten eine kontinuierliche, gerichtete Bewegung entlang des Mikrotubulus an. Die Mikrosphäre war dabei im Mittel etwa 14 nm/sec schnell. Einige male änderte sich die x-Position der Mikrosphäre sehr sprunghaft (z.B. nach etwa 5 und 9,5 Sekunden). Zur gleichen Zeit kam es auch zu Veränderungen der y-Positionen.

Wie schon bei den Messungen in Gegenwart von ATP beobachtet wurde, änderte sich die axiale Elastizität der Verbindung zwischen Latexbead und Kammeroberfläche auch in Gegenwart von ATP $\gamma$ S.

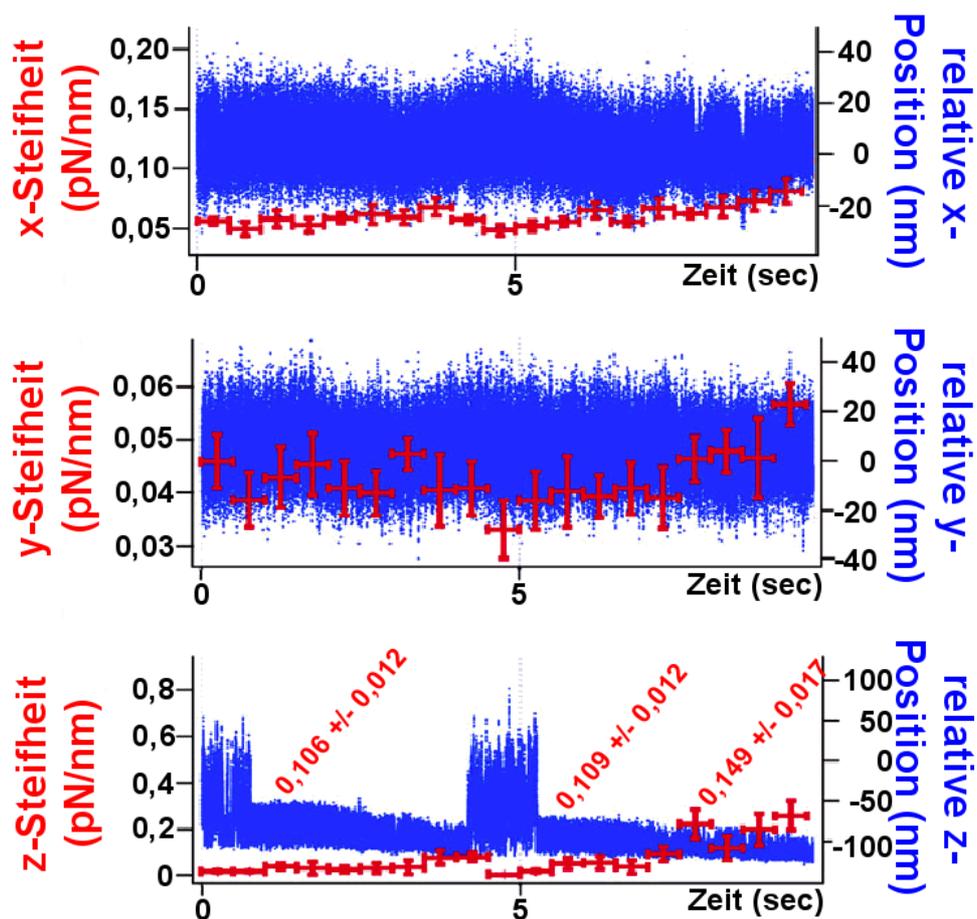


Abbildung 4.25: Dreidimensionale Positionsdaten (blau) und die axiale Elastizitäten innerhalb von 500 msec langen Zeitfenstern (rote Kreuze) während der Bewegung eines Latexbeads mit Kinesinmolekülen in sehr geringer Dichte auf seiner Oberfläche auf einem entlang der x-Achse verlaufenden Mikrotubulus in Gegenwart von 2 mM ATP $\gamma$ S. Die Zahlenwerte der axialen Verbindungselastizität wurden rot in pN/nm angegeben.

Nach dem Anbinden eines Latexbeads an einen Mikrotubulus in Gegenwart von 2 mM ATP $\gamma$ S wurde die Elastizität der Verbindung innerhalb von 500 Millisekunden langen Zeitfenstern mit etwa 0,1 pN/nm gemessen. Bei einsetzender Bewegung der Mikrosphäre entlang des Mikrotubulus stieg sie auf Werte von etwa 0,15 pN/nm an (siehe Abbildung 4.25).

Bei der Bewegung von Kinesin tragenden Latexbeads auf Mikrotubuli konnten in Gegenwart von ATP $\gamma$ S einige male einzelne Schritte von 8 und 4 nm Länge beobachtet werden. Einige Beispiele von 4 nm langen Schritten sind in Abbildung 4.26 nach etwa 6 Sekunden zu sehen. In dem gezeigten Beispiel wurde die Stärke der Laserfalle gegenüber den vorher gezeigten Registrierungen um etwa Faktor drei erhöht, was sich positiv auf die Auflösung einzelner Schritte auswirkte. Die Mikrosphäre wurde durch das Kinesin mit einer Geschwindigkeit von durchschnittlich 10 nm/sec bewegt.

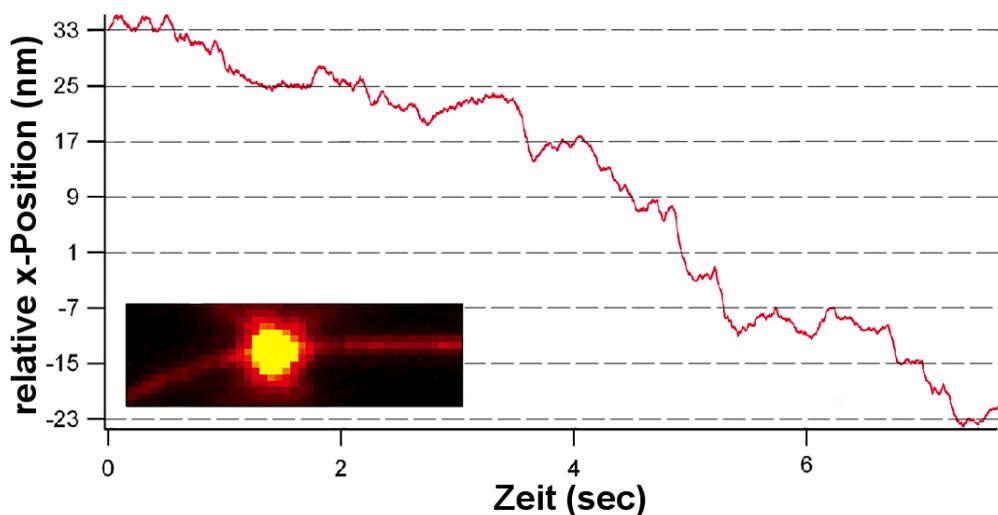


Abbildung 4.26: x-Positionen eines Kinesin tragenden Latexbeads während seiner Bewegung auf einem entlang der x-Achse ausgerichteten Mikrotubulus in Gegenwart von 100  $\mu$ M ATP $\gamma$ S.

#### 4.2.5 Elastizität einzelner Kinesinmoleküle in Anwesenheit des ATP-Analogons AMP-PNP

Da das von Myosin praktisch nicht hydrolysierbare ATP-Analogon ATP $\gamma$ S von Kinesinmolekülen scheinbar langsam hydrolysiert werden konnte, wurde mit AMP-PNP ein weiteres ATP-Analogon benutzt. AMP-PNP wird bei der Aufreinigung von Kinesin aus biologischem Material dazu benutzt, Kinesinmoleküle fest an

Mikrotubuli zu heften, um sie dann mit diesen bei anschließender Zentrifugation zu pelletieren.

In Anwesenheit von 2 mM AMP-PNP banden die Kinesin tragenden Latexbeads fest an auf dem Kammerboden immobilisierte Mikrotubuli an, ohne sich auf diesen zu bewegen oder sich von diesen abzulösen. In Abbildung 4.27 sind die Aufenthaltsorte einer solchen über ein Kinesinmolekül an einen Mikrotubulus fest gebundenen Mikrosphäre an vier verschiedenen Positionen quer zum Mikrotubulus dargestellt. Bei der ganz rechten, im Vergleich kleineren Verteilungswolke, war die gebundene Mikrosphäre vermutlich durch das schon maximal gestreckte Kinesinmolekül seitlich aus der Laserfalle gezogen worden, so dass die dort erhaltenen Positionsdaten nicht zur Analyse geeignet waren.

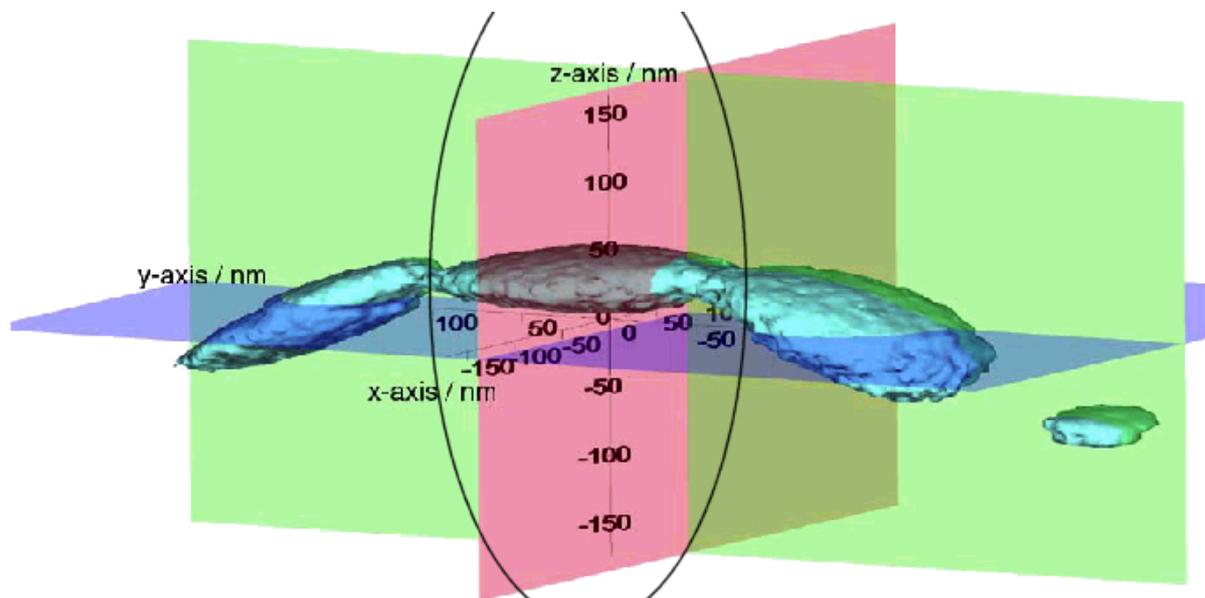


Abbildung 4.27: Türkisfarbene Wolken von Oberflächen gleicher Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines in Gegenwart von 2 mM AMP-PNP über ein Kinesinmolekül an einen Mikrotubulus gebundenen Latexbeads an vier verschiedenen Positionen quer zu diesem Mikrotubulus. Der Mikrotubulus war entlang der x-Achse auf dem Boden der Versuchskammer immobilisiert. Dies entsprach der rosa eingefärbten  $x/z$ -Ebene. Zum Vergleich wurde die Größe der entsprechenden Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines ungebundenen Latexbeads als Ausschnitt einer schwarzen Ellipse angedeutet. Bei der ganz rechten Verteilungswolke war die gebundene Mikrosphäre vermutlich durch das schon maximal gestreckte Kinesinmolekül seitlich aus der Laserfalle gezogen worden.

Zum Größenvergleich der erhaltenen Positionsverteilungen des in Anwesenheit von AMP-PNP über ein Kinesinmolekül an den Mikrotubulus gebundenen Latexbeads wurde wiederum die Größe der Positionsverteilung einer ungebundenen Mikrosphäre

in der optischen Falle schematisch als Ellipse angedeutet. Aus den Aufenthaltswahrscheinlichkeitsverteilungen des gebundenen *beads* wurde über die daraus resultierenden Potentiellandschaft die Federkonstante der Verbindung zwischen Latexbead und Kammeroberfläche ermittelt.

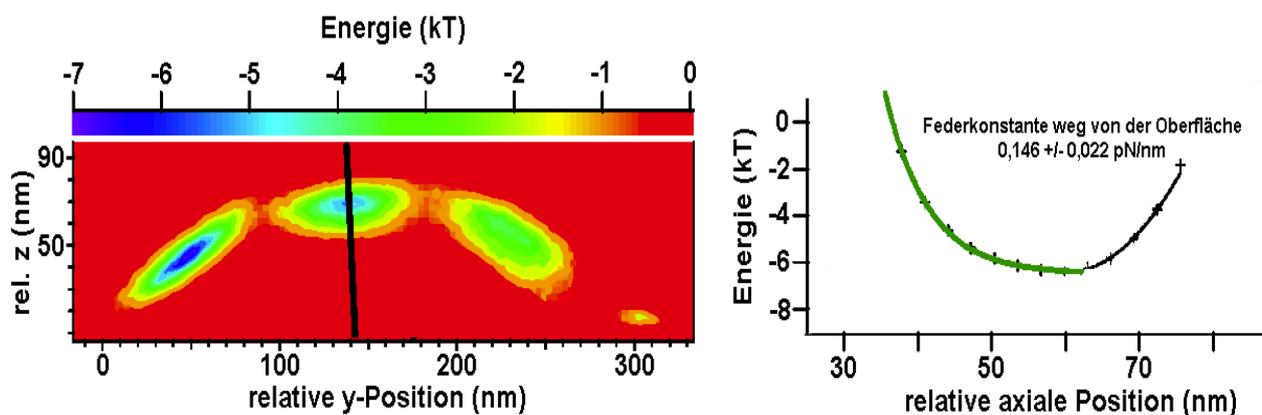


Abbildung 4.28: Farbkodierte, zweidimensionale Darstellung einer Energielandschaft eines in Anwesenheit von 2 mM AMP-PNP über ein Kinesinmolekül an einen Mikrotubulus gebundenen Latexbeads (links). Entlang der schwarzen Linie durch das Rotationszentrum der zweiten Wahrscheinlichkeitsverteilung von links verläuft das rechts gezeigte Potential. Anhand dieses Potentials wurde eine Federkonstanten für die Extension der Verbindung zwischen Latexbead und Mikrotubulus von  $0,146 \text{ pN/nm}$  ( $\pm 0,022 \text{ pN/nm}$ ) berechnet. Der Mikrotubulus befand sich in der linken Abbildung „unten“, in der rechten Abbildung „links“.

Aus dem in Abbildung 4.28 dargestellten Beispiel, das aus der vorher gezeigten dreidimensionalen Positionsverteilung erhalten wurde, wurde eine Elastizität der Verbindung für die Extension weg vom Mikrotubulus von  $0,146 \text{ pN/nm}$  ( $\pm 0,022 \text{ pN/nm}$ ) berechnet.

Durchschnittlich wurde eine Verbindungselastizität zwischen Kinesin tragenden Latexbeads und Mikrotubuli auf der Kammeroberfläche in Gegenwart von 2 mM AMP-PNP von  $0,134 \text{ pN/nm}$  ( $\pm 0,01 \text{ pN/nm}$ ) beobachtet.

## 5 Diskussion

Für die Entwicklung von Kraft oder Bewegung durch Motormoleküle wie Myosin oder Kinesin ist eine elastische Verformbarkeit innerhalb der an Aktinfilamente oder Mikrotubuli gebundenen Querbrücken nötig. Die Querbrücken müssen also ein Element enthalten, welches elastisch verformt werden kann und so den Aufbau von Spannung innerhalb der Querbrücke ermöglicht, die sich dann in Kraft oder Bewegung bemerkbar macht. Obwohl viel über die Struktur von Myosin und Kinesin sowie Aktin und Tubulin durch elektronenmikroskopische Untersuchungen und Röntgenkristallographie wie auch über die Kinetik während ihrer Interaktion bekannt ist, konnte die Frage, welche Molekülteile die elastischen Elemente beherbergen, nicht eindeutig geklärt werden.

In dieser Arbeit sollten mechanische Eigenschaften wie die Elastizität einzelner Moleküle der Mechanoenzyme Myosin II und konventionellem Kinesin untersucht werden. Dies geschah mit Hilfe des Photonischen Kraftmikroskops, indem Mikrosphären über einzelne Motormoleküle an den jeweiligen auf dem Kammerboden immobilisierten Bindungspartner gebunden wurden. Die mechanischen Eigenschaften des verbindenden Motormoleküls beeinflussten die thermische Fluktuationen der in einer Laserfalle gefangenen Mikrosphäre. So ließ sich durch Aufzeichnung der thermischen Bewegung der Mikrosphären auf die Elastizität und andere mechanische Eigenschaften des verbindenden Moleküls rückschließen.

### 5.1 Experimente mit Myosinmolekülen

*Die Molekülelastizität einzelner, funktionsfähiger Myosinmoleküle wurde bei Extension mit 0,03 bis 0,04 pN/nm bestimmt*

Die mit dem PFM aufgezeichneten Positionen von Mikrosphären in einer optischen Falle bildeten die dreidimensionale Form einer hochkant stehenden Zigarre. Auf der Oberfläche der Mikrosphären befanden sich Myosinmoleküle in sehr geringer Dichte. Die Myosinmoleküle wurden frisch aus einzelnen, chemisch gehäuteten Skelettmuskelfasern extrahiert, verdünnt und mit BSA vorbeschichteten Latexbeads inkubiert. Die Funktion der extrahierten Myosinmoleküle wurde vor der Inkubation mittels eines Aktingleitassays überprüft, um die Präsenz von unversehrten Motormolekülen auf der Beadoberfläche zu gewährleisten. Wurden die Mikrosphären

mit Hilfe der optischen Falle in räumliche Nähe von auf dem Boden der Versuchskammer immobilisierten Aktinfilamenten gebracht, so konnten die Myosinmoleküle in Abwesenheit von ATP fest an Aktin binden.

Die Verbindung zwischen Latexbead und dem Kammerboden wurde durch die Interaktion eines Myosinmoleküls mit einem auf dem Boden der Versuchskammer immobilisierten Aktinfilament hergestellt. Die aus biotinylierten Aktinmonomeren polymerisierten, fluoreszenzmarkierten Aktinfilamente waren durch diese Modifikationen nicht in ihrer Funktion beeinträchtigt. Dies konnte durch vergleichende Messungen der Aktingleitgeschwindigkeit von fluoreszenzmarkierten biotinylierten und nicht biotinylierten Aktinfilamenten sicher gestellt werden. Durch die Fluoreszenzmarkierung mit Rhodamin-Phalloidin kam es ebenfalls nicht zu einer Beeinträchtigung der Funktion der Aktinfilamente in Bezug auf ihre Gleitgeschwindigkeit (Yanagida *et al.*, 1984). Durch das Anbinden an den Untergrund bestand die Möglichkeit einer funktionellen Veränderung der Aktinfilamente. Jedoch konnte die Bewegung von mit viel Myosin beschichteten Mikrosphären auf diesen Aktinfilamenten in einem sogenannten Perlenassay (Sheetz und Spudich, 1983; Spudich *et al.*, 1985) in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  ATP beobachtet werden. Dies zeigte sowohl die Anwesenheit von mehreren nicht-prozessiven Motormolekülen auf den Mikrosphären als auch die nicht gestörte Funktion von Myosinmolekülen und Aktinfilamenten. Ein weiterhin bestehender Unterschied zu Bedingungen im Muskel war die Abwesenheit von Aktin assoziierten Proteinen wie Tropomyosin und dem Troponin-Komplex und der dadurch bedingte Wegfall der Regulation der starken Anbindung von Myosin an Aktin durch Kalzium-Ionen. Die Präsenz eines einzelnen Aktinfilaments und seine Ausrichtung wurde durch die im *Photonic Force Microscope* integrierte *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy* festgestellt. Für das Zustandekommen der Verbindung durch Myosin sprechen mehrere Dinge. In Abwesenheit von Myosinmolekülen auf den Latexbeads kam es nicht zum Anbinden an auf dem Kammerboden befestigten Aktinfilamenten. Außerdem konnten in Abwesenheit von ATP an einen mit Aktinfilamenten beschichteten Kammerboden gebundene Myosin tragende Latexbeads durch Zugabe von ATP wieder abgelöst werden.

Für die Interpretation der während der Bindung eines Latexbeads an Aktin erhaltenen Daten war es wichtig, dass nur ein einzelnes Myosinmolekül die Mikrosphäre mit dem Aktinfilament auf dem Kammerboden verband. Um sicher zu

gehen, dass die Verbindung zwischen Latexbead und Aktinfilament auf dem Anbinden eines einzelnen Myosinmoleküls beruhte, wurden nur solche Beadpräparationen mit Myosin auf der Oberfläche für Experimente verwendet, bei denen höchstens die Hälfte von zwanzig zufällig selektierten Mikrosphären der gut gemischten Präparation in Abwesenheit von ATP innerhalb von einer halben Minute an ein Aktinfilament banden. Hierbei handelte es sich um eine auf das Motormolekül Myosin adaptierte Methode einer ursprünglich für Kinesinmoleküle entwickelten Statistik von Steven Block (Block *et al.*, 1990). Kam es bei höchsten 50 % der Mikrosphären zum Anbinden an Aktin, so waren im Mittel weniger als ein einzelnes ( $\leq 0,67$ ) Myosinmolekül auf der Oberfläche jedes Latexbeads adsorbiert. Als Resultat wurde in Anwesenheit von ATP kein Anbinden von Latexbeads mit Myosinmolekülen in sehr geringer Dichte auf der Oberfläche an Aktin beobachtet, während es bei höheren Myosindichten zu gerichteter Bewegung der Latexbeads entlang der Aktinfilamente kam. Dies deutet auf das Zusammenspiel und enge räumliche Nähe von mehreren nicht-prozessiven Myosinmolekülen im letzteren Fall hin. Eine weitere Kontrolle der Anzahl der an der Verbindung zwischen Latexbead und Aktinfilament beteiligten Myosinmoleküle stellte die geometrische Analyse dieser Verbindung dar. Auf eine Verbindung durch mehrere Myosinmoleküle hätte eine starke Einschränkung der Beweglichkeit des Latexbeads entlang der Achse des vereinzelt Aktinfilaments hindeuten können. Das *bead* wäre über mehrere Verbindungselemente an mehreren Stellen des Aktinfilaments „aufgespannt“ gewesen. Die Positionsfluktuationen einer an mehreren Stellen entlang eines Aktinfilaments gebundenen Mikrosphäre wären wie das Wackeln eines Geodreiecks entlang seiner unteren Kante stark eingeschränkt gewesen, während sie quer zum Aktinfilament diesen Effekt nicht in einem solchen Maße gezeigt hätten. Dies wurden jedoch bei den analysierten Messdaten nicht beobachtet, was auf einzelne Moleküle hindeutete. Durch die geometrische Analyse der Verbindungen zwischen Latexbeads und Oberfläche ließen sich zusätzlich zur Kontrolle der Latexbead-Präparationen *vor* den Experimenten so auch *nach* den Messungen Abschätzungen darüber machen, ob sie durch einzelne Moleküle zustande kamen.

Nachdem ein einzelnes Myosinmolekül auf der Oberfläche eines Latexbeads an ein am Boden der Versuchskammer befestigtes Aktinfilament in Abwesenheit von ATP anband, wurden die thermischen Fluktuationen der Mikrosphäre stark eingeschränkt. Die Positionen gleicher Aufenthaltswahrscheinlichkeit bildeten die dreidimensionale

Form eines Schirms, da die Bewegungen des *beads* entlang der Achse des verbindenden Myosinmoleküls stärker eingeschränkt wurden als in anderen Richtungen. Die Elastizität von Myosinmolekülen entlang ihrer Achse war nicht linear. Bei Extension der Myosinmoleküle, also Bewegung der Mikrosphäre weg vom Anbindungspunkt am Aktinfilament, wurde eine Molekülsteifheit von durchschnittlich 0,03 bis 0,04 pN/nm ermittelt, während die Elastizität bei Kompression, der Bewegung hin zum Aktinfilament, im Mittel mit 0,004 pN/nm um eine Zehnerpotenz kleiner war. Eine Abhängigkeit der Elastizität bei Kompression und Extension von der Ausrichtung des Aktinfilaments konnte nicht festgestellt werden. Sowohl bei Dehnung quer als auch längs zum Aktinfilament wurden vergleichbare Werte für die Molekülsteifheiten gefunden.

Bei der Anheftung des Latexbeads bestanden die Möglichkeiten, dass das verbindende Myosinmolekül nur mit einem oder mit beiden Köpfen an Aktin gebunden war. In Muskelfasern sollen in Abwesenheit von Nukleotid im Rigor-Zustand alle Myosinköpfe an Aktin gebunden sein (Lovell *et al.*, 1981). Auch *in vitro* wurde schon ein solches doppelköpfiges Anbinden von Myosin an ein Aktinfilament beobachtet (Griffiths *et al.*, 2002). Es ist also anzunehmen, dass auch bei den Experimenten mit dem PFM die Anbindung des Myosinmoleküls an Aktin in Abwesenheit von ATP mit beiden Köpfen stattfand. Dabei waren entweder beide Köpfe im nukleotidfreien Zustand gebunden oder ein Kopf war ohne Nukleotid gebunden, während der zweite noch ADP gebunden hatte, da er durch das doppelköpfige Anbinden unter Spannung stand, was die ADP-Abgabe sehr verlangsamte. Alternativ könnte sich initial ATP oder ADP und Phosphat im zweiten Kopf befunden haben. Aufgrund der Nähe zum Aktinfilament und der daraus resultierenden schnellen Phosphat-Abgabe wäre diese vorübergehend einköpfige Bindung in eine doppelköpfige Bindung übergegangen.

*Die beobachtete Molekülelastizität war außerhalb des Myosinkopfes, wahrscheinlich im S-2-LMM Gelenk, lokalisiert*

Die hier erhaltenen Werte für die Elastizität von Myosinmolekülen waren wesentlich niedriger als die vor allem von Experimenten an isolierten Muskelfasern erwartete Steifheit des Myosinkopfes. Für lange Zeit wurde für den Myosinkopf eine Elastizität von etwa 0,25 pN/nm angenommen (Huxley und Simmons, 1971). Wie schon in den Achtziger Jahren von Eisenberg und Mitarbeitern vorgeschlagen wurde (Eisenberg *et*

*al.*, 1980), wurden die erwarteten Werte in jüngerer Vergangenheit nach oben auf Werte von etwa 2 pN/nm korrigiert (Huxley und Tideswell, 1996). Diese neueren, von Computersimulationen erhaltenen Einschätzungen beruhten auf verbesserten Einzel-fasereperimenten und *in vitro* Messungen an einzelnen Myosinmolekülen. Außerdem wurde berücksichtigt, dass etwa die Hälfte der insgesamt gemessenen Dehnbarkeit von Muskelfasern in den Aktin- und Myosinfilamenten selbst lokalisiert sein soll (Higuchi *et al.*, 1995; Huxley *et al.*, 1994; Kojima *et al.*, 1994; Wakabayashi *et al.*, 1994).

*In vitro* Messungen von individuellen mechanischen Ereignissen an einzelnen Myosinmolekülen oder enzymatischen Spaltprodukten lieferten verschiedene Ergebnisse bezüglich der Molekülelastizität. Bei diesen Messungen wurde sich verschiedener Techniken bedient. Bei der sogenannten Drei-*bead* Geometrie (Finer *et al.*, 1994) wurde ein Aktinfilament zwischen zwei in optischen Fallen gefangenen Mikrosphären aufgespannt und in die Nähe eines Myosinmoleküls oder eines Spaltprodukts (S-1 oder HMM) gebracht. Dieses Myosinfragment war auf einer vorher auf dem Kammerboden immobilisierten dritten Glaskugel adsorbiert. Anstelle des Myosin-spaltprodukts auf einer dritten Glaskugel wurden auch in synthetische Myosinfilamente inkorporierte ein- oder zweiköpfige Myosinmoleküle verwendet (Ishijima *et al.*, 1998; Ishijima *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1998). Bei anderen Messaufbauten wurde ein Aktinfilament zwischen einer Mikrosphäre, die in einer Laserfalle gefangen war, und in geringer Dichte auf einer Glasoberfläche adsorbierten HMM- oder S-1 Molekülen aufgespannt und durch Manipulieren der Mikrosphäre von diesen weggezogen (Nishizaka *et al.*, 1995; Nishizaka *et al.*, 2000). Andere Messungen wurden zwischen auf einer Glasoberfläche immobilisierten, biotinylierten Aktinfilamenten und S-1 Molekülen auf einer kristallinen Spitze durchgeführt (Kitamura *et al.*, 1999). Unabhängig vom verwendeten Messaufbau wurde die Elastizität von Myosinmolekülen mit 0,03 bis 0,06 pN/nm (Ishijima *et al.*, 1998; Ishijima *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1998) und die von enzymatischen Spaltprodukten wie S-1 oder HMM mit 0,5 bis 1,5 pN/nm bestimmt (Kitamura *et al.*, 1999; Mehta *et al.*, 1997; Molloy *et al.*, 1995; Nishizaka *et al.*, 1995; Veigel *et al.*, 1998). Die in dieser Arbeit erhaltene Elastizität von vollständigen Myosinmolekülen lag mit Werten von 0,03 bis 0,04 pN/nm im Bereich der Werte, die in anderen Studien bei der Verwendung von in synthetische Myosinfilamenten inkorporierten zwei- oder einköpfigen, aber sonst vollständigen Myosinmolekülen beschrieben wurden (Ishijima

*et al.*, 1998; Ishijima *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1998). Wurden Myosinfragmente verwendet, so fiel die erhaltene Molekülelastizität viel höher aus. Die Unterschiede bezüglich der gefundenen Myosinsteifheit scheinen also von der Art der verwendeten Moleküle her zu rühren. In den Experimenten, die eine höhere Steifheit des Myosinmoleküls ergaben, wurden kurze Myosinfragmente verwendet, in denen das S-2 Fragment und/oder der LMM Teil des Myosins fehlten (Kitamura *et al.*, 1999; Mehta *et al.*, 1997; Molloy *et al.*, 1995; Nishizaka *et al.*, 1995; Nishizaka *et al.*, 2000; Veigel *et al.*, 1998). Mit der An- oder Abwesenheit dieser Molekülteile änderte sich also die Elastizität. Dies deutet darauf hin, dass innerhalb oder zwischen diesen Molekülregionen der Ursprung zusätzlicher Flexibilität lag und dass in dieser Arbeit nicht die Elastizität der Myosinkopfdomäne bestimmt wurde sondern von anderen, weicheren Elementen außerhalb des Myosinkopfes.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass hier die Elastizität eines Molekülteils außerhalb des Myosinkopfes ermittelt wurde, zeigte sich bei der Analyse der Verbindungslänge zwischen beobachteter Mikrosphäre und Kammerboden. Es wurde ein Drehpunkt innerhalb des verbindenden Myosinmoleküls gefunden, der sich etwa 89 nm oberhalb der Kammeroberfläche befand. Da die Kopfdomänen des Myosinmoleküls nur etwa 19 nm Länge messen (Elliott und Offer, 1978) und an Aktinfilamente mit einem Durchmesser von etwa 6 nm gebunden sind, in der Summe also etwa 27 nm, lag der beobachtete flexible Teil des Myosin außerhalb der Kopfdomäne.

Welcher Teil des Myosinmoleküls kam also als strukturelle Ursache der gemessenen Elastizität in Frage? Myosinmoleküle haben eine Länge von etwa 180 nm (Elliott und Offer, 1978) und können durch Proteasen in drei Fragmente verdaut werden: das S-1 Fragment oder Kopfdomäne, das S-2 Fragment und das leichte Meromyosin (LMM). S-1 und S-2 bilden zusammen das schwere Meromyosin (HMM), während der sogenannte Myosinschwanzteil aus S-2 und LMM besteht. Es ist allgemein akzeptiert, dass Myosinmoleküle mindestens zwei flexible Regionen beinhalten, eine zwischen dem S-1 Fragment und dem Schwanzteil und eine andere, als *hinge* bezeichnete, nahe der Mitte des Schwanzes am Ende des S-2 Fragments. Es wurde postuliert (Huxley und Simmons, 1971; Huxley, 1969), dass diese *hinge* Region während des Querbrückenzyklus des Myosins (Huxley, 1957; Huxley und Niedergerke, 1954) die Bewegung der Myosinköpfe weg vom Rückgrat der dicken Filamente erlaubt und dadurch das Anbinden von Myosin an Aktinfilamente erst ermöglicht wird. In elektronenmikroskopischen Studien wurden zwei Biegepunkte

innerhalb des Myosinmoleküls, einer etwa 44 nm (Elliott und Offer, 1978; Walker *et al.*, 1985) und ein anderer etwa 78 nm (Takahashi, 1978; Walker *et al.*, 1985) vom Übergang der Kopfdomäne in den Schwanzteil entfernt, beschrieben. Unter Einbeziehung der 19 nm für den Myosinkopf ergeben sich Abstände von 62 beziehungsweise 95 nm vom Anbindungspunkt an das Aktinfilament (vergleiche Abbildung 5.1).

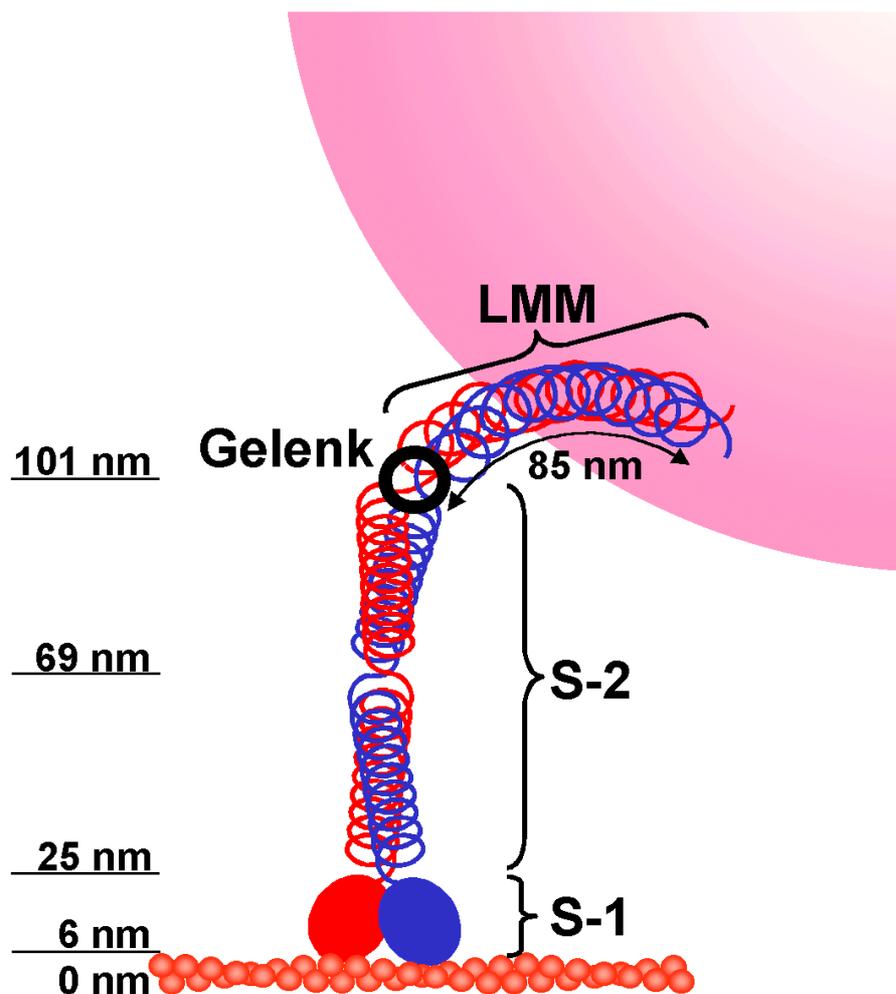


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung eines verbindenden Myosinmoleküls (rot und blau) zwischen einer rosa Mikrosphäre und einem roten Aktinfilament auf dem Boden der Versuchskammer.

Bei Messungen von Lichtbrechung und optischer Drehung zeigte sich bei Temperaturen zwischen 20 und 40 °C Bewegung im Gelenk zwischen S-2 und LMM Teil des Myosins, während es bei niedrigeren Temperaturen steif blieb (Rodgers und Harrington, 1987). In Gegenwart von gegen Myosins S-2 Teil gerichteten Antikörpern wurde eine Reduktion der Muskelfasersteifheit beobachtet, während hingegen die

Kraft-Steifheit Beziehung und die ATPase Aktivität unverändert blieben (Sugi *et al.*, 1992). Dies deutet darauf hin, dass, wenn Antikörper an das S-2 Fragment des Myosins angebunden waren und so die Flexibilität dieses Elements reduziert wurde, die Köpfe dieser Myosinmoleküle noch ATP hydrolysierten, aber weder zur Kraftentwicklung noch zur Fasersteifheit beitrugen. Eine gewisse Beweglichkeit dieser Region des Myosinmoleküls scheint also für die Kraftgenerierung im Muskel wichtig zu sein.

Durch eine geometrische Auswertung ließ sich abschätzen, welche Teile der Myosinmoleküle die Verbindung zwischen Latexbead und Oberfläche der Versuchskammer herstellten und welche Molekülregionen dabei die flexibelsten waren. Bei der Bestimmung der Verbindungslänge wurde eine Gesamtlänge von etwa 129 nm erhalten. Dieser Wert, der jedoch auch noch die Dicke des Aktinfilaments enthielt, erscheint angesichts der mit etwa 180 nm bestimmten Länge des Myosinmoleküls (Elliott und Offer, 1978) sinnvoll. Die beobachtete Verbindungslänge war größer als die Summe aus den S-1 und S-2 Fragmenten (95 nm), jedoch kleiner als die gesamte Moleküllänge. Es scheint also nur ein Teil des LMM Fragments an der Anheftung der Myosinmoleküle an die Latexbeads beteiligt gewesen zu sein. Obwohl der LMM Teil des Myosins als steifer Zylinder beschrieben wurde (Highsmith *et al.*, 1977), zeigte sich, dass die distalen etwa 20 nm signifikant anders waren und oft eine hakenförmige Struktur bildeten (Walker *et al.*, 1985). Diese Änderung der Konformation innerhalb des LMM Fragments erfordert zumindest eine geringe Flexibilität sowohl innerhalb der distalen 20 nm als auch zwischen diesen und dem Rest des LMM Teils. Angesichts der mit 129 nm bestimmten Gesamtlänge der Verbindung zwischen *bead* und Oberfläche schien jedoch ein größerer Teil des LMM Fragments als die letzten 20 nm an der Mikrosphäre adsorbiert gewesen zu sein.

Der rotierbare Teil des Myosinmoleküls war im entspannten Molekül im Mittel 40 nm lang und konnte auf maximal 70 nm gedehnt werden. Wie schon erwähnt, beinhalteten die 89 nm zwischen Drehpunkt innerhalb des Myosinmoleküls und dem Boden der Versuchskammer sowohl Myosin- als auch Nicht-Myosin-Komponenten. Als einer dieser Anteile, die nicht von Myosinmolekül herrührten, ist vor allem das Aktinfilament mit etwa 6 nm zu nennen, an das das Myosinmolekül angebunden war. Das Aktinfilament war über Biotin an etwa 5 nm große Neutravidinmoleküle gebunden. Die Größe der Neutravidinmoleküle ging jedoch nicht in die

Verbindungs­länge mit ein, da eine dünne Schicht von Neutravidinmolekülen den *ganzen* Kammerboden bedeckte. Der von den Myosinmolekülen resultierende Abstand des Drehpunktes von dem Anbindungspunkt am Aktinfilament betrug also etwa 83 nm. Dieser Wert erhöhte sich jedoch noch etwas, da zu diesen 83 nm noch die Schichtdicke von BSA auf den Mikrosphären hinzu addiert werden musste. Die Beschichtung von Kammerboden und Latexbead resultierte in einem größeren Abstand zwischen Beadzentrum und Glassoberfläche als mit dem reinen Beadradius angenommen wurde. Damit lag der Drehpunkt etwa im Bereich des Myosin­gelenks zwischen S-2 Fragment und dem LMM Teil des Myosin. Dieses ist etwa 95 nm von der Aktin­bin­dungs­stelle entfernt (siehe Abbildung 5.1). Es ist also sehr wahrscheinlich, dass es sich bei dem mit dem Photonischen Kraftmikroskop gefundenen Drehpunkt innerhalb des Myosinmoleküls um die schon mit anderen Methoden beobachtete *hinge* Region des Myosins handelte. Dies bedeutet für die gemessene Elastizität von Myosinmolekülen, dass sie von Strukturen außerhalb des Myosinkopfes herrührten. Hierfür kommen Teile des S-2 Fragments, die *hinge* Region und der proximale Teil des leichten Meromyosins in Frage. Da von Messungen an Muskelfasern wesentlich höhere Werte für den Elastizität des Myosinkopfes erwartet werden als die, die hier erhaltenen wurden, muss sich die Region, die bei den hier vorgestellten Experimenten Ursache einer größeren Flexibilität war, im Muskelfaserverband steifer als hier beobachtet verhalten. Es könnte zum Beispiel sein, dass dieses Element normalerweise im Muskel in das Rückgrat der Myosinfilamente inkorporiert und so stabilisiert ist, während es bei den Experimenten mit dem PFM an einzelnen Myosinmolekülen frei zugänglich war. Eine weitere Möglichkeit, gerade im Hinblick auf das asymmetrische Verhalten der Myosinelastizität, wäre, dass dieser Molekülteil in Muskelfasern schon vorgedehnt ist. Bei weiterer Extension würde sich das Element sehr steif verhalten. Dies zeigten die in dieser Arbeit erhaltenen Elastizitätskurven des Myosin bei starker Dehnung (Abbildung 4.7). Kompression oder die Rückkehr in die entspannte Lage wären hingegen einfacher. Ein weiterer Unterschied zu den Bedingungen bei vielen Muskelfaserexperimenten war die Temperatur. Während die PFM-Experimente bei Raumtemperatur durchgeführt wurden, laufen Steifheitsmessungen an Muskelfasern im allgemeinen bei etwa 5 bis maximal 20 °C ab. Die Beweglichkeit des S-2-LMM Übergangs wurde jedoch als temperaturabhängig beschrieben (Rodgers und Harrington, 1987; Ueno und Harrington, 1984). Bei 5 bis maximal 20 °C könnte sich

die *hinge* Region wesentlich steifer verhalten als bei Raumtemperatur, da die Beweglichkeit erst ab einer Temperatur von mindestens 20 °C beobachtet werden konnte (Rodgers und Harrington, 1987). Angesichts des in dieser Arbeit erhaltenen Wertes für die Elastizität einzelner, isolierter Myosinmoleküle und der Lokalisation der flexiblen Region innerhalb des Moleküls sprechen einige Dinge dagegen, dass die hier beobachtete Elastizität ihren Ursprung in in anderen Studien vorgeschlagenen Molekülteilen hat. Es wurden Elemente wie die Aktinbindungsstelle (Huxley, 1974), Myosins *converter* Domäne (Köhler *et al.*, 2002) oder die daran angeschlossene Helix mit den Bindungsstellen für die leichten Ketten, der Hebelarm (Dobbie *et al.*, 1998; Irving *et al.*, 2000; Uyeda *et al.*, 1996) diskutiert. Hingegen spricht vieles für die Übergangsstelle zwischen Myosins S-2 Fragment und leichtem Meromyosin (Sugi *et al.*, 1992) als strukturelles Gegenstück der in dieser Arbeit vorgestellten Flexibilität.

#### *Ablösen der Myosinmoleküle von Aktin oder der Aktinfilamente vom Kammerboden fand nicht statt*

Sowohl das Ablösen der Aktinfilamente vom Boden der Versuchskammer als auch das Abreißen der Myosinmoleküle von den Latexbeads oder von den Aktinfilamenten, an die sie gebunden waren, würden erhebliche Probleme für die Bestimmung der mechanischen Eigenschaften der verbindenden Myosinmoleküle darstellen. Jedoch wurden die dafür nötigen Kräfte mit der sehr schwachen Laserfalle des Photonischen Kraftmikroskops während der Experimente bei weitem nicht erreicht. Wie beschrieben waren die biotinylierten Aktinfilamente über auf der Glassoberfläche adsorbierte Neutraavidinmoleküle am Kammerboden befestigt. Mit einem Atomischen Kraftmikroskop (AFM) wurden die Abrisskräfte von Biotin-Avidin Paaren mit 160 pN pro Paar bestimmt (Florin *et al.*, 1994). Die Bindung zwischen Biotin und Streptavidin war mit 260 pN pro Molekülpaar noch fester (Moy *et al.*, 1994). Es ist anzunehmen, dass die Bindungsstärke zwischen Biotin und Neutraavidin ähnlich fest ist. Außerdem waren bei der Befestigung der Aktinfilamente viele Biotin-Neutraavidin Paare beteiligt. Die Kräfte, die für ein Ablösen eines Myosinkopfes von einem Aktinfilament in Abwesenheit von ATP nötig sind, wurden mit etwa 9 pN (+/- 4 pN) bestimmt (Nishizaka *et al.*, 1995). All diese Werte sind vergleichsweise groß gegen die Elastizitäten, die in dieser Arbeit gemessen wurden, was gegen ein Ablösen der einzelnen Moleküle voneinander während der Messungen spricht. Die

erhaltene Steifheit stellt demnach die Elastizität von Teilen einzelner Myosinmoleküle dar.

*Vergleich mit früheren Ergebnissen: Gemeinsamkeiten und mögliche Unterschiede*

Wie schon dargestellt, scheint das strukturelle Gegenstück der hier bestimmten Myosinelastizität außerhalb des Myosinkopfes lokalisiert gewesen zu sein. Als wahrscheinlichstes Element für den beobachteten Drehpunkt innerhalb des Myosinmoleküls stellte sich die S-2-LMM *hinge* dar, die beobachtete Dehnung im rotierbaren Teil des Myosins könnte ebenfalls aus diesem Gelenk oder dem anschließenden LMM Fragment hervorgegangen sein. Die mit 0,03 bis 0,04 pN/nm erhaltenen Werte für die Elastizität einzelner, vollständiger Myosinmoleküle waren jedoch sehr gering im Vergleich zu Werten, die von Muskelfasermessungen erwartet oder bei Einzelmolekülexperimenten mit den Myosinfragmenten S-1 und HMM erhalten wurden. Beim Vergleich mit den letzteren wurde schon die An- oder Abwesenheit des S-2-LMM Gelenks und des LMM Teils diskutiert. Diese Molekülteile waren allerdings bei Messungen an Myosinmolekülen im Muskelfaserverband präsent. Beim Vergleich mit den von Muskelfaserexperimenten erwarteten Werten von etwa 2 pN/nm wurde schon auf die Möglichkeiten hingewiesen, dass diese Molekülteile in der Muskelfaser in das Rückgrat der Myosinfilamente inkorporiert und so stabilisiert sein könnten, während sie bei den Experimenten mit dem PFM an einzelnen Myosinmolekülen zugänglich waren. Auch die Möglichkeit, dass diese Teile des Myosins in der Muskelfaser durch ständigen Zug „versteift“ sein könnten, wurde angesprochen. Jedoch wurde bei Messungen an in synthetische Myosinfilamente inkorporierten, vollständigen Myosinmolekülen eine mit den hier vorgestellten Werten vergleichbare Elastizität bestimmt (Ishijima *et al.*, 1998; Ishijima *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1998). Das könnte auf eine nur unvollständige Rekonstitution der synthetischen Myosinfilamente hindeuten, aus der eine verminderte Stabilisierung der Myosinmoleküle resultierte.

Obwohl vieles auf das Gelenk zwischen S-2 und dem LMM Teil als Region der größten Flexibilität hindeutet, muß von einigen anderen Experimenten her auch das Gelenk zwischen S-1 und dem S-2 als nicht völlig starr angenommen werden. Diese Stelle scheint in der *in vitro* Motilität zumindest soweit rotierbar zu sein, dass Aktinfilamente auf nativen und synthetischen Myosinfilamenten auch entgegen der „physiologischen“ Laufrichtung weg vom Zentrum transportiert werden konnten (Han

und Sellers, 1998; Scholz, 1998; Sellers und Kachar, 1990; Yamada und Takahashi, 1992; Yamada und Wakabayashi, 1993; Yamada *et al.*, 1997). Auch bei der Verwendung von in eine Richtung ausgerichteten HMM Molekülen im *in vitro* Motilitätsassay wurde Gleiten von Aktinfilamenten in beide Richtungen beobachtet (Toyoshima *et al.*, 1989), und es wird angenommen, dass die Rotationssteifheit von HMM niedrig ist (Nishizaka *et al.*, 2000).

Bei der Analyse der Verbindungslänge zwischen Myosin tragenden Latexbeads und Aktinfilamenten könnten sich zusätzlich zu der Drehung um den ermittelten Punkt noch andere Bewegungen ereignet haben. Eine Möglichkeit wäre, dass an dem Teil, mit dem das Myosinmolekül an der Mikrosphäre adsorbiert war, Drehung oder partielles Ablösen stattfand. Da das Myosinmolekül wohl mit einem längeren Teil als den distalen 20 nm an das Latexbead adsorbiert war, ist davon auszugehen, dass auch anderen Teile der starren *coiled coil* des LMM mit an der Anheftung beteiligt waren. Nach elektronenmikroskopischen Beobachtungen befinden sich in diesem 69 nm langen Abschnitt des LMM zwischen S2-LMM *hinge* und den distalen 20 nm keine weiteren Gelenkpunkte im Myosinmolekül. Wenn diese Region also teilweise an das *bead* adsorbiert war, ist es unwahrscheinlich, dass sie, wie in der Modellzeichnung in Abbildung 5.1 angedeutet wurde, entlang der Achse des rotierbaren Teils der Verbindung zwischen Latexbead und Untergrund ausgerichtet war. Wahrscheinlicher ist hingegen, dass sich dieser teilweise an die Mikrosphäre angebundene Teil des Moleküls eher wie eine Blattfeder als wie eine Spiralfeder verhielt. Dies könnte das teilweise von dem benutzen, einfachen Modell abweichende Verhalten erklären und resultierte außerdem in einer leicht unterschätzten Länge dieses rotierenden Teils der *bead*-Oberflächen-Verbindung. Das blattfeder-artige Verhalten des teilweise an die Mikrosphäre adsorbierten Molekülteils könnte sich auch durch Rotation der Latexbeads verstärkend auf das nicht lineare Verhalten der gemessenen Verbindungselastizität ausgewirkt haben (Dupuis *et al.*, 1997).

Als Versuchsmaterial wurden native Myosinmoleküle verwendet, die frisch aus einzelnen, chemisch gehäuteten Skelettmuskelfasern extrahiert wurden. Diese Art der Myosinisolierung stellte eine etablierte und sehr schnelle Methode dar, und die dabei gewonnenen Myosinmoleküle ließen sich einfach und schnell mit dem bekannten und gewohnten System des *in vitro* Motilitätsassays auf unversehrte Funktion überprüfen. Alternative Versuche, chemisch modifiziertes schweres

Meromyosin über Biotin an mit Neutraavidin beschichtete Latexbeads zu binden und für die Experimente zu verwenden, waren nicht von Erfolg gekrönt. Gründe hierfür könnten Denaturierung des HMM während des Biotinylierens oder Mehrfach-Biotinylierung gewesen sein. Auch konnten die Aktinfilamente bei der Anbindung von HMM an die Latexbeads über ein Biotin-Neutraavidin System nicht durch die gleichen Moleküle auf dem Boden der Versuchskammer immobilisiert werden. Die Verwendung eines alternativen Anbindens der Aktinfilamente an eine zuvor silanisierte Glassoberfläche resultierte in einem gehäuften, unspezifischen Anbinden der Mikrosphäre an die zusätzlich mit BSA beschichtete Kammeroberfläche.

Anfänglich wurden statt einzelner Aktinfilamente etwa 100 nm dicke Bündel von Aktinfilamenten verwendet, um so eine funktionelle Veränderung des Aktins durch das Anbinden an den Untergrund zu verhindern. Eine solche Veränderung hätte vermutlich nicht die Aktinfilamente auf der dem Kammerboden abgewandten Seite betroffen. Jedoch zeigte sich bei der Verwendung von Aktinfilamentbündeln, dass die Geometrie der Verbindung zwischen Latexbead und Aktinfilamentbündel nach dem Anbinden von der Gestalt des Bündels vorgegeben wurde, was fälschlicherweise als Effekt der verbindenden Myosinmoleküle interpretiert wurde (Tischer, 2000). Häufig wurden auch sehr steife Bindungen an die Aktinfilamentbündel beobachtet, was jedoch wohl von Mikrosphären herrührte, die sich in einem Netzwerk von Aktinfilamenten eines durch Lösungswechsel „aufgeweichten“ Bündels verfangen hatten und so *im* Aktinfilamentbündel immobilisiert waren. Dies wurde als sehr feste Bindung von Myosin an Aktin fehlinterpretiert. Durch Verwendung von einzelnen Aktinfilamenten, die über Biotin auf einer mit Neutraavidin beschichteten Glassoberfläche immobilisiert wurden, ließen sich diese Probleme verhindern.

## 5.2 Experimente mit einzelnen Kinesinmolekülen

*Mikrosphären banden über einzelne, funktionstüchtige Kinesinmoleküle an immobilisierte Mikrotubuli an*

Wie auch bei den Experimenten mit einzelnen Myosinmolekülen bildeten die Positionsverteilungen von in einer Laserfalle gefangenen Mikrosphären mit vereinzelt Kinesinmolekülen auf der Oberfläche vor ihrem Anbinden an Mikrotubuli die Gestalt einer hochkant stehenden Zigarre. Die auf den Latexbeads adsorbierten Kinesinmoleküle waren funktionstüchtig, und ihre Fähigkeit, sich entlang von Mikrotubuli zu bewegen, wurde vorab mit einem Mikrotubuli Gleitassay überprüft.

Wurden die Mikrosphären mit Hilfe der optischen Falle in räumliche Nähe von auf dem Boden der Versuchskammer immobilisierten Mikrotubuli gebracht, so banden die Kinesinmoleküle in Abwesenheit von ATP fest an diese an. Durch das Immobilisieren der Mikrotubuli auf dem Untergrund kam es nicht zu einer funktionellen Beeinträchtigung der Mikrotubuli. In Gegenwart von ATP bewegten sich die Mikrosphären auf diesen Mikrotubuli, wie es schon früher bei Latexbeads mit einzelnen Kinesinmolekülen auf der Oberfläche beobachtet wurde (Block *et al.*, 1990; Higuchi *et al.*, 1997; Svoboda *et al.*, 1993). Dies zeigte sowohl die Anwesenheit prozessiver Motormoleküle auf den Mikrosphären als auch die normale Funktion von Kinesinmolekülen und Mikrotubuli. Die Geschwindigkeiten der von Kinesinmolekülen transportierten Latexbeads entlang von Mikrotubuli wurden bei verschiedenen ATP-Konzentrationen bestimmt. Bei einer ATP-Konzentration von 2 mM wurden die Mikrosphären mit einer Geschwindigkeit von 600 nm/sec bewegt. Bei ATP-Konzentrationen von 2  $\mu$ M und 1  $\mu$ M wurden Geschwindigkeiten von 36 nm/sec, beziehungsweise von 12 nm/sec erhalten. Diese Werte lagen im Bereich von früheren Messungen der Kinesingeschwindigkeit (Higuchi *et al.*, 1997). Die Präsenz eines einzelnen Mikrotubulus und seine Ausrichtung wurde durch die im *Photonic Force Microscope* integrierte *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy* gesichert. War kein Kinesin auf den Latexbeads adsorbiert, so wurde auch kein Anbinden der *beads* an Mikrotubuli beobachtet. Dies spricht dafür, dass die Anbindung der Mikrosphären durch Kinesinmoleküle zustande kam. Zweifelsfrei wurde das noch durch die beobachteten gerichteten Bewegungen der Latexbeads in Anwesenheit von ATP bestätigt.

Um sicher zu stellen, dass die Verbindung zwischen Latexbead und Mikrotubulus von dem Anbinden eines einzelnen Kinesinmoleküls verursacht wurde, wurde sich der schon beschriebenen Methode von Steven Block bedient (Block *et al.*, 1990). Es wurden nur solche Präparationen von Latexbeads mit Kinesinmolekülen auf der Oberfläche verwendet, bei denen höchstens die Hälfte von zwanzig zufällig ausgewählten Mikrosphären der gut gemischten Präparation in Anwesenheit von ATP innerhalb von mindestens 10 Sekunden an einen Mikrotubulus anbanden und sich auf diesem fort zu bewegen begannen. Kam es bei höchsten 50 % der Mikrosphären zum Anbinden an einen Mikrotubulus, so waren im Mittel weniger als ein einzelnes ( $\leq 0,67$ ) Kinesinmolekül auf der Oberfläche jedes Latexbeads adsorbiert. Auch aus der geometrischen Analyse der nach dem Anbinden der

Latexbeads mit dem PFM erhaltenen Positionsdaten ging hervor, dass Mikrosphären und Mikrotubuli durch einzelne Kinesinmoleküle verbunden waren.

*In Abwesenheit von ATP kam es zu ein- und doppelköpfigem, festen Anbinden von Kinesin an Mikrotubuli*

Wenn ein einzelnes Kinesinmolekül auf der Oberfläche eines Latexbeads an einen am Boden der Versuchskammer befestigten Mikrotubulus in Abwesenheit von ATP anband, wurden die thermischen Fluktuationen der Mikrosphäre stark eingeschränkt. Die Positionen gleicher Aufenthaltswahrscheinlichkeit bildeten die dreidimensionale Form eines Schirms, da die Bewegungen des *beads* entlang der Achse des verbindenden Kinesinmoleküls stärker eingeschränkt wurden als in anderen Richtungen. Dabei wurden Steifheitswerte zwischen 0,04 und 0,075 pN/nm gemessen, mit gehäuftem Auftreten von Werten um 0,04 pN/nm und 0,065 pN/nm. Ein ausgeprägtes asymmetrisches Verhalten der Molekülsteifigkeit des Kinesins bei Kompression und Extension wurde im Gegensatz zu den Experimenten mit Myosinmolekülen nicht beobachtet. Jedoch zeigte sich ein zeitlicher Verlauf der axialen Verbindungssteifheiten bei der Anbindung eines Kinesinmoleküls an einen Mikrotubulus (Abbildung 4.19). Nach anfänglichen Fluktuationen mit einer Federkonstante von 0,00128 pN/nm (+/- 0,00024 pN/nm) erhöhte sich die Elastizität auf 0,0408 pN/nm (+/- 0,0069 pN/nm) für den Zeitraum von etwa einer Sekunde, um danach wieder auf den vorherigen Wert abzufallen. Zwei Sekunden später erhöhte sich die Steifheit der Verbindung wieder auf 0,0405 pN/nm (+/- 0,0078 pN/nm). Nach etwa zwei Sekunden änderte sich die Stärke der axialen Fluktuationen des *beads* nicht mehr und nach insgesamt acht Sekunden wurde eine Elastizität von 0,0666 pN/nm (+/- 0,0112 pN/nm) gemessen. Wenn die zu unterschiedlichen Zeitpunkten ermittelten Federkonstanten der Verbindung zwischen Latexbead und Mikrotubulus von unterschiedlichen Zuständen des Kinesinmoleküls mit verschiedenen mechanischen Eigenschaften herrührten, welche Zustände kamen dann in Frage? Dies soll anhand von Abbildung 5.2 diskutiert werden. Es wurde dort ein ausführlicherer Ausschnitt aus dem in der Einleitung gezeigten Reaktionsschema der Kinesin-ATPase dargestellt, der die Zustände in Abwesenheit von ATP beschreibt.

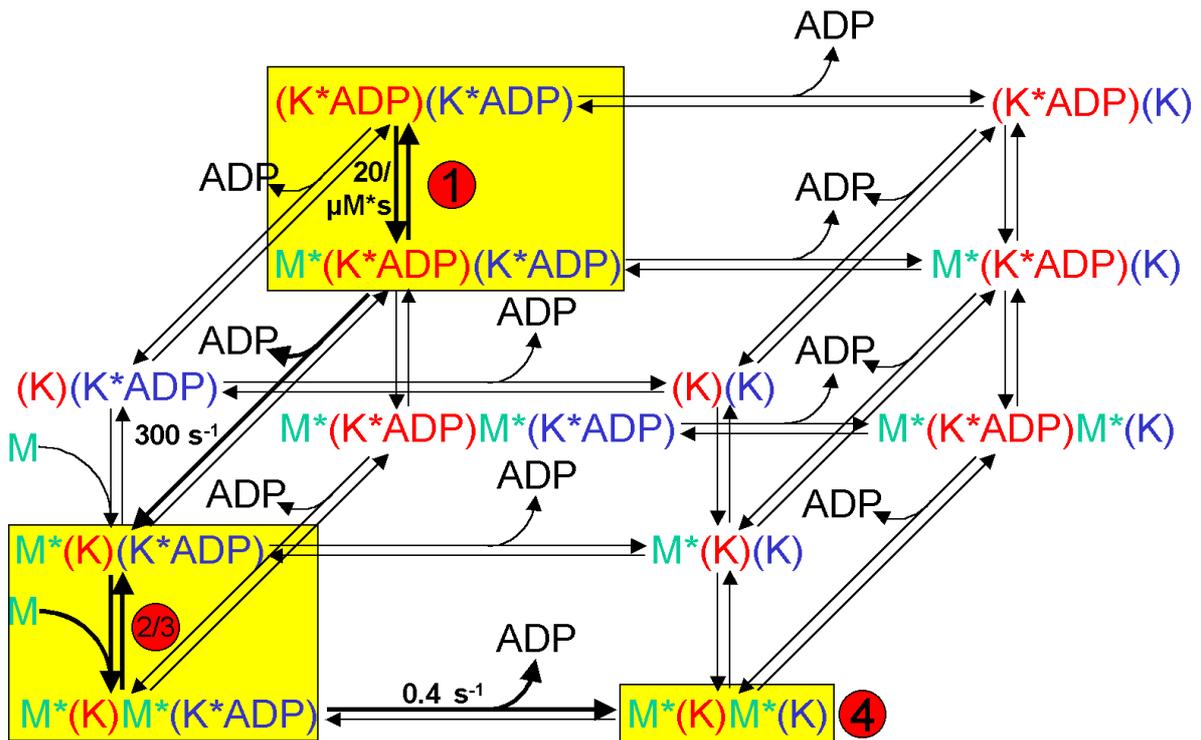


Abbildung 5.2: Reaktionsschema der Kinesin-ATPase in Abwesenheit von ATP mit M = Mikrotubulus, K = Kinesinkopf. Bindung an einen Kinesinkopf wurde durch ein \*-Symbol zwischen beiden Komponenten angedeutet. Der Übersichtlichkeit wegen wurden die beiden Kinesinköpfe in unterschiedlichen Farben dargestellt. Die Ratenkonstanten einzelner Teilreaktionen wurden an den entsprechenden Pfeilen angegeben. Die vermutlichen Zustände zu den Zeitpunkten 1 bis 4 in Abbildung 4.19 sind gelb unterlegt und mit roten Kreisen gekennzeichnet. Der vermutliche Reaktionsweg wurde durch stärker gezeichnete Pfeile angedeutet.

Während der in Abbildung 4.19 mit „1“ gekennzeichneten Zeitpunkte lagen vermutlich zwei verschiedene Zustände im Gleichgewicht miteinander vor. Davon war einer nicht und der andere kurzzeitig mit nur einem Kopf schwach an einen Mikrotubulus gebundenen. Diese wurden in Abbildung 5.2 gelb unterlegt und mit einer roten 1 gekennzeichnet. Die gemessenen Steifheit lag im Bereich der Steifheit der Laserfalle, wodurch sich keine Aussage über die Elastizität eines über einen Kopf schwach an einen Mikrotubuli gebundenen Kinesinmoleküls machen ließ. Zu den Zeitpunkten 2 und 3 wurden ähnliche Verbindungssteifheiten von etwa  $0,04\text{ pN/nm}$  erhalten. Nach der ADP-Abgabe eines der beiden Köpfe, wahrscheinlich des an den Mikrotubulus gebundenen, kam es wohl zu einem Gleichgewicht zwischen den beiden mit 2/3 gekennzeichneten Zuständen. Während der eine Kinesinkopf im nukleotidfreien Zustand fest an den Mikrotubulus gebunden war, blieb der andere Kopf mit ADP ungebunden oder nur schwach an den Mikrotubulus assoziiert. Wiederum stellt die

gemessene Elastizität vermutlich eine Mischung der Elastizitäten der beiden Einzelzustände und deren zeitlichen Anteilen dar. Zwischen Zeitpunkt 2 und 3 kam es zwischenzeitlich zu einer Reduktion der gemessenen Verbindungssteifheit auf das Niveau des Zeitpunkts 1. Dies konnte nur sehr selten beobachtet werden und könnte auf die Wiederaufnahme von ADP durch den nukleotidfreien Kinesinkopf hindeuten. ADP konnte in Spuren zu Bruchteilen eines Pikomols zusammen mit Kinesin aus dessen Präparation eingeschleppt worden sein. Eine Wiederaufnahme von ADP war also sehr unwahrscheinlich, aber nicht unmöglich. Alternativ könnte beim Kinesin der Übergang in eine feste Bindung an einen Mikrotubulus in einer zweistufigen Reaktion, zuerst ADP-Abdissoziation, dann Ausbildung einer festen Bindung, vonstatten gehen. Ein solcher zweistufiger Mechanismus konnte schon bei der Bewegung von Myosin I entlang von Aktin beobachtet werden (Veigel *et al.*, 1999). Im Anschluss an die zum Zeitpunkt 3 bestimmte Steifheit erfolgte eine weitere Erhöhung der gemessenen Elastizität. Zum Zeitpunkt 4 wurde eine Verbindungselastizität von etwa 0,067 pN/nm beobachtet. Diese rührte wahrscheinlich von einem Kinesinmolekül als Verbindung zwischen Mikrosphäre Mikrotubulus her, dessen Köpfe beide im nukleotidfreien Zustand fest an den Mikrotubulus gebunden waren („4“ in Abbildung 5.2). Der Übergang zwischen Zustand 3 und Zustand 4 in Abbildung 4.19 war etwa nach zwei Sekunden abgeschlossen. Die ADP-Abgabe des zweiten Kinesinkopfes erfolgt mit etwa  $0,4 \text{ s}^{-1}$  (Mandelkow und Johnson, 1998; Moyer *et al.*, 1998) und beansprucht demnach 2,5 Sekunden. Auch dies deutet auf eine ADP-Abgabe durch den zweiten Kinesinkopf zwischen den Zeitpunkten 3 und 4 hin. Die mit 0,04 pN/nm und 0,067 pN/nm erhaltenen Molekülelastizitäten zu den Zeitpunkten 2/3 und 4 fanden sich auch gehäuft in der Verteilung der gemessenen Kinesinelastizitäten von verschiedenen Experimenten wieder (siehe Abbildung 4.18). Scheinbar wurden auch dort die Steifheiten von ein- und doppelköpfig fest an Mikrotubuli gebundenen Kinesinmolekülen bestimmt.

*In Anwesenheit von ATP oder der ATP-Analoga ATP $\gamma$ S und AMP-PNP kam es zu einem Anstieg der Molekülelastizität von Kinesin*

Auch in Anwesenheit von ATP wurden verschiedene Verbindungssteifheiten gemessen (siehe Abbildung 4.22). Vor dem Start von gerichteter Bewegung entlang eines Mikrotubulus war die Mikrosphäre mit einer Steifheit von 0,065 pN/nm (+/-

0,005 pN/nm) gebunden. Dabei schien es sich aufgrund der gemessenen Größe wieder um die Elastizität eines mit zwei nukleotidfreien Köpfen fest an den Mikrotubulus gebundenes Kinesinmolekül gehandelt zu haben. Jedoch sollte bei einer ATP-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  die ATP-Aufnahme eines Kopfes ausgehend vom  $\text{M}^*(\text{K})(\text{K}^*\text{ADP})$ -Zustand im Mittel nach 500 Millisekunden geschehen sein, während für die ADP-Abgabe durch den zweiten Kopf etwa 2,5 Sekunden benötigt werden. Nach etwa 6 Sekunden wurde die Mikrosphäre dann gerichtet und ohne größere Pausen entlang des Mikrotubulus bewegt. Während des Laufens stieg die durchschnittliche Elastizität der Verbindung zwischen Latexbead und Mikrotubulus auf 0,125 pN/nm ( $\pm$  0,021 pN/nm) an. Dieser Wert spiegelte vermutlich die über die Zeit gemittelten Elastizitäten von einer Reihe von Kinesinzuständen während seines ATPase-Zyklus wider. Hierfür kommen vor allem der  $\text{M}^*(\text{K})(\text{K}^*\text{ADP})$ -Zustand, der  $\text{M}^*(\text{K}^*\text{ATP})\text{M}^*(\text{K})$ -Zustand und der  $\text{M}^*(\text{K}^*\text{ADP}^*\text{P}_i)\text{M}^*(\text{K})$ -Zustand in Frage (siehe Abbildung 2.4). Wie schon erwähnt braucht die ATP-Bindung bei einer ATP-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  und einer Ratenkonstante zweiter Ordnung von 2  $\mu\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$  durchschnittlich etwa 500 Millisekunden. Bei höheren ATP-Konzentrationen ist das Ablösen des fest gebundenen Kopfes von dem Mikrotubulus nach der Hydrolyse ratenlimitierend (Gilbert *et al.*, 1995) und erfolgt ausgehend vom  $\text{M}^*(\text{K}^*\text{ADP}^*\text{P}_i)\text{M}^*(\text{K})$ -Zustand mit etwa 20  $\text{sec}^{-1}$  (Johnson und Gilbert, 1995). In Anwesenheit von ATP befand sich also das Kinesinmolekül in Zuständen höherer Elastizität verglichen mit Zuständen ohne ATP. Dies kann nicht nur mit einer doppelköpfigen Bindung an den Mikrotubulus erklärt werden, da auch im nukleotidfreien Zustand das Kinesinmolekül mit beiden Köpfen an den Mikrotubulus angehängt war. Der beobachtete Anstieg der Verbindungselastizität in Anwesenheit von ATP musste demnach von einer Erhöhung der Elastizität des Kinesinmoleküls selbst während der Zwischenzustände mit gebundenem ATP oder ADP und Phosphat herrühren.

Um diesen Aspekt näher zu beleuchten, wurden die ATP-Analoga  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  und AMP-PNP eingesetzt.  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  kann von Myosin und dem Pilzkinesin Nkin nur sehr langsam hydrolysiert werden (Crevel *et al.*, 1999; Gulick *et al.*, 1997; Resetar und Chalovich, 1995; Van Dijk *et al.*, 1998) und AMP-PNP nicht von der Kinesin ATPase (Amos, 1987; Block *et al.*, 1990; Hirose *et al.*, 1995; Kawaguchi und Ishiwata, 2001; Svoboda *et al.*, 1994; Uemura *et al.*, 2002; Vale *et al.*, 1985). Es wurde jedoch beobachtet, dass AMP-PNP von dem unkonventionellen Kinesin Ncd mit etwa 1 % der Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse umgesetzt werden konnte (Suzuki *et al.*, 1997).

Die Hydrolyse konnte allerdings auch durch hohe Mikrotubuli-Konzentrationen nicht weiter stimuliert werden. In Gegenwart von  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  kam es bei den Kinesinexperimenten zu gerichteter Bewegung der Latexbeads auf den Mikrotubuli. Eine Kontamination durch ATP war dabei ausgeschlossen, da eventuell aus der Präparation eingeschlepptes ATP durch ein System von Glukose und Hexokinase aus der Lösung entfernt wurde. Die Geschwindigkeit der Mikrosphären war deutlich langsamer als in Anwesenheit von ATP in vergleichbaren Konzentrationen. Eine verlangsamte Hydrolyse von  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  durch die unkonventionellen Kinesine Nkin und Ukinesin wurde schon früher beschrieben, jedoch ohne Geschwindigkeiten anzugeben (Crevel *et al.*, 1999). Sowohl bei 2 mM als auch bei 100  $\mu\text{M}$   $\text{ATP}\gamma\text{S}$  wurden Beadgeschwindigkeiten von etwa 15 nm/sec beobachtet. Da demnach die Geschwindigkeit von Kinesin zwischen 100  $\mu\text{M}$  und 2 mM  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  von der  $\text{ATP}\gamma\text{S}$ -Konzentration unabhängig war, deutet dies darauf hin, dass bei der Umsetzung von  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  durch Kinesinmoleküle der Hydrolyseschritt geschwindigkeitsbestimmend war. Ausgehend von einer gegenüber bei ATP-Umsatz unveränderten Schrittgröße des Kinesins von 8 nm in Gegenwart von  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  und einem unveränderten Umsatz von einem Molekül ATP pro Schritt (Hua *et al.*, 1997; Schnitzer und Block, 1997; Visscher *et al.*, 1999) wurden pro Sekunde etwa 2 Moleküle  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  vom Kinesin hydrolysiert.

In Anwesenheit von 2 mM  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  wurde die Verbindungssteifheit vor Einsetzen von Bewegung der Mikrosphäre entlang des Mikrotubulus mit 0,11 pN/nm und während der Bewegung mit 0,15 pN/nm gemessen (Abbildung 4.25). Der erste Wert setzte sich vermutlich aus den Steifheiten der Kinesinzustände  $\text{M}^*(\text{K}^*\text{ATP}\gamma\text{S})(\text{K}^*\text{ADP})$ ,  $\text{M}^*(\text{K}^*\text{ATP}\gamma\text{S})\text{M}^*(\text{K}^*\text{ADP})$  und  $\text{M}^*(\text{K}^*\text{ATP}\gamma\text{S})\text{M}^*(\text{K})$  zusammen (siehe Abbildung 2.4). Die ersten beiden Zustände standen dabei vermutlich in einem schnellen Gleichgewicht. Die anschließende ADP-Abgabe erfolgte mit  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  im ersten Kopf mit nur einem Drittel der Geschwindigkeit bei gebundenem ATP (Ma und Taylor, 1997a), wodurch der Anteil des letzten Zustand an der Gesamtsteifheit vermindert wurde. Auch der Kinesinzustand  $\text{M}^*(\text{K})(\text{K}^*\text{ADP})$  könnte Einfluss auf die gemessene Elastizität genommen haben, falls die Bindung von  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  gegenüber der von ATP wesentlich schwächer war. Die größere Verbindungselastizität wurde nach Einsetzen der Bewegung des Latexbeads entlang des Mikrotubulus gemessen. Da für Bewegung  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  hydrolysiert werden musste, erweiterte sich der Kreis der

wahrscheinlich beobachteten Zustände des Kinesinmoleküls um den  $M^*(K^*ADP^*P_i)M^*(K)$ -Zustand. Aus den Wanderungsgeschwindigkeiten der Mikrosphären in Gegenwart von  $ATP\gamma S$  wurde eine Hydrolysegeschwindigkeit von etwa  $2 \text{ sec}^{-1}$  abgeschätzt. Somit ist der Hydrolyseschritt der langsamste während des Umsatzes von  $ATP\gamma S$  durch Kinesin, während die Phosphatabgabe nun den zweitlangsamsten Schritt darstellte. Eine höhere Verbindungssteifheit könnte also auf eine erhöhte Molekülelastizität der Zustände  $M^*(K^*ATP\gamma S)M^*(K)$  und  $M^*(K^*ADP^*P_i)M^*(K)$  hindeuten. Vermehrtes Auftreten des letztgenannten Zustands während der ATP-abhängigen Bewegung der Kinesin tragenden Latexbeads schien auch für die Erhöhung der beobachteten Verbindungssteifheit gegenüber nukleotidfreien Bedingungen verantwortlich gewesen zu sein. Ein eindeutigeres Bild lieferte die gemessene Elastizität in Anwesenheit von AMP-PNP, bei dessen Einsatz es nicht zu Beadbewegungen entlang von Mikrotubuli und demnach wahrscheinlich auch nicht zur Hydrolyse des ATP-Analogons kam. Dies wurde schon früher beschrieben (Amos, 1987; Block *et al.*, 1990; Hirose *et al.*, 1995; Kawaguchi und Ishiwata, 2001; Svoboda *et al.*, 1994; Svoboda *et al.*, 1993; Uemura *et al.*, 2002; Vale *et al.*, 1985). Die axiale Steifheit der Verbindung zwischen Mikrosphäre und Mikrotubulus wurde mit etwa  $0,14 \text{ pN/nm}$  bestimmt und repräsentierte wohl vor allem die Elastizität des  $M^*(K^*AMP\text{-}PNP)M^*(K)$ -Zustands des Kinesins. Nach Block, Goldstein und Schnapp (1990) soll das ATP-Analogon eine rigor-ähnliche Bindung des Kinesins an Mikrotubuli bewirken. Es scheint jedoch, als dass Zustände, in denen ein Kopf des Kinesins ATP,  $ATP\gamma S$  oder AMP-PNP gebunden hatte, entlang der Molekülachse steifer waren als bei doppelköpfiger Bindung des Kinesins an Mikrotubuli im nukleotidfreien Zustand. Hinweise auf eine erhöhte Steifheit von Teilen des Kinesinmoleküls, dem Verbindungselement zwischen Kopf und Nacken, dem sogenannten *neck linker*, in Gegenwart von ATP wurden schon früher durch elektronenmikroskopische und FRET-Messungen erhalten (Rice *et al.*, 1999). Bei der Bindung von intaktem *caged* ATP an Kinesin und während der Kraftentwicklung durch Kinesinmoleküle wurden mit  $0,18 \text{ pN/nm}$  mit den hier vorgestellten vergleichbare Werte erhalten (Higuchi *et al.*, 1997). Höhere Steifheiten wurden in anderen Veröffentlichungen angegeben. Bei Bestimmung der Abrisskräfte von Kinesin-Mikrotubuli Komplexen entlang der Mikrotubuli wurde in Abwesenheit von Nukleotiden eine Steifheit von  $0,35 \text{ pN/nm}$  gefunden. In Anwesenheit von AMP-PNP wurden Werte von etwa  $0,38 \text{ pN/nm}$  pro Kinesinkopf erhalten (Kawaguchi und

Ishiwata, 2001). Dabei soll es sich ohne Nukleotid nur um eine einköpfige Bindung des Kinesins an den Mikrotubulus gehandelt haben, während es in Gegenwart von AMP-PNP zum Anbinden mit beiden Köpfen kam. Da sich die Elastizität der Verbindung zwischen einer Mikrosphäre und einem Mikrotubulus über ein Kinesinmolekül mit der auf sie ausgeübten Kraft ändert und mit dieser Kraft ansteigt (Kojima *et al.*, 1997), lassen sich die bei den beschriebenen Studien erhaltenen Steifheiten mit den vergleichsweise hohen Kräften von bis zu 15 pN erklären. Auch wurden diese Elastizitäten entlang der Achse des Mikrotubulus bestimmt. Bei den in dieser Arbeit ermittelten Steifheiten handelte es sich jedoch um die entlang der Kinesinachse verlaufenden Molekülelastizitäten, quer zu den Mikrotubuli. Es besteht demnach sehr wohl die Möglichkeit, dass sich die Kinesinmoleküle entlang verschiedener Richtungen verschieden elastisch verhalten. Ein großer Unterschied zwischen den in dieser Arbeit vorgestellten Resultaten und den Ergebnissen von Kawaguchi *et al.* (2001) und Uemura *et al.* (2002) besteht jedoch bezüglich dem von Kawaguchi und Uemura gefundenen gleichen elastischen Verhalten von Kinesin in Abwesenheit von Nukleotid und in Gegenwart von AMP-PNP. Ein ähnlich elastisches Verhalten von Kinesin unter diesen beiden Bedingungen ließe sich wiederum mit der *entlang von Mikrotubuli* bestimmten Molekülsteifheit bei Kawaguchi und Uemura begründen, während sich eventuell zwischen diesen beiden Zuständen des Kinesins bestehende Unterschiede nur in der Elastizität *entlang der Achse des Kinesinmoleküls* bemerkbar machten. Unterstützt werden die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse von FRET- und elektronenmikroskopischen Messungen, bei denen beobachtet wurde, dass das Verbindungselement zwischen Kinesinkopf und Nackenteil, der *neck linker*, in Abwesenheit von Nukleotiden flexibler war und viele verschiedene Konformationen einnahm, während diese Region durch ATP stabilisiert wurde (Rice *et al.*, 1999). In vielen Modellen der Arbeitsweise des Kinesins kommt diesem *neck linker* eine herausragende Bedeutung zu. Da Kinesinköpfe keine dem Hebelarm von Myosin analoge Region besitzen, wird diskutiert, ob diese Aufgabe bei Kinesinmolekülen von dem hochgradig konservierten (Case *et al.*, 1997; Vale und Fletterick, 1997) *neck linker* übernommen wird. Der *neck linker* soll außerdem Einfluss auf die Bewegungsrichtung von Kinesin haben (Case *et al.*, 1997; Endow und Waligora, 1998; Henningsen und Schliwa, 1997). Auch wird dieses Element dafür verantwortlich gemacht, dass sich die beiden Köpfe eines Kinesinmoleküls voneinander entfernen können und so erst die im Vergleich zum Myosin größere

Schrittgröße (8 nm gegenüber 5 nm) trotz kleinerer Molekülgröße ermöglicht wird. Das elastische Verhalten des *neck linkers* und die Nukleotidabhängigkeit dieser Region scheinen also entscheidenden Einfluss auf die Funktionsweise von Kinesin zu haben.

*Abreißen der Kinesinmoleküle von Mikrotubuli oder der Mikrotubuli vom Kammerboden fand nicht statt*

Wie schon bei den Experimenten mit Myosin erläutert wurde, würden sowohl das Ablösen von Mikrotubuli vom Boden der Versuchskammer als auch das Abreißen des Kinesinmoleküls von dem Mikrotubulus, an den es gebunden war, erhebliche Probleme für die Bestimmung der mechanischen Eigenschaften der verbindenden Kinesinmoleküle darstellen. Jedoch wurden die dafür nötigen Kräfte mit der sehr schwachen Laserfalle des Photonischen Kraftmikroskops während der Experimente bei weitem nicht erreicht. Die aus biotinyliertem Tubulin polymerisierten Mikrotubuli waren an vielen am Kammerboden adsorbierten Neutravidinmolekülen befestigt. Für das Abreißen von Biotin von Avidin oder Streptavidin werden etwa 160 pN (Florin *et al.*, 1994) und 260 pN pro Molekülpaar (Moy *et al.*, 1994) benötigt. Es ist anzunehmen, dass die Bindungsstärke zwischen Biotin und Neutravidin ähnlich fest ist. Die Kräfte, die für ein Ablösen eines Kinesinkopfes von einem Mikrotubulus nötig sind, wurden in Abwesenheit von ATP mit 8 pN bestimmt, in Anwesenheit von 1 mM AMP-PNP mit 15,1 pN, hier jedoch für das Ablösen von zwei Köpfen (Kawaguchi und Ishiwata, 2001). Pro Kopf wurden in Abwesenheit von Nukleotid oder bei einer AMP-PNP Konzentration von 1 mM Abrisskräfte zum Plus-Ende des Mikrotubulus von 6 bis 7 pN und 9 bis 10 pN zum Minus-Ende gefunden (Uemura *et al.*, 2002). Allerdings wurden die Kräfte in diesen Studien entlang des Mikrotubulus bestimmt und nicht quer dazu wie in den hier vorgestellten Experimenten. All diese Werte sind jedoch vergleichsweise groß gegenüber den Kräften, die in dieser Arbeit auf die Verbindungen zwischen Latexbeads und Mikrotubulus ausgeübt wurden, was gegen ein Ablösen der einzelnen Moleküle voneinander während der Messungen spricht. Die erhaltene Steifheit stellt demnach größter Wahrscheinlichkeit nach die Elastizität von Teilen einzelner Kinesinmoleküle dar.

*Verzögertes Einsetzen der Kinesinbewegung deutete auf nötige Aktivierung der Mikrotubuli hin*

Häufig wurde beobachtet, dass es nach dem Anbinden eines Kinesinmoleküls an einen Mikrotubulus in Anwesenheit von ATP einige Sekunden dauerte, bis es zu gerichteter Bewegung des Latexbeads kam. Bei dem in Abbildung 4.23 gezeigten Beispiel dauerte es in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  ATP etwa 5 Sekunden bis sich die Mikrosphäre entlang des Mikrotubulus bewegte. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, dass es sich bei dem Grund für diese Verzögerung allein um das Warten eines Kinesinmoleküls auf ATP handelte, worauf bei dieser ATP-Konzentration nur etwa 500 Millisekunden entfallen sollten (siehe Abbildung 2.4). Vorstellbar wäre, dass es eine Zeit dauerte, bis ein Bereich eines Mikrotubulus durch das Anbinden eines Kinesinmoleküls „aktiviert“ wurde. Für eine Kinesin abhängige Aktivierung der Mikrotubuli spricht auch die Beobachtung, dass an einen Mikrotubulus, auf dem schon vorher Latexbeads gelaufen waren, immer wieder neue Mikrosphären banden und ohne merkliche Verzögerung gerichtete Bewegung entlang dieses Mikrotubulus entwickelten, während auf anderen Mikrotubuli kein einziger Latexbead band und los lief. Eine eventuell stattgefundenene Aktivierung zumindest eines Teils des Mikrotubulus scheint also eine gewisse Zeit anzuhalten.

*Die beobachtete Molekülelastizität war wahrscheinlich in Kinesins neck linker oder Nacken-Stiel Gelenk lokalisiert*

Durch eine geometrische Auswertung ließ sich abschätzen, welche Teile der Kinesinmoleküle die Verbindung zwischen Latexbead und Oberfläche der Versuchskammer herstellten und welche Molekülregionen dabei die flexibelsten waren. Die Länge der maximal gestreckten Verbindung wurde mit etwa 86 nm, in Ruhelage mit 71 nm bestimmt. Diese Werte lagen somit im Bereich der Länge des Kinesinmoleküls von 80 bis 90 nm (Amos, 1987; Hirokawa *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 1989). Der rotierbare Teil des Kinesinmoleküls hatte eine Ruhelänge von etwa 40 nm. Ausgehend von der Gleichgewichtslänge konnte dieser Teil bei Raumtemperatur um 16 nm auf eine Maximallänge von etwa 56 nm gestreckt werden.

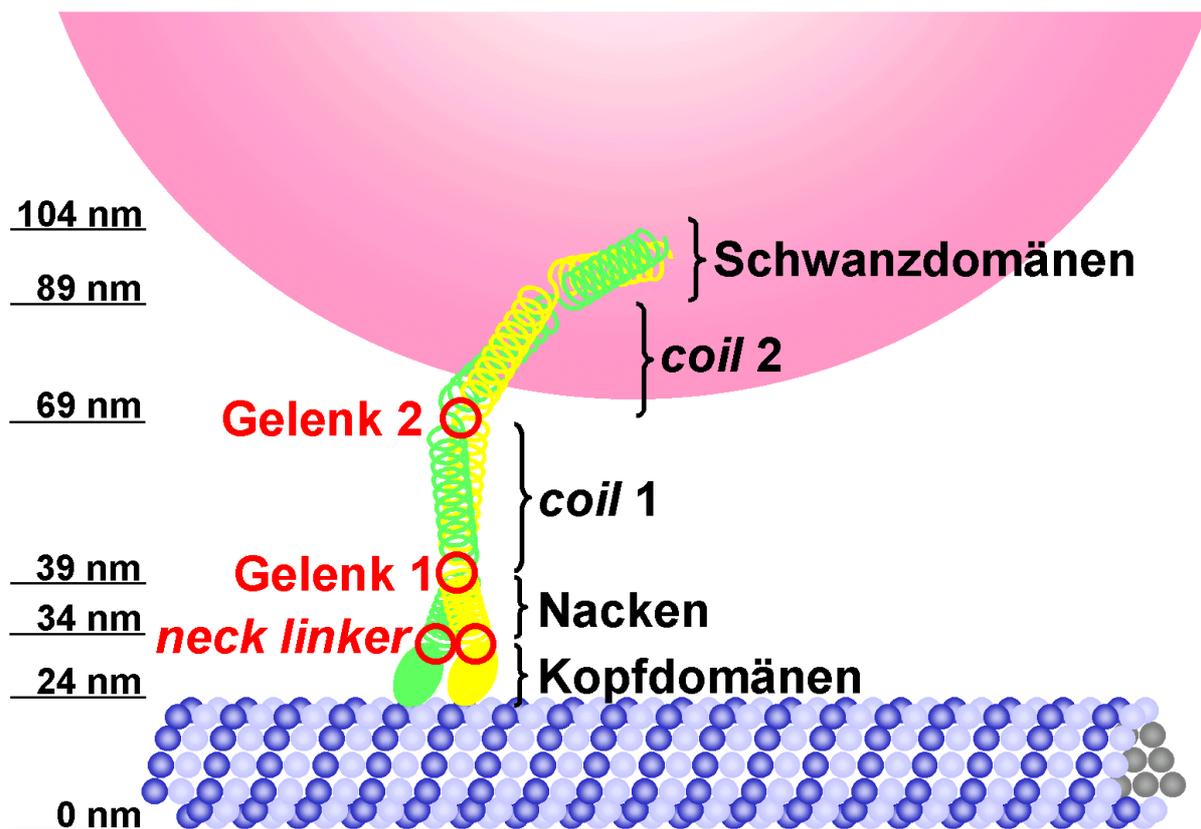


Abbildung 5.3: Schematische Darstellung eines verbindenden Kinesinmoleküls (gelb und grün) zwischen einer rosa Mikrosphäre und einem blauen Mikrotubulus auf dem Boden der Versuchskammer.

Innerhalb der Verbindung zwischen Latexbead und Kammerboden wurde ein Drehpunkt bestimmt, der etwa 30 nm oberhalb der Glassoberfläche lag. Diese 30 nm enthielten sowohl Kinesin- als auch Nicht-Kinesin-Komponenten. Der Anteil, der nicht vom Kinesinmolekül herrührte, hatte seinen Ursprung in dem 24 nm dicken Mikrotubulus, an den das Kinesinmolekül angebunden war. Der Mikrotubulus war über Biotin an etwa 5 nm große Neutravidinmoleküle gebunden. Die Größe der Neutravidinmoleküle floss jedoch nicht in die Verbindungslänge mit ein, da eine dünne Schicht von Neutravidinmolekülen den *ganzen* Kammerboden bedeckte. Der von den Kinesinmolekülen resultierende Abstand des Drehpunktes von dem Anbindungspunkt am Mikrotubulus betrug also etwa 6 nm. Dieser Wert erhöhte sich jedoch noch etwas, da zu diesen 6 nm noch die Schichtdicke von Casein auf den Mikrosphären hinzu addiert werden musste. Die Beschichtung von Kammerboden und Latexbead resultierte in einem größeren Abstand zwischen Beadzentrum und Glassoberfläche als mit dem reinen Beadradius angenommen wurde. Damit lag der

Drehpunkt innerhalb des Kinesinmoleküls und etwa im Bereich des Gelenks zwischen Nacken und Stiel (etwa 15 nm vom Mikrotubulus entfernt) oder im Bereich des sogenannten *neck linkers* zwischen den Motordomänen und dem Nacken (etwa 10 nm vom Mikrotubulus entfernt, siehe Abbildung 5.3). Beide Bereiche werden durch den nur 5 nm langen Nackenteil des Kinesins getrennt, und aufgrund dieser geringen Entfernung ließ sich mit den erhaltenen Werten leider keine genauere Auswahl treffen. Vorstellbar wäre auch eine Beteiligung *beider* Regionen an der beobachteten Flexibilität. Bei Messungen der Rotationssteifheit von vollständigen Kinesinmolekülen wurde mehrfaches Drehen um 360° von gebundenen Mikrotubuli beobachtet (Hunt und Howard, 1993). Wurden jedoch Fragmente des Kinesins verwendet, deren Nackenregionen direkt am Boden befestigt wurden, so kam es nur zu sehr eingeschränkten Rotationen von in Anwesenheit von AMP-PNP gebundenen Mikrotubuli (Hua *et al.*, 2002). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei der hier beobachteten flexiblen Region eher um das Gelenk zwischen Nacken und Stiel gehandelt haben könnte, falls die von Hunt und Howard (1993) beschriebene Rotationsflexibilität in diesem Gelenk ihren Ursprung hatte. Die schon beschriebene Nukleotidabhängigkeit der Flexibilität des *neck linkers* (Rice *et al.*, 1999) deutet allerdings eher auf den *neck linker* als Ursprung der hier beobachteten axialen Elastizität hin, während der Drehpunkt innerhalb des Kinesinmoleküls weiterhin zwischen Nacken und Stiel lokalisiert gewesen sein konnte. Jedoch konnte es sich bei dem von Hunt und Howard (1993) beobachteten Gelenk auch um das Gelenk zwischen *coil 1* und *coil 2* oder zwischen Stiel und Schwanzteil gehandelt haben und sowohl die *neck linker* als auch das Gelenk zwischen Nacken und Stiel verhielten sich in deren Experimenten beide steifer.

Die Gesamtlänge der entspannten Verbindung zwischen Latexbead und Mikrotubulus betrug etwa 50 nm. Dies war länger als in vorherigen Studien gemessen wurde. Mit elektronenmikroskopischen Methoden wurden die Längen von Kinesin-Querbrücken *in situ* zwischen Organellen und Mikrotubuli beziehungsweise *in vitro* zwischen Mikrosphären und Mikrotubuli mit 25 bis 30 nm bestimmt (Amos, 1987; Hirokawa *et al.*, 1989). Dies könnte auf eine eher gestauchte Molekülstruktur bei den elektronenmikroskopischen Experimenten und auf eine eher gestreckte bei den Versuchen mit dem PFM hindeuten. Bei der Verwendung von Kinesin als Verbindungselement zwischen Latexbead und Oberfläche der Versuchskammer wurde eine geringere Streuung der erhaltenen Verbindungslängen als bei der

Verwendung von Myosin erhalten. Dies spricht dafür, dass Kinesin in etwa immer mit einem gleichen Teil an den Mikrosphären anband, während es bei Myosin zu einer größeren Variabilität bezüglich Anteil und Art der Anbindung an die Mikrosphären kam. Ein Grund für die bessere Reproduzierbarkeit der Bindung von Kinesinmolekülen an Latexbeads lag sicherlich in deren biologischer Funktion als Transportmolekül für Organellen und Vesikel begründet.

### 5.3 Fazit und Ausblicke

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich mit Hilfe des Photonischen Kraftmikroskops die Elastizität einzelner, funktionsfähiger Moleküle der Motorproteine Myosin und Kinesin bestimmen und Molekülelementen zuordnen lässt.

Bei der Bindung einzelner Kinesinmoleküle an Mikrotubuli ließen sich in Abwesenheit von ATP ein- und zweiköpfiges Binden durch unterschiedliche Molekülsteifheiten unterscheiden. Die Elastizität von Kinesin änderte sich in Gegenwart von ATP oder ATP-Analoga und stieg auf etwa das Doppelte der in Abwesenheit von ATP erhaltenen Werte an. Als strukturelles Korrelat der beobachteten Kinesinelastizität wurde die Molekülregion um Kinesins *neck linker* und das Nacken-Stiel Gelenk bestimmt. Im Hinblick auf andere Studien, die Kinesins *neck linker* eine zentrale Rolle bei der Bewegungs- und Kraftentwicklung zuschreiben, erscheint besonders dessen Elastizität und die hier beobachtete Nukleotidabhängigkeit sehr interessant.

Auch von einzelnen, funktionstüchtigen Myosinmolekülen ließen sich mit dem Photonischen Kraftmikroskop die Elastizität entlang ihrer Molekülachse bestimmen. Die gemessene Elastizität änderte sich scheinbar in Gegenwart von ATP nicht wesentlich und war deutlich geringer als von Studien an Muskelfasern erwartet wurde. Das strukturelle Korrelat der erhaltenen Molekülelastizität lag außerhalb des Myosinkopfes und war in Myosins *hinge* Region, dem Übergang zwischen Subfragment 2 und dem leichten Meromyosin, lokalisiert. Der Vergleich mit anderen Einzelmolekülexperimenten an Myosinmolekülen oder –fragmenten mit und ohne den LMM Teil deutete ebenfalls auf eine erhöhte Flexibilität in Gegenwart der *hinge* Region hin. Obwohl in dieser Arbeit frisch aus Muskelfasern extrahierte, vollständige Myosinmoleküle wegen ihrer guten Funktionalität verwendet wurden, könnten bei zukünftigen Experimenten exprimierte, artifizielle Myosinkonstrukte von definierter Länge und eingefügten Anheftungsstellen zur Verbindung mit den Mikrosphären zur Bestimmung der Elastizität des Myosinkopfes von großem Nutzen sein. Durch

Eliminieren der flexiblen *hinge* Region am distalen Molekülende könnte dann die Elastizität steiferer Elemente des Myosinmoleküls wie die des Myosinkopfes bestimmt werden. Dann könnte auch die Frage, in wie weit elastische Verformung des Myosinkopfes durch Veränderung der freien Energieprofile seine Anbindung an Aktin beeinflusst, untersucht werden. Bei Verwendung von nativen oder rekonstituierten Aktinfilamenten mit Aktin-assoziierten Proteinen wie Tropomyosin und Troponin bestünde außerdem noch die Möglichkeit, Einflüsse der Regulation der Aktinfilamente durch Kalziumionen auf die Elastizität von Querbrücken zu untersuchen.

Durch den Vergleich der mechanischen Eigenschaften wie der Molekülelastizität verschiedener Mechanoenzyme neben konventionellem Myosin und Kinesin lassen sich vielleicht gemeinsame Mechanismen dieser beiden Motorfamilien erkennen. Aussichtsreiche Kandidaten hierfür wären die prozessiven Vertreter der Myosinfamilie, das zweiköpfige Myosin Va und das einköpfige Myosin IXb.

## 6 Literaturverzeichnis

- Allersma M.W., Gittes F., deCastro M.J., Stewart R.J. und Schmidt C.F. 1998. Two-dimensional tracking of ncd motility by back focal plane interferometry. *Biophys J.* 74(2 Pt 1):1074-85.
- Amos L.A. 1987. Kinesin from pig brain studied by electron microscopy. *J Cell Sci.* 87(Pt 1):105-11.
- Amos L.A. 2000. Kinesin sticks its neck out. *Nat Cell Biol.* 2(1):E15-6.
- Ashkin A., Dziedzic J.M., Bjorkholm J.E. und Chu S. 1986. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics Letters.* 11(5):288-290.
- Axelrod D. 1989. Total internal reflection fluorescence microscopy. *Methods Cell Biol.* 30:245-70.
- Berliner E., Young E.C., Anderson K., Mahtani H.K. und Gelles J. 1995. Failure of a single-headed kinesin to track parallel to microtubule protofilaments. *Nature.* 373(6516):718-21.
- Block S.M. 1998. Leading the procession: new insights into kinesin motors. *J Cell Biol.* 140(6):1281-4.
- Block S.M., Goldstein L.S. und Schnapp B.J. 1990. Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature.* 348(6299):348-52.
- Brenner B. und Chalovich J.M. 1999. Kinetics of thin filament activation probed by fluorescence of N-((2-(Iodoacetoxy)ethyl)-N-methyl)amino-7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazole-labeled troponin I incorporated into skinned fibers of rabbit psoas muscle: implications for regulation of muscle contraction. *Biophys J.* 77(5):2692-708.
- Case R.B., Pierce D.W., Hom-Booher N., Hart C.L. und Vale R.D. 1997. The directional preference of kinesin motors is specified by an element outside of the motor catalytic domain. *Cell.* 90(5):959-66.
- Coy D.L., Wagenbach M. und Howard J. 1999. Kinesin takes one 8-nm step for each ATP that it hydrolyzes. *J Biol Chem.* 274(6):3667-71.
- Crevel I., Carter N., Schliwa M. und Cross R. 1999. Coupled chemical and mechanical reaction steps in a processive *Neurospora* kinesin. *Embo J.* 18(21):5863-72.
- Cross R. und Scholey J. 1999. Kinesin: the tail unfolds. *Nat Cell Biol.* 1(5):E119-21.

- Dobbie I., Linari M., Piazzesi G., Reconditi M., Koubassova N., Ferenczi M.A., Lombardi V. und Irving M. 1998. Elastic bending and active tilting of myosin heads during muscle contraction. *Nature*. 396(6709):383-7.
- Dupuis D.E., Guilford W.H., Wu J. und Warshaw D.M. 1997. Actin filament mechanics in the laser trap. *J Muscle Res Cell Motil*. 18(1):17-30.
- Eisenberg E. und Hill T.L. 1985. Muscle contraction and free energy transduction in biological systems. *Science*. 227(4690):999-1006.
- Eisenberg E., Hill T.L. und Chen Y. 1980. Cross-bridge model of muscle contraction. Quantitative analysis. *Biophys J*. 29(2):195-227.
- Elliott A. und Offer G. 1978. Shape and flexibility of the myosin molecule. *J Mol Biol*. 123(4):505-19.
- Endow S.A. und Waligora K.W. 1998. Determinants of kinesin motor polarity. *Science*. 281(5380):1200-2.
- Finer J.T., Simmons R.M. und Spudich J.A. 1994. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature*. 368(6467):113-9.
- Florin E.L., Moy V.T. und Gaub H.E. 1994. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science*. 264(5157):415-7.
- Florin E.L., Pralle A., Hörber J.K. und Stelzer E.H. 1997. Photonic force microscope based on optical tweezers and two-photon excitation for biological applications. *J Struct Biol*. 119(2):202-11.
- Geeves M.A. 1991. The dynamics of actin and myosin association and the crossbridge model of muscle contraction. *Biochem J*. (274):1-14.
- Geeves M.A., Goody R.S. und Gutfreund H. 1984. Kinetics of acto-S1 interaction as a guide to a model for the crossbridge cycle. *J Muscle Res Cell Motil*. 5(4):351-61.
- Gilbert S.P., Webb M.R., Brune M. und Johnson K.A. 1995. Pathway of processive ATP hydrolysis by kinesin. *Nature*. 373(6516):671-6.
- Gittes F. und Schmidt C.F. 1998. Interference model for back focal plane displacement detection in optical tweezers. *Optics Letters*. 23(1):7-9.
- Greene L.E. und Eisenberg E. 1980. Dissociation of the actin.subfragment 1 complex by adenylyl-5'-yl imidodiphosphate, ADP, and PPI. *J Biol Chem*. 255(2):543-8.

- Griffiths P.J., Bagni M.A., Colombini B., Ameritsch H., Bernstorff S., Ashley C.C. und Cecchi G. 2002. Changes in myosin S1 orientation and force induced by a temperature increase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(8):5384-5389.
- Gulick A.M., Bauer C.B., Thoden J.B. und Rayment I. 1997. X-ray structures of the MgADP, MgATPgammaS, and MgAMPPNP complexes of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain. *Biochemistry*. 36(39):11619-28.
- Hackney D.D. 1994a. Evidence for alternating head catalysis by kinesin during microtubule-stimulated ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(15):6865-9.
- Hackney D.D. 1994b. The rate-limiting step in microtubule-stimulated ATP hydrolysis by dimeric kinesin head domains occurs while bound to the microtubule. *J Biol Chem*. 269(23):16508-11.
- Han Y.J. und Sellers J.R. 1998. Motility assays on molluscan native thick filaments. *Methods Enzymol*. 298:427-35.
- Hancock W.O. und Howard J. 1998. Processivity of the motor protein kinesin requires two heads. *J Cell Biol*. 140(6):1395-405.
- Hancock W.O. und Howard J. 1999. Kinesin's processivity results from mechanical and chemical coordination between the ATP hydrolysis cycles of the two motor domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(23):13147-52.
- Harada Y., Noguchi A., Kishino A. und Yanagida T. 1987. Sliding movement of single actin filaments on one-headed myosin filaments. *Nature*. 326(6115):805-8.
- Harrington W.F., Karr T., Busa W.B. und Lovell S.J. 1990. Contraction of myofibrils in the presence of antibodies to myosin subfragment 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(19):7453-6.
- Henningsen U. und Schliwa M. 1997. Reversal in the direction of movement of a molecular motor. *Nature*. 389(6646):93-6.
- Highsmith S., Kretzschmar K.M., O'Konski C.T. und Morales M.F. 1977. Flexibility of myosin rod, light meromyosin, and myosin subfragment-2 in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74(11):4986-90.
- Higuchi H., Muto E., Inoue Y. und Yanagida T. 1997. Kinetics of force generation by single kinesin molecules activated by laser photolysis of caged ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(9):4395-400.
- Higuchi H., Yanagida T. und Goldman Y.E. 1995. Compliance of thin filaments in skinned fibers of rabbit skeletal muscle. *Biophys J*. 69(3):1000-10.

- Hirokawa N., Pfister K.K., Yorifuji H., Wagner M.C., Brady S.T. und Bloom G.S. 1989. Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration. *Cell*. 56(5):867-78.
- Hirose K., Lockhart A., Cross R.A. und Amos L.A. 1995. Nucleotide-dependent angular change in kinesin motor domain bound to tubulin. *Nature*. 376(6537):277-9.
- Hodge T. und Cope M.J. 2000. A myosin family tree. *J Cell Sci*. 113(Pt 19):3353-4.
- Hoenger A., Sablin E.P., Vale R.D., Fletterick R.J. und Milligan R.A. 1995. Three-dimensional structure of a tubulin-motor-protein complex. *Nature*. 376(6537):271-4.
- Hoenger A., Thormahlen M., Diaz-Avalos R., Doerhoefer M., Goldie K.N., Muller J. und Mandelkow E. 2000. A new look at the microtubule binding patterns of dimeric kinesins. *J Mol Biol*. 297(5):1087-103.
- Howard J. 1996. The movement of kinesin along microtubules. *Annu Rev Physiol*. 58:703-29.
- Hua W., Chung J. und Gelles J. 2002. Distinguishing inchworm and hand-over-hand processive kinesin movement by neck rotation measurements. *Science*. 295(5556):844-8.
- Hua W., Young E.C., Fleming M.L. und Gelles J. 1997. Coupling of kinesin steps to ATP hydrolysis. *Nature*. 388(6640):390-3.
- Hunt A.J. und Howard J. 1993. Kinesin swivels to permit microtubule movement in any direction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(24):11653-7.
- Huxley A.F. 1957. Muscle structure and theories of contraction. *Prog Biophys Biophys Chem*. 7:255-318.
- Huxley A.F. 1974. Muscular contraction. *J Physiol*. 243(1):1-43.
- Huxley A.F. und Niedergerke R. 1954. Interference microscopy of living muscle fibres. *Nature*. 173:971-973.
- Huxley A.F. und Simmons R.M. 1971. Proposed mechanism of force generation in striated muscle. *Nature*. 233(5321):533-8.
- Huxley A.F. und Tideswell S. 1996. Filament compliance and tension transients in muscle. *J Muscle Res Cell Motil*. 17(4):507-11.
- Huxley H.E. 1969. The mechanism of muscular contraction. *Science*. 164(886):1356-65.

- Huxley H.E. und Hanson J. 1954. Changes in the cross striations of muscle during contraction and stretch and their interpretation. *Nature*. 173:973-976.
- Huxley H.E., Stewart A., Sosa H. und Irving T. 1994. X-ray diffraction measurements of the extensibility of actin and myosin filaments in contracting muscle. *Biophys J*. 67(6):2411-21.
- Irving M., Piazzesi G., Lucii L., Sun Y.B., Harford J.J., Dobbie I.M., Ferenczi M.A., Reconditi M. und Lombardi V. 2000. Conformation of the myosin motor during force generation in skeletal muscle. *Nat Struct Biol*. 7(6):482-5.
- Ishijima A., Kojima H., Funatsu T., Tokunaga M., Higuchi H., Tanaka H. und Yanagida T. 1998. Simultaneous observation of individual ATPase and mechanical events by a single myosin molecule during interaction with actin. *Cell*. 92(2):161-71.
- Ishijima A., Kojima H., Higuchi H., Harada Y., Funatsu T. und Yanagida T. 1996. Multiple- and single-molecule analysis of the actomyosin motor by nanometer-piconewton manipulation with a microneedle: unitary steps and forces. *Biophys J*. 70(1):383-400.
- Jiang W. und Hackney D.D. 1997. Monomeric kinesin head domains hydrolyze multiple ATP molecules before release from a microtubule. *J Biol Chem*. 272(9):5616-21.
- Johnson K.A. und Gilbert S.P. 1995. Pathway of the microtubule-kinesin ATPase. *Biophys J*. 68(4 Suppl):173S-176S; discussion 176S-179S.
- 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(6288):37-44.
- Kawaguchi K. und Ishiwata S. 2001. Nucleotide-dependent single- to double-headed binding of kinesin. *Science*. 291(5504):667-9.
- Kitamura K., Tokunaga M., Iwane A.H. und Yanagida T. 1999. A single myosin head moves along an actin filament with regular steps of 5.3 nanometres. *Nature*. 397(6715):129-34.
- Köhler J., Winkler G., Schulte I., Scholz T., McKenna W., Brenner B. und Kraft T. 2002. Mutation of the myosin converter domain alters cross-bridge elasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(6):3557-3562.
- Kojima H., Ishijima A. und Yanagida T. 1994. Direct measurement of stiffness of single actin filaments with and without tropomyosin by in vitro nanomanipulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(26):12962-6.

- Kojima H., Muto E., Higuchi H. und Yanagida T. 1997. Mechanics of single kinesin molecules measured by optical trapping nanometry. *Biophys J.* 73(4):2012-22.
- Kozielski F., Sack S., Marx A., Thormahlen M., Schonbrunn E., Biou V., Thompson A., Mandelkow E.M. und Mandelkow E. 1997. The crystal structure of dimeric kinesin and implications for microtubule-dependent motility. *Cell.* 91(7):985-94.
- Kraft T., Chalovich J.M., Yu L.C. und Brenner B. 1995a. Parallel inhibition of active force and relaxed fiber stiffness by caldesmon fragments at physiological ionic strength and temperature conditions: additional evidence that weak cross-bridge binding to actin is an essential intermediate for force generation. *Biophys J.* 68(6):2404-18.
- Kraft T., Messerli M., Rothen-Rutishauser B., Perriard J.C., Wallimann T. und Brenner B. 1995b. Equilibration and exchange of fluorescently labeled molecules in skinned skeletal muscle fibers visualized by confocal microscopy. *Biophys J.* 69(4):1246-58.
- Kron S.J., Toyoshima Y.Y., Uyeda T.Q. und Spudich J.A. 1991. Assays for actin sliding movement over myosin-coated surfaces. *Methods Enzymol.* 196:399-416.
- Kull F.J., Sablin E.P., Lau R., Fletterick R.J. und Vale R.D. 1996. Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature.* 380(6574):550-5.
- Lovell S.J., Knight P.J. und Harrington W.F. 1981. Fraction of myosin heads bound to thin filaments in rigor fibrils from insect flight and vertebrate muscles. *Nature.* 293(5834):664-6.
- Lowey S., Slayter H.S., Weeds A.G. und Baker H. 1969. Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J Mol Biol.* 42(1):1-29.
- Lymn R.W. und Taylor E.W. 1971. Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry.* 10(25):4617-24.
- Ma Y.Z. und Taylor E.W. 1997a. Interacting head mechanism of microtubule-kinesin ATPase. *J Biol Chem.* 272(2):724-30.
- Ma Y.Z. und Taylor E.W. 1997b. Kinetic mechanism of a monomeric kinesin construct. *J Biol Chem.* 272(2):717-23.
- Mandelkow E. und Johnson K.A. 1998. The structural and mechanochemical cycle of kinesin. *Trends Biochem Sci.* 23(11):429-33.

- Mehta A.D., Finer J.T. und Spudich J.A. 1997. Detection of single-molecule interactions using correlated thermal diffusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(15):7927-31.
- Mermall V., Post P.L. und Mooseker M.S. 1998. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science*. 279(5350):527-33.
- Molloy J.E., Burns J.E., Kendrick-Jones J., Tregear R.T. und White D.C. 1995. Movement and force produced by a single myosin head. *Nature*. 378(6553):209-12.
- Moore P.B., Huxley H.E. und DeRosier D.J. 1970. Three-dimensional reconstruction of F-actin, thin filaments and decorated thin filaments. *J Mol Biol*. 50(2):279-95.
- Mooseker M.S. und Cheney R.E. 1995. Unconventional myosins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 11:633-75.
- Moy V.T., Florin E.L. und Gaub H.E. 1994. Intermolecular forces and energies between ligands and receptors. *Science*. 266(5183):257-9.
- Moyer M.L., Gilbert S.P. und Johnson K.A. 1998. Pathway of ATP hydrolysis by monomeric and dimeric kinesin. *Biochemistry*. 37(3):800-13.
- Nishizaka T., Miyata H., Yoshikawa H., Ishiwata S. und Kinoshita K., Jr. 1995. Unbinding force of a single motor molecule of muscle measured using optical tweezers. *Nature*. 377(6546):251-4.
- Nishizaka T., Seo R., Tadakuma H., Kinoshita K., Jr. und Ishiwata S. 2000. Characterization of single actomyosin rigor bonds: load dependence of lifetime and mechanical properties. *Biophys J*. 79(2):962-74.
- Nogales E., Wolf S.G. und Downing K.H. 1998. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*. 391(6663):199-203.
- Pardee J.D. und Spudich J.A. 1982. Purification of muscle actin. *Methods Enzymol*. 85 Pt B:164-81.
- Pralle A., Prummer M., Florin E.L., Stelzer E.H. und Hörber J.K. 1999. Three-dimensional high-resolution particle tracking for optical tweezers by forward scattered light. *Microsc Res Tech*. 44(5):378-86.
- Rayment I., Holden H.M., Whittaker M., Yohn C.B., Lorenz M., Holmes K.C. und Milligan R.A. 1993a. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science*. 261(5117):58-65.

- Rayment I., Rypniewski W.R., Schmidt-Base K., Smith R., Tomchick D.R., Benning M.M., Winkelmann D.A., Wesenberg G. und Holden H.M. 1993b. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science*. 261(5117):50-8.
- Reedy M.K., Holmes K.C. und Tregear R.T. 1965. Induced changes in orientation of the cross-bridges of glycerinated insect flight muscle. *Nature*. 207:1276-1280.
- Resetar A.M. und Chalovich J.M. 1995. Adenosine 5'-(gamma-thiotriphosphate): an ATP analog that should be used with caution in muscle contraction studies. *Biochemistry*. 34(49):16039-45.
- Rice S., Lin A.W., Safer D., Hart C.L., Naber N., Carragher B.O., Cain S.M., Pechatnikova E., Wilson-Kubalek E.M., Whittaker M., Pate E., Cooke R., Taylor E.W., Milligan R.A. und Vale R.D. 1999. A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature*. 402(6763):778-84.
- Rodgers M.E. und Harrington W.F. 1987. Hinging of rabbit myosin rod. *Biochemistry*. 26(26):8697-703.
- Sadhu A. und Taylor E.W. 1992. A kinetic study of the kinesin ATPase. *J Biol Chem*. 267(16):11352-9.
- Schnitzer M.J. und Block S.M. 1997. Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step. *Nature*. 388(6640):386-90.
- Scholz T. 1998. Entwicklung modifizierter in vitro Motilitätsassays für das Aktomyosinsystem [Diplomarbeit]. Hannover: Universität Hannover.
- Sellers J.R. 2000. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta*. 1496(1):3-22.
- Sellers J.R. und Kachar B. 1990. Polarity and velocity of sliding filaments: control of direction by actin and of speed by myosin [published erratum appears in *Science* 1990 Aug 31;249(4972):973]. *Science*. 249(4967):406-8.
- Sheetz M.P., Block S.M. und Spudich J.A. 1986. Myosin movement in vitro: a quantitative assay using oriented actin cables from *Nitella*. *Methods Enzymol*. 134:531-44.
- Sheetz M.P. und Spudich J.A. 1983. Movement of myosin-coated fluorescent beads on actin cables in vitro. *Nature*. 303(5912):31-5.
- Sosa H., Peterman E.J., Moerner W.E. und Goldstein L.S. 2001. ADP-induced rocking of the kinesin motor domain revealed by single-molecule fluorescence polarization microscopy. *Nat Struct Biol*. 8(6):540-4.

- Spudich J.A., Kron S.J. und Sheetz M.P. 1985. Movement of myosin-coated beads on oriented filaments reconstituted from purified actin. *Nature*. 315(6020):584-6.
- Squire J. 1981. The structural basis of muscular contraction. New York: *Plenum Press*.
- Stein L.A., Schwarz R.P., Jr., Chock P.B. und Eisenberg E. 1979. Mechanism of actomyosin adenosine triphosphatase. Evidence that adenosine 5'-triphosphate hydrolysis can occur without dissociation of the actomyosin complex. *Biochemistry*. 18(18):3895-909.
- Stewart R.J., Thaler J.P. und Goldstein L.S. 1993. Direction of microtubule movement is an intrinsic property of the motor domains of kinesin heavy chain and *Drosophila ncd* protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(11):5209-13.
- Sugi H., Kobayashi T., Gross T., Noguchi K., Karr T. und Harrington W.F. 1992. Contraction characteristics and ATPase activity of skeletal muscle fibers in the presence of antibody to myosin subfragment 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(13):6134-7.
- Suzuki Y., Shimizu T., Morii H. und Tanokura M. 1997. Hydrolysis of AMPPNP by the motor domain of *ncd*, a kinesin-related protein. *FEBS Lett*. 409(1):29-32.
- Svoboda K., Mitra P.P. und Block S.M. 1994. Fluctuation analysis of motor protein movement and single enzyme kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(25):11782-6.
- Svoboda K., Schmidt C.F., Schnapp B.J. und Block S.M. 1993. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature*. 365(6448):721-7.
- Takahashi K. 1978. Topography of the myosin molecule as visualized by an improved negative staining method. *J Biochem (Tokyo)*. 83(3):905-8.
- Tanaka H., Ishijima A., Honda M., Saito K. und Yanagida T. 1998. Orientation dependence of displacements by a single one-headed myosin relative to the actin filament. *Biophys J*. 75(4):1886-94.
- Thedinga E., Karim N., Kraft T. und Brenner B. 1999. A single-fiber in vitro motility assay. In vitro sliding velocity of F-actin vs. unloaded shortening velocity in skinned muscle fibers. *J Muscle Res Cell Motil*. 20(8):785-96.
- Tischer C. 2000. Charakterisierung der dreidimensionalen mechanischen Eigenschaften des Motorproteins Myosin mit photonischer Kraftmikroskopie [Diplomarbeit]. Heidelberg: Ruprecht-Karls-Universität.

- Toyoshima Y.Y., Toyoshima C. und Spudich J.A. 1989. Bidirectional movement of actin filaments along tracks of myosin heads. *Nature*. 341(6238):154-6.
- Uemura S., Kawaguchi K., Yajima J., Edamatsu M., Toyoshima Y.Y. und Ishiwata S. 2002. Kinesin-microtubule binding depends on both nucleotide state and loading direction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16:16.
- Ueno H. und Harrington W.F. 1984. An enzyme-probe study of motile domains in the subfragment-2 region of myosin. *J Mol Biol*. 180(3):667-701.
- Uyeda T.Q., Abramson P.D. und Spudich J.A. 1996. The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(9):4459-64.
- Vale R.D. 1987. Intracellular transport using microtubule-based motors. *Annu Rev Cell Biol*. 3:347-78.
- Vale R.D. und Fletterick R.J. 1997. The design plan of kinesin motors. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 13:745-77.
- Vale R.D., Reese T.S. und Sheetz M.P. 1985. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell*. 42(1):39-50.
- Van Dijk J., Fernandez C. und Chaussepied P. 1998. Effect of ATP analogues on the actin-myosin interface. *Biochemistry*. 37(23):8385-94.
- Weigel C., Bartoo M.L., White D.C., Sparrow J.C. und Molloy J.E. 1998. The stiffness of rabbit skeletal actomyosin cross-bridges determined with an optical tweezers transducer. *Biophys J*. 75(3):1424-38.
- Weigel C., Coluccio L.M., Jontes J.D., Sparrow J.C., Milligan R.A. und Molloy J.E. 1999. The motor protein myosin-I produces its working stroke in two steps. *Nature*. 398(6727):530-3.
- Visscher K., Schnitzer M.J. und Block S.M. 1999. Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. *Nature*. 400(6740):184-9.
- Voet D. und Voet J.D. 1995. Biochemistry. New York: *John Wiley & Sons*.
- Wakabayashi K., Sugimoto Y., Tanaka H., Ueno Y., Takezawa Y. und Amemiya Y. 1994. X-ray diffraction evidence for the extensibility of actin and myosin filaments during muscle contraction. *Biophys J*. 67(6):2422-35.
- Walker M., Knight P. und Trinick J. 1985. Negative staining of myosin molecules. *J Mol Biol*. 184(3):535-42.

- Watkins R.W. und Robertson C.R. 1977. A total internal-reflection technique for the examination of protein adsorption. *J Biomed Mater Res.* 11(6):915-38.
- Woehlke G., Ruby A.K., Hart C.L., Ly B., Hom-Booher N. und Vale R.D. 1997. Microtubule interaction site of the kinesin motor. *Cell.* 90(2):207-16.
- Woehlke G. und Schliwa M. 2000. Walking on two heads: the many talents of kinesin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1(1):50-8.
- Wu X., Jung G. und Hammer J.A., 3rd. 2000. Functions of unconventional myosins. *Curr Opin Cell Biol.* 12(1):42-51.
- Yamada A. und Takahashi K. 1992. Sudden increase in speed of an actin filament moving on myosin cross-bridges of "mismatched" polarity observed when its leading end begins to interact with cross-bridges of "matched" polarity. *J Biochem (Tokyo).* 111(5):676-80.
- Yamada A. und Wakabayashi T. 1993. Movement of actin away from the center of reconstituted rabbit myosin filament is slower than in the opposite direction. *Biophys J.* 64(2):565-9.
- Yamada A., Yoshio M. und Nakayama H. 1997. Bi-directional movement of actin filaments along long bipolar tracks of oriented rabbit skeletal muscle myosin molecules. *FEBS Lett.* 409(3):380-4.
- Yanagida T., Nakase M., Nishiyama K. und Oosawa F. 1984. Direct observation of motion of single F-actin filaments in the presence of myosin. *Nature.* 307(5946):58-60.
- Yang J.T., Laymon R.A. und Goldstein L.S. 1989. A three-domain structure of kinesin heavy chain revealed by DNA sequence and microtubule binding analyses. *Cell.* 56(5):879-89.
- Yang J.T., Saxton W.M., Stewart R.J., Raff E.C. und Goldstein L.S. 1990. Evidence that the head of kinesin is sufficient for force generation and motility in vitro. *Science.* 249(4964):42-7.
- Yu L.C. und Brenner B. 1989. Structures of actomyosin crossbridges in relaxed and rigor muscle fibers. *Biophys J.* 55(3):441-53.

## Eigene Veröffentlichungen

Köhler, J., Winkler, G., Schulte, I., Scholz, T., McKenna, W., Brenner, B. und Kraft, T. 2002. Mutation of the myosin converter domain alters cross-bridge elasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(6):3557-3562.

Köhler, J., Schulte, I., Scholz, T., McKenna, W., Brenner, B. und Kraft, T. 2002. The converter domain of skeletal muscle myosin: a major element of cross-bridge elasticity?. *Biophys J*. 82(1):369A.

Scholz, T. und Brenner B. 2002. Actin sliding on reconstituted myosin filaments containing only one myosin heavy chain isoform. akzeptiert und *in press*. *J Muscle Res Cell Motility*.

Scholz, T., Altmann, S.M., Hörber, J.K.H. und Brenner, B. 2002. Mechanical properties of myosin probed with the Photonic Force Microscope. *Biophys J*. 82(1):372A.

Scholz, T. und Brenner B. 2001. Actin sliding on myosin filaments reconstituted from myosin with only one MHC-isoform from a single muscle fiber. *Biophys J*. 80(1):578A.

Scholz, T. und Brenner B. 2000. Sliding velocity of actin in vitro on reconstituted rabbit psoas muscle myosin filaments. *Eur J Physiol*. 439(6):R432.

Altmann, S.M., Scholz, T., Brenner, B. und Hörber, J.K.H. 2002. Mechanical properties of single kinesin motors measured using Photonic Force Microscopy. In Präparation.

Scholz, T., Altmann, S.M., Tischer, C., Hörber, J.K.H. und Brenner, B. 2002. Characterization of mechanical properties of single myosin II motors using Photonic Force Microscopy. In Präparation für *Biophys J*.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Tim Scholz, geboren am 28.09.1971 in Hameln, an Eides statt, dass ich die von mir eingereichte Dissertation mit dem Titel:

*Mechanische Charakterisierung einzelner Motorprotein-Moleküle mit Hilfe des Photonischen Kraftmikroskops*

selbstständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben habe. Gleichzeitig versichere ich an Eides statt, dass die in dieser Dissertation aufgeführten Ergebnisse hiermit zum ersten mal in einer Prüfungsarbeit erwähnt sind und nicht bereits schon zuvor für eine Diplomarbeit o.ä. verwendet wurden.

Hannover, 09.10.2002

## Danksagung

Meinem Betreuer Herrn Professor Dr. B. Brenner danke ich ganz herzlich für die sehr interessante Fragestellung, die fachkundige Betreuung und seine Diskussionsbereitschaft. Seine wertvollen Anregungen und sein technisches Interesse haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit und zur Erweiterung meiner Kenntnisse beigetragen. Besonders möchte ich mich dafür bedanken, dass er meinen USA-Aufenthalt unterstützt hat.

Bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. W. Müller bedanke ich mich für seine Hilfe und beruhigende Art und ein immer offenes Ohr bei Fragen organisatorischer Art. Außerdem möchte ich mich bei ihm für seine Unterstützung bei der Beantragung meiner Stipendien bedanken.

Ein riesen „Danke“ geht an *die Heidelberger*, allen voran natürlich an Stephan Altmann. Ohne sein physikalisches Wissen und technisches Geschick hätte es nicht *das* Gerät gegeben, mit dem wir gemessen haben. Nur durch unsere vielen Diskussionen und die gute Zusammenarbeit haben wir letztendlich der Natur einige sinnvolle Daten abringen können. Heinrich Hörber danke ich für seinen nie endenden Optimismus. Bei Arnd Pralle und Christian Tischer möchte ich mich für den Beistand gerade zu Beginn des Projektes bedanken.

Der *European Molecular Biology Organisation* (EMBO) danke ich für die finanzielle Unterstützung der vielen „Heidelberg-Reisen“ durch ein *short term fellowship*.

Professor DJ. Manstein und Frau Lang vom MPI für medizinische Forschung in Heidelberg danke ich für die Organisation von Gästezimmern im Max-Planck-Haus in Heidelberg.

Herrn Professor MS. Mooseker vom *Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology* der Yale University und seinem Arbeitskreis bin ich sehr dankbar für gastfreundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und das sehr gut betreute Training von Aufreinigen und Arbeiten mit prozessiven Motormolekülen.

Dem Boehringer Ingelheim Fonds danke ich für die finanzielle Unterstützung des Aufenthalts in den USA.

Für die Bereitstellung der Kinesinmoleküle danke ich Herrn Dr. J. Howard vom MPI für molekulare Zellbiologie und Genetik in Dresden.

Bei Imke, Dirk und Volker möchte ich dafür bedanken, dass sie mich haben erahnen lassen, welch Wissen und Weisheit doch in der Generation der Altvorderen zu stecken vermag.

Eva danke ich, neben der Hilfe in logistischen Angelegenheiten, vor allem für ihr offenes Ohr auch außerhalb der Sprechzeiten und die lustigen Momente, obwohl sie immer mein Taschengeld vergessen hat.

Theresia bin ich sehr dankbar für ihre Hilfe und ständige Gesprächsbereitschaft über all die Jahre.

Meinen (teilweise schon weiter gezogenen) Kollegen Beate, Birgit, Claudia, Enke, Hiroaki, Petra, Thomas und Udo verdanke ich das angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima im Labor. Vor allem Edgar, Gudrun und Jan sei an dieser Stelle für tägliche Updates bezüglich *Daily Soaps* und diverse sinnlose Scherze gedankt.

Vielen Dank an meine Oma für kulinarische und sonstige materielle Unterstützung. Großer Dank geht an meine Eltern für ihre Unterstützung bei der Verwirklichung meines Berufswunsches und dafür, dass sie mir beigebracht haben, zufrieden zu leben.

Zu guter Letzt vielen Dank an Christina dafür, dass sie da ist. Ich weiß, ich war nicht immer einfach.

## Wissenschaftlicher Werdegang

Vorname: S c h o l z  
Name: T i m  
Adresse: Edenstr. 46  
30163 Hannover

Geboren am: 28.09.1971  
Geboren in: Hameln

Eltern: Rüdiger Scholz  
Marianne Scholz, geb. Weber

Staatesangehörigkeit: deutsch

Hochschulstudien: 1992 bis 1998 Studium der Biochemie an der  
Universität Hannover  
02.06.1998 Diplom in Biochemie, Diplomarbeit in  
der Abteilung für Molekular- und Zellphysiologie,  
Zentrum Physiologie, Medizinische Hochschule  
Hannover, Titel: Entwicklung modifizierter *in vitro*  
Motilitätsassays für das Aktomyosinsystem,  
Betreuer: Prof. Dr. Bernhard Brenner  
seit 1996 Studium der Humanmedizin an der  
Medizinische Hochschule Hannover  
06.04.1999 Physikum

Schulischer Werdegang: 29.05.1991 Abitur am Schiller-Gymnasium in  
Hameln  
1984 - 1991 Schiller-Gymnasium in Hameln  
1982 - 1984 Orientierungsstufe in Aerzen  
1978 - 1982 Grundschule in Aerzen

Militärdienst: 1991 - 1992 im Heer der Deutschen Bundeswehr

Stipendien und  
Auslandsaufenthalte:

Dezember 2000 bis April 2001 Forschungsaufenthalt am *Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology*, Yale University, New Haven, CT, USA, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mark S. Mooseker, gefördert von den Boehringer Ingelheim Fonds

2001 *short term fellowship* der *European Molecular Biology Organisation*, EMBO