

NMR-spektroskopische Untersuchungen der Struktur und der Dynamik des Aktomyosinsystems

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte

DISSERTATION

D 386

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Harry Kany

Betreuer: Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer

Kaiserslautern 2000

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 10. Juli 2000

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. G. Eisenbrand

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. E. Trommer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen November 1994 und Mai 2000 am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in Heidelberg und am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie der Universität Regensburg.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer danke ich herzlich für die gute Betreuung, die vielen Diskussionen und die unerschöpfliche Fülle immer neuer Ideen und Anregungen.

Herrn Prof. Dr. K. C. Holmes danke ich für die freundliche Aufnahme in die Abteilung Biophysik und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. W. E. Trommer danke ich für das Interesse an der vorliegenden Arbeit sowie für die Vertretung vor dem Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern.

Für Petra, Laura und Lukas

Zusammenfassung

Aktin und Myosin sind die beiden wichtigsten molekularen Komponenten der Myofibrillen, die für die Muskelkontraktion verantwortlich sind. In Nichtmuskelzellen bildet Aktin die Mikrofilamente, die wiederum über Wechselwirkungen mit Myosin kontraktile Einheiten bilden. In der vorliegenden Arbeit wurden strukturelle Aspekte und Funktion der beiden Motorproteine sowie ihre Interaktion mittels der hochauflösenden Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR) untersucht.

Die Struktur von filamentösem Aktin (F-Aktin) wird durch das komplexierte bivalente Ion beeinflusst. Mit drei voneinander unabhängigen Methoden wurde gezeigt, daß in Mg^{2+} -F-Aktin im Gegensatz zu Ca^{2+} -F-Aktin die N-terminalen Domänen der Monomereinheiten hochmobil sind. Sie sind durch 1H -NMR-Signale mit schmaler Linienbreite charakterisiert, die selbst im polymeren Zustand im Filament zu beobachten sind.

Die chemische Modifikation des Cys 374 mit dem Markierungsreagenz 4-Perfluoro-tert.-butylphenyliodacetamid (PFP) ermöglichte die Untersuchung des C-Terminus mit der ^{19}F -NMR-Spektroskopie. Unabhängig vom gebundenen Ion wurden die intensiven ^{19}F -Signale des G-Aktins nach der Polymerisation zu F-Aktin sehr stark verbreitert. Dies bewies die Immobilisierung des C-Terminus und damit, daß die scharfen NMR-Signale des Mg^{2+} -F-Aktins von anderen Domänen stammen müssen.

Die Bindung von Antikörperfragmenten (F_{ab}) gegen die ersten sieben Aminosäurereste des Aktins führte zur Unterdrückung der scharfen 1H -NMR-Signale des Mg^{2+} -F-Aktins, die der mobilen Region zugeordnet waren. Dies deutete auf stark bewegliche Aminosäurereste im N-Terminus nach der Polymerisation hin.

Schließlich wurden in sehr konzentrierten Mg^{2+} -F-Aktin-Proben mit der homonuklearen 2D-NMR-Spektroskopie die Resonanzlinien der 25 N-terminalen Aminosäurereste des Aktins sequentiell zugeordnet. Anhand der Quantifizierung der TOCSY-Kreuzsignal-Volumina wurde nachgewiesen, daß die ersten sechs Aminosäurereste am beweglichsten sind. Die Aminosäurereste in den beiden folgenden β -Faltblattsträngen bis Position 20 besitzen eine intermediäre Mobilität. In der folgenden Schleife verringert sich die Beweglichkeit weiter und die Aminosäurereste des dritten β -Faltblattstranges sind durch die Umgebung im Protein vollständig fixiert. Die Dynamik des N-Terminus bleibt dabei unabhängig von pH-Wert und Temperatur.

In Mg^{2+} -F-Aktin wurde eine niederaffine Mg^{2+} -Bindungsstelle durch eine Gleichgewichtstitration bestimmt. Da die N-terminale Acetylgruppe beobachtet wurde, sollte sich die Bindungsstelle in der Nähe des N-Terminus befinden. Allerdings könnten auch konformationelle Änderungen induziert worden sein, die nur indirekt den N-Terminus beeinflussen.

Der Austausch des im Aktin gebundenen Ca^{2+} durch Mg^{2+} war eine neue und sehr schonende Methode, um das Cys 10 in der Subdomäne I von Aktin für Markierungsreagenzien

zugänglich zu machen. Anhand der sehr sensitiven PFP-Markierung an Cys 10 wurden in der ^{19}F -NMR-Spektroskopie zwei verschiedene Zustände der Bindung von Myosin S1 an das Aktinfilament beobachtet. Solange ATP im Überschuß vorhanden war, schien die im Fließgleichgewicht dominierende Konformation des Myosin-Nukleotid-Komplexes mit der Subdomäne I von Aktin zu interagieren und die PFP-Markierung zu immobilisieren. Nach der Hydrolyse von ATP erhöhte sich die Mobilität der Markierung signifikant.

Durch NMR-Experimente mit gepulsten Feldgradienten wurde der Diffusionskoeffizient von Mg^{2+} -G-Aktin und Mg^{2+} -F-Aktin bestimmt. Der relativ große Wert, der für den Diffusionskoeffizient von filamentösem Aktin ($0,34 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$) erhalten wurde, deutete daraufhin, daß die Aktindiffusionsmessungen nicht durch ein einfaches starres Körpermodell erklärt werden können, sondern die interne Bewegung im Filament einen zusätzlichen Beitrag leistet.

Um das Muskelaktin aus Kaninchen mit Nichtmuskelaktin zu vergleichen, wurde Aktin aus dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* in ausreichenden Mengen für erstmalige NMR-spektroskopische Untersuchungen isoliert.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden auch Studien am Interaktionspartner von Aktin durchgeführt. Mit der ^{31}P -NMR-Spektroskopie wurden die strukturellen Änderungen der Nukleotidbindungsstelle im Myosin S1 bei verschiedenen Temperaturen verfolgt. Die Komplexe von Myosin S1.ADP und Myosin S1.ADP. VO_4^{3-} lagen bei 298 K jeweils in einer bevorzugten Konformation vor, die strukturell dem ADP. P_i -Zustand zuzuordnen ist. Bei tieferen Temperaturen liegt wahrscheinlich eine Vielzahl von Konformeren im Gleichgewicht vor. Die Resonanzlinien sind dann durch Austauschprozesse bis auf das Rauschniveau verbreitert und können nicht mehr detektiert werden. Im Gegensatz zum Myosin S1.ADP- bzw. Myosin S1.ADP. VO_4^{3-} -Komplex existiert eine diskrete Tieftemperaturkonformation von Myosin S1.ADP. AlF_4^- und Myosin S1.ADP. BeF_x . Durch Temperaturerhöhung kann Myosin S1.ADP. AlF_4^- in eine weitere Konformation überführt werden. Die Existenz einer zweiten Konformation von Myosin S1.ADP. BeF_x bei höheren Temperaturen war nicht eindeutig nachzuweisen.

Die in *Dictyostelium discoideum* exprimierte Motordomäne M754 besitzt eine verkürzte Halsregion und kann im Gegensatz zu Myosin S1 keine leichten Ketten mehr binden. Die ^1H -NMR-spektroskopischen Untersuchungen beider Motorproteine ergab, daß die Motordomäne selbst sehr kompakt strukturiert ist. Die in der ^1H -NMR-Spektroskopie beobachtbaren mobilen Bereiche des Myosin S1 sind fast ausschließlich in den leichten Ketten lokalisiert und wurden durch die Bindung an Aktin im Aktomyosinkomplex immobilisiert. Die Veränderung des Nukleotidbesetzungszustands von Myosin S1.ADP zu Myosin S1.ADP. VO_4^{3-} führt zu einer anderen Proteinkonformation und verschiebt das Gleichgewicht von gebundenem zu freiem Myosin S1. Die im ersten Teil der Arbeit als mobil charakterisierte N-terminale Acetylgruppe von Aktin wurde im ADP-Zustand des Myosins entgegen der Erwartung nicht immobilisiert.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Kernspinresonanz-Spektroskopie zur Analyse biologischer Makromoleküle	1
1.2	Aktin	2
1.2.1	Biologische Funktion	2
1.2.2	Kristallstruktur von Aktin	3
1.2.3	Liganden des Aktins	5
1.2.4	Polymerisation von Aktin	6
1.2.5	Aktinbindende Toxine	8
1.2.6	Chemische Modifizierung von Aktin	8
1.2.7	Diffusion von G- und F-Aktin	10
1.3	MYOSIN	11
1.3.1	Muskelmyosin	11
1.3.2	Temperaturabhängigkeit der Ordnung der Myosinköpfe im isolierten dicken Filament	13
1.3.3	Temperaturabhängigkeit der Myosin S1 Konformation	13
1.3.4	Muskelkontraktion	13
2	METHODISCHE GRUNDLAGEN	15
2.1	NMR-Spektroskopie	15
2.2	Bestimmung der Diffusionskoeffizienten von Aktin und Modellproteinen	18
2.2.1	Die Diffusion	19
2.2.2	Diffusionsmessungen mittels NMR-Spektroskopie	21
3	ERGEBNISSE	26
3.1	Aktin	26
3.1.1	Mobilität der Subdomäne I von Aktin	26
3.1.1.1	Mobilität des C-Terminus in G- und F-Aktin	27
3.1.1.2	Mobilität des N-Terminus von Mg ²⁺ -F-Aktin	28
3.1.1.3	2D-NMR-Spektroskopie am Kaninchen-Aktin	30
3.1.1.3.1	Struktur und Dynamik der N-terminalen Domäne von Mg ²⁺ -F-Aktin	33
3.1.1.3.2	Einfluß von pH und Temperatur auf die mobile Domäne von Mg ²⁺ -F-Aktin	35
3.1.2	Diffusionsmessungen	36
3.1.2.1	Kalibrierung des Spektrometers	36
3.1.2.2	Auswahl und Optimierung der Pulsprogramme	37
3.1.2.3	Bestimmung der Diffusionskoeffizienten verschiedener Proteine	40
3.1.2.4	Vergleich der Diffusionskoeffizienten von Mg ²⁺ -G- und Mg ²⁺ -F-Aktin	42
3.1.3	Austausch des zweiwertigen Ions durch Dialyse	45
3.1.4	Mg ²⁺ bindet an den N-Terminus von Aktin	48
3.1.5	¹⁰ PFP-Aktin	49
3.1.5.1	Selektive Markierung von Cys 10 mit PFP in Mg ²⁺ -G-Aktin	51
3.1.5.2	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Myosin S1-dekoriertem ¹⁰ PFP-Mg ²⁺ -Aktin	51
3.1.5.3	Titration von ¹⁰ PFP-Mg ²⁺ -G-Aktin mit F _{ab}	52
3.1.5.4	Mobilität der PFP-Markierung von ¹⁰ PFP-Mg ²⁺ -Aktin im Aktomyosin-Komplex	53
3.1.5.5	Mobilität der N-Acetylgruppe von ¹⁰ PFP-Mg-Aktin im Aktomyosin-Komplex	54
3.1.6	Nukleotidfreies Aktin	56
3.1.7	Aktin aus Huhn	57
3.1.8	<i>Dictyostelium discoideum</i> -Aktin	58
3.2	Myosin S1	60

3.2.1	Kaninchen Myosin S1	60
3.2.1.1	Temperaturabhängigkeit der Myosin S1.ADP-Konformationen	60
3.2.1.2	Temperaturabhängigkeit der Myosin S1.ADP.VO ₄ ³⁻ -Konformationen	61
3.2.1.4	Temperaturabhängigkeit der Myosin S1.ADP.AIF ₄ -Konformationen.....	63
3.2.1.5	Temperaturabhängigkeit der Myosin S1.ADP. BeF _x -Konformationen	64
3.2.2	Vergleich von Kaninchen Myosin S1 und <i>Dictyostelium discoideum</i> Motordomäne (MD).....	67
3.3	Die Interaktion zwischen Aktin und Myosin.....	69
3.3.1	Aktin und Kaninchen Myosin S1	69
3.3.2	Aktin und <i>Dictyostelium discoideum</i> - Motordomäne.....	71
3.3.3	Aktomyosin-Wechselwirkungen in Gegenwart von ATP oder ADP.VO ₄ ³⁻	73
4	DISKUSSION.....	75
4.1	Strukturelle Aspekte von Aktin	75
4.2	Strukturelle Aspekte beim Myosin S1.....	80
4.3	Aktomyosin.....	85
5	EXPERIMENTELLER TEIL	87
5.1	Präparation der Proteine	87
5.1.1	Aktin aus Kaninchen	87
5.1.1.1	Aceton-Trockenpulver	87
5.1.1.2	Präparation von Aktin aus Aceton-Trockenpulver.....	87
5.1.1.3	Herstellung von ADP-Aktin	88
5.1.2	Präparation von Aktin aus Huhn.....	88
5.1.3	Präparation von Aktin aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	88
5.1.4	Myosin und Myosin Subfragment I aus Kaninchen	89
5.1.4.1	Myosin	89
5.1.4.2	Myosin S1	89
5.1.5	Proteinpräparation der His-tagged Myosin-Motor-Domäne aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	90
5.1.5.1	Aufzucht der Zellen	90
5.1.5.2	Proteinpräparation der Motordomäne.....	91
5.2	Chemische Modifikation von Aktin	91
5.2.1.1	Derivatisierung von Cys 374 in ATP-G-Aktin mit N-Ethyl-Maleinimid	91
5.2.1.2	Derivatisierung von Cys 374 in ATP-G-Aktin mit 4-(perfluoro-tert-butyl)-phenyliodacetamid (PFP)	92
5.2.1.3	Derivatisierung von Cys 10 in ATP-G-Aktin mit 4-(perfluoro-tert-butyl)-phenyliodacetamid (PFP)	92
5.3	Atomabsorptionsspektroskopie (AAS).....	93
5.4	SDS-Page	93
5.5	Materialien	94
5.5.1	Chemikalien	94
5.5.2	Säulenfüllmaterialien	94
5.5.3	Pufferlösungen.....	95
5.5.4	Geräte.....	96
6	LITERATUR.....	97
7	ANHANG	108

Verzeichnis der Abkürzungen

$\Delta\nu_{1/2}$	Halbwertsbreite
A1, A2	Alkalische leichte Kette 1, Alkalische leichte Kette 2
AEDANS	N-(iodoacetyl)-N'-(5-sulfo-1-naphthyl)ethylendiamin (1,5-AEDANS)
AP ₅ A	P,P ⁵ -Di(adenosine-5'-)pentaphosphat Trilithiumsalz
COSY	Korrelationspektroskopie (<i>correlated spectroscopy</i>)
Da	Dalton, molare Masse
DMF	Dimethylformamid
DQF	doppelquanten-gefiltert (<i>double quantum filtered</i>)
DSS	Natrium-4,4-dimethyl-4-silapentansulfonat
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
ELC	Essentielle leichte Kette (<i>Essential light chain</i> , je nach Isoform LC1 oder LC3, bzw. A1 oder A2)
FID	freier Induktionszerfall („free induction decay“)
LC1	Leichte Kette 1, Essentielle leichte Kette
LC2	Leichte Kette 2, Regulatorische leichte Kette
LC3	Leichte Kette 3, Essentielle leichte Kette
M _r	Molekulare Masse
Myosin S1	Myosin Subfragment 1
Myosin S1.ADP	Myosin Subfragment 1 mit gebundenem ADP
Myosin S1.ADP.AlF ₄	Myosin Subfragment 1 mit gebundenem ADP und Aluminiumfluorid
Myosin S1.ADP.BeF _x	Myosin Subfragment 1 mit gebundenem ADP und Berylliumfluorid
Myosin S1.ADP.P _i	Myosin Subfragment 1 mit gebundenem ADP und Orthophosphat
Myosin S1.ADP.VO ₄ ³⁻	Myosin Subfragment 1 mit gebundenem ADP und Vanadat
Myosin S1.ATP	Myosin Subfragment 1 mit gebundenem ATP
NEM	N-Ethylmaleinimid
NOE	Kern-Overhauser-Effekt (<i>nuclear Overhauser effect</i>)
NOESY	Kern-Overhauser-Effekt-Spektroskopie (<i>nuclear Overhauser enhanced spectroscopy</i>)
ODNB	n-Octyl-5-dithio-2-nitrobenzoesäure
PFP	4-Perfluoro-tert.-butyl-phenyliodacetamid
TOCSY	totale Korrelationspektroskopie (<i>total correlation spectroscopy</i>)
TROSY	<i>transverse relaxation-optimized spectroscopy</i>

1 Einleitung

1.1 Kernspinresonanz-Spektroskopie zur Analyse biologischer Makromoleküle

Proteine spielen bei den elementaren biologischen Prozessen eine zentrale Rolle. Um sie verstehen zu können, ist die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur auf atomarer Ebene eine notwendige Voraussetzung. Die Struktur allein macht aber über die Arbeitsweise eines Proteins keine Aussage. Zur Aufklärung von Enzymmechanismen und biochemischen Reaktionswegen sind weitere Details notwendig.

Zur Bestimmung von Proteinstrukturen mit atomarer Auflösung existieren drei Methoden, die Röntgenbeugung an Proteinkristallen, die hochauflösende Kernspinresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR) von Proteinen in Lösung und in Anfängen die Elektronendiffraktion an oberflächenfixierten Proteinkristallen. Zur Zeit ist die Röntgenkristallographie mit über 9000 Strukturen¹ noch immer die bedeutendste Methode. Mit über 1800 Strukturen ist die NMR-Spektroskopie dagegen die einzige Methode mit der sich Strukturen in Lösung bestimmen lassen. Dadurch sind annähernd physiologische Bedingungen für das Protein realisierbar. Die Strukturbestimmung mittels der NMR-Spektroskopie ist wegen der zunehmenden Überlagerung der Spektrallinien derzeit routinemäßig auf relativ kleine Proteine mit einem Molekulargewicht bis zu 30 kDa beschränkt. Allerdings ist zu erwarten, daß mit der neu eingeführten TROSY-Spektroskopie in der Zukunft wesentlich größere Strukturen bestimmt werden können. Abgesehen von Strukturbestimmungen können dynamische Prozesse auf einer weiten Zeitskala von Nanosekunden bis Stunden beobachtet werden. So lassen sich Konformationsänderungen durch äußere Einflüsse (z.B. pH, Temperatur, Ionenstärke, Druck) oder Protein-Substrat- und Protein-Protein-Wechselwirkungen verfolgen.

Der erste Nachweis der kernmagnetischen Resonanz gelang im Jahre 1945 (BLOCH, 1946). Seit der Empfindlichkeitssteigerung durch die Einführung der Fourier-Spektroskopie (ERNST, 1966) hat sich die NMR-Spektroskopie zu einer Routinemethode in der Strukturbestimmung entwickelt. Für diesen Fortschritt war neben der Einführung moderner spektroskopischer Methoden auch die Weiterentwicklung technischer Geräte notwendig. Ohne die parallel dazu verlaufende Entwicklung der Computertechnik mit der permanenten Steigerung der Rechnerleistung und Speicherkapazität wäre die moderne hochauflösende NMR-Spektroskopie wegen der anfallenden Datenmengen nicht denkbar.

¹ Strukturen = Einträge in der Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org>

1.2 Aktin

1.2.1 Biologische Funktion

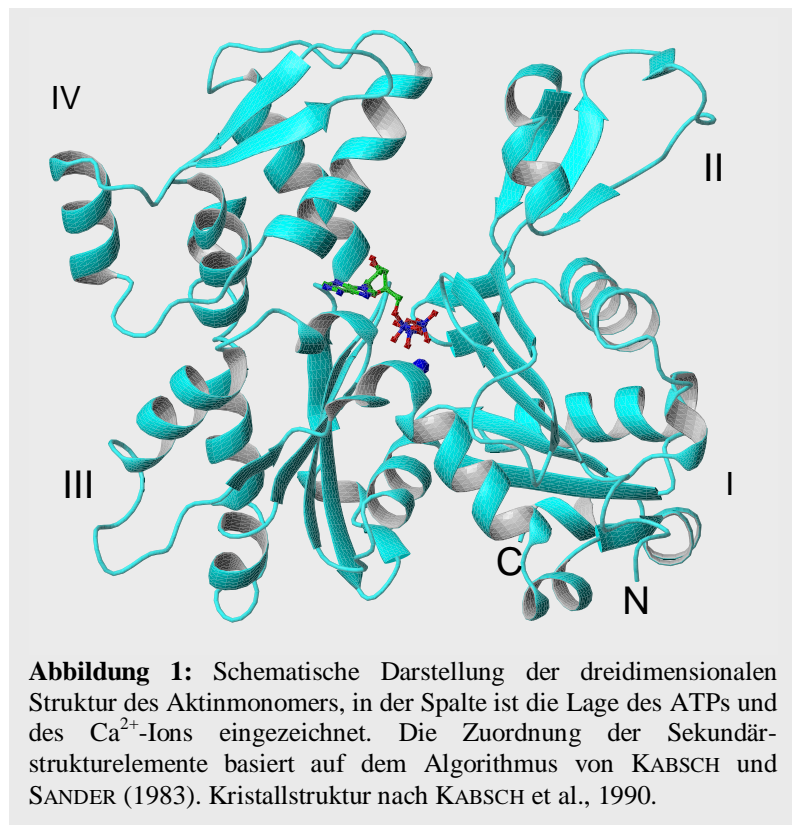
Aktin ist das häufigste Protein in Eukaryontenzellen und eines der am besten untersuchten Proteine überhaupt. Seit seiner Entdeckung in Muskelgewebe (STRAUB, 1942) und in Nichtmuskelzellen (HATANO & OOSAWA, 1966) besteht ein großes Interesse an diesem Protein. Es spielt eine zentrale Rolle bei den meisten Bewegungsabläufen, angefangen von Bewegungen einzelner Zellen (z.B. Lamellipoden) über den intrazellulären Transport durch das Cytoplasma bis hin zur Muskelkontraktion durch den Aktomyosinkomplex.

Aktin ist in seiner polymeren Form (F-Aktin) durch die Ausbildung der dünnen Filamente eine der beiden Hauptkomponenten des kontraktiven Aktomyosinsystems im Muskel. Die gerichtete Bewegung der Muskelkontraktion wird durch die Wechselwirkung mit den aus Myosin bestehenden dicken Filamenten erzeugt (COOKE, 1986). In Nichtmuskelzellen kommt Aktin sowohl in der polymeren als auch in der monomeren Form (G-Aktin) vor. In diesen Zellen ist G-Aktin an aktinbindende Proteine gebunden. Die Aktinfilamente werden permanent auf- und abgebaut und bilden zusammen mit Mikrotubuli und Intermediärfilamenten das Cytoskelett der Zelle. Die cytoplasmatischen Aktine von Tieren, Pilzen und Einzellern sind über weite phylogenetische Distanzen hochkonserviert (KORN, 1982). Die Muskelaktine unterscheiden sich untereinander nur in vier bis sechs von 378 Aminosäureresten und weichen nur um 25 Aminosäurereste von den Nichtmuskelaktinen ab (POLLARD, 1990). Die pflanzlichen Aktine weisen im Gegensatz zu den tierischen Aktinen mit mehr als 10 % Abweichung auch untereinander deutlich größere Unterschiede auf (HIGHTOWER & MEAGHER, 1985).

Die Substitutionen der Aminosäurereste von Muskel- und Nichtmuskelaktinen sind räumlich begrenzt. Die wesentlichsten Veränderungen befinden sich in Subdomäne I, insbesondere am Aminoterminal (KABSCH & VANDEKERCKHOVE, 1992). Dieser Bereich im Protein dient aufgrund seiner guten Zugänglichkeit und der hohen Ladungsdichte als Andockstelle für fast alle aktinbindende Proteine. Die eigentlichen Wechselwirkungen bilden sich erst später aus (REISLER, 1993). Die Aminosäuren der Aktin-Aktin-Bindungsstellen sind von den Substitutionen fast nicht betroffen, so daß auch alle Aktine fast identische Polymerisationseigenschaften aufweisen (CLARKE & SPUDICH, 1977; KORN, 1978).

1.2.2 Kristallstruktur von Aktin

G-Aktin. Die Kristallisation von G-Aktin wurde lange Zeit durch die ausgeprägte Neigung zur Polymerisation verhindert. Nur im Komplex mit monomerstabilisierenden Proteinen wie DNase I (SUCK et al., 1982) oder Profilin (SCHUTT et al., 1993) gelang es, ein Modell mit atomarer Auflösung (280 pm) zu erhalten. Zusätzlich mußten die drei C-terminalen Aminosäuren, die aufgrund ihrer hohen Beweglichkeit die Kristallisation störten, entfernt werden (KABSCH et al., 1984, 1990). Das Aktinmonomer wird durch eine tiefe Spalte in die kleine Domäne und die große Domäne geteilt. Die kleine Domäne wird wiederum in die Subdomäne I mit C- und N-Terminus und die Subdomäne II mit der DNase-Bindungsschleife unterteilt. Die große Domäne besteht aus den Subdomänen III und IV (Abbildung 1). Der Boden des Spaltes wirkt wie ein Gelenk und verbindet flexibel die beiden Hälften des Proteins. Die beiden Domänen werden erst durch ein gebundenes Nukleotid, assoziiert mit einem divalenten Kation, über eine Vielzahl von Wechselwirkungen fixiert. Das Nukleotid bindet in einer hydrophoben Tasche zwischen den Subdomänen III und IV, während die Phosphatreste mit den Seitenketten der kleinen Domäne wechselwirken. Wie sich anhand der Zahl der zugänglichen Thiole verfolgen läßt, denaturiert nukleotidfreies Aktin sehr schnell (DREWES, 1991). Der Austausch von ATP gegen ADP bewirkt durch eine reversible Konformationsänderung die Freilegung von Cys 10, zusätzlich zu dem immer zugänglichen Cys 374 (DREWES & FAULSTICH, 1991). Durch die Bindung der zur Kristallisation notwendigen DNase I an die Subdomänen II und IV wird die Spalte verschlossen und der Nukleotidaustausch verhindert (HITCHCOCK, 1980). Wie der Vergleich mit zwei weiteren Strukturbestimmungen zeigt, sind die durch die Bindung verursachten Veränderungen relativ klein (MCLAUGHLIN et al., 1993 und SCHUTT et al., 1993). Die Entfernung des C-Terminus führt zu Filamenten mit stark erhöhter Flexibilität und größerer Labilität (O'DONOGHUE et al., 1992; DREWES & FAULSTICH, 1993). Dies deutet daraufhin, daß er vor allem in Aktin-Aktin-Kontakten eine Rolle spielt.



F-Aktin. Durch Erhöhung der Ionenstärke entsteht durch nichtkovalente Bindungen reversibel aus dem monomeren G-Aktin das filamentöse F-Aktin. Das linkshändige, doppelsträngige helikale Polymer besteht aus 13 Aktinmolekülen in sechs Windungen, die sich alle 36 nm wiederholen.

Sowohl elektronenmikroskopische Arbeiten, als auch das aus Faserdiffraktionsdaten und der Monomerstruktur errechnete atomare Filamentmodell zeigen, daß die wichtigsten Kontakte in longitudinaler Richtung zwischen der Subdomäne II des einen Moleküls und den Subdomänen I und III des Nachbarmoleküls bestehen (MILLIGAN et al., 1990; BREMER & AEBI, 1992; HOLMES et al. 1990 und LORENZ et al., 1993). Die Kontakte quer zur Filamentachse sind dagegen schwach. Die longitudinalen Bindungen sind dreifach stärker als die lateralen Bindungen (ERICKSON, 1989). In diesen beiden Modellen des Filaments liegt die große Domäne nahe der Filamentachse. Hier finden hauptsächlich die Aktin-Aktin-Interaktionen statt. Die kleine Domäne, mit Subdomäne I und den Bindungsstellen für Myosin und andere aktinbindende Proteine, ist nach außen orientiert und gut zugänglich (Abbildung 2).

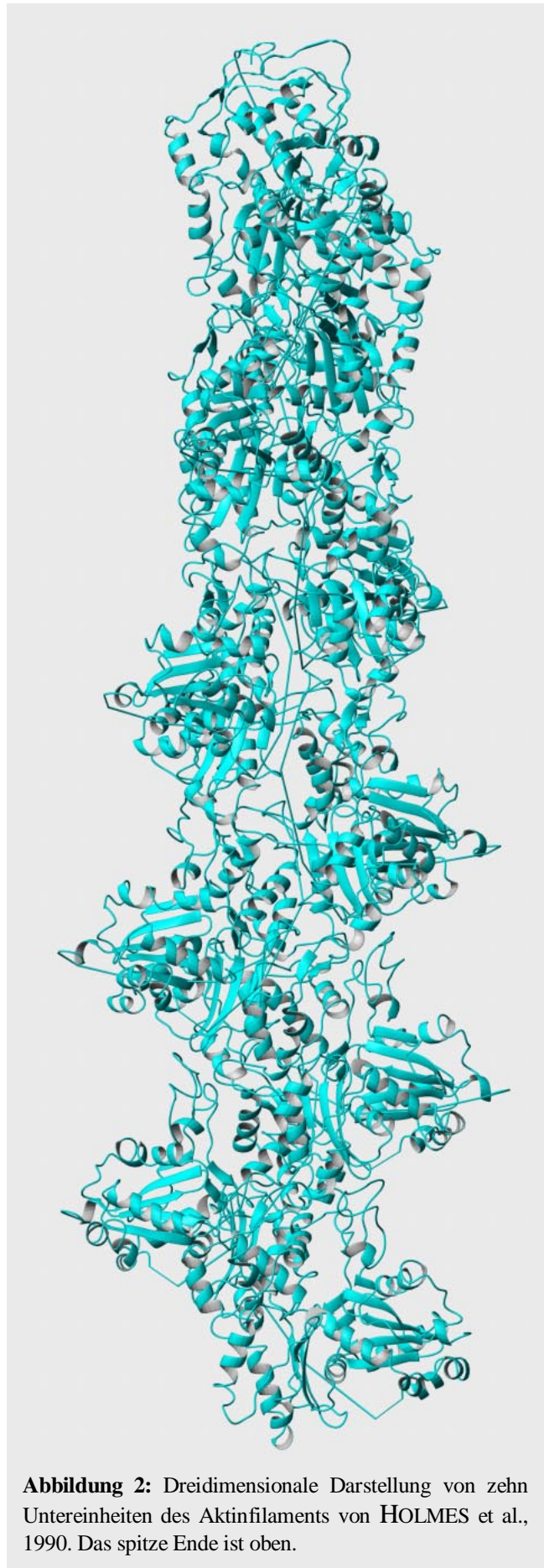


Abbildung 2: Dreidimensionale Darstellung von zehn Untereinheiten des Aktinfilaments von HOLMES et al., 1990. Das spitze Ende ist oben.

1.2.3 Liganden des Aktins

Metallionen: *In vivo* werden die Bindungsstellen für zweiwertige Ionen von Mg^{2+} und *in vitro* aufgrund der gebräuchlichen Puffersysteme meist von Ca^{2+} besetzt (KABSCH & VANDEKERCKHOVE, 1992). Die Bindung des zweiwertigen Metallions an die hochaffine Bindungsstelle ist sehr fest. Die Dissoziationskonstante liegt für ATP-Aktin bei 2 nM für Ca^{2+} und 10 nM für Mg^{2+} (GERSHMAN et al., 1986; ESTES et al., 1987). Im ADP-Aktin bindet dagegen Mg^{2+} mit 8 nM fester als Ca^{2+} mit 375 nM. Während einige Arbeiten davon ausgehen, daß das Nukleotid räumlich getrennt vom Metallion ist (BARDEN et al., 1980; NOWAK et al., 1988), sprechen neuere Arbeiten für eine gemeinsame Bindung (VALENTIN-RANC & CARLIER, 1989; KABSCH & VANDEKERCKHOVE, 1992). Hinweise für eine gemeinsame Bindung geben auch die Wechselwirkungen des einzigen in der Röntgenstruktur sichtbaren Ca^{2+} -Ions mit den Sauerstoffatomen der β - und γ -Phosphaten des Nukleotids (KABSCH et al., 1990).

Das Aktinmonomer besitzt außer dieser hochaffinen Bindungsstelle für divalente Kationen noch weitere mit Affinitäten im mikromolaren (CARLIER et al., 1986) und millimolaren Bereich (ZIMMERLE et al., 1987). An letztere können auch einwertige Metallionen binden (PAN & WARE, 1988; DREWES & FAULSTICH, 1990^a).

Die Funktion der gebundenen zweiwertigen Metallionen ist noch nicht vollständig geklärt. Es gibt mehrere Hinweise dafür, daß durch sie Konformationsänderungen induziert werden (STEINMETZ et al., 1997). ³⁷⁴AEDANS-Aktin zeigt ein stärkeres Fluoreszenzsignal in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen gegenüber Ca^{2+} -Ionen (FRIEDEN, 1982) und die proteolytische Spaltung von Aktin wird durch das divalente Ion beeinflusst (STRZELECKA-GOLASZEWSKA, 1995). Elektronenmikroskopische Arbeiten deuten ebenfalls auf strukturelle Änderungen in der Subdomäne I hin (ORLOVA & EGELMAN, 1992, 1993, 1995^{a,b}). Ob der Austausch an der hoch- oder mittelaaffinen Bindungsstelle stattfindet ist noch nicht geklärt (ESTES et al., 1987; ZIMMERLE et al., 1988^b). Die Sättigung der mittelaaffinen Bindungsstellen induziert vermutlich die Polymerisation. Die Bindung von Metallionen an Stellen niedriger Affinität scheint eine filamentstabilisierende Wirkung zu besitzen (STRZELECKA-GOLASZEWSKA et al., 1978; PAN & WARE, 1988; DREWES & FAULSTICH, 1990^a).

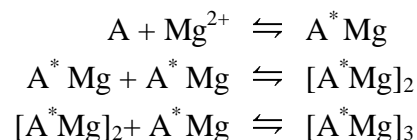
Nukleotid: In Abhängigkeit von den an die hoch- und mittelaaffinen Bindungsstellen gebundenen Metallionen binden ATP und ADP mit hoher bis mittlerer Affinität, (FRIEDEN & PATANE, 1988; NOWAK et al., 1988). ATP bindet in Gegenwart von 0,8 mM Ca^{2+} 200fach stärker als ADP ($K_D \sim 0.13$ nM) (WAECHTER & ENGEL, 1977). Unter physiologischen Bedingungen wird durch Mg^{2+} die ATP-Bindung soweit geschwächt, daß der Unterschied zwischen beiden Nukleotiden fast völlig verschwindet (WANGER & WEGNER, 1983).

1.2.4 Polymerisation von Aktin

Oberhalb einer bestimmten Monomerkonzentration, die wiederum von der Ionenstärke abhängt, lagern sich Monomere zu Polymeren unter der Spaltung des gebundenen ATPs zusammen. Der Prozeß läßt sich in die vier jeweils reversible Schritte Aktivierung, Nukleation, Elongation und Kondensation unterteilen.

Aktivierung: Die schwache Bindung von Mg^{2+} -Ionen führt zu einer Konformationsänderung wie sie auch im AEDANS-Aktin zugrunde liegt (FRIEDEN, 1983). Erst das aktivierte Aktin mit fester gebundenem Mg^{2+} -Ion ist in der Lage zu polymerisieren. Für die Existenz eines aktivierten Monomers spricht auch die Geschwindigkeitskonstante der Änderung. Sie ist identisch mit der Geschwindigkeitskonstante des ersten der beiden geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Mg^{2+} induzierten Polymerisation von Ca^{2+} -Aktin (FRIEDEN, 1982). Die Nukleations- und die Elongationsreaktion für Mg^{2+} -Aktin sind wesentlich schneller als diejenigen für Ca^{2+} -Aktin (COOPER et al., 1983; GERSHMAN et al., 1984).

Nukleation: Nuklei sind die kleinsten Oligomere, deren Elongation wahrscheinlicher als deren Zerfall ist. Durch kinetische Arbeiten mit kovalent verbrückten Di- und Trimeren wurde gezeigt, daß es sich bei den Nuklei um Aktintrimere handelt (TOBACMAN & KORN, 1982; LAL et al., 1984; FRIEDEN, 1985). Für ihre Bildung wurde folgender Mechanismus unter Berücksichtigung der Monomeraktivierung vorgeschlagen (POLLARD, 1990):



Alle Reaktionen sind stark von der Temperatur und dem pH-Wert abhängig (ZIMMERLE & FRIEDEN, 1986, 1988^b). Wegen der kurzen Lebensdauer und der geringen Konzentration der Nuklei konnten bisher nur größere Oligo- und Polymere nachgewiesen werden (MATSUDAIRA et al., 1987).

Elongation: Das Filamentwachstum wird durch die Assoziation und Dissoziation der Monomere an den Filamentenden bestimmt. An die terminalen Aktineinheiten ist entweder ATP oder ADP gebunden, so daß von mindestens acht verschiedenen Reaktionen an den beiden Enden ausgegangen werden muß (Abbildung 3, POLLARD & COOPER, 1986; KORN, 1987). Mit Myosin S1 dekorierte Aktinfilamente haben im Elektronenmikroskop ein pfeilartiges Aussehen und die Enden werden entsprechend als stumpfes (*barbed*) und spitzes (*pointed*) Ende bezeichnet. Die Assoziation am schneller wachsenden stumpfen Ende ist diffusionskontrolliert

(DRENCKHAHN & POLLARD, 1986). Die Nukleotidzusammensetzung (ADP, ADP.P_i, ATP) in den terminalen Untereinheiten beeinflusst ebenfalls die Elongationsgeschwindigkeit (PANTALONI et al., 1985; CARLIER, 1988, 1989). Der langsame Prozeß der Dissoziation ist auch vom gebundenen Nukleotid abhängig. Die ATP-Untereinheiten am stumpfen Ende dissoziieren langsamer als die ADP-Untereinheiten, während für das spitze Ende das Gegenteil zutrifft. Für die Längenänderung an jedem Filamentende gilt:

$$\frac{dl}{dt} = k_+ A - k_-$$

Die Filamentlänge bleibt konstant mit $k_+[A]=k_-$. Diese Konzentration von A wird kritische Konzentration (c_{krit}) genannt. Für die beiden Filamentenden ist c_{krit} verschieden und im Gleichgewicht wandern die Untereinheiten durch das Filament. Bei diesem sogenannten „Tretmühlenprozeß“ (*tread-milling*) dissoziieren die Untereinheiten vom spitzen Ende und assoziieren am stumpfen Ende.

Fragmentierung und Kondensation:

Aktinfilamente können spontan oder durch Ultraschall fragmentieren (CARLIER, 1984; HITCHCOCK-DEGREGORI, 1988). Im Elektronenmikroskop konnte die Aneinanderreihung kurzer Filamente beobachtet werden (MURPHY et al., 1988). Die Kondensationsrate ist direkt nach einer Ultraschallbehandlung am höchsten und nimmt mit wachsender Filamentlänge durch die eingeschränkte Beweglichkeit stark ab.

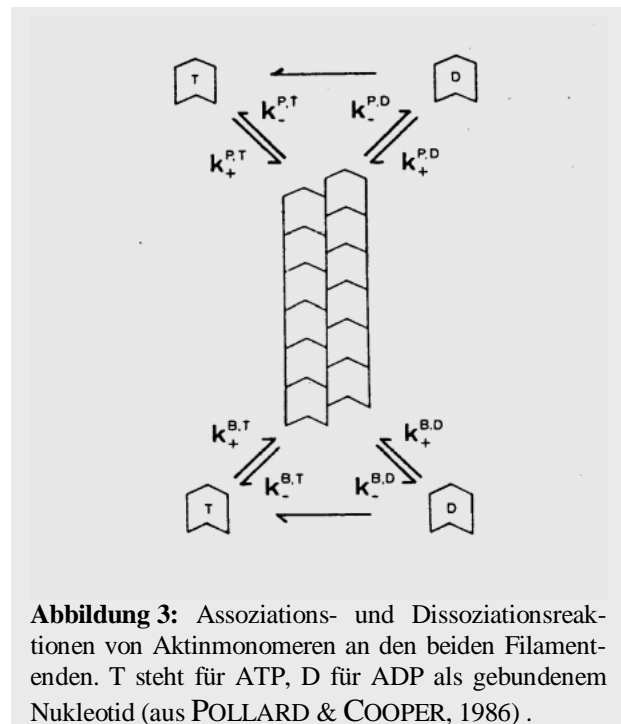


Abbildung 3: Assoziations- und Dissoziationsreaktionen von Aktinmonomeren an den beiden Filamentenden. T steht für ATP, D für ADP als gebundenem Nukleotid (aus POLLARD & COOPER, 1986).

Nukleotidhydrolyse: Das vom Aktin gebundene ATP wird während des Polymerisationsprozesses gespalten (STRAUB & FEUER, 1950). Für die Polymerisation ist die Hydrolyse jedoch nicht zwingend notwendig, wie die Polymerisation von ADP-Aktin oder nukleotidfreiem Aktin zeigt (POLLARD, 1986). Am wachsenden Filamentende befindet sich eine „Kappe“ (*ATP-cap*) von ATP-Untereinheiten, da die Hydrolyse zeitverzögert zum Monomereinbau stattfindet (CARLIER et al., 1984; KORN, 1985, CARLIER, 1988, 1989). Die irreversible Hydrolyse des ATP ist mit $0,01 \text{ s}^{-1}$ relativ langsam (POLLARD & WEEDS, 1984). Gegenüber der Hydrolyse ist die anschließende Dissoziation des abgespaltenen Orthophosphats

10fach verlangsamt und besitzt eine Dissoziationskonstante im millimolaren Bereich (RICKARD & SHETERLINE, 1986). Die ATP-Hydrolyse scheint die Stabilität und Dynamik der Filamente zu regulieren, indem terminales ADP-Aktin bei Bedarf schnell zu Monomeren depolymerisiert wird (CARLIER, 1989).

1.2.5 Aktinbindende Toxine

Phallotoxine: Diese Gruppe von bizyklischen Heptapeptiden aus dem grünen Knollenblätterpilz *Amanita Phalloides* bildet sehr feste Komplexe mit polymerem Aktin ($K_D \sim 3 \times 10^{-8} \text{ M}$) (WIELAND & FAULSTICH, 1978; FAULSTICH et al., 1977). Phalloidin unterdrückt die Dissoziation von Untereinheiten an beiden Filamentenden fast völlig und verringert dadurch die kritische Konzentration für die Polymerisation, die je nach Bedingungen um das 10-30fache herabgesetzt wird (ESTES et al., 1981).

Phalloidin verbindet jeweils zwei Aktinuntereinheiten. Mit einem photolabilen Phalloidinderivat konnte gezeigt werden, daß Phalloidin dabei an die Aminosäuren Glu 117 und Met 119 des einen Aktins sowie Met 335 des benachbarten Aktins bindet (VANDEKERCKHOVE et al., 1985). Bereits bei einem Aktin/Phalloidin-Verhältnis von 3:1 wird die vollständige stabilisierende Wirkung erreicht (WIELAND et al., 1975; DANCKER et al. 1975; MIYAMOTO et al., 1986).

Fluoreszierende Phalloidinderivate werden zur Lokalisierung von polymerem Aktin in Zellen eingesetzt (FAULSTICH et al. 1988) und ermöglichen *in vitro* die Beobachtung sich bewegender Aktinfilamente (YANAGIDA et al., 1984).

1.2.6 Chemische Modifizierung von Aktin

Die chemische Modifizierung bestimmter Aminosäuren des Aktins ermöglicht die Einführung von Reportermolekülen, wie z. B. ^{19}F -NMR Sonden (BARDEN et al., 1989; KALBITZER et al., 1991^a), verschiedener Spinlabel (SLEIGH & BURLEY, 1973; OSTAP & THOMAS, 1991) und fluoreszierender Gruppen (DETMERS et al., 1981; KOUYAMA & MIHASHI, 1981; TAIT & FRIEDEN, 1982^a; HOUMEIDA et al., 1992). Diese Reportermoleküle ermöglichen die Verfolgung von Polymerisationskinetiken (COOPER et al., 1983), Entfernungsbestimmungen unter verschiedenen Bedingungen mittels FRET-Messungen (MIKI et al., 1986; KASPRZAK et al., 1989) oder die Lokalisierung der Bindungsstellen von aktinbindenden Proteinen und die Abschätzung von deren Affinität (BETTACHE et al., 1990; HOUMEIDA et al., 1992).

Die meisten Derivatisierungen wurden aufgrund der guten Zugänglichkeit an Cys 374 durchgeführt. An Cys 374 kovalent gebundene Reportergruppen sind sehr sensible Polymerisationsindikatoren. Zusätzlich ist diese Position ideal für Untersuchungen mit

aktinbindenden Proteinen, deren Bindungsstellen bevorzugt in Subdomäne I liegen. Bisher wurde nur für ein Protein, Profilin, ein starker Abfall der Affinität durch die Derivatisierung von Cys 374 beobachtet (LAL & KORN, 1985).

Ein weiteres Ziel der chemischen Derivatisierung von Aktin ist die Herstellung eines nativen aber unpolymerisierbaren Monomers zur Kristallisation (HEGYI et al., 1974; CHANTLER & GRATZER, 1984; BENDER et al., 1976; BETTACHE al., 1989). Die meisten dieser Derivate zeigten nur eine stark erhöhte kritische Konzentration (BETTACHE et al., 1990) und polymerisierten in Gegenwart von Phalloidin (MIKI et al., 1987; MIKI, 1987, 1988). Von den wenigen unpolymerisierbaren Aktinderivaten (BURTNICK, 1984) kristallisierte bisher noch keine und es ist weiterhin nicht bewiesen, daß das Protein dabei noch nativ vorlag.

In dieser Arbeit wurde die Zugänglichkeit von Cys 374 und Cys 10 dazu benutzt, um eine NMR-spektroskopisch sensitive ¹⁹F-Markierung an die beiden Termini des Aktins einzuführen.

1.2.7 Diffusion von G- und F-Aktin

Für G-Aktin erwartet man das Verhalten eines globulären Proteins in wässriger Lösung. Der Diffusionskoeffizient ist abhängig von dem Reibungskoeffizienten und damit direkt von der Masse und Form des Moleküls, sowie der Viskosität des Lösungsmittels.

Die Diffusion von filamentösem F-Aktin ist konzentrationsabhängig. Aufgrund einer Mindestlänge von ungefähr $1,8 \mu\text{m}$ und einer durchschnittlichen Länge von $22 \mu\text{m}$ (KÄS et al., 1996) eignet sich mit Phalloidin stabilisiertes F-Aktin auch für Dynamikstudien von semiflexiblen Polymeren. In sehr verdünnten Lösungen von circa $4,8 \text{ nM}$ zeigt das Aktin keine zwischenfilamentäre Wechselwirkungen. Zusätzlich zur Diffusion ist noch eine Wellenbewegung der Filamente beobachtbar. Bei Konzentrationen oberhalb $33 \mu\text{M}$ kommen sterische Interaktionen zu benachbarten Filamenten hinzu. Durch die benachbarten Filamente wird die Wellenbewegung eingeschränkt und das betrachtete Filament befindet sich in einer virtuellen Röhre. Die Diffusion findet in diesen Lösungen hauptsächlich entlang der Filamentachse statt (Reptation). Der Diffusionskoeffizient D_{\parallel} entlang der Röhre verringert sich mit wachsender Kettenlänge. Für Konzentrationen $> 60 \mu\text{M}$ findet ein Übergang von isotropen Knäueln zu der Koexistenz von isotropen Knäueln und nematischen Domänen statt. Die Filamente in den isotropen und den geordneten Bereichen stehen hierbei in einem thermodynamischen Gleichgewicht. In den nematischen Phasen wird der Diffusionskoeffizient D_{\parallel} fast unabhängig von der Filamentlänge.

1.3 MYOSIN

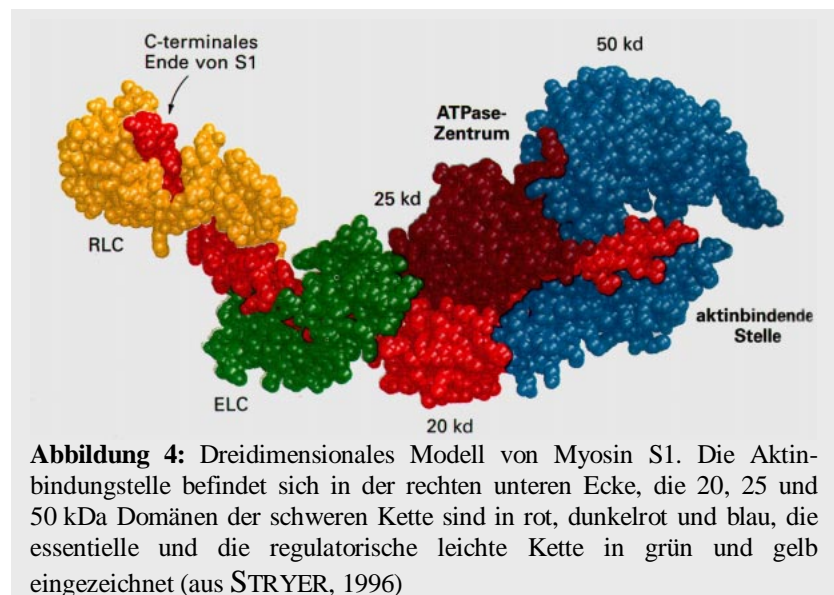
Die Myosine bilden eine große Familie von Motorproteinen, die durch die Spaltung von ATP in Gegenwart von filamentösem Aktin gerichtete Bewegung erzeugen können. Die ATPase-Aktivität der Myosine ist produktinhibiert und wird erst durch die Interaktion mit filamentösem Aktin bis zum 100fachen erhöht. Die allen Myosinen gemeinsame globuläre Motordomäne (Subfragment 1 bzw. S1) am N-Terminus der schweren Kette ist hochkonserviert und enthält sowohl die aktinbindende Region als auch die ATP-Bindungsstelle. Im weiteren Verlauf bildet die schwere Kette die zweite funktionelle Domäne des Myosins aus. Die Halsregion besteht aus einer α -helikalen Struktur und wird durch die Bindung der leichten Ketten oder Calmodulin stabilisiert. Sie dient als Hebel zur Verlängerung der Motordomäne und bei einigen Myosinen auch zur Regulierung der ATP-Aktivität. Die größten sequentiellen und funktionellen Unterschiede zwischen den Myosinen findet man in der Schaftregion. Ursprünglich wurde zwischen konventionellen Myosinen bzw. Muskelmyosinen und unkonventionellen Myosinen bzw. Nichtmuskelmyosinen unterschieden. Die Schaftregionen zweier Muskelmyosine bilden eine doppelsträngige α -helikale Superhelix (*coiled-coil*-Struktur) aus. Bei niedrigen Ionenstärken lagern sich die Dimere zu dicken Filamenten zusammen. Die Nichtmuskelmyosine können keine dicken Filamente bilden und werden über die Phosphorylierung ihrer leichten Ketten reguliert. Diese unkonventionellen Myosine befinden sich zusammen mit Aktin in der Zelle und sind als Motorproteine an Transportprozessen und der Dynamik des Cytoskeletts beteiligt (ADAMS & POLLARD, 1986; KUZNETZOV et al., 1992; CONRAD et al., 1993). Durch die Entdeckung immer neuer Mitglieder dieser Gruppe wird inzwischen eine Einteilung in 11 verschiedene Myosinklassen vorgenommen (MOOSEKER & CHENEY, 1995).

1.3.1 Muskelmyosin

Konventionelles Myosin ist ein sehr großes Molekül (520 kD). Es besteht aus zwei identischen schweren Ketten und vier leichten Ketten (LOWEY et al., 1969). Die Motordomänen lassen sich mit voller katalytischer und aktinbindender Aktivität durch begrenzte Proteolyse des Gesamtmoleküls erhalten. Die Kristallisation des Myosin S1 wurde aufgrund der hohen Beweglichkeit erschwert und gelang erst nach reduktiver Methylierung der Lysinreste (RAYMENT et al., 1993^a). Die Proteinstrukturen der verschiedenen Hydrolysezustände wurden mit ATP-Analoga wie Mg.PP_i, ADP.BeF_x, ADP.AlF₄ und ADP.VO₄³⁻ im Kristall stabilisiert (FISHER et al, 1995^b, SMITH et al., 1996).

Myosin S1 ist ein unsymmetrisches Protein und wird durch begrenzte Proteolyse in drei weitere Fragmente gespalten: die N-terminale 25 kD Region, die zentrale 50 kD Region und die C-terminale 20 kD Region (Abbildung 4). Die Nukleotidbindungsstelle ist in der 25 kD Region

lokalisiert und akzeptiert Trinukleotide in der Reihenfolge ATP > CTP > UTP > ITP > GTP für die Erzeugung der Bewegung. Die Kristallstruktur zeigt entsprechend wenige Wechselwirkungen zwischen der Base und dem Protein. Im Gegensatz dazu sind starke Wechselwirkungen vom Protein zu dem α - und β -Phosphat sowie dem Analogon des γ -Phosphats erkennbar (RAYMENT, 1996). Die zentrale 50 kD Region wird durch eine große Spalte in die obere und untere 50 kD Domäne geteilt. Die Spalte erstreckt sich von der Nukleotidbindungsstelle bis zur aktinbindenden Region. Es wird vermutet, daß die Bewegung der beiden Regionen relativ zueinander der Kommunikationsweg von der aktinbindenden Region zur Nukleotidbindungsstelle während des kontraktiven Zyklus ist (RAYMENT et al., 1993^b). Ein ungewöhnliches Strukturelement in der C-terminalen 20 kD Region ist die 8,5 nm lange α -Helix, die die Halsregion von Myosin S1 bildet. Die essentielle leichte Kette und die regulatorische leichte Kette binden an diese α -Helix und stabilisieren sie.



1.3.2 Temperaturabhängigkeit der Ordnung der Myosinköpfe im isolierten dicken Filament

Unabhängig voneinander machten WRAY (1987) und WAKABAYASHI et al. (1988) an lebenden Muskelfasern bei röntgenstrukturellen Untersuchungen am Kaninchenpsoas die Beobachtung, daß die Ordnung der Myosinköpfe im dicken Filament von der Temperatur abhängig ist. Bei Temperaturen über 293 K liegen die Myosinköpfe helikal geordnet am Filamentschaft an, bei Temperaturen um 276 K stehen sie ungeordnet vom Filamentschaft ab. Beide Autoren vermuteten einen Zusammenhang zwischen der temperaturabhängigen Verteilung der Nukleotidbesetzung im Fließgleichgewicht der ATP-Hydrolyse und der globalen Konformation des Myosins. WRAY postulierte, daß bei 0 °C der ungeordnete M.ATP-Zustand und bei 20 °C der geordnete M.ADP.P_i-Zustand bevorzugt ist. SCHRUMPF (1995) zeigte in elektronenmikroskopischen Arbeiten mit isolierten dicken Filamenten, daß die Ordnung der Myosinköpfe nicht nur von der Temperatur, sondern auch vom gebundenen Nukleotid abhängig ist.

1.3.3 Temperaturabhängigkeit der Myosin S1 Konformation

Die Kristallstrukturen von Myosin S1 zeigen je nach gebundenen ATP-Analoga (ADP.VO₄³⁻, ADP.AIF₄ usw.) Unterschiede in der ATP-Bindungsstelle und in der Halsregion (RAYMENT et al., 1993^{a,b}; FISHER et al., 1995^b; SMITH & Rayment, 1996). Diese Konformationen werden den verschiedenen Hydrolysezuständen zugeordnet. Frühere Arbeiten belegen, daß diese Konformationen koexistent sind und die Populationen sich durch die Temperatur beeinflussen lassen (SHRIVER & SYKES, 1981^{a,b}; HIGHSMITH et al., 1993; TANOKURA & EBASHI, 1993).

1.3.4 Muskelkontraktion

Die heute allgemein anerkannte Vorstellung für die Muskelkontraktion ist das Gleitfilament-Modell (*sliding-filament*). Die dünnen und dicken Filamente gleiten durch die Wechselwirkung der Myosinköpfe mit dem Aktin aneinander vorbei, ohne sich selbst zu verkürzen. Durch die Kombination der Röntgenstrukturen mit cryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen des Rigorkomplexes wurde ein Modell für den mehrstufigen Interaktionszyklus der Myosinköpfe mit filamentärem Aktin unter ATP-Hydrolyse entwickelt (RAYMENT et al., 1993^b). In diesem Modell bindet Myosin S1 in einem 45° Winkel tangential zum Aktinfilament. Die ATP-Bindungsstelle befindet sich dabei auf der entgegengesetzten Seite des Myosin S1-Kopfes in einer Entfernung von 4-6 nm. Im Rigorkomplex (Abbildung 5A und Abbildung 6) ist Myosin S1 fest und stereospezifisch an das Aktinfilament gebunden. Die Spalte zwischen oberer und unterer 50 kD Domäne ist geschlossen und die freie Nukleotidbindungsstelle ist geöffnet. Die anschließende ATP-Bindung ist ein zweistufiger Prozeß. Durch die Bindung wird

zuerst eine Konformationsänderung induziert und die Spalte öffnet sich. Dadurch wird die Affinität zu Aktin verringert und ermöglicht die Dissoziation von Aktin und Myosin (Abbildung 5B). Während ATP fester gebunden wird, schließt sich die Nukleotidbindungstasche und die anschließende ATP-Hydrolyse führt zu einem metastabilen Zustand (Abbildung 5C), in dem die Hydrolyseprodukte gebunden bleiben. Während dieser weiteren Konformationsänderung bewegt sich der C-Terminus relativ zur Aktinbindungsstelle um 5 nm. Die Bindung des Myosin-Produkt-Komplexes an Aktin erfolgt in einem mehrstufigen Prozeß an eine andere Aktinuntereinheit im Filament. Nach den ersten schwachen elektrostatischen Wechselwirkungen folgen stärkere stereospezifische Interaktionen mit der unteren 50 kD Region während sich die Spalte schließt. Die geschlossene Spalte ermöglicht die Freisetzung des Phosphats, wodurch der „Kraftschlag“ ausgelöst wird und dem Myosin S1 die Rückkehr in seine frühere Konformation erlaubt (Abbildung 5D). Die Öffnung der Nukleotidbindungsstelle und Dissoziation von ADP (Abbildung 5E) führen zur Rückkehr des Komplexes in den Rigorzustand.

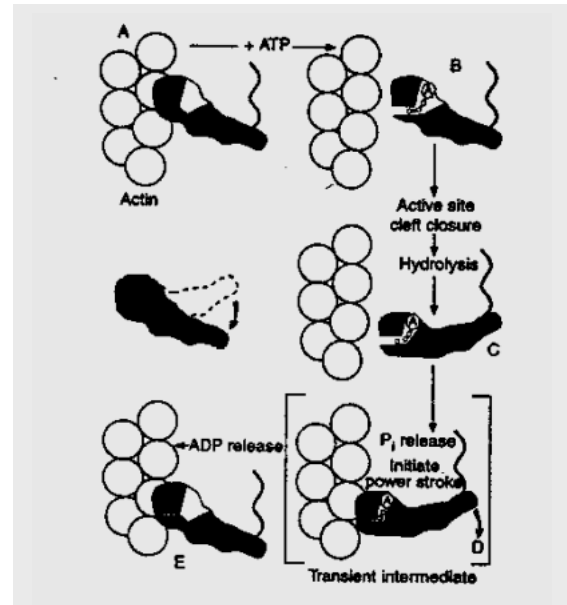


Abbildung 5: Modell der Aktomyosin-Wechselwirkung während der Muskelkontraktion, basierend auf den strukturellen Merkmalen des Myosin S1. (aus RAYMENT et al., 1993^b)

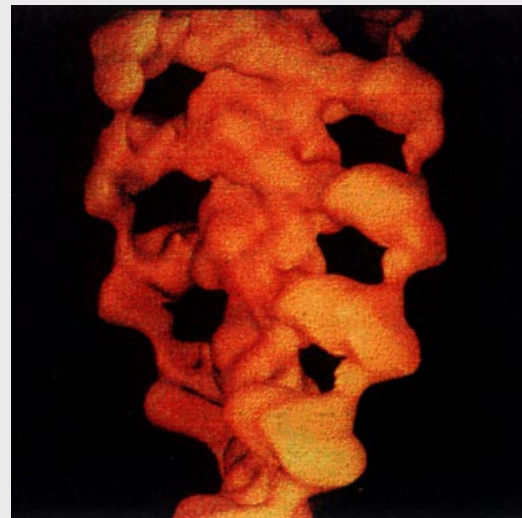


Abbildung 6: Oberflächenmodell von *Dictyostelium* S1 dekoriertem Muskelaktin. (aus SCHRÖDER et al., 1993)

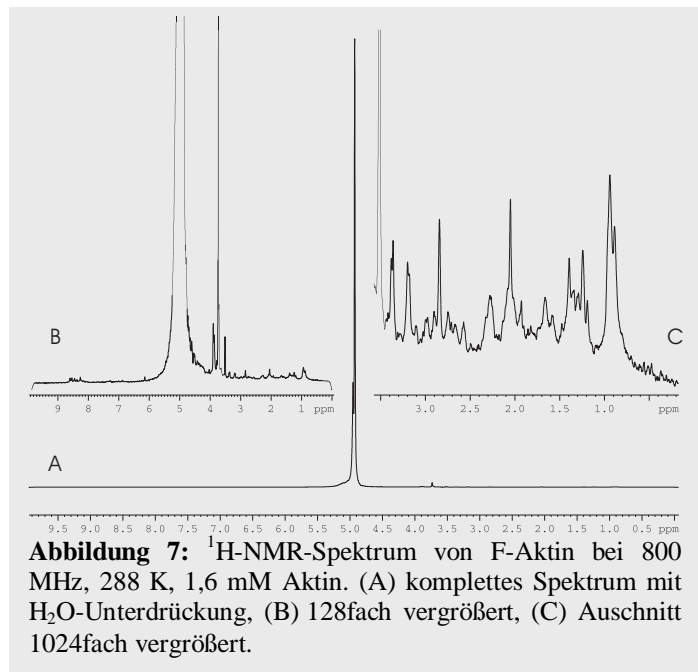
2 Methodische Grundlagen

2.1 NMR-Spektroskopie

Das einfachste (1D) NMR-Experiment besteht aus der Pulsfolge :

Präparation – Detektion (t_1)

Das ^1H -NMR Spektrum in Abbildung 7 ist das Ergebnis dieses Experiments. Man erzeugt mit einem sehr kurzem ($\sim 10 \mu\text{s}$) Radiofrequenzpuls (RF-Puls) mit der Resonanzfrequenz des beobachteten Kerns im \mathbf{B}_0 -Feld des Spektrometers die Transversal- oder Quermagnetisierung (Präparation). Nach dem RF-Puls wird der Empfänger für 100 bis 1000 ms eingeschaltet. Das Signal des Zerfalls der Quermagnetisierung (FID, *free induction decay*) wird detektiert, digitalisiert und abgespeichert. Die Signale in der Zeitdomäne werden durch Fouriertransformation in Signale der Frequenzdomäne umgewandelt. Nachdem das System sich wieder im Gleichgewicht befindet, wiederholt man die Puls-Detektionssequenz (*scan*) und addiert die FIDs auf. Für das eindimensionale Spektrum in Abbildung 7 wurden 40 *scans* in ungefähr 2 Minuten aufaddiert.



Will man die Informationen, die ein 1D NMR Spektrum enthält, auf zwei Dimensionen verteilen, fügt man zwischen der Präparationsphase und der Detektionsphase noch eine Evolutionsphase und eine Mischungsphase ein:

Präparation – Evolution (t_1) – Mischung – Detektion (t_2)

Die Präparationsphase besteht meistens aus einem 90° -Puls (RF-Puls), der die Transversalmagnetisierung erzeugt. Im Verlauf der Evolutionsphase mit der variablen Zeit t_1 entwickeln sich die Kohärenzen, die in der nicht immer notwendigen Mischphase durch einen weiteren RF-Puls miteinander gekoppelt und in die detektierbare Transversalmagnetisierung umgewandelt werden. Die Zeitdauer t_1 wird von Experiment zu Experiment um einen konstanten

Betrag inkrementiert. Eine Serie von FIDs, die nach diesem Schema aufgenommen wurden, enthält Informationen über die chemische Verschiebung aus der t_2 -Phase sowie Informationen über die Kohärenzen, die sich während der Evolutionsphase entwickelt haben. Die unabhängige Fouriertransformation des Datensatzes nach den beiden Zeitvariablen (t_1 , t_2) ergibt dann ein zweidimensionales Frequenzspektrum. Das 2D-Experiment enthält bereits die grundlegenden Elemente der mehrdimensionalen Spektroskopie. Durch die Kombination von weiteren Pulsen Evolutionsphasen sind dreidimensionale und n-dimensionale Experimente zugänglich.

Die auf der Diagonalen liegenden Signale besitzen zwei gleiche chemische Verschiebungen und enthalten dieselben Informationen wie ein 1D-Spektrum. Die Signale neben der Diagonalen werden als Kreuzsignale (*cross peaks*) bezeichnet und liefern die Korrelationen zwischen den koppelnden Kernen.

Skalare Kopplung

Die Polarisation der Kernspins wird im Fall der skalaren Kopplung (auch Spin-Spin-Kopplung oder J-Kopplung) durch die Bindungselektronenpaare übertragen. In diesem über die Bindungselektronen gekoppelten System ist die Energie der einzelnen Zustände von der Ausrichtung aller koppelnden Kerne abhängig und führt zu einer Aufspaltung der Energieniveaus. Die daraus resultierenden Unterschiede in den Resonanzfrequenzen führen zu mehreren Resonanzlinien (Dublett, Triplett usw.). Die J-Kopplung ist von Größe und Richtung des äußeren Magnetfeldes \mathbf{B}_0 unabhängig und wird als Spin-Spin-Kopplungskonstante J in Hertz (Hz) gemessen. Mit zunehmender Anzahl von Bindungen zwischen den koppelnden Kernen wird die J-Kopplung immer schwächer und ist für mehr als drei Bindungen normalerweise nicht mehr meßbar.

Dipolare Kopplung

Bei der dipolaren Kopplung wechselwirken zwei benachbarte Kernspins durch den Raum miteinander. Zusätzlich zum äußeren Magnetfeld \mathbf{B}_0 induzieren die beiden magnetischen Dipole der Kerne gegenseitig ein lokales Magnetfeld \mathbf{B}_{loc} . Die magnetische Dipolkopplung nimmt mit der dritten Potenz des Abstandes zwischen den beiden Dipolen ab und ist anisotrop.

Bei NMR-Messungen in Lösung führt die Brownsche Molekularbewegung zu einer schnellen Umorientierung der Moleküle relativ zur Feldrichtung und mittelt die dipolare Wechselwirkung heraus.

Dipolare Relaxation

Aufgrund der Translation, Rotation und Vibration der benachbarten Moleküle stellt die dipolare Kopplung auch den Hauptrelaxationsweg der Magnetisierung dar. Durch die Änderung der Orientierung der Moleküle zum äußeren Magnetfeld wird ein fluktuierendes lokales Magnetfeld am Ort des Kernspins erzeugt.

Kern-Overhauser-Effekt

Der Kern-Overhauser-Effekt (*nuclear Overhauser effect*, NOE) beruht ebenfalls auf der dipolaren Kopplung. Wird ein System aus gekoppelten Dipolen gestört, relaxiert es über den dipolaren Mechanismus. Die Veränderung der Populationen in einem Subsystem führt zu Polarisationsänderungen bei dem gekoppelten Kern und dadurch zu einer veränderten Intensität seiner Resonanzlinie. Wie die dipolare Kopplung ist der Kern-Overhauser-Effekt stark vom Abstand der wechselwirkenden Kernspins abhängig ($\text{NOE} \propto r^{-6}$). Diese Eigenschaft wird bei der Strukturbestimmung zur Bestimmung der atomaren Abstände genutzt.

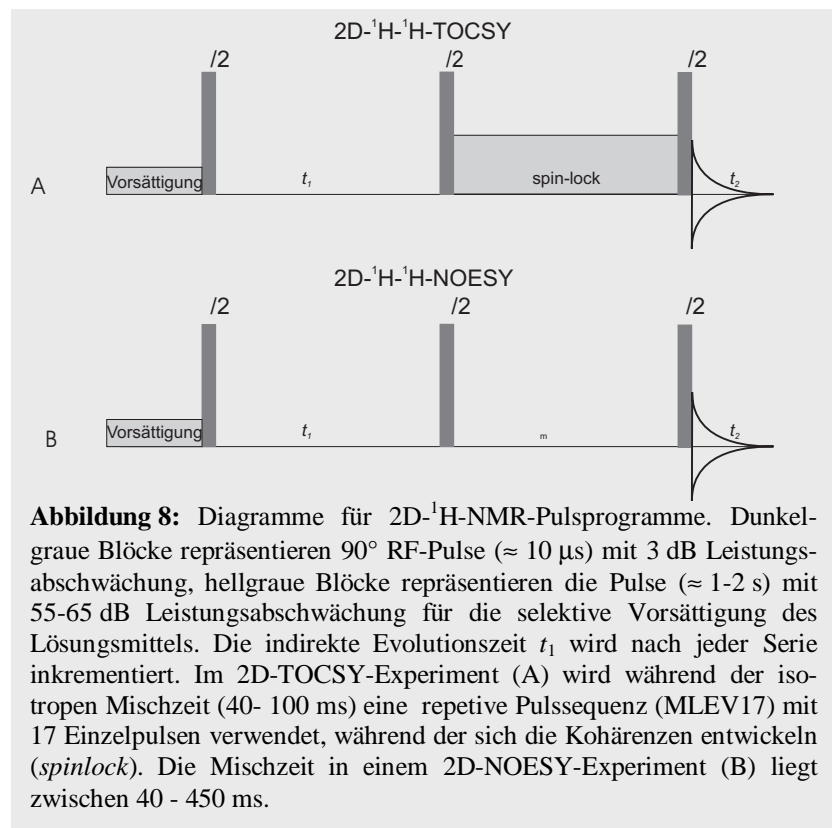
2D-TOCSY

Die Korrelationen bei dem TOCSY-Experiment basieren auf dem Magnetisierungstransfer durch skalare Wechselwirkungen, die man auch als Kreuzpolarisation (*cross-polarization*) bezeichnet. Durch das *spin-lock*-Feld im TOCSY-Experiment bildet jede Aminosäure ein isoliertes, stark J-gekoppeltes Spinsystem. Im homonuklearen TOCSY-Spektrum zeigt jedes Proton ein Kreuzsignal mit jedem anderen Proton. Nach der Präparation wird die Magnetisierung von Kern A auf Kern B übertragen. Von Kern B wird dann die Magnetisierung auf Kern C und zum Teil zurück auf Kern A übertragen. Je nach Länge der Mischzeit (50 – 100 ms) hat sich dann die zu Beginn vorhandene Magnetisierung der Kerne verteilt. Das Pulsprogramm des TOCSY-Experiments ist in Abbildung 8A dargestellt.

2D NOESY

Der Kern Overhauser Effekt wird im NOESY-Spektrum genutzt, um Korrelationen zwischen räumlich benachbarten, dipolar gekoppelten Kernen zu erhalten. Den Austausch der koppelnden Spins bezeichnet man als Kreuzrelaxation. Durch die Abstandsabhängigkeit der Relaxationsrate (r^{-6}) wechselwirken nur Kerne miteinander, die nicht weiter als etwa 0,5 nm entfernt sind. Die Kreuzsignale des NOESY-Spektrums (NOE) liefern Informationen über die in der Primärstruktur (sequentielle NOEs), in der Sekundärstruktur (sequentielle, mittel- und

langreichweitige NOEs) und in der Tertiärstruktur (langreichweitige NOEs) benachbarten Aminosäuren. Das Pulsprogramm des NOESY-Experiments ist in Abbildung 8B dargestellt.



2.2 Bestimmung der Diffusionskoeffizienten von Aktin und Modellproteinen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Diffusionsmessungen mittels NMR-Spektroskopie an Aktin und Modellproteinen durchgeführt. Hierzu wurde eine modifizierte Spin-Echo-Pulsfolge mit linearen Feldgradientenpulsen benutzt. Das Ziel dieser Experimente war es, aus dem Verhältnis der gemessenen Diffusionskoeffizienten des Aktins bzw. der Proteine auf deren relative Molekulargewichte zu schließen. Diese Methode hat gegenüber anderen Verfahren zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten oder Molekulargewichten den Vorteil, daß die zur Struktur- und Funktionsbestimmung eines biologischen Makromoleküls benötigten NMR-Experimente und die Diffusionsmessungen kombiniert und unter identischen Meßbedingungen mit geringem zeitlichem Aufwand durchgeführt werden können.

2.2.1 Die Diffusion

Die Diffusion als Transportphänomen wurde ursprünglich von einem makroskopischen Standpunkt aus beschrieben. Dabei werden Systeme betrachtet, die sich nicht im Gleichgewicht befinden und die räumlich inhomogen verteilte Größe durch gerichteten Transport eine Herstellung des Gleichgewichts anstrebt. Liegen in einer Flüssigkeit ortsabhängige Konzentrationsunterschiede vor, so führt die Diffusion zu einem Fluß von Teilchen in Richtung des Konzentrationsgefälles. Die Teilchenstromdichte \vec{j} wird durch den Diffusionskoeffizienten D und das Konzentrationsgefälle beschrieben. Die Abhängigkeit der Diffusionsflußdichte $\vec{j}(\vec{r}, t)$ vom Gradienten der Konzentration $c(\vec{r}, t)$ beschreibt das 1. Ficksche Gesetz.

$$\vec{j}(\vec{r}, t) = -D \cdot \vec{\nabla} c(\vec{r}, t). \quad (1)$$

Die thermische Molekularbewegung führt zu häufigen Stößen zwischen den Molekülen und stellt die eigentliche Ursache der Diffusion dar. Der Diffusionskoeffizient D hängt mit den dynamischen Eigenschaften des Moleküls über

$$\sigma^2 = 2Dt = \frac{2}{3} vlt \quad (2)$$

zusammen. Hierbei ist σ die gemittelte Molekülverschiebung, v die mittlere thermische Geschwindigkeit und l die mittlere freie Weglänge. Der Zusammenhang zwischen Diffusionskoeffizient D und Molekulargewicht M_r ergibt sich über den Reibungskoeffizienten der Translation f mit Hilfe der Stokes-Einstein Beziehung

$$D = \frac{kT}{f}. \quad (3)$$

Für sphärische Körper wie globuläre Proteine folgt mit dem Reibungskoeffizient f in Flüssigkeit mit der Viskosität η

$$f = 6 \pi \eta r \quad \text{Stokessche Gleichung} \quad (4)$$

die Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten D vom (Stokesschen) Radius r

$$D = \frac{kT}{6 \pi \eta r}. \quad (5)$$

Unter der Annahme, daß die Masse des Moleküls proportional zu dessen Volumen ist, ergibt sich die Proportionalität zwischen Diffusionskoeffizient und molarer Masse zu

$$D \propto \frac{T}{\eta r} \propto \frac{T}{\eta^3 \sqrt{V}} \propto \frac{T}{\eta^3 \sqrt{M_r}}. \quad (6)$$

Die molare Masse beliebiger Proteine kann anhand von Referenzproteinen mit Hilfe der Diffusionskoeffizienten durch

$$M_{r_2} = \left(\frac{D_1}{D_2} \right)^3 \cdot M_{r_1} \quad (7)$$

berechnet werden.

2.2.2 Diffusionsmessungen mittels NMR-Spektroskopie

Einfluß eines inhomogenen Magnetfeldes auf die Magnetisierung der Kernspins

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Magnetfeldinhomogenitäten zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten gewählt. Dem homogenen, statischen Zeemanfeld \mathbf{B}_0 wird in z-Richtung ein inhomogenes Magnetfeld $\Delta B(r,t)$ überlagert. Dieses Magnetfeld wird durch einen linearen Feldgradienten mit Amplitude G entlang der z-Achse erzeugt und ist axialsymmetrisch um die z-Achse. Bei gepulsten, linearen Feldgradienten kann die Amplitude gemäß einer beliebigen Funktion $f(t)$ zeitlich moduliert werden. Dadurch sind die einzelnen Spins in Abhängigkeit ihrer z-Koordinate jeweils einem anderen Magnetfeld zur Zeit t ausgesetzt und beginnen entsprechend ihrer lokalen Abweichung vom eigentlichen Zeemanfeld \mathbf{B}_0 mit unterschiedlichen Winkelgeschwindigkeiten zu präzedieren. Die transversalen Magnetisierungen der Spinpakete fächern auf und addieren sich vektoriell zu einer zerfallenden Gesamtmagnetisierung. Die beobachtete Signalabschwächung ist umso stärker, je länger die Spins unter dem Einfluß von $\Delta B_z(z,t)$ präzedieren und je größer die Gradientenamplitude ist.

Refokussierung der durch statische Feldgradienten verursachten Dephasierung mittels Spin-Echo

Die Auffächerung der Magnetisierung infolge einer statischen Magnetfeldinhomogenität ist ein reversibler Prozeß und kann durch eine geeignete HF-Impulsfolge refokussiert werden, wenn keine Diffusion vorliegt.

Ein 180° -Puls zur Zeit τ setzt die Phasen aller Spinpakete zweimal um den Betrag zurück, den diese zum Zeitpunkt τ aufweisen (Abbildung 9). Im folgenden Zeitintervall von τ bis 2τ

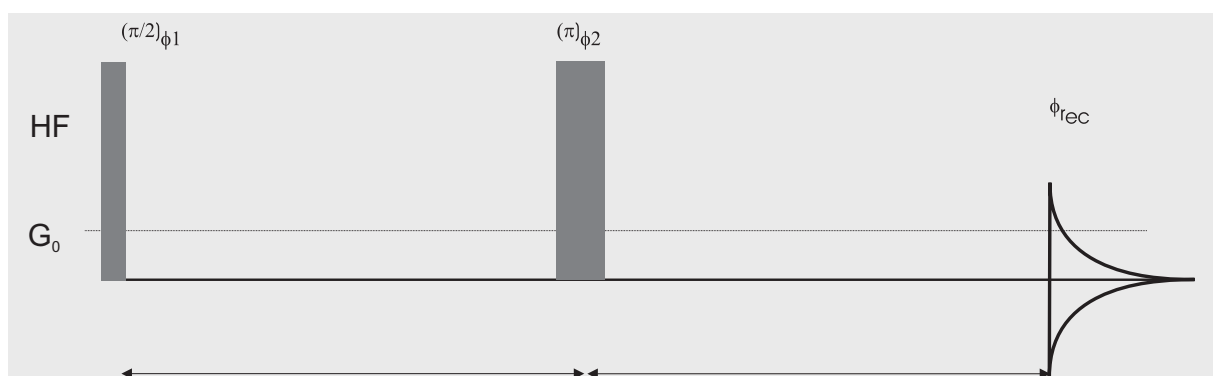


Abbildung 9: Mittels einer Spin-Echo-Pulsfolge kann die durch einen statischen Feldgradienten G_0 hervorgerufene Dephasierung rephasiert werden. Der 180° -Puls zur Zeit τ führt zu einem Spinecho zum Zeitpunkt 2τ .

erhalten alle Spins denselben Phasenwinkel wie im Intervall von 0 bis τ . Die im Laufe einer Pulssequenz aufgenommenen Phasen eines Spinpakets kompensieren sich. Abgesehen von T_2 -Effekten weist das beobachtete Spinecho deshalb keinen Amplitudenverlust auf.

Refokussierung der durch gepulste Feldgradienten verursachten Dephasierung mittels Gradienten-Echo

Bei einem gepulsten Feldgradienten besteht mit dem Gradientenecho eine dem Spin-Echo ähnliche Möglichkeit die Dephasierung der Magnetisierung rückgängig zu machen. Alle Spins in einer Ebene senkrecht zur Gradientenachse weisen nach der Anwendung eines linearen Gradienten mit der Pulsdauer δ den gleichen z -abhängigen Phasenwinkel auf. Zur vollständigen Refokussierung der durch den ersten Gradienten dephasierten Magnetisierung kann ein zweiter Gradientenpuls mit entgegengesetzter Vorzeichen benutzt werden. Der zweite Gradient kompensiert den durch den ersten erzeugten Phasenwinkel, und die gesamte aufgenommene Phase jedes Spinpakets beträgt null. Die Wirkungen der gepulsten Feldgradienten heben sich auf, d.h. sie erzeugen ein Gradientenecho. Diese Refokussierungsbedingung ist unabhängig davon, wann und in welchem zeitlichen Abstand die Gradientenpulse geschaltet werden.

Einfluß der Diffusion auf ein Gradientenecho

Solange Diffusionseffekte vernachlässigbar sind, kann die durch einen gepulsten bzw. konstanten Feldgradienten dephasierte Magnetisierung prinzipiell vollständig refokussiert werden. Durch die Moleküldiffusion wandern die Spins mit dem Molekül in der Probe und ändern ihre Position bezüglich der Gradientenachse. Die Refokussierungsbedingung geht aber von statischen Spinpaketen (feste z -Koordinate) aus. Die durch den zweiten Feldgradienten erzeugten Phasenwinkel sind denjenigen entgegengesetzt, die die Spins aufgrund ihrer z -Koordinaten zur Zeit t_1 erhielten. Die Spins sind aber zwischen dem Beginn des ersten und des zweiten Gradientenpulses an einen anderen Ort diffundiert und der Phasenwinkel durch den

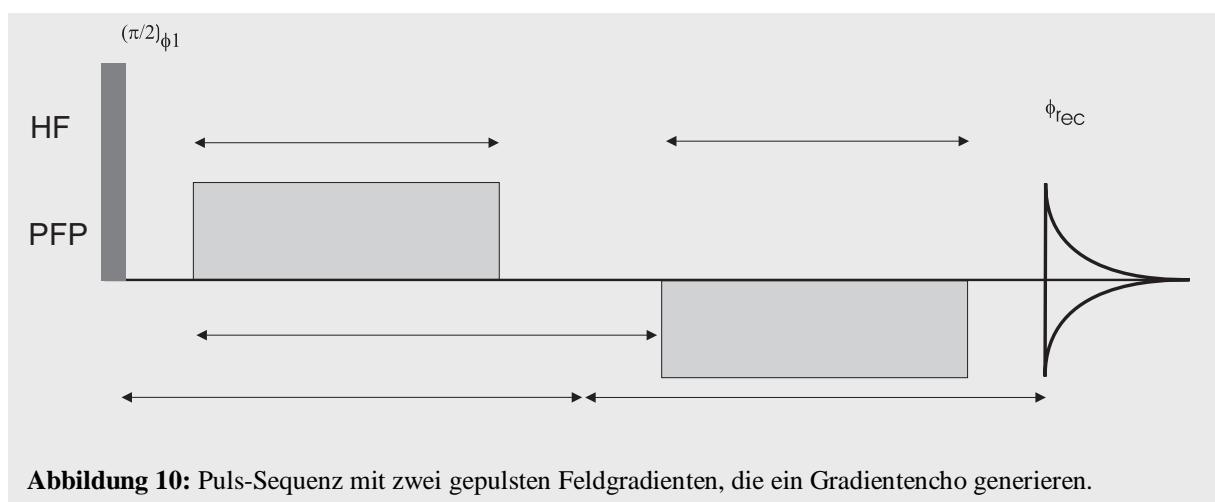


Abbildung 10: Puls-Sequenz mit zwei gepulsten Feldgradienten, die ein Gradientenecho generieren.

zweiten Gradienten ist zu groß oder zu klein für die Refokussierung. Die Wirkungen der beiden Gradienten kompensieren sich nicht. Ähnliches gilt für den Einfluß der Diffusion auf ein Spinecho bei einer statischen Magnetfeldinhomogenität. Die Größe des beobachteten Amplitudenverlustes wird dabei sowohl vom Diffusionskoeffizienten als auch von dem Zeitintervall Δ oder dem Zeitintervall τ beeinflusst. Die Zeitspanne Δ entspricht dem Abstand zwischen defokussierendem und refokussierendem Gradientenpuls und die Zeits τ dem Zeitpunkt des 180°-Pulses für das Spinecho.

Spin-Echo-Pulsfolge

Die Diffusionsmessung nach STEJSKAL & TANNER (1965) verwendet eine Kombination von Spin-Echo und Gradientenecho (Abbildung 11). Das Experiment enthält zwei identische gepulste Feldgradienten und einen 180°-Puls zur Refokussierung. Für die Bestimmung der Diffusionskoeffizienten muß die funktionale Abhängigkeit der Signalabschwächung vom Diffusionskoeffizienten bekannt sein.

Bei modernen Spektrometern ist der Beitrag von G_0 durch die Inhomogenität des Zeemanfeldes gegenüber dem gepulsten Feldgradienten G vernachlässigbar und die Signalabschwächung läßt sich durch folgenden Ausdruck beschreiben:

$$\ln \left[\frac{A(2\tau)}{A_0(2\tau)} \right] = -\gamma^2 D G^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) \quad (8)$$

Die nur durch Spin-Spin-Relaxationseffekte beeinflusste Echoamplitude zur Zeit 2τ entspricht $A_0(2\tau)$ und schließt Diffusionsverluste aus. Die wirklich beobachtete Signalamplitude der freien Präzession mit Diffusions- und T_2 -Effekten stellt $A(2\tau)$ dar. Die durch die Diffusion während der Zeit Δ hervorgerufene Amplitudenabschwächung als Funktion vom Diffusionskoeffizienten D wird vom Quotienten $A(2\tau)/A_0(2\tau)$ in Gleichung (8) repräsentiert. γ ist das gyromagnetische Verhältnis, G ist die Gradientenstärke, δ ist die Dauer des Gradientenpulses.

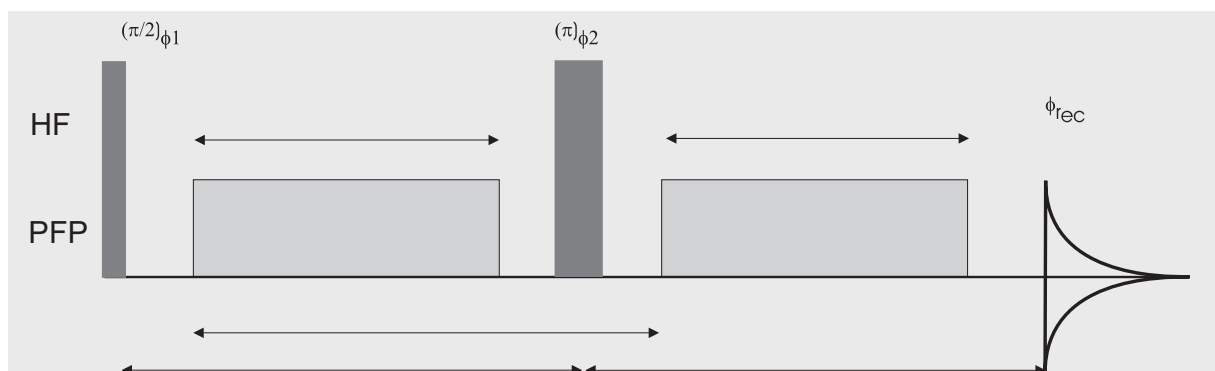
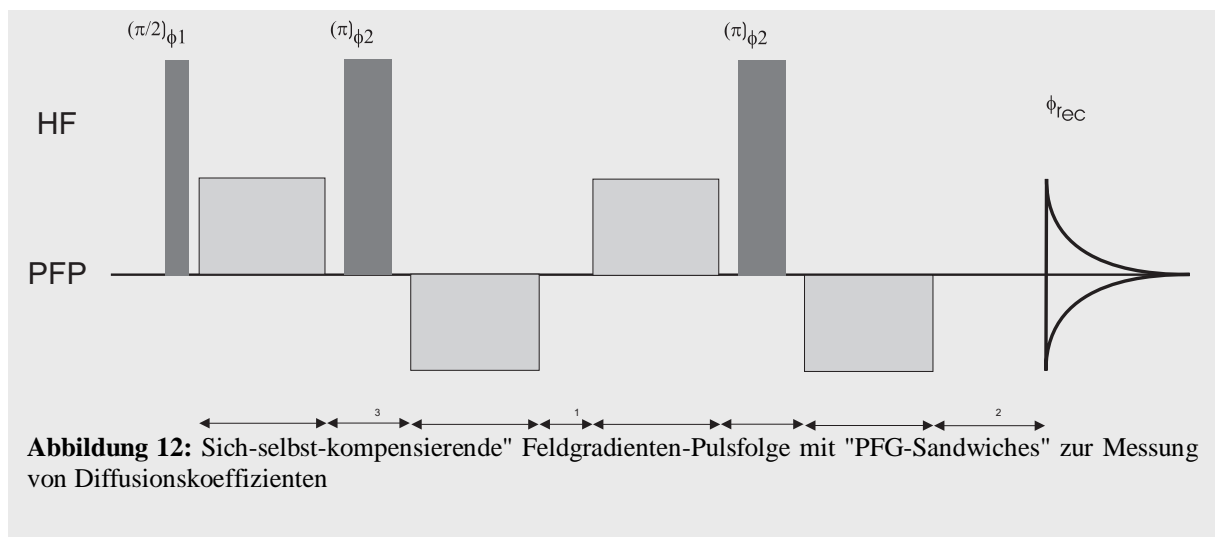


Abbildung 11: Spin-Echo-Sequenz mit zwei gepulsten Feldgradienten, die ein Gradientenecho generieren.

Zur Ermittlung des Diffusionskoeffizienten D wird die Amplitude des Echosignals bei verschiedenen Gradientenstärken gemessen. Die Gradientenstärke kann entweder durch die Stromstärke oder die Zeit δ variiert werden. Trägt man dann den natürlichen Logarithmus der Amplitudenabschwächung gegen $(G^2\delta^2)$ auf, so erhält man eine Gerade, aus deren Steigung sich bei bekannter Gradientenstärke G der Diffusionskoeffizient ergibt. Die absoluten Gradientenamplituden des Feldgradienten können durch Gleichung (8) über die bekannte Selbstdiffusionskonstante von Wassermolekülen kalibriert werden.

Pulsfolge mit „PFG Sandwiches“

Die Schaltvorgänge für die Feldgradientenpulse induzieren in den normal- und supraleitenden Teilen des Magneten und des Probenkopfes Wirbelströme. Diese wiederum verursachen zeitlich veränderliche Magnetfelder, die zu unkontrollierten Störungen des Spinsystems führen. In den modernen NMR-Spektrometern befinden sich aktive Abschirmspulen, die diese Streufelder nach außen reduzieren. Am Probenort existiert dann ein Magnetfeld, das in guter Näherung linear mit dem Ort variiert. Zusätzlich verkürzen die abgeschirmten Spulen die sogenannte Abklingzeit, so daß sich das homogene statische Magnetfeld nach der Gradientenschaltung schneller stabilisiert. Durch die Schaltung sehr großer Gradientenamplituden werden trotz der Abschirmspulen Wirbelstromfelder hervorgerufen. Die verzögerte Wiederherstellung der Magnetfeldhomogenität führt zu verzerrten Spektren und Signalverlust, der nicht von dem durch Diffusion bedingten getrennt werden kann. Um die Wirbelstromeffekte weiter zu reduzieren, kommen statt der Pulsfolge in Abbildung 11 Pulssequenzen zum Einsatz, die sogenannte „sich-selbst-kompensierende PFG-Sandwiches“ (*self-compensating pulsed magnetic-field gradients sandwiches*) verwenden (Abbildung 12, WIDER et al., 1994).



Ein solches „*PFG-Sandwich*“ besteht aus zwei identischen Feldgradientenpulsen mit entgegengesetzten Vorzeichen, zwischen denen ein 180°-HF-Puls geschaltet wird. Dieses Gradienten-„*Sandwich*“, bei dem die Zeitdauer für einen einzelnen PFG δ beträgt, ersetzt einen gepulsten Feldgradienten der Dauer 2δ . Die Wirkungen eines Gradienten-„*Sandwich*“ und eines einzelnen Feldgradientenpulses doppelter Pulsdauer sind insofern gleich, als daß sie gleichgroße ortsabhängige Phasen verursachen. Der Vorteil bei der Anwendung eines Paares von Vorzeichen-invertierten, aber ansonsten identischen Feldgradientenpulsen besteht darin, daß die durch ihre Schaltung verursachten Störungen ebenfalls entgegengesetzte Vorzeichen aufweisen und sich gegenseitig besser kompensieren. Die anschließende Abklingzeit wird daher deutlich verkürzt, so daß die resultierenden Spektren auch bei großen Gradientenamplituden weniger verzerrt und besser aufgelöst sind.. Für das Experiment in Abbildung 12 mit Rechteck-Gradientenpulsen beschreibt

$$\ln \left[\frac{A(2\tau)}{A_0(2\tau)} \right] = -4\gamma^2 DG^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{5\delta}{3} \right) \quad (9)$$

die durch Diffusion bedingte Amplitudendämpfung.

Der zeitliche Verlauf $f(t)$ des Feldgradienten über das Zeitintervall $0 < t < \delta$ des Pulses kann frei gewählt werden. Er wird digital in Form aufeinander folgender einzelner Rechteck-Pulse mit einer minimalen Dauer von 3,4 μ s auf den Verstärker gegeben. Die Wahl der Gradientenpulsform beeinflusst ebenfalls die Abklingzeit. Wenn man Pulse gleicher Stärke vergleicht, so weist z.B. die Form eines Sinusbogens eine etwas kürzere Abklingzeit auf als die Rechteckform (MERRIL, 1993). Aus diesem Grund wurde für die hier durchgeführten Diffusionsmessungen eine Rechteck-Funktion mit einer anschließenden halbierten Gauß-Funktion als Gradientenpulsform benutzt. In diesem Fall muß in Gleichung (9) ein konstanter Faktor c auf der rechten Seite eingeführt werden (LE BIHAN, 1991).

3 Ergebnisse

3.1 Aktin

3.1.1 Mobilität der Subdomäne I von Aktin

Während die ^1H -Spektren von G-Aktin, die bisher veröffentlicht wurden, untereinander sehr ähnlich sind, stellt man bei den Spektren des F-Aktins häufig große Unterschiede fest. Einerseits sind alle Resonanzlinien des F-Aktins bis unter die Detektionsgrenze verbreitert (HIGHSMITH & JARDETZKY, 1980). Andererseits wurden NMR-Spektren des F-Aktins veröffentlicht, die starke Resonanzlinien zeigen, wie sie auch im Spektrum von G-Aktin zu beobachten sind (PRINCE et al., 1981; TRAYER et al., 1987). SLÓSAREK et al. (1994) konnten zeigen, daß die Polymerisation von ATP-G-Aktin durch Erhöhung der Ionenstärke zur Auslöschung fast aller ^1H -NMR-Signale führt. Trotzdem können ausgeprägte Signale mit relativ schmaler Linienbreite bei F-Aktin-Filamenten beobachtet werden, welche auf die Existenz mobiler und in der NMR-Spektroskopie sichtbarer Aminosäurereste in der makromolekularen Struktur hinweisen. Durch den Austausch von Mg^{2+} gegen Ca^{2+} sinkt die Intensität der Signale in den Spektren stark. Auch nach Erhöhung der Ionenstärke wird eine schwache, nicht signifikante Verminderung der Signalintensität beobachtet. Diese Ergebnisse erklärt ein Zwei-Zustands-Modell. Dabei stehen ein M- (mobiler) und ein I- (immobiler) Zustand im Gleichgewicht. Im M-Zustand sind einige Aminosäurereste in Bewegung und bedingen die NMR-Signale. Das Gleichgewicht verschiebt sich auf die Seite des I-Zustandes, wenn Mg^{2+} durch Ca^{2+} -Ionen ersetzt werden. Keinen Einfluß auf dieses Gleichgewicht zwischen M- und I-Zustand hat die hochaffine Bindung von Phalloidin an die Filamente. Phalloidin selbst wird durch die Bindung an F-Aktin vollständig immobilisiert und sein interfilamentärer Austausch ist sehr langsam (SLÓSAREK et al., 1994). Zum Zeitpunkt der zuvor genannten Arbeit konnten die mobilen Regionen des Mg^{2+} -F-Aktins noch keinem spezifischem Strukturelement zugeordnet werden. Elektronenmikroskopische Studien an F-Aktin deuten auf die Existenz verschiedener Zustände des F-Aktins hin (ORLOVA & EGELMAN, 1992, 1993). Je nach Art des bivalenten Kations an der hochaffinen bzw. den mittellaffinen Bindungsstellen zeigen die Filamente unterschiedliche Flexibilitäten. Die Veränderung der Beweglichkeit geht einher mit einer Rotation der Subdomäne II und einer Reorientierung der schleifenförmigen DNase Bindungsstelle. Bei der Simulation der G-Aktindynamik durch Normalschwingungen (*normal mode analysis*, TIRION & BEN-AVRAHAM, 1993) wurde ebenfalls eine große Mobilität in Subdomäne II zwischen den Aminosäureresten 35 bis 52 beobachtet. Weitere mögliche bewegliche Regionen sind in Subdomäne I der C- beziehungsweise der N-Terminus des Proteins, sowie die Schleife zwischen den Aminosäureresten 18 und 29.

Im folgenden sind die Ergebnisse der ^1H - und ^{19}F -NMR-Spektroskopiestudien an Aktin in seiner G- und F-Form dargestellt. Die Studien hatten das Ziel, die mobilen Aminosäurereste des F-Aktins zu lokalisieren.

3.1.1.1 Mobilität des C-Terminus in G- und F-Aktin

Der für Proteasen zugängliche C-Terminus von G-Aktin war ein plausibler Bereich, in dem die mit der NMR-Spektroskopie detektierbaren Aminosäurereste des F-Aktins lokalisiert sein konnten. Seine proteolytische Abspaltung beeinflusst sowohl die Polymerisationsrate als auch die ATPase-Aktivität (STRZELECKA-GOLASZEWSKA et al., 1995). Die C-terminale Sequenz enthält mit Cys 374 eine Thiolgruppe, die leicht mit der PFP-Markierung (4-Perfluoro-tert-butyl-phenyliodacetamid, Abbildung 13) derivatisiert werden kann (KALBITZER et al., 1991^a). Die Markierung dieser Gruppe sollte es mittels ^{19}F -NMR-Spektroskopie ermöglichen, die interne Beweglichkeit in diesem Teil des Proteins zu beobachten.

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse für Cys 374 markiertes Mg^{2+} -Aktin dargestellt. Das schmale ^{19}F -Signal bei 15,06 ppm von Mg^{2+} -G-Aktin wird durch die Polymerisation mit KCl erheblich verbreitert. Dieser Verlust an Mobilität stand nicht in Einklang mit den Beobachtungen aus der ^1H -NMR-Spektroskopie. Die markierte Aminosäure befand sich nicht in den mobilen und für die NMR-Spektroskopie sichtbaren Regionen von F-Aktin. Die Halbwertsbreite $\Delta\nu_{1/2}$ beträgt 19 Hz für Mg^{2+} -G-Aktin und entspricht einer transversalen Relaxationszeit von 16,7 ms bei 283 K. Nach der Polymerisation verbreitert sich das Signal auf $\Delta\nu_{1/2} = 520 \pm 40$ Hz. Durch die unterschiedlichen Viskositäten in der Lösung der einzelnen Präparationen variiert die Linienbreite etwas. Das Signal war nach der Polymerisation leicht zu tieferem Feld verschoben. Die Signifikanz dieses Effektes ist aufgrund der großen Linienbreite schwer zu bestimmen. Auch die

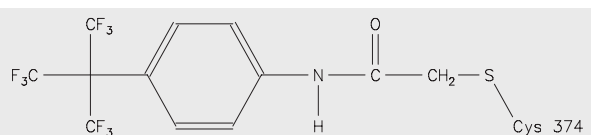


Abbildung 13: Struktur der an Cys 374 gebundenen PFP-Markierung.

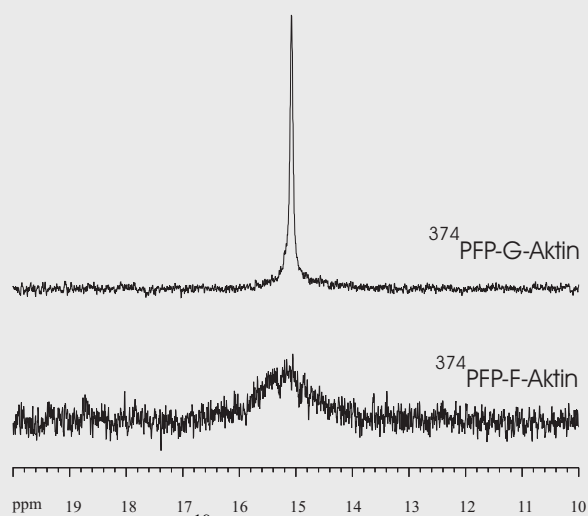


Abbildung 14: ^{19}F -NMR-Spektren von Fluormarkiertem G- und F-Aktin. Oben: ^{19}F -NMR-Spektrum von G-Aktin. Unten: ^{19}F -NMR-Spektrum von Mg^{2+} -F-Aktin. Die Mg^{2+} -G-Aktin Probe enthielt $74 \mu\text{M}$ Mg^{2+} -G-Aktin, markiert mit PFP an Cys 10 in 2 mM Tris-HCl pH 7,7, 0,2 mM ATP, 0,1 mM MgCl_2 , 0,2 mM EGTA, , 0,002 % NaN_3 in 90 % H_2O , 10 % D_2O . Nach Aufnahme des G-Aktin-Spektrums wurde das Protein im NMR-Röhrchen durch Zugabe von KCl-Lösung (Endkonzentration 30 mM) polymerisiert. Die Spektren wurden bei 283 K aufgenommen. Außer der Anzahl der aufaddierten FIDs waren die experimentellen Bedingungen und die Prozessierung der Daten identisch für die beiden Spektren.

Polymerisation von Ca^{2+} -G-Aktin zu Ca^{2+} -F-Aktin verbreiterte das scharfe Signal, und innerhalb der Fehlergrenzen scheint die Linienposition und Linienbreite in freiem und polymerisiertem Aktin unabhängig von dem Ion im aktiven Zentrum zu sein.

3.1.1.2 Mobilität des N-Terminus von Mg^{2+} -F-Aktin

Ein anderer Weg, um die mobilen Aminosäuren zu identifizieren, war der Einsatz von spezifischen Anti-Aktin-Antikörperfragmenten (*fragment antigen binding*, F_{ab}), die die Beweglichkeit der entsprechenden Aminosäuren einschränken. Durch die Verfügbarkeit von Antikörperfragmenten gegen die ersten sieben N-terminalen Aminosäuren konnte die Hypothese, daß wenigstens ein Teil der Signale des Mg^{2+} -F-Aktins vom N-Terminus stammen, überprüft werden. Die sukzessive Zugabe des F_{ab} s zu Mg^{2+} -F-Aktin führte zu einer Abschwächung und letztendlich auch zum Verschwinden einiger Signale, die typisch für Mg^{2+} -F-Aktin sind. Die intensivste detektierbare Resonanz ist das Signal bei 2,048 ppm (als N-ACE in Abbildung 15 markiert), das entweder zu einem Methionin oder zur Methylgruppe der N-Acetylgruppe gehört (SLÓSAREK et al., 1994). Da dieses Signal verschwindet und der N-Terminus kein Methionin enthält, stammt es sehr wahrscheinlich von der N-terminalen Acetylgruppe. Nach der Sättigung des Mg^{2+} -F-Aktins mit dem F_{ab} blieben noch einige Signale sichtbar. Eine nähere Betrachtung der Daten zeigte, daß sich die Spektren von freiem Mg^{2+} -F-Aktin und dem Aktin- F_{ab} -Komplex unterscheiden und ein Teil der Signale von mobilen Bereichen des F_{ab} s selbst stammen konnten. Bestätigt wurde dies durch die schon beschriebene Zugabe von Calciumionen. In erster Näherung sollten die im Komplex noch verbliebenen Resonanzlinien des Aktins verschwinden und die restlichen Signale würden dann nur noch von den komplexierten Antikörperfragmenten stammen. Abbildung 16 zeigt, daß die Antikörperfragmente auch im Komplex noch mobile Aminosäurereste besitzen.

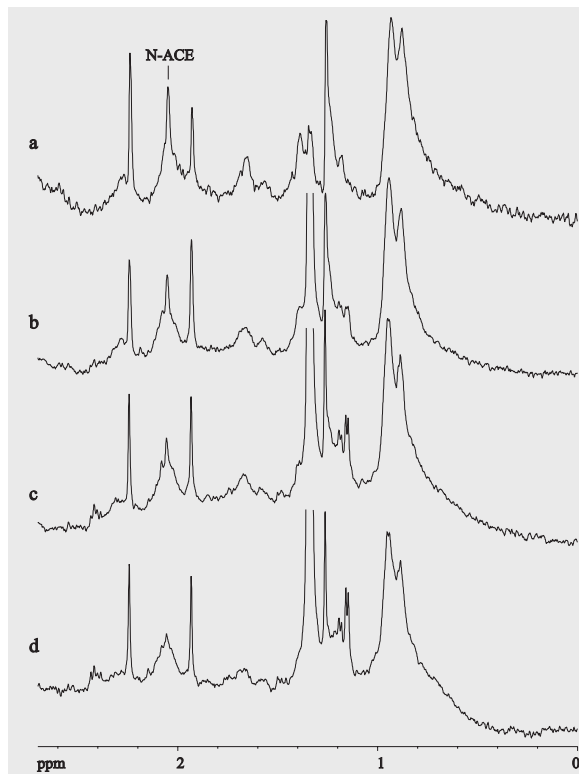


Abbildung 15: Ausschnitte aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von Mg^{2+} -F-Aktin, komplexiert mit F_{ab} gegen die ersten sieben N-terminalen Aminosäuren von Aktin. Die Probe enthielt $27 \mu\text{M}$ Mg^{2+} -F-Aktin in 2 mM Tris-HCl pH 7,8, 30 mM KCl, $0,2 \text{ mM}$ ATP, $0,1 \text{ mM}$ MgCl_2 , $0,2 \text{ mM}$ EGTA, 10% D_2O bei 283 K , sowie Fab in verschiedenen Konzentrationen. Das stöchiometrische Verhältnis von F_{ab} /Aktin betrug 0 (a), $0,27$ (b), $0,7$ (c), und 1 (d). Für die Aufnahme, Prozessierung und Darstellung der Spektren wurden identische Parameter gewählt. Zur Signalfilterung wurde der FID mit einer Exponentialfunktion multipliziert, die zu einer Linienverbreiterung von 3 Hz führt.

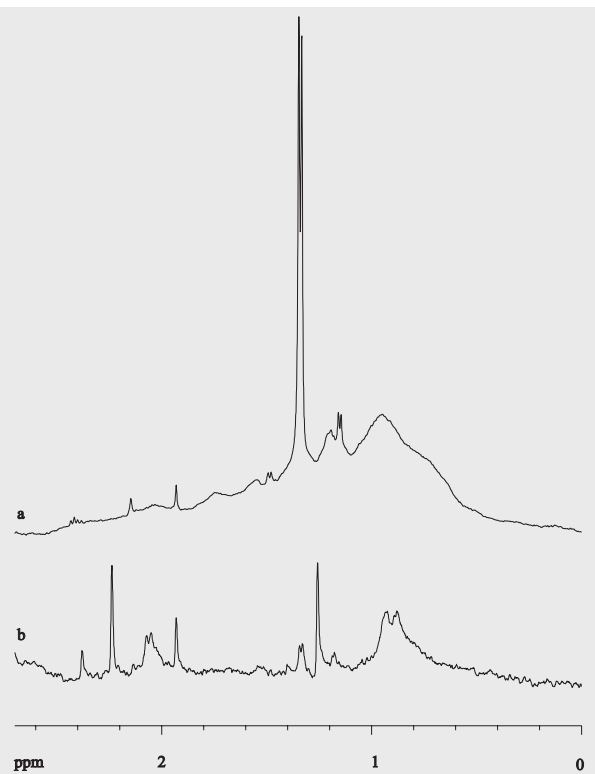


Abbildung 16: Ausschnitte aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von freiem Fab (a) und an Mg^{2+} -F-Aktin (immobilisiert mit Ca^{2+}) gebundenem F_{ab} (b). Probe (a) enthielt $72 \mu\text{M}$ Fab in 2 mM Tris-HCl pH 7,8, 30 mM KCl, 10% D_2O bei 283 K . Probe (b) enthielt $26,8 \mu\text{M}$ Mg^{2+} -F-Aktin und $14,3 \mu\text{M}$ F_{ab} in 2 mM Tris-HCl pH 7,8, 30 mM KCl, $0,13 \text{ mM}$ ATP, $0,06 \text{ mM}$ MgCl_2 , 5 mM CaCl_2 , $0,13 \text{ mM}$ EGTA, 10% D_2O bei und 283 K . Für die Aufnahme, Prozessierung und Darstellung der Spektren wurden identische Parameter gewählt. Zur Signalfilterung wurde der FID mit einer Exponentialfunktion multipliziert, die zu einer Linienverbreiterung von 3 Hz führt.

3.1.1.3 2D-NMR-Spektroskopie am Kaninchen-Aktin

Die der Primärstruktur entsprechende sequentielle Zuordnung der chemischen Verschiebung von Protonen, ^{13}C - und ^{15}N -Kernen ist die Voraussetzung für die Strukturbestimmung von kleinen Proteinen mittels 2D-NMR-Spektroskopie (Abbildung 17). Diese Methoden sollten für die mobilen Bereiche in Mg^{2+} -F-Aktin ebenfalls anwendbar sein. Das Signal/Rausch-Verhältnis war wegen den geringen Konzentrationen bis zu 0,05 mM, in denen Aktin normalerweise verfügbar ist, nicht ausreichend. Durch die Erhöhung der Aktinkonzentration um mehr als das 30fache konnten Spektren bei 600 MHz mit ausreichender Qualität erhalten werden, um die ersten 19 Aminosäuren der Primärstruktur zuzuordnen (HEINTZ et al., 1996). Die spätere Verfügbarkeit eines 800 MHz-Spektrometers ermöglichte durch das höhere Auflösungsvermögen und des günstigeren Signal/Rausch-Verhältnisses die Zuordnung an qualitativ besseren Spektren zu überprüfen und weitere 6 Aminosäurereste zuzuordnen. Die Abbildungen 18 und 19 zeigen die Region der $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\alpha}$ -Kreuzsignale von TOCSY-Spektren einer 1,2 mM Mg^{2+} -F-Aktinprobe² bei 600 MHz, bzw. einer 1,6 mM Probe bei 800 MHz. Das 800 MHz-Spektrum war wesentlich besser aufgelöst und zeigte auch deutlich mehr Signale. Man erkennt eine Anzahl der Kreuzsignale (*cross peaks*), wie sie für kleine Peptide mit ungefähr 25 Aminosäureresten charakteristisch sind. Zusammen mit DQF-COSY-Spektren und NOESY-Spektren konnten die Resonanzlinien sequentiell den ersten 25 Aminosäureresten der Primärstruktur von Aktin zugeordnet werden. Ein guter Ausgangspunkt war das Signal bei 2,048 ppm, das vom Methylrest eines Methionins oder der N-terminalen Acetylgruppe herrührt. Aufgrund des starken NOE-Kreuzsignals zu der Amidresonanz eines Asparagins oder einer Asparaginsäure wurde dieses Signal der Acetylgruppe zugeordnet. Dies war auch in Übereinstimmung mit den schon beschriebenen unabhängigen F_{ab} -Experimenten.

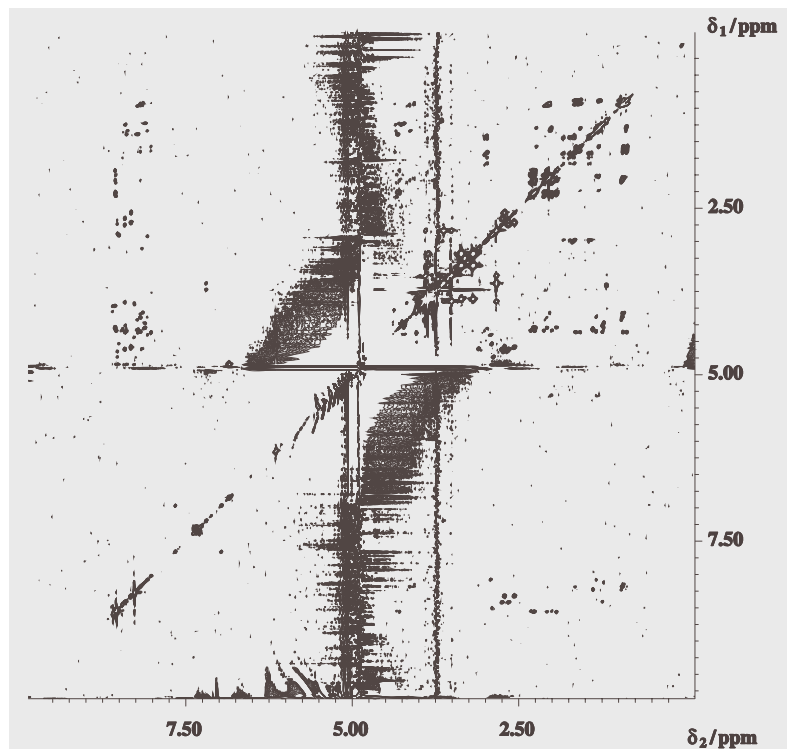


Abbildung 17: 800 MHz TOCSY-Spektrum von Mg^{2+} -F-Aktin. Die Probe enthielt 1,6 mM Mg^{2+} -F-Aktin, 2 mM Tris-HCl pH 7,8, 30 mM KCl, 0,1 mM MgCl_2 , 0,2 mM EGTA, bei 288 K.

² Konzentrationsangaben von F-Aktin beziehen sich immer auf die zugrundeliegende Monomerkonzentration

Die Zuordnung der ersten 25 Aminosäuren ergab sich direkt aus den sequentiellen NOEs, deren komplette Spinsysteme das TOCSY-Spektrum zeigte. Die Resonanzlinien der Amidprotonen der Seitenkette von Asn 12 konnten über den NOE des H^β mit dem Rest des Asparaginspinsystems verknüpft werden. Die bei 600 MHz nicht zu erkennende Resonanz des zweiten H^β von Asn 12 und des zweiten H^β von Gly 15 wurden bei 800 MHz zugeordnet. Erst bei diesem hohem Feld war die Auflösung ausreichend, um alle Spinsysteme eindeutig zu identifizieren. Durch das bessere Signal/Rausch-Verhältnis wurde auch das NOE-Kreuzsignal von einem H^β des Ser 14 zu den beiden H^α s von Gly 15 gefunden. Dadurch ergab sich eine neue Zuordnung des Gly 15 (Tabelle 1). Für Leu 16 und Leu 8 konnten erstmals zwei verschiedene Spinsysteme identifiziert werden. Das Spinsystem der Seitenketten von Lys 18 scheint aus strukturellen Gründen doppelt vorhanden zu sein. Die H^N - H^α -Kreuzsignale von Gly 20 und Phe 21 waren erst bei 800 MHz sichtbar. Die aromatischen Ringprotonen von Phe 21 zeigen die erwarteten NOE-Kreuzsignale zu den H^β der Seitenkette. Gly 23 konnte erst bei 800 MHz identifiziert werden. Asp 24 zeigt ein schwaches Signal für das H^α und zwei starke Signale für die H^β s. Für Asp 25 wurde für die beiden H^β s nur ein Signal gefunden. Die Aminosäurereste von Ala 22 bis Val 30 bilden eine Schleife, die offensichtlich noch recht beweglich ist, da die NOE-Signale noch erkennbar waren, aber zunehmend schwächer wurden. Die Aminosäurereste Ala 26, Arg 28, Ala 29 und Val 30 könnten anhand ihrer Spinsysteme identifiziert werden. Sie lassen sich aber wegen der schwachen sequentiellen NOEs nicht mehr eindeutig der Primärstruktur zuordnen. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, daß bei diesem hohen Feld die Resonanzlinien von anderen potentiell mobilen Bereichen des Aktins stammen.

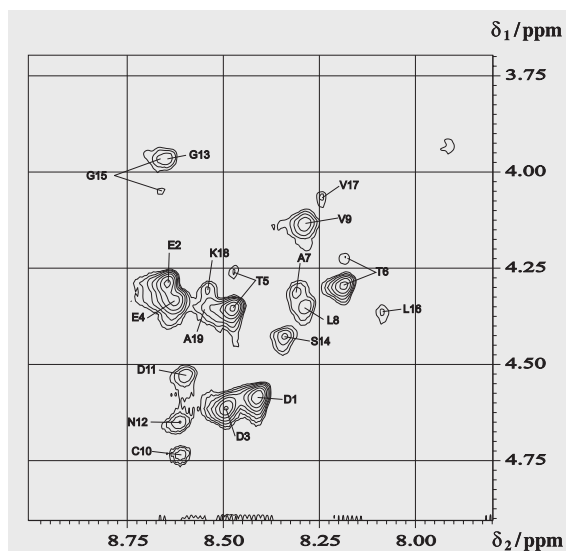


Abbildung 18: H^N - H^α -Bereich eines 600 MHz TOCSY-Spektrums von Mg^{2+} -F-Aktin. Die Probe enthielt 1,2 mM Mg^{2+} -F-Aktin, 30 mM KCl, 0,2 mM ATP, 0,1 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EGTA, 2 mM Tris-HCl pH 7,8 bei 283 K.

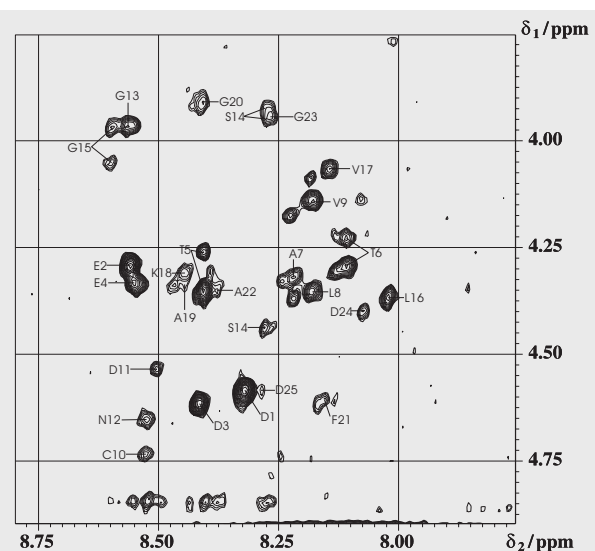


Abbildung 19: H^N - H^α -Bereich eines 800 MHz TOCSY-Spektrums von Mg^{2+} -F-Aktin. Die Probe enthielt 1,6 mM Mg^{2+} -F-Aktin¹, 30 mM KCl, 0,2 mM ATP, 0,1 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EGTA, 2 mM Tris-HCl pH 7,8 bei 288 K.

Aminosäure	H	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ	H ζ
N-Ace			2,048 (2,048)				
Asp 1	8,32 (8,41)	4,59 (4,58)	2,57, 2,71 (2,57, 2,73)				
Glu 2	8,56 (8,64)	4,29 (4,29)	1,94, 2,08 (1,93, 2,10)	2,26, 2,28 (2,26, 2,30)			
Asp 3	8,42 (8,49)	4,61 (4,61)	2,66, 2,75 (2,65, 2,75)				
Glu 4	8,55 (8,62)	4,33 (4,33)	2,00, 2,12 (1,99, 2,12)	2,27, 2,31 (2,27, 2,33)			
Thr 5	8,41 (8,47)	4,35 (4,36)	4,26 (4,26)	1,24 (1,24)			
Thr 6	8,11 (8,18)	4,30 (4,29)	4,23 (4,22)	1,23 (1,23)			
Ala 7	8,22 (8,31)	4,32 (4,31)	1,40 (1,38)				
Leu 8	8,18 (8,28)	4,35 (4,35)	1,58, 1,65 (1,56, 1,67)	1,62 (1,64)	0,88, 0,94 (0,88, 0,94)		
Val 9	8,18 (8,28)	4,14 (4,14)	2,08 (2,07)	0,94, 0,96 (0,94, 0,96)			
Cys 10	8,53 (8,62)	4,73 (4,65)	2,68, 2,73 (2,68, 2,74)				
Asp 11	8,51 (8,59)	4,54 (4,52)	2,91, 2,91 (2,89, 2,89)				
Asn 12	8,53 (8,61)	4,65 (4,73)	2,88, 2,74 (2,88)	2,74 (3,22 ^a)	6,97 (7,04)	7,66 (7,73)	
Gly 13	8,57 (8,65)	3,96 (3,96, 4,43)					
Ser 14	8,28 (8,34)	4,44 (4,43)	3,92, 3,95 (3,89, 3,93)				
Gly 15	8,60 (8,08)	3,97, 4,05 (4,36)					
Leu 16	8,02 (^{-a})	4,36 (^{-a})	1,58, 1,65 (^{-a})	0,88, 0,94 (^{-a})			
Val 17	8,15 (8,25)	4,07 (4,07)	2,2,036 (2,03)	0,92, 0,95 (0,92, 0,95)			
Lys 18	8,45	4,31	1,81, 1,83 1,72, 1,74	1,44, 1,46 1,41, 1,44,	1,66, 1,67 (1,66, 1,68)	2,98 (2,98)	
Ala 19	8,45 (8,54)	4,33 (4,35)	1,36 (1,36)				
Gly 20	8,41 (^{-a})	3,91, 4,18 (^{-a})					
Phe 21	8,16 (^{-a}) (7,32)	4,61 (4,36)	3,10, 3,10 (3,05, 3,17)		7,28, 7,28 (7,28, 7,28)	7,36, 7,36 (7,36, 7,36)	7,32
Ala 22	8,38 (8,48)	4,35 (4,36)	1,34 (1,38)				
Gly 23	8,27	3,95					
Asp 24	8,08	4,40	2,92				
Asp 25	8,29	4,59	2,70, 2,56				
(Ala 26 ^b)	8,08	4,12	1,34				
(Pro 27 ^b)	-	-	-				
(Arg 28 ^b)	8,22	4,37	1,59, 1,65				
(Ala 29 ^b)	8,24	4,33	1,39				
(Val 30 ^b)	8,23	4,18	2,10	0,96, 0,96			

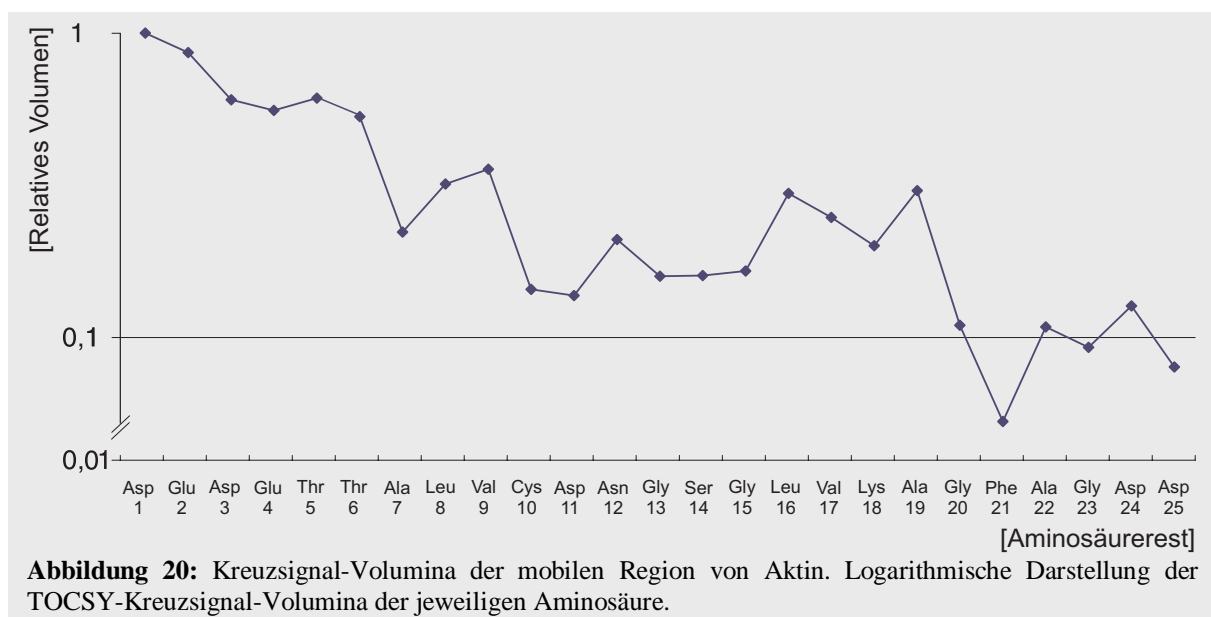
Tabelle 1: Mobile Aminosäurereste in Mg-F-Aktin. Chemische Verschiebung der TOCSY-Kreuzsignale in ppm relativ zu DSS, bei pH 7,8, 288 K und 800 MHz und in Klammern bei pH 7,8, 283 K und 600 MHz. (^{-a}) bei 600 MHz nicht identifizierbar, (^{-b}) Zuordnung wegen sehr schwacher NOE-Kreuzsignale unsicher. Abgesehen von den neu zugeordneten Aminosäuren sind die teilweise unterschiedlichen chemischen Verschiebungen auf die unterschiedlichen Temperaturen zurückzuführen.

3.1.1.3.1 Struktur und Dynamik der N-terminalen Domäne von Mg²⁺-F-Aktin.

Da der Kern-Overhauser-Effekt, der eine Basis für die Strukturbestimmung darstellt, von der Korrelationszeit τ abhängt und die Bewegungsmodi durch die Korrelationsfunktion $f(\tau)$ beschrieben werden, schien es nicht sinnvoll diese Effekte in einem so komplizierten System wie Aktin zu quantifizieren. Man kann jedoch mit einschränkenden Annahmen zumindest semiquantitative Ergebnisse erhalten.

Da nur negative NOEs beobachtet werden (NOE-Kreuzsignale mit dem selben Vorzeichen wie die Signale der Diagonalen), muß die apparente Korrelationszeit τ_a die Bedingung $2\pi\nu_0\tau_a > 5^{1/2}/2$ erfüllen. Durch die Resonanzfrequenz $\nu_0=800$ MHz erhält man ein τ_a , das größer als 0,22 ns sein muß. Für kurze Mischzeiten t_m kann man die Kreuzsignalvolumina V_{ij} des TOCSY-Spektrums näherungsweise durch $A \sin^2(\pi J_{ij}t_m) e^{-t_m/T_{1\rho}}$, mit A als Konstante, J_{ij} als skalare Kopplungskonstante J zwischen dem Spin i und dem Spin j , sowie $T_{1\rho}$ als longitudinale Relaxationsrate im rotierendem Koordinatensystem berechnen. Unter der vereinfachenden Annahme, daß die Kopplungskonstanten J_{ij} gleich sind, ist $\ln V_{ij}$ linear abhängig von $t_m/T_{1\rho}$ und deswegen auch vom apparenten τ_a . Abbildung 20 zeigt die Volumina $\ln V_{ij}$ der H ^{α} -Amide-Kreuzsignale der Aminosäurereste i und $i + 1$. Bei einer näheren Betrachtung kann man drei Gruppen von Aminosäureresten unterscheiden, eine Gruppe mit relativ großen Volumina (Asp 1 bis Thr 6), eine Gruppe mit signifikant kleineren Volumina (Ala 7 bis Ala 19) und eine Gruppe mit variablen aber kleinen Volumina ab Gly 20. In der ersten Gruppe variiert $\ln V_{ij}$ zwischen 1 und 0,54, in der zweiten Gruppe zwischen 0,37 und 0,15. Den kleinsten Wert erhält man mit 0,06 für Phe 21.

Abbildung 21 zeigt, daß außer den sequenziellen NOEs auch Intermediär- und Fernkopplungen zu beobachten waren. Von besonderem Interesse war dabei der weitreichende NOE zwischen den H ^{δ} -Protonen von Leu 8 und den Ringprotonen von Phe 21 (H ^{δ} und H ^{ϵ}). Dieser



NOE belegte, wie auch schon die Röntgenkristallstruktur zeigte, daß diese beiden Aminosäuren zumindest im zeitlichen Mittel auch in Lösung benachbart sind. Ein weiterer Kontakt in Lösung von zwei benachbarten β -Faltblattsträngen wurde durch den weitreichenden NOE zwischen dem Amidproton von Gly 13 und dem H^α von Val 17 belegt. Wenn der erste Strang des β -Faltblatts, wie in der Kristallstruktur, auch im mobilen Zustand von Mg^{2+} -F-Aktin vorhanden sein sollte, dann sollten H^α - H^α NOEs zwischen den Aminosäuren der ersten zwei Stränge beobachtbar sein. Aufgrund der eingeschränkten Qualität der Spektren in diesem Bereich konnte dies leider nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden.

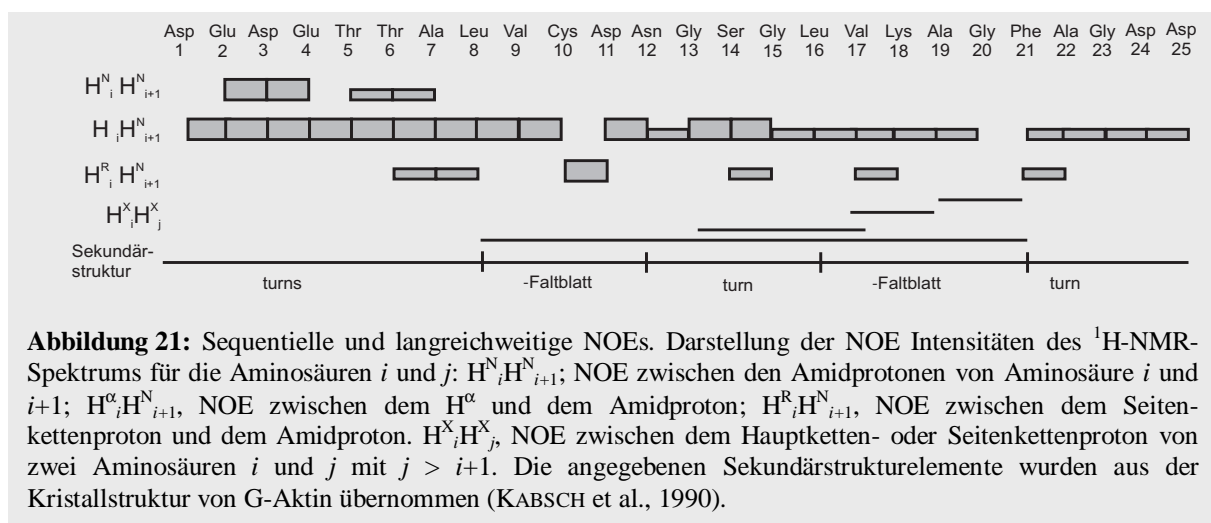


Abbildung 21: Sequentielle und langreichweitige NOEs. Darstellung der NOE Intensitäten des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums für die Aminosäuren i und j : $H_i^N H_{i+1}^N$; NOE zwischen den Amidprotonen von Aminosäure i und $i+1$; $H_i^H H_{i+1}^N$, NOE zwischen dem H^α und dem Amidproton; $H_i^R H_{i+1}^N$, NOE zwischen dem Seitenkettenproton und dem Amidproton. $H_i^X H_j^X$, NOE zwischen dem Hauptketten- oder Seitenkettenproton von zwei Aminosäuren i und j mit $j > i+1$. Die angegebenen Sekundärstrukturelemente wurden aus der Kristallstruktur von G-Aktin übernommen (KABSCH et al., 1990).

3.1.1.3.2 Einfluß von pH und Temperatur auf die mobile Domäne von Mg^{2+} -F-Aktin

Die Temperatur von 283 K, der pH-Wert von 7,8 und die geringe Ionenstärke entsprachen bei dem 2D-Experiment nicht den physiologischen Bedingungen. Darum sollte geklärt werden, ob diese Parameter Einfluß auf das Gleichgewicht der mobilen Region im Mg^{2+} -F-Aktin haben. Dies kann durch die Integration der Resonanzlinien beobachtet werden. Da Basislinienartefakte von schwachen und sehr breiten NMR-Signalen sehr schwer zu vermeiden sind, wurde ein gut aufgelöstes Signal ausgewählt. Den spektralen Bereich mit der Methylgruppe des N-Acetylrestes zeigt Abbildung 22. Neben dem Signal der N-Acetylgruppe befindet sich im G-Aktinspektrum ein weiteres, noch nicht zugeordnetes scharfes Signal bei 2,070 ppm. Es ist nicht im polymerisierten Aktin zu beobachten und könnte den Methylgruppen von Met 44 und Met 47 zugeordnet werden. Beide befinden sich in der DNase-Bindungsschleife, von der man annimmt, daß sie im G-Aktin flexibel ist und im F-Aktin Kontakt zur nächsten Aktineinheit hat. Die Spektren von F-Aktin wurden unter verschiedenen experimentellen Bedingungen aufgenommen und die N-Acetylsignale jeweils auf das Ausgangssignal des G-Aktins der gleichen Probe vor der Polymerisation normiert. Die normierten Integrale des N-Acetylsignals von G- und F-Aktin zeigt Abbildung 23. Die relativen Signalintensitäten variierten von Spektrum zu Spektrum, aber unter allen Bedingungen blieb ein wesentlicher Teil des Aktins im mobilen Zustand. Der sehr große experimentelle Fehler erlaubte es jedoch nicht, im Gegensatz zu SLÓSAREK et al. (1994), eine Aussage über die Abhängigkeit der Intensität von der Ionenstärke zu machen. Das arithmetische Mittel aller Messungen war 0,56 mit einer Standardabweichung von $\pm 0,1$. Daraus ergab sich unter der Annahme, daß nur die statistischen

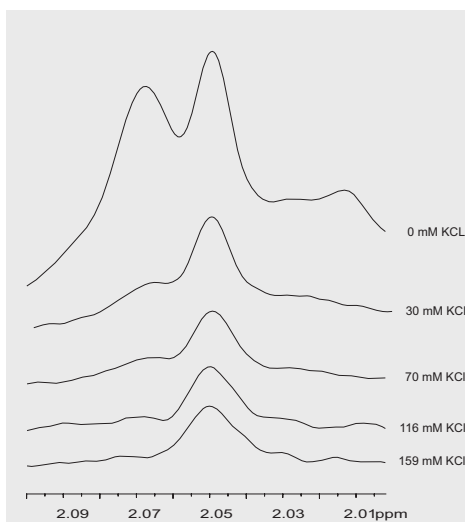


Abbildung 22: 1H -NMR-Signal der Methylgruppe des N-Acetylrestes von Mg^{2+} -G- und Mg^{2+} -F-Aktin. 1H -NMR-Spektrum von Mg^{2+} -Aktin bei pH 7,2 und 298 K vor (oben) und nach polymerisieren mit KCl.

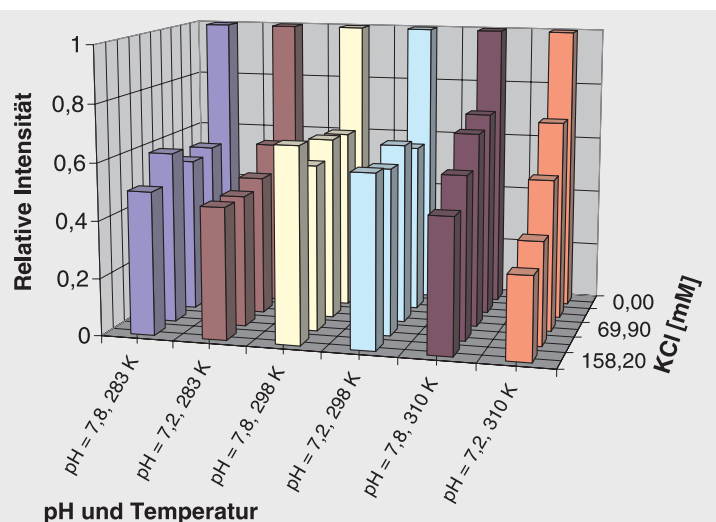


Abbildung 23: Population des mobilen und immobilen Zustands in Mg^{2+} -F-Aktin. Die Probe enthielt $50 \mu M$ Mg^{2+} -Aktin in $0,2 \text{ mM}$ ATP, $0,1 \text{ mM}$ $MgCl_2$, $0,2 \text{ mM}$ EGTA, 2 mM Tris-HCl, $90\% \text{ H}_2\text{O}$, $10\% \text{ D}_2\text{O}$ und KCl in den angegebenen Konzentrationen. Die Temperatur und der pH-Wert wurden in den Experimenten variiert.

Fehler eingehen, für das Gleichgewicht zwischen mobilem Aktin (A_M) und immobilisiertem Aktin (A_I) eine Gleichgewichtskonstante $K_{MI}=[A_M/A_I]$ von 1,3.

3.1.2 Diffusionsmessungen

Bei den vorangegangenen Messungen konnte nicht ausgeschlossen werden, daß ein proteolytisch abgespaltetes N-terminales Fragment gemessen wurde. Zur Überprüfung wurden Diffusionsmessungen mit Mg^{2+} -G- und Mg^{2+} -F-Aktin unter Beobachtung des N-Terminus mittels 1H -NMR-Spektroskopie und des C-Terminus mittels ^{19}F -NMR-Spektroskopie durchgeführt. Durch die Markierung von Cys 374 mit der PFP-Markierung war es möglich das translatorische Verhalten des C-Terminus vor und nach der Polymerisation zu beobachten und mit dem des N-Terminus zu vergleichen. In einem intakten Molekül können sich die beiden Bereiche nicht unabhängig voneinander bewegen und sollten in beiden Messreihen auch identische Diffusionskoeffizienten liefern.

3.1.2.1 Kalibrierung des Spektrometers

Für die Kalibrierung des Spektrometers wurde vorausgesetzt, daß der Diffusionskoeffizient für HDO bei 25°C in einer D_2O -Probe $1,90 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ beträgt (LONGSWORTH, 1960).

Für die Temperaturkorrektur wurde die Viskosität von D_2O bei 283 K und 298 K berechnet (LAPHAM et al., 1997; NATARAJAN, 1989).

$$\ln \eta_0 = a + \left[\frac{b}{c - T} \right]$$

T ist die Temperatur in Kelvin. Die Terme a, b und c sind für ein bestimmtes D_2O/H_2O -Verhältnis bekannt. Für eine 100 % D_2O -Lösung ist $a = -4,2911$, $b = -164,97$ und $c = 174,24$.

Dies ergibt für den Viskositätskoeffizienten bei 283 K $\eta = 1,67 \text{ kg}/(\text{cm s})$ und bei 25 °C $\eta = 1,09 \text{ kg}/(\text{cm s})$. Mit der Stokes-Einstein-Gleichung

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r}$$

wurde der Diffusionskoeffizient von HDO mit Hilfe der Gleichung

$$D_{283} = \frac{T_{283} \cdot \eta_{298} \cdot D_{298}}{T_{298} \cdot \eta_{283}}$$

bei 283 K zu $1,18 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ berechnet. Aus diesem Diffusionskoeffizienten kann dann die jeweilige Gerätekonstante, in Abhängigkeit von der jeweils verwendeten Pulssequenz, durch den Vergleich mit der gemessenen HDO-Diffusionskonstante bestimmt werden. Die sonst übliche Berechnung der Gradientenstärke in G^2/cm^2 war in diesem Fall nicht sinnvoll, da für die Gradientenpulse kein Rechtecksignal mit konstanter Gradientenstärke verwendet wurde.

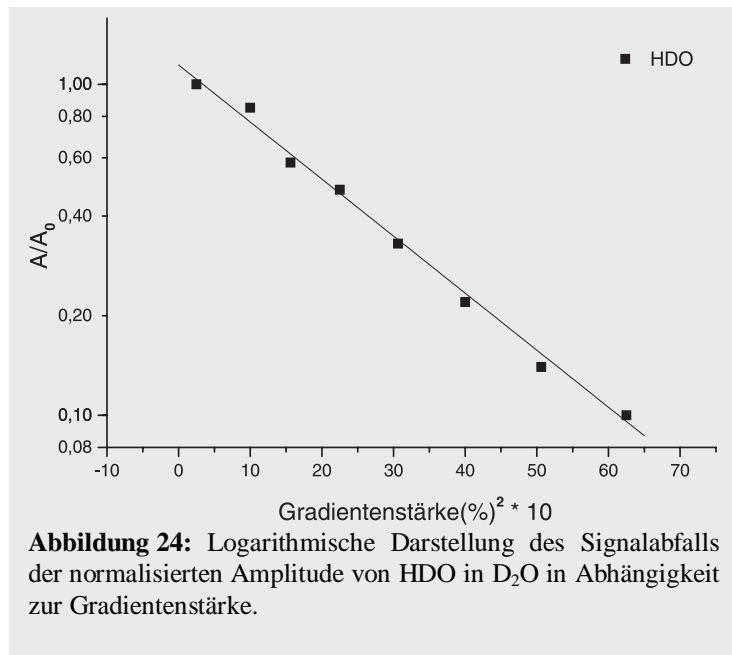
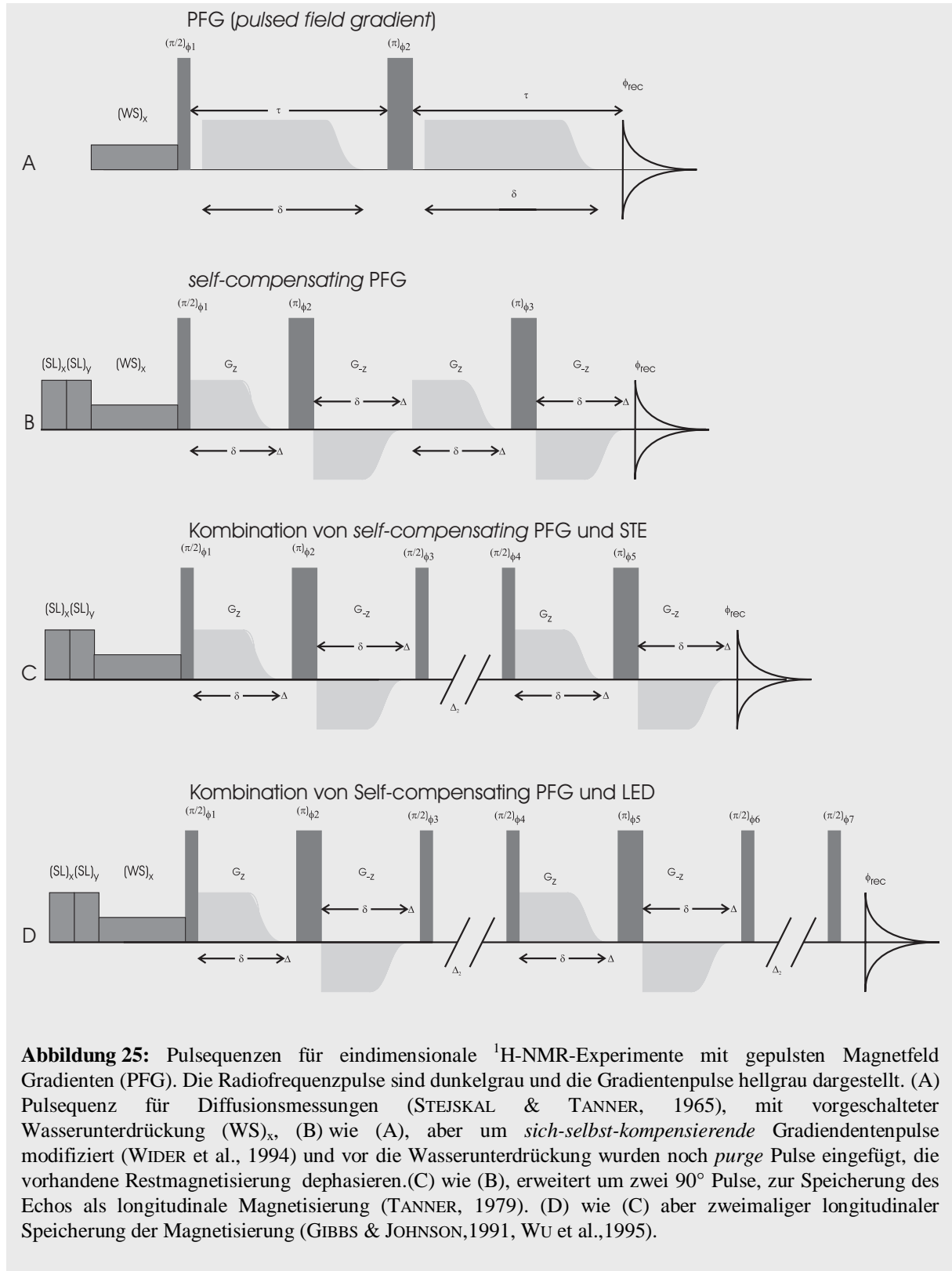


Abbildung 24: Logarithmische Darstellung des Signalabfalls der normalisierten Amplitude von HDO in D_2O in Abhängigkeit zur Gradientenstärke.

3.1.2.2 Auswahl und Optimierung der Pulsprogramme

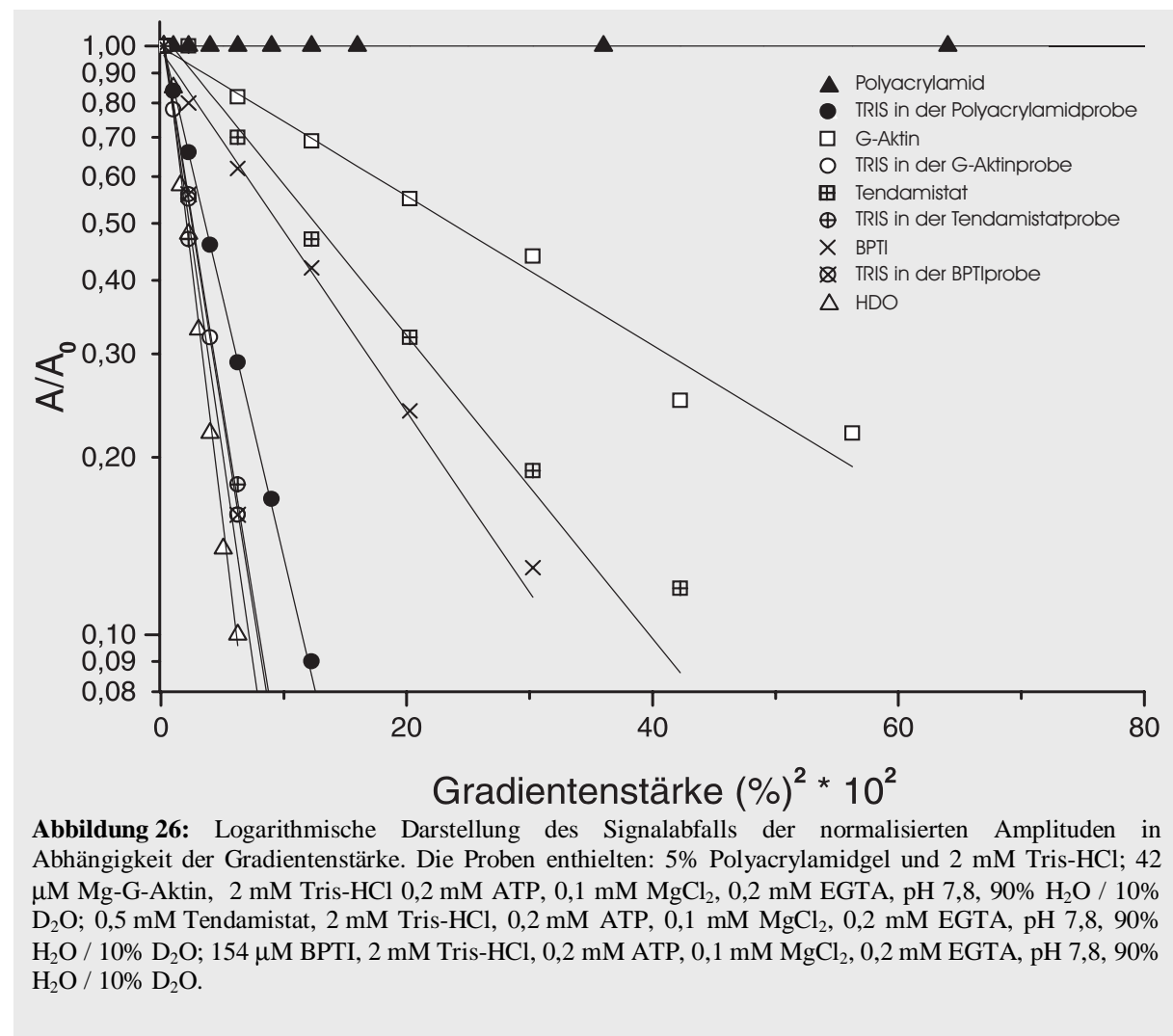
Die ursprüngliche *puls gradient spin echo* (PGSE) Sequenz von STEJSKAL und TANNER (1965) ist sehr gut für kleine Moleküle geeignet und wird intensiv zur Messung von Diffusionskoeffizienten in Flüssigkeiten und Gasen angewendet (Abbildung 25A). Bei den hier untersuchten Proteinen bereiteten die durch die hohen Gradientenstärken verursachten Wirbelströme und die durch transversale Relaxation während der Diffusion stark abklingende Magnetisierung sehr große Probleme. Eine Verbesserung bezüglich der Wirbelströme konnte durch die Einführung von bipolaren Gradientenpulsen (WIDER et al., 1994) erzielt werden (Abbildung 24B). Durch die abgesehen vom Vorzeichen identischen Gradientenpulse werden Wirbelstromeffekte weitgehend kompensiert. Für Aktin ist T_1 sehr viel größer als T_2 , so daß das Signal/Rausch-Verhältnis durch die temporäre Speicherung der transversalen Magnetisierung durch zwei 90° -Pulse als longitudinale Magnetisierung im Stimulierten-Echo-PFG-Experiment (STE) deutlich verbessert werden konnte (TANNER, 1970, Abbildung 25C). Der Vorteil dieser Methode ist, daß die Magnetisierung noch nicht ganz ausrelaxiert ist und man auch für große Moleküle die notwendigen langen Diffusionszeiten realisieren kann. Die nicht ganz kompensierbaren Wirbelströme störten die Phase vor der Detektion des FIDs. Eine zusätzliche Wartezeit von ungefähr 100 ms minimierte diese Effekte, führte aber zu einem nicht akzeptablen Signalverlust. Das LED-Experiment von GIBBS und JOHNSON (1991), ein weiterentwickeltes STE-Experiment, speichert vor der Detektion bis zum Abklingen der Wirbelströme das Echo ein zweites Mal als longitudinale Magnetisierung. Dadurch konnte der Signalverlust während der Abklingzeit der Wirbelströme erheblich verringert werden.

Ursprünglich wurde diese Puls-Sequenz für die älteren Spektrometer mit langen Abklingzeiten entwickelt. Für die modernen Spektrometer mit Abklingzeiten unter 1 ms sollte dies wegen der aktiv abgeschirmten Spulen, modellierten Pulsen und der Gradienten-Vorverstärkung nicht mehr erforderlich sein. Nur die Kombination dieser Techniken in der BPPLIED-Pulsequenz (WU et al., 1995) führte bei extrem großen Molekülen wie polymerem F-Aktin auswertbaren Spektren (Abbildung 24D).



3.1.2.3 Bestimmung der Diffusionskoeffizienten verschiedener Proteine

Wird die Gradienteneinheit ganz abgeschaltet, stellt sich ein undefinierter Zustand ein und die Integrale der Signale sind nicht reproduzierbar. Deshalb wurde jeweils das Spektrum bei 1 % der maximalen Gradientenstärke als Referenz gewählt. Abbildung 26 zeigt die Signalreduktion für die normalisierten Amplituden für Polyacrylamid (stationär), Mg²⁺-G-Aktin (M_r = 42,6 kD), Tendamistat (M_r = 10,8 kD), BPTI (M_r = 6,5 kD) und HDO (M_r = 0,019 kD) bei der Verwendung der mit *purge*-Pulsen modifizierten BPPLIED-Pulssequenz. Zur Kalibrierung diente HDO. Im Verlauf der Messungen zeigte sich, daß bei sehr starken Gradientenpulsen die Instabilitäten der Gradienteneinheit und die nicht vollständig kompensierten Wirbelströme einen Signalabfall vortäuschen. Als Referenz für ein „stationäres Molekül“ wurde im NMR-Röhrchen polymerisiertes Polyacrylamid verwendet. Idealerweise sollte die Signalintensität für Polyacrylamid unabhängig von der Gradientenstärke sein. Besonders bei den einfacheren Pulsprogrammen war jedoch auch für Polyacrylamid ein Amplitudenabfall bei starken Gradienten zu beobachten. Aus diesem Grund war es notwendig zu überprüfen, ob der Signalabfall diffusionsbedingt oder ein Messartefakt ist. Es fällt auf, daß mit steigender Masse



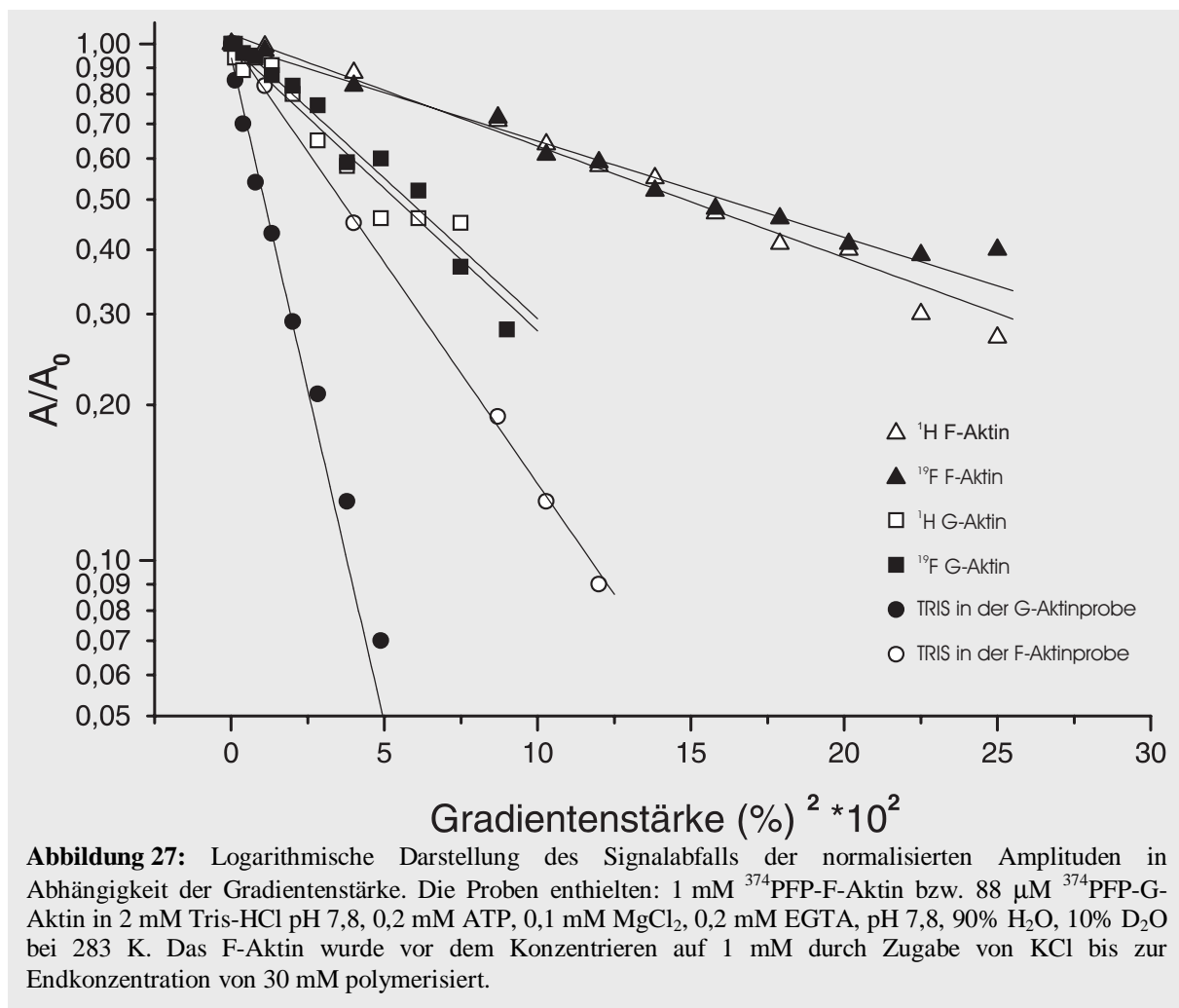
der untersuchten Spezies eine immer stärkere Streuung zu beobachten ist. Dies ist zum einen auf die oben genannten Instabilitäten der Gradienteneinheit des Spektrometers zurückzuführen, zum anderen aber auch darauf, daß die großen Proteine schneller relaxieren. Damit ist ein schlechteres Signal/Rausch-Verhältnis verbunden, und die Auswertung der Integrale ist mit einem größeren Fehler behaftet. Abbildung 26 zeigt deutlich, daß ab ungefähr 63 % (bzw. 4000 %² in Abbildung 26) der absoluten Gradientenstärke für BPTI und Tendamistat die Abweichung größer wird und für Aktin aufgrund des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses außerdem noch eine statistische Streuung überlagert ist.

Weiterhin wurde noch die Amplitudenabschwächung von Tris-HCl in der jeweiligen Probe aufgetragen. Ursprünglich sollte über dieses Signal eine Viskositätskorrektur durchgeführt werden. Mit der Annahme, daß sich die Viskosität in der Probe für Tris-HCl und das Protein im gleichen Maß verändert, lässt sich mit $D_{\text{Protein}}/D_{\text{Tris-HCl}}$ ein relativer Diffusionskoeffizient D_{rel} berechnen, der unabhängig von der Viskosität in der jeweiligen Probe ist. Bei der Auswertung stellte sich jedoch heraus, daß Tris-HCl über unspezifische Bindungen mit manchen Proteinen interagiert und die sich daraus ergebenden D_{rel} -Werte verfälscht sind.

Innerhalb eines sehr engen Bereichs korrelierte der Diffusionskoeffizient gut mit der molaren Masse. Die molare Masse von Tendamistat konnte mit den gemessenen Diffusionskonstanten und der molaren Masse von BPTI als Referenz relativ genau mit Gleichung (7) berechnet werden. Wurde die molare Masse von G-Aktin nach derselben Gleichung berechnet, erhielt man je nach Referenz 66,5 kDa oder 99,0 kDa. Das G-Aktin wäre dimerisiert gewesen. Dieses Ergebnis entsprach nicht den Erwartungen, da die anderen spektroskopischen Daten, wie z.B. die Linienbreiten, auf ein monomeres Protein deuteten. Es konnte zwar nicht ausgeschlossen werden, daß ein kleiner Anteil des Proteins zu Dimeren und Trimeren oligomerisiert ist. Dadurch konnte der gemittelte Diffusionskoeffizient jedoch nicht so stark beeinflusst werden. Ein Vergleich mit Literaturdaten ähnlich großer Proteine zeigte, daß deren Diffusionskoeffizient im selben Bereich von ca. $0,8 * 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ lag und das Aktin als Monomer vorlag (Tabelle 2).

3.1.2.4 Vergleich der Diffusionskoeffizienten von Mg^{2+} -G- und Mg^{2+} -F-Aktin

Das ursprüngliche Experiment, der direkte Vergleich des in Abschnitt 3.1 identifizierten N-Terminus mit dem fluormarkierten C-Terminus, war mit dem zur Verfügung stehenden BRUKER AMX 500 Spektrometer nicht realisierbar. Wie schon in Abschnitt 3.1.1.1 festgestellt wurde, war das Signal/Rausch-Verhältnis der Fluormarkierung an Cys 374 nach der Polymerisation durch die schnelle transversale Relaxation so gering, daß es nicht möglich war, mit dem vorhandenen 10 A-Verstärker der Gradienteneinheit ausreichend kurze und entsprechend starke Gradientenpulse zu erzeugen. Die Messungen der 1H -NMR- und ^{19}F -NMR-Messungen wurden deshalb im Applikationszentrum der Firma BRUKER in Karlsruhe durchgeführt. Dort stand ein hochauflösendes BRUKER DMX 500 Spektrometer und ein Probenkopf mit aktiv abgeschirmten Gradientenspulen für die x-, y- und z-Koordinaten zur Verfügung. Für die Erzeugung der Gradientenpulse kamen 40 A-Verstärker von BRUKER zum Einsatz.



Aufgrund der im vorigen Abschnitt erwähnten Einschränkungen bezüglich der quantitativen Bestimmung des Diffusionskoeffizienten stand bei diesen Experimenten der strukturelle Aspekt im Vordergrund. Aus Abbildung 27 lassen sich zwei qualitative Ergebnisse ablesen: Erstens konnte ausgeschlossen werden, daß das N-terminale Signal von einem Proteinfragment stammt. Mit dem Fluorsignal wurde die Translation des C-Terminus und mit dem Protonensignal die des N-Terminus gemessen, und beide zeigten die gleiche Abhängigkeit von der Gradientenstärke. Der Signalabfall wäre bei zwei Proteinfragmenten für jeden Kern aufgrund der unterschiedlichen Massen verschieden, und die Fragmente dürften, abgesehen von der durch die höhere Proteinkonzentration verursachten höheren Viskosität, nicht durch die Polymerisation beeinflusst werden. Zweitens kann man die Ergebnisse so interpretieren, daß die PFP-Markierung von Aktin an Cys 374 die Polymerisation nicht oder nur kaum beeinflusst. Wenn die Markierung die Polymerisation verhindern würde, müßte die Kurve für $^{19}\text{F-Mg}^{2+}$ -F-Aktin den gleichen Verlauf wie für die beiden G-Aktin-Messungen zeigen.

Ein Aktinfilament setzt sich normalerweise aus 300 bis zu über 4 000 Monomereinheiten zusammen, und eine entsprechend große molare Masse für das Filament wurde erwartet. Der sich aus den Messungen ergebende Diffusionskoeffizient von $0,34 * 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ entspricht unter der sicher nicht zutreffenden Annahme eines kompakten globulären Moleküls nur ungefähr 17 Untereinheiten. Eine mögliche Erklärung wäre, daß für F-Aktin nicht die Diffusion, sondern die in der Einleitung erwähnte ondulierende Bewegung des Aktins in einer virtuellen Röhre gemessen wurde. Diese Interpretation wird auch durch den Vergleich der Daten von F-Aktin und mit Phalloidin stabilisiertem F-Aktin gestützt (Daten nicht gezeigt). Der kleinere Diffusionskoeffizient für die stabilisierten Filamente lässt sich sowohl mit einer eingeschränkten Beweglichkeit quer zur Filamentachse als auch mit einer Verlängerung der durchschnittlichen Filamentgröße erklären. Allerdings zeigen fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Rhodamin-Phalloidin-stabilisiertem Aktin (KÄS et al., 1996) einen von der Filamentlänge unabhängigen Diffusionskoeffizient für die Filamente in den nematischen Phasen. Die dafür notwendigen Konzentrationen über $60 \mu\text{M}$ wurden bei den vorliegenden Versuchen um Größenordnungen überschritten.

	D [cm ² /s]	M _r [kDa]
HDO ^{a)}	1,18 x 10 ⁻⁵	0,019
BPTI ^{a)}	2,11 x 10 ⁻⁶	6,5
Ubiquitin ^{b,c)}	1,73 x 10 ⁻⁶	8,6
Tendamistat ^{a)}	1,76 x 10 ⁻⁶	10,8
Lysozym ^{c)}	1,34 x 10 ⁻⁶	14,0
Lysozym ^{b)}	1,08 x 10 ⁻⁶	14,0
MCP-1 ^{b)}	1,08 x 10 ⁻⁶	17,4 (Dimer)
Interleukin 10 ^{b)}	0,82 x 10 ⁻⁶	37,2 (Dimer)
Maltose binding protein ^{c)}	0,83 x 10 ⁻⁶	40,0
G-Aktin ^{d)}	0,57 x 10 ⁻⁶	42,6
G-Aktin ^{a)}	0,87 x 10 ⁻⁶	42,6
G-Aktin ^{a)} (¹⁹ F-NMR)	0,86 x 10 ⁻⁶	42,6
F-Aktin ^{a)}	0,34 x 10 ⁻⁶	
F-Aktin ^{a)} (¹⁹ F-NMR)	0,29 x 10 ⁻⁶	
F-Aktin ^{e)}	7,70 x 10 ⁻¹⁰	

Tabelle 2: Diffusionskoeffizienten a) Im Rahmen dieser Arbeit bei 283 K durchgeführte Messung, b) ALTIERI et al., 1995, c) EKIEL et al., 1997, 303 K. MCP-1 und IL-10 liegen als Dimer vor. d) TAIT & FRIEDEN, 1982^{b)}. e) KÄS et al., 1996. Alle Diffusionskoeffizienten außer d) und e) wurden mittels NMR-Spektroskopie bestimmt.

3.1.3 Austausch des zweiwertigen Ions durch Dialyse

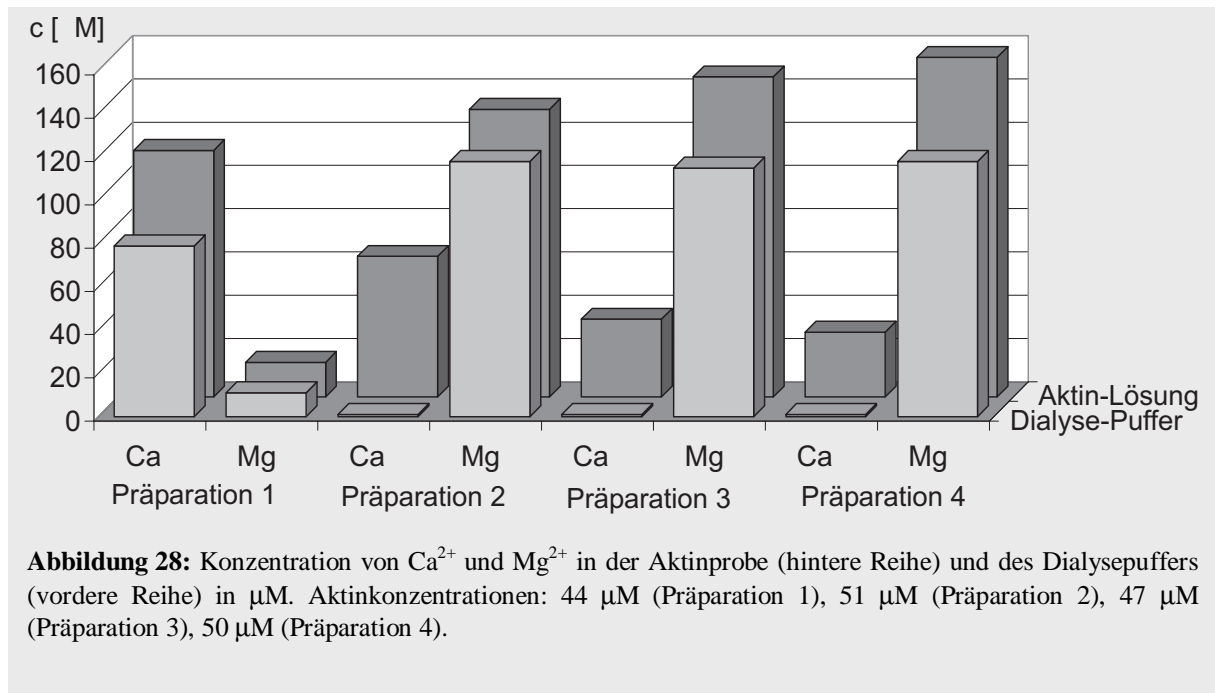
Während der Präparation werden die Muskeln homogenisiert, so daß am Ende im Aceton-Trockenpulver ein undefiniertes Gemisch an Ca^{2+} -Aktin und Mg^{2+} -Aktin vorliegt. Dieses Trockenpulver diente als Ausgangsmaterial für die eigentliche Aktinpräparation. Bei den anschließenden NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden bei der Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin immer wieder Schwankungen von Präparation zu Präparation festgestellt. Da bekannt war, daß das gebundene zweiwertige Ion an der hochaffinen Bindungsstelle einen Einfluss auf die Struktur des Filaments hat, stellte sich die Frage, ob die Dialyse während der Präparation effektiv genug war, um Ca^{2+} vollständig gegen Mg^{2+} auszutauschen.

Die Aktinpräparationen wurden auf vier verschiedenen Wegen durchgeführt:

- 1) Standardpräparation nach PARDEE & SPUDICH (1982) mit Ca^{2+} -G-Puffer: 2 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,1 mM CaCl_2 , 0,2 mM ATP, 0,002% NaN_3 .
- 2) wie 1) und anschließender 24stündiger Dialyse mit Mg^{2+} -G-Puffer: 2 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,1 mM MgCl_2 , 0,2 mM ATP, 0,002% NaN_3 , 0,2 mM EGTA.
- 3) wie 1) und anschließender zweimaliger 24stündiger Dialyse mit Mg^{2+} -G-Puffer
- 4) mit Mg^{2+} -G-Puffer (HEINTZ et al., 1996)

Die Gesamtkonzentrationen von Ca^{2+} und Mg^{2+} wurden mittels Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt (Abbildung 28). Durch den in allen Präparationen enthaltenen Polymerisationsschritt mit 0,1 mM MgCl_2 wird durch unspezifische Bindungen an intermediäre Bindungsstellen des Proteins zwischen 10 bis 20 μM Mg^{2+} in die Dialyse übertragen. Die gegenüber den Erwartungen zu geringe Konzentration von Ca^{2+} -Ionen im Dialysepuffer ist auf Adsorptionseffekte an die Glaswand des Dialysegefäßes zurückzuführen. Die höheren Gesamtkonzentrationen in den Proteinlösungen im Vergleich zum Dialysepuffer ergeben sich durch die Addition von gebundenen und freien Ionen.

Unerwartet hoch dagegen war der Gehalt an Calciumionen in den drei Mg^{2+} -Aktinproben. Abbildung 28 zeigt deutlich, daß in Gegenwart von EGTA der Transport von Ca^{2+} -Ionen durch die Dialysemembran behindert war. Eine mögliche Erklärung wäre, daß der Austausch von komplexiertem EGTA durch die Dialysemembran trotz einer Ausschlußgrenze von 12 kD stark verringert war und die Dialyse von freiem Ca^{2+} aufgrund des extrem geringen Konzentrationsgefälles nicht mehr stattfand.



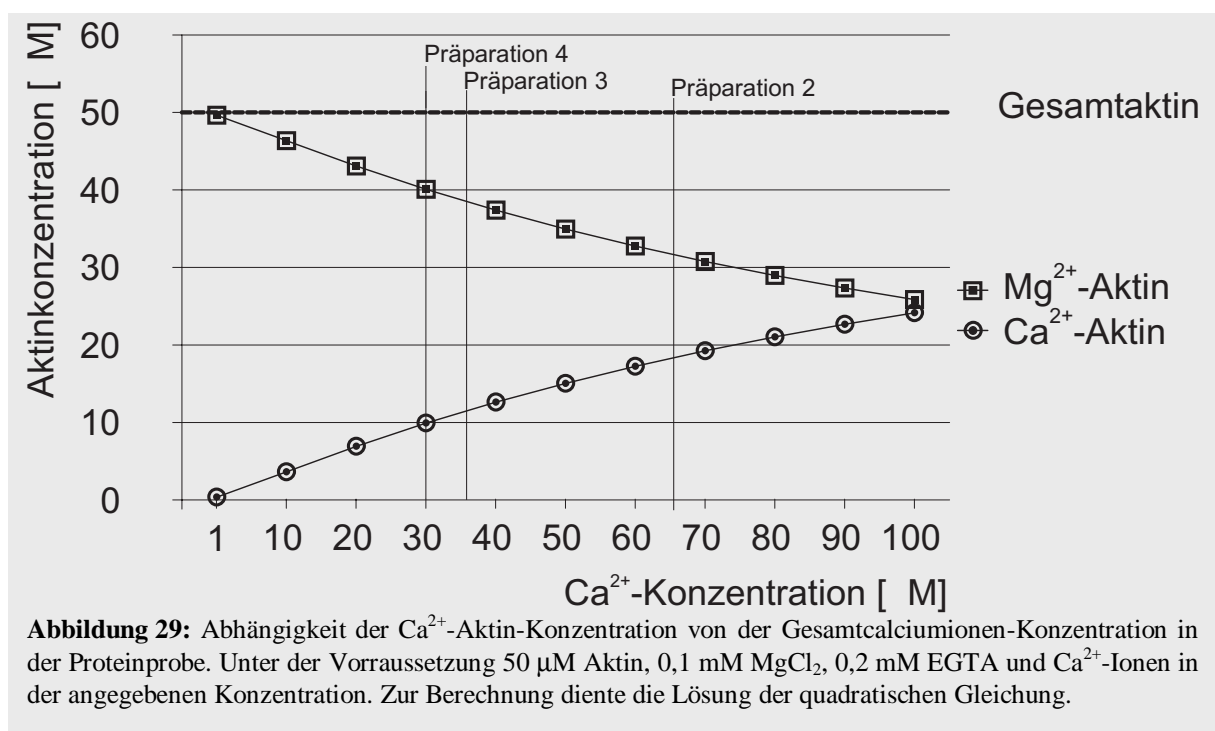
Für die Berechnung des sich daraus ergebenden Ca^{2+} -Aktin-Anteils wurde eine Gleichung von REINSTEIN (1990) verwendet. Die ursprüngliche Gleichung ergibt sich direkt aus dem Massenwirkungsgesetz und beschreibt die Bindung eines Liganden an ein Enzym. Im konkreten Fall mußte die Dissoziationskonstante noch um die konkurrierenden Einflüsse von Mg^{2+} auf Aktin und von EGTA auf Ca^{2+} korrigiert werden. Die Gleichung gilt allerdings nur, wenn die Konzentrationen für Mg^{2+} und EGTA sehr viel größer als für Ca^{2+} sind und sich nicht verändern. Dies war unter den Dialysebedingungen gegeben.

$$[ACa] = \frac{[A_0] + [Ca_0] + K_{Ca} \left(1 + \frac{[EGTA_0]}{K_{EGTA}} + \frac{[Mg_0]}{K_{Mg}} \right)}{2} - \sqrt{\left(\frac{[A_0] + [Ca_0] + K_{Ca} \left(1 + \frac{[EGTA_0]}{K_{EGTA}} + \frac{[Mg_0]}{K_{Mg}} \right)}{2} \right)^2 - [A_0] \cdot [Ca_0]}$$

- $[A_0]$ = Gesamtkonzentration Aktin
- $[ACa]$ = Konzentration von Ca^{2+} -Aktin
- $[Ca_0]$ = Gesamtkonzentration Ca^{2+}
- $[Mg_0]$ = Gesamtkonzentration Mg^{2+}
- $[EGTA_0]$ = Gesamtkonzentration EGTA
- K_{Ca} = Dissoziationskonstante Aktin-Calcium
- K_{Mg} = Dissoziationskonstante Aktin-Magnesium
- K_{EGTA} = Dissoziationskonstante EGTA-Magnesium

Die aus der Literatur entnommenen Werte für die Dissoziationskonstanten (SCHWARZENBACH & FLASCHKA, 1965) wurden mit Hilfe des Programms WinMAXC auf Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke der Dialyse korrigiert (BERS, 1994).

In Abbildung 29 ist grafisch die Verteilung von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Aktin in Abhängigkeit vom Restgehalt an Ca^{2+} am Beispiel einer $50 \mu\text{M}$ Proteinlösung dargestellt. Danach enthielt das einmal dialysierte Aktin 36 % Ca^{2+} -Aktin, das zweimal dialysierte Aktin 24 % Ca^{2+} -Aktin und das in Mg^{2+} -Puffer präparierte Aktin noch etwa 20 % Ca^{2+} -Aktin. Sollte die Calciumionen vollständig entfernt werden, mußte nach der Dialyse auf jeden Fall noch eine Gelfiltration durchgeführt werden.



3.1.4 Mg^{2+} bindet an den N-Terminus von Aktin

Aus vorhergehenden Versuchen war die Korrelation von Mg^{2+} -Konzentration und der Intensität des Signals bei 2,048 ppm bekannt. Die Zuordnung dieses Signals zur N-terminalen Acetylgruppe von Aktin legte den Schluß nahe, daß sich in der Nähe des N-Terminus eine Bindungsstelle für Mg^{2+} befindet.

Die Affinität von Mg^{2+} zum N-Terminus wurde in einer Gleichgewichtstitration mit 90 μM Mg^{2+} -F-Aktin bestimmt. Zur Gleichgewichtseinstellung wurde vor jeder Messung 30 Minuten inkubiert. In Abbildung 30 ist die Signalabschwächung des N-terminalen Acetylrestes in Abhängigkeit der Magnesiumionenkonzentration aufgetragen. Die Titrationspunkte werden durch eine quadratische Gleichung (siehe Anhang) beschrieben (REINSTEIN et al., 1990). Es wurde nur die Resonanz der N-terminalen Acetylgruppe ausgewertet, so daß die einfachste Interpretation der Daten eine 1:1-Bindungsstöchiometrie mit einer Dissoziationskonstante von $2,8 \pm 0,2$ mM für die Interaktion zwischen dem N-Terminus des Aktins und dem Mg^{2+} war. Es kann aber anhand der Daten nicht ausgeschlossen werden, daß es mehrere N-terminale Bindungsstellen mit gleicher Dissoziationskonstante für Mg^{2+} gibt. Um die Bindungsstöchiometrie sicher zu bestimmen, sollte die Proteinkonzentration im Bereich der K_D liegen. Diese hohen Aktinkonzentrationen sind aber nicht realisierbar. Nicht unerwartet ist die Abweichung der bestimmten Dissoziationskonstante von dem Literaturwert (10 mM, Sheterline et al., 1996), der die mittlere Dissoziationskonstante aller niederaffinen Bindungsstellen ist. Sicher ausschließen kann man, daß in der Nähe des N-Terminus weitere Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität titriert wurden. In diesem Fall würde die Titrationskurve einer Treppenfunktion entsprechen.

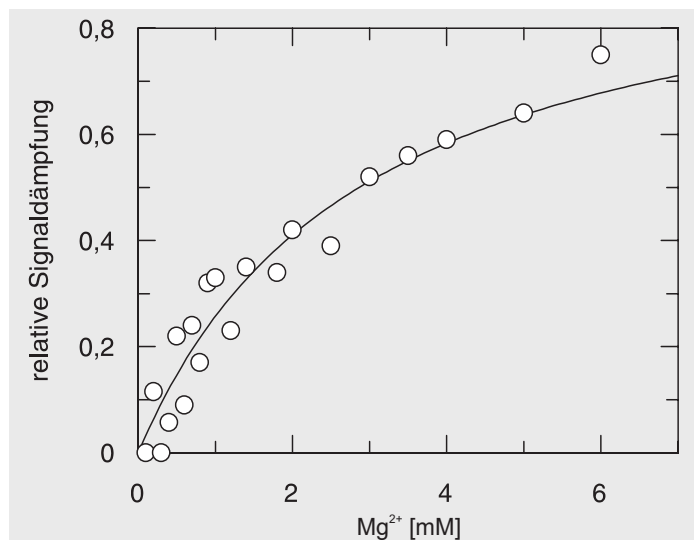
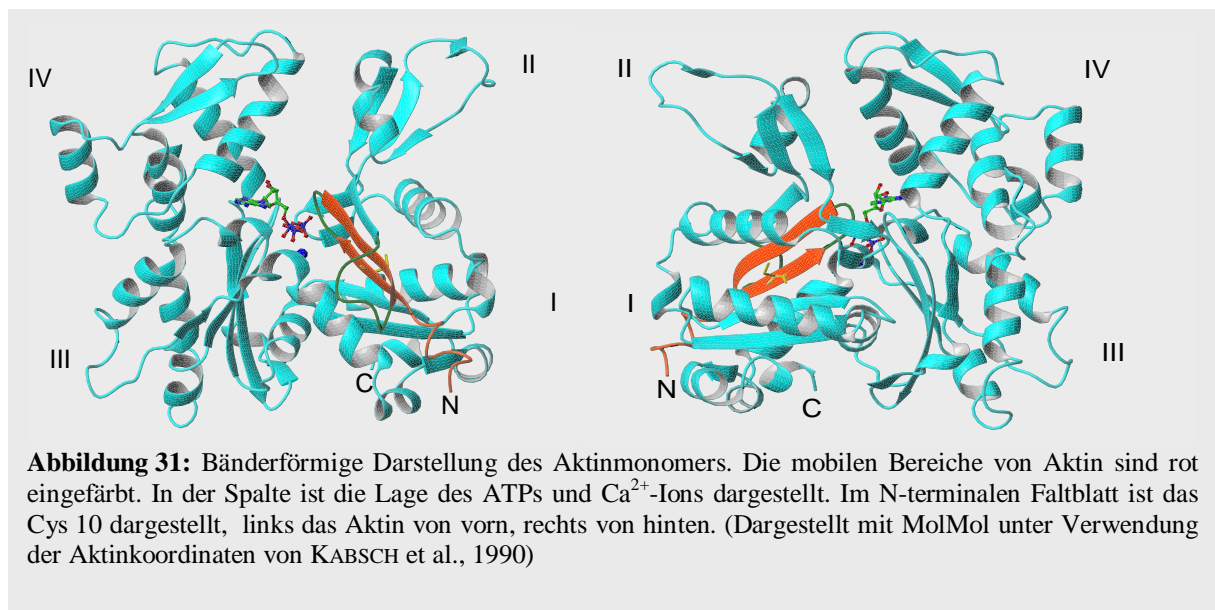


Abbildung 30: Bindung von Mg^{2+} an Aktin. Die Titrationsdaten können durch eine quadratische Gleichung beschrieben werden (siehe Anhang). Die Daten entsprechen einer Bindungsstöchiometrie von 1:1 und einem K_D von $2,8 \pm 0,2$ mM für die Interaktion von Aktin und Magnesium. Die Probe enthielt 90 μM Mg^{2+} -F-Aktin, 2 mM Tris-HCl pH 7,8, 30 mM KCl, 0,2 mM EGTA, 0,2 mM ATP und die angegebenen Konzentrationen an $MgCl_2$ bei 283 K.

3.1.5 ^{10}PFP -Aktin

Unter Standardbedingungen ist im monomeren Aktin von den fünf vorhandenen SH-Gruppen nur diejenige von Cys 374 exponiert (ELZINGA & COLLINS, 1975, BLACKHOLM & FAULSTICH, 1981). Durch die Überführung von ATP-G-Aktin in ADP-G-Aktin wird die SH-Gruppe von Cys 10 zugänglich (DREWES & FAULSTICH, 1991). Wie Abbildung 31 zeigt befindet sich dieses Cystein weit im Inneren von Subdomäne I. Eine neuere Methode Cys 10 freizulegen bestand darin, das an der hochaffinen Bindungsstelle gebundene Ca^{2+} -Ion durch ein Mg^{2+} -Ion zu ersetzen. Abbildung 32a zeigt, daß in Mg^{2+} -G-Aktin zwei Cysteine für ODNB zugänglich sind. Wurde, wie in $^{374}\text{NEM-Mg}^{2+}$ -G-Aktin, das Cys 374 durch NEM blockiert, war noch Cys 10 exponiert und konnte mit ODNB umgesetzt werden. Das am Aktin gebundene Nukleotid (ATP oder ADP) beeinflusst nur die Reaktionsgeschwindigkeit, nicht aber die Stöchiometrie (Abbildung 32b). Auch im Aktinfilament bleibt das Cys 10 zugänglich. Dies stimmt auch mit den 2D-NMR-Untersuchungen überein, die zeigten, daß der Austausch der Ionen die Mobilität der ersten 25 Aminosäuren im F-Aktin erhöht. Höhere Ionenstärke (Abbildung 32c) oder die Gegenwart von Ca^{2+} (Abbildung 32d) verringerte die Reaktionsgeschwindigkeit.



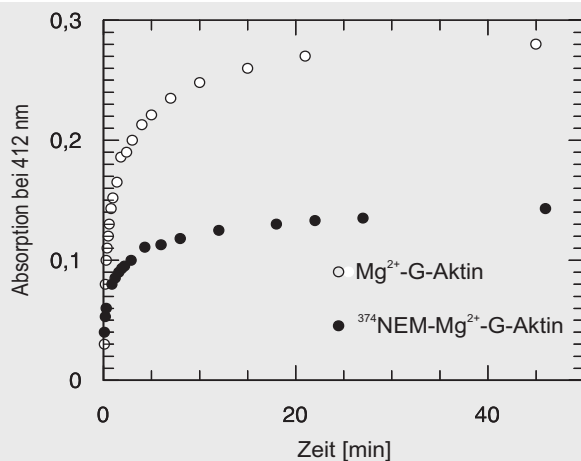


Abbildung 32a: Bindung von Oktyl-5-dithio-2-nitrobenzoesäure (ODNB) an Cysteine in Mg^{2+} -G-Aktin und ^{374}NEM - Mg^{2+} -G-Aktin. Jeweils 10 μM Aktin, in 2 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,2 mM ATP, 0,1 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EGTA wurde bei 277 K mit dem zwanzigfachen Überschuß ODNB inkubiert. Die Reaktion wurde photometrisch bei 412 nm verfolgt

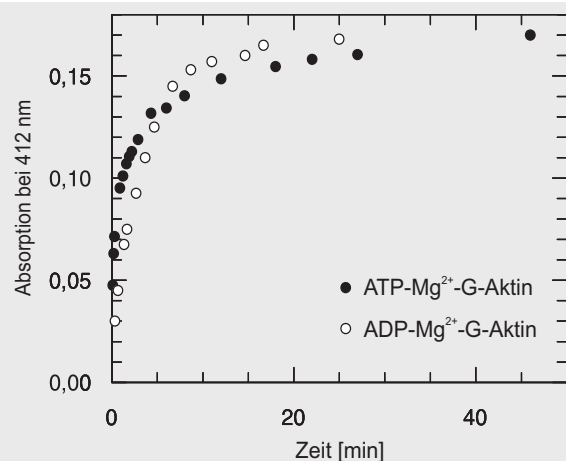


Abbildung 32b: Bindung von ODNB an Cysteine in ^{374}NEM -ATP- Mg^{2+} -G-Aktin und ^{374}NEM -ADP- Mg^{2+} -G-Aktin. Jeweils 12 μM Aktin, in 2 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,2 mM ATP bzw. ADP, 0,1 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EGTA wurde bei 277 K mit dem zehnfachen Überschuß ODNB inkubiert. Die Reaktion wurde photometrisch bei 412 nm verfolgt.

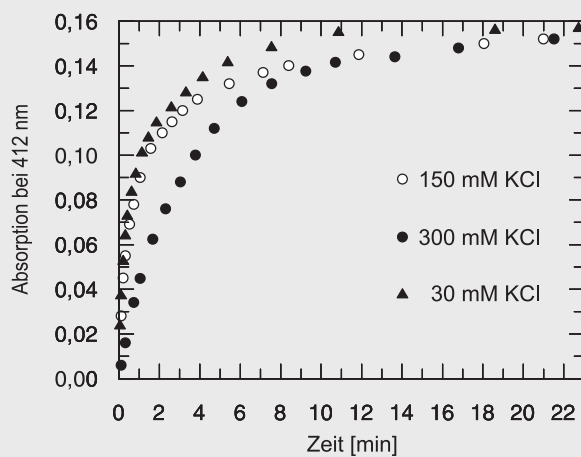


Abbildung 32c: Bindung von ODNB an Cystein 10 in ^{374}NEM - Mg^{2+} -F-Aktin, polymerisiert mit den oben angegebenen Konzentrationen KCl. Jeweils 11 μM Aktin, in 2 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,2 mM ATP, 0,1 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EGTA wurde bei 277 K mit dem zehnfachen Überschuß ODNB inkubiert. Die Reaktion wurde photometrisch bei 412 nm verfolgt.

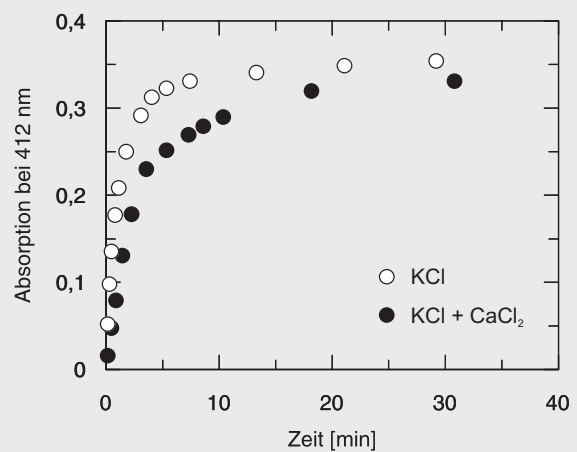


Abbildung 32d: Bindung von ODNB an Cystein 10 in ^{374}NEM - Mg^{2+} -F-Aktin, polymerisiert mit 30 mM KCl bzw. mit 30 mM KCl und 1 mM $CaCl_2$. Jeweils 25 μM Aktin, in 2 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,2 mM ATP, 0,1 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EGTA wurde bei 277 K mit dem zehnfachen Überschuß ODNB inkubiert. Die Reaktion wurde photometrisch bei 412 nm verfolgt.

3.1.5.1 Selektive Markierung von Cys 10 mit PFP in Mg^{2+} -G-Aktin

Durch die unterschiedlichen Eigenschaften des Aktins bezüglich Cys 374 und Cys 10 in Abhängigkeit des gebundenen zweiwertigen Ions in der Spalte konnte selektiv Cys 10 mit dem PFP-Label markiert werden.

Zuerst wurde im Ca^{2+} -G-Aktin das Cys 374 durch NEM blockiert. Das $^{374}NEM-Ca^{2+}$ -G-Aktin wurde dann in $^{374}NEM-Mg^{2+}$ -G-Aktin überführt. Wie die Abbildungen 32a und 32b zeigen, waren in Mg^{2+} -G-Aktin zwei Cysteine und in $^{374}NEM-Mg^{2+}$ -G-Aktin nur ein Cystein zugänglich. Diese frei zugängliche Thiolfunktion wurde selektiv mit PFP markiert.

3.1.5.2 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Myosin S1-dekoriertem $^{10}PFP-Mg^{2+}$ -Aktin

Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen wurde überprüft, ob das Aktin nach den Modifikationen an Cys 10 mit PFP und an Cys 374 mit NEM noch polymerisierbar war und mit Myosin S1 dekoriert werden konnte. Durch die beiden Modifikationen an den Cysteinen wird die kritische Konzentration für die Polymerisation erhöht. Wie die elektronenmikroskopischen Bilder im Gegensatz zur 1H -NMR-Spektroskopie zeigten, war die Endkonzentration von 30 mM KCl nicht ausreichend, um das Aktin zu polymerisieren. Erst durch die Zugabe von Phalloidin polymerisierte das Protein (Abbildung 33a). Die Bindung von Myosin S1 an das Filament wird durch die Modifikationen nicht verhindert (Abbildung 33b).

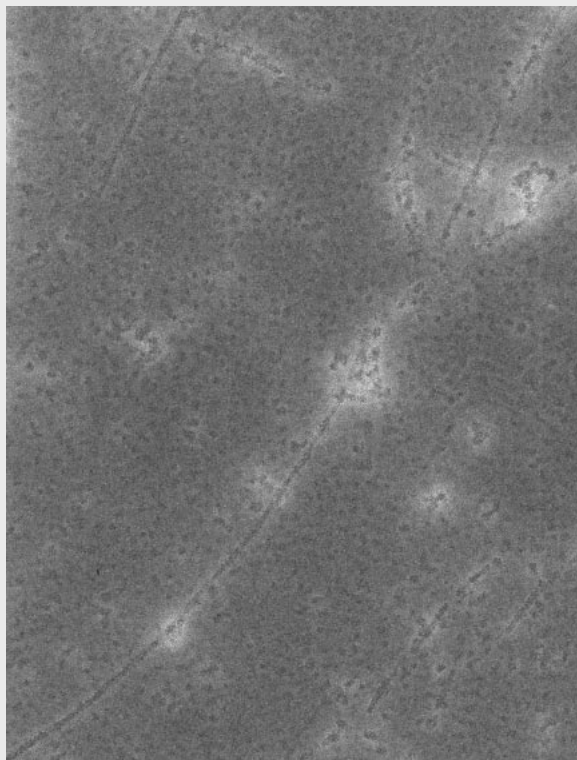


Abbildung 33a: Elektronenmikroskopische Aufnahme von $^{10}PFP-^{374}NEM-Mg^{2+}$ -F-Aktin.

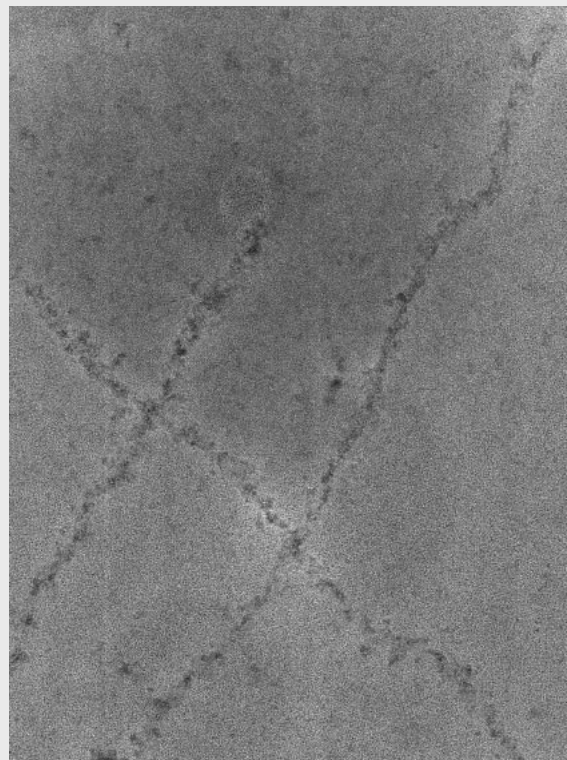


Abbildung 33b: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Myosin S1 dekoriertem $^{10}PFP-^{374}NEM-Mg^{2+}$ -F-Aktin.

3.1.5.3 Titration von $^{10}\text{PFP-Mg}^{2+}\text{-G-Aktin}$ mit F_{ab}

Durch die Markierung am Cys 10 konnten am Aktin weitere Experimente bezüglich des N-Terminus durchgeführt werden.

Im Gegensatz zu $^{374}\text{PFP-Mg}^{2+}\text{-G-Aktin}$ ist für $^{10}\text{PFP-Mg}^{2+}\text{-G-Aktin}$ das ^{19}F -Signal sehr stark verbreitert (Abbildung 13 und Abbildung 35). Eine plausible Erklärung dafür wäre, daß das Cys 10 sich nicht, wie Cys 374, im peripheren Bereich des Aktins befindet, sondern mehr im Inneren der Subdomäne I und durch die Modifizierung im zeitlichen Mittel nicht mehr eine, sondern mehrere Konformationen die N-terminalen Domäne vorliegen.

Abbildung 35 zeigt den Verlauf der Titration von $^{10}\text{PFP-Mg}^{2+}\text{-G-Aktin}$ mit F_{ab} . Im Gegensatz zu dem in Kapitel 3.1.1.2 beschrieben äquivalenten Experiment, bei dem auf Protonen detektiert und konkret das Signal des N-Acetylrestes beobachtet wurde, wurde das ^{19}F -Signal der PFP-Markierung durch die Bindung des Antikörperfragmentes um 12 % reduziert. Wahrscheinlich war die Distanz von 1,1 nm zwischen Ala 7 und dem Cys 10 zu groß und die Bindung des Antikörperfragmentes konnte die Mobilität der Markierung nicht stärker einschränken. Weiterhin muß berücksichtigt werden, daß

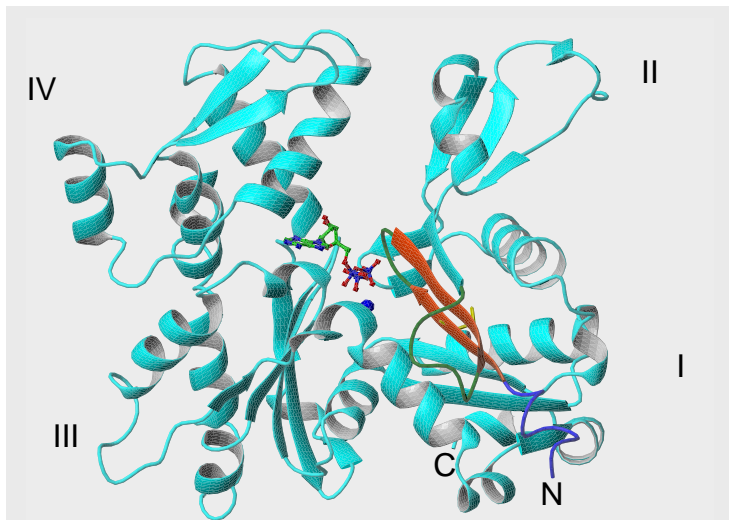


Abbildung 34: Darstellung der Raumstruktur des Aktinmonomers. Blau, orange, grün und dunkelblau hervorgehoben sind die über die 2D-NMR als mobil identifizierten Aminosäurereste. Zusätzlich ist die Seitenkette von Cys 10 gelb abgebildet. Das Antikörperfragment bindet an die ersten sieben Aminosäurereste des N-Terminus (blau). In der Spalte ist das ATP und Mg^{2+} -Ion eingezeichnet.

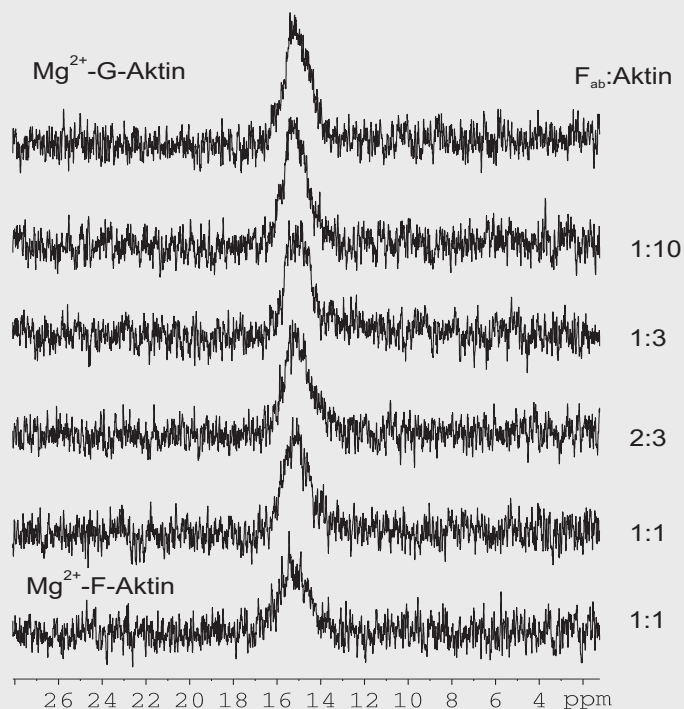


Abbildung 35: ^{19}F -NMR-Spektren der Titration von $^{10}\text{PFP-Mg}^{2+}\text{-G-Aktin}$ mit F_{ab} . $8,4 \mu\text{M}$ $^{10}\text{PFP-Mg}^{2+}\text{-G-Aktin}$ in 2 mM Tris-HCl pH 7,8, $0,2 \text{ mM}$ ATP, $0,1 \text{ mM}$ MgCl_2 , $0,2 \text{ mM}$ EGTA und 1 mM NaN_3 bei 283 K wurde in den angegebenen stöchiometrischen Verhältnissen mit F_{ab} titriert. Der am Ende der Titrationsreihe erhaltene 1:1-Aktin- F_{ab} -Komplex wurde durch Zugabe von KCl bis zur Endkonzentration von 30 mM polymerisiert.

gerade die ersten sieben Aminosäuren, an die das Fragment bindet, aus dem Aktin herausragen und das gebundene Antikörperfragment nicht unbedingt eine Strukturänderung im β -Faltblatt induziert. Eine deutlichere Signalreduktion auf ungefähr 63 % des Ausgangssignals wurde erst durch die Polymerisation zu F-Aktin erreicht. Dies ist ebenfalls in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der ^1H -NMR-Spektroskopie.

3.1.5.4 Mobilität der PFP-Markierung von $^{10}\text{PFP-Mg}^{2+}$ -Aktin im Aktomyosin-Komplex

Cross-linking- und Mutationsexperimente deuten darauf hin, daß das N-terminale Faltblatt in der Subdomäne I von Aktin direkt in die Aktomyosin-Interaktion involviert ist (COOKE et al. 1993, SOLOMON et al., 1988, BERTRAND et al., 1988, ARATA, 1986; SUTOH, 1982). Dieser Bereich ließ sich durch die PFP-Markierung am Cys 10 während der Wechselwirkung mit Myosin S1 beobachten. Abbildung 36 zeigt oben das stark verbreiterte ^{19}F -Signal von $^{10}\text{PFP-Mg}^{2+}$ -G-Aktin. Die Zugabe von KCl bis zur Endkonzentration von 30 mM führte wie bei dem F_{ab} -Experiment zu einer Signalabschwächung auf 71 % des Ausgangssignals. Wie die elektronenmikroskopische Kontrolle zeigte, polymerisierte das chemisch modifizierte Aktin bei dieser Ionenstärke nicht mehr. Erst die anschließende Zugabe von Phalloidin stabilisierte die Aktinfilamente, führte aber nicht zu einer Änderung des ^{19}F -NMR-Signals. Die Signaländerungen sind auf den Konformationswechsel zu dem „aktivierten“ Aktinmonomer zurückzuführen (vgl. Einleitung). Im Gegensatz zur Titrationsreihe mit dem Antikörperfragment wurde die PFP-Markierung durch die Bindung von Myosin S1 an F-Aktin beeinflusst. Die ersten vier Titrationspunkte mit Myosin S1 zeigten eine Korrelation zur zugegebenen Myosin S1-Menge. Diese Spektren entsprechen der schwachen Bindung von Myosin S1.ATP und Myosin S1.ADP. P_i an Aktin. Im weiteren Verlauf der Titration wurde durch die ATPase-Aktivität des entstandenen Aktomyosinkomplexes das ATP vollständig zu ADP hydrolysiert, so daß in der Nukleotid-

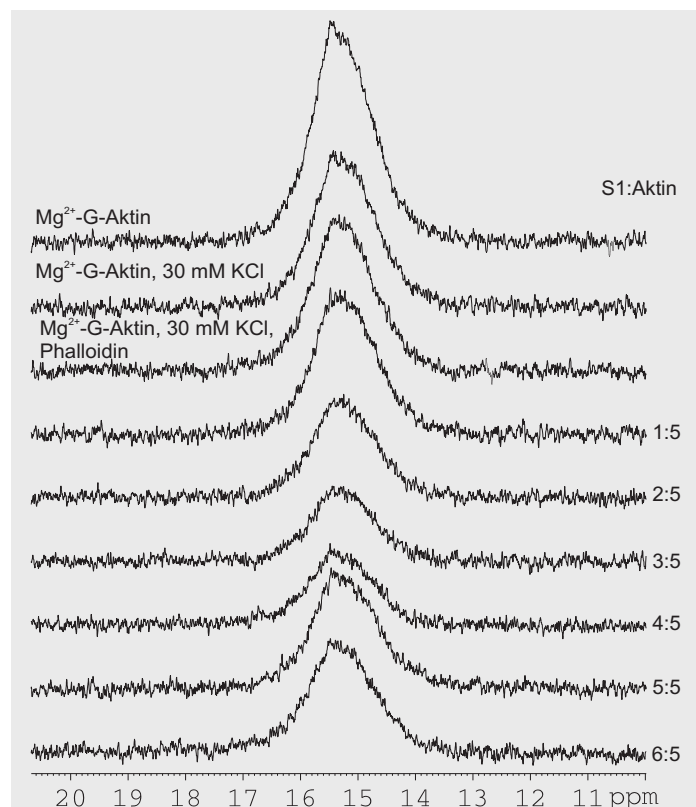


Abbildung 36: ^{19}F NMR Spektren der Titration von $^{10}\text{PFP-Mg}^{2+}$ -G-Aktin mit Myosin S1. $42,6 \mu\text{M}$ $^{10}\text{PFP-Mg}^{2+}$ -G-Aktin in 2 mM Tris-HCl pH 7,8, $0,2 \text{ mM}$ ATP, $0,1 \text{ mM}$ MgCl_2 , $0,2 \text{ mM}$ EGTA und 1 mM NaN_3 bei 283 K wurden durch Zugabe von KCl bis zur Endkonzentration von 30 mM polymerisiert. Das entstandene Filament wurde durch eine äquimolare Menge Phalloidin stabilisiert und mit den angegebenen stöchiometrischen Mengen Myosin S1 titriert.

bindungsstelle des Myosin S1 ADP gebunden war. Die zwei unteren NMR-Spektren entsprechen daher dem ADP-Aktomyosinkomplex. Die Titrationsreihe zeigte, daß im ADP.P_i-Aktomyosinkomplex die Mobilität des PFP deutlich reduziert ist. Dies entspricht einer starken Wechselwirkung von Myosin S1 mit der Region um Cys 10 im β -Faltblatt. Im weiteren Verlauf der Titration erhöhte sich die Signalintensität, erreichte aber nicht mehr den Ausgangswert. Im ADP-Aktomyosinkomplex war die Bindung an das β -Faltblatt um Cys 10 nicht mehr so stark ausgeprägt.

3.1.5.5 Mobilität der N-Acetylgruppe von ¹⁰PFP-Mg-Aktin im Aktomyosin-Komplex

Das Verhalten von ¹⁰PFP-Mg²⁺-Aktin wurde auch mit der ¹H NMR-Spektroskopie untersucht. Die Experimente sollten Aufschluss geben, ob sich das chemisch modifizierte Aktin anders als unmodifiziertes Aktin bezüglich des N-Terminus verhält. ¹⁰PFP-Mg²⁺-Aktin zeigte die bekannten Spektren für Mg²⁺-G-Aktin, Mg²⁺-F-Aktin und Phalloidin-stabilisiertes Mg²⁺-F-Aktin (Abbildung 37). Im nächsten Schritt wurde das stabilisierte F-Aktin mit Myosin S1 im Verhältnis 3:2 dekoriert. Im Gegensatz zu dem ¹⁹F-Signal des markierten Cys 10 war keine Signalabnahme im ¹H-Spektrum für die N-terminale Acetylgruppe während der Interaktion mit Myosin S1 zu erkennen. Die verbliebenen Aktinsignale wurden durch Zugabe von CaCl₂ bis zu einer Endkonzentration von 9,2 mM gequenchet. Das daraus resultierende Spektrum entsprach aktungebundenem Myosin S1 und zeigte bei 2,048 ppm das schwache Signal der N-terminalen Acetylgruppe der leichten Kette 3 des Myosin S1. Eine eindeutige Zuordnung war erst bei 800 MHz möglich (Kapitel 3.4.1). Aufgrund der besseren Auflösung und des besseren Signal/Rausch-Verhältnisses bei 800 MHz werden die Signale der beiden N-Acetylgruppen von Aktin und der leichten Kette 3 von Myosin S1 erst bei höherem Feld aufgelöst.

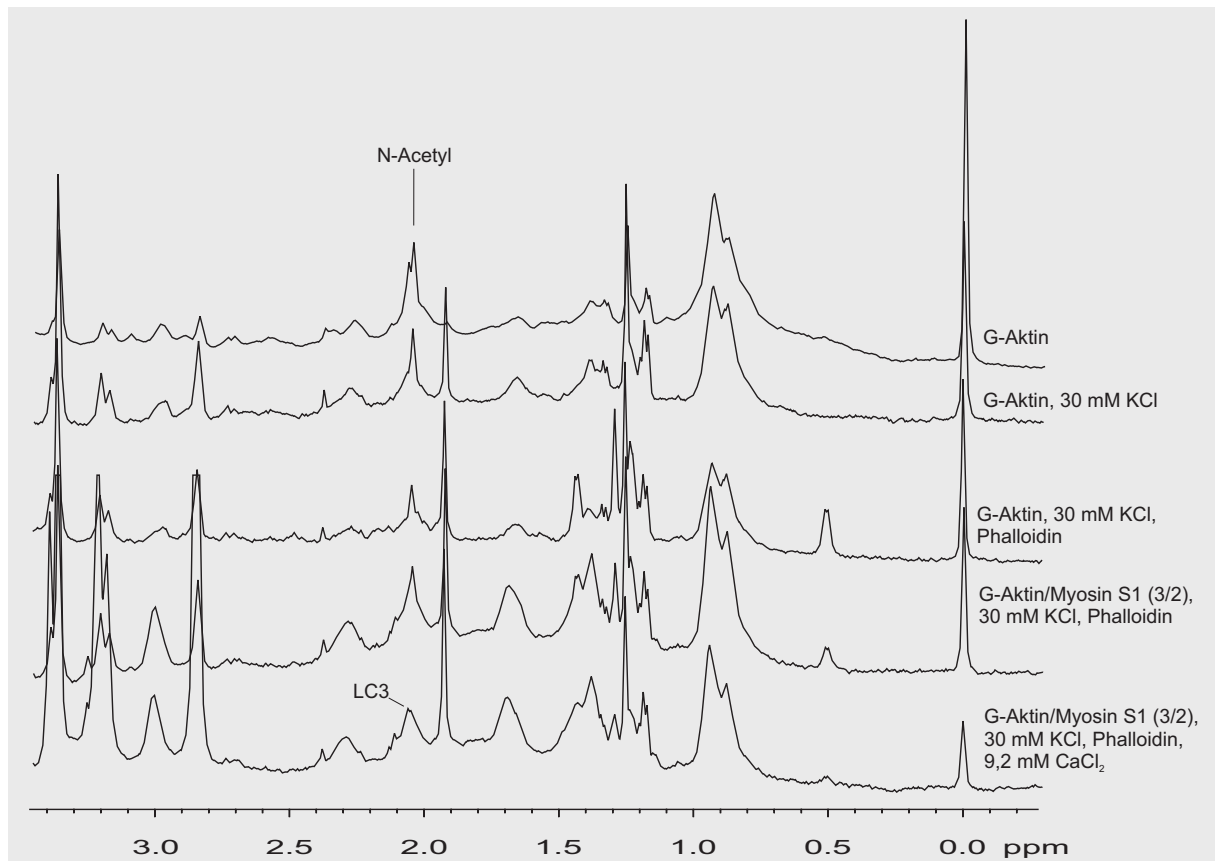


Abbildung 37: 500 MHz ^1H -NMR-Spektren von $^{10}\text{PFP-Mg}^{2+}$ -Aktin. Von oben nach unten: $53,3 \mu\text{M}$ $^{10}\text{PFP-Mg}^{2+}$ -G-Aktin in 2 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,2 mM ATP, 0,1 mM MgCl_2 , 0,2 mM EGTA und 1 mM NaN_3 bei 283 K. Polymerisation durch KCl, Endkonzentration 30 mM. Stabilisierung des Aktinfilaments durch leichten Überschuss Phalloidin. Komplexierung von Aktin mit Myosin S1 im Verhältnis 3:2. Die Resonanzlinien des Aktins wurden durch Zugabe von CaCl_2 (Endkonzentration 9,2 mM) unter das Rauschniveau verbreitert.

3.1.6 Nukleotidfreies Aktin

Aktin wird durch das gebundene Nukleotid aufgrund der zentralen Position im Protein und der Wechselwirkungen mit den benachbarten Aminosäuren stabilisiert. Vom Nukleotid befreites G-Aktin denaturiert dagegen sehr schnell (DREWES, 1991). Die Abwesenheit des Nukleotids sollte sich deswegen in einer erhöhten Mobilität des Proteins zeigen. Das ^1H -NMR-Spektrum von nukleotidfreiem G-Aktin weist deutliche Unterschiede gegenüber dem ^1H -NMR-Spektrum dem Mg^{2+} -ATP-G-Aktin auf (Abbildung 38). Es fehlt das charakteristische, noch nicht zugeordnete Signal bei 2,07 ppm neben dem Signal der N-Acetylgruppe (Abbildung 22). Ein weiteres Kriterium für ein definiert gefaltetes G-Aktin sind die hochfeldverschobenen Signale von 0,8 ppm bis 0,3 ppm. Diese Signale zeigen sich als weit auslaufende Basis der intensiven Signale um 0,9 ppm (Abbildung 31), und sind ebenfalls nicht vorhanden. Abgesehen von den intensiven, nicht aufgelösten Signalen zwischen 3,0 und 3,5 ppm zeigten die Spektren keine Änderungen bei dem Übergang von G- zu F-Aktin. Die Zugabe von CaCl_2 führte nicht zu der bei Mg^{2+} -ATP-Aktin bekannten Immobilisierung und Verbreiterung der Signale.

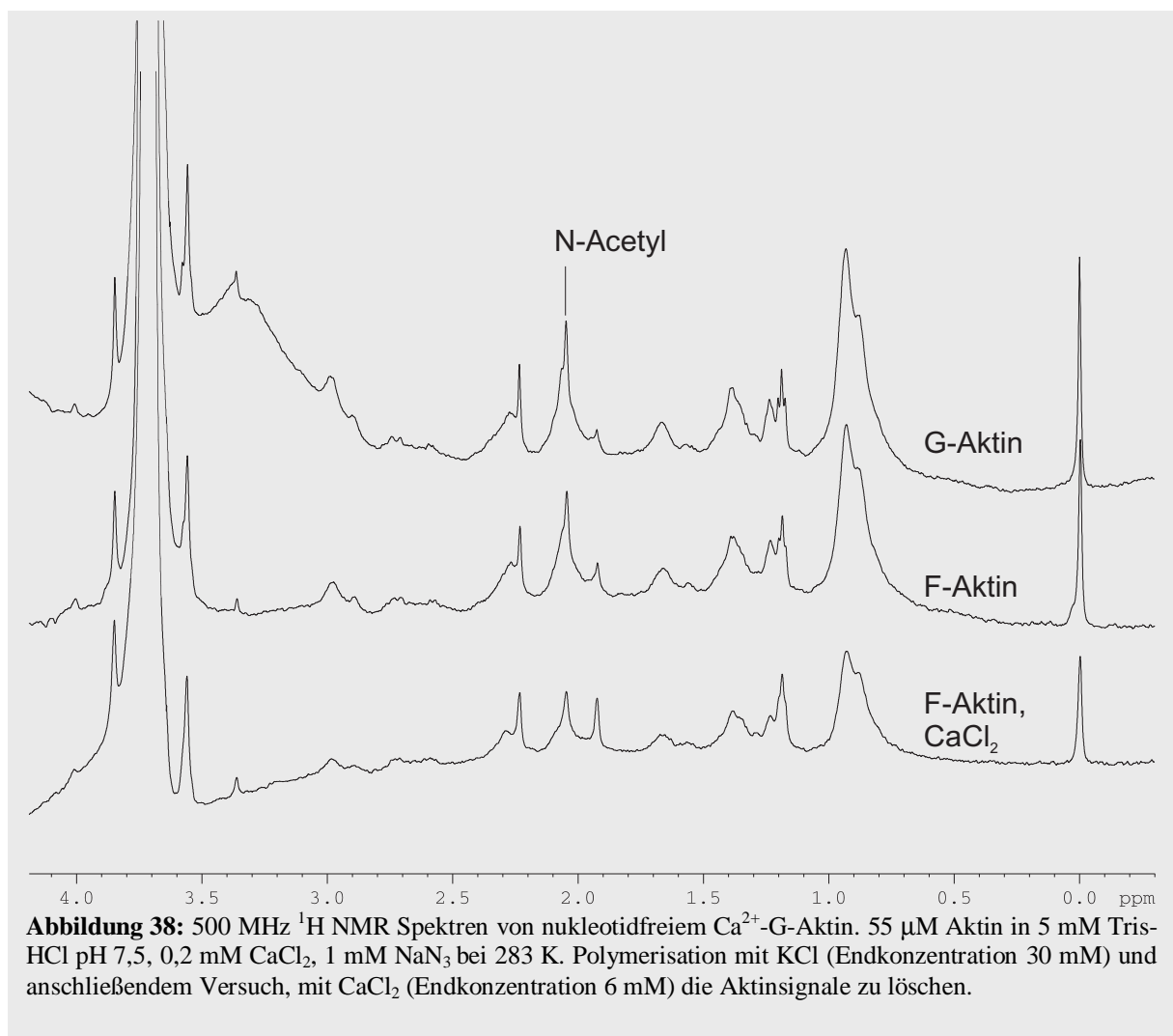
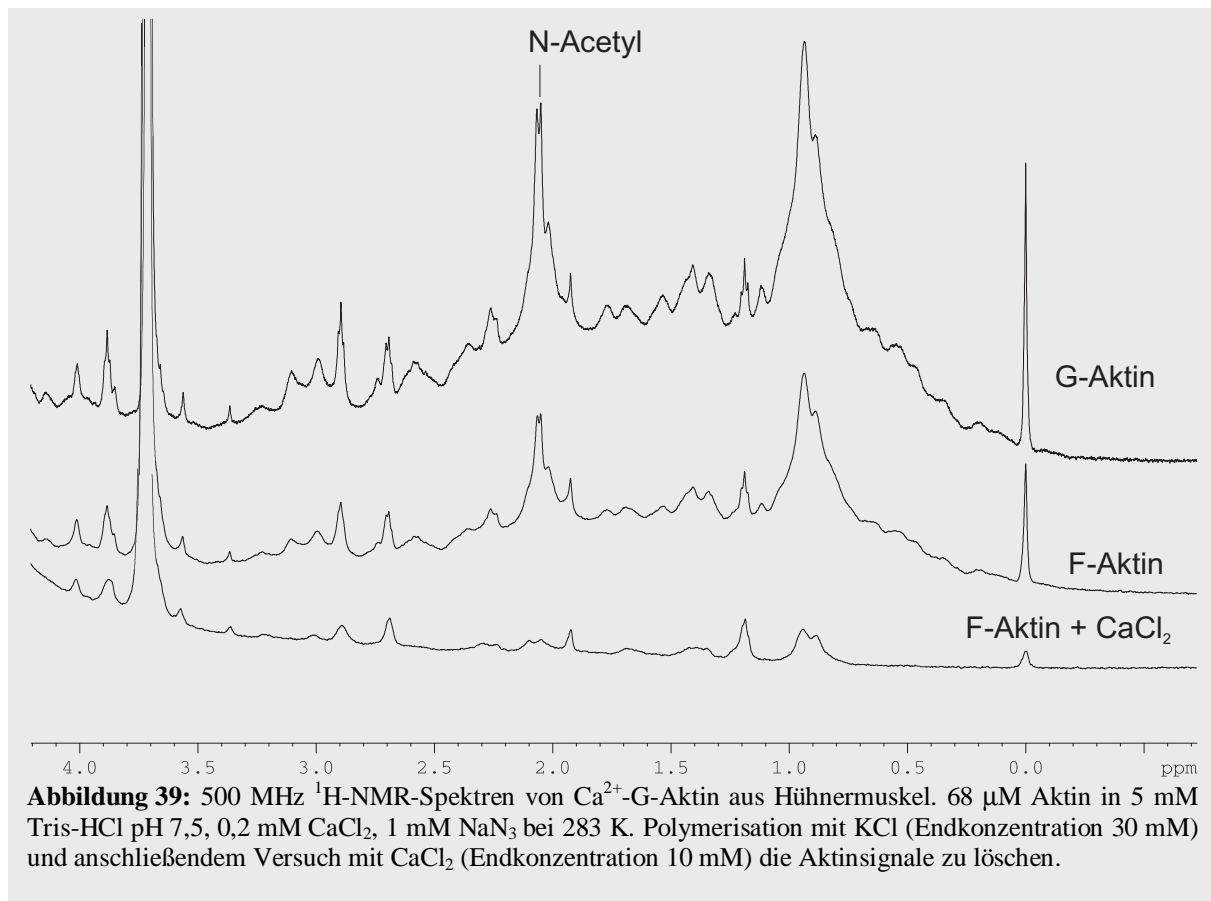


Abbildung 38: 500 MHz ^1H NMR Spektren von nukleotidfreiem Ca^{2+} -G-Aktin. 55 μM Aktin in 5 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,2 mM CaCl_2 , 1 mM NaN_3 bei 283 K. Polymerisation mit KCl (Endkonzentration 30 mM) und anschließendem Versuch, mit CaCl_2 (Endkonzentration 6 mM) die Aktinsignale zu löschen.

3.1.7 Aktin aus Huhn

Das Muskelaktin aus Hühnern besitzt dieselbe Aminosäuresequenz wie das Muskelaktin von Kaninchen. Die Ergebnisse bezüglich der Mobilität sollten darum auch auf Hühneraktin übertragbar sein. Als Kontrollexperiment diente wieder der Vergleich von G- und F-Aktin und die anschließende Immobilisierung mit CaCl_2 . Wie Abbildung 39 zeigt, entsprachen die ^1H -NMR-Spektren von Hühner-Aktin weitgehend den jeweiligen Spektren von Kaninchen-Aktin. Das G-Aktin-Spektrum zeigt neben der charakteristischen Resonanz für den acetylierten N-Terminus bei 2,048 ppm das nicht zugeordnete Signal bei 2,07 ppm. Die hochfeldverschobenen Signale zwischen 0,8 ppm und 0,2 ppm deuten auf ein definiert gefaltetes Aktin hin. Die Polymerisation mit KCl bis zur Endkonzentration von 30 mM führte zu der erwarteten Signalreduktion von ungefähr 50 %. In zwei Details unterscheiden sich die F-Aktin Spektren von Hühner- und Kaninchen-Aktin. Das scharfe zweite Singulett bei 2,05 ppm und die hochfeldverschobenen Signale zwischen 0,8 ppm und 0,2 ppm sind nach der Polymerisation im Spektrum von Hühneraktin noch vorhanden. Die Zugabe von CaCl_2 bis zur Endkonzentration von 10 mM immobilisierte das Aktin soweit, daß die restlichen NMR-Resonanzlinien bis zum Rauschniveau verbreitert waren.



3.1.8 *Dictyostelium discoideum*-Aktin

Mit dem Aktin aus dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* stand ein Nichtmuskelaktin für die NMR-spektroskopischen Studien zur Verfügung. Es unterscheidet sich in der N-terminalen Aminosäuresequenz von Muskelaktin aus Kaninchen an den Positionen 1 bis 6, 10, 16, 17, 18 und 41. Die ersten sechs Aminosäurereste ragen frei in das Lösungsmittel und ihre Ladungen beeinflussen die Aktomyosin-ATPase-Aktivität. Sie sollten aber keinen Beitrag zur Stabilität der Subdomäne I leisten. Die Substitutionen innerhalb des β -Faltblatt können dagegen einen größeren Effekt auf die Mobilität der Subdomäne I haben.

Die NMR-Spektren zeigen die typischen Signale eines nativ gefalteten Proteins. Die Resonanz des bei allen bisher untersuchten Aktinen vorhandenen N-Acetylrestes ist wie im Muskelaktin von Kaninchen bzw. Huhn bei 2,048 ppm (Abbildung 40 und 41). Allerdings fehlen die für ein definiert gefaltetes G-Aktin charakteristischen hochfeldverschobenen Resonanzlinien zwischen 0,9 ppm und 0,2 ppm. Zwischen 2,5 und 3,5 ppm zeigt das *Dictyostelium* G-Aktin ähnlich intensive und breite Signale wie nukleotidfreies Kaninchen-Muskelaktin. Nach der Polymerisation mit KCl sind auch im filamentösen Aktin noch mobile Bereiche vorhanden, die sich ebenfalls wie bei nukleotidfreiem F-Aktin durch CaCl_2 nicht immobilisieren lassen (Abbildung 41). Eine eingehende Untersuchung der Ursachen für dieses Verhalten von *Dictyostelium*-Aktin und dem vom Nukleotid befreitem Aktin steht noch aus. Es kann aber aufgrund der Präparationsmethode ausgeschlossen werden, daß das Aktin denaturiert war. Mit einem denaturierten Aktin wäre die Extraktion der Motordomäne aus demselben Zellysate nicht möglich gewesen. Diese Präparationsmethode nutzt unter anderem die Bindung der Motordomäne an filamentöses *Dictyostelium*-Aktin aus. In einem weiteren Reinigungs-

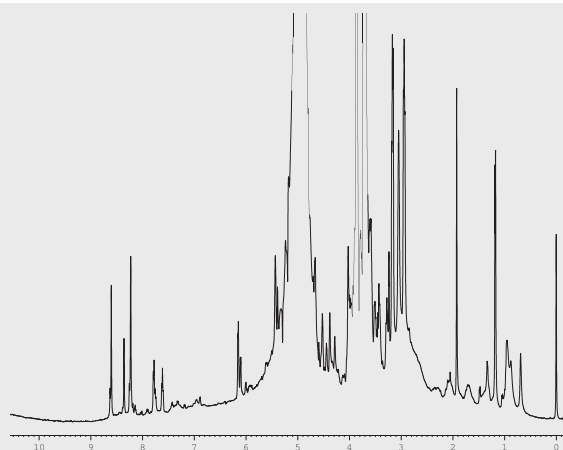


Abbildung 40: 500 MHz ^1H -NMR-Spektrum von Mg^{2+} -G-Aktin aus *Dictyostelium discoideum*. 48 μM Aktin in 2 mM Tris-HCl, 0,2 mM ATP, 0,2 mM MgCl_2 , 0,2 mM EGTA und 1 mM NaN_3 bei pH 7,8 und 283 K.

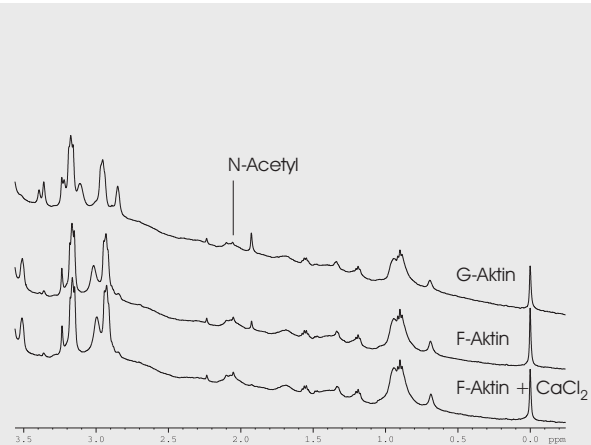
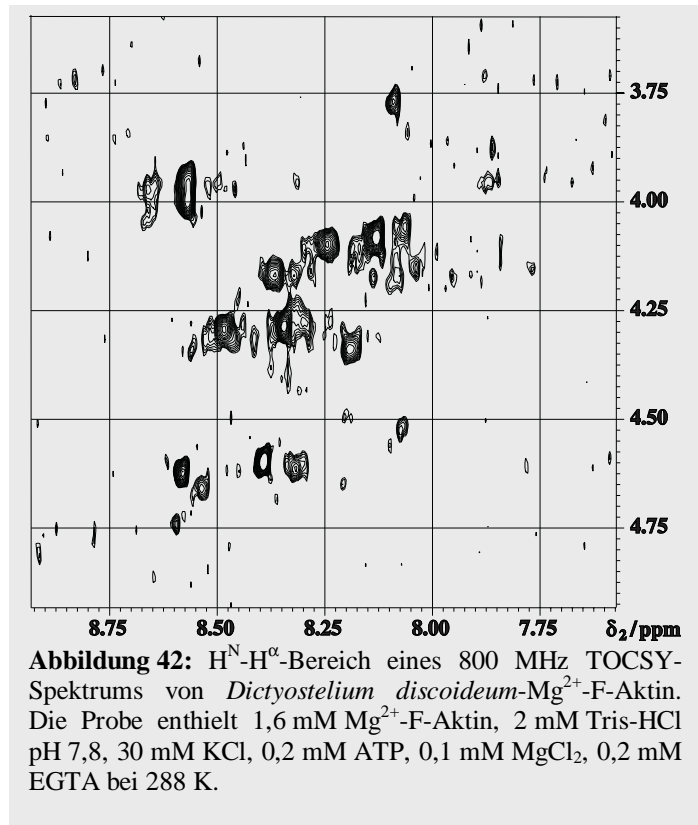


Abbildung 41: 500 MHz ^1H -NMR-Spektren von Mg^{2+} -G-Aktin aus *Dictyostelium discoideum*. 51 μM Aktin in 2 mM Tris-HCl, 0,2 mM ATP, 0,2 mM MgCl_2 , 0,2 mM EGTA, 1 mM NaN_3 bei pH 7,8 und 283 K. Polymerisierung mit KCl (Endkonzentration 30 mM) und anschließendem Versuch mit CaCl_2 (Endkonzentration 10 mM) die Aktinsignale zu löschen.

schritt wurde das Aktin dann depolymerisiert. Es könnten allerdings noch Spuren von Alkalischer Phosphatase aus der Präparation nachträglich das ATP im Dialysepuffer abgebaut haben und dadurch irreversibel die Struktur des Aktins verändert haben. Dies würde auch die Analogien von Nichtmuskelaktin und dem vom Nukleotid befreiten Muskelaktin erklären.

Aufgrund der noch offenen Fragen bezüglich des Nukleotids im Aktin aus *Dictyostelium* wurde auf eine Zuordnung der Signale im 2D-NMR-Spektrum zur Aminosäuresequenz verzichtet. Der H^N - H^α -Bereich eines TOCSY-Spektrums von *Dictyostelium discoideum*- Mg^{2+} -F-Aktin belegt aber ebenfalls, daß das Protein noch nativ gefaltet war (Abbildung 42).



3.2 Myosin S1

3.2.1 Kaninchen Myosin S1

Wie schon in der Einleitung erwähnt sind die Nukleotidbesetzungszustände im Fließ-Gleichgewicht (*steady-state*) der ATP-Hydrolyse von der Temperatur abhängig. Die einzelnen Schritte der Hydrolyse lassen sich durch ATP-Analoga, wie z.B. ADP.AlF₄, ADP.BeF_x und ADP.VO₄³⁻, stabilisieren. Bei den folgenden Experimenten am Myosin S1 wurde anhand des ³¹P-Signals von ADP oder der ATP-Analoga die temperaturabhängige Besetzung von Proteinkonformationen untersucht.

3.2.1.1 Temperaturabhängigkeit der Myosin S1.ADP-Konformationen

Mit Hilfe der ³¹P-NMR-Spektroskopie wurden von SHRIVER und SYKES (1981^{a,b}) und von TANOKURA und EBASHI (1993) Aussagen über die Umgebung des gebundenen Nukleotids im Myosin S1 gemacht. Diese beiden Arbeiten führten zu unterschiedlichen Ergebnissen und Interpretationen. Darum sollten eigene Experimente diese Diskrepanzen aufklären. Abbildung 43 zeigt die ³¹P-NMR-Spektren des Myosin S1.ADP-Komplexes bei verschiedenen

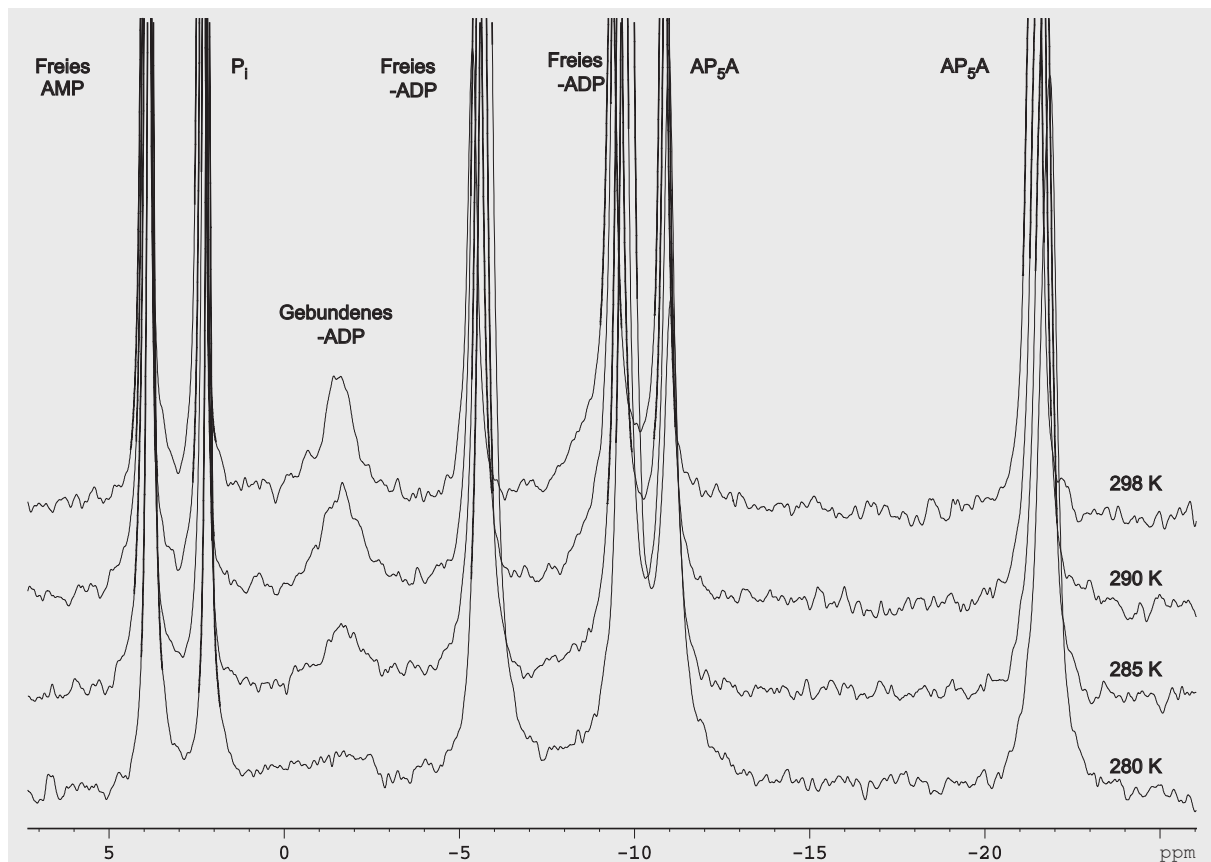


Abbildung 43: ³¹P-Spektren von Myosin S1.ADP bei verschiedenen Temperaturen und 202 MHz. Für jedes Spektrum wurden 6144 Scans aufgenommen. Die Probe enthielt 0,91 mM S1, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 100 mM KCl, 50 mM Pipes pH 7,0, 2 mM ADP, 0,2 mM AP₅A, 1 mM NaN₃ und 5% D₂O.

Temperaturen. Die geringen Mengen Adenylatkinase, die in jeder S1-Präparation vorhandenen sind, wurden mit AP₅A inhibiert. Die Resonanzlinien von AP₅A sind bei -11 ppm und -22 ppm. Die Signale vom α - und β -Phosphat des freien ADP liegen bei -9,5 und -5,5 ppm. Das gebundene α -Phosphat läßt sich erst ab 290 K deutlich am Fuß des freien α -Phosphats erkennen. Das Signal des β -Phosphats von komplexiertem ADP liegt bei -1,7 ppm und ist zu tieferem Feld verschoben als das β -Phosphat des freien ADPs. Bei Temperaturen unter 290 K verliert das Signal an Intensität und ist bei 280 K durch die Verbreiterung praktisch nicht mehr detektierbar. Eine Erklärung dafür wäre, daß es einen gut geordneten Hochtemperaturzustand und eine Population von mehreren Tieftemperaturzuständen gibt.

3.2.1.2 Temperaturabhängigkeit der Myosin S1.ADP.VO₄³⁻-Konformationen

In elektronenmikroskopischen Untersuchungen (SCHRUMPF, 1995) wurde für den Komplex Myosin S1.ADP.VO₄³⁻ ein temperaturabhängiges Verhalten festgestellt, sodaß dieser Komplex ebenfalls NMR-spektroskopisch untersucht wurde. Nach der Zugabe von Vanadat waren weder bei 273 K noch bei 298 K die Signale des gebundenen Nukleotids zu erkennen. Da die Möglichkeit bestand, daß die Resonanzlinien des gebundenen ADP.VO₄³⁻ durch die Resonanzlinien des freien ADP überlagert werden, wurde das überschüssige ADP, Vanadat und AP₅A durch Dialyse entfernt. Der Myosin S1.ADP.VO₄³⁻-Komplex sollte wegen der sehr geringen Austauschraten stabil bleiben (GOODNO, 1979). Wie der Myosin S1.ADP-Komplex zeigte auch der Myosin S1.ADP.VO₄³⁻-Komplex ein ähnliches temperaturabhängiges Verhalten (Abbildung 44). Bei 278 K liegen mehrere Konformationen vor, die bis unter das Rauschniveau verbreitert sind. Wird die Temperatur auf 298 K erhöht, scheinen dagegen zwei Hochtemperaturkonformationen bevorzugt zu sein. Der Vergleich mit den Myosin S1.ADP-Spektren zeigte sich jedoch, daß neben dem Myosin S1.ADP.VO₄³⁻-Komplex auch meßbare Mengen an Myosin S1.ADP vorhanden waren. Die Phosphorsignale des Myosin S1.ADP-Komplexes liegen für das α -Phosphat bei -9,2 ppm und für das β -Phosphat bei -1,7 ppm. Die Signale des Myosin S1.ADP.VO₄³⁻-Komplexes sind für das α -Phosphat nach -8,2 ppm tieffeldverschoben und für das β -Phosphat bei -4,3 ppm hochfeldverschoben. Das schwache Signal bei 0,5 ppm könnte dem gebundenen P_i zugeordnet werden. Durch die Zugabe von Harnstoff (Endkonzentration 8 M) wurde anschließend das Protein denaturiert und das gebundene Nukleotid freigesetzt. Die Signalintensitäten des freigesetzten Nukleotids sind um ein Vielfaches größer als die Signale der Hydrolyseprodukte AMP und Orthophosphat und des Adenylatkinaseinhibitors AP₅A. Dieses Experiment zeigte, daß das in der Lösung vorhandene ADP im Protein gebunden war und der ADP.VO₄³⁻-Komplex ohne das native Myosin S1 in Lösung nicht stabil ist.

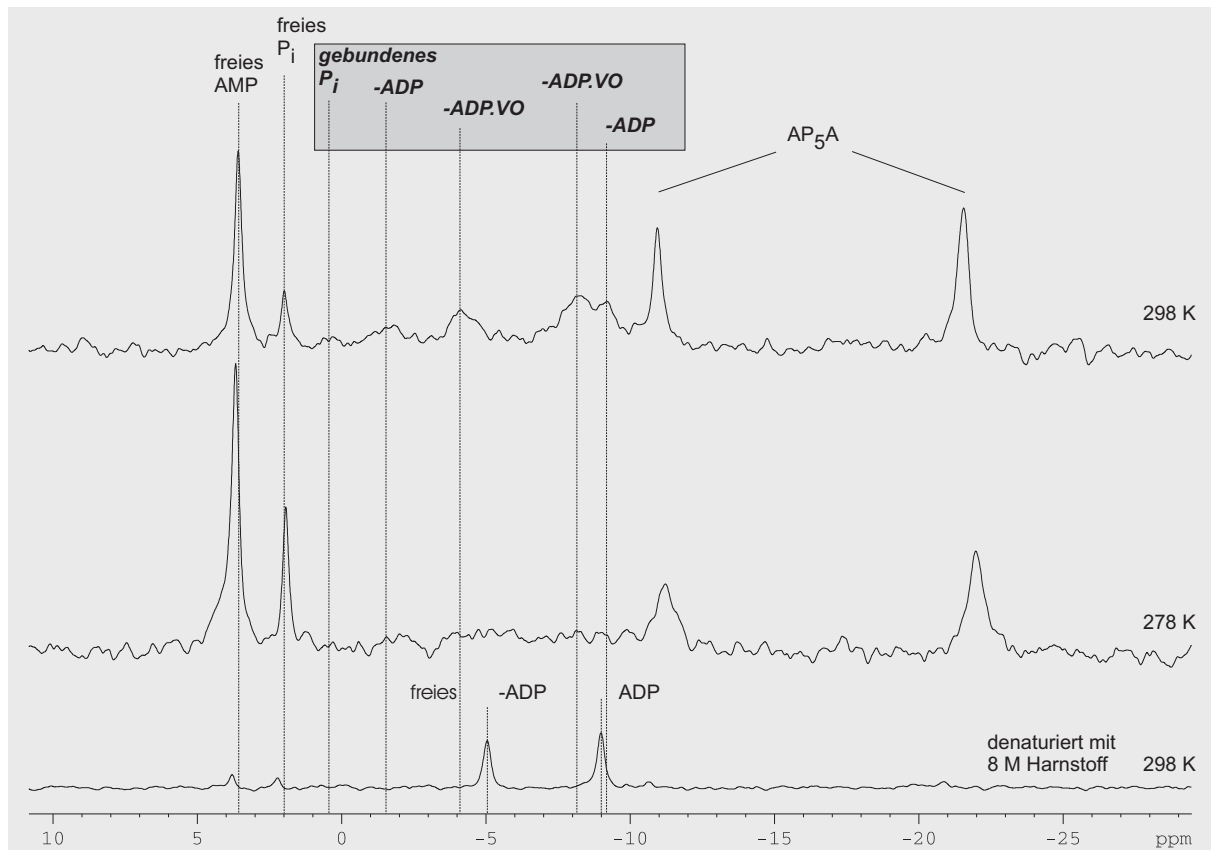


Abbildung 44: ^{31}P -NMR Spektren von Myosin S1.ADP.VO₄³⁻ bei 298 K und 278 K und 202 MHz. Für die beiden oberen Spektren wurden jeweils 30 720, für das untere 2048 FIDs aufaddiert. Die Probe enthielt 0,55 mM S1, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 100 mM KCl, 50 mM Pipes pH 7,0, 1 mM NaN₃, und 5% D₂O. Für das unterste Spektrum wurde noch Harnstoff bis zu der Endkonzentration von 8 M zugesetzt. Die Beschriftung für die Signale des gebundenen Nukleotids ist dunkelgrau unterlegt.

3.2.1.4 Temperaturabhängigkeit der Myosin S1.ADP.AIF₄-Konformationen

Im Myosin S1.ADP.AIF₄-Komplex wurden die Signale des gebundenen ADP.AIF₄ von den Signalen des freien ADPs bei 278 K und 298 K überlagert (Abbildung 45a und 45b). Bei 278 K war vermutlich ein Signal bei -7,8 ppm und bei 298 K die Resonanz des Orthophosphats bei -0,5 ppm und des β -Phosphats von Myosin S1.ADP bei -1,7 ppm zu erkennen. Das letzte Signal belegt, daß neben Myosin S1.ADP.AIF₄ auch Myosin S1.ADP vorlag. Durch die Subtraktion des Myosin S1.ADP-Spektrums (Abbildung 43) bei der jeweils entsprechenden Temperatur wurden die Signale des freien ADPs ausgeblendet (Abbildung 45c und 45d). Das β -Phosphat des Myosin S1.ADP.AIF₄ zeigt ein breites, relativ intensives Signal bei -5,6 ppm. Dieses Signal verliert fast die Hälfte seiner Intensität durch die Temperaturerhöhung auf 298 K an das benachbarte Signal bei -7,8 ppm. Diese Resonanzlinie stammt von dem β -Phosphat in einer weiteren Myosin S1.ADP.AIF₄-Konformation. Die beiden entsprechenden α -Phosphate wurden entweder vom AP₅A oder dem Subtraktionsartefakt bei 10 ppm überlagert.

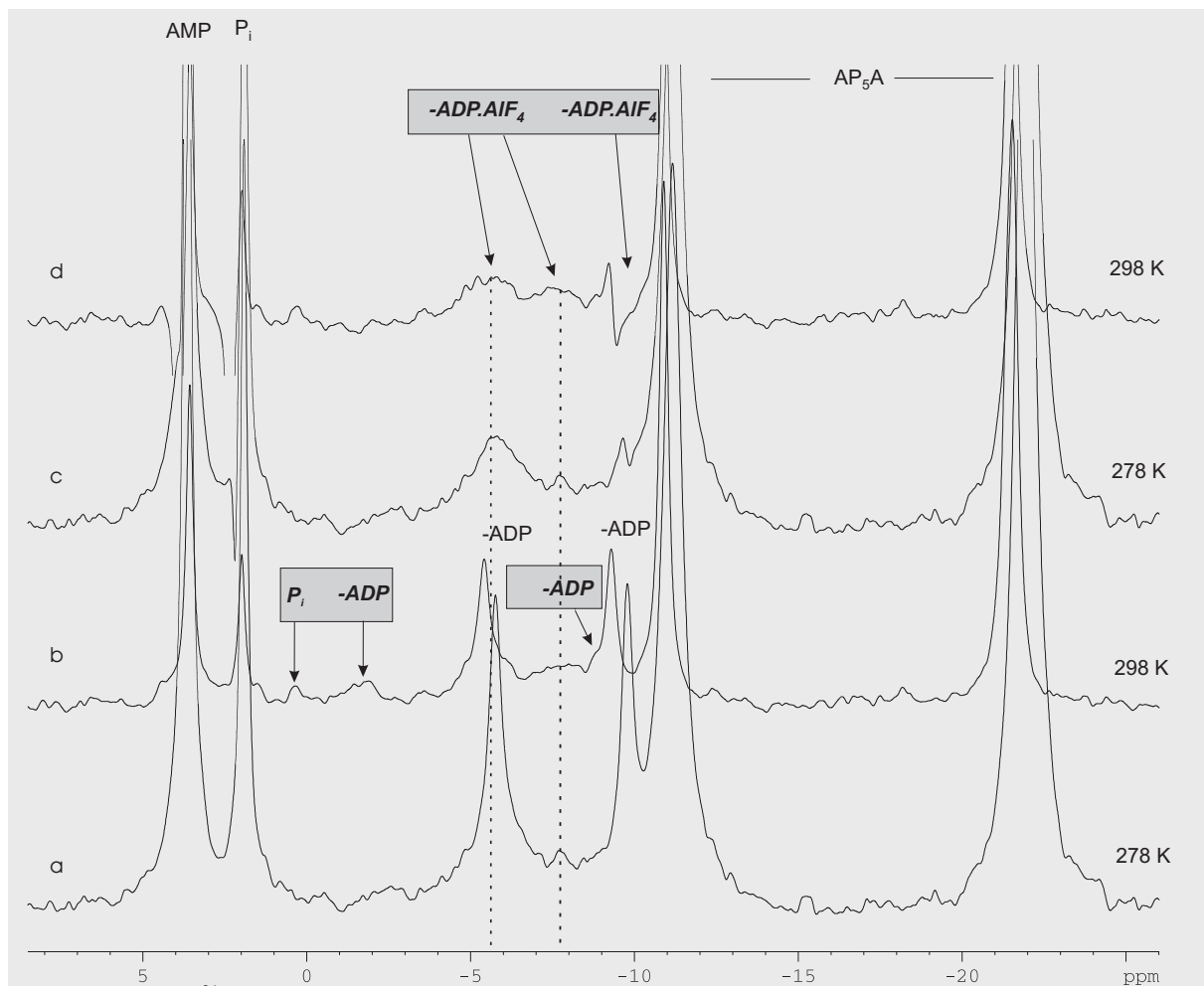


Abbildung 45: ³¹P-NMR-Spektren von Myosin S1.ADP.AIF₄ bei 278 K und 298 K. Die Probe enthielt 0,68 mM Myosin S1 in 50 mM Pipes pH 7, 100 mM KCl, 2 mM ADP, 200 μ M AP₅A, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, 3 mM AlCl₃ und den jeweiligen Temperaturen (278 K: 78 848 FIDs; 298 K: 28 672 FIDs). Die Beschriftungen der im Myosin S1 gebundenen Nukleotide sind dunkelgrau unterlegt. Die Spektren c und d wurden durch Subtraktion der Myosin S1.ADP-Spektren aus a und b erhalten.

3.2.1.5 Temperaturabhängigkeit der Myosin S1.ADP. BeF_x-Konformationen

Die ³¹P-NMR-Spektren von Myosin S1.ADP.BeF_x³ zeigten im Gegensatz zu den Spektren von S1.ADP, S1.ADP.VO₄³⁻ und S1.ADP.AlF₄ relativ scharfe Signale, die bei tiefen Temperaturen nicht unter das Rauschniveau verbreitert waren (Abbildung 46 und 47). Die Existenz eines freien ADP.BeF_x-Komplexes konnte anhand der Titrationsreihe mit Berylliumchlorid ausgeschlossen werden (Abbildung 46). Das ADP des proteinfreien Puffers (Spektrum a) bildete weder in Gegenwart von KF (Spektrum b) noch bei zusätzlicher Zugabe von BeF_x (Spektrum c) stabile Komplexe. Die Spektren d und e zeigten bei -1,7 ppm (β) das Signal des Myosin S1.ADP-Komplexes. Die Zugabe von weiterem ADP und Kaliumfluorid führten zu keiner Änderung. Beim stöchiometrischen Verhältnis S1:BeF_x von 3:1 ist kein Signal des Myosin S1.ADP-Komplexes mehr vorhanden (Spektrum f). Die Assoziation des Myosin

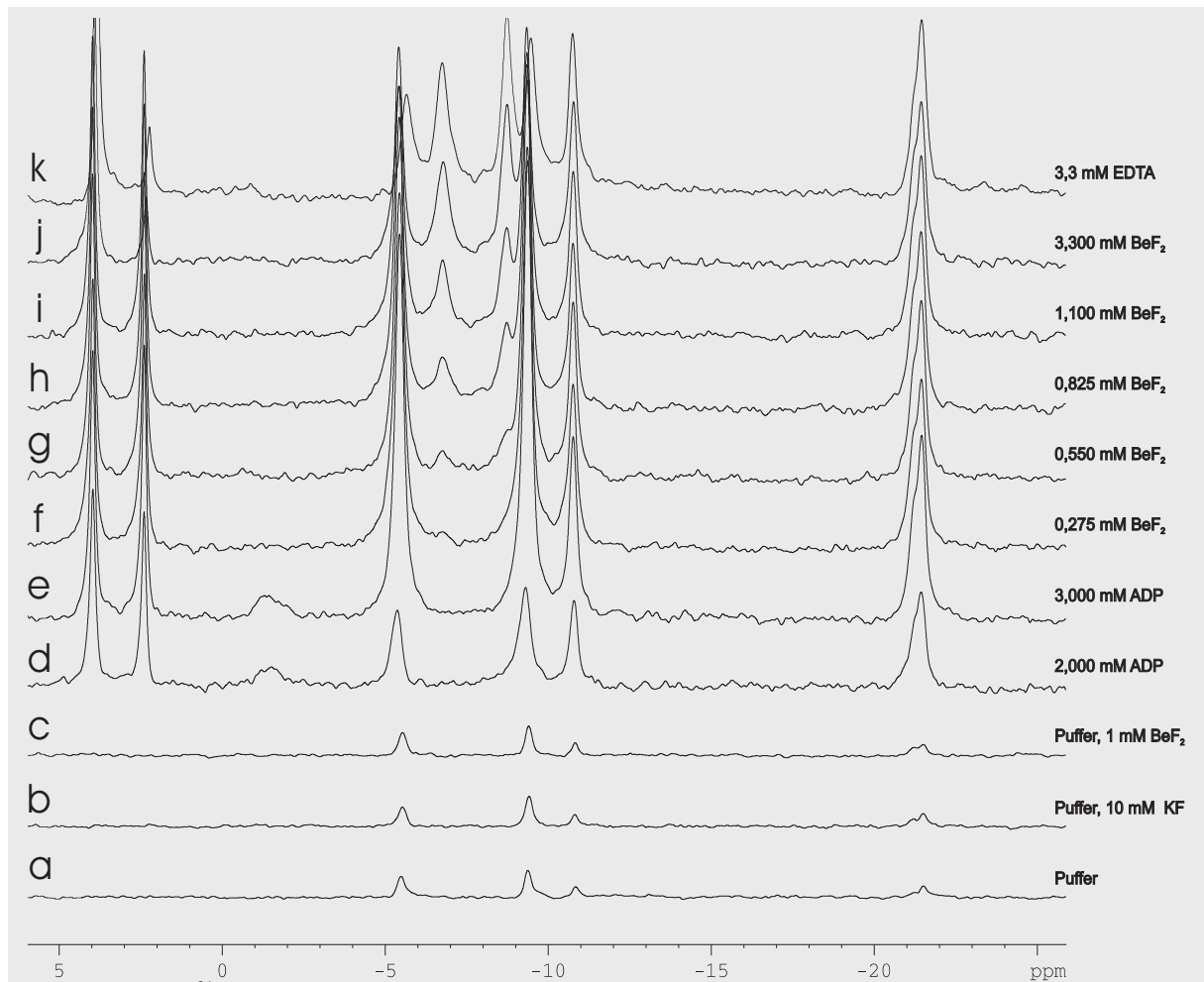
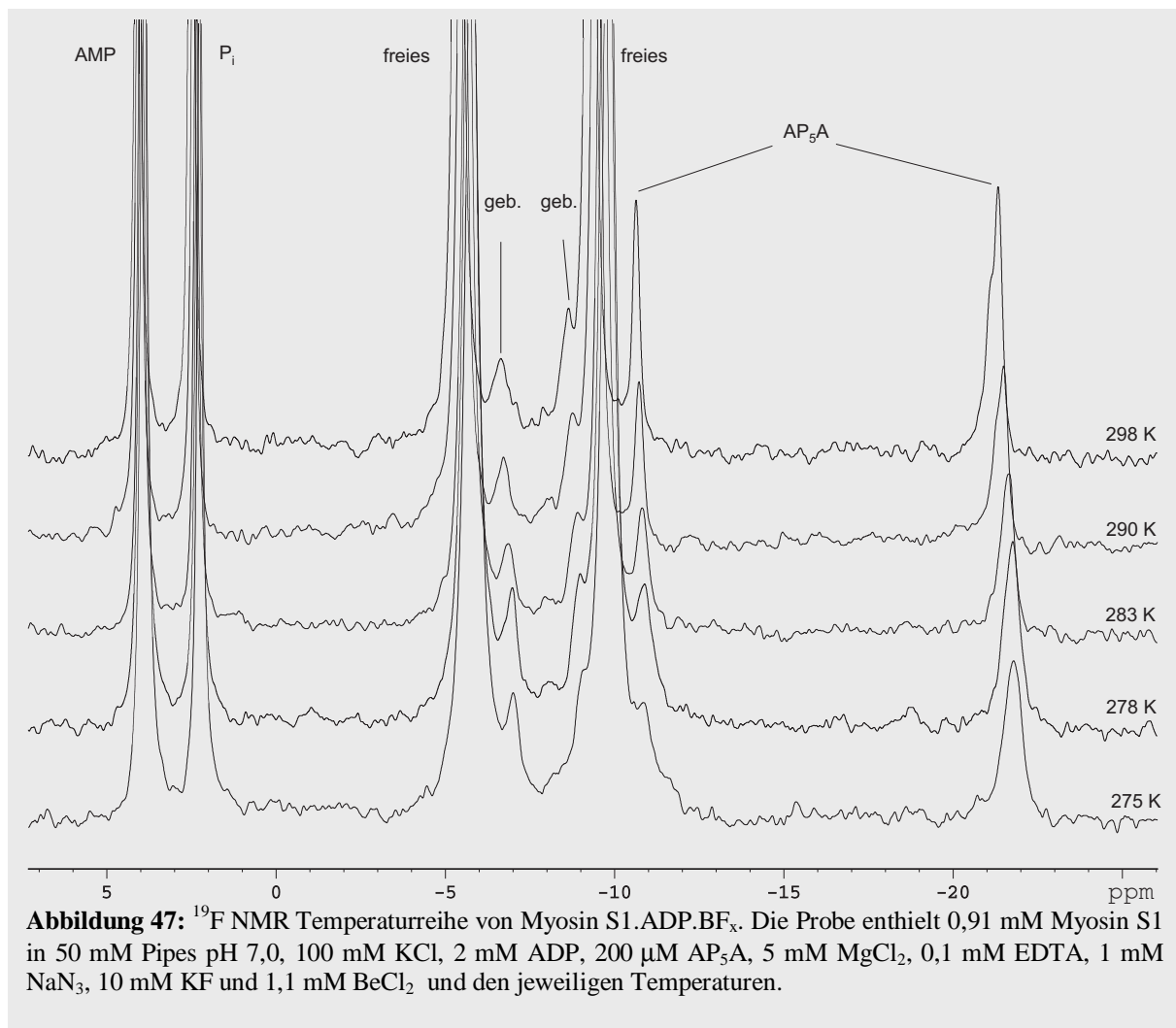


Abbildung 46: ³¹P NMR Titrationsreihe von Myosin S1 mit Be und KF. Von unten nach oben:(a) Puffer mit 5mM MgCl₂, 100 mM KCl, 50 mM Pipes pH 7,0, 2 mM ADP, 0,2 mM AP₅A, 1 mM NaN₃ und 5 % D₂O. (b) + 10 mM KF, (c) + 1 mM BeCl₂, (d) a + 0,91 mM S1A2, (e) wie d, aber 3 mM ADP, und 10 mM KF, (f) wie e, aber 0,275 mM BeCl₂, (g) 0,55 mM BeCl₂, (h) 0,825 mM BeCl₂, (i) 1,1 mM BeCl₂, (j) 3,3 M BeCl₂, (k) wie j, aber 3,3 mM EDTA, Temperatur jeweils 298 K.

³ Die genaue Zusammensetzung der Berylliumfluoride ist unbekannt. NMR-spektroskopische Untersuchungen deuten auf ein Gemisch von Hydroxyfluoroberyllaten hin (Henry et al., 1993).

S1.ADP.BeF_x-Komplexes läßt sich an den Signalen bei -6,5 ppm für das β -Phosphat und -8,4 ppm für das α -Phosphat verfolgen (Spektren g-j). Die Bindungskonstante des Myosin S1.ADP.BeF_x-Komplexes ist größer als die des Be.EDTA-Komplexes. Mit äquimolaren Konzentrationen EDTA zum Berylliumfluorid war keine Reduktion der ³¹P-Resonanzlinien des Myosin S1.BeF_x-Komplexes erkennbar (Spektrum k).

Der S1.ADP.BeF_x-Komplex zeigt bei tiefen und hohen Temperaturen schmale, gut detektierbare Resonanzlinien. Bei Temperaturen ab 283 K ist eine Verbreiterung und eine deutliche Tieffeldverschiebung für das α - und β -Phosphat erkennbar. Die Verschiebung allein könnte ein reiner Temperatureffekt ohne Strukturänderung sein. Dem widerspricht aber die Tatsache, daß man entgegen der Erwartung bei höherer Temperatur ein verbreitertes Signal erhält.



	275 K	278 K	280 K	283 K	285 K	290 K	298 K
S 1.ADP							
β			--- ^{a)}		-1,76 ppm	-1,74 ppm	-1,54 ppm
$\nu_{1/2}$ [Hz]					165	220	142
α			--- ^{a)}		--- ^{b)}	--- ^{b)}	-9,20 ppm ^{b)}
$\nu_{1/2}$ [Hz]							
S 1.ADP.VO₄³⁻							
β		--- ^{a)}					-4,35 ppm
$\nu_{1/2}$ [Hz]							160
α		--- ^{a)}					-8,15 ppm
$\nu_{1/2}$ [Hz]							160
S 1.ADP.BeF_x							
β	-7,16 ppm	-7,10 ppm		-7,00 ppm		-6,86 ppm	-6,78 ppm
$\nu_{1/2}$ [Hz]	55	45		57		52	60
α	-9,23 ppm	-9,12 ppm		-9,02 ppm		-8,90 ppm	-8,77 ppm
$\nu_{1/2}$ [Hz]							
S 1.ADP.AlF₄							
β		-5,80 ppm					-5,40 ppm
$\nu_{1/2}$ [Hz]							350
α		-7,74					
$\nu_{1/2}$ [Hz]							

Tabelle 3: Chemische Verschiebung der Phosphoratome in der α - und β -Phosphatgruppe von S 1-Nukleotid-komplexen bei verschiedenen Temperaturen. a) nicht detektierbar, b) von freiem ADP überlagert;

3.2.2 Vergleich von Kaninchen Myosin S1 und *Dictyostelium discoideum* Motordomäne (MD)

Einige Resonanzlinien von Myosin und Myosin S1 wurden schon zugeordnet (AKASAKA et al., 1978; HIGHSMITH & JARDETZKY, 1980, 1981; ROUX-FROMY & CARDINAUD, 1984; TRAYER et al., 1987; KALBITZER et al., 1991^b). Übereinstimmend kommen die Autoren zu dem Schluß, daß fast alle Signale von mobilen Bereichen der leichten Ketten (LC1, LC2 und LC3) stammen. Die Trimethylaminogruppen von LC1 und LC2 des intakten Myosins zeigen ein scharfes, intensives Signal bei 3,25 ppm (Abbildung 54). Durch Linienformanalyse kann das Signal in zwei Lorentzlinien aufgelöst werden (ROUX-FROMY & CARDINAUD, 1984). Das in dieser Arbeit verwendete Myosin S1 besaß aufgrund der Präparation mit α -Chymotrypsin nur noch die Isoformen LC1 und LC3 der essentiellen leichten Kette. Das Signal bei 1,37 ppm ist der β -CH₃-Gruppe der N-terminalen N-Trimethylalaninen der LC1 zugeordnet. Das Signal der N-acetylierten leichten Kette LC 3 liegt bei 2,05 ppm. Die Signale bei 2,95 ppm sind den ϵ -CH₂-Gruppen von Lysinen zugeordnet. Noch nicht zugeordnet ist das scharfe Signal bei 2,12 ppm. Anhand dieser Signale ist die Beobachtung der essentiellen und regulatorischen

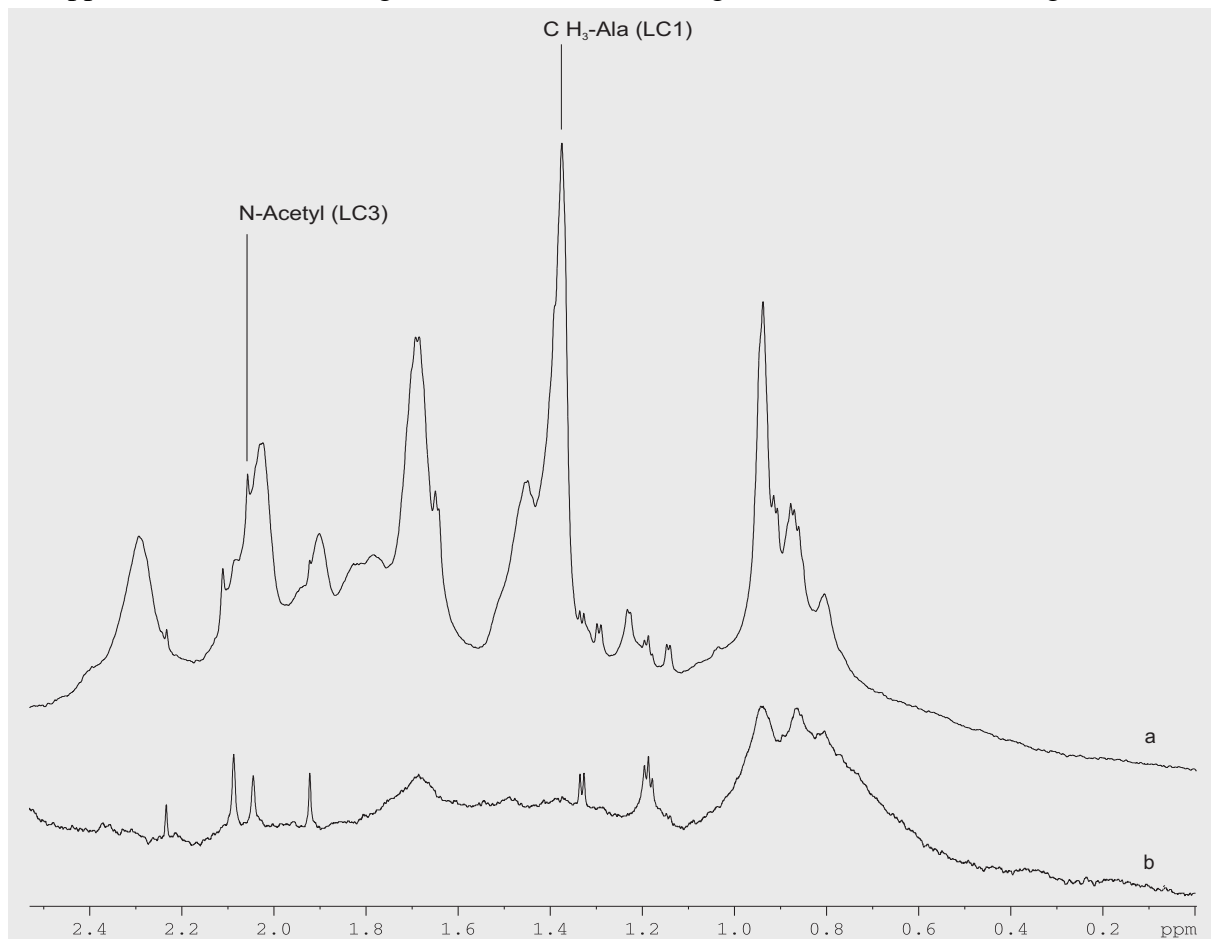


Abbildung 48: ¹H-NMR-Spektren von Kaninchen Myosin S1 und *Dictyostelium* Motordomäne. Die Probe enthielt 0,28 mM S1 (a), bzw. 0,09 mM MD (b), 2 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,2 mM ATP, 0,1 mM MgCl₂, 0,2 mM EGTA, 1 mM NaN₃ bei 288 K.

leichten Ketten von Myosin S1 möglich. Die Halsregion der *Dictyostelium discoideum* Mutante M 754 ist für die Bindung der leichten Ketten zu kurz. Dadurch konnten eventuelle Interaktionen mit Aktin beobachtet werden, ohne daß die Signale der leichten Ketten störten. Wie Abbildung 48 zeigt, enthält das Spektrum der *Dictyostelium* Motordomäne (MD) wesentlich weniger Signale als das Spektrum von Kaninchen Myosin S1. Die wenigen scharfen Signale der *Dictyostelium* MD bei 2,048 ppm und 2,090 ppm sind zur Zeit noch nicht zugeordnet. Insgesamt besitzen die Motordomänen von Myosin S1 und *Dictyostelium* nur wenige mobile Bereiche und die intensiven Signale stammen von den leichten Ketten.

3.3 Die Interaktion zwischen Aktin und Myosin

Die Beobachtung des N-terminalen Acetyl-Restes des freien Aktins ermöglichte es, eine eventuelle Interaktion dieses Bereiches mit Myosin S1 oder der *Dictyostelium* MD zu verfolgen. Umgekehrt konnten mit analoger Vorgehensweise die Änderungen im Bereich der zugeordneten Resonanzlinien von Myosin S1 bzw. der *Dictyostelium* MD beobachtet werden. Es ist bekannt, daß die leichten Ketten LC1 und LC3 (letztere war in den verwendeten Myosin S1-Präparationen in Spuren vorhanden) mit dem F-Aktin interagieren (TRAYER et al., 1987). Aus diesem Grund bestand die Möglichkeit, daß wegen der fehlenden leichten Kette 1 die *Dictyostelium* MD eventuell einen anderen Einfluß auf den N-Terminus von Aktin hat. Um einen definierten Bindungszustand zu erreichen, wurde das F-Aktin immer mit Phalloidin stabilisiert und vorhandenes ATP durch Alkalische Phosphatase hydrolysiert.

3.3.1 Aktin und Kaninchen Myosin S1

Bei konstanter Aktinkonzentration und steigender Myosin S1-Konzentration wurde das Signal der N-Acetylgruppe von Aktin beobachtet. Durch die Bindung von Myosin S1 an Aktin sollte dessen N-terminale Acetylgruppe immobilisiert werden (SCHROEDER et al., 1993). Wie in dem ^{10}PFG -Aktin-Experiment gezeigt, wird die Acetylgruppe auf der Zeitskala der NMR-

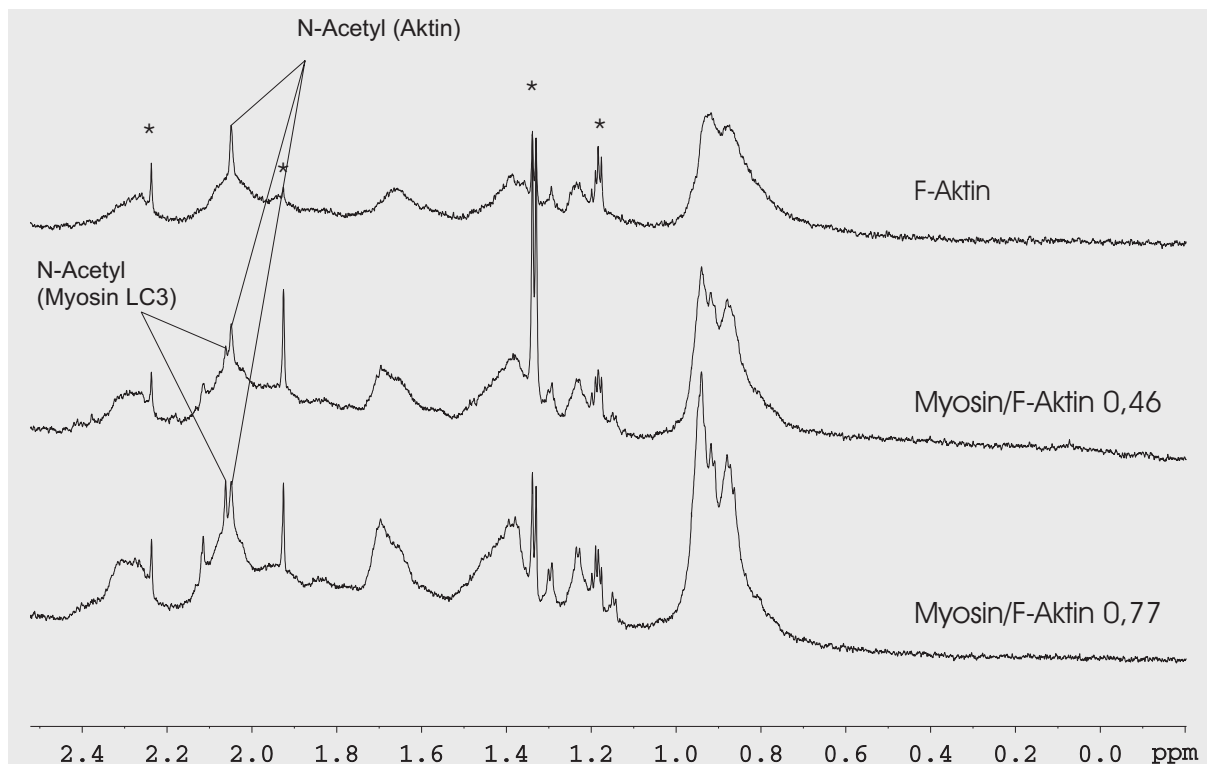


Abbildung 49: ^1H -NMR-Spektren (800 MHz) von Aktin und Kaninchen Myosin S1. Die Proben enthielten $29\ \mu\text{M}$ Aktin, $13\ \mu\text{M}$ S1 (mitte), $22\ \mu\text{M}$ S1 (unten), $2\ \text{mM}$ Tris-HCl pH 7,8, $30\ \text{mM}$ KCl, $0,1\ \text{mM}$ Phalloidin, $1\ \text{U/ml}$ Alkalische Phosphatase, $0,2\ \text{mM}$ ATP, $0,1\ \text{mM}$ MgCl_2 , $0,2\ \text{mM}$ EGTA, $1\ \text{mM}$ NaN_3 bei $288\ \text{K}$, * niedermolekulare Verunreinigung.

Spektroskopie durch die Bindung von Myosin S1 an das Aktinfilament nicht beeinflusst und bleibt frei beweglich (Abbildung 49). Es war weder eine Signalreduktion noch eine Verbreiterung erkennbar. Mit zunehmender Myosin S1-Konzentration werden die Resonanzlinien des N-Acetylrestes der leichten Kette 3 des Myosins bei 2,05 ppm und das nicht zugeordnete Myosin S1-Signal bei 2,12 ppm sichtbar. Das N-trimethylierte Alanin der LC1 wird durch die Wechselwirkungen mit dem Aktinfilament immobilisiert (Abbildung 54), wie das fehlende Signal bei 3,25 ppm bestätigt (PRINCE et al., 1981).

Wenn im umgekehrten Fall die Myosin S1-Konzentration konstant gehalten wurde, konnte die Immobilisierung des N-terminalen N-Trimethylalanins und der β -CH₃-Gruppen von weiteren Alaninen des Myosin S1 beobachtet werden (Abbildung 50). Das erste Spektrum zeigt freies Myosin S1. Das besondere Interesse lag hier auf den Signalen von LC1 und LC3. Die LC1 zeigt bei 1,37 ppm die Resonanzlinien von mobilen Alaninen und bei 3,25 ppm das Singulettsignal vom N-Trimethylalanin. Die Resonanz der N-terminalen Acetyl-Gruppe von LC3 liegt bei 2,05 ppm. Die Zugabe von Aktin führte nur zum Intensitätsverlust der Signale von LC1. Die N-terminale Acetyl-Gruppe von LC3 wird durch die Bindung an F-Aktin nicht immobilisiert und ihr Signal bei 2,05 ppm blieb während der gesamten Titration erhalten. Das Signal des acetylierten N-Terminus von Aktin bei 2,049 ppm wurde mit zunehmender Aktinkonzentration sichtbar.

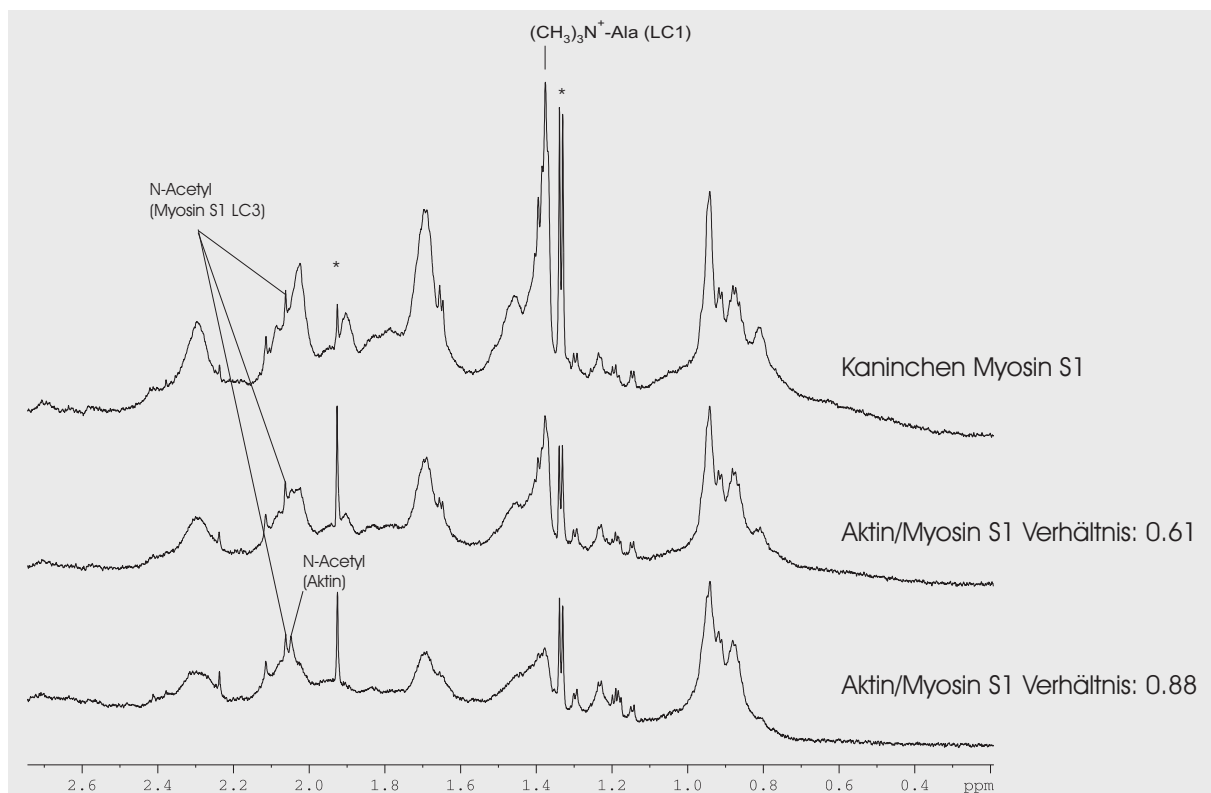


Abbildung 50: ¹H-NMR-Spektren (800 Mhz) von Kaninchen Myosin S1 und Aktin. Die Proben enthielten jeweils 31 μ M S1, 19 μ M Aktin (mitte), 27 μ M Aktin (unten), 2 mM Tris-HCl pH 7,8, 30 mM KCl, 0,1 mM Phalloidin, 1 U/ml Alkalische Phosphatase, 0,2 mM ATP, 0,1 mM MgCl₂, 0,2 mM EGTA, 1 mM NaN₃ bei 288 K.

3.3.2 Aktin und *Dictyostelium discoideum* - Motordomäne

Die analogen Experimente zum vorhergehenden Kapitel wurden auch mit der *Dictyostelium discoideum* Motordomäne als Interaktionspartner durchgeführt. In der ersten Titrationsreihe wurde wieder Aktin vorgelegt und die Konzentration während der Titration mit der Motordomäne konstant gehalten (Abbildung 51). Wie in der Titrationsreihe mit Myosin S1 beeinflusste die Bindung der Motordomäne die Beweglichkeit des N-Terminus nicht. Die zusätzlichen Signale (+) im Spektrum stammen von dem überschüssigen Phalloidin. Im Aktomyosin-Komplex der Motordomäne sind die Aminosäurereste, von denen die beiden scharfen Signale der freien Motordomäne bei 2,048 ppm und 2,090 ppm stammen, nicht mehr frei beweglich und nur zu beobachten, wenn die Motordomäne im Überschuß vorliegt (Abbildung 52). Durch die Bindung der Motordomäne wird der N-Terminus von Aktin nicht beeinflusst und man würde eine Überlagerung der Signale von den N-terminalen Acetylgruppen von Aktin und der Motordomäne bei 2,048 ppm erwarten. Da dieses Signal weder intensiver noch breiter wird muß das Signal der Motordomäne gequenchet worden sein. Die Spektren in Abbildung 52 zeigen die Signalreduktion der beiden Resonanzlinien der Motordomäne durch die Bindung an F-Aktin.

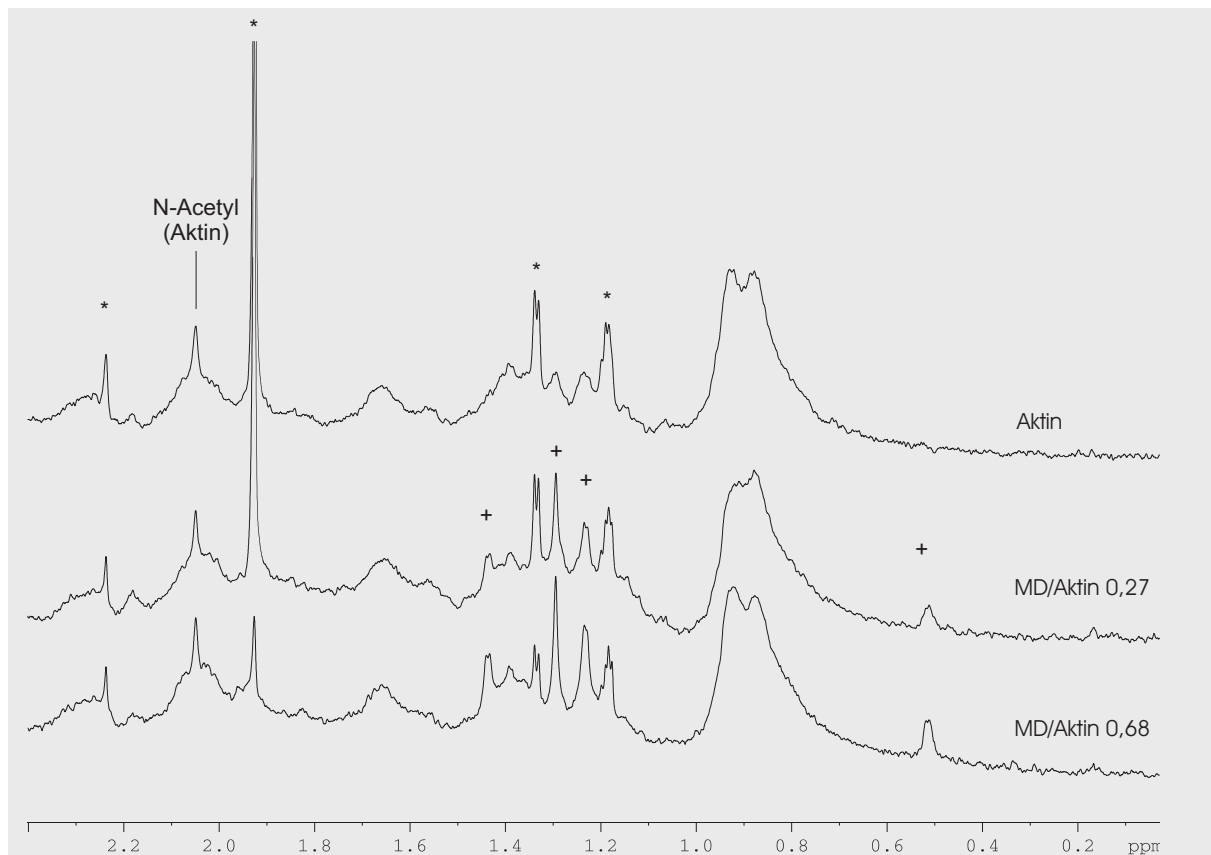


Abbildung 51: ^1H -NMR-Spektren (800 MHz) von Aktin und *Dictyostelium Discoideum* MD. Die Proben enthielten jeweils 32 μM Aktin und 34 μM Phalloidin, 8,6 μM MD (mitte), 21,7 μM MD (unten), 1 U/ml Alkalische Phosphatase, 2 mM Tris-HCl pH 7,8, 30 mM KCl, 0,2 mM ATP, 0,1 mM MgCl_2 , 0,2 mM EGTA, 1 mM NaN_3 bei 288 K, (+) Phalloidin, (*) niedermolekulare Verunreinigung.

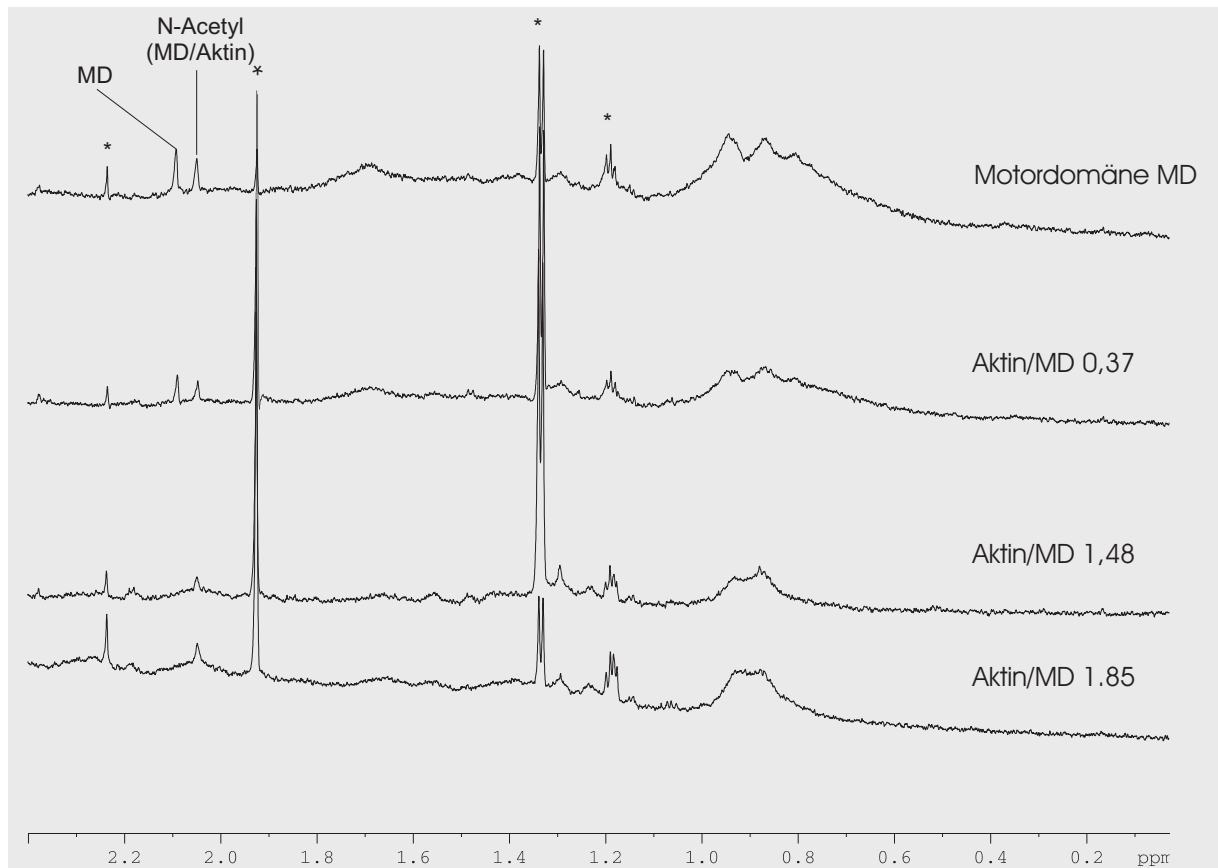


Abbildung 52: ¹H-NMR-Spektren (800 MHz) von *Dictyostelium discoideum* MD und Aktin. Die Proben enthielten jeweils 17 μM MD, 2 mM Tris-HCl pH 7,8, 30 mM KCl, 0,2 mM ATP, 0,1 mM MgCl₂, 0,2 mM EGTA, 1 U/ml Alkalische Phosphatase, 1 mM NaN₃ bei 288 K. Die Aktinkonzentrationen von oben nach unten betragen 0 μM, 6,3 μM, 25,2 μM und 31,5 μM Aktin. (*) niedermolekulare Verunreinigung.

3.3.3 Aktomyosin-Wechselwirkungen in Gegenwart von ATP oder $\text{ADP}\cdot\text{VO}_4^{3-}$

Durch die Zugabe von ATP sollte anhand der Intensivierung der Signale der leichten Kette 1 von Myosin S1 die Dissoziation des Aktomyosin-Komplexes beobachtet werden. Bei einer vollständigen Dissoziation sollten sich die Spektren von freiem Aktin und freiem Myosin S1 überlagern (Abbildung 49a, 50a). Entgegen der Erwartung veränderte sich in Gegenwart von ATP das Spektrum nicht (Abbildung 53c, d und 54f, e). Weder die N-terminalen N-Trimethylgruppen noch die $\beta\text{-CH}_3$ -Gruppen der Alanine der leichten Kette 1 wurden mobilisiert. Im zeitlichen Mittel lag fast ausschließlich der Aktomyosin-Komplex vor und das freie Myosin S1 lieferte keinen Beitrag zum Spektrum. Die Lebensdauer von freiem Myosin S1 war sehr viel geringer als die des Komplexes. Eine schwache Mobilisierung dieser Gruppen war in Gegenwart von VO_4^{3-} erkennbar (Abbildung 53b, 54d, 54c, 54b). Die Bildung des Myosin S1. $\text{ADP}\cdot\text{VO}_4^{3-}$ -Komplexes war nach 15 Minuten deutlich erkennbar und nach 2 Stunden weitgehend abgeschlossen.

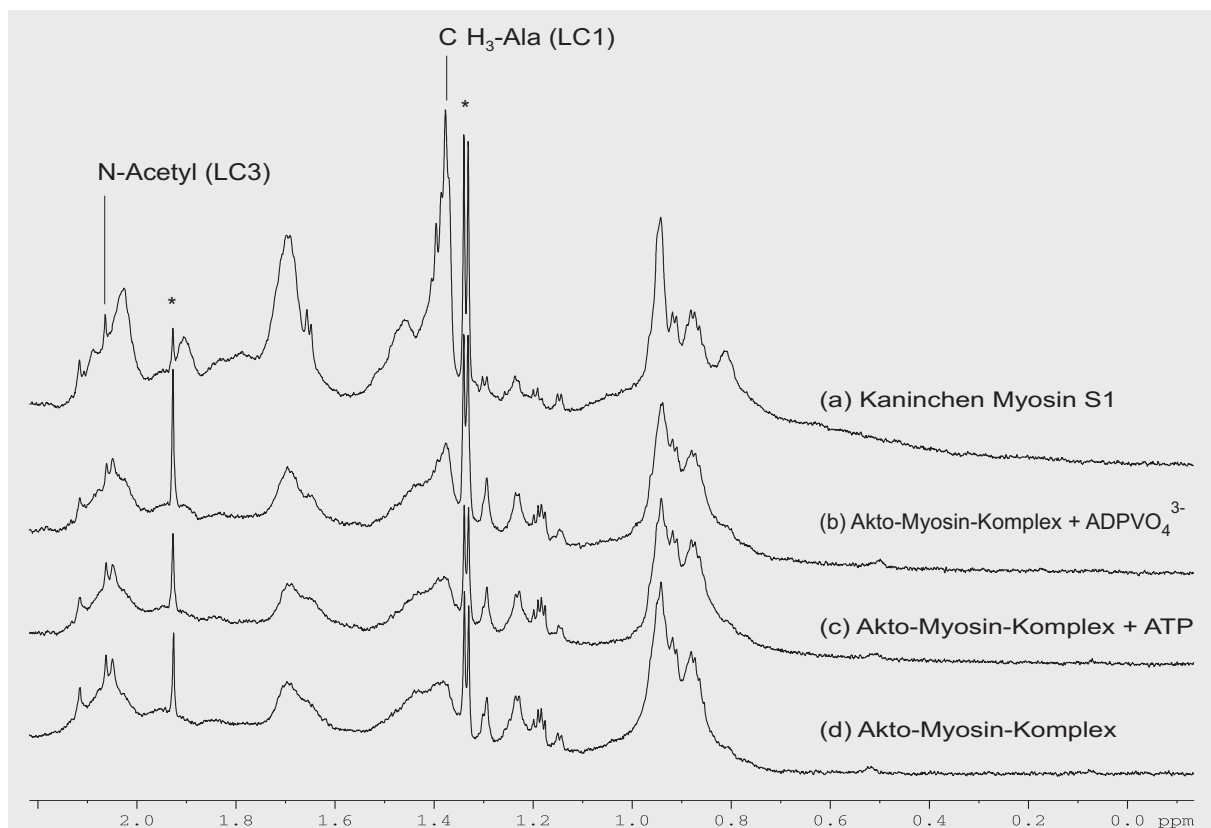


Abbildung 53: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (800 MHz) von Aktin und Myosin S1. Die Proben enthielten jeweils $40\ \mu\text{M}$ Aktin (außer (a)), $32\ \mu\text{M}$ Myosin S1, $40\ \mu\text{M}$ Phalloidin, $2\ \text{mM}$ Tris-HCl, $30\ \text{mM}$ KCl, $0,1\ \text{mM}$ MgCl_2 , $0,2\ \text{mM}$ EGTA, $1\ \text{mM}$ NaN_3 bei $288\ \text{K}$ und $\text{pH}\ 7,8$. (a) $0,2\ \text{mM}$ ATP, (b) $4\ \text{mM}$ ADP, $1\ \text{mM}$ Na_3VO_4 ($\approx 1\ \text{mM}$ ADPVO_4^{3-}), (c) $4\ \text{mM}$ ATP, (d) $2\ \text{mM}$ ADP (*) niedermolekulare Verunreinigung.

ADP.VO_4^{3-} wird als ATP-Analogen verwendet, ähnelt aber wegen der äquatorialen Anordnung der Sauerstoffatome des Vanadats mehr dem Übergangszustand der ATP-Hydrolyse und induziert eine Konformationsänderung des Myosin S1. Diese strukturelle Änderung führte zu der Hochfeldverschiebung um 0,05 ppm des N-Trimethylsignals der leichten Kette des Myosin S1. ADP.VO_4^{3-} .

Der dem Übergangszustand der Hydrolyse entsprechende Myosin S1. ADP.VO_4^{3-} -Komplex interagiert mit dem Aktinfilament. Wie die Zunahme der Signalintensität bewies, ist dabei im Vergleich zu Myosin S1. ADP das Gleichgewicht von gebundenem Myosin S1 und freiem Myosin S1 verschoben.

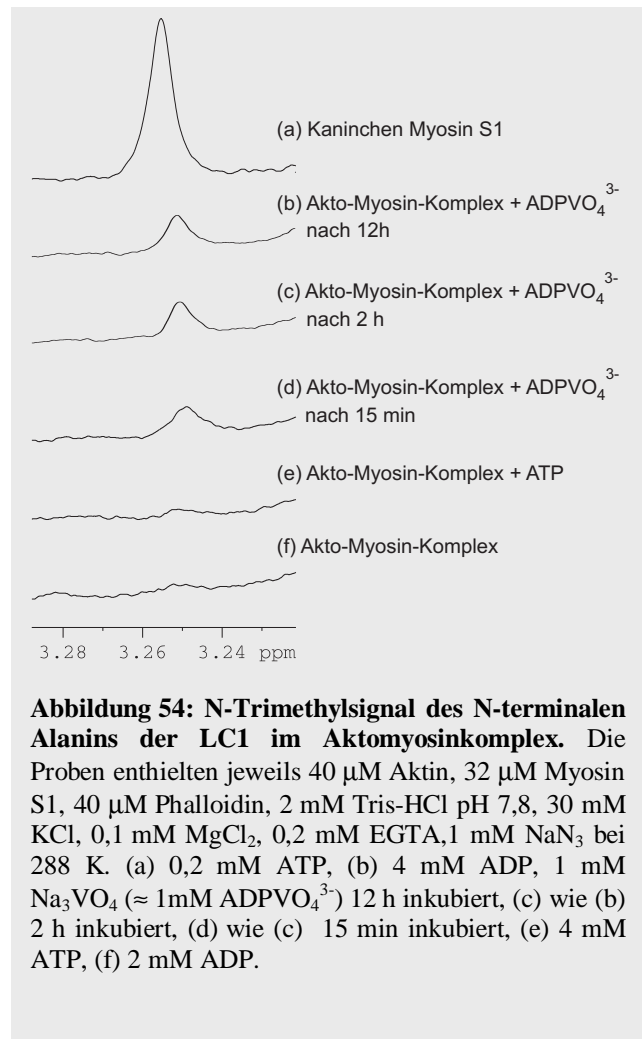


Abbildung 54: N-Trimethylsignal des N-terminalen Alanins der LC1 im Aktomyosinkomplex. Die Proben enthielten jeweils 40 μM Aktin, 32 μM Myosin S1, 40 μM Phalloidin, 2 mM Tris-HCl pH 7,8, 30 mM KCl, 0,1 mM MgCl_2 , 0,2 mM EGTA, 1 mM NaN_3 bei 288 K. (a) 0,2 mM ATP, (b) 4 mM ADP, 1 mM Na_3VO_4 ($\approx 1\text{mM ADPVO}_4^{3-}$) 12 h inkubiert, (c) wie (b) 2 h inkubiert, (d) wie (c) 15 min inkubiert, (e) 4 mM ATP, (f) 2 mM ADP.

4 Diskussion

4.1 Strukturelle Aspekte von Aktin

F-Aktin, das durch die Polymerisation von Mg^{2+} -G-Aktin anstelle von Ca^{2+} -G-Aktin erhalten wurde, zeigt in Gegenwart von ATP noch scharfe definierte NMR-Signale. Alle biochemischen und NMR-spektroskopischen Beweise zeigen, daß diese Signale von mobilen Bereichen des F-Aktins und nicht von Verunreinigungen der Proben stammen (SLÓSAREK et al., 1994). In Mg^{2+} -F-Aktin befinden sich ungefähr die Hälfte der Protomeren in einem Zustand mit sehr hoher interner Mobilität. Der mobile Teil konnte zweifelsfrei in der N-terminalen Region lokalisiert werden und umfaßt den N-Terminus selbst, die ersten zwei Stränge des großen N-terminalen β -Faltblattes und die Hälfte der anschließenden Schleife (Abbildung 55). Durch die sequentielle Zuordnung wurde nachgewiesen, daß die beobachteten Signale von Aktin selbst und nicht von Verunreinigungen stammen. Die Quantifizierung der Signale und ihre Unabhängigkeit von Details der Reinigungsmethode machen es extrem unwahrscheinlich, daß sie von denaturiertem Aktin stammen. Die Resonanzlinien können auch nicht von einem proteolytisch abgespaltenen Fragment stammen, wie die Diffusionsmessungen zeigten. Die Intensitäten der TOCSY-Kreuzsignale (Abbildung 18 und 19) und die Linienbreite der ein-dimensionalen Spektren zeigen, daß die ersten sechs Aminosäuren am mobilsten sind, die zwei antiparallelen Stränge des Faltblattes eine intermediäre und die Schleifen die geringste Mobilität besitzen. Eine intensivere Betrachtung dieser im Kristall anscheinend hoch geordneten und dicht gepackten Struktur legt den Schluß nahe, daß sich für Mg^{2+} -F-Aktin dieser Teil der Struktur in Lösung stark verändert. Eine möglich Erklärung wäre eine fast totale Entfaltung dieser Region mit einer damit einhergehenden Erhöhung der lokalen Mobilität der Polypeptidhauptkette. Dies wäre in Übereinstimmung mit Strukturstudien an dem N-terminalen Peptid (28 Aminosäuren) von Aktin in Trifluorethanol durch SÖNNICHSEN et al. (1992). In wässriger Lösung waren die Peptide nicht geordnet und sehr flexibel. In 80%igen Trifluorethanol fand man zwei Helices im Bereich von AS 4 bis AS 13 und von AS 16 bis AS 20 mit einer durch die AS 13 bis AS 16 geformten Schleife. Zwischen den beiden Helices konnten keine langreichweitigen NOEs beobachtet werden. Diese Daten zeigen, daß die β -Faltblattstruktur dieser Region hauptsächlich durch das gesamte Protein und das gebundene Mg.ATP stabilisiert wird. Lediglich eine Tendenz für die Ausbildung der Schleife zwischen den beiden β -Faltblattsträngen scheint im isolierten Peptid zu bestehen. Dahingegen zeigen jedoch die NOE-Muster des intakten Proteins, daß in diesem Fall die β -Faltblattstruktur und die Kontakte der ersten beiden Stränge erhalten bleiben. Die chemischen Verschiebungen von Mg^{2+} -F-Aktin und dem Peptid von SÖNNICHSEN et al. (1992) unterscheiden sich so stark voneinander, daß man davon ausgehen muß, daß durch Trifluorethanol auch unterschiedliche Strukturen verursacht werden. Bei Abwesenheit von Trifluorethanol werden für die chemischen

Verschiebungen nur Werte gefunden, die typisch für Zufallsknäuelpeptide (*random coil*) sind. Die NOE-Muster von Mg^{2+} -F-Aktin entsprechen jedoch keinem Zufallsknäuel und belegen die Struktur des zweisträngigen β -Faltblatts der ersten 26 Aminosäuren. Darum unterscheiden sich die chemischen Verschiebungen in Tabelle 1 auch signifikant von typischen Zufallsknäuelwerten (BUNDI & WÜTHRICH, 1977; WISHART et al., 1992).

Bei näherer Betrachtung der Röntgenstruktur von Ca^{2+} -G-Aktin (KABSCH et al., 1990) zeigt sich, daß das β -Faltblatt mit den beiden N-terminalen Strängen ziemlich stark verzerrt ist. Eine Analyse der veröffentlichten Koordinaten mit dem Programm DSSP (KABSCH & SANDER, 1983) zeigt, daß das β -Faltblatt trotzdem durch Wasserstoffbrücken mit positiven elektrostatischen Energien gut stabilisiert wird. Die beiden Stränge 8-14 und 16-21 werden untereinander durch Wasserstoffbrücken (9 NH \rightarrow 20 O, 9 O \leftarrow 20 NH, 11 NH \rightarrow 18 O, 11 O \leftarrow 18 NH, 13 NH \rightarrow 16 O) stabilisiert. Fünf Bindungen zu dem antiparallelen Strang 28 - 33 (15 O \leftarrow 33 NH, 17 NH \rightarrow 31 O, 17 O \leftarrow 31 NH, 19 NH \rightarrow 29 O, 19 O \leftarrow 29 NH) und vier weitere zu dem parallelen Strang 102 - 106 (8 NH \rightarrow 102 O, 8 O \leftarrow 104 NH, 10 NH \rightarrow 104 O, 10 O \leftarrow 106 NH) fixieren das β -Faltblatt im Protein. Nur drei dieser Bindungen (9 O \leftarrow 20 NH, 13 NH \rightarrow 16 O, 10 O \leftarrow 106 NH) sind mit elektrostatischen Energien von $-3,6$ kJ/mol relativ schwach. Das hochaffine Ca^{2+} -Ion ist im ADP-Komplex an ein Sauerstoffatom und im ATP-Komplex an beide Sauerstoffatome der freien Carboxylgruppe des Asp 11 koordiniert, wobei in den meisten Fällen wahrscheinlich eine sehr schlecht definierte Mischung von ATP- und ADP-Aktin im Filament vorliegt. Im Ca^{2+} -G-Aktin wird der im Mg^{2+} -F-Aktin mobile Teil noch durch weitere Wasserstoffbrücken zu den Phosphatgruppen des Nukleotids fixiert. Im ADP-Komplex sind Bindungen zwischen den Sauerstoffatomen des β -Phosphats und der Amidprotonen von Ser 14, Gly 15 und Leu 16 vorhanden und im ATP-Komplex kann auch noch eine weitere Bindung vom Amidproton von Ser 14 zu einem Sauerstoff am γ -Phosphat vorhanden sein.

Es ist schwer vorstellbar, daß diese Fülle von Interaktionen eine schnelle Bewegung der beiden Stränge im Ca^{2+} -G-Aktin ermöglichen, zudem sie in einer Region liegen, die auch noch einen der geringsten Temperaturfaktoren des Proteins besitzt. Dies bedeutet, daß sich die Konformationen im Mg^{2+} -F-Aktin in einigen Punkten deutlich von der Kristallstruktur des Ca^{2+} -G-Aktins unterscheiden müssen. Da, wie schon dargelegt, die NOE-Muster zeigen, daß die beiden N-terminalen Stränge in Lösung erhalten bleiben, kann man die Unterschiede nur durch eine Abschwächung der Interaktion zwischen dem bivalenten Ion und der Asp 11, sowie einer Abschwächung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Strängen aufgrund der Aktin-Aktin-Wechselwirkungen durch die Polymerisation erklären. Dies ist auch in Übereinstimmung mit Beobachtungen von ADAMS und REISLER (1994). Sie beobachteten, daß das Metallion an der hochaffinen Bindungsstelle die Bindung von Antikörpern an AS 18-29 im F-Aktin beeinflusst. Dieser Teil des Proteins befindet sich direkt neben den beiden sehr mobilen N-terminalen Falblattsträngen.

Die Interaktionen zwischen den β -Faltblattsträngen und dem Nukleotid sind in Lösung zwar deutlich schwächer, aber immer noch in nennenswerten Umfang vorhanden. Wird das Nukleotid vollständig entfernt oder, wie im Fall des Aktins aus *Dictyostelium discoideum*, Aminosäuren dieser Region ausgetauscht, bleibt die Gesamtstruktur der Subdomäne I erhalten. Die Spektren von nukleotidfreiem Aktin bzw. von *Dictyostelium*-Aktin zeigen kein denaturiertes Protein, aber das Netzwerk der Interaktionen wird irreversibel gestört. Der für Mg^{2+} -F-Aktin charakteristische, durch Ca^{2+} induzierte Wechsel in eine wohldefinierte immobilisierte Konformation ist nicht mehr möglich. In diesen beiden Aktinen ist durch den Verlust von stabilisierenden Wechselwirkungen die Ordnung gestört. Dies kann für das zelluläre Aktin aus *Dictyostelium* wegen seiner vielfältigen Aufgaben physiologisch sogar notwendig sein.

Die Markierung von Cys 10 macht deutlich, wie sensibel die Subdomäne I auf Störungen reagiert. Das in der Mitte des ersten β -Faltblattstranges lokalisierte Cys 10 ist normalerweise aufgrund der starken Wechselwirkungen in dieser Region des Proteins nicht zugänglich. Erst der Austausch von Ca^{2+} gegen Mg^{2+} schwächt die Interaktionen so stark, wie der Verlust des Nukleotids oder der teildenaturierende Einsatz von Harnstoff, daß Cys 10 markiert werden kann (DREWES & FAULSTICH, 1991, BARDEN et al., 1989). Die Einführung der PFP-Markierung an dieser Position erhöht die kritische Konzentration für die Polymerisation. Der Vergleich der ^{19}F -Spektren von Cys 10-markiertem und Cys 374-markiertem F- Mg^{2+} -Aktin zeigt, daß durch die chemische Modifizierung in die Subdomäne I keine einheitliche Struktur mehr vorliegt.

In der Literatur wird von mehreren Regionen im Aktin vermutet, daß sie sehr flexibel sind und es stellt sich die Frage, ob die NMR ihre Existenz ausschließen kann. Da das NMR-Spektrum von Aktin fast komplett zugeordnet ist, kann man ausschließen, daß im Aktin weitere Bereiche mit einer ähnlichen Flexibilität und entsprechenden transversalen Relaxationszeiten wie der N-Terminus existieren. Besonders der C-Terminus scheint im F-Aktin nicht sehr mobil zu sein, wie die 1H - und ^{19}F -Daten in dieser Arbeit belegen. Dabei darf man nicht übersehen, daß diese Aussage nur im Nanosekundenbereich, also der Zeitskala der NMR stimmt. Langsamere Bewegungen oder Bewegungen mit kleineren Amplituden sind mit dieser Methode nicht meßbar und könnten in anderen Regionen des Proteins stattfinden.

Eine detailliertere Analyse der inneren Beweglichkeit könnte mit Relaxationsmessungen oder H/D-Austauschmessungen an isotonenangereichertem Aktin durchgeführt werden. Leider steht zur Zeit kein Expressionssystem zur Verfügung, das isotonenangereichtertes, natives Aktin in ausreichender Menge liefert.

Funktionelle Bedeutung der Mobilität

Nach den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit befinden sich ungefähr die Hälfte der Protomeren des Mg^{2+} -F-Aktins unabhängig vom pH-Wert und Temperatur, also wahrscheinlich auch unter physiologischen Bedingungen, im M-Zustand mit stark beweglichen N-terminalen Aminosäureresten. Die ersten sechs Aminosäuren sind nicht im direkten Kontakt zu dem Rest des Aktins und ragen nach dieser Hypothese in die Lösung. Da man vermutet, daß die ersten Kontakte der Myosinköpfe zu Aktin über den N-Terminus ablaufen, wäre dies sinnvoll. Unter der Annahme, daß die Verteilung zwischen M- und I-Zustand ähnlich wie im intakten Muskel ist, könnte über dieses Gleichgewicht die Interaktion der Aktinfilamente mit den Myosinfilamenten reguliert werden. Sollten sie zum Beispiel nicht statistisch über das Filament verteilt sein, könnten sie die Bereiche, in denen Interaktionen zu Myosin möglich sind, separieren. Eine solche Zusammenarbeit könnte auch durch thermische Bewegung hervorgerufen werden. Bei *in vitro motility assays* und in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen (KÄS et al., 1996) wurden ondulierende Bewegungen beobachtet. Betrachtet man ein einzelnes Aktinfilament, so befindet es sich in einer „Röhre“, die aus den umgebenden Aktinfilamenten gebildet wird. Aus dieser „Röhre“ muß das Filament durch Reptation herausdiffundieren. Die fluoreszenzmikroskopisch bestimmten Diffusionskoeffizienten D_{\parallel} sind um vier Zehnerpotenzen kleiner, als die mit der NMR-Spektroskopie bestimmten Diffusionskoeffizienten. Berücksichtigt man die sich daraus ergebende mittlere Verschiebung $\bar{\sigma}$ der signalgebenden Gruppen im Filament, so bewegen sich die N-Termini bzw. die ^{19}F -Markierung im Bereich des Röhrendurchmessers, in dem das Filament „schwingt“. Diese schnellen Bewegungen könnten zu sich verdichtenden und dehnbaren Bereichen in Abhängigkeit von der aktuellen Verteilung der Protomeren I/M auf dem Filament führen. Kleine, aber sehr weitreichende Verzerrungen in der linearen Filamentstruktur wären besonders nach der Interaktion mit den Myosinköpfen und der Kraftentwicklung vorstellbar.

Darüber hinaus muß auch berücksichtigt werden, daß Aktin nicht nur im Muskel, sondern auch im Cytoskelett eine wesentliche Rolle spielt. Hier bilden Aktinfilamente sehr dynamische Strukturen, die raschem Auf-, Um- und Abbau unterliegen. Es sind zahlreiche Aktin-bindende Proteine bekannt, denen bei der Dynamik des Aktin-Skeletts regulatorische Rollen zugeschrieben werden. Sowohl die Bindung von Aktin-verbrückenden Proteinen als auch die schwache erste Bindung der Querbrücken von Myosin (COOKE, 1997) wird in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen nicht beobachtet. Offen bleibt dabei aber die Frage, ob der Austausch der Ionen an der hochaffinen Bindungsstelle in der Spalte oder an der niederaffinen Bindungsstelle am N-Terminus erfolgt. Ein an die Subdomäne I gebundenes zweiwertiges Ion könnte in einer frühen Phase den Aktomyosin-Komplex als Zentralion stabilisieren. Die Stabilität dieser Komplexe kann durch die geringere Ladungsdichte oder den anderen Ionenradius von Ca^{2+} verringert sein.

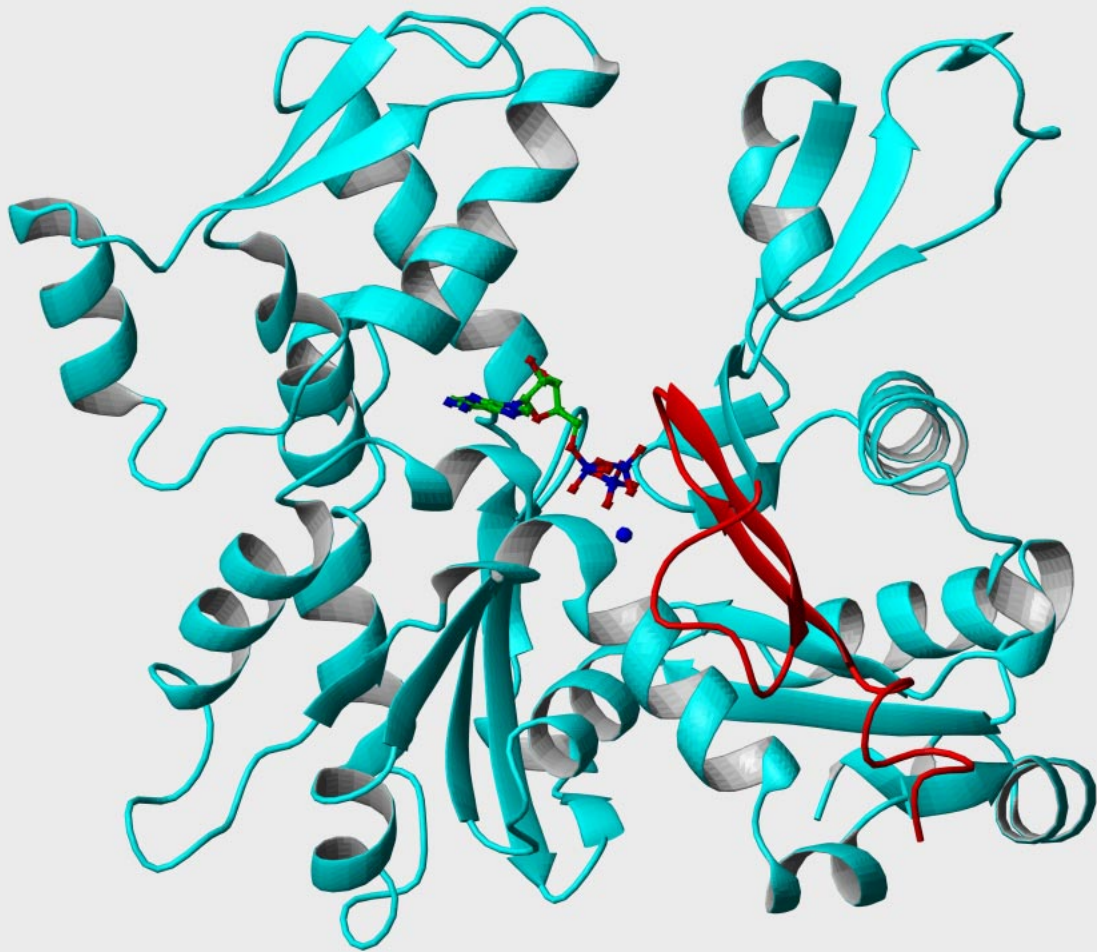


Abb. 55: Die mobilen Aminosäuren in Mg^{2+} -F-Aktin sind in der Röntgenstruktur von Ca^{2+} -G-Aktin (KABSCH et al., 1990) rot hervorgehoben. Die immobilen Aminosäurenreste sind blau eingefärbt.

4.2 Strukturelle Aspekte beim Myosin S1

Myosin als der aktive Partner während der Muskelbewegung zeigt erwartungsgemäß die größten strukturellen Änderungen beim Ablauf des vollständigen ATPase-Zyklus. Um das Myosin S1 in definierte Zustände der Hydrolyse zu überführen, wurden neben ADP auch Nukleotidanaloga eingesetzt. Dabei diente die ^{31}P -NMR-Spektroskopie dazu, die Bindung des Nukleotids und der Nukleotidanaloga an Myosin S1 zu überprüfen und das strukturelle Verhalten der ATP-Bindungsstelle im Myosin S1-Nukleotidkomplexe bei verschiedenen Temperaturen zu untersuchen. Es konnte dabei gezeigt werden, daß die ATP-Bindungsstelle eine sehr gut definierte und stabile oder auch eine strukturell sehr inhomogene Umgebung sein kann.

Eine auf die Struktur der dicken Filamente bezogen ähnliche Beobachtung machte WRAY (1987) und WAKABAYASHI (1988). Im Bereich physiologischer Temperaturen ($> 293\text{ K}$) zeigen die Myosinköpfe der dicken Filamente im Elektronenmikroskop und in der Röntgendiffraktion eine helikale Ordnung um den Schaft des Filaments (WRAY, 1987; WAKABAYASHI et al., 1988; LOWY et al., 1991; KENSLER & WOODHEAD, 1995; SCHRUMPF, 1995; MALINCHIK et al., 1997). Diese helikale Struktur wird durch Temperaturerniedrigung gestört und führt zu einem ungeordneten Zustand der Myosinköpfe. Der Übergang von geordneter zu ungeordneter Struktur der Myosinköpfe im Filament kann auch durch das gebundene Nukleotid beeinflusst werden (SCHRUMPF, 1995). WRAY postulierte, daß der Übergang von ungeordneter zu geordneter Struktur durch die Verschiebung des Gleichgewichts von Myosin.ATP zum Myosin.ADP.P_i mit zunehmender Temperatur verursacht wird (TAYLOR, 1977).

Die NMR-Spektroskopie liefert ein detaillierteres Bild der einzelnen Myosin S1-Nukleotidkomplexe. Die Gesamtstruktur wird weniger durch das gebundene Nukleotid, sondern durch die Temperatur beeinflusst. Dafür spricht auch, daß Myosin durch einen pH-Temperatur-Sprung eine ATP-Synthase sein kann (TAYLOR, 1977).

Myosin S1.ADP und Myosin S1.ADP.VO₄³⁻

Der Myosin S1.ADP-Komplex ist die vorletzte Stufe vor dem Freisetzen von ADP im ATP-Zyklus (Abbildung 56). Seine Konformationen sind stark von der Temperatur abhängig. Die bei zunehmender Temperatur abnehmende Linienbreite der Resonanzen in den ^{31}P -NMR-Spektren deuten auf einen gut geordneten Protein-Nukleotid-Komplex, in dem sich die Phosphorkerne in einer relativ isotropen chemischen Umgebung befinden, hin. Bei tieferen Temperaturen dominiert ein Ensemble von Konformationen, die untereinander im schnellen Austausch stehen. Die unterschiedlichen Interaktionen der Aminosäuren mit den Phosphatgruppen führen durch die inhomogene Umgebung zur Verbreiterung der Signale bis unter das Rauschniveau. Die Verteilung zwischen Hochtemperatur- und Tieftemperaturform befindet sich in einem

reversiblen Gleichgewicht. Diese Ergebnisse sind konform mit den Daten von TANOKURA und EBASHI (1993), widersprechen jedoch den Arbeiten von SHRIVER und SYKES (1981^{a,b}), die auch bei tieferen Temperaturen zwei diskrete Konformationen des Proteins finden. Diese Diskrepanz zwischen diesen Ergebnissen ist nicht auf die Frequenzabhängigkeit von Austauschprozessen zurückzuführen. Die Messungen dieser Arbeit wurden bei 202 MHz und die von Tanokura und Ebashi wurden bei 83 und 121 MHz durchgeführt und umfassen damit den Bereich von SHRIVER und SYKES. Auch die naheliegende Vermutung, daß durch die relativ hohe Konzentration von Orthophosphat, ungefähr äquimolar zu S1, neben S1.ADP auch S1.ADP.P_i zu diesem Ergebnis führte, kann aufgrund der bekannten Gleichgewichtskonstanten ausgeschlossen werden (SMITH & GEEVES, 1995).

Der Myosin S1.ADP.VO₄³⁻-Komplex zeigte ein dem Myosin S1.ADP-Komplex vergleichbares Verhalten. Es besteht ebenfalls ein Gleichgewicht zwischen einem Ensemble von Tieftemperaturformen, deren ³¹P-Resonanzlinien durch die Inhomogenität der Umgebung nicht mehr detektierbar sind, und einer Hochtemperaturform mit relativ schmaler Linienbreite. Durch die trigonal bipyramidale Anordnung der Sauerstoffatome um das Vanadiumion sollte im Myosin S1.ADP.VO₄³⁻-Komplex die Struktur während oder kurz nach der ATP-Hydrolyse stabilisiert werden (SMITH & RAYMENT, 1996, WELLS & BAGSHAW, 1984, GOODY et al., 1980^{a,b}). Die NMR-spektroskopischen Ergebnisse belegen auch in diesem Fall, daß die Struktur nicht primär durch das gebundene Nukleotid sondern durch die Temperatur forciert wird.

Myosin S1.ADP.BeF_x

Die im Vergleich zu dem Myosin S1.ADP-Komplex relativ schmalen und intensiven Resonanzlinien des Myosin S1.ADP.BeF_x-Komplexes belegen die sehr homogene Umgebung der Phosphorkerne in der ATP-Bindungsstelle über den gesamten beobachteten Temperaturbereich. Der Komplex zeigte bei jeder Temperatur jeweils nur ein scharfes Signal für das α- und das β-Phosphat. Auf die Existenz einer weiteren Konformation bei höheren Temperaturen deutet die geringe Hochfeldverschiebung des Phosphors der β-Phosphatgruppe um 0,09 ppm gegenüber dem Phosphor in der α-Phosphatgruppe und die Linienverbreiterung des selben Signals um 30 Hz hin. Die Stabilisierung einer einzelnen Konformationen schon bei tieferen Temperaturen ist auf die Ausbildung der Wasserstoffbrücken der Fluoratome zurückzuführen. In der Röntgenkristallstruktur des *Dictyostelium* S1.ADP.BeF_x⁻-Komplexes sind Die Be-F-Bindungsabstände sind ähnlich groß wie die nichtverbrückenden P-O-Bindungsabstände der γ-Phosphatgruppe im ATP (FISHER et al., 1995). Der Kaninchen S1.ADP.BeF_x⁻-Komplex sollte deswegen ein Analogon des Myosin ATP-Komplexes sein und den Zustand im aktiven Zentrum vor der Hydrolyse repräsentieren.

Myosin S1.ADP.AIF₄⁻

Myosin S1.ADP.AIF₄⁻ zeigte bei 278 K und 298 K zwei verschiedene Zustände, die nebeneinander vorliegen. Wie die Resonanzlinien zeigen ist das Gleichgewicht zwischen diesen beiden Zuständen temperaturabhängig und erst bei Temperaturen über 298 K fast gleich besetzt. Der Austausch zwischen den beiden Zuständen ist auf der Zeitskala der NMR-Spektroskopie langsam. Auch in diesem Protein-Nukleotid-Komplex ist die Ausbildung eines stabilen Zustands bei tiefen Temperaturen auf die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu den Fluoratomen zurückzuführen. Die Bindungslänge vom Aluminiumion zum verbrückenden Sauerstoffatom ist im *Dictyostelium* S1.ADP.AIF₄⁻-Komplex deutlich größer als im *Dictyostelium* S1.ADP.BeF_x-Komplex die Beryllium-Sauerstoff-Bindungslänge (FISHER et al., 1995^b) und sollte deshalb dem Übergangszustand der Hydrolyse oder dem Zustand kurz danach entsprechen.

Das System Myosin-Nukleotid ist wesentlich komplexer als es die Röntgenkristallstrukturen nahelegen. Die Fluoratome in den Nukleotidanaloga stabilisieren wegen der sehr starken Wasserstoffbrückenbindungen nur jeweils zwei Zustände. Im Gegensatz dazu wird durch ADP oder ADP.VO₄³⁻ nur bei Temperaturen über 285 K ein Zustand bevorzugt.

ATPase-Zyklus

Die einzelnen Myosin S1-Nukleotidkomplexe ergeben ein sehr komplexes Bild, wenn die Ergebnisse aus der Röntgenkristallographie (SMITH & RAYMENT, 1996, FISHER et al., 1995; GULICK et al., 1997, SCHLICHTING et al., in Vorbereitung), der Elektronenmikroskopie (SCHRUMPF, 1995), der röntgenstrukturellen Untersuchungen (WRAY, 1987, Xu et al., 1999) und der ³¹P-NMR-Spektroskopie nebeneinander stehen. Die Röntgenkristallstrukturen können nur Momentaufnahmen der ATP-Hydrolyse unter den eingeschränkten Kristallisationsbedingungen sein. Sie unterscheiden sich in den verschiedenen *Dictyostelium* S1-Komplexen je nach gebundenem Nukleotid im Bereich der Halsregion, dem Zustand der 50 kDa-Spalte und in der ATP-Bindungsstelle, hier besonders in der Umgebung in der sich normalerweise die γ -Phosphatgruppe befindet. Untereinander sind diese drei Bereiche im Myosinkopf funktional eng gekoppelt. Mit der Elektronenmikroskopie und der Röntgendiffraktion des intakten dicken Filaments kann das ganze Ensemble der Myosinköpfe betrachtet werden. Anhand der Bedingungen während der Fixierung, wie z.B. Temperatur und Nukleotid, sind Rückschlüsse auf die Zusammenhänge von der Halsregion der Myosinköpfe und den Nukleotidbindungszuständen möglich. Umgekehrt kann mit der ³¹P-NMR-Spektroskopie die Gesamtheit aller Nukleotide studiert werden und ein Bezug zu den anderen Methoden hergestellt werden.

In Abbildung 56 ist der siebenstufige ATPase-Zyklus von Myosin dargestellt (BAGSHAW et al., 1974). Das aktuell diskutierte Modell wurde um den Schritt 3b erweitert (GEEVES & HOLMES, 1999). In Abbildung 56 sind zusätzlich noch einige Kristallstrukturen bzw. die Zustände aus der NMR-Spektroskopie zugeordnet. Die Bindung von ATP an Myosin S1 ist diffusionslimitiert (1). Anschließend folgt eine schnelle und meist irreversible Konformationsänderung (2), mit noch offener γ -Phosphat tasche in der ATP-Bindungsstelle. Dieser Zustand wird bei Kristallen mit ADP, AMP.PNP und ATP γ S im aktiven Zentrum gefunden (GULICK et al., 1997). In diesem offenen Zustand kann Myosin S1 keine ATPase sein (GEEVES & HOLMES, 1999). Für die Hydrolyse ist ein weiterer langsamer Konformationswechsel notwendig (3a). Der Wechsel der dicken Filamente mit ATP oder ADP.VO $_4^{3-}$ von ungeordneter zu geordneter helikaler Struktur durch Temperaturerhöhung in der Elektronenmikroskopie und Röntgendiffraktion ist wahrscheinlich hier einzuordnen und sollte dem Myosin S1-Produktzustand entsprechen. Die Nukleotidanaloga AMP.PNP und ATP γ S scheinen diese Konformation nicht zu stabilisieren oder gar zu verhindern und bleiben in der Konformation nach dem 2. Schritt (SCHRUMPF, 1995). In der Kristallstruktur des Vanadat-Komplexes ist die γ -Phosphat tasche geschlossen (SMITH & RAYMENT, 1996). In der ^{31}P -NMR-Spektroskopie dagegen zeigte der Myosin S1.ADP.VO $_4^{3-}$ -Komplex selbst im Übergangszustand noch eine relativ heterogene Umgebung für die β -Phosphatgruppe und belegt, daß der Übergangszustand der Hydrolyse auch mit Vanadat nicht eindeutig definiert ist und besetzt nur bei höherer Temperatur öfter den Zustand mit geschlossener γ -Phosphat-Bindungsstelle (*switch 2* in GEEVES & HOLMES, 1999). Dafür spricht auch, daß der Myosin S1.ADP.VO $_4^{3-}$ -Komplex den gesamten ATPase-Zyklus durchlaufen kann und die Freisetzung von Vanadat in Gegenwart von Aktin um das 10^5 -fache erhöht wird (GOODNO & TAYLOR, 1982). Diese Heterogenität könnte auch die Ursache für den weniger gut definierten C-Terminus in der Kristallstruktur sein.

Bei Temperaturen um 298 K wird der Myosin S1.ADP-Komplex trotz der fehlenden γ -Phosphatgruppe ähnlich gut wie der Myosin S1.ADP.VO $_4^{3-}$ -Komplexe stabilisiert. In der Kristallstruktur wird die Position der Sauerstoffatome des γ -Phosphats in der offenen γ -Phosphatbindungstasche von Wassermolekülen eingenommen (GULICK et al., 1997). Die ^{31}P -NMR-Spektren von Myosin S1.ADP und Myosin S1.ADP.VO $_4^{3-}$ deuten darauf, daß sich bei Temperaturen über 285 K die γ -Phosphatbindungstasche schließt.

Die ^{31}P -NMR-Spektren zeigen deutlich, daß ADP.AIF $_4$ zwei unterschiedliche und gut strukturierte Konformationen stabilisiert. Die Änderung der chemischen Verschiebung nach höherem Feld für das β -Phosphoratom deutet vielleicht auf die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung von dem in allen Myosinen konservierten Gly 468 zu einem Fluoratom hin. Vom Myosin S1.ADP.AIF $_4$ -Komplex ist zur Zeit nur eine Röntgenkristallstruktur bekannt. Sie ist der Struktur von Myosin S1.ADP.VO $_4^{3-}$ sehr ähnlich (FISHER et al., 1995^b) und beide werden dem Übergangszustand oder dem ADP.P $_i$ -Zustand (3b) zugeordnet. Im Kristall ist bei beiden

Komplexen die ATP-Bindungsstelle mit geschlossener γ -Phosphatgruppe gut definiert, aber die Halsregion scheint mehrere Konformationen zu zeigen. In dem zweiten, nur in der NMR-Spektroskopie sichtbaren Zustand kann das Myosin S1.ADP.AIF₄ eventuell die ersten schwachen Wechselwirkungen mit F-Aktin ausbilden. MARUTA et al. (1993) konnten bei 298 K Myosin S1.ADP.AIF₄ mit F-Aktin nur teilweise kopräzipitieren. Auch die elektronenmikroskopischen Arbeiten von SCHRUMPF (1995) belegen mit dem Übergang von ungeordneter zu geordneter helicaler Struktur der dicken Filamente mit ADP.AIF₄⁻ zwei verschiedene Strukturen.

Im Myosin S1.ADP.BeF_x-Komplex ändert sich die Umgebung der Phosphorkerne in der ATP-Bindungsstelle nur sehr gering durch die Temperaturerhöhung. Auf einen zweiten Zustand bei 298 K weist nur die sehr kleine Änderung der chemischen Verschiebung um 0,09 ppm und die Linienverbreiterung um 30 Hz hin. Die Röntgenstruktur von FISHER et al. (1995) zeigt den Myosin S1.ADP.BeF_x-Komplex mit offener γ -Phosphat-Bindungsstelle und der Halsregion in der Position nach dem Kraftschlag (4). In einer neueren Arbeit (SCHLICHTING et al., in Vorbereitung) kristallisierte der Myosin S1.ADP.BeF_x-Komplex auch mit geschlossener γ -Phosphat-Bindungsstelle und die Halsregion ist in derselben Konformation wie im Myosin S1.ADP.VO₄³⁻-Komplex, also vor dem Kraftschlag (3a oder 3b). Wenn die beiden Konformere der NMR-Spektroskopie den beiden Kristallstrukturen entsprechen, wäre der Konformationswechsel der Halsregion weitgehend von der eigentlichen Hydrolyse entkoppelt. Denn der Angriff der Base auf die γ -Position sollte die Abschirmung des Phosphors von der β -Phosphatgruppe stärker verändern. Dies sollte entweder mit einer deutlicheren Verschiebung oder Linienverbreiterung einhergehen. Andererseits ist der Abstand von Gly 468 zu dem nächsten Fluoratom wesentlich größer als im S1.ADP.AIF₄, und die Ausbildung der stabilisierenden Wasserstoffbrücken von Gly 468 ist nicht möglich (FISHER et al., 1995^b). So daß mit diesem Nukleotidanaloga der erste Myosin S1.ADP.P_i-Zustand (3b) nicht stabilisiert

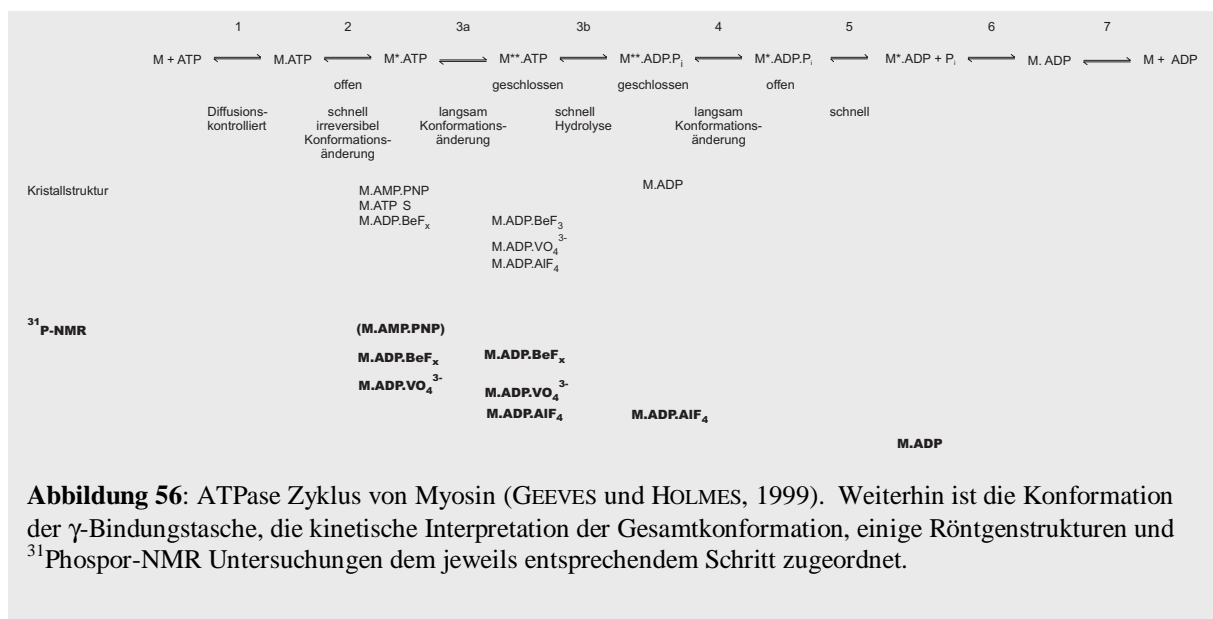


Abbildung 56: ATPase Zyklus von Myosin (GEEVES und HOLMES, 1999). Weiterhin ist die Konformation der γ -Bindungstasche, die kinetische Interpretation der Gesamtkonformation, einige Röntgenstrukturen und ³¹Phosphor-NMR Untersuchungen dem jeweils entsprechendem Schritt zugeordnet.

werden kann und erst durch eine höhere Temperatur induziert werden kann. Für diese Interpretation sprechen die Beobachtung von SCHRUMPF (1995), daß geordnete helikale Strukturen der Myosinköpfe mit ADP.BeF_x im dicken Filament erst bei 303 K vorlagen und die Beobachtung von Maruta et al. (1993), daß der Myosin S1.ADP.BeF_x-Komplex keine Aktomyosin-Komplexe bildet. Der Myosin S1.ADP.BeF_x-Komplex entspricht in diesem Fall dem Myosin S1.ATP-Zustand nach dem Kraftschlag *und* der erneuten Bindung von ATP der zur Ablösung des Myosins vom Aktinfilament führt.

4.3 Aktomyosin

Die Ergebnisse der ¹H-NMR-Spektroskopie zeigen, daß der N-Terminus von Aktin nicht in die starke Bindung des Myosins an das Aktinfilament nach der ATP-Hydrolyse involviert ist. In Abwesenheit von ATP wurde der N-terminale Acetylrest von Aktin nicht durch das Myosin S1 aus Kaninchen oder der *Dictyostelium* Motordomäne immobilisiert. Dies widerspricht aber nur bei oberflächlicher Betrachtung den Ergebnissen, die in der Literatur beschrieben sind (Übersicht in SHETERLINE et al., 1996). Daß der N-Terminus für die Bildung des Aktomyosinkomplexes mit nukleotidfreiem Myosin S1 nicht notwendig ist wurde durch die Blockierung der sieben N-terminalen Aminosäureresten bzw. der Aminosäurereste 18-29 mit den entsprechenden Anti-Aktin-Antikörperfragmenten gezeigt (MILLER et al. 1987, ADAMS & REISLER, 1994). Durch den Einsatz von ADP.VO₄³⁻ als ATP-Analogon im Myosin S1 wird der Myosin S1.ADP.P_i-Zustand stabilisiert. Auch in dieser früheren Phase der Interaktion beider Proteine wurde der N-Terminus von Aktin nicht immobilisiert. Einen Hinweis auf einen anderen Bindungszustand liefert aber die teilweise Mobilisierung und die Änderung der chemischen Verschiebung der N-terminalen N-Trimethylgruppe der LC1 des Myosins im Aktomyosinkomplex. An Cys 10 chemisch modifiziertem Aktin konnten zwei verschiedene Bindungszustände von Myosin S1 an F-Aktin gezeigt werden. In Gegenwart von ATP wurde durch Myosin S1 die Signalintensität der PFP-Markierung deutlich reduziert. Erst nach der Hydrolyse des ATPs nahm die Mobilität wieder zu und das ¹⁹F-Signal wurde intensiver. Diese Ergebnisse beweisen die Bindung von Myosin S1 in einer frühen Phase an die Subdomäne I von Aktin. Erst im weiteren Verlauf der Interaktion sind andere Regionen des Aktins an der Ausbildung der starken Wechselwirkungen im Aktomyosinkomplex beteiligt. Diese erste Interaktion von Myosin S1 mit der Subdomäne I von Aktin scheint für die Hydrolyse des ATPs essentiell zu sein. Die Blockierung des N-Terminus oder der Aminosäurereste 18-29 mit den oben erwähnten Antikörperfragmenten verhindert die aktinaktivierte Myosin-ATPase und die Bindung von Myosin an das Aktinfilament (DASGUPTA et al. 1992). Für elektrostatische Wechselwirkungen während der ersten Interaktionen des Myosin S1 mit dem N-terminalen Acetylrest des Aktins (SCHRÖDER et al., 1993) spricht auch der Einfluß der Ladung des

N-Terminus. Zusätzlich eingefügte negativ geladene Aminosäuren beschleunigen die ATPase-Aktivität des Myosins und Deletion verringert sie (COOK et al., 1993). Da die ^1H NMR-Spektren keine Immobilisierung oder Linienverbreiterung der Resonanzlinie des N-Terminus von Aktin zeigen sollte dieser Teil des Prozesses sehr schnell ablaufen und nur ein sehr kleiner Teil des Gesamtsystems befindet sich in dem Zustand. Die Ergebnisse dieser Experimente deuten auf mindestens zwei verschiedene, von gebundenem Nukleotid abhängige stereospezifische Bindungen des Myosin S1 an das Aktinfilament.

5 Experimenteller Teil

5.1 Präparation der Proteine

5.1.1 Aktin aus Kaninchen

Die Herstellung von Aceton-Trockenpulver aus Kaninchenmuskel und von Aktin aus dem Aceton-Trockenpulver erfolgte, mit geringen Modifikationen, nach Literaturangaben (SPUDICH & WAIT, 1971; LÖW & DANCKER 1976; PARDEE & SPUDICH 1982).

5.1.1.1 Aceton-Trockenpulver

Das Muskelfleisch von Rücken und Hinterläufen zweier frisch geschlachteter Kaninchen wurde vom Fett befreit und zum Transport in Eiswasser gelagert. Die weiteren Arbeitsschritte fanden bei 4 °C (im Kühlraum) statt. Das Muskelfleisch wurde mit Filterpapier getrocknet, im Fleischwolf zerkleinert, in 1,5 l 0,1 M KCl aufgenommen und portionsweise in einem Schnellmixer homogenisiert. Das Homogenisat wurde mit 750 ml 3 M KCl versetzt und mit dest. H₂O auf 4 l aufgefüllt. Die Suspension wurde eine halbe Stunde gerührt und danach in einer Beckman J6 Zentrifuge 5 min bei 4000 rpm in 1 l Bechern zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets nacheinander mit 0,6 M, 0,3 M und 0,1 M KCl gewaschen. Um Reste von anhaftendem Myosin zu entfernen, wurde anschließend in 5 mM NaHCO₃/100 mM KCl 30 min lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zentrifugation wie oben, wurden die Pellets fünfmal mit 0,1 M KCl und sechsmal mit dest. H₂O gewaschen, wobei die Pellets immer voluminöser wurden. Der Rückstand wurde dann mit insgesamt ca. 15 l Aceton mehrfach gewaschen, wobei die Acetonmenge jeweils verringert wurde und der Ansatz in den letzten drei Waschgängen in einem Leinentuch gut ausgewrungen wurde. Nach einer Trockenzeit von ca. 5 h wurde der Rückstand durch ein Sieb gerieben und bei -20 °C eingefroren.

5.1.1.2 Präparation von Aktin aus Aceton-Trockenpulver

4 g Trockenpulver wurden in 80 ml eisgekühltem bidest. H₂O suspendiert und 20 min im Eisbad unter langsamen Rühren extrahiert. Der Extrakt wurde über einen Büchnertrichter in eine gekühlte Waschflasche abgesaugt und der Rückstand für weitere 15 min mit 50 ml H₂O extrahiert. Um Rückstände zu entfernen, wurden die vereinigten Filtrate 20 min bei 30 000 rpm in einem Beckman 60 TI Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend durch Zugabe von 0,1 M MgCl₂ (Endkonzentration 0,7 mM) und Tris-HCl pH 8 (Endkonzentration 2 mM) polymerisiert. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde die sehr viskose Lösung im Beckman TI-60

Rotor, bei 54 000 rpm und 10°C eine Stunde zentrifugiert. Anschließend wurden die F-Aktin Pellets mit 30 ml kaltem ATP-Puffer⁴ (Depolymerisationspuffer) im Glas/Teflon Potter homogenisiert und über Nacht gegen 2 l dieses Puffers dialysiert. Nicht depolymerisiertes F-Aktin wurde durch Zentrifugation wie oben aus dem Dialysat entfernt. Das G-Aktin wurde dann über eine HW 55 Säule, äquilibriert mit ATP-Puffer, weiter gereinigt. Das danach erhaltene G-Aktin erwies sich im SDS-Gel als sauber.

5.1.1.3 Herstellung von ADP-Aktin

ATP-G-Aktin in ATP-Puffer wurde 30 min bei Raumtemperatur mit 1 mM MgCl₂, 0,2 mM EGTA polymerisiert. Während weiterer 90 min wurde das ATP durch die Inkubation mit 5 U/ml Hexokinase und 1 mM Glucose zu ADP und Glukose-6-Phosphat umgewandelt (Pollard, 1996). Nach der Ultrazentrifugation wurden die F-Aktin Pellets über Nacht auf Eis mit ADP-Puffer aufgeweicht und anschließend im Glas/Teflon Potter vorsichtig homogenisiert.

5.1.2 Präparation von Aktin aus Huhn

Die Präparation erfolgte analog zu 5.1.1.

5.1.3 Präparation von Aktin aus *Dictyostelium discoideum*

Nach der Extraktion der Motordomäne mit dem Extraktionspuffer und dem Abzentrifugieren befindet sich das Aktin im Pellet. Die Pellets wurden mit 25 ml kaltem Mg²⁺-ATP-Puffer in einem Glas/Teflon-Potter homogenisiert und gegen 2 l Mg²⁺-ATP-Puffer 12 bis 24 h mit einmaligem Wechsel des Puffers nach 3 h dialysiert. Das Dialysat wurde eine Stunde im 60 TI-Rotor bei 54 000 rpm und 4°C 90 min zentrifugiert. Das danach im Überstand enthaltene G-Aktin wurde mit MgCl₂ (Endkonzentration 0,7 mM) polymerisiert und nochmals wie oben zentrifugiert. Anschließend wurden die F-Aktin Pellets wieder in 25 ml ATP-Puffer homogenisiert und über Nacht gegen 2 l ATP-Puffer dialysiert. Nicht depolymerisiertes Aktin wurde durch Zentrifugation wie oben aus dem Dialysat entfernt. Das danach erhaltene G-Aktin erwies sich im SDS-Gel als sauber.

⁴ Für Mg-Aktin: 2 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,2 mM ATP, 0,1 mM MgCl₂, 0,2 mM EGTA, 0,1 mM NaN₃

Für Ca-Aktin: 2 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,2 mM ATP, 0,1 mM CaCl₂, 0,1 mM NaN₃

Für nukleotidfreies Ca-Aktin: 2 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,1 mM CaCl₂, 0,1 mM NaN₃

5.1.4 Myosin und Myosin Subfragment I aus Kaninchen

5.1.4.1 Myosin

Die Präparation folgte mit einigen Modifikationen der Vorschrift von MARGOSSIAN & LOWEY (1975).

Der Überstand der KCl Extraktion (siehe 5.1.1) des Muskelfleisches wurde durch einige Lagen sterilen Mull filtriert und jeweils 150 ml des Filtrates mit bidest. H₂O auf 2 l aufgefüllt. Das Myosin fiel dabei als weißer Niederschlag aus. Jeweils 4 x 1 l wurden in der Beckman J6 Zentrifuge abzentrifugiert. Es wurden jeweils drei bis vier Pellets übereinander gesammelt. Sie wurden anschließend mit 12 ml 3 M KCl je 1 l-Becher mit Hilfe einer Glaspipette homogenisiert, auf 1 l mit dest. H₂O aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Die Pellets wurden in einem 1 l Meßzylinder mit KCl homogenisiert (Endkonzentration 0,6 M) und es wurden Imidazol-HCl (pH 7) (Endkonzentration 10 mM), ATP (Endkonzentration 5 mM) und MgCl₂ (Endkonzentration 5 mM) zugegeben. Diese Lösung wurde im Beckman 45 Ti Rotor 2 h bei 4°C und 35 000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe von obenliegenden Verunreinigungen (hauptsächlich Lipide) befreit, gesammelt und mit dest. H₂O aufgefüllt um das Myosin auszufällen. Nach drei analogen Waschschrritten wurden die Pellets in 0,6 M KCl/10 mM Imidazol-HCl pH 7 gelöst, 1:1 mit Glycerin gemischt und bei -20°C eingefroren.

5.1.4.2 Myosin S1

Die Präparation folgte im wesentlichen einer Vorschrift von WEEDS & TAYLOR (1976).

Die Myosin-Stocklösung wurde 15fach mit kaltem bidest. H₂O verdünnt und das ausgefallene Myosin abzentrifugiert. Die Pellets wurden mit wenig 3 M NaCl aufgenommen und mit Hilfe einer Glaspipette wieder homogenisiert. Das Myosin wurde dann durch Auffüllen mit bidest. H₂O wieder ausgefällt und der gesamte Waschvorgang noch viermal wiederholt. Der Überstand wurde nach dem letzten Waschen mit der Wasserstrahlpumpe vollständig abgesaugt, die Pellets in 3 M NaCl aufgelöst und mit 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7, 1 mM EDTA, auf 200 ml verdünnt. Die Proteinkonzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt ($\epsilon_{280}=249000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Für die proteolytische Spaltung bei Raumtemperatur wurden 0,05 mg/ml Chymotrypsin zugegeben und die Reaktion nach 10 min durch Zugabe von 0,1 mM PMSF (in CH₃OH) beendet. Die Lösung wurde über Nacht gegen 50 mM Imidazol-HCl pH 7, 1 mM DTT dialysiert. Die dabei ausgefallenen Myosin-Rods wurden durch Ultrazentrifugation (1h, 40 000 rpm) von dem im Überstand bleibenden Myosin S1 abgetrennt. Das Myosin S1

wurde zur Trennung der beiden Isoformen A1 und A2 auf eine Whatman DE52 Ionentauschersäule, äquilibriert mit 20 mM Imidazol-HCl pH 7, gegeben und mit 500 ml Puffer gespült. Die beiden Isoformen eluieren durch Anlegen eines linearen Gradienten von 0 bis 0,15 M NaCl. Die weitere Reinigung erfolgte durch Ammoniumsulfatfällung. Alles Material, das unter 47% Sättigung ausfiel, wurde abzentrifugiert (25 min. 20000 rpm) und verworfen. Die Fraktion zwischen 47% und 58% Sättigung enthielt das Myosin S1, das nach der Zentrifugation in wenig 20 mM Imidazolpuffer aufgenommen und zur Entfernung des Ammoniumsulfates ausgiebig gegen den gleichen Puffer dialysiert wurde. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch ($\epsilon_{280} = 81200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Zur Aufbewahrung wurde die Lösung mit 5% Glucose versetzt, tropfenweise in flüssigem N_2 tiefgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

5.1.5 Proteinpräparation der His-tagged Myosin-Motor-Domäne aus *Dictyostelium discoideum*

Der *Dictyostelium discoideum* Klon M754 besitzt eine G418 Resistenz und exprimiert die N-terminalen 754 Aminosäuren der Motordomäne mit einem Histidinanhang aus 8 Histidinen am N-Terminus. Die Sporen des Klones wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Manstein zur Verfügung gestellt.

Die Präparation erfolgte mit einigen Modifikationen nach der Vorschrift von MANSTEIN & HUNT (1995).

5.1.5.1 Aufzucht der Zellen

Die Sporen waren in 1 ml Aliquots mit 1×10^7 Sporen/ml in 10% Glycerin bei -80°C gelagert. Zu Anfang wurden 2×10^7 Sporen in 50 ml DD20-Medium angesetzt. Zum Abtöten von Bakterien wurden von Beginn an $7\mu\text{l/ml}$ eines Penicillin/Streptomycin-Gemisches (1000 Einheiten, Boehringer) zugesetzt. Die ausgekeimten Zellen haben anfangs sehr lange Generationszeiten, so daß erst nach 48 h $0,2 \mu\text{l/ml}$ G418 hinzugegeben wurden. Die maximale Zellkonzentration betrug 2×10^6 Zellen/ml. Nach Erreichen dieser Zellkonzentration wurde auf 2×10^5 Zellen/ml mit DD20-Medium verdünnt und die entsprechende Menge an Penicillin/Streptomycin und G418 zugesetzt. Die Erlenmeyerkolben wurden maximal bis zur Hälfte gefüllt, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu erreichen. Während des Hochwachstums der Zellen sollte die Temperatur zwischen 20 und 23°C und die Schüttelfrequenz zwischen 130 und 190 rpm liegen.

5.1.5.2 Proteinpräparation der Motordomäne

Bei einer Zelldichte von 6×10^6 bis 1×10^7 Zellen/ml und einem Gesamtvolumen von 15 l wurden die Zellen durch Zentrifugation in 1 l Bechern in einer Beckman J6-Zentrifuge bei 4°C und sechs Minuten mit 2700 rpm vom Medium abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen ausgewogen und in einem Liter kaltem PBS-Puffer resuspendiert und nochmal unter den gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Die so gewaschenen Zellen wurden pro Gramm Zellen mit 4 ml Lyse-Puffer im Glas/Teflon-Potter homogenisiert. Nach dem Homogenisieren wurde pro Gramm Zellen mit weiteren zwei ml Lysepuffer, dem zusätzlich 1% Triton, 15 $\mu\text{g/ml}$ RNase A, und 100 Einheiten Alkalische Phosphatase zugesetzt wurden, verdünnt. Die Zellsuspension wurde für eine Stunde auf Eis aufbewahrt. Dann wurde das Lysat in der Ultrazentrifuge in 45 Ti-Röhrchen eine Stunde bei 45 000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die so erhaltenen Pellets wurden mit 100 ml Extraktions-Puffer gewaschen und im 45 Ti-Rotor bei 45 000 rpm und 4°C für 45 Minuten zentrifugiert. Die Motordomäne wurde durch Resuspension in 1,6 ml Extraktions-Puffer mit 10 mM ATP pro Gramm Zellen extrahiert. Die Suspension wurde im 70 TI-Rotor für eine Stunde bei 65 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Flußrate von zwei ml/min über eine Ni-NTA-Säule (Quiagen) gepumpt. Die ungebundenen Proteine wurden durch Waschen mit Niedrigsalz-Puffer und Hochsalz-Puffer sowie Niedrigsalz-Puffer mit 50 mM Imidazol, jeweils ungefähr drei Säulenvolumen bis zum Erreichen der Schreibergrundlinie, entfernt. Die Motordomäne eluierte in der zweiten Hälfte eines linearen Gradienten aus Niedrigsalz-Puffer und 0,5 M Imidazol. Der Gradient beginnt mit 90 % Niedrigsalz-Puffer/10 % Imidazol-Puffer und endet bei 100 % Imidazol-Puffer. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Die reinen Fraktionen wurden vereinigt und 12 bis 18 h gegen drei Liter DEAE-Puffer dialysiert.

Das gereinigte Protein wurde in Centriprep 30 Konzentratoren (Amicon) bis auf 7 mg/ml konzentriert, mit 3 % (Gewichtsprozent) Sucrose versetzt und in flüssigen Stickstoff getropft. Die so erhaltenen tiefgefrorenen Tropfen wurden bei -80°C gelagert.

5.2 Chemische Modifikation von Aktin

5.2.1.1 Derivatisierung von Cys 374 in ATP-G-Aktin mit N-Ethyl-Maleinimid

Für die Derivatisierung von Cys 10 war es notwendig, die Thiolgruppe von Cys 374 durch die Umsetzung mit N-Ethyl-Maleinimid (NEM) zu blockieren. Dazu wurde ein 50facher Überschuß NEM in Ethanol gelöst und zur Ca^{2+} -Aktinlösung gegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde das überschüssige Reagenz über eine G-25 Säule, äquilibriert mit Ca^{2+} -G-Aktin-Puffer, abgetrennt. Anschließend wurde das ^{374}NEM -Aktin durch Zugabe von 0,1 M MgCl_2 (Endkonzentration 1 mM) und 0,1 M EGTA (Endkonzentration 0,4 mM) eine Stunde bei RT

polymerisiert, bei 54 000 rpm und 10 °C 90 min im TI-60 Rotor in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Um das an der hochaffinen Bindungsstelle gebundene Ca-Ion gegen ein Mg-Ion auszutauschen, wurden die Pellets in Mg²⁺-ATP-G-Aktin-Puffer aufgenommen, im Glas/Teflon-Potter homogenisiert und über Nacht gegen 2 l Mg²⁺-ATP-Puffer dialysiert. Das ³⁷⁴NEM-Mg²⁺-G-Aktin wurde dann über eine HW 55 Säule, äquilibriert mit Mg²⁺-ATP-G-Aktin-Puffer, weiter gereinigt.

5.2.1.2 Derivatisierung von Cys 374 in ATP-G-Aktin mit 4-(perfluoro-tert-butyl)-phenyliodacetamid (PFP)

Das Markierungsreagens 4-(perfluoro-tert-butyl)phenyliodacetamid (PFP) wurde freundlicherweise von Herrn Zimmermann zur Verfügung gestellt (KALBITZER et al., 1992).

Zu 3 ml 70 µM Ca²⁺-G-Aktin in 2 mM Tris-HCl pH 7,8 mit 0,2 mM ATP und 0,1 mM CaCl₂ wurde unter starkem Rühren bei RT zügig der 7-fache Überschuß an PFP, gelöst in 100 µl DMF, gegeben. Aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit fiel das Reagens bei der Zugabe zur Proteinlösung aus, doch genügte der gelöste Anteil zur vollständigen Reaktion, wenn die Aktinlösung nach der Zugabe noch drei Stunden⁵ bei RT verblieb und gelegentlich vorsichtig gerührt wurde. Nach weiteren 12 Stunden bei 4 °C wurde das Reagenz mittels einer mit Ca²⁺-ATP-Puffer äquilibrierten Bio-Gel P2 Säule entfernt. Um das an der hochaffinen Bindungsstelle gebundene Ca²⁺-Ion gegen ein Mg²⁺-Ion auszutauschen, wurden die Pellets in Mg²⁺-ATP-G-Aktin-Puffer aufgenommen, im Glas/Teflon-Potter homogenisiert und über Nacht gegen 2 l Mg²⁺-ATP-Puffer dialysiert. Das ³⁷⁴NEM-Mg²⁺-G-Aktin wurde dann über eine HW 55 Säule, äquilibriert mit Mg²⁺-ATP-G-Aktin-Puffer, weiter gereinigt.

5.2.1.3 Derivatisierung von Cys 10 in ATP-G-Aktin mit 4-(perfluoro-tert-butyl)-phenyliodacetamid (PFP)

Um selektiv Cys 10 zu derivatisieren, mußte vorher die Thiofunktion von Cys 374 mit NEM blockiert und das Ca²⁺-Ion an der hochaffinen Bindungsstelle gegen ein Mg²⁺-Ion ausgetauscht werden (vgl. 5.2.1.1).

Zu ³⁷⁴NEM-Mg²⁺-G-Aktin wurde unter starkem Rühren bei RT zügig der 7-fache Überschuß an PFP, gelöst in 100 µl DMF, gegeben (vgl. 5.2.1.2). Danach verblieb die Aktinlösung noch drei Stunden bei RT und wurde gelegentlich vorsichtig gerührt. Nach weiteren 12 Stunden bei 4 °C wurde das Reagenz mittels einer mit Mg²⁺-ATP-Puffer äquilibrierten Bio-Gel P2 Säule entfernt. Anschließend wurde das ¹⁰PFP-³⁷⁴NEM-Mg²⁺-G-

⁵ Durch die Erhöhung der Temperatur von 0 °C auf RT konnte die Ausbeute wesentlich erhöht werden (Kalbitzer et. al, 1992).

Aktin durch Zugabe von 0,1 M MgCl₂ (Endkonzentration 1 mM) und 0,1 M EGTA (Endkonzentration 0,4 mM) eine Stunde bei RT polymerisiert und entsprechend 5.2.1.2 mit Mg²⁺-ATP-Puffer weiter aufgearbeitet.

5.3 Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)

Calcium- und Magnesiumbestimmungen mit Flammenionisations-AAS wurden im Physikalisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg von Herrn Herrn E. Wiedemann an einem Spektrometer von Perkin Elmer (Modell 3030) durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte für Calcium mit wäßrigen Lösungen der Konzentrationen 0,250, 0,500 und 2,500 µg/ml, bei Magnesium betragen die Konzentrationen 0,125, 0,250 und 1,250 µg/ml.

5.4 SDS-Page

Die Reinheit einer Präparation wurde durch denaturierende Gelelektrophorese nach LÄMMLI (1974) kontrolliert. Aktin zeigt auf SDS-Gelen ein scheinbares Molekulargewicht von ca. 45 kDa, Myosin S1 ca. 120 kDa und die *Dictyostelium discoideum* Motordomäne ca. 87 kDa.

5.5 Materialien

5.5.1 Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
ADP	Pharma-Waldhof, Mannheim
Aluminiumtrichlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad, München
ATP	Pharma-Waldhof, Mannheim
α -Chymotrypsin	Serva, Heidelberg
Berylliumchlorid	Merck, Darmstadt
Coomassie Blue R-250	Merck, Darmstadt
Deuteriumoxid	Roth, Karlsruhe
EDTA	Sigma, München
EGTA	Roth, Karlsruhe
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff („MB Reagent)	Sigma, München
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hexokinase	Sigma, München
Hefeextrakt	Oxoid, Wesel
Imidazol	Roth, Karlsruhe
Kaliumfluorid	Merck, Darmstadt
Leupeptid	Fluka, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
MW-Marker (SDS-Page)	Sigma, München
N-Ethylmaleinimid	Sigma, München
Natriumorthovanadat	Merck, Darmstadt
N-CBZPA	Sigma, München
Pepstatin	Fluka, Deisenhofen
Protease Peptone L85	Oxoid, Wesel
SDS	Merck, Darmstadt
Saccharose (Sucrose)	Roth, Karlsruhe
TAME	Sigma, München
TEMED	Merck, Darmstadt
TLCK	Sigma, München
TPCK	Sigma, München
Triton X-100	Sigma, München
Uranylacetat	Serva, Heidelberg

5.5.2 Säulenfüllmaterialien

Bio-Gel P2	Bio-Rad, München
Fractogel TSK, HW55	Merck, Darmstadt
Ni-NTA	Qiagen, Hilden
Sephadex G-25	Pharmacia, Schweden
Whatman DE-52	Whatman, England

5.5.3 Pufferlösungen

Ca²⁺-ATP-G-Aktin-Puffer:

2 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,2 mM ATP, 0,1 mM CaCl₂, 0,1 mM NaN₃

Ca-G-Aktin-Puffer (nukleotidfrei):

2 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,1 mM CaCl₂, 0,1 mM NaN₃

Mg- ATP-G-Aktin-Puffer:

2 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,2 mM ATP, 0,1 mM MgCl₂, 0,2 mM EGTA, 0,1 mM NaN₃

Mg-ADP-G-Aktin-Puffer:

25 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM ADP, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM NaN₃

DD Broth20-Medium (pH 6,5):

20 g/l Protease Peptone L85, 7 g/l Hefeextrakt, 45 mM Glucose, 1,34 mM NaH₂HPO₄, 2,57 mM KH₂PO₄, (7 µl/ml Penstrep, 20 µl/ml G418 erst während dem Kultivieren zugeben)

PBS:

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4 (HCl)

Lyse-Puffer:

50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM EDTA, 0,2 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 mM Benzamidin und 40 µg/ml TLCK, 40 µg/ml TAME, 40 µg/ml PMSF, 40 µg/ml Phenanthrolin, 0,02% NaN₃

Extraktionspuffer ohne ATP:

50 mM Hepes (pH 7,3), 30 mM KAcetat, 10 mM MgSO₄, 5 mM Benzamidin, 1 mM DTT, 40 µg/ml PMSF

Extraktionspuffer mit ATP:

50 mM Hepes (pH 7,3), 10 mM ATP, 30 mM KAcetat, 10 mM MgSO₄, 5 mM Benzamidin, 1 mM DTT, 40 µg/ml PMSF

Niedrig-Salz-Puffer:

50 mM HEPES (pH 7,3), 30 mM KAcetat, 3 mM Benzamidin

Hoch-Salz-Puffer:

50 mM HEPES (pH 7,3), 300 mM KAcetat, 3 mM Benzamidin

Imidazol-Puffer:

0,5 mM Imidazol (pH 7,3), 3 mM Benzamidin

DEAE-Puffer:

5 mM HEPES-KOH (pH 7,3), 1mM DTT, 2 mM EDTA, 5 mM MgSO₄, 1 mM Benzamidin, 0,2 mM Phenanthrolin, 0,1 mM PMSF, 0,02 % (Gewichtsprozent) NaN₃

Lösungen für die Gelelektrophorese

Monomerlösung: 28,2 % Acrylamid 0,8 % Bisacrylamid

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)

Sammelpuffer: 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)

Initiator: 10 % Ammoniumpersulfat

Färbelösung: 0,124 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 % CH₃OH, 10 % Eisessig

Entfärbelösung: 50 % CH₃OH, 10 % Eisessig

SDS-Page:

Probenpuffer (6fach): 0,375 M Tris-HCl (pH 6,8), 12 % SDS, 60 % Glycerin,
30 % β-Mercapto-ethanol, 0,006 % Bromphenolblau

Elektrophoresepuffer: 0,025 M Tris, 0,192 M Glycerin, 0,1 % SDS

5.5.4 Geräte

AMX 500

Bruker, Rheinstetten

DMX 600

Bruker, Rheinstetten

DMX 800

Bruker, Rheinstetten

Kühlzentrifuge J6

Beckman, USA

Ultrazentrifuge Optima L 70

Beckman, USA

Tischultrazentrifuge TLX 100

Beckman, USA

Tischzentrifuge 5415 C

Eppendorf, Hamburg

45 TI-Rotor

Beckman, USA

60 TI-Rotor

Beckman, USA

70 TI-Rotor

Beckman, USA

Ostwald Kapillarviskosimeter

6 Literatur

- ADAMS, R. J. & POLLARD, T. D. (1986): Propulsion of organelles isolated from *Acanthamoeba* along actin. *Nature* **322**, 754-756
- ADAMS, S.B., REISLER E. (1994) Sequence 18-29 on actin: antibody and spectroscopic probing of conformational changes. *Biochemistry*. **33**, 14426-14433
- AKASAKA, K., KONRAD, M., GOODY, R.S., (1978): Selective spin diffusion. A novel method for studying motional properties of biopolymers in solution. *FEBS Let.* **96**, 287-290
- ALTIERI, A. S., HINTON, D. P. & BYRD, R. A.(1995): Association of Biomolecular Systems via Field Gradient NMR Self-Diffusion Measurements. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 7566-7567
- ARATA, T. (1986): Structure of the acto-myosin complex produced by crosslinking in the presence of ATP. *J. Mol. Biol.* **191**, 107-116
- BAGSHAW, C. R., ECCLESTON J, F., ECKSTEIN, F., GOODY, R. S., GUTFREUND, H., TRENTHAM, D. R. (1974) The magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase of myosin. Two-step processes of adenosine triphosphate association and adenosine diphosphate dissociation. *Biochem. J.* **141**, 351-64
- BARDEN, J. A., COOKE, R., WRIGHT, P. E. & DOSREMEDIOS, C. G. (1980): Proton nuclear resonance and electron paramagnetic resonance studies on skeletal muscle actin indicate that the metal and nucleotide binding sites are separate. *Biochemistry* **19**, 5912-5916
- BARDEN, J. A., PHILLIPS, L., CORNELL, B. D. & DOSREMEDIOS, C. G. (1989): ¹⁹F-NMR studies on the interaction of selectively labelled actin and myosin. *Biochemistry* **28**, 5895-5901
- BENDER, N., FASOLD, H., KENMOKU, A., MIDDELHOFF, G., & VOLK, K.E. (1976): The selective blocking of the polymerization reaction of actin leading to a derivative suitable for crystallization. Modification of Tyr53 by 5-diazonium-(1H)-tetrazol. *Eur. J. Biochem* **64**, 215-218
- BERS, D., PATTON, C. & NUCCITELLI, R. (1994) A Practical Guide to the Study of Ca²⁺ in Living Cells. A Practical Guide to the Preparation of Ca Buffers. *Methods Cell Biol.* **40**, 3-29, Academic Press; San Diego
<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>
- BERTRAND, R., CHAUSSEPIED, P., KASSAB, R., BOYER, M., ROUSTAN, C. & BENJAMIN, Y. (1988): Cross-linking of the skeletal myosin subfragment 1 heavy chain to the N-terminal actin segment of residues 40-113. *Biochemistry* **27**, 5728-5736
- BETTACHE, N., BERTRAND, R. & KASSAB, R. (1989): Coupling of nonpolymerizable actin to the F-actin binding region of the myosin head. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **86**, 6028-6032
- BETTACHE, N., BERTRAND, R. & KASSAB, R. (1990): Maleimidobenzoyl-G-actin: Structural properties and interaction with skeletal myosin subfragment. *Biochemistry* **29**, 9085-9091
- Blackholm, H. & Faulstich, H. (1981): Protection of one of the two reactive thiol groups in F-actin by ATP and phalloidin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **103**, 125-130
- BLOCH, F. (1946): Nuclear Induction, *Phys. Rev.* **70**, 460-474
- BREMER, A. & AEBI, U. (1992): The structure of the F-actin filament and the actin molecule. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 20-26

- BUNDI, A., WÜTHRICH, K. (1977) ^1H NMR titration shifts of amide proton resonances in polypeptide chains. *FEBS Letters*. **77**, 11-4
- BURTNICK, L. D. (1984): Modification of actin with fluorescein isothiocyanate. *Biochim. Biophys. Acta* **791**, 57-62
- CARLIER, M.F., PANTALONI, D. & KORN, E. D. (1984): Evidence for an ATP cap at the ends of actin filaments and its regulation of the F-actin steady-state. *J. Biol. Chem.* **259**, 9983-9991
- CARLIER, M. F., PANTALONI, D. & KORN, E. D. (1986): Fluorescence measurements of the binding of cations to high-affinity and low-affinity sites on ATP-G-actin. *J. Biol. Chem.* **261**, 10778-10784
- CARLIER, M. F. (1988): Role of nucleotide hydrolysis in the polymerization of actin and tubulin. *Cell Biophys.* **12**, 105-117
- CARLIER, M. F. (1989): Role of nucleotide hydrolysis in the dynamics of actin filaments and microtubules. *Int. Rev. Cytol.* **115**, 139-170
- CHANTLER, P. D. & GRATZER, W. B. (1984): Effects of specific chemical modification of actin. *Eur. J. Biochem.* **60**, 67-72
- CLARKE, M. & SPUDICH, J.A. (1977): Nonmuscle contractile proteins: the role of actin and myosin in cell motility and shape determination. *Ann. Rev. Biochem.* **46**, 797-822
- CONRAD, P.A., GIULANO, K.A. FISHER, G., COLLINS K., MATSUDAIRA P.T., TAYLOR, D.L. (1993): Relative distribution of actin, myosin I, and myosin II during the wound healing response of fibroblasts. *J. Cell Biol.* **120**, 1381-1391
- COOKE, R. (1986): The mechanism of muscle contraction. *CRC Crit Rev. Biochem.* **21**, 53-118
- COOKE, R. K., ROOT, D., MÜLLER, C., REISLER, E. & RUBENSTEIN, P. A. (1993): Enhanced stimulation of myosin subfragment 1 ATPase activity by addition of negatively charged residues to the yeast actin NH_2 terminus. *J. Biol. Chem.* **268**, 2410-2415
- COOKE R. (1997) Actomyosin interaction in striated muscle. *Physiological Reviews*. **7**, 671-97
- COOPER, J. A., BUHLE, E. L., WALKER, S. B., TSONG, T. Y. & POLLARD, T. D. (1983): Kinetic evidence for a monomer activating step in actin polymerization. *Biochemistry* **22**, 2193-2200
- DANCKER, P., LÖW, I., HASSELBACH, W. & WIELAND, Th. (1975): Interaction of actin with phalloidin: Polymerization and stabilization of F-actin. *Biochim. Biophys. Acta* **400**, 407-414
- DASGUPTA, G. & REISLER, E. (1989): Antibody against the amino terminus of alpha actin inhibits actomyosin interaction in the presence of ATP. *J. Mol. Biol.* **207**, 833-836
- DETMERS P., WEBER, A., ELZINGA, M. & STEPHENS, R. A. (1981): 7-Chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole actin as a probe for actin polymerization. *J. Biol. Chem.* **256**, 99-105
- DRENCKHAHN, D. & POLLARD, T. D. (1986): Elongation of actin filaments is a diffusion limited reaction at the barbed end and is accelerated by inert macromolecules. *J. Cell Biol.* **103**, 2747-2754
- DREWES, G. & FAULSTICH H. (1990^a): The enhanced ATPase activity of glutathion substituted actin provides a quantitative approach to filament stabilization. *J. Biol. Chem.* **265**, 3017-3021
- DREWES, G. (1991): Die Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehungen beim Aktin mittels chemischer Modifizierung von Thiofunktionen. Doktorarbeit, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg

- DREWES, G. & FAULSTICH, H. (1991): A reversible conformational transition in muscle actin is caused by nucleotide exchange and uncovers cysteine in position 10. *J. Biol. Chem.* **266**, 5508-5513
- DREWES G. FAULSTICH H. (1993): Cooperative effects on filament stability in actin modified at the C-terminus by substitution or truncation. *Eur. J. of Biochem.* **212**, 247-253
- EKIEL, I, ABRAHAMSON, M, FULTON, D. B. LINDAHL, P., STORER, A. C., LEVADOUX, W., LAFRANCE, M., LABELLE, S., POMERLEAU, Y., GROLEAU, D., LESAUTEUR, L., & GEHRING, K. (1997): NMR Structural Studies of Human Cystatin C Dimers and Monomers. *J. Mol. Biol.* **271**, 266-277
- ELZINGA, M. & COLLINS, J. H. (1975): The primary structure of actin from rabbit skeletal muscle. Five cyanogen bromide peptides, including the NH₂ and COOH termini. *J. Biol. Chem.* **250**, 5897-5905
- ERICKSON, H. P. (1989): Co-operativity of Protein-Protein association. The Structure and stability of the actin filament. *J. Mol. Biol.* **206**, 465- 474
- ERNST, R. R. (1966): Sensitivity Enhancement in Magnetic Resonance. *Adv. Magn. Reson.* **2**, 1-135
- ESTES, J. E., SELDEN, L. A. & GERSHMAN, L. C. (1981): Mechanism of action of phalloidin on the polymerization of muscle actin. *Biochemistry* **20**, 708-712
- ESTES, J. E., SELDEN, L. A. & GERSHMAN, L. C. (1987): Tight binding of divalent cations to monomeric actin. Binding kinetics support a simplified model. *J. Biol. Chem.* **262**, 4952-4957
- FAULSTICH, H., SCHÄFER, A. J. & WECKAUF, M. (1977): The dissociation of the phalloidin-actin complex. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **358**, 181-184
- FAULSTICH, H., ZOBEL, S., RINNERHALER, G. & SMALL, J. V (1988): Fluorescent phalloidins as probes for filamentous actin. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **9**, 370-383
- FAULSTICH, H., DREWES, P. & HEINTZ, D. (1993): Determination and derivatization of protein thiols by n-octylnitrobenzoic acid. *Anal. Biochem.* **208**, 357-362
- FISHER, A. J., SMITH, C. A., THODEN, J., SMITH, R., SUTOH, K., HOLDEN, H.M. & RAYMENT, I (1995^a): Structural studies of myosin:nucleotide complexes: a revised model for the molecular basis of muscle contraction. *Biophys. J.* **68** (4 Suppl):19s-26s
- FISHER, A.J., SMITH, C. A., THODEN, J. B., SMITH, R., SUTOH, K., HOLDEN, H. M. & RAYMENT, I (1995^b): X-ray structures of the myosin motor domain of Dictyostelium discoideum complexed with MgADP.BeF_x and MgADP.AlF₄⁻. *Biochemistry* **34**, 8960-8972.
- FRIEDEN, C. (1982): The Mg²⁺-induced conformational change in rabbit skeletal muscle G-actin. *J. Biol. Chem.* **257**, 2882-2886
- FRIEDEN, C. (1983): Polymerisation of actin. Mechanism of the Mg²⁺-induced process at pH 8 and 20°C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **80**, 6513-6517
- FRIEDEN, C. (1985): Actin and tubulin polymerization. The use of kinetic methods to determine mechanism. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **14**, 189-210
- FRIEDEN, C. & PATANE, K (1988): Mechanism for nucleotide exchange in monomeric actin. *Biochemistry* **27**, 3812-3820
- GEEVES, M.A. & HOLMES, K.C. (1999): Structural mechanism of Muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 687-728

- GERSHMAN, L. C., NEWMAN, J., SELDEN, L. A. & ESTES, J. E. (1984): Bound-cation exchange affects the lag phase in actin polymerization. *Biochemistry* **23**, 2199-2203
- GERSHMAN, L. C., SELDEN, L. A. & ESTES, J. E. (1986): High affinity binding of divalent cation to actin monomer is much stronger than previously reported. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **135**, 607-614
- GIBBS, S. J. & JOHNSON Jr., C. S., (1991): A PFG NMR Experiment for Accurate Diffusion and Flow Studies in the Presence of Eddy Currents, *J. Magn. Reson.*, **93**, 395-402
- GOODNO, C. C. (1979): Inhibition of myosin ATPase by vanadate ion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2620-2624
- GOODNO, C.C. & TAYLOR, E.W. (1982): Inhibition of the actomyosin ATPase by vanadate. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **79**, 21-25
- GOODY RS & HOFMANN W (1980^a): Stereochemical aspects of the interaction of myosin and actomyosin with nucleotides. *J. Muscle Research & Cell Motility* **1**, 101-115
- GOODY, R. S., HOFMANN, W., REEDY, M. K., MAGID, A. & GOODNO, C. C. (1980^b): Relaxation of glycerinated insect flight muscle by vanadate. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **1**, 198 - 199
- GULICK, A. M., BAUER, C.B., THODEN, J.B., RAYMENT, I. (1997) X-ray structures of the MgADP, MgATPgammaS, and MgAMPPNP complexes of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain. *Biochemistry*. **36**, 11619-28
- HATANO, S. & OOSAWA, F. (1966): Isolation and characterisation of Plasmodium actin. *Biochim. Biophys. Acta* **127**, 488-498
- HEGYI, G., PREMECZS, G., SAIN, B. & MUHLRAD, A. (1974): Selective carboxymethylation of the histidine residue of actin by diethylpyrocarbonate. *Eur. J. Biochem.* **44**, 7-12
- HEINTZ, D., KANY, H. & KALBITZER, H.R. (1995): Mobility of the N-Terminal Segment of Rabbit Skeletal Muscle F-Actin detected by ¹H and ¹⁹F Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *Biochemistry*, **35**, 12686-12693
- HENRY, G.D., MARUTA, S., IKEBE, M. & SYKES, B. (1993): Observation of multiple Myosin Subfragment 1-ADP-Fluoroberyllate Complexes by ¹⁹F NMR Spectroscopy. *Biochemistry*, **32**, 10451-10456
- HIGHSMITH, S., AKASAKA, K., KONRAD, M., GOODY, R., HOLMES, K., WADE JARDETZKY, N., & Jardetzky, O. (1979): Internal motions in myosin. *Biochemistry* **18**, 4238-4244
- HIGHSMITH, S. & JARDETZKY, O. (1980): G-actin binding quenches internal motions in myosin subfragment-1. *FEBS Lett.* **121**:55-60
- HIGHSMITH, S. & JARDETZKY, O. (1981): Internal motions in myosin. 2. *Biochemistry* **20**, 780-783
- HIGHSMITH, S, KUBINEC, M., JAISWAL, D.K., MORIMOTO, H., WILLIAMS, P.G., WEMMER, D.E. (1993): [2-³H]ATP synthesis and ³H NMR spectroscopy of enzyme-nucleotide complexes: ADP and ADP.V_i bound to myosin subfragment 1, *J. Biomol. NMR*, **3**, 325-334
- HIGHTOWER, R. C. & MEAGHER, R. B. (1985): Divergence and different expression of soybean actin genes. *EMBO J.* **4**, 1-8
- HITCHCOCK, S. E. (1980): Actin-DNase I interaction. Depolymerization and nucleotide exchange. *J. Biol. Chem.* **255**, 5668-5673

- HITCHCOCK-DEGREGORI, L. S. (1988): Tropomyosin inhibits the rate of actin depolymerization by stabilizing actin filaments *Biochemistry* **27**, 9182-9185
- HOLMES, K C., POPP, D., GEBHARD, W. & KABSCH, W. (1990): Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**, 44-49
- HOUMEIDA, M., HANIN, V., CONSTANS, J. BENYAMIN, Y. & ROUSTAN, C. (1992): Localization of a vitamin-D-binding protein interaction site in the COOH-terminal sequence of actin. *Eur. J. Biochem.* **203**, 499-503
- JEENER, J. (1971): II. Ampère International Summer School, Basko Polje, Jugoslawien
- KABSCH, W., SANDER, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577-637
- KABSCH, W., MANNHERZ, G. & SUCK, D. (1984): Three-dimensional structure of the complex of actin and DNase I at 4.5 Å resolution. *EMBO J.* **4**, 2113-2118
- KABSCH, W., MANNHERZ, H. G., SUCK, D., PAI, E.F. & HOLMES, K C. (1990): Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* **347**, 37-44
- KABSCH, W. & VANDEKERCKHOVE, J. (1992): Structure and function of actin. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 49-76
- KALBITZER, H. R., ROHR, G., NOWAK, E., GOODY, R. S., KUHN, W. & ZIMMERMANN, H. (1991): A new high sensitivity ¹⁹F-Probe for labelling cysteine groups of proteins. *NMR in Biomedicine* **5**, 347-350
- KALBITZER, H.R., MAEDA, K., RÖSCH A., MAÉDA, Y., GEYER, M., BENEICKE, W., NEIDIG, K.P. & WITTINGHOFER, A. (1991): C-Terminal structure and mobility of rabbit skeletal muscle light meromyosin. As studied by One- and Two-Dimensional ¹H NMR Spectroscopy and X-ray small angle scattering. *Biochemistry* **30**, 8083-8091
- KÄS, J., STREY, H., TANG, J.X., FINGER, D., EZZEL, R., SACKMANN, E., & JANMEY, P.A. (1996): F-Actin, a model Polymer for Semiflexible Chains in Dilute, Semidilute, and Liquid Crystalline Solutions. *Biophys. J.* **70**, 609-625
- KASPRZAK, A. A., CHAUSSEPIED, P. & MORALES, M. F. (1989): Localization of a contact site between actin and myosin in the three-dimensional structure of the acto-S1 complex *Biochemistry* **28**, 9230-9238
- KENSLER, R., W. & WOODHEAD, J. L. (1995) The chicken muscle thick filament: temperature and the relaxed cross-bridge arrangement. *J. of Muscle Research & Cell Motility* **16**, 79-90
- KORN, E. D. (1978): Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility (a review). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 588-599
- KORN, E. D. (1982): Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiol. Rev.* **63**, 672-737
- KORN, E.D (1985): The regulation of actin and myosin by ATP, *Curr. Top. Cell. Regul.* **26**, 221-233
- KORN, E.D., CARLIER, M. F. & PANTALONI, D. (1987): Actin polymerization and ATP-hydrolysis, *Science* **238**, 638-641
- KOUYAMA, T. & MIHASHI, K (1981): Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin. *Eur. J. Biochem.* **114**, 33-38

- KUZNETSOV, S. A., LANGFORD, G. M. & WEISS, D. M. (1992): Actin-dependent organelle movement in squid axoplasm. *Nature* **356**, 722-725
- LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- LAL, A. A., KORN, E. D. & BRENNER, S. L. (1984): Rate constants for actin polymerization in ATP determined using crosslinked actin-trimers as nuclei. *J. Biol. Chem.* **259**, 8794-8800
- LAL, A. A. & KORN, E. D. (1985): Reinvestigation of the inhibition of actin polymerization by profilin. *J. Biol. Chem.* **260**, 10132-10138
- LAPHAN, J., RIFE, J.P., MOORE, P.B. & CROTHERS, D.M. (1997): Measurement of Diffusion constants for nucleic acids by NMR. *J. Biomol. NMR*, **10**, 255-262
- LE BIHAN, D. (1991): Diffusion NMR imaging. *Magn. Reson.* **Q 7**, 1-30
- LONGSWORTH, L.H. (1960): The mutual diffusion of light and heavy water. *J. Phys. Chem.*, **64**, 1914-1917
- LORENZ, M., POPP, D. & HOLMES, K.C. (1993): Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm. *J. Mol. Biol.* **261**, 826-836
- LOWEY, S., SLAYTER, H. S., WEEDS, A. G. & BAKER, H. (1969): Substructure of the myosin molecule I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J. Mol. Biol.* **42**, 1-8
- Löw, I. & Dancker, P. (1976): Stabilization of F-actin by phalloidin. Reversal of the destabilizing effect of cytochalasin B. *FEBS Lett.* **54**, 263-265
- LOWY, J., POPP, D. & STEWART, A. A. (1991) X-ray studies of order-disorder transitions in the myosin heads of skinned rabbit psoas muscles. *Biophysical Journal.* **60**, 812-24
- MALINCHIK, S., XU, S. & YU, L. C. (1997) Temperature-induced structural changes in the myosin thick filament of skinned rabbit psoas muscle. *Biophysical Journal.* **73**, 2304-2312
- Manstein, D.J. & Hunt, D.M. (1995): Overexpression of myosin motor domains in *Dictyostelium*: screening of transformants and purification of the affinity tagged protein. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **11**, 325-332
- MARGOSSIAN, S. S. & LOWEY, S. (1982): Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Meth. Enzymol.* **85**, 55-71
- MARUTA, S., HENRY, G.D. SYKES, B.D. & IKEBE, M. (1993): Formation of the stable Myosin-ADP-Aluminium Fluoride and Myosin-ADP-Beryllium Fluoride Complexes and their analysis using ¹⁹F NMR. *J. Biol. Chem.* **268**, 7093-7100
- MATSUDAIRA, P., BORDAS, J. & KOCH, M. H. J (1987): Synchrotron X-ray diffraction studies of actin structure during polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3151-3155
- MCLAUGHLIN, P. J., GOOCH, J. T., MANNHERZ, H. G. & WEEDS, A. G. (1993): Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature* **36**, 685-692
- MERRIL, M. R. (1993): NMR Diffusion Measurements using a composite Gradient PGSE Sequence. *J. Magn. Reson.* **A 103**, 223-225.
- MIKI, M., BARDEN, J. A. & DOSREMEDIOS, C. G. (1986): Fluorescence resonance energy transfer between the nucleotide binding site and Cys-10 in G-actin and F-actin. *Biochem. Biophys. Acta* **872**, 76-82

- MIKI, M. (1987): The recovery of the polymerizability of Lys61 labelled actin by the addition of phalloidin. Fluorescence polarization and resonance energy transfer measurements. *Eur. J. Biochem.* **164**, 229-235
- MIKI, M., BARDEN, J. A., DOSREMEDIOS, C. G., PHILLIPS, L. & HAMBLY, B.D. (1987): Interaction of phalloidin with chemically modified actin. *Eur. J. Biochem.* **165**, 125-130
- MIKI, M. (1988): Charakterization of carbethoxylated actin. *J. Biochem.* **104**, 312-316
- MILLER, L., KALNOSKI, M., YUNOSSI, Z., BULINSKI, J.C., & REISLER, E. (1987): Antibodies directed against N-Terminal Residues on Actin do not block Acto-Myosin Binding. *Biochemistry* **26**, 6064-6070
- MILLIGAN, R. A., WHITTAKER, M. & SAFER, D. (1990): Molecular structure of F-actin an location of surface binding sites. *Nature* **348**, 217-221
- MIYAMOTO, Y., KURODA, M., MUNETAKA, E. & MASAKI, T. (1986): Stoichiometry of actin and phalloidin binding: one molecule of the toxin dominates two actin subunits. *J. Biochem. (Tokyo)* **100**, 1677-1680
- MOOSEKER, M.S. & CHENEY, R.E. (1995): Unconventional myosins, *Annual Review of Cell & Developmental Biology* **11**, 633-75
- MURPHY, D. B., GRAY, R. O., GRASSER, W. A. & POLLARD, T. D. (1988): Direct demonstration of actin filament annealing in vitro. *J. Cell Biol.* **106**, 1947-1954
- NATARAJAN, G. (1989) Data Book on the Viscosity of Liquids, Hemisphere, New York, NY, U.S.A.
- NOWAK, E., STRZELECKA-GOLASZEWSKA, H. & Goody, R. S. (1988): Kinetics of nucleotide and metal ion interaction with G-actin. *Biochemistry* **27**, 1785-1792
- O'DONOGHUE, S. I., MIKI, M. & DOSREMEDIOS, C. G. (1992): Removing the two C-terminal residues of actin affects the filament structure. *Arch. Biochem. Biophys.* **293**, 110-116
- ORLOVA, A. & EGELMAN, E.H. (1992): Structural basis for the destabilization of F-actin by phosphate release following ATP hydrolysis. *J. Mol. Biol.* **227**, 1043-1053
- ORLOVA, A. & EGELMAN, E.H. (1993): A conformational change in the actin subunit can change the flexibility of the actin filament. *J. Mol. Biol.* **232**, 334-341
- ORLOVA, A., PROCHNIEWICZ, E., & EGELMAN, E.H. (1995^a): Structural dynamics of f-actin: I. changes in the c-terminus. *J. Mol. Biol.* **245**, 582-597
- ORLOVA, A., PROCHNIEWICZ, E., & EGELMAN, E.H. (1995^b): Structural dynamics of f-actin: II. cooperativity in structural transitions. *J. Mol. Biol.* **245**, 598-607
- OSTAP, E. M. & THOMAS, D. D. (1991): Rotational dynamics of spin-labeled F-actin during activation of myosin S1 ATPase using caged-ATP. *Biophys. J.* **59**, 1235-1241
- PAN, X. X. & WARE, B. R. (1988): Actin assembly by lithium ions. *Biophys. J.* **53**, 11-16
- PANTALONI, D., HILL, T. L., CARLIER, M. F. & KORN E. D. (1985): A model for actin polymerization and the kinetic effects of ATP hydrolysis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **82**, 7207-7211
- PARDEE J. A. & SPUDICH J.A. (1982): Purification of muscle actin. *Methods Enzymol.* **85**, 164-181
- POLLARD. T. D. & WEEDS, A. G. (1984): The rate constant for ATP hydrolysis by polymerized actin. *FEBS Lett.* **170**, 94-98

- POLLARD, T. D. (1986): Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* **103**, 2747-2754
- POLLARD, T. D. & COOPER, J. A. (1986): Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 987-1035
- POLLARD, T. D. (1990): Actin, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**, 33-40
- PRINCE, H.P., TRAYER, H.R., HENRY, G.D., TRAYER, I.P., DALGARNO, D.C., LEVINE, B.A., CARY, P.D., & TURNER, C (1981): Proton nuclear-magnetic-resonance spectroscopy of myosin subfragment 1 isoenzymes, *Eur. J. Biochem.* **121**, 213-219
- RAYMENT, I., RYPNIEWSKI, W. R., SCHMIDT-BÄSE, K, SMITH, R., TOMCHICK, D. R., BENNING, M. M., WINKELMANN, D. A., WESENBERG, G. & HOLDEN, H.M. (1993^a): Three-dimensional structure of Myosin Subfragment-1: A molecular motor. *Science* **261**, 50-58
- RAYMENT, I., HOLDEN, H. M., WHITTAKER, M., YOHN, C. B., LORENZ, M., HOLMES, K C. & MILLIGAN, R. A. (1993^b): Structure of the Actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* **261**, 58-65
- RAYMENT, I (1996): The structural Basis of the Myosin ATPase Activity. *J. of Biological Chemistry*, **271:27**
- REINSTEIN, J., VETTER, I. R., SCHLICHTING, I., RÖSCH, P., WITTINGHOFER, A., & GOODY, R. S. (1990): Fluorescence and NMR Investigations on the Ligand Binding Properties of Adenylate Kinases, *Biochemistry*, **29**, 7440-7450
- REISLER, E. (1993): Actin molecular structure and funktion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 41-47
- RICKARD, J. E. & SHETERLINE, P. (1986): Cytoplasmic concentrations of inorganic phosphate affect the critical concentration for assembly of actin in the presence of cytochalasin D or ADP. *J. Mol. Biol.* **191**, 273-280
- RÖSCH, P., GOODY, R. S., KALBITZER, H. R., & ZIMMERMANN, H. (1981): The Interaction of Myosine S1 with Phosphorothioates of ADP: An ¹⁸O Exchange Study by ³¹P NMR. *Arch. of Biochemistry and Biophysics*, **211**, 622 - 627
- ROUX-FROMY, M. & CARDINAUD, R. (1984): 500 MHz ¹H-NMR study of the N-terminal N-trimethylalanine residue of the LC 1 and LC 2 light chains in rabbit fast skeletal myosin solutions, *FEBS* **172**, 198-204
- SCHLICHTING, I, BECKER, A., MANSTEIN, D. & HOLMES, K. C., Manuskript in Vorbereitung)
- SCHWARZENBACH, G. & FLASCHKA, H. (1965): Die komplexometrische Titration, 5. Auflage, Enke, Stuttgart
- Sheterline, P., Clayton, J. & Sparrow, J. (1996): Actins 3rd Ed., *Protein Profiles*, Academic Press, London
- SCHROEDER, R. R., MANSTEIN, D. J., JAHN, W., HOLDEN, H., RAYMENT, I., HOLMES, K C. & SPUDICH, J. A. (1993): Three-dimensional atomic model of F-actin decorated with Dicyostelium myosin S1, *Nature*, **364**, 171-174
- SCHRUMPF, M. (1995) Strukturelle und biochemische Untersuchungen am Myosin, Dissertation Universität Heidelberg
- SCHUTT, C. E., MYSLIK, J. C., ROZYCKI, M. D., GOONESEKERE, N.C. W. & LINDBERG, U. (1993): The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature* **365**, 810-816

- SHRIVER, J. W. & SYKES, B. D. (1981^a) Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Evidence for Two Conformations of Myosin Subfragment-1.Nucleotide Complexes. *Biochemistry* **20**, 2004 – 2012
- SHRIVER, J. W. & SYKES, B. D. (1981^b) Energetics and Kinetics of Two Myosin Subfragment-1.Adenosine 5'-Diphosphate Complexes as viewed by Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance. *Biochemistry* **20**, 2004 - 2012
- SLEIGH, R. W. & BURLEY, R. W. (1973): Site of action of sulfhydryl spin labels with skeletal muscle actin. *Arch. Biochem. Biophys.* **159**, 792-801
- SLÓSAREK, G., HEINTZ, D., KALBITZER, H.R. (1994): Mobile segments in rabbit skeletal muscle F-actin detected by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *FEBS Lett.* **351**, 405-410
- SMITH, D. A. & GEEVES, M. A. (1995): Strain-Dependent Cross-Bridge Cycle for Muscle, *Biophysical Journal*, **69**, 524-537
- SMITH, C. A. & RAYMENT, I. (1996): X-ray structure of the magnesium(II).ADP.vanadate complex of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain to 1.9 Å resolution. *Biochemistry* **35**, 5404-5417
- SÖNNICHSEN, F. D., VAN EYCK, J. E., HODGES, R.S., & SYKES, B.D. (1992): Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide. *Biochemistry* **31**, 8790-8798.
- SOLOMON, T. L., SOLOMON, L. R., GAY, L. S. & RUBENSTEIN, P. A. (1988): Studies on the role of actin's aspartic acid 3 and aspartic acid 11 using oligodeoxynucleotide-directed site-specific mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **263**, 19622-19669
- SPUDICH, J.A. & WAIT, J. (1971): The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. *J. Biol. Chem.* **240**, 4866-4871
- STEINMETZ, M.O., GOLDIE, K.N., & AEBI, U. A (1997): Correlative analysis of actin filament assembly, structure, and dynamics. *J. Cell Biol.* **138**, 559-574
- STEJSKAL, E. O. & TANNER, J. E. (1965): Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time dependent field gradient. *J. Chem. Phys.* **42**, 288-292
- STRAUB, F. B. (1942): Actin. *Stud Inst. Med Chem. Univ. Szeged.* **2**, 3-15
- STRAUB, F. B. & FEUER, G. (1950): Adenosine triphosphate, the functional group of actin. *Biochim. Biophys. Acta* **4**, 455-470
- STRYER, L. (1996): Biochemie, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg
- STRZELECKA-GOLASZEWSKA, H., PROCHNIEWICZ, E. & DRABIKOWSKI, W. (1978): Interaction of actin with divalent cations. *Eur. J. Biochem.* **88**, 229-237
- STRZELECKA-GOLASZEWSKA, H., MOSSAKOWSKA, M., WOZNIAK, A., MORACZEWSKA, J. & NAKAYAMA, H. (1995): Long-range conformational effects of proteolytic removal of the last three residues of actin. *Biochem. J.* **307**, 527-534
- SUCK, D., KABSCH, W. & MANNHERZ, H. G. (1982): Three-dimensional structure of muscle actin and bovine pancreatic desoxyribonuclease I at 6 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4319-4323
- SUTOH, K. (1982): Identifikation of myosin binding sites on the actin sequence. *Biochemistry* **21**, 3654-3661

- TAIT, J. F. & FRIEDEN, C. (1982^a): Chemical modification of actin. Acceleration of polymerization and reduction of network formation by reaction with N-methylmaleimide, (Iodacetamido)-tetramethylrhodamine or 7-Chloro-4-nitrobenzeno-2-oxa-1,3-diazole. *Biochemistry* **21**, 6046-6053
- TAIT, J. F. & FRIEDEN, C. (1982^b): Polymerisation and gelation of actin studied by fluorescence photobleaching recovery. *Biochemistry* **21**, 3666-3674
- TANNER, J.E. (1979): Use of the Stimulated Echo in NMR Diffusion Studies. *J. chem. Phys.*, **52**, 2523-2526
- TANOKURA, M. & EBASHI, S. (1993): Complexes of Myosin Subfragment 1 with Pyrophosphate and with Adenosine Diphosphate as studied by Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance. *J. Biochem.* **113**, 19-21
- Taylor, E. W. (1977): Transient Phase of Adenosine Triphosphate Hydrolysis by Myosin, Heavy Meromyosin, and Subfragment 1. *Biochemistry* **16**, 732-739
- TIRION, M.M. & BEN AVRAHAM, D. (1993): Normal mode analysis of G-actin. *J. Mol. Biol.* **230**, 186-195
- TOBACMAN, L. S. & KORN, E. D. (1982): The regulation of actin polymerization and the inhibition of monomeric actin ATPase activity by Acanthamoeba profilin. *J. Biol. Chem.* **257**, 166-4170
- TRAYER, I.P., TRAYER, H.R., & LEVINE, B.A. (1987): Evidence that the N-terminal region of A1-light chain of myosin interacts directly with the C-terminal region of actin. A proton magnetic resonance study. *Eur. J. Biochem.* **164**, 259-266
- TRENTHAM, D. R., ECCLESTONE, J. F., BAGSHAW, C. R. (1976): Kinetic analysis of ATPase mechanisms. *Quarterly Reviews of Biophysics.* **9**, 217-81
- VALENTIN-RANC, C. & CARLIER, M. F. (1989): Evidence for the direct interaction between tightly bound divalent metal ion and ATP on actin. *J. Biol. Chem.* **264**, 20871-20880
- VANDEKERCKHOVE, J., DEBOBEN, A.; NASSAL, M. & WIELAND, Th. (1985): The phalloidin binding site of F-actin. *EMBO J.* **4**, 2815-2818
- WAECHTER, F. & ENGEL, J. (1977): Association kinetics and binding constants of nucleoside triphosphates with G-actin. *Eur. J. Biochem.* **74**, 227-231
- WAGNER, G. (1993): Prospects for NMR of large proteins. *J. Biomol. NMR* **3**, 375-385
- WAKABAYASHI, T., AKIBA, T., HIROSE, K., TOMIOKA, A., TOKUNAGA, M., SUZUKI, M., TOYOSHIMA, C. SUTOH, K., YAMAMOTO, K., MATSUMOTO, T. ET AL. (1988) Temperature-induced change of thick filament and location of the functional sites of myosin. *Advances in Experimental Medicine & Biology.* **226**, 39-48
- WANGER, M. & WEGNER, A. (1983): Similar affinities of ADP and ATP for G-actin at physiological salt concentrations. *FEBS Lett.* **162**, 112-116
- WEEDS, A.G. & TAYLOR, R.S. (1975): Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin. *Nature* **257**, 54-57
- WELLS, C. & BAGSHAW, C. R (1984): The characterization of vanadate-trapped nucleotide complexes with spin-labelled myosins. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **5**, 97-112
- WIDER, G., DÖTSCH, V., WÜTHRICH, K. (1994): Self-Compensating Pulsed Magnetic-Field Gradients for Short Recovery Times. *J. Magn. Reson. A* **108**, 255-258

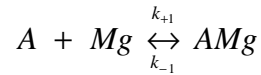
- WIELAND, T., DE VRIES, J. X., SCHAFER, A. & FAULSTICH, H. (1975): Spectroscopic evidence for the interaction of phalloidin with actin. *FEBS Lett.* **54**, 73-75
- WIELAND T. & FAULSTICH, H. (1978): Arnatoxins, phallotoxins, phallolysin and antamanide: the biologically active components of poisonous Amanita mushrooms. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **5**, 185-260
- WISHART, D. S., SYKES, B. D., RICHARDS, F. M. (1992) The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry* **31**, 1647-1651
- WRAY, J. S. (1987): Structure of relaxed myosin filaments in relation to nucleotide state in vertebrate skeletal muscle, *J. Muscle Res. Cell Mot.*, **8**, 62
- WÜTHRICH, K. (1986) „NMR of Proteins and Nucleid Acids“, John Wiley & Sons, New York
- Wu, D., Chen, A., Johnson, C.S., Jr., (1995): An improved Diffusion-Ordered Spectroscopy Experiment incorporating Bipolar-Gradient Pulses. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **A115**, 260-264
- XU, S., GU, J., RHODES, T., BELKNAP, B., ROSENBAUM, G., OFFER, G., WHITE, H. & YU, L.C. (1999): The M.ADP.P_i State is required for helical order in the Thick Filaments of skeletal muscle. *Biophys. J.*, **77**, 2665-2676
- YANAGIDA, T., JAKASE, M., NISHIYAMA, K & OOSAWA, F. (1984): Direct observation of motion of single F-actin filaments in the presence of myosin. *Nature* **307**, 58-60
- ZIMMERLE, C. T. & FRIEDEN, C. (1986): Effect of temperature on the mechanism of actin polymerization. *Biochemistry* **25**, 6432-6438
- ZIMMERLE, C. T., PATANE, K & FRIEDEN, C. (1987): Divalent cation binding to the high-and low affinity sites on G-actin. *Biochemistry* **26**, 6545-6552
- ZIMMERLE C. T. & FRIEDEN, C. (1988^a): pH-induced changes in G-actin conformation and metal affinity. *Biochemistry* **27**, 7759-7765
- ZIMMERLE, C. T. & FRIEDEN, C. (1988^b): Effect of pH on the mechanism of actin polymerization. *Biochemistry* **27**, 7766-7772

7 Anhang

Systeme im chemischen Gleichgewicht

Abgeschlossenes System: (Küvette, NMR-Röhrchen)

Die Bindung eines Liganden (Ca^{2+} oder Mg^{2+}) an ein Enzym (Aktin) lässt sich durch folgenden Mechanismus beschreiben:



Der Ligand bindet mit der Assoziationsratenkonstante k_{+1} (k_{on}) und dissoziiert mit der Dissoziationsratenkonstante k_{-1} (k_{off}). Der Quotient von k_{-1}/k_{+1} ist die Dissoziationskonstante (K_D). Bei vielen kinetischen Analysen ist es notwendig, die Konzentration eines Komplexes aus beliebigen, vorgegebenen Gesamtkonzentrationen sowie der Dissoziationskonstante zu berechnen.

Definitionen:

$[A], [Mg]$:	Konzentrationen an freiem Enzym (Aktin) und Liganden (Mg)
$[A_0], [Mg_0]$:	Gesamtkonzentrationen Enzym, Ligand
$[AMg]$:	Konzentration des Komplexes
K_D :	Dissoziationskonstante des Komplexes

aus:

$$K_D = \frac{[A][Mg]}{[AMg]} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$$

und den Massengleichungen

$$\begin{aligned} [A_0] &= [A] + [AMg] \\ [Mg_0] &= [Mg] + [AMg] \end{aligned}$$

folgt
$$K_D = \frac{([A_0] - [AMg])([Mg_0] - [AMg])}{[AMg]}$$

$$[AMg]: 0 = [AMg]^2 - [AMg]([A_0] + [Mg_0] + K_D) + [A_0][Mg_0]$$

Die Lösung dieser quadratischen Gleichung ergibt sich nach dem Satz von Vieta zu:

$$[AMg] = \frac{[A_0] + [Mg_0] + K_D}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{[A_0] + [Mg_0] + K_D}{2}\right)^2 - [A_0][Mg_0]}$$

Biochemisch sinnvoll ist nur eine Lösung:

$$[AMg] = \frac{[A_0] + [Mg_0] + K_D}{2} - \sqrt{\left(\frac{[A_0] + [Mg_0] + K_D}{2}\right)^2 - [A_0][Mg_0]}$$

Aminosäuresequenz von Muskelaktin aus Kaninchen

	10	20	30	40	50	60
1	XDEDETTALV	CDNGSGLVKA	GFAGDDAPRA	VFPSIVGRPR	HQGVMVGMGQ	KDSYVGDEAQ
61	SKRGILTLYK	PIEHGIITNW	DDMEKIWHHT	FYNELRVAPE	EHPTLLTEAP	LNPKANREKM
121	TQIMFETFNV	PAMYVAIQAV	LSLYASGRRT	GIVLDSGDGV	THNVPIYEGY	ALPHAIMRLD
181	LAGRDLTDYL	MKILTERGYS	FVTTAEREIV	RDIKEKLCYV	ALDFENEMAT	AASSSSLEKS
241	YELPDGQVIT	IGNERFRCPE	TLFQPSFIGM	ESAGIHETTY	NSIMKCDIDI	RKDLYANNVM
301	SGGTTMYPGI	ADRMQKEITA	LAPSTMKIKI	IAPPERKYSV	WIGGSILASL	STFQQMWITK
361	QEYDEAGPSI	VHR				

Aminosäuresequenz der Motordomäne aus *Dictyostelium discoideum* M754

	10	20	30	40	50	60
1	MDGTEDPIHD	RTSDYHKYLK	VKQGSDSLFK	LTVSDKRYIW	YNPDPKERDS	YECGEIVSET
61	SDSFTFKTVD	GQDRQVKKDD	ANQRNPIKFD	GVEDMSELSY	LNPAVVFHNL	RVRYNQDLIY
121	TYSGLFLVAV	NPFKRIPIYT	QEMVDIFKGR	RRNEVAPHIF	AISDVAYRSM	LDDRQNSLL
181	ITGESGAGKT	ENTKKVIQYL	ASVAGRQAN	GSGVLEQQIL	QANPILEAFG	NAKTTRNNS
241	SRFGKFIEIQ	FNSAGFISGA	SIQSYLLEKS	RVVFQSETER	NYHIFYQLLA	GATAEKKAL
301	HLAGPESFNY	LNQSGCVDIK	GVSDSEEFKI	TRQAMDIVGF	SQEEQMSIFK	IIAGILHLGN
361	IKFEKGAGEG	AVLKDKTALN	AASTVFGVNP	SVLEKALMEP	RILAGRDLVA	QHLNVEKSSS
421	SRDALVKALY	GRLFLWLK	INNVLQERK	AYFIGVLDIS	GFEIFKVNSF	EQLCINYTNE
481	KLQQFFNHHM	FKLEQEEYLK	EKINWTFIDF	GLDSQATIDL	IDGRQPPGIL	ALLDEQSVFP
541	NATDNTLITK	LHSHFSKKNA	KYEEPRFSKT	EFGVTHYAGQ	VMYEIQDWLE	KNKDPLQQDL
601	ELCFKDSSDN	VVTKLFNDPN	IASRAKKGAN	FITVAAQYKE	QLASLMATLE	TTNPHFVRCI
661	IPNNKQLPAK	LEDKVVLQDL	RCNGVLEGIR	ITRKGFPNRI	IYADFKRY	LLAPNVPRDA
721	EDSQKATDAV	LKHLNIDPEQ	YRFGITKIFF	RAGQLARILG	STRDALHHHH	HHHH

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, ohne deren Unterstützung, Hilfe, Verständnis und Anregungen diese Arbeit sicherlich nicht zustande gekommen wäre.

Besonders bedanken möchte ich mich bei

Prof. Dr. E. Reisler für die Antikörperfragmente,

Dr. D. Manstein für die freundliche Überlassung der *Dictyostelium discoideum* Mutante,

Dr. D. Heintz, Dr. J. Reinstein und Dipl.-Chem. H. Theyssen für die Diskussionen und vielen hilfreichen Hinweise für die Handhabung von Proteinen,

Frau G. Helmig für die wirklich großen Mengen an Myosin S1 für die Phosphorspektren,

Dr. E. Wiedemann für die Calcium- und Magnesiumbestimmungen mit der AAS,

den Mitgliedern des Arbeitskreises von Prof. Dr. H. Faulstich für die enge Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt möchte ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe danken. Jacqueline Schorr für die abwechslungsreichen und unterhaltsamen Stunden im Labor. Markus Schott und Adrian Goerler für ihre Tips und Hilfe meinen Rechner vor Abstürzen zu bewahren. Anja Schulte für die Vorarbeiten bei den Diffusionsmessungen. Jörg Bomke für die Diskussionen und Unterhaltung während der langen Fahrten nach Regensburg. Matthias Geyer für die wissenschaftliche Beratung bei der Wahl des Probenkopfes. Till Maurer für die vielen kleinen Hinweise im täglichen Umgang mit NMR-Software, sofern er nicht durch eine Corel Draw- und seit Regensburg auch durch eine Linux-Installation verhindert war. Werner Kremer für die Ruhe, die er ausstrahlt. Eike Brunner für die detaillierte Erklärung der vielen Phänomene der Kern-Spin-Resonanz. Wolfram Gronwald für seine Motivation während der Endphase dieser Arbeit und Jones Wolf für das interessierte Korrigieren meiner Arbeit und dessen Whiskey- und Rotwein-Sammlung dem Rotstift seinen Schrecken nahm.

Mein ganz besonderer Dank gilt aber meiner Familie, meinen Kindern Laura und Lukas für ihr Verständnis, sowie meiner Frau Petra für ihre Geduld und die alles getan hat mir den Kopf für diese Arbeit freizuhalten.

Lebenslauf

Name Harry Reinhold Kany
Wohnort Lauberweg 1,
67310 Hettenleidelheim
Geburtsdatum 22.02.1964
Geburtsort Grünstadt
Familienstand verheiratet, 2 Kinder
Staatsangehörigkeit deutsch

1. Schulausbildung 1970 bis 1974 Grundschule Ludwigshafen
1974 bis 1980 Kopernikus - Realschule Ludwigshafen

Berufsausbildung 1980 bis 1982 Berufsausbildung zum Fleischer

2. Schulausbildung 1982 bis 1985 Berufsbildendes Gymnasium Technik I, Ludwigshafen
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Grundwehrdienst 1985 bis 1986

Studium 1986 bis 1993 Studium der Chemie an der Universität Kaiserslautern

Diplomarbeit Mär. 1993 - Nov. 1993 Externe Diplomarbeit bei Raschig AG,
Ludwigshafen

Dissertation Sep. 1994 - Mai 2000 am Max-Planck-Institut für medizinische
Forschung, Abt. Biophysik in Heidelberg und am Institut für Biophysik
und physikalische Biochemie der Universität Regensburg.