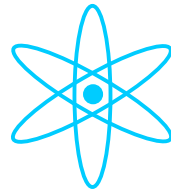


PHYSIK-DEPARTMENT



Charakterisierung des molekularen
Motors Myosin-V mittels Laser-Pinzette
und Fluoreszenzmikroskopie

Dissertation
von
Anabel Clemen



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Physik Department
der Technischen Universität München
Lehrstuhl für Biophysik E22

Charakterisierung des molekularen Motors Myosin-V mittels Laser-Pinzette und Fluoreszenzmikroskopie

Anabel Clemen

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Kleber
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. M. Rief
2. Univ.-Prof. Dr. M. Schliwa,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 31.01.05 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 24.2.05 angenommen.

*„Die ganze Welt ist voll von Sachen, und es
ist wirklich nötig, dass jemand sie findet“*

Pippi Langstrumpf (von A. Lindgren)

In liebevoller Erinnerung meinem Großvater Werner gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	2
Einleitung	3
1 Grundlagen der Untersuchungsmethoden	8
1.1 Die Laser-Pinzette	8
1.1.1 Prinzip der Laser-Pinzette	9
1.1.2 Kalibrierung der Fallenstärke	13
1.2 Das TIRF-Mikroskop	14
2 Theoretische Modelle von Myosin-V	16
2.1 Kinetische Ratenmodelle	16
2.2 Mechanisches Modell	19
2.3 Eigene Abschätzungen	21
3 Experimenteller Aufbau	36
3.1 Konzept	36
3.2 Aufbau der mechanischen und optischen Untersuchungsmethoden . .	37
3.2.1 Die Laser-Pinzette	37
3.2.2 Der Kraft-Feedback	41
3.2.3 Das TIRF-Mikroskop	43
3.2.4 Aufbau der Messkammern	43
4 Bestimmung der Bewegungsart von Myosin-V	44
4.1 Prinzip der Untersuchungen	44
4.2 Verwendete Materialien	45
4.2.1 Puffer	45
4.2.2 Myosin-V	46
4.2.3 Aktin	47
4.2.4 Fluoreszenzmarkierung von Myosin-V	47
4.2.5 Fluoreszenzmarkierung von Calmodulin	48
4.2.6 Calmodulinaustausch	49
4.3 Experimente	49

4.3.1	Test der Funktionalität der Motoren	49
4.3.2	Einzelmolekül-Fluoreszenzdetektion von Myosin-V	50
4.3.3	Präparation der Probe	51
4.3.4	Datenerfassung	52
4.3.5	Bildanalyse	52
4.4	Ergebnisse	55
4.5	Diskussion der Ergebnisse	56
5	Kraftabhängige Schrittkinetik von Myosin-V	58
5.1	Prinzip der Untersuchungen	58
5.2	Verwendete Materialien	60
5.3	Experimente	60
5.3.1	Vorbereitende Experimente	60
5.3.2	Einzelmolekülexperimente unter Kräften	60
5.3.3	Kugelpräparation für Einzelmolekül-Experimente	60
5.3.4	Präparation der Probe	62
5.3.5	Datenerfassung	63
5.4	Ergebnisse	64
5.4.1	Schrittweiten und Verweildauern bei Rückwärtskräften unterhalb der Anhaltekraft	65
5.4.2	Schrittweiten und Verweildauern bei Kräften nahe der Anhaltekraft	68
5.4.3	Schrittweiten und Verweildauern bei Vorwärtskräften und Rückwärtskräften oberhalb der Anhaltekraft	70
5.4.4	Kraftabhängigkeit der kinetischen Ratenkonstanten	74
5.4.5	Laufängen	76
5.5	Diskussion der Ergebnisse	78
5.5.1	Schrittweiten	79
5.5.2	Kraftabhängige Übergänge im chemomechanischen Zyklus	81
5.5.3	Rückwärtsschritte	83
5.5.4	Laufängen	84
	Abschließende Bemerkungen und Ausblick	85
	Literaturverzeichnis	87
	Danksagung	93

Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Struktur von Myosin-V und Aktin	5
2	Erstes chemomechanisches Modell von Myosin-V	6
1.1	Prinzip der optischen Pinzette	11
1.2	Prinzip des TIRF-Mikroskops	15
2.1	Schema eines periodisch stochastischen Modells mit N Zuständen . .	16
2.2	Vorstellung der Übergänge im „energy landscape“-Modell	17
2.3	Mechanisches Modell des Myosin-V	19
2.4	Schematische Darstellung kleiner Auslenkungen eines Balkens	22
2.5	Modell für das zweiköpfige Myosin-V aus zwei Balken	24
2.6	Modell für das ein- bzw. zweiköpfige Myosin-V aus Balken mit Drehmoment	29
2.7	Veranschaulichung zur mechanischen Beschreibung der Schritte des Myosin-V	33
3.1	Konzept der optischen Pinzette mit integriertem TIRF-Mikroskop . .	36
3.2	Detaillierter Versuchsaufbau der optischen Pinzette und des TIRF-Mikroskops	38
3.3	Schematische Darstellung des neuartigen Kraft-Feedbacks	42
4.1	Mögliche Modelle der Fortbewegung des Myosin-V	45
4.2	Schematische Darstellung des Motilitätsassays	49
4.3	Momentaufnahme der Aktinfilamente im Motilitätsassay	50
4.4	Bildbearbeitung zur Identifikation aktiver fluoreszenzmarkierter Myosin-V Motoren	53
4.5	Auswertung der Bildinformation zur Bestimmung der Positionsänderung einer Motordomäne	54
4.6	Ergebnisse der Einzelmolekülfluoreszenz-Experimente	55
5.1	Schema der Experimente mit dem weitreichenden Kraft-Feedback . .	59
5.2	Daten eines kraftabhängigen Experiments	64
5.3	Schrittweiten- und Verweildauerverteilung von Myosin-V	66
5.4	Beispielkurven zur Simulation auf Grund der limitierten Antwortzeit .	67
5.5	Verteilung der Schrittweiten und Verweildauern bei 1.6 pN	68
5.6	Experiment zum Hin- und Herschalten zwischen 1.5 und 1.6 pN . . .	69

5.7	Schritte von Myosin-V bei Vorwärtskräften und hohen Rückwärtskräften	70
5.8	Schrittweiten- und Verweildauerverteilungen bei Vorwärtskräften . . .	71
5.9	Untersuchung der Rückwärtsschritte	72
5.10	Längster gemessener Rückwärtslauf	73
5.11	Schrittweiten- und Verweildauerverteilung der Rückwärtsschritte bei 5 pN	73
5.12	Kraftabhängigkeit der kinetischen Ratenkonstanten	74
5.13	Kraftabhängigkeit der Gesamtgeschwindigkeit	75
5.14	Verteilungen der Lauflängen von Myosin-V bei rückwärtsgerichteten Kräften	76
5.15	Verteilungen der Lauflängen von Myosin-V bei vorwärtsgerichteten Kräften	77
5.16	Kraftabhängigkeit der charakteristischen Lauflänge c	77
5.17	Verteilung der Lauflängen der Rückwärtsschritte des Myosin-V	77
5.18	Modell des chemomechanischen Zyklus von Myosin-V	78
5.19	Mögliche Erklärung der kleinen Schrittweiten bei Kräften nahe der Anhaltkraft	80

Zusammenfassung

Das Motorprotein Myosin-V transportiert intrazelluläre Stoffe unter ATP-Hydrolyse in diskreten, ungefähr 36 nm großen Schritten entlang von Aktinfilamenten. Um einen besseren Einblick in den chemomechanischen Zyklus dieses Motors zu bekommen, wurden in dieser Arbeit **optische und mechanische Einzelmolekülexperimente an Myosin-V** durchgeführt.

Dazu wurde zuerst eine **optische Pinzette** in Verbindung mit einem „**Total Internal Reflection Fluorescence**“ (**TIRF**)-Mikroskop konzipiert und aufgebaut. Ein **neuartiger Kraft-Feedback** erlaubte erstmals ganze Läufe des Motorproteins über mehrere Mikrometer und unter verschiedenen vorwärts- und rückwärtsgerichteten Kräften aufzuzeichnen. Das räumliche Auflösungsvermögen des neuen Feedbacks lag bei ~ 3 nm, die zeitliche Auflösung bei ~ 10 ms, wobei typischerweise Federkonstanten zwischen 0.02 pN/nm und 0.08 pN/nm verwendet wurden. Über das integrierte TIRF-Mikroskop mit zwei Anregungslasern konnten einzelne Cy3- bzw. Cy5- Fluorophore bei einer Konzentration bis zu 50 nM mit einer Zeitauflösung von 100 ms und einer räumlichen Auflösung von 20 nm 10 s lang beobachtet werden.

Eine zentrale Frage bei prozessiven Motoren ist, wie sich die beiden Arme beim Laufen koordinieren. Einerseits könnte es sich um eine sogenannte „Hand-über-Hand“-Bewegung handeln, bei der der hintere Arm nach vorne schwingt und zum vorderen Arm wird. Andererseits wurde eine Bewegung ähnlich einer Raupe vorgeschlagen, bei der der hintere Kopf an etwa die Position des vorderen gelangt und der vordere Kopf nach vorne ausweicht. In dieser Arbeit wurden **Einzelmolekülfluoreszenz-Experimente** durchgeführt, die das raupenähnliche Modell für Myosin-V ausschließen und das „**Hand-über-Hand**“-Modell bestärken.

In weiteren Experimenten wurden mittels einer optischen Pinzette an einzelne, aktive Motorproteine verschiedene **vorwärts- und rückwärtsgerichtete Kräfte** angelegt. Dabei konnten erstmals ganze Läufe des Myosin-V im Mikrometerbereich aufgezeichnet und in Hinsicht auf **Schrittweiten, Verweildauern, und Lauflängen** untersucht werden. Die breiten Schrittweitenverteilungen zeigen, dass Myosin-V seine diskreten Schritte überraschend flexibel gestalten kann. Im Mittel ist die Periodizität des Aktinfilaments von ungefähr 36 nm aber in weiten Kraftbereichen gut reproduziert. Erst bei Kräften sehr nahe der Anhaltekraft zeigen die Schrittweitenverteilungen einen Einbruch hin zu kleineren Schritten. Die Analyse der Verweildauern ergibt **zwei kraftabhängige Ratenkonstanten**, die mit ADP-Loslösen und dem diffusiven Suchen der Motordomäne nach der Bindungstasche am Aktin identifiziert werden können. Die limitierende Ratenkonstante ADP-Loslösen ist dabei nur schwach kraftabhängig, während die Ratenkonstante für das diffusive Suchen der Motordomäne nach der Bindungstasche am Aktin stärker kraftabhängig ist. Diese Kraftabhängigkeiten lassen Rückschlüsse auf die mit den Ratenkonstanten verbundene Bewegung des Moleküls zu. Dabei ergibt sich, dass mit ADP-Loslösen keine nennenswerte Bewegung des Moleküls einhergeht, während das diffusive Suchen mit einer charakteristischen Distanz von ~ 3 nm verbunden ist. Zur Erklärung dieser Ergebnisse und für weitere Einblicke in den chemomechanischen Zyklus werden einige **analytische Abschätzungen** gemacht, bei denen die Arme des Myosin-V als elastische, am Aktin eingespannte oder drehbar gelagerte Balken mit angreifendem Drehmoment behandelt werden. Die experimentell bestimmten Lauflängenverteilungen zeigen ein einfache exponentielles Verhalten, wobei die Lauflängen mit einer charakteristischen Länge von etwa 10 Schritten weitgehend kraftunabhängig sind. Bei diesen Experimenten wurde weiterhin untersucht, wie sich Myosin-V, das in vivo beim Melanosomentransport zusammen mit sehr viel stärkeren Motoren wie Kinesinen gefunden wurde, bei Kräften weit über der Anhaltekraft verhält. Bei hohen Rückwärtskräften zeigt sich ein neues Phänomen. Myosin-V führt **mehrere, aufeinander folgende Rückwärtsschritte** aus, was darauf schließen lässt, dass externe Kräfte den mechanischen Schlag des Moleküls umkehren können.

Abstract

The motor protein Myosin-V transports intracellular particles in discrete steps that are app. 36 nm long along actin filaments while hydrolysing ATP. To gain a better insight into the chemo-mechanical cycle of this motor, optical and mechanical single molecule experiments were performed in this PhD work.

To perform these experiments an **optical tweezers setup** in combination with a „**Total Internal Reflection Fluorescence**“(TIRF)-**microscope** was first planned and built. A **new long range force feedback** allowed the observation of full runs of Myosin-V under different forward and backward forces for the first time. The spacial resolution was ~ 3 nm, the time resolution ~ 10 ms and the spring constants typically used were between 0.02 and 0.08 pN/nm. Single Cy3- and Cy5-fluorophores with a concentration up to 50 nM could be observed for around 10 s with a time resolution of 100 ms and a spacial resolution of 20 nm by the integrated two colored TIRF-microscope.

One of the central questions of processive motors is „how does the two lever arm coordinate?“. There are two proposed mechanisms. First, a so-called „hand-over-hand“ movement occurs. This means the rear head swings in front and becomes the leading head. In the second proposed mechanism an inchworm like movement occurs. In this mechanism the rear head reaches the position of the leading head and the leading head moves forward. The **single molecule fluorescence experiments** described in this thesis disprove the inchworm model but are consistent with the „**hand-over-hand**“-**model**.

Experiments in which different **forward and backward forces** were applied on single, active motor proteins by using optical tweezers, provided insight into the chemo-mechanical cycle. For the first time full runs of Myosin-V in the micrometer range were described and analyzed with respect to **step sizes, dwell times and run length**. This analysis shows that Myosin-V does not have only one step size but demonstrates a broad distribution of step sizes. However in average the actin helix periodicity of around 36 nm is well reproduced using a wide range of forces. Only at forces very near to the stall force, the step size distribution shifts to a smaller size. Analysis of the dwell times gives **two force dependent rates**, which can be identified as ADP-release and the diffusive search of the motor domain for the actin-binding site. The limiting rate ADP-release is only weakly dependent on the force, the diffusive search of the motor domain for the actin-binding site shows a stronger dependence on the force. From the force dependences one can draw conclusions about the molecule movement associated with the rates. As a result ADP-release is not associated with an appreciable movement of the molecule. In contrast the diffusive search is related to a characteristic distance of ~ 3 nm. To explain these results and to gain further insight into the chemo-mechanical cycle a couple of **analytical estimates** are made. In this estimates the lever arms of the Myosin-V are modelled as clamped or pivoted elastic rods at the actin filament, which are then affected by a torque. The experimentally observed run length distributions show a single exponential behavior. With a characteristic run length of around 10 steps the run length is largely independent of the load. Further more the behavior of Myosin-V, which co-localizes in the context of melanosome transport with much stronger motors like kinesin, was observed under superstall forces. At high backward forces a new phenomenon was observed, **Myosin-V runs backwards**, indicating a force-driven reversal of the power-stroke is possible.

Einleitung

Bewegung ist ein wesentlicher Teil von Lebensprozessen. Ein Vogel im Flug, ein schlagendes Herz, eine Zelle, in der wie im Verkehr einer Großstadt die verschiedenen Lasten transportiert werden - bei allen diesen Vorgängen stellt sich die faszinierende Frage, wie gespeicherte Energie in gerichtete Bewegung umgesetzt wird. Auf molekularer Ebene sind dafür Motorproteine verantwortlich. Die Zahl der bekannten molekularen Motoren steigt noch ständig, aber schon heute zeichnet sich ab, welche eine faszinierende Fülle von Motorproteinen mit unterschiedlichsten Funktionen die Natur hervorgebracht hat.

Man unterteilt diese Motoren heute in zwei große Gruppen, einerseits die Rotationsmotoren, die eine Drehbewegung vollziehen, und andererseits die linearen Motoren, die eine lineare Bewegung ausführen. Ein bekanntes Beispiel der Rotationsmotoren ist die F_1F_0 -ATPase [1]. Dieser molekulare Motor produziert in einer Drehbewegung, die durch einen Protonengradienten angetrieben wird, aus Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat (P) den lebenswichtigen Energielieferant Adenosintriphosphat (ATP). Mehrere Kilogramm werden davon täglich in unserem Körper umgesetzt.

Das in dieser Arbeit untersuchte Myosin-V gehört zu den linearen Motoren, die ihre Bewegung unter ATP-Hydrolyse ausführen. In biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen konnten zahlreiche Erkenntnisse über die Aufgaben dieser Motoren in der Zelle gewonnen werden [2]. Die grundlegende Frage aber, wie Veränderungen im Ångstrom-Bereich in der ATP-Bindungstasche, z. B. durch ATP-Binden, die Hydrolyse, Phosphat- und ADP-Löslösen, übersetzt werden in Nanometer große strukturelle Änderungen, die die Bewegung ausmachen, konnte noch nicht geklärt werden. Ziel der vorliegenden Doktorarbeit ist es, diesen chemomechanischen Zyklus besser zu verstehen.

Warum ist dieser Mechanismus bisher nicht verstanden? Motorproteine sind typischerweise nur einige 10 bis 100 nm groß, die Übergänge in ihrem ATPase-Zyklus passieren im Millisekunden-Bereich und Kräfte, die die Motoren aufbringen, liegen bei wenigen Piconewton. Untersuchungsmethoden müssen also entsprechend gute Auflösungen haben. Für ein genaues Verständnis des grundlegenden chemomechanischen Zyklus sind außerdem Untersuchungen an einzelnen Motoren nötig, da beim Studium einer größeren Gruppe von asynchronen Motoren die vom einzelnen Motor ausgeführte Aktion undeutlich wird. Erst in letzter Zeit wurden geeignete Einzelmolekültechniken, wie z. B. auch in dieser Dissertation, so weiterentwickelt, dass Untersuchungen des chemomechanischen Zyklus möglich sind.

Myosin-V wurde in den 80er Jahren bei biochemischen Analysen des Gehirns von Wirbeltieren entdeckt und Anfang der 90er Jahre als molekularer Motor identifiziert [3, 4, 5, 6, 7]. Myosin-V kommt in den meisten eukariotischen Zellen vor und transportiert dort verschiedene Zellorganellen und Vesikel entlang von Aktinfilamenten, einem Teil des Zytoskeletts. Die biologischen Aufgaben von Myosin-V werden vor allem durch Mutationen im Genom von Hefezellen oder Mäusen untersucht. So zeigten z. B. Mäuse ohne funktionierendes Myosin-V Gen auffällige Farbveränderungen des Fells. Die Minderung der Pigmente führte man auf den unterdrückten Transport von Melanosomen in den Melanocyten zurück. Neben den Farbveränderungen zeigten diese Mäuse auch Defekte im Nervensystem, die durch eine falsche Lokalisation des endoplasmatischen Reticulums in den Dendriten auftreten könnten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Myosin-V beim Transport der mRNA eine entscheidende Rolle spielt [2, 8].

Was aber macht gerade Myosin-V aus dem großen „Zoo“ an linearen Motoren für die Untersuchung des chemomechanischen Zykluses so interessant?

Ein großer Vorteil von Myosin-V ist seine im Vergleich zu anderen linearen Motoren besonders lange Halsregion, die in Abb. 1A schematisch gezeigt ist. Diese Halsregion führt nach heutiger Kenntnis den mechanischen Schlag aus. Aufgrund der begrenzten Auflösungen von Untersuchungsmethoden können Größenunterschiede von auch nur einem Faktor zwei oder drei im Nanometerbereich den Ausschlag geben, ob Untersuchungen sinnvoll sind oder nicht. Z. B. konnte der lange Hals des Myosin-V im Unterschied zu Kinesinen mit elektronenmikroskopischen Verfahren dargestellt werden [9]. Ein weiterer Vorteil dabei ist, dass beide Motordomänen gleichzeitig an Aktin binden können, wobei sich die eine in der Konfiguration vor dem mechanischen Schlag, die andere aber in der Konfiguration nach Ausführen des mechanischen Schlages befindet. So konnten Aufnahmen beider Konfigurationen gemacht werden.

Dieses Anbinden beider Motordomänen in unterschiedlichen chemomechanischen Zuständen geht auf eine weitere Besonderheit von Myosin-V zurück, auf seine sogenannte Prozessivität. Prozessive Bewegung bedeutet, dass der Motor alleine viele aufeinander folgende Schritte entlang des Aktins vollziehen kann. Es war eine Überraschung, dass ein Vertreter der Myosin-Familie diese Transportereigenschaften zeigte, war doch eine solche prozessive Bewegung bisher nur von Mitgliedern der Kinesin-Familie bekannt. Auch das Muskelmyosin, Myosin II, führt z. B. nur einen einzelnen Schlag aus, bevor es das Aktinfilament loslässt. Man nennt dieses Verhalten „nicht prozessiv“. Für die Muskeln, bei denen sehr viele Myosine im Verband arbeiten, macht dies Sinn. Ein zu langes Halten an den Aktinfilamenten würde die Bewegung des ganzen Muskels nur behindern. Ein Transporter dagegen sollte lange entlang des Aktin gebunden bleiben, damit er seine Last möglichst weit tragen kann. Dafür muss ein prozessiver Motor seine Motordomänen nicht nur bewegen sondern auch koordinieren, was die Bewegung komplizierter macht. Dennoch ist Prozessivität ein experimenteller Vorteil. Sie liefert die Möglichkeit, mehrere aufeinander folgende Zyklen mit entsprechenden Schrittweiten und Verweildauern zu messen, wodurch man Aussagen über das Zusammenspiel vom chemischen und mechanischen Zyklus gewinnen kann.

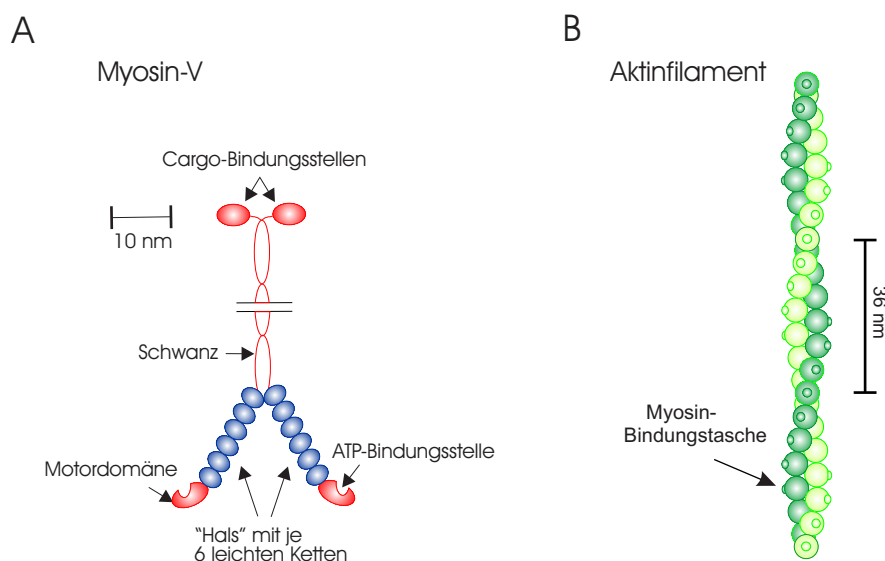


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Proteine Myosin-V und Aktin. (A) Strukturelle Untersuchungen zeigen, dass es sich bei Myosin-V um ein dimeres, ca. 530 kD schweres Polypeptid handelt, das durch eine lange Halsregion gekennzeichnet ist [2, 9, 10, 11, 12]. Dieser „Hals“ wird durch jeweils sechs leichte Seitenketten (Calmoduline) stabilisiert. An die Halsregion schließen die Motordomänen, auch Köpfe genannt, mit den ATP-Bindungstaschen und am anderen Ende eine α -helikale Schwanzregion in Form eines „coiled-coil“, sowie zwei Cargo-Bindungsstellen an. (B) Das Aktinfilament setzt sich aus fast kugelförmigen Untereinheiten, dem sogenannten G-Aktin zusammen. Diese lagern sich so an, dass eine Helix entsteht, die periodische Abstände von etwa 36 nm zeigt.

Einen großen Beitrag zum Verständnis des Mechanismus der Prozessivität von Myosin-V brachten 1999 erste Einzelmolekül-Experimente, die zeigten, dass Myosin-V diskrete, ungefähr 36 nm große Schritte macht [13]. Diese Schrittweite korrespondiert mit der Periodizität des Aktinfilaments (Abb. 1B). Dies ließ darauf schließen, dass Myosin-V sich geradlinig auf dem Aktinstrang bewegt und nicht um das Filament herumspiralisiert. Diese Interpretation unterstützten auch die oben erwähnten, elektronenmikroskopischen Aufnahmen, die Myosin-V an Aktin in diesem Abstand gebunden zeigen. In weiteren mechanischen und biochemischen Experimenten konnte gezeigt werden, dass pro Schritt ein ATP hydrolysiert wird und ADP-Loslassen mit 12/s die limitierende Ratenkonstante im Zyklus ist [14, 15, 16, 17]. Diese Erkenntnisse führten Rief et al. im Jahr 2000 zu einem ersten Modell zusammen. Dieses ist schematisch in Abb. 2 gezeigt.

Betrachten wir den Zyklus von dem Zeitpunkt an, da die vordere Domäne ADP (in Abb. 2 mit D abgekürzt) enthält und am Aktin gebunden ist, während die hintere Domäne ATP (T) bindet und damit das Aktinfilament loslässt (I). Der vordere Teil des Myosin-V führt, wahrscheinlich auf Grund intramolekularer Spannung, den mechanischen Schlag aus. Die hintere Motordomäne schwingt nach vorne und wird zur vorderen Domäne (II). ATP wird hydrolysiert, die Motordomäne bindet im Abstand

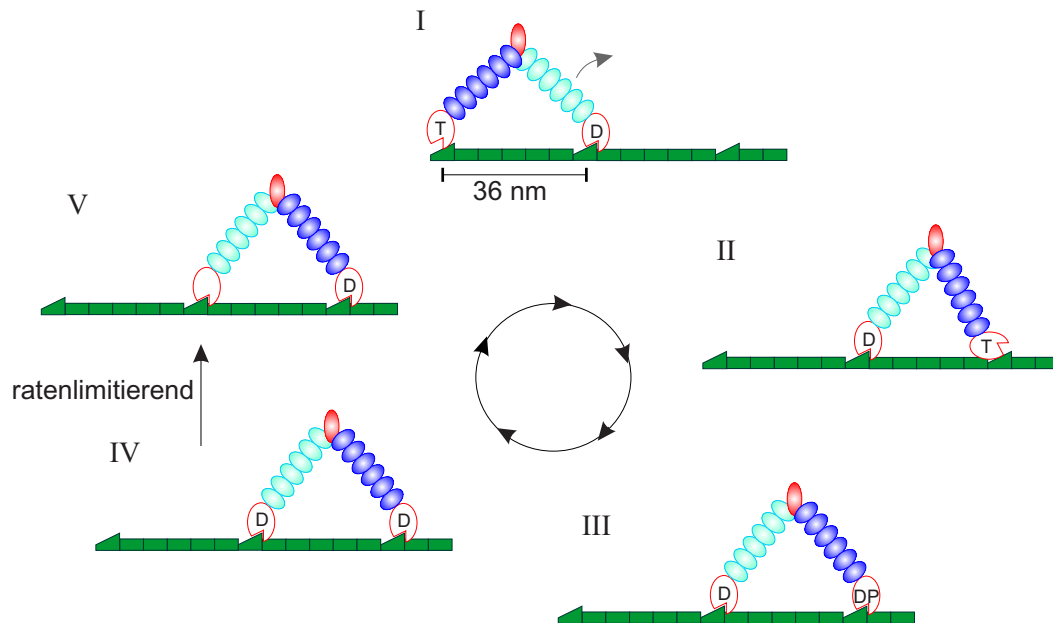


Abbildung 2: Erstes Modell des chemomechanischen Zyklusses von Myosin-V, Bild frei nach [14]

von ungefähr 36 nm zur anderen Domäne ans Aktinfilament (III) und Phosphat (P) wird abgespalten. Alle diese Vorgänge passieren schnell, die meiste Zeit verweilt Myosin-V in dem nun folgenden Zustand, bei dem beide Domänen ADP gebunden haben und am Filament angreifen (IV). ADP-Loslösen vom hinteren Kopf ist ratenlimitierend (V). An den nun freien hinteren Kopf kann wieder ATP binden, der Zyklus schließt sich.

Dieses Modell war auf einige Vermutungen gebaut, so nahm es z. B. die sogenannte „Hand-über-Hand“-Bewegung an, bei der der hintere Kopf nach vorne schwingt und zum vorderen Kopf wird. Eine andere Möglichkeit wäre die Bewegung ähnlich einer Raupe, bei der der hintere Kopf etwa an die Position des vorderen gelangt und der vordere Kopf nach vorne ausweicht. Untersuchungen an prozessiven Motoren der Kinesin-Familie stützten das raupenähnliche Modell [18]. Beide Bewegungsarten wurden für Myosin-V heiß diskutiert.

Um zwischen beiden Bewegungsarten zu unterscheiden, wurde in dieser Arbeit ein einzelnes Fluorophor am Myosin-V in der Nähe einer der Motordomänen angebracht. Bei einem Schritt des Motors im „Hand-über-Hand“-Modell sollte das Fluorophor eine Distanz von ungefähr 72 nm zurücklegen, bei der raupenähnlichen Bewegung jedoch nur eine Strecke von ungefähr 36 nm. Mittels eines selbst aufgebauten „Total Internal Reflection Fluorescence“ (TIRF)-Mikroskops konnte die Bewegung des Fluorophors für einzelne Schritte des Motors aufgelöst und so zwischen beiden Bewegungsarten unterschieden werden.

In weiteren Experimenten wurden externe Kräfte an einen aktiven Motor angelegt. Die Kräfte beeinflussen Übergänge im Zyklus, was zu beobachtbaren Effekten führt und diese Übergänge hervorheben kann. Um auf diese Weise einen besseren Einblick in den chemomechanischen Zyklus von Myosin-V zu bekommen, wurden in dieser Arbeit Einzelmolekül-Experimente mit einer selbst konzipierten Laser-Pinzette unter verschiedenen Kräften durchgeführt. Dabei werden Polystyrolkugeln mit einzelnen Motoren auf der Oberfläche optisch eingefangen und in Kontakt mit fluoreszierenden, auf der Probenoberfläche verankerten Aktinfilamenten gebracht. Sobald der Motor losläuft, startet die Feedback-Kontrolle, die den Motor unter einer konstanten Kraft hält. Der neuartige Feedback wurde über einen Piezotisch realisiert, der das Voranschreiten der Kugeln durch Mitführen des oberflächengebundenen Aktins, ähnlich wie bei einem Laufband, ausgleicht und damit den Schritten des Myosin-V folgt. So konnten erstmals ganze Läufe einzelner Motorproteine unter verschiedenen vorwärts- und rückwärtsgerichteten Kräften aufgezeichnet werden. Die Untersuchung in Hinsicht auf Schrittweiten, Verweildauern und Lauflängen erlaubten vielfältige Einblicke in den chemomechanischen Zyklus. Bei den Messungen wurde auch untersucht, wie sich Myosin-V bei Kräften weit über der Stillstandkraft verhält. Dies ist z. B. deshalb interessant, da Myosin-V *in vivo* beim Melanosomentransport zusammen mit sehr viel stärkeren Motoren wie Kinesinen gefunden wurde [19, 20]. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich ein ganz neues Phänomen: Myosin-V zeigte mehrere, aufeinanderfolgende Rückwärtsschritte. In der vorliegenden Arbeit wird nun detailliert auf diese Experimente und ihre Grundlagen eingegangen.

Kapitel 1 startet mit den Prinzipien der optischen und mechanischen Untersuchungsmethoden. Zuerst wird dabei auf die Laser-Pinzette eingegangen, dann auf das TIRF-Mikroskop.

Kapitel 2 gibt einen Überblick über die theoretischen Modelle von Myosin-V. Dabei wird auf die Ratenmodelle eingegangen und ein erst kürzlich bekannt gewordenes, mechanisches Modell vorgestellt. Eigene theoretische Abschätzungen schließen dieses Kapitel.

Der experimentelle Aufbau aus Laser-Pinzette und integriertem TIRF-Mikroskop, der in dieser Arbeit konzipiert und aufgebaut wurde, wird in Kapitel 3 geschildert.

Die zur Bestimmung der Bewegungsart durchgeführten Einzelmolekülfluoreszenz-Experimente sind Inhalt des 4. Kapitels. Dabei wird zuerst auf das Prinzip der Messungen eingegangen, dann auf die Materialien und Methoden, die Ergebnisse und schließlich auf die Diskussion der Ergebnisse.

In gleicher Weise werden in Kapitel 5 die kraftabhängigen Messungen geschildert. Eine abschließende Bemerkung und ein Ausblick schließen diese Arbeit ab.

Kapitel 1

Grundlagen der Untersuchungsmethoden

Im Folgenden werden die Prinzipien der verwendeten optischen Pinzette und des „Total-Internal-Reflection-Fluorescence“ (TIRF)-Mikroskops zusammenfassend dargestellt [21, 22, 23, 24, 25].

1.1 Die Laser-Pinzette

War es noch vor 30 Jahren unvorstellbar, Objekte nur mit der „Kraft von Licht“ festzuhalten, so ist es heute Laboralltag. Möglich wird dies durch die in den 80er Jahren von Arthur Ashkin und Kollegen entdeckte Laser-Pinzette, die häufig auch optische Pinzette oder optische Falle genannt wird [22]. Dabei werden Nanometer bis einige hundert Mikrometer große Teilchen mittels eines fokussierten Laserstrahls eingefangen.

Detektiert wird die Position des gefangenen Objekts über die Zeit. Ermittelt man die Federkonstante des Systems, so kann man über die Auslenkung auf die wirkenden Kräfte schließen. Messbar sind dabei Positionsänderungen im Nanometer- und Kräfte im Piconewton- und Subpiconewton-Bereich.

Viele molekulare Motoren arbeiten in diesem Bereich. Daher ist die optische Pinzette ein geeignetes Werkzeug, um in mechanischen Einzelmolekülexperimenten diese Proteine zu charakterisieren. Weiterhin vereinen optische Pinzetten geringe Federkonstanten mit geringer viskoser Dämpfung, so dass man eine hohe Meßbandbreite erhält.

Neben der Untersuchung molekularer Motoren kommt die optische Pinzette auch bei zahlreichen anderen Fragestellungen und Anwendungen zum Einsatz. So können Zellen und Viren sowie Zellorganellen innerhalb von Zellen oder Viren zerstörungsfrei manipuliert werden [23, 26]. Ein prominentes Beispiel ist das Einfangen von extrem beweglichen Spermien zur Durchführung einer künstlichen Befruchtung [27].

Die optische Pinzette wird außerdem verwendet, um mechanische Eigenschaften von Zellen, intrazellulären Strukturen, Filamenten und einzelnen Makromolekülen (z. B. der DNA) zu untersuchen. In Einzelmolekülexperimenten kann man z.B. die Proteinfaltung oder auch Protein-Protein-Wechselwirkungen untersuchen [28].

Es können auch mehrere Fallen verwendet werden, um andere Geometrien für weitere mechanische Untersuchungen zu nutzen. Auch Kombinationen von optischen Fallen mit anderen Methoden wie z.B. der Mikropipette, der Mikrochirurgie oder wie in dieser Arbeit mit der Fluoreszenzmikroskopie bieten ein großartiges Werkzeug zur Untersuchung biologischer Systeme.

1.1.1 Prinzip der Laser-Pinzette

Laser-Pinzetten nutzen den Strahlungsdruck eines Laserstrahls. Treffen Photonen auf eine reflektierende oder absorbierende Oberfläche, so wird auf diese durch die Änderung der Photonenimpulse eine Kraft ausgeübt. Die Photonen führen dabei zu einer Streukraft \vec{F}_s , die dazu tendiert, das betreffende Objekt entlang des Lichtstrahls zu bewegen, gefangen werden kann es dadurch jedoch noch nicht. Dazu kann die sogenannte Gradientenkraft \vec{F}_{grad} verhelfen, die durch einen räumlichen Gradienten in der Lichtintensität zu Stande kommt und die nicht in Richtung des Lichtstrahls zeigen muss. Die Gradientenkraft ist im allgemeinen klein gegenüber der Streukraft. Das muss aber nicht immer so sein, besonders wenn das Objekt fast transparent ist. In einer optischen Pinzette ist die Geometrie so ausgelegt, dass die Gradientenkraft möglichst groß und so gerichtet ist, dass ein stabiles Einfangen des Objekts möglich ist.

Woher kommt nun diese Gradientenkraft? Dazu wollen wir zwei unterschiedliche Erklärungen betrachten.

Wenn Licht, das eine hochfrequente elektromagnetische Oszillation darstellt, durch ein dielektrisches Medium läuft, dann polarisieren die zeitlich veränderlichen elektrischen Feldvektoren das Medium, indem Dipole induziert werden. Auf eine Ladung q wirkt in einem elektrischen Feld \vec{E} die Kraft $q\vec{E}$. Ähnlich erfährt ein elektrischer Dipol p eine Kraft in einem räumlich veränderlichen elektrischen Feld von $p \cdot \nabla E$, da die Ladungen des Dipols sich in Bereichen mit unterschiedlicher Feldstärke befinden [29]. Die induzierten Dipole des transparenten Mediums sind im Objekt fest, so dass eine Kraft in Richtung des Lichtgradienten entsteht. Die Stärke des induzierten Dipols p hängt von der Polarisierbarkeit des Mediums und von der Feldstärke ab, was zu einem weiteren Term von E in der Feldabhängigkeit führt. Insgesamt kann man die Gradientenkraft für eine Rayleigh-Teilchen (Radius $r \ll$ Wellenlänge des Lichts λ) mit dem Brechungsindex n und umgeben von einem Medium mit dem Brechungsindex n_b folgendermaßen angeben [30]:

$$\vec{F}_{grad} = -(\alpha/2)\vec{\nabla} E^2, \quad (1.1)$$

wobei $\alpha = r^3 n_b^2 (n^2 - 1 / (n^2 + 2))$ die Polarisierbarkeit ist. Teilchen, die sich in einem Lichtgradienten befinden, erfahren also eine Kraft, die sie zu einem Punkt zieht, an dem das Licht am hellsten ist, z. B. in einen Fokus.

Neben der Gradientenkraft wurde schon die Streukraft durch reflektiertes oder absorbiertes Licht erwähnt, die in Richtung des Lichtstrahls wirkt. Kleine Partikel ($r \ll \lambda$) streuen das Licht invers proportional zur 4. Potenz der Wellenlänge, eine Beziehung, die Lord Rayleigh benutzte, um die blaue Farbe des Himmels zu erklären:

$$F_s = \frac{I_0}{c} \frac{128\pi^5 r^6}{3\lambda^4} \left(\frac{n_b(n^2 - 1)^2}{(n^2 + 2)^2} \right), \quad (1.2)$$

wobei $I_0 \propto E^2$ die Lichtintensität ist [22].

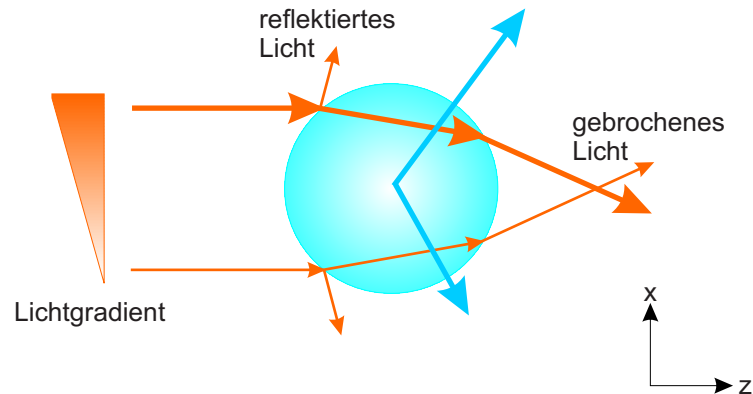
F_{grad} und F_s zeigen also unterschiedliche Abhängigkeiten von n , n_b und r . F_s hängt vom Quadrat des elektrischen Feldes, F_{grad} dagegen vom Gradienten des Quadrats des Feldes ab. Für kleine Partikel ($r \ll \lambda$) und für ein genügend großes Verhältnis von $(\nabla E^2)/(E^2)$ gibt es einen Bereich mit $F_{grad} > F_s$, in dem Teilchen gefangen werden können. Diese Region befindet sich nahe der Taille eines hoch konvergenten Strahls, z. B. nahe am Fokus eines Objektivs mit hoher numerischer Apertur.

Mikrometergroße Polystyrolkugeln, Bakterien oder eukariotische Zellen haben Dimensionen vergleichbar oder größer als die Wellenlänge des Lichts, dort kann man obige Rayleigh-Näherung nicht anwenden.

Für Objekte mit $r \gg \lambda$ gelingt aber ein weiterer einfacher Zugang zur Gradientenkraft mit Hilfe der Strahlenoptik.

In dieser Vorstellung, die in Abb. 1.1 dargestellt ist, kann man die zu fangenden Kugeln ($n > n_b$) als Linsen ansehen, auf die Licht fällt. Das Licht wird an den Oberflächen gebrochen, wenn es in die Kugel ein- und austritt (Abb. 1.1 dickere orange Pfeile). Außerdem wird das Licht an der Oberfläche reflektiert. Dieser Anteil wird aber klein sein, wenn man annimmt, dass die Kugel fast transparent ist (dünne orange Pfeile). Mit den Lichtstrahlen ist ein Impuls verbunden. Bevor das Licht auf die Kugel fällt, zeigt dieser Impuls ausschließlich in longitudinale (z) Richtung. Nachdem das Licht die Kugel passiert hat, hat der Impuls auch eine Komponente in transversaler (x) Richtung. Nach der Impulserhaltung geht diese Impulsänderung mit einer Impulsänderung der Kugel einher, die gleich groß und entgegengesetzt gerichtet ist. Wenn der Strahl überall die gleiche Intensität hat, dann gleichen sich die Impulsüberträge der oberen Strahlen, die zu einer Richtungsänderung der Kugel nach oben (und in z-Richtung) führen, mit den Impulsüberträgen der unteren Strahlen, die zu einer Richtungsänderung der Kugel nach unten (und in z-Richtung) führen, genau aus. Wenn es aber einen Lichtgradienten gibt, wie in Abb. 1.1 oben dargestellt, dann führen die oberen, helleren Strahlen zu einem größeren Impulsübertrag (blaue Pfeile). Insgesamt wird die Kugel also nach oben (und etwas in z-Richtung) gedrückt, hin zum helleren Licht. So kann man sich die Gradientenkraft vorstellen. Da die Streukraft nur in z-Richtung wirkt, ist hauptsächlich die Gradientenkraft fürs Fangen verantwortlich.

A
Erklärung zur lateralen (x-y) Kraft zum Einfangen der Kugel



B
Erklärung zur longitudinalen (z) Kraft zum Einfangen der Kugel

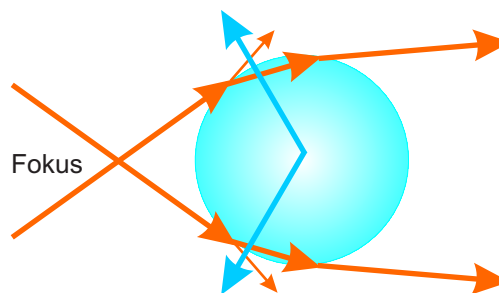


Abbildung 1.1: Prinzip der optischen Pinzette im Bild der Strahlenoptik. Das Licht (orange Pfeile) wird gebrochen bzw. reflektiert. Die blauen Pfeile zeigen die Impulsüberträge auf die Kugel.

Die Kugel in Abb.1.1 unten befindet sich nahe am Fokus eines hoch konvergenten Strahls. Die orangen Pfeile zeigen analog zum oberen Bild den Strahlenverlauf. In diesem Fall wird das Licht also durch die Kugel fokussiert. Durch die Impulserhaltung in z-Richtung wird die Kugel durch diese Strahlen ihre Richtung in negative z-Richtung ändern (blaue Pfeile). Die Impulsänderung durch die gestreuten Strahlen zeigt wieder in positiver z-Richtung. Streukraft und Gradientenkraft zeigen also in entgegengesetzte Richtungen. Angenommen, dass das Objekt transparent ist und das Licht genügend konvergent, kann die Gradientenkraft größer als die Streukraft werden und die Falle ist stabil. Die Betrachtung der Impulsänderungen zeigt dabei, dass die Position der stabilen Falle irgendwo nahe hinter dem Fokus liegen wird, da vor dem Fokus Gradienten- und Streukraft in die gleiche Richtung zeigen.

Im Fall, in dem die Dimensionen größer als die Wellenlänge sind (also im Mie- bzw. Strahlenoptikbereich), wird neben den Eigenschaften des Lichtstrahls auch das genaue Aussehen des Objekts den Strahlungsdruck bestimmen. Die Betrachtungen werden dann, außer für die einfachsten Geometrien, recht kompliziert. Nach Ashkin [24] kann man die Kraft eines parallelen Strahlenbündels mit der Leistung P allge-

mein abschätzen durch: $F_{Falle} = Q \frac{n_b P}{c}$, wobei $n_b P/c$ das Kraftmoment pro Sekunde in einem Medium mit Brechungsindex n_b ist und Q ein dimensionsloser Koeffizient aus Wellenlänge, Modenstruktur und Polarisation des Lichts, numerischer Apertur des Objektivs und Brechungsindex und Geometrie des zu fangenden Objekts. Für eine Mikrometergroße Kugel und einen Infrarotlaser erhält man für Q in einer groben Abschätzung einen Wert von $Q = 0,03$, d. h. die Kraft beträgt etwa 3% des entsprechenden Photonendrucks auf eine absorbierende Oberfläche.

Die beiden Betrachtungen für die Gradientenkraft zeigten das Einfangen für Objekte, die entweder kleiner oder größer als die Wellenlänge sind, da sie einerseits von der Rayleigh-Näherung für sehr kleine Teilchen und andererseits von der Strahlenoptik für große Objekte ausging. Das Einfangen funktioniert aber problemlos auch mit Latexkugeln, die gerade einen Durchmesser in der Größe der Wellenlänge (~ 1000 nm) haben. In diesem Regime greifen die beschriebenen Erklärungen der Gradientenkraft nicht. Dort müssen kompliziertere Betrachtungen angestellt werden, die zusätzliche Beugungseffekte und den vektoriellen Charakter des elektromagnetischen Feldes berücksichtigen [31].

Nun kann man sich fragen, ob die im Fokus gefangenen Teilchen nicht durch das Licht zu stark aufgeheizt werden. Ein typischer Fallenlaser mit 1 mW Leistung wird z. B. im Fokus mit ~ 1000 nm Durchmesser riesige Werte im Bereich von Megawatt pro Quadratcentimeter erzeugen. Trotzdem ist stabiles Einfangen weitgehend ohne Zerstörung möglich. Betrachten wir dazu folgende grobe Abschätzung [21]: Eine Kugel mit 1000 nm Durchmesser, thermisch abgeschirmt von der Umgebung, mit einer thermischen Leitfähigkeit die der von Wasser entspricht (z. B. ein Bakterium), wird von einem Laser mit einer Milliwatt Leistung eingefangen. Auch wenn nur 1/10000 der einfallenden Strahlung absorbiert würde, reichten diese Mikrowatt aus, die Temperatur der Wasserkugel in schneller als einer Millisekunde so zu erhöhen, dass die Kugel verdampft. Stellen wir uns nun vor, dass die gleiche Kugel von Wasser umgeben ist. Damit verändert sich die physikalische Situation drastisch: Man könnte sagen, die Kugel ist wassergekühlt. Ein Ausdruck für die thermische Leitung kann für die Kugel-Geometrie berechnet werden, für die Temperaturänderung im Gleichgewicht ergibt sich für eine Kugel in Wasser $\Delta T = 3P/(8\pi\kappa r)$ [21]. Dabei ist r der Radius, κ die thermische Leitfähigkeit von Wasser und P die Leistung, die auf die Kugel übertragen wird. Setzt man typische Zahlen ein, dann ergibt sich in diesem Fall für die gleichen Mikrowatt wie oben ein Temperaturanstieg von $\sim 1^\circ\text{C}$, also ein viel akzeptableres Ergebnis.

Natürlich ist die Zerstörung durch Licht ein weit komplizierteres Phänomen als nur die Betrachtung des nicht-spezifischen Heizens. So kann es zu resonanter Absorption oder spezifischen, photochemischen Prozessen kommen. Da die Fallenstärke linear mit der Laserleistung ansteigt, möchte man für stabiles Fangen viel Licht einstrahlen. Es macht daher Sinn, eine Wellenlänge zu verwenden, die am wenigsten zerstört. Dies ist für die meisten biologischen Systeme im Infrarotbereich der Fall [32].

1.1.2 Kalibrierung der Fallenstärke

Für kleine Auslenkungen eines in einer optischen Pinzette gefangenen Teilchens aus dem Zentrum der Pinzette ist die auf das Teilchen wirkende, rücktreibende Kraft proportional zur Auslenkung [22]. Die optische Falle verhält sich damit wie eine Feder und ist durch die entsprechende Federstärke charakterisiert.

Zur Kalibrierung der Federstärke optischer Pinzetten existieren mehrere Methoden, die ausführlich in [33, 34] erklärt werden. Im Folgenden sollen die zwei Methoden vorgestellt werden, die bei den Experimenten dieser Doktorarbeit verwendet wurden. Da dabei nur die laterale Federstärke, genauer gesagt die Federstärke in Richtung des Aktinfilaments (vergleiche Kapitel 5) von Interesse war, reduzierte sich die Kalibrierung auf eine Dimension.

In den Experimenten wurde die Federstärke für jede verwendete Kugel durch Messung der thermischen Fluktuationen der Position der gefangenen Kugel bestimmt. Nach dem Äquipartitions-Theorem für ein Teilchen in einem harmonischen Potential gilt:

$$\frac{1}{2}k_B T = \frac{1}{2}k \langle x^2 \rangle, \quad (1.3)$$

wobei k_B die Boltzmannkonstante, T die absolute Temperatur, k die Federkonstante des Systems und $\langle x^2 \rangle$ die mittlere quadratische Auslenkung des Teilchens aus seiner Ruhelage ist. Setzt man also für T die Zimmertemperatur ein und bestimmte mit dem in der optischen Pinzette vorhandenen, schnellen und kalibrierten Positionsdetektor die mittlere quadratische Auslenkung, dann kann man die Federkonstante bestimmen.

Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass sie recht einfach in den Ablauf eines Experiments integriert werden kann. Typischerweise wurden Federstärken von 0.02 bis 0.08 pN/nm über eine entsprechende Laserleistung eingestellt.

Diese Kalibrierungsmethode wurde mit einer weiteren Kalibrierungstechnik, die die Abfallfrequenz des Leistungsspektrums der Position einer gefangenen Kugel verwendet, überprüft. Das Prinzip beruht darauf, dass sich für ein Teilchen in einem harmonischen Potential bei niedrigen Reynolds-Zahlen (starke Dämpfung, $mk \ll \beta^2$, wobei m die Masse ist) die Position x des Teilchens durch die Langevin-Gleichung beschreiben lässt:

$$\beta \dot{x} + kx(t) = F(t), \quad (1.4)$$

wobei β der viskose Reibungskoeffizient ist. $F(t)$ ist eine stochastische Kraft mit $\langle F(t) \rangle = 0$ und der Korrelation $\langle F(t)F(t') \rangle = C\delta(t-t')$, C stellt dabei ein Maß für die Korrelation dar. Im thermischen Gleichgewicht ($t \rightarrow \infty$) ergibt sich eine Beziehung zwischen der stochastischen Kraft und $\langle x^2 \rangle$, wobei $x(t)$ eine Lösung der Langevin-Gleichung 1.4 ist. Das Äquipartitionsprinzip 1.3 liefert dann das „Fluktuations-Dissipationstheorem“:

$$k_B T = k \langle x^2 \rangle = \frac{C}{2\beta} \quad (1.5)$$

Nach Fouriertransformation $x(t) \rightarrow \tilde{x}(f)$, $F(t) \rightarrow \tilde{F}(f)$ in der Langevin-Gleichung 1.4 erhalten wir dann

$$\langle x^2 \rangle = \frac{k_B T}{2\pi^2 \beta} \int_{-\infty}^{+\infty} df \frac{1}{f^2 + f_c^2} \quad (1.6)$$

mit der Abfallfrequenz

$$f_c = \frac{k}{2\pi\beta} \quad (1.7)$$

und einem Lorentzschcn Powerspektrum. Die Fallenstärke k lässt sich bei bekanntem β aus der Abfallfrequenz ermitteln. Diese erhält man durch Vergleich obiger Frequenzabhängigkeit mit dem experimentellen Spektrum. Dies hat den Vorteil, dass man die absolute Normierung nicht braucht.

Für eine Kugel mit dem Radius r , die sich in einem Medium mit der Viskosität η im Abstand h von der Oberfläche befindet, ergibt sich mit dem Gesetz von Stokes und einer Korrektur für die Nähe zur Oberfläche („proximity effect“) für den viskosen Reibungskoeffizient β [34]:

$$\beta = \frac{6\pi\eta r}{1 - \frac{9}{16}(r/h) + \frac{1}{8}(r/h)^3 - \frac{45}{256}(r/h)^4 - \frac{1}{16}(r/h)^5} \quad (1.8)$$

Die mit beiden Kalibrierungstechniken ermittelten Federstärken zeigten lediglich eine geringe Abweichung von $\leq 10\%$.

1.2 Das TIRF-Mikroskop

Lichtmikroskopische Techniken wie die Fluoreszenzmikroskopie haben den großen Vorteil, dass auch dynamische Prozesse von biologischen Systemen wie z. B. Zellen oder Motorproteinen studiert werden können. Bekannte Fluoreszenzmikroskopietechniken werden z. B. im Lehrbuch von A. Sharma und S. Schulmann [35] ausführlich beschrieben. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Fluoreszenzmikroskopie auf der Tatsache beruht, dass gewisse Moleküle einen Teil des von ihnen absorbierten Lichts in Form einer langwelligeren Strahlung wieder abgeben. Solche sogenannten Fluorophore kann man spezifisch an die zu untersuchenden Teilchen, z. B. in unserem Fall an die Aktinfilamente oder das Myosin-V, binden. Bringt man die Fluorophore durch Licht mit geeigneter Wellenlänge zum Leuchten und detektiert das Fluoreszenzlicht z. B. über ein Objektiv, Filter und eine Kamera, dann kann man den Ort der fluoreszenzmarkierten Teilchen sichtbar machen. Durch Sonderformen der Fluoreszenzmikroskopie wie der „Total-Internal-Reflection-Fluorescence“ (TIRF)-Mikroskopie kann man heute Positionsänderungen einzelner Moleküle im nm-Bereich auflösen.

Prinzip des TIRF-Mikroskops

Beim TIRF-Mikroskop macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass bei Totalreflexion eines Lichtstrahls an der Grenzschicht zu einem optisch dünneren Medium

das Licht auch in das optisch dünnere Medium eindringt, allerdings meist nur um weniger als eine Wellenlänge. Damit können fluoreszenzmarkierte Moleküle selektiv in einer extrem dünnen Schicht unmittelbar an der optischen Grenzschicht angeregt werden, ohne dass Moleküle außerhalb dieser Schicht zu einem unspezifischen Hintergrund beitragen (Abb. 1.2). Diese selektive Anregung erlaubt selbst einzelne Moleküle fluoreszenzmikroskopisch zu beobachten, allerdings beschränkt auf die beleuchtete Schicht nahe der Oberfläche.

Das Eindringen des Lichts bei Totalreflexion, die sogenannte evaneszente Welle, kann mit der elektromagnetischen Wellentheorie des Lichts erklärt werden [36]. Die Intensität des evaneszenten Feldes fällt exponentiell mit steigendem Abstand von der Oberfläche:

$$I(z) = I(0)e^{-z/d}, \quad (1.9)$$

dabei ist $I(z)$ die Intensität im (von der Oberfläche aus senkrechten) Abstand z , $I(0)$ die Intensität an der Oberfläche und d die charakteristische Eindringtiefe:

$$d = \frac{\lambda_0}{4\pi \sqrt{(\sin(\alpha_1)/\sin(\alpha_g))^2 - 1}}, \quad (1.10)$$

wobei λ_0 die Wellenlänge des einfallenden Lichts im Vakuum, α_1 der Einfallswinkel und α_g der Grenzwinkel der Totalreflexion ist.

Die Eindringtiefe ist dabei unabhängig von der Polarisation des Lichts. Sie wird mit größerem Einfallswinkel kleiner und hängt von den Brechungsindizes der beteiligten Medien und der Wellenlänge des verwendeten Lichts ab. Grob gesprochen ist die Eindringtiefe meist etwas kleiner als die Wellenlänge.

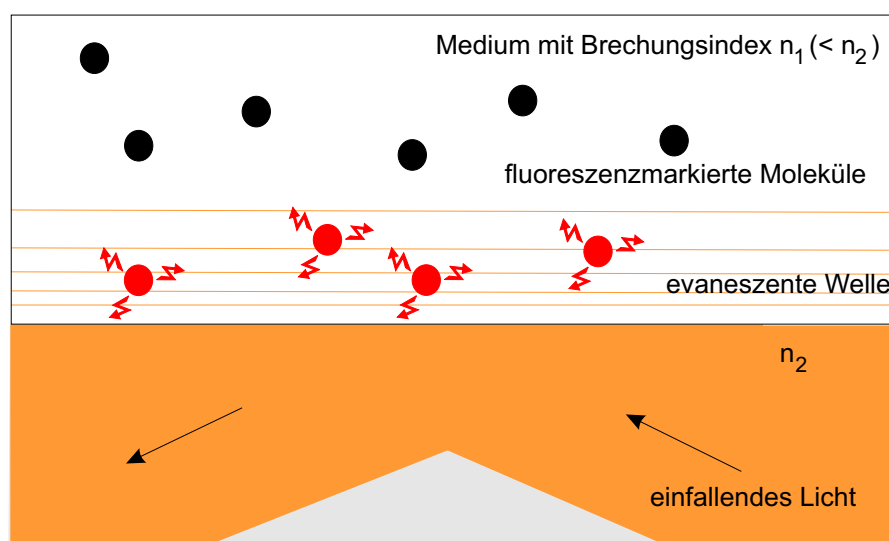


Abbildung 1.2: Prinzip des TIRF-Mikroskops: Die evaneszente Welle eines totalreflektierten Strahls (orange) bringt nur oberflächennahe Moleküle zum Fluoreszieren. Die Moleküle im Hintergrund liefern kein Signal, was das Signal-Rausch Verhältnis erheblich verbessert (\sim Faktor 2000 gegenüber herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie [37]).

Kapitel 2

Theoretische Modelle von Myosin-V

2.1 Kinetische Ratenmodelle

Seit Mitte der 90er Jahre wurden theoretische Modelle prozessiver molekularer Motoren entwickelt [38, 39, 40, 41, 42, 43]. Die meisten gehen von einigen langlebigen Zuständen im chemomechanischen Zyklus aus und nehmen stochastische Übergänge zwischen diesen an. Die Modelle unterscheiden sich in der Wahl dieser Zustände, beschreiben aber alle den Motor als ein Objekt, das durch eine bestimmte Anzahl von Konfigurationen mit verschiedenen Positionen entlang seines Weges x geht. Nach Vollendung eines gesamten Zyklus hat der Motor dann einen Schritt zurückgelegt. Abbildung 2.1 zeigt schematisch ein solches periodisch stochastisches Modell mit N Zuständen.

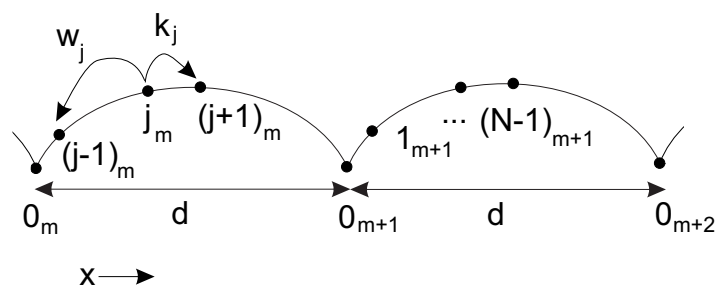


Abbildung 2.1: Schema eines periodisch stochastischen Modells mit N Zuständen, Bild frei nach [43].

In einem Zyklus, der den Motor von der Bindungsstelle m zu $m + 1$ versetzt, durchläuft das Protein N biochemische Zwischenzustände $j_m = 1_m, 2_m \dots$ bis $N_m = 0_{m+1}$. Vorwärts- bzw. rückwärts gerichtete Übergänge sind jeweils durch die kinetischen Ratenkonstanten k_j und w_j beschrieben, d ist die Schrittweite.

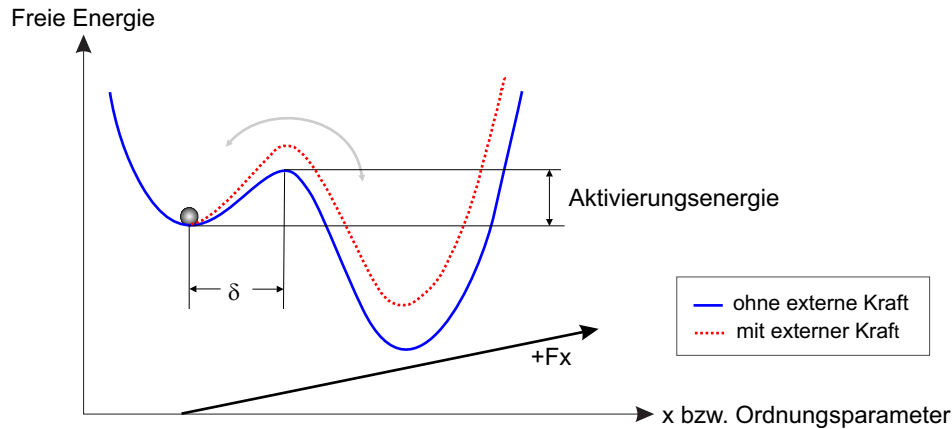


Abbildung 2.2: Vorstellung der Übergänge in einem „energy landscape“-Modell. Dabei ist δ die charakteristische Distanz vom Grundzustand zum Übergangszustand und F die externe Kraft.

Experimentell wurde beobachtet, dass die Prozessivität der Motoren durch Anlegen einer äußeren Kraft beeinflusst wird [13]. Einige Ratenkonstanten im chemomechanischen Zyklus werden daher kraftabhängig sein. Dies kann man in einem „energy landscape“-Modell berücksichtigen [44, 45]. Der kraftabhängige Übergang überwindet dabei eine Barriere in der freien Energie (Abb. 2.2). Das Protein muss gemäß der Arrhenius-Theorie für Reaktionsraten [46] die sogenannte Aktivierungsenergie durch thermische Diffusion überwinden. Die Übergangszeit über die Barriere geht exponentiell mit der angelegten Kraft, die kinetische Ratenkonstante folgt einer Boltzmann-Verteilung:

$$k(F) = k_0 e^{-F\delta/k_B T} \quad (2.1)$$

dabei ist k_0 die Ratekonstante ohne äußere Kraft F , δ die charakteristische Distanz vom Grundzustand zum Übergangszustand, k_B die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur.

Im einfachsten Fall kann man den chemomechanischen Zyklus auf zwei Übergänge mit den Vorwärtsraten, k_1 und k_2 reduzieren [14]:



Experimentell bestimmt werden kann z. B. die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Verweildauern der Schritte (vergleiche Kapitel 5). Diese ergibt sich folgendermaßen:

Für die Wahrscheinlichkeitsdichten der einzelnen Übergänge gilt:

$$A \xrightarrow{k_1} B : P_1(t_1) = k_1 e^{-k_1 t_1}, \quad \text{wobei} \quad \int_0^\infty k_1 e^{-k_1 t_1} dt_1 = 1 \quad (2.3)$$

$$B \xrightarrow{k_2} A : P_2(t_2) = k_2 e^{-k_2 t_2}, \quad \text{wobei} \quad \int_0^\infty k_2 e^{-k_2 t_2} dt_2 = 1, \quad (2.4)$$

Damit ergibt sich die Wahrscheinlichkeitsdichte für beide Übergänge:

$$P_{gesamt}(t_1, t_2) = k_1 e^{-k_1 t_1} k_2 e^{-k_2 t_2} \quad \text{wobei} \quad \int_0^\infty dt_1 \int_0^\infty dt_2 k_1 e^{k_1 t_1} k_2 e^{k_2 t_2} = 1. \quad (2.5)$$

Für den Vergleich mit den experimentellen Daten, die ja die Verteilungen der Verweildauern eines ganzen Schrittes ($t = t_1 + t_2$) wiedergeben, müssen wir $P_{gesamt}(t_1, t_2)$ noch umrechnen auf $P_{gesamt}(t)$:

$$1 = \int_0^\infty d(t = t_1 + t_2) \int_0^t dt_1 k_1 e^{-k_1 t_1} k_2 e^{-k_2(t-t_1)} = \int_0^\infty dt \frac{k_1 k_2}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}), \quad (2.6)$$

Die normierte Wahrscheinlichkeitsverteilung der Verweildauern im 2-Zustands-Modell mit den kinetischen Ratenkonstanten k_1 und k_2 ergibt sich also zu:

$$\boxed{P_{gesamt}(t) = \frac{k_1 k_2}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t})}. \quad (2.7)$$

Interessant ist auch die mittlere Verweildauer τ , sie ergibt sich in diesem Modell zu:

$$\tau = \int_0^\infty dt_1 \int_0^\infty dt_2 (t_1 + t_2) k_1 e^{-k_1 t_1} k_2 e^{-k_2 t_2} = \frac{1}{k_1} + \frac{1}{k_2}. \quad (2.8)$$

Ein erweitertes Ratenmodell für Myosin-V, das 2003 von Kolomeisky und Fisher [43] veröffentlicht wurde, ging ebenfalls von zwei Vorwärtsraten k_1 und k_2 aus, führte aber außerdem zwei korrespondierende Rückwärtsraten w_1 und w_2 ein (vergleiche Abbildung 2.1). Ein Schritt des Myosin-V ist mit der Hydrolyse eines ATP-Moleküls gekoppelt. Da alle Konfigurationsänderungen in diesem Modell reversibel sind, schreitet der Motor unter Kräften über der Anhaltekeft des Motors rückwärts und synthetisiert dabei ATP.

Mit diesem Modell ließen sich die mittleren Verweildauern und bei Annahme einer festen Schrittweite auch die Geschwindigkeit des Motors in Abhängigkeit dieser Vorwärts- und Rückwärtsraten beschreiben. Mit Gleichung 2.1 kann man dann auch Aussagen über die Kraftabhängigkeiten und δ machen (wobei für die Kraftabhängigkeit der Rückwärtsraten das Vorzeichen im Exponent geändert werden muss). Kolomeisky und Fisher fitteten ihre Resultate an experimentelle Daten von Mehta et al [13], die die Geschwindigkeit in Abhängigkeit von der extern angelegten Kraft zeigten. Dieser Fit ergab Werte für die Ratenkonstanten k_1 und k_2 , die die Autoren durch Vergleich mit weiteren Messdaten [13, 15] als „ATP-Binden“ und „ADP-Lösen“ identifizierten. Weiterhin sagt dieses Modell für einen der Fit-Parameter δ eine Zwischenschrittweite von 13-14 nm voraus. Das Modell ist also in der Lage, erste Interpretationen der Kraft-Geschwindigkeits-Relation zu liefern.

Allerdings besteht der chemomechanische Zyklus in Wirklichkeit aus mehr als nur den Ratenkonstanten für ATP-Binden und ADP-Loslösen. Vor allem wird wohl der „power-stroke“ einen großen Anteil an der Schrittweite haben, dies wird hier nicht berücksichtigt. Die gesamte Schrittweite wird durch die Ratenkonstanten für ATP-Binden und ADP-Loslösen bzw. deren Rückraten bestimmt. Daher sind die absoluten Werte für die Rückraten von ATP-Binden und ADP-Loslösen wohl mit Vorsicht zu genießen. Das Modell, bisher auf zwei Zustände reduziert, kann durch Einführen von mehr Zuständen noch ausgebaut werden, dazu kommen wir unter anderem im nächsten Abschnitt.

Insgesamt kann man sagen, dass die kinetischen Ratenmodelle erste Einblicke in den chemomechanischen Zyklus erlauben, sie sind aber dadurch limitiert, dass sie die mechanische Bewegung und die koordinierte Aktivität beider Köpfe des Myosin-V eher annehmen als erklären.

2.2 Mechanisches Modell

Eine neue Idee, bei der ein chemischer Zyklus von 4 bzw. 5 Zuständen mit einer mechanischen Betrachtung des Myosin-V gekoppelt wird, stellte A. Vilfan 2004 vor [47]. Die Leverarme des Myosin-V wurden dabei als biegende Balken behandelt: Sie sind oben durch ein flexibles Gelenk verbunden und unten in einem für jeden Zustand festen Winkel eingespannt (Abb. 2.3). Die Länge der Balken ist fest, es ist keine Dilatation oder Kontraktion der Balken möglich. Oben am Doppelbalken greift eine vorgegebene externe Kraft \vec{F} parallel zum Aktinfilament an. Die geometrisch verwendeten Parameter wie Länge der Arme und verwendete Winkel wurden aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen übernommen [9, 10].

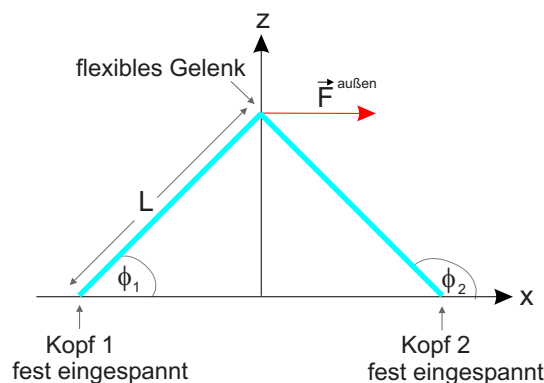


Abbildung 2.3: Mechanisches Modell von Myosin-V. Die beiden Köpfe mit den Leverarmen, die als unten fest eingespannte Balken modelliert werden, bilden ein Dreieck mit festen Winkeln ϕ_1 und ϕ_2 , die vom Zustand des Kopfes abhängen (ATP-gebunden, ADP-gebunden oder frei).

Die Berechnungen starteten mit der Betrachtung der Biegung eines einzelnen, auf der einen Seite fest eingespannten, auf der anderen Seite freien Balkens, auf den eine externe Kraft wirkt. Über das Drehmoment $M = EI\kappa$, wobei E das Elastizitätsmodul, I das Flächenträgheitsmoments und κ die lokale Krümmung ist, erhielt man unter Berücksichtigung der gegebenen Randbedingungen eine Differentialgleichung, die sich allgemein nur numerisch lösen lässt. Der Übergang zum Doppelbalken (Abb. 2.3) funktioniert nun so, dass für zwei einzelne Balken, die in einem vorgegebenen Abstand voneinander fest eingespannt waren, jeweils numerisch Lösungen gesucht wurden, die die Randbedingungen Kräftegleichgewicht ($\vec{F}_1 + \vec{F}_2 = \vec{F}$) und Anbindung der Balken oben ($x_1 = x_2, z_1 = z_2$) erfüllten. Zu den erhaltenen Lösungen wurden die korrespondierenden Biegeenergien bestimmt. Bei mehreren Lösungen zur gleichen Fragestellung wurde die energetisch günstigste als stabile Lösung genommen. Die erhaltene Lösung konnte A. Vilfan grafisch darstellen.

Diese numerische Herangehensweise nutzte Vilfan, um EI abzuschätzen. Er bestimmte für verschiedene Werte von EI die jeweils energetisch günstigsten Schrittweiten, besser gesagt die günstigsten Abstände der beiden Einzelbalken unten am Aktin. Er stellte fest, dass $EI > 1000 \text{ pN nm}^2$ sein muss, damit unter Kräften von $\sim 1.8 \text{ pN}$ Schritte von $\sim 36 \text{ nm}$ noch energetisch sinnvoll sind. Für die folgenden Rechnungen nahm er $EI = 1500 \text{ pN nm}^2$ an.

Außerdem ergab sich, dass die Schwerpunktsbewegung des doppelköpfigen Myosin-V stark von der Geometrie des Dreiecks und kaum von der Konfiguration der einzelnen Arme abhing. Das mit beiden Köpfen gebundene Myosin-V zeigte, anders als das einköpfige Konstrukt, auch bei hohen externen Kräften und verschiedenen Werten für die Winkel, unter denen die beiden Balken fest eingespannt sein können, kaum Auslenkungen. So ergab sich z. B., dass ADP-Loslösen, das im Modell mit einer Winkeländerung des Kopfes von 10° und damit verbundener Durchbiegung verknüpft ist, ohne externe Kraft beim Einzelkopf zu einer Verschiebung von 3.3 nm führt. Beim mit zwei Köpfen gebundenen Myosin-V dagegen ergibt sich ein 50 mal kleinerer Wert von 0.07 nm . Wenn man rein mechanische Effekte vernachlässigt, und die Kraftabhängigkeit der Ratenkonstanten wie oben beschrieben (Gleichung 2.1) thermodynamisch beschreibt, dann gilt, dass Ratenkonstanten für Konfigurationsübergänge, mit denen kein nennenswerter Weg verbunden ist, auch nicht stark kraftabhängig sein können. Insgesamt sagte Vilfan voraus, dass Ratenkonstanten für Vorgänge, während derer beide Köpfe gebunden sind, kaum kraftabhängig sein werden. Die entsprechenden Ratenkonstanten beim einköpfigen Konstrukt können dagegen stark kraftabhängig sein.

Seine mechanische Vorstellung des Systems koppelte Vilfan nun mit zwei Ratenmodellen. Einmal ging er von vier kinetischen Ratenkonstanten aus (ATP-Binden, Phosphat-Loslösen, „Anbindung ans Aktinfilament“ und ADP-Loslösen) und im zweiten Fall von fünf Ratenkonstanten („power-stroke“ ist nicht gekoppelt mit Phosphat-Loslösen und bekommt eine eigene Ratenkonstante) plus jeweils den entsprechenden Rückwärtsraten. Die Ratenkonstanten für den „power-stroke“, das Phosphat-Binden und die „Anbindung ans Aktinfilament“ musste er abschätzen, für die an-

deren Ratenkonstanten konnte er von verschiedenen Gruppen gemessene Werte verwenden [12, 14, 15, 48, 49, 50]. Zur Untersuchung der Lauflängen wurden in beiden Modellen Ratenkonstanten der Dissoziation eingeführt.

Zur Bestimmung der absoluten Ratenkonstanten griff Vilfan auf die Arrhenius Theorie für Reaktionsraten zurück (vergleiche auch Abschnitt 2.1). Diese beinhaltet, dass das Protein die sogenannte Aktivierungsenergie beim „activation point“ x_a ($x_a = (1 - \epsilon)x_i + \epsilon x_f$, $0 \leq \epsilon \leq 1$), der also irgendwo in der Mitte zwischen Anfangszustand (x_i) und Endzustand (x_f) liegt, durch thermische Diffusion überwinden muss. Damit kann man z.B. die Vorwärtsraten mit $k_{+i} = k_{+i}^0 e^{-\frac{U(x_a) - U(x_i)}{k_B T}}$ beschreiben, wobei $U(x)$ das totale Potential aus der Biegung der beiden Leverarme und der Arbeit gegen die äußere Kraft ist, welches das Protein überwinden muss, um seinen Zustand zu ändern. Das Problem ist nun, dass man $U(x_a)$, also die Aktivierungsenergie, nicht kennt. Um dennoch rechnen zu können, geht Vilfan davon aus, dass $U(x_a) = (1 - \epsilon)U(x_i) + \epsilon U(x_f)$, die Aktivierungsenergie also zwischen den Energiewerten am Anfang des Übergangs und am Ende des Übergangs liegt. Dies widerspricht der Vorstellung, dass es einen Potentialwall gibt, die Aktivierungsenergie also größer als die Anfangs- bzw. Endenergien ist (vergleiche Abb. 2.2). Diese Bestimmung von $U(x_a)$ ist eine sehr grobe Näherung und es stellt sich die Frage, in wie weit man damit realistische Werte für die absoluten Ratenkonstanten erhält.

Ebenso wie bei den einfacheren Ratenmodellen oben, nutzte Vilfan die Ratenkonstanten, um die Geschwindigkeit und Lauflänge darzustellen. Über die Kraftabhängigkeiten der Ratenkonstanten bekam er nun Aussagen über die Kraftabhängigkeiten der Geschwindigkeit und der Lauflänge von Myosin-V. In beiden Modellen (dem 4-Zustands- und dem 5-Zustands-Modell) erhielt er Kurven, die die von Mehta et al. [13] gemessene Kraftabhängigkeit der Geschwindigkeit gut beschreiben. Die Kurven für die Lauflängen zeigten große Unterschiede für die beiden Modelle. So war die Lauflänge im 5-Zustands-Modell (bei dem Phosphat-Loslösen nicht mit dem „powerstroke“ gekoppelt ist) im Grunde kraftunabhängig, im 4-Zustands-Modell dagegen stark kraftabhängig.

2.3 Eigene Abschätzungen

Die klassische Mechanik der Balkenbiegung ist ein gut erschlossenes Gebiet der Physik und spielt in der Baukonstruktion eine große Rolle. Daher stellte sich die Frage, ob man die Idee von A. Vilfan, die Arme des Myosin-V als eingespannte Balken zu behandeln (Kapitel 2.2), nicht auch dazu nutzen kann, mit bekannten analytischen Verfahren Eigenschaften des Motors zu beschreiben. Bei den im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten kraftabhängigen Experimenten, die in Kapitel 5 beschrieben werden, reagierte doppelköpfiges Myosin-V erstaunlich robust auf extern angelegte Kräfte. So zeigte sich z. B., dass die Ratekonstante „ADP-Loslösen“ beim doppelköpfigen Myosin-V im Gegensatz zum einköpfigen Konstrukt [48] weitgehend kraftunabhängig ist. Die oben beschriebenen Berechnungen von A. Vilfan zeigten dieses Phänomen. Seine numerische Herangehensweise erlaubte dabei die Betrachtung

tung großer Biegungen, allerdings ging sie von der sehr unwahrscheinlichen Annahme aus, dass es keine elastische Dilatation oder Kontraktion der Arme des Myosin-V gibt. Im Folgenden wird gezeigt, wie man bei Betrachtung kleiner Auslenkungen analytisch an dieses Problem herangehen und elastische Dehnungen einbeziehen kann. Letzteres ist für die Konsistenz der Betrachtung bei kleinen Auslenkungen wesentlich. Dabei sei angemerkt, dass die Eingrenzung auf „kleine“ Auslenkungen durchaus 10° -Verbiegungen und mehr beinhaltet und extrem stärkere Verbiegungen für einen stabil arbeitenden Motor eher unwahrscheinlich sind.

Betrachten wir zuerst kleine Auslenkungen eines einzelnen Balkens, an den die Kraft \vec{F} angreift. Eine Seite des Balkens sei dabei frei, die andere Seite eingespannt. Abb. 2.4 zeigt dies schematisch und erklärt die verwendeten Parameter.

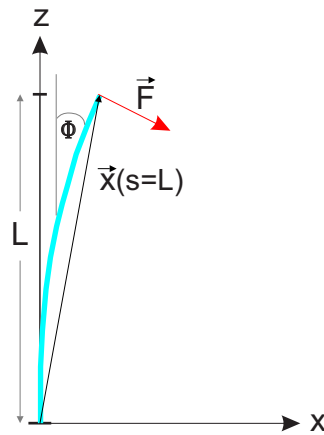


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Biegung eines Balkens für kleine Auslenkungen. Die Skala von s verläuft entlang des Balkens ($0 \leq s \leq L$), $d\phi(s)/ds$ ist die Krümmung, das Elastizitätsmodul sei mit E und das Flächenträgheitsmoment des Balkenquerschnitts mit I bezeichnet.

Für das Drehmoment \vec{M} gilt:

$$\vec{M} = (\vec{x}(L) - \vec{x}(s)) \times \vec{F} = EI \frac{d\phi(s)}{ds} \quad (2.9)$$

Für kleine Auslenkungen ist $z \simeq s$ und die Krümmung ergibt sich aus $\frac{d^2x}{dz^2}$. Nach Landau und Lifschitz [51] ergibt sich in einer sehr sorgfältigen Ableitung in kartesischen Koordinaten für die Balkenbiegung in der x-z-Ebene folgende Differentialgleichung:

$$EI \frac{d^3x}{dz^3} - F_z \frac{dx}{dz} + F_x = 0 \quad (2.10)$$

mit den Randbedingungen für die starre Einspannung und das offene Ende:

$$x(z=0) = \frac{dx}{dz} \Big|_{z=0} = 0, \quad \text{und} \quad \frac{d^2x}{dz^2} \Big|_{z=L} = 0. \quad (2.11)$$

Diese lineare Differentialgleichung 3. Ordnung läßt sich durch Addition einer speziellen und der homogenen Lösung unter Berücksichtigung der Randbedingungen analytisch lösen [51]. Das Ergebnis bei $F_z > 0$ sieht mit $k = \sqrt{\frac{F_z}{EI}}$ folgendermaßen aus:

$$x(z) = \frac{F_x}{F_z k} \left[\frac{\sinh kL}{\cosh kL} (\cosh kz - 1) - \sinh kz + kz \right], \quad (2.12)$$

und bei $F_z < 0$ mit $k = \sqrt{-\frac{F_z}{EI}}$:

$$x(z) = \frac{F_x}{F_z k} \left[\frac{\sin kL}{\cos kL} (\cos kz - 1) - \sin kz + kz \right]. \quad (2.13)$$

Für $kL = \frac{\pi}{2}$ wird diese Lösung singular ($x(z) \rightarrow \infty$), es gibt keine kleine Auslenkung. Physikalisch stellt diese Lösung den Knickfall dar, für die Knickkraft F_z^{knicken} ergibt sich:

$$-F_z^{\text{knicken}} = \frac{\pi^2}{4L^2} EI. \quad (2.14)$$

Die Taylorentwicklung der Lösungen in k^2 ergibt für kleine Auslenkungen die allgemeine Biegeformel:

$$x(z) = \frac{F_x}{EI} \left[\frac{Lz^2}{2} - \frac{z^3}{6} \right] + \frac{F_x F_z}{EI EI} \cdot \dots + \dots \quad (2.15)$$

wobei also in der untersten Näherung die F_z -Kraft nicht eingeht. Verschiebungen in Längs- und Querrichtung sind in der linearen Näherung unabhängig voneinander. Daher läßt sich hier eine Kontraktion bzw. Dilatation in Längsrichtung (z-Richtung) folgendermaßen einführen: Wie von Landau und Lifschitz abgeleitet, kann man die Längenänderung ΔL wie beim „Hookeschen Gesetz“ beschreiben. Mit der „Federkonstante“ $D = \frac{Ea}{L}$, wobei a die Querschnittsfläche des Balkens ist, ergibt sich:

$$\Delta L = \Delta z = \frac{1}{D} F_z = \frac{L}{Ea} F_z. \quad (2.16)$$

Insgesamt ergibt sich aus den Gleichungen 2.15 und 2.16 für die Auslenkung des Balkenendes ($z = L$):

$$\Delta x = \frac{1}{3} \frac{L^3}{EI} F_x \quad \text{und} \quad \Delta z = \frac{L}{Ea} F_z \quad (2.17)$$

Nennen wir den Anteil der Biegung A, den Anteil der Dehnung B:

$$A = \frac{1}{3} \frac{L^3}{EI} \quad \text{und} \quad B = \frac{L}{Ea}, \quad (2.18)$$

dann gilt:

$$\begin{pmatrix} \Delta x \\ \Delta z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A & 0 \\ 0 & B \end{pmatrix} \begin{pmatrix} F_x \\ F_z \end{pmatrix}. \quad (2.19)$$

Die Auslenkungen Δx und Δz sind also proportional zur angelegten Kraft (F_x bzw. F_z). Man kann Letztere daher als Federkräfte ansehen. Mit den Federkonstanten $D_x = \frac{3EI}{L^3} = A^{-1}$ für die Biegung und $D_z = \frac{Ea}{L} = B^{-1}$ für die Dehnung ergibt sich für die in Biegung bzw. Dehnung gespeicherte Energie:

$$E_{\text{energie}}^{\text{Biegung}} = \frac{1}{2} D_x (\Delta x)^2 = \frac{1}{2 D_x} F_x^2 \quad (2.20)$$

$$E_{\text{energie}}^{\text{Dehnung}} = \frac{1}{2} D_z (\Delta z)^2 = \frac{1}{2 D_z} F_z^2 \quad (2.21)$$

Nach diesen grundlegenden Betrachtungen für einen einzelnen Balken kommen wir nun zum Modell des zweiköpfigen Myosin-V, bei dem jeder der Arme als Balken behandelt wird. Abb. 2.5 zeigt schematisch die Vorstellung und erklärt die benötigten Parameter.

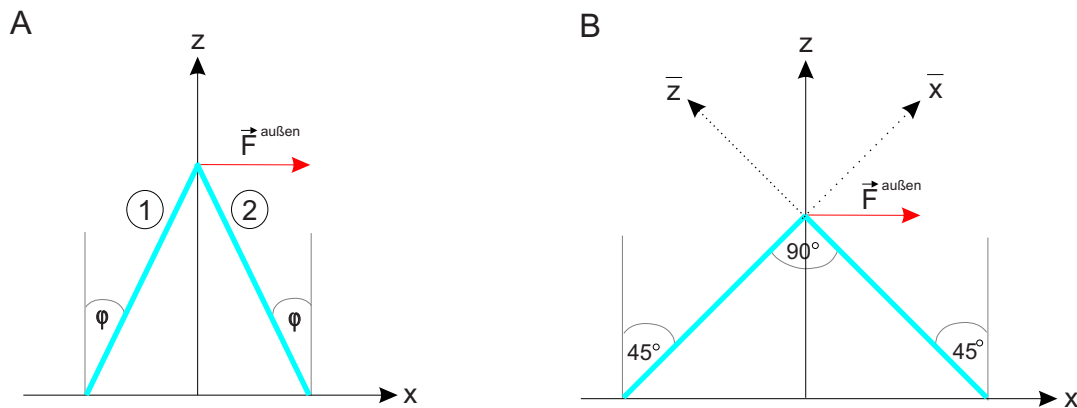


Abbildung 2.5: Modell für das zweiköpfige Myosin-V aus zwei Balken. (A) Schematische Darstellung des allgemeinen Falls zur Definition der Parameter. (B) Schematische Darstellung des Spezialfalls, bei dem der Winkel zwischen den beiden Balken gerade 90° beträgt.

Wir nehmen an, dass die Arme unten beide in einem festen Winkel eingespannt sind und oben zusammentreffen. Um jeden der Arme einzeln als biegenden Balken wie oben beschrieben zu behandeln, müssen wir die Koordinatensysteme jeweils anpassen, das passiert durch Drehung um φ bzw. $-\varphi$.

Für Balken 1 ergibt sich mit einer Drehung um φ :

$$\begin{pmatrix} \Delta x_1 \\ \Delta z_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos \varphi & \sin \varphi \\ -\sin \varphi & \cos \varphi \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \Delta \bar{x}_1 \\ \Delta \bar{z}_1 \end{pmatrix}. \quad (2.22)$$

Nennen wir diese Drehmatrix D_φ , dann ergibt sich mit Gleichung 2.19:

$$\begin{pmatrix} \Delta x_1 \\ \Delta z_1 \end{pmatrix} = D_\varphi \begin{pmatrix} A & 0 \\ 0 & B \end{pmatrix} \begin{pmatrix} F_{\bar{x}_1} \\ F_{\bar{z}_1} \end{pmatrix} = D_\varphi \begin{pmatrix} A & 0 \\ 0 & B \end{pmatrix} D_\varphi^{-1} \begin{pmatrix} F_{x_1} \\ F_{z_1} \end{pmatrix}. \quad (2.23)$$

Für Balken 2 ergibt sich mit einer Drehung um $-\varphi$:

$$\begin{pmatrix} \Delta x_2 \\ \Delta z_2 \end{pmatrix} = D_{-\varphi} \begin{pmatrix} A & 0 \\ 0 & B \end{pmatrix} D_{-\varphi}^{-1} \begin{pmatrix} F_{x_2} \\ F_{z_2} \end{pmatrix}. \quad (2.24)$$

wobei $D_{-\varphi} = D_\varphi^{-1}$ gilt.

Die Verbindung der beiden Stäbe führt zu folgenden Randbedingungen:

$$\begin{pmatrix} \Delta x_1 \\ \Delta z_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \Delta x_2 \\ \Delta z_2 \end{pmatrix}. \quad (2.25)$$

Das Kräftegleichgewicht führt zu:

$$\begin{pmatrix} F_{x_1} \\ F_{z_1} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} F_{x_2} \\ F_{z_2} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} F_x^{au\beta en} \\ 0 \end{pmatrix}. \quad (2.26)$$

Es ergeben sich also vier Gleichungen mit vier Unbekannten. Dieses Gleichungssystem ist lösbar, aber doch etwas unübersichtlich. Recht einfach zu berechnen ist der Spezialfall bei $\varphi = 45^\circ$, der den Winkelverhältnissen, die bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Myosin-V, das mit beiden Armen an Aktin gebunden ist, sehr nahe kommt [9]. Abb. 2.5B zeigt diesen Spezialfall und erklärt die verwendeten Parameter.

Im gequerten System gilt dann:

$$\Delta \bar{x} = BF_{1\bar{x}} = AF_{2\bar{x}} \quad \text{und} \quad \Delta \bar{z} = BF_{2\bar{z}} = AF_{1\bar{z}} \quad (2.27)$$

$$\vec{F}^{au\beta en} = \frac{1}{\sqrt{2}}(F^{au\beta en}, -F^{au\beta en}) = \frac{1}{\sqrt{2}}F^{au\beta en}(1, -1). \quad (2.28)$$

Das Kräftegleichgewicht ergibt:

$$F_{1\bar{x}} + F_{2\bar{x}} - F_{\bar{x}}^{au\beta en} = 0 \quad \text{und} \quad F_{1\bar{z}} + F_{2\bar{z}} - F_{\bar{z}}^{au\beta en} = 0 \quad (2.29)$$

Damit kann man $F_{2\bar{x}}$ und $F_{1\bar{z}}$ in den Gleichungen 2.27 folgendermaßen ersetzen:

$$\Delta\bar{x} = BF_{1\bar{x}} = A(-F_{1\bar{x}} + \frac{1}{\sqrt{2}}F^{au\beta en}) \quad (2.30)$$

$$\Delta\bar{z} = BF_{2\bar{z}} = A(-F_{2\bar{z}} - \frac{1}{\sqrt{2}}F^{au\beta en}) \quad (2.31)$$

Führen wir nun den Parameter α ein:

$$\alpha = \frac{B}{A} = \frac{L}{Ea} / \frac{\frac{1}{3}L^3}{EI} \quad (2.32)$$

dann ergibt sich für die Gleichungen 2.30 bzw. 2.31:

$$AF_{1\bar{x}}(1 + \alpha) = \frac{A}{\sqrt{2}}F^{au\beta en}, \quad (2.33)$$

$$AF_{2\bar{z}}(1 + \alpha) = -\frac{A}{\sqrt{2}}F^{au\beta en}. \quad (2.34)$$

in die Gleichungen 2.27 eingesetzt, ergibt das:

$$\Delta\bar{x} = \frac{\alpha}{1 + \alpha}A\frac{F^{au\beta en}}{\sqrt{2}} \quad \text{und} \quad \Delta\bar{z} = -\frac{\alpha}{1 + \alpha}A\frac{F^{au\beta en}}{\sqrt{2}}. \quad (2.35)$$

Um die Einflüsse im x-y-System zu bekommen, muss man nun nur noch in dieses Koordinatensystem umrechnen:

$$\begin{pmatrix} \Delta x \\ \Delta z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{1}{2}\sqrt{2} & -\frac{1}{2}\sqrt{2} \\ \frac{1}{2}\sqrt{2} & \frac{1}{2}\sqrt{2} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \Delta\bar{x} \\ \Delta\bar{z} \end{pmatrix}. \quad (2.36)$$

Für die Auslenkung Δx und Δz zweier unter 90° verbundener Balken ergibt sich schließlich:

$$\Delta x = \frac{\alpha}{1 + \alpha}AF^{au\beta en} \quad \text{und} \quad \Delta z = 0 \quad (2.37)$$

Die Auslenkung in x-Richtung eines einzelnen Balkens ergab sich zu $\Delta x_{\text{einzel}} = AF^{au\beta en}$ (Gleichung 2.19). Die Auslenkung in x-Richtung beim Doppelpfeiler (Gleichung 2.37) unterscheidet sich davon also um den Term $\frac{\alpha}{1+\alpha}$.

Der Parameter α war gerade das Verhältnis B/A also des elastischen Anteils zum Biegeanteil (Gleichung 2.32). Ohne elastische Dehnung bleibt das System also starr, bis die Kräfte zum Knicken des Balkens führen. Mit elastischer Dehnung ergibt sich eine kleine Verbiegung, unterdrückt durch das Verhältnis $\frac{\alpha}{1+\alpha}$.

Wie sieht das nun bei den Verhältnissen von Myosin-V quantitativ aus? Untersuchen wir zunächst, ob wir uns bei den typischer Weise angelegten Kräften ≤ 1.7 pN (Kapitel 5) schon im Knickfall befinden. Die Knickkraft (Gleichung 2.14) ergab sich zu:

$$\frac{F_x}{\sqrt{2}} = \frac{\pi^2}{4L^2} EI. \quad (2.38)$$

Aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Myosin-V ist $L \sim 25$ nm bekannt [9]. EI kann mit ~ 1500 pN nm² abgeschätzt werden [47]. Setzt man diese Werte in Gleichung 2.38 ein, so ergibt sich für die Knickkraft $F_x \sim 8$ pN. Das ist im Vergleich zu den typischer Weise angelegten Kräften von ≤ 1.7 pN ein großer Wert. Selbst wenn EI um den Faktor vier kleiner wäre, was sehr unwahrscheinlich ist, wären die angelegten Kräfte noch nicht in der Lage, die Arme des Myosin-V zum Knicken zu bringen. Sind wir aber nicht im Knickfall, dann werden die „ α -Effekte“ wichtig für die Verformung. Schätzen wir daher α ab.

α war durch Gleichung 2.32 definiert als:

$$\alpha = \frac{B}{A} = \frac{L}{Ea} / \frac{\frac{1}{3}L^3}{EI} = \frac{3I}{aL^2} \quad (2.39)$$

Nimmt man das Bild mit dem Balken sehr wörtlich, dann ergibt sich mit einem quadratischen Querschnitt mit der Seitenlänge d für I :

$$I = 2d \int_0^{d/2} x^2 dx = 2d \frac{1}{3} \frac{d^3}{2} = \frac{d^4}{12}. \quad (2.40)$$

Mit $a = d^2$ ergibt sich dann für α :

$$\alpha = \frac{d^2}{4L^2}. \quad (2.41)$$

Nehmen wir an, die Dicke der Arme des Myosin-V betrage ~ 5 nm, dann ergibt sich mit $L = 25$ nm:

$$\alpha = \frac{d^2}{4L^2} \sim \frac{1}{100}. \quad (2.42)$$

Die Dicke von 5 nm ist recht groß gewählt, wenn diese kleiner ist, wird auch α noch kleiner.

Die Auslenkung des einzelnen Balkens (Gleichung 2.19) unterschied sich von der Auslenkung des Doppelbalkens (Gleichung 2.37) gerade um den Term $\frac{\alpha}{1+\alpha}$. Obige Abschätzung für α zeigt also, dass die Auslenkungen durch externe Kräfte beim doppelköpfigen Myosin-V durchaus 100 mal kleiner sein können als die Auslenkungen beim einköpfigen Myosin-V. Natürlich ist der Leverarm nicht wirklich ein Balken, daher wäre es interessant, auch mit Methoden der Molekülphysik die elastische Dehnung bzw. Kontraktion abzuschätzen.

Die Auslenkung des einköpfigen Myosin-V bei extern angelegten Kräften lässt sich mit Gleichung 2.19 abschätzen:

$$\Delta x = \frac{1}{3} \frac{L^3}{EI} F_x^{\text{außen}}. \quad (2.43)$$

Für eine externe Kraft von z. B. 1 pN, ergibt sich damit ($L=25$ nm, $EI=1500$ pN nm²) eine Auslenkung des einköpfigen Myosin-V von ~ 3.5 nm. Die Auslenkung des doppelköpfigen Myosin-V fällt nach obiger Abschätzung etwa 100 mal kleiner aus.

Insgesamt lässt sich aus diesen Abschätzungen schließen, dass der doppelköpfige Motor, während er mit beiden Armen am Aktin gebunden ist, viel robuster als der einzelköpfige gegenüber äußeren Kräften reagiert, also kaum ausgelenkt wird.

Bisher hatten wir den Fall betrachtet, bei dem der Motor unter festen Winkeln am Aktin angreift. Dieses Modell kann man ausbauen, indem man drehbare Auflager gestattet und Drehmomente M einführt, durch die das System in Positionen gehalten wird, die von den „Ruhewinkeln“ φ abweichen dürfen und vom Winkel $\Delta\varphi$ abhängen. Im Prinzip können diese Drehmomente mit der Zeit variieren („power-stroke“). Betrachten wir jedoch zunächst den statischen Fall mit konstantem M_0 .

Starten wir die Betrachtung wieder mit einem einzelnen Balken (Abb. 2.6A). Im Gleichgewicht gilt:

$$M_0 = -F_x L, \quad (2.44)$$

damit ist F_x vorgegeben.

Wie oben (Gleichung 2.11) gilt die Randbedingung $\frac{dx}{dz}|_{z=0} = 0$ für die gewählte Gleichgewichtslage, bei der man im Grunde um einen beliebigen Winkel drehen kann.

Es ergibt sich die gleiche Lösung wie beim starr eingespannten Fall (Gleichung 2.15), auch wenn man Kontraktion bzw. Dilatation berücksichtigt. Mit Gleichung 2.44 ergibt sich:

$$\bar{x}(z) = \frac{F_x}{EI} \left[\frac{L\bar{z}^2}{2} - \frac{\bar{z}^3}{6} \right] = -\frac{M_0}{LEI} \left[\frac{L\bar{z}^2}{2} - \frac{\bar{z}^3}{6} \right] \quad (2.45)$$

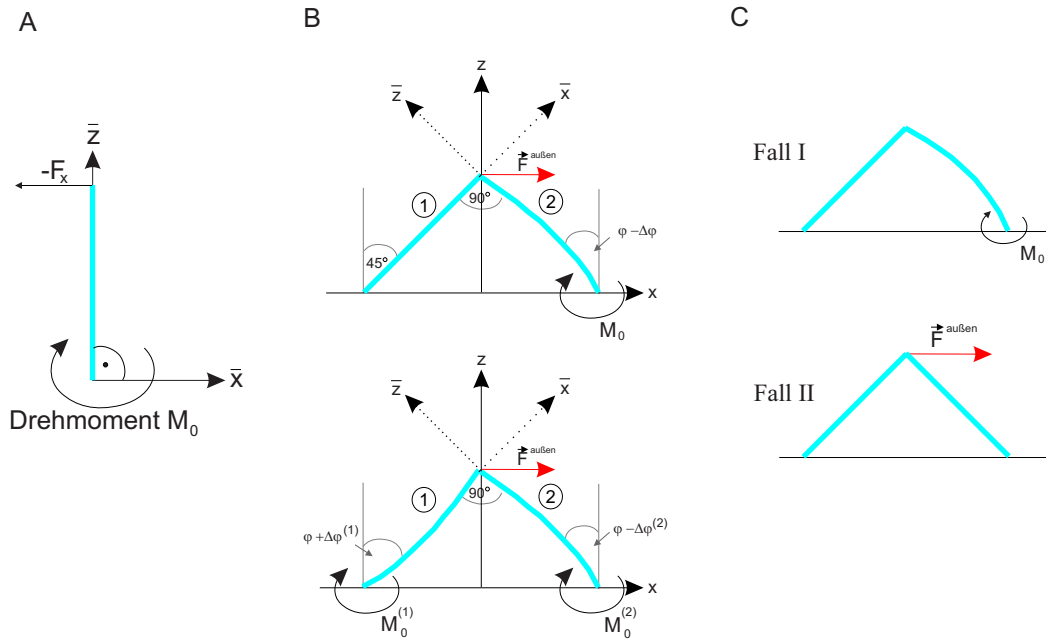


Abbildung 2.6: (A) Schematische Darstellung eines Balkens, an den ein Drehmoment angreift. (B) Mechanisches Modell des doppelköpfigen Myosin-V unter Einbeziehung drehbar gelagerter Arme. (C) Veranschaulichung zur Superponierung: Fall I ohne äußere Kraft aber mit Drehmoment und Fall II ohne „Vorspannung“ aber mit äußerer Kraft.

Kommen wir nun zum Modell des zweiköpfigen Myosin-V. Nehmen wir zunächst an, nur Balken 2 sei drehbar gelagert, Balken 1 dagegen fest eingespannt (Abb. 2.6B oben). Betrachten wir wieder nur kleine Auslenkungen (lineare Effekte), dann lässt sich dieser Fall aus einem Fall I ohne äußere Kraft aber mit „Vorspannung“ M_0 und einem Fall II ohne Drehmoment aber mit äußerer Kraft $\vec{F}^{au\beta en}$ superponieren (Abb. 2.6C). Die Rechnungen des fest eingespannten Zweibeins im Spezialfall $\varphi = 45^\circ$ (Gleichungen 2.27 ff) können wir übernehmen, wenn wir dabei $F_{2\bar{x}} = -\frac{M_0}{L}$ einsetzen und die drehbare Lagerung von Balken 2 mit dem Term $L\Delta\varphi$ berücksichtigen:

$$\Delta\bar{x} = BF_{1\bar{x}} = A \left(-\frac{M_0}{L} \right) + L\Delta\varphi \quad (2.46)$$

$$\Delta\bar{z} = BF_{2\bar{z}} = AF_{1\bar{z}} \quad (2.47)$$

$$F_{1\bar{x}} + \left(\frac{M_0}{L} \right) - F_{\bar{x}}^{au\beta en} = 0 \quad \text{und} \quad F_{1\bar{z}} + F_{2\bar{z}} - F_{\bar{z}}^{au\beta en} = 0. \quad (2.48)$$

Analog zum starr eingespannten Fall ergibt sich für die Auslenkungen im System mit einem drehbar gelagerten Arm:

$$\Delta\bar{x} = \alpha A \left(\frac{M_0}{L} + \frac{F_x^{au\beta en}}{\sqrt{2}} \right) \quad (2.49)$$

$$\Delta \bar{z} = -\frac{\alpha A}{1 + \alpha} \left(\frac{F_x^{\text{außen}}}{\sqrt{2}} \right) \quad (2.50)$$

$$\Delta \varphi = \frac{A}{L} \left(\frac{M_0}{L} (1 + \alpha) + \alpha \frac{F_x^{\text{außen}}}{\sqrt{2}} \right). \quad (2.51)$$

Dies sind die Lösungen im gequerten System, über die Drehmatrix könnte man leicht auch ins x-z-Koordinatensystem umrechnen.

Die Vorspannung durch M_0 erzeugt also eine Ausbiegung von Balken 2 um $\Delta \varphi$ und eine Verschiebung $\Delta \bar{x}_{M_0} = \alpha A \frac{M_0}{L}$ zusätzlich zu den Verschiebungen sehr ähnlich wie im Fall zuvor, auch in diesem Fall sind die Lösungen mit dem Faktor α unterdrückt, die Auslenkungen daher klein.

Ganz analog lässt sich auch der Fall für zwei drehbar gelagerte Balken behandeln, an die jeweils Drehmomente $M_0^{(1)}$ und $M_0^{(2)}$ angreifen (Abb. 2.6B unten). Dabei ersetzt man in den Gleichungen 2.27 ff.:

$$F_{2\bar{x}} = \left(-\frac{M_0^{(2)}}{L} \right) \quad \text{und} \quad F_{1\bar{z}} = \left(-\frac{M_0^{(1)}}{L} \right) \quad (2.52)$$

und berücksichtigt nun zwei drehbare Auflagerungen jeweils durch die Terme $L\Delta\varphi^{(2)}$ und $-L\Delta\varphi^{(1)}$:

$$\Delta \bar{x} = BF_{1\bar{x}} = A \left(-\frac{M_0^{(2)}}{L} \right) + L\Delta\varphi^{(2)} \quad (2.53)$$

$$\Delta \bar{z} = BF_{2\bar{x}z} = A \left(-\frac{M_0^{(1)}}{L} \right) - L\Delta\varphi^{(1)} \quad (2.54)$$

$$F_{1\bar{x}} + \left(\frac{M_0^{(2)}}{L} \right) - F_{\bar{x}}^{\text{außen}} = 0 \quad \text{und} \quad F_{2\bar{z}} + \left(\frac{M_0^{(1)}}{L} \right) - F_{\bar{z}}^{\text{außen}} = 0. \quad (2.55)$$

Mit analoger Rechnung wie oben ergibt sich für die Auslenkungen (im gequerten System):

$$\Delta \bar{x} = \alpha A \left(\frac{M_0^{(2)}}{L} + \frac{F_x^{\text{außen}}}{\sqrt{2}} \right) \quad (2.56)$$

$$\Delta \bar{z} = \alpha A \left(-\frac{M_0^{(1)}}{L} - \frac{F_x^{\text{außen}}}{\sqrt{2}} \right) \quad (2.57)$$

$$\Delta\varphi^{(1)} = \frac{A}{L} \left((1 + \alpha) \frac{M_0^{(1)}}{L} + \frac{\alpha F_x^{\text{au\ss en}}}{\sqrt{2}} \right) \quad (2.58)$$

$$\Delta\varphi^{(2)} = \frac{A}{L} \left((1 + \alpha) \frac{M_0^{(2)}}{L} + \frac{\alpha F_x^{\text{au\ss en}}}{\sqrt{2}} \right) \quad (2.59)$$

Es ergeben sich, wie in den anderen Fällen zuvor, auch hier Verschiebungen unterdrückt mit dem kleinen Faktor α (nach dem groben Beispiel oben $\alpha \sim 1/100$), die Auslenkung des Motors bleibt auch in diesem Fall klein.

In allen drei behandelten Fällen, ob mit oder ohne „Vorspannung“, reagierte das Zweibein also sehr robust gegen äußere Kräfte. Diese linearen Näherungen sollten dabei auch für vergleichsweise große Winkelveränderungen von $\Delta\varphi=10^\circ$ - 20° gute Resultate ergeben, da sich abschätzen lässt, dass damit relativ kleine Ausbiegungen der einzelnen Balken verbunden sind (z. B. $20^\circ \rightarrow \frac{20}{360}2\pi \sim \frac{1}{3}$; berücksichtigt man außerdem, dass der unten ausgebogene Balken oben wieder zurückgebogen sein muss grob mit einem Faktor $\frac{1}{2}$, dann ergibt sich für die Auslenkung eines Balkens des Doppelbeins $\sim \frac{L=25nm}{2 \cdot 3} \sim 4$ nm).

Bisher haben wir also lineare Näherungen betrachtet, so z. B. die Gleichungen 2.27 für den Fall der zwei fest eingespannten Balken, die oben unter 90° zusammentreffen:

$$\Delta\bar{x} = BF_{1\bar{x}} = AF_{2\bar{x}} \quad \text{und} \quad \Delta\bar{z} = BF_{2\bar{z}} = AF_{1\bar{z}} \quad (2.60)$$

Für sehr kleine B , wenn also die Kompression gegenüber der Biegung sehr klein ist, könnten höhere Ordnungen wichtig werden. Insbesondere muss man die Verkürzung in z -Richtung durch Biegung berücksichtigen.

Mit der Länge

$$L = \int_0^L ds = \int_0^{L-\Delta L} d\bar{z} \left(1 + \left(\frac{dx}{d\bar{z}} \right)^2 \right)^{1/2} \sim L - \Delta L + \frac{1}{2} \int_0^L d\bar{z} \left(\frac{dx}{d\bar{z}} \right)^2 \quad (2.61)$$

ergibt sich für die Längenänderung

$$\Delta L = -\frac{1}{1} \int_0^L d\bar{z} \left(\frac{dx}{d\bar{z}} \right)^2 \quad (2.62)$$

Verwenden wir Gleichung 2.15, dann ergibt sich für die Verschiebung in z -Richtung:

$$\Delta z_{\text{Biegung}} = \Delta L = -\frac{F_x^2 L^5}{15(EI)^2} = -CF_x^2 \quad (2.63)$$

falls $C = \frac{L^5}{15(ET)^2}$.

Damit ändern sich die Gleichungen 2.60 im gequerten System (vergleiche Abb. 2.6) zu:

$$\Delta \bar{x} = BF_{1\bar{x}} - CF_{1\bar{z}}^2 = AF_{2\bar{x}} \quad (2.64)$$

$$\Delta \bar{z} = BF_{2\bar{z}} - CF_{2\bar{x}}^2 = AF_{1\bar{z}} \quad (2.65)$$

Für $B = 0$ ergibt sich:

$$-CF_{1\bar{z}}^2 = AF_{2\bar{x}} \quad \text{und} \quad -CF_{2\bar{x}}^2 = AF_{1\bar{z}}. \quad (2.66)$$

Für $F_{2\bar{x}} \neq 0$ erhält man daraus $F_{2\bar{x}} = F_{1\bar{z}} = -\frac{A}{C}$. Dieser Wert kann in der Tat sehr groß werden. Allerdings gibt es auch die Lösung $F_{2\bar{x}} = F_{1\bar{z}} = 0$, d. h. keine Querkräfte, das System bleibt starr. Dies ist die energetisch sinnvollere und damit stabile Lösung. Die lineare Näherung sollte daher auch für sehr kleine B (für größere B überwiegt ohnehin der lineare Term) gute Ergebnisse produzieren. Auch rein anschaulich ist es schwer vorstellbar, dass ein stabiles mechanisches System sehr große Verbiegungen zeigt.

In allen betrachteten Fällen ergab sich, dass die Auslenkungen des doppelköpfigen Myosin-V gegenüber dem einköpfigen Myosin-V mit dem Faktor α unterdrückt, also sehr klein sind. Aus diesen Betrachtungen können wir schließen, dass Ratenkonstanten für Vorgänge im chemomechanischen Zyklus des doppelköpfigen Myosin-V, die passieren während beide Köpfe gebunden sind, fast kraftunabhängig sind, falls diese allein thermodynamisch geregelt werden.

Der Übersichtlichkeit halber wurde hier mit Winkeln von 45° gerechnet, aber die Ergebnisse sollten auch allgemein gültig sein, wovon man sich durch numerische Auswertung oder Taylorentwicklung um 45° der allgemeinen Gleichungen überzeugen könnte.

Für diese mechanischen Betrachtungen des Systems wäre es sehr interessant, die Dehnungseigenschaften (also den Parameter B) des Motors zu kennen. Diese könnte man wahrscheinlich mittels Kraftspektroskopie experimentell ermitteln.

Neben thermisch bedingten chemischen Kräften oder Drehmomenten („powerstroke“) könnten auch rein mechanische Kräfte, die also auch bei $T = 0$ wirken, zum Mechanismus des Weiterreichens des „power-stroke“ beitragen. So könnte der Arm des Myosin-V z. B. bei Zug durch eine „Bruchkraft“ abreißen und auch die Bewegung der Arme nach dem Abreißen einer Verbindung sollte rein mechanisch zu beschreiben sein (Abb. 2.7). Dafür sprechen auch die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Rückwärtsschritte (Kapitel 5), zu denen der Motor unter hohen externen Rückwärtskräften sehr wahrscheinlich ohne Einbezug des chemischen Zyklus fähig ist.

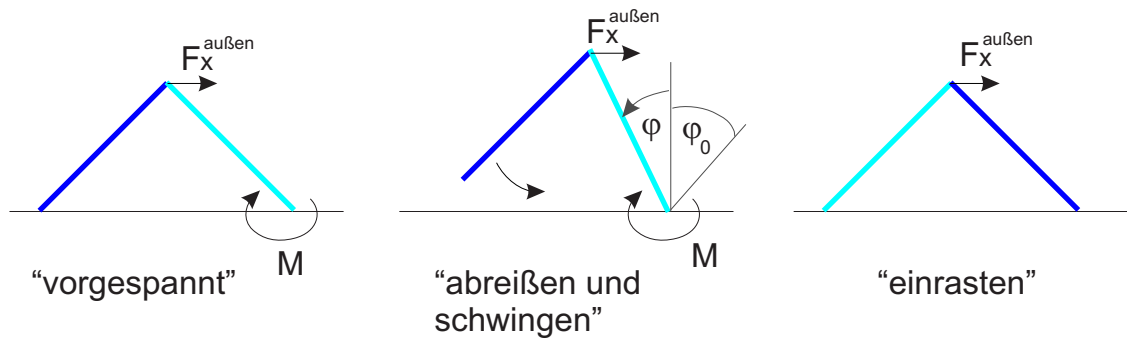


Abbildung 2.7: Veranschaulichung zur mechanischen Beschreibung der Schritte des Myosin-V

In einem mechanischen Modell, bei dem das Drehmoment M und die externe Kraft $F_x^{\text{außen}}$ für ein Vorschwingen des freien Balkens sorgen, das durch Reibungskräfte gedämpft wird, kann man die Zeit t für dieses Vorschwingen des freien Balkens, bzw. das Umklappen des festen Balkens, abschätzen.

Die Differentialgleichung dieses Problems wird eine Gleichung für zwei Winkel (pro Balken einer) mit Trägheitsmomenten und Drehmomenten sein. Für eine erste Betrachtung kann man diesen etwas komplizierten Fall, der nach Schreiben der Bewegungsgleichungen numerisch diskutiert werden könnte, vereinfachen, indem man nur die Abhängigkeit eines Winkels φ betrachtet (Abb. 2.7).

Die Bewegungsgleichung kann man dann folgendermaßen schreiben:

$$\theta \ddot{\varphi} + \gamma \int_{-\infty}^t d\tau \dot{\varphi}(\tau) f(t - \tau) = M + F_x^{\text{außen}} L + F(\varphi) \quad (2.67)$$

wobei θ das Trägheitsmoment ist und der „ γ -Term“ eine Reibung mit „Erinnerung“ („Kausalität“) berücksichtigt, deren Fouriertransformierte zur einer Funktion führt, die die Kramers-Kronig kausale Relation erfüllt. Weiterhin wird die stochastische Kraft $F(\varphi)$ („weißes Temperaturrauschen“) einbezogen, die schon in Kapitel 1.1.2 Gleichung 1.4 vorgestellt wurde.

Bei einer elastischen Feder mit der Ruhestellung $-\varphi_0$ können wir das Drehmoment schreiben als $M = -D_M(\varphi + \varphi_0)$ und $F_x^{\text{außen}} L$ lässt sich in eine Verschiebung von $\varphi_0 \rightarrow \bar{\varphi}_0$ umrechnen. Nach Fourier-Transformation könnte man die Lösungen nun allgemein berechnen. Für eine erste, grobe Abschätzung der Zeitskala bietet es sich aber an, wie z. B. auch bei den Betrachtungen zur Mechanik von Motorproteinen im Lehrbuch von Jonathan Howard [52], die Vorgeschichte der Reibung zu vernachlässigen. γ kann man, wie in [52] angegeben, mit $\gamma \sim \eta L^3$ abzuschätzen, wobei η die Viskosität des umgebenden Mediums ist. Bei der Betrachtung der Zeitskala interessiert uns hauptsächlich der Einschwingvorgang, der durch die homogene Lösung der Differentialgleichung beschrieben wird. Diese ist nun aber gerade die bekannte Lösung des harmonischen Oszillators $\varphi + \bar{\varphi}_0 = Ae^{-\xi t}$ mit:

$$\xi_{1/2} = \frac{\gamma}{2\theta} \pm \left(\left(\frac{\gamma}{2\theta} \right)^2 - \frac{D_M}{\theta} \right)^{1/2}. \quad (2.68)$$

In unserem Fall des Myosin-V in wässriger Lösung ist das System stark gedämpft, da $\sqrt{\frac{D_M}{\theta}} \ll \frac{\gamma}{2\theta}$, wovon man sich durch Einsetzen der Werte, die wie folgt berechnet werden können, überzeugen kann:

Beginnen wir mit der Berechnung von D_M . Aus Gleichung 2.51 ergibt sich, wenn wir den Term der externen Kraft nicht betrachten:

$$\Delta\varphi = \frac{1}{L} \left(\frac{M_0}{L} A(1 + \alpha) \right) \quad (2.69)$$

Für das Drehmoment ergibt sich mit einer abgeschätzten Wirkung des „power-strokes“ von $\Delta\varphi \sim 10^\circ \sim \frac{10}{360} 2\pi \sim \frac{1}{6}$:

$$M_0 \sim \frac{\frac{1}{6} L^2}{\frac{1}{3} \frac{L^3}{EI}} = \frac{1}{2} \frac{EI}{L} \quad (2.70)$$

Mit $\varphi + \varphi_0 \sim 90^\circ \sim \frac{\pi}{2}$ ist

$$D_M \sim M_0 \frac{2}{\pi} \sim \frac{EI}{\pi L}, \quad (2.71)$$

wobei wir wie oben $L=25$ nm und $EI=1500$ pN nm² annehmen können. $\gamma \sim \eta L^3$ berechnen wir mit $\eta = 10^{-2} \text{gs}^{-1} \text{cm}^{-1}$, der Viskosität von Wasser bei 20°C. Das Trägheitsmoment θ kann grob mit $\theta \sim mL^2$ abgeschätzt werden, wobei m die Masse des Armes ist. Proteine haben eine Dichte von $\sim 1,3 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$. Nehmen wir an, die Arme des Myosin-V haben ein Volumen von $25 \times 5 \times 5 \text{ nm}^3$, dann ergibt sich für die Masse eines Armes $m \sim 10^{-18}$ g.

Eingesetzt ergibt sich:

$$\left(\sqrt{\frac{D_M}{\theta}} = 1,7 \cdot 10^8 / \text{s} \right) \ll \left(\frac{\gamma}{2\theta} = 1,2 \cdot 10^{10} / \text{s} \right) \quad (2.72)$$

Für ein stark gedämpftes System erhalten wir die für den Kriechfall bekannte Lösung mit $\xi = D_M/\gamma$

Die typische Zeitskala ergibt sich damit zu:

$$t_{\text{Umklappen}} \approx \xi^{-1} \approx \left(\frac{\gamma}{D_M} \right) \approx \frac{\pi \eta L^3}{EI/L} \quad (2.73)$$

Weiterhin sollte man bei diesem Problem die Biegeschwingungen diskutieren, die nach dem „power-stroke“ und Abreißen auftreten werden. Dies ist ein recht kompliziertes Problem, besonders da sich die Biegeschwingungen und die obige Bewegung des „starrten“ Systems gegenseitig beeinflussen werden. Die Eigenfrequenzen der Biegeschwingungen lassen sich nach Jonathan Howard (Gleichung 6.9 in [52]) bestimmen. Für die typische Zeitskala T ergibt sich:

$$T \propto \frac{\eta L^4}{EI} \quad (2.74)$$

Diese Zeit stimmt (in der Größenordnung) aber gerade mit der oben abgeschätzten „Umklappzeit“ überein, die man dann wohl auch mit rein dimensional Betrachtungen erhalten kann. Die Größenordnung dieser Zeiten wird damit also eine typische Zeitskala für die Bewegung darstellen.

Berechnen wir die typische Zeitskala für das Myosin-V: Schätzen wir dazu wie oben $\eta = 10^{-2} \text{gs}^{-1}\text{cm}^{-1}$ mit dem Wert von Wasser bei 20°C ab. Setzen wir wieder $L=25$ nm und nehmen wir $EI=1500$ pN nm² an, dann ergibt sich:

$$\text{typische Zeitskala der Bewegung} \sim 8 \cdot 10^{-7} \text{s} \quad (2.75)$$

Das Umklappen eines der Balken bzw. das Vorschwingen des anderen Balkens ist also trotz der starken Dämpfung wohl ein extrem schnelles Ereignis.

Das heutige Bild des chemomechanischen Zyklus wird im Rahmen der durchgeführten Experimente in Kapitel 5 diskutiert. Dennoch soll hier kurz darauf eingegangen werden, um die Aussagen der theoretischen Abschätzungen zusammenzufassen.

ADP-Loslassen mit einer typischen Zeit im Millisekunden-Bereich ist nach Experimenten von Rief et al. [14] ratenlimitierend. Kraftabhängige Messungen im Rahmen dieser Doktorarbeit zeigten, dass ADP-Loslösen beim doppelköpfigen Myosin-V im Gegensatz zu Messungen an einköpfigem Muskelmyosin [53] nur sehr schwach kraftabhängig ist. Obige mechanische Abschätzungen erklären dies, wenn man davon ausgeht, dass das doppelköpfige Myosin-V in dieser Zeit mit beiden Armen am Aktin gebunden ist. Gehen wir wie in unseren theoretischen Abschätzungen davon aus, dass die ATP-Hydrolyse im vorderen Kopf zu einem Drehmoment führt, dann ist der „Doppelbalken“ Myosin-V vorgespannt. Nachdem ADP vom hinteren Kopf loslöst, kann ATP an diesen binden. Der Kopf reißt ab und schwingt rein mechanisch im Bereich von Mikrosekunden nach vorne. Dieser nun vordere Kopf „sucht“ diffusiv seine Bindungtasche am Aktin. Die in dieser Dissertation durchgeführten, kraftabhängigen Experimente zeigten eine weitere langsame Ratekonstante im Millisekunden-Bereich, die stark kraftabhängig ist, nach unseren Überlegungen also passiert, wenn nur ein Arm gebunden ist. Diese Ratekonstante könnte das diffusive Anbinden sein. Dafür spricht auch der über Gleichung 2.1 gefundene Weg von ~ 3 nm, der gut zum Anbinden ans Aktin passt. Ob das Phosphat vor oder nach dem Anbinden ans Aktin abgegeben wird, ist noch unklar. Danach steht Myosin-V wieder mit beiden Armen auf dem Aktinfilament und der Zyklus startet von Neuem.

Kapitel 3

Experimenteller Aufbau

Die optische Pinzette und das „Total Internal Reflection Fluorescence“ (TIRF)-Mikroskop, die in dieser Dissertation konzipiert und aufgebaut wurden, werden im Folgenden vorgestellt. Dabei wird zuerst das Konzept erklärt. In den darauf folgenden Abschnitten werden die einzelnen Komponenten der optischen Falle, des TIRF-Mikroskops und der Meßkammern detailliert beschrieben.

3.1 Konzept

Abbildung 3.1 zeigt schematisch das Konzept der optischen Pinzette in Verbindung mit dem zweifarbigen TIRF-Mirkoskop.

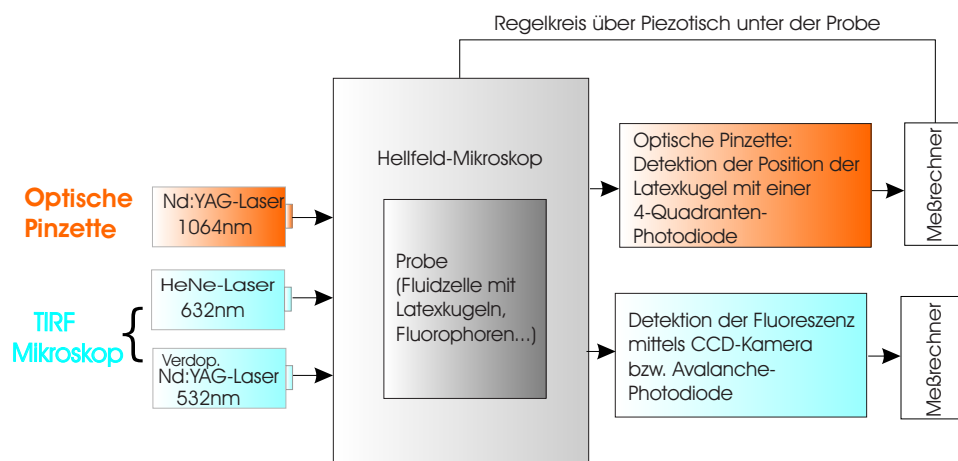


Abbildung 3.1: Konzept der optischen Pinzette mit integriertem TIRF-Mikroskop

Das „Herzstück“ des Aufbaus ist ein Hellfeldmikroskop mit einem Objektiv mit hoher numerischer Apertur. Für möglichst große Stabilität und um den neuen Kraftfeedback der optischen Pinzette über weite Strecken realisieren zu können, wurde das Mikroskop selbst aufgebaut und kein kommerziell erhältliches verwendet. Koppelt man einen Laser in geeigneter Weise in das Objektiv ein, so kann man im Fokus etwa Mikrometer große Polystyrolkugeln fangen (Kapitel 1.1.1). Als Fallenlaser wurde ein Nd:YAG-Laser (1064 nm, bis zu 8 W) verwendet, der aufgrund seiner Wellenlänge möglichst wenig von den biologischen Proben absorbiert wird. Eine hohe Leistung erlaubt es, Pinzetten mit hohen Federkonstanten oder auch mehrere Fallen gleichzeitig zu erzeugen. Die Polystyrolkugelchen befinden sich in einer Fluidzelle auf dem Probenstisch. Mittels Hellfeldmikroskopie bildet man das gefangene Kugelchen auf einen Detektor ab, der über eine Quadranten-Photodiode mit nm-Präzision die Position der Kugel bestimmt. Kennt man die Federkonstante des Systems (Kapitel 1.1.2), lassen sich neben Auslenkungsmessungen der Kugel auch definierte Kraftmessungen durchführen. Möchte man die Kugel während der Messungen unter einer konstanten Kraft halten, braucht man weiterhin einen feedback, der die Position der Kugel in Bezug zum Laserfokus regelt.

Um neben mechanischen Untersuchungen auch optische Messungen durchführen zu können, wurde in die optische Pinzette ein TIRF-Mikroskop integriert. Dazu benötigte man Anregungs-Laser, die man entsprechend den Anregungswellenlängen der gewünschten Fluorophore wählte. In diesem Aufbau wurden dazu ein frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser (532 nm, 100 mW) und ein Helium-Neon-Laser (632 nm, 10 mW) verwendet. Die Laser werden so in das Objektiv eingekoppelt, dass sie totalreflektiert werden. Fluorophore in der Probe werden dann im evaneszenten Feld angeregt (Kapitel 1.2). Das Fluoreszenzlicht wird geeignet gefiltert und mittels einer CCD-Kamera oder einer Avalanche-Photodiode detektiert.

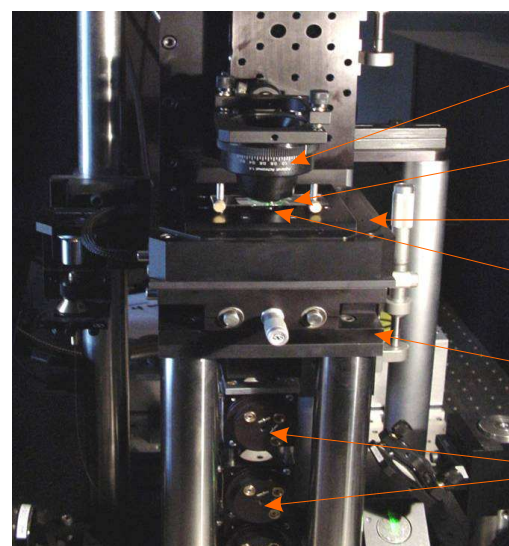
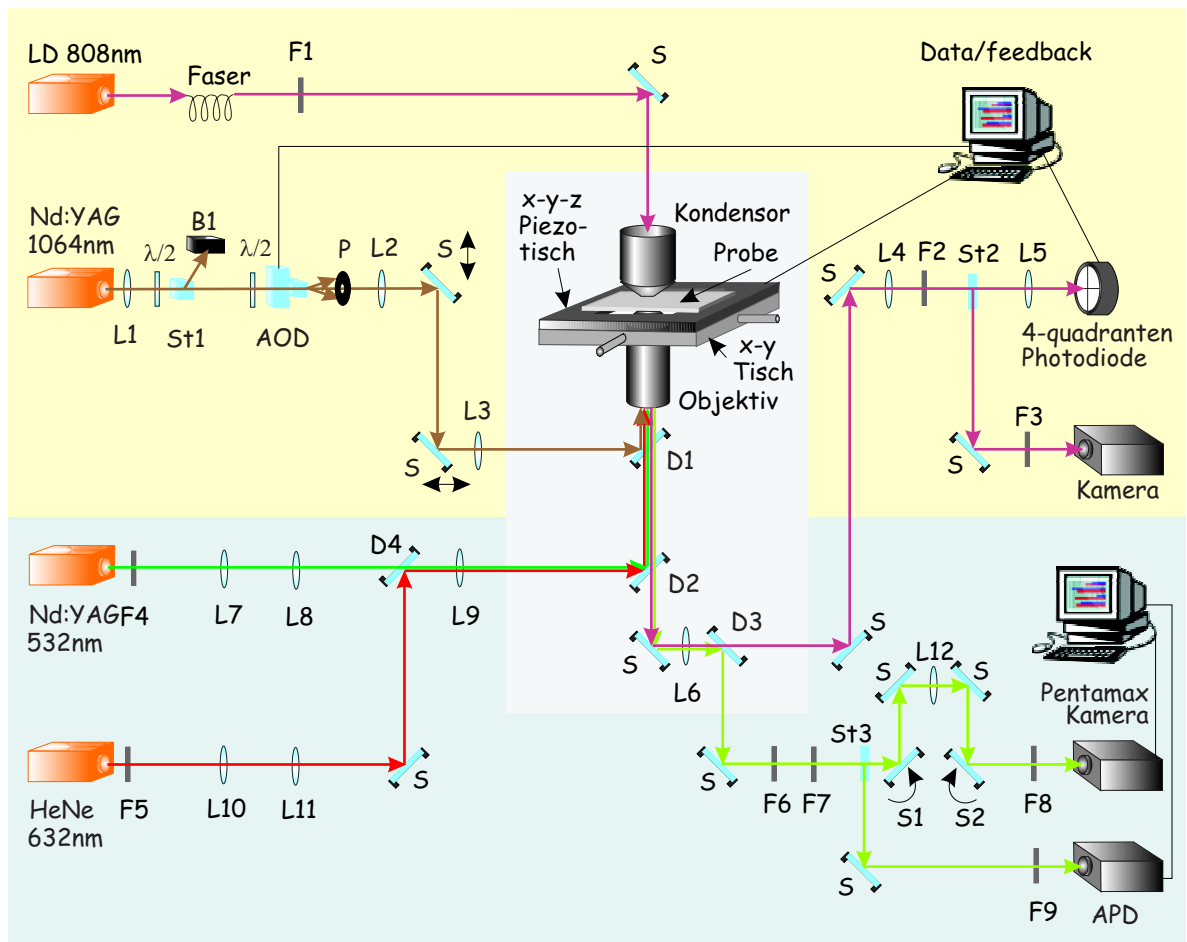
In den folgenden Abschnitten wird nun detailliert auf diesen Aufbau eingegangen.

3.2 Aufbau der mechanischen und optischen Untersuchungsmethoden

Der Versuchsaufbau der Laser-Pinzette in Verbindung mit dem TIRF-Mikroskop ist in Abbildung 3.2 schematisch dargestellt.

3.2.1 Die Laser-Pinzette

Der gesamte Aufbau ist auf einem optischen Tisch (I-2000, Newport, Deutschland) aufgebaut. Als Laserquelle der optischen Pinzette dient ein Nd:YAG-Festkörperlaser (1064 nm, 8 W, Spectra Physics, Deutschland), dessen Strahl durch eine Linse (L1) parallelisiert wird. Die Herstellerangaben der beschriebenen Optiken finden sich in Tabelle 3.1, für die Optomechanik wurden Bauteile der Firma Thorlabs und Newport verwendet.



- Kondensator
- Probe (Fluidzelle)
- Piezotisch
- Objektiv (verdeckt)
- x-y-Tisch
- Einkopplung des Laserlichts für optische Pinzette bzw. TIRF-Mikroskop

Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau der optischen Pinzette und des TIRF-Mikroskops. Das grau hinterlegte „Herzstück“ des Aufbaus, das auch im Foto gezeigt ist, ist sowohl Teil der optischen Pinzette (gelb hinterlegt) als auch des TIRF-Mikroskops (blau hinterlegt). Eine genaue Beschreibung erfolgt im Text.

L1	Plankonvexlinse, F=309 mm, No. BBAR/BBAR-D PLCX-25.4/154.5C, Laser Components
L2	Plankonvexlinse, F=154.6 mm, No. BBAR/BBAR-D PLCX-25.4/77.3C, Laser Components
L3	Plankonvexlinse, F=750 mm, No. KPX214Ar.33, Newport
L4	Plankonvexlinse, F=154.6 mm, No. BBAR/BBAR-D PLCX-25.4/77.3C, Laser Components
L5	10x Objektiv und Plankonkavlinse, F=-200 mm, No. KPXC028Ar.33, Newport
L6	Plankonvexlinse, F=515 mm, No. BBAR/BBAR-D PLCX-25.4/257.5C, Laser Components
L7	Plankonvexlinse, F=51.6 mm, No. BBAR/BBAR-C PLCX-25.4/25.8C, Laser Components
L8	Plankonvexlinse, F=515 mm, No. BBAR/BBAR-C PLCX-25.4/257.5C, Laser Components
L9	Plankonvexlinse, F=309 mm, No. BBAR/BBAR-C PLCX-25.4/154.5C, Laser Components
L10	Plankonvexlinse, F=51.6 mm, No. BBAR/BBAR-C PLCX-25.4/25.8C, Laser Components
L11	Plankonvexlinse, F=206 mm, No. BBAR/BBAR-C PLCX-25.4/103C, Laser Components
L12	Plankonvexlinse, F=154.6 mm, No. BBAR/BBAR-D PLCX-25.4/77.3C, Laser Components
S	Silberspiegel, No. 10D20ER.2, Newport; die Silberspiegel S1 und S2 sind klappbar gelagert
D1	dichroitischer Spiegel, No. 950DCSP, AHF Analysentechnik
D2	dichroitischer Spiegel (Dualband), No. F53-534, AHF Analysentechnik
D3	dichroitischer Spiegel, No. F53-770, AHF Analysentechnik
D4	Beamcombiner, No. F33-528, AHF Analysentechnik
$\lambda/2$	$\lambda/2$ -Plättchen, Quarzkristall, low order, entspiegelt für 1064, B. Halle
St1	Polarisationsstrahlteilerwürfel, Flintglas für 780-1100 nm, Kantenlänge 11 mm, B. Halle
St2	10% Strahlteiler, No. 15W850200, Laser Components
F1	Sperrfilter, Blockung 0-763 nm und 855-1195 nm, OD4, Dr. Hugo Anders
F2	Sperrfilter, No. D825/150, AHF Analysentechnik
F3	ND Filter, OD3, No. ND30B, Thorlabs
F4/F5	doppeltes Filterradd mit ND Filtern zwischen OD0.1 und OD4, Thorlabs
F6	Holographischer Filter, 532 nm, OD>6, No. HNPF-28469, Kaiser Optical Systems
F7	Holographischer Filter, 632.8 nm, OD>6, No. HNPF-34218, Kaiser Optical Systems
F8	Langpaßfilter, OD6 bei 532, No. F32-554, AHF Analysentechnik
F9	Sperrfilter, D600/80, AHF Analysentechnik
B1	Beamblocker, Thorlabs

Tabelle 3.1: Beschreibung der in Abb.3.2 aufgeführten optischen Komponenten der optischen Falle und des TIRF-Mikroskops

Nach der Linse L1 läuft das Licht weiter durch ein drehbar gelagertes $\lambda/2$ -Plättchen in Verbindung mit einem Polarisationsstrahlteiler (St1). Zu Beginn des Aufbaus hatte dies den Sinn, dort den Strahl zu teilen, um so zwei optische Pinzetten in der Probe erzeugen zu können. Mehrere Fallen konnten im Aufbau jedoch, wie unten beschrieben, auch über die akustooptischen Deflektoren (AOD) erreicht werden, was den Aufbau vereinfacht. Das drehbare $\lambda/2$ -Plättchen in Kombination mit dem Polarisationsstrahlteiler leistet aber auch zur Einstellung der gewünschten Laserintensität und damit der gewünschten Federkonstanten der optischen Pinzette gute Dienste. Ein weiteres $\lambda/2$ -Plättchen lässt den Strahl mit einer für den AOD (NEOS, ELS Elektronik Laser System GmbH, Deutschland) geeigneten Polarisation in diesen eintreten.

Akustooptische Deflektoren bestehen im Wesentlichen aus Bragg-Zellen, in denen eine Interaktion zwischen Schall und Licht stattfindet. Die Schallleistung wird dabei mittels eines Transducers eingekoppelt, wobei die notwendige Hochfrequenz auf elektronischem Wege erzeugt wird. Durch die induzierte Schallwelle bildet sich im Inneren der Bragg-Zelle eine stehende Welle und damit eine periodische Änderung des Brechungsindex aus. Ein Laserstrahl, der durch die Zelle hindurchtritt, wird wie bei einem optischen Gitter zum Teil gebeugt, so dass aus der Zelle mehrere Laserstrahlen austreten, die durch einen bestimmten Winkel separiert sind. Der Beugungswinkel hängt dabei von der Schallfrequenz ab, wodurch sich die Ablenkung des Laserstrahls genau kontrollieren lässt. Zwei in Serie geschaltete, in ihren Ablenkungsrichtungen zueinander senkrecht stehende AODs ermöglichen eine schnelle und exakte Positionierung bzw. Positionsveränderung eines Laserstrahls in beide Richtungen. Diese Technik eignet sich daher gut zum Aufbau einer optischen Pinzette. Insbesondere ermöglichen die Deflektoren durch ihre schnellen Antwortzeiten (typischerweise $2\mu\text{s}$) auch die Realisierung von Experimenten mit mehreren Fallen unter Verwendung eines einzigen Laserstrahls, indem sehr schnell zwischen verschiedenen Fallenpositionen hin- und hergeschaltet werden kann [54]. In diesem Aufbau ermöglicht ein PC mit eingebautem Signalprozessorboard (M6x, Innovative Integrations, USA) die Änderung der Fallenposition mit einer Frequenz von bis zu 450 kHz.

Hinter den AODs wählt ein Pinhole (P) die geeignete (jeweils erste) Ordnung aus. Der Strahl wird über eine Teleskopanordnung durch zwei Sammellinsen (L1, L2) so aufgeweitet, dass er die Apertur des Objektivs möglichst gut ausfüllt. Zum Objektiv (PLAPO 60x/0 IR/TIRF, n. A. 1.45, Olympus, Deutschland) gelangt der Strahl über Silberspiegel (S), die zur manuellen Manipulation der Position der Falle auf Linearverschiebetischen angebracht sind, und einen geeigneten dichroitischen Spiegel (D1). Durch das Objektiv wird der Strahl in der Probe, die auf einem Probentisch befestigt werden kann, fokussiert. Dieser Fokus bildet, wie in Kapitel 1.1 beschrieben, die eigentliche Pinzette. Der Probentisch besteht aus einem Piezotisch (P-517.3CL, Physik Instrumente GmbH, Deutschland) und einem x-y-Linearverschiebetisch (M-406, Newport, Deutschland), die übereinander auf einem stabilen Halter angebracht sind.

Mit diesem geschilderten Teil des Aufbaus kann man Teilchen fangen, „sehen“ kann man noch nichts. Die Hellfeld-Detektion sieht folgendermaßen aus: Als besonders helle Lichtquelle dient eine Laserdiode (LD 808 nm, 1 W, Heller Elektronik, Deutschland). Diese wird knapp unterhalb der Laserschwelle gefahren, um störende Laser-Speckels zu vermeiden. Für eine symmetrische Beleuchtung wird das Licht über 10x Objektive (Newport, Deutschland) in eine Multimode-Faser (F-MFD-4, Newport, Deutschland) ein- und ausgekoppelt. Ein Filter (F1) lässt nur das gewünschte Licht bei 808 nm durch, damit es im Detektionsgang des Fluoreszenzmikroskops vollständig herausgefiltert werden kann. Ein Silberspiegel (S) leitet die Beleuchtung durch einen Kondensator (U-AAC achromatisch-aplanarer Kondensator, n. A. 1.40, Micro-Optic GmbH, Deutschland) zur Probe. Über das Objektiv und mehrere dichroitische Spiegel (D1, D2, D3), Silberspiegel (S), Linsen (L4, L5) und einen Filter

(F2) wird das Bild in geeigneter Weise auf eine Quadranten-Photodiode (SPOT4D, UDT Sensors Inc., USA) geworfen (Bild der Kugel ist mit ~ 1 mm etwa so groß wie Detektionsfläche). Die Bandbreite dieser Diode wurde mit einem Spektrumanalysator gemessen, sie beträgt ~ 3 kHz.

Die Quadranten-Photodiode misst die relative Lichtintensität, die auf die vier Quadranten fällt. Die Positionsbestimmung erfolgt durch paarweises Vergleichen der auf die Quadranten einfallenden Lichtintensitäten. Vergleicht man beispielsweise die Summe des Photostroms der beiden oberen Quadranten mit der Summe des Photostroms der beiden unteren Quadranten, dann erhält man damit die Information über die vertikale Position der gefangenen Kugel. Dies wird im Aufbau mit einer selbst konzipierten Differenzverstärker-Elektronik erreicht. Diese Information über die Positionsänderung in den beiden detektierten Raumrichtungen wird über einen PC mit integriertem Analog-Digital-Converter (MIO-16XE-50, National Instruments, Deutschland) ausgelesen (Aufnahmerate 1 kHz). Dargestellt werden die Daten mit dem Programm LabView4.1 (National Instruments, Deutschland). Neben dieser Aufzeichnung der Daten ist es für die dauernde Betrachtung des Signals von großem Vorteil, wenn man die Positionsdaten auch auf ein Oszilloskop gibt, das in einem x-y-Modus die Bewegungen der Kugel zeigt.

Neben dieser nm-genauen Detektion gibt es im Aufbau auch eine einfache CCD-Kamera (Nr. 10-420-34, ELV Elektronik, Deutschland), die über einen Strahlteiler (St2) und einen Filter (F3) einen kleinen Teil des Detektionslichts abbekommt. Mit dieser Kamera kann man das Bild der Probe mit den Augen gut verfolgen, dies ist z. B. nötig, um Kugeln, die gefangen werden sollen, in die Nähe des Laserfokus zu leiten.

3.2.2 Der Kraft-Feedback

Das in den Aufbau integrierte digitale Feedbacksystem ermöglicht es erstmals, lange und ununterbrochene Läufe der zu untersuchenden Proteine unter dem Einfluss einer konstanten, äußeren Kraft zu erzielen. Anders als in herkömmlichen Aufbauten [55] wurde dazu nicht die Fallenposition durch eine Feedbackroutine an die aktuelle Position eines aktiven, prozessiven Motors angepasst, sondern es wurde, um eine konstante Haltekraft auf die in der Falle gefangene Kugel zu erzielen, die Position der gesamten Probe durch einen piezogetriebenen Mikroskoptisch geeignet verändert. Diese Methode hat gegenüber der herkömmlichen Technik einige entscheidende Vorteile. Der größte Vorteil besteht darin, dass der maximale Bereich der Nachregelung nicht auf die Abmessung des Detektors sondern lediglich durch den Aktionsbereich des Piezotisches beschränkt ist. Dies ermöglicht, erheblich größere Lauflängen im Bereich von μm aufzunehmen. Bei herkömmlichen Regelungen über die AODs konnte nur eine maximale Lauflänge von einigen 100 nm detektiert werden, da dann die Falle samt Kugel und Motor aus dem detektierbaren Bereich lief. Ein weiterer Vorteil des neuen Feedbacks ist, dass die Fallenposition, und damit auch die Ruhelage der Kugel auf dem Detektor während der Messungen, konstant bleibt. Nichtlinearitäten der Detektordiode spielen damit nur eine untergeordnete Rolle.

Abb. 3.3 zeigt schematisch den Aufbau des Regelkreises. Die Positionsdaten (Istwert) der Kugel werden über den Quadrantendetektor bestimmt und einerseits mittels des Messrechners, wie oben geschildert, aufgenommen. Andererseits wird die Information auch mit einer Aufnahme rate von 30 kHz mittels eines DSP-Boards (M6x, Innovativ Integration, USA) und entsprechender Software aufgenommen so bearbeitet, dass die richtige Sollwert-Information an den Piezotisch gegeben wird. Der Piezotisch regelt nach und gibt seine Positionsinformation nach einer Offset- und Tiefpaß-Elektronik ebenfalls an den Meßsrechner weiter.

Die räumliche Auflösung liegt bei ~ 3 nm, die zeitliche Auflösung bei etwa 10 ms, die Reichweite des Feedback bei ~ 4 μ m. Dazu wurden die Spannungen (Bereich 0-10 V), die das DSP-Board an den Piezotisch weitergibt noch durch einen 20-fach Abschwächer so eingestellt, dass man für die gewünschte Anwendung den besten Kompromiss zwischen Positionsauflösung und Reichweite des Feedbacks bekommt.

Bisher erfolgt eine Nachregelung der Position in eine Dimension. Der Feedback könnte aber durch geeignete Programmierung auch auf zwei Dimensionen ausgeweitet werden.

Die Anwendungen der neuartigen Regelung, bei der der Piezotisch den Schritten des Myosin-V folgt, wird im Rahmen der kraftabhängigen Experimente in Kapitel 5 geschildert.

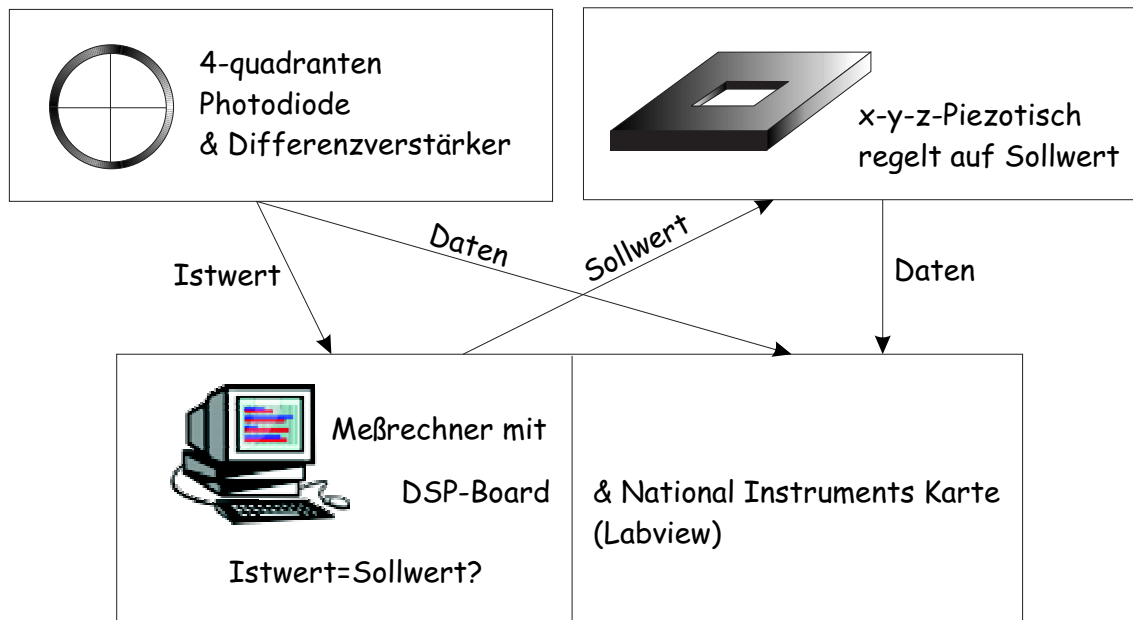


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des neuartigen Kraft-Feedbacks über den Piezotisch

3.2.3 Das TIRF-Mikroskop

Das in die optische Pinzette integrierte TIRF-Mikroskop (Abb. 3.2) besteht aus zwei Anregungslasern, einem frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser (532 nm, 100 mW, Coherent, Deutschland) und einem Helium-Neon-Laser (632 nm, 10 mW, Coherent, Deutschland), die jeweils mit einem Filterrad (F4, F5) auf die gewünschte Leistung gebracht werden können. Die Strahlen werden jeweils über zwei Sammellinsen (L7, L8, L10, L11) aufgeweitet. Über einen dichroitischen Spiegel (D4) werden die beiden Anregungsstrahlen übereinandergelegt. Eine weitere Sammellinse (L9) fokussiert die Strahlen in die hintere Ebene des Objektivs, wo der Strahl durch Silberspiegel (S) und dichroitische Spiegel (D2, D1) so eingestrahlt wird, dass er oben am Objektiv in einem so großen Winkel auftrifft, dass der Strahl totalreflektiert wird. Das Fluoreszenzlicht der Probe geht durch das Objektiv, die dichroitischen Spiegel (D1, D2), Silberspiegel (S) und einen weiteren dichroitischen Spiegel, der das Fluoreszenzlicht vom Detektionslicht der Falle trennt (D3). Zwei holographische Filter (F6, F7) filtern eventuell vorhandenes Licht der beiden Anregungslaser heraus. Über einen Strahlteiler (St3) kann das Fluoreszenzlicht in zwei Detektionswege geteilt werden. Einmal fällt das Licht zum Schutz gegen störendes Streulicht durch einem Langpaßfilter (F8) und einem etwa 10 cm langen Tubus auf eine hoch empfindliche CCD-Kamera (Pentamax Generation IV, Roper Scientific, Deutschland), deren Bilder über einen Messrechner ausgelesen werden. Dabei kann man die Größe des detektierten Sichtfeldes noch durch Klappspiegel (S1, S2) und eine Sammellinse (L12) wählen. Sind die Spiegel (S1, S2) nicht eingeklappt, erhält man ein Sichtfeld der Probe von $\sim 80 \times 80 \mu\text{m}$, bei eingeklappten Spiegeln beträgt das Sichtfeld $\sim 30 \times 30 \mu\text{m}$. Mit dieser Detektion konnten einzelne Cy3- bzw. Cy5- Fluorophore bei einer Konzentration bis zu 50 nM mit einer Zeitauflösung von 100 ms und einer räumlichen Auflösung von 20 nm 10 s lang beobachtet werden.

Der zweite Detektionsweg läuft durch einen für Cy3 angepassten Filter (F9) auf eine Avalanche-Photodiode (APD) (SPCM-AQR-15, Percin Elmer Optoelectronics über Laser Components, Deutschland), deren Ausgangssignal über den Messrechner ausgelesen wird. Bisher wurde diese Detektion bei den Experimenten noch nicht eingesetzt. Erste vorbereitende Experimente mit einzelnen Fluorophoren in der Probe zeigen aber, dass eine Einzelmolekülfluoreszenz-Detektion möglich ist. Im Ausblick wird geschildert, wie dieser Detektor in naher Zukunft für die Untersuchung molekularer Motoren eingesetzt werden soll.

3.2.4 Aufbau der Messkammern

Auf handelsübliche Objektträger aus Glas (Nr. 0656, Roth, Deutschland) werden zwei Streifen Silikonfett (Nr. 166180, Reiff, Deutschland) im Abstand von etwa 5 mm gegeben, auf die man ein Deckgläschen (Nr. 6319411, Merck, Deutschland) leicht andrückt, so dass zwischen Deckgläschen und Objektträger eine Kammer von etwa 10-15 Mikroliter Inhalt entsteht. Je nach Versuch pipettiert man nun die gewünschten Flüssigkeiten in die Kammer, verschließt dann die offenen Ränder mit Silikonfett und gibt für Objektiv bzw. Kondensator jeweils Immersionsöl (Nr. 510F, Zeiss, Deutschland) auf beide Seiten der Kammer.

Kapitel 4

Bestimmung der Bewegungsart von Myosin-V

Eine zentrale Frage ist, wie sich die beiden Köpfe des Myosin-V beim Laufen koordinieren. Biochemische und biophysikalische Untersuchungen [14, 56, 57, 58] schlagen ein Modell vor, bei dem die Köpfe eine „Hand-über-Hand“-Bewegung ausführen. Dabei schwingt der hintere Kopf nach vorne und wird zum vorderen Kopf. Eine andere Möglichkeit wäre die Bewegung ähnlich der einer Raupe, bei der der hintere Kopf an etwa die Position des vorderen gelangt und der vordere Kopf nach vorne ausweicht. Kurz bevor die im Folgenden geschilderten Experimente zur Unterscheidung beider Möglichkeiten durchgeführt wurden, stützten Untersuchungen an Kinesinen [18], einer anderen großen Gruppe molekularer Motoren mit ähnlicher Struktur, eher das raupenähnliche Modell und gaben der Diskussion neuen Zündstoff.

In diesem Kapitel wird zuerst das Prinzip der Messungen vorgestellt, dann wird auf die Materialien und Methoden eingegangen und schließlich werden die Ergebnisse gezeigt und diskutiert.

4.1 Prinzip der Untersuchungen

Abbildung 4.1 zeigt die Idee der Messungen. Ein Fluorophor wird so an das Myosin-V angebracht, dass man dadurch die Bewegung einer der beiden Motordomänen des Myosin-V mit dem TIRF-Mikroskop verfolgen kann. Beim „Hand-über-Hand“-Modell sollte das Fluorophor eine doppelt so große Bewegung zeigen wie beim raupenähnlichen Modell. Quantitativ heißt das bei einer Schrittweite von 36 nm [14], dass das Fluorophor beim „Hand-über-Hand“-Modell eine Distanz von ~ 72 nm zurücklegt, beim raupenähnlichen Gang nur ~ 36 nm.

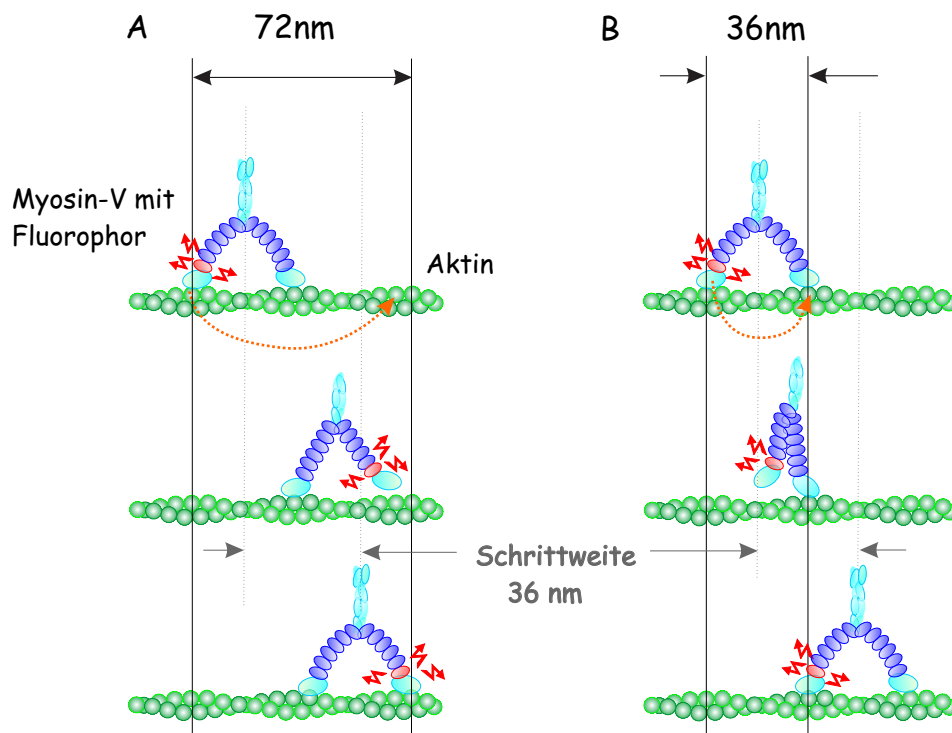


Abbildung 4.1: Vergleich zweier möglicher Bewegungsarten des Myosin-V
 A: Hand-über-Hand-Modell, B: Raupenähnliche Bewegung

4.2 Verwendete Materialien

Im Folgenden wird die Herstellung der für die Experimente benötigten Materialien beschrieben. Alle Chemikalien, die im Folgenden nicht mit Herstellerangaben speziell bezeichnet werden, wurden bei Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland, bezogen. In diesem Abschnitt wird zuerst auf die benötigten Puffer eingegangen. Grob gesprochen handelt es sich um Salzlösungen, in denen Motorproteine funktionsfähig aufbewahrt werden können. Die nächsten beiden Abschnitte beschäftigen sich mit den Proteinen Myosin-V und Aktin. Die Beschreibung der Fluoreszenzmarkierung von Myosin-V schließt diesen Abschnitt ab.

4.2.1 Puffer

Folgende Puffer wurden in den Versuchen verwendet:

„AB“:

25 mM Imidazol Hydrochlorid (pH 7.4), 25 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 1 mM EGTA und 1 mM DTT

Dieser Puffer wurde jeweils zehnfach konzentriert in einer Menge von 50 ml hergestellt und konnte dann einige Wochen verwendet werden.

„HS-AB“:

Dies ist eine „High Salt“-Version des AB-Puffers oben. Dabei wird nur statt 25 mM KCl 600 mM KCl verwendet.

„ABSA“:

Hierbei handelt es sich um AB-Puffer, der zusätzlich 1 mg/ml BSA enthält.

„Motilitätspuffer“:

44 μ l ABSA-Puffer, 2.5 μ l 20% Glucose (hierfür 2g Glucose in 10 ml destilliertem Wasser lösen), 2.5 μ l „Goc“ (hierfür Glucoseoxidase (1.2 mg/ml) und Katalase (0.2 mg/ml) in AB-Puffer ohne Magnesium lösen)

Nun fügt man dem Puffer noch die gewünschte Menge ATP zu. ATP lag 0.1 molar vor, so dass dem Puffer für ATP-Sättigung (z. B. 2 mM ATP) 1 μ l ATP (0.1 M) hinzugefügt wurde.

„F-Puffer“:

50 mM K-Hepes, pH 7.5, 0.2 mM CaCl₂, 0.2 mM ATP, 0.1 M KCl und 5 mM MgCl₂

„G-Puffer“:

5 mM K-Hepes, pH 7.5, 0.2 mM CaCl₂ und 0.2 mM ATP

„B-Puffer“:

20 mM Imidazol, pH 7.6, 25 mM KCl, 2 mM MgCl₂ und 1 mM EGTA

4.2.2 Myosin-V

Myosin-V wurde nach der Anleitung von R. Cheney [59] aus Kükenhirn extrahiert. Es lag danach in einer Konzentration von 2 mg/ml in AB-Puffer und 30 % Glycerol tiefgekühlt bei -80 Grad Celsius vor.

Für die Versuche wurde das Myosin-V schnell in der Hand aufgetaut, dann auf Eis aufbewahrt und war je nach Präparation drei bis acht Tage funktionsfähig.

4.2.3 Aktin

G-Aktin (monomere Form des Aktins) wurde nach Standardmethoden [60, 61] hergestellt. Es lag in einer Konzentration von 1,4 mg/ml vor. Durch Zugabe von 150 μM MgCl_2 wurde es unter vorsichtigem Rühren polymerisiert und je nach Bedarf mit Tetramethylrhodamin-Phalloidin bzw. Alexa-Fluor-647-Phalloidin (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande) so fluoreszenzmarkiert, dass ein Fluorophor pro G-Aktin vorhanden ist. Die Aktinfilamente wurden dann auf Eis aufbewahrt und konnten mehrere Tage verwendet werden.

Anbindung der Aktine an Glas über NEM-Myosin-II

Für die Versuche müssen die Aktin-Filamente auf die Glasoberfläche des Deckgläschens der Messkammern gebracht werden. Dazu wurde Myosin-II, das am Lehrstuhl aus Muskelgewebe von Kaninchen extrahiert wurde, immobilisiert [54]. Dies erreicht man folgendermaßen:

100 μl Myosin-II (Konzentration 38 mg/ml) wird durch Zugabe von 900 μl destilliertem Wasser ausgefällt und in einer Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehungszahl 5 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20-50 μl HS-AB sehr vorsichtig aufgelöst. Nun gibt man 5 μl 10 mM N-Ethylmaleimid (NEM) hinzu. Nach einer Stunde bei 25 Grad Celsius wird die Lösung mit 900 μl destilliertem Wasser aufgefüllt und wieder abzentrifugiert.

Die Flüssigkeit mit überflüssigem NEM wird entfernt und das Pellet wieder vorsichtig in 20-50 μl HS-AB-Puffer aufgelöst. Dieser Säuberungsschritt mit jeweils 900 μl destilliertem Wasser wird noch drei Mal wiederholt. Das dann erhaltene Pellet wird vorsichtig in 200 μl HS-AB-Puffer gelöst.

Um Aktinfilamente an Glas zu binden, geht man folgendermaßen vor:

15 μl NEM-Myosin 1:15 mit HS-AB-Puffer mischen und in die Meßkammer füllen. Nach 3 Minuten mit 100 μl ABSA-Puffer spülen. 30 μl Aktin 1:100 gemischt mit AB-Puffer langsam aber kontinuierlich in die Kammer füllen und sofort mit 100 μl ABSA-Puffer spülen.

4.2.4 Fluoreszenzmarkierung von Myosin-V

Zuerst wurde versucht, Myosin-V direkt durch Zugabe von monoaktivem Cy5-NHS-Ester zu markieren. (Durch NHS-Ester kann der Farbstoff Cy5 kovalent an freie Aminosäuren eines Proteins binden.) Danach konnte jedoch keine Motilität des Motors mehr nachgewiesen werden.

Daher wurden im zweiten Durchgang die leichten Seitenketten von Myosin-V fluoreszenzmarkiert. Bei den Seitenketten handelt es sich um über IQ-Domänen angebundene Calmoduline, wobei jeweils sechs Stück pro Bein angebunden sind. Die leichten Seitenketten können durch Zugabe von Ca^{2+} -Ionen abgelöst werden und nach Entfernung des Calciums aus der Umgebung mittels EGTA wieder an ihre Bindungsstellen zurückkehren. Gibt man im abgelösten Zustand fluoreszenzmarkiertes Calmodulin zu der Motor-Lösung, so sollten nach Entfernen des Calciums auch fluoreszierende Calmoduline an die Motoren binden und diese damit markieren. Geht man davon aus, dass die Calmodulin-Bindungsstellen nach dem Zufallsprinzip besetzt werden und die Fluorophore auf die Bindungskonstanten keinen Einfluß haben, so lässt sich der Grad der Fluoreszenzmarkierung durch die Konzentration der fluoreszierenden Calmoduline einstellen. Wählt man die Konzentration so, dass pro Motor ein fluoreszierendes Calmodulin gebunden wird, so sollte (bei 6 leichten Ketten pro Bein) bei jedem sechsten Motor das Calmodulin fluoreszent sein, dass einer der Motordomänen am nächsten liegt.

In den folgenden Kapiteln wird die Herstellung des fluoreszenten Myosin-V beschrieben, zuerst die Herstellung des fluoreszenten Calmodulins, dann des fluoreszenten Myosin-V.

4.2.5 Fluoreszenzmarkierung von Calmodulin

Zur Fluoreszenzmarkierung des Calmodulins wurde die Anleitung aus [63] leicht verändert.

Man gibt 1.4 mg lyophilisiertes Calmodulin in 1 ml Puffer (0.3 M KCL, 50 mM Borsäure (pH 8.5), 0.1 mM CaCl_2). Vom monoaktiven Cy3-NHS-Ester (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) löst man 1 mg in 100 μl DMSO, das entspricht etwa einer Cy3-Konzentration von 13 mM. 10 μl des gelösten Farbstoffes werden nun gut mit der Calmodulinlösung durchmischt. Man beendet die Reaktion nach einer Stunde bei 25 Grad Celsius durch Zugabe von 5 mM DTT. Das stöchiometrische Verhältnis von Farbstoff zu Calmodulin liegt bei etwa 2:1, so dass eine deutliche Markierung des Calmodulins zu erwarten ist. Das Cy3-Calmodulin wird nun lichtgeschützt über Nacht bei vier Grad Celsius gegen 2 Liter B-Puffer mit 2 mM β -Mercaptoethanol dialysiert (Slide-A-Lyser mini dialysis unit, Abschneidegewicht 10 kD, Perbio Science, Helsingborg, Schweden). Dadurch wird überschüssiger Farbstoff entfernt. Dann wird die Konzentration des Cy3-Calmodulin an Hand des erhaltenen Volumens abgeschätzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 Grad Celsius lichtgeschützt aufbewahrt.

Anfangs wurde als Farbstoff Cy5 (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) verwendet, der dann wegen der besseren Photostabilität durch Cy3 (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) ersetzt wurde. Die beschriebenen Techniken sind für beide Farbstoffe gleich.

4.2.6 Calmodulinaustausch

Um die fluoreszenten Calmoduline an die Motoren zu binden, werden 240 nM Myosin-V, 500 nM Cy3-Calmodulin und 5 mM DTT zwei Minuten bei 25 Grad Celcius in B-Puffer inkubiert. Durch Zugabe von 1.4 mM CaCl_2 lösen sich die Calmoduline ab. Nachdem man fünf Minuten bei 25 Grad Celsius abgewartet hat, gibt man 4 mM EGTA hinzu, um die Ca^{2+} -Ionen abzufangen. Nun können die Calmoduline an die Motoren binden. Nach weiteren drei Minuten bei 25 Grad Celsius wurde die Lösung auf Eis abgekühlt und über Nacht lichtgeschützt bei vier Grad Celsius gegen 2 Liter B-Puffer mit 2 mM β -Mercaptoethanol dialysiert (Spectrapor Micro DispoDialyzer, Abschneidewicht 60 kD, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Dadurch soll das freie, fluoreszente Calmodulin möglichst vollständig entfernt werden.

Um Zeit zu sparen wurde versucht, den Dialysevorgang durch eine Zentrifugation mit Centricon-Membranen (Abschneidewicht 50 kD, Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland) zu ersetzen. Dies war aber mit zu hohen Proteinverlusten verbunden.

4.3 Experimente

4.3.1 Test der Funktionalität der Motoren

Zu Beginn jeden Versuchstages wurde das Myosin-V in sogenannten Motilitätsassays getestet [64]. Dazu wurden Motoren, wie in Abbildung 4.2 skizziert, auf ein Deckgläschen gebracht. Bei den richtigen Salz- und ATP-Bedingungen (genaue Anleitung unten) werden dann Aktinfilamente von den Motoren bewegt. Sind die Aktinfilamente fluoreszenzmarkiert, kann man sie mit dem TIRF-Mikroskop beobachten. Eine Momentaufnahme der fluoreszierenden Aktine zeigt Bild 4.3. Um die Motoren zu testen, wurde bei ATP-Sättigung ein Film von etwa drei Minuten aufgenommen. Um Aussagen über einzelne Motoren zu bekommen, wurde dabei die Konzentration der Motoren so gering gewählt, dass einzelne Motoren die Aktine bewegten.

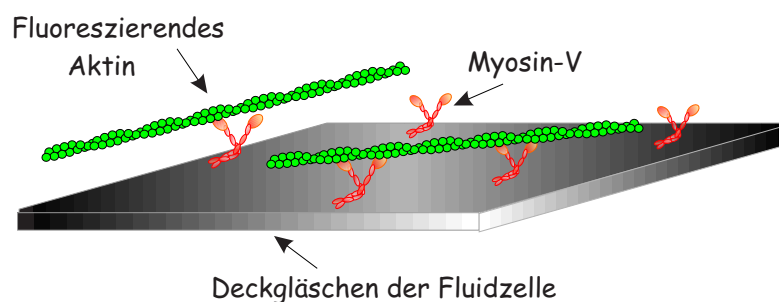


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Motilitätsassays

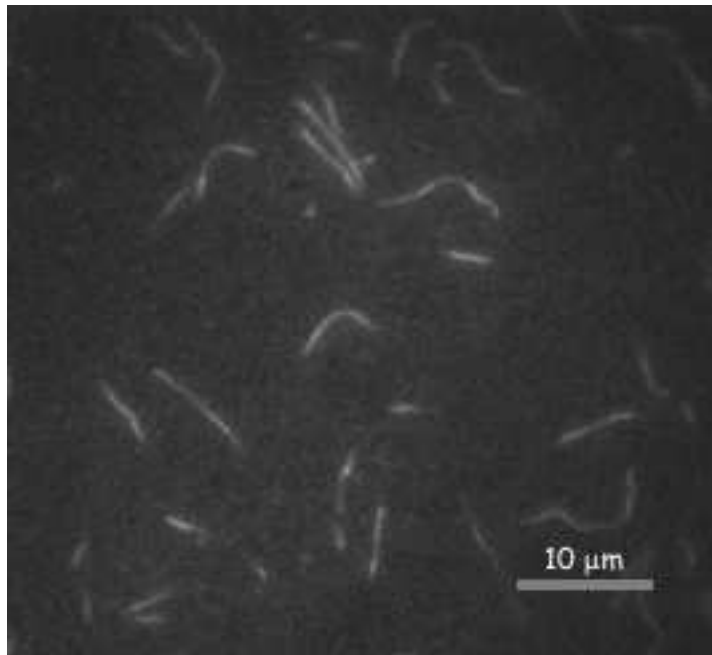


Abbildung 4.3: Momentaufnahme der Aktinfilamente im Motilitätsassay mit dem Fluoreszenzmikroskop

Besonderes Augenmerk wurde bei den Filmen auf zwei Dinge gelegt:

1. Bewegen sich alle Aktine, die im Beobachtungszeitraum auf einen Motor stoßen? Bleibt ein Aktin-Filament sofort hängen, kann man davon ausgehen, dass dieser Motor nicht funktionsfähig ist.
2. Weiterhin wurde getestet, ob die Aktine die „richtige“ Geschwindigkeit von circa 350 nm/s erreichen.

Anleitung für den Motilitätsassay

ABSA-Puffer 1:15 mit AB-Puffer mischen und in eine Fluidzelle füllen. Drei Minuten inkubieren lassen.

In der Zwischenzeit jeweils frisch die gewünschte Verdünnung an Motoren herstellen. Für Einzelmotor-Motilitätsassays wurde das Myosin-V etwa 1:5000 mit AB-Puffer gemischt. Davon gibt man nun 30 μl in die Meßkammer und wartet wieder 3 Minuten, bevor man mit 100 μl ABSA-Puffer spült. Vom fluoreszierenden Aktin werden etwa 0,3 μl in 50 μl Motilitätspuffer gelöst und durch die Zelle gespült.

4.3.2 Einzelmolekül-Fluoreszenzdetektion von Myosin-V

Wie zu Beginn dieses Kapitels (Abb. 4.1) gezeigt, soll die Bewegung eines an das Myosin-V gebundenen Fluorophors beobachtet werden, um zwischen den Bewe-

gungsarten „Hand-über-Hand“ und „raupenähnlich“ unterscheiden zu können.

Im Folgenden wird erklärt, wie die verwendete Probe hergestellt wurde, wie die Messdaten mittels des TIRF-Mikroskops aufgenommen und diese Daten ausgewertet wurden.

4.3.3 Präparation der Probe

Für die Versuche wird 15 μl NEM-Myosin-V 1:15 mit HS-AB-Puffer gemischt und in die Messkammer gefüllt. Nach 3 Minuten mit 100 μl ABSA-Puffer spülen. 30 μl fluoreszentes Aktin 1:100 gemischt mit AB-Puffer langsam aber kontinuierlich in die Kammer füllen und sofort mit 100 μl ABSA-Puffer spülen.

Hiermit erreicht man eine Ausrichtung der Aktin-Filamente in Richtung des Flusses. Dies reduziert und vereinfacht die spätere Auswertung der Myosin-V Läufe auf eine Raumdimension.

Man verwendet fluoreszentes Aktin, um sozusagen die möglichen Wege der Myosine sichtbar zu machen. Nur dort macht es Sinn, nach laufenden Myosinen zu suchen, andere haften immobilisiert an der Glasoberfläche und sind für die Experimente wertlos. Damit nun die Fluoreszenz der Aktine nicht die Fluoreszenz der Myosine überdeckt, wurden zwei verschiedene Fluorophore gewählt, deren Anregungsspektren sich nicht überdecken. So kann man, je nachdem welche von zwei Laserwellenlängen man verwendet, einmal die Fluorophore am Aktin und einmal die Fluorophore am Myosin-V betrachten. Konkret wurde das Aktin zuerst mit Rhodaminphalloidin, das mit dem 532nm-Laser angeregt wird, markiert. Das Myosin-V dagegen zuerst mit Cy5 (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland), das mit dem 632 nm-Laser angeregt wird.

Da sich herausstellte, dass der Farbstoff Cy3 (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) eine bessere Photostabilität hat, wurde fortan dieser für die Fluoreszenzmarkierung des Myosin-V verwendet. Da Cy3 wie das für Aktin verwendete Rhodaminphalloidin mit dem grünen Laser angeregt wird, wurde das Aktin fortan mit Alexa-Fluor-647-Phalloidin (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Holland) markiert, das durch den roten Laser angeregt wird.

Vom fluoreszenten Myosin-V wurde je nach gewünschter Dichte 0.1-1 μl Myosin-V in 50 μl Motilitätspuffer gegeben. Die gewünschte Motorgeschwindigkeit wird dabei über die ATP-Konzentration eingestellt. Zu Testzwecken wurde zuerst bei sättigendem ATP (2 mM) gemessen, hier kann man die Bewegung der Fluorophore an den Motoren auch mit bloßem Auge ausmachen. Für die ausgewerteten Experimente wurde jedoch eine ATP-Konzentration von 1 μM gewählt, was einer Geschwindigkeit von etwa einem Schritt pro Sekunde entspricht. Dies ist sinnvoll, da man eine Auflösung des Schrittes in mehre aufgezeichnete Bilder erreichen will und die Kamera Bilder im Takt von nicht schneller als 100 ms aufnehmen kann. Um ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu bekommen, wurden die Filme letztlich nicht mit zehn sondern mit fünf Bildern pro Sekunde aufgenommen.

4.3.4 Datenerfassung

Mittels des TIRF-Mikroskops wurden nun Filme der laufenden Myosine von etwa 10 Minuten Länge und mit einer Bildrate von fünf Bildern pro Sekunde aufgenommen. Dabei bestrahlte man die Probe zuerst mit dem Laserlicht, das die fluoreszenzmarkierten Aktine zeigte, verdeckte diesen wieder und gab das Laserlicht frei, das die Fluorophore an den Motoren zeigte.

Die Lebensdauer der Fluorophore ist gegensätzlich proportional der Laserleistung. Um die Fluorophore möglichst lange verfolgen zu können, möchte man die Laserleistung also möglichst gering halten. Andererseits ist dann die Quantenausbeute gering. Um einen möglichst guten Kompromiss zu finden, wurden Filme mit verschiedenen Laserleistungen aufgenommen. Konkret waren das bei der Konstellation mit Cy3 als Farbstoff an den Myosinen Laserleistungen des grünen Lasers von 3, 6, 10, 16 und 30 mW, wobei sich die besten Ergebnisse bei einer Leistung von 16 mW ergaben.

Der Abbildungsmaßstab wurde auf zwei Arten bestimmt. Erstens durch Abbilden einer Eichskala und zweitens durch Abbilden von fest auf das Deckgläschen absorbierten Fluorophoren, die über den geeichten Piezotisch eine bekannte Distanz verschoben wurden.

Mit beiden Methoden ergab sich der Abbildungsmaßstab von 88 nm pro Pixel.

4.3.5 Bildanalyse

Die Bildbearbeitung erfolgte mit dem Programm ImageJ (ImageJ, Version 1.29x, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Um zwischen immobilen und sich entlang der Aktine bewegend Motoren unterscheiden zu können, wurden die aufgenommenen Filme in eine Darstellung der Aktin-Richtung (y -Richtung) gegen die Zeit umgewandelt (siehe Abb. 4.4). Bilder, bei denen man Bewegung vermutete, wurden ausgeschnitten. Störende, in der Nähe befindliche, immobile Fluorophore wurden mit der Software entfernt. Das erhaltene Bild wurde als 16bit TIFF-File gespeichert.

Zur Bestimmung der Positionsveränderung eines Fluorophors wurden diese aufbereiteten Daten im Programm IgorPro4.0 (Wavemetrics, Inc., USA) dargestellt. Abb. 4.5 zeigt die typische Vorgehensweise zur Auswertung der Bildinformation. Bei jedem aufgenommenem Bild ergibt sich ein vom Fluorophor erzeugter Zerstreuungskreis, dessen Zentrum man durch Anpassen einer Gaußkurve finden kann. Um übermäßige Schwankungen des Signals, wie sie durch das für Fluorophore typische Blinken erzeugt werden, zu mindern, wurde die Gaußkurve jedoch nicht an einzelne Bilder gefittet, sondern an ein mittleres Helligkeitsprofil. Dieses konnte durch Mittelung über zwei bis vier Helligkeitsprofile aufeinander folgender Bildzeilen erzeugt werden. Das Maximum dieser Gaußkurve wurde dann als Position des Fluorophors definiert. Nun wurde diese Position gegen die Zeit aufgetragen. Diese Kurve gibt die gewünschte Auskunft über die Bewegung des Fluorophors.

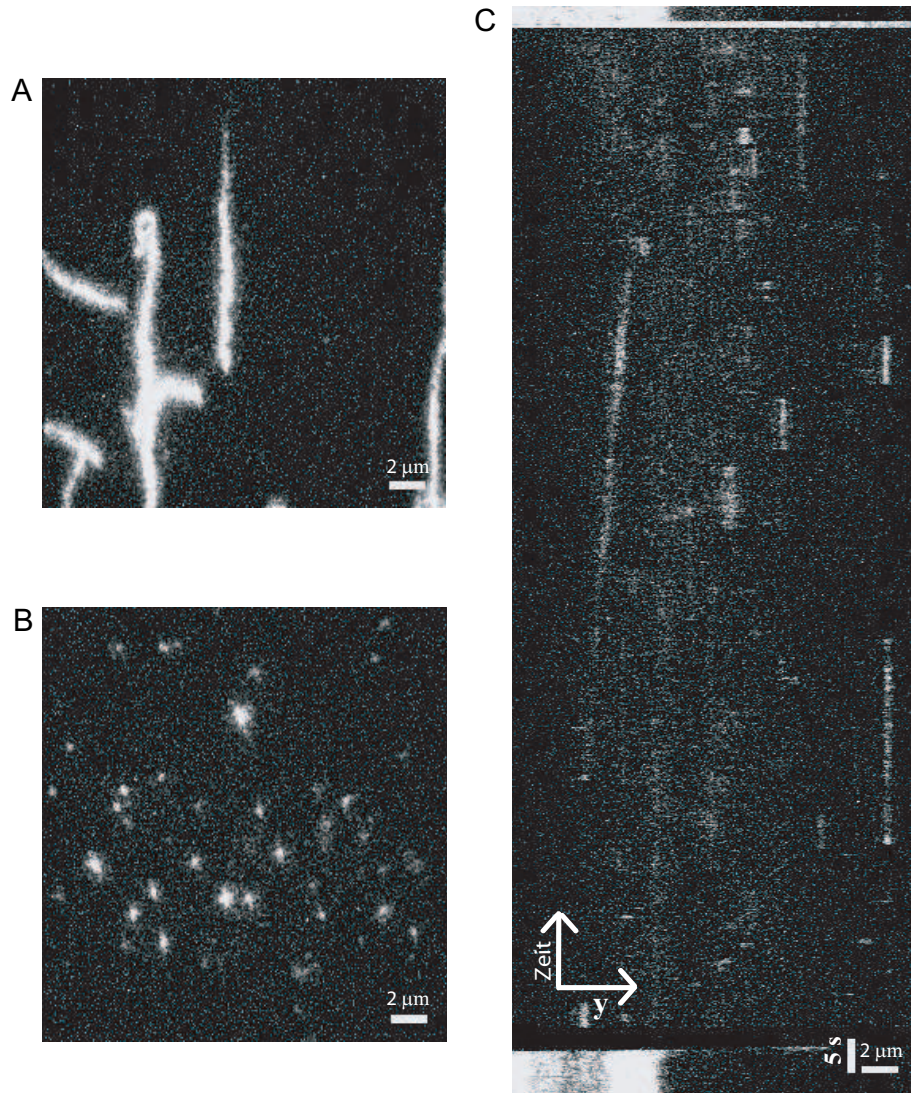


Abbildung 4.4: Bildbearbeitung zur Identifikation aktiver fluoreszenzmarkierter Myosin-V Motoren (A) Fluoreszenzbild der auf der Glasoberfläche verankerten und mit Alexa-Fluor 647 markierten Aktinfilamente bei Beleuchtung durch den Helium-Neon-Laser. (B) Das Fluoreszenzbild desselben Bereichs der Messzelle bei Beleuchtung mit dem verdoppelten Nd:YAG-Laser zeigt die am Myosin-V angebrachten Cy3-Fluorophore. (C) Schnitt durch einen aufgenommenen Film. Dargestellt ist die y-Position der Cy3-Fluorophore gegen die Zeit. Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen immobil auf der Glasoberfläche adhäreren Fluorophoren (z. B. im untere Drittel rechts) und sich in y-Richtung bewegendnen Objekten (Mitte links) zu erkennen.

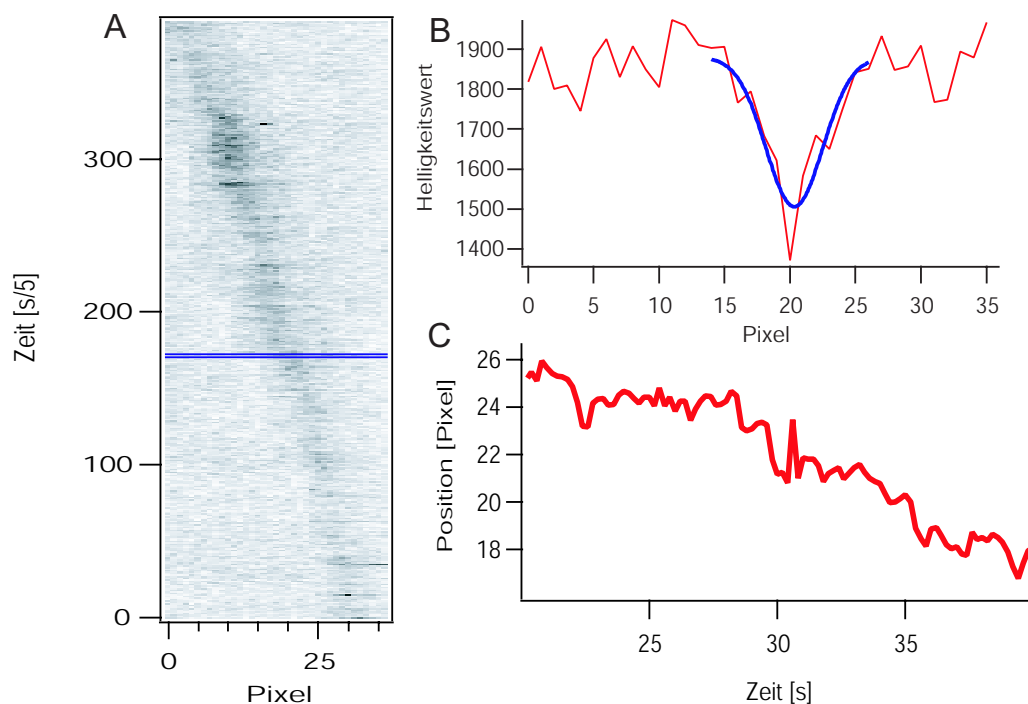


Abbildung 4.5: Auswertung der Bildinformation zur Bestimmung der Ortsveränderung einer Motordomäne eines Myosin-V Moleküls während eines ATPasezyklus am Beispiel eines laufenden Myosins bei $1\mu\text{M}$ ATP. (A) Darstellung des sich bewegenden, fluoreszenzmarkierten Motors aus Abb. 4.4: Es ist wieder die y -Position des Fluorophors gegen die Zeit aufgetragen. Die Bewegung des Motors ist deutlich zu erkennen. Entlang der blau eingezeichneten Linien wird das Helligkeitsprofil ermittelt, um den Schwerpunkt des Zerstreuungskreises des Fluorophors zu bestimmen. (B) Helligkeitsprofil entlang der in (A) blau eingezeichneten Linien. Das Profil ergibt sich aus der Mittelung der Helligkeitsprofile der zwei Bildzeilen des Bildes (A) zwischen den blauen Linien. Die dicke blaue Linie zeigt die angepasste Gaußkurve. (C) Darstellung des Zentrums der in das Helligkeitsprofil eingepassten Gaußkurve gegen die Zeit. Man erkennt die Änderung der Position des Fluorophors in der Zeit. In der dargestellten Zeitspanne von 20 s legt der Motor in etwa eine Strecke von 800 nm zurück (Kalibrierung der Kamera: $1\text{ Pixel} \hat{=} 88\text{ nm}$). Bei einer Schwerpunktsbewegung des Myosin-V von 36 nm pro ATPase Zyklus entspricht dies in etwa dem erwarteten Wert von durchschnittlich einem Schritt pro Sekunde.

4.4 Ergebnisse

Insgesamt wurden über 100 Filme der am Aktin entlanglaufenden, fluoreszenzmarkierten Myosin-V Motoren aufgezeichnet. Von den zahlreichen, sich bewegenden Motoren wurden etwa 600 ausgewählt und analysiert. Diese Menge war vor allem nötig, da das am Calmodulin angebrachte Fluorophor sich auch an einer anderen Position als direkt an der Motordomäne befinden konnte. Myosin-V bindet an jedem Arm 6 Calmoduline (vergleiche Abb. 4.1). Befindet sich das Fluorophor an einer der sechs möglichen Calmodulin-Positionen und nennen wir den Abstand dieser Stelle zum Mittelpunkt des Myosins x , so ergeben sich im „Hand-über-Hand“-Modell Schrittweiten des Fluorophors von $36 \pm 2x$ nm. Nur Schritte von Fluorophoren nahe der Motordomäne zeigen also wirklich die doppelte Schwerpunktbewegung.

Einen solchen exemplarischen Lauf zeigt Abb. 4.6. Dabei ist die Position des Fluorophors in der Zeit und die Autokorrelationsfunktion der Positionsverteilung gezeigt, die gut wiedergeben, dass es sich um Schritte von etwa der doppelten Schwerpunktsbewegung handelt.

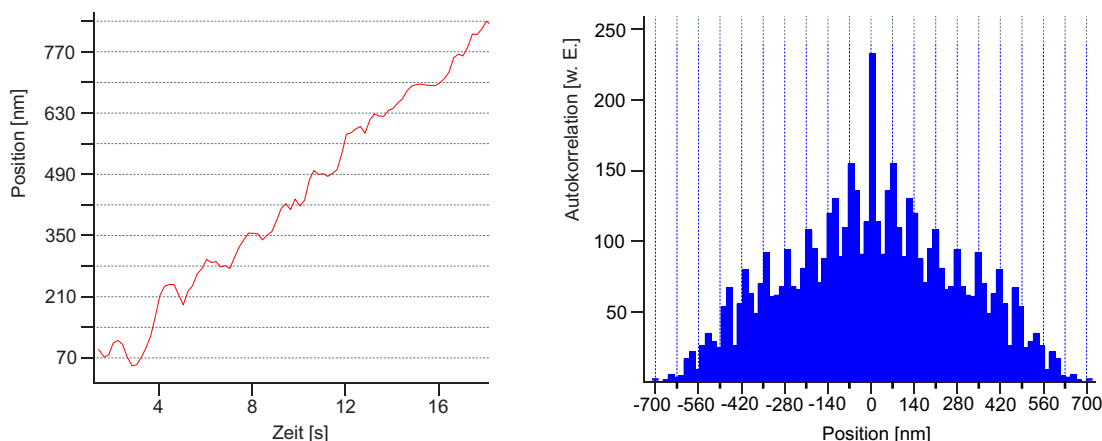


Abbildung 4.6: Links: Position eines an einem Myosin-V Molekül befestigten Fluorophors als Funktion der Zeit bei $1 \mu\text{M}$ ATP. Zur Anpassung der Gaußkurve an das Helligkeitsprofil des Fluorophors wurde jeweils über vier Zeilen des Helligkeitsprofils gemittelt (vergleiche Datenanalyse). Die Geschwindigkeit des Myosin-V beträgt etwa 50 nm/s und liegt damit im erwarteten Bereich. Rechts: zugehörige Autokorrelationsfunktion der Schrittweitenverteilung. Man erkennt deutlich, dass pro Schritt ein Weg zurückgelegt wird, der im Grunde der doppelten Schwerpunktbewegung entspricht, auf jeden Fall aber weit größer als die einfache Schwerpunktsbewegung ist.

4.5 Diskussion der Ergebnisse

Der wichtigen Frage nach der Koordination der beiden Köpfe wurde bisher in zwei gegensätzlichen Modellen nachgegangen. Wie zu Beginn dieses Kapitels erwähnt, schlugen biochemische und biophysikalische Untersuchungen [14, 56, 57, 58] ein Modell vor, bei dem die Köpfe eine „Hand-über-Hand“-Bewegung ausführen. Dabei schwingt der hintere Kopf nach vorne und wird zum vorderen Kopf. Eine andere Möglichkeit, die durch Untersuchungen an Kinesinen [18] gestützt wurde, war die Bewegung ähnlich einer Raupe, bei der der hintere Kopf an etwa die Position des vorderen gelangt und der vordere Kopf nach vorne ausweicht.

Das „Hand-über-Hand“-Modell sagt für ein Fluorophor, das sehr nahe oder direkt an der Motordomäne des Myosin-V angebracht ist, bei einem Schritt eine Positionsänderung von etwa 72 nm voraus (vergleiche Abb. 4.1 zu Beginn dieses Kapitels). Die in den oben geschilderten Einzelmolekül-Fluoreszenz-Experimenten gemessenen, regelmäßigen Ortsveränderungen von etwa der doppelten Schwerpunktsbewegung entsprechen dieser Voraussage. Nimmt man das raupenähnliche Modell an (vergleiche ebenfalls Abb. 4.1), so wäre dieses Ergebnis nur möglich, wenn jeweils ein langsamer und ein schneller Schritt des Moleküls innerhalb der durch die Integrationszeit der Kamera bedingten Zeitauflösung ablaufen würden. Im Folgenden soll daher eine derartige Abfolge abgeschätzt werden:

Nehmen wir an, dass die Schrittdauern eines Myosin-V Moleküls exponentiell verteilt sind und dass Schritte in einer Zeitspanne von 0.4 Sekunden aufgelöst werden können. Dies entspricht bei den durchgeführten Aufnahmen zwei Bildern.

Für die Wahrscheinlichkeit P für ein solches Ereignis ergibt sich:

$$P = \int_0^{0.4} \frac{1}{\tau} e^{-\frac{t}{\tau}} dt \cdot \int_{\tau}^{\infty} \frac{1}{\tau} e^{-\frac{t}{\tau}} dt \quad (4.1)$$

Hierbei ist τ die charakteristische Zeit für einen Schritt des Motors. Es wurde bei einer Geschwindigkeit von im Mittel ein Schritt pro Sekunde gemessen. Daher kann $\tau=1$ angenommen werden. Die Wahrscheinlichkeit für einen langsamen und einen schnellen Schritt in der gegebenen Zeitspanne von 0.4 Sekunden ergibt sich daher zu:

$$P = [-e^{-t}]_0^{0.4} \cdot [-e^{-t}]_1^{\infty} = \frac{1}{e}(-e^{-0.4} + 1) \approx 0.12 \quad (4.2)$$

Die Wahrscheinlichkeit, dass dies bei z. B. drei aufeinander folgenden Schritten der Fall ist, beträgt also $P = (0.12)^3 \sim 0.0017$ also gerade mal knapp 2 Promille. Daher kann man davon ausgehen, dass es sich wirklich um Schritte mit der doppelten Schwerpunktsbewegung handelt.

Damit kann das raupenähnliche Modell ausgeschlossen werden. Das „Hand-über-Hand“-Modell gibt dagegen eine gute Erklärung für die beobachteten Phänomene.

Die geschilderten Ergebnisse basieren auf Messungen bei niedrigem ATP, aber sehr wahrscheinlich gelten sie auch bei physiologischen ATP-Konzentrationen. Sie stehen in gutem Einklang mit zur gleichen Zeit durchgeführten, sehr ähnlichen Experimenten von Yildiz et al. [65]. Dabei erreichte diese Gruppe sogar eine Auflösung der Schritte von $\sim 1-2$ nm. Dieser Wert ist fast eine Größenordnung besser als die der oben beschriebenen Messungen, was auf eine bessere Kontrolle des Photobleichens zurückzuführen ist. Wie dies erreicht wird ist im Moment noch nicht ganz klar, da der experimentelle Aufbau ebenso wie die verwendeten Chemikalien gleich zu sein scheinen. Mit dieser guten Auflösung war es der Gruppe mittlerweile auch möglich, die Hand-über-Hand Bewegung für prozessives Kinesin, das kleinere Schritte als Myosin-V durchführt, nachzuweisen. Diese Bewegungsart scheint also nicht nur typisch für Myosin-V zu sein sondern auch für andere prozessive Motoren.

Dabei kann die „Hand-über-Hand“-Bewegung noch auf verschiedene Weise vor sich gehen. In einem symmetrischen Modell, bei dem der hintere Kopf immer nur rechts- bzw. linksherum am anderen Kopf vorbeigeht, müsste das Molekül sich verdrehen. Diese Modell wurde vielfach angenommen, da hier die Bewegung der Köpfe funktionell gleich ist und erst einmal nicht klar ist, warum sich die Köpfe funktionell unterscheiden sollten. Hua et al. [18] berichteten 2002, dass die Coiled-coil-Struktur des Kinesins sich nicht systematisch verdreht, ein Ergebnis, das sie als Bestärkung des raupenähnlichen Modells werteten. Das Ergebnis passt aber auch auf ein asymmetrisches „Hand-über-Hand“-Modell, bei dem die Köpfe funktionell nicht gleich sind und sie sich einmal links einmal rechts am anderen vorbei bewegen, so dass das Molekül sich nicht verzwirbelt. Dieses asymmetrische Modell ist für Transporter attraktiv, da dabei die eventuell recht große Last, die der Transporter trägt, nicht gedreht werden muss. Unklar ist jedoch, woher der funktionelle Unterschied der Köpfe kommt. Dennoch wurde 2002 ein solches asymmetrisches Modell von Ali et al. [66] für Myosin-V vorgeschlagen. Ende 2003 konnten Asbury et al. [67] für Kinesin das asymmetrische Modell bestärken, da sie bei einigen Kinesin-Molekülen abwechselnd unterschiedlich lange Verweildauern der Schritte feststellten, man könnte sagen: der Motor „hinkte“. Im raupenähnlichen Modell oder dem symmetrischen „Hand-über-Hand“-Modell wäre dies nicht möglich. Auch wenn die Bewegung des Myosin-V anders als bei Kinesinen ablaufen könnte, so erhöhen diese Ergebnisse doch die Wahrscheinlichkeit, dass auch für Myosin-V und andere dimerische, prozessive Motoren das asymmetrische „Hand-über-Hand“-Modell zutrifft.

Kapitel 5

Kraftabhängige Schrittkinetik von Myosin-V

Ein sehr hilfreicher Ansatz zum Verständnis des Mechanismus von Motorproteinen ist, eine externe Kraft an einzelne, aktive Motoren anzulegen. Diese Kräfte beeinflussen Übergänge im chemomechanischen Zyklus, was zu beobachtbaren Effekten führt und diese Übergänge hervorheben kann. Um auf diese Weise einen besseren Einblick in den Zyklus von Myosin-V zu bekommen, wurden mittels der optischen Pinzette Einzelmolekül-Experimente unter verschiedenen Kräften durchgeführt [68]. Dabei wurde in den Experimenten auch untersucht, wie sich Myosin-V bei Kräften weit über der Stillstandkraft verhält. Dies ist z.B. deshalb interessant, da Myosin-V in vivo beim Melanosomentransport zusammen mit sehr viel stärkeren Motoren wie Kinesinen gefunden wurde [19, 20].

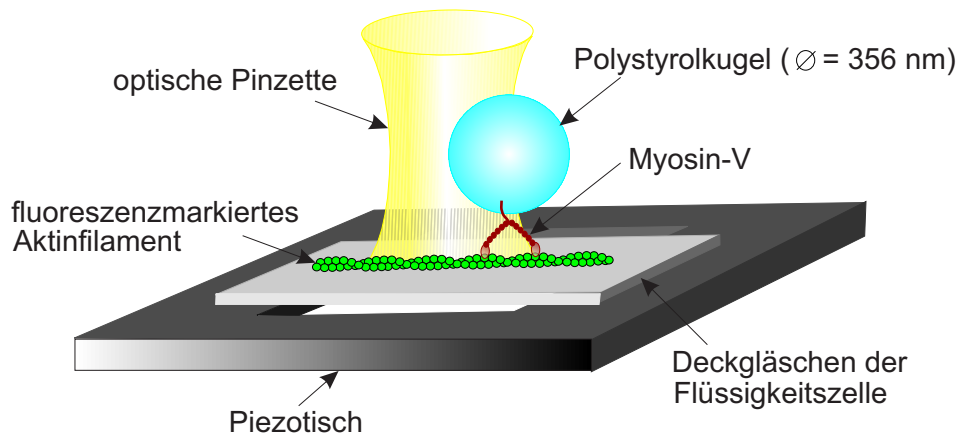
In diesem Kapitel wird zuerst das Prinzip dieser Messungen vorgestellt. Es folgt die Beschreibung der Materialien, und eine detaillierte Schilderung der Experimente. Dabei wird auch darauf eingegangen, warum man mit großer Sicherheit wirklich von Einzelmolekül-Experimenten ausgehen kann. Dann werden die Ergebnisse gezeigt. Zuerst werden dabei die Ergebnisse der Schrittweiten und Verweildauern in den verschiedenen Kraftbereichen vorgestellt. Diese Ergebnisse führen dann zur Beschreibung der Kraftabhängigkeit der gefundenen Ratenkonstanten. In weiteren Abschnitten wird auf die gemessenen Lauflängen und Rückwärtsschritte eingegangen. Eine ausführliche Diskussion der Ergebnisse schließt dieses Kapitel ab.

5.1 Prinzip der Untersuchungen

Abb. 5.1 zeigt eine schematische Darstellung der Experimente. Kurz gesagt werden dabei Polystyrolkugeln mit Motoren auf der Oberfläche optisch eingefangen und in Kontakt mit fluoreszierenden, auf der Probenoberfläche verankerten Aktinfilamenten gebracht. Sobald der Motor losläuft, startet die Feedback-Kontrolle, die den Motor unter einer konstanten Kraft hält. Der neuartige Feedback wurde über einen

Piezotisch realisiert, der das Voranschreiten der Kugeln durch Mitführen des oberflächengebundenen Aktins, ähnlich wie bei einem Laufband, ausgleicht und damit den Schritten des Myosin-V folgt. So konnten erstmals ganze Läufe einzelner Motorproteine unter verschiedenen vorwärts- und rückwärtsgerichteten Kräften aufgezeichnet und in Hinsicht auf Schrittweiten, Verweildauern und Lauflängen untersucht werden.

A



B

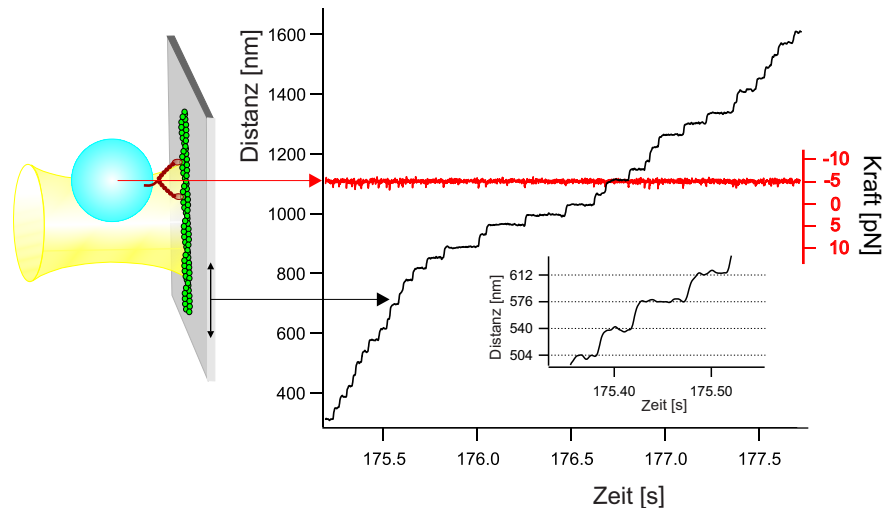


Abbildung 5.1: (A) Schematische Darstellung des Experiments. Eine gefangene Polystyrolkugel mit Myosin-V auf der Oberfläche wird in Kontakt mit einem oberflächengebundenen Aktinfilament gebracht. Bei richtigen Bedingungen (ATP, Salze...) in der Flüssigkeitszelle beginnt der Motor zu laufen und führt die Kugel mit. (B) Die Position der optischen Pinzette ist während der Experimente fest. Ein Regelkreis über einen Piezotisch unter der Probe hält die Distanz zwischen Fallenzentrum und Kugel konstant (rote Kurve) während Myosin-V entlang des Aktinfilaments läuft. Der Piezotisch folgt den Schritten des Motors (schwarze Kurve).

5.2 Verwendete Materialien

Proteine und Puffer

Die Herstellung der Puffer und der Proteine Myosin-V und Aktin wurde wie im letzten Kapitel über die Experimente zur Bestimmung des Bewegungsablaufs von Myosin-V vorgenommen (siehe Abschnitt 4.2.1, 4.2.2 und 4.2.3).

5.3 Experimente

5.3.1 Vorbereitende Experimente

Zu Beginn jeden Versuchstages wurde die Funktionalität des Myosin-V, ebenfalls wie bei den Experimenten zur Bestimmung des Bewegungsablaufs von Myosin-V, in sogenannten Motilitätsassays getestet (siehe Abschnitt 4.3.1).

Weiterhin wurde in regelmäßigen Abständen die Position der Falle auf der Abbildung des TIRF-Mikroskopes mit fluoreszierenden Kugeln überprüft. Dazu wurde $1\mu\text{l}$ Polystyrolkugeln (Durchmesser: 356 nm, 2.5 % solid, Polysciences Inc., Deutschland) in $99\mu\text{l}$ AB-Puffer gegeben. Nun mischte man $20\mu\text{l}$ ABSA-Puffer mit $4\mu\text{l}$ Rhodamin-BSA. Davon gab man $1\mu\text{l}$ zur Kugelmischung und ließ diese mindestens 3 Minuten inkubieren. Diese Kugelmischung wurde 1:10 mit ABSA verdünnt und in eine Meßkammer gegeben. Mittels der optischen Falle wurden Kugeln gefangen und mit dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. So konnte die Position der Falle auf dem Mikroskopbild gekennzeichnet werden.

5.3.2 Einzelmolekülexperimente unter Kräften

In diesen Experimenten wurden Schrittweiten, Verweildauern und Lauflängen von einzelnen Myosin-V Motoren unter verschiedenen Kräften bestimmt, um Rückschlüsse auf den chemomechanischen Zyklus und das Verhalten bei Kräften auch weit über der Anhaltkraft ziehen zu können.

Im Folgenden wird zuerst erklärt, wie die verwendete Probe hergestellt wurde. Dabei wird auch darauf eingegangen, wann man mit großer Sicherheit wirklich von Einzelmolekül-Experimenten sprechen kann. Es folgt die Beschreibung wie die Messdaten mittels der optischen Pinzette aufgenommen und diese Daten ausgewertet wurden.

5.3.3 Kugelpräparation für Einzelmolekül-Experimente

Für Einzelmolekül-Experimente in der optischen Pinzette müssen Polystyrolkugeln so mit Myosin-V präpariert werden, dass mit großer Wahrscheinlichkeit wirklich nur ein Motor für die Bewegung verantwortlich ist. Wann ist das der Fall?

Gehen wir davon aus, dass die Motoren voneinander unabhängig an zufällige Punkte der Kugeloberfläche adsorbieren [69]. Betrachten wir zunächst die Wahrscheinlichkeit, dass aus der Menge N von Motoren, die binden könnten, n Stück wirklich an die Oberfläche binden. Diese ergibt sich mit der Bindewahrscheinlichkeit p_b aus den Wahrscheinlichkeiten für das Binden von n Motoren und für das „nicht Binden“ von $N - n$ Motoren:

$$P(N, n) = \binom{N}{n} \cdot p_b^n \cdot (1 - p_b)^{N-n} \quad (5.1)$$

Für $N \gg n$ und $p_b \ll 1$ kann diese Gleichung mit einer Poissonverteilung genähert werden:

$$P(N, n) = \frac{(N \cdot p_b)^n}{n!} e^{-N \cdot p_b} \quad (5.2)$$

Für die Experimente interessiert uns die Wahrscheinlichkeit, dass eine beobachtete Bewegung von einem einzelnen Motorprotein herrührt. Diese bekommen wir, indem wir berechnen, wie unter den laufenden Kugeln die Wahrscheinlichkeit dafür aussieht, dass genau ein Motor bindet:

$$P_{\text{einzel}} = \frac{P(N, 1)}{1 - P(N, 0)} \quad (5.3)$$

wobei $P(N, 1)$ die Wahrscheinlichkeit ist, genau einen Motor gebunden zu haben, und $1 - P(N, 0)$ die Wahrscheinlichkeit, eine laufende Kugel zu haben.

Betrachten wir zunächst den Mittelwert $\langle n \rangle$:

$$\langle n \rangle = \sum_{n=1}^{\bar{N}} n \cdot P(N, n) \xrightarrow{\bar{N} \rightarrow \infty} N p_b. \quad (5.4)$$

Damit ergibt sich für $P(N, 0)$:

$$P(N, 0) = e^{-\langle n \rangle} \quad (5.5)$$

und

$$P(N, 1) = \langle n \rangle e^{-\langle n \rangle}. \quad (5.6)$$

Insgesamt erhalten wir:

$$P_{\text{einzel}} = \frac{P(N, 1)}{1 - P(N, 0)} = \frac{\langle n \rangle e^{-\langle n \rangle}}{1 - e^{-\langle n \rangle}} = \frac{\langle n \rangle}{e^{\langle n \rangle} - 1} \quad (5.7)$$

Betrachten wir das Beispiel, bei der jede dritte Kugel läuft. Dann ergibt sich mit

$$P(N, 0) = \frac{2}{3} = e^{-\langle n \rangle} \quad (5.8)$$

für den Mittelwert $\langle n \rangle$:

$$\langle n \rangle = \ln \frac{2}{3} \quad (5.9)$$

Damit erhalten wir:

$$P_{\text{einzel}} = \frac{\ln \frac{2}{3}}{\frac{2}{3} - 1} \sim 0.81 \quad (5.10)$$

Unter der Bedingung, dass nur jede dritte Kugel läuft, ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese Bewegung durch ein einzelnes Motorprotein hervorgerufen wird also 81%.

Um mit großer Sicherheit von Einzelmolekülexperimenten sprechen zu können, wurden in den im Folgenden geschilderten Experimenten die Daten nur dann ausgewertet, wenn höchstens jede dritte Kugel lief.

Dazu wurden die Kugeln folgendermaßen präpariert: 1 μl Polystyrolkugeln (Durchmesser: 356 nm, 2.5 % solid, Polysciences Inc., Deutschland) wurden für 3 Minuten in 98 μl AB-Puffer und 1 μl ABSA-Puffer inkubiert, um die Oberfläche mit BSA vorzublocken. Dann wurden unter vorsichtigen Rühren 30 pM Myosin-V dazugegeben. Die Kugeln wurden für jedes Experiment neu präpariert.

5.3.4 Präparation der Probe

In einer Messkammer wurden zuerst fluoreszente Aktinfilamente wie in Kapitel 4.2.3 geschildert über immobiles Myosin-II an die Glasoberfläche gebunden. Dabei bewirkt der Fluss beim Einfüllen in die Kammer, dass die Filamente gut in Richtung des Flusses ausgerichtet waren, so dass die Läufe in dieser einen Dimension aufgenommen werden konnten.

Nun wurde 45 μl des Motilitäts-Puffers mit sättigender ATP-Konzentration von 2 mM für jeden Versuch neu hergestellt. In diesen gab man unter vorsichtigem Rühren 5 μl der mit Motoren präparierten Kugelmischung.

5.3.5 Datenerfassung

Zuerst wurden mittels des TIRF-Mikroskops die markierten Akinfilamente auf der Glasoberfläche der Probenkammer dargestellt. Die Kamera der Hellfelddetektion der optischen Falle zeigte dann die diffundierenden Kugeln. Von diesen fing man eine ein, indem man mit dem x-y-Tisch eine der Kugeln in die Nähe der Fallenposition brachte. Nun wurde zunächst die Fallenstärke und die Umsetzung des Quadranten-Detektors von Nanometer in Volt kalibriert. Letzteres erhält man, wenn man über die AODs die Kugel einen bekannten Weg hin- und herspringen lässt und diesen Wert mit dem erhaltenen Spannungswert verrechnet. Bei dieser Messung ergibt sich aus der Mittelung des thermischen Rauschens der Kugel auch gleich die Fallenstärke (vergleiche Abschnitt 1.1.2). Diese wurde über die Laserleistung typischerweise auf Werte von 0.02-0.08 pN/nm eingestellt. Nach der Kalibrierung fuhr man mit der Piezotisch-Steuerung ein Aktinfilament unter die gefangene Kugel und hob dieses langsam so weit in Richtung der Kugel, dass diese gerade das Filament berührte. Dies konnte man gut über den Quadranten-Detektor an einer leichten Auslenkung der Kugel sehen. Da die Kugel in der Laserfalle praktisch frei rotieren kann, war es für einen an der Kugeloberfläche absorbierten Motor möglich, mit dem Filament in Kontakt zu treten, an diesen zu binden und sich prozessiv entlang des Aktins zu bewegen. Die Kugel folgte der Bewegung des Motors und ihre Auslenkungen konnten mit Hilfe des Quadranten-Detektors quantitativ erfasst werden. Auf den Motor wirkt dabei eine zur Auslenkung der Kugel proportionale rücktreibende Kraft. Für eine systematische Untersuchung der Kraftabhängigkeit der Schrittkinetik von molekularen Motoren sind aber Experimente nötig, bei denen die Kraft konstant gehalten wird. Wenn der Motor lief, startete man daher den digitalen Feedback, der einen konstanten Abstand zwischen Kugel und Zentrum der Falle festhielt, was zu einer konstanten Kraft auf den Motor führte. Der im Rahmen dieser Doktorarbeit neu entwickelte Feedback steuerte dabei den Piezotisch unter der Probe an. Dieser glich das Voranschreiten der Kugel aus, indem er die Position des oberflächengebundenen Aktinfilaments ähnlich einem Laufband anpasste. Während eines Laufs stand die Falle also fest, während die Probe mit den ausgerichteten Aktinfilamenten bewegt wurde und der Piezotisch den Schritten des Myosin-V folgte. Abb. 5.1 zeigt das Positionssignal des Piezotischs (schwarz) während eines Laufs von Myosin-V. Schrittweiten und Verweildauern sind gut zu erkennen. Das Quadranten-Detektorsignal (rot), das die Position der Kugel zeigt, gibt über die bei der Kalibrierung gemessene Federkonstante Auskunft über die angelegte Kraft.

Dieser in Kapitel 3.2.2 charakterisierte, weitreichende Feedback erlaubte es nun erstmals, vollständige Läufe des Myosin-V über mehrere Mikrometer Länge aufzunehmen. Da sich herausstellte, dass Myosin-V nur selten weiter als einen Mikrometer am Stück lief, wurde der Feedback-Bereich meist auf ~ 1500 nm begrenzt.

Die Daten eines Experiments, das mit IgorPro4.0 (WaveMetrics Inc., USA) dargestellt und ausgewertet wurde, zeigt Abb. 5.2. Die rote Kurve stellt die Position der Kugel dar, detektiert über die Quadranten-Diode. Die schwarze Kurve zeigt die Bewegung des Piezotisches über die Regelung. Sobald die Kugel losläuft (siehe als

Beispiel oberen Zoom) und die gewählte Haltekraft erreicht, startet die Regelung und der Piezotisch folgt den Schritten des Motors (siehe als Beispiel unteren Zoom). Lässt der Motor vom Aktinfilament los, zieht der Feedback ihn zurück (z. B. gut bei ~ 100 s zu sehen). Oft konnte er dabei aber wieder binden und erneut loslaufen, bevor das untere Feedbacklimit erreicht wurde (z. B. gut bei ~ 108 s zu sehen).

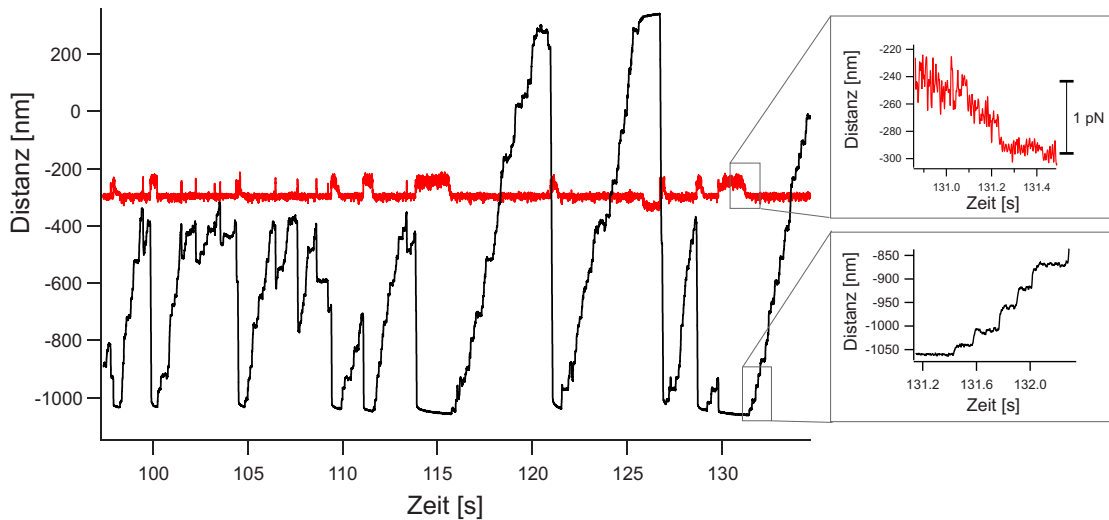


Abbildung 5.2: Daten eines kraftabhängigen Experiments. Die rote Kurve stellt die Position der Kugel dar. Die schwarze Kurve zeigt die Bewegung des Piezotisches über die Regelung. Sobald die Kugel losläuft (siehe als Beispiel oberen Zoom) und die gewählte Haltekraft erreicht, startet die Regelung und der Piezotisch folgt den Schritten des Motors (siehe als Beispiel unteren Zoom).

5.4 Ergebnisse

Mit Hilfe der im Rahmen dieser Doktorarbeit aufgebauten optischen Falle in Kombination mit dem TIRF-Mikroskop konnten erstmals Schrittweiten, Verweildauern und Lauflängen unter verschiedenen rückwärts- und vorwärtsgerichteten Kräften bestimmt werden. Das neue Feedbackschema über den Piezotisch hat im Vergleich zu früheren Realisierungen über akusto-optische Deflektoren [14] den Vorteil, dass mit ihm kontinuierliche Läufe eines Motors bis zu mehreren Mikrometern Länge beobachtet werden können. Bei der Regelung über akusto-optischen Deflektoren folgte die Falle dem Motor entlang des Filaments. Da der Detektor feststand, lief die Kugel aus dem Detektionsfeld heraus. Mit dieser Methode konnten daher nur ~ 10 kontinuierliche Schritte aufgenommen werden. Der neue Feedback hat weiterhin den Vorteil, dass die Abbildung der Kugel immer im inneren linearen Bereich des Detektors bleibt.

Im Folgenden soll nun zuerst auf die Schrittweiten und Verweildauern bei verschiedenen Kräften eingegangen werden, dann auf die Kraftabhängigkeit der kinetischen Ratenkonstanten und die Lauflängen.

5.4.1 Schrittweiten und Verweildauern bei Rückwärtskräften unterhalb der Anhaltekraft

Aus den Läufen des Motors wurden die Schrittweiten und Verweildauern unter Rückwärtskräften zwischen 0.7 pN und 1.5 pN bestimmt. Dies geschah manuell mittels Cursorsetzen und Aufzeichnen der Cursorabstände. Jedem Schritt wurde dabei die Verweilperiode nach dem Schritt zugeordnet. Die Schrittweitenverteilungen liegen zwischen 20 nm und 50 nm (siehe Abb. 5.3) und können jeweils mit einer Gaußfunktion um ~ 36 nm gefittet werden. Die Verteilungen der Verweildauern fallen zu großen Werten einfach exponentiell ab, zeigen aber bei kleinen Werten eine Peak, der darauf schließen lässt, dass mehr als eine Ratekonstante im chemomechanischen Zyklus limitierend ist (siehe Abb.5.3). Ein einfaches kinetische Ratenmodell, das diese Beobachtung erklärt, beinhaltet zwei unabhängige Ratenkonstanten k_1 und k_2 (siehe Kapitel 2.1). Die Verteilung der Verweildauern wurde nach diesem Modell mit einer doppelt exponentiellen Funktion (Gleichung 2.7, siehe Kapitel 2.1) gefittet. Die Fits und die bei den verschiedenen Kräften erhaltenen Werte für die kinetischen Ratenkonstanten k_1 und k_2 zeigt Abb. 5.3.

Da dem ersten Datenpunkt der Verweildauerverteilungen, der die schnellsten Ereignisse enthält, aufgrund der limitierten Antwortzeit des Feedbacks (~ 10 ms) einige Ereignisse fehlen könnten, wurde dieser in den Fits nicht berücksichtigt.

Simulation zur Überprüfung der Ratenkonstanten

Um die Robustheit dieser Fits zu testen wurden Läufe eines Poissonsteppers für verschiedene Werte von k_1 und k_2 mittels IgorPro4.0 simuliert und die Verteilungen der Verweildauern untersucht. Die Fits an die simulierten Daten mit 1000 Ereignissen zeigten, dass der erste Datenpunkt aus den Fits ausgeschlossen werden kann, solange die schnellere Rate den inversen Wert des binnings (50/s) nicht überschreitet.

Um weiterhin Artefakte auf Grund der limitierten Antwortzeit des Feedbacks (~ 10 ms) ausschließen zu können, wurden die simulierten Verteilungen der Verweildauern in verschiedener Hinsicht untersucht. Gleichung 2.7 wurde zuerst an die Verteilung gefittet, die alle erhaltenen Daten umfasste. Der abschneidende Einfluss des Feedbacks wurde nun so untersucht, dass die Verteilung der simulierten Verweildauern mit einer kontinuierlich ansteigenden Funktion (errorfunction), die bei 20 ms eine Detektionswahrscheinlichkeit von 0.5 hat, abgeschnitten wurde. Der Fit mit Gleichung 2.7 an diese Kurve wurde nun mit dem an die ursprüngliche Verteilung verglichen. Abb. 5.4 zeigt beispielhafte Ergebnisse dieser Simulation. Außerdem wurde der Einfluss des Binnings der Histogramme untersucht, indem Fits an die Verteilun-

gen mit Balkenbreiten von 3 ms, 10 ms und 20 ms verglichen wurden. Dabei ergab sich, dass für Werte von $k_1 < 50/s$ und $k_2 < 20/s$ alle Fits die Werte von k_1 und k_2 gut reproduzierten. Für Werte über $k_1 \sim 50/s$ blieb k_1 bei allen abgeschnittenen Verteilungen bei $\sim 50/s$, was darauf schließen ließ, dass Werte höher als $\sim 50/s$ aufgrund der limitierenden Antwortzeit des Feedbacks nicht aufgelöst werden können. Der Wert $\sim 50/s$ ist dann nur ein unteres Limit für solch eine Ratekonstante.

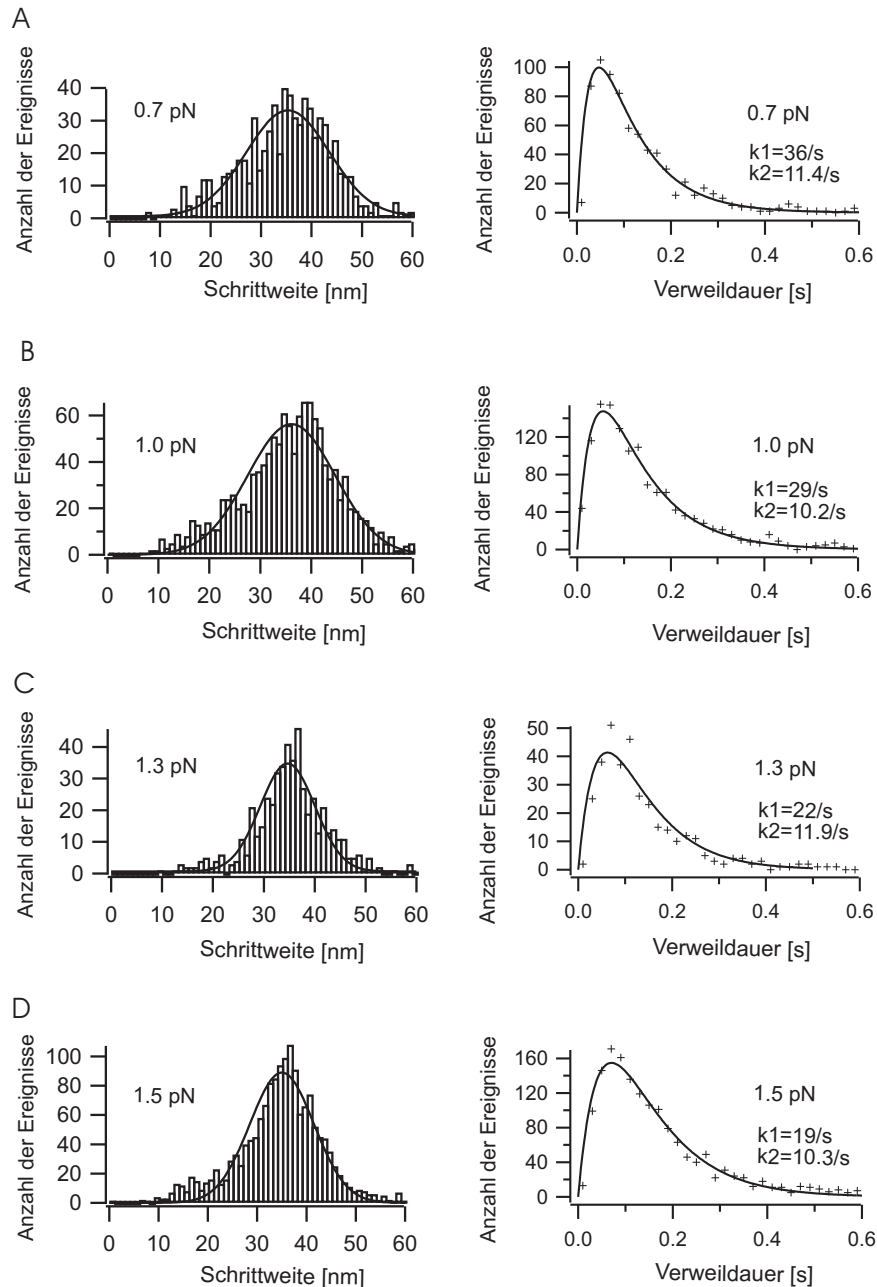


Abbildung 5.3: Links: Schrittweitenverteilungen bei verschiedenen Rückwärtskräften unterhalb der Anhaltekraft, gefittet mit einer Gaußkurve. Rechts: Verteilungen der Verweildauern, gefittet mit einer doppelt exponentiellen Funktion (Gleichung 2.7), die angegebenen Werte für k_1 und k_2 ergeben sich jeweils aus den Fits.

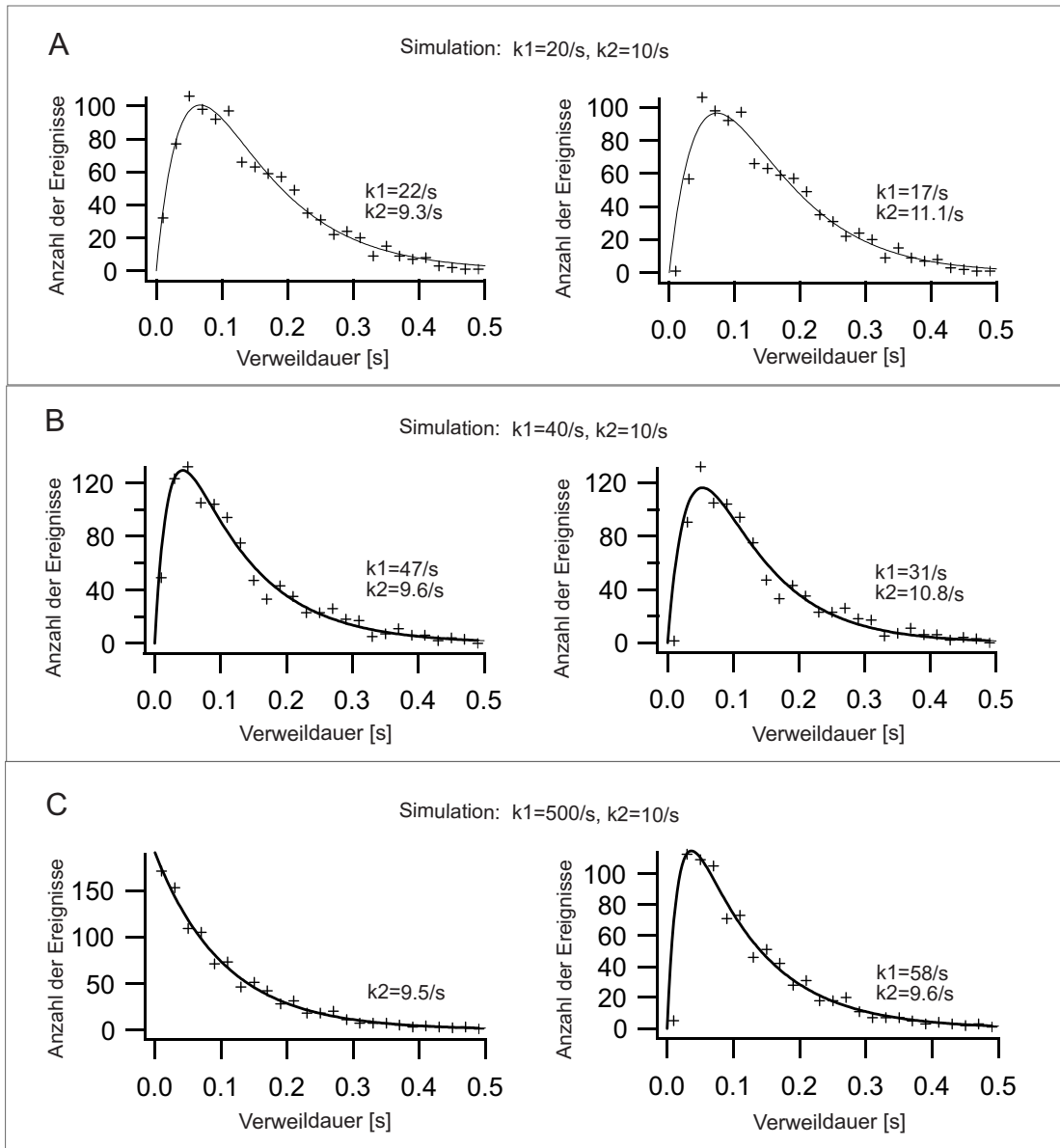


Abbildung 5.4: Beispiele der Verweildauervertellungen aus Simulationen zur Untersuchung des Einflusses der limitierten Antwortzeit des Feedbacks bei verschiedenen vorgegebenen Ratenkonstanten k_1 und k_2 . Die linken Kurven stellen das vollständige Ergebnis der Simulation mit Fit (Gleichung 2.7) dar. Um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass Ereignisse ≤ 40 ms eventuell nicht aufgelöst werden können, wurden Werte bis 40 ms erst mit einer errorfunction, die bei 20 ms eine Detektionswahrscheinlichkeit von 0.5 hat, gewichtet und dann gefittet (rechte Kurven). (A) Verweildauervertellungen aus Simulation mit vorgegebenen Werten $k_1=20/s$ und $k_2=10/s$. (B) Verweildauervertellungen aus Simulation mit vorgegebenen Werten $k_1=40/s$ und $k_2=10/s$. (C) Verweildauervertellungen aus Simulation mit vorgegebenen Werten $k_1=500/s$ und $k_2=10/s$.

5.4.2 Schrittweiten und Verweildauern bei Kräften nahe der Anhaltekraft

Schrittweiten und Verweildauern bei 1.6 pN wurden wie in Kapitel 5.4.1 geschildert bestimmt. Die Verteilungen zeigt Abb. 5.5. Bei dieser Kraftbelastung sieht man nicht, wie bei den anderen angelegten Kräften, ein gaußförmige Schrittverteilung um ~ 36 nm, stattdessen erkennt man eine sehr breite Verteilung hin zu kurzen Schritten mit einer mittleren Schrittweite von ~ 28 nm. Die Verteilung der Verweildauern dagegen ändert sich kaum gegenüber der Verteilung bei 1.5 pN. (Dennoch verlangsamt sich die eigentliche Geschwindigkeit des Motors gemessen in mittlerer Verweildauer/Schrittgröße, da die Schrittweite so stark abnimmt.)

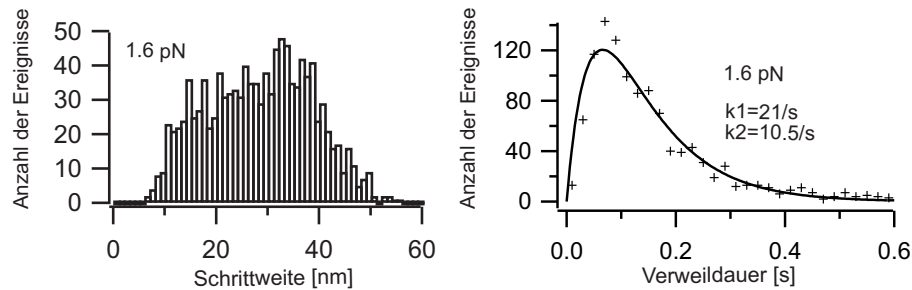


Abbildung 5.5: Verteilung der Schrittweiten und Verweildauern bei 1.6 pN, die Verweildauerverteilung kann mit einer doppelt exponentiellen Funktion (Gleichung 2.7) gefittet werden, die angegebenen Werte für k_1 und k_2 ergeben sich aus dem Fit.

Um zu testen, ob der Einbruch wirklich so abrupt zwischen 1.5 pN und 1.6 pN stattfindet, wurde innerhalb eines Experiments, also mit demselben Motor und den gleichen Einstellungen zwischen diesen Kraftwerten hin- und hergeschaltet. Abb. 5.6 zeigt einen Ausschnitt eines solchen Experiments, das den abrupten Einbruch der Schrittweiten bestätigt.

Um die kleinen Schritte näher charakterisieren zu können, wurden weitere Auswertungen vorgenommen. Bei der Analyse der Verweildauern bei 1.6 pN stellte sich heraus, dass kürzere Schritte auch etwas kürzere Verweildauern zeigen. Daraufhin wurden auch die Schritte bei anderen Kräften in dieser Hinsicht untersucht. Tabelle 5.1 zeigt die mittleren Verweildauern bei verschiedenen Kräften und Schrittgrößen x . Es stellte sich heraus, dass kürzere Schritte in diesen Experimenten generell etwas schneller passierten. Es wurden dabei nur Verweildauern ≤ 0.5 s gewertet, da bei den Experimenten hin und wieder sekundenlange Wartezeiten des Motors auftraten: Diese Zeiten, die wohl keine wirklichen Verweildauern darstellten sondern auf andere Einflüsse wie z. B. auf einen Fehler in der Struktur des Filaments zurückgeführt werden können, würden die mittlere Verweildauer extrem verfälschen. Um zu untersuchen, ob die Schritte eine Korrelation zeigen, wurden weiterhin Schritte ≤ 20 nm bei 1.6 pN mit ihrem Nachfolgerschritt addiert. Die Verteilung der addierten Schrittweiten zeigt Abb. 5.6B. Es ergibt sich eine Verteilung, die mit einer Gaußkurve um ~ 38 nm gefittet werden kann.

Die Anhaltekraft, gegen die der Motor gerade nicht mehr anlaufen konnte, lag bei 1.7 pN.

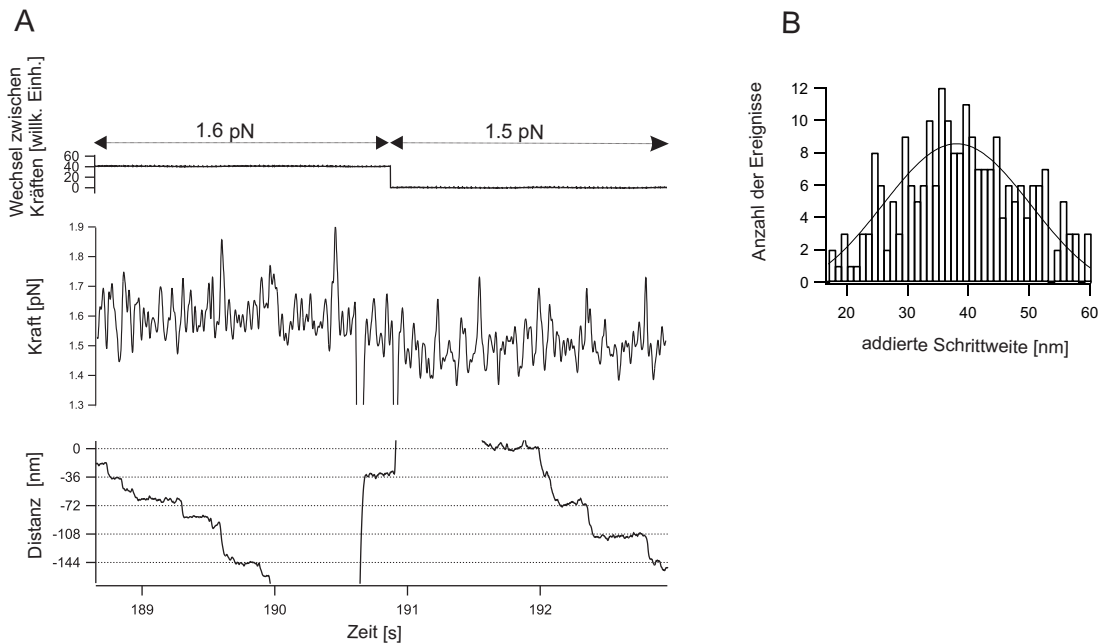


Abbildung 5.6: (A) Experimentelle Daten eines Experiments, bei dem zwischen 1.6 pN und 1.5 pN hin- und hergeschaltet wurde. Die oberste Kurve zeigt das Triggersignal, das den Zeitpunkt des Setpoint-Wechsels und damit des Kraftwechsels angibt. Die mittlere Kurve zeigt das Kraftsignal und die untere Kurve das Piezotisch-Signal, das den Schritten des Motors folgt. Dabei erkennt man im Bereich von 1.6 pN (bei ~ 189 s) kleine Schritte, während der Motor im Bereich von 1.5 pN (bei ~ 192 s) klare ~ 36 nm große Schritte zeigt. (B) Verteilung der addierten Schrittweiten bei 1.6 pN, die sich ergeben, wenn man Schritte ≤ 20 nm mit den unmittelbaren Nachfolgern addiert. Die Verteilung kann mit einer Gaußglocke um ~ 38 nm gefittet werden.

Kraft [pN]	Verweildauer [s]			
	$x \leq 20$ nm	$20 < x \leq 30$ nm	$30 < x \leq 40$ nm	$40 < x \leq 50$ nm
0.7	0.103	0.112	0.119	0.143
1.0	0.084	0.097	0.137	0.152
1.5	0.119	0.130	0.153	0.173
1.6	0.119	0.138	0.162	0.156

Tabelle 5.1: Mittelwerte der Verweildauern (≤ 0.5 s) von Schritten mit Schrittweite x bei verschiedenen Kräften.

5.4.3 Schrittweiten und Verweildauern bei Vorwärtskräften und Rückwärtskräften oberhalb der Anhaltekraft

Um das Verhalten von Myosin-V bei Vorwärtskräften und bei Rückwärtskräften oberhalb der Anhaltekraft untersuchen zu können, musste das experimentelle Vorgehen angepasst werden, da ein molekularer Motor in diesen Kraftbereichen nicht von sich aus läuft. Dazu wurde der Feedback in Zeitintervallen von 3 s schnell zwischen Vorwärtskräften und Rückwärtskräften hin- und hergeschaltet (siehe Abb. 5.7). Im Folgenden werden Rückwärtskräfte mit positiven Werten, Vorwärtskräfte mit negativen Werten gekennzeichnet.

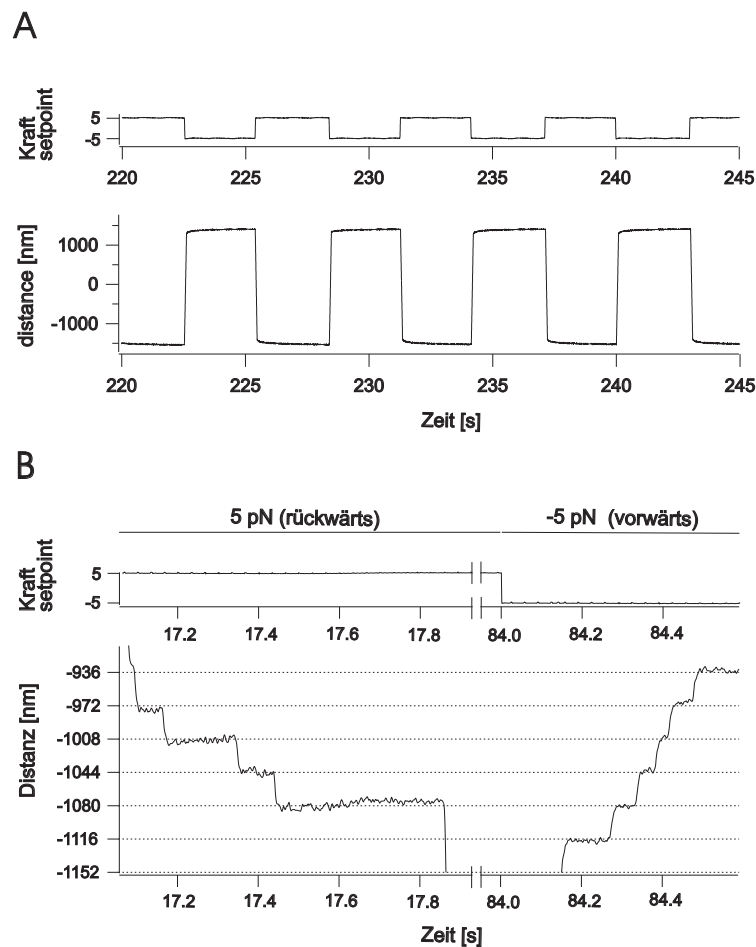


Abbildung 5.7: Beobachtung von Myosin-V Schritten bei Vorwärtskräften und Rückwärtskräften weit über der Anhaltekraft. (A) In diesem Experiment wurde periodisch zwischen vorwärts- und rückwärtsgerichteten Kräften hin- und hergeschaltet (-5 pN, +5 pN, 3 s Zeitintervall). Der obere Graph zeigt den gewählten Setpoint. Der untere Graph zeigt die Position des Piezotisches. Wenn kein Motor an Aktin bindet, folgt der Feedback dem Trigger-Signal und hüpfet zwischen seinen Limits. (B) Beispielkurve für Myosin-V Rückwärtsschritte bei 5 pN Rückwärtskraft (17-18 s) und Vorwärtsschritte bei -5 pN Vorwärtskraft (>84 s).

Wenn kein Motor ans Aktinfilament angriff, versuchte der Feedback seinen eingestellten Kraftsetpoint zu erreichen und der Piezotisch fuhr schnell ans Limit des Feedbacks (± 1500 nm, Abb. 5.7). Wenn ein Motor ans Aktin angriff, während sich der Piezotisch in einer mittleren Position zwischen den Limits befand, konnte der Feedback die Kraft konstant halten und den Schritten des Myosin-V folgen. Beispiele für Schritte bei 5 pN bzw. -5 pN zeigt Abb. 5.7B. Im 5 pN Rückwärtskraft-Bereich zeigt die Feedbackkurve Rückwärtsschritte von Myosin-V.

Schrittweiten und Verweildauern wurden wie in Kapitel 5.4.1 ermittelt. Die Verteilungen für vorwärtsgerichtete Kräfte von -1 pN und -5 pN zeigt Abb. 5.8. Schrittweitenverteilungen sind gaußförmig um ~ 36 nm verteilt und ähneln denen bei niedrigen Rückwärtskräften (Kapitel 5.4.1). Die Verweildauerverteilungen können mit dem gleichen kinetischen Modell (Gleichung 2.7) wie bei niedrigen Rückwärtskräften (Kapitel 5.4.1) beschrieben werden. Die aus diesem Fit erhaltenen Werte für k_1 und k_2 sind in Abb. 5.8 angegeben.

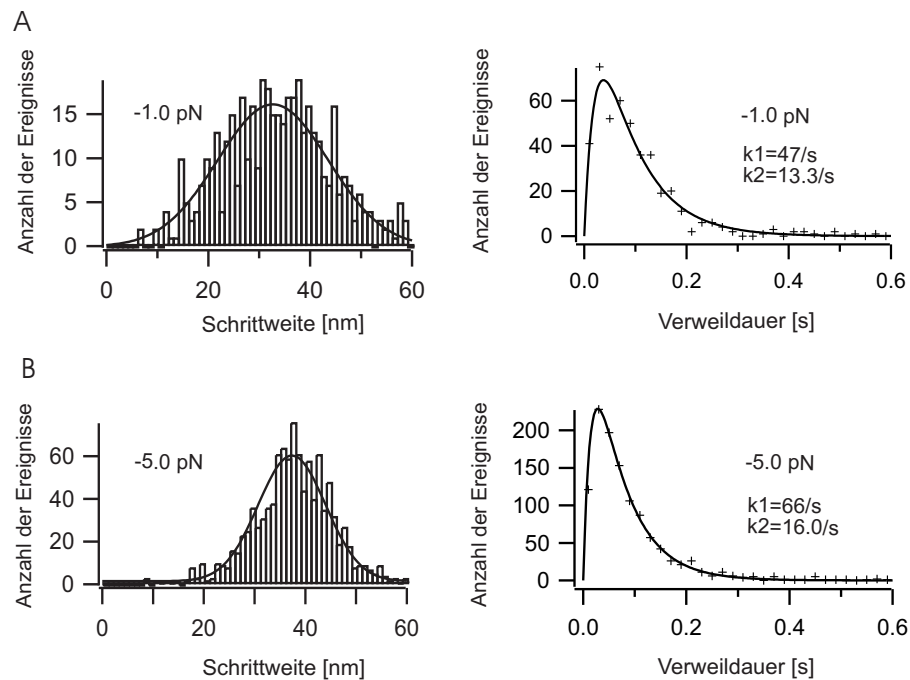


Abbildung 5.8: Schrittweiten- und Verweildauerverteilungen bei Vorwärtskräften, gefittet mit einer Gaußkurve bzw. einer doppelt exponentiellen Funktion (Gleichung 2.7). Die angegebenen Werte für k_1 und k_2 ergeben sich jeweils aus den Fits.

Bei den Rückwärtsschritten ist es wichtig auszuschließen, dass es sich nicht einfach nur um vollständiges Loslassen des Motors und anschließend schnelles Wiederbinden an eine Bindungstasche des Aktins 36 nm weiter auf dem Filament handelt. Dazu wurden alle Daten analysiert, bei denen der Feedback schnell von Vorwärts- zu Rückwärtsziehen umschaltet (siehe Abb.5.9).

Es konnten zwei verschiedene Arten von Ereignissen beobachtet werden. Eine Sorte zeigte das Ablösen des Motors übers Rückwärtsziehen und kein oder ein Wiederbin-

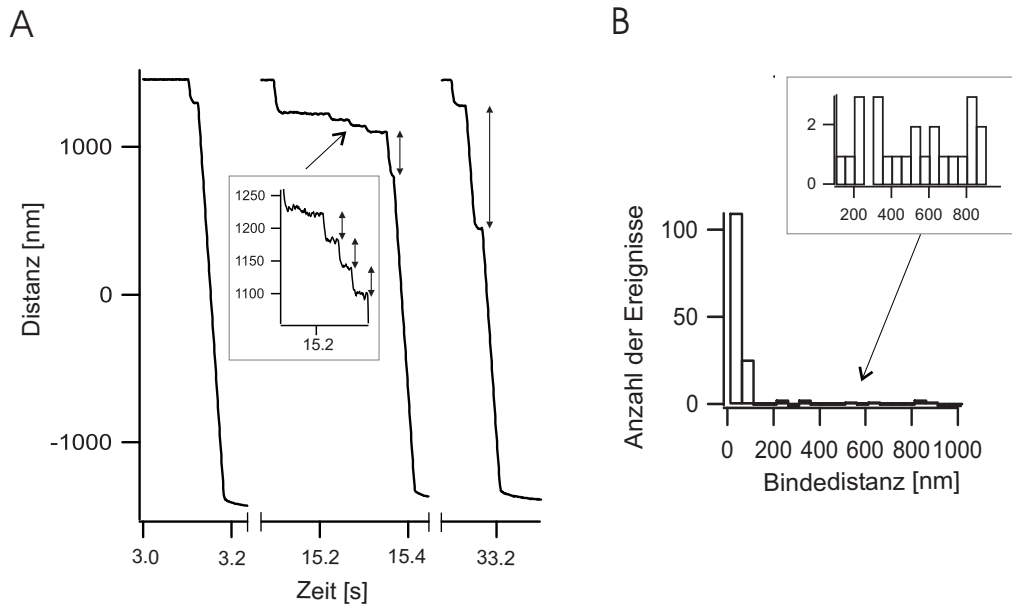


Abbildung 5.9: (A) Drei beispielhafte Kurvenausschnitte der Bewegung von Myosin-V über das Umkehren des Feedback-Setpoints von vorwärts- zu rückwärtsgerichteter Kraft. Die Kurven zeigen kein Wiederbinden des Motors (links), mehrere aufeinander folgende Rückwärtsschritte (Mitte), und ein Wiederbinden (rechts). Die Pfeile markieren die gezählten Bindungsdistanzen, d. h. die Distanz, die der Motor entlang des Aktins zwischen Ablösen und Wiederbinden zurücklegt. Inset: Zoom in die Rückwärtsschritte bei der mittleren Kurve. (B) Die Verteilung der Bindungsdistanzen zeigt einen ausgeprägten Peak bei einer Schrittweite, während höhere Distanzen gleichverteilt sind (oberer Graph links). Der obere rechte Graph ist ein Zoom in den linken Graph, der die Schritte <100 nm ausschließt.

den am Aktinfilament (Abb. 5.9A linker und rechter Kurvenausschnitt). Die andere Sorte zeigte aufeinanderfolgende, ~ 36 nm grosse Rückwärtsschritte unter einer Kraft von 5 pN (Abb. 5.9A mittlerer Kurvenausschnitt). Die Verteilung der Bindungsdistanzen ist in Abb. 5.9B dargestellt. Die Bindungsdistanz ist der Abstand, die der Motor vom feedback zurückgezogen wird, bevor er wieder an das Aktin bindet (Pfeile in Abb. 5.9A). Schritte wurden hierbei also als vermeintliches Loslassen und Wiederbinden gewertet, genau wie andere, weiter auseinander liegende Distanzen. Das Histogramm zeigt einen sehr ausgeprägten Peak bei Schritten bis 50 nm (unterster Bin), wogegen höhere Bindungsdistanzen sehr viel weniger auftreten und in etwa gleichverteilt über den gesamten Feedbackbereich liegen. Aus dem Peak bei Distanzen bis 50 nm lässt sich schließen, dass es sich um Rückwärtsschritte handelt, wogegen die gleichverteilte Population bei größeren Distanzen das Wiederanbinden ans Aktin darstellt. Der recht große Teil an Schritten zwischen 50 nm und 100 nm im Histogramm stellt wahrscheinlich schnelle, aufeinander folgende Rückwärtsschritte dar, die nicht aufgelöst werden konnten.

Um die Interpretation, dass die Verteilung in Abb. 5.9B wirklich zwei verschiedenen Prozesse beschreibt, zu stärken, wurden χ^2 -Analysen durchgeführt. Dabei wur-

de einerseits ein Modell für nur einen Prozess (stark abfallende einzelexponentielle Funktion ohne Offset) und andererseits ein Modell mit zwei Prozessen (einzelexponentielle Funktion mit Offset) untersucht. χ^2 verbesserte sich vom Wert 1.6 auf 0.6, was für die Interpretation von zwei verschiedenen Ereignissen spricht.

Abb. 5.10 zeigt den längsten gemessenen Rückwärtslauf mit zehn Rückwärtsschritten in einer Reihe, wenn man annimmt, dass es sich bei den großen Schrittweiten bei ~ 324.0 s und ~ 324.8 s um Doppelschritte handelt, die nur auf Grund der limitierten Antwortzeit nicht aufgelöst werden konnten.

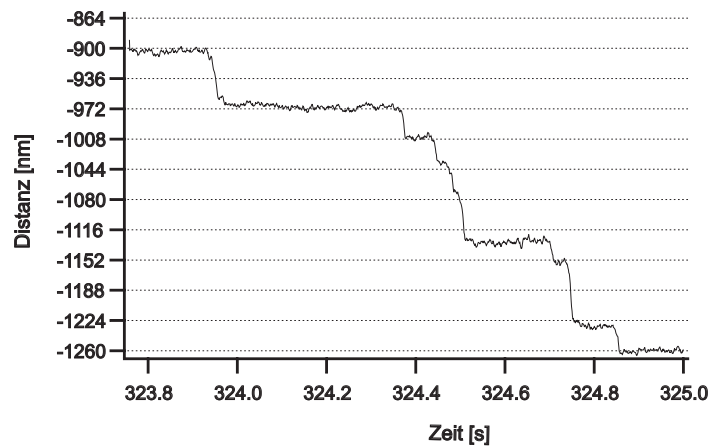


Abbildung 5.10: Der Piezotisch folgt über den Kraft-Feedback den Rückwärtsschritten des Myosin-V bei einer externen Kraft von 5 pN in Rückwärtsrichtung. Die Abbildung zeigt den längsten gemessenen Rückwärtslauf.

Die Rückwärtsschritte wurden wie in Kapitel 5.4.1 erklärt ausgewertet. Die Verteilungen für die Schrittweiten und Verweildauern stellt Abb. 5.11 dar. Die Schrittweitenverteilung lässt sich mit einer Gaußkurve um ~ 36 nm fitten. Die Verteilung der Verweildauern sieht einzelexponentiell aus mit einer Ratekonstante von von $(7 \pm 1)/s$.

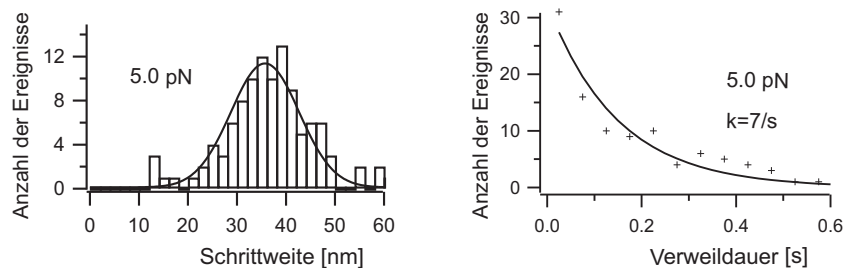


Abbildung 5.11: Schrittweiten- und Verweildauerverteilung der Rückwärtsschritte bei 5 pN, gefittet mit einer Gaußkurve und einer einfachen exponentiellen Funktion.

5.4.4 Kraftabhängigkeit der kinetischen Ratenkonstanten

Abb. 5.12 zeigt die Kraftabhängigkeit der Ratenkonstanten k_1 und k_2 , die wie in den vorangegangenen Kapiteln erklärt, aus den Verteilungen der Verweildauern ermittelt wurden. Die Abhängigkeit der chemischen Ratenkonstanten von der Kraft lässt sich nach Bell [44] folgendermaßen schreiben (siehe auch Kapitel 2.1):

$$k_j(F) = k_{0j} \cdot e^{-Fd_i/k_B T} \quad (5.11)$$

wobei k_{0i} die Übergangsrate ohne angelegte Kraft, d_i die Distanz vom Grundzustand zum Übergangszustand für den betrachteten Übergang in der Energielandschaft des Motors, k_B die Boltzmannkonstante und T die absolute Temperatur ist. Die langsamere Ratenkonstante k_2 folgt Gleichung 5.11 mit $d_2 = (0.3 \pm 0.2)$ nm und $k_{02} = (12 \pm 2)s^{-1}$. Im Bereich der Rückwärtskräfte kann die schnellere Ratenkonstante mit $d_1 = (3 \pm 2)$ nm und $k_{01} = (60 \pm 30)s^{-1}$ modelliert werden. Bei vorwärtsgerichteten Kräften liegt k_1 bei Werten, die wegen der limitierten Antwortzeit des Feedbacks nicht aussagekräftig sind (vergleiche Abschnitt 5.4.1), sie stehen daher in Klammern.

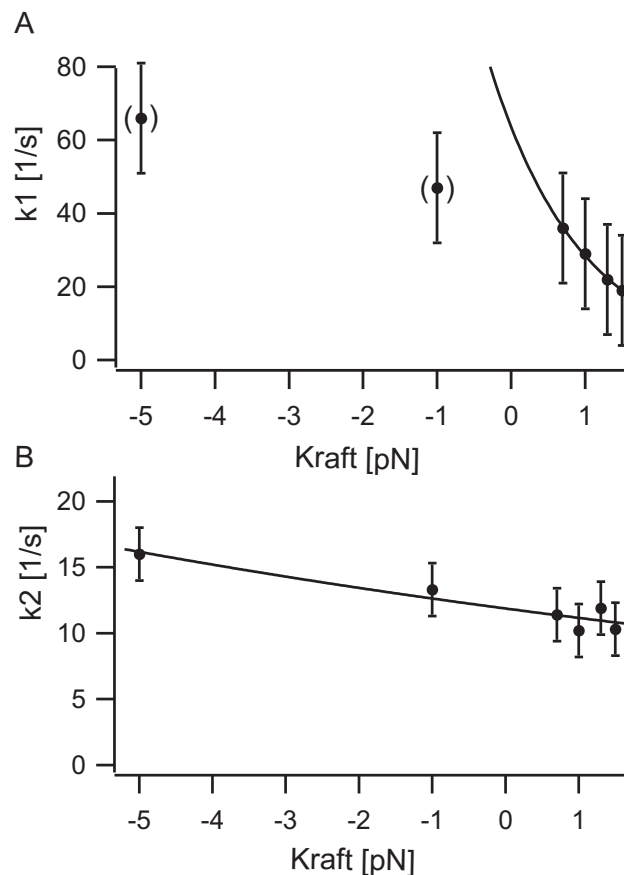


Abbildung 5.12: Kraftabhängigkeit der kinetischen Ratenkonstanten k_1 und k_2 . Die durchgezogenen Linien sind die Fits (Gleichung 5.11) mit den Fitparametern $k_{01} = (60 \pm 30)s^{-1}$ und $d_1 = (3 \pm 2)$ nm bzw. $k_{02} = (12 \pm 2)s^{-1}$ und $d_2 = (0.3 \pm 0.2)$ nm.

Um die statistische Relevanz der erhaltenen Werte zu zeigen, wurden χ^2 -Analysen der Fits unter Verwendung der Raten k_1 und k_2 (Abb. 5.12A und B) mit entsprechenden Analysen der Nullhypothese (bei der die Raten nicht von der Kraft abhängen) verglichen. Die erhaltenen χ^2 -Werte stiegen bei der Nullhypothese um einen Faktor 10 gegenüber den besten Fits, die in Abb. 5.12A und B gezeigt sind.

Das Ergebnis der zwei kraftabhängigen Raten wird auch durch die Analyse der Kraftabhängigkeit der Gesamtgeschwindigkeit des Motors, die in Abb. 5.13 gezeigt ist, bestärkt. Der Fit wurde dabei in einem Modell mit zwei Raten vorgenommen (vergleiche 2.1):

$$v(F) = d \left(\frac{1}{k_{01} \exp(-Fd_1/k_B T)} + \frac{1}{k_{02} \exp(-Fd_2/k_B T)} \right)^{-1} \quad (5.12)$$

Die damit erhaltenen Wert für $k_{01} = 40s^{-1}$, $d_1 = 3.2 \text{ nm}$, $k_{02} = 11.1s^{-1}$ und $d_2 = 0.05 \text{ nm}$ liegen nah bei den Werten aus den Fits an die Daten der einzelnen Raten (Abb. 5.12A und B).

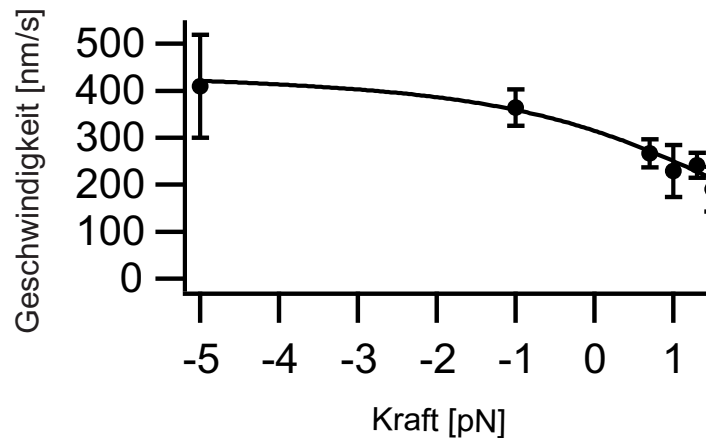


Abbildung 5.13: Kraftabhängigkeit der Gesamtgeschwindigkeit des Motors v . Der Fit wurde dabei in einem Modell mit zwei Raten vorgenommen (Gleichung 5.12). Die damit erhaltenen Wert für $k_{01} = 40s^{-1}$, $d_1 = 3.2 \text{ nm}$, $k_{02} = 11.1s^{-1}$ und $d_2 = 0.05 \text{ nm}$ liegen nah bei den Werten aus den Fits an die Daten der einzelnen Raten (Abb. 5.12A und B).

5.4.5 Lauflängen

Lauflängen wurden manuell wie in Kapitel 5.4.1 beschrieben tabelliert. Dabei wurde ein Lauf definiert als die Distanz, die der Motor läuft, wenn eine vorher eingestellte Kraft erreicht war, bis er vom Aktinfilament losließ und von der Falle zurückgezogen wurde. In vielen Fällen griff der Motor wieder ans Aktinfilament an, bevor das Feedbacklimit erreicht war, und begann von diesem neuen Punkt aus erneut zu laufen. Wenn der Motor mehr als ungefähr zwei Schrittweiten zurückgezogen wurde, wurde dieses Ereignis als neuer Lauf gezählt.

Es wurden die Lauflängen bei Kräften von -5 pN bis 1.6 pN bestimmt. Die Verteilungen zeigt Abb. 5.14 bzw. 5.15. Alle Verteilungen folgen sehr gut einer einzelexponentiellen Kurve:

$$P(r) \propto \exp(-r/c). \quad (5.13)$$

Es stellte sich heraus, dass die charakteristische Lauflänge c bei allen gemessenen Kräften im Grunde unabhängig von der Kraft ist (Abb. 5.16).

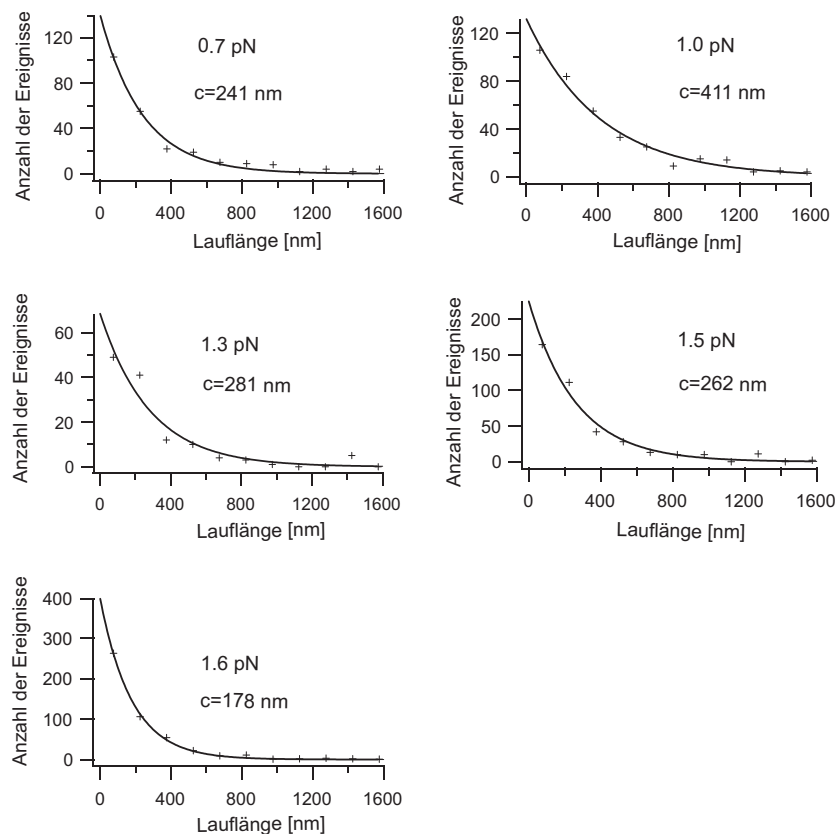


Abbildung 5.14: Verteilungen der Lauflängen von Myosin-V bei verschiedenen Rückwärtskräften, gefittet mit einer einfachen exponentiellen Funktion (Gleichung 5.13), c ist die charakteristische Lauflänge.

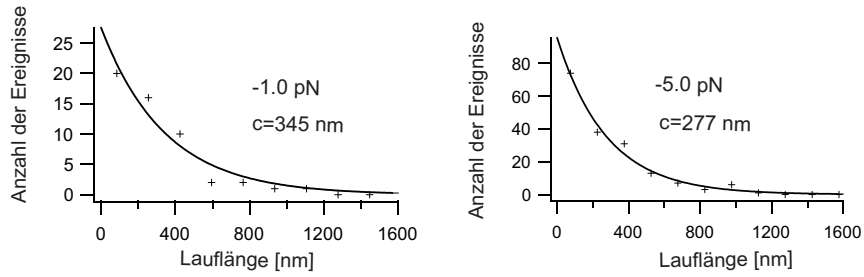


Abbildung 5.15: Verteilungen der Laufängen von Myosin-V bei Vorwärtskräften, gefittet mit einer einfach exponentiellen Funktion (Gleichung 5.13), c ist die charakteristische Lauflänge.

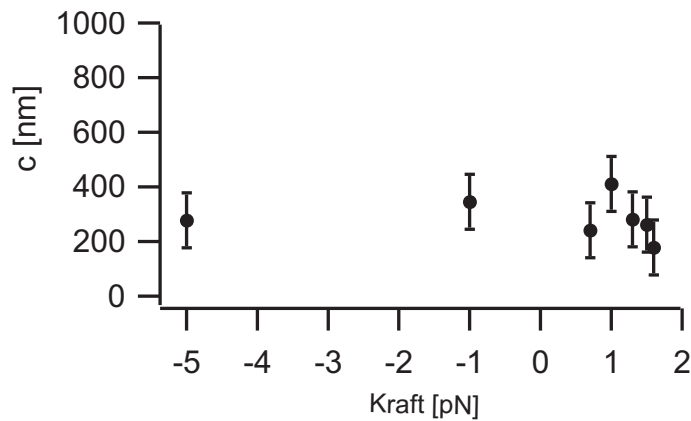


Abbildung 5.16: Kraftabhängigkeit der charakteristischen Lauflänge c .

Weiterhin wurden die Laufängen der Rückwärtsschritte des Myosin-V bei einer Rückwärtskraft von 5 pN bestimmt, deren Verteilung ist in Abb. 5.17 dargestellt. Die Verteilung zeigt ein einzellexponentielles Verhalten mit einer charakteristischen Lauflänge von 2-3 Schritten.

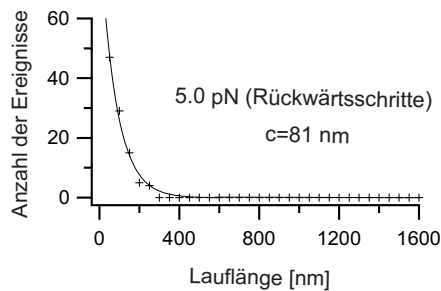


Abbildung 5.17: Verteilung der Laufängen der Rückwärtsschritte des Myosin-V bei 5 pN, gefittet mit einer einfach exponentiellen Funktion (Gleichung 5.13), c ist die charakteristische Lauflänge.

5.5 Diskussion der Ergebnisse

Viele Aspekte von Myosin-V sind konsistent mit einem chemomechanischen Modell, wie es in der Einleitung schon angesprochen wurde und das in Abb. 5.18 noch einmal schematisch dargestellt ist. Die meiste Zeit des Zyklus ist Myosin-V mit beiden Köpfen an Aktin gebunden. Beginnen wir mit einer Konfiguration, bei der beide Köpfe gebunden sind und der hintere Kopf kein Nukleotid enthält. ATP bindet an den hinteren Kopf, was zur Loslösung dieses Kopfes vom Filament führt und dem vorderen Kopf, der ADP gebunden hat, ermöglicht, seinen mechanischen Schlag zu vollziehen. ATP wird schnell hydrolysiert, der nun vordere Kopf bindet ans Aktin. Daraufhin sind beide Köpfe im ADP-gebundenen Zustand und möglicherweise verhindert intermolekulare Spannung frühzeitiges Loslösen des ADP im vorderen Kopf. Die limitierende Ratenkonstante im Zyklus ist mit $\sim 12/s$ ADP-Loslösen vom hinteren Kopf [14, 15, 48, 56, 70, 71].

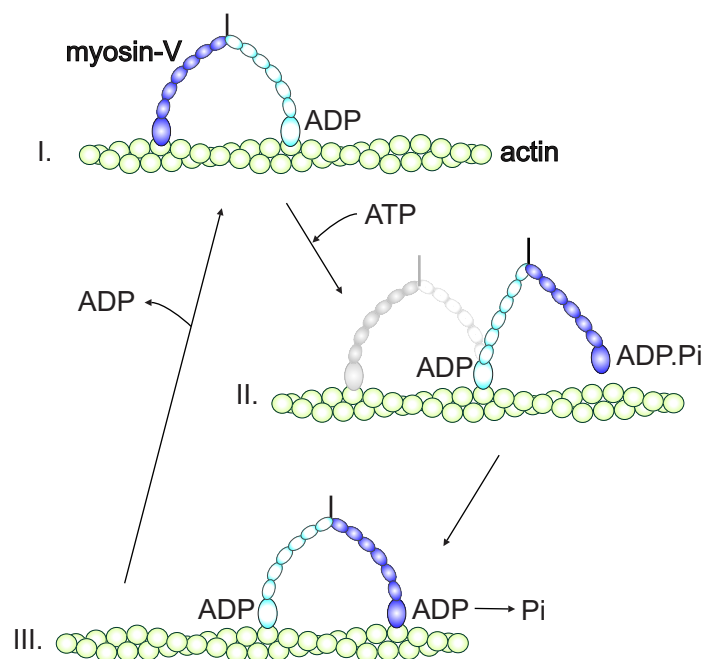


Abbildung 5.18: Modell des chemomechanischen Zyklus von Myosin-V. Die beiden Hebelarme mit den Köpfen des Myosin-V Moleküls sind in hellblau und dunkelblau gekennzeichnet, um sie unterscheiden zu können. Der Zyklus beginnt, wenn beide Köpfe an Aktin gebunden sind, der hintere Kopf kein Nukleotid gebunden hat und der vordere Kopf Adenosindiphosphat (ADP) enthält (siehe I). Adenosintriphosphat (ATP) bindet an den hinteren Kopf, was zum Loslösen vom Aktinfilament führt, und der vordere Kopf kann den mechanischen Schlag ausführen. (siehe II). ATP wird schnell hydrolysiert, der nun vordere Kopf bindet ans Aktin. Daraufhin sind beide Köpfe im ADP-gebundenen Zustand und intramolekulare Spannung verhindert möglicherweise das vorzeitige Loslösen des ADP im vorderen Kopf (siehe III). Der raten-limitierende Schritt des ADP-Loslösens vom hinteren Kopf schließt den Zyklus.

Welche Rückschlüsse lassen die kraftabhängigen Messungen auch in Zusammenhang mit inzwischen zahlreichen Untersuchungen anderer Wissenschaftler zu? Betrachten wir dazu zuerst die Schrittweiten, dann die beiden limitierenden Ratenkonstanten, die Lauflängen und schließlich die Rückwärtsschritte.

5.5.1 Schrittweiten

Schrittweiten von Myosin-V waren in einem weiten Bereich zwischen -5 pN und 1.5 pN praktisch unabhängig von der Kraft um ~ 36 nm zentriert. Die breiten Verteilungen der Schrittweiten zeigten die Flexibilität, mit der Myosin-V die Bindungstaschen am Aktin bei einem Schritt auswählen kann. Im Mittel war die Aktin-Pseudohelix allerdings mit einer Variabilität von < 2 nm extrem gut reproduziert. Dieses Ergebnis ist konsistent mit kürzlich durchgeführten Messungen von Forkey et al. [58], bei denen die Autoren von breiten Verteilungen des axialen Winkels relativ zum Aktinfilament berichten. Ali et al. [66] beobachteten die Rotation einzelner Myosin-V Motoren um ein frei hängendes Aktinfilament mit einer durchschnittlichen Schrittweite von nur 34.8 nm. In unseren Experimenten dagegen ist das Aktin an die Oberfläche gebunden. Bei einer solchen Geometrie, bei der der Motor nicht alle Bindungstaschen des Aktins erreichen kann, scheint Myosin-V die Schrittweite angleichen zu können, so dass lange lineare Läufe entlang des Aktinfilaments möglich sind.

Bei einer Kraft von 1.6 pN, sehr nahe der Anhaltekraft von 1.7 pN, konnte ein Einbruch der Schrittweiten beobachtet werden (siehe Abb. 5.5). Dieser Einbruch hin zu kleinen Schrittweiten läßt zwei Vermutungen zu. Es könnte sich bei den kleinen Schritten um Unterschritte innerhalb eines Zykluses handeln, die bei einer kraftabhängigen Ratenkonstante in diesem Zeitbereich auftreten. Es könnten aber auch ganze, eben nur kürzere Schritte mit einem vollen ATP-Zyklus sein, der Motor würde also in eine Art „zweiten Gang“ schalten.

Um beide Erklärungen zu testen, wurden verschiedene Untersuchungen vorgenommen (siehe auch Ergebnisse 5.4.2). So wurden alle Schritte ≤ 20 nm mit ihrem Nachfolger addiert. Sind diese Schritte Unterschritte eines ganzen Schrittes, dann sollte sich eine Verteilung um ~ 36 nm ergeben. Abb. 5.6B zeigt, dass die addierte Schrittweitenverteilung gut mit einer Gaußfunktion um ~ 38 nm gefittet werden kann. Dieses Verhalten lag also nah an der Erwartung an Unterschritte. Allerdings kann man mit dieser Untersuchung die kleinen, vollen Schritte nicht ausschließen. Das liegt an der Breite der gemessenen Verteilung (siehe Abb. 5.5). Der Mittelwert aller Schritte lag bei 28 nm. Addiert man also Schritte zwischen 10 und 20 nm mit ihrem Nachfolger (der im Mittel bei 28 nm liegt), dann sollte sich eine Verteilung um so etwa $15+28=43$ nm ergeben. Dieser Wert liegt zu nah am Mittelwert der addierten Schrittweitenverteilung von ~ 38 , um diese Möglichkeit auszuschließen.

Weiterhin wurden die Verweildauern untersucht. Auf den ersten Blick sieht die Verteilung wie bei anderen Kräften aus und kann mit einer doppelt exponentiellen Funktion (Gleichung 2.7) gefittet werden. Das läßt eher auf volle Schritte schließen. Betrachtet man aber die Verweildauern zu verschiedenen Schrittgrößen (siehe

Tabelle 5.1), so erkennt man, dass kürzere Schritte kleinere Verweildauern zeigen. Eigentlich ein Indiz für Unterschritte. Daraufhin wurden auch die kleineren Schritte bei anderen Kräften untersucht und es zeigte sich, dass auch hier kleinere Schritte kürzere Verweildauern hatten. Handelt es sich also doch um kleine, ganze Schritte? Von der Geometrie des Aktinfilaments wären solche Schritte möglich (siehe Abb. 5.19). Das Filament besteht aus 5.5 nm großen Untereinheiten, auf denen sich jeweils eine Bindungstasche für Myosin befindet [72]. Geht man davon aus, dass neben den Bindungstaschen im Abstand von ~ 36 nm auch die zwei Bindungstaschen vorher bzw. hinterher vom Motor erreicht werden können, dann können gemessenen Schrittfolgen erklärt werden. Diese sogenannten „target zones“ auf dem Aktin, an die Myosin binden kann, wurden schon früher von Steffen et al. [73] gefunden. Ein Beispiel, wie ein Lauf des Motors in diesem Bild erklärt werden kann, zeigt Abb. 5.19. Allerdings müsste der Motor dabei manchmal sehr große Wege auf dem Filament umspannen, wie z. B. in Abb. 5.19 C beim 50 nm-Schritt. Dies erscheint bei hohen externen Kräften eher unwahrscheinlich, auch wenn die Schrittverteilungen bei niedrigeren Kräften die große Variabilität, mit der Myosin-V die Schrittweiten anpassen kann, zeigte. Eventuell könnte es sich bei diesen Schritten auch um Doppelschritte handeln, die nicht aufgelöst werden konnten.

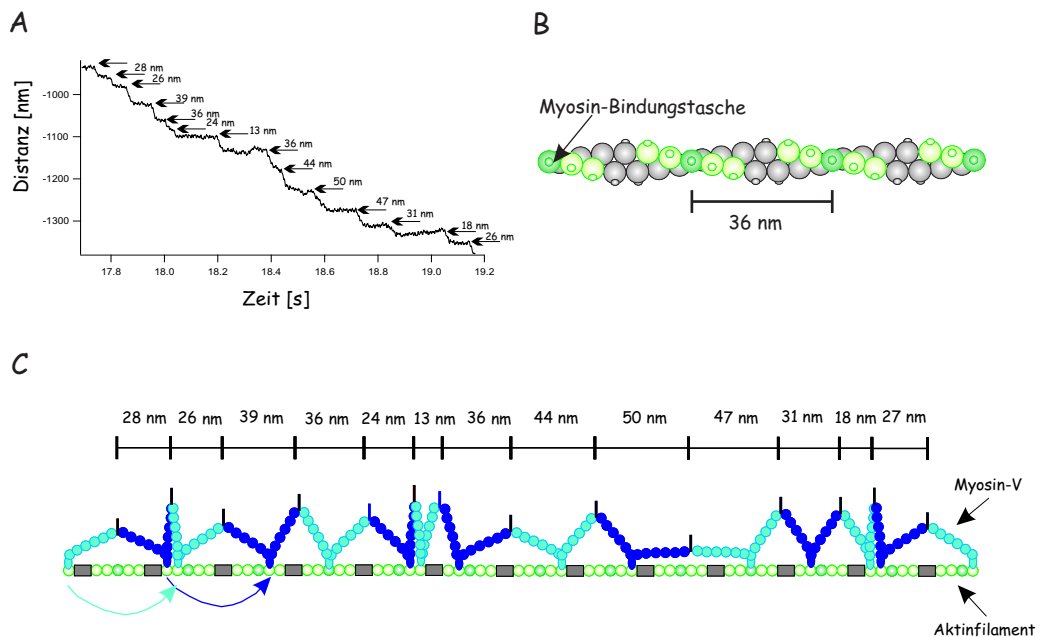


Abbildung 5.19: (A) Beispielkurve des Piezotisch-Signals, das den Schritten des Myosin-V bei einer externen Kraft von 1.6 pN folgt. (B) Schematische Darstellung des Aktinfilaments. Jede etwa kugelförmige Untereinheit dieses Proteins hat eine Myosin-Bindungstasche. Der Pseudorepeat-Abstand dieser Helix beträgt ~ 36 nm. Die grün gekennzeichneten Untereinheiten sollen diejenigen Bindungstaschen kennzeichnen, die Myosin-V erreichen kann, wenn das Filament, wie bei den durchgeführten Experimenten, am Deckgläschen befestigt ist. (C) Möglicher Weg des Myosin-V (zur Unterscheidung der beiden Arme in türkis und dunkelblau gekennzeichnet) entlang des Aktinfilaments, bezogen auf den in (A) gezeigten Lauf und die in (B) dargestellten Bindungsmöglichkeiten.

Für die vollen Schritte sprach vor allem die Tatsache, dass kleinere Schritte bei allen Kräften im Mittel kürzere Verweildauern zeigten. Um einen Vergleich zu anderen Experimenten herzustellen, wurden Daten, die Matthias Rief an der Pinzette in Stanford gemessen hatte [14], auf diesen Effekt hin untersucht. Die Messungen zeigten diesen Effekt nicht. Die Experimente unterschieden sich vor allem im Feedback-Schema. Hatte der Feedback über den Piezotisch gegenüber den früheren Ausführungen über akusto-optische Deflektoren den Vorteil, dass ganze Läufe des Myosin-V über mehrere Mikrometer aufgenommen werden können, so ist er aber durch den Piezotisch in seiner Antwortzeit auf ~ 10 ms limitiert. Es könnte sein, dass dadurch in den Experimenten das Signal bei kleinen Verweildauern noch nicht die endgültige Schrittweite erreicht hat und so als kleinerer Schritt erscheint. Gegen diese Annahme spricht, dass die mittleren Verweildauern auch bei kleinen Schritten im Bereich von 100 ms, also weit über der Antwortzeit von ~ 10 ms lagen. Die Daten zeigen aber, wie z. B. in Abb. 5.19 A zu sehen, oft ein starkes „Schleichen“ in die entsprechenden Niveaus. Die Schritte sind keine klaren Stufen. Eventuell liegt dies am Motor selbst. Für die Unterschritte spricht auch, dass Uemura et al. kürzlich Unterschritte feststellten [74]. Wenn man außerdem die Verteilungen der Schrittweiten bei niedrigen Kräften genau ansieht, bemerkt man jeweils eine kleine Menge an kurzen Schritten. Auch das spricht eher für die Unterschritte und gegen die Interpretation als „zweiten Gang“ bei hohen Kräften. Insgesamt lässt es die Breite der Verteilung aber nicht zu, eine der Möglichkeiten auszuwählen.

Die Auflösung könnte vielleicht mit einer sehr guten Präparation von Myosin-V und mit einem erweiterten Feedback-System erhöht werden. Zur Verbesserung der Antwortzeit könnte neben dem Piezotisch über kurze Strecken auch eine Regelung über die akusto-optischen Deflektoren integriert werden.

Die gemessene Anhaltekraft von ~ 1.7 pN ist etwas kleiner als die von Mehta et al. berichtete [13]. Eventuell spielt die unterschiedliche Geometrie der Experimente eine Rolle, so greifen die Kräfte bei den Experimenten z. B. unter verschiedenen Winkeln an den Motor an. Um dies zu testen, wären Experimente geeignet, die die von Mehta et al. verwendete Zwei-Kugel-Geometrie in den Aufbau integrieren und unter sonst gleichen Bedingungen die Anhaltekraft testen.

5.5.2 Kraftabhängige Übergänge im chemomechanischen Zyklus

Bei rückwärts gerichteten Kräften zwischen 0.7 pN und 1.5 pN konnten zwei kraftabhängige Ratenkonstanten gefunden werden. Die langsamere Ratenkonstante k_2 hängt nur schwach von der Kraft ab mit einer Übergangsrate (Gleichung 5.11) mit $d_2 = (0.3 \pm 0.2)$ nm (Abb. 5.12), während die schnellere Ratenkonstante k_1 eine stärkere Kraftabhängigkeit vorweist mit $d_2 = (3 \pm 2)$ nm (Abb. 5.12 durchgezogene Linie). Dieses Ergebnis wird durch die Untersuchung der Kraftabhängigkeit der Gesamtgeschwindigkeit des Motors gestützt. Ähnliche Werte für k_1 und k_2 wie oben fitten auch die Relation Gesamtgeschwindigkeit-Kraft (Abb. 5.13) gut. Experimen-

ten von Rief et al. [14] konnte die langsamere Ratenkonstante als ADP-Loslösen identifiziert werden. Daher kann man schließen, dass im doppelköpfigen Myosin-V ADP-Loslösen nur wenig kraftabhängig ist. Sogar bei vorwärts gerichteten Kräften von -5 pN läuft der Motor nur mit einem Faktor von ~ 1.5 schneller. Auf den ersten Blick scheint dieses Ergebnis in Widerspruch mit Untersuchungen an einköpfigen Myosin-V Konstrukten zu stehen, die zeigen, dass 5 nm des Powerstrokes an ADP-release gekoppelt ist [48]. Daher würde man eine starke Kraftabhängigkeit dieses Übergangs erwarten, wenn man annimmt, dass die Übergangsposition d in etwa in der Mitte dieses Übergangs liegt. Außerdem zeigten Einzelmolekülexperimente mit Muskelmyosin [53] eine starke Kraftabhängigkeit von ADP-Loslösen ($d=1.3$ nm) bei einzelnen Muskelmyosin-Aktin Verbindungen. Kürzlich durchgeführte theoretische Betrachtungen von A. Vilfan [47], ebenso wie die in Kapitel 2.3 beschriebenen, eigenen Abschätzungen, zeigen, dass interne Konfigurations-Übergänge bei einem zweiköpfigen Motor, bei dem beide Köpfe fest an Aktin gebunden sind, den Schwerpunkt dieses Motors kaum beeinflussen. Die Konfigurations-Änderung wird dabei vor allem durch die Biegung der Leverarme absorbiert. Dieses Argument erklärt die Beobachtung, dass ADP-Loslösen beim doppelköpfigen Myosin-V weitgehend unabhängig von äußeren Kräften ist (Abb. 5.12), während bei einköpfigen Motoren ADP-Loslösen durchaus stark von der Kraft abhängen kann. Diese Ergebnisse sind also in Einklang mit dem heute weitgehend akzeptierten Mechanismus von interner Spannung, die die zwei Köpfe koordiniert, indem ADP-Loslösen im vorderen Kopf, der unter Spannung in Rückrichtung steht, verlangsamt und im hinteren Kopf, der unter Spannung in Vorwärtsrichtung steht, beschleunigt wird (Abb. 5.18 III) [14, 48, 70].

Dieses Ergebnis zeigt, wie die Natur einen doppelköpfigen, gegenüber externen Kräften sehr robusten Motor entwickeln konnte, indem zwei Köpfe kombiniert wurden, von denen jeder einzelne sehr Kraft-sensitiv ist. Diese Robustheit ist besonders wichtig, wenn man bedenkt, dass Myosin-V in vivo zusammen mit sehr starken Motoren wie z. B. Kinesinen gefunden wurde [19, 20]. Interessanter Weise wurde kürzlich von Altman et al. [75] berichtet, dass auch das doppelköpfige Myosin-VI bei sättigendem ATP nur eine schwache Kraftabhängigkeit des ADP-Loslösens zeigt.

Die Analyse der Verweildauerverteilungen unter einer konstanten Kraft erlaubt direkte Beobachtung der Kraftabhängigkeit von ADP-Loslösen. Kürzlich interpretierten Uermura et al. [74] eine stark kraftabhängige Ratenkonstante mit einer Übergangsposition d von ~ 12 nm als ADP-Loslösen. Eine Konsequenz dieser so starken Kraftabhängigkeit wäre aber, dass ADP-Loslösen ohne externe Kraft mit einer Ratenkonstante von $\sim 1000/s$ passieren müsste. Das ist schwer in Einklang zu bringen mit dem von mehreren Gruppen unabhängig gemessenen Wert von $\sim 10/s$ [14, 15, 48, 56, 70, 71]. Andererseits würde eine zusätzliche, kraftabhängige Ratenkonstante mit einem solch großen d das scharfe Abfallen der Geschwindigkeit bei der Anhaltkraft auch in unseren Messungen erklären.

Im Gegensatz zu ADP-Loslösen zeigt die schnellere der beiden Ratenkonstanten mit $d_1 = (3 \pm 2)$ nm bei Rückwärtskräften eine starke Kraftabhängigkeit (Abb. 5.12).

Dabei ist es wichtig zu erwähnen, dass das Zwei-Zustands-Modell (Gleichung 2.2), das zur Analyse der Verteilungen verwendet wurde, eine einfache Näherung darstellt und k_1 eine zusammenfassende Ratenkonstante darstellt, die die Summe aller schnellerer Ratenkonstanten im chemomechanischen Zyklus des Motors beinhaltet. Da k_1 eine ausgeprägte Kraftabhängigkeit mit einer großen Übergangsposition zeigt, muss damit auch eine erhebliche Bewegung entlang des Aktinfilaments verbunden sein. Da Konfigurationssänderungen, bei denen beiden Köpfen am Aktin gebunden sind, nicht zu beträchtlichen Bewegungen führen können (siehe Kapitel 2.3 bzw. [47]), wird dieser Übergang wahrscheinlich in einer Konfiguration passieren, bei der nur ein Kopf am Aktin gebunden ist. Daher kann man den 5 nm Anteil des Powerstrokes, der mit ADP-Loslassen verbunden sein könnte, ausschließen. Es bleiben zwei mögliche Kandidaten für k_1 : Der hauptsächliche Powerstroke von 25 nm oder das diffusive Suchen des vorderen Kopfes nach der korrekten Bindungstasche am Aktin von ~ 6 nm [48]. Dabei erscheint letzteres aus zwei Gründen plausibler. Erstens hat das diffusive Suchen wahrscheinlich eine Übergangsposition sehr nah am Ende dieser Bewegung, da erst hier ein „Einrasten“ des Kopfes passieren kann, und der Wert von $d_1 = (3 \pm 2)$ nm kommt den erwarteten ~ 5 nm sehr nahe. Zweitens würde die Kinetik des Powerstrokes, wenn die Übergangsposition des hauptsächlichen Powerstrokes so nah an der Anfangskonfiguration läge, auch bei der Anhaltekraft von 1.7 pN noch ~ 20 s⁻¹ betragen und man würde beim Anhalten des Motors schnelle Oszillationen zwischen Pre- und Postpowerstroke-Konfigurationen erwarten. Das konnte aber nicht beobachtet werden.

5.5.3 Rückwärtsschritte

Bei Kräften weit über der Anhaltekraft kann der Motor nicht mehr vorwärts laufen, stattdessen konnten Rückwärtsschritte beobachtet werden. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie Rückwärtsschritte von molekularen Motoren an den kinetischen Zyklus gekoppelt sein können. Bei Kinesin z. B. wurde gefunden, dass das Rückwärtslaufen mit ATP-Hydrolyse gekoppelt ist [78]. Wie erst kürzlich für den Rotationsmotor F_1 -ATPase demonstriert, führt erzwungene Rückwärtsbewegung in einem fest gekoppelten System zu ATP-Synthese [79]. Auch wenn dies vielleicht auch für lineare Motoren wie Myosin-V möglich ist, so sind doch die Konzentrationen von ADP und Pi in unseren Experimenten viel zu niedrig, um bei den hohen, gemessenen Ratenkonstanten von ~ 7 /s fest gekoppeltes Rückwärtsschreiten zu erlauben. Ein weniger fest gekoppeltes Modell für die durch externe Kraft ausgelösten Rückwärtsschritte erscheint sinnvoll. Wahrscheinlich bewirken die hohen Kräfte das Loslassen des vorderen Kopfes. Die externe Kraft könnte den Powerstroke im hinteren Kopf, der dieser Kraft nun voll ausgesetzt ist, umkehren. Der andere Kopf könnte dann an der neuen hinteren Position binden. Dieser Mechanismus würde mechanische Theorien, z. B. auch die in Kapitel 2.3 geschilderten eigenen Abschätzungen stützen und bedeutete, dass der „powerstroke“ bei der Bewegung nicht fest an ein chemisches Ereignis, wie z. B. Phosphat-Loslösen, gebunden ist.

Zur genaueren Untersuchung der Koordination der beiden Köpfe bei der kraftinduzierten Rückwärtsbewegung werden gerade im Rahmen der Diplomarbeit von C. Gebhard an der optischen Falle weitere Experimente unter verschiedenen Kräften, ATP-, ADP und Phosphat-Konzentrationen durchgeführt. Erste Ergebnisse dort zeigen, dass die Rückwärtsschritte auch ohne ATP möglich sind, was die obige Interpretation stützt.

5.5.4 Lauflängen

Eine charakteristische Größe von prozessiven Motoren ist die Distanz, die sie laufen können, bevor sie das Aktinfilament loslassen. In den durchgeführten Experimenten wurden Lauflängen von ~ 10 Schritten gefunden (Abb. 5.16). Diese Zahl erscheint recht klein im Vergleich zu Einzelmolekül-Fluoreszenz-Experimenten oder in *in vitro* gliding-assays [50, 13, 63]. Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen zieht in unseren Experimenten der Feedback den Motor jedoch vom Aktinfilament weg, sobald er loslässt. Er beeinträchtigt also die Diffusion des Motors und verhindert dadurch eventuell ein schnelles Wiederanbinden ans Aktin, was bei anderen Untersuchungen möglich ist.

Wie für Kinesin zeigen die Verteilungen der Lauflängen ein einfach exponentielles Verhalten (Abb. 5.14 und Abb. 5.15), was darauf schließen lässt, dass ein einziger Prozess das Loslösen vom Filament bewirkt [45, 69, 76]. Im Gegensatz zu Kinesin aber, bei dem die Lauflänge exponentiell von der angelegten Kraft abhängt, ist die Lauflänge von Myosin-V im Grunde kraftunabhängig. Diese Kraftunabhängigkeit der Lauflänge bedeutet, dass die Bindung, die beim Loslösen bricht, eine Übergangsposition zeigt, die sehr nahe der bei der Konfiguration ohne äußere Kraft liegt. Ein Kandidat für ein solch kurzreichweitiges Potential wäre die Myosin-Aktin-Verbindung. Wie in [50, 77] vorgeschlagen, wird ein Lauf wohl am wahrscheinlichsten beendet, wenn nur ein Kopf an Aktin gebunden ist.

In der folgenden, abschließenden Bemerkung werden die wichtigsten Diskussionspunkte zusammenfassend dargestellt.

Abschließende Bemerkungen und Ausblick

Wie in den Diskussionen der Ergebnisse ausführlich dargestellt, konnten die Untersuchungen dieser Arbeit viele Aspekte erster Modelle des chemomechanischen Zyklus von Myosin-V überprüfen und ausbauen. Einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Prozessivität brachten Einzelmolekülfluoreszenz-Experimente, die ein raupenähnliches Modell ausschließen und ein „Hand-über-Hand“ Modell bestärken. Weitere Einblicke gestatteten die kraftabhängigen Experimente, die unter anderem zwei kraftabhängige, limitierende Raten zeigten, die mit ADP-Loslösen und dem diffusiven Suchen der Bindungstasche identifiziert werden konnten. Zusammen mit einigen mechanischen Abschätzungen stützen diese Ergebnisse ein Modell, bei dem Myosin-V die längste Zeit mit beiden Armen am Aktin gebunden ist und in diesem Zustand, der mit der Rate ADP-Loslösen gekoppelt ist, keine großen Schwerpunktsbewegungen durchführt. Geht man, wie in den theoretischen Betrachtungen beschrieben, weiterhin davon aus, dass die ATP-Hydrolyse im vorderen Kopf zu einem Drehmoment führt, dann ist der „Doppelbalken“ Myosin-V vorgespannt. Nachdem ADP vom hinteren Kopf loslöst, kann ATP an diesen binden. Dadurch kann der Kopf abreißen und durch die interne Vorspannung schwingt er nach vorne, was den größten Teil der Schwerpunktsbewegung ausmacht. Dieser Vorgang könnte ein rein mechanischer sein und erste, grobe Abschätzungen ergäben dann eine typische Zeitskala von Mikrosekunden. Für eine mechanische Beschreibung sprechen auch die in den kraftabhängigen Messungen beobachteten Rückwärtsschritte, zu denen der Motor unter hohen Rückwärtskräften sehr wahrscheinlich ohne Einbezug des chemischen Zykluses fähig ist. Dies würde auch darauf hindeuten, dass der „powerstroke“ nicht an ein chemisches Ereignis wie z. B. Phosphat-Loslösen gekoppelt ist. Die gemessene, mittlere Schrittweite lag in weiten Kraftbereichen immer bei ~ 36 nm. Allerdings zeigte die Breite der Schrittweitenverteilungen, dass Myosin-V flexibel an verschiedene Bindungstaschen auch in anderen Abständen als 36 nm binden kann. Wahrscheinlich kommt es dabei vor allem darauf an, wo der freie Arm nach dem Vorschwingen landet, denn das darauf folgende, diffusive Suchen des nach vorne geschleuderten Armes, das mit der zweiten limitierenden Rate identifiziert werden konnte, zeigt zwar über die starke Kraftabhängigkeit einen damit verbundenen Weg, allerdings beträgt der „nur“ wenige Nanometer. Ob das Phosphat vor oder nach dem Anbinden ans Aktin abgegeben wird, ist noch unklar. Nach dem Anbinden ans Aktin mit dem vorderen Arm hält Myosin-V wieder mit beiden Armen am Aktinfilament fest und der Zyklus startet von neuem.

Die kraftabhängigen Messungen zeigten, dass Myosin erstaunlich robust auf äußere Kräfte reagiert. Sogar sehr hohe Kräfte beeinflussten die Lauflänge und Geschwindigkeit nur wenig. Wenn die molekularen Motoren ihre Last frei durch eine wässrige Lösung tragen, dann werden sie die meiste Zeit nur sehr geringen Kräften ausgesetzt sein. In einer Zelle aber, in der sie durch ein dichtes Zytoskelett laufen und

sich möglicherweise gegen andere, stärkere Motoren durchsetzen müssen, kann das Verhalten von Myosin-V unter sehr hohen Kräften von entscheidender Bedeutung bei seinem Einsatz als Transporter sein. Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass die Natur durch Kombination von zwei Köpfen einen Motor entwickelt hat, der sehr viel widerstandsfähiger gegenüber externen Kräften ist als die einzelnen Komponenten, aus denen er zusammengesetzt ist.

Für weitere Einblicke in die Funktionsweise molekularer Motoren ist in zukünftigen Experimenten geplant, die optischen und mechanischen Untersuchungsmethoden zu kombinieren. So könnte man z. B., während mittels der optischen Pinzette Läufe des Myosin-V aufgezeichnet werden, gleichzeitig einzelne, fluoreszenzmarkierte ATP-Moleküle, die an den Motor binden, mittels des TIRF-Mikroskops beobachten. Es wäre faszinierend direkt zu zeigen, dass Myosin-V pro Schritt wirklich ein ATP hydrolysiert. Die Zeit, die das fluoreszierende Molekül am Myosin-V bleibt, könnte weitere Rückschlüsse auf den chemomechanischen Zyklus geben. Hierfür wurden in dieser Arbeit schon einige grundlegende Experimente durchgeführt. So zeigte sich in Motilitätsassays, dass Myosin-V mit Cy3- oder Cy5-markiertem ATP gut lief, während bei Verwendung von entsprechenden Alexa-Farbstoffen die Bewegung stark beeinträchtigt war. Weiterhin wurde zur Detektion der Einzelmolekülfluoreszenz auch ein für diese Versuche geeigneter Avalanche-Photodiode-Detektor in den Aufbau integriert, der mit einem Dunkelstrom von <50 counts/s sogar einzelne Photonen zählen kann.

Ein wichtiger Punkt ist auch die Untersuchung der in dieser Arbeit gefundenen Rückwärtsschritte von Myosin-V. Es bleibt durch Experimente mit verschiedenen externen Kräften und Konzentrationen von ATP, ADP oder Phosphat zu klären, ob diese Schritte wirklich unabhängig vom chemomechanischen Zyklus sind und wie sie zu Stande kommen.

Die aufgebaute, optische Pinzette in Verbindung mit dem TIRF-Mikroskop eignet sich für viele weitere Experimente. So können andere Motorproteine, wie z. B. Kinesine untersucht werden. Durch die Möglichkeit, mehrere Kugeln zu fangen und unabhängig voneinander zu bewegen, kann die Falle außerdem zur Einzelmolekül-Kraftspektroskopie verwendet werden. Die Auflösungen der Kraft-Abstandskurve liegen dabei im nm- bzw. Femto- und Piconewtonbereich. In naher Zukunft ist geplant, an zwei Kugeln jeweils ein Aktinfilament zu bringen und diese beiden Filamente über ein einzelnes Myosin-V zu koppeln. Zieht man nun die beiden in der Falle gefangenen Kugeln auseinander, werden diese der mechanischen Reaktion des schwächsten Glieds in dieser Kette, vermutlich der Entfaltung des Motorproteins, folgen. Damit ließen sich die elastischen Eigenschaften von Myosin-V bestimmen, was weitere Rückschlüsse auf die Funktionsweise ermöglichen könnte.

Literaturverzeichnis

- [1] K. Kinoshita Jr., K. Adachi und H. Itoh, *Rotation of F1-ATPase: How an ATP-driven Molecular Machine may work*, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **32** 245-68 (2004)
- [2] S. Reck-Peterson, D. W. Provan, M. S. Mooseker und J. A. Mercer, *Class V myosins*, Biochim. Biophys. Acta **1496** 36-51 (2000)
- [3] R. E. Cheney, M. K. O'Shea, J. E. Heuser, M. V. Coelho, J. S. Wolenski, E. M. Espreafino, P. Forscher, R. E. Larson und M. S. Mooseker, *Brain Myosin-V is a two-headed Unconventional Myosin with motor activity*, Cell **75** 13 (1993)
- [4] G. C. Johnston, J. A. Pendergast und R. A. Singer, *The Saccharomyces cerevisiae MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles*, J Cell Biol **113** 539-551 (1991)
- [5] J. A. Mercer, P. K. Seperack, M. C. Strobel, N. G. Copeland und N. A. Jenkins, *Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colours locus*, Nature **352** 574 (1991)
- [6] F. S. Espindola, E. M. Espreafico, M. V. Coelho, A. R. Martins, F. R. Costa, S. Mooseker und R. E. Larson, *Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: a novel calmodulin-binding myosin*, J Cell Biol **118** 359-68 (1992)
- [7] R. E. Larson, D. E. Pitta und J. A. Ferro, *A novel 190KDa calmodulin-binding protein associated with brain actomyosin*, Braz. J. Med. Biol. Res. **21** 213-217 (1988)
- [8] E. Bertrand, P. Chartrand, M. Schaefer, M. Shenoy, S. M. Singer und R. H. Long, *Localisation of ASH 1 mRNA particles in living yeast*, Mol Cell **2** 437-445 (1998)
- [9] M. L. Walker, S. A. Burgess, J. R. Sellers, F. Wang, J. A. Hammer, J. Trinick und P. J. Knight, *Two-headed binding of a processive myosin to F-actin*, Nature **405** 804-7 (2000)

- [10] S. Burgess, M. Walker, F. Wang, J. R. Sellers, H. D. White, P. J. Knight und J. Trinick, *The prepower stroke conformation of myosin V*, J Cell Biol **159** 983-91 (2002)
- [11] P. D. Coureux, A. L. Wells, J. Menetrey, C. M. Yengo, C. A. Morris, H. L. Sweeney und A. Houdusse, *A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide*, Nature **425** 419-23 (2003)
- [12] F. Wang, K. Thirumurugan, W. F. Stafford, J. A. Hammer, P. J. Knight und J. R. Sellers, *Regulated conformation of myosin V*, J Biol Chem **279** 2333-6 (2004)
- [13] A. D. Mehta, R. S. Rock, M. Rief, J. A. Spudich, M. S. Mooseker und R. E. Cheney, *Myosin-V is a processive actin-based motor*, Nature **400** 590-3 (1999)
- [14] M. Rief, R. S. Rock, A. D. Mehta, M. S. Mooseker, R. E. Cheney und J. A. Spudich, *Myosin-V stepping kinetics: a molecular model for processivity*, Proc Natl Acad Sci U S A **97** 9482-6 (2000)
- [15] E. M. De La Cruz, A. L. Wells, S. S. Rosenfeld, E. M. Ostap, und H. L. Sweeney, *The kinetic mechanism of myosin V*, Proc Natl Acad Sci U S A **96** 13726-31 (1999)
- [16] E. M. De La Cruz, H. L. Sweeney, E. M. Ostap, *ADP inhibition of myosin V ATPase activity*, Biophys J **79** 1524-9 (2000)
- [17] E. M. De La Cruz, A. L. Wells, H. L. Sweeney, E. M. Ostap, *Actin and light chain isoform dependence of myosin V kinetics*, Biochemistry **39** 14196-202 (2000)
- [18] W. Hua, J. Chung und J. Gelles, *Distinguishing inchworm and hand-over-hand processive kinesin movement by neck rotation measurements*, Science **295** 844 (2002)
- [19] J. D. Huang, S. T. Brady, B. W. Richards, D. Stenolen, J. H. Resau, N. G. Copeland und N. A. Jenkins, *Direct interaction of microtubule- and actin-based transport motors*, Nature **397** 267-70 (1999)
- [20] V. Mermall, P. L. Post und M. S. Mooseker, *Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction*, Science **279** 527-33 (1998)
- [21] J. K. Foskett und S. Ginstein, *Noninvasive Techniques in Cell Biology*, Wiley-Liss, Inc. 1990 (§15 S. M. Block, *optical tweezers: a new tool for biophysics*)
- [22] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm und S. Chu, *Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*, Opt Lett **11** 288-290 (1986)
- [23] A. Ashkin und J. M. Dziedzic, *Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria*, Science **235** 1517-1520 (1987)

- [24] A. Ashkin, *Force of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime*, Biophys. J. **51** (1992)
- [25] www.olympusmicro.com und www.zeiss.com
- [26] M. P. Sheetz, *Laser tweezers in cell biology*, Academic Press, San Diego (1998)
- [27] J. Quellette, *Lasers open up the Life Science*, The Industrial Physicist **5** 9-13 (1999)
- [28] M. J. Lang und S. M. Block, *Resource Letter: LBOT-1: Laser based optical tweezers*, Am J Phys **71** 201-215 (2003)
- [29] E. M. Purcell, *Electricity and Magnetism*, Berkeley Physics course, Volume 2. New York: MacGraw-Hill, Inc. 1985
- [30] P. W. Smith, A. Ashkin und W. J. Tomlinson, *Four-wave mixing in an artificial Kerr medium*, Optics Lett **6** 284-286 (1981)
- [31] J. B. Barton, D. R. Alexander und S. A. Achaub, *Theoretical determination of net radiation force and torque for a spherical particle illuminated by a focused laser beam*, J. Appl. Phys. **66** 4594-4602 (1989)
- [32] K. C. Neumann, E. H. Chadd, G. F. Liou, K. Bergmann, S. M. Block *Characterization of photodamage to escherichia coli in optical traps*, Biophys. J. **77** 2856-63 (1999)
- [33] K. Visscher, S. P. Gross und S. M. Block, *Construction of Multiple-Beam Optical Traps with Nanometer-Resolution Position Sensing*, IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics **2** (1996)
- [34] K. Svoboda und S. M. Block, *Biological applications of optical forces.*, Annu Rev Biophys Biomol Struct **23** 247-85 (1994)
- [35] A. Sharma und S. G. Schulmann, *Introduction to Fluorescence Spektroskopie*, New York, Wiley, 1999
- [36] M. Kramer und C. Zeiss, *Evaneszente Wellen in der Mikroskopie* Photonik 2 (www.zeiss.com) (2004)
- [37] A. Ishijima, H. Kojima, T. Funatsu, M. Tokunaga, H. Higuchi, H. Tanaka und T. Yanagida, *Simultaneous Observation of Individual ATPase and Mechanical Events by a Single Myosin Molecule during Interaction with Actin*, Cell **92** 161-71 (1998)
- [38] C. S. Peskin und G. Oster, *Coordinated hydrolysis explains the mechanical behavior of kinesin*, Biophys J **68** 202-211 (1995)
- [39] W. R. Schief und J. Howard, *Conformational changes during kinesin motility*, Curr. Opin. Cell Biol. **13** 19-28 (2001)

- [40] M. E. Fisher and A. B. Kolomeisky, *The force exerted by a molecular motor*, PNAS **96** 6597 (1999)
- [41] M. E. Fisher and A. B. Kolomeisky, *Simple mechanochemistry describes the dynamics of kinesin molecules*, PNAS **96** 6597 (1999)
- [42] Thomas N., Imafuku Y., Kamiya T. and Tawada K. *Kinesin: a molecular motor with a spring in its step*, Proc. Roy. Soc. London B **269** 2363-2371 (2002)
- [43] A. B. Kolomeisky und M. E. Fisher, *A Simple Kinetic Model Describes the Processivity of Myosin-V*, Biophys. J **84** 1642-1650 (2003)
- [44] G. I. Bell, *Models for the specific adhesion of cells to cells*, Science **200** 618-627 (1978)
- [45] M. J. Schnitzer, K. Visscher und S. M. Block, *force production by single kinesin motors*, Nat Cell Biol **2** 718-23 (2000)
- [46] T. L. Hill, *Theoretical formalism for the sliding filament model of contraction of striated muscle. Part. I*, Prog. Biophys. Mol. Biol. **28** 267-340 (1974)
- [47] A. Vilfan, *Elastic lever arm model for myosin V*, Biophys J submitted.
- [48] C. Veigel, F. Wang, M. L. Bartoo, J. R. Sellers, J. E. Molloy, *The gated gait of the processive molecular motor, myosin V*, Nat Cell Biol **4** 59-65 (2002)
- [49] C. M. Yengo, H. L. Sweeney *Functional role of loop 2 in myosin V.*, Biochemistry **43** 2605-12 (2004)
- [50] J. E. Baker, E. B. Krementsova, G. G. Kennedy, A. Armstrong, K. M. Trybus und D. M. Warshaw, *Myosin V processivity: multiple kinetic pathways for head-to-head coordination*, Proc Natl Acad Sci U S A **101** 5542-6 (2004)
- [51] L. D. Landau und E. M. Lifschitz, *Lehrbuch der theoretischen Physik VII, Elastizitätstheorie*, § 20, Akademie-Verlag Berlin 1983
- [52] J. Howard, *Mechanics of Motor Proteins and Cytoskeleton*, Dinauer Ass Sunderland, Massach. 2001
- [53] C. Veigel, J. E. Molloy, S. Schmitz und J. Kendrick-Jones, *Load-dependent kinetics of force production by smooth muscle myosin measured with optical tweezers*, Nat Cell Biol **5** 980-6 (2003)
- [54] C. Veigel, M. L. Bartoo, D. C. White, J. C. Sparrow und J. E. Molloy, *The stiffness of rabbit skeletal actomyosin cross-bridges determined with an optical tweezers transducer*, Biophys J **75** 1424-38 (1998)
- [55] K. Visscher und S. M. Block, *Versatile Optical Traps with Feedback Control*, Methods in Enzymology (1997)

- [56] A. Mehta, *Myosin learns to walk*, J Cell Sci **114** 1981-98 (2001)
- [57] T. J. Purcell, C. Morris, J. A. Spudich und H. L. Sweeney, *Role of the lever arm in the processive stepping of myosin V*, Proc Natl Acad Sci U S A **99** 14159-64 (2002)
- [58] J. N. Forkey, M. E. Quinlan, M. A. Shaw, J. E. Corrie und Y. E. Goldman, *Three-dimensional structural dynamics of myosin V by single-molecule fluorescence polarization*, Nature **422** 399-404 (2003)
- [59] R. E. Cheney, *Purification and assay of myosin V*, Methods Enzymol **298** 3-18 (1998)
- [60] S. MacLean-Fletcher und T. D. Pollard, *Identification of a factor in conventional muscle actin preparations which inhibits actin filament self-association*, Biochem Biophys Res Commun **96** 18-27 (1980)
- [61] J. D. Pardee, J. A. Spudich und J. A. Ferro, *Purification of muscle actin*, Methods Cell Biol **214** 271-89 (1982)
- [62] A. D. Mehta, J. T. Finer und J. A. Spudich, *Use of optical traps in single-molecule study of nonprocessive biological motors*, Methods Enzymol **298** 436-59 (1998)
- [63] T. Sakamoto, I. Amitani, E. Yokata und T. Ando, *Direct Observation of Processive Movement of Individual Myosin-V Molecules*, Biochemical and Biophysical Research Communications **272** 589 (2000)
- [64] R. S. Rock, M. Rief, A. D. Mehta und J. A. Spudich, *In vitro assays of processive myosin motors*, Methods **22** 373-81 (2000)
- [65] A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman und P. R. Selvin, *Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization*, Science **300** 2061-5 (2003)
- [66] M. Y. Ali, S. Uemura, K. Adachi, H. Itoh, K. Kinosita Jr. und S. Ishiwata, *Myosin V is a left-handed spiral motor on the right-handed actin helix*, Nat Struct Biol **9** 464-7 (2002)
- [67] C. L. Asbury, A. N. Fehr und S. M. Block, *Kinesin Moves an Asymmetric Hand-over-Hand Mechanism*, Science **302** 2130-2134 (2003)
- [68] A. E.-M. Clemen, M. Vilfan, J. Jaud, J. Zhang, M. Bärmann und M. Rief, *Force Dependent Stepping Kinetics of Myosin-V*, submitted to Biophys J
- [69] S. M. Block, L. S. Goldstein und P. J. Schnapp, *Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers*, Nature **348** 348-352 (1990)
- [70] S. S. Rosenfeld und H. L. Sweeney *A model of myosin V processivity*, J Biol Chem. **279** 40100-11 (2004)

- [71] R. D. Vale, *Myosin V motor proteins: marching stepwise towards a mechanism*, J Cell Biol **163** 445-50 (2003)
- [72] R. A. Milligan, M. Whittaker und D. Safer, *Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites*, Nature **348** 217-21 (1990)
- [73] W. Steffen, D. Smith, R. Simmons und J. Sleep, *Mapping the actin filament with myosin*, PNAS **98** 14949-54 (2001)
- [74] S. Uemura, H. Higuchi, A. O. Olivares, E. M. De La Cruz und S. Ishiwata, *Mechanochemical coupling of two substeps in a single myosin V motor*, Nat Struct Mol Biol **11** 877-83 (2004)
- [75] D. Altman, H. L. Sweeney und J. A. Spudich, *The mechanism of myosin VI translocation and its load-induced anchoring*, Cell **116** 737-49 (2004)
- [76] R. D. Vale, T. Funatsu, D. W. Pierce, L. Romberg, Y. Harada und T. Yanagida, *Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules*, Nature **380** 451-3 (1996)
- [77] T. Sakamoto, F. Wang, S. Schmitz, Y. Xu, Q. Xu, J. E. Molloy, C. Veigel und J. R. Seller, *Neck length and processivity of myosin V*, J Biol Chem **278** 29201-7 (2003)
- [78] M. Nishiyama, H. Higuchi und T. Yanagida, *Chemomechanical coupling of the forward and backward steps of single kinesin molecules*, Nat Cell Biol **4** 790-7 (2002)
- [79] H. Itoh, A. Takahashi, K. Adachi, H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida und K. Kinoshita, *Mechanically driven ATP synthesis by F1-ATPase*, Nature **427** 465-8 (2004)

Ein herzliches Dankeschön...

...allen denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

- Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Matthias Rief, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand, von dem ich viel gelernt habe und der es mir in einem neuen Projekt ermöglichte, meine Begeisterung für Optik mit der faszinierenden Welt der Biophysik zu kombinieren.
- Prof. Hermann Gaub, an dessen Lehrstuhl ein großer Teil dieser Arbeit stattfand, danke ich sehr für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und viele spannende Diskussionen.
- Johann Jaud, der mich fast die ganze Doktorarbeit über als Werkstudent, Diplomand und Doktorand begleitet hat, danke ich sehr für die freundschaftliche Zusammenarbeit und viele gute Gespräche zur Physik und anderen Themen.
- Dr. Mojca Vilfan danke ich für die aktive Mitarbeit während ihres Aufenthalts in München.
- Mein Dank gilt auch Michael Schlierf und Eike Friedrichs, die als Werkstudenten die Projekte vorangebracht haben, ebenso wie dem Diplomand Christof Gebhardt und der Diplomandin Melanie Reisinger, die Projekte an der optischen Falle fortführen und viel dazu beigetragen haben, dass der Umzug des Experiments an die TU München schnell vonstatten ging.
- Junshan Zhang und Michael Bärmann danke ich sehr für die Extraktion des Myosin-V und dafür dass sie stets bereit waren, mich an ihrem Wissen über Chemie und Biologie teilhaben zu lassen.
- Für die Aufreinigung der Proteine möchte ich mich ebenfalls bei Claudia Antrecht, Hulda Kirpal, Monika Rusp und Karin Vogt bedanken.
- Für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und viele Antworten auf drängende Fragen danke ich weiterhin: Martin Benoit, Thorsten Hugel, Angelika Kardinal, Max Kessler, Christian Kirchner, Rupert Krautbauer, Ferdinand Kühner, Gregor Neuert, Hilde Rinia und Ingo Schwaiger.
- Für die gute technische Unterstützung aus der Mechanik- und Elektronikwerkstatt bedanke ich mich bei Alexander Hoch, Josef Wieser und Christian Holopirek.
- Allen anderen von der „Gambicrew“ und dem E22 sei für ein gutes Arbeitsklima herzlich gedankt.
- Zuletzt, aber eigentlich an erster Stelle bedanke ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meinem geliebten Mann Hans Jörg. Er bestärkte mich mit Humor und Geduld und hielt mir besonders auch seit der Geburt unserer wunderbaren Felicitas den Rücken frei. Auch meinen Eltern, die immer für mich da sind, möchte ich herzlich danken.