

Lehrstuhl für Biophysik – E22

Mechanische Charakterisierung schneller Kinesinmotoren in Einzelmolekülexperimenten

Johann Jaud

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. Manfred Kleber

Prüfer der Dissertation:

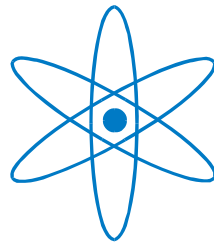
1. Univ.- Prof. Dr. Matthias Rief

2. Univ.- Prof. Dr. Manfred Schliwa

Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 28. Februar 2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 27. März 2007 angenommen.

PHYSIK-DEPARTMENT



Mechanische Charakterisierung schneller Kinesinmotoren in Einzelmolekülexperimenten

Dissertation
von

Johann Jaud



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	v
Abstract	vii
1 Einleitung	1
1.1 Molekulare Motoren	1
1.2 Zytoskelett-assoziierte molekulare Motoren	1
1.3 Die Superfamilie der Kinesinmotoren	2
1.4 Die Kinesin-1 Untergruppe	3
1.4.1 Das Kinesin-1 des Pilzes <i>Neurospora crassa</i>	4
1.4.2 Die Motordomänen und der Neck-Linker	5
1.4.3 Das Coiled-Coil der NcKin-1 Nackendomäne	6
1.4.4 Die NcKin-1 Scharnier-Domäne	8
1.4.5 Die Stalk- und Schwanzdomäne des NcKin-1	8
1.4.6 Modelle für die Prozessivität des Kinesin-1	9
1.4.7 Der ATPase-Zyklus des NcKin-1	9
1.5 Die Kinesin-3 Untergruppe	11
1.5.1 Das Kinesin-3 des Pilzes <i>Neurospora crassa</i>	11
1.6 Ziele dieser Arbeit	13
2 Materialien und Methoden	15
2.1 Die optische Falle	15
2.1.1 Der Versuchsaufbau im Überblick	16
2.1.2 Bestimmung der Fallenstärke	18
2.1.3 Datenerfassung	20
2.1.4 Das TIRF-Fluoreszenzmikroskop	20
2.2 Versuchsgeometrien	21
2.2.1 Die klassische Einzelkugelmethode	21
2.2.2 Die Dreikugelmethode	23
2.3 Verwendete Proteine und Reagenzien	26
2.3.1 Verwendete Puffer	27
2.3.2 Die verwendeten Kinesinkonstrukte	27
2.3.3 Aufreinigung der Kinesinkonstrukte	30

2.3.4	Tubulin und Mikrotubuli	31
2.4	Vorbereitung der Proben	32
2.4.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	32
2.4.2	Aufbau der Messkammern	32
2.4.3	<i>In vitro</i> Motilitätsassays	32
2.5	Fallenexperimente mittels der Einzelkugelmethode	33
2.5.1	Anbindung der Mikrotubuli auf der Glasoberfläche durch polyklonale Tubulin-Antikörper	33
2.5.2	Anbindung biotinylierter Mikrotubuli auf Streptavidin-beschichteten Glasoberflächen	33
2.5.3	Präparation der motorbeschichteten Kugeln	34
2.5.4	Abschätzung der Motorendichte auf den Kugeln	34
2.6	Präparation der Proben für Dreikugelmessungen	35
2.6.1	Vorbereitung der Deckgläser	35
2.6.2	Fixierung tubulinspezifischer Antikörper auf Polystyrolkugeln	35
2.6.3	Fixierung der inaktiven Kinesinmutante HsKin-G234A auf Polystyrolkugeln	36
2.6.4	Herstellung der Probe	36
2.7	Aufbereitung und Auswertung der Daten	37
2.7.1	Auswertung der Motilitätsassays	37
2.7.2	Auswertung der Fallenexperimente	37
3	Experimentelle Ergebnisse	39
3.1	Vergleich des NcKin-1 Wildtyps mit dem NcKin-SN Konstrukt	39
3.1.1	Biochemische Charakterisierung des NcKin-SN Konstrukts	39
3.1.2	Geschwindigkeitsbestimmung aus Motilitätsassays	40
3.1.3	Lauflänge unter externer Kraft	41
3.1.4	Die Kraft-Geschwindigkeits Relation	43
3.1.5	Maximalkraft einzelner Kinesinmoleküle	44
3.1.6	Der doppelte Rückwärtsschritt des NcKin-1 Wildtyps	45
3.2	Das NcKin-P342C Konstrukt	49
3.2.1	Geschwindigkeitsbestimmung aus Motilitätsassays	50
3.2.2	Die Lauflänge des NcKin-P342C Konstrukts	51
3.2.3	Die Kraft-Geschwindigkeits Relation des NcKin-P342C Konstrukts	52
3.2.4	Die Maximalkraft des NcKin-P342C Konstrukts	53
3.2.5	Rückwärtsschritte des NcKin-P342C Konstrukts	53
3.3	Etablierung der Dreikugelmethode	56
3.3.1	Die Belastbarkeit der Mikrotubuli-Kugel Bindung	56
3.3.2	Maximalkraft einzelner NcKin-1 Motoren in der Dreikugelmethode	60

3.4	Die chimären Kinesinkonstrukte NcKin-1/3 und NcKin-3/1	62
3.4.1	Geschwindigkeitsbestimmung aus Motilitätsassays	62
3.4.2	Die Prozessivität des NcKin-1/3 Chimärs	63
3.4.3	Die Kraft-Geschwindigkeits Relation des NcKin-1/3 Chimärs	64
3.4.4	Die Maximalkraft des NcKin-1/3 Chimärs	65
3.4.5	Rückwärtsschritte des NcKin-1/3 Chimärs	66
3.4.6	Kinetische Charakterisierung der chimären NcKin-1/3 und NcKin-3/1 Motoren	67
4	Diskussion	71
4.1	Der Einfluss der Kinesin-1 Nacken Coiled-Coil	72
4.1.1	Ein Aufwinden der Nacken Coiled-Coil ist für die prozessive Bewegung des NcKin-1 nicht notwendig	73
4.1.2	Der Einfluss der Nettoladung des Nacken Coiled-Coils auf die Motilität des NcKin-1 Motors	75
4.1.3	Die axiale Flexibilität der Kinesin Nackendomäne beeinflusst die Motilität des Moleküls unter Last	76
4.1.4	Der doppelte Rückwärtsschritt des NcKin-1 Wildtyps	79
4.2	Das NcKin-1 in der Dreikugelanordnung	88
4.3	Das NcKin-1/3 Chimär	91
4.3.1	Die Prozessivität des chimären NcKin-1/3 Motors	91
4.3.2	Modelle zur Erklärung der verringerten Prozessivität des NcKin- 1/3 Konstrukts	92
4.3.3	Das NcKin-3/1 Konstrukt	99
4.3.4	Die Motordomäne bestimmt die Prozessivität eines Kinesin- motors	100
4.4	Schlussfolgerungen	100
5	Ausblick	103
6	Anhang	105
6.1	Das Prinzip der optischen Falle	105
6.2	Verwendete Puffer bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . .	107
6.3	Abkürzungen	108
	Literaturverzeichnis	111
	Danksagung	121

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Eigenschaften des schnellen konventionellen Kinesins aus *N. crassa* (NcKin-1) in Einzelmolekülexperimenten untersucht.

In einer ersten Serie von Experimenten wurde das besonders weiche Coiled-Coil der Nackendomäne des NcKin-1 durch ein synthetisch versteiftes Coiled-Coil gleicher Länge und Phase ersetzt. Die Ergebnisse dieser Experimente belegen erstmals, dass die mechanische Flexibilität des nativen Coiled-Coils im Kinesinnacken die Funktionalität eines Kinesinmotors unter Last unterstützt. Durch Untersuchungen an NcKin-1 Konstrukten mit N-terminal kovalent verbundenen Nacken Coiled-Coils konnte darüber hinaus erstmalig auch für schnelle Pilzkinesine gezeigt werden, dass ein in der Literatur postuliertes Aufwinden der Nackendomäne keine notwendige Voraussetzung für die Prozessivität des Motormoleküls darstellt.

Bei Messungen zur Bestimmung der Maximalkraft des NcKin-1 wurde das häufige Auftreten eines schnellen doppelten Rückwärtsschritts einer Länge von 16 nm unter Kräften nahe der vom Motor produzierten Maximalkraft beobachtet. Dieser doppelte Rückwärtsschritt konnte im Rahmen eines Modells durch eine ungenügende Synchronisation der beiden Motordomänen als Folge der für eine Coiled-Coil Bildung nicht-idealen Aminosäuresequenz des NcKin-1 Nackens erklärt werden.

Um den Einfluss der Messgeometrie auf die gemessene Maximalkraft zu bestimmen, wurde als alternative Messmethode die Dreikugelmethode auf das Kinesin/Mikrotubuli System übertragen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Maximalkraft eines Kinesinmotors unabhängig von der Geometrie des Messsystems ist. In einer weiteren Serie von Experimenten mit chimären NcKin-1/3 Motoren konnte erstmalig belegt werden, dass die Prozessivität eines Kinesinmotors durch dessen Motordomänen bedingt ist. Das Coiled-Coil im Kinesinnacken nimmt zwar regulatorisch Einfluss auf die Abläufe in den Motordomänen, ist aber in Kombination mit nicht-prozessiven Motordomänen selbst nicht hinreichend, um die Prozessivität eines Kinesinmotors zu gewährleisten.

Eine Analyse der Kraft-Geschwindigkeits Relationen des NcKin-1 und NcKin-1/3 Motors ergab zwei ratenlimitierende Übergänge in den chemomechanischen Zyklen beider Motoren. Die Rate des langsameren Übergangs ist bei beiden Konstrukten kraftunabhängig, unter niedrigen Kräften limitierend und konnte mit dem Ablösen des ADPs nach einem Schrittereignis identifiziert werden. Die schnellere der beiden Raten weist bei beiden Molekülen eine ausgeprägte Kraftabhängigkeit mit einer charakteristischen Länge von $d \approx 7$ nm auf und wird unter höheren Kräften limitierend. Diese Rate ist beim chimären NcKin-1/3 im Vergleich zum NcKin-1 um etwa einen Faktor sieben reduziert und konnte in einem Modell der diffusiven Suche des Motormoleküls nach der nächsten Mikrotubulibindungsstelle zugeordnet werden. Diese Ergebnisse widersprechen Modellen, die den 8 nm Vorwärtsschritt eines Kinesinmotors als Summe zweier rasch aufeinander folgender 4 nm Zwischenschritte interpretieren. Sie stützen dagegen Modelle, die die diffusive Suche der freien Motordomäne nach der nächsten Bindungsstelle als den entscheidenden Prozess bei der Vorwärtsbewegung eines Kinesinmotors betrachten.

Abstract

The single-molecule properties of the fast conventional kinesin from *N. crassa* (NcKin-1) were investigated with optical tweezers.

In a first set of experiments the particularly soft neck region of the NcKin-1 molecule was replaced by an artificial, mechanically highly stable coiled-coil of identical length and phase. The results from these experiments indicate the compliance of kinesin's neck is important to sustain motility under load and reveal a so far unknown constraint on the imperfect coiled-coil heptad pattern of kinesin-1. Furthermore, experiments with kinesin-1 constructs with a covalent cross-link at the N-terminal end of the neck region proved that a postulated partial and transient unwinding of the neck coiled-coil during a processive run is no prerequisite for the processivity of fast fungal kinesin motors.

The observation of single kinesin runs against a static laser trap revealed a so far unknown feature: often, single NcKin-1 motors exhibit a characteristic fast double backward step under near-stall forces before they terminate their processive run. Within a model, these double backward steps could be explained by assuming a non-perfect chemo-mechanical coupling between the two motor heads as a consequence of the particularly soft NcKin-1 neck coiled-coil.

As a new tool for future investigations of non-processive kinesin motors, a so called "three-bead-geometry" was developed for the kinesin/microtubule system. Thus, it could be demonstrated that the geometry of the measurements has no significant influence on the measured stall force of a kinesin motor.

Another series of experiments were aimed at identifying the structural parts of a kinesin motor determining its processivity. In studies with chimeric kinesin constructs it could be demonstrated that the kinesin motor domains bear the determinants for processivity. The neck coiled-coil dimerisation domain exerts a regulatory influence on the motor domains, but is not sufficient to render two non-processive kinesin motor domains processive.

By analyzing the force-velocity relation of both the NcKin-1 and the processive chimeric NcKin-1/3 construct, two rate-limiting transitions in the chemo-mechanical cycle of a kinesin-1 molecule could be identified. The rate of the slower transition is independent of an applied external force, limiting under low forces and represents the release of ADP from the leading head upon its binding to the microtubule. The faster rate displays a pronounced force sensitivity for both motors with a characteristic distance $d \approx 7$ nm between its ground and transition state and becomes limiting under higher forces. In the NcKin-1 motor, this rate is about sevenfold faster than the corresponding NcKin-1/3 rate. Within a model this rate was attributed to the diffusive search of the leading motor head to the next microtubule binding site. These results are not consistent with models proposing the kinesin step to consist of two rapid sub-steps with a length of ≈ 4 nm each. However, they support a recently published model assuming the diffusive search of the leading head for the next binding site is the fundamental process leading to a net displacement of a kinesin-1 motor molecule.

1 Einleitung

1.1 Molekulare Motoren

Molekulare Motoren sind hochgradig spezialisierte Enzyme, die als essentieller Bestandteil jeder lebenden Zelle eine breite Palette unterschiedlichster Aufgaben erfüllen. Sie sind die treibenden Kräfte hinter so verschiedenen Abläufen wie der Muskelbewegung, dem intrazellulären Transport von Vesikeln und mRNA oder der Fortbewegung von Spermien und Bakterien, wobei sie zur Erfüllung ihrer Aufgaben chemisch gespeicherte Energie in mechanische Arbeit umwandeln (Spudich, 1994). In ihren Erscheinungsformen sind molekulare Motoren dabei ebenso vielfältig wie in ihren Aufgaben. Entsprechend ihrer verschiedenartigen mechanischen Funktionsweise unterscheidet man häufig zwischen den beiden Gruppen der Rotations- und Linearmotoren.

Bei den Rotationsmotoren, wie beispielsweise dem bakteriellen Flagellarmotor (Berg und Anderson, 1973; Silverman und Simon, 1974) oder der in den Mitochondrienmembranen lokalisierten F_0/F_1 -ATP-Synthase (Boyer, 1989), wird ein Fluss von Ionen oder Protonen, getrieben durch ein elektrochemisches Potential über einer Membran, als Energiequelle genutzt, um eine Drehbewegung zu erzeugen. Linearmotoren bewegen sich dagegen geradlinig entlang bestimmter Trägerfilamente fort. Als Beispiele hierfür seien die RNA- und DNA-Polymerasen genannt, die sich entlang von Nukleinsäureketten bewegen, sowie die Mitglieder der Myosin- und Kinesin-Familie, die Aktinfilamente beziehungsweise Mikrotubuli als Träger nutzen (Spudich, 1994; Schliwa, 2003). Einige Linearmotoren sind dabei in der Lage, viele ATPase-Zyklen zu durchlaufen und große Distanzen zurückzulegen, ohne dabei den Kontakt zu ihrem Träger zu verlieren. Diese Eigenschaft wird als mechanische Prozessivität bezeichnet.

1.2 Zytoskelett-assoziierte molekulare Motoren

Ohne die Möglichkeit einen gerichteten intrazellulären Stofftransport über große Distanzen bewerkstelligen zu können, ist das Funktionieren eines komplexen Gebildes, wie beispielsweise einer Nervenzelle, nur schwer vorstellbar. Diffusionsprozesse im dreidimensionalen Raum sind zu langsam, um den für das Überleben

einer Zelle notwendigen Transport von Proteinen, Vesikeln und Zellorganellen zu bestimmten Orten innerhalb des Zytoplasmas oder zwischen einzelnen Kompartimenten zu gewährleisten. Ein funktionierendes aktives Transportsystem ist daher die unabdingbare Voraussetzung für das Überleben einer jeden Zelle. Die in der Natur gebräuchlichste Methode zur Realisierung dieser Transportvorgänge beruht auf Zytoskelett-assoziierten molekularen Motoren. Diese oft auch einfach als „molekulare Motoren“ bezeichneten Enzyme transportieren Lasten gerichtet entlang von Aktinfilamenten oder Mikrotubuli, wobei teilweise einzelne Moleküle Distanzen im Mikrometerbereich zurücklegen können (Schliwa, 2003). Generell unterscheidet man zwischen drei verschiedenen Familien der Zytoskelett-assoziierten Motoren: Vertreter der Myosin-Familie bewegen sich entlang von Aktinfilamenten, während die Mitglieder der Kinesin- und Dyneinfamilie jeweils Mikrotubuli als Träger benutzen (Woehlke und Schliwa, 2000).

Allen drei Familien ist gemein, dass ihre Mitglieder die für die Bewegung notwendige Energie aus der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) beziehen und in Abhängigkeit ihres jeweiligen Nukleotidzustands eine Reihe von Konformationsänderungen durchlaufen, die in einer gerichteten Nettobewegung resultieren (Cross, 1999). Die für das Anbinden an die jeweiligen Träger sowie das Binden des energiereichen Nukleotids notwendigen katalytischen Zentren werden als Motordomänen bezeichnet. Ihre Größe variiert zwischen den verschiedenen Familien stark: Während Kinesin die mit ca. 300 Aminosäuren kleinsten Motordomänen besitzt, weisen die Motordomänen der Myosine typische Größen von 800 Aminosäuren und die der Dyneine gar bis über 4000 Aminosäuren auf (Woehlke und Schliwa, 2000).

1.3 Die Superfamilie der Kinesinmotoren

Nachdem bereits in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts das Dynein als Ursache der Cilien- und Flagellarbewegung bei Bakterien und Spermien erkannt wurde (Gibbons, 1965), galt es lange Zeit auch als der wahrscheinlichste Verursacher intrazellulärer Transportvorgänge. Der Beweis für zytoplasmatisches Dynein konnte jedoch erst im Jahr 1987 erbracht werden (Lye et al., 1987). Bereits zwei Jahre früher wurde der erste Kinesinmotor bei der Beobachtung von Vesikeltransportvorgängen in großen Tintenfisch-Axonon identifiziert (Schnapp et al., 1985; Brady, 1985; Vale et al., 1985). Mittlerweile ist eine breite Palette an Kinesinen und Kinesin-assoziierten Proteinen in einer Vielzahl von Spezies identifiziert, die für unterschiedlichste zelluläre Funktionen, vom zytoplasmatischen Vesikel- und mRNA-Transport über die Spindeldynamik während der Zellteilung bis hin zur Motilität der Chromosomen verantwortlich sind (Hirokawa, 1998; Goldstein, 2001; Schnapp, 2003). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt stellt sich die Gruppe der Kinesine als eine schnell wachsende Superfamilie molekularer Motoren mit mehr als zehn

Untergruppen dar, die zwar in ihrer Struktur und Funktionalität teilweise große Variabilität aufweisen, jedoch aufgrund der großen Homologie in der Struktur ihrer ATP- und Mikrotubuli-Bindungscentren eindeutig als Mitglieder einer Familie molekularer Motoren identifizierbar sind (Hirokawa, 1998; Schliwa, 2003; Schoch et al., 2003; Dagenbach und Endow, 2004).

1.4 Die Kinesin-1 Untergruppe

Das erste isolierte Kinesin, ein dimeres Molekül bestehend aus zwei identischen schweren Ketten mit einem Molekulargewicht von etwa 120 kDa und zwei assoziierten, leichten Seitenketten mit einem Molekulargewicht von etwa 64 kDa (Bloom et al., 1988; Brady, 1985; Cyr et al., 1991; Gauger und Goldstein, 1993; Schnapp et al., 1985; Vale et al., 1985), wurde aus dem Nervengewebe von Tieren aufgereinigt. Es wird als „konventionelles Kinesin“¹ bezeichnet und heute in die Kinesin-1 Untergruppe eingeordnet (Lawrence et al., 2004). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigt es sich als etwa 80 nm große, stäbchenförmige Struktur, bestehend aus zwei globulären Köpfchen mit einem Durchmesser von etwa 10 nm, einem stängelartigen Fortsatz und einem fächerförmigen Ende (Hirokawa et al., 1989). Die globulären Köpfchen stellen dabei die Motordomänen dar und befinden sich, wie bei den meisten Vertretern der Kinesin Familie, am N-terminalen Ende der schweren Ketten. Konventionelles Kinesin findet sich in Zellen fast aller Gewebetypen, bewegt sich prozessiv (Howard et al., 1989) in Plus-Richtung entlang von Mikrotubuli und transportiert dabei Endosomen, Lysosomen und Vesikel im endoplasmatischen Retikulum (Hirokawa, 1998).

Neben den tierischen Kinesinen stellen die konventionellen Kinesine der Pilze eine weitere wichtige Untergruppe dar. Wegen der großen Zahl bekannter Genomsequenzen und der einfachen Möglichkeit der Genmanipulation stellen Pilze experimentell leicht zugängliche Modellsysteme dar, die eine einfache Identifizierung von Motorproteinen und die Beobachtung ihrer *in vivo* Funktionalität erlauben (Seiler et al., 1997). Das erste konventionelle Pilzkinesin wurde aus dem filamentösen Pilz *Neurospora crassa* isoliert und wird heute als NcKin-1 bezeichnet (Steinberg und Schliwa, 1995). Eine der auffälligsten Eigenschaften der konventionellen Pilzkinesine ist ihre im Vergleich zu ihren tierischen Verwandten etwa vier- bis fünffach höhere Geschwindigkeit (Steinberg und Schliwa, 1996; Vale et al., 1985; Howard et al., 1989).

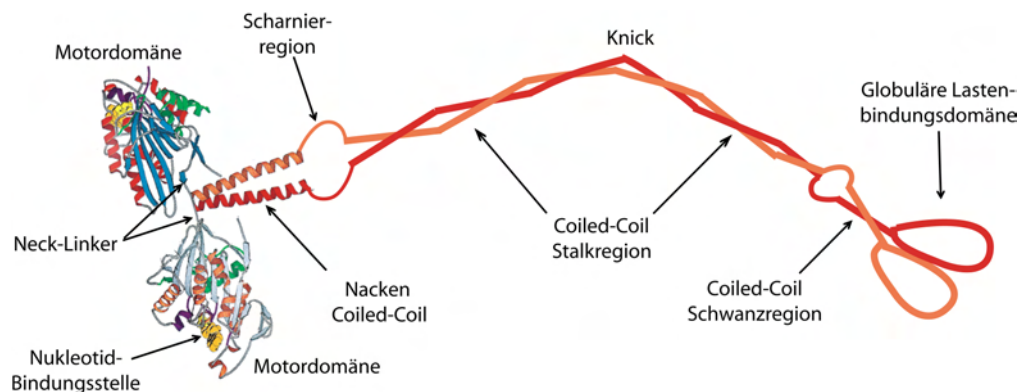


Abbildung 1.1: Darstellung der Domänenstruktur eines Kinesin-1 Moleküls. Das dimeres Molekül aus zwei identischen schweren Ketten besitzt zwei N-terminale Motordomänen, die über zwei kurze, unterbrochene β -Faltblätter mit der für die Dimerisierung verantwortlichen Coiled-Coil Struktur des Kinesinnackens verbunden sind. Die Kristallstruktur der Motordomänen mit Neck-Linker und der daran anschließenden Nackendomäne sind aus (Kozielski et al., 1997) entnommen. C-terminal der Nackendomäne folgen eine flexible Scharnierregion und eine weitere, ausgedehnte und von einem charakteristischen Knick unterbrochene Coiled-Coil Struktur, die als Stalk-Region bezeichnet wird. Das C-terminale Ende des Proteins bilden nach einem kurzen, vermutlich ebenfalls flexiblen Verbindungsstück ein weiteres Coiled-Coil und zwei globuläre Lastenbindungsdomänen (Kirchner et al., 1999a).

1.4.1 Das Kinesin-1 des Pilzes *Neurospora crassa*

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte NcKin-1 weist sowohl in der Sequenz seiner Motordomäne als auch in seiner allgemeinen Domänenstruktur (siehe Abbildung 1.1) große Ähnlichkeiten zum Kinesin-1 der Säugetiere auf. Wie aufgrund dieser Homologie zu erwarten ist, zeigt NcKin-1 auch in seinen biochemischen Eigenschaften große Ähnlichkeit zum tierischen konventionellen Kinesin (Steinberg und Schliwa, 1995, 1996). Insbesondere weist es eine mikrotubuliinduzierte ATPase-Aktivität auf und bewegt sich prozessiv in Richtung des Plus-Endes eines Mikrotubulus. Während tierische Kinesin-1 Moleküle jedoch zwei assoziierte leichte Seitenketten aufweisen, fehlen diese beim NcKin-1 und anderen Pilzkinesinen (Seiler et al., 2000). Erhebliche Abweichungen finden sich darüber hinaus auch bei allen weiteren strukturellen Einheiten außerhalb der Motordomänen. Dies wird insbesondere in der Sequenz der Nacken- und der Scharnierregion (siehe Kapitel 1.4.3) deutlich, wo außer den für die Coiled-Coil Bildung unbedingt nötigen hydrophoben

¹Das ubiquitäre konventionelle Kinesin wird in der Literatur häufig auch als uKHC („ubiquitous Kinesin heavy chain“) oder KIF5B bezeichnet (Schliwa, 2003).

Aminosäuren so gut wie keine Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz zu finden sind.

1.4.2 Die Motordomänen und der Neck-Linker

Als Kopf- oder Motordomäne eines NcKin-1 Moleküls bezeichnet man die globuläre Struktur bestehend aus den ersten 332 N-terminalen Aminosäuren. Sie beinhaltet sowohl die Nukleotid- als auch die Mikrotubuli-Bindungsstellen. Ein Vergleich der Kristallstruktur der Motordomäne des NcKin-1 (Song et al., 2001) mit der Kristallstruktur des Kinesin-1 der Ratte (Kozielski et al., 1997; Sack et al., 1997) zeigt eine weitgehende Übereinstimmung beider Strukturen. Im Zentrum beider Motordomänen befindet sich ein aus acht Strängen bestehendes β -Faltblatt, flankiert von je drei α -Helices auf beiden Seiten (Song et al., 2001). Die als Nukleotidbindungsstelle identifizierte Region besteht aus vier Untereinheiten und beinhaltet hochgradig konservierte Regionen.

In Lösung weist die Kinesin Motordomäne lediglich eine geringe ATPase-Aktivität auf, die erst durch Binden an einen Mikrotubulus stark beschleunigt wird (Kallipolitou et al., 2001). Die Bindungsaffinität der Motordomäne zum Mikrotubulus wiederum ist abhängig vom jeweiligen Nukleotidzustand. Im nukleotidfreien oder ATP-gebundenen Zustand weist die Motordomäne eine hohe Affinität zum Mikrotubulus auf, im ADP-Zustand ist die Bindungsaffinität etwa um den Faktor 10 verringert (Crevel et al., 1996, 1999).

Für eine erfolgreiche Propagation eines Kinesins entlang eines Mikrotubulus muss eine kleine Konformationsänderung im katalytischen Zentrum einer Motordomäne während eines ATPase-Zyklus verstärkt und in eine Änderung der Schwerpunktsposition des gesamten Proteins umgesetzt werden. Bei Kinesin-1 Molekülen ist der Neck-Linker, eine kurze, etwa 10-14 Aminosäuren lange Sequenz C-terminal der Motordomäne, von entscheidender Bedeutung für den Bewegungsablauf des Motors (Rice et al., 1999). Die Sequenz des Neck-Linkers ist in der gesamten Kinesin-1 Familie stark konserviert, lediglich zwei für Pilzkinesine typische Lysine finden sich nicht in der Struktur der tierischen Kinesine. In den Kristallstrukturen des Rattenkinesins erscheint der Neck-Linker sowohl bei monomeren als auch bei dimeren Konstrukten geordnet und besteht aus zwei kurzen, voneinander getrennten β -Faltblättern (Kozielski et al., 1997; Sack et al., 1997). Die Kristallstruktur des NcKin-1 dagegen zeigt den Neck-Linker in einem ungeordneten Zustand (Song et al., 2001), während für das humane Kinesin sowohl eine Kristallstruktur mit geordnetem (Sindelar et al., 2002) als auch mit ungeordnetem Neck-Linker (Kull et al., 1996) existiert. Der Übergang zwischen geordneter und ungeordneter Struktur zeigt die große Beweglichkeit dieser Region und deutet auch auf eine fundamentale Bedeutung des Neck-Linkers für die Bewegung eines Kinesins hin, zumal Mutanten mit einer zufälligen Aminosäuresequenz an Stelle des nativen

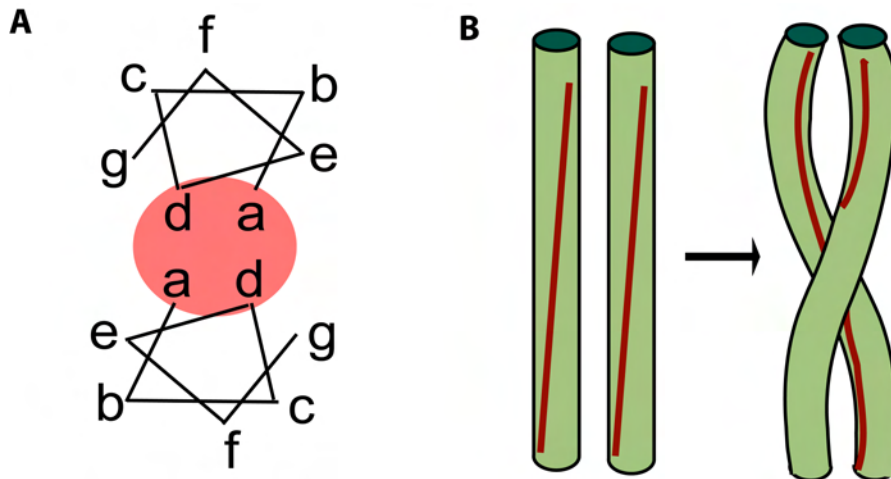


Abbildung 1.2: Ablauf der Coiled-Coil Bildung. **(A):** Die unpolaren Aminosäuren an den a und d Positionen der α -Helices bilden einen „hydrophoben Streifen“. **(B):** Zwei identische α -Helices umschlingen sich nach dem „knobs-into-holes“ Schema (Crick, 1953) derart, dass ihre hydrophoben Streifen (rot) zueinander weisen und nicht länger dem polaren Lösungsmittel ausgesetzt sind. Es bildet sich eine doppelsträngige Coiled-Coil Struktur.

Neck-Linkers eine um einen Faktor 200-250 reduzierte Gleitgeschwindigkeit aufweisen (Case et al., 2000). Während eines ATPase-Zyklus führt der Neck-Linker eine Konformationsänderung aus. Befindet sich in der Nukleotidbindungstasche ein Molekül ADP oder ist diese leer, so ist der Neck-Linker frei. Das Anbinden eines Moleküls ATP bewirkt dagegen eine Konformationsänderung des Neck-Linkers, der an die Motordomäne andockt und dann in die Plus-Richtung des Mikrotubulus zeigt (Rice et al., 1999; Sindelar et al., 2002; Rice et al., 2003). Der Neck-Linker scheint damit die Rolle des mechanischen Hebels zu erfüllen, der die Konformationsänderung der Kinesin Motordomäne in eine gerichtete Bewegung des gesamten Moleküls umsetzt (Vale und Milligan, 2000; Schliwa, 2003).

1.4.3 Das Coiled-Coil der NcKin-1 Nackendomäne

Als Nackenregion des NcKin-1 bezeichnet man das durch die Aminosäuren 342-374 gebildete α -helikale Coiled-Coil C-terminal des Neck-Linkers. Coiled-Coil Strukturen bestehen aus zwei bis fünf α -Helices, die sich umeinander winden und auf diese Weise eine neue Überstruktur bilden (Burkhard et al., 2001). Dabei ist für links-händige, parallele Coiled-Coils wie der NcKin-1 Nackendomäne die Periodizität der Aminosäuresequenz charakteristisch: Jeweils sieben Aminosäuren bilden eine

komplette Umdrehung der Helix und werden als „Heptade“ bezeichnet². Bezeichnet man diese Aminosäuren mit den Buchstaben abcdefg, so bildet sich durch die bevorzugte Platzierung apolarer Aminosäuren auf den Positionen a und d ein so genannter „hydrophober Streifen“ aus (siehe Abbildung 1.2). Die Stabilität einer Coiled-Coil Struktur wird dadurch erreicht, dass sich die beteiligten α -Helices nach dem zuerst von Crick (Crick, 1953) postulierten „knobs-into-holes“ Schema derart umschlingen, dass ihre hydrophoben Reste zueinander weisen und einen hydrophoben Kern bilden, anstatt dem polaren Lösungsmittel ausgesetzt zu sein. Eine weitere Stabilisierung kann durch Einbau polarer oder geladener Aminosäuren an lösungsmittlexponierten Stellen erfolgen, während eine gezielte Destabilisierung der Struktur durch den Einbau sperriger oder hydrophiler Aminosäuren an einer a oder d Position erreicht werden kann. Gerade bei molekularen Motoren sind Coiled-Coil Strukturen ein häufig anzutreffendes Motiv, da sie einerseits eine einfache Möglichkeit für die Dimerisierung eines funktionellen Proteins aus gleichen Untereinheiten darstellen und andererseits in ihrer Stabilität flexibel an die jeweiligen physiologischen Bedürfnisse angepasst werden können (Burkhard et al., 2001). Während beim Kinesin-1 der Ratte in der Kristallstruktur das Coiled-Coil des Nackens noch erkennbar ist (Kozielski et al., 1997), erscheint der Nacken des NcKin-1 ungeordnet (Song et al., 2001). Ein Blick auf die Aminosäuresequenz des NcKin-1 Nackens (siehe Abbildung 1.5) offenbart, dass insbesondere in der ersten Heptade die Sequenz von der eines optimalen Coiled-Coils erheblich abweicht. Es ist daher anzunehmen, dass diese Struktur im Vergleich zum tierischen Kinesin eine größere Flexibilität aufweist und daher in der Kristallstruktur nicht aufgelöst werden kann. In Analogie zum Bewegungsmechanismus des Myosins wurde lange Zeit angenommen, dass die Nackenregion des Kinesin-1 eine Art Hebelarm darstellt, dessen Umklappen für die gerichtete Schwerpunktsbewegung des Moleküls verantwortlich ist. Die Kristallstruktur des dimeren Rattenkinesins legt nahe, dass der Nacken tangential zur Oberfläche des Mikrotubulus ausgerichtet ist, anstatt, wie für einen Hebelarm zu erwarten, annähernd vertikal von dieser abzustehen (Sack et al., 1997). Der Abstand zwischen den beiden Motordomänen scheint außerdem zu gering zu sein, um deren gleichzeitiges Binden an zwei benachbarte, voneinander 8 nm entfernt liegende Bindungsstellen eines Mikrotubulus zu erlauben. Es wurde daher postuliert, dass ein (teilweises) Aufschmelzen des Nacken Coiled-Coils dem Motor die nötige Spannweite verleiht, die ein Überbrücken dieser Distanz ermöglicht (Kozielski et al., 1997; Tripet et al., 1997; Hoenger et al., 1998). Die Tatsache, dass viele Kinesine in den ersten Heptaden ihrer Nacken Coiled-Coils zum Teil erhebliche Abweichungen von der für eine Coiled-Coil Bildung idealen Aminosäuresequenz aufweisen, stützten diese These. Mit der Identifizierung des Neck-Linkers

²Bei rechtshändigen parallelen Coiled-Coils bilden jeweils elf Aminosäuren eine vollständige Umdrehung der Helix (Harbury et al., 1998; Stetefeld et al., 2000).

als flexibles Element zwischen den beiden Motordomänen erscheint das Problem der mangelnden Reichweite des Motors mittlerweile gelöst. Für tierische Kinesine konnte außerdem gezeigt werden, dass ein Aufschmelzen der Nackendomäne während eines prozessiven Laufs unwahrscheinlich ist (Tomishige und Vale, 2000). Für Pilzkinesine mit ihren besonders instabilen ersten Heptaden der Nacken Coiled-Coil (Song et al., 2001) fehlte dagegen bisher dieser Nachweis, und ein kurzfristiges partielles Aufschmelzen des Nackens konnte nicht ausgeschlossen werden.

1.4.4 Die NcKin-1 Scharnier-Domäne

Die Region C-terminal der Nackendomäne, die keine Coiled-Coil Struktur aufweist, wird als Scharnier-Domäne (engl: „hinge-domain“) des Kinesin-1 bezeichnet. Beim NcKin-1 umfasst sie die Aminosäuren 375-433, wobei innerhalb der Kinesin-1 Familie erhebliche Unterschiede sowohl in der Länge als auch in der Sequenz dieser Domäne auftreten können. Speziell bei Pilzkinesinen fällt auf, dass diese Region zahlreiche Prolin- und Glycinreste aufweist, was auf eine hochgradige Flexibilität der Struktur schließen lässt (Grummt et al., 1998). Die daraus resultierende leichte Drehbarkeit des Moleküls spielt möglicherweise eine wichtige Rolle für eine rasche und korrekte Orientierung eines Kinesinmoleküls beim Anbinden an einen Mikrotubulus (Hunt und Howard, 1993).

1.4.5 Die Stalk- und Schwanzdomäne des NcKin-1

Die so genannte „Stalk-Domäne“ des Kinesin-1 besteht aus zwei Coiled-Coil Regionen, die durch einen charakteristischen, flexiblen Knick getrennt sind (de Cuevas et al., 1992). C-terminal der Stalk-Domäne folgt nach einer weiteren flexiblen Region die so genannte Schwanzdomäne in Form eines weiteren Coiled-Coils und abschließend eine globuläre Lastenbindungsdomäne (Kirchner et al., 1999a). Während bei tierischen Kinesinen zwei weitere, für die Regulation des Proteins und die Anbindung von Lasten notwendige, leichte Ketten gebunden sind (Diefenbach et al., 1998; Verhey et al., 2001), fehlen diese bei Pilzkinesinen (Steinberg und Schliwa, 1995; Kirchner et al., 1999a).

Sowohl tierische als auch Pilzkinesine besitzen die Möglichkeit, bei Abwesenheit einer an die Schwanzdomäne angebondenen Last, in eine gefaltete, inaktive Konformation zu wechseln (Hackney et al., 1992; Stock et al., 1999; Seiler et al., 2000). Bei dieser Selbstinhibition des Kinesinmotors interagiert vermutlich ein Teil der globulären Schwanzregion derart mit einem Element der Motordomäne, dass keine Bindung an einen Mikrotubulus mehr erfolgen kann, bis die Inhibition durch das Anbinden einer Last wieder aufgehoben wird (Coy et al., 1999; Friedman und Vale, 1999; Stock et al., 1999; Seiler et al., 2000).

1.4.6 Modelle für die Prozessivität des Kinesin-1

Eine der auffälligsten Eigenschaften des konventionellen Kinesins ist dessen mechanische Prozessivität, also die Fähigkeit, mehrere Schritte entlang eines Mikrotubulus zu laufen, ohne sich zwischenzeitlich von diesem abzulösen. Bei den gegenwärtig diskutierten Modellen der Kinesinprozessivität wird angenommen, dass Prozessivität an das Vorhandensein zweier Motordomänen geknüpft ist (Hancock und Howard, 1998; Young et al., 1998; Hancock und Howard, 1999), die wechselseitig vom Nukleotidzustand abhängige Phasen starker und schwacher Mikrotubulaffinität durchlaufen (Crevel et al., 1996). Bei diesem so genannten „alternating site“-Mechanismus (Hackney, 1994) sind die jeweiligen ATPase-Zyklen der beiden Köpfe derart außer Phase, dass zu jedem Zeitpunkt mindestens ein Kopf fest an den Mikrotubulus gebunden ist (Hackney, 2002). Die Bewegung selbst erfolgt dabei nach dem „Hand-über-Hand“ Modell (vergleiche Abbildung 1.3), wobei beide Köpfe fortlaufend ihre Position tauschen und das Ablösen des jeweilig hinteren Kopfes erst nach erfolgreicher Anbindung des jeweils vorderen Kopfes erfolgen kann.

Obwohl auch andere Möglichkeiten der Fortbewegung eines Kinesins entlang eines Mikrotubulus, wie beispielsweise das so genannte „Raupenmodell“ diskutiert werden, bei dem die zwei Köpfe des Kinesins nicht äquivalent sind, sondern vielmehr ein Kopf stets der in Bewegungsrichtung führende ist (Hua et al., 2002), kann das „Hand-über-Hand“ Modell nicht zuletzt durch die direkte fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der exakten Positionsveränderung eines Kopfes während eines prozessiven Laufs eines Kinesinmoleküls (Yildiz et al., 2004) als bestätigt gelten. Für eine effektive Fortbewegung eines zweiköpfigen Motors ist es von zentraler Bedeutung, die in den beiden Motordomänen ablaufenden enzymatischen Zyklen zu synchronisieren (Hackney, 1994; Howard, 1996). Da die α -helikale Coiled-Coil Struktur der Kinesin Nackendomäne die einzige Verbindung zwischen den beiden Motordomänen darstellt, wird angenommen, dass die strukturelle Integrität dieser Domäne für die Synchronisation der in den beiden Motordomänen ablaufenden chemomechanischen Prozesse notwendig ist (Hancock und Howard, 1999).

1.4.7 Der ATPase-Zyklus des Nckin-1

Abbildung 1.3 verdeutlicht den ATPase-Zyklus eines Kinesin-1 Moleküls. Frei in Lösung befinden sich beide Köpfe des dimeren Moleküls im ADP-Zustand. Bei der Anbindung an den Mikrotubulus gibt der bindende Kopf sein Molekül ADP frei, während das Loslassen des ADPs vom hinteren Kopf inhibiert ist (Hackney, 1994). Bindet nun ein Molekül ATP an den vorderen Kopf, so wird eine Konformationsänderung induziert, die zum Andocken des Neck-Linkers an die Motordomäne führt (Rice et al., 1999). Der bis dahin hintere Kopf wird in Bewegungsrichtung nach vorne transportiert, wo er in Form einer diffusiven Bewegung die nächste Mikro-

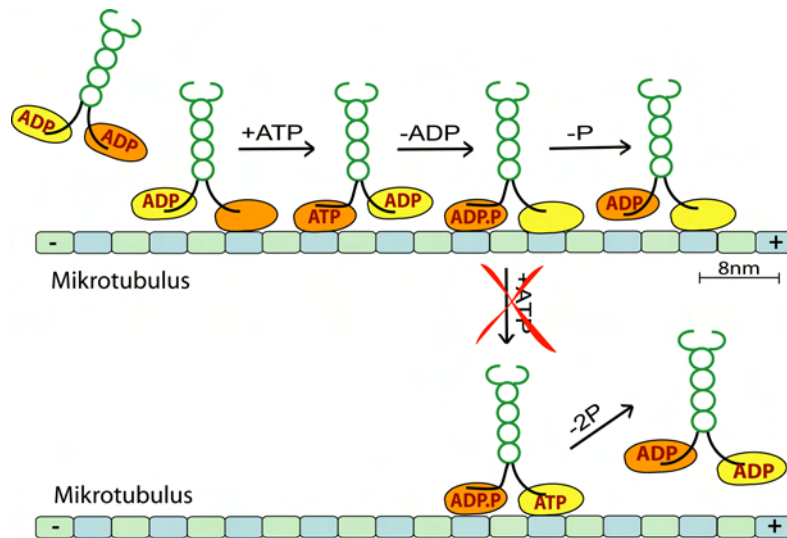


Abbildung 1.3: Der chemomechanische Zyklus des Kinesin-1.

Die beiden Motordomänen eines sich entlang eines Mikrotubulus bewegendes Kinesin-1 Moleküls sind zur leichteren Unterscheidung in gelb und orange dargestellt. Die Neck-Linker sind als schwarze Linien gezeichnet, die die Motordomänen mit dem grün dargestellten Nacken Coiled-Coil verbindet. Ein in Lösung befindliches Kinesinmolekül mit beiden Köpfen im ADP-Zustand kann an einen Mikrotubulus anbinden, wobei das ADP Molekül des bindenden Kopfes abgegeben wird. Der chemomechanische Zyklus startet, indem ATP an den vorderen, orange dargestellten Kopf anbindet. Das Binden des ATPs führt zum Andocken des Neck-Linkers an die Motordomäne (dargestellt durch den waagrecht gezeichneten Neck-Linker), wodurch der ungebundene gelbe Kopf in Richtung der nächsten Mikrotubulibindungsstelle nach vorne verlagert wird. Nach Abgabe des ADPs vom jetzt vorderen Kopf und der Hydrolyse des ATPs im hinteren Kopf zu ADP und Phosphat kann der vordere Kopf an den Mikrotubulus anbinden. Das Molekül hat seinen Schwerpunkt um 8 nm in Plus-Richtung des Mikrotubulus verlagert und befindet sich jetzt in einem beidköpfig angebindenen Zustand. Da das Kinesin nur mit teilweise gestreckten Neck-Linkern in der Lage ist, die 8 nm Distanz zwischen zwei benachbarten Bindungsstellen am Mikrotubulus zu überbrücken (Kozielski et al., 1997; Rice et al., 1999), wirkt eine Zugspannung auf beide Neck-Linker. In diesem Zustand könnte ein weiteres Molekül ATP an die vordere Motordomäne binden und rasch zu ADP und Phosphat hydrolysiert werden, was zu einem Ablösen des Motors vom Mikrotubulus und damit zum Ende des prozessiven Laufs führen würde. Da dieser Vorgang nicht oder nicht in nennenswertem Maße stattfindet, muss es einen effektiven Mechanismus geben, der das Anbinden des ATPs an den vorderen, nukleotidfreien Kopf vor dem Ablösen des hinteren Kopfes verhindert. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird angenommen, dass die zwischen den beiden an den Mikrotubulus gebundenen Motordomänen bestehende intramolekulare Spannung diese Aufgabe erfüllt (Schief und Howard, 2001; Hackney, 2002; Rosenfeld et al., 2003). Ob dabei aber das Ablösen des hinteren Kopfes beschleunigt (Schief und Howard, 2001; Hackney, 2002) oder das Anbinden eines neuen Moleküls ATP an den vorderen Kopf verlangsamt wird (Rosenfeld et al., 2003), ist noch immer Gegenstand von Diskussionen.

bulibindungsstelle zu erreichen sucht. Nach Abgabe des ADPs vom jetzt vorderen Kopf und der Hydrolyse des ATPs im hinteren Kopf zu ADP und Phosphat kann der vordere Kopf an den Mikrotubulus anbinden. Das Molekül befindet sich in einem beidköpfig gebundenen Zustand. Dieser Zustand stellt einen kritischen Schritt im Bewegungsablauf des Moleküls dar: Um den ATPase-Zyklus zu vervollständigen, ohne den Kontakt zum Mikrotubulus zu verlieren, muss sichergestellt werden, dass kein neuerliches Anbinden eines ATPs an den vorderen der beiden gebundenen Köpfe erfolgen kann, bevor der hintere Kopf in den ADP-Zustand wechseln und sich vom Mikrotubulus ablösen kann. Gegenwärtig wird angenommen, dass die im beidköpfig gebundenen Zustand auftretende intramolekulare Spannung das Binden eines ATPs an die vordere Motordomäne inhibiert (Rosenfeld et al., 2003). Nach der Abgabe des Phosphats vom hinteren Kopf befindet sich dieser im schwach bindenden ADP-Zustand und kann sich vom Mikrotubulus ablösen. Das Molekül befindet sich wieder in seinem Ausgangszustand und kann durch Binden eines weiteren Moleküls ATP an die nukleotidfreie Motordomäne den nächsten Schritt einleiten.

1.5 Die Kinesin-3 Untergruppe

Während alle Mitglieder der Kinesin-1 Gruppe in der Natur als Dimere vorkommen und als klassische Vertreter der Gruppe der prozessiven molekularen Motoren gelten, finden sich in der Kinesin-3 Gruppe sowohl monomere als auch dimere Motormoleküle. Das monomere KIF1A der Maus wird beispielsweise in der Literatur als prozessiv beschrieben (Okada und Hirokawa, 1999; Kikkawa et al., 2000; Okada und Hirokawa, 2000; Nitta et al., 2004), während das ebenfalls monomere Unc104 aus *C.elegans* als nicht prozessiv gilt (Pierce et al., 1999). Weitere Vertreter der Kinesin-3 Untergruppe, wie beispielsweise das Kinesin-3 aus *Neurospora crassa* (NcKin-3), sind, obwohl in der Natur als Dimere vorliegend und in ihrer Domänenorganisation dem Kinesin-1 sehr ähnlich, eindeutig nichtprozessiv (Adio et al., 2006).

Der Bewegungsablauf des prozessiven monomeren KIF1A ist noch nicht vollständig geklärt. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird davon ausgegangen, dass sich das Molekül in Form einer gerichteten Brownschen Bewegung entlang des Mikrotubulus bewegt. Mittels einer zusätzlichen, positiv geladenen, lysinreichen Mikrotubulibindungsstelle („K-Loop“) wird dabei das Ablösen vom Mikrotubulus während des schwach gebundenen Zustands verhindert (Okada und Hirokawa, 2000).

1.5.1 Das Kinesin-3 des Pilzes *Neurospora crassa*

Im Gegensatz zu vielen anderen Vertretern der Kinesin-3 Untergruppe liegt das Kinesin-3 aus *N. crassa* (NcKin-3) als stabiles Dimer mit einem Molekulargewicht

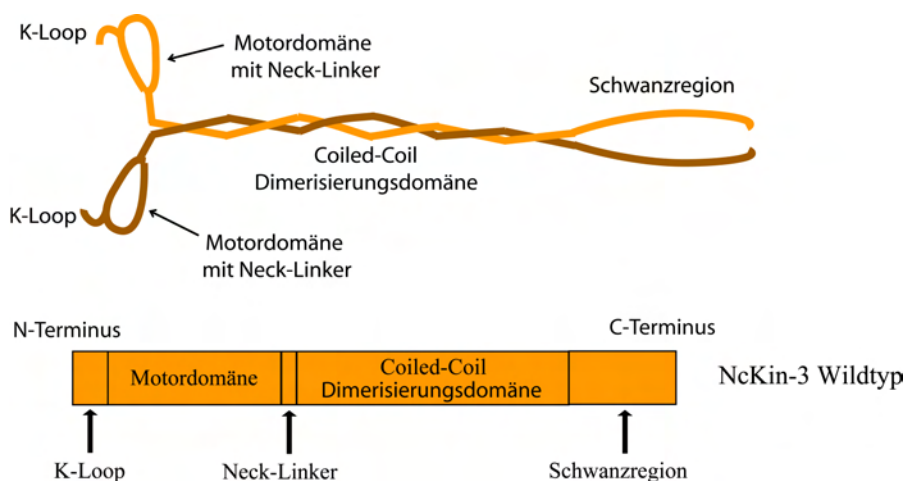


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des NcKin-3. Das dimerisierte Molekül verfügt über zwei globuläre Motordomänen, die über eine kurze Neck-Linker Sequenz mit einer ausgedehnten Coiled-Coil Region verbunden sind, über die auch die Dimerisierung des Moleküls erfolgt. Die C-terminale Schwanzregion des Motors ist ungewöhnlich kurz und weist keine Homologie zu anderen Motoren der Kinesin-3 Untergruppe auf. Anders als das NcKin-1 besitzt das NcKin-3 Molekül N-terminal seiner Motordomäne eine zusätzliche Sequenz aus 37 Aminosäuren („K-Loop“), deren Funktionsweise bisher nicht vollständig geklärt ist.

von 76 kDa vor (Adio et al., 2006). Die Dimerisierung erfolgt vermutlich durch Bildung eines doppelsträngigen Coiled-Coils zwischen den Aminosäuren 437 und 513 des Proteins (Adio et al., 2006), wobei jedoch mehrere Abweichungen von einer idealen Coiled-Coil Sequenz vorhanden sind. Die Motordomäne des NcKin-3 weist eine große Homologie zu anderen Motoren dieser Untergruppe auf (Schoch et al., 2003) und besitzt an ihrem N-terminalen Ende 37 zusätzliche Aminosäuren („K-Loop“), deren Funktion bisher nicht vollständig geklärt ist (Adio et al., 2006). Die K-Loop Region des NcKin-3 ist deutlich kürzer als die entsprechende Sequenz des KIF1A und darüber hinaus weniger stark geladen. Die C-terminale Schwanzregion des Proteins ist mit ca. 200 Aminosäuren ebenfalls ungewöhnlich kurz und weist keine Homologie zu anderen Motoren der Kinesin-3 Untergruppe auf. Da sich *in vivo* hohe Konzentrationen von NcKin-3 in der Nähe von Mitochondrien nachweisen lassen, wird angenommen, dass das Molekül für den Transport und die Lokalisation dieser Zellorganellen verantwortlich ist (Fuchs und Westermann, 2005). Nach derzeitigem Kenntnisstand ist der NcKin-3 Wildtyp mechanisch nicht prozessiv, unterstützt aber in hohen Konzentrationen *in vitro*-Motilität von Mikrotubuli mit einer Geschwindigkeit von $\approx 0,6 \mu\text{m/s}$ (Adio et al., 2006).

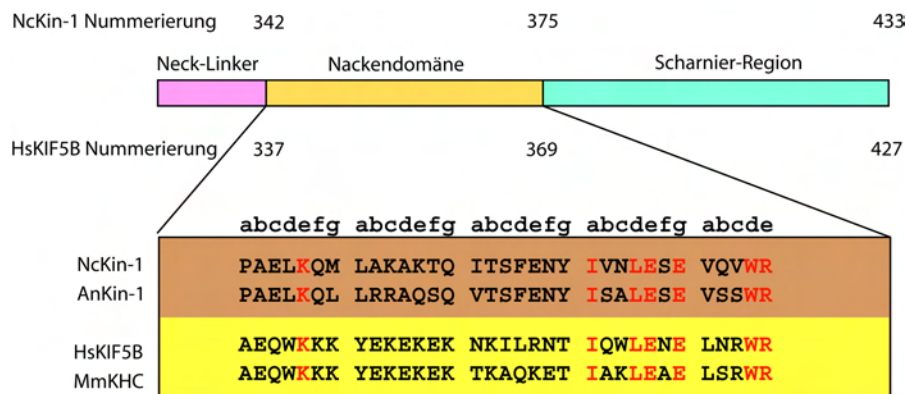


Abbildung 1.5: Vergleich der Aminosäuresequenz des Kinesinnackens. Die großen Unterschiede in der Aminosäuresequenz tierischer Kinesine (gelb hinterlegt) im Vergleich zu den entsprechenden Sequenzen der Pilzkinesine (braun hinterlegt) sind in den ersten drei Heptaden der Nackendomäne gut zu erkennen. Das für tierische Kinesine charakteristische EKEKEK-Motiv fehlt bei Pilzkinesinen gänzlich. Die bei beiden Kinesinarten konservierten Aminosäuren sind rot gekennzeichnet. NcKin-1: *Neurospora crassa*, AnKin-1: *Aspergillus nidulans*, HsKIF5B: *Homo sapiens*, MmKHC: *Mus musculus*

1.6 Ziele dieser Arbeit

Bestimmung des Einflusses der spezifischen Nackensequenz auf die Motilitätseigenschaften des NcKin-1

Im Gegensatz zu ihren tierischen Gegenstücken weisen konventionelle Pilzkinesine wie das NcKin-1 eine bis zu vierfach höhere durchschnittliche Geschwindigkeit und eine größere mechanische Prozessivität auf (Steinberg und Schliwa, 1996; Lakämper et al., 2003). Gleichzeitig offenbart ein Vergleich der jeweiligen Motordomänen einen ausgesprochen hohen Grad an Homologie (Hirokawa, 1998; Schliwa, 2003; Schoch et al., 2003; Dagenbach und Endow, 2004), während die Homologie in der Nackenregion nur gering ist (siehe Abbildung 1.5). Mit Ausnahme der für die Ausbildung des hydrophoben Streifens notwendigen apolaren Aminosäuren an den a und d Positionen der α -Helix zeigen die Sequenzen der tierischen Kinesine so gut wie keine Übereinstimmung mit denen der Pilzkinesine. Insbesondere beim NcKin-1 weicht die Aminosäuresequenz der Nackendomäne zum Teil auch erheblich von der für die Coiled-Coil-Bildung optimalen Sequenz ab, so dass ein teilweises und vorübergehendes Aufschmelzen, zumindest der ersten Heptade dieser Sequenz, bisher nicht ausgeschlossen werden konnte.

In einer ersten Serie von Experimenten sollte daher überprüft werden, inwieweit die spezifische Sequenz und die spezifischen Eigenschaften der Coiled-Coil Nacken-

domäne des NcKin-1 Moleküls dessen Motilität beeinflussen. Hierzu wurden die einzelmolekularen Eigenschaften des NcKin-1 Wildtyps mit denen eines NcKin-1 Konstrukts verglichen, dessen gesamte Nackendomäne durch eine repetitive, vollständig synthetische und auf maximale Coiled-Coil Stabilität optimierte Aminosäuresequenz ausgetauscht wurde (siehe Kapitel 2.3.2). Da durch den Austausch sowohl die Nettoladung des Nacken Coiled-Coils als auch dessen mechanische Stabilität sowie die spezifische Aminosäuresequenz drastisch verändert wurden, sollte der Einfluss dieser Größen auf das charakteristische Verhalten des Motormoleküls auf Einzelmolekülebene nachweisbar sein. Um darüber hinaus die Hypothese eines teilweisen und vorübergehenden Aufschmelzens des Kinesinnackens während der prozessiven Bewegung des Moleküls (Kozielski et al., 1997) zu untersuchen, wurden in einer weiteren Serie von Experimenten NcKin-1 Konstrukte betrachtet, deren Nackendomänen über zwei eingefügte Cysteine an der ersten N-terminalen a Position kovalent verbunden waren. Die experimentellen Ergebnisse hierzu sind in den Kapiteln 3.1 beziehungsweise 3.2 beschrieben und werden in Kapitel 4.1 diskutiert.

Um den Einfluss der Messgeometrie auf die gemessene Maximalkraft eines NcKin-1 Motors zu bestimmen, sollte die bereits erfolgreich zur Untersuchung von nicht-prozessiven Myosinen eingesetzte Dreikugelmethode (Finer et al., 1994; Veigel et al., 2003) auf das Kinesin/Mikrotubuli System übertragen werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Kapitel 3.3 beschrieben und werden in Kapitel 4.2 diskutiert.

Der Ursprung der Prozessivität des Kinesins

Während das Kinesin-1 aus *N. crassa* ein typischer Vertreter der Gruppe der konventionellen, hochprozessiven Kinesine ist, weist das ebenfalls dimere Kinesin-3 aus *N. crassa* trotz ähnlicher Domänenorganisation und *in vivo* Funktionalität (Fuchs und Westermann, 2005) keine Anzeichen von Prozessivität auf (Adio et al., 2006). Durch einen Austausch einzelner funktioneller Untereinheiten zwischen beiden Motoren soll die Frage geklärt werden, welche strukturellen Einheiten die Prozessivität eines Kinesinmotors bestimmen. Zu diesem Zweck wurden chimäre Kinesinmotoren, bestehend aus Untereinheiten des NcKin-1 und NcKin-3 Motors, kloniert und untersucht. Alle Einzelmoleküluntersuchungen an den chimären Konstrukten sind Teil dieser Arbeit (siehe Kapitel 3.4) und werden in Kapitel 4.3 zusammen mit den Ergebnissen der von Sarah Adio am Institut für Zellbiologie der LMU München durchgeführten kinetischen Charakterisierung diskutiert.

2 Materialien und Methoden

In diesem Kapitel werden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden beschrieben. Dabei wird zuerst der Aufbau der für alle Einzelmolekülmessungen verwendeten optischen Falle vorgestellt. Es folgt eine Beschreibung der verwendeten Kinesin-Konstrukte sowie der eingesetzten Proteine und Chemikalien. Da die Herstellung und Aufreinigung der verwendeten Kinesinkonstrukte nicht Teil dieser Arbeit war, werden lediglich die zum Verständnis der hier beschriebenen Untersuchungen notwendigen Grundlagen beschrieben. Für weiterführende Aspekte wird jeweils auf geeignete Spezialliteratur verwiesen. Eine ausführliche Beschreibung der einzelnen Messmethoden sowie der zur Analyse der gewonnenen Daten eingesetzten Methoden und Werkzeuge schließt dieses Kapitel ab.

2.1 Die optische Falle

Optische Fallen, häufig auch als optische Pinzetten bezeichnet, sind Instrumente, die eine direkte Manipulation kleiner kolloidaler Teilchen mittels eines stark fokussierten Laserstrahls ermöglichen. Seit ihrer Erfindung durch Arthur Ashkin im Jahr 1986 (Ashkin et al., 1986) finden optische Fallen breite Anwendung in Medizin und Forschung. Sie ermöglichen beispielsweise eine direkte Manipulation von Viren und Zellen sowie von Zellkompartimenten innerhalb lebender Zellen (Ashkin und Dziedzic, 1987; Sheetz, 1998), ohne dabei die zu untersuchenden biologischen Systeme zu zerstören. Mittels optischer Fallen wurde es erstmals auch möglich, direkt die kraftproduzierenden Eigenschaften einzelner molekularer Motoren zu untersuchen, indem diese in geringen Dichten auf dielektrische Mikrosphären adsorbiert wurden, die wiederum mittels optischer Fallen manipuliert werden können (Block et al., 1990). Die Möglichkeit, Kräfte im Bereich zwischen einem und einigen hundert Piconewton zu messen sowie Positionsveränderungen im sub-Nanometerbereich mit einer hohen Bandbreite zu erfassen, macht die optische Falle zu einem idealen Instrument zur Erforschung dieser Klasse kraftproduzierender Proteine.

Um die Beeinflussung der zu untersuchenden biologischen Systeme durch das intensive Laserlicht möglichst gering zu halten, wird für viele Experimente mit optischen Fallen ein Nd:YAG Laser mit einer Wellenlänge von $\lambda = 1064 \text{ nm}$ als Lichtquelle gewählt. Bei dieser Wellenlänge im nahen Infrarot ist zwar die Absorption in Wasser nicht mehr im Minimum (Jackson, 1975), die direkte Schädigung der zu

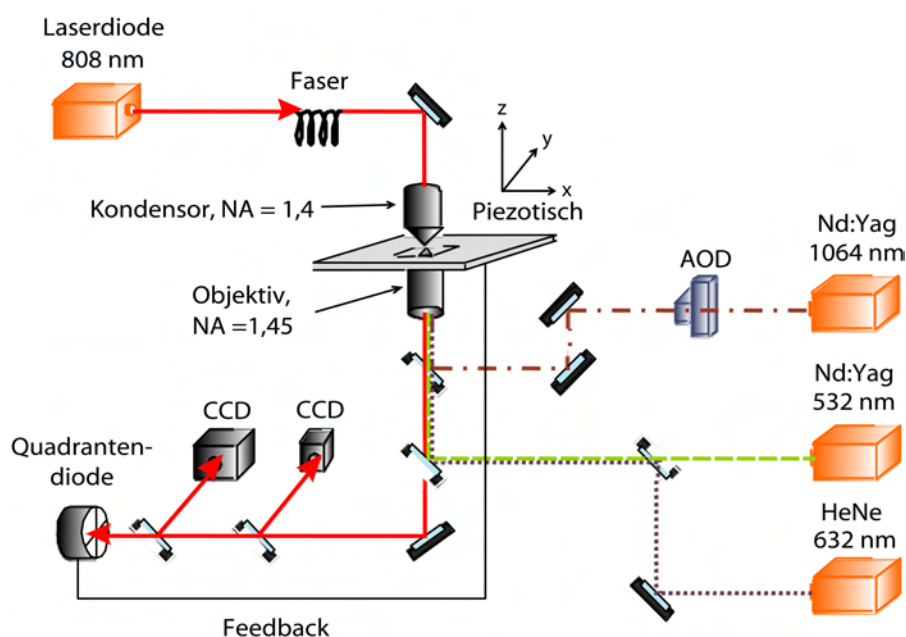


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der optischen Falle. Im Zentrum befindet sich das Objektiv mit der numerischen Apertur $NA = 1,45$, in das sowohl der Fallenlaser als auch die beiden Laser zur Fluoreszenzanregung eingekoppelt werden. Die Auskoppelung des zu detektierenden Lichts erfolgt ebenfalls über dieses Objektiv. Das gesammelte Fluoreszenzlicht wird mittels einer CCD Kamera detektiert, während eine Quadranten-diode (im Bild links unten) als schneller Positionsdetektor für die Fallenposition fungiert. Auf sie wird ein Hellfeldbild der gefangenen Kugel abgebildet. Die Laserdiode mit der Wellenlänge $\lambda = 808 \text{ nm}$ (im Bild links oben) dient hierzu als starke, monochromatische Lichtquelle und wird unter ihrer Laserschwelle betrieben, um eine Verminderung der Signalqualität durch die lasertypischen „speckles“ zu vermeiden. Ein elektronisches Feedbacksystem ermöglicht durch geeignetes Nachführen des Piezotisches eine Bestimmung der Prozessivität und Geschwindigkeit einzelner molekularer Motoren unter konstanten Kräften.

untersuchenden biologischen Proben ist jedoch geringer als bei Verwendung von Laserlicht im sichtbaren Bereich (Ashkin et al., 1987; Ashkin und Dziedzic, 1987). Auf die physikalischen Grundlagen einer optischen Falle wird in Anhang (Kapitel 6.1) näher eingegangen.

2.1.1 Der Versuchsaufbau im Überblick

Alle Messungen wurden an einer selbstgebauten optischen Falle in Verbindung mit einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Der Aufbau ist ausführlich in (Clemen

et al., 2005) beschrieben.

Abbildung 2.1 zeigt die verwendete Versuchsanordnung im Überblick. Zur Erzeugung eines dreidimensionalen Lasergradienten wird die TEM₀₀-Mode eines Nd:YAG-Lasers (Spectra Physics, max. 8 W) der Wellenlänge $\lambda = 1064$ nm durch ein Objektiv (Olympus PLAPON 60x/OIR/TIRFM, $NA = 1,45$) fokussiert. Die Position des Lasers und damit auch der resultierenden Falle kann digital durch den Einsatz eines akustooptischen Deflektors (AOD)(NEOS, ELS Elektronik Laser Systems GmbH, Groß-Zimmern, Deutschland) bestimmt werden. Durch zwei in Serie geschaltete, in ihren Ablenkrichtungen orthogonale Deflektoren ist eine exakte Positionierung des Strahls in der Ebene der Probe möglich. Insbesondere können durch schnelles Umschalten zwischen zwei oder mehreren diskreten Datensätzen für die x- und y-Position der Falle mit einer Geschwindigkeit deutlich über der Geschwindigkeit der Diffusion einer gefangenen Kugel zusätzliche Fallen erzeugt werden, ohne dass hierzu separate Strahlengänge nötig wären. Die Ansteuerung des AODs erfolgt über ein digitales Signalprozessor-Board (M62, Innovative Integrations, CA, USA) und erlaubt Wechsel zwischen verschiedenen Fallenpositionen mit einer Frequenz von mehreren 100 kHz. Die Programmierung des DSP-Boards und damit auch die Ansteuerung der AODs und des in Kapitel 2.1.2 beschriebenen Feedbacksystems über den Piezotisch erfolgte durch ein selbstgeschriebenes C-Programm.

Die Positionsdetektion

Als schneller Positionsdetektor kam eine Quadrantendiode mit nachgeschalteter Verstärkerelektronik zum Einsatz, auf die ein Hellfeldbild der gefangenen Kugel projiziert wurde. Die Positionsbestimmung erfolgt bei diesem System über Messung und paarweises Vergleichen der auf die Quadranten einfallenden Lichtintensität. Als Lichtquelle der Hellfeldbeleuchtung diente ein Diodenlaser ($\lambda = 808$ nm, max. 1 W), der, um Artefakte aufgrund der lasertypischen „speckles“ zu vermeiden, unterhalb der Laserschwelle als starke, monochromatische Lichtquelle betrieben wurde. Um trotz des für Diodenlaser typischen, eher ovalen Strahlprofils eine möglichst gleichmäßige Ausleuchtung zu erhalten, erfolgte die Einkopplung des Lichts über eine Multimode-Glasfaser (Typ F-MFD-4, Newport GmbH, Darmstadt, Deutschland). Die Gesamtbandbreite des Systems aus Photodiode und nachgeschalteten Verstärkern betrug ≈ 15 kHz (-3 dB).

Die Kalibrierung der Positionsdetektion erfolgte automatisiert durch ein selbstgeschriebenes C-Programm. Hierzu wurde eine Kugel in der Falle gefangen und auf die Mitte der Quadrantendiode abgebildet. Die der Kugelposition entsprechende Spannung wurde bestimmt, die Kugelposition anschließend um eine bekannte Strecke verschoben und die Spannungsmessung wiederholt. Aus der Differenz der ermittelten Spannungen und dem bekannten Abstand zwischen den beiden Fallenpositionen ließ sich ein Kalibrierungsfaktor für die Positionsdetektion ermitteln.

2.1.2 Bestimmung der Fallenstärke

Da die gegenwärtig zur Verfügung stehende Theorie zur Berechnung der Fallenstärke keine zuverlässigen Ergebnisse liefern kann, ist es notwendig, die Federhärte k eines in einem Lasergradienten gefangenen Teilchens experimentell zu bestimmen. Hierzu stehen mehrere Methoden zur Verfügung, deren Grundlagen in (Svoboda und Block, 1994b) und (Visscher und Block, 1998) ausführlich beschrieben sind. Bei allen in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten erfolgte die Bestimmung der Federhärte durch Messung der thermischen Fluktuation der Position einer gefangenen Kugel in einer Dimension. Die gesuchte Federkonstante ergibt sich mit Hilfe des Äquipartitionstheorems, wonach für ein Teilchen in einem harmonischen Potential

$$\frac{1}{2}k_B T = \frac{1}{2}k \langle x^2 \rangle \quad (2.1)$$

gilt, wobei k_B die Boltzmannkonstante, T die absolute Temperatur, k die Federhärte des Systems und $\langle x^2 \rangle$ die mittlere quadratische Auslenkung des beobachteten Teilchens aus dessen Ruhelage bezeichnen. Ist ein schneller und kalibrierter Positionsdetektor vorhanden, so stellt diese Methode eine einfache Möglichkeit zur Bestimmung der Federhärte einer optischen Falle dar, da eine Kenntnis der Viskosität des umgebenden Mediums und der Geometrie des gefangenen Partikels nicht notwendig ist. Darüber hinaus lässt sie sich wegen ihrer schnellen und einfachen Durchführung gut automatisieren und in den Ablauf eines Experiments integrieren. Typische Federhärten bewegten sich dabei, je nach Anwendung, zwischen 20 und 100 fN/nm.

Für einige Kugeln erfolgte zusätzlich eine Überprüfung der ermittelten Federhärte durch Bestimmung der Abfallfrequenz des Leistungsspektrums der Position einer gefangenen Kugel. Ist ein Teilchen in einem harmonischen Potential gefangen, so lässt sich seine Position x bei niedrigen Reynolds-Zahlen durch die Langevin-Gleichung

$$\beta \dot{x}(t) + kx(t) = F(t) \quad (2.2)$$

beschreiben, wobei $F(t)$ die Langevin-Kraft und β der viskose Reibungskoeffizient ist. Führt man nun $\tilde{X}(f)$, die Fourier-Transformierte von $x(t)$ ein, löst die Gleichung und wendet wiederum das Äquipartitionstheorem an, so erhält man

$$\frac{k_B T}{k} = \langle x^2 \rangle = 2\pi \int_0^\infty \tilde{X}(f) \tilde{X}^*(f) df \quad (2.3)$$

und das Leistungsspektrum

$$\tilde{X}(f) \tilde{X}^*(f) = \frac{k_B T f_c}{k \pi^2 (f^2 + f_c^2)} \quad (2.4)$$

ist eine Lorentzkurve mit der charakteristischen Abfallfrequenz

$$f_c = \frac{k}{2\pi\beta}. \quad (2.5)$$

Die Federhärte lässt sich bei bekanntem Reibungskoeffizienten

$$\beta = 6\pi\eta r \quad (2.6)$$

ermitteln, indem eine Lorentzkurve an das Spektrum angepasst und so die Abfallfrequenz f_c bestimmt wird. Für diese Methode der Kalibrierung ist keine vorherige Kalibrierung des Detektionssystems notwendig, jedoch muss der Zunahme der Viskosität des umgebenden Mediums in der Nähe der Oberfläche durch den Korrekturterm

$$\eta = \frac{1}{1 - \frac{9}{16}(r/h) + \frac{1}{8}(r/h)^3 - \frac{45}{256}(r/h)^4 - \frac{1}{16}(r/h)^5} \quad (2.7)$$

für eine Kugel mit Radius r in einem Abstand h von der Oberfläche Rechnung getragen werden (Svoboda und Block, 1994a).

Das Feedbacksystem

Um lange, ununterbrochene Läufe eines Kinesinmotors unter konstanter Kraft untersuchen zu können, wurde die optische Falle mit einem digitalen Feedbacksystem ausgestattet. Grundsätzlich sind hierzu zwei unterschiedliche Szenarien denkbar: Entweder wird DSP-gestützt die Fallenposition fortwährend der Position eines laufenden Motors angepasst, d.h. die Falle dem laufenden Motor hinterher bewegt, oder es wird der auf der Unterlage befestigte Mikrotubulus durch eine geeignete Verschiebung des Piezotisches entgegen der Laufrichtung des Motors derart bewegt, dass die Auslenkung der Kugel aus der Falle und damit die auf den Motor wirkende Kraft ebenfalls konstant gehalten werden kann. Beide Methoden erfordern eine schnelle Positionsdetektion sowie einen fortwährenden Abgleich der aktuell wirkenden mit der zu haltenden Kraft und weisen jeweils eine Reihe spezifischer Vor- und Nachteile auf.

Während sich ein Feedback über die AODs wegen deren schnellen Ansprechverhaltens besonders zum Auflösen schneller Vorgänge eignet, ändert sich hier mit der Fallenposition fortwährend auch die Position der detektierten Kugel auf der Quadrantendiode. Deren begrenzte Ausmaße und Nichtlinearität im äußeren Bereich limitieren die erreichbare Lauflänge unter den gegebenen Bedingungen auf maximal ca. 200 nm. Für die beschriebenen Versuche unter konstanten Kräften wurde daher ein Feedback über den Piezotisch gewählt. Diese Methode ist zwar weniger geeignet, extrem schnelle Bewegungen nachzuvollziehen, da mit dem Tisch stets

eine relativ große Masse bewegt werden muss, dafür ist aber die maximal erreichbare Lauflänge im Bereich einiger Mikrometer erheblich größer. Da sich darüber hinaus die Position der detektierten Kugel auf der Quadrantendiode nicht ändert, können nicht-lineare Effekte, wie sie in den Randbereichen der Quadrantendiode auftreten, vernachlässigt werden.

2.1.3 Datenerfassung

Die Aufzeichnung der Falldaten erfolgte über eine Digital-Analog-Wandlerkarte (MIO-16XE-50, National Instruments Germany GmbH, München, Deutschland) mit einer Frequenz von 1-5 kHz pro Kanal. Als Steuerungssoftware kam dabei ein in LabView 4.01 (National Instruments Germany GmbH, München, Deutschland) selbst geschriebenes Programm zum Einsatz. Da kontinuierliches Sampling mit der vorhandenen Kombination aus Datenerfassungskarte und Rechner nicht möglich war, wurden die Daten für jeweils 5 Sekunden aufgezeichnet und ohne vorherige Filterung auf Festplatte archiviert. Nach jedem 5-Sekunden-Intervall ergab sich bedingt durch die limitierende Verarbeitungsgeschwindigkeit der eingesetzten Hardware eine Totzeit, die je nach gewählter Samplingfrequenz bis zu 3 s betragen konnte. Die aufgezeichneten Daten wurden anschließend in IGOR Pro 4.01 (WaveMetrics Inc, Portland, OR) importiert und visualisiert.

Um auch höhere Samplingfrequenzen realisieren und insbesondere Einzelschritte eines laufenden Kinesinmotors auflösen zu können, wurde die oben beschriebene Hardware im Laufe der Experimente durch eine neue, leistungsfähigere Datenerfassungskarte (NI-PCI-6259, National Instruments Germany GmbH, München, Deutschland) ersetzt. Die Steuerungssoftware wurde unter LabView 7.0 komplett neu entwickelt. Im Zusammenspiel mit einem leistungsfähigeren Computer konnten nun alle Kanäle mit einer hinreichend hohen Samplingfrequenz (insgesamt maximal 1,3 MS/s) abgetastet werden, ohne dass dabei eine Totzeit feststellbar war. Bei allen folgenden Experimenten wurden Samplingraten von 40kHz pro Kanal gewählt, da so Aliasing-Effekte durch zweifaches Oversampling (siehe Kapitel 2.1.1) ausgeschlossen werden konnten und die Menge der aufgezeichneten Daten noch handhabbar blieb. Alle gewonnenen Daten wurden wiederum in Form von 5 Sekunden Datenblöcken ohne vorherige Filterung auf Festplatte gespeichert und zur Analyse in IGOR Pro 4.01 importiert.

2.1.4 Das TIRF-Fluoreszenzmikroskop

Zur Visualisierung der fluoreszenzmarkierten Mikrotubuli wurde das in den Fallenaufbau integrierte TIRF-Fluoreszenzmikroskop¹ benutzt. Als Beleuchtungsla-

¹TIRF = **T**otal **I**nternal **R**eflection **F**luorescence

ser standen dabei ein frequenzverdoppelter 100 mW Nd:YAG-Laser der Wellenlänge $\lambda = 532$ nm (Coherent Deutschland GmbH, Dieburg, Deutschland) und ein 20 mW HeNe-Laser der Wellenlänge $\lambda = 632$ nm (Coherent Deutschland GmbH, Dieburg, Deutschland) zur Verfügung. Die Einkopplung der Fluoreszenzbeleuchtung erfolgt über das Objektiv mit der numerischen Apertur $NA = 1,45$ derart, dass an der Glas/Wasser Grenzfläche der kritische Winkel der Totalreflexion überschritten wird. Dies führt zur Ausbildung eines evaneszenten Feldes mit wenigen hundert Nanometern Eindringtiefe in das Probenvolumen, wodurch nur Fluorophore in diesem Bereich angeregt werden können. Durch diese Methode lässt sich der Beitrag der Fluorophore im restlichen Probenvolumen zur Gesamtfluoreszenz im Vergleich zu konventionellen Fluoreszenzmikroskopen um mehr als einen Faktor 2000 reduzieren (Ishijima et al., 1998), was einerseits zu deutlich kontrastreicherer Bildern führt und andererseits eine erheblich höhere Konzentration fluoreszenzmarkierter Proteine in der Probenkammer erlaubt. Die in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Motilitätsassays mit einzelnen molekularen Motoren und einer hohen Konzentration fluoreszenzmarkierter Mikrotubuli im Probenvolumen sind nur mit dieser Technik möglich.

Alle zur Auswertung von Motilitätsassays verwendeten Filme wurden mittels einer CCD-Kamera (Pentamax mit Gen IV Restlichtverstärker, Roper Scientific GmbH, Ottobrunn, Deutschland) aufgezeichnet und als 8 bit TIFF-Stack auf Festplatte gespeichert. Die Kalibrierung des Abbildungsmaßstabs der CCD-Kamera erfolgte durch Verfahren einer auf einem Deckgläschen fest adhärennten fluoreszenten Probe um eine bekannte Distanz mittels des kalibrierten Piezotisches. Der dabei ermittelte Abbildungsmaßstab ergab sich zu 138 nm/pixel.

2.2 Versuchsgeometrien

2.2.1 Die klassische Einzelkugelmethode

Die klassische Einzelkugelmethode eignet sich insbesondere für Messungen an mechanisch prozessiven, zytoskelett-assoziierten molekularen Motoren. Wie in Abbildung 2.2 gezeigt, werden die zu untersuchenden Motormoleküle, in diesem Fall Motoren der Kinesinfamilie, in geringen Dichten auf Latexkugeln adsorbiert, die im Gradienten einer Laserfalle gefangen und in Kontakt zu fest auf der Oberfläche verankerten Mikrotubuli gebracht werden. Ist der Kinesinmotor aktiv, so beginnt er bei Kontakt mit dem Mikrotubulus seinen prozessiven Lauf und lenkt die Kugel entsprechend der von ihm produzierten Kraft aus ihrer Ruhelage aus. Wird die Position der Laserfalle nicht verändert, so erreicht der Motor seine Maximalkraft F_{max} , verliert schließlich den Kontakt zum Mikrotubulus, und die Kugel kehrt in ihre Ausgangsposition zurück. Mittels dieser Methode lässt sich sowohl die

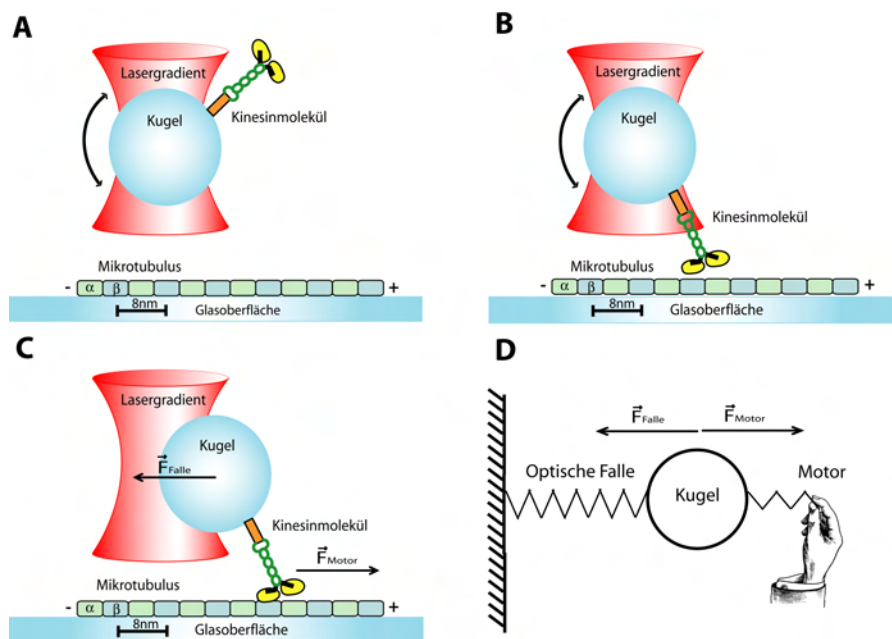


Abbildung 2.2: Die klassische Einzelkugelmethode.

(A)-(B): Eine Polystyrolkugel mit adsorbiertem Kinesinmolekül wird in der optischen Falle gefangen und in die Nähe eines auf der Oberfläche fixierten Mikrotubulus gebracht. Die Kugel ist in ihrem Fallenpotential frei drehbar. (C): Bei Kontakt des Motormoleküls mit dem Mikrotubulus kann dieses seinen prozessiven Lauf beginnen und zieht die Kugel aus dem Fallenzentrum. Die dabei auf den Motor wirkende rücktreibende Kraft ist direkt proportional zur Auslenkung. Verliert der Motor den Kontakt zum Mikrotubulus, so wird die Kugel von der Falle zurück in ihre Ausgangsposition gezogen. (D): Schematische Darstellung der mechanischen Elemente. Die optische Falle wirkt wie eine mechanische Feder, die auf die von einem aktiven molekularen Motor aus ihrer Ruhelage ausgelenkte Kugel eine rücktreibende Kraft ausübt. Bei bekannter Federhärte der Falle muss nur die Auslenkung der Kugel bestimmt werden, um die vom Motor produzierte Kraft zu messen. Die Motor/Kugel-Bindung besitzt ebenfalls eine Elastizität und kann das dynamische Verhalten des Systems gerade unter niedrigen Kräften beeinflussen.

vom Motor produzierte Maximalkraft als auch seine charakteristische Schrittweite bestimmen. Darüber hinaus gehende Aussagen bezüglich der Prozessivität und typischen Geschwindigkeiten des Motors unter Last erfordern den Einsatz eines elektronischen Feedbacksystems, das die auf den Motor wirkende Kraft konstant halten kann (siehe Kapitel 2.1.2).

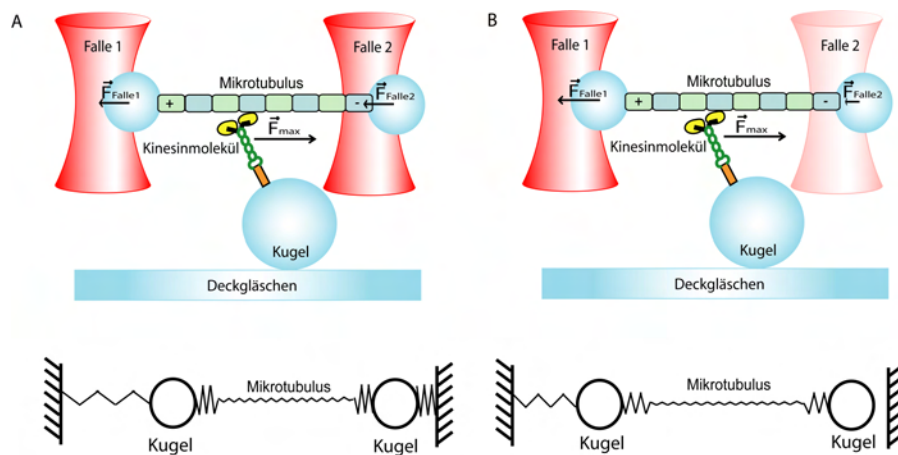


Abbildung 2.3: Ein Mikrotubulus wird zwischen zwei in der optischen Falle gehaltenen Kugeln eingespannt und in die Nähe einer auf der Oberfläche fixierten dritten Kugel gebracht, auf die Kinesinmoleküle in einer hinreichend geringen Dichte adsorbiert sind. Kommt es zu einer Interaktion zwischen Motor und Mikrotubulus, so wird der Mikrotubulus vom Motor transportiert, und die beiden mit dem Mikrotubulus verbundenen Kugeln werden aus ihren Ruhelagen ausgelenkt. **(A):** Die beiden Fallen besitzen eine identische Federhärte. Durch den angreifenden Kinesinmotor werden beide Fallen aus ihrer Ruhelage ausgelenkt. Da auch die rechte Falle eine Kraft auf den Mikrotubulus ausübt, wird dieser gestaucht. Für eine korrekte Kraftmessung müssen beide Auslenkungen gemessen und die elastischen Eigenschaften des Mikrotubulus sowie der Kugel/Mikrotubulus Bindung mit berücksichtigt werden.

(B): Die Federhärte der rechten Falle beträgt weniger als 5% der Federhärte der linken Falle (siehe Text). Die von der rechten Falle ausgeübte Kraft reicht nicht aus, um den Mikrotubulus zu stauchen und ist auch insgesamt klein genug, um vernachlässigt werden zu können. Für eine korrekte Kraftmessung genügt die Messung der Auslenkung der Kugel aus der stärkeren, linken Falle.

2.2.2 Die Dreikugelmethode

Für Messungen an mechanisch nicht-prozessiven Kinesinen ist die oben beschriebene Einzelkugelmethode ungeeignet. Nicht-prozessive Motoren durchlaufen bei jedem Kontakt mit einem Mikrotubulus nur einen ATPase-Zyklus und dissoziieren anschließend sofort wieder vom Mikrotubulus ab. Ein Kraftschlag eines derartigen Kinesins würde daher im thermischen Rauschen der in der Falle gehaltenen Kugel untergehen. Eine alternative Anordnung, die auch eine Untersuchung der kraftproduzierenden Eigenschaften nicht-prozessiver molekularer Motoren erlaubt, ist die „Dreikugelmethode“ (Finer et al., 1994). Diese Methode wurde bereits erfolgreich zur Untersuchung des nicht-prozessiven Myosin-II eingesetzt (Veigel et al., 1998) und im Rahmen dieser Arbeit auf das Kinesin/Mikrotubuli System übertragen. Der

grundlegende Aufbau des Experiments wird aus Abbildung 2.3 ersichtlich. Ein Mikrotubulus wird zwischen zwei in unabhängigen Fallen (der Einfachheit halber als linke und rechte Falle bezeichnet) gehaltenen Polystyrolkugeln gefangen und eingespannt. Anschließend wird der Mikrotubulus in die Nähe einer dritten, auf der Oberfläche eines Deckgläschens fixierten Kugel gebracht, auf die zuvor Kinesinmoleküle in einer hinreichend geringen Dichte adsorbiert wurden. Greift ein aktives Kinesin an den Mikrotubulus an und transportiert diesen ein Stück entlang seiner Achse, so werden auch die in den Fallen gefangenen Kugeln aus ihren jeweiligen Ruhelagen ausgelenkt. Im Gegensatz zur Einzelkugelmethode ist der angreifende Motor nicht auf einer frei drehbaren Kugel befestigt, sein Kraftschlag wird daher auch nicht durch die Bewegung der Kugel überdeckt. Die Dreikugelmethode erlaubt damit auch für nicht-prozessive Motoren eine Messung der produzierten Kraft und der Länge eines Schrittereignisses.

Während bei der Einzelkugelmethode für eine exakte Kraftmessung lediglich die Kenntnis der Federhärte einer Falle nötig ist, sind die Verhältnisse bei der Dreikugelmethode etwas komplexer. Durch die Kombination zweier Fallen mit nicht zwangsweise identischen Federhärten, der Elastizität des eingespannten Filaments und der Elastizität der Kugel/Filament-Bindung kommt es zu Effekten, deren Auswirkungen im folgenden Abschnitt näher betrachtet werden.

Die mechanischen Elemente bei Experimenten in der Dreikugelanordnung

Abbildung 2.4 zeigt schematisiert die mechanischen Elemente bei Fallenmessungen mit der Dreikugelmethode. Nimmt man den zwischen den beiden Fallen eingespannten Mikrotubulus vereinfachend als vollkommen starr an, so ergibt sich die gesamte axiale Federhärte κ_x der Anordnung einfach als die Summe der Federhärten der beiden Fallen κ_L und κ_R . Wegen des starren Körpers zwischen den beiden Kugeln ist die Auslenkung beider Kugeln aus ihren Ruhelagen gleich groß. Bei Kenntnis der Federhärten der beiden Fallen genügt damit die Positionsmessung einer Kugel zur Bestimmung von Kraft und Schrittweite eines angreifenden Motors. Verhält sich das eingespannte Filament dagegen nicht wie ein starrer Körper, sondern besitzt selbst eine Federhärte κ_{Filament} , die sich als Serienschaltung von Federn gemäß

$$\frac{1}{\kappa_{\text{Filament}}} = \frac{1}{\kappa_{B1}} + \frac{1}{\kappa_{MT}} + \frac{1}{\kappa_{B2}} \quad (2.8)$$

aus den Federhärten κ_{MT} des Mikrotubulus sowie der beiden Mikrotubuli/Kugel Anbindungen κ_{B1} und κ_{B2} zusammensetzt, so ergibt sich die Federhärte des Gesamtsystems bei zwei gleich starken Fallen zu

$$\kappa_x = \frac{\kappa_{\text{Falle}} \cdot \kappa_{\text{Filament}}}{\kappa_{\text{Falle}} + \kappa_{\text{Filament}}} + \kappa_{\text{Falle}} \quad (2.9)$$



Abbildung 2.4: Mechanische Elemente der Dreikugelmethode: Die Federhärte des Gesamtsystems setzt sich aus den Federhärten der beiden Fallen κ_L und κ_R , der Federhärte des eingespannten Mikrotubulus κ_{MT} und den Federhärten der beiden Mikrotubuli/Kugel Bindungen κ_{B1} und κ_{B2} zusammen.

Für Untersuchungen der Dynamik nicht-prozessiver Motoren ist es sinnvoll, den zwischen den beiden Kugeln festgehaltenen Mikrotubulus mechanisch vorzuspannen. Auf diese Weise kann sichergestellt werden, dass die elastischen Elemente aus Gleichung 2.8 hinreichend gespannt sind und die Schrittweite des angreifenden Motors nicht systematisch unterschätzt wird.

Für die Bestimmung der Maximalkraft des prozessiven NcKin-1 mittels der Dreikugelmethode stand nur ein Positionsdetektor zur Verfügung. Um trotzdem sowohl die vom Motor produzierte Maximalkraft als auch dessen typische Schrittweite bestimmen zu können, wurde die klassische Dreikugelmethode modifiziert. Da die beiden diskreten Fallenpositionen von einem Laserstrahl durch schnelle Positionswechsel mittels des akustooptischen Deflektors erzeugt werden, kann die Lichtintensität an jedem Ort und damit auch die Stärke der jeweiligen Falle beliebig gewählt werden. Wählt man nun, wie in Abbildung 2.3 (B) dargestellt, durch geeignete Programmierung der AODs die Bedingungen derart, dass $> 95\%$ der Laserleistung auf die linke und $< 5\%$ auf die rechte Falle entfallen, so ergibt sich dasselbe Verhältnis auch für die jeweiligen Federhärten. Wird die Polarität des gefangenen Mikrotubulus derart gewählt, dass die detektierte Kugel bei einem aktiven Motor aus ihrem Potential gezogen wird, während die nicht detektierte, nur schwach gefangene Kugel aus ihrem Potential geschoben wird, so genügt in dieser Versuchsanordnung die Messung der Position der linken Kugel. Ist die Federhärte der schwächeren Falle nämlich hinreichend gering, so ist der eingespannte Mikrotubulus durch die von ihr verursachte rücktreibende Kraft keiner nennenswerten Stauchung unterworfen und kann damit wieder in guter Näherung als starr angenommen werden. Die durch die rechte Falle verursachte Kraft beträgt weniger als 5% der von der linken Falle ausgeübten Kraft und kann, wie die folgenden Abschätzungen verdeutlichen, ebenfalls vernachlässigt werden:

Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen betrug die Länge des zwischen den beiden Kugeln eingespannten Mikrotubulus etwa $5 \mu\text{m}$. Bei einer Biegesteifig-

keit EI des Mikrotubulus von etwa $30 \cdot 10^{-24} \text{ Nm}^2$ (Gittes et al., 1993) beträgt die kritische Kraft

$$F_c = \pi^2 \frac{EI}{l^2} \quad (2.10)$$

für eine Stauchung etwa 12 pN. Die Annahme eines starren Körpers für den eingespannten Mikrotubulus ist damit zulässig.

Typische Federhärten für die stärkere, detektierte Falle, gemessen mit einer freien Kugel, bewegten sich bei allen Versuchen im Bereich zwischen 60 und 70 fN/nm. Ein stabiles Halten der in der schwächeren rechten Falle gefangenen Kugel war unter den eingestellten Bedingungen nur dann möglich, wenn die Kugel über einen angebundenen Mikrotubulus durch die linke, in der stärkeren Falle festgehaltenen Kugel stabilisiert wurde. Eine Bestimmung der Federhärte der rechten Falle war daher nur unter diesen Bedingungen möglich. Mit angebundenem Mikrotubulus ergaben sich für die rechte Falle typische Federhärten zwischen 2 und 5 fN/nm. Um darüber hinaus eine obere Schranke für die Federhärte dieser Falle zu erhalten, wurde getestet, ab welchen Federhärten und bei welchen relativen Laserintensitäten bei identischer Ausgangsleistung des Lasers ein stabiles Fangen einer einzelnen Kugel am Ort der schwächeren Falle wieder möglich wurde. Dies war bei einer Verteilung von ca. 88:12 der Fall. Die entsprechende Federhärte betrug bei diesem Intensitätsverhältnis etwa 7 fN/nm. Bei dem für die Experimente gewählten Verhältnis von 95:5 in der in den Fallen deponierten Lichtintensität ist der Fehler in der Kraftmessung damit deutlich kleiner als 5%.

2.3 Verwendete Proteine und Reagenzien

In den folgenden Kapiteln werden die verwendeten Proteine und Reagenzien sowie die Vorbereitung der Proben beschrieben. Sofern im Text nicht anders erwähnt, stammen alle verwendeten Reagenzien von Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland). Alle Kinesinkonstrukte sowie aufgereinigtes Tubulin wurden im Rahmen einer Kooperation von Dr. Günther Woehlke und dessen Gruppe am Institut für Zellbiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München bezogen. Da insbesondere in der Dissertation von Friederike Bathe (Bathe, 2005) ausführlich auf die Klonierung und Aufreinigung der hier verwendeten NcKin-1 Konstrukte eingegangen wird, sind die entsprechenden Abschnitte in dieser Arbeit bewusst kurz gehalten und auf das für das Verständnis der folgenden Kapitel notwendige Minimum beschränkt.

2.3.1 Verwendete Puffer

Der bei allen Experimenten mit Kinesin verwendete BRB-80 Puffer bestand aus 80mM PIPES · KOH, (pH 6,8), 2mM MgCl₂ und 1mM EGTA. Als Motilitätspuffer kam BRB-80 mit zusätzlich 100mM KCl, 0,5mg/ml Casein und einer variablen Menge ATP zum Einsatz. Um dem Puffer freien Sauerstoff zu entziehen und damit Bleicheffekte und oxidative Prozesse zu minimieren, wurden dem Motilitätspuffer zusätzlich 6 µg/ml Glucoseoxidase, 1 µg/ml Katalase und 1% Glucose zugesetzt. Als Waschpuffer zum Ausspülen nicht adsorbierter Proteine und zur Absättigung der Oberflächen wurde BRB-80 mit zusätzlich 1mg/ml BSA (BRBSA) verwendet. Alle Puffer, die mit Mikrotubuli in Kontakt kamen, enthielten zusätzlich 20 µM Taxol.

Sämtliche Pufferlösungen wurden an jedem Versuchstag frisch zubereitet und bei Raumtemperatur aufbewahrt, um bei Kontakt mit den Mikrotubuli deren Depolymerisation zu vermeiden.

2.3.2 Die verwendeten Kinesinkonstrukte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Kinesine mit Ausnahme des NcKin-3/1 Chimärs basieren auf dem Kinesin-1 des filamentösen Pilzes *Neurospora crassa*. Um dieses Motorprotein leichter in *E. coli* exprimieren zu können und außerdem eine Selbstregulation (Coy et al., 1999; Friedman und Vale, 1999; Stock et al., 1999; Seiler et al., 2000) durch die Lastenbindungsdomäne des Proteins zu verhindern, wurden die Konstrukte auf die ersten 433 N-terminalen Aminosäuren verkürzt (NcKin-433). Das NcKin-433 Molekül ist ein stabiles Dimer und in seinen charakteristischen Eigenschaften dem nativen NcKin-1 Vollängenkonstrukt sehr ähnlich (Kallipolitou, 2002; Bathe, 2005).

Der NcKin-1 Wildtyp

Um NcKin-433 Konstrukte leicht an Glasoberflächen und carboxymodifizierte Polystyrolkugeln anbinden zu können, wurde an das Molekül C-terminal der Scharnierregion zusätzlich ein Teil der Stalk-Region des humanen Kinesins KIF5B (Aminosäuren 432-546) angehängt. Die so erhaltenen Motoren unterscheiden sich in ihren charakteristischen Eigenschaften nicht vom NcKin-433 beziehungsweise dem nativen NcKin-1 Vollängenkonstrukt, sind *in vitro* stabil (Kallipolitou, 2002; Bathe, 2005) und werden in den folgenden Kapiteln als NcKin-1 Wildtyp oder NcKin-1 WT Konstrukt bezeichnet.

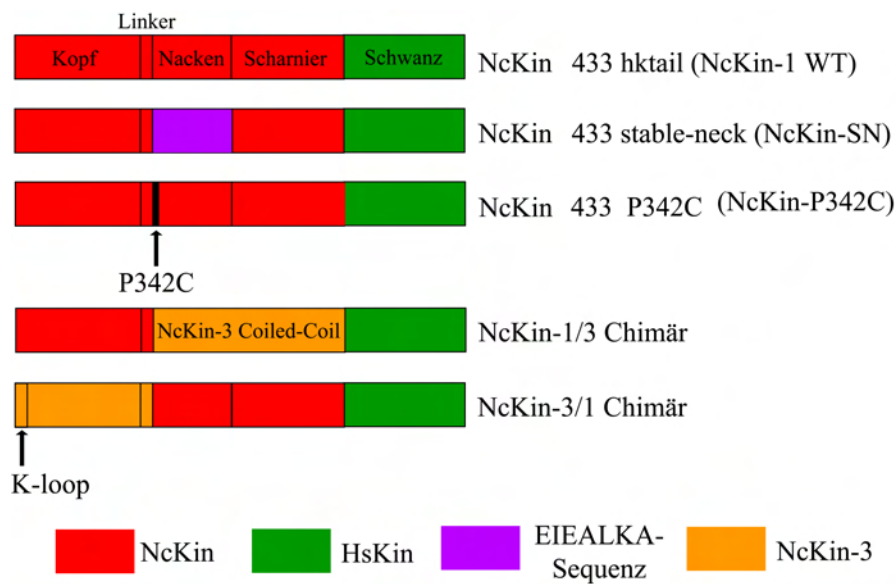


Abbildung 2.5: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Kinesinkonstrukte. Die Farbcodierung zeigt den Ursprung der jeweiligen Domänen. Alle NcKin-1 Konstrukte basieren auf dem NcKin-433 Motor, der *in vitro* stabil und in seinen charakteristischen Eigenschaften dem NcKin-1 Vollängenkonstrukt sehr ähnlich ist (Kallipolitou, 2002; Bathé, 2005). Um die erhaltenen Konstrukte leicht auf Glas oder carboxyfunctionalisierte Polystyrolkugeln adsorbieren zu können, wurde C-terminal ein zusätzliches Segment der Schwanzregion des humanen Kinesins KIF5B (Aminosäuren 432-546 des KIF5B) angehängt (NcKin-433 hktail).

Das chimäre NcKin-3/1 Konstrukt basiert auf den ersten 429 N-terminalen Aminosäuren des NcKin3-558 (Adio et al., 2006), an die zusätzlich C-terminal die Nackendomäne des NcKin-1 (Aminosäuren 342-374) sowie die für die Anheftung des Moleküls benötigte Sequenz aus der Schwanzregion des KIF5B angefügt wurde.

Das stable-neck-Konstrukt

Für eine Untersuchung des spezifischen Einflusses der charakteristischen Coiled-Coil Nackenregion des NcKin-1 auf die Motilitätseigenschaften des molekularen Motors (siehe Kapitel 1.6) wurde der gesamte Nacken des NcKin-1 zwischen den Aminosäuren 342 und 374 durch eine repetitive, auf maximale Stabilität optimierte, voll synthetische Coiled-Coil Aminosäuresequenz („stable-neck“) ersetzt (siehe Abbildung 2.6). Diese so genannte EIEALKA-Sequenz (Su et al., 1994; Romberg et al., 1998) wurde dabei so in das NcKin-1 Molekül eingefügt, dass sowohl die Länge als auch die Phase des Nacken-Coiled-Coils erhalten blieben. Lediglich sieben Aminosäurereste der Nackendomäne blieben durch den Austausch an ihren angestammten Plätzen, da sie für die Ausbildung des für die Coiled-Coil Bildung

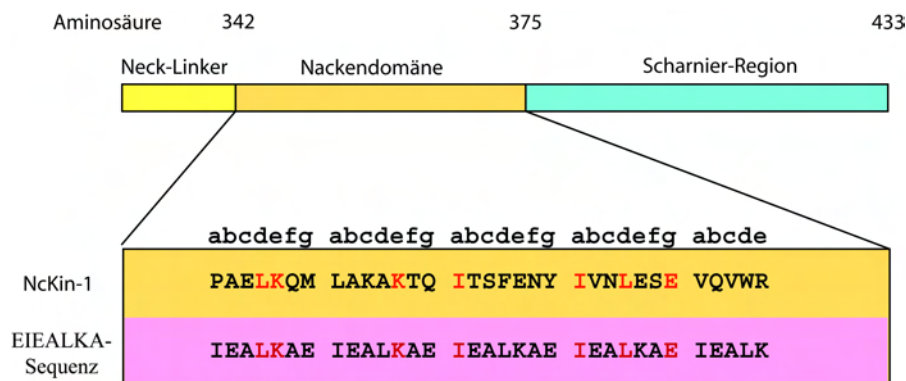


Abbildung 2.6: Vergleich der Nackensequenz des NcKin-1 WT und NcKin-SN. Durch den Austausch der nativen NcKin-1 Nackensequenz (oben, orange hinterlegt) gegen die synthetische, repetitive EIEALKA-Sequenz (unten, violett hinterlegt) bleiben die Länge und Phase des Nacken Coiled-Coils erhalten, es ändert sich jedoch sowohl die mechanische Flexibilität als auch die Nettoladung des Nackens (siehe Text). Die rot markierten Residuen bleiben vom Austausch unberührt, da sie zur Ausbildung des für die Coiled-Coil Bildung notwendigen hydrophoben Streifens erforderlich sind.

notwendigen hydrophoben Streifens erforderlich sind.

Ein Segment der EIEALKA-Sequenz vergleichbarer Länge wies in Untersuchungen eine Schmelztemperatur von $\approx 140^\circ\text{C}$ auf (Su et al., 1994), während der Schmelzpunkt des nativen NcKin-1 Nacken Coiled-Coils zu $\approx 47^\circ\text{C}$ bestimmt wurde (Bathe, 2005). ΔG für die Denaturierung der EIEALKA-Sequenz wurde zu $\Delta G > 80 \text{ kJ/mol}$ bestimmt (Su et al., 1994; Tripet et al., 1997) und liegt damit deutlich über der bei der Hydrolyse eines Moleküls ATP ($\Delta G \approx 32 \text{ kJ/mol}$) freiwerdenden Energie unter physiologischen Bedingungen. Ein Aufschmelzen der EIEALKA-Sequenz im Kinesinnacken während der prozessiven Bewegung des Motormoleküls kann daher als äußerst unwahrscheinlich angenommen werden. Durch das Einsetzen der EIEALKA-Sequenz wird neben der Stabilität der Nackendomäne auch deren Nettoladung deutlich verändert. Während die Nackensequenz des NcKin-1 Wildtyps unter physiologischen pH-Werten elektrisch neutral ist, weist das NcKin-SN Konstrukt in seiner ausgetauschten Nackendomäne unter identischen Bedingungen eine Nettoladung von $-7e$ auf.

Das NcKin-P342C Konstrukt

Die Möglichkeit des Aufschmelzens der ersten Heptade des Kinesinnackens während eines prozessiven Laufs wurde an Kinesinkonstrukten untersucht, deren schwere Ketten am N-terminalen Ende des Nackens kovalent miteinander verbunden wur-

den. Hierzu wurde ein Prolin an der α -Position der ersten Heptade der Nacken Coiled-Coil durch ein Cystein ersetzt (NcKin-P342C). Unter oxidierenden Pufferbedingungen bildet sich aufgrund der räumlichen Nähe zwischen den beiden Cystein-Resten eine Disulfidbrücke aus, die ein eventuelles Aufschmelzen der Nackendomäne des Moleküls während eines prozessiven Laufs verhindert. Unter reduzierenden Bedingungen kann die Disulfidbrücke zwischen den beiden schweren Ketten wieder gelöst werden, wodurch ein eventuell notwendiges Aufschmelzen des Kinesinackens während eines prozessiven Laufs des Moleküls wieder möglich wäre.

Die chimären Kinesine NcKin-1/3 und NcKin-3/1

Das in dieser Arbeit untersuchte NcKin-1/3 Chimär bestand aus den ersten 342 N-terminalen Aminosäuren des prozessiven NcKin-1, an das die Aminosäuren 482 bis 558 des nicht-prozessiven Kinesin-3 aus *N. crassa* (NcKin-3) angehängt wurden (siehe Abbildung 2.5). Der resultierende Motor besaß damit die Motordomänen und Neck-Linker des prozessiven NcKin-1, während die Dimerisierungsdomäne und ein Teil des Schwanzes vom Kinesin-3 stammte. Um über eine einfache Möglichkeit zu verfügen, auch diesen Motor an Glasoberflächen oder carboxylierte Polystyrolkugeln zu binden, wurden wie beim NcKin-1 Wildtyp und seinen Mutanten zusätzlich die Aminosäuren 432 bis 546 aus der Schwanzdomäne des humanen Kinesins KIF5B angefügt. Die ATPase-Eigenschaften der daraus resultierenden Proteine waren identisch zu den Eigenschaften der Konstrukte ohne zusätzlich angehängte humane Schwanzregion (Adio et al., 2007).

Das dem NcKin-1/3 komplementäre NcKin-3/1 Konstrukt bestand aus den Motordomänen und den Neck-Linkern des nicht-prozessiven NcKin-3 (Aminosäuren NcKin-3 1-429) (Adio et al., 2006) sowie der für die Dimerisierung notwendigen Nacken- und Scharnierdomäne des prozessiven NcKin-1 (Aminosäuren NcKin-1 332-433).

2.3.3 Aufreinigung der Kinesinkonstrukte

Der NcKin-1 Wildtyp und das NcKin-SN Konstrukt

Der NcKin-1 Wildtyp und das NcKin-SN Konstrukt wurden in *E. coli* exprimiert und über ihre Affinität zu Mikrotubuli aufgereinigt (Bathe, 2005; Henningsen und Schliwa, 1997; Kallipolitou et al., 2001; Steinberg und Schliwa, 1995). Das fertige Protein lag in einem Puffer bestehend aus 100 mM PIPES-KOH (pH 6,8), 2 mM MgCl₂, 1mM EGTA, 10 mM ATP und 10% (v/v) Glycerin vor und war tiefgekühlt bei -70°C mehrere Monate haltbar, ohne dass dabei eine Abnahme der Aktivität erkennbar gewesen wäre.

Das NcKin-P342C Konstrukt

Das NcKin-P342-C Konstrukt wurde wie der NcKin-1 Wildtyp in *E. coli* exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie über eine 5 ml HiTrap SP-Sepharose Säule (Crevel et al., 1999). Ein ausführliches Protokoll findet sich in (Bathe, 2005). Das Protein lag nach Abschluss der Aufreinigung in einem Puffer bestehend aus 20 mM Na₃PO₄ (pH 7,4), 5 mM MgCl₂, 10 μM ATP sowie, je nach gesammelter Fraktion, zusätzlich 100 – 200 mM NaCl vor. Mit 10% (v/v) Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -70°C gelagert, war es ebenfalls mehrere Monate ohne erkennbaren Aktivitätsverlust haltbar.

Die chimäre NcKin-1/3 und NcKin-3/1 Konstrukte

Die chimären NcKin-1/3 und NcKin-3/1 Konstrukte wurden, wie in (Adio et al., 2006, 2007) beschrieben, in *E. coli* exprimiert, analog zum NcKin-P342C Konstrukt durch Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt, mit 10% (v/v) Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -70°C gelagert.

2.3.4 Tubulin und Mikrotubuli

Tubulin wurde in drei Polymerisations- und Depolymerisationszyklen aus frischem Schweinehirn aufgereinigt (Mandelkow et al., 1985), durch Zugabe von 0,1 mM GTP stabilisiert, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -70°C aufbewahrt. Um Mikrotubuli im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, wurde an einen Teil des gewonnenen Tubulins der Fluoreszenzfarbstoff Cy-5 angebunden. Hierzu wurde monoreaktiver Cy-5-succinimidyl Ester (Cy-5-OSu monofunctional reactive Fluorophore, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) an polymerisierte Mikrotubuli gekoppelt. Die Verwendung polymerisierter Mikrotubuli stellte sicher, dass die für die Polymerisation wichtigen Zentren des Tubulins geschützt waren und die Polymerisationsfähigkeit des Tubulins nicht beeinträchtigt war. Ein ausführliches Protokoll hierzu findet sich in (Bathe, 2005).

Vor der Polymerisation des Tubulins wurde unmarkiertes Tubulin im Verhältnis 20:1 mit Cy-5 Tubulin gemischt und anschließend in einer luftgetriebenen Ultrazentrifuge (Beckman Airfuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) für 15 Minuten bei 4°C und maximaler Umdrehungszahl ($\approx 150.000 \times g$) zentrifugiert, um eventuelle Reste denaturierten Tubulins abzutrennen. Der Überstand wurde mit 1 mM GTP versetzt und in einem Heizblock bei 37°C für 10 Minuten anpolymerisiert. Zur Stabilisierung der Mikrotubuli wurden anschließend 20 μM Taxol in DMSO zugesetzt und die Polymerisationsreaktion für weitere 20 Minuten bei 37°C fortgesetzt.

2.4 Vorbereitung der Proben

2.4.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Der Oxidationszustand der Cysteine im Nacken des NcKin-P342C Konstrukts wurde durch eine SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen bestimmt. Ein Teil des NcKin-P342C Proteins wurde dazu für zwei Stunden auf Eis mit 5 mM DTT inkubiert, um die zwischen den Cysteinen ausgebildeten Disulfidbrücken zu spalten. Die für die Gelelektrophorese verwendeten Puffer sind in Tabelle 6.1 in Kapitel 6.2 aufgeführt. Alle Gele wurden in einem „Multigel-Long-System“ (Biometra GmbH, München, Deutschland) bei Spannungen von 50-100V gefahren. Die zu untersuchenden Proteine und der Gewichtsstandard (High-Range SDS Standard, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) wurden mit Lämmli-Puffer (Laemmli, 1970) gemischt, für fünf Minuten bei 95°C inkubiert und sofort auf das Gel aufgetragen.

Nach dem Durchlaufen der Gele wurden diese für 30-60 Minuten in Comassie Färbelösung eingelegt, anschließend mit Milliporewasser gewaschen und in 10%iger Essigsäure entfärbt. Die Gele wurden auf einem Flachbettscanner (CanoScan LiDE 60, Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland) eingescannt und archiviert.

2.4.2 Aufbau der Messkammern

Zur Herstellung der Messkammern wurden handelsübliche Deckgläschen der Größe 18x18mm mittels zweier dünner Streifen Vakuumsfett (Hochvakuumsfett schwer, Wacker Chemie, Burghausen, Deutschland) auf einen Objektträger geklebt. Durch gleichmäßiges Andrücken entstand eine Probenkammer mit einem Volumen von 10 – 20µl, in welche die zu untersuchenden Proben eingespült und aus der nicht adsorbierte Proteine wieder ausgewaschen werden konnten. Vor der Messung wurde die Fluidkammer durch zwei zusätzliche Streifen Vakuumsfett versiegelt, um die Verdunstung des Wassers und damit die Änderung der Salzkonzentrationen zu vermeiden.

2.4.3 *In vitro* Motilitätsassays

Für alle *in vitro* Motilitätsassays mit Kinesin wurden ausschließlich Kinesinkonstrukte benutzt, die das C-terminal zusätzlich angefügte Schwanzsegment des humanen KIF5B aufwiesen. Diese Konstrukte haften sehr gut unspezifisch an Glasoberflächen und zeigen bei der Adsorption keine Anzeichen für Aggregation. Fluidzellen wurden zuerst für drei Minuten mit 0,06 mg/ml BSA in BRB-80 vorgeblockt

und anschließend mit 20 μl verdünnter Kinesin-Lösung² in BRB-80 inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 100 μl BRBSA wurden 0,1 μl Mikrotubuli verdünnt in 50 μl Motilitätspuffer durch die Fluidzelle gespült. Alle Motilitätsassays wurden bei 23-24°C durchgeführt.

2.5 Fallenexperimente mittels der Einzelkugelmethode

2.5.1 Anbindung der Mikrotubuli auf der Glasoberfläche durch polyklonale Tubulin-Antikörper

Fluidzellen wurden, wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, hergestellt und bei Raumtemperatur für mindestens 15 Minuten mit 0,1 mg/ml eines polyklonalen Tubulin Antikörpers (ab1289, Acris Antibodies, Hiddenhausen, Deutschland) verdünnt in BRB-80 inkubiert. Nicht adsorbierte Antikörper wurden in einem Waschschrift mit 100 μl BRBSA ausgespült, wobei durch das enthaltene BSA gleichzeitig die noch vorhandenen unspezifischen Bindungsstellen auf dem Deckgläschen abgesättigt werden. Zur Anbindung der Mikrotubuli wurden mindestens 20 μl einer verdünnten Mikrotubulilösung langsam und gleichmäßig in die Zelle eingespült, um eine Orientierung der Filamente in Richtung des Flusses zu erzielen. Nach drei Minuten Inkubation erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 100 μl BRBSA, um ungebundene Mikrotubuli aus der Fluidkammer zu entfernen.

2.5.2 Anbindung biotinylierter Mikrotubuli auf Streptavidin-beschichteten Glasoberflächen

Fluidzellen wurden, wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, hergestellt und bei Raumtemperatur für etwa zehn Minuten mit 0,3 mg/ml BBSA in PBS (pH 7,4) inkubiert. Nicht auf den Glasoberflächen adsorbiertes BBSA wurde anschließend in einem Spülschrift mit 100 μl BRBSA ausgespült und die Zelle für mindestens drei Minuten mit einer Lösung von 0,3 mg/ml Streptavidin in PBS (pH 7,4) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 100 μl BRBSA wurden 20 μl verdünnte Mikrotubuli langsam und gleichmäßig in die Zelle eingespült. Sofort im Anschluss erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 50 μl BRBSA.

Um sicherzustellen, dass die Methode der Mikrotubulianbindung auf Glasoberflächen keinen Einfluss auf das Verhalten der zu messenden Motorproteine ausübt, wurden Vergleichsmessungen mit dem NcKin-1 Wildtyp Motoren durchgeführt.

²Da die einzelnen Kinesinchargen unterschiedlich konzentriert waren, musste die optimale Verdünnung für jede Charge experimentell ermittelt werden.

Hierbei war keinerlei Einfluss der Anbindungsmethode auf die gemessenen Proteineigenschaften feststellbar. Für die Mehrzahl der Versuche wurde eine Anbindung über das Streptavidin/Biotin System gewählt, da sich mit dieser Methode die Oberflächendichte der fixierten Mikrotubuli leichter den jeweiligen Bedürfnissen anpassen ließ.

2.5.3 Präparation der motorbeschichteten Kugeln

Für die Präparation der Kugeln wurden carboxylierte Polystyrolkugeln mit einem Durchmesser von 532 nm (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland) im Verhältnis 1:5 in BRB-80 verdünnt. 10 μ l dieser Verdünnung wurden schnell mit gleichen Volumina einer Caseinlösung in BRB-80 (5 mg/ml) und ebenfalls in BRB-80 verdünntem Kinesin gemischt. Nach mindestens fünf Minuten Inkubation auf Eis wurde die Kugel/Motor-Mischung 1:2000 in Motilitätspuffer verdünnt und ein Teil dieser Verdünnung in die Zelle mit den angebundenen Mikrotubuli gespült.

2.5.4 Abschätzung der Motorendichte auf den Kugeln

Die Dichte der auf die Kugeln adsorbierten Motoren wurde bei allen Experimenten so eingestellt, dass höchstens 1/3 der getesteten Kugeln bei Kontakt mit einem Mikrotubulus Aktivität zeigte. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass es sich bei der Mehrheit der beobachteten Ereignisse um wirkliche Einzelmolekulereignisse handelte und nicht mehrere Motoren gleichzeitig mit einem Mikrotubulus interagierten.

Für eine Abschätzung der Anzahl gleichzeitig mit einem Mikrotubulus interagierender Motoren nimmt man an, dass die eingesetzten Motormoleküle voneinander unabhängig an zufällige Punkte der Kugeloberfläche adsorbieren. In diesem Fall lässt sich laut (Block et al., 1990) die Wahrscheinlichkeit, dass eine Kugel keinen Motor trägt, mit der Poisson-Verteilung

$$P(n,x) = e^{-x} \frac{x^n}{n!} \quad (2.11)$$

als

$$P(0,x) = e^{-x} \quad (2.12)$$

schreiben, wobei x die durchschnittliche Anzahl der Kinesine pro Kugel bezeichnet. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Kugel genau ein Kinesin trägt, ist

$$P(1,x) = xe^{-x}, \quad (2.13)$$

während sich die Wahrscheinlichkeit für zwei oder mehr Motorproteine pro Kugel zu $(1 - e^{-x} - xe^{-x})$ ergibt. Bei den eingestellten Bedingungen zeigen 2/3 der Kugeln bei

Kontakt mit einem Mikrotubulus keine Bindeereignisse, tragen also keinen aktiven Motor. Die durchschnittliche Anzahl von Motoren auf einer Kugel ergibt sich damit zu

$$x = -\ln(2/3) \approx 0,41. \quad (2.14)$$

und der Anteil der Kugeln, die zwei oder mehr Motoren tragen, lässt sich zu

$$1 - (2/3) + (2/3) \ln(2/3) \approx 0,06 \quad (2.15)$$

berechnen. Bei lediglich 6% der Kugeln ist damit zu erwarten, dass es sich bei den verzeichneten Ereignissen um keine Einzelmolekülereignisse handelt.

2.6 Präparation der Proben für Dreikugelmessungen

2.6.1 Vorbereitung der Deckgläser

Quarzkugeln mit einem Durchmesser von $2\ \mu\text{m}$ wurden im Verhältnis 1:1500 in Ethanol verdünnt und für 10 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt, um etwaige Kugelagglomerate aufzulösen. Anschließend wurden jeweils $10 - 15\ \mu\text{l}$ der verdünnten Kugelsuspension mit einer Pipette auf Mikroskopiedeckgläschen (Marienfeld No.1, $18 \times 18\ \text{mm}$) aufgetragen. Nach Verdunsten des Lösungsmittels wurden die Gläschen in eine 0,1%ige Nitrozelluloselösung in Isoamylacetat getaucht und über Nacht im Abzug getrocknet. Die Nitrozelluloseschicht fixierte die zuvor aufgetragenen Quarzkugeln effektiv auf der Glasoberfläche und ermöglichte darüber hinaus die Adsorption von Kinesinmolekülen auf den Kugeln.

2.6.2 Fixierung tubulinspezifischer Antikörper auf Polystyrolkugeln

Die Anbindung der Mikrotubuli an die Polystyrolkugeln erfolgte über monoklonale Anti-Tyrosin-Tubulin Antikörper (TUB-1A2, Sigma T9028). In einem ersten Schritt wurde rekombinantes Protein G (Protein G', recombinant, Sigma 19459) unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Carbodiimid-Kopplungskits (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland) kovalent an carboxylierte Latexkugeln (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland) mit einem Durchmesser von $1\ \mu\text{m}$ gebunden. Anschließend wurden $50\ \mu\text{l}$ des Antikörpers mit $100\ \mu\text{l}$ der Kugelsuspension für 2 Stunden bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die antikörperbeschichteten Kugeln wurden zweimal in PBS Puffer mit zusätzlich 0,05% (v/v) Tween 20 gewaschen und im selben Puffer resuspendiert. Die so erhaltenen Kugeln wiesen eine hohe Affinität zu Mikrotubuli auf und konnten, im

Kühlraum unter konstantem Schütteln aufbewahrt, bis zu zwei Wochen verwendet werden.

Alternativ zu den oben beschriebenen, selbst mit Protein G beschichteten Kugeln, wurden für einen Teil der Versuche kommerziell erhältliche $1,1\ \mu\text{m}$ Kugeln mit kovalent angebundenem Protein A (Bangs Labs Inc., Fishers, IN, USA; Produkt-nummer CP02N/7873) verwendet. Nach zweistündiger Inkubation mit dem Anti-Tubulin und zwei Waschschritten mit PBS und $0,05\%$ (v/v) Tween 20 wiesen diese Kugeln ebenfalls eine hohe Affinität zu Mikrotubuli auf. Beide Kugelsorten unterschieden sich hinsichtlich der Stabilität der Mikrotubuli/Kugel-Anbindung nicht erkennbar voneinander, wegen der leichteren Handhabung wurden jedoch bei der Mehrzahl der Versuche die kommerziell erhältlichen Kugeln verwendet.

2.6.3 Fixierung der inaktiven Kinesinmutante HsKin-G234A auf Polystyrolkugeln

Polystyrolkugeln mit einem Durchmesser von $1,0\ \mu\text{m}$ (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland) wurden im Verhältnis 1:20 in BRB-80 verdünnt. $200\ \mu\text{l}$ dieser Kugelverdünnung wurden mit $10\ \mu\text{l}$ unverdünntem Hs-KinG234A Motor unter leichtem Schütteln für mindestens 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Kugeln und zwei Waschschritten in BRB-80 und $0,05\%$ (v/v) Tween 20 wiesen diese Kugeln eine hohe Affinität zu Mikrotubuli auf.

2.6.4 Herstellung der Probe

Fluidzellen wurden, wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, aus den mit Quarzkugeln und Nitrozellulose beschichteten Deckgläsern (siehe Kapitel 2.6.1) hergestellt. Die erhaltenen Zellen wurden für drei Minuten mit $0,06\ \text{mg/ml}$ BSA in BRB-80 vorgeblockt und anschließend mit $20\ \mu\text{l}$ verdünntem Kinesin in BRB-80 inkubiert. Nicht-adhärierte Motoren wurden nach drei Minuten mit $100\ \mu\text{l}$ BRBSA ausgespült. Mikrotubuli wurden, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, polymerisiert und im Verhältnis 1:200 in BRB80 mit $20\ \mu\text{M}$ Taxol verdünnt. Die antikörperbeschichteten Kugeln wurden 1:20 in BRB-80 mit $1\ \text{mg/ml}$ Casein verdünnt. Zur Bereitung der Kugel/Mikrotubuli Mischung wurden $1\ \mu\text{l}$ der Kugelverdünnung und $1\ \mu\text{l}$ der verdünnten Mikrotubuli mit $48\ \mu\text{l}$ Motilitätspuffer gemischt und in die Zelle eingespült. Für alle Versuche wurde eine Endkonzentration von $2\ \text{mM}$ ATP eingestellt.

2.7 Aufbereitung und Auswertung der Daten

2.7.1 Auswertung der Motilitätsassays

Alle Filme von TIRF-Motilitätsassays wurden als TIFF-Stacks mit dem Programm WinView32 (Roper Scientific GmbH, Ottobrunn, Deutschland) aufgenommen und gespeichert. Die Auswertung erfolgte durch manuelles Tracking der Mikrotubuli mit dem Programm ImageJ 1.32j (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Die weitere Verarbeitung der gewonnenen Daten erfolgte in IGOR Pro 4.01.

2.7.2 Auswertung der Fallenexperimente

Alle Lauflängen unter Feedback-Bedingungen wurden manuell ausgewertet. Als Lauf wurden alle Ereignisse gewertet, bei denen eine bestimmte eingestellte Haltekraft von einem laufenden Kinesin erreicht und durch das Feedbacksystem konstant gehalten wurde. Zeigten sich im Feedback Signal Rückschritte größer als 16 nm, so wurde dies als Loslassen des Motors vom Mikrotubulus und anschließendes Wiederanbinden und damit als neuer Lauf gewertet.

Die Geschwindigkeiten laufender Kinesinmotoren wurden aus 0,1 s Intervallen ununterbrochener Motorbewegung bestimmt.

Die jeweiligen Maximalkräfte der einzelnen Konstrukte wurden ohne Feedbacksystem in einer statischen Laserfalle bestimmt, wobei nur Ereignisse gewertet wurden, bei denen ein Motormolekül die von ihm maximal erreichte Kraft für mindestens 0,1 Sekunden halten konnte. Zur Bestimmung dieser Kraft wurde über ein 50 ms Intervall des Maximalkraftplateaus gemittelt und vom Ergebnis der Mittelwert eines 50 ms Intervalls des Basisrauschens der ungebundenen Kugel subtrahiert.

3 Experimentelle Ergebnisse

In einer ersten Serie von Experimenten wurde der Einfluss der NcKin-1 Nackensequenz auf das einzelmolekulare Verhalten des Motorproteins untersucht. Dazu wurden an der optischen Falle Vergleichsmessungen zwischen dem NcKin-1 Wildtyp und einem modifizierten NcKin-1 Konstrukt mit einem vollständig synthetischen, auf maximale Stabilität optimierten Nacken Coiled-Coil durchgeführt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse finden sich in Kapitel 3.1. Um darüber hinaus Aufschluss über ein in der Literatur postuliertes vorübergehendes Aufschmelzen des Kinesinackens während der prozessiven Bewegung eines Motors zu erhalten, wurde eine Kinesinmutante untersucht, bei der durch zwei am N-terminalen Ende der Nacken Coiled-Coil eingefügte Cysteine eine kovalente Verbindung zwischen den beiden schweren Ketten hergestellt und so ein Aufschmelzen der Coiled-Coil unterbunden wird. Die bei der Untersuchung dieser Mutante gewonnenen Daten finden sich in Kapitel 3.2.

Die Möglichkeit einer Beeinflussung der ermittelten Proteineigenschaften durch die Versuchsgeometrie wurde durch Experimente mit NcKin-1 Wildtyp Motoren in der alternativen Dreikugelanordnung untersucht. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind im Kapitel 3.3 beschrieben.

Eine weitere Reihe von Experimenten beschäftigte sich mit der Fragestellung, welche Teile eines Kinesinmotors dessen Prozessivität bedingen. Hierzu wurden Teile des prozessiven NcKin-1 Motors durch entsprechende Untereinheiten des nicht-prozessiven NcKin-3 ersetzt und die Motilitätseigenschaften des resultierenden chimären Kinesinmotors auf einzelmolekularer Ebene untersucht. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Kapitel 3.4 beschrieben.

3.1 Vergleich des NcKin-1 Wildtyps mit dem NcKin-SN Konstrukt

3.1.1 Biochemische Charakterisierung des NcKin-SN Konstrukts

Um mögliche Artefakte bei den Einzelmolekülmessungen aufgrund einer eventuell nicht erfolgten Dimerisierung der verwendeten Kinesinkonstrukte ausschließen

Konstrukt	Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]		Molekulare Masse [kDa]		Oligo- merisierung
	Multi-Motor	Einzelmotor	gemessen	errechnet*	
NcKin-WT	$1,49 \pm 0,03$	$1,48 \pm 0,03$	83,4	47,9	Dimer
NcKin-SN	$1,29 \pm 0,02$	$1,49 \pm 0,05$	72,5	47,9	Dimer

* Monomer

Tabelle 3.1: Gleitgeschwindigkeiten und Oligomerisierungsgrad des NcKin-1 Wildtyps und NcKin-SN Konstrukts (Jaud et al., 2006): Für die Bestimmung der Mikrotubulitranslationsgeschwindigkeit wurden Konstrukte mit humanem Schwanzsegment verwendet. Die Messungen zur Bestimmung der Molekülmassen und der Oligomerisierungszustände erfolgten an Konstrukten ohne humanes Schwanzsegment (Bathe, 2005; Jaud et al., 2006).

zu können, wurden von Friederike Bathe sowohl der NcKin-1 Wildtyp als auch das NcKin-SN Konstrukt mittels Gelfiltration und Succrose-Dichte Zentrifugation hinsichtlich ihres Oligomerisierungszustands untersucht (Bathe et al., 2005; Kallipolitou et al., 2001; Jaud et al., 2006). Die Bestimmung des Dimerisierungszustands erfolgte dabei an Konstrukten ohne zusätzliche humane Schwanzsequenz. Sowohl der NcKin-1 Wildtyp als auch das NcKin-SN Konstrukt erwiesen sich als klare Dimere mit einer gemessenen molekularen Masse von 83,4 und 72,6 kD (siehe Tabelle 3.1) (Jaud et al., 2006).

3.1.2 Geschwindigkeitsbestimmung aus Motilitätsassays

Die typische Geschwindigkeit der Mikrotubulitranslation über motorbeschichtete Glasoberflächen wurde in klassischen Motilitätstests bestimmt (Howard et al., 1989). Die Ergebnisse für den NcKin-1 Wildtyp und das NcKin-SN Konstrukt unter hohen Motordichten sowie unter Einzelmolekülbedingungen sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

In geringen Dichten auf die Oberfläche adsorbierte NcKin-SN Moleküle transportierten Mikrotubuli gerichtet und mit gleichmäßiger Geschwindigkeit über einzelne isolierte Ankerpunkte, wobei die transportierten Mikrotubuli eine freie Drehbarkeit um ihre jeweiligen Ankerpunkte aufwiesen. Bereits diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Prozessivität der NcKin-1 Moleküle durch das Ersetzen der kompletten Nackendomäne nicht nennenswert beeinträchtigt wird.

Im Falle des NcKin-1 Wildtyps wiesen die beobachteten Mikrotubuli sowohl unter hoher Oberflächendichte als auch unter Einzelmolekülbedingungen eine hohe Gleitgeschwindigkeit von $(1,49 \pm 0,03) \mu\text{m/s}$ beziehungsweise $(1,48 \pm 0,03) \mu\text{m/s}$ auf und

waren damit etwa um einen Faktor drei schneller als das entsprechende humane Kinesin KIF5B (Romberg et al., 1998; Lakämper et al., 2003). Die Gleitgeschwindigkeit der Mikrotubuli auf NcKin-SN beschichteten Oberflächen war unter hoher Oberflächendichte im Vergleich dazu mit $(1,29 \pm 0,03) \mu\text{m/s}$ signifikant reduziert. Unter Einzelmolekülbedingungen dagegen lag die mittlere Translationsgeschwindigkeit der Mikrotubuli auch beim NcKin-SN Konstrukt bei $(1,49 \pm 0,03) \mu\text{m/s}$ und war damit nicht von der Geschwindigkeit des NcKin-1 Wildtyps zu unterscheiden.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren Studien, die nach dem Ersetzen des humanen Kinesinackens durch die EIEALKA-Sequenz in Motilitätsassays unter hohen Motordichten ebenfalls eine verringerte Gleitgeschwindigkeit feststellten, während die Geschwindigkeit unter Einzelmolekülbedingungen unverändert blieb (Romberg et al., 1998).

3.1.3 Lauflänge unter externer Kraft

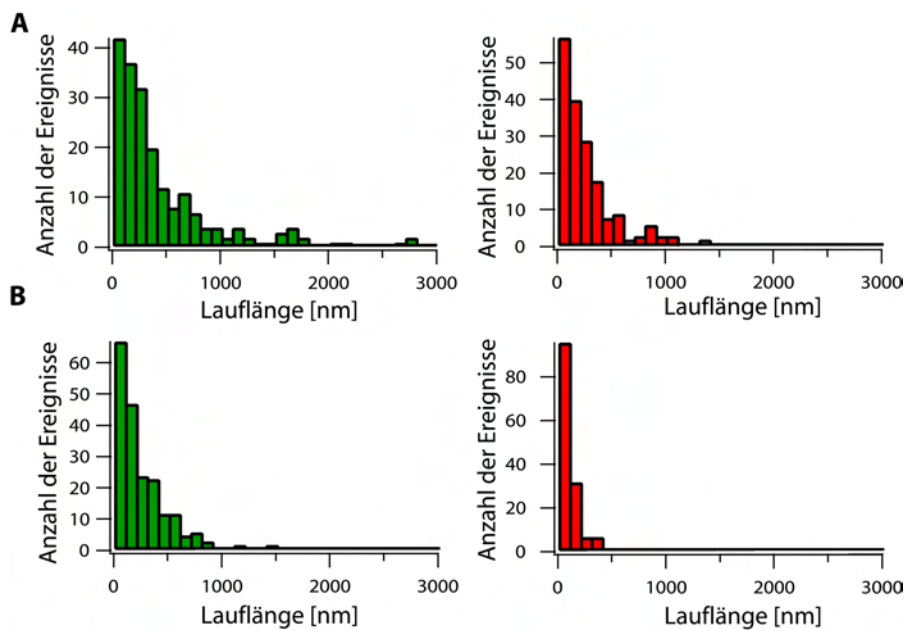


Abbildung 3.1: Lauflängenverteilung des NcKin-1 Wildtyps (grün) und NcKin-SN Konstrukts (rot) unter 1,0 pN (**A**) und 2,0 pN (**B**) Last. Alle Verteilungen weisen ein einzelnes exponentielles Verhalten auf.

Zur Bestimmung der Prozessivität wurde die durchschnittliche Lauflänge des NcKin-1 Wildtyps und des NcKin-SN Konstrukts unter verschiedenen konstanten Kräften in der optischen Falle gemessen (siehe Abbildung 3.2). Die Lauflängen-

verteilung beider Konstrukte unter allen gemessenen Kräften weist ein einzel-exponentielles Verhalten auf (Beispiele siehe Abbildung 3.1). Für den NcKin-1 Wildtyp (grün, $N=50-477$) ergibt sich bei 1,0 pN Last eine durchschnittliche Lauflänge von (480 ± 40) nm. Bei größeren Lasten reduziert sich die durchschnittliche Lauflänge des Konstrukts zu (364 ± 10) nm bei 2,0 pN und (192 ± 12) nm bei 3,0 pN. Wie erwartet sind die ermittelten Lauflängen unter allen Kräften kleiner als bereits publizierte Lauflängen aus Einzelmolekülfluoreszenzmessungen ohne Kraft (Lakämper et al., 2003) (siehe auch Kapitel 4.1).

Im Vergleich zum Wildtyp zeigt das NcKin-SN Konstrukt (rot, $N=40-358$) unter allen gemessenen Kräften eine signifikant niedrigere durchschnittliche Lauflänge. Während sich unter 1,0 pN Last noch eine Lauflänge von (297 ± 26) nm ergibt, verringert sich diese auf (146 ± 10) nm bei 2,0 pN und (57 ± 12) nm bei der höchsten gemessenen Last von 2,7 pN.

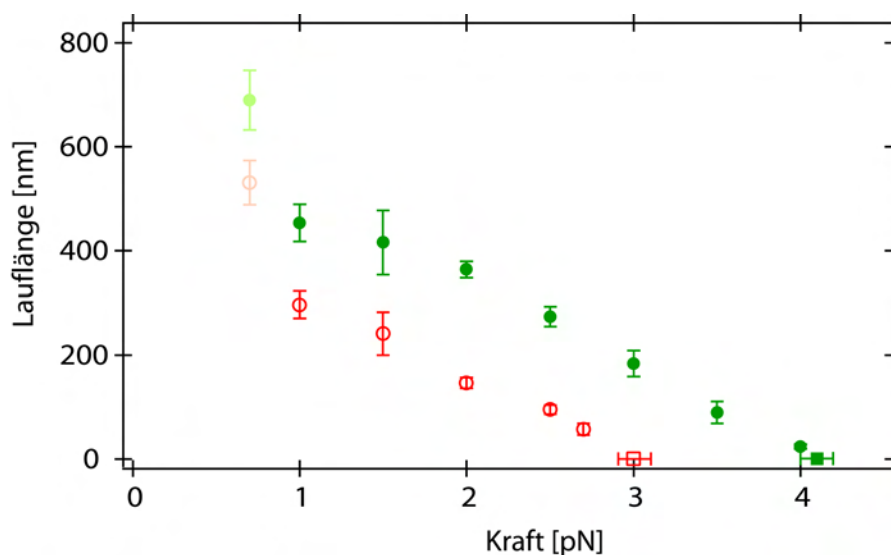


Abbildung 3.2: Aufgetragen ist die durchschnittliche Lauflänge l (Mittelwert \pm SEM) des NcKin-1 Wildtyps (grün, gefüllte Kreise, $N=50-477$) und des NcKin-SN Konstrukts (rot, ungefüllte Kreise, $N=40-358$) unter konstanten Lasten. Die Datenpunkte bei 0,7 pN stellen lediglich eine untere Grenze für die Lauflänge beider Konstrukte unter dieser Last dar, da eine korrekte Ermittlung der Werte aufgrund der begrenzten Reichweite des Feedbacksystems nicht möglich war. Beide Konstrukte weisen jedoch unter Lasten kleiner als 1,0 pN eine deutlich zunehmende Prozessivität auf. Die Quadrate kennzeichnen die von den jeweiligen Konstrukten produzierte Maximalkraft (siehe Kapitel 3.1.5), unter der sich die durchschnittliche Lauflänge auf null reduziert.

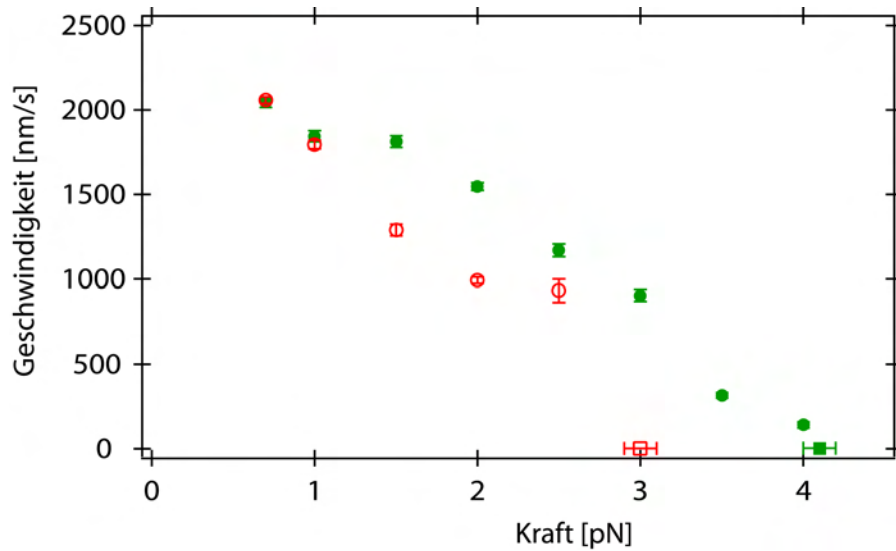


Abbildung 3.3: Die Kraft-Geschwindigkeits Relation: Aufgetragen sind die mittleren Geschwindigkeiten v (Mittelwerte \pm SEM) des NcKin-1 WT (grün, gefüllte Kreise, $N=103-758$) und des NcKin-SN Konstrukts (rot, ungefüllte Kreise, $N=73-512$) gegen die angelegte Kraft. Bei beiden Molekülen nimmt die durchschnittliche Geschwindigkeit mit zunehmender Kraft ab. Während unter den kleinsten angelegten Kräften von 0,7 und 1,0 pN beide Moleküle gleich schnell sind, ist das NcKin-SN Konstrukt unter höheren Kräften signifikant langsamer. Die farbigen Quadrate markieren die von den jeweiligen Konstrukten aufgebrauchte Maximalkraft, bei der sich die mittlere Geschwindigkeit auf null reduziert.

3.1.4 Die Kraft-Geschwindigkeits Relation

Die durchschnittliche Geschwindigkeit einzelner NcKin-1 Wildtyp und NcKin-SN Moleküle bei sättigender ATP-Konzentration und unter konstanter Last wurde aus 0,1 Sekunden langen Intervallen ununterbrochener Läufe ermittelt. Abbildung 3.3 zeigt die Kraft-Geschwindigkeits Relationen beider Moleküle.

Unter der geringsten angelegten Kraft von 0,7 pN zeigen sowohl NcKin-1 Wildtyp (grün, gefüllte Kreise, $N=103-758$) als auch NcKin-SN Motoren (rot, ungefüllte Kreise, $N=73-512$) hohe Geschwindigkeiten von $(2,04 \pm 0,03) \mu\text{m/s}$, beziehungsweise $(2,06 \pm 0,02) \mu\text{m/s}$. Dies deutet darauf hin, dass selbst ein Austausch der kompletten Nackendomäne die Motilität des Kinesinmotors nicht einschränkt, solange die wirkenden Kräfte gering sind. Unter höherer Last verringert sich die mittlere Geschwindigkeit des Wildtyps um $\approx 16\%$ auf $(1,55 \pm 0,02) \mu\text{m/s}$ bei 2,0 pN, während das NcKin-SN durch 2,0 pN Last bereits um $\approx 52\%$ auf $(0,99 \pm 0,02) \mu\text{m/s}$ verlangsamt wird. Unter Lasten größer als 2,5 pN zeigen NcKin-SN Konstrukte kaum mehr lange, ununterbrochene Läufe, die das Auswahlkriterium einer ununterbrochenen

Laufzeit von mindestens 0,1 s erfüllen.

3.1.5 Maximalkraft einzelner Kinesinmoleküle

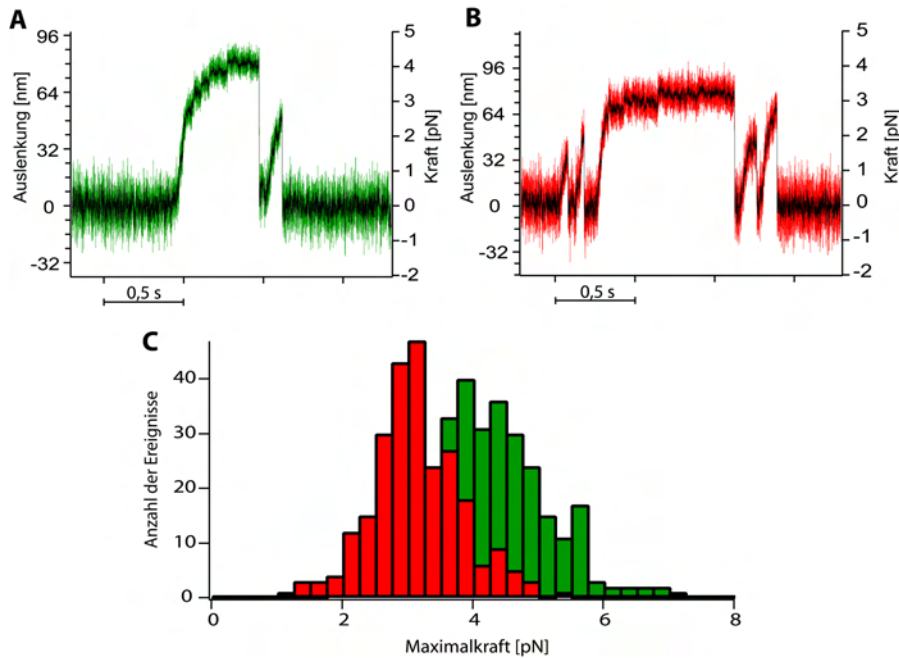


Abbildung 3.4: (A) und (B): Beispielkurven eines NcKin-1 WT (grün) und NcKin-SN Moleküls (rot) in einer statischen Laserfalle. Das Positionssignal der gefangenen Kugel wurde mit einer Rate von 40 kHz aufgezeichnet und ohne vorherige Filterung abgespeichert. Die farbigen Kurven zeigen jeweils die ungefilterten Originaldaten, die schwarze Kurve zeigt die Daten nach einer Mittelwertfilterung mit einem gleitenden Zeitfenster von 1 ms. Während der Kinesin-1 Wildtyp in der Lage ist, eine Maximalkraft von über 4 pN zu produzieren, erreichen NcKin-SN Moleküle typische Maximalkräfte von etwa 3 pN. Die Abnahme des thermischen Rauschens der gefangenen Kugel mit zunehmender Kraft ist deutlich erkennbar. In der Nähe des Plateaus der Maximalkraft werden bei beiden Motoren einzelne 8 nm Schritte sichtbar. (C): Histogramm der Maximalkräfte des NcKin-1 WT (grün) und NcKin-SN Konstrukts (rot): Die mittlere Maximalkraft des NcKin-1 Wildtyps beträgt $4,1 \pm 0,1$ pN ($N=305$), die des NcKin-SN Konstrukts $3,0 \pm 0,1$ pN ($N=251$).

Die von einzelnen Kinesinen maximal aufgebraachte Kraft wurde in der statischen Laserfalle gemessen. Der zu untersuchende Motor lenkt dabei die im Lasergradienten gefangene Kugel so weit aus ihrer Ruhelage aus, bis sich die vom Motor produzierte Maximalkraft und die Rückstellkraft gerade die Waage halten. Abbildung 3.4 (A) und (B) zeigen Beispielkurven für einzelne Läufe eines NcKin-1 Wildtyps

(grün) sowie eines NcKin-SN Moleküls (rot) bei 2 mM ATP. Beide Kurven sind mit einer Bandbreite von 40 kHz aufgenommen. Die farbigen Kurven zeigen jeweils die ungefilterten Originaldaten, die schwarzen Kurven zeigen die Daten nach einer Mittelwertfilterung mit einem gleitenden Zeitfenster von 1 ms.

Schon mit dem Binden des Motors an den Mikrotubulus ist eine deutliche Abnahme des thermischen Rauschens der Kugel zu beobachten. Mit steigender Kraft nimmt das Rauschen weiter ab: Das Positionssignal der ungebundenen Kugel weist bei einer Federhärte von 50 fN/nm eine Standardabweichung von ≈ 8 nm auf. In der Nähe des Plateaus der Maximalkraft (≈ 4 pN) reduziert sich die Standardabweichung bis auf ≈ 4 nm. Die gemessenen Daten sind damit nicht durch die in der Kette Kugel/Motor/Mikrotubulus vorhandenen elastischen Elemente dominiert. In der Nähe des Plateaus der Maximalkraft zeigen beide Kurven deutlich einzelne, für Kinesin typische 8 nm Schritte. Dies deutet darauf hin, dass alle elastischen Elemente zwischen der Kugel und dem oberflächengebundenen Mikrotubulus hinreichend gespannt sind, und eine Positionsveränderung des Motorproteins unmittelbar in einer gleich großen Positionsveränderung der detektierten Kugel resultiert.

Bei einer ATP-Konzentration von 2 mM zeigten die untersuchten NcKin-1 WT Moleküle Maximalkräfte von 2 – 7 pN, wobei sich die durchschnittliche Maximalkraft zu $(4,1 \pm 0,1)$ pN ergab (siehe Abbildung 3.4 C). NcKin-SN Moleküle wiesen im Vergleich dazu eine leicht reduzierte Maximalkraft zwischen 1 und 5 pN auf, deren Mittelwert bei $(3,0 \pm 0,1)$ pN und damit $\approx 27\%$ unter der des NcKin-1 Wildtyps lag.

Abbildung 3.5 zeigt Beispiele für Läufe einzelner NcKin-1 Wildtyp Motoren bei einer ATP-Konzentration von $50 \mu\text{M}$. Die Abnahme des thermischen Rauschens der detektierten Kugel mit steigender anliegender Kraft und die charakteristischen, prozessiven 8 nm Schritte des Kinesins sind dabei deutlich zu erkennen.

3.1.6 Der doppelte Rückwärtsschritt des NcKin-1 Wildtyps

Bei den in Abbildung 3.5 gezeigten Beispielen fällt auf, dass die Motormoleküle nach dem Erreichen des Plateaus der Maximalkraft häufig einzelne charakteristische Rückwärtsschritte zeigen und sich anschließend vom Mikrotubulus ablösen. Während alle untersuchten Konstrukte unter Kräften nahe ihrer Maximalkraft teilweise vereinzelte 8 nm Rückwärtsschritte zeigen, auf die meist erneute Schritte in Vorwärtsrichtung folgen (siehe Kapitel 3.2.5 und 3.4.5), zeigen NcKin-1 Wildtyp Moleküle häufig Rückwärtsschritte einer Länge von 16 nm. Tabelle 3.2 vermittelt einen Eindruck über die Häufigkeit von Rückwärtsschritt-Ereignissen bei den einzelnen untersuchten Kinesinkonstrukten unter verschiedenen ATP-Konzentrationen. Obwohl das NcKin-SN, das NcKin-P342C und das chimäre NcKin-1/3 Konstrukt (siehe Kapitel 3.1, 3.2 und 3.4) ebenfalls die Motordomänen und Neck-Linker des NcKin-1 Wildtyps besitzen, ist bei diesen Konstrukten ein

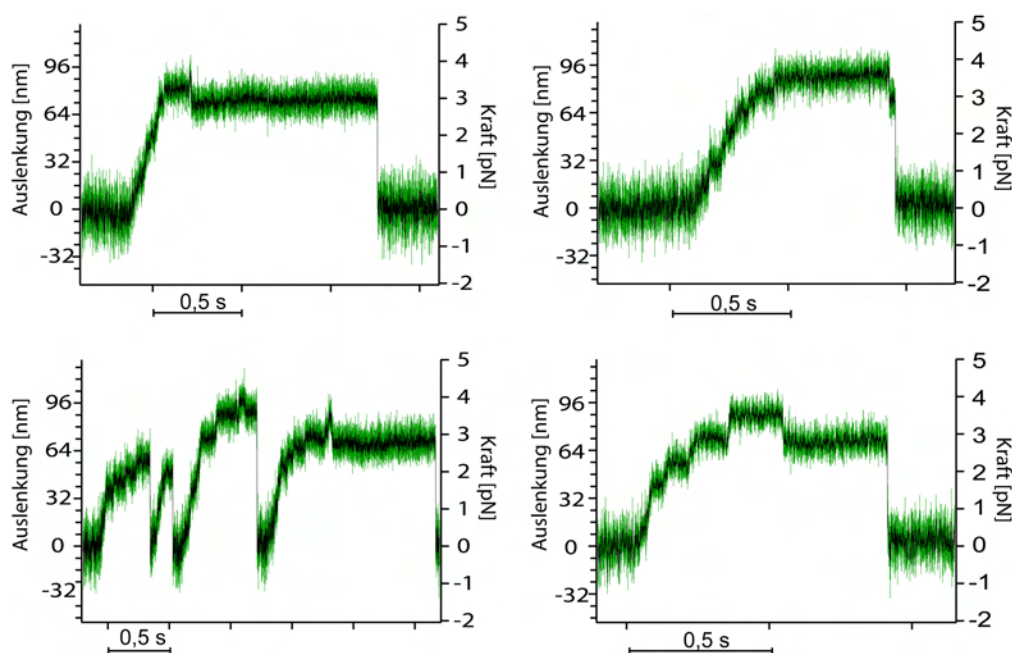


Abbildung 3.5: Beispiele für einzelne Läufe eines NcKin-WT Moleküls bei $50 \mu\text{M}$ ATP: Die Kurven sind jeweils bei voller Datenrate (40 kHz, grün) und nach einer Mittelwertfilterung mit einem gleitenden Zeitfenster von 1 ms (schwarz) gezeigt. In der Nähe des Plateaus der Maximalkraft sind deutlich einzelne 8 nm Schritte erkennbar.

vergleichbares Verhalten nicht zu beobachten.

Neben den in der Tabelle 3.2 aufgeführten 8 und 16 nm Rückwärtsschritten kommt es bei allen untersuchten Kinesinkonstrukten vereinzelt auch zu Rückwärtsschritten größerer Längen. Die Häufigkeit dieser Ereignisse ist bei allen Konstrukten in etwa gleich groß und liegt deutlich unter 1%. Da diese Ereignisse sehr rasch ablaufen ($t < 0,5 \text{ ms}$) und in keinem Fall Zwischenschritte erkennbar sind, handelt es sich hierbei vermutlich um eine weitere Klasse von Ereignissen, die durch ein vollständiges Ablösen und Wiederanbinden des Kinesinmotors verursacht werden. Abbildung 3.6 zeigt die typischen doppelten Rückwärtsschritte des NcKin-1 Wildtyp Motors im Detail. Dargestellt sind zwei Läufe des Moleküls gegen eine statische Laserfalle bei $50 \mu\text{M}$ ATP. Die rot umrandeten Ausschnitte werden jeweils vergrößert dargestellt. Die Dauer eines doppelten Rückwärtsschritt-Ereignisses beträgt im Schnitt weniger als 1 ms. Häufig scheint den Ereignissen, wie in Abbildung 3.6 zu erkennen, der Versuch eines Vorwärtsschritts voranzugehen. Kurve 3.6 (A) zeigt nach dem doppelten Rückwärtsschritt den Ansatz eines erneuten Vorwärtsschritts (gekennzeichnet durch den Pfeil), der aber mit einer Schrittweite von etwa 4 nm nicht erfolgreich ablaufen kann. In keinem Fall konnten bei NcKin-1 Wildtyp Motoren nach einem doppelten Rückwärtsschritt erneute Schritte in Vorwärtsrichtung

3.1 Vergleich des NcKin-1 Wildtyps mit dem NcKin-SN Konstrukt

Konstrukt	kein Rückwärtsschritt	8 nm	16 nm	N
NcKin-SN (2mM ATP)	95%	5%	< 1%	170
NcKin-P342C oxi (2 mM ATP)	90%	10%	< 1%	60
NcKin-1/3 Chimär (2 mM ATP)	93%	7%	< 1%	107
NcKin-1/3 Chimär (20 μ M ATP)	94%	6%	—*	68
NcKin-1 Wildtyp (2 mM ATP)	58%	17%	25%	115
NcKin-1 Wildtyp (50 μ M ATP)	55%	11%	34%	134
NcKin-1 Wildtyp (20 μ M ATP)	48%	15%	37%	92

* Unter 20 μ M ATP wurden beim NcKin-1/3 Chimär keine doppelten Rückwärtsschritte beobachtet.

Tabelle 3.2: Relative Häufigkeit von Rückwärtsschritten der Längen 8 und 16 nm während eines prozessiven Laufs einzelner Motoren gegen eine statische Laserfalle. Betrachtet wurden ausschließlich Ereignisse, die ein klar erkennbares Plateau der Maximalkraft von mindestens 0,1 s Dauer aufwiesen. Die angegebenen Werte sind auf ganze Prozent gerundet, N gibt die Anzahl der betrachteten Ereignisse an.

beobachtet werden, bevor sich der Motor vom Mikrotubulus ablöste. Da Motoren nach Rückwärtsschritt-Ereignissen weiterhin zu prozessiven Läufen fähig waren, kann ausgeschlossen werden, dass die Moleküle bei Rückwärtsschritt-Ereignissen dauerhaft geschädigt werden.

Mögliche Modelle zur Erklärung der beobachteten Phänomene werden in Kapitel 4.1.4 diskutiert.

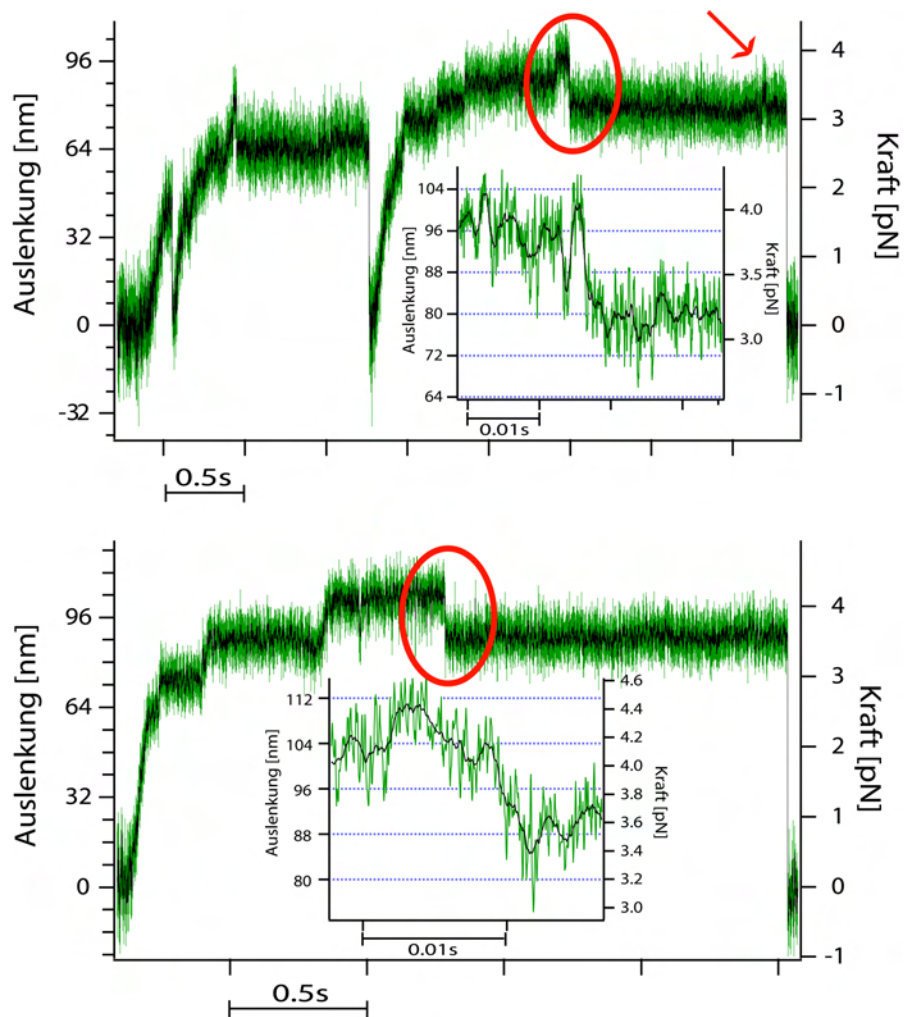


Abbildung 3.6: Der doppelte Rückschritt des NcKin-1 Wildtyps im Detail. Gezeigt ist jeweils ein Lauf eines NcKin-1 Wildtyp Moleküls gegen eine statische Laserfalle bei einer ATP-Konzentration von $50 \mu\text{M}$. Die mit einer Samplingfrequenz von 40 kHz aufgenommenen Originaldaten sind grün dargestellt, die schwarze Kurve gibt die Daten nach einer Mittelwertfilterung mit einem gleitenden Zeitfenster von 1 ms wieder. Die umrandeten Bereiche sind jeweils vergrößert dargestellt. **(A):** Bei beiden Läufen des Motormoleküls ist der doppelte Rückwärtsschritt deutlich erkennbar. Wie die Vergrößerung des zweiten Rückwärtsschritt-Ereignisses zeigt, fällt der Motor ohne erkennbaren Zwischenschritt um 16 nm zurück. Bereits vor dem doppelten Rückwärtsschritt kommt es zu einem einfachen Rückwärtsschritt, auf den jedoch sehr rasch eine erneute Verlagerung des Schwerpunkts nach vorne erfolgt. Vor dem Ablösen des Moleküls ist der Versuch eines erneuten Vorwärtsschritts zu erkennen (roter Pfeil), der allerdings mit einer Schrittweite von etwa 4 nm nicht erfolgreich ist. **(B):** Das Motormolekül zeigt ebenfalls einen Rückwärtsschritt der Länge 16 nm . Dem Rückwärtsschritt scheint der Versuch eines Schritts in die Vorwärtsrichtung vorauszugehen. Nach dem doppelten Rückwärtsschritt zeigt der Motor keine erneuten Schritte in Vorwärtsrichtung, bevor er den Kontakt zum Mikrotubulus verliert.

3.2 Das NcKin-P342C Konstrukt

Ermittlung des Oxidationszustands des NcKin-P342C Konstrukts durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

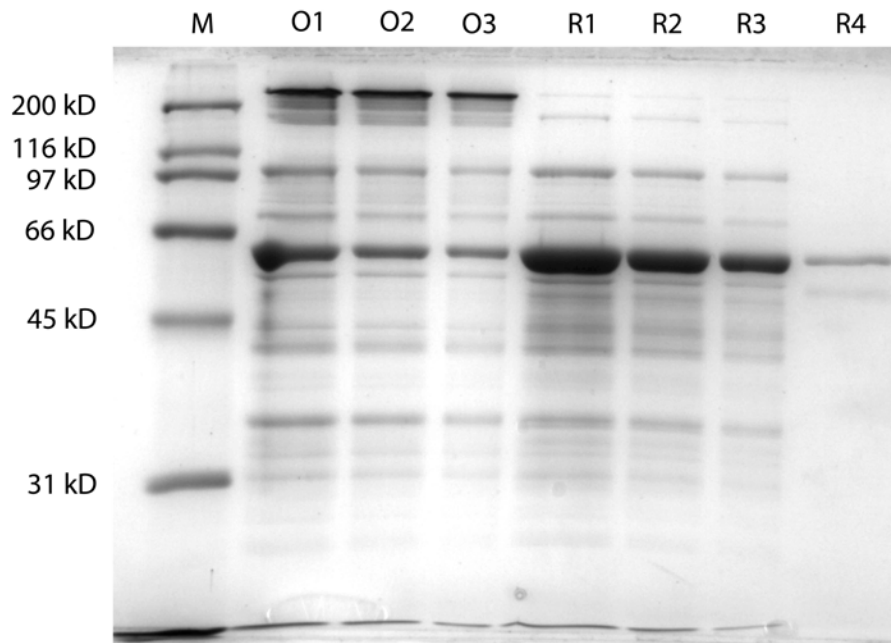


Abbildung 3.7: Auftrennung des P342C Konstrukts auf einem nichtreduzierenden SDS-Gel. M: Marker (Biorad broad molecular weight standard); O1-O3: variable Mengen des P342C Proteins in einem luftgesättigten Puffer ohne Vorbehandlung; R1-R3: variable Mengen des P342C Proteins, das vor dem Auftragen auf das Gel für 2 Stunden mit 5 mM DTT inkubiert wurde; R4: P342C, das vor dem Auftragen auf das Gel für 24 Stunden mit 5 mM DTT inkubiert wurde.

Unter oxidierenden Bedingungen (O1-O3) liegt zwar ein Großteil des P342C Konstrukts als Dimer bei einem scheinbaren Molekulargewicht > 200 kD vor, jedoch zeigt der deutlich erkennbare Anteil der Monomere bei einem scheinbaren Molekulargewicht von ca. 60 kD, dass sich nicht bei allen Motormolekülen eine kovalente Bindung zwischen den beiden schweren Ketten des Moleküls ausbilden konnte. Unter reduzierenden Bedingungen (R1-R4) liegt das Protein fast vollständig als Monomer, d.h. ohne kovalente Bindung zwischen den beiden schweren Ketten des Motors vor. Wie die schwache Bande auf Höhe des dimeren Motorproteins zeigt, war bei einer kleinen Minderheit auch nach zweistündiger Inkubation mit DTT die Disulfidbrücke zwischen den beiden schweren Ketten des Motors nicht gelöst.

Der Oxidationszustand der in den NcKin-1 Nacken eingebauten Cysteine in Abhängigkeit der Pufferbedingungen wurde durch eine Gelelektrophorese nach Lämm-

li (Laemmli, 1970) auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel bestimmt. Dabei wurde auf alle reduzierenden Substanzen sowohl im Laemmli- als auch im Lauffpuffer verzichtet. Abbildung 3.7 zeigt das Ergebnis der Auftrennung des P342C Konstrukts: Die mit O1-O3 gekennzeichneten Spalten zeigen die Auftrennung des P342C Konstrukts, das in einem mit Luftsauerstoff gesättigten Puffer aufbewahrt und nicht mit DTT behandelt wurde. Neben der Hauptbande bei einem scheinbaren Molekulargewicht > 200 kDa, die den beiden durch eine Disulfidbrücke kovalent verbundenen schweren Kinesinketten entspricht (Bathe, 2005), ist auch eine nennenswerte Fraktion monomerer schwerer Ketten mit einem Molekulargewicht von etwa 60 kDa erkennbar. Dies lässt den Schluß zu, dass entweder nur ein Teil der NcKin-P342C Konstrukte eine Disulfidbrücke zwischen den beiden Nacken-Cysteinen ausbildet oder eine bereits ausgebildete Disulfidbrücke durch die Denaturierung und das Auftrennen auf dem Gel wieder gelöst wird.

In den Spalten R1 bis R3 wurde eine variable Menge des P342C Konstrukts aufgetragen, das vorher für 2 Stunden auf Eis mit 5 mM DTT inkubiert wurde. Hier zeigt sich, dass der größte Teil des Proteins in Form monomerer schwerer Ketten mit dem typischen Molekulargewicht von ca. 60 kDa vorliegt, wobei auch hier eindeutig eine Bande zu erkennen ist, die dem durch die Cysteine verbundenen dimeren Molekül entspricht. Eine vollständige Reduktion der Nacken-Cysteine scheint damit ebenso wenig erreichbar, wie deren vollständige Oxidation. Dies ist im Einklang mit Studien an Mutanten des humanen Kinesins KIF5B, die nach Ersetzen der ersten a Position ihrer Nacken Coiled-Coil durch ein Cystein ebenfalls nicht vollständig als kovalent verbundene Dimere vorlagen (Tomishige und Vale, 2000).

Sollten sich die unterschiedlichen Oxidationszustände des NcKin-P342C Motors in einem signifikant unterschiedlichen mechanischen Verhalten der Proteine widerspiegeln, so sollte dies in Einzelmolekülexperimenten feststellbar sein, selbst wenn unter den jeweiligen Pufferbedingungen immer auch eine Minorität an Proteinen des jeweils anderen Oxidationszustands existiert. In Experimenten mit mehreren gleichzeitig wirkenden Motoren, wie beispielsweise Motilitätsassays unter hohen Motordichten, wäre dagegen eine Mischform der für die unterschiedlichen Oxidationszustände typischen Verhaltensweisen zu erwarten.

3.2.1 Geschwindigkeitsbestimmung aus Motilitätsassays

Zur Bestimmung der Geschwindigkeit der Mikrotubulitranslation wurden Motilitätsassays sowohl unter oxidierenden als auch unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Um eine Reduktion der Disulfidbrücken im NcKin-P342C Konstrukt zu erreichen, wurde das Protein wieder für mindestens zwei Stunden auf Eis mit 5 mM DTT inkubiert und in einem ebenfalls mit 5 mM DTT angereicherten Motilitätspuffer gemessen. Unabhängig von den Oxidationsbedingungen unterstützte das NcKin-P432C sowohl unter hohen Motordichten als auch unter Einzelmolekül-

bedingungen einen schnellen und gleichmäßigen Transport von Mikrotubuli. Unter Einzelmolekülbedingungen konnte unter beiden Oxidationsbedingungen teilweise eine Rotation der transportierten Mikrotubuli um einen isolierten Ankerpunkt beobachtet werden. Einzelmolekülbedingungen wurden dabei für beide Oxidationszustände des NcKin-P342C Konstrukts bei identischen Verdünnungen erreicht, so dass ausgeschlossen werden kann, dass NcKin-P342C Moleküle durch einen Wechsel ihres Oxidationszustandes in einen inaktiven Zustand überführt werden.

Für das NcKin-P342C Konstrukt unter oxidierenden Pufferbedingungen ergab sich bei hoher Motordichte eine mittlere Translationsgeschwindigkeit der Mikrotubuli von $(1,52 \pm 0,02) \mu\text{m/s}$, die sich mit abnehmender Motordichte nicht signifikant änderte. Einzelne isolierte Motormoleküle unterstützten unter oxidierenden Pufferbedingungen einen gleichmäßigen Mikrotubulitransport mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit von $(1,50 \pm 0,03) \mu\text{m/s}$. Für NcKin-P342C Motoren unter reduzierenden Bedingungen ergab sich eine mittlere Geschwindigkeit von $(1,50 \pm 0,02) \mu\text{m/s}$ unter hohen Motordichten sowie von $(1,54 \pm 0,02) \mu\text{m/s}$ unter Einzelmolekülbedingungen. Ein signifikanter Unterschied in der Geschwindigkeit der Mikrotubulitranslation in Abhängigkeit der Motordichte oder des Oxidationszustands der eingesetzten Motoren ist damit nicht feststellbar.

3.2.2 Die Lauflänge des NcKin-P342C Konstrukts

Um den Einfluss der P342C Punktmutation bzw. der unter oxidierenden Bedingungen bei der Mehrzahl der Proteine ausgebildeten Disulfidbrücke zwischen den beiden schweren Ketten des Kinesins auf dessen mechanische Prozessivität zu untersuchen, wurde die Lauflänge einzelner Kinesinmotoren unter konstanter Last in der optischen Falle bestimmt. Für die Untersuchung der oxidierten Form des NcKin-P342C wurde das Protein ohne Vorbehandlung in mit Luftsauerstoff gesättigten Puffern verdünnt und auf die Kugeln adsorbiert. Für Messungen an NcKin-P342C Konstrukten im reduzierten Zustand wurden die Motoren für mindestens 2 Stunden auf Eis mit 5 mM DTT inkubiert, in Puffern mit 5 mM DTT verdünnt und auf die Kugeln adsorbiert. Abbildung 3.8 zeigt die Kraft-Lauflängen Relation einzelner NcKin-P342C Motoren beider Oxidationszustände. Unter Kräften $> 1 \text{ pN}$ sind die Relationen der oxidierten (hellblau, mit Ecke nach unten, $N = 56 - 259$) und der reduzierten Form (violett, mit Ecke nach oben, $N = 52 - 212$) des Proteins weitestgehend identisch. Unter Lasten $< 1 \text{ pN}$ scheint die Prozessivität des Motors mit kovalent zusammengebundenem Nacken etwas stärker zuzunehmen als die der reduzierten Form des NcKin-P342C. Wegen der begrenzten Reichweite des Feedbacksystems sind die Werte der Prozessivität beider Motoren unter $0,7 \text{ pN}$ Last (ungefüllte Dreiecke) wiederum als unterer Grenzwert zu verstehen.

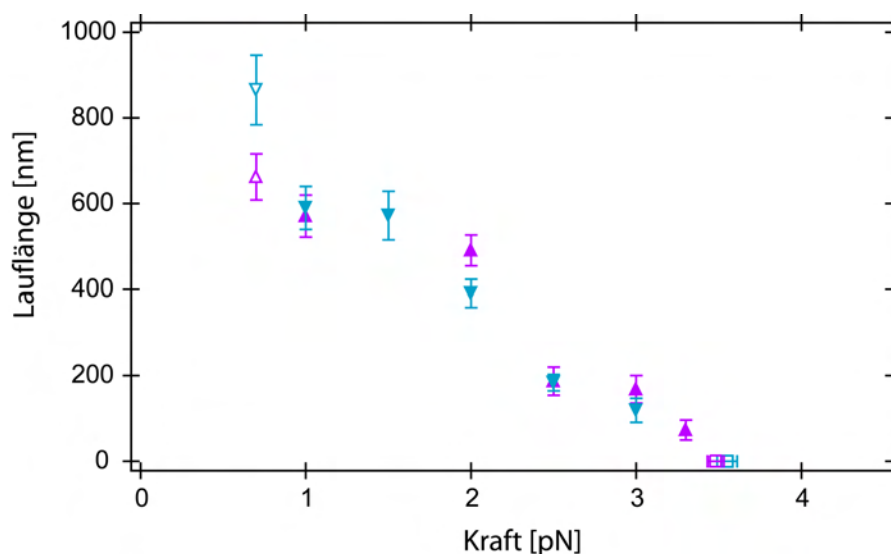


Abbildung 3.8: Die Kraft-Lauflängen Relation des NcKin-P342C Konstrukts: Sowohl unter oxidierten Bedingungen (hellblau, mit Ecke nach unten, $N = 56 - 259$) als auch in Gegenwart von 5 mM DTT (violett, mit Ecke nach oben, $N = 52 - 212$) nimmt die durchschnittliche Lauflänge des NcKin-P342C Konstrukts mit steigender Last ab. Wegen der begrenzten Reichweite des Feedbacksystems sind die Werte für die Prozessivität der Motoren unter 0,7 pN Last (ungefüllte Dreiecke) als unterer Grenzwert zu verstehen. Die Quadrate kennzeichnen für beide Fraktionen die jeweilige Maximalkraft, unter der keine prozessive Vorwärtsbewegung mehr möglich ist.

3.2.3 Die Kraft-Geschwindigkeits Relation des NcKin-P342C Konstrukts

Abbildung 3.9 zeigt die Kraft-Geschwindigkeits Relation für einzelne NcKin-P342C Moleküle unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen. Unter der kleinsten angelegten Kraft von 0,7 pN weisen sowohl die oxidierte (hellblau, mit Ecke nach unten, $N = 73 - 565$) als auch die reduzierte Form des P342C Konstrukts (violett, mit Ecke nach oben $N = 50 - 718$) hohe Geschwindigkeiten von $(2,24 \pm 0,08) \mu\text{m/s}$ beziehungsweise $(2,10 \pm 0,06) \mu\text{m/s}$ auf. Unter einer höheren Last von 2 pN reduzieren sich die gemessenen Geschwindigkeiten zu $(1,24 \pm 0,06) \mu\text{m/s}$ für die oxidierte und $(1,31 \pm 0,08) \mu\text{m/s}$ für die reduzierte Form des Proteins. Mit diesen Geschwindigkeiten bleibt das P342C Konstrukt fast im gesamten Kraftbereich etwas hinter dem NcKin-1 Wildtyp zurück (vergleiche Abbildung 3.3 in Kapitel 3.1.4). Eine Abhängigkeit der Geschwindigkeit des NcKin-P342C Motors vom Oxidationszustand der Nacken-Cysteine ist nicht zu erkennen.

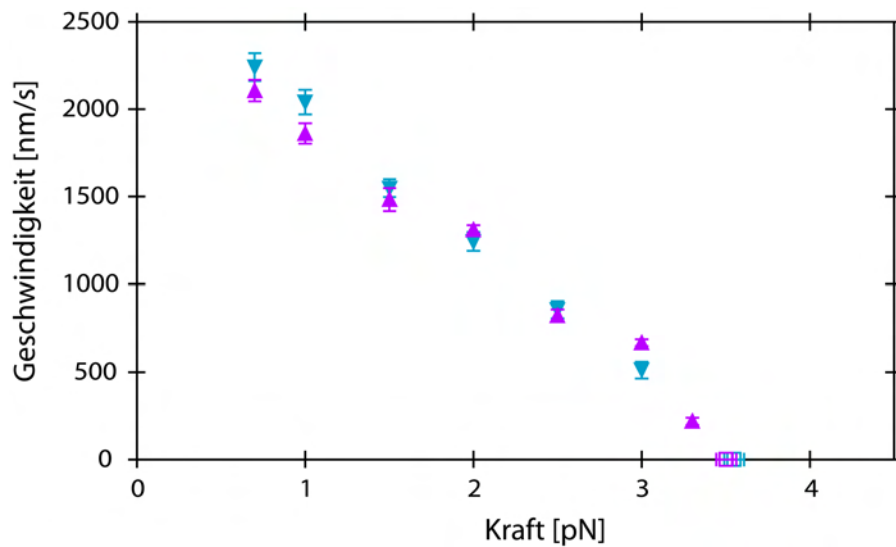


Abbildung 3.9: Die Kraft-Geschwindigkeits Relation des NcKin-P342C Konstrukts: Die durchschnittliche Geschwindigkeit des P342C Konstrukts in oxidierter (hellblau, mit Ecke nach unten, $N = 73 - 565$) und reduzierter Form (violett, mit Ecke nach oben $N = 50 - 718$) sind gegen die angelegte Last aufgetragen.

3.2.4 Die Maximalkraft des NcKin-P342C Konstrukts

Analog zur Bestimmung der Maximalkraft des NcKin-1 Wildtyps (siehe Kapitel 3.1.5) wurde die von einzelnen NcKin-P342C Molekülen maximal produzierte Kraft in einer statischen Laserfalle gemessen. Abbildung 3.10 zeigt die Verteilung der gemessenen Maximalkräfte des NcKin-P342C Konstrukts unter oxidierenden (A) und reduzierenden (B) Bedingungen. Für die oxidierte Form des Proteins ergibt sich eine durchschnittliche Maximalkraft von $(3,6 \pm 0,1)$ pN. Bei der reduzierten Form ergibt sich eine durchschnittliche Maximalkraft von $(3,5 \pm 0,1)$ pN. Das NcKin-P342C Konstrukt produziert damit unabhängig vom Oxidationszustand der Nacken-Cysteine ca. 86% der Maximalkraft des NcKin-1 Wildtyps und ca. 118% der Maximalkraft des NcKin-SN Konstrukts. Analog zu den anderen gemessenen Kinesinen zeigen Läufe des NcKin-P342C Konstrukts in der Nähe des Plateaus der Maximalkraft einzelne charakteristische 8 nm Schritte (siehe Abbildung 3.10 (C)).

3.2.5 Rückwärtsschritte des NcKin-P342C Konstrukts

Ähnlich dem NcKin-1 Wildtyp zeigen einzelne NcKin-P342C Moleküle in ihren Läufen gegen eine statische Laserfalle vereinzelt Rückwärtsschritte. Abbildung 3.11 zeigt zwei Beispiele für Rückwärtsschritte bei NcKin-P342C Motoren unter oxidierenden Pufferbedingungen bei 2 mM ATP. Die rot umrandeten Bereiche der Rück-

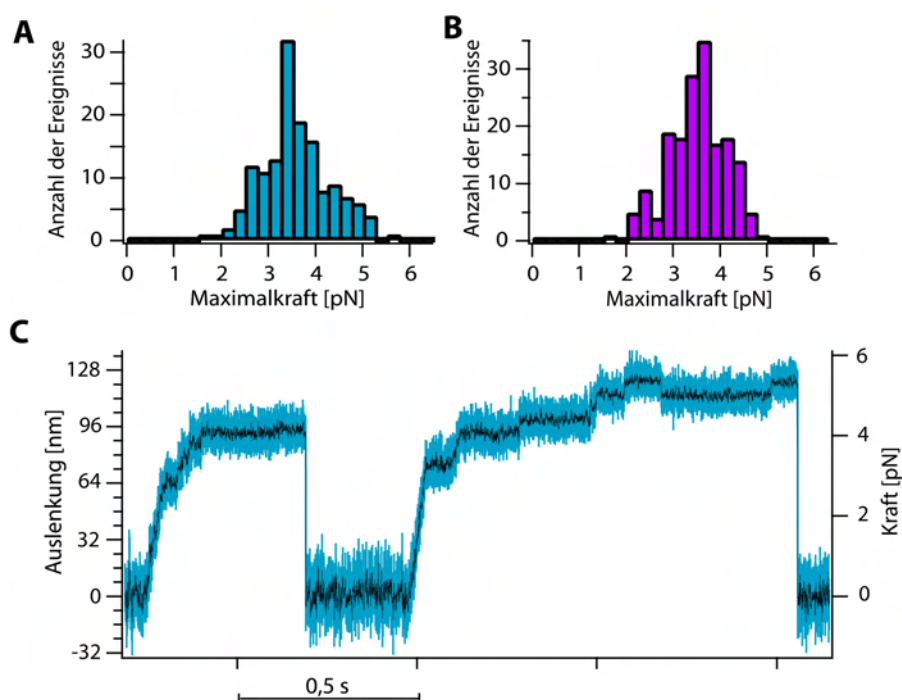


Abbildung 3.10: Histogramm der Maximalkräfte des NcKin-P342C Konstrukts: Für die oxidierte Form des Proteins (**A**) ergibt sich eine mittlere Maximalkraft von $(3,6 \pm 0,1)$ pN ($N = 147$), für die reduzierte Form (**B**) eine fast identische Maximalkraft von $(3,5 \pm 0,1)$ pN ($N = 175$). (**C**): Beispiel für einen Lauf eines NcKin-P342C Moleküls in einer statischen Laserfalle unter oxidierenden Bedingungen. Die mit einer Samplingfrequenz von 40 kHz aufgenommenen Originaldaten sind in blau dargestellt, die schwarze Kurve zeigt die Daten nach einer Mittelwertfilterung mit einem gleitenden Zeitfenster von 1 ms. In der Nähe des Plateaus der Maximalkraft sind einzelne 8 nm Schritte deutlich erkennbar.

wärtsschritte sind jeweils vergrößert dargestellt. Bei der in Abbildung 3.11 (A) dargestellten Kurve zeigt das Motormolekül zwei rasche Schritte in Rückwärtsrichtung, auf die, anders als beim NcKin-1 Wildtyp beobachtet, zwei erneute Schritte in Vorwärtsrichtung folgen. Im Gegensatz zum NcKin-1 Wildtyp zeigen weniger als 1% der Läufe einzelner NcKin-P342C Motoren doppelte Rückwärtsschritte (siehe auch Tabelle 3.2 in Kapitel 3.1.6). In etwa 10% der Fälle treten dagegen einfache Rückwärtsschritte einer Länge von 8 nm auf, wie sie in Abbildung 3.11 (B) gezeigt sind. Auch hier erfolgen nach den Rückwärtsschritt-Ereignissen in der Regel erneute Schritte in Vorwärtsrichtung.

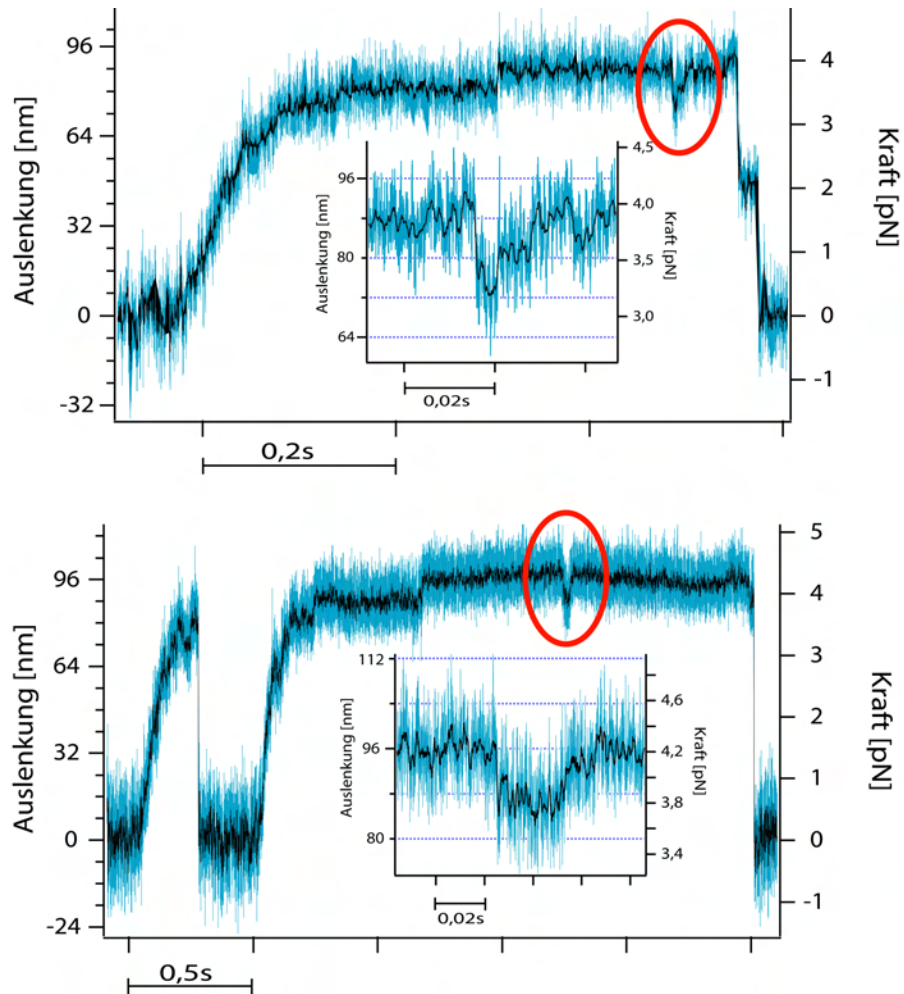


Abbildung 3.11: Rückwärtsschritte des NcKin-P342C Konstrukts unter oxidierenden Pufferbedingungen bei 2 mM ATP. Die mit einer Samplingfrequenz von 40 kHz aufgenommenen Originaldaten sind blau dargestellt, die schwarze Kurve zeigt die Daten nach einer Mittelwertfilterung mit einem gleitenden Zeitfenster von 1 ms. Rot umrandete Bereiche sind jeweils in Vergrößerung dargestellt. **(A):** Auf einen doppelten Rückwärtsschritt folgen zwei erneute Schritte in Vorwärtsrichtung. Weniger als 1% aller Läufe eines NcKin-P342C Moleküls gegen eine statische Laserfalle weisen diese Charakteristik auf. **(B):** Auf einen 8 nm Rückwärtsschritt folgt ein erneuter Schritt in Vorwärtsrichtung, wobei ein Zwischenschritt der Länge ≈ 4 nm erkennbar ist. Am Ende des Plateaus der Maximalkraft findet ein weiterer 8 nm Rückwärtsschritt statt, bevor sich der Motor vom Mikrotubulus ablöst. Etwa 10% aller Läufe des NcKin-P342C Konstrukts unter oxidierenden Pufferbedingungen zeigen einzelne 8 nm Rückwärtsschritte.

3.3 Etablierung der Dreikugelmethode

Für Messungen an mechanisch nicht-prozessiven molekularen Motoren ist die klassische Einzelkugelmethode, wie sie zur Bestimmung der einzelmolekularen Eigenschaften des NcKin-1 und seiner Mutanten (siehe Kapitel 3.1, 3.2 und 3.4) verwendet wurde, ungeeignet. Ein von einem nicht-prozessiven Motor ausgeübter Kraftschlag würde vom thermischen Rauschen der ansonsten ungebundenen Kugel weitgehend überdeckt und wäre damit nur äußerst schwer zu beobachten. Als alternative Messmethode bietet sich daher die sogenannte „Dreikugelmethode“ (Finer et al., 1994) an, die bereits erfolgreich zur Messung der kraftproduzierenden Eigenschaften des Myosin-II benutzt wurde (Veigel et al., 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode auf das Kinesin/Mikrotubuli-System übertragen. Es wurden erste Messungen an prozessiven NcKin-1 Motoren durchgeführt, die einen möglichen Einfluss der Messgeometrie auf die ermittelte Maximalkraft einzelner Motoren aufzeigen sollten.

Bei Messungen mit der Dreikugelmethode wird ein Mikrotubulus zwischen zwei in einer optischen Falle gefangenen Kugeln eingespannt und in die Nähe einer auf der Glasoberfläche fixierten dritten Kugel gebracht, auf die die zu untersuchenden Motoren in einer hinreichend geringen Dichte adsorbiert sind (siehe Kapitel 2.2.2). Von entscheidender Bedeutung für die erfolgreiche Durchführung dieser Experimente ist eine dauerhafte Anheftung des Mikrotubulus an die in der Laserfalle gehaltenen Kugeln. In ersten Vorexperimenten wurde deshalb die mechanische Belastbarkeit verschiedener Arten der Mikrotubuli-Kugel Bindung untersucht.

3.3.1 Die Belastbarkeit der Mikrotubuli-Kugel Bindung

Drei verschiedene Methoden zur Anbindung einzelner Mikrotubuli an Polystyrolkugeln erschienen vielversprechend: Eine Anbindung der Mikrotubuli an Kugeln, die zuvor mit einer immobilen Kinesinmutante beschichtet wurden, eine Anbindung biotinylierter Mikrotubuli an mit Streptavidin/Avidin beschichtete Kugeln sowie eine Anbindung der Mikrotubuli an Kugeln, die mit tubulinspezifischen Antikörpern beschichtet wurden. Da alle drei Methoden das Fangen eines Mikrotubulus zwischen zwei in der optischen Falle festgehaltenen Kugeln (siehe Abbildung 3.12) erlaubten, wurde die mechanische Belastbarkeit der jeweiligen Mikrotubuli-Kugel Bindung in der optischen Falle bestimmt. Hierzu wurde ein Mikrotubulus, wie in Abbildung 3.13 (A) gezeigt, zwischen zwei Kugeln gefangen und durch schrittweises Wegbewegen der rechten Falle so lange unter Spannung gesetzt, bis es entweder zu einem Abriss der Kugel/Mikrotubulus-Bindung kam oder eine der beiden gefangenen Kugeln aus ihrer Falle gezogen wurde.

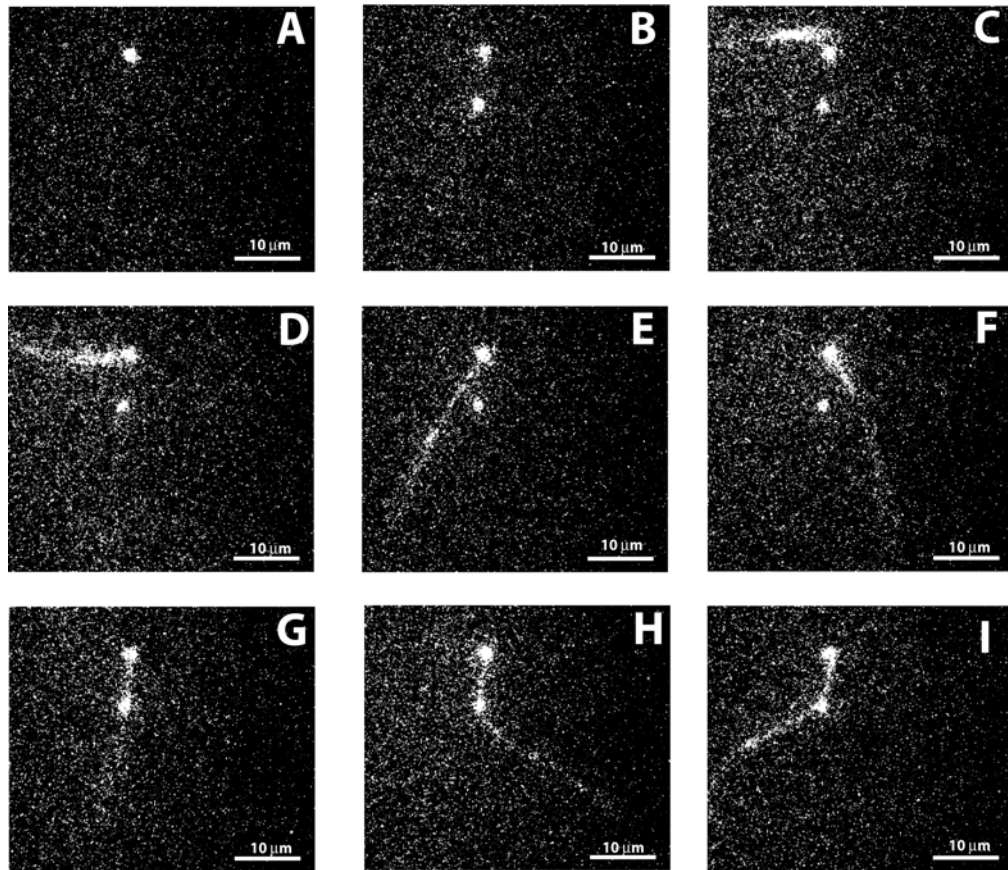


Abbildung 3.12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Fangens eines Mikrotubulus zwischen zwei mit Antikörpern beschichteten Kugeln: Zur Sichtbarmachung der Kugeln wurden diese zusätzlich mit fluoreszentem BSA beschichtet.

A-B: Zwei fluoreszenzmarkierte Kugeln werden nacheinander im Lasergradienten zweier optischer Fallen gefangen. Der Abstand zwischen den beiden Fallenpositionen beträgt ca. $7,5 \mu\text{m}$.

C-D: Ein fluoreszenzmarkierter Mikrotubulus wird in die Nähe der oberen Kugel gebracht und bindet an diese an.

E-G: Der an die obere Kugel gebundene Mikrotubulus wird durch kontrollierte Bewegung der Fluidzelle bei gleichzeitig festen Fallenpositionen gestreckt und in die Nähe der unteren Kugel gebracht, bis er an diese anbindet.

H-I: Der Mikrotubulus ist an beide Kugeln gebunden.

Anbindung über die immobile Kinesinmutante HsKin-G234A

Analog zu den Experimenten mit Myosin-II, bei denen die Anbindung des Aktins an die Kugeln über chemisch inaktivierte und unspezifisch auf die Kugeln adsorbierte Myosinmotoren erfolgte (Veigel et al., 1998), wurde die Möglichkeit einer Anbindung von Mikrotubuli über eine durch eine Punktmutation im ATPase-Zentrum inaktivierte Kinesinmutante (HsKin-G234A) untersucht. Polystyrolkugeln wurden dazu, wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben, mit HsKin-G234A beschichtet und anschließend gewaschen. Die Kugeln wiesen eine hohe Affinität zu Mikrotubuli auf und ermöglichten ein einfaches Fangen der Mikrotubuli zwischen den zwei Kugeln. Ein typisches Ergebnis eines Belastungstests einer auf diese Art gefertigten Hantel zeigt Abbildung 3.13 (B). Zwar wird eine Auslenkung der rechten Kugel unmittelbar auf die linke, detektierte Kugel übertragen, jedoch ist bereits unter niedrigen Kräften eine langsame und kontinuierliche Relaxation der angelegten Kraft erkennbar. Unter hohen Kräften (in Abbildung 3.13 (B) bei ca. 10 pN) relaxiert die angelegte Spannung innerhalb weniger Sekunden bis fast zum Nullpunkt. Die Relaxation erfolgt dabei in diskreten 8 und 16 nm Schritten, was die Vermutung nahe legt, dass durch die angelegte Kraft die zur Mikrotubulianheftung benutzten chemisch inaktiven Kinesinmotoren zu einzelnen, diskreten Schritten gezwungen werden. Eine Anbindung der Mikrotubuli an Kugeln mittels dieser Technik ist damit zur Untersuchung anderer Kinesinmotoren ungeeignet.

Mikrotubulianbindung über das Biotin/Streptavidin-System

Auch die Verwendung des Biotin/Streptavidin-Systems ermöglicht ein einfaches Fangen der Mikrotubuli zwischen zwei Kugeln. Für die Stabilitätstests wurden sowohl kommerziell erhältliche Kugeln mit kovalent angebundenem Streptavidin als auch Biotin-modifizierte Kugeln mit selbst angebundenem Streptavidin verwendet. Beide Sorten zeigten hinsichtlich ihrer Affinität zu biotinylierten Mikrotubuli keine erkennbaren Unterschiede. Biotinylierte Mikrotubuli wurden, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, frisch polymerisiert und zusätzlich bei Raumtemperatur durch ein Sucrosekissen zentrifugiert, um Reste freien Biotins zu entfernen. Abbildung 3.13 (C) zeigt das typische Ergebnis der Stabilitätsprüfung einer auf diese Weise hergestellten Hantel. Eine angelegte Spannung relaxiert innerhalb kürzester Zeit wieder bis zum Nullpunkt. Weder eine Erhöhung des Biotinylierungsgrads der Mikrotubuli noch eine Variation der Beschichtungsdichte der Kugeln ergaben eine signifikante Änderung des Verhaltens. Das Biotin/Streptavidin-System erwies sich damit zur Herstellung einer stabilen Mikrotubuli-Kugel Bindung ebenfalls als untauglich.

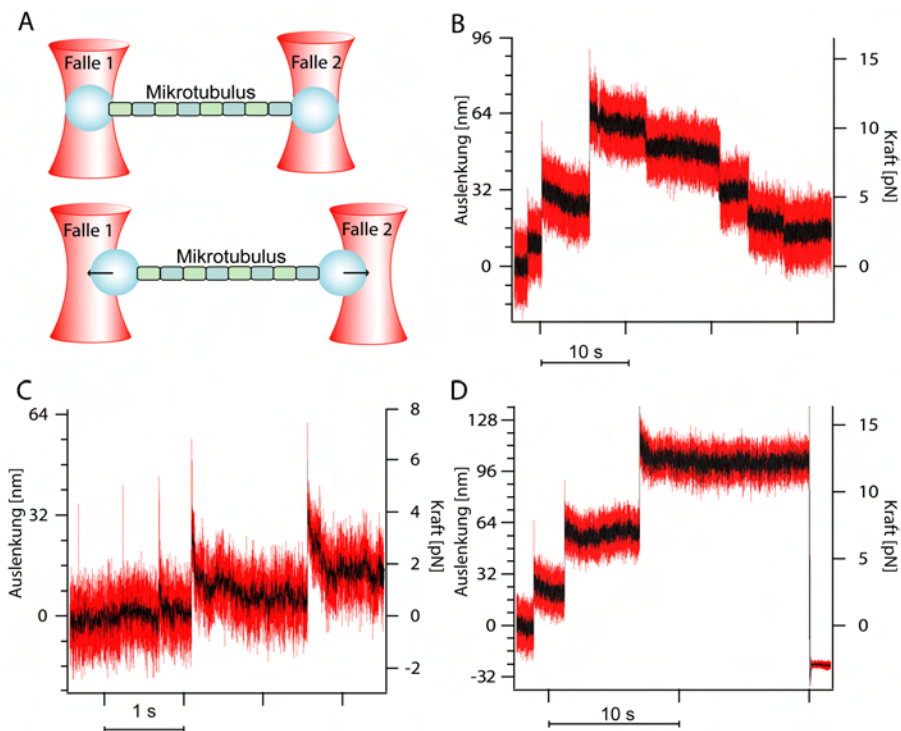


Abbildung 3.13: Untersuchung der Stabilität der Mikrotubuli-Kugel Bindung. **(A):** Ein einzelner Mikrotubulus wird zwischen zwei in der optischen Falle festgehaltenen Kugeln eingefangen. Durch eine schrittweise Positionsveränderung der rechten Falle nach rechts wird das System unter Spannung gesetzt, bis die Mikrotubuli-Kugel Bindung abreißt, oder eine der Kugeln aus ihrer Falle gezogen wird. **(B):** Stabilität der Mikrotubuli-Kugel Bindung bei Verwendung der Kinesinmutante HsKin-G234A. Dargestellt ist das Positionssignal einer Kugel gegen die Zeit. Die Position der rechten Falle wird manuell in drei Schritten so weit verändert, dass auf das System eine Kraft von ca. 10 pN wirkt. Bereits unter geringen Kräften ist eine langsame und kontinuierliche Relaxation der angelegten Spannung zu beobachten. Unter höheren Kräften relaxiert die angelegte Kraft innerhalb weniger Sekunden in einer Reihe von diskreten 8 und 16 nm Schritten bis fast zum Nullpunkt. **(C):** Stabilität der Mikrotubulianbindung über das Biotin/Streptavidin System. Eine angelegte Spannung relaxiert sofort bis fast zum Nullpunkt. **(D):** Stabilität der Mikrotubuli-Kugel Bindung bei Verwendung des tubulinspezifischen Antikörpers TUB-1A2. Eine angelegte Spannung relaxiert nicht. Bei einer Steigerung der angelegten Kraft auf ≈ 15 pN wird die detektierte Kugel aus ihrer Falle gezogen.

Mikrotubulianbindung über tubulinspezifische Antikörper

Die stabilste Bindung zwischen Kugeln und Mikrotubuli wurde bei Verwendung eines tubulinspezifischen Antikörpers erreicht, der auf Polystyrolkugeln mit kovalent gebundenem Protein-A oder Protein-G adsorbiert wurde (siehe Kapitel 2.6.2).

Abbildung 3.13 (D) zeigt ein typisches Beispiel eines Stabilitätstest mit einer auf diese Weise hergestellten Hantel. Dargestellt ist wieder das Positionssignal der gefangenen Kugel gegen die Zeit. Eine Auslenkung der rechten Kugel wird instantan auf die detektierte linke Kugel übertragen. Die an die Hantel angelegte Spannung relaxiert nicht. Bei einer Steigerung der angelegten Kraft auf ≈ 15 pN wird die detektierte Kugel schließlich aus ihrer Falle gezogen. In weiteren Versuchen wurde festgestellt, dass das System Kräften von ca. 10 pN über Minuten standhält und nur sehr selten nennenswerte Relaxationsprozesse aufweist. Wegen der überzeugenden Stabilität stellt diese Art der Anbindung der Mikrotubuli eine gute Möglichkeit dar, Messungen an molekularen Motoren mittels der Dreikugelmethode vorzunehmen. Für alle durchgeführten Untersuchungen wurde daher diese Methode der Anbindung gewählt.

3.3.2 Maximalkraft einzelner NcKin-1 Motoren in der Dreikugelmethode

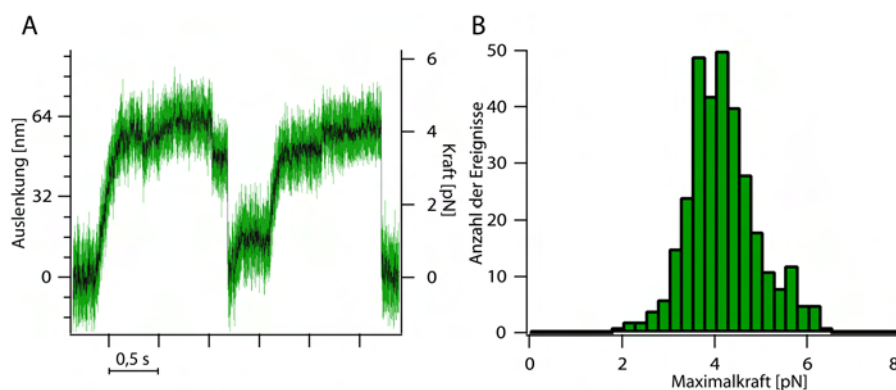


Abbildung 3.14: Die Maximalkraft des NcKin-1 Wildtyps gemessen mit der Dreikugelmethode. **(A):** Lauf eines einzelnen NcKin-1 Motors in einem Dreikugelexperiment. Die ungefilterten Originaldaten sind farbig dargestellt, die schwarze Kurve zeigt das Positionssignal nach einer Mittelwertfilterung mit einem gleitenden Zeitfenster von 2 ms. In der Nähe des Plateaus der Maximalkraft sind einzelne 8 nm Schritte erkennbar. **(B):** Histogramm der Maximalkräfte des NcKin-1 in der Dreikugelanordnung. Der Mittelwert der Maximalkraft liegt bei $(4,1 \pm 0,2)$ pN ($N = 323$) und ist damit identisch zu der in Einzelkugelexperimenten bestimmten Maximalkraft.

Die von einzelnen NcKin-1 Motoren produzierte Maximalkraft wurde mit der Dreikugelmethode gemessen. Abbildung 3.14 (A) zeigt ein Beispiel für einen prozessiven Lauf eines NcKin-1 Motors. Unter hohen Kräften sind einzelne 8 nm Schritte zu erkennen. Die Dichte der adsorbierten Motoren auf der oberflächengebundenen Kugel wurde wie bei der Einzelkugelmethode so eingestellt, dass höchstens jede

dritte getestete Oberflächenkugel bei Kontakt mit einem Mikrotubulus eine Interaktion zeigte.

Ein Vergleich der Datensätze aus Einzelkugelexperimenten mit denen aus Experimenten in der Dreikugelanordnung offenbart deutliche qualitative Unterschiede. Die Pausen zwischen einzelnen Läufen eines aktiven molekularen Motors in der Dreikugelanordnung fallen deutlich kürzer aus als die Pausen bei vergleichbaren Messungen mit der Einzelkugelmethode. Während Datensätze aus Einzelkugelexperimenten in der Regel Pausen von mehreren 100 Millisekunden zwischen den einzelnen Läufen eines molekularen Motors aufweisen, ist die Pausendauer in der Dreikugelanordnung in den meisten Fällen erheblich geringer. Auch die Wahrscheinlichkeit für das Wiederanbinden eines Motors an den Mikrotubulus, noch bevor das System sich wieder in seinem Ausgangszustand befindet, ist in der Dreikugelanordnung deutlich höher. Eine Erklärung hierfür ergibt sich unmittelbar aus der Betrachtung der räumlichen Verhältnisse. Bei der Einzelkugelmethode sind einige wenige Motoren auf einer Polystyrolkugel adsorbiert, die in ihrem Fallenpotential frei drehbar ist. Verliert ein laufender Motor seinen Kontakt zum Mikrotubulus, so wird die Kugel von der Falle in ihre Ausgangsposition zurückgezogen. Ein neuerliches Anbinden des Motors und damit ein weiterer Lauf kann erst erfolgen, wenn die sich frei drehende Kugel den adsorbierten Motor wieder in die Nähe des Mikrotubulus bringt. Bei Experimenten in der Dreikugelanordnung ist die den Motor tragende Kugel dagegen auf dem Deckgläschen fixiert. Ein Kinesinmolekül, das seinen Kontakt zum Mikrotubulus verliert, kann daher sofort wieder an den sich weiterhin in unmittelbarer Nähe befindlichen Mikrotubulus anbinden und einen erneuten Lauf starten. Die Wartezeit zwischen den einzelnen Läufen ist entsprechend kürzer und ein Wiederanbinden eines abgelösten Motors an den Mikrotubulus noch vor Erreichen der Ruhelage des Systems wahrscheinlicher.

Abbildung 3.14 zeigt ein Histogramm der in der Dreikugelanordnung gemessenen Maximalkräfte. Die durchschnittliche Maximalkraft des NcKin-1 unter den beschriebenen Bedingungen ergibt sich zu $(4,1 \pm 0,1)$ pN ($N = 323$) und ist damit identisch zu der mit der klassischen Einzelkugelmethode bestimmten Maximalkraft (siehe Kapitel 3.1.5).

3.4 Die chimären Kinesinkonstrukte NcKin-1/3 und NcKin-3/1

Im folgenden Kapitel werden die im Rahmen der einzelmolekularen Untersuchung des NcKin-1/3 Chimärs erhaltenen Daten beschrieben. Das inverse NcKin-3/1 Konstrukt erwies sich sowohl in Einzelmolekül-Motilitätsassays als auch in Fallenexperimenten als mechanisch nicht-prozessiv. Zur Interpretation der in diesem Kapitel vorgestellten Daten und insbesondere auch zur Diskussion der Fragestellung nach den die Prozessivität des Kinesinmotors bestimmenden Faktoren werden darüber hinaus in Kapitel 3.4.6 kinetische Daten der beiden chimären Kinesinkonstrukte vorgestellt, die in Messungen von Sarah Adio und Bettina Ebbing am Institut für Zellbiologie der LMU München gewonnen wurden (Adio et al., 2007).

3.4.1 Geschwindigkeitsbestimmung aus Motilitätsassays

Die Geschwindigkeit des NcKin-1/3 Chimärs, wie auch die des zum NcKin-1/3 komplementären NcKin-3/1 Konstrukts, wurden in Motilitätsassays unter hohen Motordichten bestimmt. Auf die Glasoberfläche adsorbierte NcKin-1/3 Moleküle unterstützten den gleichmäßigen unidirektionalen Transport von Mikrotubuli mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von $(1,18 \pm 0,02) \mu\text{m/s}$. Eine Reduzierung der Motordichte bis zu Einzelmolekülbedingungen (ca. $0,05 \mu\text{M}$) führte zwar zum kurzzeitigen Anbinden einzelner Mikrotubuli an isolierte Punkte und einen kurzzeitigen Transport der Mikrotubuli über die entsprechenden Punkte, jedoch erwies sich die Prozessivität der NcKin-1/3 Konstrukte als so gering, dass eine exakte Geschwindigkeitsbestimmung unter diesen Bedingungen nicht möglich war.

Das NcKin-3/1 Konstrukt unterstützte einen unidirektionalen Transport von Mikrotubuli nur unter hohen Motorkonzentrationen. Die durchschnittliche Geschwindigkeit war im Vergleich zum NcKin-1/3 mit $(0,57 \pm 0,01) \mu\text{m/s}$ deutlich reduziert und entsprach in etwa der mittleren Mikrotubulitranslationsgeschwindigkeit des NcKin-3 Motors (Adio et al., 2006). Eine schrittweise Reduzierung der Motordichte bis zu Einzelmolekülbedingungen erwies sich bei diesem Konstrukt als nicht durchführbar, da reproduzierbar bei Unterschreiten einer Grenzkonzentration von ca. $0,2 \mu\text{M}$ Motor die Mikrotubulibindungsrate sprunghaft abnahm und keine Bindeereignisse von Mikrotubuli an die mit Motoren besetzte Glasoberfläche mehr zu identifizieren waren.

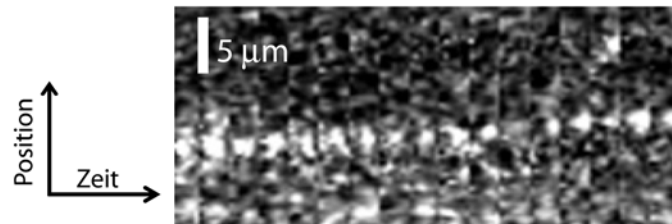


Abbildung 3.15: Kymogramm eines NcKin-1/3 Motors bei einer ATP-Konzentration von $20 \mu\text{M}$. Ein mit dem Farbstoff atto-488 markiertes NcKin-1/3 Konstrukt bewegt sich entlang eines Mikrotubulus. Die Zeit zwischen den einzelnen Punkten beträgt 300 ms. Bild mit Erlaubnis von Bettina Ebbing (LMU München).

3.4.2 Die Prozessivität des NcKin-1/3 Chimärs

Nachweis der Prozessivität des NcKin-1/3 Konstrukts in Einzelmolekülfluoreszenzexperimenten

Der direkte Nachweis der Prozessivität des NcKin-1/3 Konstrukts wurde von Bettina Ebbing am Institut für Zellbiologie der LMU München durch direkte fluoreszenzmikroskopische Beobachtung von einzelnen fluoreszenzmarkierten NcKin-1/3 Motoren erbracht. Abbildung 3.15 zeigt ein Kymogramm eines einzelnen, entlang eines Mikrotubulus laufenden Kinesin-1/3 Motors. Im Rahmen dieser Experimente konnten einzelne Läufe einer Länge von bis zu $3 \mu\text{m}$ mit einer mittleren Geschwindigkeit von $(1,40 \pm 0,03) \mu\text{m}$ beobachtet werden. Die durchschnittliche Lauflänge des Moleküls unter diesen Bedingungen betrug $(0,67 \pm 0,13) \mu\text{m}$ (Adio et al., 2007) und beträgt damit nur ca. 37% der durchschnittlichen Lauflänge des NcKin-1 Wildtyps unter vergleichbaren Bedingungen (Lakämper et al., 2003).

Wie die im folgenden Kapitel beschriebenen Resultate aus Untersuchungen mit der optischen Falle belegen, ist die Prozessivität des NcKin-1/3 Konstrukts in der Tat nur schwach ausgeprägt.

Die Kraft-Lauflängen Relation des NcKin-1/3 Chimärs

Die durchschnittliche Lauflänge einzelner chimärer NcKin-1/3 Motoren im Kraftbereich von 0,7 pN bis 2,5 pN wurde mit der optischen Falle bestimmt. Abbildung 3.16 zeigt einen Vergleich der dabei ermittelten durchschnittlichen Lauflänge mit der des NcKin-1 Wildtyps (siehe Kapitel 3.1.3). Die Prozessivität des chimären Moleküls (gelb) liegt bei allen Kräften deutlich unter der des NcKin-1 Wildtyps (grün). Bei einer Last von 1,0 pN weist das NcKin-1/3 Molekül eine durchschnittliche Lauflänge von $(165 \pm 12) \text{nm}$ und damit lediglich ca. 34% der Lauflänge des NcKin-1 Wildtyps auf. Unter einer höheren Last von 2 pN verringert sich die Prozessivität

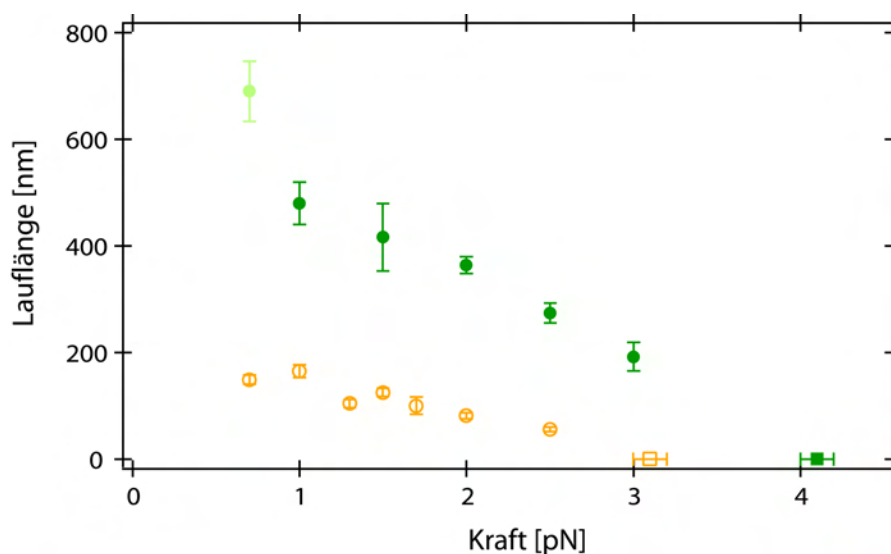


Abbildung 3.16: Die Kraft-Lauflängen Relation des NcKin-1/3 Chimärs. Aufgetragen ist die durchschnittliche Lauflänge einzelner Motoren gegen die auf sie wirkende konstante Haltekraft. Das NcKin-1/3 Chimär (gelb, offene Kreise, $N=143-258$) zeigt im Vergleich zum NcKin-1 Wildtyp (grün, gefüllte Kreise, $N=50-477$) im gesamten Kraftbereich eine signifikant niedrigere durchschnittliche Lauflänge. Während die Prozessivität des NcKin-1 Wildtyps unter Kräften < 1 pN deutlich zunimmt und mit der optischen Falle wegen der begrenzten Reichweite des Feedbacksystems nicht mehr zuverlässig ermittelt werden kann (gefüllter hellgrüner Kreis bei 0,7 pN, siehe auch Kapitel 3.1.3), zeigt das NcKin-1/3 Chimär auch bei 0,7 pN keine signifikante Zunahme der Prozessivität. Die Quadrate zeigen die durchschnittliche Maximalkraft der jeweiligen Motorkonstrukte, unter der sich die durchschnittliche Lauflänge auf null reduziert.

um etwa die Hälfte auf (81 ± 6) nm, was etwa 22% der typischen Lauflänge des NcKin-1 unter identischen Bedingungen entspricht. Während die Prozessivität des NcKin-1 Wildtyps unter Kräften < 1 pN deutlich zunimmt und mit der optischen Falle wegen der begrenzten Reichweite des Feedbacksystems nicht mehr zuverlässig ermittelt werden kann (siehe Kapitel 3.1.3), zeigt das NcKin-1/3 Chimär auch bei 0,7 pN keine signifikante Zunahme der Prozessivität.

3.4.3 Die Kraft-Geschwindigkeits Relation des NcKin-1/3 Chimärs

Die Kraft-Geschwindigkeits Relation des NcKin-1/3 Chimärs ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Sie verläuft im Wesentlichen parallel zu der des NcKin-1 Wildtyps (grün, gefüllte Kreise, $N=103-758$), wobei das NcKin-1/3 Chimär (gelb, offene Kreise, $N=23-150$) unter allen untersuchten Kräften eine signifikant reduzierte mittlere

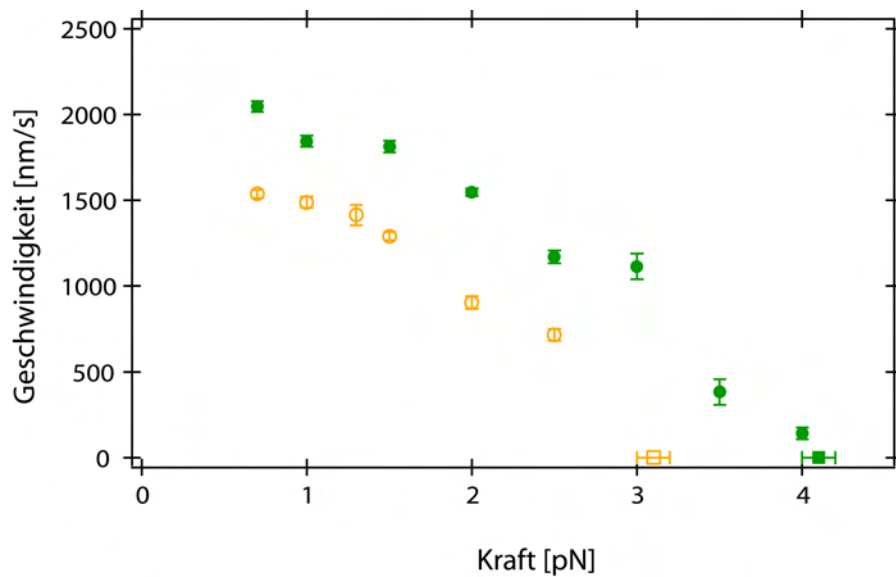


Abbildung 3.17: Die Kraft-Geschwindigkeits Relation des NcKin-1/3 Chimärs. Aufgetragen ist die durchschnittliche Geschwindigkeit einzelner laufender Motoren gegen die auf sie wirkende konstante Haltekraft. Das NcKin-1/3 Chimär (gelb, offene Kreise N=23-150) weist im Vergleich zum NcKin-1 Wildtyp (grün, gefüllte Kreise, N=103-758) unter allen Kräften eine deutlich reduzierte Geschwindigkeit auf. Der Verlauf der beiden Relationen ist ähnlich. Die Quadrate kennzeichnen die von den Motoren durchschnittlich produzierten Maximalkräfte, unter denen sich die mittlere Geschwindigkeit der jeweiligen Konstrukte auf null reduziert.

Geschwindigkeit aufweist. So beträgt seine maximale Geschwindigkeit, gemessen unter einer Last von 0,7 pN ($1,54 \pm 0,02$) $\mu\text{m/s}$, etwa 25% weniger als die Geschwindigkeit des NcKin-1 Wildtyps unter gleichen Bedingungen. Unter einer Kraft von 2,5 pN bewegen sich chimäre NcKin-1/3 Moleküle noch mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von ($0,72 \pm 0,04$) $\mu\text{m/s}$, was im Vergleich zum NcKin-1 Wildtyp einer Reduzierung der mittleren Geschwindigkeit um etwa 40% entspricht.

3.4.4 Die Maximalkraft des NcKin-1/3 Chimärs

Die von einzelnen NcKin-1/3 Molekülen produzierte Maximalkraft wurde analog zu den Versuchen mit dem NcKin-1 Wildtyp (Kapitel 3.1.5) in einer statischen Laserfalle bestimmt. Abbildung 3.18 (A) zeigt ein Beispiel für einen Lauf eines einzelnen NcKin-1/3 Motors in einer statischen Laserfalle. Wiederum zeigen sich bei Annäherung des Motors an das Plateau der Maximalkraft einzelne, charakteristische 8 nm Schritte.

Abbildung 3.18 (B) zeigt ein Histogramm der von NcKin-1/3 Motoren aufgebracht-

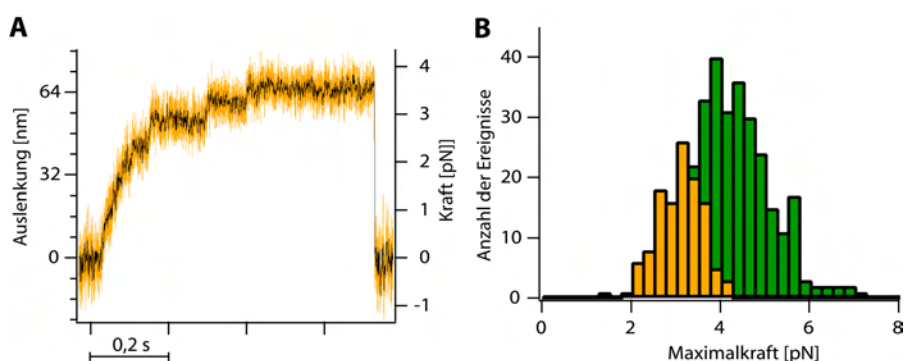


Abbildung 3.18: (A): Lauf eines chimären NcKin-1/3 Moleküls in einer statischen Laserfalle. Aufgetragen ist das Positionssignal der gefangenen Kugel gegen die Zeit. Die ungefilterten Positionsdaten sind orange dargestellt, die schwarze Kurve zeigt die Daten nach einer Mittelwertfilterung mit einem gleitenden Zeitfenster von 1 ms. In der Nähe des Plateaus der Maximalkraft zeigen sich einzelne 8 nm Schritte des Motors. (B): Histogramm der Maximalkräfte des NcKin-1/3 Chimärs (gelb) im Vergleich zum NcKin-1 Wildtyp (grün). Die durchschnittliche Maximalkraft des NcKin-1/3 Chimärs beträgt $(3,1 \pm 0,1)$ pN.

ten Maximalkräfte (gelb) im Vergleich zum NcKin-1 Wildtyp (grün). Die mittlere Maximalkraft des chimären Motors beträgt $(3,1 \pm 0,1)$ pN und liegt damit etwa 24% unter der durchschnittlichen Maximalkraft des NcKin-1 Wildtyps.

3.4.5 Rückwärtsschritte des NcKin-1/3 Chimärs

Obwohl das chimäre NcKin-1/3 Konstrukt sowohl die Motordomänen als auch die Neck-Linker Region des NcKin-1 Wildtyps besitzt, zeigt es in seinen Läufen gegen eine statische Laserfalle sowohl unter sättigenden als auch unter limitierenden ATP-Konzentrationen in weniger als 10% aller Ereignisse Rückwärtsschritte (siehe Tabelle 3.2 in Kapitel 3.1.6). Doppelte Rückwärtsschritte, wie sie beim NcKin-1 Wildtyp gerade unter limitierenden ATP-Konzentrationen häufig auftreten, waren beim NcKin-1/3 Chimär bei 2 mM ATP nur sehr selten und unter limitierenden ATP-Konzentrationen überhaupt nicht zu beobachten. Abbildung 3.19 zeigt ein Beispiel für einen Rückwärtsschritt beim Lauf eines chimären NcKin-1/3 Motors gegen eine statische Laserfalle. Schon während der Plateauphase sind einzelne Fluktuationen in Vor- und Rückwärtsrichtung zu erkennen. Gegen Ende des Plateaus der Maximalkraft erfolgt zuerst ein einzelner Rückwärtsschritt, auf den ein doppelter Rückwärtsschritt mit erneutem Vorwärtsschritt folgt, bevor sich das Molekül vom Mikrotubulus ablöst. Da der doppelte Rückwärtsschritt sehr rasch erfolgt und kein Zwischenschritt erkennbar ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesem Ereignis um ein vollständiges Ablösen und Wiederanbinden des Motors

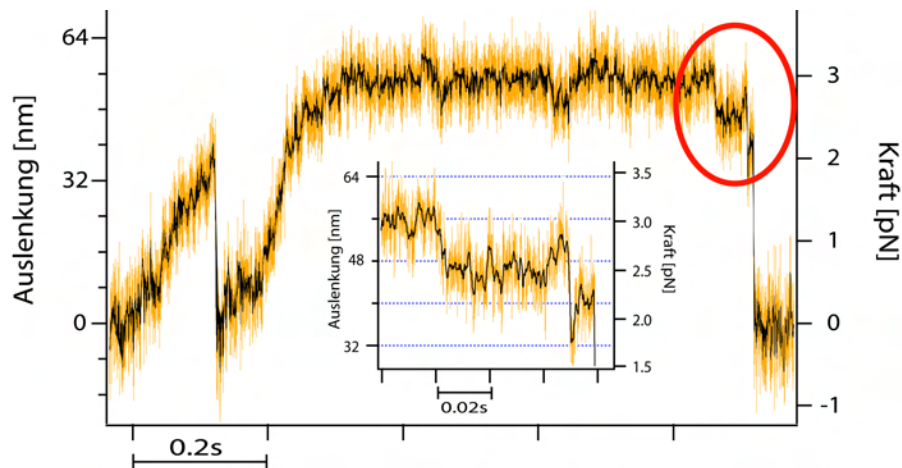


Abbildung 3.19: Beispiel für Rückwärtsschritte des chimären Kinesin-1/3 Motors. Die mit einer Samplingfrequenz von 40 kHz aufgezeichneten Originaldaten sind farbig dargestellt, die schwarze Kurve stellt die Daten nach einer Mittelwertfilterung mit einem gleitenden Zeitfenster von 1 ms dar. Der rot umrandete Bereich ist in Vergrößerung dargestellt. Schon während der Plateauphase des Motors sind einzelne Fluktuationen in Vor- und Rückwärtsrichtung zu erkennen. Gegen Ende des Plateaus der Maximalkraft erfolgen nacheinander zwei Rückwärtsschritte. Vor dem letzten Rückwärtsschritt ist der Versuch eines Schritts in die Vorwärtsrichtung erkennbar.

handelt.

3.4.6 Kinetische Charakterisierung der chimären NcKin-1/3 und NcKin-3/1 Motoren

Die kinetische Charakterisierung der chimären Kinesinmotoren NcKin-1/3 und NcKin-3/1 wurde im Rahmen einer Kooperation von Sarah Adio am Institut für Zellbiologie der LMU München durchgeführt. Da eine geschlossene Interpretation der Eigenschaften der chimären Kinesinmotoren ohne diese Daten nicht möglich ist, werden die wichtigsten Aspekte an dieser Stelle kurz beschrieben. Für eine ausführlichere Darstellung sei auf (Adio et al., 2007) verwiesen.

Die ATPase-Rate des NcKin-1/3 Konstrukts

Die Bestimmung der ATPase-Rate des NcKin-1/3 Konstrukts ergab für die Mikrotubuli-stimulierte ATPase einen Wert von $k_{\text{cat}} = (99 \pm 16) \text{ s}^{-1}$ mit einer halbmaximalen Aktivierungskonzentration für Mikrotubuli von $K_{0,5(\text{MT})} = (2,1 \pm 0,4) \mu\text{M}$ bei ($N = 3$) verschiedenen Proteinpräparationen. Aus der Rate des ATP-Umsatzes ergibt sich rein rechnerisch eine Geschwindigkeit von $2 \times 8 \text{ nm} \times 99 \text{ s}^{-1} \approx 1,6 \mu\text{m/s}$ für

ein doppelköpfiges Konstrukt, das sich mit zwei enzymatisch gekoppelten Köpfen entlang eines Mikrotubulus bewegt.

Die ATPase-Rate des NcKin-3/1 Konstrukts

ATPase-Messungen für das inverse NcKin-3/1 Konstrukt ergaben eine ATP-Umsatzrate für die mikrotubulistimulierte ATPase von $k_{cat} = (23,2 \pm 1,0) s^{-1}$ ($N = 2$) sowie eine halbmaximale Aktivierungskonzentration für Mikrotubuli $K_{0,5(MT)} = (0,2 \pm 0,1) \mu M$. Nimmt man für dieses Konstrukt ebenfalls einen Hand-über-Hand Mechanismus der Fortbewegung an, so wäre nach den kinetischen Daten eine mittlere Mikrotubulitranslationsgeschwindigkeit von etwa $0,37 \mu m/s$ zu erwarten. Die in Motilitätsassays gemessene Geschwindigkeit der Mikrotubulitranslation liegt mit $(0,57 \pm 0,01) \mu m/s$ (siehe Kapitel 3.4.1) erheblich über diesem Wert. Diese Diskrepanz legt nahe, dass der beobachteten Mikrotubulitranslation ein anderer Mechanismus zu Grunde liegt.

Beide Motordomänen des NcKin-3/1 Konstrukts zeigen ATPase Aktivität

Untersuchungen am NcKin-3 Wildtyp ergaben, dass nur eine der beiden Motordomänen des dimeren Moleküls aktiv ist (Adio et al., 2006). Um zu überprüfen, ob diese Eigenschaft auch auf das in seinen Motordomänen identische NcKin-3/1 Konstrukt zutrifft, wurde an diesem die Rate für das Mikrotubuli-induzierte Loslösen des ADPs bestimmt. Zu diesem Zweck wurde mit mant-ADP beladenes NcKin-3/1 an Mikrotubuli gebunden, was zum Ablösen des mant-ADPs vom gebundenen Kopf des Kinesins führte. Im Gegensatz zum NcKin-3 Wildtyp, bei dem ein vergleichbares Experiment nicht möglich war (Adio et al., 2006), erfolgte das Ablösen des mant-ADPs des zweiten Kopfes mit einer Rate von $k_{max} = (47 \pm 8) s^{-1}$ bei einer halbmaximalen Aktivierungskonzentration von Mikrotubuli von $k_{M,ATP} = (60 \pm 16) \mu M$.

Die chemische Prozessivität des NcKin-3/1 Konstrukts

Da das NcKin-3/1 Chimär sowohl in Motilitätsassays als auch bei Untersuchungen mit der optischen Falle alle Eigenschaften eines mechanisch nicht prozessiven molekularen Motors aufwies, wurde in einem weiteren Schritt die biochemische Prozessivität des Moleküls bestimmt. Hierzu wurde ein Vergleich der ATPase-Rate im Gleichgewicht mit der Rate für das mikrotubuliinduzierte Ablösen von ADP durchgeführt (Hackney, 1994). Der Quotient aus

$$k_{bi,ratio} = \frac{k_{cat}/k_{0,5,MT}}{k_{max}/K_{0,5,MT}} \quad (3.1)$$

erlaubt demnach eine Abschätzung, wie viele Moleküle ATP pro Kontakt und pro Bildung eines Motor-Mikrotubulus Komplexes umgesetzt werden. Die Rate für

Konstrukt	k_{cat}, s^{-1}	$k_M(MT), \mu M$	$k_M(ATP), \mu M$	prozessiv?
NcKin-3	$23,2 \pm 8,0$	$1,0 \pm 1,2$	$4,0 \pm 0,9$	nein
NcKin-3/1	$23,2 \pm 1,0$	$0,2 \pm 0,1$	$49,1 \pm 1,3$	nein
NcKin-1	$66,9 \pm 18,1$	$2,2 \pm 1,4$	$64,5 \pm 20,4$	ja
NcKin-1/3	$99,6 \pm 15,5$	$2,1 \pm 0,4$	$33,1 \pm 4,6$	ja

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der wichtigsten kinetischen Daten der NcKin-1/NcKin-3 Chimären sowie der jeweiligen Wildtypmotoren (Adio et al., 2007). Alle Werte sind Mittelwerte der Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Messungen. Mit Genehmigung von Sarah Adio (Institut für Zellbiologie der LMU München).

das mikrotubuliinduzierte Ablösen des ADP-Analogons mant-ADP ergab sich aus stopped-flow-Experimenten zu $k_{max} = 53,5 s^{-1}$ bei einer halbmaximalen Aktivierungskonzentration von Mikrotubuli von $1,7 \mu M$. Zusammen mit der oben bereits angegebenen Umsatzrate für ATP k_{cat} errechnet sich daraus die biochemische Prozessivität als

$$k_{bi,ratio} = \frac{23,2 s^{-1}/0,2 \mu M}{53,5 s^{-1}/1,7 \mu M} \approx 3,7. \quad (3.2)$$

Dies deutet an, dass ein NcKin-3/1 Motor bei jedem Kontakt mit einem Mikrotubulus 3-4 ATPase-Zyklen durchläuft, bevor er vom Mikrotubulus abdissoziiert. Darüber hinaus wurde für den NcKin-3/1 Motor auch die Rate für das ATP-induzierte Ablösen vom Mikrotubulus bestimmt. Sie ergibt sich für das NcKin-3/1 Konstrukt zu $k_{off} = (0,47 \pm 0,03) s^{-1}$ und liegt damit um etwa einen Faktor 3 unter der entsprechenden Rate des NcKin-3 Wildtyps (Adio et al., 2006). In Tabelle 3.3 sind die wichtigsten kinetischen Daten des NcKin-1/3 und NcKin-3/1 Motors nochmals zusammengefasst.

Die Duty-Ratio

Als Duty-Ratio r_d eines molekularen Motors bezeichnet man den Bruchteil der Dauer eines enzymatischen Zyklus, den der Motor an das ihn tragende Zytoskelettfilament gebunden ist (Howard, 2001). Die Duty-Ratio berechnet sich als der Quotient aus den Werten $K_{M,ATP}$ der ATPase-Rate im Gleichgewicht und $K_{M,ATP}$ aus Motilitätsassays. Im Falle des NcKin-1/3 Konstrukts ergibt sich aus den entsprechenden kinetischen Daten eine Duty-Ratio $r_d = \frac{33,1 \mu M}{50,5 \mu M} \approx 0,66$, während das NcKin-3/1 Konstrukt eine Duty-Ratio von $r_d = \frac{49,1 \mu M}{135,3 \mu M} \approx 0,36$ aufweist (Sarah Adio, persönliche Kommunikation) .

Die Duty-Ratio der jeweiligen Wildtypkonstrukte wurde bereits im Rahmen früherer Arbeiten bestimmt. Für den NcKin-1 Wildtyp ergibt sie sich zu $r_d \approx 0,53$ (Bathe, 2005), für den NcKin-3 Wildtyp zu $r_d \approx 0,03$ (Adio et al., 2006).

4 Diskussion

Kinesin-1 Motoren bewegen sich gerichtet entlang von Mikrotubuli, indem ihre beiden identischen Köpfe abhängig von ihrem jeweiligen Nukleotidzustand abwechselnd Phasen starker und schwacher Mikrotubuliaffinität durchlaufen. Dazu müssen die enzymatischen Zyklen der beiden Motordomänen zu jedem Zeitpunkt derart außer Phase sein, dass stets mindestens ein Kopf fest an den Mikrotubulus gebunden ist (Hackney, 1994; Howard, 1996). Bei Molekülen der Kinesin-1 Familie ist das α -helikale Coiled-Coil der Nackendomäne von entscheidender Bedeutung für die Synchronisation der enzymatischen Zyklen (Hancock und Howard, 1999). Obwohl die Nackendomäne von den katalytischen und für die Mikrotubulibindung verantwortlichen Zentren des Kinesins durch den Neck-Linker getrennt ist, spielt sie doch eine entscheidende Rolle für die Motilitätseigenschaften des Motors. Wird die Integrität dieser Domäne durch Mutationen gestört, so sind die resultierenden Motoren in ihrer Motilität stark eingeschränkt und teilweise nicht mehr prozessiv (Kirchner et al., 1999b; Kallipolitou et al., 2001; Bathe et al., 2005).

Obwohl die Nackenregion für das Funktionieren des Kinesinmotors von so zentraler Bedeutung ist, fällt auf, dass sich die Nackensequenzen tierischer Kinesine zum Teil erheblich von denen der Pilzkinesine unterscheiden (Thormählen et al., 1998; Mandelkow und Johnson, 1998; Schief und Howard, 2001). Darüber hinaus finden sich in den Sequenzen beider Kinesinfamilien zum Teil erhebliche Abweichungen von der für die Coiled-Coil Bildung optimalen Aminosäuresequenz mit hydrophoben Aminosäuren an den jeweiligen a und d Positionen der einzelnen Heptaden. Speziell in der ersten N-terminalen Nackenheptade vieler Kinesinmotoren finden sich einige nichtideale, hydrophile oder sperrige Reste an den jeweiligen a oder d Positionen, die einen destabilisierenden Einfluss auf die Nacken Coiled-Coil ausüben. Als Beispiele hierfür seien das Tyr344 sowie das Glu347 in der Sequenz des humanen Kinesins KIF5B (Tripet et al., 1997; Thormählen et al., 1998) sowie das Pro337 in der Sequenz des NcKin-1 genannt.

Welcher Art ist der Einfluss der NcKin-1 Nackensequenz auf das Verhalten des Moleküls? Sind die pilzspezifischen Residuen im NcKin-1 Nacken von entscheidender Bedeutung für das Verhalten des Motormoleküls und hat die Nettoladung einen Einfluss auf die Prozessivität des Motors? Anhand der bereits in den Kapiteln 3.1, 3.2 und 3.4 vorgestellten Einzelmoleküldaten werden diese Fragestellungen in Kapitel 4.1 behandelt.

In Kapitel 3.3 werden die bei Experimenten in der Dreikugelanordnung auftretenden

den Kräfte näher betrachtet.

Kapitel 4.3 beschäftigt sich mit den Untersuchungen an chimären Kinesinmotoren, bestehend aus Untereinheiten des prozessiven NcKin-1 und des nicht-prozessiven NcKin-3 Moleküls. Chimäre Kinesinkonstrukte wurden bereits in der Vergangenheit untersucht, um Informationen darüber zu gewinnen, welche strukturellen Elemente des Kinesinmotors dessen Direktionalität bestimmen (Henningsen und Schliwa, 1997). Dabei konnte zwar belegt werden, dass Strukturelemente außerhalb der Kinesin Motordomänen für die Direktionalität des Moleküls verantwortlich sind, die Frage nach den die Prozessivität bedingenden Struktureinheiten blieb jedoch unbeantwortet. Anhand der in Kapitel 3.4 beschriebenen experimentellen Ergebnisse wird diese Frage in Kapitel 4.3 diskutiert.

4.1 Der Einfluss der Kinesin-1 Nacken Coiled-Coil

Durch einen Vergleich der einzelmolekularen Eigenschaften des NcKin-1 Wildtyps mit denen der NcKin-SN Mutante mit künstlich versteiftem Nacken Coiled-Coil wurde der spezifische Einfluss der mechanischen Stabilität des Kinesinnackens auf die Motilitätseigenschaften des Motors untersucht. Die beim NcKin-SN eingesetzte repetitive EIEALKA-Sequenz maximiert durch die optimale Anordnung hydrophober und polarer Aminosäuren die bei der Coiled-Coil Bildung freiwerdende Energie, weist unter physiologischen pH-Bedingungen eine negative Nettoladung von -7e auf und ist in der Literatur gut charakterisiert (Su et al., 1994; Romberg et al., 1998). Unter anderem konnte gezeigt werden, dass eine Coiled-Coil Struktur vergleichbarer Länge einen Schmelzpunkt von 140°C sowie ein ΔG für die Denaturierung von $> 80 \text{ kJ/mol}$ aufweist (Tripet et al., 1997) und auch gegenüber chemischer Denaturierung äußerst stabil ist (Su et al., 1994).

Ersetzt man den kompletten Nacken des NcKin-1 (Aminosäuren 342-374) durch 5 Heptaden der synthetischen EIEALKA-Sequenz derart, dass Phase und Länge der Coiled-Coil erhalten bleiben, so werden bis auf sieben Aminosäuren, die an ihren jeweiligen Positionen den Anforderungen einer maximalen Coiled-Coil Stabilität genügen, alle Aminosäuren ersetzt (siehe Abbildung 4.1). Bei den erhalten gebliebenen Aminosäuren (in Abbildung 4.1 rot gekennzeichnet) handelt es sich hauptsächlich um Leucine, Lysine und Isoleucine, die für die Coiled-Coil Bildung notwendig sind und an den entsprechenden Stellen auch in den Sequenzen anderer Kinesine vorkommen. Insbesondere wurden im Rahmen des Austausches auch die meisten pilzspezifischen Aminosäuren (in Abbildung 4.1 grün gekennzeichnet) ersetzt.

Da die unter physiologischen Bedingungen aus der Hydrolyse eines Moleküls ATP gewonnene freie Energie im Bereich von $\approx 32 \text{ kJ/mol}$ liegt und die Coiled-Coil Aufwindung ein hoch kooperativer Prozess ist, ist ein Aufschmelzen des synthetischen

Coiled-Coils im Nacken des Kinesins während eines prozessiven Laufs sehr unwahrscheinlich (Romberg et al., 1998).

4.1.1 Ein Aufwinden der Nacken Coiled-Coil ist für die prozessive Bewegung des NcKin-1 nicht notwendig

Mit der Veröffentlichung der ersten Kristallstruktur des Kinesinkopfs (Kozielski et al., 1997) wurde festgestellt, dass die beiden Köpfe des Kinesinmotors nicht über genügend Reichweite verfügen, um die 8 nm Distanz zwischen zwei benachbarten Bindungsstellen eines Mikrotubulus zu überbrücken. Da die Nackensequenzen der meisten Kinesin-1 Motoren auch Aminosäuren enthalten, die für eine Coiled-Coil Bildung nicht ideal sind, wurde ein vorübergehendes Aufschmelzen der Nackenstruktur während der Kinesinbewegung postuliert (Kozielski et al., 1997; Tripet et al., 1997; Hoenger et al., 1998). Hierdurch sollte der Motor die nötige Reichweite für die gleichzeitige Anbindung seiner beiden Köpfe an zwei benachbarte β -Tubulin Untereinheiten erhalten. Mit der Identifizierung des Neck-Linkers als zusätzliches mechanisches Element (Rice et al., 1999) erscheint das Problem der mangelnden Spannweite des Motors gelöst. Darüber hinaus stellten Untersuchungen an humanen Kinesinkonstrukten mit kovalent verbundenen Cysteinen an der ersten α -Position der Nacken Coiled-Coil keine signifikanten Motilitätseinbußen fest (Tomishige und Vale, 2000). Für schnelle Pilzkinesine wie das NcKin-1 mit seiner für eine Coiled-Coil Bildung besonders ungünstigen Aminosäuresequenz der ersten Nackenheptade (Song et al., 2001) konnte dieser Nachweis bisher nicht erbracht werden.

Wie bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben, zeigen Einzelmolekül-Motilitätsassays mit dem NcKin-SN Motor eindeutig einen schnellen und gleichmäßigen Transport von Mikrotubuli über einzelne, isolierte Ankerpunkte. Bei zahlreichen Mikrotubuli konnte gleichzeitig eine weitgehende Drehbarkeit der transportierten Mikrotubuli um die jeweiligen Ankerpunkte beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass die jeweiligen Mikrotubuli tatsächlich von einzelnen Motoren und nicht etwa durch Cluster von Motoren bewegt wurden. Diese Beobachtungen zeigen zusammen mit den in Kapitel 3.1 beschriebenen Einzelmoleküldaten aus Experimenten mit der optischen Falle, dass es sich beim NcKin-SN Konstrukt um einen prozessiven, schnellen molekularen Motor handelt.

Da ein Aufschmelzen der hochgradig stabilen Nackensequenz des NcKin-SN Konstrukts, wie bereits diskutiert, als äußerst unwahrscheinlich angesehen werden kann, ist ein Aufwinden des Kinesinnackens auch bei schnellen Pilzkinesinen keine notwendige Voraussetzung für deren Prozessivität.

Das NcKin-P342C Konstrukt

Die in Kapitel 3.2 vorgestellten Einzelmoleküldaten des NcKin-P342C Konstrukts zeigen ebenfalls, dass ein Aufschmelzen der Kinesin Nackendomäne keine Voraussetzung für die Prozessivität eines Kinesinmotors ist. Das NcKin-P342C Konstrukt besitzt an der ersten N-terminalen α -Position seiner Nacken Coiled-Coil ein Cystein. Bei der Dimerisierung des Kinesinmoleküls kommen sich die beiden Cysteine am N-terminalen Ende der Nacken Coiled Coil so nahe, dass sie unter oxidierenden Pufferbedingungen eine Disulfidbrücke ausbilden und die beiden schweren Ketten damit kovalent verbinden können. Durch diese kovalente Bindung ist ein Aufschmelzen der Nacken Coiled-Coil während der prozessiven Bewegung des Moleküls unmöglich. Wie aus der Kraft-Geschwindigkeits Relation und der Kraft-Lauflängen Relation (siehe Abbildung 3.8 und 3.9) ersichtlich ist, sind die Eigenschaften des P342C Konstrukts unter oxidierenden Bedingungen, d.h. mit ausgebildeter Disulfidbrücke, nicht von den Eigenschaften des Moleküls unter reduzierenden Bedingungen zu unterscheiden.

Dieser experimentelle Befund lässt zwei Möglichkeiten der Interpretation zu: Würde der NcKin-P342C Motor durch Ausbilden der Disulfidbrücke inaktiv, so würde nur die immer vorhandene Minderheit der Proteine ohne ausgebildete Disulfidbrücke bei Kontakt mit einem Mikrotubulus Bewegung zeigen. Unter diesen Umständen wären unter oxidierenden wie reduzierenden Bedingungen identische Relationen zu erwarten. Da unter oxidierenden Bedingungen aber in diesem Fall nur noch ein kleiner Teil der in der Probe vorhandenen Moleküle Bewegung unterstützt, sollte die einzusetzende Menge Protein, die nötig ist, um eine identische Anzahl Aktivität zeigender Kugeln zu erhalten, deutlich höher sein, als im reduzierenden Fall. Dies war bei keinem Experiment zu beobachten. Vielmehr wurde der gleiche Anteil aktiver Kugeln stets bei exakt identischen Motorverdünnungen erreicht.

Sind die Motoren mit ausgebildeter Disulfidbrücke lauffähig, zeigen aber durch die kovalente Bindung zwischen den beiden Nacken-Cysteinen hinreichend ausgeprägte Defizite, so sollte sich dies, da diese Fraktion der Proteine unter oxidierenden Bedingungen die eindeutige Mehrheit darstellt (siehe Abbildung 3.7), auch im durchschnittlichen Verhalten widerspiegeln. Wie die Abbildungen 3.8 und 3.9 zeigen, ist dies nicht der Fall. Im Vergleich zum NcKin-1 Wildtyp sind, unabhängig vom Oxidationszustand des Nackencysteins, sowohl die durchschnittlichen Geschwindigkeiten als auch die durchschnittlichen Lauflängen unter allen Kräften leicht reduziert. Ein Einfluss der zwischen den Cysteinen ausgebildeten Disulfidbrücke ist dagegen nicht zu erkennen. Dieses Ergebnis lässt nur den Schluss zu, dass auch bei schnellen Pilzkinesinen eine am Anfang des Nacken Coiled-Coils zwischen den beiden Strängen bestehende Disulfidbrücke die Koordinierung der beiden Motordomänen nicht beeinträchtigt. Ein Aufwinden der Nacken Coiled-Coil ist damit auch bei schnellen Pilzkinesinen keine Voraussetzung für deren Prozessivität.

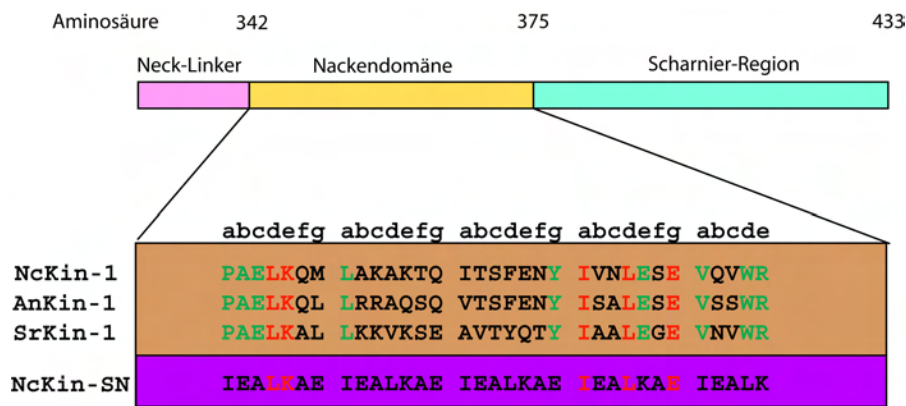


Abbildung 4.1: Vergleich der typischen Nackensequenz von Pilzkinesinen (braun hinterlegt) mit der synthetischen EIEALKA-Sequenz (violett hinterlegt). Bis auf wenige Ausnahmen (rot gekennzeichnet), die an ihren jeweiligen Positionen die für die Coiled-Coil Bildung idealen Aminosäuren darstellen, werden die meisten pilzspezifischen Aminosäuren (grün gekennzeichnet) ersetzt. Insbesondere wird auch das innerhalb der Familie der Pilzkinesine stark konservierte Tyr362 ersetzt. NcKin-1: *Neurospora crassa*, AnKin-1: *Aspergillus nidulans*, SrKin-1: *Syncephalastrum racemosum*, NcKin-SN: NcKin-1 mit EIEALKA-Sequenz als Nackendomäne.

4.1.2 Der Einfluss der Nettoladung des Nacken Coiled-Coils auf die Motilität des NcKin-1 Motors

Welche Faktoren bestimmen den Grad der Prozessivität von Kinesin-1 Motoren? Neben den Motordomänen mit ihren Mikrotubuli- und Nukleotid-Bindungscentren erscheint auch ein Einfluss der Coiled-Coil Nackendomäne wahrscheinlich (Hancock und Howard, 1999). Insbesondere wird die Möglichkeit einer direkten Interaktion des unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen Kinesinnackens mit dem negativ geladenen COOH-terminalen Ende der Tubulinuntereinheiten des Mikrotubulus diskutiert (Thorn et al., 2000; Wang und Sheetz, 2000). Untersuchungen am humanen KIF5B (Nettoladung der Nackendomäne unter physiologischen Bedingungen +4e) deuteten an, dass dessen Prozessivität in entscheidender Weise von der elektrischen Ladung des Nacken Coiled-Coils abhängt (Thorn et al., 2000). Zusätzliche positive Ladungen in der Nacken Coiled-Coil bewirken demnach eine Zunahme der Prozessivität, während zusätzliche negative Ladungen zu kürzeren durchschnittlichen Lauflängen führen.

Bereits durch Untersuchungen zur Prozessivität des NcKin-1, das trotz seines unter physiologischen Bedingungen elektrisch neutralen Nacken Coiled-Coils eine größere Prozessivität als sein humanes Gegenstück aufweist (Lakämper et al., 2003), wurde diese Interpretation in Frage gestellt. Das in dieser Arbeit untersuchte NcKin-SN Konstrukt weist in seiner Coiled-Coil Nackendomäne unter physiologischen Bedin-

gungen eine stark negative Nettoladung von $-7e$ auf. Der Argumentation in (Thorn et al., 2000; Wang und Sheetz, 2000) folgend wäre zu erwarten, dass ein Austausch der NcKin-1 Nackendomäne durch die EIEALKA-Sequenz zu einem in seiner Prozessivität stark eingeschränkten Motor führt. Wie aus den in Kapitel 3.1 beschriebenen Daten hervorgeht, ist dies eindeutig nicht der Fall. Die durchschnittliche Lauflänge des NcKin-SN Konstrukts ist zwar unter allen Kräften geringer als die des NcKin-1 Wildtyps, jedoch ist die Abnahme der Prozessivität nicht so stark ausgeprägt, wie auf Grund der drastischen Änderung der Nettoladung des Kinesinnackens zu erwarten wäre. Dies lässt den Schluss zu, dass elektrostatische Interaktionen der Nacken Coiled-Coil mit den C-terminalen Enden der Tubulinuntereinheiten des Mikrotubulus bei Pilzkinesinen nur eine sehr untergeordnete Rolle spielen.

Neben der Möglichkeit einer elektrostatischen Wechselwirkung des gesamten Kinesinnackens mit dem Mikrotubulus erscheint auch eine Wechselwirkung einzelner spezifischer Residuen der Kinesin Nacken Coiled-Coil mit dem Mikrotubulus denkbar. Abbildung 4.1 zeigt einen Vergleich der Nackensequenzen mehrerer Pilzkinesine mit der synthetischen EIEALKA-Sequenz. Bis auf wenige Ausnahmen (in Abbildung 4.1 rot dargestellt) werden durch die Substitution des natürlichen NcKin-1 Nackens durch die EIEALKA-Sequenz auch die meisten pilzspezifischen Aminosäuren (in Abbildung 4.1 grün dargestellt) ersetzt. Insbesondere die charakteristische PAE-Sequenz in der ersten N-terminalen Heptade der Nacken Coiled-Coil und das in Pilzkinesinen streng konservierte Tyr362 sind im NcKin-SN Nacken nicht vorhanden. Sollten diese pilzspezifischen Residuen einen entscheidenden Einfluss auf die Prozessivität oder Geschwindigkeit des NcKin-1 ausüben, so sollte dies im direkten Vergleich mit dem NcKin-SN Konstrukt sichtbar werden. Da die Unterschiede zwischen den beiden Konstrukten unter niedrigen Kräften aber entweder, wie im Falle der Geschwindigkeit nicht feststellbar, oder, wie im Falle der Prozessivität nur schwach ausgeprägt sind, jedoch mit steigender Kraft zunehmen, scheint eine andere Interpretation sinnvoll. Im folgenden Kapitel wird die mechanische Flexibilität der Nacken Coiled-Coil als der entscheidende Parameter vorgestellt, der die Propagation eines Kinesinmotors unter Kraft beeinflusst und für dessen optimale Funktionalität von Bedeutung ist.

4.1.3 Die axiale Flexibilität der Kinesin Nackendomäne beeinflusst die Motilität des Moleküls unter Last

Auffälligstes Merkmal des NcKin-SN Konstrukts ist dessen im Vergleich zum NcKin-1 Wildtyp stärker ausgeprägte Kraftsensibilität. Dies wird besonders im Verlauf der Kraft-Geschwindigkeits Relation (Abbildung 3.3) deutlich. Während unter niedrigen Kräften (0,7 und 1,0 pN) die durchschnittlichen Geschwindigkeiten des NcKin-1 Wildtyps und der NcKin-SN Mutante praktisch identisch sind, treten bei der SN-

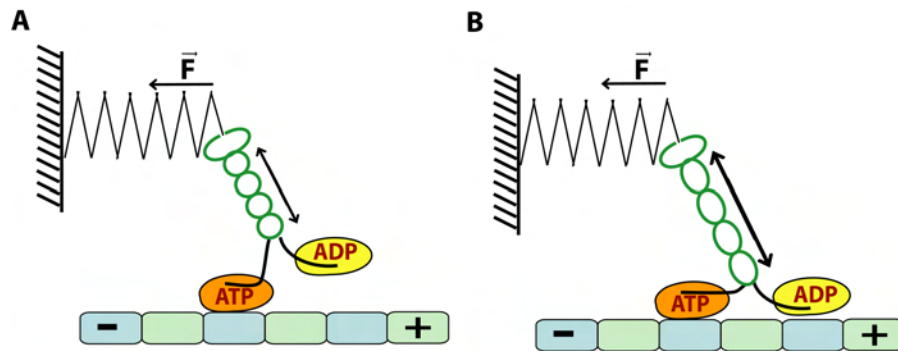


Abbildung 4.2: Modell für den Einfluss der axialen Steifigkeit des Kinesinnackens auf die prozessive Bewegung des Moleküls unter Last. **(A):** Dargestellt ist das Kinesinmolekül in einem Zustand seines enzymatischen Zyklus vor dem Erreichen der doppelköpfig gebundenen Konformation. Auf den Motor wirkt eine Kraft entgegen dessen natürlicher Laufrichtung. Der Neck-Linker des hinteren Kopfes ist an diesen angedockt, der vordere Kopf sucht diffusiv nach der nächsten Bindungsstelle. **(B):** Um die nächste Bindungsstelle zu erreichen, muss das Nacken Coiled-Coil in axialer Richtung gestreckt werden. Bei einem in axialer Richtung weicheren Nacken Coiled-Coil muss zum Erreichen der nächsten Bindungsstelle weniger Energie aufgewendet werden, als bei einem in axialer Richtung steiferen Coiled-Coil.

Mutante mit steigender Last zunehmend funktionelle Defizite zutage. Ein ähnliches Bild ergibt sich bei einem Vergleich der von einzelnen Motormolekülen produzierten Maximalkraft (siehe Abbildung 3.4). Die durchschnittliche Maximalkraft eines NcKin-SN Moleküls beträgt $(3,0 \pm 0,1)$ pN und ist damit ca. 27% geringer als die durchschnittliche Maximalkraft des NcKin-1 Wildtyps.

Der Austausch des natürlichen NcKin-1 Nackens gegen die synthetische EIEALKA-Sequenz beeinträchtigt die typischen Eigenschaften des NcKin-1 unter geringen Lasten kaum, führt aber unter hohen Lasten zu deutlichen Defiziten. Es ist daher plausibel anzunehmen, dass die beobachteten Defizite nicht auf das Fehlen pilzspezifischer Aminosäuren in der Nackendomäne des Moleküls oder auf fehlende elektrostatische Interaktionen des Kinesinnackens mit dem Mikrotubulus zurückzuführen sind. Vielmehr erscheint ein mechanistischer Ansatz zur Erklärung der Defizite des NcKin-SN Konstrukts sinnvoll.

Betrachtet man ein Kinesinmolekül während seiner prozessiven Bewegung entlang eines Mikrotubulus, so stellt das Erreichen des doppelköpfig gebundenen Zustands einen kritischen Schritt dar. Abbildung 4.2 verdeutlicht die Verhältnisse bei einem prozessiven Lauf eines Kinesinmoleküls gegen eine Kraft. Dargestellt ist das Kinesinmolekül in einem Zustand seines enzymatischen Zyklus vor dem Erreichen der beidköpfig gebundenen Konformation. Der Neck-Linker des hinteren Kopfes ist an die Motordomäne gedockt. Der ungebundene Kopf sucht angetrieben von der

Brownschen Molekularbewegung nach der nächsten freien Bindungsstelle (Carter und Cross, 2005). Sobald das Motorprotein einer nennenswerten Kraft ausgesetzt ist, werden alle flexiblen Elemente zwischen der Kugel und dem auf der Oberfläche angeordneten Mikrotubulus gestreckt. Zum Erreichen des beidköpfig gebundenen Zustands muss sich das Protein die notwendige Reichweite aus einer zusätzlichen Ausdehnung der Nackenstruktur „borgen“. Dies ist energetisch umso kostspieliger und damit umso langsamer, je größer die Federhärte der dafür zu dehnenden Feder, in diesem Fall die des Coiled-Coils im Kinesinnacken, ist.

Wie die Kraft-Geschwindigkeits Relation (Abbildung 3.3) zeigt, ist die Geschwindigkeit des NcKin-SN im Bereich niedriger Kraft nicht von der des NcKin-1 Wildtyps zu unterscheiden. In diesem Kraftbereich genügt offensichtlich alleine die Reichweite der Neck-Linker, um ein rasches Anbinden der vorderen Motordomäne an den Mikrotubulus zu ermöglichen. Bei höheren Lasten fällt die durchschnittliche Geschwindigkeit des NcKin-SN Konstrukts deutlich schneller ab als die Geschwindigkeit des NcKin-1 Wildtyps. In diesem Kraftbereich ist zum Erreichen der nächsten Bindungsstelle zusätzlich zu den gestreckten Neck-Linkern eine axiale Ausdehnung des Nacken Coiled-Coils notwendig. Für eine Ausdehnung des NcKin-SN Nackens muss dabei mehr Energie aufgewendet werden als für eine entsprechende Ausdehnung des nativen NcKin-1 Nackens. Das NcKin-SN Molekül braucht mehr Zeit bis zu einem erfolgreichen Anbinden des vorderen Kopfes. Die mittlere Geschwindigkeit des NcKin-SN Motors unter Last wird verringert. Da das Kinesinmolekül mit einem steiferen Nacken dem Modell zufolge darüber hinaus gezwungen ist, mehr Zeit in seiner einköpfig gebundenen Konformation zu verbringen, erhöht sich auch die Chance für die Terminierung eines Laufs durch Ablösen des Motors aus diesem Zustand. Dies drückt sich in der beim NcKin-SN beobachteten verminderten Prozessivität aus.

In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass in dem beschriebenen Modell die axiale Flexibilität des Nacken Coiled-Coils und nicht etwa ein aneinander Entlanggleiten der beiden Stränge (Asbury et al., 2003) als Quelle der Elastizität angesehen wird, die es dem Motor ermöglicht, sich auch unter Last effizient fortzubewegen. Anhand der vorliegenden Daten kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Torsionssteifigkeit des Kinesinnackens (Asbury et al., 2003) eine Rolle für die Bewegung des Moleküls unter Last spielt. Da aber in einer helikalen Struktur wie der Kinesin Nackendomäne Streckung und Torsion möglicherweise gekoppelt sind, ergibt dies keine neuen Möglichkeiten der Interpretation der vorliegenden Einzelmoleküldaten.

Das vorgeschlagene Modell wird auch durch die Daten der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kinetik des NcKin-P342C Konstrukts unterstützt. Bei diesem Konstrukt ist kein signifikanter Unterschied zwischen der oxidierten und der reduzierten Form des Proteins erkennbar. Da die axiale Flexibilität der Coiled-Coil des

Kinesinnackens durch die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen den beiden α -Helices nicht in nennenswerter Weise beeinflusst wird, ist bei NcKin-P342C Motoren auch keine signifikant erhöhte Kraftsensitivität zu erwarten. Die stabile EIEALKA-Sequenz im NcKin-SN Nacken dagegen weist eine signifikant erhöhte axiale Steifigkeit auf und führt deshalb zu den beobachteten Defiziten des NcKin-SN Motors unter hohen Kräften. Weiterhin liegen von Tomishige et al. Messungen an humanen Kinesinkonstrukten mit kovalent verbundenen Nackendomänen vor, die ebenfalls keinen Unterschied in der Geschwindigkeit zwischen oxidiertem und reduzierter Form des Motorproteins und nur minimale Unterschiede in der Prozessivität belegen (Tomishige und Vale, 2000).

4.1.4 Der doppelte Rückwärtsschritt des NcKin-1 Wildtyps

Wie in Kapitel 3.1.6 beschrieben, zeigen einzelne NcKin-1 Wildtyp Motoren bei Läufen gegen eine statische Laserfalle charakteristische Rückwärtsschritte einer Länge von 16 nm, deren Häufigkeit mit sinkender ATP-Konzentration leicht zuzunehmen scheint (siehe Tabelle 3.2). Weder das NcKin-SN noch das NcKin-P342C oder das chimäre NcKin-1/3 Konstrukt zeigen, obwohl sie ebenfalls die Motordomänen und Neck-Linker Sequenzen des NcKin-1 Wildtyps besitzen, ein vergleichbares Verhalten. Zwar kommt es auch bei diesen Motoren zu vereinzelt Rückwärtsschritten (siehe Abbildung 3.11 und 3.19), jedoch erfolgen hier nach fast allen Rückwärtsschritt-Ereignissen erneute Schritte in Vorwärtsrichtung, ohne dass hierfür ein vorheriges Ablösen des Motors vom Mikrotubulus nötig wäre. Bei NcKin-1 Wildtyp Motoren erfolgt dagegen nach einem einfachen Rückwärtsschritt-Ereignis in den meisten Fällen kein erneuter Schritt in Vorwärtsrichtung. Nach einem doppelten Rückwärtsschritt konnten beim NcKin-1 Wildtyp in keinem Fall erneute Schritte in Vorwärtsrichtung beobachtet werden. Erst nach einem vollständigen Ablösen und Wiederanbinden waren erneute Schritte in Vorwärtsrichtung möglich. Die Häufigkeit der einzelnen 8 nm Rückwärtsschritte liegt bei allen Konstrukten zwischen 5 und 15%, wobei NcKin-1 Wildtyp Motoren eine leicht erhöhte Häufigkeit aufzuweisen scheinen. Da alle Konstrukte über identische Motordomänen und Neck-Linker Sequenzen verfügen, ist anzunehmen, dass bei allen Konstrukten ein identischer Mechanismus zumindest für einen Teil der einfachen Rückwärtsschritte verantwortlich ist.

In dem Modell der Kinesinbewegung von Carter und Cross (Carter und Cross, 2005) wird angenommen, dass ein Vorwärtsschritt im Wesentlichen durch die diffusive Suche der freien Motordomäne nach der nächsten Bindungsstelle bestimmt ist. Unter Abwesenheit externer Kräfte gibt das Docken des Neck-Linkers an die Motordomäne des gebundenen Kopfes der diffusiven Suche eine Vorzugsrichtung, und der freie Kopf bindet an die nächste erreichbare Bindungsstelle in Plus-Richtung des Mikrotubulus. Hohe Kräfte entgegen der natürlichen Laufrichtung des Moleküls

kehren die Vorzugsrichtung um, und der freie Kopf bindet unter Abgabe seines Phosphats an die nächste erreichbare Bindungsstelle in Minus-Richtung des Mikrotubulus. Nachdem die vordere Motordomäne ebenfalls ihr Phosphat abgegeben hat, kann sie vom Mikrotubulus ablösen, und das Molekül hat seinen Schwerpunkt um 8 nm entgegen seiner natürlichen Laufrichtung verlagert. Durch Binden eines weiteren Moleküls ATP sind erneute Schritte in Vorwärtsrichtung möglich.

Das Carter/Cross-Modell vermag die bei allen Konstrukten beobachteten einfachen 8 nm Rückwärtsschritte zu erklären. Insbesondere erlaubt es nach einfachen Rückwärtsschritten erneute Schritte in Vorwärtsrichtung, wie sie bei allen hier untersuchten Konstrukten beobachtet wurden. Ein Beispiel findet sich in Abbildung 3.11.

Nach den doppelten Rückwärtsschritten des NcKin-1 Wildtyps konnte dagegen in keinem Fall ein erneuter Schritt in Vorwärtsrichtung beobachtet werden. Dies schließt das Carter/Cross-Modell als Erklärung aus, da sich hier das Molekül nach einem doppelten Rückwärtsschritt wieder in seinem Ausgangszustand befindet und erneute Schritte in Vorwärtsrichtung möglich sein sollten. Tabelle 3.2 zeigt, dass bei NcKin-1 Wildtyp Molekülen auch die Wahrscheinlichkeit für einfache Rückwärtsschritte im Vergleich zu den anderen Konstrukten leicht erhöht scheint. Dies deutet darauf hin, dass bei diesem Konstrukt neben den einfachen Rückwärtsschritten nach dem oben beschriebenen Carter/Cross-Modell möglicherweise noch ein weiterer Prozess existiert, der zu einfachen Rückwärtsschritten führt. In den folgenden Abschnitten werden mögliche Modelle zur Erklärung der doppelten Rückwärtsschritt-Ereignisse und der größeren Häufigkeit einzelner Rückwärtsschritte des NcKin-1 Wildtyps vorgestellt und diskutiert.

Das Ablösen und Wiederanbinden des Kinesinmotors

Die einfachste Erklärung für das beobachtete Phänomen wäre ein kurzzeitiges, vollständiges Ablösen des Motormoleküls vom Mikrotubulus und ein sofort darauf erfolgendes Wiederanbinden an eine 16 nm weiter in Minus-Richtung des Mikrotubulus gelegene Bindungsstelle. Dieses Modell würde zwar die kurze Dauer des Schrittereignisses und das teilweise Fehlen von Zwischenschritten erklären, jedoch wäre zu erwarten, dass ein Wiederanbinden des Motors an verschiedene, 8 nm auseinander liegende Bindungsstellen am Mikrotubulus möglich sein sollte. Die Länge der Rückwärtsschritte sollte daher Vielfache von 8 nm betragen und im Wesentlichen zufällig verteilt sein. Beobachtet werden jedoch fast ausschließlich Schrittweiten von 8 und 16 nm. Darüber hinaus liefert dieses Modell keinerlei Erklärung dafür, warum das Phänomen der 16 nm Rückwärtsschritte fast ausschließlich bei NcKin-1 Wildtyp Motoren auftritt und nach dem Rückwärtsschritt keine erneuten Schritte in Vorwärtsrichtung zu beobachten sind. Bei den typischen Federhärten von 40 – 60 fN/nm wird durch einen 16 nm Rückwärtsschritt die auf den Motor

wirkende Kraft um etwa 0,6 – 1,0 pN verringert, so dass erneute Schritte in Vorwärtsrichtung wieder möglich sein sollten. Da dies nicht geschieht, ist davon auszugehen, dass sich der Kinesinmotor nach dem Rückwärtsschritt-Ereignis in einem Nukleotidzustand befindet, der ein Binden eines neuen Moleküls ATP und damit einen erneuten Schritt in Vorwärtsrichtung unmöglich macht.

Modell I: Vorzeitiges Binden eines Moleküls ATP

Abbildung 4.3 zeigt ein Modell, das dem beobachteten Fehlen erneuter Vorwärtsschritte nach den 16 nm Rückwärtsschritt-Ereignissen Rechnung trägt. Dargestellt ist ein Kinesinmolekül, dessen beide Motordomänen zur Unterscheidung in gelb und orange gezeichnet sind. Auf den Motor wirkt eine Kraft entgegen seiner natürlichen Laufrichtung. Befindet sich das Molekül in seinem beidköpfig gebundenen Zustand (oben, zweite Darstellung von links), so ist der Neck-Linker der in Bewegungsrichtung hinteren Motordomäne an diese gedockt, das gebundene ATP ist bereits zu ADP und Phosphat hydrolysiert. Wie bereits in Kapitel 1.4.6 beschrieben, wird davon ausgegangen, dass eine interne Spannung zwischen den beiden Motordomänen, vermittelt durch die Coiled-Coil Struktur des Kinesinnackens, das Anbinden eines weiteren Moleküls ATP an die in Bewegungsrichtung vordere Motordomäne verhindert, bis der hintere Kopf sein Phosphat abgeben und sich vom Mikrotubulus ablösen konnte. Funktioniert dieser Prozess bei NcKin-1 Wildtyp Molekülen nur unzureichend, so kann ein weiteres Molekül ATP an den in Bewegungsrichtung vorderen Kopf binden. Da der hintere Kopf noch nicht vom Mikrotubulus abdissoziieren konnte, ist ein Docken des Neck-Linkers an die vordere Motordomäne nicht möglich. Das frisch angebundene ATP wird rasch zu ADP und Phosphat hydrolysiert.

Für den weiteren Ablauf ist entscheidend, welcher der beiden Köpfe zuerst sein Phosphat verliert. Erfolgt zuerst die Abgabe des Phosphats vom vorderen Kopf (in Abbildung 4.3 nicht dargestellt), so geht dieser in den schwach bindenden ADP-Zustand über und wird durch die auf ihn wirkende Kraft sofort vom Mikrotubulus abgelöst. Die nun auf die noch angebundene, orangefarbene Motordomäne wirkende Kraft führt zu einem Entdocken des Neck-Linkers und das Motormolekül erfährt eine Verlagerung seines Schwerpunkts um 8 nm entgegen seiner natürlichen Bewegungsrichtung. Die gebundene Motordomäne befindet sich noch immer im ADP/P-Zustand, so dass kein erneutes Anbinden eines Moleküls ATP und kein weiterer Schritt in Vorwärtsrichtung erfolgen kann. Nach Abgabe ihres Phosphats geht auch diese Motordomäne in den schwach gebundenen ADP-Zustand über und der Motor verliert seinen Kontakt zum Mikrotubulus.

Erfolgt dagegen, möglicherweise begünstigt durch die intramolekulare Spannung (Cross et al., 2000), zuerst die Abgabe des Phosphats von der hinteren, orangefarbenen dargestellten Motordomäne, so kann es zu zwei rasch aufeinander folgenden

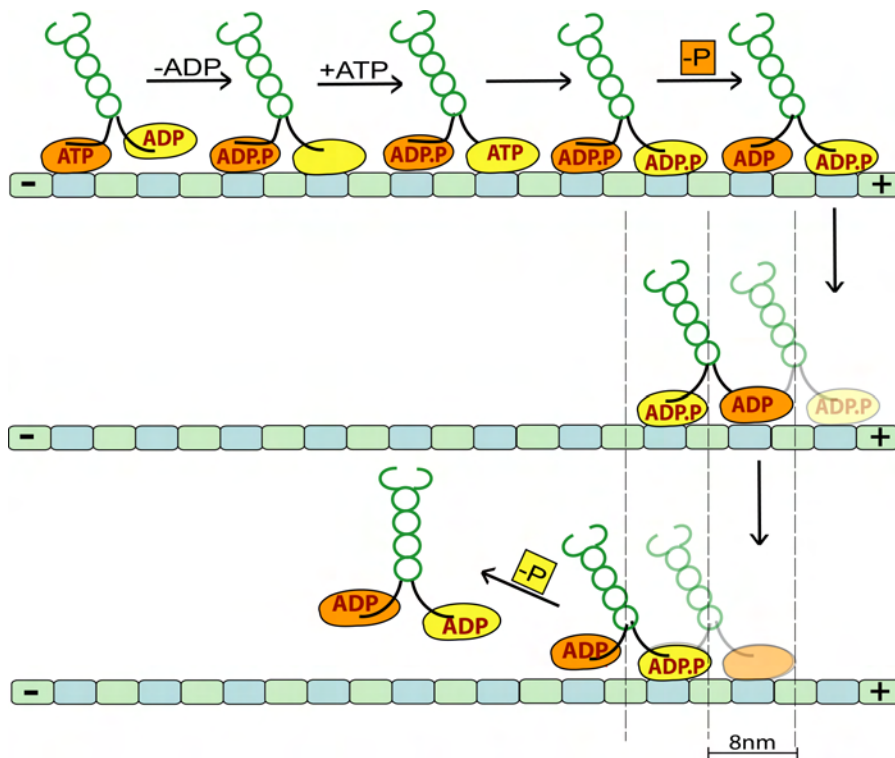


Abbildung 4.3: Dargestellt ist ein Kinesinmolekül, dessen beide Motordomänen zur Unterscheidung in gelb und orange gezeichnet sind. Auf den Motor wirkt eine Kraft entgegen seiner natürlichen Laufrichtung. Befindet sich das Molekül in seinem beidköpfig gebundenen Zustand (oben, zweite Darstellung von links), so ist der Neck-Linker der hinteren Motordomäne an diese gedockt, das ATP des hinteren Kopfes ist bereits zu ADP und Phosphat hydrolysiert. Im Falle einer ungenügenden Übertragung der intramolekularen Spannung zur vorderen Motordomäne (siehe Text) kann ein Molekül ATP an diese binden. Da der hintere Kopf noch an den Mikrotubulus angehängt ist, ist ein Andocken des Neck-Linkers an den vorderen Kopf nicht möglich und das frisch gebundene ATP wird zu ADP und Phosphat hydrolysiert. Erfolgt in diesem beidköpfig gebundenen Zustand mit beiden Motordomänen im ADP/P-Zustand zuerst die Abgabe des Phosphats des hinteren, orangefarbenen Kopfes, so kann es zu einem doppelten Rückwärtsschritt kommen. Auf die hintere, gelbe Motordomäne wirkt keine Kraft, so dass die Ablösung dieser Domäne vom Mikrotubulus nur langsam erfolgt (siehe Text). Nimmt man an, dass die Affinität der Motordomäne zum Mikrotubulus im ADP/P-Zustand geringer ist als im nukleotidfreien- oder ATP-Zustand, so kann die auf den vorderen Kopf wirkende Kraft zu dessen Ablösen vom Mikrotubulus führen. Der abgelöste Kopf befindet sich noch immer im ADP/P-Zustand und kann als hinterer Kopf erneut an den Mikrotubulus binden. Der Schwerpunkt des Motors hat sich um 8 nm nach hinten verlagert. Die nun auf den vorderen, schwach gebundenen Kopf wirkende Kraft führt zu dessen sofortigem Ablösen vom Mikrotubulus, und das Molekül erfährt erneut eine Verlagerung seines Schwerpunkts um 8 nm entgegen seiner natürlichen Laufrichtung. Da sich die am Mikrotubulus verbleibende Motordomäne noch immer im ADP/P-Zustand befindet, ist kein erneutes Binden eines Moleküls ATP und damit auch kein weiterer Schritt in Vorwärtsrichtung möglich.

Rückwärtsschritten des Motors kommen. Auf die hintere Motordomäne wirkt keine Kraft, so dass die Ablösung dieser Domäne vom Mikrotubulus nur langsam erfolgt (Crevel et al., 1999), während die gesamte am Molekül anliegende Kraft auf die in Bewegungsrichtung vordere, gelbe Motordomäne wirkt. Nimmt man an, dass die Motordomänen des Kinesins im ADP/P-Zustand eine geringere Affinität zum Mikrotubulus aufweisen als im stark bindenden nukleotidfreien- oder ATP-Zustand, so wird ein rein mechanisches Ablösen der vorderen Motordomäne durch die auf sie wirkende Kraft wahrscheinlicher. Die abgelöste Motordomäne wird nach hinten gezogen und kann, da sie sich noch immer im ADP/P-Zustand befindet, sofort wieder an den Mikrotubulus anbinden. Der Schwerpunkt des Moleküls hat sich um 8 nm entgegen seiner natürlichen Bewegungsrichtung verlagert. Die gesamte anliegende Kraft wirkt nun auf die vordere, schwach gebundene Motordomäne und führt zu deren sofortigem Ablösen vom Mikrotubulus. Durch die auf den Motor wirkende Kraft verlagert sich dessen Schwerpunkt um weitere 8 nm nach hinten. Ein erneutes Anbinden eines Moleküls ATP und ein erneuter Vorwärtsschritt ist nicht möglich, da sich die an den Mikrotubulus gebundene Motordomäne noch immer im ADP/P-Zustand befindet. Nach einiger Zeit wird auch diese Motordomäne ihr Phosphat verlieren und in den schwach bindenden ADP-Zustand übergehen, was zum Ablösen des Motormoleküls und zur Terminierung des prozessiven Laufs führt.

Das beschriebene Modell setzt voraus, dass eine Kinesin Motordomäne im ADP/P-Zustand schwächer an den Mikrotubulus bindet, als dies im nukleotidfreien- oder ATP-Zustand der Fall ist. In der Literatur gibt es nur wenige Quellen zur Bindungsaffinität des Kinesinmotors im ADP/P-Zustand. Untersuchungen am konventionellen Rattenkinesin ergeben für die Bindungsaffinität des Kinesinmotors zu Mikrotubuli in dem zum ADP/P-Zustand analogen ADP/AlF₄-Zustand einen K_d -Wert von 1,79 μM , während sich für den AMP-PNP¹ und den nukleotidfreien Zustand K_d -Werte von 0,27 μM , beziehungsweise 0,62 μM ergeben (Crevel et al., 1996). Der Kinesinmotor hätte demnach im ADP/P-Zustand in der Tat eine geringere Affinität zu Mikrotubuli als im nukleotidfreien- oder ATP-Zustand. Die Rate für das Ablösen einer Kinesin Motordomäne im ADP/P-Zustand ohne anliegende Kraft wird für das konventionelle Kinesin aus *Drosophila melanogaster* in (Hancock und Howard, 1999) zu $K_{off,ADP/P} \approx 4 \text{ s}^{-1}$ abgeschätzt. Bewegt sich die entsprechende Rate des NcKin-1 in der gleichen Größenordnung, so erscheint ein Ablösen des vorderen Kopfes des beidköpfig gebundenen NcKin-1 unter Kräften nahe der vom Motorprotein produzierten Maximalkraft plausibel.

Darüber hinaus wird in dem vorgeschlagenen Modell angenommen, dass sich die NcKin-1 Motordomäne im schwach gebundenen ADP-Zustand nicht spontan vom

¹AMP-PNP ist ein nicht-hydrolysierbares ATP Analogon, das zu einer festen Anbindung des Kinesinmotors an Mikrotubuli führt.

Mikrotubulus ablöst, solange auf sie keine Kraft wirkt. Dies ist im Einklang mit den Messungen von Crevel et al. (Crevel et al., 1999), die im Gegensatz zum entsprechenden Vorgang bei tierischen Kinesinen belegen, dass ein Ablösen einer NcKin-1 Motordomäne im ADP-Zustand spontan mit einer Rate von höchstens $4,5 \text{ s}^{-1}$ erfolgt.

Die während des doppelten Rückwärtsschritts ablaufenden Vorgänge sind rein mechanischer Natur. Insbesondere ist kein erneutes Binden eines Moleküls ATP und auch keine Abgabe von ADP limitierend, so dass eine Zeitdauer von 1 ms für den gesamten Ablauf des Vorgangs möglich erscheint. Als Zwischenzustand des doppelten Rückwärtsschritt-Ereignisses existiert ein Zustand, in dem das Molekül nur durch eine Motordomäne im schwach bindenden ADP-Zustand am Mikrotubulus fixiert ist. Bindet die hintere, gelb dargestellte Motordomäne im ADP/P-Zustand nicht schnell genug wieder an den Mikrotubulus an, so erfolgt aus diesem Zustand ein Ablösen des Motormoleküls und eine Terminierung des Laufs. Dies erklärt einerseits den extrem schnellen Ablauf eines doppelten Rückwärtsschritt-Ereignisses und eröffnet andererseits einen weiteren Weg zur Terminierung eines prozessiven Laufs nach nur einem Rückwärtsschritt von 8 nm Länge. Zusammen mit den einfachen Rückwärtsschritten nach dem Carter/Cross-Modell (siehe oben) und der Möglichkeit des Ablösens des Kinesinmoleküls nach einem einfachen Rückwärtsschritt durch Abgabe des Phosphats vom vorderen Kopf des beidköpfig gebundenen ADP/P-Zustands (siehe Abbildung 4.3) existiert damit ein dritter Mechanismus, der zu einzelnen 8 nm Rückwärtsschritten führt. Dies spiegelt sich möglicherweise in der leicht erhöhten Wahrscheinlichkeit für einfache Rückwärtsschritte des NcKin-1 Wildtyps (siehe Tabelle 3.2) wider. Nicht befriedigend zu erklären vermag das vorgeschlagene Modell dagegen die Beobachtung einer mit abnehmender ATP-Konzentration leicht steigenden Häufigkeit doppelter Rückwärtsschritte. Nach dem vorgeschlagenen Modell wird angenommen, dass ein fälschlicherweise an die vordere Motordomäne des beidköpfig gebundenen Kinesins anbindendes Molekül ATP zu der Kaskade aus zwei Rückwärtsschritten führt. Unter limitierenden ATP-Konzentrationen sollte dieser Vorgang weniger häufig ablaufen, als dies bei sättigendem ATP der Fall ist, wodurch auch die Wahrscheinlichkeit der doppelten Rückwärtsschritte mit abnehmender ATP-Konzentration geringer werden sollte.

Modell II: Doppelte Rückwärtsschritte mit ADP-Bindeereignis

Abbildung 4.4 zeigt ein Modell, das auch der größeren Häufigkeit von doppelten Rückwärtsschritt-Ereignissen unter limitierenden ATP-Konzentrationen gerecht wird, jedoch für ein doppeltes Rückwärtsschritt-Ereignis das Binden eines Moleküls ADP erfordert. Gezeigt wird wieder der Kinesinmotor mit den beiden farblich gekennzeichneten Motordomänen. Unter limitierenden ATP-Konzentrationen verharrt der Motor in seinem Ausgangszustand und erwartet das Binden eines neuen Moleküls

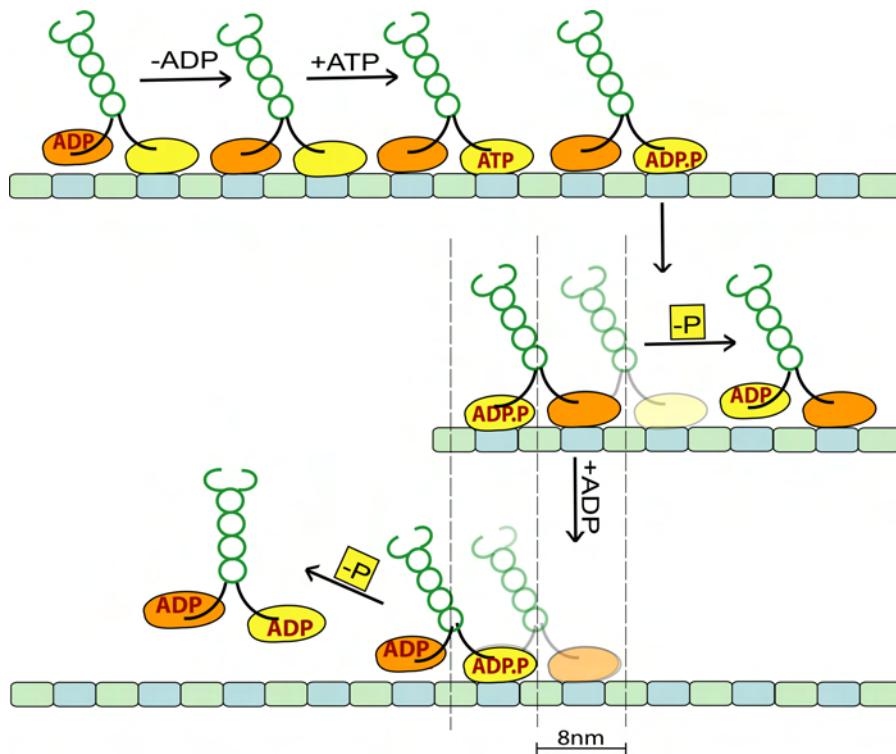


Abbildung 4.4: Gezeigt ist ein Kinesinmolekül unter dem Einfluss einer Kraft entgegen seiner natürlichen Bewegungsrichtung, dessen beide Motordomänen zur Unterscheidung in gelb und orange dargestellt sind. Unter limitierenden ATP-Konzentrationen verweilt das Motormolekül im einköpfig gebundenen Zustand und erwartet das Binden eines Moleküls ATP. Findet dieser Prozess nicht rechtzeitig statt, so kann der Motor unter Abgabe des ADPs vom hinteren Kopf in einen beidköpfig gebundenen, nukleotidfreien Zustand übergehen. Die Neck-Linker beider Motordomänen befinden sich in einem ungedockten Zustand, so dass ein Molekül ATP an die vordere Motordomäne binden kann. Wegen des beidköpfig gebundenen Zustands ist ein Docken des Neck-Linkers an die vordere Motordomäne nicht möglich und das frisch gebundene ATP wird zu ADP und Phosphat hydrolysiert. Nimmt man wie bei Modell I eine geringere Mikrotubuliaffinität der Motordomäne im ADP/P-Zustand an, so kann der in Bewegungsrichtung vordere Kopf durch die anliegende Kraft vom Mikrotubulus abgezogen werden und hinter dem noch angebotenen, nukleotidfreien Kopf an den Mikrotubulus zurückbinden. Das Motormolekül hat eine Verlagerung seines Schwerpunkts um 8 nm entgegen seiner natürlichen Laufrichtung erfahren. Erfolgt aus diesem Zustand zuerst ein Ablösen des Phosphats der hinteren Motordomäne, so löst sich diese vom Mikrotubulus ab und der Motor befindet sich wieder in seinem Ausgangszustand, weitere Vorwärtsschritte sind möglich. Bindet dagegen ein Molekül ADP an die vordere, orange dargestellte Motordomäne, so löst diese sich vom Mikrotubulus ab und das Molekül erfährt eine weitere 8 nm Schwerpunktsverlagerung entgegen seiner natürlichen Bewegungsrichtung. Da sich die weiterhin an den Mikrotubulus gebundene Motordomäne noch immer im ADP/P-Zustand befindet, ist ein Anbinden eines weiteren Moleküls ATP und damit ein erneuter Schritt in Vorwärtsrichtung nicht möglich. Nach Abgabe des Phosphats dieser Domäne löst sich der Motor schließlich vom Mikrotubulus ab.

ATP. Dauert dieser Prozess zu lange, so kann die in Bewegungsrichtung hintere Motordomäne unter Abgabe eines ADPs wieder an den Mikrotubulus anbinden. Der Motor befindet sich erneut in einem beidköpfig gebundenen Zustand, jedoch mit zwei nukleotidfreien Motordomänen. Da der hintere Kopf nun kein Nukleotid mehr trägt, befindet sich der Neck-Linker nicht mehr im gedockten Zustand, die zwischen den beiden Motordomänen bestehende intramolekulare Spannung ändert sich. Kann in diesem Zustand ein Molekül ATP an den in Bewegungsrichtung vorderen Kopf anbinden, so ist ein Docken des Neck-Linkers wegen der beidköpfig gebundenen Konformation nicht möglich. Das ATP wird zu ADP und Phosphat hydrolysiert. Nimmt man wie bei Modell I eine schwächer ausgeprägte Mikrotubuliaffinität des ADP/P-Zustands an, so kann der vordere Kopf durch die auf ihn wirkende Kraft vom Mikrotubulus entbinden und an eine 16 nm weiter in Minus-Richtung gelegene Bindungsstelle neu anbinden. Der Schwerpunkt des Motormoleküls verlagert sich durch diesen Vorgang um 8 nm entgegen der natürlichen Bewegungsrichtung des Motors. Für den weiteren Ablauf der Bewegung ist entscheidend, ob zuerst das Phosphat der hinteren Motordomäne abgegeben werden kann oder ob ein Molekül ADP an die vordere Motordomäne anbindet. Kommt es zu einem ADP-Bindeereignis, so löst sich die vordere Motordomäne vom Mikrotubulus ab und das Molekül erfährt eine weitere 8 nm Schwerpunktsverlagerung entgegen seiner natürlichen Bewegungsrichtung. Da sich der am Mikrotubulus gebundene Kopf, wie auch schon beim ersten Modell, im ADP/P-Zustand befindet, ist kein erneutes Anbinden eines Moleküls ATP und kein erneuter Vorwärtsschritt möglich. Durch Abgabe des Phosphats geht auch der an den Mikrotubulus gebundene Kopf in den schwach bindenden ADP-Zustand über und das Motormolekül löst sich vom Mikrotubulus ab.

Erfolgt dagegen nach dem ersten Rückwärtsschritt zuerst die Abgabe des Phosphats, so löst sich die hintere Motordomäne vom Mikrotubulus ab und das Molekül befindet sich wieder in seinem Ausgangszustand. Durch das Binden eines Moleküls ATP kann ein weiterer Schritt in Vorwärtsrichtung eingeleitet werden.

Wie schon das oben beschriebene Modell I setzt auch Modell II für den doppelten Rückwärtsschritt des NcKin-1 Motors voraus, dass die NcKin-1 Motordomäne im ADP/P-Zustand eine geringere Mikrotubuliaffinität aufweist als im nukleotidfreien oder ATP-Zustand und durch die von der Falle ausgeübte Kraft vom Mikrotubulus entbunden werden kann. Das Modell erklärt sowohl das Fehlen erneuter Schritte in Vorwärtsrichtung nach doppelten Rückwärtsschritt-Ereignissen als auch das häufigere Auftreten von Rückwärtsschritten unter limitierenden ATP-Konzentrationen. Anders als bei Modell I ist für einen doppelten Rückwärtsschritt allerdings das Binden eines Moleküls ADP an die orangefarben dargestellte Motordomäne notwendig. Wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, liegen NcKin-1 Wildtyp und NcKin-SN Konstrukte nach ihrer Aufreinigung in einem Puffer vor, der 10 mM ATP enthält.

Nimmt man an, dass das gesamte ATP im Laufe der Zeit von den Kinesinmolekülen in ADP und Phosphat umgesetzt wurde, so wäre präparationsbedingt eine ADP-Konzentration von maximal $0,1 \mu\text{M}$ im Endvolumen zu erwarten. Ob bei dieser geringen Konzentration ein Binden eines Moleküls ADP an die vordere Motordomäne des Kinesins nach dem ersten Rückwärtsschritt schnell genug erfolgen kann, um der mittleren Zeitdauer von etwa einer Millisekunde (siehe Kapitel 3.1.6) für ein komplettes Rückwärtsschritt-Ereignis gerecht zu werden, lässt sich wie folgt abschätzen:

Betrachtet man eine Kinesin Motordomäne vereinfacht als Kugel mit einem Radius a und nimmt ferner an, dass alle ADP Moleküle, die bei $r = a$ auf die Kugel treffen vollständig von dieser absorbiert werden, so ergibt sich im Gleichgewichtsfall die Konzentration c des ADPs bei $r = a$ zu $c_a = 0$. Q sei die konstante Rate der ADP-Aufnahme durch die Kugel. Der totale Fluss der ADP Moleküle durch jede sphärische Hülle um die Kugel muss damit ebenfalls gleich Q sein. Für jeden Radius r ergibt sich damit aus dem Fick'schen Gesetz

$$Q = -4\pi r^2 D \frac{dc}{dr} = \text{const} \quad (4.1)$$

oder

$$\frac{dc}{dr} = -\frac{Q}{4\pi D} \frac{1}{r^2}. \quad (4.2)$$

Integriert man diesen Ausdruck in den entsprechenden Grenzen

$$\int_a^\infty dc = -\frac{Q}{4\pi D} \int_a^\infty \frac{1}{r^2} dr, \quad (4.3)$$

so erhält man

$$c - c_a = -\frac{Q}{4\pi D} \frac{1}{a}. \quad (4.4)$$

Da wegen der Randbedingung $c_a = 0$ sein muss, erhält man

$$Q = -4\pi c D a. \quad (4.5)$$

Für eine Kinesin Motordomäne mit einem angenommenen Radius von $a = 5 \text{ nm}$ in Gegenwart von $0,1 \mu\text{M}$ ADP und einem Diffusionskoeffizienten $D = 0,33 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ für ADP in Wasser bei 20°C (de Graaf et al., 2000) ergibt sich die Rate Q zu

$$Q \approx 1,2 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}. \quad (4.6)$$

Die Rate Q ist damit nur unter Annahme einer 100%igen Bindungswahrscheinlichkeit bei einem Zusammentreffen von ADP Molekül und Kinesin Motordomäne groß genug, um die kurze mittlere Dauer eines 16 nm Rückwärtsschritt-Ereignisses von $\approx 1 \text{ ms}$ zu erklären. Da die Nukleotidbindungstasche im Vergleich zur gesamten Oberfläche einer Kinesin Motordomäne klein ist, ist anzunehmen, dass die effektive Bindungsrate Q_{eff} deutlich unter dem diffusionslimitierten Maximum Q liegt. Modell II erscheint daher zur Erklärung der doppelten Rückwärtsschritte ungeeignet.

Folgerungen aus dem vorgeschlagenen Modell I

Wie in Kapitel 3.1.6 beschrieben, zeigen fast ausschließlich NcKin-1 Wildtyp Moleküle doppelte Rückwärtsschritte. Bei Modell I führt das Binden eines Moleküls ATP an die vordere Motordomäne des beidköpfig gebundenen Moleküls zu den beobachteten doppelten Rückwärtsschritt-Ereignissen. Nach gegenwärtiger Meinung wird dieser Vorgang durch die im beidköpfig gebundenen Zustand existierende und über die Nacken Coiled-Coil vermittelte intramolekulare Spannung verhindert. Das auffällig häufige Auftreten der Rückwärtsschritte beim NcKin-1 Wildtyp würde bedeuten, dass die native NcKin-1 Nacken Coiled-Coil eine bestehende intramolekulare Spannung nur unzureichend an die in Bewegungsrichtung vordere Motordomäne weitergibt, während dies bei Mutanten, wie beispielsweise dem NcKin-SN oder NcKin-P342C im oxidierten Zustand, besser gelingt. Die beobachteten doppelten Rückwärtsschritte wären damit eine Folge der für die Coiled-Coil Bildung nicht-idealen Aminosäuresequenz insbesondere in der ersten N-terminalen Heptade der NcKin-1 Nackendomäne.

4.2 Das NcKin-1 in der Dreikugelanordnung

Inwieweit hängt die mit einer optischen Falle bestimmte Maximalkraft eines molekularen Motors von der Messgeometrie ab? Um diese Frage zu beantworten, wurde die von einzelnen NcKin-1 Molekülen produzierte Kraft in der in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Dreikugelanordnung gemessen. Wie in Kapitel 3.3 beschrieben, ist die mit dieser Methode bestimmte mittlere Maximalkraft des NcKin-1 Motors mit $(4,1 \pm 0,1)$ pN nicht von der mittels der klassischen Einzelkugelmethode gemessenen Maximalkraft (siehe Kapitel 3.1.5) zu unterscheiden. Abbildung 4.5 zeigt die beiden Messmethoden im Vergleich. Abgebildet ist jeweils der Komplex aus Kugel, Motormolekül und Mikrotubulus in der (x, z) -Ebene. Bei der klassischen Einzelkugelmethode (A) wird die den Motor tragende Kugel im Lasergradienten einer optischen Falle festgehalten und ist frei rotierbar. Die Größe Δz beschreibt die Distanz zwischen der Oberseite des Mikrotubulus und dem nächstgelegenen Punkt der Kugeloberfläche. Diese ist im Wesentlichen bestimmt durch den Mittelwert der thermischen Fluktuation der Kugel in z -Richtung unter der Randbedingung, dass gerade keine Berührung mehr zwischen Kugel und Mikrotubulus stattfindet. Folgt man der Argumentation von (Fisher und Kim, 2005) und nimmt an, dass die Kraft senkrecht zur Glasoberfläche F_z von F_x abhängt, also $F_z = F_z(F_x)$ ist, so ergibt sich aus der Geometrie der Anordnung der einfachste Ansatz

$$F_z = -F_x \cot \Phi, \quad (4.7)$$

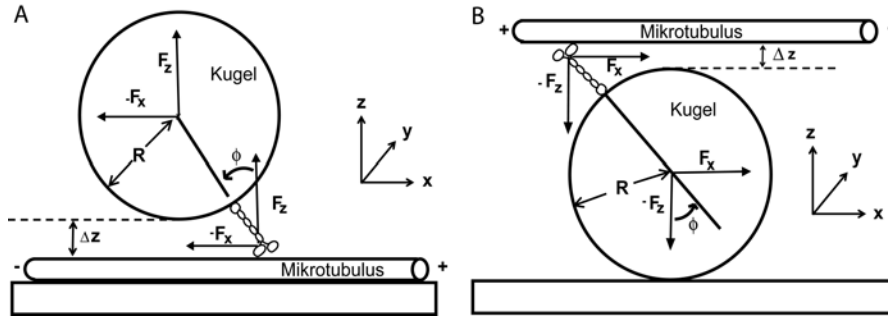


Abbildung 4.5: Kräfteverhältnisse bei den beiden alternativen Versuchsanordnungen: Abgebildet ist jeweils die Kugel mit Radius R sowie ein Motormolekül mit der effektiven Länge l_0 und dem Neigungswinkel Φ , das die gesamte vektorielle Kraft $\vec{F} = (F_x, F_y, F_z)$ zum Ort seiner Bindung an den Mikrotubulus überträgt.

(A) Klassische Einzelkugelmethode: Die den Motor tragende Kugel wird im Lasergradienten einer optischen Falle gehalten und ist frei rotierbar. Abhängig von der Größe der Kugel und der effektiven Länge des Motorproteins stellt sich bei einem laufenden Motor immer ein fester Winkel Φ zwischen dem Kraftvektor F_z und der durch das gestreckte Motorprotein und den Kugelmittelpunkt definierten Achse ein. Nimmt man an, dass $F_z = F_z(F_x)$, so lässt sich das Verhältnis der wirkenden Kräfte durch geometrische Größen ausdrücken (siehe Text).

(B) Dreikugelanordnung: Die den Motor tragende Kugel ist auf dem Deckgläschen fixiert und nicht mehr frei drehbar. Der Motor greift an einen Mikrotubulus an, der zwischen zwei in der Falle festgehaltenen Kugeln eingespannt ist. Da einzelne Kinesinmotoren an beliebigen Stellen und in verschiedenen Orientierungen auf der fixierten Kugel angebunden sein können, stellt die abgebildete Konfiguration lediglich eine von vielen Möglichkeiten dar.

wobei sich die Konstante $\cot \Phi$ aus Abbildung 4.5 mit Hilfe elementarer geometrischer Überlegungen zu

$$\cot \Phi = -\frac{F_z}{F_x} = \frac{R + \Delta z}{\sqrt{(l_0 - \Delta z)(2R + l_0 + \Delta z)}} \quad (4.8)$$

ergibt.

Mit Hilfe von Gleichung 4.8 lässt sich für die Einzelkugelmethode der Winkel Φ zwischen der durch das gestreckte Motormolekül definierten Achse und der Oberflächennormalen abschätzen. Nimmt man für den quadratischen Mittelwert der Fluktuation einer Kugel mit dem Durchmesser $d = 500$ nm in z -Richtung $\Delta z = 5$ nm an (Svoboda und Block, 1994a), so ergibt sich für ein Kinesinmolekül mit einer effektiven Länge $l_0 = 40 - 80$ nm ein Winkel Φ von $28 - 40^\circ$. Alle in dieser Arbeit benutzten Kinesinkonstrukte beruhen auf dem verkürzten NcKin-433 Konstrukt und wurden über das zusätzlich an das Protein angehängte Teilstück der humanen

Stalk-Domäne unspezifisch an die Kugeln angeheftet. Die Größe l_0 der effektiven Länge ist daher nicht exakt zu ermitteln, dürfte sich aber am unteren Ende der oben genannten Spanne bewegen. In Fallenexperimenten wird jeweils nur die Komponente F_x bestimmt. Diese wird nach Gleichung 4.8 umso kleiner ausfallen, je kürzer das eingesetzte Kinesinkonstrukt ist. Betrachtet man die Ergebnisse der Maximalkraftbestimmung einzelner Kinesinmotoren in der Literatur, so finden sich hierfür Belege. Das von Crevel et al. (Crevel et al., 1999) eingesetzte NcKin-460 wurde spezifisch an seinem C-terminalen Ende an Kugeln angebunden und verfügt damit vermutlich über eine ähnliche effektive Länge wie das in dieser Arbeit eingesetzte NcKin-1. Die Maximalkraft des NcKin-460 wird dabei für Messungen mit Kugeln eines Durchmessers $d = 750$ nm mit $4 - 5$ pN angegeben und ist damit ebenfalls vergleichbar zu der in dieser Arbeit ermittelten Maximalkraft des NcKin-1 Wildtyps von $4,1$ pN, während Visscher et al. bei Messungen mit ungekürzten Kinesinkonstrukten und 500 nm Kugeln eine durchschnittliche Maximalkraft von $6,5$ pN ermitteln (Visscher et al., 1999).

Bei Dreikugelexperimenten (siehe Abbildung 4.5 (B)) ist die mit Kinesinmolekülen dekorierte Kugel auf der Glasoberfläche fixiert und nicht mehr frei drehbar. Einzelne Kinesinmoleküle können in verschiedenen Orientierungen auf der fixierten Kugel adsorbiert sein, so dass sich eine Vielzahl möglicher Konformationen ergibt. Abbildung 4.5 (B) stellt lediglich einen Grenzfall dar, der in seiner Geometrie den Verhältnissen bei Einzelkugelexperimenten entspricht.

In FLIC-Messungen² konnte aus Motilitätsassays mit ungekürzten Kinesin-1 Konstrukten der Abstand d zwischen der Oberfläche und den durch die Kinesine transportierten Mikrotubuli zu $d \approx 17$ nm bestimmt werden (Kerssemakers et al., 2006). Die Kinesinmoleküle sind damit nicht zu ihrer vollen Konturlänge gestreckt, sondern liegen in einem teilweise kompakten Zustand vor. Kerssemakers et al. interpretieren in ihrer Arbeit diesen teilweise kompakten Zustand als Folge mehrerer flexibler Elemente in einem Kinesinmolekül, die es dem Motor ermöglichen, je nach der auf ihn wirkenden Kraft unterschiedliche Konformationen einzunehmen. In Fallenexperimenten ist im Gegensatz zu Motilitätsassays davon auszugehen, dass sich die Motormoleküle durch die auf sie wirkende Kraft in einer gestreckten Konformation befinden. Einzelne NcKin-1 Moleküle weisen, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, in Dreikugelexperimenten stets sehr ähnliche Maximalkräfte um 4 pN auf. Ein Einfluss ihrer Position und Orientierung auf der fixierten Kugel ist dabei nicht erkennbar. Die einfachste Erklärung für dieses Verhalten ist, dass die flexiblen Regionen des NcKin-1 Proteins dem Motor die Annahme einer Konformation und Orientierung erlauben, in der eine effektive Vorwärtsbewegung entlang eines Mikrotubulus möglich ist. *In vivo* ist diese Eigenschaft des Kinesin-1 möglicherweise von großer Bedeutung, da sie eine flexible Orientierung der von einem Motormolekül transpor-

²Fluorescence Interference Contrast microscopy

tierten Lasten auf dem Weg durch das mit Zellorganellen dicht besetzte Zytoplasma erlaubt. Darüber hinaus ist bei Motormolekülen mit großer Flexibilität auch dann ein effektiver Transport von Vesikeln oder Zellorganellen möglich, wenn mehrere Kinesinmotoren gleichzeitig an die zu transportierende Last angreifen, ohne dabei speziell angeordnet oder orientiert zu sein.

4.3 Das NcKin-1/3 Chimär

Das Genom des Pilzes *N. crassa* enthält mit dem NcKin-1 sowohl einen typischen Vertreter aus der Gruppe der hochgradig prozessiven Kinesine als auch ein nicht-prozessives Kinesin-3 (Adio et al., 2006). *N. crassa* bietet sich daher als ideales System an, um einen Vergleich von prozessiven und nicht-prozessiven Kinesinen desselben Organismus durchzuführen. *In vivo* sind sowohl das NcKin-1 als auch das NcKin-3 für den langreichweitigen Transport von Vesikeln und Zellorganellen zuständig (Adio et al., 2006). Während vom prozessiven NcKin-1 jedoch theoretisch bereits ein einzelnes, an eine zu transportierende Last angebundenes Protein für dessen prozessiven Transport genügt, müssen im Falle des NcKin-3 mehrere Moleküle kooperativ zusammenarbeiten, um dieselbe Aufgabe zu erfüllen. Da beide Motormoleküle eine ähnliche Domänenstruktur aufweisen (siehe Abbildungen 1.1 und 1.4), eröffnet dies die Möglichkeit, neue Motormoleküle zu generieren, indem strukturelle Untereinheiten beider Motoren gegeneinander ausgetauscht werden. Insbesondere sollte anhand dieses Austausches festgestellt werden können, welche Teile eines Kinesinmotors dessen Prozessivität bedingen.

Am Institut für Zellbiologie der LMU München wurden von Sarah Adio zunächst zwei chimäre Kinesinkonstrukte kloniert und exprimiert. Das als NcKin-1/3 bezeichnete Konstrukt (siehe auch Kapitel 2.3.2) besitzt, wie in Abbildung 1.4 gezeigt, die Motordomänen und den Neck-Linker des prozessiven NcKin-1 (Aminosäuren 1-342), während die Sequenz der Coiled-Coil Dimerisierungsdomäne dem Kinesin-3 entnommen ist. Das komplementäre NcKin-3/1 Konstrukt besitzt die Motordomänen und Neck-Linker des nicht-prozessiven NcKin-3 sowie die Nacken Coiled-Coil des prozessiven Kinesin-1. Zwei zusätzliche chimäre Konstrukte, die die jeweiligen Motordomänen mit den Neck-Linker Sequenzen des jeweils anderen Kinesintyps kombinierten, erwiesen sich als nicht exprimierbar.

4.3.1 Die Prozessivität des chimären NcKin-1/3 Motors

Wie aus den in Kapitel 3.4 gezeigten Daten hervorgeht, ist das chimäre NcKin-1/3 Molekül, bestehend aus den Motordomänen und dem Neck-Linker des NcKin-1 sowie der Dimerisierungsdomäne des NcKin-3, ein prozessiver molekularer Motor. Nicht nur die hohe Duty-Ratio von 63%, sondern insbesondere auch die in

Abbildung 3.15 gezeigten Läufe einzelner, mit einem Farbstoff markierter Kinesinmoleküle sowie die in Abbildung 3.18 gezeigten Einzelschritte des Kinesin-1/3 Konstrukts belegen eindeutig, dass dieses sich prozessiv in diskreten Schritten von 8 nm entlang eines Mikrotubulus bewegt.

Auffälligste Eigenschaft des NcKin-1/3 Chimärs ist dessen stark eingeschränkte Prozessivität. Einzelmolekülmessungen in der optischen Falle zeigen, dass die durchschnittliche Lauflänge des NcKin-1/3 Chimärs selbst unter niedrigen Kräften weniger als 200 nm beträgt (siehe Abbildung 3.16). Anders als beim NcKin-1 Wildtyp, dessen Prozessivität hin zu kleineren Kräften deutlich zunimmt, zeigt das NcKin-1/3 Konstrukt keine derartige Tendenz.

4.3.2 Modelle zur Erklärung der verringerten Prozessivität des NcKin-1/3 Konstrukts

Wie lässt sich die im Vergleich zum NcKin-1 Wildtyp deutlich reduzierte Prozessivität des NcKin-1/3 Chimärs erklären? Die Motordomänen, wie auch die Neck-Linker des chimären Motors, entstammen dem hochprozessiven NcKin-1. Die Ursache für das Prozessivitätsdefizit des NcKin-1/3 Chimärs ist daher in der vom NcKin-3 stammenden Dimerisierungsdomäne des Moleküls zu suchen. Diese scheint zwar hinreichend für eine Koordinierung der enzymatischen Zyklen beider Motordomänen zu sein, wirkt aber anscheinend auf die an sich prozessiven Motordomänen in einer Weise ein, die ein vorzeitiges Ablösen des sich prozessiv fortbewegenden Motormoleküls begünstigt.

Modell I: Fehlende Synchronisation der beiden Motordomänen durch das NcKin-3 Coiled-Coil

Ein entscheidender Faktor für die effektive prozessive Fortbewegung eines zweiköpfigen Motors ist die Koordinierung der in den beiden Motordomänen ablaufenden enzymatischen Zyklen (Hancock und Howard, 1999). Ein prozessives Motormolekül muss über einen Regelungsmechanismus verfügen, der gewährleistet, dass die enzymatischen Zyklen beider Köpfe stets außer Phase bleiben. Gelingt dies nicht, so können beide Köpfe gleichzeitig in einen schwach gebundenen Zustand gelangen, wodurch ein prozessiver Lauf terminiert wird. Bei den gegenwärtig diskutierten Modellen der Kinesinbewegung (vergleiche Abbildung 1.3) wird angenommen, dass im beidköpfig gebundenen Zustand des Moleküls eine zwischen den beiden Motordomänen vermittelte intramolekulare Spannung entscheidend für die Koordination der enzymatischen Zyklen beider Köpfe ist (Rosenfeld et al., 2003). Erfüllt die Dimerisierungsdomäne des Motors nicht die Anforderung, die mechanische Spannung effektiv auf die vordere Motordomäne zu übertragen, so wäre dieser Mechanismus wenigstens teilweise außer Kraft gesetzt. Ein Molekül ATP kann an die vordere,

nukleotidfreie Motordomäne binden, bevor der hintere Kopf sich von seiner Bindungsstelle lösen kann. In diesem Fall wird das frisch angebundene ATP rasch hydrolysiert und der Motor löst sich entweder direkt oder nach einem einfachen oder doppelten Rückwärtsschritt (vergleiche Kapitel 4.1.4) vom Mikrotubulus ab. Eine kürzere durchschnittliche Lauflänge wäre die Folge. Eine signifikante Änderung der Geschwindigkeit wäre unter diesen Umständen nicht zu erwarten, da ein vorzeitiges Binden eines Moleküls ATP an den vorderen Kopf auch nach dem in Kapitel 4.1.4 vorgeschlagenen Modell zum Ablösen des Motors und zur Terminierung des prozessiven Laufs führen würde. Wie aus den in Kapitel 3.4 gezeigten Einzelmoleküldaten hervorgeht, weist das NcKin-1/3 Konstrukt im Vergleich zum NcKin-1 Wildtyp unter allen Kräften nicht nur eine geringere Prozessivität, sondern auch eine geringere mittlere Geschwindigkeit auf. Der Argumentation in Kapitel 4.1.4 folgend, wäre im Falle einer ungenügenden Übertragung der intramolekularen Spannung im beidköpfig gebundenen Zustand des Moleküls für das NcKin-1/3 Chimär eine erhöhte Anzahl einfacher und doppelter Rückwärtsschritte zu erwarten. Wie Tabelle 3.2 in Kapitel 3.1.6 zeigt, lassen sich bei NcKin-1/3 Motoren, unabhängig von der ATP-Konzentration, nur wenige Rückwärtsschritte beobachten. Eine fehlende Synchronisation zwischen den beiden Motordomänen des NcKin-1/3 Konstrukts als Ursache für die beobachteten Prozessivitätsdefizite des Motors erscheint damit unwahrscheinlich.

Modell II: Eine Fehlorientierung der Motordomänen verursacht die Defizite des chimären NcKin-1/3 Motors

Eine zweite Möglichkeit zur Erklärung der verringerten Prozessivität des NcKin-1/3 Chimärs stellt die Annahme einer durch die NcKin-3 Dimerisierungsdomäne bedingten Fehlorientierung der Motordomänen dar.

Eine effektive Möglichkeit, das gleichzeitige Anbinden beider Motordomänen zu verhindern oder erheblich zu erschweren, besteht darin, die beiden Köpfe eines dimeren Moleküls in eine Ausgangsposition zu zwingen, aus der ein gleichzeitiges Anbinden an den Mikrotubulus nur schwer möglich ist. Die Dimerisierungsdomäne des NcKin-1/3 Konstrukts entstammt dem nicht-prozessiven NcKin-3 Molekül. Um einen Kraftschlag ausführen zu können, ist es für diesen Motor wichtig zu verhindern, dass beide Motordomänen gleichzeitig an einen Mikrotubulus anbinden und sich so gegenseitig blockieren. Ist die NcKin-3 Dimerisierungsdomäne darauf optimiert, diesen Effekt zu nutzen, so entsteht durch die Koppelung der NcKin-3 Coiled-Coil an die NcKin-1 Motordomänen mit ihrer hohen Duty-Ratio ein Motormolekül, dessen Motordomänen zwar eine gleichzeitige Bindung beider Köpfe an den Mikrotubulus zu erreichen suchen, diese aber wegen der durch die NcKin-3 Coiled-Coil erzwungenen nichtidealen Orientierung ihrer Motordomänen nur schwer erreichen können. Abbildung 4.6 verdeutlicht diese Modellvorstellung.

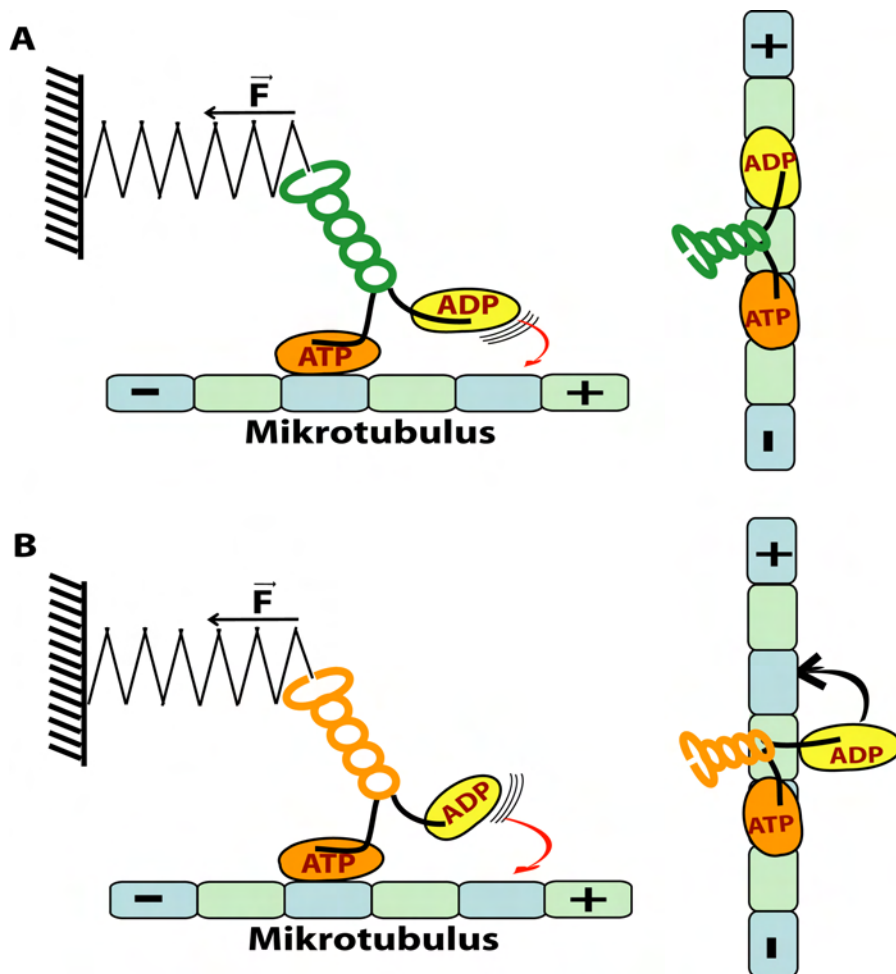
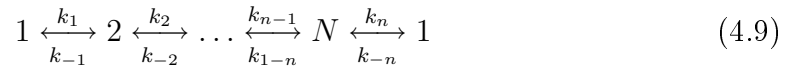


Abbildung 4.6: Modell zur Erklärung der Motilitätsdefizite des NcKin-1/3 Chimärs: Dargestellt ist das Kinesinmolekül in einem Zustand seines enzymatischen Zyklus vor dem Erreichen der doppelköpfig gebundenen Konformation. Auf den Motor wirkt eine Kraft entgegen seiner natürlichen Laufrichtung. Die linke Darstellung zeigt jeweils eine Seitenansicht des Vorgangs, die rechte Darstellung zeigt den selben Zustand in der Draufsicht. **(A):** Beim NcKin-1 Wildtyp sind die beiden Motordomänen so orientiert, dass sich die in Bewegungsrichtung vordere Domäne nach dem Docken des Neck-Linkers direkt über dem Mikrotubulus in unmittelbarer Nähe der nächsten Bindungsstelle befindet. Zum Auffinden der Bindungsstelle ist nur eine kurze diffusive Suche notwendig. **(B):** Beim NcKin-1/3 Chimär wird die vordere Motordomäne durch die Coiled-Coil Dimerisierungsdomäne des NcKin-3 in eine Position gezwungen, die ein Anbinden an die nächstgelegene Bindungsstelle erschwert. Da ein größerer Raum nach der nächsten Bindungsstelle abgesucht werden muss, nimmt die diffusive Suche mehr Zeit in Anspruch, die entsprechende Rate verlangsamt sich.

Nimmt man an, die Coiled-Coil Dimerisierungsdomäne des NcKin-1/3 Chimärs zwingt die beiden Köpfe des Motormoleküls in eine Ausgangsstellung, aus der das Anbinden des vorderen Kopfes deutlich erschwert wird, so wäre das resultierende NcKin-1/3 Chimär gezwungen, einen größeren Teil seines enzymatischen Zyklus im einköpfig gebundenen Zustand zu verbringen. Da ein Ablösen des Motors vom Mikrotubulus gerade aus diesem Zustand leicht möglich ist, wäre für das NcKin-1/3 Molekül in diesem Fall eine deutlich geringer ausgeprägte Prozessivität zu erwarten. Stellt das Anbinden des freien Kopfes an die nächste Bindungsstelle einen ratenlimitierenden Schritt im chemomechanischen Zyklus eines Kinesinmoleküls dar, so sollte sich eine Fehlorientierung der NcKin-1/3 Motordomänen darüber hinaus in einer im Vergleich zum NcKin-1 Wildtyp geringeren mittleren Geschwindigkeit des chimären Konstrukts bemerkbar machen. Beide Folgerungen lassen sich durch Daten aus Kapitel 3.4 belegen.

Die Kraft-Geschwindigkeits Relation des NcKin-1/3 Konstrukts

Nimmt man an, dass ein Kinesinmolekül während eines Vorwärtsschritts N Zwischenzustände durchläuft, wobei jedem Übergang zwischen den Zuständen eine reversible Rate k_1, k_2, \dots, k_n zugeordnet ist, so lässt sich das Schema eines Vorwärtsschritts als



darstellen. Wie die experimentellen Daten zeigen, ist die Geschwindigkeit des Kinesinmotors abhängig von der auf den Motor wirkenden Kraft. Einige der Übergangsraten aus Schema 4.9 müssen daher ebenfalls kraftabhängig sein. Betrachtet man diese Kraftabhängigkeit im „energy landscape“-Modell (Bell, 1978; Wang et al., 1998), so muss der Kinesinmotor bei einem derartigen Übergang gemäß der Arrhenius-Theorie eine Barriere in der freien Energie, die sogenannte Aktivierungsenergiebarriere, durch thermische Diffusion überwinden. Die Übergangsrate $k(F)$ über die Barriere hängt exponentiell von der angelegten Kraft ab und folgt einer Boltzmann-Verteilung. Sie lässt sich nach Bell (Bell, 1978) als

$$k_n(F) = k_{0n} \exp\left(-\frac{F d_n}{k_B T}\right) \quad (4.10)$$

schreiben, wobei k_{0n} die Rate des n -ten Übergangs ohne angelegte Kraft F , d_n die charakteristische Distanz zwischen Grund- und Übergangszustand, k_B die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur bezeichnet. Da der Kinesinmotor unter Normalbedingungen ausschließlich Schritte in Vorwärtsrichtung ausführt, ist anzunehmen, dass zumindest eine der Rückwärtsraten klein genug ist, um vernachlässigt werden zu dürfen. Nimmt man als einfachsten Fall einen chemomechanischen

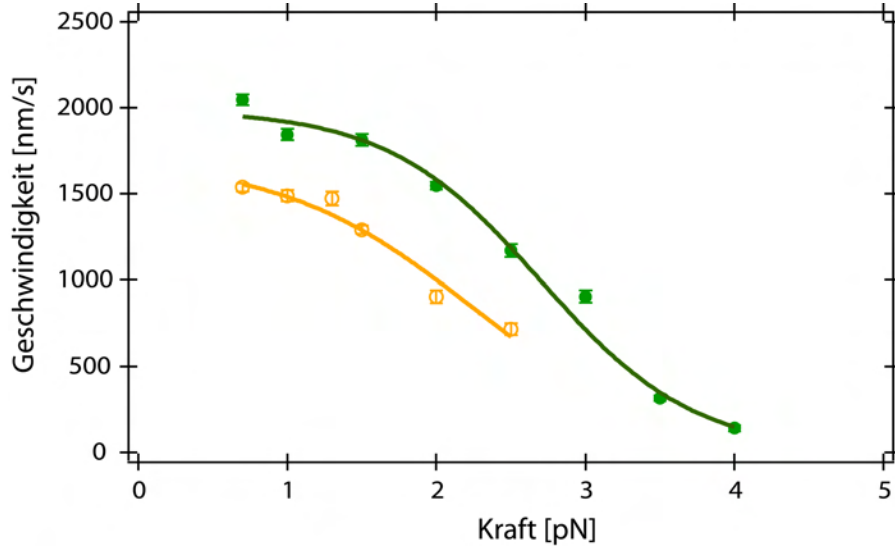


Abbildung 4.7: Kraft-Geschwindigkeits Relation des NcKin-1/3 Chimärs (gelb, offene Kreise) und des NcKin-1 Wildtyps (grün, gefüllte Kreise). Die durchgezogenen Linien stellen die beste angepasste Kurve gemäß Gleichung 4.13 mit den Parametern $k_{01} = (46.600 \pm 9.800) \text{ s}^{-1}$, $d_1 = (7,7 \pm 0,3) \text{ nm}$ und $k_{02} = (249 \pm 3) \text{ s}^{-1}$ für den NcKin-WT (grün) und $k_{01} = (7.000 \pm 3.000) \text{ s}^{-1}$, $d_1 = (6,3 \pm 0,7) \text{ nm}$ und $k_{02} = (212 \pm 8) \text{ s}^{-1}$ für das NcKin-1/3 Chimär dar.

Zyklus



mit zwei nacheinander ablaufenden, irreversiblen limitierenden Raten an, wobei eine der Raten kraftabhängig und eine Rate kraftunabhängig ist, so ergibt sich die Gesamtrate für einen vollständigen Zyklus als die Summe der beiden Einzelraten zu

$$\frac{1}{k_{ges}} = \frac{1}{k_{01} \exp\left(-\frac{Fd_1}{k_B T}\right)} + \frac{1}{k_{02}}. \quad (4.12)$$

Aus dem Reziproken von Gleichung 4.12 ergibt sich für einen molekularen Motor mit der typischen Schrittweite d der Ausdruck

$$v(F) = d \left(\frac{1}{k_{01} \exp\left(-\frac{Fd_1}{k_B T}\right)} + \frac{1}{k_{02}} \right)^{-1} \quad (4.13)$$

für dessen kraftabhängige Geschwindigkeit. Abbildung 4.7 zeigt die Anpassung einer Kurve gemäß Gleichung 4.13 an die Kraft-Geschwindigkeits Relationen des NcKin-1 Wildtyps (grün) und des NcKin-1/3 Chimärs (gelb). Dabei ergeben sich

die Parameter $k_{01} = (7.000 \pm 3.000) \text{ s}^{-1}$, $d_1 = (6,3 \pm 0,7) \text{ nm}$ und $k_{02} = (212 \pm 8) \text{ s}^{-1}$ für das NcKin-1/3 Konstrukt sowie $k_{01} = (46.600 \pm 9.800) \text{ s}^{-1}$, $d_1 = (7,7 \pm 0,3) \text{ nm}$ und $k_{02} = (249 \pm 3) \text{ s}^{-1}$ für den NcKin-1 Wildtyp.

Gleichung 4.13 ist das einfachste Modell, das sowohl die Kraft-Geschwindigkeits Relation des NcKin-1 Wildtyps als auch die Relation des NcKin-1/3 Chimärs zu beschreiben vermag. Modelle mit weniger als den in Gleichung 4.13 enthaltenen drei freien Parametern erlauben keine Anpassung einer Kurve an die Messdaten. Modelle mit mehr freien Parametern ergeben keine signifikant besser angepassten Kurven.

Die schnellere der beiden Raten, k_{01} , weist bei beiden Kinesinkonstrukten mit einem d_1 zwischen 6,3 und 7,7 nm eine sehr ausgeprägte Kraftabhängigkeit auf und wird bei höheren Kräften limitierend. Auffällig ist, dass die Rate k_{01} beim NcKin-1 Wildtyp mit etwa 46.600 beinahe um einen Faktor 7 schneller ist als die entsprechende Rate des NcKin-1/3 Chimärs. Die durch den Parameter d ausgedrückte Entfernung zwischen dem Grund- und Übergangszustand des durch die Rate k_{01} beschriebenen Übergangs ist bei beiden Konstrukten sehr ähnlich. Es ist daher anzunehmen, dass die Rate k_{01} bei beiden Motormolekülen den selben Prozess beschreibt. Die zweite, kraftunabhängige Rate k_{02} ist im Vergleich zu k_{01} deutlich kleiner und unterscheidet sich bei den beiden Konstrukten nur um ca. 20%.

Die langsamere und unter niedrigen Kräften limitierende Rate k_{02} zeigt dabei sowohl für das NcKin-1 als auch für das NcKin-1/3 Konstrukt eine gute Übereinstimmung mit den jeweiligen ATPase-Raten der Konstrukte (Kallipolitou et al., 2001; Bathe et al., 2005; Adio et al., 2007). Da nach derzeitiger Ansicht das Ablösen des ADPs den ratenlimitierenden Schritt im chemomechanischen Zyklus des Kinesinmotors ohne Einwirkung einer äußeren Kraft darstellt (Ma und Taylor, 1995), erscheint es sinnvoll, die langsamere und unter niedrigen Kräften dominierende Rate k_{02} diesem Prozess zuzuordnen. Nach dem derzeitigen Modell der Kinesinbewegung (siehe Abbildung 1.3) ist mit der Abgabe des ADPs keine signifikante Konformationsänderung verbunden. Die Unabhängigkeit dieser Rate von der auf das Motormolekül wirkenden Kraft erscheint daher plausibel.

Die schnellere Rate k_{01} mit ihrer bei beiden Molekülen stark ausgeprägten Kraftabhängigkeit wird unter höheren Kräften limitierend. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich bei der Rate k_{01} um eine zusammengesetzte Rate handelt, zu der mehrere im chemomechanischen Zyklus des Motors mit ähnlichen Geschwindigkeiten ablaufende Prozesse beitragen, ist eine eindeutige Zuordnung eines Prozesses zu dieser Rate schwierig. Als mögliche Prozesse kommen unter anderem das Anbinden und die Hydrolyse des ATPs, das Docken des Neck-Linkers und die diffusive Suche des in Laufrichtung vorderen Kopfes nach der nächsten Bindungsstelle in Frage. Für das Binden und die Hydrolyse des ATPs sind beim Kinesinmotor die katalytischen Zentren in den beiden Motordomänen verantwortlich. Diese Domänen sind

bei NcKin-1/3 und NcKin-1 Wildtyp Motoren identisch. Die Rate k_{01} der beiden Motoren unterscheidet sich aber um einen Faktor 7. Es ist daher anzunehmen, dass sich weder das Binden, noch die Hydrolyse maßgeblich in der Rate k_{01} ausdrücken. Die Neck-Linker Sequenzen beider Motoren sind ebenfalls identisch, so dass eine analoge Argumentation auch für den Vorgang des Neck-Linker-Dockens gilt. Ein konsistentes Bild ergibt sich mit der im vorangehenden Kapitel aufgestellten Hypothese einer Fehlorientierung der Motordomänen durch die NcKin-1/3 Dimerisierungsdomäne. Verursacht die NcKin-1/3 Dimerisierungsdomäne eine Fehlstellung der beiden Motordomänen wie in Abbildung 4.6 angedeutet, so muss die ungünstig positionierte vordere Motordomäne zum Erreichen des beidköpfig gebundenen Zustands mehr Raum nach der nächsten Bindungsstelle absuchen. Dieser Vorgang dauert bei NcKin-1/3 Konstrukten länger als bei NcKin-1 Motoren, die entsprechende Rate wird kleiner. Auch die durch den Parameter d ausgedrückte Kraftabhängigkeit erscheint plausibel, da mit der diffusiven Suche des Kopfes nach der nächsten Bindungsstelle auch eine maßgebliche Veränderung des Schwerpunkts des Motormoleküls einhergeht.

Betrachtet man die Ergebnisse aus den Vergleichen der Kraft-Geschwindigkeits Relation und der Kraft-Laufängen Relation des NcKin-1/3 Konstrukts mit den jeweiligen Relationen des NcKin-1 Wildtyps zusammenfassend, so bleibt festzuhalten, dass lediglich die Hypothese einer Fehlorientierung der Motordomänen des NcKin-1/3 Chimärs eine plausible Erklärung für alle beobachteten Phänomene erlaubt. Diese durch die NcKin-3 Coiled-Coil bedingte Fehlorientierung verlangsamt den Prozess der diffusiven Suche der vorderen Motordomäne nach der nächsten Mikrotubulibindungsstelle, der sich als einer von möglicherweise mehreren etwa gleich schnell ablaufenden Prozessen in der Rate k_{01} ausdrückt. Zieht man weitergehend in Betracht, dass der Gewinn an freier Energie durch das nukleotidinduzierte Docken des Neck-Linkers an die Motordomäne nur etwa $1 - 2k_B T$ beträgt (Rice et al., 2003), so verschmelzen möglicherweise die in bisherigen Modellen der Kinesinbewegung (Visscher et al., 1999) als getrennt angenommenen Prozesse des Dockens des Neck-Linkers und der diffusiven Suche des vorderen Motors nach der nächsten Bindungsstelle zu einem Prozess. Der Vorwärtsschritt wäre damit maßgeblich durch die diffusive Suche des freien Kopfes nach der nächsten Bindungsstelle bestimmt, wobei das Docken des Neck-Linkers der diffusiven Bewegung eine Vorzugsrichtung verleiht. Dieses Modell der Kinesinbewegung würde der Größe des ermittelten Parameters d_1 für die mit der Rate k_{01} verbundene Konformationsänderung Rechnung tragen und wäre im Einklang mit Untersuchungen am humanen Kinesin, die das Vorhandensein von mechanischen Zwischenzuständen des Kinesinschritts mit typischen Verweildauern $> 30 \mu s$ ausschließen (Carter und Cross, 2005).

4.3.3 Das NcKin-3/1 Konstrukt

Das zum prozessiven NcKin-1/3 Konstrukt inverse NcKin-3/1 Chimär weist deutliche Eigenschaften eines nicht-prozessiven Motors auf. Zwar unterstützt das Konstrukt in Motilitätsassays, sofern es in hoher Dichte eingesetzt wird, den unidirektionalen Transport von Mikrotubuli mit einer Geschwindigkeit von $(0,59 \pm 0,01)\mu\text{m/s}$ (siehe Kapitel 3.4.1), doch deutet bereits die geringe Duty-Ratio von 36% darauf hin, dass es sich bei diesem Konstrukt um einen nichtprozessiven Motor handelt. Weder aus Einzelmolekül-Motilitätsuntersuchungen noch in Fallexperimenten ergaben sich eindeutige Anzeichen für eine mechanische Prozessivität. Betrachtet man die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen am NcKin-3/1 Konstrukt (siehe Kapitel 3.4.6), so ergibt sich aus der Rate für die mikrotubuliinduzierten ATPase $k_{cat} = 23,3\text{s}^{-1}$ bei der Annahme einer Hand-über-Hand Fortbewegung des Motors eine theoretische Gleitgeschwindigkeit der Mikrotubuli in Motilitätsassays von $v = 0,37\mu\text{m/s}$, was ca. 40% unter der real beobachteten Gleitgeschwindigkeit liegt. Diese Diskrepanz weist darauf hin, dass die beobachtete Motilität nicht durch eine prozessive Bewegung des NcKin-3/1 Konstrukts zu Stande kommt, sondern ein anderer Mechanismus zu Grunde liegt, bei dem mehrere gleichzeitig an einen Mikrotubulus angreifende Motoren für dessen Transport notwendig sind (Howard, 2001).

Der Einfluss der NcKin-1 Nackendomäne auf die NcKin-3 Motordomänen

Sowohl in der ATPase-Rate als auch in der mittleren Geschwindigkeit der Mikrotubulitranslation ist das chimäre NcKin-3/1 Konstrukt dem NcKin-3 Wildtyp sehr ähnlich. Betrachtet man aber die weiteren kinetischen Daten, so ergeben sich deutliche Abweichungen. Im Gegensatz zum NcKin-3 Wildtyp verfügt das NcKin-3/1 Chimär über zwei aktive Motordomänen (Adio et al., 2006, 2007). Durch den Austausch der nativen NcKin-3 Dimerisierungs Coiled-Coil gegen die Nackendomäne des prozessiven NcKin-1 wird die Blockade einer der beiden Motordomänen aufgehoben. Die native NcKin-3 Sequenz verfügt offensichtlich über die Fähigkeit, die Aktivität einer NcKin-3 Motordomäne zu unterdrücken, um ein gleichzeitiges Anbinden beider Köpfe an den gleichen Mikrotubulus und damit eine Selbstblockade des Moleküls zu verhindern. Dieser Einfluss scheint spezifisch an das Vorhandensein einer NcKin-3 Motordomäne gebunden zu sein, da im Falle des chimären NcKin-1/3 keine Blockade einer Motordomäne zu beobachten ist. Ein weiterer fundamentaler Unterschied offenbart sich in der Rate für das Ablösen eines NcKin-3/1 Motors von einem Mikrotubulus. Während dieser Vorgang beim NcKin-3 Wildtyp mit einer Rate von 23s^{-1} und damit identisch zur ATP-Umsatzrate abläuft (Adio et al., 2006), liegt die entsprechende Rate für das NcKin-3/1 Konstrukt bei $k_{off} = 0,47\text{s}^{-1}$ und damit etwa zwei Größenordnungen niedriger. Dies deutet an, dass das Molekül pro

Kontakt mit einem Mikrotubulus mehr als ein Molekül ATP hydrolysiert, ohne dabei mechanische Prozessivität zu zeigen.

4.3.4 Die Motordomäne bestimmt die Prozessivität eines Kinesinmotors

Die in Kapitel 3.4 beschriebenen experimentellen Daten zeigen, dass das chimäre NcKin-1/3 Konstrukt alle Kriterien eines prozessiven molekularen Motors erfüllt, während das komplementäre NcKin-3/1 Konstrukt keine Anzeichen mechanischer Prozessivität aufweist. Dies belegt erstmals eindeutig, dass die mechanische Prozessivität eines Kinesinmotors durch dessen Motordomänen bedingt ist. Die Dimerisierungsdomäne der Kinesinmotoren wirkt zwar, wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt wurde, durch ihre spezifischen Eigenschaften in vielfältiger Weise regulierend auf die typischen Eigenschaften eines Kinesinmotors ein, ist jedoch selbst nicht hinreichend für die Prozessivität eines Kinesinmotors.

4.4 Schlussfolgerungen

Die Coiled-Coil Struktur in der Kinesin-1 Nackendomäne ist darauf optimiert, mehrere scheinbar gegensätzliche Anforderungen in einer Struktur zu vereinen. Sie ermöglicht die Dimerisierung zweier identischer Polypeptidketten zu einem funktionierenden Motormolekül und stellt eine feste Verbindung zwischen den beiden Köpfen des Motors her, die für die Koordinierung der enzymatischen Zyklen der beiden Motordomänen unerlässlich ist. Gleichzeitig verleiht sie dem Kinesinmolekül genügend Flexibilität, um dessen prozessive Fortbewegung auch dann zu gewährleisten, wenn es gegen einwirkende Kräfte im Bereich mehrerer Piconewton ankämpfen muss. Kräfte dieser Größenordnung treten nicht nur beim Transport von Lasten durch das Zytoplasma, sondern auch dann auf, wenn mehrere Motoren unterschiedlichen Typs gleichzeitig auf den zu transportierenden Organellen oder Vesikeln lokalisiert sind (Huang et al., 1999). Da die Stabilität von Coiled-Coil Strukturen darüber hinaus durch Änderung des pH-Werts, Phosphorylierung oder die Interaktion mit bestimmten Ionen flexibel variiert werden kann (Burkhard et al., 2001), sind Coiled-Coils ideale Strukturelemente gerade zum Bau kraftproduzierender Proteine. Die für eine Coiled-Coil Bildung nicht perfekte Aminosäuresequenz des NcKin-1 Nackens stellt demnach eine evolutionäre Anpassung des Kinesinmoleküls dar, die eine effektive Fortbewegung auch dann gewährleistet, wenn auf das Motormolekül Kräfte im Bereich einiger Piconewton entgegen seiner natürlichen Laufrichtung einwirken.

Für die im Rahmen der einzelmolekularen Untersuchung des NcKin-1 Wildtyps erstmals beobachteten doppelten Rückwärtsschritte konnte ein Modell entwickelt

werden, das die beobachteten Phänomene zu beschreiben vermag. Der doppelte Rückwärtsschritt des NcKin-1 Wildtyps stellt demnach eine weitere direkte Auswirkung der für die Coiled-Coil Bildung nicht-idealen Aminosäuresequenz der ersten Heptade der NcKin-1 Nackendomäne dar. Diese gewährleistet keine effektive Übertragung der intramolekularen Spannung auf den in Bewegungsrichtung vorderen Kopf des Motormoleküls und begünstigt dadurch das vorzeitige Binden eines Moleküls ATP, was zu den beobachteten doppelten Rückwärtsschritten und damit zur Terminierung eines prozessiven Laufs führt.

Die Untersuchung der chimären Kinesinkonstrukte NcKin-1/3 und NcKin-3/1 zeigte erstmals, dass die Prozessivität eines Kinesinmotors durch dessen Motordomänen bestimmt ist. Die Coiled-Coil Struktur der NcKin-1 Nackendomäne ist dagegen nicht hinreichend, um zwei Motordomänen des nicht-prozessiven NcKin-3 zu einem prozessiven molekularen Motor zu verbinden.

Durch Anpassen eines Modells an die Kraft-Geschwindigkeits Relation des NcKin-1 Wildtyps und NcKin-1/3 Chimärs konnten zwei limitierende Raten im chemomechanischen Zyklus der Motoren identifiziert und einzelnen chemomechanischen Prozessen zugeordnet werden. Die schnellere der beiden Raten weist eine ausgeprägte Kraftabhängigkeit auf und wurde der Suche der in Bewegungsrichtung vorderen Motordomäne nach der nächsten Mikrotubulibindungsstelle zugeordnet. Da diese Rate beim NcKin-1/3 im Vergleich zum NcKin-1 Wildtyp etwa um einen Faktor 7 kleiner ist, wurde die im Vergleich zum NcKin-1 reduzierte Geschwindigkeit und die eingeschränkte Prozessivität des NcKin-1/3 Konstrukts in einem Modell durch eine verzögerte Anbindung des vorderen Kopfes an den Mikrotubulus erklärt. Die im chimären NcKin-1/3 Molekül für die Dimerisierung der beiden schweren Ketten verantwortliche Coiled-Coil Dimerisierungsdomäne des NcKin-3 verursacht dem Modell zufolge eine Fehlorientierung der beiden Köpfe und verlangsamt so das Anbinden des vorderen Kopfes an die nächste Bindungsstelle. Die beobachteten Motilitätsdefizite des chimären NcKin-1/3 Konstrukts stellen damit eine direkte Folge der für einen prozessiven Motor nicht-idealen Nackendomäne des NcKin-3 dar und belegen erneut den regulatorischen Einfluss der Kinesin Nacken Coiled-Coil auf die Funktion des Motormoleküls.

Das an die Kraft-Geschwindigkeits Relation angepasste Modell mit zwei nacheinander ablaufenden, limitierenden Raten erlaubt weitere Folgerungen. Wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben, ergibt sich für die schnellere, kraftabhängige Rate k_1 für beide Motoren eine Distanz d_1 zwischen dem Grund- und Übergangszustand der Rate in einer Größe von ≈ 7 nm. Dies entspricht fast der gesamten Schrittlänge des Kinesinmotors. Damit stellt dem Modell zufolge die diffusive Bewegung der freien Motordomäne den wesentlichen Schritt bei der Vorwärtsbewegung eines Kinesinmotors dar. Dies steht im Einklang mit den Daten von Carter und Cross, die die Vorwärtsbewegung des Kinesinmotors ebenfalls als diffusive Bewegung ohne er-

kennbaren Zwischenschritt beschreiben (Carter und Cross, 2005). Das Docken des Neck-Linkers ist in diesem Bild entgegen der ursprünglichen Interpretation (Rice et al., 1999) nicht als das eigentliche mechanische Ereignis zu sehen, sondern gibt der diffusiven Suche der Motordomäne lediglich eine Vorzugsrichtung. Dieses Bild wird auch durch Untersuchungen der Energetik des Neck-Linker Dockens gestützt, die zwischen gedockter und ungedockter Konformation des Neck-Linkers einen Unterschied in der freien Energie von lediglich $1 - 2 k_B T$ ergeben (Rice et al., 2003).

5 Ausblick

Durch die in dieser Arbeit durchgeführte einzelmolekulare Charakterisierung von Kinesinkonstrukten ist es gelungen, einen tieferen Einblick in die Funktionsweise dieses molekularen Motors zu erlangen. Insbesondere wurde dabei der Einfluss der Coiled-Coil Nackenstruktur auf die spezifischen Eigenschaften des Kinesinmotors intensiv untersucht, wodurch mehrere neue funktionelle Zusammenhänge aufgedeckt werden konnten. Aus den zur Erklärung der beobachteten Phänomene herangezogenen Modellen ergeben sich eine Reihe von Folgerungen, die teilweise einer weiteren experimentellen Überprüfung bedürfen.

Bei dem zur Erklärung der doppelten Rückwärtsschritte des NcKin-1 Wildtyps aufgestellten Modell erscheinen zusätzliche Einzelmolekülexperimente unter limitierenden ATP-Konzentrationen sinnvoll. Insbesondere sollte dabei geklärt werden, ob die beobachtete Zunahme der Häufigkeit doppelter Rückwärtsschritte mit abnehmender ATP-Konzentration signifikant ist. Das zur Erklärung vorgeschlagene Modell beschreibt das Rückwärtsschritt-Ereignis als rein mechanischen Ablauf, der kein Binden und keine Abgabe eines Nukleotids erfordert. Eine direkte Überprüfung des Modells durch Variation der ADP- und Phosphatkonzentration ist daher nicht möglich. Bleibt die Häufigkeit und insbesondere die Zeitdauer der doppelten Rückwärtsschritt-Ereignisse jedoch auch unter veränderten ADP- und Phosphatkonzentrationen gleich, so könnten andere Modelle, die das Binden oder die Abgabe eines Nukleotids oder Phosphations erfordern, ausgeschlossen werden.

Das zur Erklärung der beobachteten Motilitätsdefizite des NcKin-1/3 Chimärs aufgestellte Modell nimmt eine durch die NcKin-3 Coiled-Coil verursachte Fehlorientierung der freien Motordomäne als Ursache für die geringe Prozessivität des NcKin-1/3 Chimärs an. Eine Überprüfung dieses Modells kann erst erfolgen, sobald eine Kristallstruktur des NcKin-1/3 Dimers oder des NcKin-3 Wildtyps inklusive der Coiled-Coil Dimerisierungsdomäne vorliegt. Weitere Aufschlüsse ergeben sich jedoch möglicherweise aus einer einzelmolekularen Untersuchung des zum NcKin-1/3 komplementären NcKin-3/1 Konstrukts. In ersten Voruntersuchungen mit der klassischen Einzelkugelmethode zeigt das Molekül zwar keine Anzeichen mechanischer Prozessivität, jedoch auffällig lange Phasen, in denen das Motorprotein an den Mikrotubulus angebunden bleibt. Durch die im Rahmen dieser Arbeit auf das Kinesin-Mikrotubuli System übertragene Dreikugelmethode sind nun auch Messungen an nicht-prozessiven Kinesinmotoren möglich. Das NcKin-3/1 Konstrukt stellt hierfür ein interessantes Ziel dar. Möglicherweise ist bei diesem Konstrukt die feste

Koppelung des chemischen an den mechanischen Zyklus des Proteins aufgehoben, so dass pro Kontakt mit einem Mikrotubulus mehrere Moleküle ATP hydrolysiert werden, ohne dass dabei eine gerichtete Bewegung des Moleküls stattfindet. Die bereits an diesem Konstrukt durchgeführten kinetischen Untersuchungen deuten auf ein derartiges Szenario hin. Weitere Einzelmoleküluntersuchungen mittels der neu etablierten Dreikugelmethode können zur Klärung dieses Sachverhalts beitragen.

6 Anhang

6.1 Das Prinzip der optischen Falle

Trifft Licht auf ein Objekt, so kann es von diesem absorbiert oder gestreut werden. Bei beiden Prozessen findet eine vollständige oder teilweise Übertragung des Photonenimpulses auf das wechselwirkende Objekt statt, das dadurch eine Kraft erfährt. Wegen der geringen Kräfte, die bei der Wechselwirkung eines Photons mit Materie ausgeübt werden, ist für eine sinnvolle Anwendung des beschriebenen Effekts eine Strahlungsquelle großer Intensität erforderlich, wie sie mit einem Laser für einen breiten Spektralbereich vom Infrarot- bis in den UV-Bereich zur Verfügung steht. Darüber hinaus muss die Form des Laserstrahls sowie die Art und Beschaffenheit des wechselwirkenden Teilchens sinnvoll gewählt werden, um ein stabiles Fangen des Teilchens im Strahl zu ermöglichen.

Betrachtet man die Wechselwirkung von Licht mit kolloidalen, dielektrischen Partikeln, so können optische Kräfte durch die Beziehung

$$F = \frac{Qn_m P}{c} \quad (6.1)$$

beschrieben werden, wobei Q eine dimensionslose Effizienz, n_m den Brechungsindex des umgebenden Mediums, P die Laserleistung am Ort der Probe und c die Lichtgeschwindigkeit bezeichnet (Ashkin, 1998). Der Parameter Q beschreibt dabei den Bruchteil des Lichts, der zur Erzeugung einer Kraft genutzt wird. Im einfachsten Fall einer planaren Welle, die auf ein perfekt absorbierendes Teilchen trifft, wird $Q = 1$. Das absorbierende Teilchen erfährt dabei eine Kraft in Richtung des Pointingvektors der eintreffenden Welle.

Um stabiles Fangen zu ermöglichen, müssen sich die durch den Strahlungsdruck hervorgerufenen Kräfte in einem stabilen Gleichgewicht befinden. Für eine quantitative Betrachtung der auftretenden Kräfte ist es sinnvoll, zuerst folgende Grenzfälle zu betrachten: Ist die typische Ausdehnung des zu fangenden Objekts d sehr viel kleiner als die Wellenlänge λ des verwendeten Lasers ($d \ll \lambda$), so lassen sich die auftretenden Prozesse im Rahmen der Rayleigh-Streuung beschreiben, während für Objekte mit $d \gg \lambda$ die Mie-Streuung zur Erklärung herangezogen werden kann. Im Grenzfall der Rayleigh-Streuung wirkt das elektromagnetische Feld gleichförmig über die ganze Ausdehnung des zu fangenden Teilchens, das in diesem Grenzfall

als Punktdipol aufgefasst werden kann. Die resultierende Gesamtkraft lässt sich als Summe zweier Komponenten beschreiben:

$$\vec{F} = \vec{F}_{grad} + \vec{F}_s. \quad (6.2)$$

\vec{F}_{grad} beschreibt dabei eine Kraft, die in Richtung des Intensitätsgradienten eines Laserstrahls zeigt, während \vec{F}_s die Streukraft beschreibt, die von den am Objekt zurückgestreuten Photonen verursacht wird und in Richtung des Lichtstrahls zeigt. Für ein dielektrisches, kugelförmiges Objekt mit dem Radius r und einem Brechungsindex n_b in einem umgebenden Medium mit Brechungsindex n_m ergibt sich die Polarisierbarkeit des Teilchens als (Gordon, 1973)

$$\alpha = r^3 n_b^2 \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right). \quad (6.3)$$

Die Gradientenkraft \vec{F}_{grad} lässt sich damit als

$$\vec{F}_{grad} = -\frac{\alpha}{2} \nabla E^2 \quad (6.4)$$

ausdrücken. Die Streukraft ergibt sich mit der Lichtintensität I_0 laut Ashkin (Ashkin et al., 1986) zu

$$\vec{F}_s = I_0 \frac{128\pi^5 r^6 n_b}{c_0 3\lambda^4} \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right). \quad (6.5)$$

Für ein stabiles Kräftegleichgewicht und damit eine stabile Position des gefangenen Teilchens muss \vec{F}_{grad} größer als die Streukraft \vec{F}_s sein. Erfüllt wird diese Bedingung beispielsweise durch einen parallelen Laserstrahl, der durch ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur NA fokussiert wird. Durch die stets vorhandene Streukraft ist die stabile Position des gefangenen Teilchens vom Fokus geringfügig in Richtung des Laserstrahls verschoben.

Ist das in der optischen Falle zu fangende Teilchen wesentlich größer als die Wellenlänge des verwendeten Lichts ($d \gg \lambda$), so spricht man von Mie-Streuung, und eine Beschreibung der auftretenden Kräfte ist mit den Mitteln der Strahlenoptik möglich. Nimmt man eine bekannte Verteilung paralleler Strahlen an, die auf die rückwärtige Fokalebene eines Objektivs treffen, so werden diese auf einen einzigen Punkt gebündelt. Beugungseffekte werden in dieser Betrachtung per Definition vernachlässigt. Die Kraft F eines einzelnen Strahls mit der Leistung P ergibt sich laut Ashkin (Ashkin, 1998) zu

$$\vec{F} = \frac{n_m P}{c} \left\{ 1 + R \cos 2\Theta - \frac{T^2 [\sin(2\theta - 2\epsilon) + R \cos 2\Theta]}{1 + R^2 + 2R \cos 2\epsilon} \right\} \vec{k} + \quad (6.6)$$

$$\frac{n_m P}{c} \left\{ R \sin 2\Theta - \frac{T^2 [\sin(2\theta - 2\epsilon) + R \sin 2\Theta]}{1 + R^2 + 2R \cos 2\epsilon} \right\} \vec{l}, \quad (6.7)$$

wobei Θ der Einfallswinkel des Strahls, \vec{k} und \vec{l} die Einheitsvektoren parallel und senkrecht zur Einfallrichtung und R und T die Fresnelschen Reflexions- und Brechkoeffizienten (Jackson, 1975) sind.

Für biologische Anwendungen, insbesondere zur Untersuchung molekularer Motoren, kommen oft Kugeln mit einem Durchmesser von $d = 0,2 - 2,0 \mu\text{m}$ zum Einsatz. Für diese Teilchen trifft bei der Verwendung eines infraroten Fallenlasers keine der oben beschriebenen Näherungen zu. Für Partikel dieser Größe dürfen Beugungseffekte nicht länger vernachlässigt werden, zudem muss für stark fokussierte Strahlen der Vektorcharakter des elektromagnetischen Feldes berücksichtigt werden, was die korrekte Beschreibung der Kräfteverhältnisse erheblich verkompliziert. An dieser Stelle sei daher lediglich auf die Arbeiten von Barton et al. verwiesen (Barton et al., 1989), die sich mit dieser Thematik auseinandersetzen und auch für Partikel einer Größe zwischen $0,2$ und $2,0 \mu\text{m}$ eine Beschreibung der optischen Kräfte in einem Lasergradienten liefern, die im Einklang mit experimentellen Ergebnissen von Ashkin et al. (Ashkin und Dziedzic, 1975) steht.

6.2 Verwendete Puffer bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzten Puffer sind in Tabelle 6.1 aufgeführt.

Laufpuffer	25 mM TRIS-HCl, 0,1% SDS, 192 mM Glycin
10x Puffer für das Sammelgel	500 mM TRIS-HCl, pH 6,8, 0,4% SDS
10x Puffer für das Trenngel	1,5 M TRIS-HCl, pH 8,8, 0,4% SDS
6x Lämmli-Puffer	300 mM TRIS-HCl, pH 6,8, 15 mM EDTA, 12% SDS, 30% Glycerol, 0,06% Bromphenol-Blau
Comassie Färbelösung	2,5% Essigsäure, 50% Methanol, 0,25% Comassie Brilliant Blue R350 (Sigma)

Tabelle 6.1: Puffer für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

6.3 Abkürzungen

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP-PNP	Adenosin-5' [β, γ -imido]-triphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BRB-80	Brinkmann reconstitution buffer
BRBSA	BRB-80 mit zusätzlich 1 mg/ml BSA
BSA	Serumalbumin (Rind)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ΔE_A	Arrhenius Aktivierungsenergie
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(1-aminoethylether)-N,N'-tetraacetat
FLIC	Fluorescence interference contrast microscopy
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HCl	Salzsäure
HsKin	konventionelles Kinesin aus <i>Homo sapiens</i>
k_{cat}	ATP Umsatz pro Sekunde und Kopf
$k_{0.5,MT}$	halbmaximale Aktivierungskonstante
KOH	Kaliumhydroxid
MT	Mikrotubulus
NcKin-1	konventionelles Kinesin aus <i>Neurospora crassa</i>
PBS	Phosphate buffered saline
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-[2ethansulfonsäure]
RNA	Ribonucleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SN	EIEALKA-Sequenz ("stable neck")
TIRF	Total internal reflection fluorescence
TRIS	Tris-hydroxymethyl-ammoniumethan
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

1.1	Die Domänenstruktur des Kinesin-1 Moleküls	4
1.2	Ablauf der Coiled-Coil Bildung	6
1.3	Der chemomechanische Zyklus des Kinesin-1	10
1.4	Domänenstruktur des NcKin-3 Moleküls	12
1.5	Vergleich der Aminosäuresequenz des Kinesinnackens	13
2.1	Schematische Darstellung der optischen Falle	16
2.2	Die klassische Einzelkugelmethode	22
2.3	Schematische Darstellung der Dreikugelanordnung	23
2.4	Mechanische Elemente der Dreikugelmethode	25
2.5	Verwendete Kinesinkonstrukte	28
2.6	Vergleich der Nackensequenz des NcKin-1 WT und NcKin-SN	29
3.1	Laufängenverteilung des NcKin-1 Wildtyps und NcKin-SN Kon- strukts unter 1,0 und 2,0 pN Last	41
3.2	Laufängen des NcKin-1 WT und NcKin-SN unter konstanter Kraft	42
3.3	Die Kraft-Geschwindigkeits Relation des NcKin-1 WT und NcKin- SN Konstrukts	43
3.4	Beispielkurven einzelner Läufe des NcKin-1 WT und NcKin-SN Kon- strukts in einer statischen Laserfalle	44
3.5	Beispiele für einzelne Läufe eines NcKin-WT Moleküls bei 50 μ M ATP	46
3.6	Der doppelte Rückwärtsschritt des NcKin-1 Wildtyps im Detail . .	48
3.7	Auftrennung des P342C Konstrukts auf einem nichtreduzierenden SDS-Gel	49
3.8	Die Kraft-Laufängen Relation des NcKin-P342C Konstrukts	52
3.9	Die Kraft-Geschwindigkeits Relation des P342C Konstrukts	53
3.10	Histogramm der Maximalkräfte des NcKin-P342C Konstrukts	54
3.11	Beispiele für Rückwärtsschritte des NcKin-P342C	55
3.12	Anbindung eines Mikrotubulus an zwei antikörperbeschichtete Kugeln	57
3.13	Die Stabilität der Mikrotubuli-Kugel Bindung	59
3.14	Maximalkraft des NcKin-1 gemessen mit der Dreikugelmethode . .	60
3.15	Kymogramm eines NcKin-1/3 Motors	63
3.16	Die Kraft-Laufängen Relation des NcKin-1/3 Chimärs	64

3.17	Die Kraft-Geschwindigkeits Relation des NcKin-1/3 Chimärs	65
3.18	Lauf eines chimären NcKin-1/3 Moleküls in einer statischen Laserfalle und Histogramm der von NcKin-1/3 Konstrukt produzierten Maximalkräfte	66
3.19	Beispiel für Rückwärtsschritte des chimären NcKin-1/3 Konstrukts	67
4.1	Pilzspezifische Aminosäuren im Kinesinnacken	75
4.2	Modell für den Einfluss der Steifigkeit des Kinesinnackens auf die Molekülbewegung unter Last	77
4.3	ATPase Schema mit Rückschritt	82
4.4	Modell für den doppelten Rückwärtsschritt mit ADP Bindeereignis	85
4.5	Kräfteverhältnisse bei den beiden alternativen Versuchsanordnungen	89
4.6	Modell zur Erklärung der Motilitätsdefizite des NcKin-1/3 Chimärs	94
4.7	Kraft-Geschwindigkeits Relation des NcKin-1/3 Chimärs und des NcKin-1 Wildtyps mit angepasster Kurve	96

Literaturverzeichnis

- Sarah Adio, Marieke Bloemink, Michaela Hartel, Sven Leier, Michael A Geeves, und Günther Woehlke. Kinetic and mechanistic basis of the nonprocessive kinesin-3 motor nckin3. *J Biol Chem*, 281(49):37782–37793, Dec 2006.
- Sarah Adio, Johann Jaud, Bettina Ebbing, Matthias Rief, und Günther Woehlke. The molecular determinants of processivity in kinesin. *Submitted to Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007.
- Charles L Asbury, Adrian N Fehr, und Steven M Block. Kinesin moves by an asymmetric hand-over-hand mechanism. *Science*, 302(5653):2130–2134, Dec 2003.
- A. Ashkin. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Methods Cell Biol*, 55:1–27, 1998. 0091-679X (Print) Journal Article Review.
- A. Ashkin und J. M. Dziedzic. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, 235(4795):1517–20, 1987. 0036-8075 (Print) Journal Article.
- A. Ashkin und J.M. Dziedzic. Optical levitation of liquid drops by radiation pressure. *Science*, 187:1073–75, 1975.
- A. Ashkin, J.M. Dziedzic, J.E. Bjorkholm, und S. Chu. Observations of a single beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics Lett*, 11:288–290, 1986.
- A. Ashkin, J. M. Dziedzic, und T. Yamane. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature*, 330(6150):769–71, 1987. 0028-0836 (Print) Journal Article.
- 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.
- F. Bathe. *Influence of Neck and Hinge Regions on the Mechanism of Conventional Kinesin*. PhD thesis, Universität Witten/Herdecke, 2005.

- F. Bathe, K. Hahlen, R. Dombi, L. Driller, M. Schliwa, und G. Woehlke. The complex interplay between the neck and hinge domains in kinesin-1 dimerization and motor activity. *Mol Biol Cell*, 16(8):3529–37, 2005. 1059-1524 (Print) Journal Article.
- G. I. Bell. Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, 200:618–627, 1978.
- H. C. Berg und R. A. Anderson. Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. *Nature*, 245(5425):380–382, Oct 1973.
- S. M. Block, L. S. Goldstein, und B. J. Schnapp. Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature*, 348(6299):348–52, 1990. 0028-0836 (Print) Journal Article.
- G. S. Bloom, M. C. Wagner, K. K. Pfister, und S. T. Brady. Native structure and physical properties of bovine brain kinesin and identification of the atp-binding subunit polypeptide. *Biochemistry*, 27(9):3409–3416, May 1988.
- P. D. Boyer. A perspective of the binding change mechanism for atp synthesis. *FASEB J*, 3(10):2164–2178, Aug 1989.
- S. T. Brady. A novel brain atpase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature*, 317(6032):73–75, 1985.
- P. Burkhard, J. Stetefeld, und S. V. Strelkov. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol*, 11(2):82–88, Feb 2001.
- N. J. Carter und R. A. Cross. Mechanics of the kinesin step. *Nature*, 435(7040):308–312, May 2005.
- R. B. Case, S. Rice, C. L. Hart, B. Ly, und R. D. Vale. Role of the kinesin neck linker and catalytic core in microtubule-based motility. *Curr Biol*, 10(3):157–160, Feb 2000.
- Anabel E-M Clemen, Mojca Vilfan, Johann Jaud, Junshan Zhang, Michael Bärman, und Matthias Rief. Force-dependent stepping kinetics of myosin-v. *Biophys J*, 88(6):4402–4410, Jun 2005.
- D. L. Coy, W. O. Hancock, M. Wagenbach, und J. Howard. Kinesin’s tail domain is an inhibitory regulator of the motor domain. *Nat Cell Biol*, 1(5):288–92, 1999. 1465-7392 (Print) Journal Article.

- I. Crevel, N. Carter, M. Schliwa, und R. Cross. Coupled chemical and mechanical reaction steps in a processive neurospora kinesin. *EMBO J*, 18(21):5863–5872, Nov 1999.
- I. M. Crevel, A. Lockhart, und R. A. Cross. Weak and strong states of kinesin and ncd. *J Mol Biol*, 257(1):66–76, Mar 1996.
- F. C. H. Crick. The packing of alpha-helices: simple coiled coils. *Acta Crystallographica*, 6:689–697, 1953.
- R. A. Cross. Molecular motors: Walking talking heads. *Curr Biol*, 9(22):R854–R856, Nov 1999.
- R. A. Cross, I. Crevel, N. J. Carter, M. C. Alonso, K. Hirose, und L. A. Amos. The conformational cycle of kinesin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 355(1396):459–464, Apr 2000.
- J. L. Cyr, K. K. Pfister, G. S. Bloom, C. A. Slaughter, und S. T. Brady. Molecular genetics of kinesin light chains: generation of isoforms by alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(22):10114–10118, Nov 1991.
- Elise M Dagenbach und Sharyn A Endow. A new kinesin tree. *J Cell Sci*, 117(Pt 1):3–7, Jan 2004.
- M. de Cuevas, T. Tao, und L. S. Goldstein. Evidence that the stalk of drosophila kinesin heavy chain is an alpha-helical coiled coil. *J Cell Biol*, 116(4):957–965, Feb 1992.
- R. A. de Graaf, A. van Kranenburg, und K. Nicolay. In vivo (31)p-nmr diffusion spectroscopy of atp and phosphocreatine in rat skeletal muscle. *Biophys J*, 78(4):1657–1664, Apr 2000.
- R. J. Diefenbach, J. P. Mackay, P. J. Armati, und A. L. Cunningham. The c-terminal region of the stalk domain of ubiquitous human kinesin heavy chain contains the binding site for kinesin light chain. *Biochemistry*, 37(47):16663–16670, Nov 1998.
- J. T. Finer, R. M. Simmons, und J. A. Spudich. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometer steps. *Nature*, 368:113–119, 1994.
- Michael E Fisher und Young C Kim. Kinesin crouches to sprint but resists pushing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(45):16209–16214, Nov 2005.

- D. S. Friedman und R. D. Vale. Single-molecule analysis of kinesin motility reveals regulation by the cargo-binding tail domain. *Nat Cell Biol*, 1(5):293–7, 1999. 1465-7392 (Print) Journal Article.
- Florian Fuchs und Benedikt Westermann. Role of unc104/kif1-related motor proteins in mitochondrial transport in *neurospora crassa*. *Mol Biol Cell*, 16(1): 153–161, Jan 2005.
- A. K. Gauger und L. S. Goldstein. The drosophila kinesin light chain. primary structure and interaction with kinesin heavy chain. *J Biol Chem*, 268(18):13657–13666, Jun 1993.
- I. R. Gibbons. Chemical dissection of cilia. *Arch. Biol. (Liege)*, 76:317–352, 1965.
- F. Gittes, B. Mickey, J. Nettleton, und J. Howard. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J Cell Biol*, 120(4):923–934, Feb 1993.
- L. S. Goldstein. Molecular motors: from one motor many tails to one motor many tales. *Trends Cell Biol*, 11(12):477–482, Dec 2001.
- J.P. Gordon. Radiation forces and momenta in dielectric media. *Phys.Rev. A*, 8: 14–21, 1973.
- M. Grummt, G. Woehlke, U. Henningsen, S. Fuchs, M. Schleicher, und M. Schliwa. Importance of a flexible hinge near the motor domain in kinesin-driven motility. *EMBO J*, 17(19):5536–5542, Oct 1998.
- D. D. Hackney. Evidence for alternating head catalysis by kinesin during microtubule-stimulated atp hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(15):6865–6869, Jul 1994.
- D. D. Hackney, J. D. Levitt, und J. Suhan. Kinesin undergoes a 9 s to 6 s conformational transition. *J Biol Chem*, 267(12):8696–8701, Apr 1992.
- David D Hackney. Pathway of adp-stimulated adp release and dissociation of tethered kinesin from microtubules. implications for the extent of processivity. *Biochemistry*, 41(13):4437–4446, Apr 2002.
- W. O. Hancock und J. Howard. Processivity of the motor protein kinesin requires two heads. *J Cell Biol*, 140(6):1395–1405, Mar 1998.
- W. O. Hancock und J. Howard. Kinesin’s processivity results from mechanical and chemical coordination between the atp hydrolysis cycles of the two motor domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(23):13147–13152, Nov 1999.

- P. B. Harbury, J. J. Plecs, B. Tidor, T. Alber, und P. S. Kim. High-resolution protein design with backbone freedom. *Science*, 282(5393):1462–1467, Nov 1998.
- U. Henningsen und M. Schliwa. Reversal in the direction of movement of a molecular motor. *Nature*, 389(6646):93–6, 1997. 0028-0836 (Print) Journal Article.
- N. Hirokawa. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*, 279(5350):519–526, Jan 1998.
- N. Hirokawa, K. K. Pfister, H. Yorifuji, M. C. Wagner, S. T. Brady, und G. S. Bloom. Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration. *Cell*, 56(5):867–878, Mar 1989.
- A. Hoenger, S. Sack, M. Thormählen, A. Marx, J. Müller, H. Gross, und E. Mandelkow. Image reconstructions of microtubules decorated with monomeric and dimeric kinesins: comparison with x-ray structure and implications for motility. *J Cell Biol*, 141(2):419–430, Apr 1998.
- J. Howard. The movement of kinesin along microtubules. *Annu Rev Physiol*, 58:703–729, 1996.
- J. Howard, A. J. Hudspeth, und R. D. Vale. Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature*, 342(6246):154–158, Nov 1989.
- Jonathon Howard. *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 2001.
- Wei Hua, Johnson Chung, und Jeff Gelles. Distinguishing inchworm and hand-over-hand processive kinesin movement by neck rotation measurements. *Science*, 295(5556):844–848, Feb 2002.
- 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(6716):267–270, Jan 1999.
- A. J. Hunt und J. Howard. Kinesin swivels to permit microtubule movement in any direction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(24):11653–11657, Dec 1993.
- 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(2):161–71, 1998. 0092-8674 (Print) Journal Article.
- J.D. Jackson. *Classical Electrodynamics, 2nd ed.* Wiley, New Your, NY, 1975.

- Johann Jaud, Friederike Bathe, Manfred Schliwa, Matthias Rief, und Günther Woehlke. Flexibility of the neck domain enhances kinesin-1 motility under load. *Biophys J*, 91(4):1407–1412, Aug 2006.
- A. Kallipolitou. *Charakterisierung von Domänen des schnellen konventionellen Kinesins aus Neurospora crassa mit Hilfe C-terminal verkürzter und chimärer Mutanten*. PhD thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2002.
- A. Kallipolitou, D. Deluca, U. Majdic, S. Lakamper, R. Cross, E. Meyhofer, L. Moroder, M. Schliwa, und G. Woehlke. Unusual properties of the fungal conventional kinesin neck domain from neurospora crassa. *Embo J*, 20(22):6226–35, 2001. 0261-4189 (Print) Journal Article.
- Jacob Kerssemakers, Jonathon Howard, Henry Hess, und Stefan Diez. The distance that kinesin-1 holds its cargo from the microtubule surface measured by fluorescence interference contrast microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(43):15812–15817, Oct 2006.
- M. Kikkawa, Y. Okada, und N. Hirokawa. 15 Å resolution model of the monomeric kinesin motor, kif1a. *Cell*, 100(2):241–252, Jan 2000.
- J. Kirchner, S. Seiler, S. Fuchs, und M. Schliwa. Functional anatomy of the kinesin molecule in vivo. *EMBO J*, 18(16):4404–4413, Aug 1999a.
- J. Kirchner, G. Woehlke, und M. Schliwa. Universal and unique features of kinesin motors: insights from a comparison of fungal and animal conventional kinesins. *Biol Chem*, 380(7-8):915–921, 1999b.
- F. Kozielski, S. Sack, A. Marx, M. Thormählen, E. Schönbrunn, V. Biou, A. Thompson, E. M. Mandelkow, und E. Mandelkow. The crystal structure of dimeric kinesin and implications for microtubule-dependent motility. *Cell*, 91(7):985–994, Dec 1997.
- F. J. Kull, E. P. Sablin, R. Lau, R. J. Fletterick, und R. D. Vale. Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature*, 380(6574):550–555, Apr 1996.
- U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–685, Aug 1970.
- Stefan Lakämper, Athina Kallipolitou, Günther Woehlke, Manfred Schliwa, und Edgar Meyhöfer. Single fungal kinesin motor molecules move processively along microtubules. *Biophys J*, 84(3):1833–1843, Mar 2003.

- Carolyn J Lawrence, R. Kelly Dawe, Karen R Christie, Don W Cleveland, Scott C Dawson, Sharyn A Endow, Lawrence S B Goldstein, Holly V Goodson, Nobutaka Hirokawa, Jonathon Howard, Russell L Malmberg, J. Richard McIntosh, Harukata Miki, Timothy J Mitchison, Yasushi Okada, Anireddy S N Reddy, William M Saxton, Manfred Schliwa, Jonathan M Scholey, Ronald D Vale, Claire E Walczak, und Linda Wordeman. A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol*, 167(1):19–22, Oct 2004.
- R. J. Lye, M. E. Porter, J. M. Scholey, und J. R. McIntosh. Identification of a microtubule-based cytoplasmic motor in the nematode *c. elegans*. *Cell*, 51(2):309–318, Oct 1987.
- Y. Z. Ma und E. W. Taylor. Kinetic mechanism of kinesin motor domain. *Biochemistry*, 34(40):13233–13241, Oct 1995.
- E. Mandelkow und K. A. Johnson. The structural and mechanochemical cycle of kinesin. *Trends Biochem Sci*, 23(11):429–433, Nov 1998.
- E. M. Mandelkow, M. Herrmann, und U. Ruhl. Tubulin domains probed by limited proteolysis and subunit-specific antibodies. *J Mol Biol*, 185(2):311–27, 1985. 0022-2836 (Print) Journal Article.
- Ryo Nitta, Masahide Kikkawa, Yasushi Okada, und Nobutaka Hirokawa. Kif1a alternately uses two loops to bind microtubules. *Science*, 305(5684):678–683, Jul 2004.
- Y. Okada und N. Hirokawa. Mechanism of the single-headed processivity: diffusional anchoring between the k-loop of kinesin and the c terminus of tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(2):640–645, Jan 2000.
- Y. Okada und N. Hirokawa. A processive single-headed motor: kinesin superfamily protein kif1a. *Science*, 283(5405):1152–1157, Feb 1999.
- D. W. Pierce, N. Hom-Booher, A. J. Otsuka, und R. D. Vale. Single-molecule behavior of monomeric and heteromeric kinesins. *Biochemistry*, 38(17):5412–5421, Apr 1999.
- S. Rice, A. W. Lin, D. Safer, C. L. Hart, N. Naber, B. O. Carragher, S. M. Cain, E. Pechatnikova, E. M. Wilson-Kubalek, M. Whittaker, E. Pate, R. Cooke, E. W. Taylor, R. A. Milligan, und R. D. Vale. A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature*, 402(6763):778–784, Dec 1999.
- S. Rice, Y. Cui, C. Sindelar, N. Naber, M. Matuska, R. Vale, und R. Cooke. Thermodynamic properties of the kinesin neck-region docking to the catalytic core. *Biophys J*, 84(3):1844–1854, Mar 2003.

- L. Romberg, D. W. Pierce, und R. D. Vale. Role of the kinesin neck region in processive microtubule-based motility. *J Cell Biol*, 140(6):1407–1416, Mar 1998.
- Steven S Rosenfeld, Polly M Fordyce, Geraldine M Jefferson, Peter H King, und Steven M Block. Stepping and stretching. how kinesin uses internal strain to walk processively. *J Biol Chem*, 278(20):18550–18556, May 2003.
- S. Sack, J. Müller, A. Marx, M. Thormählen, E. M. Mandelkow, S. T. Brady, und E. Mandelkow. X-ray structure of motor and neck domains from rat brain kinesin. *Biochemistry*, 36(51):16155–16165, Dec 1997.
- W. R. Schief und J. Howard. Conformational changes during kinesin motility. *Curr Opin Cell Biol*, 13(1):19–28, Feb 2001.
- Manfred Schliwa, editor. *Molecular Motors*. Wiley-VCH, 2003.
- B. J. Schnapp, R. D. Vale, M. P. Sheetz, und T. S. Reese. Single microtubules from squid axoplasm support bidirectional movement of organelles. *Cell*, 40(2):455–462, Feb 1985.
- Bruce J Schnapp. Trafficking of signaling modules by kinesin motors. *J Cell Sci*, 116(Pt 11):2125–2135, Jun 2003.
- Conrad L Schoch, James R Aist, Olen C Yoder, und B. Gillian Turgeon. A complete inventory of fungal kinesins in representative filamentous ascomycetes. *Fungal Genet Biol*, 39(1):1–15, Jun 2003.
- S. Seiler, F. E. Nargang, G. Steinberg, und M. Schliwa. Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *neurospora crassa*. *EMBO J*, 16(11):3025–3034, Jun 1997.
- S. Seiler, J. Kirchner, C. Horn, A. Kallipolitou, G. Woehlke, und M. Schliwa. Cargo binding and regulatory sites in the tail of fungal conventional kinesin. *Nat Cell Biol*, 2(6):333–8, 2000. 1465-7392 (Print) Journal Article.
- M. P. Sheetz. Laser tweezers in cell biology. introduction. *Methods Cell Biol*, 55:xi–xii, 1998. 0091-679X (Print) Journal Article.
- M. Silverman und M. Simon. Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature*, 249(452):73–74, May 1974.
- Charles V Sindelar, Mary Jane Budny, Sarah Rice, Nariman Naber, Robert Fletcher, und Roger Cooke. Two conformations in the human kinesin power stroke defined by x-ray crystallography and epr spectroscopy. *Nat Struct Biol*, 9(11):844–848, Nov 2002.

- Y. H. Song, A. Marx, J. Müller, G. Woehlke, M. Schliwa, A. Krebs, A. Hoenger, und E. Mandelkow. Structure of a fast kinesin: implications for atpase mechanism and interactions with microtubules. *EMBO J*, 20(22):6213–6225, Nov 2001.
- J. A. Spudich. How molecular motors work. *Nature*, 372(6506):515–518, Dec 1994.
- G. Steinberg und M. Schliwa. The neurospora organelle motor: a distant relative of conventional kinesin with unconventional properties. *Mol Biol Cell*, 6(11):1605–18, 1995. 1059-1524 (Print) Journal Article.
- G. Steinberg und M. Schliwa. Characterization of the biophysical and motility properties of kinesin from the fungus neurospora crassa. *J Biol Chem*, 271(13):7516–7521, Mar 1996.
- J. Stetefeld, M. Jenny, T. Schulthess, R. Landwehr, J. Engel, und R. A. Kammerer. Crystal structure of a naturally occurring parallel right-handed coiled coil tetramer. *Nat Struct Biol*, 7(9):772–776, Sep 2000.
- M. F. Stock, J. Guerrero, B. Cobb, C. T. Eggers, T. G. Huang, X. Li, und D. D. Hackney. Formation of the compact conformer of kinesin requires a cooh-terminal heavy chain domain and inhibits microtubule-stimulated atpase activity. *J Biol Chem*, 274(21):14617–23, 1999. 0021-9258 (Print) Journal Article.
- J. Y. Su, R. S. Hodges, und C. M. Kay. Effect of chain length on the formation and stability of synthetic alpha-helical coiled coils. *Biochemistry*, 33(51):15501–10, 1994. 0006-2960 (Print) Journal Article.
- K. Svoboda und S. M. Block. Biological applications of optical forces. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 23:247–285, 1994a.
- K. Svoboda und S. M. Block. Biological applications of optical forces. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 23:247–85, 1994b. 1056-8700 (Print) Journal Article Review.
- M. Thormählen, A. Marx, S. Sack, und E. Mandelkow. The coiled-coil helix in the neck of kinesin. *J Struct Biol*, 122(1-2):30–41, 1998.
- K. S. Thorn, J. A. Ubersax, und R. D. Vale. Engineering the processive run length of the kinesin motor. *J Cell Biol*, 151(5):1093–1100, Nov 2000.
- M. Tomishige und R. D. Vale. Controlling kinesin by reversible disulfide cross-linking. identifying the motility-producing conformational change. *J Cell Biol*, 151(5):1081–1092, Nov 2000.

- B. Tripet, R. D. Vale, und R. S. Hodges. Demonstration of coiled-coil interactions within the kinesin neck region using synthetic peptides. implications for motor activity. *J Biol Chem*, 272(14):8946–8956, Apr 1997.
- R. D. Vale und R. A. Milligan. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science*, 288(5463):88–95, Apr 2000.
- R. D. Vale, T. S. Reese, und M. P. Sheetz. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell*, 42(1):39–50, Aug 1985.
- 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(3):1424–1438, Sep 1998.
- Claudia Veigel, Justin E Molloy, Stephan Schmitz, und John Kendrick-Jones. Load-dependent kinetics of force production by smooth muscle myosin measured with optical tweezers. *Nat Cell Biol*, 5(11):980–986, Nov 2003.
- K. J. Verhey, D. Meyer, R. Deehan, J. Blenis, B. J. Schnapp, T. A. Rapoport, und B. Margolis. Cargo of kinesin identified as jip scaffolding proteins and associated signaling molecules. *J Cell Biol*, 152(5):959–970, Mar 2001.
- K. Visscher und S. M. Block. Versatile optical traps with feedback control. *Methods Enzymol*, 298:460–89, 1998. 0076-6879 (Print) Journal Article.
- K. Visscher, M. J. Schnitzer, und S. M. Block. Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. *Nature*, 400(6740):184–189, Jul 1999.
- M. D. Wang, M. J. Schnitzer, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, und S. M. Block. Force and velocity measured for single molecules of rna polymerase. *Science*, 282(5390):902–907, Oct 1998.
- Z. Wang und M. P. Sheetz. The c-terminus of tubulin increases cytoplasmic dynein and kinesin processivity. *Biophys J*, 78(4):1955–1964, Apr 2000.
- G. Woehlke und M. Schliwa. Walking on two heads: the many talents of kinesin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(1):50–58, Oct 2000.
- Ahmet Yildiz, Michio Tomishige, Ronald D Vale, und Paul R Selvin. Kinesin walks hand-over-hand. *Science*, 303(5658):676–678, Jan 2004.
- E. C. Young, H. K. Mahtani, und J. Gelles. One-headed kinesin derivatives move by a nonprocessive, low-duty ratio mechanism unlike that of two-headed kinesin. *Biochemistry*, 37(10):3467–3479, Mar 1998.

Vielen Dank...

...an alle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ganz besonders möchte ich mich bedanken bei:

Meinem Doktorvater **Prof. Dr. Matthias Rief**, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mir die Durchführung dieser Arbeit in so ausgezeichneter Atmosphäre ermöglichte.

Dr. Günther Woehlke für die zahlreichen anregenden wissenschaftlichen Diskussionen und die hervorragende Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Manfred Schliwa für sein Interesse an meiner Arbeit, die wertvollen Tipps und Anregungen und nicht zuletzt auch für die Gastfreundschaft, die mir an seinem Institut zuteil wurde.

Melanie Reisinger und J. Christof M. Gebhardt für die freundschaftliche Zusammenarbeit in der „Trapping Crew“, die gute Stimmung, die interessanten Gespräche über Physik und andere Themen, die hilfreichen Anregungen und Vorschläge sowie die in jeder Hinsicht großartige Unterstützung.

Friederike Bathe für ihre Begeisterungsfähigkeit und Ausdauer, als noch kein Motor laufen wollte. Vielen Dank auch für die freundschaftliche Atmosphäre innerhalb und außerhalb des Labors und die gute Laune auch in schweren Stunden.

Sarah Adio und Bettina Ebbing für die konspirativen Treffen, das NcKin-1/3, literweise Kaffee, leckere Mittagessen, die vertrauensvolle Zusammenarbeit und die vielen guten Diskussionen.

Kevin Hermanson und Christian Daniel für die gute Stimmung im Büro und die „Nachhilfe“ in Englisch.

Michael Schlierf für die gute Zusammenarbeit und die wertvollen Anregungen zu dieser Arbeit.

Gabriele Wolf, Thomas Karlstetter, Marion Karlstetter, Katja Kunze-mann und Dietmar Ristow für das Korrekturlesen und die hilfreichen Anmerkungen.

Meiner Familie und meinen Freunden für die liebevolle Unterstützung, die große Geduld und den Rückhalt, auf den ich mich immer verlassen konnte.