

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Physik-Department, Lehrstuhl für Biophysik E22

Mechanische Untersuchungen heterodimerer Kinesin-2 Motoren

Melanie Deborah Brunnbauer

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

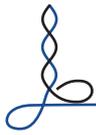
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Martin Zacharias

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Matthias Rief
2. Univ.-Prof. Dr. Manfred Schliwa,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 30.03.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 20.10.2011 angenommen.



Dissertation am Department Physik

Mechanische Untersuchungen heterodimerer Kinesin-2 Motoren

vorgelegt von
Melanie Deborah Brunnbauer

durchgeführt am Lehrstuhl für Biophysik (E22)
unter Betreuung von Prof. Dr. Matthias Rief

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	xi
1 Einleitung	1
2 Die Kinesin-2 Familie	3
2.1 Der Aufbau von Zilien durch Intraflagellaren Transport	3
2.2 Die Architektur heterodimerer Kinesin-2 Motoren	4
2.3 Prozessivität und Auto-Inhibierung	6
2.4 Fragestellungen im Rahmen dieser Arbeit	6
3 Experimentelle Grundlagen	9
3.1 Überblick	9
3.2 Untersuchung der Prozessivität	9
3.2.1 Motilitätsversuche	9
3.2.2 Verdünnungsexperimente	10
3.3 Kraftspektroskopie an prozessiven Motoren mit der optischen Pinzette . .	13
3.3.1 Konstante Position	13
3.3.2 Konstante Kraft	13
3.4 Untersuchung des ungehinderten Transports	15
3.4.1 Hintergrund	15
3.4.2 Die Architektur von Mikrotubuli	15
3.4.3 Die Hantelkonfiguration	17
4 Prozessivität und Auto-Inhibierung des heterodimeren Kinesin-2 aus <i>C. elegans</i>	19
4.1 Überblick	19
4.2 Design und Expression des KLP11/KLP20 Konstrukts und einer deregulierten Mutante	19
4.3 Ergebnisse	20
4.3.1 Motilität	20
4.3.2 Verdünnungsverhalten	21
4.3.3 Kraft, Lauflänge und Geschwindigkeit einzelner Moleküle	23
4.3.4 Schrittgröße und Analyse der Verweildauern	25
4.4 Diskussion	29
4.4.1 Prozessivität	29
4.4.2 Auto-Inhibierung	31
5 Die Bedeutung der Heterodimerisierung	35
5.1 Überblick	35
5.2 Design und Expression von chimären Kinesin-2 Konstrukten	35

5.3	Ergebnisse	36
5.3.1	Motilität der chimären Motorkonstrukte	36
5.3.2	Die (Un-)Prozessivität der chimären Motorkonstrukte	36
5.3.3	Aufhebung der Auto-Inhibierung bei den chimären Motoren	42
5.4	Diskussion	42
5.4.1	KLP20 ist notwendig für die Prozessivität von KLP11/KLP20	42
5.4.2	KLP11 ist notwendig für die Auto-Inhibierung von KLP11/KLP20	44
5.4.3	Die Bedeutung der Heterodimerisierung für die Funktionalität von KLP11/KLP20	45
6	Einfluss der Nackenstruktur auf den Pfad von Kinesin-Motoren	47
6.1	Überblick	47
6.2	Ergebnisse	48
6.2.1	Etablierung der Hantelgeometrie	48
6.2.2	Spiralisierungsverhalten heterodimerer Kinesin-2 Motoren	51
6.2.3	Spiralisierungsverhalten der "homodimeren" Chimären von KLP11/20	56
6.2.4	Die Stielregion bestimmt Spiralisierung von Kinesin-2 Motoren	56
6.2.5	Gezielte Manipulation des Spiralisierungsverhaltens durch eine flexible Nackenstruktur	59
6.3	Diskussion	61
6.3.1	Korrelation zwischen Spiralisierung und Prozessivität	62
6.3.2	Die Nackendomäne determiniert den Pfad prozessiver Kinesin-Motoren	62
6.3.3	Modellierung des Spiralisierungsverhaltens	64
6.3.4	Vergleich mit Dynein und Myosin	66
6.3.5	Mögliche Bedeutung der Spiralisierung	68
7	Schlussfolgerungen und Ausblick	69
7.1	Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse	69
7.2	Weiterführende Experimente	70
7.2.1	Prozessivität und Auto-Inhibierung anderer heterodimerer Kinesin-2 Motoren	70
7.2.2	Validierung des Modells für die Spiralisierung von Kinesin-2 Motoren	71
7.2.3	<i>Tight-Coupling</i> für Kinesin-2 Motoren	72
7.2.4	Erweiterung des Rotationsexperiments auf Mikrotubuli-Dubletten	73
7.2.5	Motorkoordination von KLP11/KLP20 mit OSM3	73
	Anhang	74
A	Material und Methoden für Experimente mit Kinesin	75
A.1	Verwendete Materialien	75
A.1.1	Kinesin-Konstrukte	75
A.1.2	Mikrotubuli	75
A.1.3	Puffer und Stocklösungen	75
A.1.4	Funktionalisierte Kugeln	77

A.2	Experimenteller Aufbau und verwendete Programme	77
A.3	Messprotokolle und Datenanalyse	77
A.3.1	Motilitätsversuche	77
A.3.2	Verdünnungsexperimente und SMWF	78
A.3.3	Lauflänge und Geschwindigkeit einzelner Motoren	79
A.3.4	Schrittgrößen und Verweildauern	79
A.3.5	Messungen in der Hantelkonfiguration	80
B	Sequenzvergleiche heterodimerer Kinesin-2 Motoren	85
C	Ergänzende Daten zu den Messungen in der Hantelgeometrie	89
C.1	Spiralisierungsverhalten der heterodimeren Kinesin-2 Motoren	89
C.2	Spiralisierungsverhalten der chimären KLP11/KLP20-Konstrukte	90
C.3	Spiralisierungsverhalten der KIF-KLP Chimären	91
C.4	Spiralisierungsverhalten der <i>Hs</i> KHC-Konstrukte	92
	Literaturverzeichnis	95

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung des Intraflagellaren Transports	4
2.2	Struktur heterodimerer Kinesin-2 Motoren	5
2.3	Prozessivität und Auto-Inhibierung von Kinesin-Motoren	7
3.1	Theoretischer Verlauf von Verdünnungskurven für prozessive und unprozessive Motoren	12
3.2	Kraftspektroskopie an molekularen Motoren mit der optischen Pinzette . .	14
3.3	Struktureller Aufbau eines Mikrotubulus	16
3.4	Schematische Darstellung der Hantelkonfiguration	17
4.1	Design der heterodimeren Kinesin-2 Konstrukte aus <i>C. elegans</i>	20
4.2	Motilitätsversuch mit KLP11/KLP20 unter geringen Oberflächendichten .	21
4.3	Verdünnungskurven von KLP11/KLP20 und KLP11 ^{EE} /KLP20 ^{EE}	22
4.4	Läufe eines KLP11 ^{EE} /KLP20 ^{EE} Moleküls bei konstanter Fallenposition .	24
4.5	Kraftabhängigkeit der Lauflänge und Geschwindigkeit einzelner KLP11 ^{EE} /KLP20 ^{EE} Motoren	24
4.6	Beispielhafte Schrittkurven von KLP11/KLP20 und KLP11 ^{EE} /KLP20 ^{EE} .	25
4.7	Beispielkurven für das Hinkverhalten von heterodimerem Kinesin-2	27
4.8	Analyse des Hinkverhaltens von heterodimerem Kinesin-2	28
4.9	Mikrotubuli-stimulierte ATPase-Aktivität der heterodimeren Kinesin-2 Konstrukte und isolierten KLP11- bzw. KLP20-Motordomänen	32
4.10	Motilitätsversuch mit KRP85 ^{EE} /KRP95 ^{EE} unter geringen Oberflächendichten	33
5.1	Design der chimären <i>C. elegans</i> Kinesin-2 Konstrukte	36
5.2	Verdünnungsverhalten und beispielhafte Schrittkurven von KLP20/11 ^{SW} und KLP20/20	38
5.3	Konzentrationsabhängigkeit des Laufverhaltens von KLP11/11 und KLP11 ^{EE} /11 ^{EE}	40
5.4	Schwellwert-abhängige Verdünnungskurven für KLP11/11	40
5.5	Vergleich der kraftabhängigen Lauflängen von KLP11 ^{EE} /KLP20 ^{EE} mit KLP20 ^{EE} /20 ^{EE}	41
5.6	SMWF der chimären Kinesin-2 Konstrukte	43
5.7	Kombination von prozessiven und unprozessiven Untereinheiten zu prozessiven Motoren	44
5.8	Mikrotubuli-stimulierte ATPase-Aktivität der chimären Kinesin-2 Konstrukte	45
5.9	ATPase-Aktivität von heterodimerem Kinesin-2 mit vertauschten Motor-domänen	45

5.10	Selektion von KLP11/KLP20 nach den Kriterien KAP-Bindung, Prozessivität und Auto-Inhibierung	46
6.1	Bewegung von <i>DmKHC</i> entlang aufgespannter Mikrotubuli	49
6.2	Ganghöhen von <i>DmKHC</i> auf verschiedenen Mikrotubuli-Brücken	50
6.3	Verdrillung eines aufgespannten Mikrotubulus	51
6.4	Spiralisierung heterodimerer Kinesin-2 Motoren um Mikrotubuli	54
6.5	Ganghöhen heterodimerer Kinesin-2 Motoren auf verschiedenen Mikrotubuli	54
6.6	Beobachtete Ganghöhen in Abhängigkeit von der Anzahl der Protofilamente	55
6.7	Spiralisierungsverhalten der "homodimeren" Chimären von KLP11/20	57
6.8	Spiralisierungsverhalten der Chimären aus KIF3a/KIF3b und KLP11/KLP20	58
6.9	<i>HsKHC</i> -Konstrukte mit flexibler, schaltbarer Nackendomäne	60
6.10	Spiralisierungsverhalten der <i>HsKHC</i> -Konstrukte	61
6.11	Modell für Spiralisierungsverhalten	64
6.12	Monte-Carlo-Simulation des Spiralisierungsverhalten	67
7.1	Spiralisierungsverhalten von OSM3.	73
A.1	Die automatisierte Schritterkennungsfunktion	81
A.2	Analyse der Spiralbewegung in der Hantelkonfiguration	83
B.1	Sequenzabgleich der Motordomänen der heterodimeren Kinesin-2 Motoren	86
B.2	Sequenzabgleich der Stielregionen der heterodimeren Kinesin-2 Motoren	87
C.1	Ganghöhen auf verschiedenen Mikrotubuli für die chimären Motorkonstrukte und <i>HsKHC</i> -basierten Konstrukte	93

Tabellenverzeichnis

2.1	Sequenzvergleich der Untereinheiten heterodimerer Kinesin-2 Motoren . . .	5
4.1	Motilitätsversuche mit KLP11/KLP20 und KLP11 ^{EE} /KLP20 ^{EE}	21
4.2	Hinkfaktoren für KLP11/KLP20 und KLP11 ^{EE} /KLP20 ^{EE}	28
5.1	Molekulargewichte der chimären <i>C. elegans</i> Kinesin-2 Konstrukte	37
5.2	Motilitätsversuche mit chimären <i>C. elegans</i> Kinesin-2 Konstrukten	37
6.1	Spiralisierungsverhalten von <i>Dm</i> KHC	51
6.2	Design und Motilität heterodimerer Kinesin-2 Motoren aus verschiedenen Organismen.	52
6.3	Beobachtete und Supertwist-bereinigte Ganghöhen von Kinesin-Motoren .	53
6.4	Motilitätsversuche mit chimären KIF-KLP Motoren	57
6.5	Motilitätsversuche mit Kinesin-1 Konstrukten	60
A.1	Kugelanbindungen für Experimente in der Hantelgeometrie	82
B.1	Sequenzvergleich der homologen Untereinheiten heterodimerer Kinesin-2 Motoren (A-Untereinheiten)	85
B.2	Sequenzvergleich der homologen Untereinheiten heterodimerer Kinesin-2 Motoren (B-Untereinheiten)	85
C.1	Spiralisierungsverhalten von KIF3a/KIF3b	89
C.2	Spiralisierungsverhalten von XKLP3a/3b	89
C.3	Spiralisierungsverhalten von KLP11/20	90
C.4	Spiralisierungsverhalten von KRP85/95	90
C.5	Spiralisierungsverhalten von KLP11/11	90
C.6	Spiralisierungsverhalten von KLP20/20(wt)	90
C.7	Spiralisierungsverhalten von KLP20/11 ^{SW}	91
C.8	Spiralisierungsverhalten von KIF-KLP(nl+stiel)	91
C.9	Spiralisierungsverhalten von KIF-KLP(nl)	91
C.10	Spiralisierungsverhalten von KIF-KLP(stiel)	91
C.11	Spiralisierungsverhalten von <i>Hs</i> KHC	92
C.12	Spiralisierungsverhalten von hCys-14GS	92
C.13	Spiralisierungsverhalten von hCys-14GS-X	92

Filmverzeichnis

4.1	KLP11/KLP20-Mot Motilitätsversuch mit KLP11/KLP20 unter geringen Oberflächendichten, 2 mM ATP, Skalenbalken: 2 μm	21
4.2	KRP85 ^{EE} /KRP95 ^{EE} -Mot-1 Motilitätsversuch mit KRP85 ^{EE} /KRP95 ^{EE} unter geringen Oberflächendichten, 1 mM ATP, Skalenbalken: 2 μm	32
4.3	KRP85 ^{EE} /KRP95 ^{EE} -Mot-2 Motilitätsversuch mit KRP85 ^{EE} /KRP95 ^{EE} unter geringen Oberflächendichten, 1 mM ATP, Skalenbalken: 2 μm	32
4.4	KRP85 ^{EE} /KRP95 ^{EE} -Mot-3-1 μM ATP Motilitätsversuch mit KRP85 ^{EE} /KRP95 ^{EE} unter geringen Oberflächendichten, 1 μM ATP, Skalenbalken: 2 μm	32
6.1	DmKHC-Hantelgeometrie <i>Dm</i> KHC-beschichtete Kugeln in der Hantelgeometrie auf zwei verschiedenen Mikrotubuli (14 und 13 Protofilamente), 1 mM ATP, Skalenbalken: 3 μm	48
6.2	KIF3a/3b-Hantelgeometrie KIF3a/3b-beschichtete Kugeln in der Hantelgeometrie auf zwei verschiedenen Mikrotubuli (14 und 13 Protofilamente), 1 mM ATP, Skalenbalken: 3 μm	53
6.3	Kinesin-2-Hantelgeometrie Unterschiedlich stark ausgeprägtes Spiralisierungsverhalten der heterodimeren Kinesin-2 Motoren XKLP3a/3b, KLP11/20 und KRP85/95 in der Hantelgeometrie, 1 mM ATP, Skalenbalken: 3 μm	53
6.4	KLP11/20-Chimären-Hantelgeometrie Spiralisierungsverhalten von KLP11/20 und seiner chimären Motorkonstrukte, 1 mM ATP, Skalenbalken: 3 μm	56
6.5	KIF-KLP-Chimären-Hantelgeometrie Spiralisierungsverhalten der chimären KIF-KLP-Konstrukte, 1 mM ATP, Skalenbalken: 3 μm	58
6.6	Kinesin-1-Nackenkonstrukte-Hantelgeometrie Spiralisierungsverhalten von <i>Hs</i> KHC und der schaltbaren Konstrukte hCys-14GS, hCys-14GS-X. Für <i>Hs</i> KHC und hCys-14GS-X sind jeweils Läufe auf zwei verschiedenen Mikrotubuli gezeigt. 1 mM ATP, Skalenbalken: 3 μm . . .	61

Zusammenfassung

Kinesin-2 Motoren spielen eine zentrale Rolle für den Aufbau von Zilien und sind gemeinsam mit diesen ubiquitären Organellen bereits früh in der Evolution entstanden. Einige Vertreter der Kinesin-2 Familie zeichnen sich durch ihren Aufbau aus zwei verschiedenen katalytischen Untereinheiten aus, wobei die biologische Bedeutung der Heterodimerisierung bislang nicht ergründet ist. Die vorliegende Arbeit analysiert die mechanischen Eigenschaften heterodimerer Kinesin-2 Motoren mittels einer optischen Pinzette. Insbesondere wurde die Vielseitigkeit optischer Pinzetten genutzt, um eine experimentelle Konfiguration zu erzeugen, die die Untersuchung von Kinesin-Motoren frei von Oberflächeninteraktionen erlaubt und so die Gegebenheiten des intrazellulären Transports besser modelliert als bislang etablierte Geometrien. Damit leistet diese Arbeit einen bedeutenden Beitrag zum Verständnis der Funktionsweise der bislang kaum untersuchten heterodimeren Kinesin-2 Motoren.

Am Beispiel von KLP11/KLP20 aus *C. elegans* wurde zunächst der Arbeitsmechanismus eines heterodimeren Kinesin-2 Motors eingehend studiert. Insbesondere wurde erstmals die Regulierung der Motor-Aktivität durch Auto-Inhibierung sowie die prozessive Fortbewegung in sukzessiven 8 nm Schritten für einen Vertreter dieser Kinesin-Familie nachgewiesen. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wenden sich darauf folgende Experimente der Frage zu, ob funktionale Unterschiede zwischen den beiden verschiedenen Untereinheiten von KLP11/KLP20 existieren. Chimäre Motoren mit zwei identischen Motordomänen zeigten, dass Auto-Inhibierung und Prozessivität asymmetrisch auf die beiden Untereinheiten aufgeteilt sind: während die Regulierung durch die unprozessive KLP11-Motordomäne vermittelt wird, kommt erst durch die prozessive, unregulierte KLP20-Motordomäne die Prozessivität des Wildtyp-Motors zustande.

Ein weiterer Satz an Experimenten widmet sich schließlich der Frage, welchen Trajektorien Kinesin-Motoren bei ihrer Fortbewegung auf einem Mikrotubulus folgen und wodurch dieses Verhalten bestimmt ist. Zu diesem Zweck wurde die Bewegung Motor-beschichteter Kugeln entlang frei in Lösung aufgespannter Mikrotubuli analysiert. Im Gegensatz zur bekanntlich geradlinigen Bewegung von Kinesin-1 beschrieben heterodimere Kinesin-2 Motoren aus verschiedenen Organismen eine unterschiedlich stark ausgeprägte, linksgängige Spiralbahn um einen Mikrotubulus. Der Austausch verschiedener Strukturelemente identifizierte die Nackendomäne, welche die beiden Motordomänen miteinander verbindet, als maßgeblichen Faktor. In Bestätigung dieser Hypothese konnte auch das Verhalten von Kinesin-1 gezielt durch die Manipulation der Flexibilität der Nackendomäne beeinflusst werden. Diese Ergebnisse liefern damit eine molekulare Erklärung für das bislang unverstandene Phänomen, warum manche Kinesin-Motoren eine seitwärtsgerichtete Bewegungskomponente besitzen, während sich andere strikt geradlinig fortbewegen.

1 Einleitung

Zielgerichteter Transport ist auf makroskopischer wie mikroskopischer Skala entscheidend für die Funktion biologischer Systeme. Insbesondere innerhalb des komplexen Gefüges einer Zelle, der kleinsten Einheit des Lebens, müssen Frachten effizient an ihren jeweiligen Bestimmungsort befördert werden, um die zeitliche wie räumliche Koordination dicht ineinander verwobener Prozesse zu gewährleisten. Eukaryontische Zellen haben hierfür eine spezielle Infrastruktur entwickelt. Ein wesentlicher Bestandteil des Transportsystems ist das Zytoskelett, das aus den Proteinfilamenten Aktin und Mikrotubuli besteht und die Zelle wie ein Gerüst durchspannt. Diese beiden Filamentarten dienen als Schienensystem für molekulare Motoren aus der Myosin-, Dynein- und Kinesin-Familie, die durch die Hydrolyse von ATP chemisch gespeicherte Energie in eine gerichtete Bewegung umsetzen. Der Aktin-basierte Motor Myosin und das Mikrotubuli-basierte Kinesin sind dabei in erster Linie für den Transport vom Zentrum zur Peripherie der Zelle zuständig, während Dynein den Rücktransport entlang von Mikrotubuli übernimmt.

Obgleich die Motoraktivität von Myosin und Dynein bereits seit Längerem im Zusammenhang mit anderen Bewegungsphänomenen wie der Muskelkontraktion oder dem Schlagen von Zilien und Geißeln bekannt ist, liegt die Entdeckung der intrazellulären Transportmaschinerie weniger als dreißig Jahre zurück und nahm ihren Ausgang in der Identifizierung von Kinesin [11, 88]. Die Anzahl der bekannten Kinesin-Motoren ist seitdem rasant gewachsen, so dass zum heutigen Zeitpunkt eine Einteilung dieser Moleküle in insgesamt 14 verschiedene Familien erfolgt [48]. Neben dem klassischen Transport von Lasten entlang von Mikrotubuli übernehmen Kinesine auch wichtige Funktionen beispielsweise in der Zellteilung oder der Regulation Mikrotubuli-basierter Strukturen. Die Vielfalt an physiologischen Aufgaben spiegelt sich auch in der Vielgestaltigkeit dieser Motoren wider, denn es existieren neben homodimeren auch homotetramere, monomere oder heterodimere Kinesine. Letztere nehmen dabei eine Sonderstellung unter den Kinesin-Motoren ein, da sie zwei unterschiedliche katalytische Untereinheiten besitzen.

Die Familie der Kinesin-2 Motoren, zu der auch die heterodimeren Kinesine gehören, spielt eine wichtige Rolle für den Aufbau von Zilien und Geißeln, die sowohl diverse sensorische als auch bewegungsbezogene Aufgaben erfüllen. Da beinahe alle eukaryontischen Zellen mindestens ein Zilium besitzen, liegt der Schluss nahe, dass sich diese Organellen bereits früh in der Evolution entwickelt haben. Obgleich manche Kinesin-2 Motoren auch Aufgaben im zytoplasmatischen Transport übernehmen, deuten weitere Indizien darauf hin, dass diese Moleküle gemeinsam mit der ziliären Struktur evolviert sind [52]. Es ist daher verlockend, über einen möglichen Zusammenhang zwischen der heterodimeren Struktur dieser Motoren und der speziellen Anordnung von Mikrotubuli in Zilien zu spekulieren.

Modernste optische Methoden mit einem Auflösungsvermögen im Nanometer-Bereich ermöglichen es uns heute, die molekulare Funktionsweise von Motorproteinen immer besser zu verstehen. Als Paradebeispiel für die Klasse der Kinesin-Motoren diene hierbei

bislang die Kinesin-1 Familie, oftmals auch als konventionelles Kinesin bezeichnet, zu der auch das erste identifizierte Kinesin zählt. Dank mannigfacher Untersuchungen an diesem Molekül haben wir heute ein recht detailreiches Bild über seine Struktur und Funktionsweise. Experimente an Motoren anderer Kinesin-Familien, wie beispielsweise der Kinesin-2 Familie sind zum momentanen Zeitpunkt rar, nicht zuletzt, da die erste Herausforderung in der Aufreinigung dieser Motoren in hinreichend guter Qualität besteht.

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal einzelne Moleküle eines heterodimeren Kinesin-2 Motors mithilfe einer optischen Pinzette im Hinblick auf mechanische und regulatorische Eigenschaften untersucht. Insbesondere konnten anhand speziell konzipierter Motorkonstrukte die Beiträge der beiden verschiedenen Untereinheiten auf die Funktion des heterodimeren Motors bestimmt werden. Eine neu etablierte experimentelle Geometrie ermöglichte zudem erstmals die Analyse der Transportwege von Kinesin-Motoren entlang eines in Lösung befindlichen Mikrotubulus. Die Anwendung dieser Geometrie auf heterodimere Kinesin-2 Motoren verschiedener Organismen gibt Aufschluss über die molekulare Basis, die der Bandbreite an beobachteten Trajektorien von Kinesin-Motoren zugrunde liegt.

2 Die Kinesin-2 Familie

2.1 Der Aufbau von Zilien durch Intraflagellaren Transport

Zilien sind antennenartige Ausstülpungen der Zellmembran an der Oberfläche eukaryontischer Zellen und werden abhängig von ihrer Funktion in bewegliche oder primäre Zilien klassifiziert. Bewegliche Zilien, gelegentlich auch als Geißeln bezeichnet, ermöglichen durch ihr Schlagen unter anderem die Fortbewegung eines Spermiums oder erzeugen eine Flüssigkeitsströmung an Oberflächen, wie beispielsweise das Flimmerepithel zur Reinigung der Atemwege. Im Gegensatz dazu erfüllt die unbewegliche primäre Zilie – lange als verkümmerte, funktionslose Struktur verkannt – diverse sensorische Prozesse und spielt unter anderem eine wesentliche Rolle in der embryonalen Entwicklung, wo sie beispielsweise zur Entstehung der Rechts-Links-Asymmetrie beiträgt [29]. Defekte in der ziliären Struktur sind Ursache einer Reihe schwerwiegender Krankheiten wie dem Bardet-Biedel-Syndrom oder der polyzystischen Nierenkrankheit [9, 61].

Kernstück aller Zilien ist das Axonem, eine stabförmige Struktur bestehend aus einer ringförmigen Anordnung von neun Mikrotubuli-Dubletten, kurz 9x2-Anordnung genannt. Bewegliche Zilien und Geißeln besitzen zudem meist ein Paar von einfachen Mikrotubuli im Zentrum. Das Axonem entspringt im Bereich der Übergangszone einem Basalkörper mit einer charakteristischen 9x3-Anordnung. Bei einer Vielzahl von Organismen gehen die Mikrotubuli-Dubletten schließlich in einfache Mikrotubuli über (9x1), so dass diese Zilien zwei strukturell verschiedene Zonen, den mittleren und den distalen Abschnitt, aufweisen (siehe Abb. 2.1 **A** und **B**) [75].

Der Aufbau von Zilien erfolgt durch Intraflagellaren Transport, auch mit IFT abgekürzt. Dieser Prozess wurde 1993 zuerst im Flagellum der Grünalge *C. reinhardtii* beobachtet [46] und umfasst den anterograden Transport, d.h. von der Übergangszone zur Spitze der Zilie, von IFT-Partikeln mittels Kinesin-2 Motoren, sowie den retrograden, Dynein-gestützten Transport zurück zur Übergangszone [68, 73]. Als kanonisches Modellsystem zur Untersuchung von IFT dient das sensorische Neuron des Fadenwurms *C. elegans*. Entlang der Mikrotubuli-Dubletten des mittleren Abschnitts kooperieren das heterotrimere Kinesin-2 KLP11/KLP20/KAP und das homodimere Kinesin-2 OSM3 beim Transport der IFT-Partikel, nach dem Übergang zur einfachen Mikrotubuli Struktur im distalen Segment arbeitet jedoch OSM3 alleine weiter [78]. Beide Kinesin-2 Motoren werden von Dynein (CHE-3) zurück zur Übergangszone transportiert [74] (Abb. 2.1 **C**).

Die Funktion von Kinesin-2 Motoren ist jedoch nicht auf IFT begrenzt, sondern sie übernehmen darüber hinaus auch Aufgaben in anderen Transportprozessen, wie beispielsweise KIF3a/KIF3b als neuronaler Transportmotor in Vertebraten [99], XKLP3a/XKLP3b bei der Melanosomendispersion im Krallenfrosch [85], oder KRP85/KRP95 bei der Mitose von Seeigel-Embryonen [33, 50].

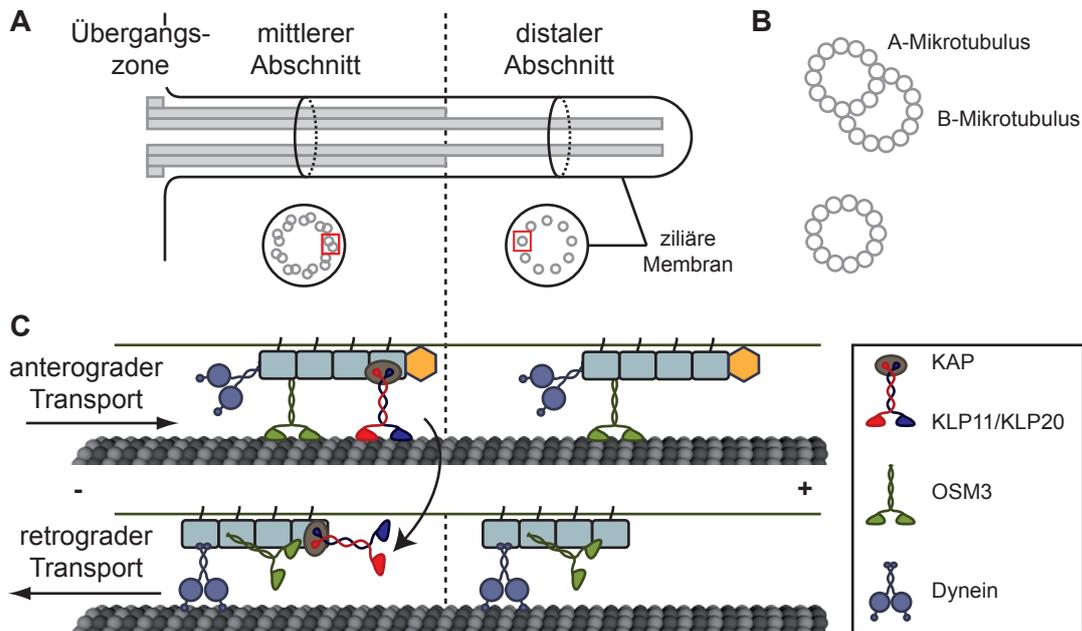


Abbildung 2.1 – Intraflagellarer Transport. **A** Schematische Darstellung eines Zilioms. Die Querschnitte des mittleren und distalen Abschnitts zeigen die Anordnung der Mikrotubuli-Strukturen im Axonem. **B** Anordnung der Protofilamente in Mikrotubuli-Dubletten (oben) und einfachen Mikrotubuli (unten) im Querschnitt (rot markierte Bereiche aus **A**). **C** IFT in *C. elegans*. Insgesamt drei verschiedene Motoren sind in den Transport von IFT-Partikeln (blaugrau) und Lasten (orange) involviert (siehe Text).

2.2 Die Architektur heterodimerer Kinesin-2 Motoren

Kinesin-2 Motoren werden oft auch als heterotrimeren bzw. heterodimeren Kinesine bezeichnet. Die Mehrzahl der Motoren dieser Familie besteht im Gegensatz zu Kinesin-1 aus zwei unterschiedlichen katalytischen Polypeptiden und bildet daher ein funktionelles Heterodimer [21], das mit einer dritten, katalytisch inaktiven Untereinheit (KAP: *kinesin associated protein*) zur Lastenanbindung assoziiert [96, 100]. Es existieren jedoch auch einige homodimeren Kinesin-2 Motoren, wie beispielsweise das im vorherigen Abschnitt erwähnte OSM3.

Die grundlegende Organisation der funktionellen Abschnitte in den katalytischen Untereinheiten von Heterokinesinen ist ähnlich zu Kinesin-1 (Abb. 2.2). Die Motordomänen mit Bindungsstellen für ATP und Mikrotubuli bilden das N-terminale Ende der schweren Ketten, gefolgt vom Necklinker. C-terminal daran schließen die für die Dimerisierung ausschlaggebenden Strukturelemente an: die Nackendomäne, eine (geladene) Scharnierregion und eine ausgedehnte, durch flexible Regionen unterbrochene Coiled-Coil Struktur. Die Bindung von KAP erfolgt an der C-terminalen Schwanzregion [86].

Im Hinblick auf die Verschiedenheit der beiden Untereinheiten von heterodimeren Kinesinen stellt sich die naheliegende Frage, wie stark sich die beiden Polypeptide voneinander unterscheiden. Ein Sequenzabgleich der beiden Untereinheiten von heterodimerem

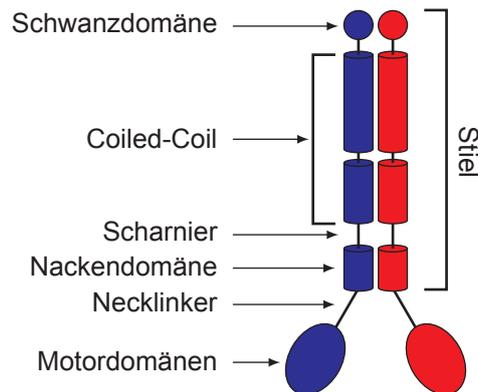


Abbildung 2.2 – Struktur eines heterodimeren Kinesin-2 Motors.

Kinesin-2 verschiedener Organismen zeigt, dass die Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz 34 – 46% beträgt. Unter Berücksichtigung von Positionen, an denen Aminosäuren mit ähnlichen physikalischen Eigenschaften auftreten, erhält man eine Identität/Ähnlichkeit von etwa 60 – 70%. Erwartungsgemäß gleichen sich die Motordomänen als katalytisch aktive Zentren deutlich stärker als die Stieldomänen (55 – 72% Identität bzw. 80 – 90% Identität/Ähnlichkeit, siehe Tabelle 2.1 und Abbildung B.1, B.2 in Anhang B). Die homologen Untereinheiten verschiedener Organismen besitzen konsistent eine größere Ähnlichkeit zueinander als die beiden verschiedenen Polypeptide des Heterodimers (Tab. B.1, B.2).

Organismus	katalytische Untereinheiten	AS	MW (kD)	% Identität	
				komplett	Motordomäne
<i>Mus musculus</i>	KIF3a	701	80	45	67
	KIF3b	747	85		
<i>Xenopus laevis</i>	XKLP3a	699	80	44	66
	XKLP3b	744	85		
<i>Caenorhabditis elegans</i>	KLP20	646	74	34	55
	KLP11	782	89		
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	KRP85	699	79	46	72
	KRP95	742	85		

Tabelle 2.1 – Überblick über die Ähnlichkeit der Untereinheiten heterodimerer Kinesin-2 Motoren aus verschiedenen Organismen. AS: Anzahl der Aminosäuren. MW: Molekulargewicht. *Mus musculus*: Maus, *Xenopus laevis*: Krallenfrosch, *Caenorhabditis elegans*: Fadenwurm, *Strongylocentrotus purpuratus*: Seeigel. Abkürzungen: KIF (*kinesin family*), KLP (*kinesin like protein*), KRP (*kinesin related protein*).

2.3 Prozessivität und Auto-Inhibierung

Kinesine bewegen sich in diskreten Schritten mit einer typischen Schrittweite von 8 nm entlang eines Mikrotubulus fort, wobei pro Schritt ein Molekül ATP hydrolysiert wird [71,82]. Nach dem allgemein akzeptierten *Hand-over-Hand* Modell vertauschen die beiden Motordomänen ihre Position zueinander mit jedem Schritt, so dass der Motor gleichsam auf dem Filament entlang schreitet. Die Vorwärtsbewegung des gesamten Moleküls um 8 nm kommt in diesem Modell durch eine Positionsveränderung der hinteren Motordomäne um 16 nm zustande, da diese die vordere Motordomäne passiert und an die nachfolgende freie Tubulin-Untereinheit desselben Protofilaments bindet (Abb. 2.3 A) [103].

Die Fähigkeit eines Motormoleküls viele aufeinanderfolgende Schritte entlang seines Filaments auszuführen ohne sich von diesem abzulösen, wird als Prozessivität bezeichnet. Beispiele für prozessive Kinesine finden sich in vielen der 14 Kinesin Familien, wobei die Bandbreite der im Mittel zurückgelegten Schritte von einigen hundert für Kinesin-1 und Kip3p (Kinesin-8) bis zu unter zehn für Eg5 (Kinesin-5) reicht [10,90,91]. Nach dem momentanen Stand der Dinge weisen heterodimere Kinesin-2 Motoren aus verschiedenen Organismen eine erstaunliche Variabilität im Hinblick auf prozessive Fortbewegung auf. Während einzelne Moleküle von XKLP3a/XKLP3b und KIF3a/KIF3b in der Lage sind, längere Strecken auf einem Mikrotubulus zurückzulegen [47, 54], konnten für KRP85/KRP95 bislang keine prozessiven Läufe nachgewiesen werden [62]. Für heterodimere Kinesin-2 Motoren existieren bislang lediglich für XKLP3a/XKLP3b Indizien für eine Fortbewegung in sukzessiven 8 nm Schritten, basierend auf der Bewegung von Melanosomen in *in vivo* Experimenten [47]. Eine Analyse der prozessiven Bewegung dieser Motoren unter kontrollierten externen Kräften anhand von *in vitro* Experimenten ähnlich zu Kinesin-1 fehlt bislang völlig.

Um eine unnötige Hydrolyse von ATP zu vermeiden, regulieren Kinesin-Motoren die Aktivität ihrer katalytischen Domänen, solange sie nicht an eine zu transportierende Last gebunden sind [41]. Dies geschieht durch eine direkte Interaktion der Motordomänen mit der Schwanzdomäne, indem sich das Molekül an einer flexiblen Stelle der Stielregion faltet (Abb. 2.3 B) [22,30]. Zahlreiche Beispiele in verschiedenen Kinesin-Familien legen nahe, dass es sich bei dieser Auto-Inhibierung um einen universellen Mechanismus zur Regulierung von Kinesinen handelt [25,32]. Bisher wurde nur für die homodimeren Kinesin-2 Motoren OSM3 und das homologe Protein KIF17 die Existenz eines gefalteten und dabei katalytisch inaktiven Zustands nachgewiesen [31,39]. Ein Hinweis, dass auch heterodimere Kinesin-2 Motoren möglicherweise einen Auto-Inhibierungsmechanismus besitzen, stammt von KRP85/KRP95, das abhängig von der Ionenstärke eine kompakte oder eine ausgestreckte Konformation einnimmt [96]. Es existieren jedoch keinerlei Daten, die einen funktionellen Nachweis für die Existenz eines auto-inhibierten Zustandes für heterodimere Kinesin-2 Motoren erbrächten.

2.4 Fragestellungen im Rahmen dieser Arbeit

Die Untersuchung von molekularen Motoren mit zwei unterschiedlichen Motordomänen ist in mehrerer Hinsicht interessant. Aus mechanistischer Perspektive können solche Heterodimere aufgrund der ihnen inhärenten Asymmetrie Einblick in ihre molekulare Funk-

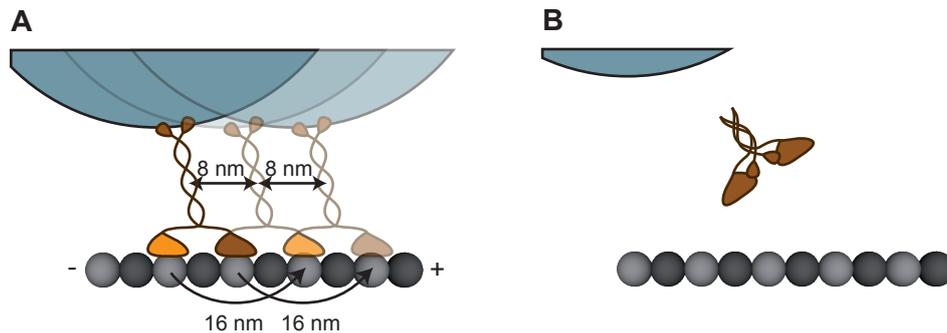


Abbildung 2.3 – Prozessivität und Auto-Inhibierung von Kinesin-Motoren. **A** Prozessive Fortbewegung eines Kinesins nach dem *Hand-over-Hand* Modell entlang der Tubulin-Untereinheiten eines Mikrotubulus (grau). Während die beiden Motordomänen ihre Position abwechselnd um 16 nm in Richtung des Plus-Endes verändern, bewegt sich der Schwerpunkt des Motors nur um 8 nm. Die beiden Motordomänen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit unterschiedlich gefärbt. **B** Ist keine Last (blau) an den Motor gebunden, nimmt dieser eine katalytisch inaktive, gefaltete Konformation ein.

tionsweise geben. So stammt beispielsweise der erste direkte Hinweis für den *Hand-over-Hand* Mechanismus für Kinesin aus Experimenten an einem artifiziellen heterodimeren Kinesin [43]. Die Einführung einer Punktmutation in eine der beiden Motordomänen von konventionellem, homodimeren Kinesin verlangsamte die Kinetik dieser Domäne beträchtlich, so dass ein Alternieren der beiden Motordomänen in der Schrittabfolge deutlich sichtbar wurde. Die nativen heterodimeren Kinesin-2 Motoren sind über den mechanistischen Aspekt hinaus insbesondere reizvoll, da sich hier die Frage stellt, warum die Natur zwei verschiedene katalytische Einheiten zu einer funktionellen Einheit kombiniert.

In einem ersten Satz von Experimenten wird zunächst die Mechanik des heterodimeren Kinesin-2 KLP11/KLP20 studiert. Insbesondere steht dabei die Frage nach der Prozessivität dieses Motors im Mittelpunkt, und ob sich das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen katalytischen Domänen direkt in der schrittweisen Fortbewegung des Motors widerspiegelt. Ausgehend von dieser grundlegenden Charakterisierung wird untersucht, welche Rollen die beiden verschiedenen Untereinheiten für die Funktionsfähigkeit des Heterokinesins spielen. Sind die Untereinheiten äquivalent, oder gibt es funktionelle Unterschiede? Abschließend wird untersucht, entlang welchen Pfades heterodimere Kinesin-2 Motoren ihre Lasten auf frei aufgespannten Mikrotubuli transportieren. Spiegelt sich möglicherweise die Bandbreite der physiologischen Transportaufgaben in verschiedenen Transportpfaden wider?

Auf dem Forschungsgebiet der molekularen Motoren sind optische Pinzetten das ideale Werkzeug, um einzelne Moleküle mechanisch zu charakterisieren. Die Grundlagen der verschiedenen Experimente, die zur Beantwortung der oben stehenden Fragen zum Einsatz kommen, werden im nächsten Kapitel kurz erläutert.

3 Experimentelle Grundlagen

3.1 Überblick

Verschiedene optische Methoden haben sich als wertvolle Techniken für die mechanische Untersuchung molekularer Motoren erwiesen. Mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie kann beispielsweise die Bewegung von Motormolekülen sichtbar gemacht werden, sei es indirekt durch die Beobachtung fluoreszenzmarkierter Filamente auf einer mit Motoren beschichteten Oberfläche oder direkt über einen Fluoreszenzfarbstoff, der am Motormolekül selbst angebracht ist. Um den Arbeitsmechanismus molekularer Motoren unter definierten äußeren Kräften zu untersuchen, hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten die optische Pinzette als das ideale Messinstrument etabliert. Diese Technik nutzt den Impulsübertrag von Licht auf Materie, um mikroskopisch kleine Kugeln in einem stark fokussierten Laserstrahl festzuhalten [6–8]. Für kleine Auslenkungen der Kugeln aus ihrer Ruhelage übt der Laserfokus eine rücktreibende Kraft proportional zur Auslenkung aus und wirkt daher wie eine Hooke'sche Feder. Eine optische Pinzette kann somit als eine Art Lichtbasierte Federwaage verstanden werden, die mit typischen Federkonstanten im Bereich von $0.01 - 0.5 \text{ pN/nm}$ und einer Ortsauflösung im Nanometer-Bereich optimal an die Krafterzeugung und Schrittlänge molekularer Motoren angepasst ist [27, 80].

Sämtliche Experimente dieser Arbeit wurden an einem Aufbau durchgeführt, der eine optische Pinzette mit Fluoreszenzmikroskopie kombiniert (siehe Anhang A). Eine detaillierte Beschreibung des Messaufbaus findet sich in [28].

3.2 Untersuchung der Prozessivität

3.2.1 Motilitätsversuche

In Motilitätsversuchen wird die Bewegung einzelner, fluoreszenzmarkierter Mikrotubuli über eine mit Motoren beschichtete Oberfläche analysiert. Diese Versuche erlauben zunächst die Bestimmung der Qualität und der Geschwindigkeit einer Motoraufreinigung. Bei hohen Besetzungsdichten von Motoren gleiten die Filamente robust über die Oberfläche, wobei sie Strecken zurücklegen, die ein Vielfaches ihrer eigenen Länge betragen. Binden dabei viele kurze Bruchstücke von Mikrotubuli unbeweglich an die Oberfläche, weist dies auf einen signifikanten Anteil von unfunktionalen Motoren hin. Ein Indiz für die prozessive Fortbewegung eines Motors können Motilitätsversuche bei geringen Oberflächenbelegungen liefern, wenn Mikrotubuli über einzelne Ankerpunkte transportiert werden [35].

3.2.2 Verdünnungsexperimente

Prozessive Motoren sind in der Lage als einzelne Moleküle Lasten über weite Strecken zu transportieren ohne sich dabei von ihrem Filament abzulösen. Grundsätzlich können auch unprozessive Motoren Transportprozesse bewerkstelligen, jedoch nur dann, wenn genügend Moleküle daran beteiligt sind. Verdünnungsexperimente geben Aufschluss über die Mindestanzahl von Motoren, die notwendig ist um beispielsweise eine Mikrometergroße Kugel fortzubewegen. Hierzu wird die Dichte der Motormoleküle auf den Kugeln über einen breiten Bereich variiert und unter Zuhilfenahme einer optischen Pinzette getestet, welcher Anteil der Kugeln Aktivität zeigt, d.h. sich entlang eines Mikrotubulus fortbewegt [10]. Der Verlauf dieser Abhängigkeit erlaubt es, eine Aussage über die Prozessivität des untersuchten Motorproteins zu treffen. Im Folgenden werden die theoretischen Grundlagen dieses Experiments kurz vorgestellt.

Poisson-Statistik

Gegeben seien N_M Motoren, die statistisch an N_K Kugeln binden. Unter der Annahme, dass jeder Motor an irgendeine Kugel bindet, beträgt die Wahrscheinlichkeit p für jeden Motor, an eine bestimmte Kugel gebunden zu haben $p = \frac{1}{N_K}$. Gemäß der Binomialverteilung ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Kugel genau k Motoren gebunden hat, gegeben durch

$$P(k) = \binom{N_M}{k} p^k (1-p)^{N_M-k}.$$

Die Anzahl der Motoren und Kugeln liegt typischerweise bei einer Größenordnung von $10^6 - 10^8$ und die Wahrscheinlichkeit p ist demnach sehr gering¹. Die mittlere Anzahl an Motoren pro Kugel ist gegeben durch $\lambda = pN_M$. In diesem Fall kann die Binomialverteilung durch die Poissonverteilung (Statistik der seltenen Ereignisse und großen Stichproben) genähert werden [12]:

$$\begin{aligned} P(k) &= \binom{N_M}{k} p^k (1-p)^{N_M-k} \\ &= \frac{N_M!}{(N_M-k)!k!} p^k (1-p)^{N_M-k} \\ &= \frac{N_M(N_M-1)\dots(N_M-k+1)}{k!} \left(\frac{\lambda}{N_M}\right)^k \left(1 - \frac{\lambda}{N_M}\right)^{N_M-k} \\ &= \underbrace{\left(1 - \frac{1}{N_M}\right) \dots \left(1 - \frac{k-1}{N_M}\right)}_{\rightarrow 1} \frac{\lambda^k}{k!} \underbrace{\left(1 - \frac{\lambda}{N_M}\right)^{N_M-k}}_{\rightarrow e^{-\lambda}} \end{aligned}$$

und man erhält

$$P(k) = \frac{\lambda^k}{k!} e^{-\lambda}. \quad (3.1)$$

¹Bei typischen Motor- bzw. Kugelkonzentrationen von $c \approx 10^{-12}$ M und Volumina $V \approx 10 \mu\text{l}$ ist $n = cV \approx 10^{-17}$ mol.

Verlauf der Verdünnungskurve

Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Kugel mindestens n Motoren gebunden hat, ist gegeben durch

$$P(\geq n) = 1 - \sum_{k=0}^{n-1} P(k) = 1 - \sum_{k=0}^{n-1} \frac{\lambda^k}{k!} e^{-\lambda}.$$

Falls es sich um einen prozessiven Motor handelt, und somit ein einzelnes Molekül für die Aktivität der getesteten Kugeln ausreicht, genügt der Verlauf des Anteils an aktiven Kugeln über der Motorkonzentration also

$$f_1(\lambda) = P(\geq 1) = 1 - e^{-\lambda}.$$

Sind hingegen mindestens zwei Motoren notwendig, wird der Verlauf beschrieben durch

$$f_2(\lambda) = P(\geq 2) = 1 - e^{-\lambda} - \lambda e^{-\lambda}.$$

Die bisherigen Berechnungen gehen davon aus, dass jeder Motor funktional an eine Kugel bindet. Im Allgemeinen muss jedoch damit gerechnet werden, dass ein Teil der Motoren entweder gar nicht oder in einer Geometrie an die Kugel bindet, die keine Interaktion mit einem Mikrotubulus erlaubt – insbesondere, wenn die Anbindung der Motoren an die Kugeln unspezifisch erfolgt. Die mittlere Anzahl an Motoren pro Kugel λ muss daher durch die mittlere Anzahl an aktiven Motoren pro Kugel $\tilde{\lambda} = c\lambda$ ersetzt werden, wobei c den Bruchteil der Motoren bezeichnet, die aktiv an die Kugeln binden:

$$f_1(\tilde{\lambda}) = P(\geq 1) = 1 - e^{-\tilde{\lambda}}, \quad (3.2)$$

$$f_2(\tilde{\lambda}) = P(\geq 2) = 1 - e^{-\tilde{\lambda}} - \tilde{\lambda} e^{-\tilde{\lambda}}. \quad (3.3)$$

In Abbildung 3.1 ist der Verlauf von Verdünnungskurven in einer doppelt-logarithmischen Auftragung gezeigt. Bei genügend hohen Motorendichten werden nahezu sämtliche Kugeln Aktivität zeigen. Unter limitierenden Motorendichten gibt die Steigung in dieser Darstellung die Mindestanzahl an notwendigen Motoren für Transport an. Hierzu definiert man $x \equiv \lg(\lambda)$ und $F_1(x) \equiv \lg f_1(\lambda)$. Dann gilt unter Berücksichtigung der Taylorentwicklung der Exponentialfunktion bis zum ersten nichtverschwindenden Term

$$F_1(x) = \lg(1 - e^{-\lambda}) \approx \lg(1 - (1 - \lambda)) = \lg(\lambda) = x.$$

Analog erhält man für $F_2(x) \equiv \lg f_2(\lambda)$ die Näherung

$$\begin{aligned} F_2(x) &= \lg(1 - e^{-\lambda} - \lambda e^{-\lambda}) \approx \lg\left(1 - (1 - \lambda + \frac{1}{2}\lambda^2) - \lambda(1 - \lambda + \frac{1}{2}\lambda^2)\right) \\ &= \lg\left(\frac{1}{2}\lambda^2\right) = 2\lg(\lambda) + \lg\left(\frac{1}{2}\right) = 2x + konst. \end{aligned}$$

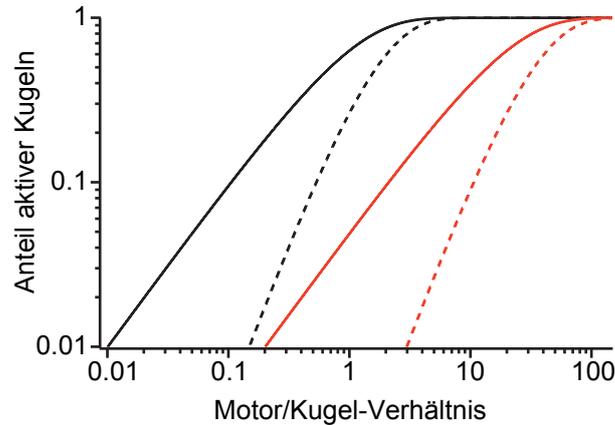


Abbildung 3.1 – Anteil der aktiven Kugeln in Abhängigkeit der Motorendichte in doppelt-logarithmischer Darstellung. Gezeigt ist der Verlauf für mindestens einen Motor (durchgezogene Linie) und mindestens zwei Motoren (gestrichelt). Bindet nur ein Bruchteil c der Motoren in einer aktiven Konfiguration an die Kugeln, so verschieben sich die Kurven zu höheren Motor/Kugel-Verhältnissen (schwarz: $c = 1$, rot: $c = 0.05$).

Wahrscheinlichkeit für Einzelmolekülereignisse

Ist die Prozessivität eines Motorproteins festgestellt, kann bei gegebenem Anteil aktiver Kugeln berechnet werden, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Kugel tatsächlich genau ein einzelnes Motormolekül gebunden hat. Sind bei einem gewählten Motor/Kugel-Verhältnis beispielsweise 20% der Kugeln aktiv, so beträgt die mittlere Anzahl an aktiven Motoren pro Kugel nach Gleichung (3.2)

$$\tilde{\lambda} = -\ln(1 - f_1) \approx 0.223. \quad (3.4)$$

Die Wahrscheinlichkeit, dass eine aktive Kugel nur einen einzigen aktiven Motor gebunden hat, ergibt sich nach Gleichung (3.1)² und (3.2)

$$P_{aktiv}(1) = \frac{P(1)}{P(\geq 1)} = \frac{\tilde{\lambda}e^{-\tilde{\lambda}}}{1 - e^{-\tilde{\lambda}}} \approx 0.89. \quad (3.5)$$

Sollen einzelne Motormoleküle mit der optischen Pinzette vermessen werden, muss beachtet werden, ob es von Bedeutung ist, dass die Kugeln tatsächlich nur ein einziges aktives Motormolekül gebunden haben, oder ob es ausreicht, dass zu jedem Zeitpunkt nur ein Molekül mit dem Mikrotubulus interagiert (beispielsweise wenn zwei Motoren an derselben Kugel, aber weit voneinander entfernt gebunden sind). Im ersten Fall muss das Motor/Kugelverhältnis konservativer gewählt werden als im zweiten, um die Wahrscheinlichkeit für echte Einzelmolekülereignisse zu erhöhen.

²Auch hier wird λ durch $\tilde{\lambda}$ ersetzt.

3.3 Kraftspektroskopie an prozessiven Motoren mit der optischen Pinzette

Zur kraftspektroskopischen Untersuchung prozessiver molekularer Motoren hat sich die Ein-Kugel-Geometrie der optischen Pinzette als Standard etabliert [51]. Mit Motoren beschichtete Kugeln werden im Laserfokus eingefangen und an ein Oberflächen-gebundenes Filament angenähert. Sobald die Motoren in Kontakt mit dem Filament kommen, beginnen sie unter ATP-Verbrauch an diesem entlang zu laufen und die Kugel aus ihrer Ruhelage zu ziehen. Die rücktreibende Kraft auf Kugel und Motor ist in guter Näherung proportional zu dieser Auslenkung und wächst stetig während eines Laufes an (für eine konstante Fallenposition) oder kann durch eine Rückkopplungsschleife auf einen konstanten Wert eingestellt werden (Rückkopplungsmodus) [82, 92].

3.3.1 Konstante Position

Im stationären Modus bleibt die Position des Fokus relativ zur Probenoberfläche konstant (Abb. 3.2 A). Da durch externe Kräfte kraftsensitive Übergänge im chemomechanischen Zyklus des Motors verlangsamt werden, verringert sich die Geschwindigkeit des Motors sukzessive, bis er seine Maximalkraft erreicht und keine Vorwärtsbewegung mehr stattfindet. Zu jedem Zeitpunkt gibt es eine endliche Wahrscheinlichkeit, dass sich der Motor vom Filament ablöst und damit seinen prozessiven Lauf beendet. Die Kugel relaxiert dann zurück in ihre Ruhelage und der Motor kann bei passender Orientierung zum Filament einen neuen Lauf initiieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die zeitliche Dichte der Läufe als Maß für die Aktivität eines Motors benutzt. Als quantitatives Maß diente hierzu die Größe SMWF (*Single Molecule Walking Frequency*), die als Anzahl der Laufereignisse n innerhalb eines Zeitintervalls Δt definiert wurde:

$$\text{SMWF} = \frac{n}{\Delta t}. \quad (3.6)$$

Eine wichtige Voraussetzung für die Aussagekraft dieser Größe ist, dass die Gesamtheit der beobachteten Läufe von einem einzigen Motormolekül auf der Kugel stammen, daher wurde für diese Messungen der Anteil an aktiven Kugeln so eingestellt, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von über 90% nur ein einzelnes aktives Molekül an die Kugel gebunden war (siehe Abschnitt 3.2.2).

3.3.2 Konstante Kraft

Erweitert man den stationären Modus um eine Rückkopplungsschleife, kann die Bewegung einzelner Motormoleküle unter konstanten Kräften untersucht werden. Die Rückkopplungsschleife hält die Auslenkung der Kugel aus der Ruhelage und somit die rückstellende Kraft auf den Motor konstant, indem sie den Piezotisch mit dem Oberflächen-fixierten Filament während eines Laufes nachführt und so die Bewegung des Motors kompensiert (Abb. 3.2 B). In dieser Geometrie können die Lauflängen und Geschwindigkeiten einzelner Motormoleküle unter definierten, konstanten Kräften bestimmt werden [20]. Wird die Geschwindigkeit des Motors ausreichend verlangsamt (beispielsweise durch limitierende ATP-Bedingungen), kann darüber hinaus die schrittweise Fortbewegung entlang des Filaments aufgelöst werden, um Informationen über die Schrittgröße und -kinetik zu erhalten.

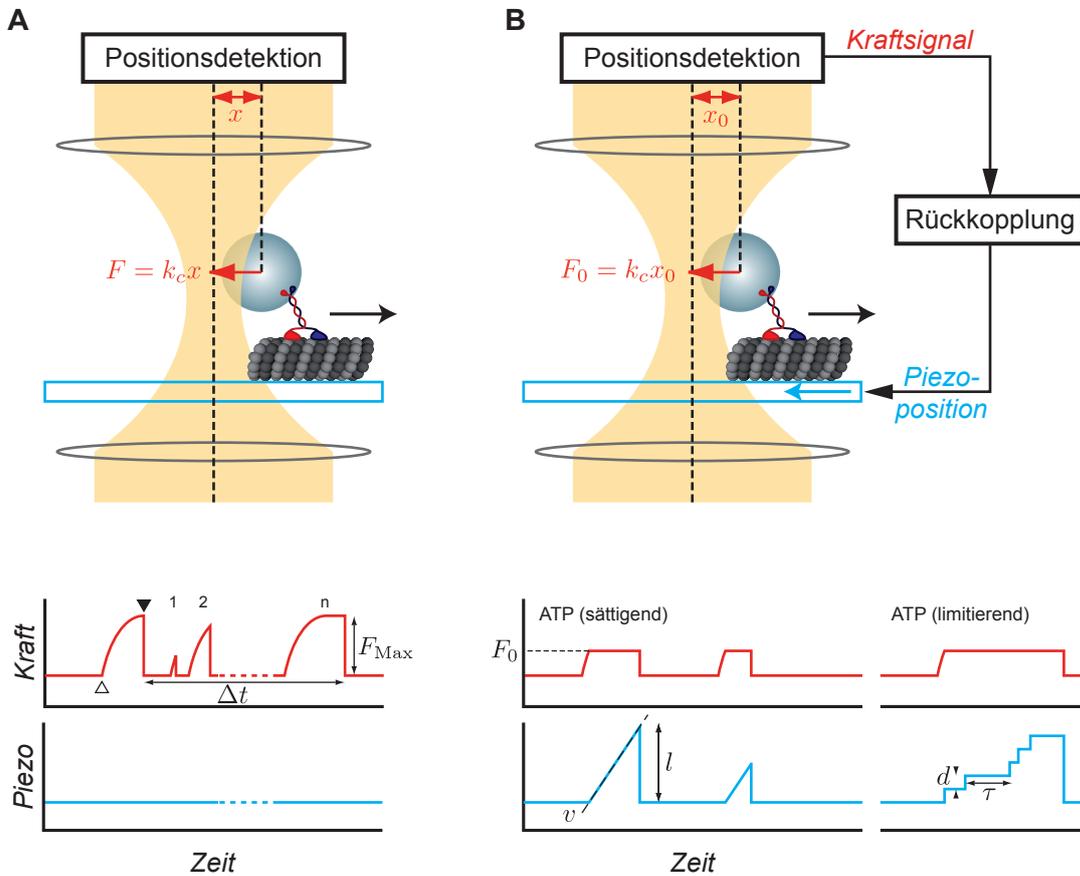


Abbildung 3.2 – Kraftspektroskopie an molekularen Motoren mit der optischen Pinzette. **A** Konstante Position. Oben: Der Laser (gelb) wird durch das Objektiv (untere Linse) in der Probenkammer fokussiert. Im Fokus wird eine Kugel (blau) mit einem gebundenen Motor gehalten und in Kontakt mit dem Mikrotubulus (grau) gebracht. Die Auslenkung der Kugel aus der Ruhelage wird über eine Positionsdetektion erfasst. Unten: Kraft- und Piezosignal im stationären Modus. Der Motor kann wiederholt Läufe initiieren (leere Pfeilspitze) und lenkt die Kugel aus bis er sich vom Mikrotubulus ablöst (gefüllte Pfeilspitze). Die relative Position von Probenoberfläche und Fokus bleibt konstant. **B** Konstante Kraft. Oben: Der stationäre Modus wird um eine Rückkopplungsschleife erweitert, die das ausgelesene Kraftsignal verarbeitet und den Piezotisch derart steuert, dass die Bewegung des Motors kompensiert und damit die Kraft konstant gehalten wird. Unten: Sobald der Motor die gewünschte Kraft F_0 erreicht hat, gleicht die Gegenbewegung des Piezotisches das weitere Fortschreiten des Motors aus. Der zeitliche Verlauf der Position des Piezotisches spiegelt somit die Bewegung des Motormoleküls wider und es können die Geschwindigkeit v und Lauflänge l des Motors bestimmt werden. Unter limitierenden ATP-Bedingungen werden diskrete Schritte des Motors erkennbar, die durch die Schrittgröße d und Verweildauer τ charakterisiert sind.

Da unter konstanten Kräften die Elastizität der Anbindung des Motors an die Kugel und die des Motorproteins selbst keine Rolle spielt, kann die Schrittweite des Motors direkt bestimmt werden.

3.4 Untersuchung des ungehinderten Transports

3.4.1 Hintergrund

Die Mehrzahl der mechanischen Untersuchungen an prozessiven molekularen Motoren wird mithilfe Oberflächen-fixierter Filamente durchgeführt, was die Bewegung des Motors auf einen Teil der Filamentoberfläche einschränkt. Generell können Artefakte nicht ausgeschlossen werden, die von der Fixierung des Trägerfilaments an der Oberfläche herühren. Beispielsweise zeigt der molekulare Motor Myosin-VI keine prozessiven Läufe auf Oberflächen-gebundenen Aktinfilamenten, läuft aber dennoch auf frei aufgespannten Filamenten [57]. Sowohl für Myosin-V als auch Myosin-VI wurde das Laufverhalten auf aufgespannten Aktinfilamenten untersucht und gezeigt, dass sich diese Motoren entlang einer Spiralbahn fortbewegen, wenn ihnen der komplette Umfang des Filaments zugänglich ist [1, 2]. Für Kinesine existieren bislang keine vergleichbaren Untersuchungen.

Bevor im Folgenden eine neue Messgeometrie vorgestellt wird, die es Kinesinen ermöglicht, sich ungehindert auf der kompletten Oberfläche eines Mikrotubulus zu bewegen, wird zunächst die Architektur dieser Filamente genauer vorgestellt.

3.4.2 Die Architektur von Mikrotubuli

Die hohlzylindrische Struktur eines Mikrotubulus wird als ringförmige Anordnung von 13 linearen Protofilamenten aufgefasst, die ihrerseits aus einer gerichteten Aneinanderreihung von Heterodimeren aus α - und β -Tubulin bestehen [34]. Die räumliche Periodizität entlang eines Protofilaments beträgt 80 \AA und benachbarte Protofilamente sind jeweils um $r = 9.23 \text{ \AA}$ entlang ihrer Achsen gegeneinander verschoben (B-Gitter). Nach $n_0 = 13$ Protofilamenten ergibt sich ein longitudinaler Versatz der Untereinheiten von $p = r \cdot n_0 = 120 \text{ \AA}$, was exakt 3 Tubulin-Monomeren entspricht, und die Anordnung der Tubulin-Monomere in einem Mikrotubulus kann infolgedessen als linksgängige Dreistart-Helix aufgefasst werden. Aufgrund der heterodimeren Struktur der Untereinheiten führt dies zur Entstehung eines Saums, an dem zwei Protofilamente in einer abweichenden Geometrie (A-Gitter) aneinanderstoßen (Abb 3.3 A) [4].

Die Anzahl von 13 Protofilamenten in einem Mikrotubulus ist nicht obligatorisch – auch wenn sie *in vivo* stark bevorzugt auftritt – sondern kann zwischen 8 und 19 variieren [19, 84]. Insbesondere für *in vitro* polymerisierte Mikrotubuli entstehen abhängig von den gewählten Bedingungen Gemische von Mikrotubuli mit vornehmlich 12 – 15 Protofilamenten [63]. Bei einer von 13 abweichenden Protofilamentanzahl n ist der über alle Protofilamente akkumulierte Versatz $p_n = r \cdot n$ nicht mehr kommensurabel mit der Periodizität der Tubulin-Monomere. Eine Rotation der gesamten Gitteranordnung relativ zur Längsachse des Mikrotubulus kann diese Diskrepanz ausgleichen, ohne dass dabei die Gitterstruktur selbst verändert wird. Der entsprechende Rotationswinkel θ ergibt sich zu

$$\tan \theta = \frac{p_n - p}{n \cdot d} = \frac{r(n - n_0)}{n \cdot d}, \quad (3.7)$$

wobei $d = 51.5 \text{ \AA}$ den lateralen Abstand zwischen benachbarten Protofilamenten bezeichnet [19]. Die Protofilamente verlaufen für $n \neq 13$ somit nicht mehr parallel zur Mikrotubulusachse, sondern beschreiben einen helikalen Pfad auf der Oberfläche des Mikrotubulus und die Ganghöhe dieses Supertwists ist gegeben durch [19, 94]

$$h = \frac{n \cdot d}{\tan \theta} = \frac{n^2 d^2}{r(n - n_0)}. \quad (3.8)$$

Entsprechend erhält man für Mikrotubuli bestehend aus 14 Protofilamenten eine linksgängige Windung der Protofilamente mit einer Ganghöhe von $5.6 \mu\text{m}$, für 12 Protofilamente hingegen eine rechtsgängige Windung mit $-4.1 \mu\text{m}$ Ganghöhe (Abb 3.3 B, C).

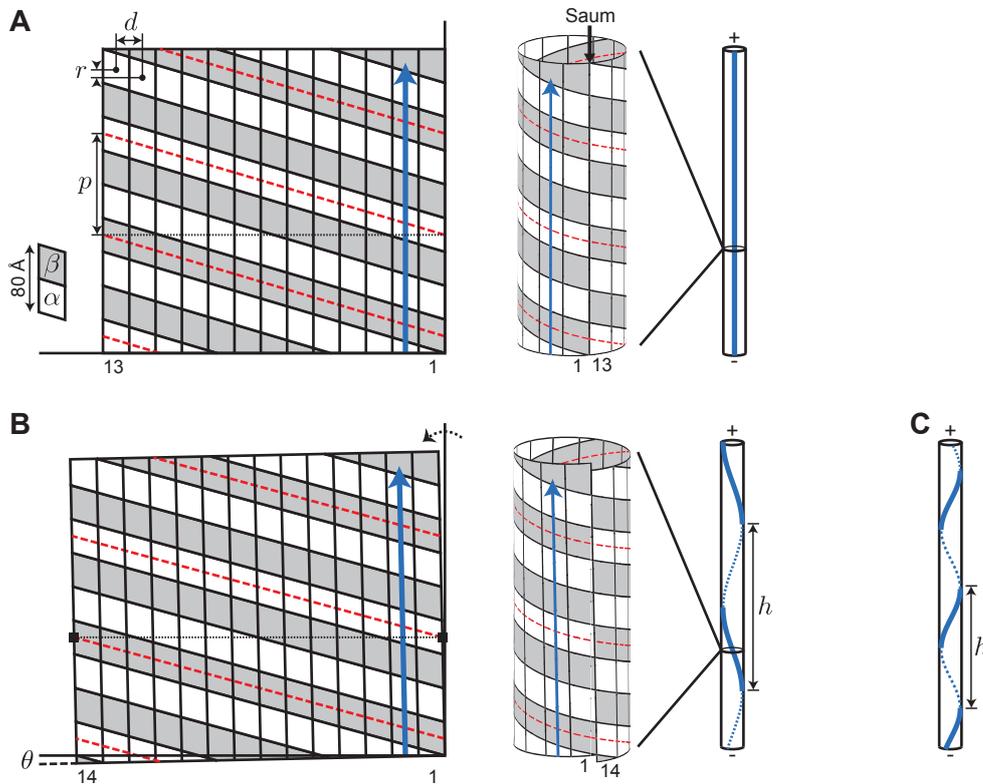


Abbildung 3.3 – Molekulare Struktur eines Mikrotubulus (adaptiert aus [19]). **A** Für einen Mikrotubulus mit 13 Protofilamenten beschreiben die Tubulinuntereinheiten (weiß: α -Tubulin, grau: β -Tubulin) einen helikalen Pfad auf der Oberfläche (rote Linie) und die Protofilamentachse (blau) verläuft parallel zur Mikrotubulusachse. Die Anordnung der Tubulin-Untereinheiten im B-Gitter führt zur Entstehung eines Saumes, an dem die Untereinheiten in einer abweichenden Anordnung (A-Gitter) aneinanderstoßen. **B** Im Falle von 14 Protofilamenten wird das Gitter um einen Winkel θ gedreht, um eine kontinuierliche Fortsetzung der Tubulin-Untereinheiten auf der Oberfläche zu erreichen (schwarz gepunktete Linie). Die Protofilamentachse ist nun nicht mehr parallel zur Mikrotubulusachse, sondern verläuft in einer linksgängigen Schraubenlinie auf der Oberfläche ($\theta = 0.73^\circ$, $h = 5.6 \mu\text{m}$). **C** Für einen Mikrotubulus mit 12 Protofilamenten beschreiben die Protofilamente eine rechtsgängige Schraubenlinie ($\theta = -0.86^\circ$, $h = -4.1 \mu\text{m}$).

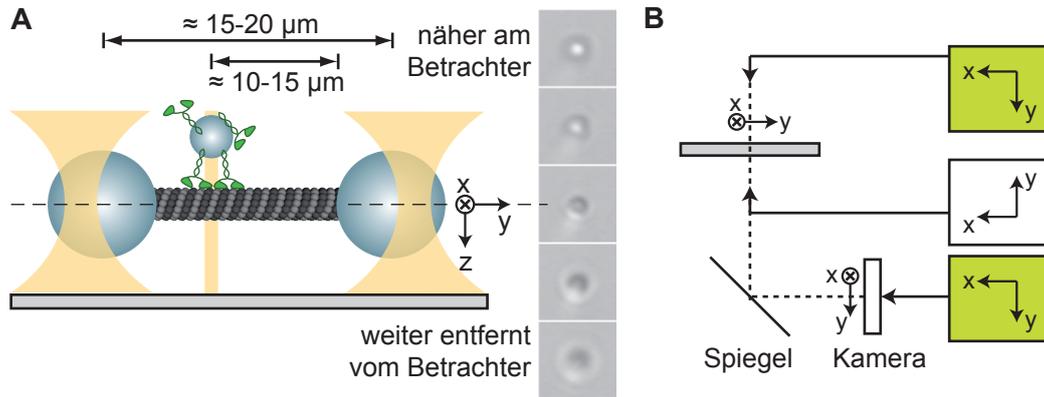


Abbildung 3.4 – Die Oberflächen-freie Hantelgeometrie. **A** Links: Experimentelle Geometrie (nicht maßstabsgetreu). Die Position des dritten Laserfokus ist durch den gelben Balken angezeigt. Rechts: Erscheinungsbild der Kugel abhängig von der Höhe zur Fokusebene (gestrichelte Linie). Die Hellfeldaufnahmen zeigen eine Oberflächen-gebundene Kugel in unterschiedlichen Abständen zur Fokusebene, eingestellt über die z -Position des Piezotisches (von oben nach unten: $z = -1, -0.5, 0, +0.5, +1 \mu\text{m}$). **B** Hellfeldabbildungen zeigen eine Draufsicht auf die Probenkammer (grün hinterlegt).

3.4.3 Die Hantelkonfiguration

Mithilfe einer optischen Pinzette, die in einer Mehr-Kugel-Geometrie betrieben wird (Anhang A), kann eine Oberflächen-freie Messgeometrie realisiert werden, so dass die gesamte Mikrotubulus-Oberfläche für Kinesin-Motoren zugänglich ist. Ein fluoreszenzmarkierter Mikrotubulus wird zwischen zwei großen Kugeln ($\approx 3 \mu\text{m}$ Durchmesser) aufgespannt, die in zwei Laserfoki in einem Abstand von $\approx 20 \mu\text{m}$ festgehalten werden. Ein dritter, dazwischen platzierter Fokus dient dazu, eine kleinere ($\approx 1 \mu\text{m}$ Durchmesser), mit Motoren beschichtete Kugel einzufangen und in Kontakt mit dem aufgespannten Filament zu bringen. Sobald diese Kugel eine Interaktion mit dem Mikrotubulus zeigt, wird der dritte Fokus ausgeschaltet und die ungehinderte Bewegung der Motoren entlang des Mikrotubulus kann über Hellfeldmikroskopie beobachtet werden (Abb. 3.4 A).

Um die Position der Motor-beschichteten Kugel relativ zum Mikrotubulus zu bestimmen, muss folgendes berücksichtigt werden: Die Höhe der Kugel relativ zur Fokusebene kann anhand des Aussehens der Kugel qualitativ bestimmt werden. Aufgrund der Anordnung von Objektiv und Kamera in der Art eines inversen Mikroskops mit einem Umlenkspiegel repräsentiert das Hellfeldbild eine Draufsicht auf die Probenkammer (Abb. 3.4 B).

4 Prozessivität und Auto-Inhibierung des heterodimeren Kinesin-2 aus *C. elegans*

4.1 Überblick

Gemessen an der Fülle an experimentellen Daten zur Funktionsweise von Kinesin-1 steckt die Forschung an Kinesin-2 Motoren gleichsam in den Kinderschuhen. Die Informationen über die mechanischen Eigenschaften dieser Motoren sind rar, nicht zuletzt, da die erste Herausforderung in der Herstellung von funktionalem Protein für *in vitro*-Experimente besteht. Jedoch bieten gerade die heterodimeren Kinesine aufgrund ihrer einmaligen Zusammensetzung aus zwei verschiedenen Untereinheiten eine interessante Erweiterung zu den homodimeren Kinesinen, da sie eine intrinsische Asymmetrie besitzen. In diesem Kapitel wird erstmals ein natürlich auftretendes heterodimeres Kinesin, KLP11/KLP20 aus dem Fadenwurm *C. elegans*, eingehend im Hinblick auf seine mechanischen Eigenschaften untersucht. Die vorgestellten Experimente klären zunächst die grundlegende Frage nach der Prozessivität dieses Motors und untersuchen das Verhalten einzelner Moleküle unter externen Kräften [14].

4.2 Design und Expression des KLP11/KLP20 Konstrukts und einer deregulierten Mutante

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Kinesin-Konstrukte wurden von Dr. Zeynep Ökten¹ konzipiert, hergestellt und auf ihren Oligomerisierungszustand untersucht. Die wesentlichen Ideen und Ergebnisse werden in diesem Abschnitt kurz zusammengefasst, da sie die Grundlage für die nachfolgenden Experimente bilden. Expression und Aufreinigung der Kinesin-Konstrukte sind in Anhang A kurz beschrieben.

Die Polypeptide KLP11 und KLP20 wurden in ihrer vollen Länge in Insektenzellen co-exprimiert. Nach der Aufreinigung des Proteins über einen C-terminalen Flag-Tag an einer der beiden Polypeptidketten konnten in der Regel beide Untereinheiten zu gleichen Anteilen auf einem SDS-Gel nachgewiesen werden (Abb. 4.1 A). Ein Gelfiltrationsexperiment in Kombination mit MALS (*Multiple Angle Light Scattering*) zeigte, dass das Protein als homogene Population mit einem Molekulargewicht von 169 kDa vorliegt, in guter Übereinstimmung mit dem für Heterodimere erwarteten Wert von 163 kDa. Analoge Experimente mit den getrennt exprimierten und aufgereinigten Untereinheiten KLP11 und KLP20 zeigten, dass keine der beiden Untereinheiten in der Lage ist, Homodimere zu bilden.

¹Arbeitsgruppe von Prof. Manfred Schliwa am Adolf-Butenand-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München.

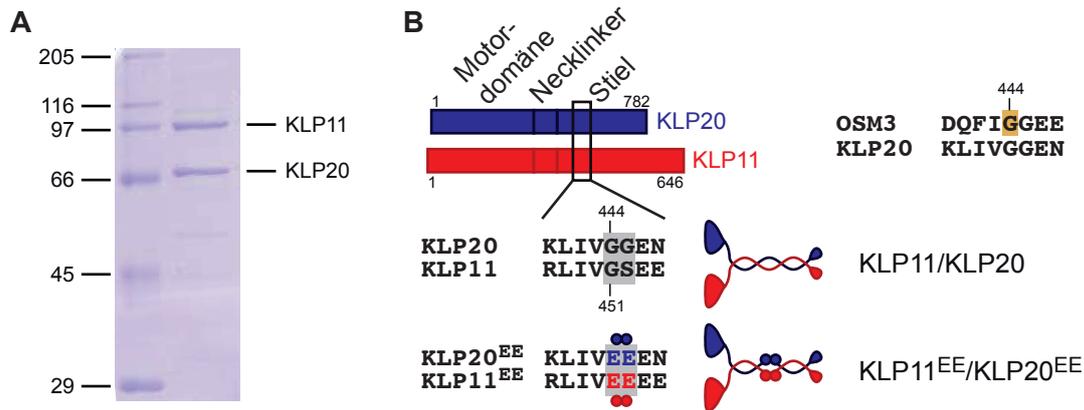


Abbildung 4.1 – **A** SDS-Gel. Links: Marker (Molekulargewichte in kDa), rechts: KLP11/KLP20, aufgereinigt über einen Flag-Tag an KLP20. Die Stöchiometrie der beiden Untereinheiten beträgt 1:1. **B** KLP11/KLP20 und die Mutante KLP11^{EE}/KLP20^{EE} mit je zwei Punktmutationen in der Stielregion jeder Untereinheit.

Potentiell birgt die Verwendung von Motoren in ihrer vollen Länge experimentelle Schwierigkeiten, da die Aktivität dieser Motoren möglicherweise aufgrund von Auto-Inhibierung unterdrückt ist. Innerhalb der Kinesin-2 Familie wurde ein derartiger Regulationsmechanismus bislang lediglich bei den homodimeren Vertretern OSM3 [39] und KIF17 [31] nachgewiesen. Für die heterodimeren Kinesin-2 Motoren existieren keine Untersuchungen im Hinblick auf eine potentielle Auto-Inhibierung, aber es ist nicht unwahrscheinlich, dass dieses Prinzip auch für die Regulation dieser Motoren eine Rolle spielt. Daher wurde zu KLP11/KLP20 ein mutmaßlich dereguliertes Konstrukt nach dem Vorbild von OSM3 entworfen (Abb. 4.1 **B**).

Für OSM3 wurde mithilfe einer Coiled-Coil Vorhersage die Scharnierregion identifiziert, an der das C-terminale Ende auf die Motordomänen zurückfaltet. Die Mutation der Aminosäure Glycin-444 zu Glutaminsäure in dieser Scharnierregion verhindert diese Konformationsänderung und stellt den aktiven, deregulierten Zustand von OSM3 her [39]. Der Abgleich der Sequenzen von KLP20 mit OSM3 zeigt, dass KLP20 eine analoge Stelle zur Scharnierregion von OSM3 besitzt, wodurch sich die korrespondierenden Mutationen G444E und G445E für KLP20 ergeben. Ein weiterer Sequenzvergleich zwischen KLP20 und KLP11 identifiziert die entsprechenden Aminosäuren G451 und G452 in KLP11. Das resultierende Konstrukt KLP11(G451E,G452E)/KLP20(G444E,G445E) wird im Weiteren mit KLP11^{EE}/KLP20^{EE} abgekürzt und stellt zunächst eine Arbeitshypothese für eine deregulierte Version des Motors KLP11/KLP20 dar.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Motilität

Die Motilität der beiden Kinesin-2 Konstrukte wurde sowohl bei hoher als auch limitierender Motorendichte getestet (Abschnitt 3.2.1). Mit einer Ausgangskonzentration von etwa 0.3 mg/ml an die Oberfläche adsorbiert, transportieren KLP11/KLP20 und

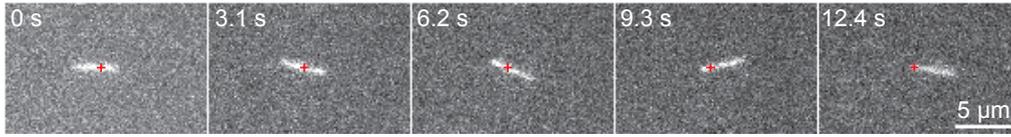


Abbildung 4.2 – Ein Mikrotubulus wird über einen isolierten KLP11/KLP20 Motor transportiert. Die freie Drehbarkeit des Mikrotubulus um einen festen Punkt (rote Markierung) ist deutlich zu erkennen.

KLP11^{EE}/KLP20^{EE} auch sehr kurze Mikrotubulifragmente mit einer Länge von etwa $0.5\ \mu\text{m}$ kontinuierlich über eine Strecke von mehreren Mikrometern, wodurch die hohe Oberflächendichte an Motoren deutlich wird. Die gemessenen Geschwindigkeiten (siehe Tab. 4.1) stimmen gut mit bereits publizierten *in vitro* Experimenten ($0.25\text{--}0.5\ \mu\text{m/s}$) [60] überein und erreichen nahezu den *in vivo* gemessenen Wert von $0.5\ \mu\text{m/s}$ [78].

Verringert man die Dichte der Motormoleküle auf der Oberfläche, werden einige Mikrotubuli über isolierte Verankerungspunkte bewegt (Abb. 4.2, Film 4.1), was gemeinhin als Transportereignis eines einzelnen Motorproteins aufgefasst wird. Da die eingesetzten Motorkonzentrationen aber nur um einen Faktor zwei bis drei geringer waren als bei den Versuchen mit hoher Motordichte, kann nicht mit letzter Sicherheit gefolgert werden, dass es sich bei den beobachteten Ankerpunkten tatsächlich um einzelne Moleküle handelt.

Konstrukt	hohe Motordichte		einzelne Ankerpunkte	
	$v\ (\mu\text{m/s})$	N	$v\ (\mu\text{m/s})$	N
KLP11/KLP20	0.41 ± 0.06	198 (5)	0.33 ± 0.16	21 (2)
KLP11 ^{EE} /KLP20 ^{EE}	0.48 ± 0.05	262 (6)	0.41 ± 0.1	6 (2)

Tabelle 4.1 – Geschwindigkeiten der Kinesin-2 Konstrukte KLP11/KLP20 und KLP11^{EE}/KLP20^{EE} in Motilitätsversuchen bei $2\ \text{mM}$ ATP. Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. N : Anzahl der Mikrotubuli, deren Bewegung analysiert wurde. Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der verschiedenen Aufreinigungen an, die in die Auswertung gingen.

4.3.2 Verdünnungsverhalten

Die Prozessivität des heterodimeren Kinesin-2 aus *C. elegans* wurde anhand eines klassischen Verdünnungsexperiments in der optischen Pinzette untersucht (Abschnitt 3.2.2). Hierzu wurde die Dichte der Motoren auf den Kugeln über einen breiten Bereich variiert und für jedes Motor/Kugel-Verhältnis zwischen 20 und 100 Kugeln auf Aktivität getestet. An den Verlauf der resultierenden Verdünnungskurven lässt sich sowohl für KLP11/KLP20 als auch KLP11^{EE}/KLP20^{EE} am besten das Ein-Motoren-Modell (Gl. 3.2) anpassen (Abb. 4.3 A). Es handelt sich demnach bei beiden Konstrukten um prozessive Motoren.

Der Anteil an funktional gebundenem Motorprotein, gegeben durch den Fitparameter c , ist für die beiden Konstrukte mit $c = 0.02$ identisch. Sowohl für KLP11/KLP20 als

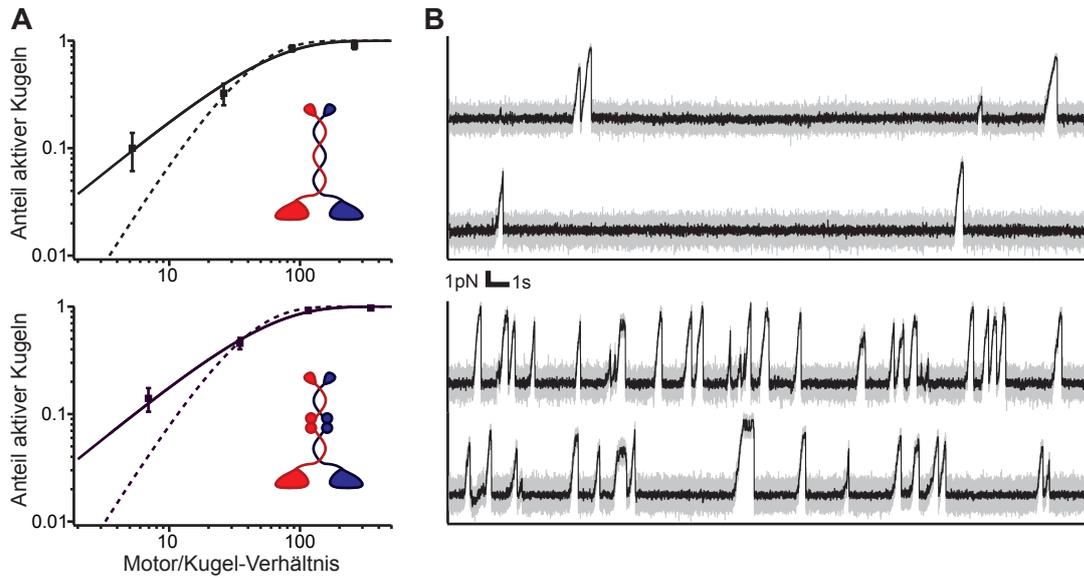


Abbildung 4.3 – **A** Anteil f der aktiven Kugeln in Abhängigkeit des Motor/Kugel-Verhältnisses. Insgesamt wurden $N = 160$ für KLP11/KLP20 (oben) und $N = 257$ für KLP11^{EE}/KLP20^{EE} (unten) Kugeln getestet (pro Verhältnis $n = 20 - 100$). Der Verlauf wird für beide Konstrukte am besten durch das Ein-Motor-Modell beschrieben (durchgezogene Linie, $\chi^2 = 3.3$ und $\chi^2 = 3.8$). Das Zwei-Motoren-Modell beschreibt die Messdaten signifikant schlechter (gestrichelte Linie, $\chi^2 = 6.8$ und $\chi^2 = 10.4$). Die Werte sind als Mittelwert $\pm \sqrt{f(1-f)/n}$ angegeben. **B** Unter Einzelmolekülbedingungen initiiert KLP11/KLP20 (oben) deutlich seltener prozessive Läufe als KLP11^{EE}/KLP20^{EE} (unten). Gezeigt sind die Läufe von je zwei verschiedenen Molekülen. Grau: ungefilterte Daten (5 bzw. 20 kHz), schwarz: mit gleitendem Durchschnitt gefilterte Daten (Zeitfenster 5 ms).

auch KLP11^{EE}/KLP20^{EE} adsorbiert also nur etwa jedes fünfzigste Molekül funktional an eine Kugel. Eine Ursache für diese geringe Effizienz der Anbindung liegt möglicherweise darin begründet, dass diese unspezifisch erfolgt ist.

Die Motoren KLP11/KLP20 und KLP11^{EE}/KLP20^{EE} verhalten sich in Motilitäts- und Verdünnungsversuchen erwartungsgemäß identisch, da sich die beiden Konstrukte lediglich in vier Aminosäuren in der Stielregion unterscheiden und die grundlegenden kinetischen Eigenschaften wie Geschwindigkeit und Prozessivität dadurch nicht beeinflusst sein sollten.

Wie für einen deregulierten Motor erwartet würde, initialisiert KLP11^{EE}/KLP20^{EE} unter limitierenden Motor/Kugel-Verhältnissen deutlich häufiger neue Läufe entlang eines Mikrotubulus als KLP11/KLP20 (Abb. 4.3 **B**). Dieser Effekt wird durch die Größe SMWF quantifiziert (Abschnitt 3.3.1). Um verlässliche Werte für SMWF zu erhalten, muss gewährleistet sein, dass alle analysierten Läufe von ein und demselben Molekül stammen, d.h. die Kugeln dürfen nur ein einziges aktives Motorprotein tragen. Das Motor/Kugel-Verhältnis wird deshalb so gewählt, dass weniger als jede vierte bzw. fünfte (KLP11/KLP20 bzw. KLP11^{EE}/KLP20^{EE}) Kugel Aktivität zeigt. Die Wahrscheinlich-

keit, dass unter diesen Bedingungen eine aktive Kugel genau einen aktiven Motor gebunden hat, liegt nach Gleichungen (3.2) und (3.1) bei rund 90%. Die Ausbeute an Läufen für einzelne KLP11^{EE}/KLP20^{EE} Moleküle ist mit $SMWF = (0.64 \pm 0.04)/s$ rund sechsmal höher als für KLP11/KLP20 Motoren mit einem Wert von $SMWF = (0.11 \pm 0.02)/s$. Dieses Ergebnis ist konsistent für je zwei unabhängige Protein-Aufreinigungen und unterstützt die Hypothese, dass es sich bei KLP11/KLP20 um einen selbstregulierten Motor handelt, der durch eine gezielte Manipulation in der Stielregion in einen deregulierten Zustand geschaltet werden kann.

4.3.3 Kraft, Lauflänge und Geschwindigkeit einzelner Moleküle

Da das Konstrukt KLP11/KLP20 eine schlechte Ausbeute an Laufereignissen liefert, bietet es sich an das lauffreudigere Konstrukt KLP11^{EE}/KLP20^{EE} zur mechanischen Charakterisierung einzelner Moleküle zu verwenden. Die Punktmutationen sollten aufgrund ihrer Positionierung in der Stielregion – also entfernt von den Motordomänen – keinen Einfluss auf die Laufeigenschaften der Motors wie beispielsweise Krafterzeugung oder Lauflängen nehmen. Das Motor/Kugel-Verhältnis wurde für alle folgenden Messungen so eingestellt, dass weniger als jede vierte Kugel Aktivität zeigte und somit die Wahrscheinlichkeit für echte Einzelmolekülereignisse nach Gleichung 3.5 bei 86% lag.

Zunächst wurde das Verhalten einzelner KLP11^{EE}/KLP20^{EE} Motoren im stationären Modus der optischen Pinzette untersucht (Abschnitt 3.3.1). In dieser Geometrie steigt während eines Laufes die rückwärts gerichtete Kraft auf den Motor stetig an bis sich dieser schließlich vom Mikrotubulus ablöst. Im Gegensatz zu konventionellem Kinesin, welches unter der zunehmenden Kraft sukzessive seine Geschwindigkeit verringert, bis schließlich an seiner Maximalkraft von 5 – 7 pN keine Netto-Vorwärtsbewegung mehr stattfindet [44, 81], endet die Mehrzahl der Läufen von KLP11^{EE}/KLP20^{EE} bevor sie ein Plateau erreichen. KLP11^{EE}/KLP20^{EE} erreicht in manchen Läufen Kräfte von bis zu 5.5 pN, ohne dabei drastisch an Geschwindigkeit zu verlieren (Abb. 4.4).

Der Grad der Prozessivität eines Motors bemisst sich an seiner mittleren Lauflänge, welche für KLP11^{EE}/KLP20^{EE} mithilfe des Rückkopplungsmodus der optischen Pinzette bestimmt wurde (Abschnitt 3.3.2). An einzelne Motormoleküle wurden bei einer ATP-Konzentration von 2 mM konstante Rückwärtskräfte zwischen 1 und 6 pN angelegt und jeweils die Lauflängenverteilung sowie die mittlere Geschwindigkeit bestimmt (Abb. 4.5). Wie erwartet sind die Lauflängen unter einer festen Kraft einfach exponentiell verteilt. Die mittlere Lauflänge ist mit rund 200 nm bei niedrigen Kräften (1 – 2 pN) um etwa einen Faktor drei geringer als der entsprechende Wert für konventionelles Kinesin unter vergleichbaren Bedingungen [72]. Mit zunehmender Rückwärtskraft nimmt die Lauflänge ab auf etwa 50 nm bei 5 pN. Die Geschwindigkeit einzelner Motormoleküle liegt bei $\approx 0.51 \mu\text{m/s}$ für niedrige Kräfte (1 – 2 pN) und erreicht damit vergleichbare Werte zu den Motilitätsversuchen. Unter steigenden Rückwärtskräften reduziert sich die Geschwindigkeit sukzessive bis schließlich bei 6 pN keine Vorwärtsbewegung des Moleküls mehr stattfindet.

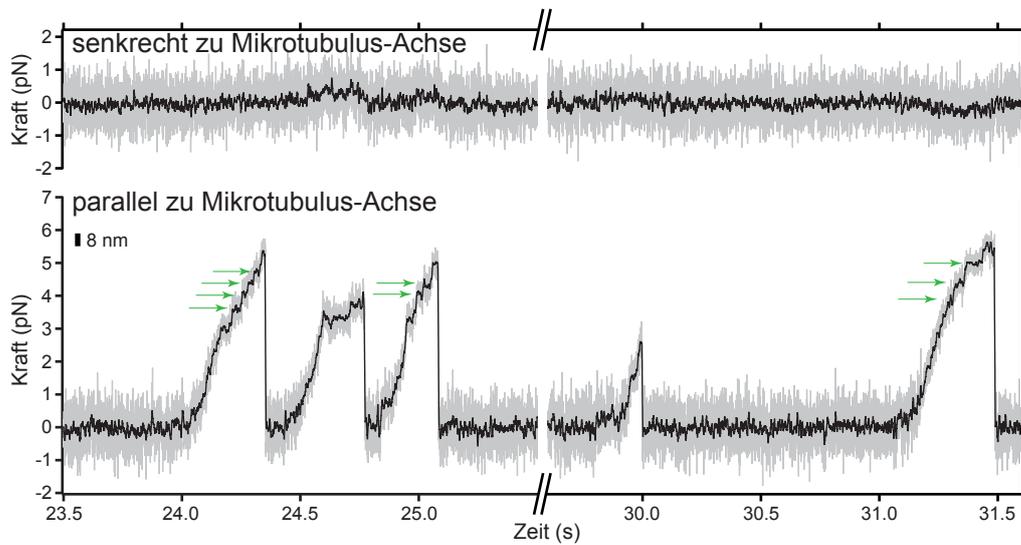


Abbildung 4.4 – Läufe eines einzelnen KLP11^{EE}/KLP20^{EE} Moleküls bei 2 mM ATP. Die Auslenkung des Motors aus dem Potential der optischen Pinzette erfolgt ausschließlich parallel zur Mikrotubulusachse mit Kräften von bis zu 5.5 pN (untere Kurve), es findet keine nennenswerte Auslenkung senkrecht zum Mikrotubulus statt (obere Kurve). Grau: ungefilterte Daten (5 kHz), schwarz: mit gleitendem Durchschnitt gefilterte Daten (Zeitfenster 5 ms). Da mit zunehmender Kraft die elastischen Elemente des Kugel-Motor-Mikrotubulus Systems gestreckt werden, nimmt das thermische Rauschen während eines Laufs ab und die Bewegung des Motors in diskreten Schritten wird erkennbar (grüne Pfeile).

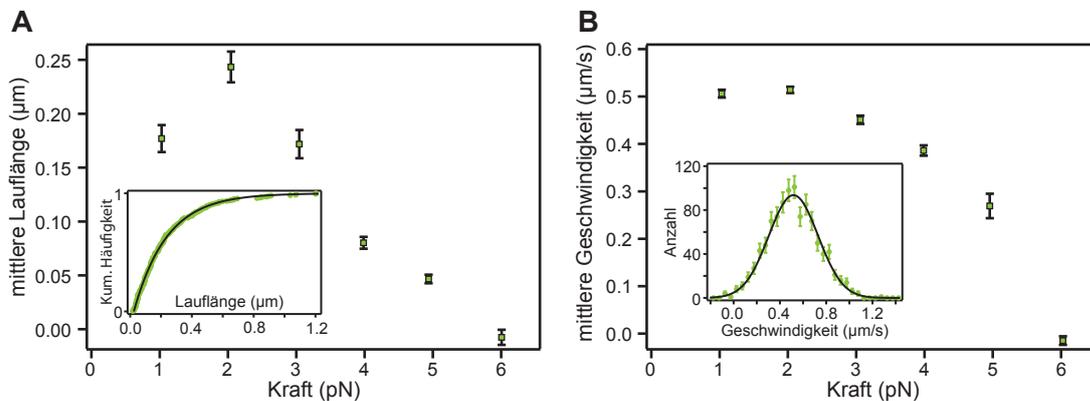


Abbildung 4.5 – Einzelne KLP11^{EE}/KLP20^{EE} Motoren unter konstanten Rückwärtskräften bei 2 mM ATP. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler. Pro Kraft wurden zwischen 11 und 247 Läufe von insgesamt 8 verschiedenen Molekülen analysiert. **A** Mittlere Lauflänge in Abhängigkeit der Kraft. Inset: kumulative Wahrscheinlichkeitsverteilung der Lauflängen bei einer Rückwärtskraft von 2 pN. Die Lauflängen sind einfach exponentiell verteilt. **B** Kraftabhängigkeit der mittleren Geschwindigkeit. Inset: Gaußförmige Verteilung der Geschwindigkeiten bei einer Rückwärtskraft von 2 pN. Fehlerbalken repräsentieren $1/\sqrt{N}$, N : Anzahl der Datenpunkte.

4.3.4 Schrittgröße und Analyse der Verweildauern

Prozessive Kinesine bewegen sich in diskreten 8 nm Schritten entlang von Mikrotubuli fort, eine Eigenschaft, die über die Grenzen verschiedener Kinesin-Familien hinweg konserviert ist, wie Experimente an Vertretern der Kinesin-1, Kinesin-5 und Kinesin-7 Familien zeigen [90, 101, 103]. Unter limitierenden ATP-Bedingungen ($3 - 6 \mu\text{M}$ ATP) und moderaten Rückwärtskräften ($1.3 - 2.4 \text{ pN}$) können auch für einzelne KLP11/KLP20 und KLP11^{EE}/KLP20^{EE} Moleküle diskrete Schritte beobachtet werden (Abb. 4.6 A), wodurch die prozessive Fortbewegung dieser Motoren unmittelbar sichtbar wird. Die Analyse der Schrittweiten und Verweildauern erfolgte mithilfe einer automatisierten Schritterkennungsroutine. (Details zur Auswertung der Schrittkurven sind in Anhang A erläutert.) Für beide Motorkonstrukte sind die Schrittweiten gaußförmig um einen Mittelwert von rund 8 nm verteilt (Abb. 4.6 B) und entsprechen damit der typischen Schrittweite von Kinesin-Motoren, in der sich die Periodizität der Tubulin-Untereinheiten widerspiegelt.

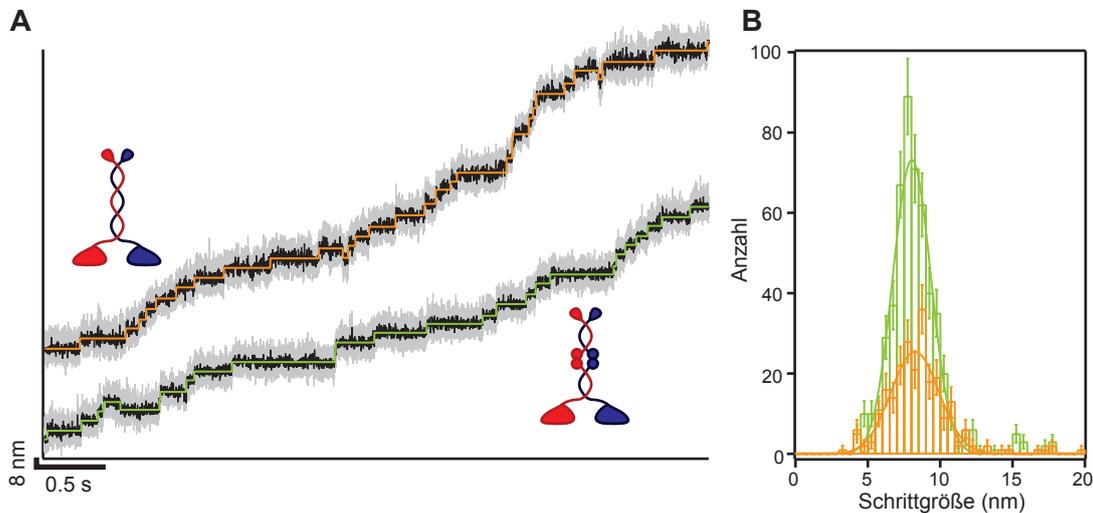


Abbildung 4.6 – Kinesin-2 bewegt sich in diskreten 8 nm Schritten entlang eines Mikrotubulus fort. **A** Sukzessive Schritte von KLP11/KLP20 (oben) und KLP11^{EE}/KLP20^{EE} (unten). Grau: ungefilterte Daten (20 kHz), schwarz: per Mittelung auf 1 kHz reduzierte Daten. Grün, orange: Rekonstruktion der Schritte mit automatisierter Schritterkennungsfunktion. **B** Die Anpassung einer Gaußfunktion an die Histogramme der Schrittgrößen liefert eine Schrittweite von $(8.25 \pm 0.15) \text{ nm}$ für KLP11/KLP20 ($N = 239$, orange) und $(8.04 \pm 0.08) \text{ nm}$ für KLP11^{EE}/KLP20^{EE} ($N = 524$, grün). Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Fehlerbalken der Histogramme repräsentieren $1/\sqrt{N}$, N : Anzahl der Datenpunkte.

Gemäß dem *Hand-over-Hand* Modell würden die beiden unterschiedlichen Motordomänen von heterodimerem Kinesin-2 mit jedem Schritt ihre relativen Positionen auf dem Mikrotubulus tauschen und abwechselnd die Rolle der vorderen Domäne einnehmen, so dass für einen Schritt prinzipiell zwei unterschiedliche Ausgangszustände existieren. Falls sich die Motordomänen in Bezug auf ihre kinetischen Eigenschaften unterscheiden, sollten sich in einer Schrittkurve systematisch längere und kürzere Verweildauern abwechseln, so dass sich das Molekül “hinkend” fortbewegen würde. Dagegen würde eine Bewegung nach

dem Inchworm-Prinzip [36], bei dem die Domänen ihre relative Position zueinander beibehalten, selbst bei einem stark ausgeprägten Unterschied zwischen den Motordomänen kein Hink-Verhalten vorhersagen [43]. Um diesen Aspekt genauer zu untersuchen, wurde die Kinetik der beiden unterschiedlichen Bewegungsphasen analog zu [5] analysiert.

Zunächst trennt man die Verweildauern einer Schrittkurve nach den beiden Ausgangszuständen auf, indem sie durchnummeriert und in geradzahlige (g) und ungeradzahlige (u) Wartezeiten gruppiert werden. Durch einen Vergleich der mittleren Verweildauern τ_g und τ_u ordnet man die Gruppen dann entsprechend einer “schnellen” und einer “langsamen” Bewegungsphase zu. Als Maß für das Hinken innerhalb einer Schrittkurve dient der Hinkfaktor L , der als das Verhältnis der mittleren Dauer der langsamen Phase zur mittleren Dauer der schnellen Phase definiert ist

$$L = \frac{\max(\tau_g, \tau_u)}{\min(\tau_g, \tau_u)}. \quad (4.1)$$

Abbildung 4.7 zeigt beispielhaft je zwei Schrittkurven für KLP11/KLP20 und KLP11^{EE}/KLP20^{EE} mit der entsprechenden Klassifizierung der Verweildauern und den resultierenden Hinkfaktoren. In keiner der Kurven zeigt sich ein ausgeprägtes Hinken des fortschreitenden Motormoleküls.

Man beachte, dass die Zuordnung der Verweildauern zu einer “schnellen” und einer “langsamen” Phase zunächst willkürlich ist. Die Wartezeit zwischen zwei Schritten ist exponentiell verteilt und unterliegt daher statistischen Schwankungen. In Kombination mit der endlichen Länge von Schrittkurven führt dies dazu, dass auch die Verweildauern eines nicht-hinkenden Motors, die ja aus einer einzigen exponentiellen Verteilung stammen, künstlich in eine “schnelle” und “langsame” Phase eingeteilt werden. Der Einfluss von Statistik und endlicher Lauflänge auf den Hinkfaktor kann mithilfe einer Monte-Carlo-Simulation verdeutlicht werden. Hierfür wurden 10000 Schrittkurven für eine feste Anzahl an Verweildauern simuliert, wobei die Verweildauern entweder aus einer einzigen Verteilung gezogen wurden (nicht-hinken), oder abwechselnd aus zwei verschiedenen Verteilungen (mit einem Faktor 3 bzw. 5 zwischen den beiden Ratenkonstanten). Analog zu den experimentellen Kurven wurde für jede simulierte Schrittkurve der Hinkfaktor berechnet. Für Schrittkurven mit einer Länge von 10 Verweildauern streuen die Hinkfaktoren breit und die Verteilungen für einen nicht-hinkende Motor und moderat hinkende Motoren überlappen stark (Abb. 4.8 **A**). Mit zunehmender Anzahl an Verweildauern in den einzelnen Kurven werden die Hinkfaktor-Verteilungen erwartungsgemäß schmaler und der Mittelwert nähert sich an das zugrunde liegende Verhältnis zwischen den Ratenkonstanten an.

Da sehr kurze Schrittkurven kaum Aussagekraft besitzen, wurden nur Kurven mit mindestens zehn Verweildauern analysiert. Tabelle 4.2 fasst die Auswertung für die beiden Konstrukte KLP11/KLP20 und KLP11^{EE}/KLP20^{EE} zusammen. Die ermittelten Hinkfaktoren umfassen Werte zwischen 1.0 und 4.5, wobei von insgesamt 32 Kurven lediglich vier mit $L \geq 4$ eine nennenswerte Tendenz zu hinken zeigten. In Abbildung 4.8 **B** sind die Hinkfaktoren aller analysierten Kurven entsprechend ihrer Anzahl an Verweildauern gezeigt. Der Vergleich mit den per Simulation bestimmten Mittelwerten zeigt, dass sich die Ratenkonstanten der “langsamen” und “schnellen” Phase um wahrscheinlich weniger als einen Faktor drei unterscheiden und unter Umständen sogar gleich sind. Das Konstrukt KLP11/KLP20 scheint systematisch etwas geringere Hinkfaktoren zu erzeugen als

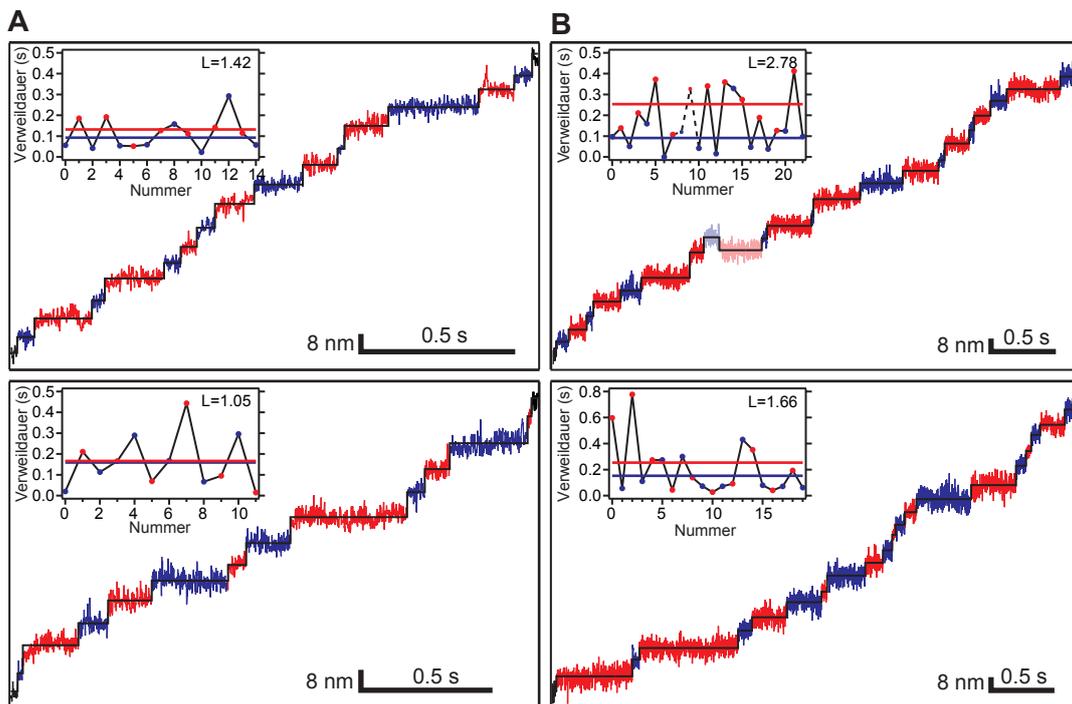


Abbildung 4.7 – Klassifizierung der Verweildauern individueller Schrittcurven in eine “langsame” (rot) und eine “schnelle” (blau) Bewegungsphase. Die Daten sind per Mittelung auf eine Bandbreite von 1 kHz reduziert. Insets: Abfolge der Verweildauern. Die mittleren Dauern der beiden Phasen, aus denen der Hinkfaktor L bestimmt wird, sind durch Linien angezeigt. Verweildauern vor und nach einem Rückwärtsschritt blieben bei der Analyse unberücksichtigt. **A** KLP11/KLP20 bei $6\ \mu\text{M}$ (oben) bzw. $3\ \mu\text{M}$ ATP (unten) und einer konstanten Rückwärtskraft von etwa $2\ \text{pN}$. **B** KLP11^{EE}/KLP20^{EE} bei $5\ \mu\text{M}$ ATP (oben und unten) und einer Rückwärtskraft von etwa $2\ \text{pN}$.

das deregulierte Protein KLP11^{EE}/KLP20^{EE}, jedoch ist es aufgrund der geringen Anzahl an Läufen schwer zu entscheiden, ob es sich dabei tatsächlich um einen signifikanten Unterschied handelt.

Eine quantitative Aussage über das Hinkverhalten von Kinesin-2 kann man mithilfe einer weiteren Monte-Carlo-Simulation erhalten. Der Datensatz von KLP11^{EE}/KLP20^{EE}, charakterisiert durch seine $N = 25$ Schrittcurven mit ihrer jeweiligen Anzahl an Verweildauern, wird in einer Monte-Carlo-Simulation für ein festes Ratenverhältnis nachgebildet und der mittlere Hinkfaktor $\langle L \rangle$ über alle 25 Kurven berechnet. Durch mehrfache Wiederholung dieses Vorgehens entsteht eine Verteilung für den mittleren Hinkfaktor $p(\langle L \rangle)$. Diese Simulation wurde sowohl basierend auf dem Fall eines nicht-hinkenden Motors durchgeführt, als auch für einen hinkenden Motor, dessen Ratenkonstanten sich um einen Faktor 2 bzw. 3 unterscheiden. Die resultierenden Verteilungen des mittleren Hinkfaktors sind in Abbildung 4.8 C gezeigt. Der Vergleich des experimentell ermittelten mittleren Hinkfaktors $\langle L \rangle = 2.4$ mit den per Simulation erzeugten Verteilungen zeigt, dass die Wahrscheinlichkeit, einen mittleren Hinkfaktor von 2.4 oder kleiner zu erhalten, bei lediglich 0.1% liegt, wenn die zugrunde liegenden Ratenkonstanten um einen

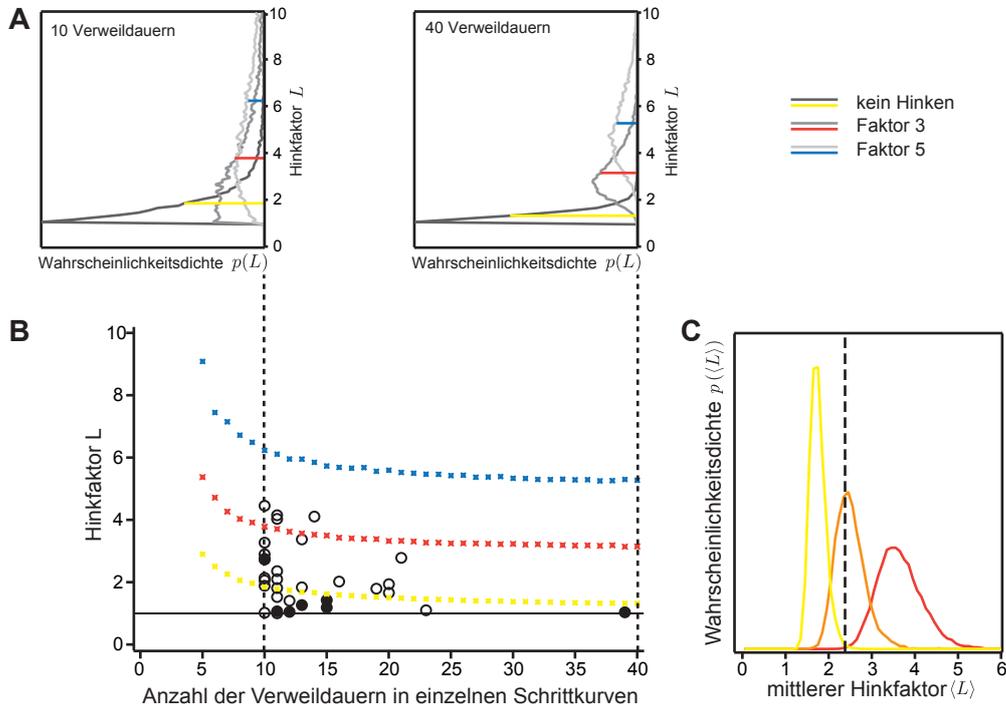


Abbildung 4.8 – Simulationsgestützte Analyse des Hinkverhaltens. **A** Verteilungen der Hinkfaktoren bei einer festen Lauflänge (10 bzw. 40 Verweildauern pro Lauf) für unterschiedliche Verhältnisse zwischen den Raten der beiden Köpfe (gelb: identische Raten, rot: dreifacher Unterschied, blau: fünffacher Unterschied). Die farbigen Linien kennzeichnen den Mittelwert der jeweiligen Verteilung. **B** Hinkfaktoren von KLP11/KLP20 (ausgefüllte Kreise) und KLP11^{EE}/KLP20^{EE} (offene Kreise); jeder Datenpunkt repräsentiert den Hinkfaktor einer Schrittcurve. Zum Vergleich sind die bei einer festen Lauflänge erwarteten mittleren Hinkfaktoren ebenfalls eingezeichnet (Farben wie in **A**). **C** Vergleich des gemessenen mittleren Hinkfaktors (gestrichelte Linie) mit simulierten Verteilungen für einen nicht-hinkenden Motor (gelb), sowie einen Motor mit zwei alternierenden Ratenkonstanten, die sich um einen Faktor zwei (orange) oder drei (rot) unterscheiden.

Konstrukt	$\langle L \rangle$	n	N
KLP11/KLP20	1.4	7	4
KLP11 ^{EE} /KLP20 ^{EE}	2.4	25	10

Tabelle 4.2 – Mittlerer Hinkfaktor $\langle L \rangle = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n L_i$ für die beiden Konstrukte, wobei n die Anzahl der analysierten Kurven und N die Anzahl der Moleküle bezeichnet.

Faktor 3 verschieden sind. Ähnlich unwahrscheinlich ist es, dass die Schrittkinetik von $\text{KLP11}^{\text{EE}}/\text{KLP20}^{\text{EE}}$ durch eine einzige Ratenkonstante charakterisiert ist: Stammen die Verweildauern aus ein und derselben Verteilung, erhält man mit einer Wahrscheinlichkeit von nur 0.36% einen mittleren Hinkfaktor von 2.4 oder größer. Der schrittweisen Fortbewegung von $\text{KLP11}^{\text{EE}}/\text{KLP20}^{\text{EE}}$ liegen also mit großer Sicherheit tatsächlich zwei verschiedene Ratenkonstanten zugrunde.

4.4 Diskussion

Die Ergebnisse dieses Kapitels zeigen, dass auch das heterodimere Kinesin-2 $\text{KLP11}/\text{KLP20}$ zwei grundlegende Funktionsprinzipien verwirklicht, die bereits aus anderen Kinesin-Familien bekannt sind: die prozessive Bewegung in diskreten 8 nm Schritten, sowie die Fähigkeit, sich selbst durch Auto-Inhibierung in einen inaktiven Zustand zu schalten.

4.4.1 Prozessivität

Die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Experimente weisen mit zunehmender Prägnanz darauf hin, dass einzelne $\text{KLP11}/\text{KLP20}$ Moleküle in der Lage sind, längere Strecken auf einem Mikrotubulus zurückzulegen ohne sich von diesem abzulösen: In Motilitätsversuchen konnte die Motorendichte auf der Oberfläche so eingestellt werden, dass Mikrotubuli-Filamente über isolierte Ankerpunkte transportiert wurden. In einem weiteren Experiment wurde $\text{KLP11}/\text{KLP20}$ auf Polystyrolkugeln adsorbiert und die Aktivität der Kugeln bei verschiedenen Motor/Kugel-Verhältnissen getestet. Dies ist eine gängige Methode, um die minimale Anzahl an Motoren zu bestimmen, die notwendig sind, um eine Kugel zu transportieren [10]. Der Verlauf der resultierenden Verdünnungskurve genügt am besten dem Modell, in dem ein einzelner Motor für die Bewegung ausreicht. Den direkten Beweis für die Prozessivität von $\text{KLP11}/\text{KLP20}$ erbrachten Messungen mit der optischen Pinzette unter limitierenden Motor/Kugel-Verhältnissen. Unter konstanten Rückwärtskräften werden bei geringen ATP-Konzentrationen sukzessiv aufeinanderfolgende Schritte sichtbar, deren Schrittweite mit 8 nm exakt der Schrittweite anderer Kinesine entspricht [82].

Alternierende Schritte

Die ersten direkten Hinweise für die Bewegung von Kinesin nach einem *Hand-over-Hand* Mechanismus lieferten künstlich erzeugte heterodimere Motoren [43]: Die Einführung einer Punktmutation in eine der Motordomänen erzeugte aus konventionellem, homodimerem Kinesin einen heterodimeren Motor, dessen katalytische Zentren sich um mehr als eine Größenordnung in ihrer Aktivität unterschieden. Das ausgeprägte Hinken dieses Heterodimers zeigte, dass die beiden Motordomänen in Übereinstimmung mit dem *Hand-over-Hand* Modell mit jedem Schritt ihre Rollen tauschen. Auch für homodimeres Kinesin mit identischen katalytischen Domänen kann ein Alternieren zwischen längeren und kürzeren Verweildauern beobachtet werden, wobei die Ausprägung des Hinkens von geometrischen Faktoren abhängt, wie beispielsweise dem Kugelradius, der Stärke der angelegten Kraft oder dem Abstand der Motordomänen von der Kugel [5, 26].

In dieser Arbeit wurde erstmalig das Schrittverhalten eines real in der Natur vorkommenden heterodimeren Motors untersucht. Die Analyse der Verweildauern zeigte, dass es keinen drastischen Unterschied in der Kinetik zwischen alternierenden Schritten gibt, und ist damit in Übereinstimmung mit ATPase-Messungen an isolierten Motordomänen (vgl. Abb. 4.9 A). Jedoch sind die abwechselnden Schritte der beiden Motordomänen mit großer Wahrscheinlichkeit auch nicht äquivalent, wie ein Vergleich des Datensatzes von KLP11^{EE}/KLP20^{EE} mit einer Monte-Carlo-Simulation ergab. Diese wenn auch geringe Asymmetrie in der Fortbewegung zeigt, dass auch das heterodimere Kinesin-2 sich nach einem *Hand-over-Hand* Mechanismus fortbewegt.

Laufängen und Krafterzeugung

Die Fähigkeit zu prozessiver Bewegung ist keine alles-oder-nichts Eigenschaft, sondern kann für verschiedene Motoren unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Beispielsweise schreitet auch das mitotische Kinesin Eg5 in sukzessiven 8 nm Schritten auf einem Mikrotubulus entlang. Eg5 löst sich jedoch nach durchschnittlich acht Schritten ab, im Gegensatz zu konventionellem Kinesin, das mit einer mittleren Laufänge von 0.6 – 1.4 μm im Stande ist, durchschnittlich für rund 100 Schritte in Kontakt mit dem Mikrotubulus zu bleiben [10, 87, 90].

Die mittlere Laufänge von heterodimerem Kinesin-2 aus *C. elegans* wurde unter konstanten Rückwärtskräften bestimmt und ist mit einem Wert von 200 nm bei einer Kraft von 2 pN etwa um einen Faktor drei geringer als für konventionelles Kinesin unter vergleichbaren Kraft- und Pufferbedingungen [72]. Ein ähnliches Verhältnis wurde für die Laufängen des homologen Kinesin-2 KIF3a/KIF3b (0.45 μm) und konventionellen Kinesins ohne externe Kraft gemessen. Die heterodimeren Vertreter der Kinesin-2 Familie scheinen demnach generell eine eingeschränkte Prozessivität aufzuweisen, eine Eigenschaft, die mit der längeren Necklinkerstruktur von Kinesin-2 im Vergleich zu Kinesin-1 in Verbindung gebracht wurde [54]. KLP11/KLP20 arbeitet bei seiner physiologischen Aufgabe, dem Transport von IFT-Partikeln im mittleren Abschnitt von Zilien, nicht als einzelnes Molekül, sondern kooperiert mit dem homodimeren Kinesin OSM3. Möglicherweise ist deshalb keine stark ausgeprägte Prozessivität vonnöten, ähnlich wie bei Eg5, welches im mitotischen Spindelapparat ebenfalls in Ensembles arbeitet.

Die Kraft, die einzelne KLP11/KLP20 Moleküle aufbringen können, ist mit 6 pN sehr ähnlich zur Maximalkraft von Kinesin-1. Während dieses jedoch bei hohen Kräften seine Geschwindigkeit drastisch reduziert, so dass schließlich keine Vorwärtsbewegung mehr stattfindet, zeigt KLP11/KLP20 eine starke Tendenz, sich vom Mikrotubulus abzulösen. Ein ähnliches Verhalten zeigen die Motoren Eg5 und OSM3, die Kräfte von bis zu 7 pN aufbringen können und ebenfalls bei hohen Kräften vom Mikrotubulus loslassen statt anzuhalten [39, 90]. Das Loslassen bei hohen Kräften ist möglicherweise insbesondere für Motoren von Bedeutung, die in Ensembles arbeiten, da ein Festhalten der Motoren bei hohen Kräften möglicherweise die Aktion der parallel arbeitenden Motoren behindern würde.

4.4.2 Auto-Inhibierung

Auto-Inhibierung bei KLP11/KLP20

Parallel zu KLP11/KLP20 wurde eine mutmaßlich deregulierte Version des Proteins untersucht, das sich durch insgesamt vier Punktmutationen in der Stielregion von dem Wildtyp-Motor unterscheidet. In den grundlegenden Eigenschaften wie Motilität und Prozessivität gab es keinen Unterschied zwischen den beiden Konstrukten, jedoch initiieren einzelne, an Kugeln adsorbierte Moleküle des mutmaßlich deregulierten Kinesin-Konstrukts signifikant häufiger Läufe entlang eines Mikrotubulus als einzelne KLP11/KLP20 Moleküle. Die erhöhte Aktivität von KLP11^{EE}/KLP20^{EE} im Vergleich zu KLP11/KLP20 ist konsistent mit der Vermutung, dass es sich bei KLP11/KLP20 um einen auto-inhibierten Motor handelt und dieser Mechanismus mithilfe von Mutationen in der Scharnierregion unterbunden werden kann.

Im Allgemeinen wird die Auto-Inhibierung eines Motors aufgehoben, wenn dieser an eine Oberfläche adsorbiert wird, beispielsweise an ein Deckglas für Motilitätsversuche oder an Kugeln für Versuche in der optischen Pinzette, da dadurch das Binden einer Last simuliert wird [22]. Im Falle von KLP11/KLP20 scheint diese Art der Aktivierung aber nur eingeschränkt für die Anbindung an Polystyrolkugeln zu funktionieren. Der beobachtete Unterschied im Verhalten von KLP11/KLP20 und dem deregulierten Konstrukt lässt sich beispielsweise dadurch erklären, dass das deregulierte Konstrukt permanent in einer aktiven Konformation vorliegt und immer dann einen Lauf startet, wenn die Orientierung der Kugel zum Mikrotubulus eine Interaktion mit diesem erlaubt. Dagegen ruft die Adsorption von KLP11/KLP20 an eine Kugel keine dauerhafte Aktivierung des Motors hervor, sondern dieser kann mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zwischen dem inhibierten und dem aktiven Zustand wechseln. Ein Lauf wird nur dann gestartet, wenn die Orientierung der Kugel dies zulässt und sich der Motor gleichzeitig im aktiven Zustand befindet.

Es ist unwahrscheinlich, dass die erhöhte Aktivität der KLP11^{EE}/KLP20^{EE}-beschichteten Kugeln durch das Zusammenwirken mehrerer Motoren auf derselben Kugel zustande kommt. Zum einen verläuft die Verdünnungskurve deckungsgleich zu der des Wildtyp-Konstrukts, also binden beide Motoren mit der gleichen Effizienz. Zum anderen erfolgte die Bestimmung der SMWF für die beiden Konstrukte bei gleichen Anteilen an aktiven Kugeln, weshalb die Wahrscheinlichkeit, dass aktive Kugeln nur einen einzigen aktiven Motor auf ihrer Oberfläche tragen für beide identisch war.

Die Interpretation, dass es sich bei KLP11^{EE}/KLP20^{EE} um eine deregulierte Version von KLP11/KLP20 handelt, wird qualitativ durch ATPase-Messungen gestützt. In diesen Versuchen wurde die Mikrotubuli-stimulierte ATPase-Aktivität der beiden frei in Lösung befindlichen Motor-Konstrukte bestimmt. Die Aktivität des (auto-inhibierten) KLP11/KLP20 sollte in diesem Experiment deutlich geringer sein als für den (deregulierten) KLP11^{EE}/KLP20^{EE} Motor. In der Tat liegt die ATPase-Aktivität von KLP11/KLP20 bei $k_{\text{cat}} \approx 1.8 \text{ s}^{-1}$ und ist damit um einen Faktor 6 – 7 niedriger als für das deregulierte Konstrukt KLP11^{EE}/KLP20^{EE} mit einer Hydrolyserate von $k_{\text{cat}} \approx 12 \text{ s}^{-1}$ (vgl. Abb. 4.9 B)².

²Ausgehend von den Geschwindigkeiten in Motilitätsversuchen liegt unter der Annahme, dass pro 8 nm Schritt ein Molekül ATP hydrolysiert wird, die erwartete ATPase-Aktivität bei $k_{\text{cat}} \approx 50 \text{ s}^{-1}$. Die gemessene Aktivität ist damit um etwa einen Faktor vier geringer als erwartet. Diese Diskrepanz könnte beispielsweise durch andere Puffer-Bedingungen in den ATPase-Versuchen begründet sein.

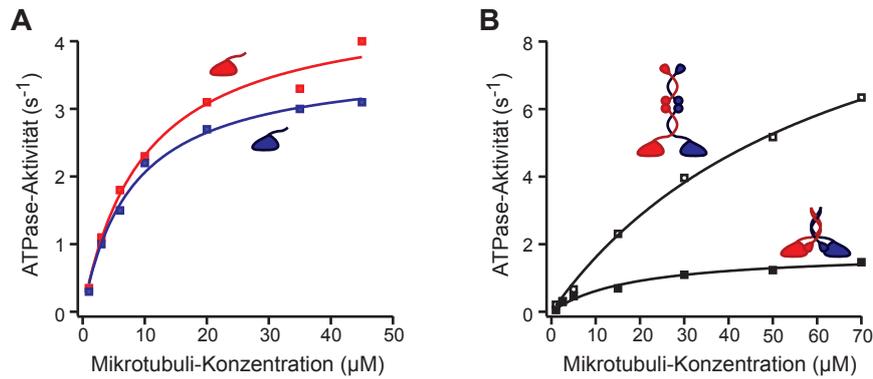


Abbildung 4.9 – Mikrotubuli-stimulierte ATPase-Aktivität von isolierten Motordomänen und heterodimeren Kinesin-2 Konstrukten (3 mM ATP). **A** ATPase-Aktivität der monomeren Motordomänen inklusive Necklinker von KLP11 (rot, Aminosäuren 1-357, $k_{\text{cat}} = 4.6 \text{ s}^{-1}$) und KLP20 (blau, Aminosäuren 1-345, $k_{\text{cat}} = 3.7 \text{ s}^{-1}$). **B** ATPase-Aktivitäten von KLP11/KLP20 (gefüllte Symbole, $k_{\text{cat}} = 1.8 \text{ s}^{-1}$) und KLP11^{EE}/KLP20^{EE} (offene Symbole, $k_{\text{cat}} = 12.1 \text{ s}^{-1}$). Die Messungen wurden von Dr. Zeynep Ökten und Süleyman Kösem durchgeführt.

Auto-Inhibierung bei KRP85/KRP95

Die Hypothese, dass Auto-Inhibierung eine wichtige Rolle für die Regulation heterodimerer Kinesin-2 Motoren spielt, kann anhand eines weiteren Vertreters, KRP85/KRP95, gefestigt werden. GFP-Fusionsproteine dieses Motors zeigten in früheren Einzelmolekül-TIRF-Versuchen keine prozessiven Läufe entlang Oberflächen-gebundener Mikrotubuli [62]. Wie auch von den Autoren damals als mögliche Erklärung angeführt, ist es denkbar, dass die mangelnde Prozessivität der Auto-Inhibierung des Proteins geschuldet ist, insbesondere da sich das Protein in diesen Versuchen frei in Lösung befand. Diese Hypothese stützte sich in erster Linie auf Experimente, in denen eine kompakte Konformation von nativem KRP85/KRP95 durch Erhöhung der Ionensärke in eine gestreckte Konformation überführt werden konnte [96]. Jedoch konnte auch eine Erhöhung der Ionenstärke keine prozessiven Läufe von KRP85/KRP95 in den Einzelmolekül-TIRF-Versuchen initialisieren.

Eine weitere Möglichkeit um zu überprüfen, ob es sich bei KRP85/KRP95 um einen prozessiven und auto-inhibierten Motor handelt, besteht darin die bei OSM3 und KLP11/KLP20 erfolgreich angewandten Mutationen einzuführen bzw. die Aktivität der Motoren zu testen, wenn diese an Kugeln adsorbiert werden. Einen ersten vielversprechenden Hinweis, dass die Einführung aktivierender Punktmutationen in die Stielregion von KRP85/KRP95 tatsächlich eine Erfolg versprechende Strategie zum Nachweis der Prozessivität dieses Proteins darstellen könnten, zeigen Motilitätsversuche bei geringen Oberflächendichten. Nach der Einführung der Mutationen G480E/G481E in KRP85 und G474E/G475E in KRP95 (KRP85^{EE}/KRP95^{EE}) konnte in der Tat der Transport von Mikrotubuli über isolierte Ankerpunkte sowohl bei sättigenden (1 mM) als auch limitierenden (1 µM) ATP-Konzentrationen beobachtet werden (Abb. 4.10 und Film 4.2, Film 4.3, Film 4.4).

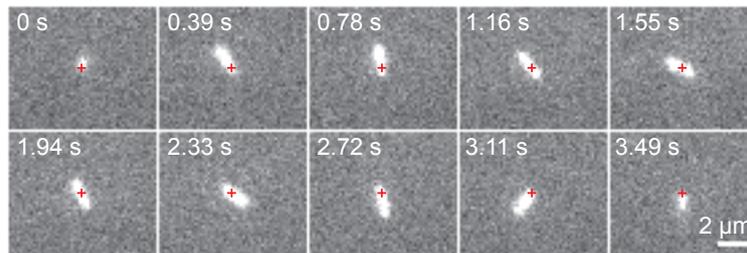


Abbildung 4.10 – Motilitätsversuch mit KRP85^{EE}/KRP95^{EE} unter geringen Oberflächendichten. Ein Mikrotubulus wird über einen isolierten Ankerpunkt (rote Markierung) transportiert.

Die Beispiele von KLP11/KLP20 und KRP85/KRP95 zeigen, dass Auto-Inhibierung ein essentieller Aspekt auch für die Funktionsweise heterodimerer Kinesin-2 Motoren ist.

5 Die Bedeutung der Heterodimerisierung

5.1 Überblick

Gibt es einen Grund für die Verheiratung zweier verschiedener Untereinheiten zu einem heterodimeren Kinesin? In diesem Kapitel werden chimäre Kinesin-Konstrukte untersucht, die jeweils zwei identische katalytische Untereinheiten des heterodimeren Motors KLP11/KLP20 besitzen. Die mechanische Charakterisierung dieser Chimären zeigt, dass die beiden Polypeptide KLP11 und KLP20 in der Tat verschieden zu Prozessivität und Auto-Inhibierung des Wildtyp-Motors beitragen [14].

5.2 Design und Expression von chimären Kinesin-2 Konstrukten

Um Motorkonstrukte mit zwei identischen Motordomänen zu erzeugen, wurden auf DNA-Ebene chimäre Untereinheiten hergestellt, bei denen die Motordomänen und Necklinker von KLP11 und KLP20 durch die der jeweils anderen Untereinheit ersetzt wurden. Die Co-Expression einer chimären Untereinheit mit dem entsprechenden nativen Gegenstück liefert die "homodimeren" Motoren KLP11/11 bzw. KLP20/20 mit identischen Motordomänen und heterodimerer Stielregion. Die Schnittstelle für die chimären Polypeptide wurde jeweils direkt nach dem konservierten Necklinker gewählt (Abb. 5.1 **A, B**).

Grundsätzlich kann durch die Transplantation einer Motordomäne an die Stielregion der komplementären Untereinheit ein nicht mehr funktionsfähiges Polypeptid entstehen. Um dies zu überprüfen, werden die beiden chimären Untereinheiten co-exprimiert, was in einem Motor resultiert, der wie das Wildtyp-Konstrukt KLP11/KLP20 zwei unterschiedliche Motordomänen enthält, nur dass diese an die Stielregionen der jeweils anderen Untereinheit fusioniert sind. Anhand dieses Konstrukts KLP20/11^{SW} kann somit auf elegante Weise die Funktionalität der beiden chimären Polypeptide nachgewiesen werden, da es sich in Hinblick auf seine katalytischen Eigenschaften wie das Wildtyp-Konstrukt verhalten sollte. Alle chimären Konstrukte wurden analog zu KLP11/KLP20 aufgereinigt und ihre Dimerisierung mithilfe von Gelfiltration in Kombination mit MALS nachgewiesen. Die für die Dimere erwarteten und die experimentell bestimmten Molekulargewichte sind in Tabelle 5.1 gegenübergestellt.

Sowohl die beiden "Homodimere" als auch das doppelt-chimäre Kontrollkonstrukt enthalten die vollständige, native, heterodimere Stielregion. Da auch diese Motoren möglicherweise durch Auto-Inhibierung reguliert sind, werden analog zum Wildtyp-Protein Konstrukte mit den in Abschnitt 4.2 beschriebenen Mutationen in der Stielregion erzeugt (Abb. 5.1 **C**).

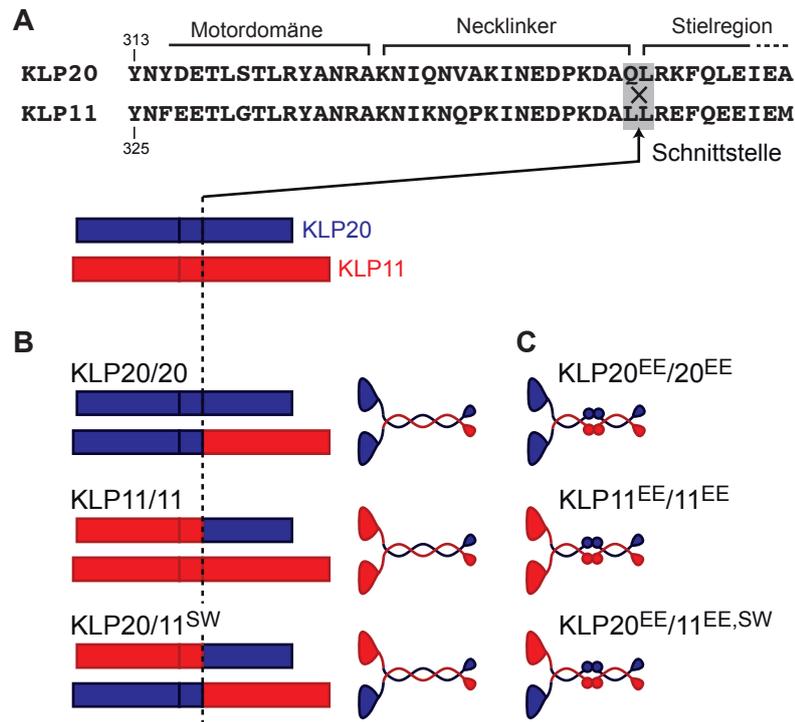


Abbildung 5.1 – **A** Die Schnittstelle für die chimären Kinesin-Motoren nach dem Necklinker. **B** Übersicht über die chimären Kinesin-2 Konstrukte mit unveränderter Stielregion. **C** Mutmaßlich deregulierte chimäre Kinesin-2 Konstrukte mit aktivierenden Mutationen in der Stielregion.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Motilität der chimären Motorkonstrukte

Zunächst wurde die Funktionalität aller chimären Motoren anhand von Motilitätsversuchen nachgewiesen. Die Motoren transportierten Mikrotubuli gleichmäßig über die Oberfläche, mit Geschwindigkeiten ähnlich zu der des Wildtyp-Motors um etwa $0,4 \mu\text{m/s}$. Lediglich die Konstrukte KLP11/11 und KLP11^{EE}/11^{EE} zeigen eine um einen Faktor zwei niedrigere Geschwindigkeit und sind damit signifikant langsamer. Die Mutationen in der Stielregion haben generell keinen signifikanten Einfluss auf die Transportgeschwindigkeit. Tabelle 5.2 fasst die Geschwindigkeiten der chimären Motoren zusammen.

5.3.2 Die (Un-)Prozessivität der chimären Motorkonstrukte

Welche Rolle spielen die beiden unterschiedlichen Motordomänen für die Prozessivität von KLP11/KLP20? Sind sie in ihrer Funktionalität so aufeinander abgestimmt, dass nur die Kombination der beiden zu einem lauffähigen Motor führt, oder können sich auch zwei identische Motordomänen zu einem prozessiven Motor koordinieren? Diese Fragestellung wurde anhand der beiden "homodimeren" Chimären KLP20/20 und KLP11/11 untersucht.

Konstrukt	MW (kDa)	
	erwartet	Experiment
KLP11/11	164	143
KLP20/20	160	154
KLP20/11 ^{SW}	162	178
BSA	66	68

Tabelle 5.1 – Erwartete und über Gelfiltration und MALS experimentell bestimmte Molekulargewichte der chimären Motorkonstrukte sowie einer BSA-Kontrolle.

Konstrukt	v ($\mu\text{m/s}$)	N	Konstrukt	v ($\mu\text{m/s}$)	N
KLP11/11	0.19 ± 0.03	176 (4)	KLP11 ^{EE} /11 ^{EE}	0.22 ± 0.03	65 (2)
KLP20/20	0.44 ± 0.05	98 (2)	KLP20 ^{EE} /20 ^{EE}	0.45 ± 0.06	69 (3)
KLP20/11 ^{SW}	0.35 ± 0.06	91 (2)	KLP20 ^{EE} /11 ^{EE,SW}	0.44 ± 0.03	65 (2)
KLP11/KLP20	0.41 ± 0.06	198 (5)	KLP11 ^{EE} /KLP20 ^{EE}	0.48 ± 0.05	262 (5)

Tabelle 5.2 – Geschwindigkeiten aller *C. elegans* Kinesin-2 Konstrukte. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. N : Anzahl der analysierten Mikrotubuli. Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der verschiedenen Motor-Aufreinigungen an, die in die Analyse eingingen.

Eine wichtige Grundlage für die Aussagekraft der Experimente mit diesen Konstrukten besteht in der Funktionalität der chimären Untereinheiten in den Motoren. Daher ist die Überprüfung der Prozessivität des Kontrollkonstrukts KLP20/11^{SW}, welches beide chimären Untereinheiten enthält, von zentraler Bedeutung.

Das Kontrollkonstrukt KLP20/11^{SW} und die Chimäre KLP20/20 sind prozessiv

In Verdünnungsexperimenten mit KLP20/11^{SW} und KLP20/20 wird der Transport von Kugeln unter variablen Motor/Kugel-Verhältnissen am besten durch das Ein-Motor-Modell (Gl. 3.2) wiedergegeben (Abb. 5.2 **A**). Ein Molekül reicht also aus, um eine Kugel entlang eines Mikrotubulus zu transportieren. Die prozessive Bewegung einzelner Motoren konnte unter limitierenden ATP-Konzentrationen unmittelbar in Form von diskreten Schritten nachgewiesen werden. Die mittlere Schrittweite liegt bei dem für Kinesin typischen Wert von rund 8 nm (Abb. 5.2 **B**).

Wie die Resultate von KLP20/11^{SW} zeigen, bilden die beiden unterschiedlichen Motor-domänen ungeachtet der Transplantation an die jeweils komplementäre Stielregion miteinander einen prozessiven Motor. Die beiden chimären Untereinheiten sind folglich im Hinblick auf Prozessivität funktional. Die Prozessivität der Chimäre KLP20/20 demonstriert, dass sich auch zwei KLP20-Motordomänen koordiniert entlang eines Mikrotubulus bewegen können und die Paarung mit einer KLP11-Motordomäne somit keine zwingende Voraussetzung für Prozessivität darstellt.

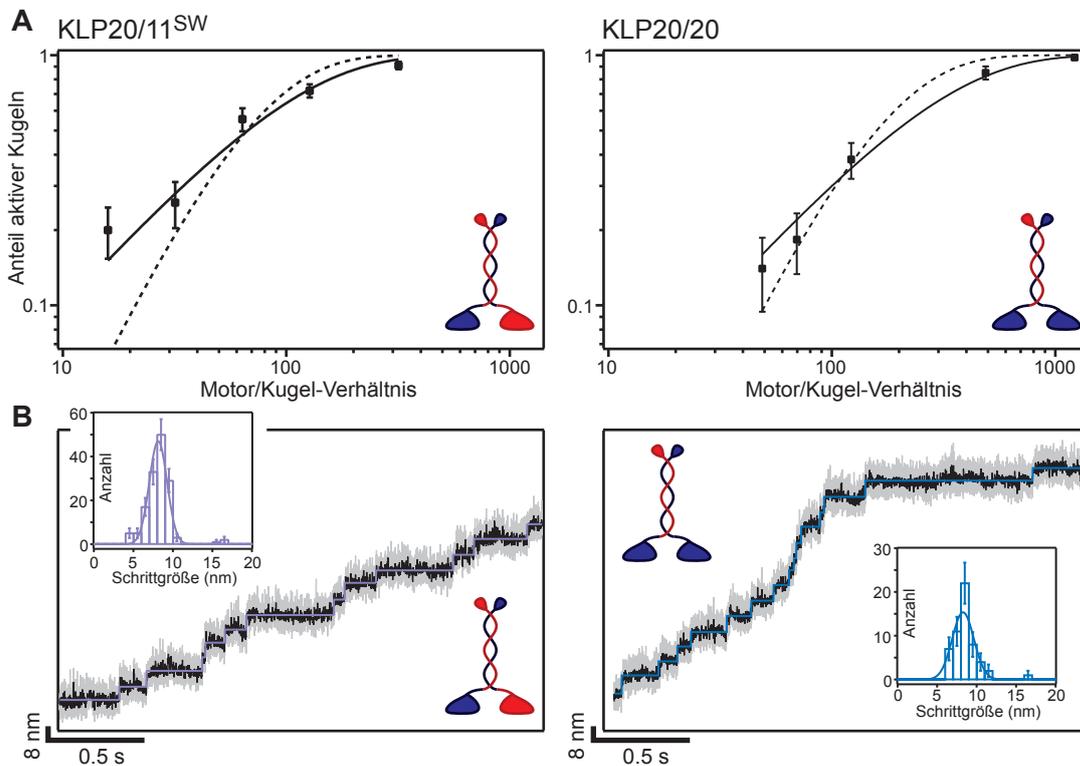


Abbildung 5.2 – KLP20/11^{SW} und KLP20/20 sind prozessiv. **A** Anteil der aktiven Kugeln in Abhängigkeit des Motor/Kugel-Verhältnisses für KLP20/11^{SW} (links) und KLP20/20 (rechts). Insgesamt wurden $N = 406$ bzw. $N = 274$ Kugeln getestet (pro Verhältnis $n = 47 - 104$). Der Verlauf wird für beide Konstrukte am besten durch das Ein-Motor-Modell beschrieben (durchgezogene Linien, $\chi^2 = 5.9$ und $\chi^2 = 1.35$). Das Zwei-Motoren-Modell liefert eine signifikant schlechtere Anpassung an die Messdaten (gestrichelte Linien, $\chi^2 = 26.6$ und $\chi^2 = 6.9$). **B** Sukzessive Schritte von KLP20/11^{SW} (links, $5 \mu\text{M}$ ATP, 1.8 pN) und KLP20/20 (rechts, $3.3 \mu\text{M}$ ATP, 2.2 pN). Grau: ungefilterte Daten (10 bzw. 20 kHz), schwarz: per Mittelung auf eine Bandbreite von 1 kHz reduzierte Daten, lila bzw. blau: Rekonstruktion der Schritte mit automatisierter Schrittenerkennungsfunktion. Insets: Die Schrittweiten sind gaußförmig verteilt mit einer Schrittweite von $(8.14 \pm 0.13) \text{ nm}$ ($N = 145$, KLP20/11^{SW}) und $(8.28 \pm 0.26) \text{ nm}$ ($N = 55$, KLP20/20). Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

Die Chimäre KLP11/11 ist unprozessiv

Bei der Durchführung des Verdünnungsexperiments mit KLP11/11 war ein deutlicher Unterschied im Laufverhalten dieses Motors zu den bislang untersuchten Konstrukten zu erkennen. Zwar bewegen sich KLP11/11-beschichtete Kugeln unter hohen Motor/Kugel-Verhältnissen entlang von Mikrotubuli, jedoch reduzierte sich diese Bewegung bei sukzessive geringeren Motorendichten auf ein gelegentliches “Zucken” der Kugeln (Abb. 5.3 **A** und **B**), das sich frappant von den prozessiven Läufen aller anderer Motorkonstrukte unterscheidet (vgl. Abb. 5.6 **A**). Dieses Verhalten wurde konsistent für mehrere Proteinaufreinigungen und auch bei Verwendung einer anderen Kugelcharge beobachtet. Um auszuschließen, dass dieses Verhalten durch eine Auto-Inhibierung der beiden KLP11-Motordomänen hervorgerufen wird, wurde der Versuch mit KLP11^{EE}/11^{EE} wiederholt. Dieser Motor zeigte jedoch das gleiche Verhalten wie KLP11/11 (Abb. 5.3 **C**).

Das uneindeutige Laufverhalten von KLP11/11 bei geringen Motorendichten machte es sehr schwierig, während des Experiments zu entscheiden, ob eine Kugel als aktiv gewertet werden sollte oder nicht. Zur Auswertung wurde daher für alle Kugeln die Position über die Dauer der Testphase (30 s) aufgezeichnet und im Nachhinein analysiert. Der Verlauf der Verdünnungskurve von KLP11/11 hängt stark von dem Kriterium ab, das an ein Laufereignis gestellt wird (Abb. 5.4). Werden alle Signale über einen Grenzwert von 1 pN hinaus als Lauf gewertet, liefern sowohl das Ein-Motor- als auch das Zwei-Motoren-Modell eine passable Anpassung an die Daten. Eine Erhöhung des Schwellwerts, den eine Kugel erreichen muss, um als aktiv klassifiziert zu werden, schlägt sich aufgrund der extrem schwachen Laufsignale in einer deutlichen Verringerung des Anteils an aktiven Kugeln nieder. Für die beiden niedrigsten Motor/Kugel-Verhältnisse aus Abb. 5.4 **A** reduziert sich der Anteil bei einem 2 oder 3 pN-Schwellwert auf Null, weshalb diese Punkte in der doppel-logarithmischen Auftragung nicht dargestellt werden (Abb. 5.4 **B** und **C**). Für diese Schwellwerte ergibt sich eine bessere Beschreibung der Daten mit dem Zwei-Motoren-Modell, d.h. es ist die gleichzeitige Aktion mehrerer Moleküle erforderlich, um ein entsprechendes Laufsignal zu erzeugen. KLP11/11 ist also nicht in der Lage, als einzelner Motor prozessive Läufe vergleichbar zu den anderen Konstrukten zu initiieren.

Für KLP11/11 werden unter limitierenden Motor/Kugel-Verhältnissen schwache Auslenkungen der Kugel aus dem Laserfokus von bis zu 10 nm detektiert. Aufgrund der Elastizität des Kugel-Kinesin Komplexes entspricht dies aber nicht der tatsächlichen Strecke, die das Kinesin-Molekül zurücklegt. Bei der mechanischen Untersuchung eines molekularen Motors in der hier verwendeten Ein-Kugel-Geometrie kann das System aus Laserfokus, Kugel und molekularem Motor als Serienschaltung von Federn betrachtet werden, wobei neben der Federhärte des Laserfokus auch die nichtlineare Elastizität der Anbindung des Motors an die Kugel und die der Stielregion des Motors eingehen. Die beobachtete Auslenkung der Kugel x_K repräsentiert nur einen Teil der tatsächlich vom Motor zurückgelegten Strecke x_M , da auch die nichtlinear elastischen Elemente um die Strecke x_{nl} gestreckt werden (Abb. 5.3 **D**):

$$x_M = x_K + x_{nl}. \quad (5.1)$$

Beginnt der Motor sich auf dem Filament fortzubewegen, so geht ein Teil dieser Positionsänderung zunächst hauptsächlich in die Dehnung der nichtlinearen Elemente, und die ersten Schritte eines Motors können nicht detektiert werden. Daher handelt es sich bei

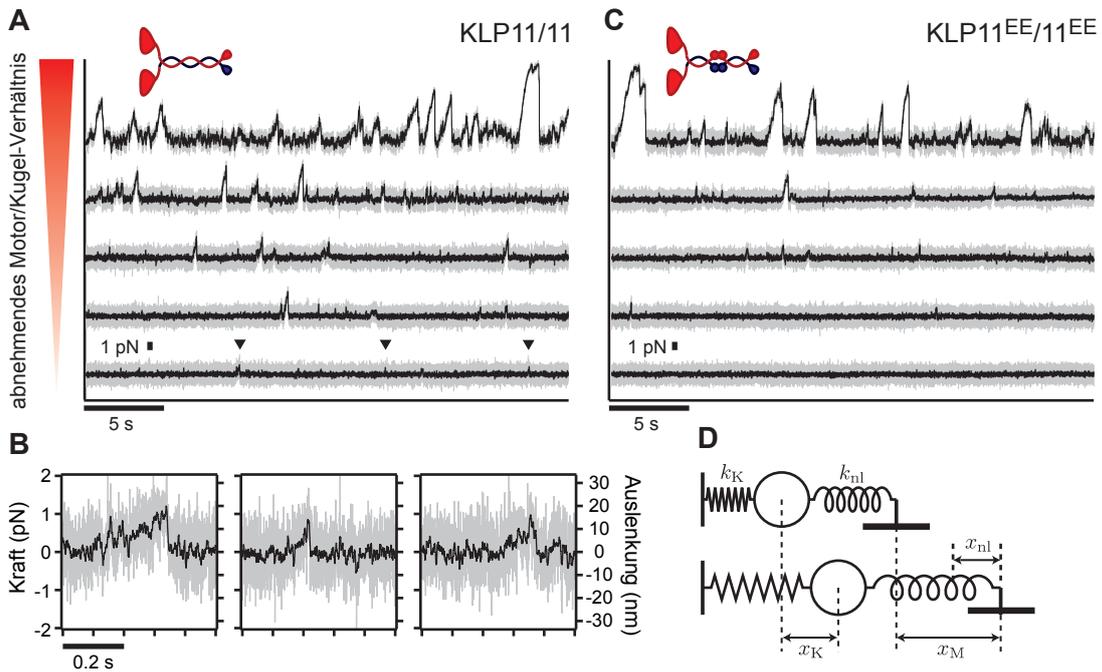


Abbildung 5.3 – KLP11/11 initiiert keine langen prozessiven Läufe. **A** Laufverhalten von KLP11/11 mit abnehmendem Motor/Kugel-Verhältnis (4000, 400, 150, 75, 15 von oben nach unten). Grau: Daten mit voller Bandbreite (10 kHz), schwarz: mit gleitendem Durchschnitt gefilterte Daten (Zeitfenster 5 ms). Mit abnehmender Motorendichte auf den Kugeln können nur noch sehr geringe Auslenkungen der Kugel detektiert werden (Pfeilspitzen). **B** Vergrößerung der mit Pfeilspitzen markierten Ereignisse aus **A**. Die Federkonstante betrug $k_c = 0.06$ pN/nm. **C** Laufverhalten von KLP11^{EE}/11^{EE} mit abnehmendem Motor/Kugel-Verhältnis (Motor/Kugel-Verhältnisse wie in **A**). **D** Federmodell der Ein-Kugel-Geometrie (siehe Text).

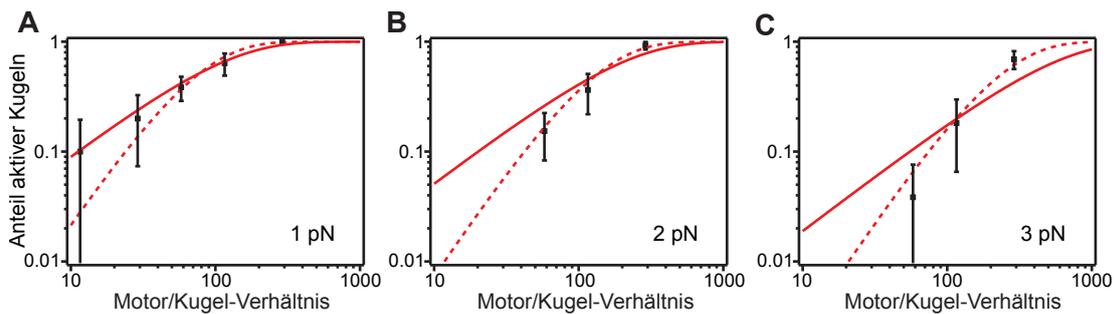


Abbildung 5.4 – Anteil der aktiven Kugeln in Abhängigkeit des Motor/Kugel-Verhältnisses für KLP11/11 bei unterschiedlichen Kriterien für aktive Kugeln. Insgesamt wurden 70 Kugeln getestet ($n = 10 - 26$ pro Verhältnis). An die Daten wurde jeweils das Ein-Motor-Modell (durchgezogene Linie) und das Zwei-Motoren-Modell (gestrichelte Linie) angepasst. **A** Grenzwert 1 pN. $\chi^2 = 1.05$ (ein Motor), $\chi^2 = 1.28$ (zwei Motoren). **B** Grenzwert 2 pN. $\chi^2 = 9.02$ (ein Motor), $\chi^2 = 0.901$ (zwei Motoren). **C** Grenzwert 3 pN. $\chi^2 = 7.85$ (ein Motor), $\chi^2 = 0.96$ (zwei Motoren).

KLP11/11 wahrscheinlich nicht um einen vollständig unprozessiven Motor im strengsten Sinne, der lediglich für die Dauer eines ATPase-Zyklus mit dem Mikrotubulus in Kontakt bleibt. Selbst wenn KLP11/11 gelegentlich eine geringfügige Anzahl aufeinanderfolgender Schritte macht, kann er dennoch als “unprozessiv” im Sinne eines Transportmotors bezeichnet werden.

Im Gegensatz zu KLP20/20 resultiert die Kombination zweier KLP11-Motordomänen in einem im physiologischen Sinne unprozessiven Motor. Die Paarung von KLP11 mit einer KLP20-Motordomäne (in KLP11/KLP20 oder KLP20/11^{SW}) ist daher für Prozessivität notwendig.

Der Einfluss der “unprozessiven” Motordomäne auf den Grad der Prozessivität

Welchen Einfluss hat die Präsenz der unprozessiven KLP11-Motordomäne auf den Grad der Prozessivität von KLP11/KLP20? Die Antwort auf diese Frage liefert der Vergleich der Lauflängen des heterodimeren Motors mit denen des prozessiven “Homodimers”, bei dem die KLP11-Motordomäne durch die von KLP20 ersetzt wurde.

Die mittleren Lauflängen des deregulierten Wildtyp-Motors KLP11^{EE}/KLP20^{EE} sind bereits aus Abschnitt 4.3.3 bekannt. In einem analogen Experiment wurden die Lauflängen von einzelnen KLP20^{EE}/20^{EE} Molekülen unter konstanten Rückwärtskräften von 1 – 4 pN bestimmt. Über diesen Kraftbereich legen die beiden Motorstrukture im Mittel ähnliche Strecken zurück, bevor sie sich vom Mikrotubulus ablösen (Abb. 5.5).

Dies zeigt, dass die Kombination der unprozessiven KLP11- mit einer prozessiven KLP20-Motordomäne denselben Grad an Prozessivität erreicht wie die Kombination zweier KLP20-Motordomänen. Die Lauflänge von KLP11/KLP20 ist demnach nicht durch das Vorhandensein der KLP11-Motordomäne beeinträchtigt.

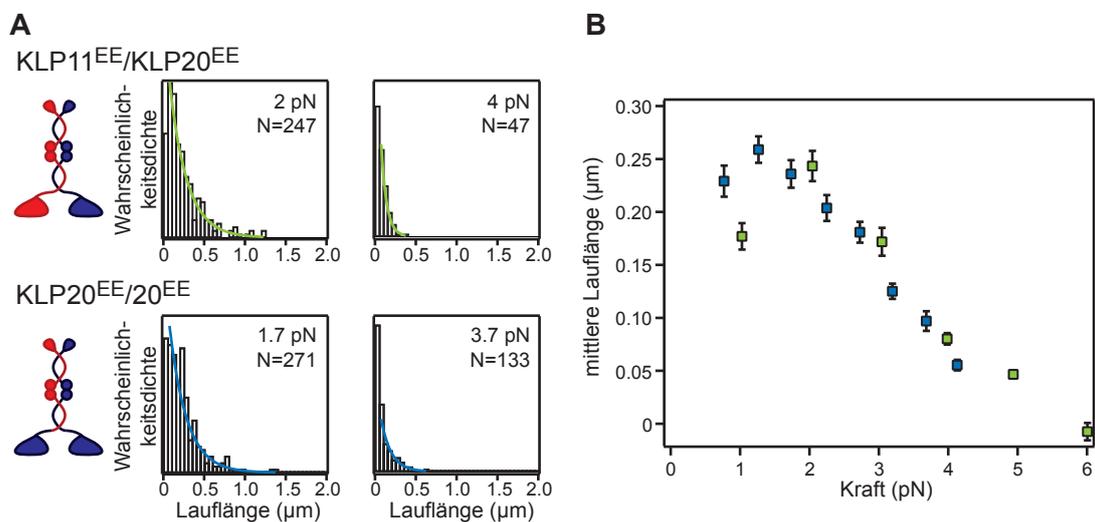


Abbildung 5.5 – **A** Einfach exponentielle Verteilung der Lauflängen für KLP11^{EE}/KLP20^{EE} (oben) und KLP20^{EE}/20^{EE} (unten) bei je zwei unterschiedlichen Kräften. **B** Mittlere Lauflänge für KLP11^{EE}/KLP20^{EE} (grün) und KLP20^{EE}/20^{EE} (blau) in Abhängigkeit der Kraft.

5.3.3 Aufhebung der Auto-Inhibierung bei den chimären Motoren

Anhand der chimären Motoren lassen sich auch die Beiträge der beiden unterschiedlichen Motordomänen zur Auto-Inhibierung von KLP11/KLP20 separieren. Analog zu den Experimenten mit KLP11/KLP20 und KLP11^{EE}/KLP20^{EE} wurde die Häufigkeit analysiert, mit der einzelne Motormoleküle Läufe entlang von Mikrotubuli initialisieren. Dabei zeigten weniger als 20% aller getesteten Kugeln Aktivität, was mit den Gleichungen (3.2) und (3.1) einer Wahrscheinlichkeit von rund 90% entspricht, dass die beobachteten Läufe von ein und demselben Motor auf der Kugel stammen. Die prozessiven Chimären initiierten unter Einzelmolekülbedingungen ebenso oft Läufe entlang eines Mikrotubulus wie das deregulierte Konstrukt KLP11^{EE}/KLP20^{EE} – unabhängig davon, ob sie die Wildtyp-Stielregion oder die deregulierte Version der Stielregion besitzen (Abb. 5.6). Mit anderen Worten: die prozessiven Chimären sind nicht mehr auto-inhibiert.

Das unregulierte “Homodimer” KLP20/20 unterscheidet sich von dem Wildtyp-Motor KLP11/KLP20 lediglich dadurch, dass die Motordomäne der KLP11-Untereinheit durch die von KLP20 ersetzt wurde. Die Präsenz der KLP11-Motordomäne ist daher notwendig, damit Auto-Inhibierung stattfinden kann. Zusätzlich ist die korrekte Positionierung der KLP11-Motordomäne erforderlich: Dies zeigt die hohe Dichte an Laufereignissen des Kontrollkonstrukts KLP20/11^{SW}, in dem ja beide Motordomänen enthalten sind, jedoch in vertauschten Positionen relativ zur heterodimeren Stielregion¹.

5.4 Diskussion

In Kapitel 4 konnte kein nennenswerter kinetischer Unterschied zwischen den beiden Motordomänen von KLP11/KLP20 festgestellt werden, weder im Kontext des Wildtyp-Motors in Einzelmolekülversuchen, noch bei der Untersuchung der katalytischen Eigenschaften isolierter Motordomänen in ATPase-Experimenten. Mit den Ergebnissen der “homodimeren” Chimären von KLP11/KLP20 kristallisiert sich indes heraus, dass das Vorhandensein der beiden verschiedenen Untereinheiten für Prozessivität und Auto-Inhibierung des Wildtyp-Motors unerlässlich ist.

5.4.1 KLP20 ist notwendig für die Prozessivität von KLP11/KLP20

Die Untereinheiten KLP11 und KLP20 sind nicht äquivalent, was ihre Fähigkeit zu prozessiver Bewegung anbelangt. Die Kombination zweier KLP20-Motordomänen im Konstrukt KLP20/20 ist prozessiv und legt im Mittel ähnliche Strecken auf einem Mikrotubulus zurück wie die Wildtyp-Konstellation. Ersetzt man jedoch die KLP20-Motordomäne inklusive Necklinker in KLP11/KLP20 durch die entsprechenden Elemente von KLP11, so zeigt das resultierende “Homodimer” KLP11/11 keine prozessiven Läufe mehr. Triviale Erklärungen für diese Beobachtung, wie unfunktionale Motoraufreinigungen oder Aggregation des Proteins, wurden bereits im Vorfeld anhand von Motilitätsversuchen und Gelfiltrationsexperimenten ausgeschlossen. Auch eine potentiell unfunktionale chimäre Untereinheit (Motordomäne von KLP11 fusioniert an Stieldomäne von KLP20) scheidet als Erklärung aus, da das Kontrollkonstrukt KLP20/11^{SW}, das genau diese Untereinheit

¹Ein aufschlussreiches Experiment in diesem Zusammenhang wäre der Versuch, durch das zusätzliche Vertauschen der Schwanzregionen die Auto-Inhibierung wieder einzuführen.

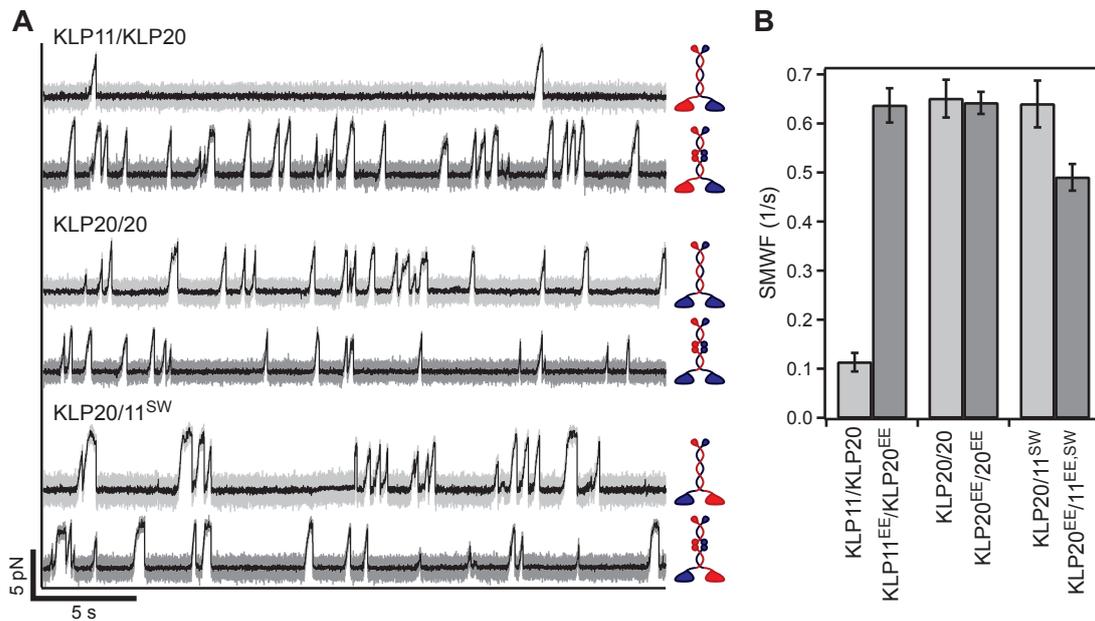


Abbildung 5.6 – **A** Laufsignale der prozessiven Chimären im Vergleich zum Wildtyp-Motor. Gezeigt sind von oben nach unten: KLP11/KLP20, KLP11^{EE}/KLP20^{EE}, KLP20/20, KLP20^{EE}/20^{EE}, KLP20/11^{SW}, KLP20^{EE}/11^{EE,SW}. Läufe von Konstrukten mit Wildtyp-Stielregion sind in hellgrau gezeigt, darunter in dunkelgrau jeweils die Läufe des entsprechenden Konstrukts mit der deregulierten Stielregion. Schwarz: mit gleitendem Durchschnitt gefilterte Daten (Zeitfenster 5 ms). **B** Alle prozessiven chimären Konstrukte zeigen vergleichbare Werte für SMWF wie das deregulierte Wildtyp-Konstrukt KLP11^{EE}/KLP20^{EE}.

enthält, prozessiv ist. Ebenso ist es unwahrscheinlich, dass KLP11/11 lediglich aufgrund von Auto-Inhibition inaktiviert ist, da auch das Konstrukt KLP11^{EE}/11^{EE} mit den aktivierenden Mutationen in der Stieldomäne keine prozessiven Läufe zeigt – auch wenn es grundsätzlich denkbar ist, dass diese Mutationen den Motor möglicherweise nicht vollständig aktivieren, falls ein zusätzlicher Regulationsmechanismus existieren sollte.

Die beiden “unprozessiven” Untereinheiten von KLP11/11 ergeben in Kombination mit den entsprechenden “prozessiven” Untereinheiten von KLP20/20 wiederum prozessive Motoren (siehe Abb. 5.7). Auch wenn offenbar zwei KLP11-Motordomänen nicht in der Lage sind, sich miteinander zu koordinieren, so kann die Paarung mit einer KLP20-Motordomäne dennoch Prozessivität erzeugen.

KLP11/KLP20 ist damit das erste Beispiel für einen natürlich vorkommenden Motor, der eine prozessive und eine unprozessive Motordomäne enthält. Dass eine unprozessive Untereinheit prozessive Bewegung erlaubt, solange sie mit einer prozessiven Untereinheit kombiniert ist, wurde bereits mit artifiziellen, Kinesin-1 basierten Heterodimeren gezeigt [42, 43, 83]. In diesen Experimenten wurde jeweils eine Wildtyp-Untereinheit mit einer katalytisch inaktiven Untereinheit dimerisiert. Während diese künstlichen Heterodimere jedoch im Vergleich zum Wildtyp-Homodimer signifikant an Geschwindigkeit und Laufflänge einbüßten, mindert die Anwesenheit der unprozessiven KLP11-Motordomäne

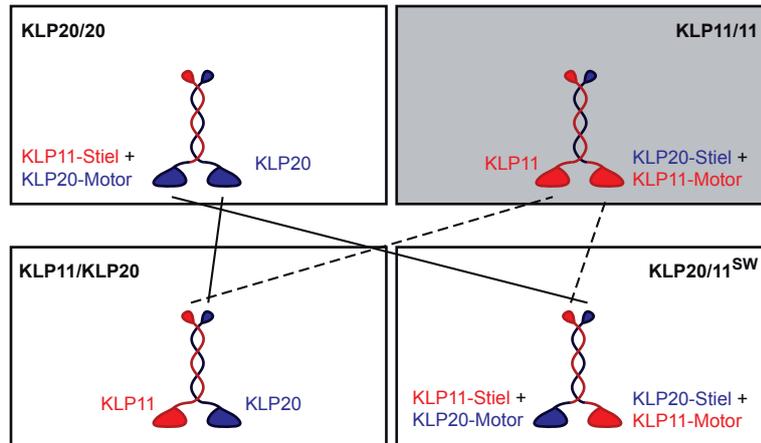


Abbildung 5.7 – Kombination der unprozessiven Untereinheiten von KLP11/11 mit den prozessiven Untereinheiten von KLP20/20 zu den prozessiven Motoren KLP11/KLP20 und KLP20/11^{SW}.

keineswegs den Grad der Prozessivität des heterodimeren Wildtyp-Motors, wie ein Vergleich der Lauflängen von KLP11^{EE}/KLP20^{EE} mit KLP20^{EE}/20^{EE} zeigte.

Ein ähnliches Ergebnis liefern Messungen der ATPase-Aktivität der chimären Kinesin-2 Konstrukte: Das unprozessive Konstrukt mit zwei KLP11-Motordomänen besitzt eine deutlich geringere Aktivität als die prozessiven Chimären, die eine ähnliche Aktivität zeigen wie der deregulierte Wildtyp-Motor (Abb. 5.8). Dabei zeigt jede der beiden Untereinheiten von KLP11^{EE}/11^{EE} volle katalytische Aktivität, wenn sie im deregulierten Wildtyp-Motor KLP11^{EE}/KLP20^{EE} oder dem Kontrollkonstrukt KLP20^{EE}/11^{EE,SW} mit einer Untereinheit gepaart werden, die eine KLP20-Motordomäne enthält. Die eingeschränkte katalytische Aktivität des unprozessiven Motors wird auch in Motilitätsversuchen deutlich, in denen er eine signifikant niedrigere Geschwindigkeit besitzt als die prozessiven Motoren.

Warum ist die Kombination zweier KLP11-Motordomänen nicht prozessiv? Es ist denkbar, dass die beiden Motordomänen aus sterischen Gründen keine aufeinanderfolgenden Schritte entlang von Mikrotubuli ausführen können. Möglicherweise besitzen die beiden Köpfe eine ungünstige Orientierung zueinander, so dass eine gleichzeitige Bindung an den Mikrotubulus erschwert ist, oder die hintere Motordomäne kann die vordere während eines Schrittes nicht ungehindert passieren. Vielleicht existiert jedoch auch eine Interaktion zwischen zwei KLP11-Motordomänen, die auf den Motor inhibierend wirkt. Interessanterweise zeigen analoge Versuche mit dem heterodimeren Kinesin-2 KIF3a/KIF3b, dass die entsprechenden "homodimeren" Chimären beide prozessiv sind [54].

5.4.2 KLP11 ist notwendig für die Auto-Inhibition von KLP11/KLP20

Die Substitution der KLP11-Motordomäne in KLP11/KLP20 durch die katalytische Domäne von KLP20 führt zu einem prozessiven Motor, der nicht mehr durch Auto-Inhibition reguliert ist. Dies zeigt unmittelbar die Wichtigkeit der KLP11-Motordomäne

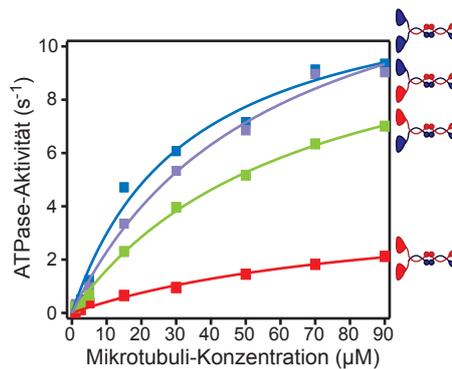


Abbildung 5.8 – Mikrotubuli-stimulierte ATPase der chimären Kinesin-2 Konstrukte. KLP11^{EE}/11^{EE} (rot, $k_{\text{cat}} = 4.2 \text{ s}^{-1}$) zeigt eine deutlich reduzierte Aktivität im Vergleich zu KLP20^{EE}/20^{EE} (blau, $k_{\text{cat}} = 12.9 \text{ s}^{-1}$), KLP20^{EE}/11^{EE,SW} (lila, $k_{\text{cat}} = 15.2 \text{ s}^{-1}$) und KLP11^{EE}/KLP20^{EE} (grün, $k_{\text{cat}} = 12.1 \text{ s}^{-1}$). Durchgeführt von Dr. Zeynep Ökten und Süleyman Kösem.

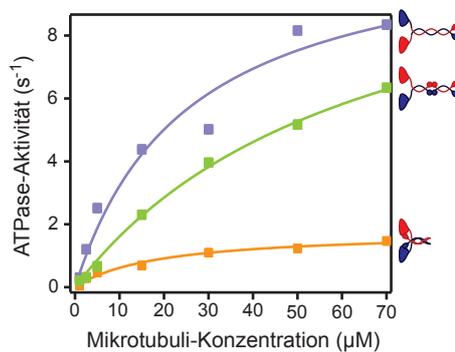


Abbildung 5.9 – Das Vertauschen der Motordomänen in KLP11/KLP20 steigert die ATPase-Aktivität auf das Niveau des deregulierten Wildtyp-Motors. $k_{\text{cat}} = 11.3 \text{ s}^{-1}$ (KLP20/11^{SW}, lila), $k_{\text{cat}} = 12.1 \text{ s}^{-1}$ (KLP11^{EE}/KLP20^{EE}, grün), $k_{\text{cat}} = 1.8 \text{ s}^{-1}$ (KLP11/KLP20, orange). Durchgeführt von Dr. Zeynep Ökten und Süleyman Kösem.

für eine funktionierende Auto-Inhibierung. Die Positionierung dieser Domäne relativ zur heterodimeren Stieldomäne ist dabei essenziell, wie das Kontrollkonstrukt KLP20/11^{SW} zeigt, in dem die Positionen der beiden Motordomänen innerhalb des Moleküls vertauscht wurden. KLP11/KLP20 ist demnach über einen asymmetrischen Auto-Inhibierungsmechanismus reguliert, der durch die KLP11-Motordomäne vermittelt wird. Diese Schlussfolgerung, die auf dem Verhalten einzelner Moleküle in der optischen Pinzette beruht, kann wiederum in einem unabhängigen Ensemble-Experiment überprüft werden. In ATPase-Versuchen sollte die Aktivität des Kontrollkonstrukts KLP20/11^{SW} deutlich über der des Wildtyp-Motors KLP11/KLP20 liegen, vergleichbar mit der des deregulierten Wildtyp-Motors KLP11^{EE}/KLP20^{EE}. Dies ist in der Tat der Fall, wie in Abbildung 5.9 gezeigt ist.

5.4.3 Die Bedeutung der Heterodimerisierung für die Funktionalität von KLP11/KLP20

Um seine physiologische Aufgabe als Transportmotor in Zilien erfüllen zu können, muss das heterodimere Kinesin-2 KLP11/KLP20 drei Anforderungen erfüllen: Die Assoziation mit dem Polypeptid KAP, Prozessivität und Auto-Inhibierung. Ausgehend von einer beliebigen Kombination von Stielregionen und Motordomänen (mit Necklinkern), haben die Ergebnisse dieses Kapitels gezeigt, dass der Wildtyp-Motor KLP11/KLP20 als einziger diesen drei Anforderungen gleichzeitig genügt (Abb. 5.10):

Die katalytisch inaktive Untereinheit KAP stellt die Verbindung des heterodimeren

6 Einfluss der Nackenstruktur auf den Pfad von Kinesin-Motoren

6.1 Überblick

Motoren der Myosin-, Kinesin- und Dynein-Familie wandeln durch die Hydrolyse von ATP chemisch gespeicherte Energie in eine gerichtete Bewegung entlang von Aktinfilamenten oder Mikrotubuli um. Aufgrund dieser Eigenschaft werden sie auch als Linearmotoren bezeichnet. Jedoch folgen diese Moleküle nicht unbedingt einem linearen Pfad entlang ihres Filamentes im streng mathematischen Sinn, da sie im Allgemeinen auch eine Kraft senkrecht zu ihrer Bewegungsrichtung und damit ein Drehmoment erzeugen. Diese Eigenschaft wurde zuerst für ein einzelköpfiges Dynein aus *Tetrahymena* Zilien entdeckt, als Mikrotubuli in Motilitätsversuchen zusätzlich zur erwarteten gerichteten Bewegung eine Rotation um ihre Längsachse vollführten [89]. In den darauffolgenden Jahren zeigten ähnliche Experimente mit Ncd, einem Vertreter aus der Kinesin-14 Familie, und Myosin-II, welches eine wesentliche Rolle bei der Muskelkontraktion spielt, dass grundsätzlich jede der drei Motorfamilien die Fähigkeit besitzt ein Drehmoment zu erzeugen [55, 95].

Bislang existieren nur eine Handvoll an Untersuchungen, die sich mit den Pfaden von Kinesin-Motoren entlang von Mikrotubuli befassen, es wird jedoch für Kinesin-Motoren aus den verschiedenen Familien eine große Bandbreite an Verhaltensweisen beobachtet. Das stark prozessive konventionelle Kinesin bewegt sich während eines Laufes strikt parallel zur Protofilamentachse auf einem Mikrotubulus entlang [63]. Auf Mikrotubuli mit 13 Protofilamenten resultiert dies in einer exakt geradlinigen Bewegung (siehe Abschnitt 3.4.2). Hingegen beschreibt der schwach prozessive Motor Eg5 aus der Kinesin-5 Familie [90] eine linksgängige Spiralbewegung mit einer Ganghöhe von $\approx 2 \mu\text{m}$, die weder mit einem möglichen Supertwist von Protofilamenten für von 13 abweichende Protofilamentzahlen noch mit einer der Helizes der Tubulin-Gitteranordnung¹ übereinstimmt [98]. Desweiteren zeigen alle bislang untersuchten unprozessiven Kinesine, nämlich das doppelköpfige Ncd oder einzelköpfige Kinesin-1 und Kinesin-5 Konstrukte, eine ausgeprägte Spiralisierungstendenz mit einer universellen Ganghöhe von etwa $0.3 \mu\text{m}$ [97, 98]. Aus diesen Beobachtungen wurde die Hypothese formuliert, dass das Ausmaß der Rotationsbewegung von Kinesin-Motoren ein einfaches Maß für deren Prozessivität darstellt [98]. Untersuchungen an dem heterodimeren Kinesin-2 KLP11/KLP20 und "homodimeren" Chimären zeigen, dass nur die Paarung von zwei KLP11-Motordomänen ein Drehmoment erzeugt [59]. Diese Beobachtung steht zusammen mit der Unprozessivität von KLP11/11, die im vorherigen Kapitel gezeigt wurde, in Übereinstimmung mit obenstehender Hypothese. Welches strukturelle Element jedoch die Spiralisierungseigenschaften eines Kinesins bestimmt, ist bislang nicht geklärt.

¹Linksgängige Dreistart-Helix von Tubulin-Monomeren: 12 nm, rechtsgängige Fünfstart-Helix von Tubulin-Dimeren: 40 nm, linksgängige Achtstart-Helix von Tubulin-Dimeren: 64 nm [4].

Der Pfad von Kinesin-Motoren entlang eines Mikrotubulus wurde bislang ausschließlich mithilfe von *in vitro* Motilitätsversuchen untersucht, in denen die Rotationsymmetrie der Mikrotubuli durch einen Marker (z.B. ein gekrümmtes Ende oder ein angehefteter Quantumdot) gebrochen und somit Informationen über die dreidimensionale Bewegung zugänglich wurden [56, 63, 97, 98]. In dieser Arbeit wurde erstmals der Transportweg von Kinesin-Motoren auf frei aufgespannten Mikrotubuli analysiert [13].

6.2 Ergebnisse

6.2.1 Etablierung der Hantelgeometrie

Um die uneingeschränkte Bewegung von Kinesin-Motoren entlang eines frei aufgespannten Mikrotubulus zu untersuchen, wurden Mikrotubuli-Brücken in Form einer Hantelgeometrie konstruiert und die Bewegung von Kinesin-beschichteten Kugeln entlang dieser Brücken beobachtet (Abschnitt 3.4.3). Die Datenerfassung und -analyse zu diesen Experimenten ist in Anhang A eingehender beschrieben. Anhand von Kinesin-1 aus *Drosophila melanogaster*² (*DmKHC*), das sich bekanntermaßen strikt auf einem Protofilament fortbewegt [56], wurde diese neue Versuchsgeometrie zunächst getestet und auf ihre Aussagekraft hin überprüft.

Transportpfad von Kinesin-1 entlang aufgespannter Mikrotubuli

Abbildung 6.1 und Film 6.1 zeigen exemplarisch das Verhalten von *DmKHC*-beschichteten Kugeln entlang zwei verschiedener aufgespannter Mikrotubuli. Die Mehrzahl der Kugeln beschrieb während ihres Laufes eine linksgängige Spiralbahn um den Mikrotubulus mit einer mittleren Ganghöhe von $(5.7 \pm 1.1) \mu\text{m}$, vereinzelt wurde auch eine exakt geradlinige Fortbewegung oder eine rechtsgängige Spiralisierung beobachtet. Die beobachteten Bewegungsmuster entsprechen in Ganghöhe und Händigkeit den erwarteten Werten für den Supertwist von Mikrotubuli bestehend aus 12, 13 oder 14 Protofilamenten (Abschnitt 3.4.2), wie in Abbildung 6.2 gezeigt. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Experimenten überein, die aufgrund der Aufspaltung der Bewegungstrajektorien abhängig von der Anzahl der Protofilamente folgerten, dass sich Kinesin-1 mit großer Präzision entlang eines Protofilaments auf einem Mikrotubulus fortbewegt [56, 63]. Dem Verhalten von *DmKHC* zufolge besteht die Mehrzahl der Mikrotubuli unter den gewählten Polymerisationsbedingungen wie erwartet aus 14 Protofilamenten [63]. Auch wenn *DmKHC* daher auf der Mehrheit der Mikrotubuli einer schwach ausgeprägten Spiralbahn folgt, wird dieser Motor im Hinblick auf seine Trajektorie entlang eines Mikrotubulus bestehend aus 13 Protofilamenten als "geradlinig" bezeichnet.

Besonderheiten der Hantelgeometrie

Der linksgängige Supertwist von $5.7 \mu\text{m}$ ist etwas geringer als die in Motilitätsversuchen bestimmten Werte ($6 - 8 \mu\text{m}$) [56, 63, 98]. Eine mögliche Erklärung für diese Abweichung liegt unter Umständen in der eingeschränkten Strecke ($\leq 15 \mu\text{m}$) begründet, über die eine

²Aufgereinigtes *DmKHC* wurde dankenswerterweise von Prof. Stefan Diez, TU Dresden zur Verfügung gestellt.

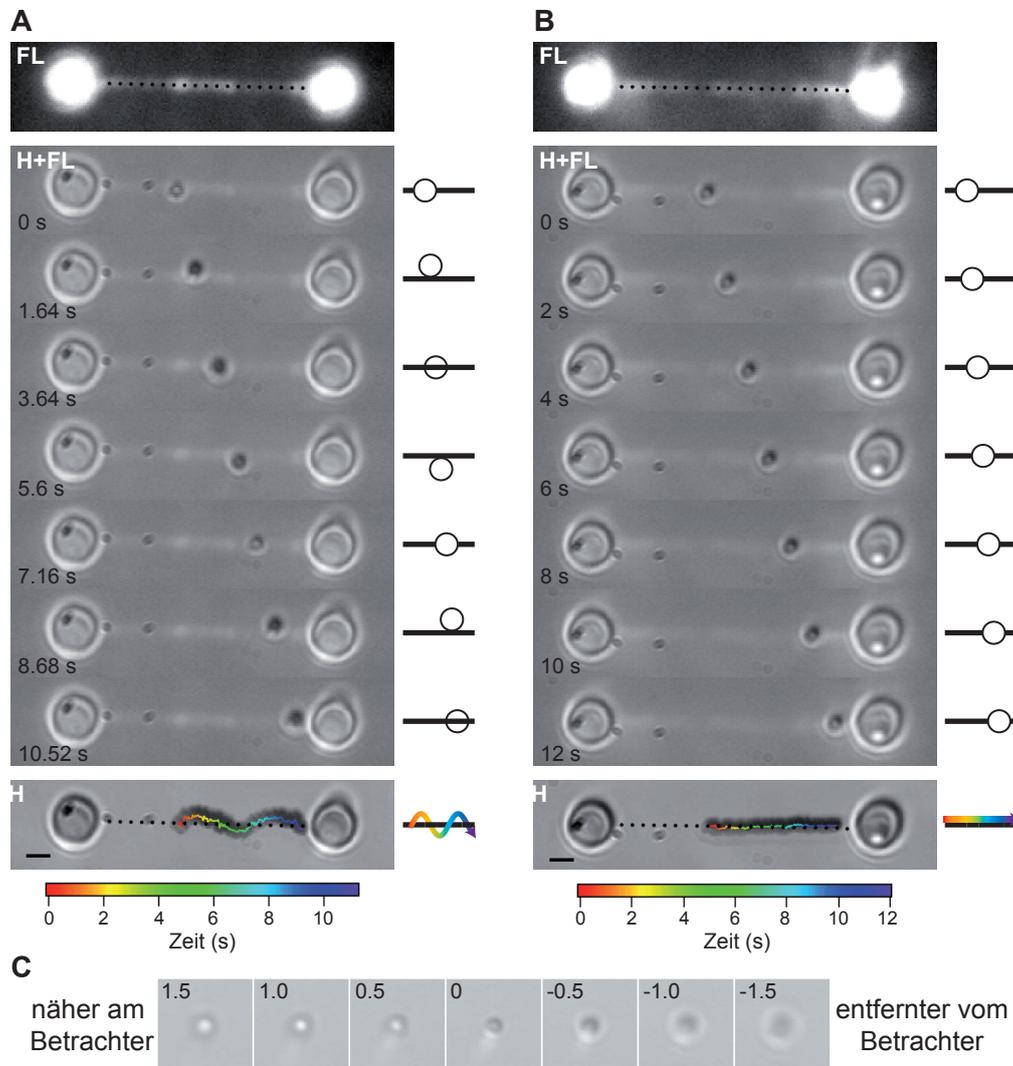


Abbildung 6.1 – Bewegung *DmKHC*-beschichteter Kugeln auf zwei verschiedenen Mikrotubulus-Brücken. **A** Linksgängige Spiralbewegung. **B** Geradlinige Bewegung. Gezeigt sind jeweils eine Fluoreszenzaufnahme (FL) der Mikrotubulus-Brücke, eine Sequenz von Hellfeldbildern, denen die Fluoreszenzaufnahme überlagert ist (H+FL), sowie eine Projektion aller Hellfeldbilder (H) mit zeitlichem Verlauf der Kugelposition (Regenbogenlinie). Die schematischen Zeichnungen repräsentieren die entsprechenden Positionen der Kugel relativ zum Mikrotubulus in der Draufsicht (vgl. Abschnitt 3.4.3). Skalenbalken: 2 μm . **C** Kamerabild einer Oberflächenfixierten Kugel in verschiedenen Abständen (in μm) zur Objektiv-Brennebene. Für negative Vorzeichen befindet sich die Kugel zwischen Brennebene und Objektivlinse, also in der Draufsicht weiter entfernt vom Betrachter.

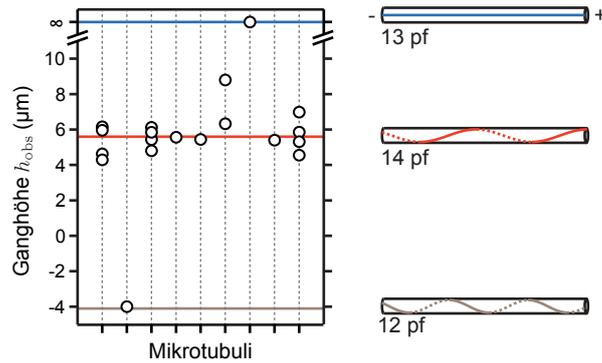


Abbildung 6.2 – Beobachtete Ganghöhen *DmKHC*-beschichteter Kugeln, gruppiert nach Mikrotubuli. Jeder Kreis repräsentiert die Bewegung einer Kugel auf einer Mikrotubulus-Brücke (senkrechte Linien). Positive Ganghöhen: linksgängige Rotation, negative Ganghöhen: rechtsgängige Rotation. Die farbigen Linien markieren die Ganghöhen des Supertwists für Mikrotubuli mit 12 (braun), 13 (blau) und 14 (rot) Protofilamenten.

Kugelbewegung beobachtet wird. Für einige Kugeln konnte über die jeweils zurückgelegte Strecke keine eindeutige Spiralisierung beobachtet werden, oder es war nicht möglich die zur Bestimmung der Ganghöhe vorausgesetzten $1\frac{1}{2}$ Rotationen zu detektieren. Da solche Kugeln nicht in die Berechnung der mittleren Ganghöhe einfließen, wird die tatsächliche Ganghöhe systematisch unterschätzt (Tab. 6.1). Es ist zudem auch möglich, dass der Unterschied zwischen den Ganghöhen zumindest teilweise den Einfluss der unterschiedlichen Messgeometrien widerspiegelt. In den Motilitätsversuchen mit gewinkelten Mikrotubuli hängt beispielsweise die Ganghöhe von der Länge des freien Endes ab, anhand dessen die Rotationsbewegung verfolgt wird. Längere Enden behindern die Rotation und führen zu einer Ganghöhe von $\approx 8 \mu\text{m}$, während für kürzere Enden die gemessene Ganghöhe auf $\approx 5.9 \mu\text{m}$ sinkt [63] und in guter Übereinstimmung mit dem hier präsentierten Wert von $5.7 \mu\text{m}$ auf aufgespannten Mikrotubuli ist.

Die Mikrotubuli wurden zwischen zwei Kugeln aufgespannt, die in frei positionierbaren Laserfoki festgehalten wurden. Dies ermöglichte es einerseits, die Hantelkonfiguration manuell zu assemblieren, indem einzelne Mikrotubuli aus der Lösung “geangelt” wurden, und das Filament nach Bedarf zu spannen. Zum anderen konnten so auf einfache Weise verschiedene Motor-beschichtete Kugeln auf demselben Mikrotubulus getestet werden, da die komplette Brücke frei durch die Flusskammer bewegt werden konnte. Grundsätzlich können die Kugeln, welche den Mikrotubulus aufspannen, frei im Laserfokus rotieren; die resultierende Drehung oder Verdrillung des Mikrotubulus um seine Längsachse würde dann die Bewegung der Motoren überlagern. Irreversibel an den Mikrotubulus gebundene Kugeln zeigten jedoch keinerlei stationäre rotatorische Bewegung, die Kugeln der Hantelkonfiguration werden also in einer stabilen Orientierung festgehalten. Sie können allerdings gelegentlich ihre Orientierung ändern, beispielsweise aufgrund des Flusses, wenn eine neue Motor-beschichtete Kugel eingefangen wurde. Dies erzeugt eine Verdrillung des aufgespannten Mikrotubulus (Abb. 6.3), die sich mit dem Supertwist der Protofilamente überlagert. Die Überlagerung von zwei Spiralisierungen mit Ganghöhen h_1 und h_2 ent-

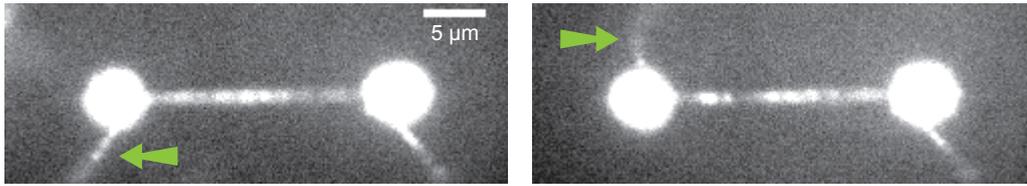


Abbildung 6.3 – Ein externer Fluss kann die Orientierung der Kugeln in den Laserfoki verändern.

spricht einer Parallelschaltung und ergibt daher einen effektiven Supertwist der Ganghöhe

$$h_{\text{eff}} = \left(\frac{1}{h_1} + \frac{1}{h_2} \right)^{-1}. \quad (6.1)$$

Für einen Mikrotubulus der Länge $L = 15 \mu\text{m}$ mit 14 Protofilamenten ($h_1 = 5.6 \mu\text{m}$) wird daher bei einer Reorientierung einer Kugel um $\pm 180^\circ$ ($h_2 = \pm 30 \mu\text{m}$) ein effektiver Supertwist von 4.7 bzw. 6.9 μm berechnet. Solche Verdrillungen können beispielsweise eine Ursache für die Streuung der gemessenen Ganghöhen verschiedener Kugeln auf demselben Mikrotubulus sein.

	N_{MT}	N_{K}	
geradlinige Bewegung [†]	1	1	
schwache Spiralisierung [‡]	3 (8)	10	
linksgängige Spiralisierung	7	17	$h_{\text{obs}} = (5.7 \pm 1.1) \mu\text{m}$
rechtsgängige Spiralisierung	1	1	$h_{\text{obs}} = -4.0 \mu\text{m}$
lineare Geschwindigkeit	12	29	$v = (0.80 \pm 0.09) \mu\text{m/s}$

[†] bei einer zurückgelegten Strecke von 11 μm .

[‡] Aufgrund der eingeschränkten Lauflänge konnte keine Ganghöhe berechnet werden (siehe Text). Für 3 Mikrotubuli konnte überhaupt keine Ganghöhe ermittelt werden, auf 4 Mikrotubuli zeigten andere Kugeln eine linksgängige Spiralisierung, auf einem Mikrotubulus zeigte eine weitere Kugel eine geradlinige Bewegung. Die Kugeln legten im Mittel eine Strecke von $(6.3 \pm 2.9) \mu\text{m}$ zurück.

Tabelle 6.1 – Zusammenfassung des Spiralisierungsverhaltens *DmKHC*-beschichteter Kugeln. N_{MT} bzw. N_{K} : Anzahl der Mikrotubuli bzw. Kugeln, auf denen/für die ein entsprechendes Verhalten beobachtet wurde. Die Geschwindigkeit entlang des Filaments und Ganghöhen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

6.2.2 Spiralisierungsverhalten heterodimerer Kinesin-2 Motoren

Der klassische Transportmotor Kinesin-1 bewegt sich geradlinig auf seinem Filament fort. Die beiden mitotischen Kinesine Eg5 und Ncd sind hingegen nur schwach prozessiv bzw. unprozessiv und induzieren eine Rotation von Mikrotubuli in Motilitätsversuchen. Heterodimere Kinesin-2 Motoren wiederum sind an einer Fülle von physiologischen Prozessen beteiligt: KIF3a/KIF3b arbeitet als neuronaler Transportmotor, XKLP3a/XKLP3b ist für den anterograden Transport von Melanosomen im Krallenfrosch zuständig und die

Motoren KLP11/KLP20 und KRP85/KRP95 sind in Zilien zu finden, wo sie essenzieller Bestandteil der IFT-Maschinerie sind. Zumindest einige dieser Motoren, nämlich KIF3a/KIF3b und KLP11/KLP20, sind prozessiv, wenn auch mit etwa dreifach geringeren Lauflängen als Kinesin-1. Welchem Pfad folgen nun heterodimere Kinesin-2 Motoren entlang eines Mikrotubulus bei der Erfüllung ihrer Transportaufgabe? Um diese Frage zu beantworten, wurden die oben genannten Motoren in der Hantelgeometrie untersucht.

Design der Konstrukte

Wie in Kapitel 4 gezeigt, können für Kinesin-2 Motoren experimentelle Schwierigkeiten aufgrund von Auto-Inhibierung durch die gezielte Einführung von Punktmutationen in der Stielregion umgangen werden. Eine Sequenzanalyse der heterodimeren Kinesin-2 Motoren zeigt, dass die für KLP11/KLP20 identifizierte Region über die verschiedenen Organismen hinweg stark konserviert ist (Abb. B.2 in Anhang B). Daher wurden vorsorglich in alle Motoren entsprechende Mutationen eingeführt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden diese Konstrukte in diesem Kapitel ohne den Zusatz “EE” abgekürzt und stattdessen Messungen an Motoren mit unveränderter Stielregion durch den Zusatz “wt” gekennzeichnet (Tab. 6.2). In Motilitätsversuchen transportierten die Motoren mit deregulierter Stielregion Mikrotubuli mit Geschwindigkeiten zwischen 0.48 und 0.64 $\mu\text{m/s}$ in Übereinstimmung mit publizierten Werten. Dies demonstriert die Funktionalität dieser Motorkonstrukte.

Konstrukt	Untereinheiten	Stiel-Mutationen	v ($\mu\text{m/s}$)
KLP11/20	KLP20	G444E / G445E	0.48 ± 0.05 (262)
	KLP11	G451E / S452E	
KIF3a/3b	KIF3a	G484E / G485E	0.53 ± 0.03 (30)
	KIF3b [†]	G477E / G478E	
XKLP3a/3b	XKLP3a	G482E / G483E	0.64 ± 0.04 (30)
	XKLP3b [‡]	G477E / G478E	
KRP85/95	KRP85	G480E / G481E	0.52 ± 0.05 (92)
	KRP95	G474E / G475E	

[†] A34V

[‡] V60D, T62I, V74D, L88F, T95Y, I172T

Tabelle 6.2 – Übersicht über die verwendeten heterodimeren Kinesin-2 Konstrukte mit deregulierenden Mutationen in der Stielregion. Für KIF3b und XKLP3b wurden die angegebenen Mutationen nach Dr. Martin Kollmar, Georg-August-Universität Göttingen, verwendet. Geschwindigkeiten wurden in Motilitätsversuchen bei 1 mM ATP bestimmt und sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. In Klammern: Anzahl der analysierten Mikrotubuli.

Heterodimere Kinesin-2 Motoren in der Hantelkonfiguration

Auf frei aufgespannten Mikrotubuli offenbarten die vier heterodimeren Kinesin-2 Motoren eine erstaunliche Bandbreite an Trajektorien entlang derer sie sich zum Plusende eines Mikrotubulus bewegten (Abb. 6.4). KIF3a/3b zeigte ähnlich zu Kinesin-1 zumeist eine schwache linksgängige Spiralisierung um Mikrotubuli und in seltenen Fällen eine

geradlinige Bewegung oder eine rechtsgängige Spiralisierung. Letztere wurde auf einem Mikrotubulus beobachtet, auf dem sich die Kugeln zunächst geradlinig bewegten und dann abrupt in eine Rotationsbewegung wechselten. Da dies für zwei verschiedene Kugeln an derselben Stelle des Mikrotubulus geschah, erscheint es plausibel, dass dieser einen Defekt aufwies, an dem sich die Anzahl der Protofilamente von 13 auf zwölf verringerte [18]. Kif3a/3b verhält sich also sehr ähnlich zu *DmKHC* und ist somit ein geradliniger Motor (siehe auch Film 6.2 und Tab. C.1 in Anhang C.1).

Im Gegensatz dazu bewegten sich die anderen heterodimeren Kinesin-2 Motoren entlang einer ausschließlich linksgängigen Spiralbahn, die für die verschiedenen Motoren unterschiedlich stark ausgeprägt war (siehe Film 6.3). Mit einer Ganghöhe von $\approx 0.7 \mu\text{m}$ ist die Spiralisierung von KRP85/95-beschichteten Kugeln am stärksten. Anders als *DmKHC* oder KIF3a/3b zeigen die beobachteten Ganghöhen von XKLP3a/3b, KLP11/20 und KRP85/95 auf verschiedenen Mikrotubuli keine Aufspaltung nach verschiedenen Protofilamentzahlen (Abb. 6.5 und Tab. C.2, C.3, C.4 in Anhang C.1).

Spiralisierung auf Mikrotubuli mit Supertwist

Die Hauptpopulation der Mikrotubuli (ca. 60 – 70%) besitzt 14 Protofilamente, wie anhand der Messungen mit *DmKHC* (und KIF3a/3b) abgeschätzt werden kann. Die Bewegung von XKLP3a/3b-, KLP11/20- und KRP85/95-beschichteten Kugeln entsteht also in der Mehrzahl der Fälle durch eine Spiralbewegung des Motors auf einem Filament, das selbst einen Supertwist besitzt. Die beobachtete, effektive Ganghöhe h_{obs} ist durch eine Parallelschaltung der tatsächlichen Spiralbewegung des Motors mit einer Ganghöhe h_{Mot} , und dem Supertwist h_{pf} der Protofilamente gegeben:

$$h_{\text{obs}} = \left(\frac{1}{h_{\text{Mot}}} + \frac{1}{h_{\text{pf}}} \right)^{-1}. \quad (6.2)$$

Die beobachtete Ganghöhe h_{obs} ist geringer als die tatsächliche Ganghöhe h_{Mot} der Motoren, da die Mehrheit der Messungen auf Mikrotubuli mit Supertwist stattfindet. Anhand von Gleichung 6.2 kann eine (obere) Abschätzung für h_{Mot} angegeben werden unter der Annahme, dass alle Messungen auf 14 Protofilamenten erfolgten (Tab. 6.3).

Konstrukt	h_{obs} (μm)	h_{Mot} (μm)
<i>DmKHC</i>	5.7 ± 1.1	(-300)
	-4.0	(-200)
KIF3a/3b	6.9 ± 1.7	(-30)
	-2.8	(-10)
XKLP3a/3b	2.6 ± 0.9	4.8
KLP11/20	1.5 ± 0.4	2.0
KRP85/95	0.7 ± 0.3	0.8

Tabelle 6.3 – Beobachtete und Supertwist-bereinigte Ganghöhen von Kinesin-Motoren. Für linksgängige Spiralbewegungen (positives Vorzeichen) wurde eine Bewegung auf 14 Protofilamenten angenommen, für rechtsgängige (negatives Vorzeichen) auf 12 Protofilamenten.

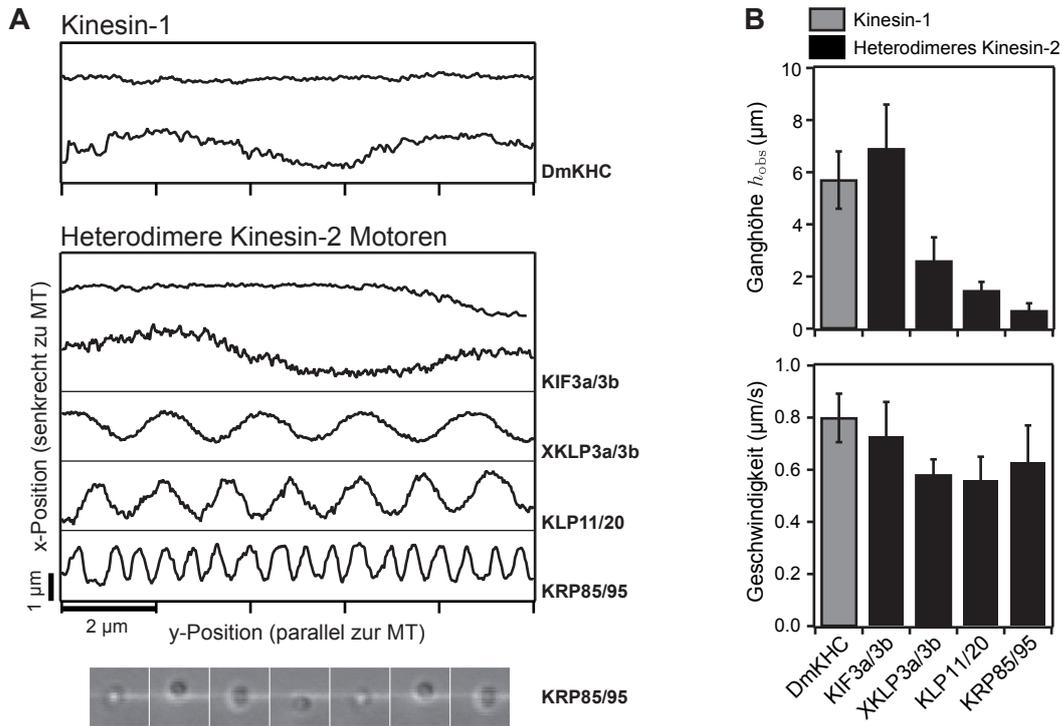


Abbildung 6.4 – **A** Beispielkurven für die Bewegung von verschiedenen Kinesinen entlang aufgespannter Mikrotubuli. Oben: Kinesin-1 zeigt keine (13 Protofilamente, oben) oder nur eine schwach ausgeprägte Spiralisierung (14 Protofilamente, unten); x-y Kurven der Beispiele aus Abb. 6.1. Mitte: x-y Kurven für heterodimere Kinesin-2 Motoren verschiedener Organismen. Unten: Beispielsequenz der linksgängigen KRP85/95 Spiralbewegung. Gezeigt ist ein Bildausschnitt von $2 \mu\text{m}$ Länge (Überlagerung aus Hellfeldbild der Kugel und Fluoreszenzaufnahme des Mikrotubulus). **B** Mittlere Ganghöhen (oben) und Geschwindigkeiten (unten) der verschiedenen heterodimeren Kinesin-2 Motoren (Mittelwert \pm Standardabweichung). Für *DmKHC* und *KIF3a/3b* ist nur die Ganghöhe der linksgängigen Spiralisierung gezeigt.

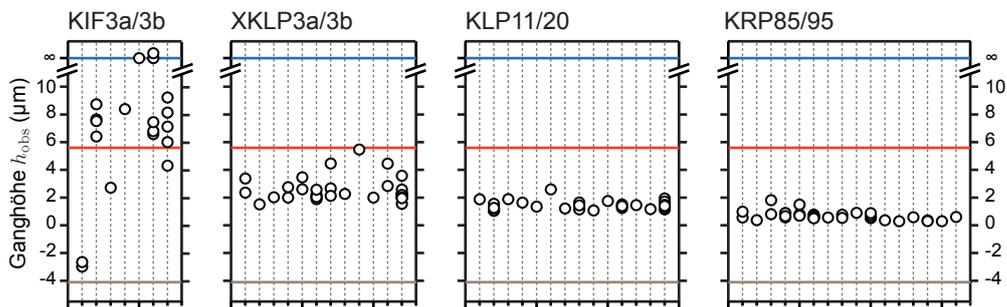


Abbildung 6.5 – Ganghöhen einzelner Kugeln (Kreise) auf verschiedenen Mikrotubuli (senkrechte Linien) für die verschiedenen heterodimeren Kinesin-2 Motoren. Die Supertwist-Ganghöhen für 12 (braun), 13 (blau) und 14 (rot) Protofilament-Mikrotubuli sind angedeutet.

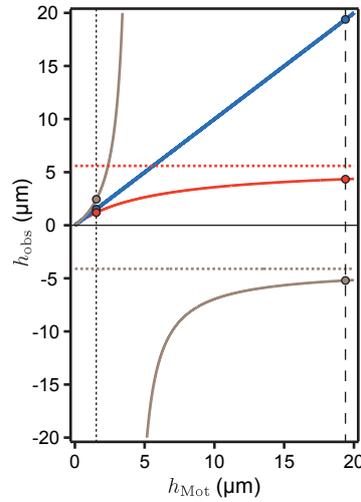


Abbildung 6.6 – Abhängigkeit der beobachteten Ganghöhe h_{obs} von der eigentlichen Spiralisierung der Motoren h_{Mot} auf 12 (braun), 13 (blau) und 14 (rot) Protofilament-Mikrotubuli. Horizontale Linien markieren die Ganghöhen der entsprechenden Supertwists ($h_{\text{Mot}} = \infty$). Vertikale Linien deuten schwach (gestrichelt) oder stark (gepunktet) spiralisierende Motoren an.

In Abbildung 6.6 ist die nach Gleichung (6.2) berechnete Abhängigkeit der beobachteten Ganghöhe h_{obs} von der tatsächlichen Ganghöhe des Motors h_{Mot} für Mikrotubuli mit 12, 13 und 14 Protofilamenten verdeutlicht. Daran wird ersichtlich, dass für Motoren mit einer starken Spiralisierung (kleine Ganghöhen h_{Mot}) diese dominiert und kaum von dem vergleichsweise schwachen Supertwist der Protofilamente beeinflusst wird. Der Supertwist wird erst relevant, wenn die Tendenz zur Spiralisierung eines Motors gering und die Ganghöhe h_{Mot} vergleichbar zu oder größer als h_{pf} ist.

Einfluss der Motorendichte auf das Spiralisierungsverhalten

Der Versuch die Spiralisierung einzelner Motormoleküle zu vermessen, scheiterte an der geringen Lauflänge der heterodimeren Kinesin-2 Motoren.

Die Wahrscheinlichkeit $q(x)$ bei einer mittleren Lauflänge λ einen Lauf über eine Strecke von $\geq x$ zu beobachten, ist gegeben durch

$$q(x) = \int_x^{\infty} \frac{1}{\lambda} e^{-\frac{x'}{\lambda}} dx' = e^{-\frac{x}{\lambda}}. \quad (6.3)$$

Die Lauflängen von KLP11/20 und KIF3a/3b sind etwa vierfach geringer als für Kinesin-1 (Abschnitt 4.3.3 und [54]) und betragen im kraftfreien Fall ≈ 400 nm. Um beispielsweise die Ganghöhe von einzelnen KLP11/20-Motoren, welche mit $1.5 \mu\text{m}$ die stärkste Spiralisierung bei gleichzeitig nachgewiesener Prozessivität zeigen, zuverlässig detektieren zu können, muss der Motor eine Strecke von mindestens $2 \mu\text{m}$ Länge zurücklegen. Dies ist nach Gleichung (6.3) bei weniger als einem von hundert Läufen der Fall ($q = 0.007$). In dieser Arbeit wurde daher das Spiralisierungsverhalten stets unter sättigenden Oberflächendichten von Motoren auf den Kugeln gemessen. Dies gewährleistete, dass die Kugeln genügend lange Strecken auf einem Mikrotubulus zurücklegten, um effizient Ganghöhen bestimmen zu können. Es wurde jedoch für Kinesin-1 bereits in früheren Experimenten gezeigt, dass die geradlinige Fortbewegung nicht von der Anzahl der beteiligten Motoren abhängt und auch einzelne Motoren zuverlässig einem Protofilament folgen [63].

Einen Hinweis, dass die Dichte der Motoren auch auf das Spiralisierungsverhalten von Kinesin-2 Motoren keinen drastischen Einfluss ausübt, liefern die Experimente mit KRP85/95. Für diesen Motor wurden verschiedene Anbindungsstrategien an die Kugeln getestet (Tab. A.1 in Anhang A). Die Adsorption des Motors an Polystyrolkugeln lieferte für diesen Motor nur unzureichende Ergebnisse, da Kugeln nur in einzelnen Fällen und erst nach mehreren Testversuchen letztlich eine kurze Laufstrecke von weniger als $2\ \mu\text{m}$ zurücklegten. Dieses Verhalten weist auf eine eher geringe Oberflächendichte an funktionalem Motor hin. Die Adsorption von KRP85/95 an Anti-Flag-Kugeln resultierte dagegen in einer deutlich effizienteren Anbindung und damit höheren Oberflächendichte der Motoren. Zwischen den beiden Anbindungsstrategien konnte kein signifikanter Unterschied im Spiralisierungsverhalten festgestellt werden.

6.2.3 Spiralisierungsverhalten der “homodimeren” Chimären von KLP11/20

Der heterodimere Motor KLP11/20 zeigt auf frei aufgespannten Mikrotubuli eine linksgängige Spiralisierung mit einer Ganghöhe von $h_{\text{obs}} \approx 1.5\ \mu\text{m}$. Anhand der in Kapitel 5 eingeführten “homodimeren” Chimären kann untersucht werden, ob eine der beiden unterschiedlichen Motordomänen, eben beispielsweise die unprozessive KLP11-Untereinheit, die Rotationseigenschaft von KLP11/20 induziert.

Alle chimären Konstrukte, sowohl die “Homodimere” KLP11/11 und KLP20/20(wt) als auch das Kontrollkonstrukt KLP20/11^{SW}, bewegten sich in einer linksgängigen Spiralbewegung um aufgespannte Mikrotubuli und besitzen Ganghöhen, die im Rahmen der Genauigkeit mit der von KLP11/20 identisch sind (Abb. 6.7, Film 6.4 und Anhang C.2 mit Abb. C.1 A). Dies steht im Widerspruch zum Verhalten ähnlicher Motorkonstrukte in Motilitätsversuchen [59], bei denen lediglich für die Kombination zweier KLP11-Motordomänen eine Spiralisierung beobachtet wurde. Zu Kontrollzwecken wurde auch KLP11/20(wt), also der Motor ohne die deregulierenden Mutationen in der Stielregion gemessen, um einen Einfluss dieser Mutationen auszuschließen. KLP11/20(wt) besitzt eine Ganghöhe von $h_{\text{obs}} = (1.6 \pm 0.5)\ \mu\text{m}$ ($N = 8$ verschiedene Kugeln) und verhält sich damit wie der Motor, der die deregulierenden Mutationen enthält.

Die beiden Motordomänen von KLP11 und KLP20 unterscheiden sich somit nicht in ihrer Eigenschaft, eine Kraft senkrecht zur Bewegungsrichtung zu erzeugen, und die Rotationsbewegung von KLP11/20 wird nicht durch eine der beiden Motordomänen hervorgerufen. Insbesondere besitzen alle Motoren ein identisches Drehmaß, ungeachtet ihrer Prozessivität bzw. Unprozessivität.

6.2.4 Die Stielregion bestimmt Spiralisierung von Kinesin-2 Motoren

Die chimären KIF-KLP Konstrukte

Die große Bandbreite des Spiralisierungsverhaltens verschiedener Kinesin-2 Motoren ermöglicht es durch den Austausch struktureller Elemente zwischen den Motoren das für das Spiralisierungsverhalten maßgebliche Element zu identifizieren. Hierfür wurden chimäre Motoren aus den prozessiven Kinesinen KIF3a/3b, welches sich geradlinig bewegt, und dem spiralisierenden KLP11/20 erzeugt (Abb. 6.8 A). Ziel der Untersuchung waren als potentiell relevante Strukturelemente die Motordomänen, Necklinker und die Stielregion

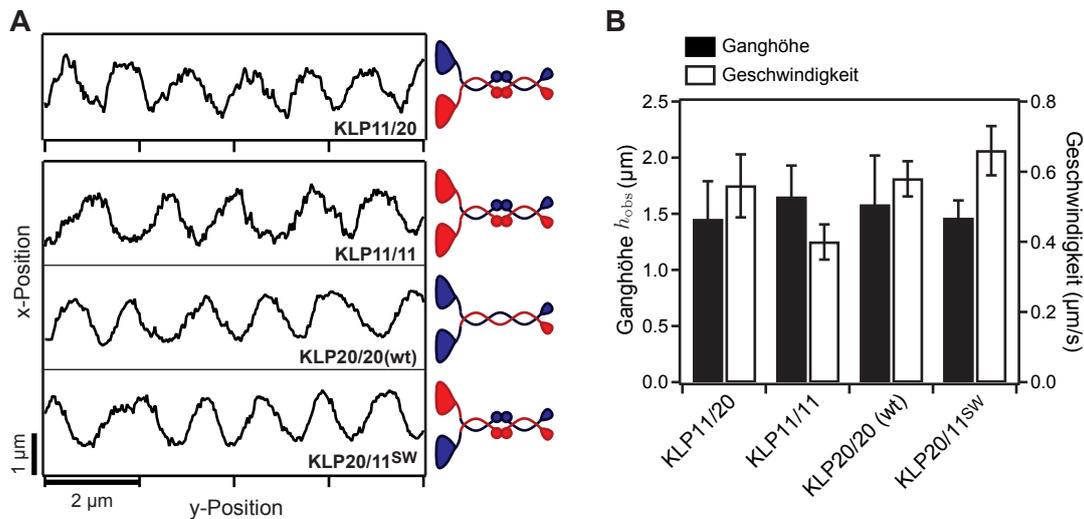


Abbildung 6.7 – Beide “homodimeren” Chimären von KLP11/20 spiralisieren. **A** x-y Positionskurven von KLP11/20, KLP11/11, KLP20/20(wt) und KLP20/11^{SW}. **B** Mittlere beobachtete Ganghöhen (schwarz) und lineare Geschwindigkeiten (weiß) gegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung. KLP11/20: $(1.45 \pm 0.34) \mu\text{m}$, $N = 28$; KLP11/11: $(1.65 \pm 0.28) \mu\text{m}$, $N = 11$; KLP20/20(wt): $(1.58 \pm 0.44) \mu\text{m}$, $N = 12$; KLP20/11^{SW}: $(1.46 \pm 0.16) \mu\text{m}$, $N = 10$. N : Anzahl der Kugeln.

dieser Motoren. Diese Domänen wurden jeweils zwischen den homologen Untereinheiten KIF3a und KLP20 sowie KIF3b und KLP11 ausgetauscht, so dass im resultierenden heterodimeren Motor die korrespondierenden Strukturelemente der beiden chimären Untereinheiten stets aus demselben Organismus stammen. Die Stielregionen enthielten jeweils die in Tabelle 6.2 aufgeführten Mutationen. Die nachfolgend beschriebenen Chimären zeigen mit Geschwindigkeiten von $0.42 - 0.47 \mu\text{m/s}$ in Motilitätsversuchen eine vergleichbare katalytische Aktivität (Tab. 6.4).

Konstrukt	v ($\mu\text{m/s}$)	N
KIF-KLP(nl+stiel)	0.42 ± 0.05	50
KIF-KLP(nl)	0.47 ± 0.03	60
KIF-KLP(stiel)	0.46 ± 0.02	32

Tabelle 6.4 – Motilitätsversuche mit chimären Motoren aus KIF3a/KIF3b und KLP11/KLP20 unter hohen Motorendichten und 1 mM ATP. N : Anzahl der analysierten Mikrotubuli.

Die Stielregion als maßgebliches strukturelles Element für Spiralisierung

Zunächst werden der Necklinker und die daran anschließende Stielregion in KIF3a durch die von KLP20 und in KIF3b durch die von KLP11 ersetzt. Dieses Konstrukt enthält nur noch die Motordomänen von KIF3a/3b und wird mit KIF-KLP(nl+stiel) abgekürzt.

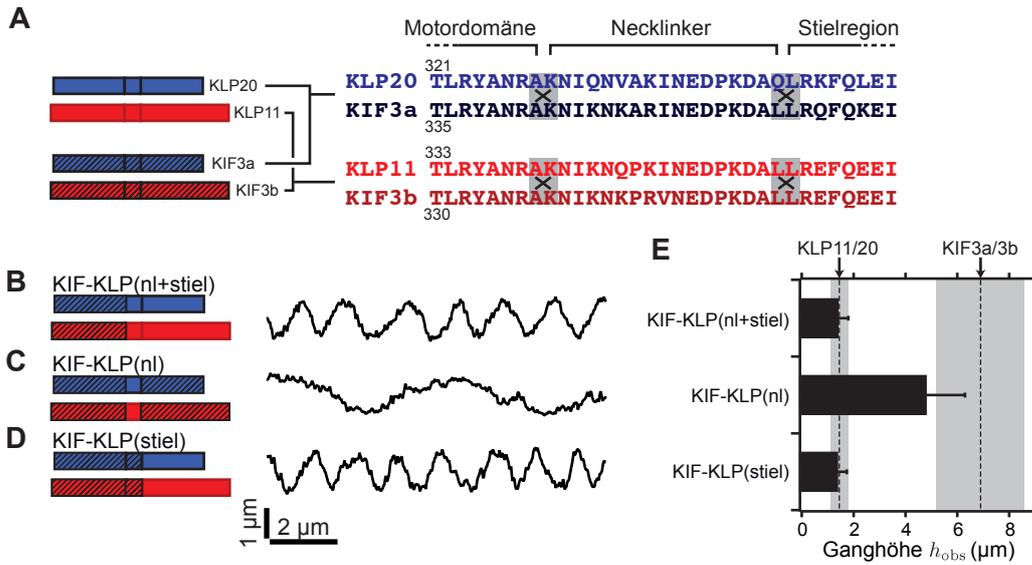


Abbildung 6.8 – **A** Design der chimären KIF-KLP Konstrukte. Die Schnittstellen (vor und nach den Necklinkern) für die chimären KIF/KLP-Motoren sind für die homologen Untereinheiten grau hinterlegt. x-y Kurven für **B** KIF-KLP(nl+stiel), **C** KIF-KLP(nl), **D** KIF-KLP(stiel). **E** Mittlere Ganghöhe \pm Standardabweichung der KIF-KLP Chimären. Die mittleren Ganghöhen und Standardabweichungen von KLP11/KLP20 und KIF3a/KIF3b sind durch die gestrichelten Linien und grauen Schattierungen angezeigt.

KIF-KLP(nl+stiel) folgte in der Hantelgeometrie einer stark ausgeprägten, linksgängigen Spiralbahn um Mikrotubuli, deren Ganghöhe mit $h_{obs} = (1.4 \pm 0.4) \mu\text{m}$ der von KLP11/20 entspricht (Abb. 6.8 **B**). Ausschlaggebend für die Spiralisierungsseigenschaft sind somit nicht die Motordomänen, sondern der Necklinker und/oder die Stielregion.

Um zu untersuchen, ob beide oder nur eines – und falls ja welches – dieser Elemente maßgeblich ist, wurden diese in Form der Motorkonstrukte KIF-KLP(nl) und KIF-KLP(stiel) separat untersucht. KIF-KLP(nl)-beschichtete Kugeln zeigten mit einer mittleren Ganghöhe von $h_{obs} = (4.8 \pm 1.5) \mu\text{m}$ eine schwache linksgängige Spiralisierung (Abb. 6.8 **C**). Dieser Wert liegt innerhalb der Fehlergrenzen der beobachteten Ganghöhe von *DmKHC* und kann daher als nahezu geradlinige Fortbewegung des Motors entlang eines Protofilaments gewertet werden. Die Rücksubstitution der Stielregion von KIF3a/3b in KIF-KLP(nl+stiel) reduziert somit die induzierte Spiralisierung beträchtlich, wenn auch nicht ganz der für KIF3a/3b gemessene Wert erreicht wird. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die Stielregion die Spiralisierungsseigenschaft des Motors diktiert.

In Einklang mit dieser Hypothese steht das Verhalten des chimären Motors KIF-KLP(stiel), bei welchem die Motordomänen und Necklinker von KIF3a/3b an die Stielregion von KLP11/20 fusioniert sind. Auch dieser Motor bewegte sich entlang einer linksgängigen Spiralbahn ($h_{obs} = (1.4 \pm 0.4) \mu\text{m}$), die mit der von KLP11/20 übereinstimmt (Abb. 6.8 **D**).

Das Spiralisierungsverhalten der chimären Konstrukte ist also weder durch Motordomänen noch Necklinker, sondern durch die jeweils enthaltene Stielregion vorgegeben (Abb. 6.8 **E**, siehe auch Film 6.5 und Anhang C.3 mit Abb. C.1 **B**). Eine weitere, nahelie-

gende Überprüfung dieser Hypothese anhand des Konstrukts KLP-KIF(stiel) scheiterte, da sich die chimäre Untereinheit KLP20(Motordomäne+Necklinker)-KIF3a(Stiel) nicht exprimieren ließ.

Das Spiralisierungsverhalten ist geprägt durch eine Seitwärtsbewegung der Motoren, also Übergängen zwischen benachbarten Protofilamenten. Dass gerade die Stielregion als katalytisch und mechanisch passiver Teil eines Motors dessen Laufverhalten maßgeblich mitbestimmt, scheint daher zunächst überraschend. Die Nackendomäne schließt als N-terminales Ende der Stielregion direkt an den Necklinker an und ist daher ein naheliegender Kandidat für das bestimmende Element der Spiralisierung von Kinesin-Motoren. Im nachfolgenden Abschnitt wird anhand eines Kinesin-1 basierten Modellsystems die Hypothese überprüft, ob die Struktur der Nackendomäne tatsächlich das Spiralisierungsverhalten von Kinesin-Motoren bestimmt.

6.2.5 Gezielte Manipulation des Spiralisierungsverhaltens durch eine flexible Nackenstruktur

Kinesin-1 Konstrukte

Die Hypothese, dass eine flexible Nackendomäne Übergänge zwischen benachbarten Protofilamenten erlaubt und dadurch das Spiralisierungsverhalten von Kinesinen determiniert, kann anhand gezielt konstruierter Kinesin-1 Motoren überprüft werden (Abb. 6.9 A). Ausgangspunkt ist ein verkürztes Konstrukt des humanen konventionellen Kinesins, in dem die Lösungsmittel-zugänglichen Cysteine durch Serin oder Alanin ersetzt wurden. Dieses Konstrukt wird im Folgenden mit *HsKHC* bezeichnet, besitzt vergleichbare katalytische Eigenschaften wie der zugrunde liegende Wildtyp-Motor [65] und sollte sich wie andere Kinesin-1 Motoren entlang eines Protofilaments bewegen. In Anlehnung an Experimente, die den Einfluss der Necklinker-Struktur auf die Koordination der beiden Motordomänen untersuchten [102], wurden in *HsKHC* nach dem Necklinker ein reaktives Cystein (Lys-Lys-Cys-Lys) und eine Abfolge von sieben Glyzin-Serin (GS) Einheiten eingeführt, so dass durch Dimerisierung das Konstrukt hCys-14GS mit einer flexiblen Nackendomäne von insgesamt 14(GS)-Einheiten entstand. Gemäß der vorgeschlagenen Hypothese sollte dieses Konstrukt nicht mehr einem geradlinigen Pfad folgen, sondern aufgrund der zusätzlichen Flexibilität eine mehr oder minder ausgeprägte Spiralisierung zeigen. Die reaktiven Cysteine in hCys-14GS ermöglichen eine gezielte Quervernetzung der beiden Polypeptidketten nach dem Necklinker (hCys-14GS-X), wodurch der Einfluss des flexiblen GS-Abschnitts wieder eliminiert werden kann und die geradlinige Fortbewegung wieder hergestellt werden sollte. Das Kontrollkonstrukt 14GS ohne reaktive Cysteine (Lys-Lys-Gly-Lys) dient zum Nachweis der Spezifität der Quervernetzungsreaktion. Die Quervernetzung von hCys-14GS durch das bifunktionelle BM(PEG)₂ erfolgt ausschließlich über die reaktiven Cysteine, jedoch beträgt die Effizienz nicht 100%, so dass ein Gemisch aus hCys-14GS-X mit einem geringen Anteil von nicht quervernetztem hCys14GS vorliegt (Abb. 6.9 B).

In Übereinstimmung mit früheren Experimenten [102] ist die Geschwindigkeit von hCys-14GS in Motilitätsversuchen fünffach geringer als für *HsKHC*, kann aber durch die (teilweise) Quervernetzung wieder um mehr als einen Faktor drei erhöht werden (Tab. 6.5).

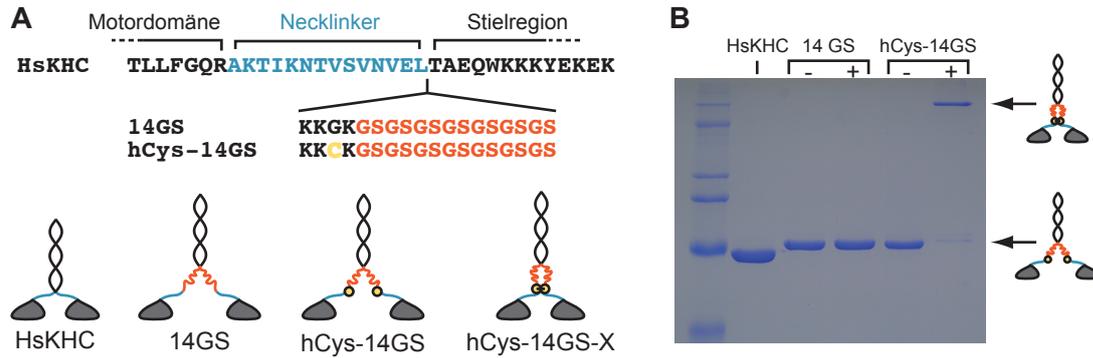


Abbildung 6.9 – **A** Design der Kinesin-1 Konstrukte. **B** Coomassie gefärbtes SDS-Gel der Kinesin-1 Konstrukte mit (+) und ohne (-) BM(PEG)₂. Eine Quervernetzung erfolgte lediglich für das Konstrukt mit reaktiven Cysteinen.

Konstrukt	v ($\mu\text{m/s}$)	N
HsKHC	0.62 ± 0.07	25 (1)
14GS	n. d.	
hCys-14GS	0.12 ± 0.03	60 (2)
hCys-14GS-X	0.39 ± 0.07	108 (2)

Tabelle 6.5 – Motilitätsversuche mit Kinesin-1-Konstrukten unter hohen Motorendichten und 1 mM ATP. Geschwindigkeiten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, N : Anzahl der analysierten Mikrotubuli. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der verschiedenen Aufreinigungen an, die analysiert wurden.

Die Nackendomäne als reversibler Schalter

In der Hantelgeometrie folgte die Mehrzahl *HsKHC*-beschichteter Kugeln einer schwachen, linksgängigen Spiralbahn mit einer Ganghöhe $h_{\text{obs}} = (5.3 \pm 0.8) \mu\text{m}$. In vereinzelt Fällen konnte eine geradlinige Bewegung beobachtet werden. Dieses Verhalten ist konform mit den Messungen an *DmKHC* und demonstriert, dass erwartungsgemäß auch *HsKHC* einem Protofilament auf der Mikrotubulus-Oberfläche folgt.

Die Einführung einer flexiblen Nackenregion in Form eines unstrukturierten 14(GS)-Abschnittes im Motorkonstrukt hCys-14GS hatte in Übereinstimmung mit der Vorhersage eine stark ausgeprägte ($h_{\text{obs}} = (0.7 \pm 0.4) \mu\text{m}$), linksgängige Spiralisierung dieser Motoren um einen aufgespannten Mikrotubulus zur Folge. Da sich dieses Konstrukt lediglich um die flexible Nackenregion von *HsKHC* unterscheidet, ist davon auszugehen, dass beide Konstrukte in einer ähnlichen Geometrie an die Kugeln binden. Somit erscheint die Möglichkeit der Spiralisierung als ein Artefakt der Anbindung des Motors an die Kugel praktisch ausgeschlossen.

Gemäß dem postulierten Modell sollte durch die kovalente Quervernetzung der beiden reaktiven Cysteine direkt nach dem Necklinker ein zu *HsKHC* äquivalenter Motor entstehen und somit eine geradlinige Bewegung induziert werden. Für hCys-14GS wurde nach der Behandlung mit dem kovalenten Quervernetzer BM(PEG)₂ eine etwa

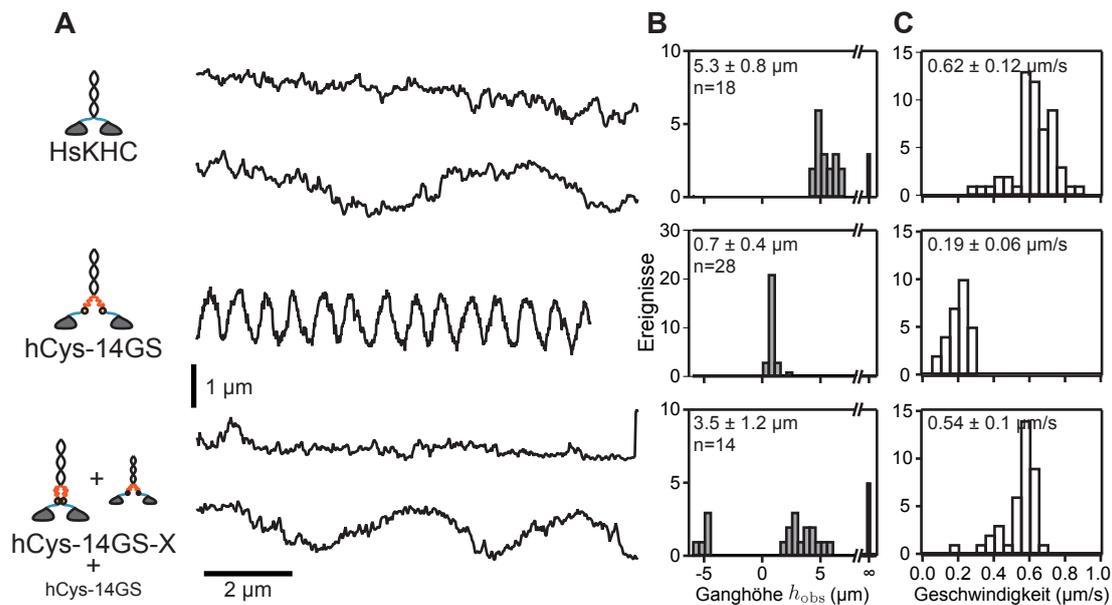


Abbildung 6.10 – **A** x-y Kurven der Kinesin-1 Konstrukte. **B** Beobachtete Ganghöhen. **C** Geschwindigkeiten entlang von Mikrotubuli. Übereinstimmend mit [102] wird die lineare Geschwindigkeit von *HsKHC* (oben) durch die Einführung einer flexiblen Region nach dem Necklinker signifikant verringert (Mitte). Die (partielle) Quervernetzung der Nackenregion erhöht die Geschwindigkeit nahezu auf Werte, *HsKHC* entsprechen (unten).

fünffach schwächere linksgängige Spiralisierung als mit unbehandeltem hCys-14GS beobachtet. Desweiteren zeigten manche Kugeln keine bzw. eine rechtsgängige Spiralisierung entlang des Mikrotubulus. Die Ganghöhe für die linksgängige Spiralisierung bleibt mit $h_{obs} = (3.5 \pm 1.2) \mu\text{m}$ etwas unter dem erwarteten Wert von $\approx 5.6 \mu\text{m}$ für den Supertwist von 14 Protofilamenten. Da stets die Bewegung von Kugeln beobachtet wurde, die mit hohen Motorendichten beschichtet waren und die Quervernetzung der Motoren nicht vollständig erfolgte, spiegeln die beobachteten Ganghöhen vermutlich die gleichzeitige Aktion von quervernetzten, sich gerade bewegenden hCys-14GS-X Molekülen und nicht quervernetzten, spiralisierenden hCys-14GS Molekülen wider. Ungeachtet dessen resultiert wie eingangs postuliert die gezielte Quervernetzung nach dem Necklinker in einer deutlichen Abschwächung des Spiralisierungsverhaltens (Abb. 6.10, siehe auch Film 6.6 und Anhang C.4 mit Abb. C.1 C).

6.3 Diskussion

Molekulare Motoren werden üblicherweise anhand ihrer Bewegung entlang Oberflächengebundener Filamente in ihren mechanischen Eigenschaften charakterisiert. Diese Geometrie schränkt allerdings den Bewegungsspielraum eines Motors ein, da nur ein Teil des Filaments für den Motor frei zugänglich ist. Die Fortbewegung von Motoren auf frei aufgespannten Filamenten, wie in diesem Kapitel vorgestellt, ahmt die Situation des intrazellulären Transports dagegen deutlich besser nach und kann Aspekte der Motorfunktion

zu Tage fördern, die auf Oberflächen-gebundenen Filamenten verborgen blieben.

In diesem Kapitel wurden die Transportpfade heterodimerer Kinesin-2 Motoren aus verschiedenen Organismen in einer Oberflächen-freien Konfiguration untersucht. Diese Kinesin-Familie liefert die ersten Beispiele für Transportmotoren, die sich nicht geradlinig auf einem Mikrotubulus fortbewegen, sondern seinen kompletten Umfang für ihre Bewegung nutzen können.

6.3.1 Korrelation zwischen Spiralisierung und Prozessivität

Ausgehend von Motilitätsversuchen mit unprozessiven, schwach prozessiven und stark prozessiven Kinesinen wurde bislang ein Zusammenhang zwischen der beobachteten Rotationsbewegung von Mikrotubuli und der Prozessivität der antreibenden Motoren postuliert [97].

In Übereinstimmung mit der Hypothese scheint zunächst das Verhalten von KRP85/95 zu sein, das stark spiralisiert und für das bislang kein endgültiger Nachweis für eine prozessive Bewegung erbracht werden konnte [62]. Motilitätsversuche bei geringen Motorendichten deuten jedoch darauf hin, dass sich auch dieser Motor prozessiv bewegen kann, wenn eine Auto-Inhibierung des Motors effektiv unterbunden wird (Abschnitt 4.4.2).

Im Widerspruch zu einem funktionalen Zusammenhang zwischen Prozessivität und Spiralisierung zeigen hingegen das prozessive KLP11/20 und die unprozessive "homodimere" Chimäre KLP11/11 ein identisches Spiralisierungsverhalten³. Darüber hinaus unterscheiden sich die heterodimeren Kinesin-2 Motoren KIF3a/3b und KLP11/20 nicht drastisch in ihrer Lauflänge, aber im Gegensatz zum spiralisierenden KLP11/20 folgt KIF3a/3b ebenso wie das vierfach prozessivere Kinesin-1 zuverlässig einem Protofilament. Am deutlichsten widersprechen die Kinesin-1 Konstrukte *HsKHC* und *hCys-14GS* der obigen Hypothese. Die Einführung einer flexiblen Nackendomäne besitzt keinen nennenswerten Einfluss auf die Lauflänge der Motoren [102], wohingegen sich das Spiralisierungsverhalten drastisch verändert.

Die Messungen an einer ganzen Reihe von Kinesin-Motoren in der Hantelgeometrie können daher eine direkte Korrelation zwischen Spiralisierung und Prozessivität nicht bestätigen, sondern deuten darauf hin, dass der Pfad eines Kinesins durch die Flexibilität seiner Nackendomäne bestimmt ist.

6.3.2 Die Nackendomäne determiniert den Pfad prozessiver Kinesin-Motoren

Die Oberfläche eines Mikrotubulus bietet aufgrund seines Aufbaus aus gleichgerichteten Protofilamenten eine zweidimensionale Anordnung möglicher Bindestellen für die beiden Motordomänen eines Kinesins. Trotz der Vielzahl an alternativen Bindestellen nutzt Kinesin-1 während seiner Fortbewegung mit großer Zuverlässigkeit die Tubulin-Untereinheiten ausschließlich eines einzigen Protofilaments. Im Gegensatz hierzu folgen heterodimere Kinesin-2 Motoren verschiedener Organismen unterschiedlich stark gewundenen, linksgängigen Spiralbahnen um einen Mikrotubulus herum. Lediglich KIF3a/3b

³Die Äquivalenz dieser beiden Motoren im Hinblick auf ihre Bewegung um einen Mikrotubulus schließt des Weiteren aus, dass es sich bei der Unprozessivität von KLP11/11 (Abschnitt 5.3.2) um ein Artefakt handelt, das lediglich durch die Messung auf Oberflächen-gebundenen Mikrotubuli zustande kam [59].

gelingt es ähnlich zu Kinesin-1 seine Bewegung an einem Protofilament auszurichten. Warum gelingt manchen Motoren eine geradlinige Fortbewegung und wie kommt hingegen die linksgängige Spiralisierung anderer Kinesine zustande?

Chimäre Motoren aus dem geradlinigen KIF3a/3b und dem spiralisierenden KLP11/20 weisen auf die Nackenregion als determinierendes Strukturelement für das Spiralisierungsverhalten hin. Die gezielte Manipulation des Verhaltens von Kinesin-1 Konstrukten stützt diese Hypothese. In Kinesin-1 bildet die Nackendomäne eine stabile Coiled-Coil Struktur aus und die Reichweite der Motordomänen ist vollständig durch die Necklinker bestimmt [45]. Die Einführung einer flexiblen Verbindung zwischen Necklinker und Nackendomäne dieses geradlinigen Motors induziert in der Tat eine ausgeprägte Spiralisierung, die durch die Quervernetzung direkt nach den Necklinkern wieder ausgeschaltet werden kann. Die mechanische Entkopplung der Motordomänen führt also dazu, dass mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit Übergänge zwischen benachbarten Protofilamenten stattfinden. In der Tat konnte für das Kinesin-1 Konstrukt mit einer flexiblen Nackendomäne bereits in früheren Experimenten eine größere Bandbreite an Schritten auf Mikrotubuli nachgewiesen werden, insbesondere treten vermehrt Seit- und Diagonalschritte auf [102].

Diese Hypothese ist im Hinblick auf das Spiralisierungsverhalten der heterodimeren Kinesin-2 Motoren in Übereinstimmung mit Experimenten zu den Dimerisierungseigenschaften dieser Moleküle. Während die Nackendomänen des nicht-spiralisierenden KIF3a/KIF3b ähnlich zu Kinesin-1 direkt nach dem Necklinker eine Coiled-Coil Struktur ausbildet [17], findet für die spiralisierenden Motoren XKLP3a/XKLP3b und KLP11/KLP20 keine Dimerisierung in dieser Region statt [23, 93].

Verblüffenderweise folgen die Motoren stets einer linksgängigen Spiralbahn um den Mikrotubulus, eine rechtsgängige Spiralisierung wurde hingegen nie beobachtet⁴. Diese Tatsache ist nicht alleine durch die Flexibilität der Nackendomäne erklärbar. Vielmehr muss die Vorgabe einer Vorzugsrichtung ein intrinsischer Bestandteil des bewegungserzeugenden Prozesses sein und damit in dem Teil des Motors produziert werden, der auch für die Erzeugung der Vorwärtsbewegung verantwortlich ist, also in der Motordomäne und/oder dem Necklinker. Eine solche Vorzugsrichtung wird in der Tat für einzelköpfige, unprozessive Kinesin-Konstrukte beobachtet, die sich durch eine ausgeprägte linksgängige Spiralisierung auszeichnen [97, 98].

Nach einem weithin akzeptierten Modell für den chemomechanischen Zyklus von Kinesin wird der mechanische Schritt des Motors durch das Binden von ATP an die vordere Motordomäne ausgelöst [65]. Der Necklinker der vorderen Motordomäne dockt an diese an und ändert seine Konformation von einer rückwärtsgerichteten Orientierung in eine vorwärts gerichtete. Dadurch wird die hintere Motordomäne nach vorne gebracht, die dann diffusiv nach der nächsten Bindungsstelle sucht. Die Ergebnisse dieses Kapitels zeigen, dass die Flexibilität der Verbindung zwischen den beiden Motordomänen eines prozessiven Kinesins darüber entscheidet, in welchem Maß die Seitwärtstendenz der gebundenen Motordomäne tatsächlich in einen Schritt auf ein benachbartes Protofilament umgesetzt wird.

Anhand dieser Überlegungen kann ein einfaches mechanisches Modell entwickelt werden, das die Pfade von Motoren mit unterschiedlich flexiblen Nackendomänen qualitativ nachzubilden vermag.

⁴Ausgenommen für "geradlinige" Motoren auf einem Mikrotubulus bestehend aus 12 Protofilamenten.

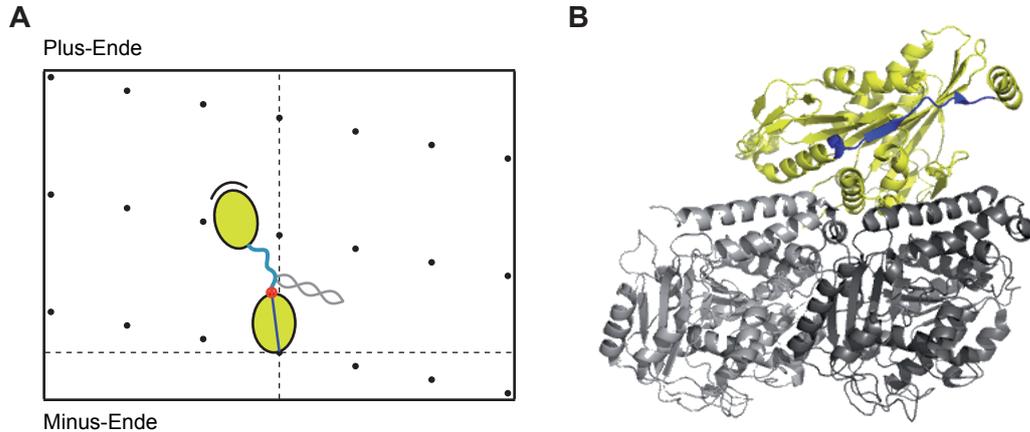


Abbildung 6.11 – **A** Modell für Spiralisierungsverhalten. Die ungebundene vordere Motordomäne sucht diffusiv nach der nächsten Bindungsstelle. Schwarz: Bindestellen auf dem Tubulungitter. Rot: Startposition für diffusive Suche. Dunkelblau: an Motordomäne gedockter Teil des Necklinkers. Hellblau: flexible Verbindung zur ungebundenen Motordomäne. **B** An Tubulin-Dimer (grau) gebundene Motordomäne von Kinesin (grün) mit gedocktem Necklinker (blau). Rekonstruiert aus PDB ID 2P4N [77] und 1MKJ [76] mittels Pymol.

6.3.3 Modellierung des Spiralisierungsverhaltens

Voraussetzungen

In einem einfachen mechanistischen Modell können die Wahrscheinlichkeiten berechnet werden, mit der die vordere Motordomäne die verschiedenen Bindestellen auf der Mikrotubulus-Oberfläche besetzt. Dabei wird berücksichtigt, dass das ATP-induzierte Andocken des Necklinkers die Länge der flexiblen Verbindung zwischen den Motordomänen verkürzt und den Startpunkt für die diffusive Suche etwa 4 nm in Richtung Plus-Ende des Mikrotubulus verschiebt (Abb. 6.11). Zudem wird ein lateraler Versatz des Startpunktes nach links angenommen, da die Bewegung einzelköpfiger Kinesin-1 Konstrukte eine entsprechend gerichtete Kraftkomponente besitzt [97].

Berechnung der Besetzungswahrscheinlichkeiten

Um die Besetzungswahrscheinlichkeiten für die zur Verfügung stehenden Bindestellen abzuschätzen, wird die Verbindung zwischen den Motordomänen als semiflexibles Polymer betrachtet. Semiflexible Polymere sind durch zwei Parameter, die Konturlänge L und die Persistenzlänge p , charakterisiert und sind in ihren mechanischen Eigenschaften gut mithilfe des *Worm-Like-Chain* (WLC) Modells beschreibbar. Das nichtlineare Antwortverhalten eines semiflexiblen Polymers auf eine externe Kraft kann im WLC-Modell mit

$$F(x) = \frac{k_B T}{p} \left(\frac{1}{4 \left(1 - \frac{x}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L} \right) \quad (6.4)$$

interpoliert werden [15], wobei x die Ausdehnung des Polymers bei einer Kraft $F(x)$ bezeichnet. Die Integration von Gleichung (6.4) bis zur Ausdehnung x liefert die im Polymer gespeicherte elastische Energie bei dieser Ausdehnung:

$$E(x) = \int_0^x F(x') dx'. \quad (6.5)$$

Aus der Energiedifferenz für verschiedene Ausdehnungen x_i und x_j lässt sich das Verhältnis der Wahrscheinlichkeiten q_i und q_j berechnen, mit denen das Polymer eine entsprechende Ausdehnung besitzt:

$$\frac{q_i}{q_j} = e^{-\frac{E(x_i) - E(x_j)}{k_B T}}. \quad (6.6)$$

Die Wahrscheinlichkeit, die Bindestelle i zu besetzen, die eine Ausdehnung x_i erfordert, ist daher gegeben durch

$$q_i = \frac{q_i}{\sum_k q_k} = \left(\sum_k \frac{q_k}{q_i} \right)^{-1}, \quad (6.7)$$

wobei $\sum_k q_k = 1$ die Summe über die Wahrscheinlichkeiten für alle möglichen Bindestellen ist.

Einfluss der Nackendomäne auf Selektion der Bindestellen

Die beiden Motordomänen von Kinesin-1 Motoren sind lediglich durch die beiden Necklinker flexibel miteinander verbunden. Die daran anschließende Nackendomäne trägt aufgrund der Ausbildung einer stabilen Coiled-Coil Struktur nicht zur Flexibilität bei [45, 53]. Der Necklinker ist ein flexibles, unstrukturiertes Peptid, das etwa 14 Aminosäuren umfasst und somit im Dimer eine Konturlänge $L = 2 \times 14 \times 0.365 \text{ nm} = 10.2 \text{ nm}$ (Aminosäuren 322 – 335 mit einer Länge von 0.365 nm pro Aminosäure [24]) besitzt. Die Persistenzlänge des Necklinkers kann anhand der Steifigkeit anderer unstrukturierter Polypeptide geschätzt werden, wobei die Schätzungen einen breiten Bereich von 0.4 – 1.4 nm umfassen [37, 102]. Im Folgenden wird ein Wert von $p = 1.0 \text{ nm}$ angenommen, der aus der Steifigkeitsmessung flexibler Glyzin-Serin-Peptide mit variabler Länge stammt [69]. Berechnet man die Besetzungswahrscheinlichkeiten der verfügbaren Bindestellen auf einem Mikrotubulugitter unter der Annahme, dass sich durch das Docken des Necklinkers der Startpunkt der diffusiven Suche um 4 nm nach vorne und 0.5 nm nach links verschiebt, so wird ausschließlich die nächste Bindestelle auf demselben Protofilament besetzt und der Motor bewegt sich entlang eines einzelnen Protofilaments fort (Abb. 6.12 **A**).

Wie verändert sich die Situation durch die Einführung einer flexiblen Nackendomäne? In dem Konstrukt hCys-14GS wurden pro Polypeptid 18 Aminosäuren (KKCK(GS)₇) nach dem Necklinker hinzugefügt, wodurch sich die Konturlänge der flexiblen Verbindung zwischen den Motordomänen um $2 \times 6.6 \text{ nm}$ auf insgesamt $L = 23 \text{ nm}$ verlängert. Aufgrund dieser erhöhten Flexibilität zwischen den beiden Motordomänen reduziert sich der Anteil für Schritte entlang eines Protofilaments auf $\approx 47\%$, dafür werden zudem Bindestellen auf den rechts und links angrenzenden Protofilamenten besetzt. Dabei treten sowohl Seitschritte auf die Bindestellen direkt neben der gebundenen (hinteren) Motordomäne auf, als auch Diagonalschritte.

Simuliert man den Pfad eines Motormoleküls, das gemäß der berechneten Wahrscheinlichkeiten auf einem Mikrotubulus mit 13 Protofilamenten entlang schreitet mithilfe einer Monte-Carlo-Simulation, ergibt sich insgesamt eine linksgängige Spiralisierung des Motors um das Filament (Abb. 6.12 **B**), wie sie auch experimentell beobachtet wird. Die berechneten Besetzungswahrscheinlichkeiten ergeben eine resultierende Wahrscheinlichkeit von etwa 13% ((11 + 22)% auf linkes Protofilament abzüglich (14 + 6)% auf rechtes Protofilament) für einen Wechsel auf das links benachbarte Protofilament bei jedem Schritt. Daraus ergibt sich eine mittlere erwartete Ganghöhe von $0.8\ \mu\text{m}$ in guter Übereinstimmung mit dem experimentell ermittelten Wert von $(0.7 \pm 0.4)\ \mu\text{m}$. Bei Seitschritten auf die Bindestellen neben der gebundenen Motordomäne bewegt sich der Schwerpunkt des Motors lediglich um etwa $4\ \text{nm}$ statt der nach dem *Hand-over-Hand* Modell erwarteten $8\ \text{nm}$ nach vorne. Tatsächlich wird für das Motorkonstrukt ein entsprechender Anteil an "halben" Schritten beobachtet [102]. Schritte auf weiter entfernt liegende Protofilamente können mit diesem simplen Modell jedoch nicht reproduziert werden.

Das quervernetzte Motorkonstrukt hCys-14GS-X besitzt vor den Cystein-Resten je zwei Lysine pro Polypeptidkette. Die Konturlänge der flexiblen Verbindung ist damit $L = 11.7\ \text{nm}$ und geringfügig länger als in *HsKHC*. Neben der großen Mehrheit an Schritten entlang desselben Protofilaments ergibt sich daher ein geringfügiger Anteil ($\approx 1.8\%$) an Seitschritten nach links, wodurch der Motor einer schwach ausgeprägten, linksgängigen Spiralbewegung mit einer Ganghöhe $h_{\text{Mot}} \approx 6\ \mu\text{m}$ auf einem Mikrotubulus mit 13 Protofilamenten folgt (Abb. 6.12 **C**). Nach Gleichung (6.2) entspricht dies einer Ganghöhe $h_{\text{obs}} \approx 3\ \mu\text{m}$ auf 14 Protofilamenten, die in etwa mit der beobachteten Ganghöhe von $3.5\ \mu\text{m}$ für die linksgängige Spiralisierung übereinstimmt.

Die geringfügig längere Verbindung der Motordomänen in hCys-14GS-X ist daher neben der unvollständigen Quervernetzung des Proteins mit ein möglicher Gesichtspunkt, warum dieses Motorkonstrukt keine exakt geradlinige Bewegung wie *HsKHC* zeigt. Die Bestimmung der Bewegungstrajektorien unter Einzelmolekül-Bedingungen würde im Rahmen eines zukünftigen Experiments eine elegante Möglichkeit bieten, die dominierende Ursache für dieses Verhalten zu identifizieren, da sich für ein Gemisch aus hCys-14GS und hCys-14GS-X eine klare Trennung im Verhalten dieser beiden Motoren ergeben müsste⁵.

6.3.4 Vergleich mit Dynein und Myosin

Auch bei Dynein und Myosin spielt die Flexibilität der Verbindung zwischen den Motordomänen eine maßgebliche Rolle für die Schrittverteilung dieser Moleküle. Zytoplasmatisches Dynein bewegt sich prozessiv in Richtung des Minus-Endes von Mikrotubuli und macht dabei nicht nur Schritte variabler Größe entlang eines einzelnen Protofilaments, sondern es werden auch Rückwärtsschritte und Seitschritte auf benachbarte Protofilamente beobachtet. Dieses Schrittverhalten legt nahe, dass ein Dynein-Schritt eine beträchtliche diffusive Komponente enthält [64].

Selbiges wird auch für den Schrittmechanismus von Myosin-VI postuliert, das ebenfalls eine flexible Region zwischen den katalytischen Domänen und der Dimerisierungsregion besitzt [66] und eine signifikant breitere Verteilung in seinen Schrittweiten aufweist als

⁵Für diese Motoren wird eine mittlere Lauflänge von etwa $1.5 - 2\ \mu\text{m}$ erwartet [102]. Die Wahrscheinlichkeit, eine Lauflänge von mehr als $4\ \mu\text{m}$ zu beobachten, liegt daher bei etwa 10%, so dass dieser Versuch mit einem realistischen experimentellen Aufwand durchführbar sein sollte.

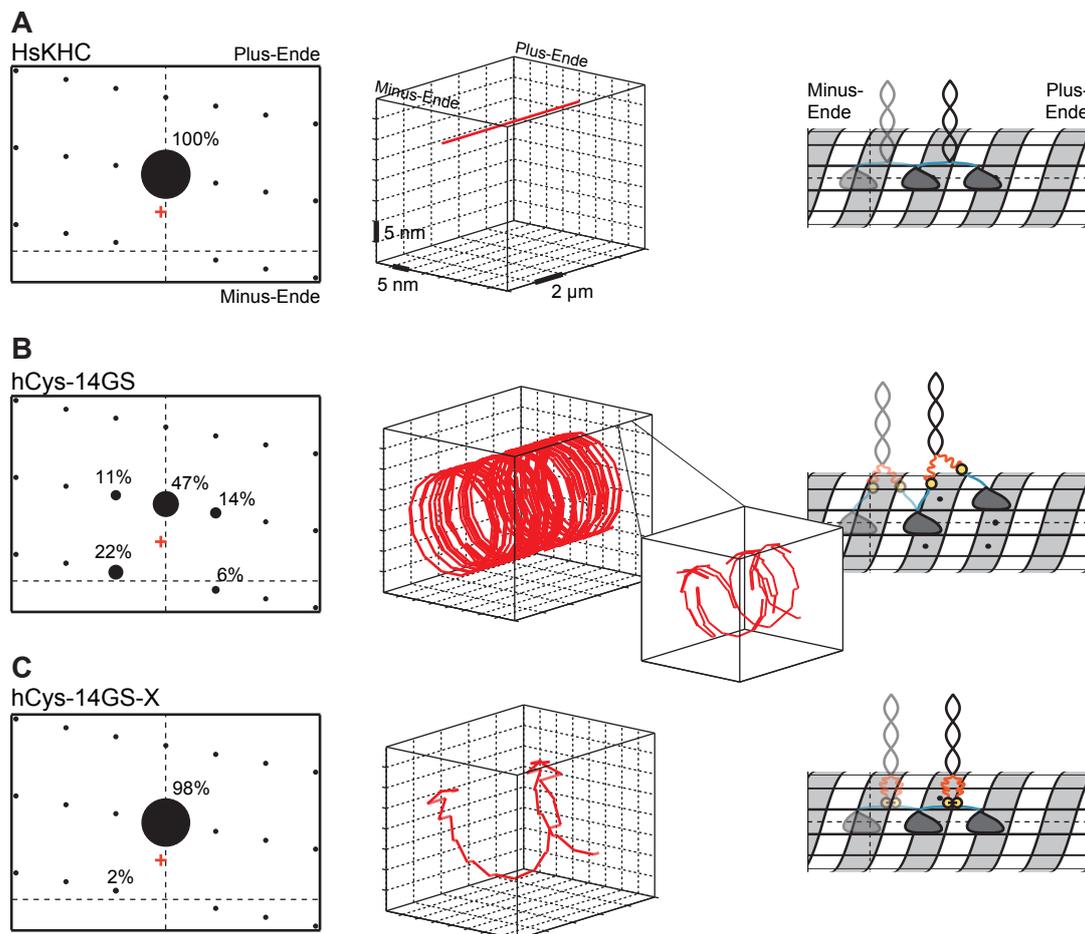


Abbildung 6.12 – Simulation des Spiralisierungsverhaltens für **A** *HsKHC*, **B** *hCys-14GS* und **C** *hCys-14GS-X*. Links: Besetzungswahrscheinlichkeiten der einzelnen Bindestellen (schwarze Punkte) auf einem Mikrotubulus. Der Startpunkt für die diffusive Suche ist rot markiert. Mitte: Monte-Carlo-Simulation eines Motorpfades auf einem Mikrotubulus mit 13 Protofilamenten unter Berücksichtigung der berechneten Besetzungswahrscheinlichkeiten. Rechts: Illustration der möglichen Bindestellen für die verschiedenen Motoren.

Myosin-V, dessen Motordomänen durch steife Hebelarme verbunden sind [67]. Entlang aufgespannter Aktinfilamente bewegen sich beide Myosin-Motoren spiralisierend fort, wobei Myosin-V linksgängig zum Plus-Ende und Myosin-VI rechtsgängig zum Minus-Ende des Aktinfilaments läuft [1, 2].

6.3.5 Mögliche Bedeutung der Spiralisierung

Über die physiologische Bedeutung der Spiralisierung molekularer Motoren kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Motoren mit einer flexiblen Nackendomäne können offenbar aus einer größeren Auswahl an zugänglichen Bindungsstellen schöpfen als Motoren, deren katalytische Domänen durch eine Verbindung geringer Flexibilität gekoppelt sind. Während daher Kinesin-1 aufgrund der begrenzten Reichweite seiner Necklinker letztlich in jedem Schritt auf eine einzelne Bindestelle beschränkt ist, können andere Motoren auf benachbarte Protofilamente ausweichen. Möglicherweise können solche Motoren buchstäblich einen Bogen um etwaige Hindernissen entlang ihres Transportweges schlagen.

Aus einem anderen Blickwinkel betrachtet, scheint es angesichts der Vielzahl an möglichen Bindestellen auf der Mikrotubulus-Oberfläche bemerkenswert, dass manche Kinesin-Motoren trotzdem strikt einem Protofilament zu folgen vermögen. Es ist daher auch denkbar, dass die Struktur der Nackendomänen von Kinesin-1 und KIF3a/KIF3b dahingehend optimiert ist, die Fortbewegung dieser Motoren entlang eines strikt linearen Pfades zu gewährleisten.

Heterodimere Kinesin-2 Motoren nutzen verschiedene Mikrotubuli-Strukturen für ihre Fortbewegung. Es ist daher verlockend über einen funktionellen Zusammenhang zwischen dem Spiralisierungsverhalten eines Kinesin-2 Motors mit der jeweiligen Filamentstruktur zu spekulieren. KRP85/KRP95 und KLP11/KLP20, die Kinesin-2 Motoren mit der am deutlichsten ausgeprägten Spiralisierung, arbeiten hauptsächlich auf den Mikrotubuli-Dubletten von Axonemstrukturen. Dagegen erfüllt KIF3a/KIF3b seine Transportaufgaben auf einfachen Mikrotubuli und bewegt sich ebenso wie Kinesin-1 geradlinig auf diesen fort. Diese Korrelation zwischen Spiralisierung und Filamentstruktur ist aber nicht eindeutig, da beispielsweise XKLP3a/XKLP3b sich ebenfalls auf einfachen Mikrotubuli fortbewegt, dabei aber schwach spiralisiert. Dennoch ist es denkbar, dass die Spiralisierung und damit das systematische "Ablaufen" eines größeren Teils der Filamentoberfläche eine wichtige Rolle für Kinesine spielt, die auf Mikrotubuli-Dubletten spezialisiert sind. Unter Umständen orientieren sie sich auf diese Art hin zu einem bestimmten Pfad auf dieser komplexeren Struktur, wie zum Beispiel der Nahtstelle zwischen dem A- und B-Mikrotubulus eines Dubletts.

7 Schlussfolgerungen und Ausblick

7.1 Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse

Eine der wichtigsten Errungenschaften von Eukaryonten ist die Entwicklung eines effizienten Transportsystems um Lasten über weite Strecken zu befördern. Dies geschieht mittels molekularer Motoren, die sich gerichtet entlang von Zytoskelettfilamenten fortbewegen. Eine bereits früh entstandene Form dieses intrazellulären Transports stellt der Aufbau von Zilien durch die IFT-Maschinerie dar. Wichtiger Bestandteil dieses Transportsystems sind die heterodimeren Kinesine, die sich durch ihre beiden verschiedenen katalytischen Untereinheiten von anderen Kinesinen abheben. Unser Verständnis über die Funktionsweise dieser wichtigen Motorproteine bleibt bislang jedoch im Vergleich zu anderen Kinesin-Motoren weit zurück. In der Tat ist die mechanische Charakterisierung heterodimerer Kinesin-2 Motoren auf eine kleine Anzahl Publikationen begrenzt.

Die vorliegende Arbeit leistet demnach einen fundamentalen Beitrag für das Verständnis der Funktionsweise heterodimerer Kinesin-2 Motoren. Im Rahmen dieser Arbeit ist es zum ersten Mal gelungen die prozessive Fortbewegung eines Kinesin-2 Motors in diskreten 8 nm Schritten nachzuweisen. Am Beispiel des heterodimeren Kinesin-2 KLP11/KLP20 aus *C. elegans* wird deutlich, dass die beiden verschiedenen Motordomänen dieses Kinesins im Hinblick auf ihre katalytische Aktivität keine drastischen Unterschiede aufweisen, sie aber auf sehr unterschiedliche Weise zur Prozessivität und Auto-Inhibierung des Moleküls beitragen: Chimäre "homodimere" Konstrukte dieses Motors zeigen, dass eine der Motordomänen unabdingbar für eine funktionierende Auto-Inhibierung, die andere dagegen essenziell für die Prozessivität des Motors ist. KLP11/KLP20 braucht daher jede seiner beiden verschiedenen Untereinheiten, um insgesamt als prozessiver und selbstregulierter Motor funktionieren zu können. Dies ist das erste Beispiel für einen molekularen Motor, in dem eine derartige Arbeitsteilung zwischen den Untereinheiten besteht. Es gilt jedoch zu beachten, dass diese Auftrennung der Funktionen auf verschiedene Untereinheiten keine notwendige Voraussetzung für gleichzeitige Prozessivität und Auto-Inhibierung darstellt – man denke beispielsweise an homodimeres Kinesin-1, das auch mit zwei identischen Untereinheiten sowohl prozessiv als auch auto-inhibiert ist. Es bleibt also die Frage, was die Besonderheit heterodimerer Motoren ausmacht, so dass diese überhaupt entstanden sind. Eine mögliche Antwort hierauf liefert möglicherweise der dreidimensionale Transportweg dieser Motoren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals ein weiterer wichtiger Aspekt der Funktionsweise von Kinesin-Motoren eingehend studiert, nämlich die dreidimensionale Bewegung dieser Motoren entlang eines Mikrotubulus, dessen Oberfläche in ihrem ganzen Umfang zugänglich ist. Diese Konstellation entspricht daher gut der Situation von Transportprozessen in einer Zelle, in der die Mikrotubuli als Schiene fungieren ohne dabei an eine Oberfläche adsorbiert zu sein. Zwar existieren einige wenige Experimente, die auf Grundlage von Motilitätsversuchen die Spiralisierungstendenz von Kinesin-Motoren untersu-

chen, die molekulare Basis für das Spiralisierungsverhalten war bislang jedoch gänzlich unbekannt. Anhand eines intelligent entworfenen Modellsystems konnten Experimente in dieser Arbeit die Flexibilität der Nackendomäne als bestimmenden Parameter identifizieren. Diese Experimente können einen vormals postulierten Zusammenhang zwischen der Prozessivität und den Spiralisierungseigenschaften von Kinesinen nicht bestätigen.

Heterodimere Kinesin-2 Motoren weisen eine erstaunliche Bandbreite auf, was ihre Bewegung entlang von aufgespannten Mikrotubuli betrifft. Während der zytoplasmatische Transportmotor KIF3a/KIF3b sich ähnlich zu Kinesin-1 Motoren verhält, die zuverlässig einem Protofilament auf der Mikrotubulus-Oberfläche folgen, bewegen sich andere heterodimere Kinesin-2 Motoren entlang einer mehr oder weniger ausgeprägten Spiralbahn um Mikrotubuli herum. Das Strukturelement, das dieses Verhalten bestimmt, ist in der Tat in der Stielregion dieser Motoren zu finden und besteht wahrscheinlich in der an den Necklinker angrenzenden Nackendomäne. Diese Region ist für heterodimere Kinesin-2 Motoren über die verschiedenen Organismen hinweg nur schwach konserviert und weist für die unterschiedlichen Motoren starke Unterschiede darin auf, eine stabile Coiled-Coil Struktur auszubilden. Welche Rolle der dreidimensionale Pfad eines Motors für seine physiologische Funktion spielt ist bislang nicht bekannt, aber möglicherweise sind heterodimere Kinesine durch ihre Nackendomäne speziell darauf angepasst, einem bestimmten Pfad zu folgen. Der Grund für die Ausbildung eines heterodimeren Motors wäre dann weniger in den katalytisch aktiven Domänen zu suchen, als vielmehr in der bislang wenig beachteten Stielregion, in der die beiden verschiedenen Untereinheiten miteinander interagieren und zu einer heterodimeren Struktur zusammenkommen.

7.2 Weiterführende Experimente

7.2.1 Prozessivität und Auto-Inhibierung anderer heterodimerer Kinesin-2 Motoren

Wie übertragen sich die Ergebnisse zu Prozessivität und Auto-Inhibierung von KLP11/KLP20 auf andere Vertreter dieser Kinesin-Familie? Analoge Einzelmolekül-Experimente an KIF3a/KIF3b und KRP85/KRP95 Konstrukten werden zeigen, ob diese Motoren auto-inhibiert sind, und ob die Regulation ebenso wie für KLP11/KLP20 asymmetrisch über eine der beiden Motordomänen erfolgt. Besonders aufschlussreich wird es sein, die Frage nach der Prozessivität von KRP85/KRP95 zu beantworten.

Frühere Untersuchungen an "homodimeren" chimären Konstrukten von KIF3a/KIF3b haben bereits gezeigt, dass für diesen Motor beide katalytischen Domänen als "Homodimere" prozessiv sind, insbesondere das zu KLP11/11 analoge KIF3b/3b [54]. Die Kombination einer unprozessiven mit einer prozessiven Motordomäne scheint demnach kein universelles Funktionsprinzip der Kinesin-2 Familie zu sein. Zur Auto-Inhibierung von KIF3a/KIF3b liegen bislang keine Informationen vor, es ist daher also möglich, dass auch in diesem Motor nur eine der beiden Motordomänen als Regulationsschalter wirkt.

Ob es sich bei KRP85/KRP95 tatsächlich um einen unprozessiven Motor handelt [62], oder ob lediglich aufgrund einer Auto-Inhibierung keine prozessiven Läufe detektiert werden konnten, ist bislang nicht endgültig geklärt, auch wenn in der vorliegenden Arbeit erste Experimente mit dem potentiell deregulierten KRP85^{EE}/KRP95^{EE} auf eine Prozessivität dieses Motors hinweisen. Sollte KRP85/KRP95 tatsächlich unprozessiv sein, so

würde die Familie der Kinesin-2 Motoren eine erstaunliche Vielfalt an Motoren umfassen, die vom prozessiven KIF3a/KIF3b bis hin zum unprozessiven KRP85/KRP95 reicht mit der interessanten Variante KLP11/KLP20 dazwischen, die eine unprozessive und eine prozessive Motordomäne miteinander kombiniert. In jedem Fall wird es interessant sein anhand "homodimerer" Konstrukte herauszufinden, ob die beiden Motordomänen von KRP85/KRP95 zueinander äquivalent sind, wie die Motordomänen von KIF3a/KIF3b, oder ob dieser Motor ähnlich zu KLP11/KLP20 eine "prozessive" mit einer "unprozessiven" Untereinheit kombiniert und hier möglicherweise die "unprozessive" Untereinheit das Gesamtverhalten dieses Motors dominiert.

Die molekulare Ursache, warum zwei KLP11-Motordomänen nicht in der Lage sind, sich so miteinander zu koordinieren, dass eine prozessive Bewegung erfolgt, ist unklar. Eine mögliche Erklärung für dieses überraschende Verhalten könnte die Existenz weiterer Regulationsmechanismen sein, die nur auf die KLP11-Motordomäne wirken und daher diese Kombination als unprozessiv erscheinen lassen. Falls tatsächlich eine weitere Regulation der KLP11-Motordomänen über die Stielregion stattfinden sollte, könnten diese durch die Substitution der kompletten Stielregion durch eine Motor-fremde Coiled-Coil Struktur, beispielsweise dem Leuzin-Zipper GCN4 [58], eliminiert werden. Denkbar wäre auch, dass sich die beiden Motordomänen von KLP11 gegenseitig sterisch behindern und daher entweder einander nicht ungehindert passieren können, oder keine gleichzeitige Bindung der Motordomänen an den Mikrotubulus stattfinden kann, wie dies für einen prozessiven Motor notwendig ist. Hierüber könnte ein Motorkonstrukt Aufschluss geben, das den beiden Motordomänen mehr Spielraum insbesondere in der Auswahl der Bindungsstellen auf dem Mikrotubulus gewährt. Dies könnte beispielweise in Anlehnung an Experimente mit Kinesin-1 durch die Einführung einer Poly-Prolin-Helix nach dem Necklinker geschehen [102].

7.2.2 Validierung des Modells für die Spiralisierung von Kinesin-2 Motoren

Experimente an Kinesin-1 Konstrukten haben gezeigt, dass die flexible Verbindung der beiden Motordomänen das Spiralisierungsverhalten des Motors um einen aufgespannten Mikrotubulus herum bestimmt. Inwieweit lässt sich dieses Modell auch auf Kinesin-2 Motoren übertragen? Die chimären Motorkonstrukte aus dem geradlinigen KIF3a/3b und dem spiralisierenden KLP11/20 zeigen lediglich, dass das determinierende strukturelle Element in der Stielregion dieser Motoren zu finden ist. Der direkte Nachweis, dass die Nackendomäne für die Spiralisierung dieser Motoren verantwortlich ist, steht aber bislang noch aus. Analog zu den Kinesin-1 Konstrukten könnten die beiden Untereinheiten der heterodimeren Kinesin-2 Motoren über ein reaktives Cystein direkt nach dem Necklinker quervernetzt werden. Als Modellsystem für dieses Experiment bietet sich KRP85/KRP95 an, da dieses zum einen die am stärksten ausgeprägte Spiralisierung zeigt und die nativen Sequenzen zudem lediglich 3 (KRP85) bzw. 2 (KRP95) Cysteine besitzen. Auch ein Austausch der Nackendomänen zwischen verschiedenen Kinesin-2 Motoren könnte die Hypothese für das Spiralisierungsverhalten bestätigen.

Ein weiteres aufschlussreiches Experiment wäre darüber hinaus die Erstellung eines Spiralisierungsmaßstabs anhand von Kinesin-1 Konstrukten mit unterschiedlichen flexiblen Verbindungen. Durch die Einführung von Poly-GS-Abschnitten unterschiedlicher Länge sollte sich die Ganghöhe der Spiralisierung gezielt manipulieren lassen. Eine solche "Kali-

brierung” des Spiralisierungsverhaltens lässt dann möglicherweise Rückschlüsse über die Struktur der Nackendomäne anderer Kinesin-Motoren basierend auf ihrer Spiralisierungseigenschaft zu.

7.2.3 *Tight-Coupling* für Kinesin-2 Motoren

Für Kinesin-1 ist jeder 8 nm Schritt mit der Hydrolyse eines Moleküls ATP verbunden [71]. Diese Eigenschaft wird als *tight-coupling* bezeichnet und bedeutet insbesondere, dass umgekehrt auch die Hydrolyse eines ATP-Moleküls mit einem Vorwärtsschritt einhergeht. Die Einführung einer flexiblen Nackenregion in Kinesin-1 führt dazu, dass dieses feste Verhältnis von einem Schritt pro Hydrolyse nicht mehr gegeben ist und die Geschwindigkeit dieser Motoren entlang von Mikrotubuli bei gleichbleibender Hydrolyseaktivität sinkt [102]. Dies gilt insbesondere auch für das Motorkonstrukt, in das eine flexible Nackendomäne in Form von insgesamt 14 Glyzin-Serin-Einheiten eingeführt wurde. Dieser Motor schreitet nicht mehr strikt entlang eines Protofilaments, sondern macht einen signifikanten Anteil an Seit- und Diagonalschritten auf die angrenzenden Protofilamente. Insbesondere führen solche Übergänge zu einem Spiralisieren des Motors um den Mikrotubulus, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde.

Bieten solche “irregulären” Schritte eine ausreichende Erklärung für die reduzierte Geschwindigkeit dieses Motors bei sonst unveränderter Hydrolyserate? Aus der Modellierung des Spiralisierungsverhaltens können die Besetzungswahrscheinlichkeiten für die verschiedenen Bindungsstellen auf der Mikrotubulus-Oberfläche abgeschätzt werden. Daraus kann unter der Annahme, dass die Anzahl der Schritte pro Zeit konstant bleibt, die Veränderung der Geschwindigkeit durch Seit- und Diagonalschritte berechnet werden:

$$\frac{v_1}{v_0} = \frac{1}{s_0} \sum_k q_k s_k. \quad (7.1)$$

Dabei bezeichnet v_1 die Geschwindigkeit mit irregulären Schritten, v_0 die Geschwindigkeit mit Schritten ausschließlich entlang eines Protofilaments, q_k den Anteil der Schritte auf Bindestelle k und s_k die Schwerpunktsbewegung des Motors in Projektion zur Mikrotubulus-Achse bei einem Schritt zur Bindestelle k . Für die modellierten Besetzungswahrscheinlichkeiten von hCys-14GS ergibt sich $v_1 \approx 0.87 \times v_0$. Die lineare Geschwindigkeit des Motors entlang eines Mikrotubulus ist jedoch etwa drei- bis vierfach geringer als *HsKHC*. Allein der Einfluss von Seit- und Diagonalschritten bietet somit keine ausreichende Erklärung für die verringerte Geschwindigkeit bei gleichbleibender Hydrolyseaktivität.

Manche heterodimeren Kinesin-2 Motoren bewegen sich in einer Spiralbahn um Mikrotubuli herum und besitzen vermutlich ähnlich wie hCys-14GS eine flexible Nackendomäne. Interessant ist daher im Umkehrschluss, ob für diese heterodimeren Kinesine eine feste Kopplung zwischen ATP-Hydrolyse und Vorwärtsschritt gegeben ist. An dieser Stelle kann bereits angemerkt werden, dass sich im Gegensatz zu *HsKHC* und hCys-14GS die Geschwindigkeiten entlang des Mikrotubulus für das geradlinige KIF3a/3b und die spiralisierenden Kinesin-2 Motoren nicht signifikant voneinander unterscheiden (Abb. 6.4 B und Abb. 6.10 C).

7.2.4 Erweiterung des Rotationsexperiments auf Mikrotubuli-Dubletten

Wie beeinflusst die Filamentstruktur den Pfad von Kinesin-Motoren? In ihrer physiologischen Funktion bewegen sich KLP11/KLP20 und KRP85/KRP95 auf Dubletten von Mikrotubuli entlang. Obgleich bekannt ist, dass sich die Tubulin-Untereinheiten *in vitro* polymerisierter Mikrotubuli nach dem B-Gitter anordnen und auch der unvollständige B-Mikrotubulus in Axonemstrukturen eine solche Gitterstruktur besitzt (Abb. 2.1 **B** und Abb. 3.3), ist es immer noch Gegenstand von Diskussionen, ob die Anordnung der Untereinheiten im A-Mikrotubulus nach einem (symmetrischen) A-Gitter oder dem B-Gitter erfolgt [3, 79]. Falls sich die beiden Mikrotubuli in der Dubletten-Struktur tatsächlich in ihrer Gitterstruktur unterscheiden, wäre zu erwarten, dass dies einen deutlichen Einfluss auf den Pfad von Motoren hat, die sich entlang bzw. um diese Struktur herum bewegen.

7.2.5 Motorkoordination von KLP11/KLP20 mit OSM3

Bei seiner physiologischen Aufgabe, dem Transport von IFT-Partikeln im mittleren Segment eines Ziliums, kooperiert KLP11/KLP20 mit dem homodimeren Kinesin-2 OSM3. Dabei bewegen sich die Motoren entlang von Dubletten von Mikrotubuli fort. Im distalen Segment hingegen transportiert nur OSM3 die IFT-Partikel entlang einfacher Mikrotubuli. Mit einer Geschwindigkeit von $1.3 \mu\text{m/s}$ ist OSM3 etwa zwei- bis dreimal so schnell wie das Heterodimer KLP11/KLP20 mit $0.5 \mu\text{m/s}$. Die Transportgeschwindigkeit von IFT-Partikeln im mittleren Segment liegt mit etwa $0.7 \mu\text{m/s}$ zwischen den Geschwindigkeiten der einzelnen Motoren [78].

Erste Experimente mit OSM3 in der Hantelgeometrie zeigen, dass die Trajektorien dieses Motors eine erstaunliche Bandbreite in ihren Ganghöhen aufweisen, die in dieser Form mit keinem anderen Motor in dieser Arbeit beobachtet wurden. Während manche Kurven darauf schließen lassen, dass OSM3 möglicherweise ähnlich wie Kinesin-1 einem Protofilament folgt, kann in einigen Läufen jedoch auch eine Spiralisierung detektiert werden, die nicht mit dieser Hypothese in Einklang steht. Es bedarf daher weiterer Experimente, um die Ursache für die breite Streuung der Ganghöhen von OSM3 herauszufinden. Da OSM3 ein prozessiver Motor mit einer mittleren Lauflänge von etwa $1.4 \mu\text{m}$ ist [39], könnten an dieser Stelle auch Experimente mit einzelnen Motoren durchgeführt werden. Ungeachtet der breiten Streuung an Ganghöhen kann mit einer mittleren beobachteten Ganghöhe von $h_{\text{obs}} = (4.0 \pm 1.3) \mu\text{m}$ als gesichert angesehen werden, dass sich die Trajektorie von OSM3 signifikant von der seines Partnerproteins KLP11/KLP20 unterscheidet.

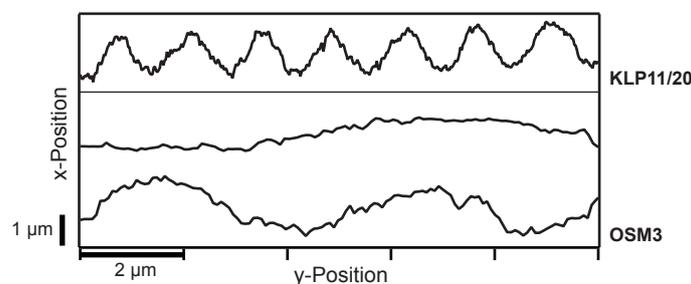


Abbildung 7.1 – Spiralisierungsverhalten von OSM3 und KLP11/KLP20 im Vergleich.

Die Verschiedenheit von OSM3 und KLP11/KLP20 macht es besonders interessant, die gleichzeitige Aktion dieser Motoren zu studieren. In einer bereits begonnenen Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Hendrik Dietz (Lehrstuhl E69 am Department Physik der Technische Universität München) werden Plattformen auf DNA-Basis hergestellt mit dem Ziel, an diese später spezifisch Motorproteine anzubinden. Mittels solcher Plattformen können dann gezielt je ein Molekül OSM3 und KLP11/KLP20 zu einer funktionellen Einheit zusammengespannt und mechanisch untersucht werden. Für die Bewegung zweier solcher gekoppelter Proteine gibt es grundsätzlich drei Möglichkeiten für die Fortbewegung der Plattform: es transportieren entweder beide Motoren gleichzeitig oder jeweils einer der beiden Motoren alleine. Anhand der Transportgeschwindigkeiten sollte es möglich sein, die jeweiligen Szenarien voneinander zu unterscheiden. In der Hantelgeometrie kann dann untersucht werden, welcher Pfad sich beim gleichzeitigen Transport entlang eines Mikrotubulus ergibt: dominiert einer der beiden Motoren oder entsteht ein mittleres Verhalten?

A Material und Methoden für Experimente mit Kinesin

A.1 Verwendete Materialien

A.1.1 Kinesin-Konstrukte

Die Klonierung, Expression und Aufreinigung der in dieser Arbeit verwendeten Kinesin-Konstrukte wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Manfred Schliwa, Institut für Zellbiologie, Adolf-Butenand-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Die Expression der Proteine erfolgte mithilfe eines Baculovirus-Expressionssystems (In-vitrogen) in Sf9-Insektenzellen (*S. frugiperda*). Nach der Affinitätsaufreinigung der Proteine über einen Flag-Tag (GDYKDDDDK) an einer der beiden Untereinheiten lagen die Proteine in einem Puffer aus 80 mM Pipes, pH 6.9, 200 mM Kaliumacetat, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.1 mM ATP, 0.2 mg/ml 1xFlag-Peptid (Sigma) vor.

A.1.2 Mikrotubuli

Die Aufreinigung, Modifikation und Polymerisation von Mikrotubuli wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Manfred Schliwa durchgeführt. Tubulin wurde nach [49] aus Schweinehirn aufgereinigt, die Präparation von Biotin-Tubulin und Atto488-Tubulin erfolgte nach [38]. Für die Polymerisation von biotinylierten, fluoreszenzmarkierten Mikrotubuli wurden typischerweise 50 µl Tubulin mit je 2 µl Biotin-Tubulin und Atto488-Tubulin gemischt, abzentrifugiert und nach Zugabe von 1 mM GTP über Nacht bei 35°C inkubiert. Verdünnungen von Mikrotubuli erfolgten in einem Taxol-haltigen Puffer (BRB80/Taxol) und wurden auf einer Temperatur von 35°C gehalten.

A.1.3 Puffer und Stocklösungen

Die nachfolgenden Puffer wurden aus einer 5-fach konzentrierten BRB80-Stocklösung erstellt, die am Tag des Experiments aus separaten Stocklösungen frisch zusammengemischt wurde.

BRB80. 80 mM Pipes-KOH, pH 6.9 (Sigma, Art.-Nr. P1851), 2 mM MgCl₂ (Fluka, Art.-Nr. 63068), 1 mM EGTA (Fluka, Art.-Nr. 03777), 5 mM DTT (Sigma, Art.-Nr. 43815).

BRB80/Taxol. BRB80 mit 5 µM Taxol (Sigma, Art.-Nr. T7191, 4 mM Stocklösung in DMSO).

BRB80/BSA. BRB80 mit 1 mg/ml BSA (Sigma, Art.-Nr. A0281, 10 mg/ml Stocklösung in H₂O).

BRB80/Cas0.1/ATP. BRB80 mit 0.1 mg/ml Casein, 10 μ M ATP.

BRB80/Cyt/Cas. BRB80 mit je 0.1 mg/ml Cytochrom C und Casein.

hsBRB80. BRB80 mit 100 mM Kaliumacetat (Fluka, Art.-Nr. 60035, 2 M Stocklösung in H₂O).

Motilitätspuffer. 42.5 μ l hsBRB80, 1 μ l Glucose (20% in H₂O), 2 μ l 25xGOC, 2.5 μ l Casein (3.8 mg/ml in BRB80), 2 μ l ATP (50 mM für eine Endkonzentration von 2 mM oder Verdünnung).

Biotin-BSA und Streptavidin Stocklösungen. Biotin-BSA (Sigma, Art.-Nr. A8549) und Streptavidin (Sigma, Art.-Nr. S4762) wurden in PBS zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml aufgelöst, aliquotiert und bei -20°C bzw. -80°C aufbewahrt. Alternativ zu Streptavidin wurde gelegentlich Neutravidin (Invitrogen, Art.-Nr. A2666) verwendet.

Glucoseoxidase und Catalase Stocklösungen (25xGOC). Glucoseoxidase (Sigma, Art.-Nr. G2133) und Catalase (Sigma, Art.-Nr. C3155) wurden in Puffer (24 mM Pipes, pH 6.8, 4 mM MgCl₂ und 2 mM EGTA) aufgelöst bzw. verdünnt, so dass eine Konzentration von 2600 units/ml für Glucoseoxidase und 170000 units/ml für Catalase vorlag. Die Lösungen wurden für 15 min bei 4°C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert um aggregiertes Protein zu entfernen. Der Überstand wurde jeweils mit gleichen Volumina Glycerol vermischt, filtriert, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Die Glucoseoxidase und Catalase Stocklösungen wurden am Tag des Experiments in gleichen Volumina miteinander gemischt (25xGOC).

Casein Stocklösung. Casein wurde nach einem Protokoll von Dr. Günther Woehlke (Lehrstuhl E22 am Department Physik der Technische Universität München) aufbereitet.

Cytochrom C Stocklösung. Cytochrom C (Sigma, Art.-Nr. C3131) wurde in ddH₂O zu einer Endkonzentration von 10 mg/ml aufgelöst. Die Lösung wurde am jeweiligen Experimentiertag frisch erstellt.

ATP Stocklösung. Aufgereinigte ATP-Stocklösungen (220–300 mM) wurden großzügig von Dr. Felix Müller-Planitz (Lehrstuhl für Molekularbiologie, Adolf Butenandt Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt. Diese wurden auf eine Konzentration von 50 mM in BRB80 verdünnt und bei -80°C aufbewahrt.

A.1.4 Funktionalisierte Kugeln

Protein G Kugeln. Protein G Kugeln dienten als Grundlage für die Anbindung von Antikörpern. Hierfür wurde Protein G (Sigma, Art.-Nr. P4689) über Glutaraldehyd (Glutaraldehyd-Kit, Polysciences) kovalent an Amino-funktionalisierte Kugeln (0.5 μm und 1 μm Polybead Amino Microspheres, Polysciences) gebunden.

Antikörper-Kugeln. Um Antikörper-beschichtete Kugeln herzustellen, wurden 5 μl Protein G-beschichtete Kugeln und 5 μl Antikörper nach Wahl (1 mg/ml) in 20 μl BRB80 verdünnt und ca. 1 – 2 Stunden auf Eis inkubiert. Um ungebundenen Antikörper zu entfernen, wurden die Kugeln anschließend dreimal in BRB80 gewaschen.

Streptavidin Kugeln für Hantelgeometrie. 3 μm Proactive Superavidin Kugeln (Polysciences, Art.-Nr. CP01N-1).

A.2 Experimenteller Aufbau und verwendete Programme

Der verwendete experimentelle Aufbau wurde von Dr. Christof Gebhardt entwickelt. Für Details zu Optik, Kalibration, Auflösungsvermögen und Datenerfassung sei daher auf [28] verwiesen. Die optische Pinzette verfügt standardmäßig über zwei Laserfoki. Ein Teil des Laserstrahls durchläuft einen akusto-optischen Deflektor, daher kann einer der beiden Laserfoki über ein Computerprogramm frei positioniert werden. Für die Experimente in der Hantelgeometrie wurde durch ein schnelles (100 kHz) Schalten des AODs zwischen zwei Positionen der benötigte dritter Laserfokus erzeugt. Zudem verfügt der Aufbau über ein integriertes Fluoreszenz- und Hellfeldmikroskop.

Die Auswertung der Daten erfolgte anhand eigens programmierter Routinen in Igor Pro (WaveMetrics, Inc.). Zur Analyse der Fluoreszenz- und Hellfeldaufnahmen kamen zudem die Bildverarbeitungsprogramme ImageJ (National Institutes of Health, NIH, USA) und OpenBox [70] zum Einsatz.

A.3 Messprotokolle und Datenanalyse

A.3.1 Motilitätsversuche

Präparation der Probenkammern. Ein Deckgläschen (Marienfeld, Nr. 0101030) wurden mit zwei Streifen Vakuumsfett (Wacker, Silikon Hochvakuumfett, schwer) auf einem Objektträger (Thermo Scientific) befestigt, so dass eine Flusskammer mit einem Probenvolumen von ca. 10 μl entstand. 10 μl einer Motorlösung (pur oder Verdünnung in BRB80/Cas0.1/ATP) wurden eingespült und ca. 3 – 5 min inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 50 μl Motilitätspuffer gemixt und mit 1 μl einer Mikrotubuli-Verdünnung versetzt. Danach wurde die Probenkammer mit Motilitätspuffer gespült und mit Vakuumsfett gegen Verdunstung versiegelt.

In manchen Versuchen wurden die Motoren über einen Antikörper an die Oberfläche gebunden. In diesem Falle wurde für die Probenkammer ein Nitrozellulose-beschichtetes Deckgläschen verwendet und zunächst für 3 – 5 min mit 0.3 mg/ml eines Anti-Flag Antikörpers (Acris, Art.-Nr. GTX80656) inkubiert. Die Flusskammer wurde anschließend mit

50 μ l BRB80/BSA gespült um ungebundenen Antikörper zu entfernen und anschließend wie beschrieben mit Motor beladen.

Datenerfassung und -analyse. Die Bewegung der Mikrotubuli wurde mit einer CCD-Kamera bei einer Bilddauer von 129 ms aufgezeichnet und als 8-bit tiff-Datei gespeichert. Der Maßstab der Abbildung betrug 161 nm/Pixel. Für die Bestimmung der Geschwindigkeiten wurden die Filme in Igor Pro geladen und die geradlinige Bewegung einzelner Mikrotubuli manuell analysiert.

A.3.2 Verdünnungsexperimente und SMWF

Probenpräparation. In eine Flusskammer wurden 10 μ l einer 0.3 mg/ml Lösung Biotin-BSA eingespült und 3 min inkubiert. Ungebundenes Biotin-BSA wurde durch das Spülen der Kammer mit 50 μ l BRB80/BSA entfernt. Anschließend wurde die Kammer mit 10 μ l einer 0.3 – 0.5 mg/ml Lösung Streptavidin befüllt und ebenfalls 3 min lang inkubiert. Ein weiterer Spülschritt mit 50 μ l BRB80/BSA entfernte ungebundenes Streptavidin. Im nächsten Schritt wurde die Probenkammer mit 10 μ l einer Verdünnung fluoreszenzmarkierter und biotinylierter Mikrotubuli in BRB80/Taxol befüllt und ohne weitere Inkubationszeit mit 50 μ l BRB80/BSA gewaschen um in Lösung befindliche Mikrotubuli zu entfernen. Der stete Fluss richtete die Mikrotubuli aus, so dass die Oberflächen-gebundenen Mikrotubuli längs der Probenkammer orientiert waren.

Zur Präparation Motor-beschichteter Kugeln wurde zuerst eine 1:5-Verdünnung von Polystyrolkugeln (0.5 μ m Polybead, Polysciences) in BRB80 hergestellt. 10 μ l dieser Verdünnung wurden mit dem gleichen Volumen BRB80/Cyt/Cas gemischt und 5 min auf Eis inkubiert, um die Kugeloberflächen vorzubehandeln. In der Zwischenzeit wurde die Stocklösung des Motors nach Bedarf in BRB80/Cas0.1/ATP verdünnt (für Verdünnungsexperimente typischerweise 1:100 bis 1:5000 bei einer Ausgangskonzentration von \approx 0.3 mg/ml). Zu 10 μ l dieser Verdünnung wurde das gleiche Volumen an vorgeblockten Kugeln gegeben, gut gemischt und nochmals für 5 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit wurden 50 μ l Motilitätspuffer gemischt.

Im letzten Schritt wurde der Motilitätspuffer mit 1 μ l der Motor-beschichteten Kugeln versetzt und in die Probenkammer gespült. Um die Probe vor Verdunstung zu schützen, wurden die Ränder mit Vakuumfett versiegelt.

Durchführung der Messung und Datenerfassung. Um den Anteil der aktiven Kugeln bei einem gegebenen Motor/Kugel-Verhältnis zu bestimmen, wurden einzelne Kugeln in der optischen Pinzette gefangen, in Kontakt mit einem Oberflächen-gebundenen Mikrotubulus gebracht und das Positionssignal der gefangenen Kugel auf einem Oszilloskop beobachtet. Aktive Kugeln zeichneten sich durch eindeutiges, wiederholtes Auslenken der Kugel aus der Ruheposition aus. Jede Kugel wurde für ein Zeitfenster von bis zu 30 s getestet und als inaktiv gewertet, wenn innerhalb dieses Zeitfensters keine Aktivität beobachtbar war.

Für alle Motorkonstrukte außer KLP11/11 und KLP11^{EE}/11^{EE} waren aktive Kugeln direkt während des Experiments eindeutig von nicht-aktiven unterscheidbar. Für KLP11/11 und KLP11^{EE}/11^{EE} wurde daher zur späteren Analyse das Positionssignal mit einer Bandbreite von 10 kHz über 30 s aufgezeichnet.

Bestimmung der SMWF. Um die Aktivität der verschiedenen Motoren anhand der Größe SMWF zu quantifizieren, wurden die Läufe einzelner Motormoleküle aufgezeichnet. Das Zeitfenster, innerhalb dessen die Anzahl der initiierten Läufe bestimmt wurde, war durch den ersten bzw. letzten detektierten Lauf festgelegt, um sicherzustellen, dass Kontakt mit dem Mikrotubulus bestand und der Motor funktional war. Um als Lauf gewertet zu werden, musste eine Auslenkung von mindestens 1 pN erreicht werden. Die SMWF eines Motorkonstrukts war dann gegeben durch das Verhältnis der Gesamtzahl an beobachteten Läufen aller analysierter Motormoleküle zum insgesamt beobachteten Zeitfenster

$$\text{SMWF} = \frac{\sum_i N_i}{\sum_i \Delta t_i},$$

wobei N_i die Anzahl der Läufe und Δt_i das analysierte Zeitfenster des i -ten Motors bezeichnet. Die Standardabweichung σ_{SMWF} ist gegeben durch

$$\sigma_{\text{SMWF}} = \frac{\text{SMWF}}{\sum_i N_i}.$$

A.3.3 Lauflänge und Geschwindigkeit einzelner Motoren

Probenpräparation und Durchführung der Messung. Die Probenpräparation erfolgte wie in A.3.2 beschrieben. Das Motor/Kugel-Verhältnis wurde so eingestellt, dass weniger als jede vierte Kugel einen funktionalen Motor gebunden hatte.

Zur Bestimmung der Lauflänge und Geschwindigkeit einzelner Motoren unter konstanten Kräften regelte eine Rückkopplungsschleife die Auslenkung der Kugel auf den gewünschten konstanten Wert [20, 40]. Sobald der Motor die eingestellte Kraft erreicht hatte, kompensierte die Gegenbewegung des Piezotisches das weitere Fortschreiten des Motormoleküls. Bei erhöhten Kräften zeigten die Motoren eine zunehmende Tendenz, sich vom Mikrotubulus abzulösen und konnten hohe Kräfte von 5 pN daher nur selten erlaufen. Die Ausbeute an Läufen konnte in diesem Fall erhöht werden, indem sofort auf die gewünschte Kraft geregelt wurde, sobald ein Lauf einen Schwellwert von 1 pN erreichte. Die Position der Kugel und des Piezotisches wurden mit einer Bandbreite von 5 – 20 kHz aufgezeichnet.

Bestimmung der Lauflängen und Kraft-Geschwindigkeits-Relation. Zur Analyse der Lauflängen und Geschwindigkeiten wurden die Daten in IgorPro geladen. Die Start- und Endzeitpunkte für einen Lauf wurde aus der Position des Piezotisches automatisiert ausgelesen. Eine Rückwärtsbewegungen um mehr als 16 nm wurden als Ablösen des Motormoleküls und damit als Ende eines Laufs interpretiert. Geschwindigkeiten wurden aus der Steigung der Piezoposition in Abschnitten der Dauer von 100 ms bestimmt.

A.3.4 Schrittgrößen und Verweildauern

Probenpräparation und Durchführung der Messung. Die Probenpräparation erfolgte wie in A.3.2 beschrieben, wobei die ATP-Konzentration durch eine entsprechende Vorverdünnung auf Werte zwischen 3 und 6 μM eingestellt wurde.

Die Schritterkennungsfunktion. Um eine möglichst objektive Analyse der Schrittkurven zu ermöglichen, wurde eine automatisierte Schritterkennungsfunktion angewandt. Die Routine basiert auf einem gleitenden t -Test [16].

Für jeden Datenpunkt werden über ein Zeitfenster von 20 ms vor und nach dem Datenpunkt die Mittelwerte $\langle x \rangle$ und die Standardabweichungen σ des Positionssignals ermittelt und daraus der t -Wert gemäß

$$t = \frac{\langle x \rangle_l - \langle x \rangle_r}{\sqrt{\frac{1}{N}(\sigma_l^2 + \sigma_r^2)}} \quad (\text{A.1})$$

berechnet, wobei N die Anzahl der Datenpunkte im betrachteten Zeitfenster ist. Der t -Wert kann als Maß dafür benutzt werden, ob sich zwei Populationen signifikant unterscheiden, in diesem Fall die Positionen zu beiden Seiten eines Datenpunktes. Anhand des Verlaufs des t -Wertes können die Zeitpunkte bestimmt werden, an denen sich ein Schritt ereignet, da sich hier Position drastisch ändert und der t -Wert einen deutlichen Ausschlag zeigt. Durch Mittelung der Position zwischen den gefundenen Zeitpunkten kann die Schrittkurve rekonstruiert werden, wobei keine Schritte mit Schrittgröße kleiner als 4 nm oder einer Dauer von weniger als 5 ms zulässig sind.

Die Zuverlässigkeit der Schritterkennungsfunktion wurde anhand simulierter Schrittkurven überprüft (Abb. A.1). Da sehr kurze Schritte (< 5 ms) von der Routine nicht detektiert werden können, tritt eine Population mit Doppelschritten auf. Schritte mit einer Schrittgröße von > 14 nm wurden als Doppelschritte gewertet und eine Verweildauer der Länge 0 s eingefügt.

Analyse der Schrittgrößen und Verweildauern. Ausgangspunkt war das Summensignal aus Kugelposition und Piezoposition. Dieses summierte Positionssignal wurde zunächst per Mittelwertbildung auf eine Bandbreite von 1 kHz reduziert. Dieses reduzierte Positionssignal wurde mit der im vorhergehenden Absatz beschriebenen Schritterkennungsfunktion analysiert und die identifizierten Schritte nochmals per Auge bestätigt. Für die weitere Analyse wurden nur Kurvenabschnitte ausgewählt, für die die Routine mehr als 10 aufeinanderfolgende Schritte zuverlässig identifizierte. Schrittgrößen und Verweildauern wurden aus der rekonstruierten Schrittkurve bestimmt.

A.3.5 Messungen in der Hantelkonfiguration

Probenpräparation. Eine Flusskammer wurde mit 10 μ l BRB80/BSA befüllt, um die Oberfläche zu passivieren. Die Präparation Motor-beschichteter Kugeln erfolgte im Wesentlichen wie weiter oben beschrieben (A.3.2, Kugeldurchmesser 1 μ m). Für eine effiziente Anbindung der verschiedenen Motorkonstrukte mussten jedoch verschiedene Kugeloberflächen gewählt werden (Tab. A.1). Außer bei der Anbindung an Antikörper-Kugeln erfolgte stets eine Vorinkubation der Kugeln mit BRB80/CC. Bei Bedarf wurden die Motor-beschichteten Kugeln durch Zentrifugation gewaschen, um überschüssigen Motor zu entfernen. Generell konnte für keinen der heterodimeren Kinesin-2 Motoren eine spezifische und damit kontrollierte Anbindung über einen C-terminalen Affinitätstag erreicht werden, da stets unspezifische Interaktionen der Stielregionen mit den Antikörper-Kugeln auftraten. Für KLP11/20 und KRP85/95 wurden verschiedene Anbindungsstrategien getestet. Das beobachtete Spiralisierungsverhalten hing nicht von der Art der Anbindung

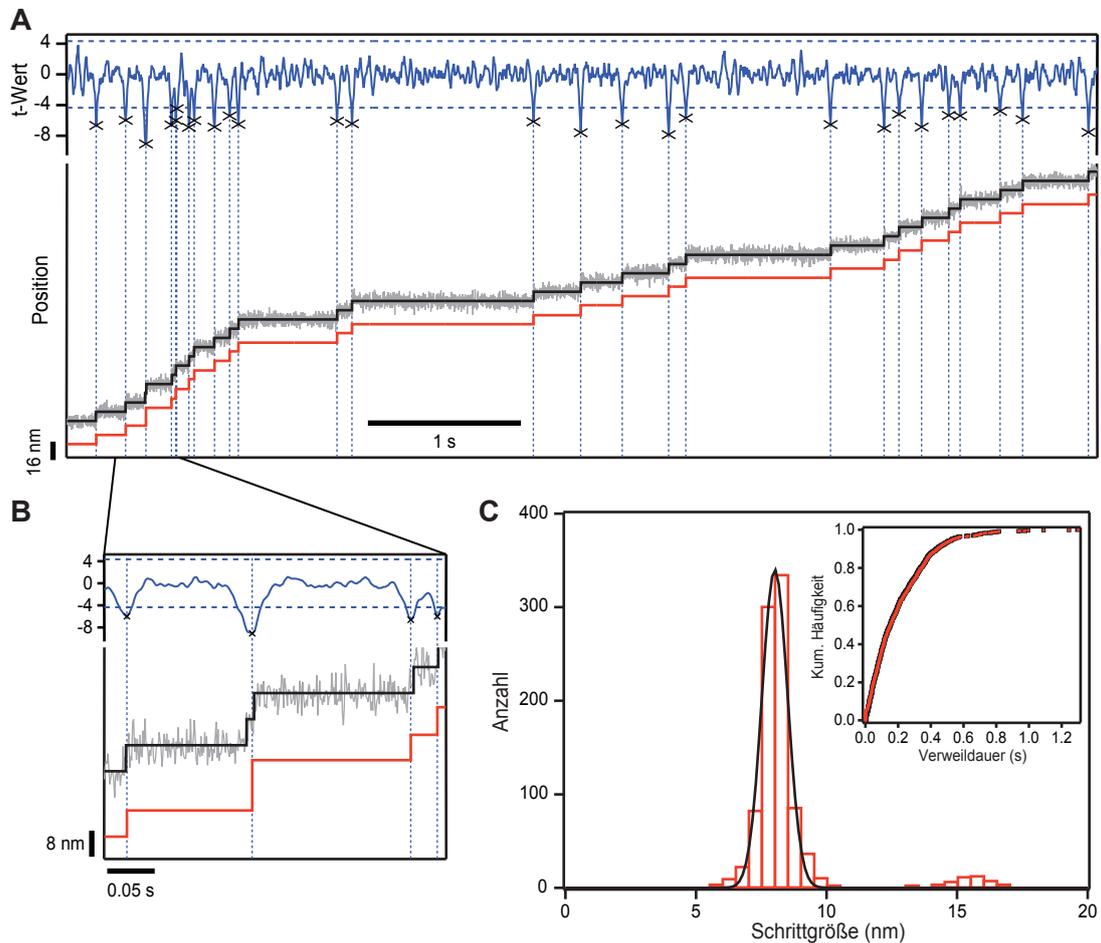


Abbildung A.1 – Die t -Wert basierte Schritterkennungsfunktion. **A** Simulierte Schrittcurve mit einer Schrittweite von 8 nm (schwarz) überlagert mit einem thermischen Rauschen ($\sigma = 3.5$ nm, grau). Die Verweildauern sind exponentiell verteilt mit einer mittleren Verweildauer von 200 ms. Anhand der Minima im t -Wert-Verlauf (blau), die einen gesetzten Schwellwert unterschreiten, können Schritte identifiziert werden. Die rekonstruierte Schrittcurve (rot) ist mit einem vertikalen Versatz gezeigt. **B** Schnelle Schritte können nicht aufgelöst werden. **C** Analyse von 20 simulierten Kurven mit je 50 Schritten (Parameter wie in **A**). Die analysierten Schrittgrößen sind gaußförmig um einen Mittelwert von 8.02 nm verteilt. Nicht detektierte, kurze Schritte führen zu einer Population von Schritten mit doppelter Schrittweite. Die Verteilung der Verweildauern der rekonstruierten Schrittcurve (rot) stimmen gut mit der simulierten Verteilung (schwarz) überein.

ab.

50 μl Motilitätspuffer wurden mit je 1 μl Streptavidin-Kugeln ($\varnothing \approx 3 \mu\text{m}$, Bangs Laboratories Inc., CP01N/8205), fluoreszenzmarkierter Biotin-Mikrotubuli und Motor-beschichteten Kugeln versetzt und in die Probenkammer gespült.

Konstrukt	Kugeln	Anmerkungen
<i>Dm</i> KHC	Polystyrol [*]	
KIF3a/3b	Polystyrol [*]	
XKLP3a/3b	Polystyrol [*]	
KLP11/20	Polystyrol [*]	
KRP85/95	Anti-GFP [†]	GFP-Fusionsprotein
	Polystyrol [*]	keine effiziente Anbindung
	Anti-Flag [‡]	
KIF-KLP-Konstrukte	Anti-His [§]	Trimer mit KAP-His
	Polystyrol [*]	
<i>Hs</i> KHC-Konstrukte	Carboxyl [¶]	

* Polybead[®] Microspheres, Polysciences.

† Biotinylierter GFP-Antikörper auf Streptavidin-funktionalisierten Kugeln.

‡ Flag-Tag-Antikörper (Acris Antibodies, Art.-Nr. GTX80656) auf Protein G-funktionalisierten Kugeln.

§ Biotinylierter His-Tag-Antikörper auf Streptavidin-funktionalisierten Kugeln.

¶ Polybead[®] Carboxylate Microspheres, Polysciences.

Tabelle A.1 – Zusammenfassung der verschiedenen Kugeloberflächen, die zur Anbindung der Motoren verwendet wurden.

Durchführung der Messung und Datenerfassung. Mikrotubuli wurden durch geschicktes Manövrieren der Probenkammer aus der Lösung an zwei Streptavidin-Kugeln befestigt, die in zwei mobilen Laserfoki festgehalten wurden. Durch Anpassen des Kugelabstands konnte der Mikrotubulus gespannt werden. Eine Motor-beschichtete Kugel wurde in einem dritten, mittleren Laserfokus eingefangen und in Kontakt mit dem Mikrotubulus gebracht. Sobald die Motoren mit dem Mikrotubulus interagierten, wurde das mittlere Fallenpotential ausgeschaltet und die Bewegung der Motor-beschichteten Kugel mit einer Bildrate von 0.04s über eine Hellfeldabbildung aufgezeichnet. Auf einem solchen Mikrotubulus konnten meist mehrere Motor-beschichtete Kugeln vermessen werden.

Analyse der Rotationsbewegung. Abbildung A.2 illustriert die Analyse der Spiralisierungsbewegung entlang eines aufgespannten Mikrotubulus. Die auf die Abbildungsebene projizierte Positionsinformation $x(t)$ und $y(t)$ der Kugel wurde mittels einer automatisierten Positionserkennung (OpenBox) analysiert. Anhand des Aussehens der Kugel konnte die Position relativ zur Fokalebene und damit die Händigkeit der Spiralisierung bestimmt werden (Abschnitt 3.4.3).

Die Anpassung einer Geraden an die Bewegung $y(t)$ parallel zur Mikrotubulus-Achse lieferte die lineare Geschwindigkeit v_{lin} (Einheit [m/s]) der Motoren. Die Rotationsgeschwindigkeit v_{rot} (Einheit [Rotationen/s]) wurde anhand der Periodizität von $x(t)$ bestimmt, indem die Extrempunkte manuell ausgelesen wurden. Die mittlere Ganghöhe h_{obs}

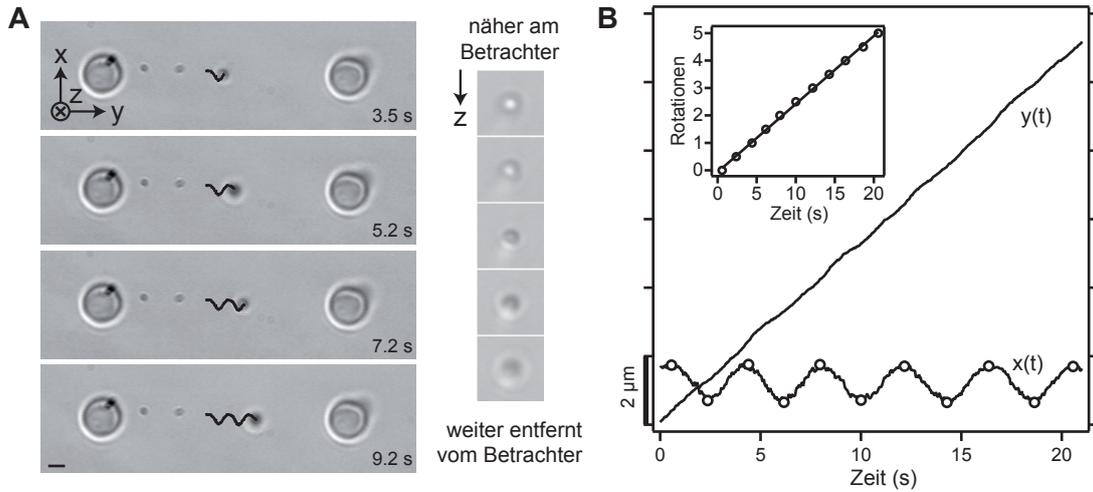


Abbildung A.2 – Analyse der Spiralbewegung. **A** Zur Analyse der Ganghöhe werden $x(t)$ und $y(t)$ ausgelesen (Skalenbalken: $2\ \mu\text{m}$), die Händigkeit der Spiralisierung wird anhand des Aussehens der Kugel qualitativ bestimmt. **B** Die lineare Geschwindigkeit v_{lin} wurde aus der Steigung von $y(t)$ bestimmt. Die Zeitpunkte, zu denen $x(t)$ ein Minimum oder Maximum durchläuft, wurde manuell bestimmt (Kreise). Die Anzahl der durchlaufenen Rotationen wurde gegen die Zeit aufgetragen, aus der Steigung ergibt sich die Rotationsgeschwindigkeit v_{rot} (Inset). Die gezeigten Daten stammen aus einer Messung mit XKLP3a/3b.

der Spiralisierung wurde berechnet nach

$$h_{\text{obs}} = \frac{v_{\text{lin}}}{v_{\text{rot}}}. \quad (\text{A.2})$$

B Sequenzvergleiche heterodimerer Kinesin-2 Motoren

	KLP20	KIF3a	XKLP3a	KRP85	Partner
KLP20	100	52 (75)	52 (76)	50 (74)	34 (60)
KIF3a	52 (75)	100	92 (98)	71 (89)	45 (71)
XKLP3a	52 (76)	92 (98)	100	70 (88)	44 (69)
KRP85	50 (74)	71 (89)	70 (88)	100	46 (72)

Tabelle B.1 – %-Identität (+Ähnlichkeit) für die homologen Untereinheiten heterodimerer Kinesin-2 Motoren. Vergleich mit korrespondierender Partner-Untereinheit in Heterodimer.

	KLP11	KIF3b	XKLP3b	KRP95	Partner
KLP11	100	45 (69)	46 (70)	45 (70)	34 (60)
KIF3b	45 (69)	100	85 (95)	67 (89)	45 (71)
XKLP3b	46 (70)	85 (95)	100	66 (89)	44 (69)
KRP95	45 (70)	67 (89)	66 (89)	100	46 (72)

Tabelle B.2 – %-Identität (+Ähnlichkeit) für die homologen Untereinheiten heterodimerer Kinesin-2 Motoren. Vergleich mit korrespondierender Partner-Untereinheit in Heterodimer.

B Sequenzvergleiche heterodimerer Kinesin-2 Motoren

KLP20	-----MEGAEKVVVRCRP ISTTEKLOGHKIAVTCNDEEKAVNIKSL--QEDPPRTFFYFDAVFS	60
KIF3A	MPINKSEKPECDNVKVVVRCRPLNEREKSMCYRQAVSVDEMRTITVHKTDS--SNEPPKTFTFDVTVFG	69
XKLP3A	MPINRADKPECDNVKVVVRCRPLNERERAMSSKMAVGVEIRGTISVHKVDS--MNEPPKTFTFDVTVFG	69
KRP85	----MPGSSGNDNVRVVVRCRPLNSKETGQGFKSVVVKMDEMRTVQVTPNAPSGEPPKSFTFDTVFAP	66
KLP11	--MVEIMKSSKQETVKVIVRCRPLSSQEIANNYSKIVHMRPQRQIQLKPNK--EQDEPSKDFTFDAIYDE	68
KIF3B	-----MSKLSSESVRVVVRCRPMNGKEKAASYDKVVDADVKLQVSVKNPKGTSHEMPKTFTFDAVYDW	65
XKLP3B	-----MSKLSSESVRVVVRCRPMNSKELAAGYERVVDVVKLQVSVKVKHGATNELSKTFTFDAIYDS	65
KRP95	-----MSK--KSAETKVVVRCRPMNSKEISQGHKRIVEMDNKRGLVEVTNPKGPPGEPNKSFTFDTVYDW	64
KLP20	NTDQMTVYVVAARPIVENVLKGYNGTIFAYGQTGTGKTFMAGDLEPVEMRGIIPNSFAHIFDHIACQH	130
KIF3A	ESKQLDVYNLTARPIIDSVLEGYNGTIFAYGQTGTGKTFMAGDLEPVEMRGIIPNSFAHIFDHIACQH	139
XKLP3A	DSNQLDVYNLTARPIIDSVLEGYNGTIFAYGQTGTGKTFMAGDLEPVEMRGIIPNSFAHIFDHIACQH	139
KRP85	GAKQTDVYNQVARTARPIVDALIEGYNGTIFAYGQTGTGKTFMAGDLEPVEMRGIIPNSFAHIFDHIACQH	136
KLP11	NSTQSDLYEETFRDLVDSVNLGNYNATIFAYGQTGTGKTFMAGDLEPVEMRGIIPNSFAHIFDHIACQH	137
KIF3B	NAKQFELYDETFRPLVDSVNLGNYNATIFAYGQTGTGKTFMAGDLEPVEMRGIIPNSFAHIFDHIACQH	134
XKLP3B	NSKQVELYDETFRPLVDSVNLGNYNATIFAYGQTGTGKTFMAGDLEPVEMRGIIPNSFAHIFDHIACQH	134
KRP95	NSKQIDLYDETFRSLVESVNLGNYNATIFAYGQTGTGKTFMAGDLEPVEMRGIIPNSFAHIFDHIACQH	133
KLP20	DTFFLVRVSYLEIYNNEIRDLLSKDHNGNLEIKERPVDGVYVVRNLSNPTVENASKMQLMEFGSKNRKVG	200
KIF3A	DTRFLVRVSYLEIYNNEVRDLLGKDQTRLEVKERPVDGVYIKDLSAYVVNNADDMDRIMTLGHKNRSVG	209
XKLP3A	DTRFLVRVSYLEIYNNEVRDLLGKDQNRLEVKERPVDGVYIKDLSGYVVNNADDMDRIMTLGHKNRSVG	209
KRP85	NVRFLVRVSYLEIYNNEVRDLLGKDQQRLEVKERPVDGVYIKDLSAFVVNNADDMDRIMTLGHKNRSVG	206
KLP11	NQEYLVRASYLEIYQEEIRDLLAEASNKLEIKERPDDGGVYVVDLTSKLTTRTVGEIHEVMIRGNHRSVG	207
KIF3B	NQQYLVRASYLEIYQEEIRDLLSKDQTKRLEKLEKRPDGTGVYVVDLSSVFTKSVKEIEHVMNVGNQNRVG	204
XKLP3B	NQQYLVRASYLEIYQEEIRDLLSKDQSKRLEKLEKRPDGTGVYVVDLSSVFTKSVKEIEHVMNVGNQNRVG	204
KRP95	NQQFLVRASYLEIYQEEIRDLLAKDQRKRLDLKERPDGTGVYVVDLSSVFTKSVKEIEHVMNVGNQNRVG	203
KLP20	ATAMNLESSSRSHAMFTVTIESCRNGL-----VTQGLQLVLDLAGSERQSKTGAQGERLKEAAKINLSLST	265
KIF3A	ATMNEHSSSRSHAIPTITIECSEKGVGDGNMHVRMGKHLVLDLAGSERQAKTGATGQRLKEATKINLSLST	279
XKLP3A	ATMNEHSSSRSHAIPTITIECSEKGDGNIHVRMGKHLVLDLAGSERQAKTGATGQRLKEATKINLSLST	279
KRP85	ATMNEHSSSRSHAIPTITILERSDMGLDKEQHVVRVGLHMDLAGSERQTKTGATGQRLKEATKINLSLST	276
KLP11	RTMNEHSSSRSHAIPTITVECSRIGEDGESHITVGRNLNLDLAGSERQSKTGATGERFKEATKINLSLSA	277
KIF3B	ATMNEHSSSRSHAIPTITIECSEVGLDGENHVRGKLNLDLAGSERQAKTGATGQGERLKEATKINLSLSA	274
XKLP3B	ATMNEHSSSRSHAIPTITIECSQIGLDGENHVRGKLNLDLAGSERQTKTGATGQGERLKEATKINLSLSA	274
KRP95	STMNEHSSSRSHAIPTITIECSELVDGENHVRGKLNLDLAGSERQAKTGATGDRLEKATKINLSLSA	273
KLP20	LGNVISLVDGKSTHIPPYRNSKLTTRLLQDSLGGNSKTMVIANVGPATYNYDETISTLRYANRAKNIQNV	335
KIF3A	LGNVISALVDGKSTHIPPYRNSKLTTRLLQDSLGGNSKTMVCANIGPADYNYDETISTLRYANRAKNIKKA	349
XKLP3A	LGNVISALVDGKSTHIPPYRNSKLTTRLLQDSLGGNSKTMVCANIGPADYNYDETISTLRYANRAKNIKKA	349
KRP85	LGNVISLVDGKSTHIPPYRNSKLTTRLLQDSLGGNAKTMVCANIGPAEYNYDETISTLRYANRAKNIKKA	346
KLP11	LGNVISALVDAKSAHIPPYRNSKLTTRLLQDSLGGNSKTMVACIIPASYNFEETLTLRYANRAKNIKQP	347
KIF3B	LGNVISALVDGKSTHIPPYRNSKLTTRLLQDSLGGNAKTMVAVANVGPASYNVEETLTLRYANRAKNIKKNP	344
XKLP3B	LGNVISALVDGRSTHIPPYRNSKLTTRLLQDSLGGNAKTMVANIGPASYNVEETLTLRYANRAKNIKKNP	344
KRP95	LGNVISALVDGKSSHIPPYRNSKLTTRLLQDSLGGNAKTMVANMGPASYNFDETTTLRYANRAKNIKKNP	343
KLP20	KINEDPKDAQ	345
KIF3A	RINEDPKDAL	359
XKLP3A	RINEDPKDAL	359
KRP85	KINEDPKDAL	356
KLP11	KINEDPKDAL	357
KIF3B	RVNEDPKDAL	354
XKLP3B	RVNEDPKDAL	354
KRP95	KINEDPKDAL	353

Abbildung B.1 – Sequenzabgleich der Motordomänen und Necklinker der heterodimeren Kinesin-2 Motoren

KLP20	KNIQNVAKINEDPKDAQLRKFQLEIEALKRILDE-----ENPGDDENQEEAWEA-----	377
KIF3A	KNIKNKARINEDPKDALLRFQKEIEELKKKLEE--GEEVSGSDISGSEEDDEE--GELGEDGKKKKRRDQ	410
XKLP3A	KNIKNKARINEDPKDALLRFQKEIEDLKKKLEE--GEDVSGSDSGETDDDEDEGEIAGEDGKKKKRR--	409
KRP85	KNIKNKAKINEDPKDALLRFQKEIEELKKQISESGEGLDDDEESGSEESGDE--EAGEGGVKKK--RKGK	406
KLP11	KNIKNQPKINEDPKDALLRFQEEIEMLRQL-----KQRKTRSRDGAT-----	384
KIF3B	KNIKNKPRVNEPKDALLRFQEEIARLKAQLEKRS----IGRRKRREKRREGGGSGGGEEEEEEEGEG	403
XKLP3B	KNIKNKPRVNEPKDALLRFQEEIARLKAQLEKRV----GVKRRRRRGRRTAGGEVDEDEDEEGDLYEG	403
KRP95	KNIKNKPKINEDPKDALLRFQEEISRKLQALDKKG----PSDGRKKGKRRKPGEGGDDDIETETEEG	402
KLP20	-----KMQEREVEMEKRRKILERVNSAVNDEETHRLVKEMMENEAELEKARSEHEKLRSKLEKIE	438
KIF3A	AGKKKVSPPDKMVMQAKIDEERKALETKLD--MEEERNKARAELEERREKDLLKAQOEHSLEKLSALE	478
XKLP3A	-GKKKGSPPDKMVMQARIDEERKVLKALG--MEEERNKARAELEERREKDLFKAQOEHSLEKLSALE	476
KRP85	NPKRKLSPEIMAAQKKIDEKKKALEEKKD--MVEEDRNTVHRELQRRESELHKAQDDQKILNEKLNAIQ	474
KLP11	-----QSFYDAERAKLEDDIEAIQKDDSD--LIKHEKDRLEIREIQEKHDLLEKERIEQARVAERIANIQ	445
KIF3B	EEDGDDKDDYWRQEQKLEIEKRAIVEDHS--LVAAEKMRLLKEKEKKMEDLRREKDAEMLGAKIKAME	471
XKLP3B	DDVLKDKEDYWRQEQERLEIEKKAILEDHS--LVAAEKMLLKEKEKKMDDLKREAMEMLNSKVKAME	471
KRP95	DEM--DEEEMYKESQQLLEEEKEKIMANQS--MIAEEKQKLLSEVQKRQGEIKKEHQKEMLEGGKIKAME	468
KLP20	KLKLVGGEN---LLEKVVEQAKLLEVNKLEQSKFQEAHLRTQLEERTAVKVEIEERYSSIQEEAFVKS	505
KIF3A	KKVIVGGVD---LLAKAEQEKLLDESNFLEERRRAEQLRKELEKEQEERLDIEEKYTSIQEEAQQGT	545
XKLP3A	KKVIVGGVD---LLAKAEQEKLLDESNFLEERRRAEQLRKELEKEQEERLDIEEKYTSIQEEAQQGT	543
KRP85	KKLIVGGVD---LLAKSEEQQLLEQSALEMKERMMAQESMRKMMEEEREQERMDIEEKYSSIQEAAHGKT	541
KLP11	SRLIVGSEEDGRLESRTKEQHAQLEKRRRELAEQRREREMVEALERQEDTVDLQKQFSDLRTEVEAKT	515
KIF3B	SKLLVGGKN---IVDHTNEQQKILEQKRQIEAQKRREIREIQQOMESRDEETLELKETYSIQEEVDIKT	538
XKLP3B	SKLLVGGKN---IVDHTNEQQKILEQKRHEIAEQKCREREMQQOMESQDEENLELKETYSIQEEVDIKT	538
KRP95	SKLLVGGKS---IVDHTNEQQRKIEEQRLLEAEKNRERDMERKLKEQDDKTVEIEGTFSSIQEEVEVKT	535
KLP20	KKIKKVSNELKDARAELKDLLEEDHQVQVEAMLLDIRQLRKLKLLNIAIIDEYIPVEHVELIEKYVSWSE	575
KIF3A	KKLKKVWTMLMAAKSEMADLQOEHQREIEGLLENIQRLSRELRLQMLIIDNFIPQDYQEMINIYVHWNE	615
XKLP3A	KKLKKVWTMLMAAKSEMADLQOEHQREIEGLLENIQRLSRELRLQMLIIDSFIPQDYQEMINIYVHWNE	613
KRP85	KKLKKVWTMLMAAKSEVADMQAEHQREMEALLENVRELSRELRLSMLIIDSFIPQDYQEMIQYVHWNE	611
KLP11	KKLKKMLIKLRQARNEIRDVSGAYSDEERQDLDTIAEVSKELKLLIENFIPRDVSEIRKERAEWNE	585
KIF3B	KKLKKLFSKLQAVKAEIHDLQEEHIERQEQLEQONELTRELKHLIENFIPLEEKNKIMNRSFFDEE	608
XKLP3B	KKLKKLFSKLQAVKAEIHDLQEEHIERQEQLEQONELTRELKHLIENFIPLEEKNMNRCFFDEE	608
KRP95	KKLKKLFAKLQSYKSDIQDLQDEHARERQEQLEQONELIRELKLKVIADNFIPVEERTKITTRAVFDEE	605
KLP20	HGDWQLKAIAYTGN--NMRASAPPAKKEFSNNQTVPM---YYSY-----RAD-----LGA	621
KIF3A	IGEWQLKCVAYTGN--NMRKQTPVPDKKERDPF--EVDLSHVYLAY-----TEES----LRQS	665
XKLP3A	IGEWQLKCVAYTGN--NMRKQTPVPDKKEGPF--EVDLSHVYLAY-----TEES----LRQS	663
KRP85	IGEWQLKCVAYTGN--NMRKQTPVADKDKSLAYEADLSNVFLTY-----NLEGGMKYKPS	666
KLP11	SFEWNVNAPQSTSSNSSTPLNNTIEVNEGVFTSRSSGDSGVSVSGNGTTPATSOFLDKRLVATPGCRP	655
KIF3B	EDHWLHPITRLEN--QQMMKRPVSAVGYKRPQSHARMSMIRP-----EPRYRAENIMLLE	664
XKLP3B	EDQWLHAI SRLDN--QQMRRPVSAGYNRPLQSHAKMSMVRP-----DSRYRAENIVLLE	664
KRP95	TEEWLLTPLAKAEGPSQMAKRPVSAVGNRRPIADYARMAAQMG-----NPRYKAENILSVD	662
KLP20	STAEHRPRTSSKKHRASIRLQQLT-----	646
KIF3A	LMKLERPRTSKGKARPKMGRKRSAKPEVIDSLLO-----	701
XKLP3A	LMKLERPRTSKGKTRPKTGRKRSAKPEAVINSLLO-----	699
KRP85	QGKSGRPKTSSG--RPKTGKKQASMASS--IDALLO-----	699
KLP11	MSMCERMLVETAREQFQAQRPPISGSGSFVEATIPETIRFCGENVVVFSALERFVPEVTDSDPSTFSN	725
KIF3B	LDMPSR-----TTRDYEGPAISPQVQAA---LDAALQDEDEIQVDASSFESTASRK-----PKARPKSGRK	722
XKLP3B	LDMPSR-----TTRDYEGPAIAPKVQAA---LEAALQDEDDIQVDASTFDSTATKR-----TTRPKSSRQ	722
KRP95	LDMPNR-----TTRDYEGPSVAPRVQAA---LDAALQDEDDLLEVQPEVFKAKTK-----LKKDKVRSKH	720
KLP20	-----	646
KIF3A	-----	701
XKLP3A	-----	699
KRP85	-----	699
KLP11	SMMSARRPSIENLTIDASKVLVPIILNQSTMILKNSKNGQARNDTTPPNGSMRRSQN	782
KIF3B	SGSSSSSGNPASQFYPSQSLVPK-----	747
XKLP3B	PGANGSSAG---SLLFPQSRGLVPK-----	744
KRP95	KAVAKPGSN---SQLYPAQAGLIQK-----	742

Abbildung B.2 – Sequenzabgleich der Stielregionen inklusive Necklinker (blau) der heterodimeren Kinesin-2 Motoren. Die konservierte Region, in der die (mutmaßlich) deregulierenden Mutationen eingeführt wurden, ist grün hinterlegt.

C Ergänzende Daten zu den Messungen in der Hantelgeometrie

Die nachfolgenden Tabellen fassen die beobachteten Kugelbewegungen für die verschiedenen Motorkonstrukte aus Kapitel 6 zusammen. Dabei bezeichnen N_{MT} bzw. N_{K} die Anzahl der Mikrotubuli bzw. Kugeln, auf denen/für die ein entsprechendes Verhalten beobachtet wurde. Die Geschwindigkeit entlang des Filaments und Ganghöhen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

C.1 Spiralisierungsverhalten der heterodimeren Kinesin-2 Motoren

	N_{MT}	N_{K}	
geradlinige Bewegung [†]	1 (2)	3	
schwache Spiralisierung [‡]	4 (7)	16	
linksgängige Spiralisierung	5	14	$h_{\text{obs}} = (6.9 \pm 1.7) \mu\text{m}$
rechtsgängige Spiralisierung	1	2	$h_{\text{obs}} = -3 \mu\text{m}$
lineare Geschwindigkeit	11	35	$v = (0.73 \pm 0.13) \mu\text{m/s}$

[†] bei einer zurückgelegten Strecke von 9–12 μm . Für einen Mikrotubulus zeigten andere Kugeln eine linksgängige Spiralisierung.

[‡] Für 4 Mikrotubuli konnte überhaupt keine Ganghöhe ermittelt werden, auf 3 Mikrotubuli zeigten andere Kugeln eine linksgängige Spiralisierung (auf einem davon wurden zudem auch zwei gerade Läufe beobachtet). Die Kugeln legten im Mittel eine Strecken von $(8.2 \pm 3.9) \mu\text{m}$ zurück.

Tabelle C.1 – Zusammenfassung des Spiralisierungsverhaltens KIF3a/3b-beschichteter Kugeln.

	N_{MT}	N_{K}	
geradlinige Bewegung	0	0	
schwache Spiralisierung [‡]	1 (4)	5	
linksgängige Spiralisierung	12	30	$h_{\text{obs}} = (2.6 \pm 0.9) \mu\text{m}$
rechtsgängige Spiralisierung	0	0	
lineare Geschwindigkeit	13	35	$v = (0.58 \pm 0.06) \mu\text{m/s}$

[‡] Für 1 Mikrotubulus konnte keine Ganghöhe ermittelt werden, auf 3 Mikrotubuli zeigten andere Kugeln eine linksgängige Spiralisierung. Die Kugeln legten im Mittel eine Strecken von $(5.1 \pm 3.4) \mu\text{m}$ zurück.

Tabelle C.2 – Zusammenfassung des Spiralisierungsverhaltens XKLP3a/3b-beschichteter Kugeln.

	N_{MT}	N_K	
geradlinige Bewegung	0	0	
schwache Spiralisierung	0	0	
linksgängige Spiralisierung	14	28	$h_{\text{obs}} = (1.45 \pm 0.34) \mu\text{m}$
rechtsgängige Spiralisierung	0	0	
lineare Geschwindigkeit	14	28	$v = (0.56 \pm 0.09) \mu\text{m/s}$

Tabelle C.3 – Zusammenfassung des Spiralisierungsverhaltens KLP11/20-beschichteter Kugeln.

	N_{MT}	N_K	
geradlinige Bewegung	0	0	
schwache Spiralisierung	0	0	
linksgängige Spiralisierung	16	38	$h_{\text{obs}} = (0.68 \pm 0.29) \mu\text{m}$
rechtsgängige Spiralisierung	0	0	
lineare Geschwindigkeit	16	38	$v = (0.63 \pm 0.14) \mu\text{m/s}$

Tabelle C.4 – Zusammenfassung des Spiralisierungsverhaltens KRP85/95-beschichteter Kugeln.

C.2 Spiralisierungsverhalten der chimären KLP11/KLP20-Konstrukte

	N_{MT}	N_K	
geradlinige Bewegung	0	0	
schwache Spiralisierung ‡	0	0	
linksgängige Spiralisierung	3	11	$h_{\text{obs}} = (1.65 \pm 0.28) \mu\text{m}$
rechtsgängige Spiralisierung	0	0	
lineare Geschwindigkeit	3	11	$v = (0.40 \pm 0.05) \mu\text{m/s}$

Tabelle C.5 – Zusammenfassung des Spiralisierungsverhaltens KLP11/11-beschichteter Kugeln. Siehe auch Abb. C.1 A

	N_{MT}	N_K	
geradlinige Bewegung	0	0	
schwache Spiralisierung	0	0	
linksgängige Spiralisierung	2	12	$h_{\text{obs}} = (1.58 \pm 0.44) \mu\text{m}$
rechtsgängige Spiralisierung	0	0	
lineare Geschwindigkeit	2	12	$v = (0.58 \pm 0.05) \mu\text{m/s}$

Tabelle C.6 – Zusammenfassung des Spiralisierungsverhaltens KLP20/20(wt)-beschichteter Kugeln. Siehe auch Abb. C.1 A

	N_{MT}	N_K	
geradlinige Bewegung	0	0	
schwache Spiralisierung ‡	(1)	1	
linksgängige Spiralisierung	2	1	$h_{\text{obs}} = (1.46 \pm 0.16) \mu\text{m}$
rechtsgängige Spiralisierung	0	0	
lineare Geschwindigkeit	2	11	$v = (0.66 \pm 0.07) \mu\text{m/s}$

‡ Auf 1 Mikrotubulus zeigten andere Kugeln eine linksgängige Spiralisierung, nur für eine Kugel war die zurückgelegte Strecke ($2.6 \mu\text{m}$) zu kurz, um eine Ganghöhe zu bestimmen.

Tabelle C.7 – Zusammenfassung des Spiralisierungsverhaltens KLP20/11^{SW}-beschichteter Kugeln. Siehe auch Abb. C.1 A

C.3 Spiralisierungsverhalten der KIF-KLP Chimären

	N_{MT}	N_K	
geradlinige Bewegung	0	0	
schwache Spiralisierung	0	0	
linksgängige Spiralisierung	8	22	$h_{\text{obs}} = (1.4 \pm 0.4) \mu\text{m}$
rechtsgängige Spiralisierung	0	0	
lineare Geschwindigkeit	8	22	$v = (0.53 \pm 0.04) \mu\text{m/s}$

Tabelle C.8 – Zusammenfassung des Spiralisierungsverhaltens KIF-KLP(nl+stiel)-beschichteter Kugeln. Siehe auch Abb. C.1 B

	N_{MT}	N_K	
geradlinige Bewegung	0	0	
schwache Spiralisierung ‡	2 (9)	18	
linksgängige Spiralisierung	9	27	$h_{\text{obs}} = (4.8 \pm 1.5) \mu\text{m}$
rechtsgängige Spiralisierung	0	0	
lineare Geschwindigkeit	11	45	$v = (0.69 \pm 0.07) \mu\text{m/s}$

‡ Für 2 Mikrotubuli konnte überhaupt keine Ganghöhe ermittelt werden, auf 7 Mikrotubuli zeigten andere Kugeln eine linksgängige Spiralisierung. Die Kugeln legten im Mittel eine Strecken von $(10.1 \pm 3.3) \mu\text{m}$ zurück.

Tabelle C.9 – Zusammenfassung des Spiralisierungsverhaltens KIF-KLP(nl)-beschichteter Kugeln. Siehe auch Abb. C.1 B

	N_{MT}	N_K	
geradlinige Bewegung	0	0	
schwache Spiralisierung	0	0	
linksgängige Spiralisierung	6	22	$h_{\text{obs}} = (1.38 \pm 0.36) \mu\text{m}$
rechtsgängige Spiralisierung	0	0	
lineare Geschwindigkeit	6	22	$v = (0.63 \pm 0.07) \mu\text{m/s}$

Tabelle C.10 – Zusammenfassung des Spiralisierungsverhaltens KIF-KLP(stiel)-beschichteter Kugeln. Siehe auch Abb. C.1 B

C.4 Spiralisierungsverhalten der HsKHC-Konstrukte

	N_{MT}	N_K	
geradlinige Bewegung [†]	2	3	
schwache Spiralisierung [‡]	4 (13)	33	
linksgängige Spiralisierung	8	18	$h_{\text{obs}} = (5.3 \pm 0.8) \mu\text{m}$
rechtsgängige Spiralisierung	0	0	
lineare Geschwindigkeit	14	54	$v = (0.62 \pm 0.12) \mu\text{m/s}$

[†] bei einer zurückgelegten Strecke von 10 – 12 μm .

[‡] Für 4 Mikrotubuli konnte überhaupt keine Ganghöhe ermittelt werden, auf 7 Mikrotubuli zeigten andere Kugeln eine linksgängige Spiralisierung, auf 2 Mikrotubuli zeigten andere Kugeln eine geradlinige Bewegung. Die Kugeln legten im Mittel eine Strecken von $(8.0 \pm 3.5) \mu\text{m}$ zurück.

Tabelle C.11 – Zusammenfassung des Spiralisierungsverhaltens HsKHC-beschichteter Kugeln. Siehe auch Abb. C.1 C

	N_{MT}	N_K	
geradlinige Bewegung	0	0	
schwache Spiralisierung	0	0	
linksgängige Spiralisierung	9	28	$h_{\text{obs}} = (0.71 \pm 0.33) \mu\text{m}$
rechtsgängige Spiralisierung	0	0	
lineare Geschwindigkeit	9	28	$v = (0.19 \pm 0.06) \mu\text{m/s}$

Tabelle C.12 – Zusammenfassung des Spiralisierungsverhaltens hCys-14GS-beschichteter Kugeln. Siehe auch Abb. C.1 C

	N_{MT}	N_K	
geradlinige Bewegung [†]	2	5	
schwache Spiralisierung [‡]	3 (6)	14	
linksgängige Spiralisierung	6	14	$h_{\text{obs}} = (3.5 \pm 1.2) \mu\text{m}$
rechtsgängige Spiralisierung [§]	(2)	5	$h_{\text{obs}} = (-4.9 \pm 0.5) \mu\text{m}$
lineare Geschwindigkeit	14 [¶]	38	$v = (0.54 \pm 0.10) \mu\text{m/s}$

[†] bei einer zurückgelegten Strecke von 6 – 12 μm . Für einen Mikrotubulus zeigten andere Kugeln eine linksgängige Spiralisierung, für einen weiteren zeigten andere Kugeln eine rechtsgängige Spiralisierung.

[‡] Für 3 Mikrotubuli konnte überhaupt keine Ganghöhe ermittelt werden, auf einem Mikrotubuli zeigte eine andere Kugeln eine geradlinige Bewegung, auf 2 Mikrotubuli zeigten andere Kugeln eine linksgängige Spiralisierung. Die Kugeln legten im Mittel eine Strecken von $(7.9 \pm 3.9) \mu\text{m}$ zurück.

[§] Beide Mikrotubuli nicht eindeutig klassifizierbar.

[¶] Für 3 Mikrotubuli konnte keine Einteilung erfolgen, da die Kugeln eine große Bandbreite in ihrem Verhalten zeigten.

Tabelle C.13 – Zusammenfassung des Spiralisierungsverhaltens hCys-14GS-X-beschichteter Kugeln. Siehe auch Abb. C.1 C

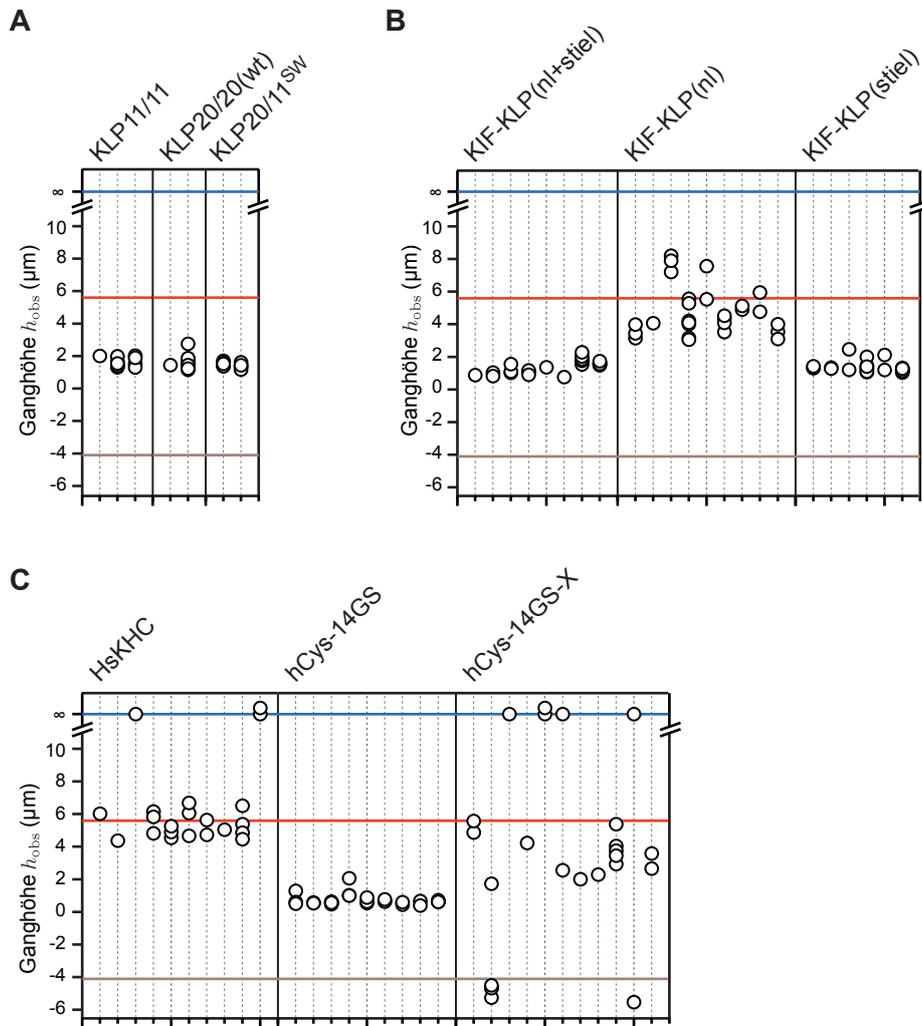


Abbildung C.1 – Ganghöhen einzelner Kugeln (Kreise) auf verschiedenen Mikrotubuli (senkrechte Linien) für chimäre Motorkonstrukte und HsKHC-basierte Konstrukte. Die Supertwist-Ganghöhen für 12 (braun), 13 (blau) und 14 (rot) Protofilament-Mikrotubuli sind angedeutet. **A** KLP11/KLP20-basierte Chimären. **B** KIF-KLP-Chimären. **C** HsKHC-basierte Motorkonstrukte.

Literaturverzeichnis

- [1] ALI, M. Y., K. HOMMA, A. H. IWANE, K. ADACHI, H. ITOH, K. KINOSITA, T. YANAGIDA, und M. IKEBE: *Unconstrained steps of myosin-VI appear longest among known molecular motors*. Biophys J, 86(6):3804–10, Jun 2004.
- [2] ALI, M. Y., S. UEMURA, K. ADACHI, H. ITOH, K. KINOSITA, und S. ISHIWATA: *Myosin-V is a left-handed spiral motor on the right-handed actin helix*. Nat Struct Biol, 9(6):464–7, Jun 2002.
- [3] AMOS, L. A.: *The microtubule lattice – 20 years on*. Trends Cell Biol, 5(2):48–51, Feb 1995.
- [4] AMOS, L. A. und A. KLUG: *Arrangement of subunits in flagellar microtubules*. J Cell Sci, 14(3):523–49, Mai 1974.
- [5] ASBURY, C. L., A. N. FEHR, und S. M. BLOCK: *Kinesin moves by an asymmetric hand-over-hand mechanism*. Science, 302(5653):2130–4, Dez 2003.
- [6] ASHKIN, A.: *Acceleration and trapping of particles by radiation pressure*. Phys Rev Lett, 24(4):156–159, Jan 1970.
- [7] ASHKIN, A.: *Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime*. Biophys J, 61(2):569–82, Feb 1992.
- [8] ASHKIN, A., J. DZIEDZIC, J. BJORKHOLM, und S. CHU: *Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*. Optics Letters, 11(5):288–290, Jan 1986.
- [9] BISGROVE, B. W. und H. J. YOST: *The roles of cilia in developmental disorders and disease*. Development, 133(21):4131–43, Nov 2006.
- [10] BLOCK, S. M., L. S. GOLDSTEIN, und B. J. SCHNAPP: *Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers*. Nature, 348(6299):348–52, Nov 1990.
- [11] BRADY, S. T.: *A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor*. Nature, 317(6032):73–5, Jan 1985.
- [12] BRONSTEIN, I. N. und K. A. SEMENDJAJEW: *Taschenbuch der Mathematik*. Verlag Harri Deutsch, Thun und Frankfurt am Main, 2000.
- [13] BRUNNBAUER, M., R. DOMBI, T. H. HO, M. SCHLIWA, M. RIEF, und Z. ÖKTEN. Manuskript in Vorbereitung.

- [14] BRUNNBAUER, M., F. MUELLER-PLANITZ, S. KÖSEM, T. H. HO, R. DOMBI, J. C. M. GEBHARDT, M. RIEF, und Z. ÖKTEN: *Regulation of a heterodimeric kinesin-2 through an unprocessive motor domain that is turned processive by its partner*. PNAS, 107(23):10460–5, Jun 2010.
- [15] BUSTAMANTE, C., J. F. MARKO, E. D. SIGGIA, und S. SMITH: *Entropic elasticity of lambda-phage DNA*. Science, 265(5178):1599–600, Sep 1994.
- [16] CARTER, N. J. und R. A. CROSS: *Mechanics of the kinesin step*. Nature, 435(7040):308–12, Mai 2005.
- [17] CHANA, M. S., B. P. TRIPET, C. T. MANT, und R. HODGES: *Stability and specificity of heterodimer formation for the coiled-coil neck regions of the motor proteins Kif3A and Kif3B: the role of unstructured oppositely charged regions*. J Pept Res, 65(2):209–20, Feb 2005.
- [18] CHRÉTIEN, D., F. METOZ, F. VERDE, E. KARSENTI, und R. H. WADE: *Lattice defects in microtubules: protofilament numbers vary within individual microtubules*. J Cell Biol, 117(5):1031–40, Jun 1992.
- [19] CHRÉTIEN, D. und R. H. WADE: *New data on the microtubule surface lattice*. Biol Cell, 71(1-2):161–74, Jan 1991.
- [20] CLEMEN, A. E.-M., M. VILFAN, J. JAUD, J. ZHANG, M. BÄRMANN, und M. RIEF: *Force-dependent stepping kinetics of myosin-V*. Biophys J, 88(6):4402–10, Jun 2005.
- [21] COLE, D. G.: *Kinesin-II, the heteromeric kinesin*. Cell Mol Life Sci, 56(3-4):217–26, Okt 1999.
- [22] COY, D. L., 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, Sep 1999.
- [23] DE MARCO, V., P. BURKHARD, N. L. BOT, I. VERNOS, und A. HOENGER: *Analysis of heterodimer formation by Xklp3A/B, a newly cloned kinesin-II from Xenopus laevis*. EMBO J, 20(13):3370–9, Jul 2001.
- [24] DIETZ, H. und M. RIEF: *Protein structure by mechanical triangulation*. PNAS, 103(5):1244–7, Jan 2006.
- [25] ESPEUT, J., A. GAUSSEN, P. BIELING, V. MORIN, S. PRIETO, D. FESQUET, T. SURREY, und A. ABRIEU: *Phosphorylation relieves autoinhibition of the kinetochore motor Cenp-E*. Mol Cell, 29(5):637–43, März 2008.
- [26] FEHR, A. N., B. GUTIERREZ-MEDINA, C. L. ASBURY, und S. M. BLOCK: *On the origin of kinesin limping*. Biophys J, 97(6):1663–70, Sep 2009.
- [27] FINER, J. T., R. M. SIMMONS, und J. A. SPUDICH: *Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps*. Nature, 368(6467):113–9, März 1994.

-
- [28] GEBHARDT, C.: *Energielandschaften einzelner Proteine gemessen mit der optischen Pinzette*. Dissertation, TU München, 2009.
- [29] GOETZ, S. C. und K. V. ANDERSON: *The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development*. Nat Rev Genet, 11(5):331–44, Mai 2010.
- [30] HACKNEY, D. D., J. D. LEVITT, und J. SUHAN: *Kinesin undergoes a 9 S to 6 S conformational transition*. J Biol Chem, 267(12):8696–701, Apr 1992.
- [31] HAMMOND, J. W., T. L. BLASIUS, V. SOPPINA, D. CAI, und K. J. VERHEY: *Autoinhibition of the kinesin-2 motor KIF17 via dual intramolecular mechanisms*. J Cell Biol, 189(6):1013–25, Jun 2010.
- [32] HAMMOND, J. W., D. CAI, T. L. BLASIUS, Z. LI, Y. JIANG, G. T. JIH, E. MEYHOFER, und K. J. VERHEY: *Mammalian kinesin-3 motors are dimeric in vivo and move by processive motility upon release of autoinhibition*. PLoS Biol, 7(3):650–663, März 2009.
- [33] HENSON, J. H., D. G. COLE, M. TERASAKI, D. J. RASHID, und J. M. SCHOLEY: *Immunolocalization of the heterotrimeric kinesin-related protein KRP(85/95) in the mitotic apparatus of sea urchin embryos*. Dev Biol, 171(1):182–94, Sep 1995.
- [34] HOWARD, J.: *Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 2001.
- [35] HOWARD, J., A. J. HUDSPETH, und R. D. VALE: *Movement of microtubules by single kinesin molecules*. Nature, 342(6246):154–8, Nov 1989.
- [36] HUA, W., J. CHUNG, und J. GELLES: *Distinguishing inchworm and hand-over-hand processive kinesin movement by neck rotation measurements*. Science, 295(5556):844–8, Feb 2002.
- [37] HYEON, C. und J. N. ONUCHIC: *Internal strain regulates the nucleotide binding site of the kinesin leading head*. PNAS, 104(7):2175–80, Feb 2007.
- [38] HYMAN, A., D. DRECHSEL, D. KELLOGG, S. SALSER, K. SAWIN, P. STEFFEN, L. WORDEMAN, und T. MITCHISON: *Preparation of modified tubulins*. Meth Enzymol, 196:478–85, Jan 1991.
- [39] IMANISHI, M., N. F. ENDRES, A. GENNERICH, und R. D. VALE: *Autoinhibition regulates the motility of the C. elegans intraflagellar transport motor OSM-3*. J Cell Biol, 174(7):931–7, Sep 2006.
- [40] JAUD, J.: *Mechanische Charakterisierung schneller Kinesinmotoren in Einzelmolekülexperimenten*. Dissertation, TU München, 2007.
- [41] JIANG, M. Y. und M. P. SHEETZ: *Cargo-activated ATPase activity of kinesin*. Biophys J, 68(4 Suppl):283S–284S, Apr 1995.
- [42] KASEDA, K., H. HIGUCHI, und K. HIROSE: *Coordination of kinesin's two heads studied with mutant heterodimers*. PNAS, 99(25):16058–63, Dez 2002.

- [43] KASEDA, K., H. HIGUCHI, und K. HIROSE: *Alternate fast and slow stepping of a heterodimeric kinesin molecule*. Nat Cell Biol, 5(12):1079–82, Dez 2003.
- [44] KOJIMA, H., E. MUTO, H. HIGUCHI, und T. YANAGIDA: *Mechanics of single kinesin molecules measured by optical trapping nanometry*. Biophys J, 73(4):2012–22, Okt 1997.
- [45] KOZIELSKI, F., 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):985–94, Dez 1997.
- [46] KOZMINSKI, K. G., K. A. JOHNSON, P. FORSCHER, und J. L. ROSENBAUM: *A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating*. PNAS, 90(12):5519–23, Jun 1993.
- [47] KURAL, C., A. S. SERPINSKAYA, Y.-H. CHOU, R. D. GOLDMAN, V. I. GELFAND, und P. R. SELVIN: *Tracking melanosomes inside a cell to study molecular motors and their interaction*. PNAS, 104(13):5378–82, März 2007.
- [48] LAWRENCE, C. J., R. K. DAWE, K. R. CHRISTIE, D. W. CLEVELAND, S. C. DAWSON, S. A. ENDOW, L. S. B. GOLDSTEIN, H. V. GOODSON, N. HIROKAWA, J. HOWARD, R. L. MALMBERG, J. R. MCINTOSH, H. MIKI, T. J. MITCHISON, Y. OKADA, A. S. N. REDDY, W. M. SAXTON, M. SCHLIWA, J. M. SCHOLEY, R. D. VALE, C. E. WALCZAK, und L. WORDEMAN: *A standardized kinesin nomenclature*. J Cell Biol, 167(1):19–22, Okt 2004.
- [49] MANDELKOW, E. M., M. HERRMANN, und U. RÜHL: *Tubulin domains probed by limited proteolysis and subunit-specific antibodies*. J Mol Biol, 185(2):311–27, Sep 1985.
- [50] MARSZALEK, J. R. und L. S. GOLDSTEIN: *Understanding the functions of kinesin-II*. Biochim Biophys Acta, 1496(1):142–50, März 2000.
- [51] MEHTA, A. D., M. RIEF, und J. A. SPUDICH: *Biomechanics, one molecule at a time*. J Biol Chem, 274(21):14517–20, Mai 1999.
- [52] MITCHELL, D. R.: *The evolution of eukaryotic cilia and flagella as motile and sensory organelles*. Adv Exp Med Biol, 607:130–40, Jan 2007.
- [53] MORII, H., T. TAKENAWA, F. ARISAKA, und T. SHIMIZU: *Identification of kinesin neck region as a stable alpha-helical coiled coil and its thermodynamic characterization*. Biochemistry, 36(7):1933–42, Feb 1997.
- [54] MUTHUKRISHNAN, G., Y. ZHANG, S. SHASTRY, und W. O. HANCOCK: *The processivity of kinesin-2 motors suggests diminished front-head gating*. Curr Biol, 19(5):442–447, Jan 2009.
- [55] NISHIZAKA, T., T. YAGI, Y. TANAKA, und S. ISHIWATA: *Right-handed rotation of an actin filament in an in vitro motile system*. Nature, 361(6409):269–71, Jan 1993.

-
- [56] NITZSCHE, B., F. RUHNOW, und S. DIEZ: *Quantum-dot-assisted characterization of microtubule rotations during cargo transport*. Nature Nanotechnology, 3(9):552–6, Sep 2008.
- [57] ÖKTEN, Z., L. S. CHURCHMAN, R. S. ROCK, und J. A. SPUDICH: *Myosin-VI walks hand-over-hand along actin*. Nat Struct Mol Biol, 11(9):884–7, Sep 2004.
- [58] O’SHEA, E. K., J. D. KLEMM, P. S. KIM, und T. ALBER: *X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil*. Science, 254(5031):539–44, Okt 1991.
- [59] PAN, X., S. ACAR, und J. M. SCHOLEY: *Torque generation by one of the motor subunits of heterotrimeric kinesin-2*. Biochem Biophys Res Commun, 401:53–57, Sep 2010.
- [60] PAN, X., G. OU, G. CIVELEKOGLU-SCHOLEY, O. E. BLACQUE, N. F. ENDRES, L. TAO, A. MOGILNER, M. R. LEROUX, R. D. VALE, und J. M. SCHOLEY: *Mechanism of transport of IFT particles in C. elegans cilia by the concerted action of kinesin-II and OSM-3 motors*. J Cell Biol, 174(7):1035–45, Sep 2006.
- [61] PAZOUR, G. J. und J. L. ROSENBAUM: *Intraflagellar transport and cilia-dependent diseases*. Trends Cell Biol, 12(12):551–5, Dez 2002.
- [62] PIERCE, D. W., N. HOM-BOOHER, A. J. OTSUKA, und R. D. VALE: *Single-molecule behavior of monomeric and heteromeric kinesins*. Biochemistry, 38(17):5412–21, Apr 1999.
- [63] RAY, S., E. MEYHÖFER, R. A. MILLIGAN, und J. HOWARD: *Kinesin follows the microtubule’s protofilament axis*. J Cell Biol, 121(5):1083–93, Jun 1993.
- [64] RECK-PETERSON, S. L., A. YILDIZ, A. P. CARTER, A. GENNERICH, N. ZHANG, und R. D. VALE: *Single-molecule analysis of dynein processivity and stepping behavior*. Cell, 126(2):335–48, Jul 2006.
- [65] RICE, S. E., 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):778–84, Dez 1999.
- [66] ROCK, R. S., B. RAMAMURTHY, A. R. DUNN, S. BECCAFICO, B. R. RAMI, C. MORRIS, B. J. SPINK, C. FRANZINI-ARMSTRONG, J. A. SPUDICH, und H. L. SWEENEY: *A flexible domain is essential for the large step size and processivity of myosin-VI*. Mol Cell, 17(4):603–9, Feb 2005.
- [67] ROCK, R. S., S. E. RICE, A. L. WELLS, T. J. PURCELL, J. A. SPUDICH, und H. L. SWEENEY: *Myosin-VI is a processive motor with a large step size*. PNAS, 98(24):13655–9, Nov 2001.
- [68] ROSENBAUM, J. L. und G. B. WITMAN: *Intraflagellar transport*. Nat Rev Mol Cell Biol, 3(11):813–25, Nov 2002.

- [69] SAHOO, H., D. ROCCATANO, M. ZACHARIAS, und W. M. NAU: *Distance distributions of short polypeptides recovered by fluorescence resonance energy transfer in the 10 Å domain*. J Am Chem Soc, 128(25):8118–9, Jun 2006.
- [70] SCHILLING, J., E. SACKMANN, und A. BAUSCH: *Digital imaging processing for biophysical applications*. Rev Sci Instrum, 75(9):2822–2827, Jan 2004.
- [71] SCHNITZER, M. J. und S. M. BLOCK: *Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step*. Nature, 388(6640):386–90, Jul 1997.
- [72] SCHNITZER, M. J., K. VISSCHER, und S. M. BLOCK: *Force production by single kinesin motors*. Nat Cell Biol, 2(10):718–23, Okt 2000.
- [73] SCHOLEY, J. M.: *Intraflagellar transport*. Annu Rev Cell Dev Biol, 19:423–43, Jan 2003.
- [74] SIGNOR, D., K. P. WEDAMAN, J. T. OROZCO, N. D. DWYER, C. I. BARGMANN, L. S. ROSE, und J. M. SCHOLEY: *Role of a class DHC1b dynein in retrograde transport of IFT motors and IFT raft particles along cilia, but not dendrites, in chemosensory neurons of living Caenorhabditis elegans*. J Cell Biol, 147(3):519–30, Nov 1999.
- [75] SILVERMAN, M. und M. R. LEROUX: *Intraflagellar transport and the generation of dynamic, structurally and functionally diverse cilia*. Trends Cell Biol, 19(7):306–316, Jun 2009.
- [76] SINDELAR, C. V., M. J. BUDNY, S. E. RICE, N. NABER, R. FLETTERICK, und R. COOKE: *Two conformations in the human kinesin power stroke defined by X-ray crystallography and EPR spectroscopy*. Nat Struct Biol, 9(11):844–8, Nov 2002.
- [77] SINDELAR, C. V. und K. H. DOWNING: *The beginning of kinesin’s force-generating cycle visualized at 9-Å resolution*. J Cell Biol, 177(3):377–85, Mai 2007.
- [78] SNOW, J. J., G. OU, A. L. GUNNARSON, M. R. S. WALKER, H. M. ZHOU, I. BRUST-MASCHER, und J. M. SCHOLEY: *Two anterograde intraflagellar transport motors cooperate to build sensory cilia on C. elegans neurons*. Nat Cell Biol, 6(11):1109–13, Nov 2004.
- [79] SONG, Y. H. und E. MANDELKOW: *The anatomy of flagellar microtubules: polarity, seam, junctions, and lattice*. J Cell Biol, 128(1-2):81–94, Jan 1995.
- [80] SVOBODA, K. und S. M. BLOCK: *Biological applications of optical forces*. Annual review of biophysics and biomolecular structure, 23:247–85, Jan 1994.
- [81] SVOBODA, K. und S. M. BLOCK: *Force and velocity measured for single kinesin molecules*. Cell, 77(5):773–84, Jun 1994.
- [82] SVOBODA, K., C. F. SCHMIDT, B. J. SCHNAPP, und S. M. BLOCK: *Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry*. Nature, 365(6448):721–7, Okt 1993.

-
- [83] THORESEN, T. und J. GELLES: *Processive movement by a kinesin heterodimer with an inactivating mutation in one head*. *Biochemistry*, 47(36):9514–21, Sep 2008.
- [84] TILNEY, L. G., J. BRYAN, D. J. BUSH, K. FUJIWARA, M. S. MOOSEKER, D. B. MURPHY, und D. H. SNYDER: *Microtubules: evidence for 13 protofilaments*. *J Cell Biol*, 59:267–75, Nov 1973.
- [85] TUMA, M. C., A. ZILL, N. L. BOT, I. VERNOS, und V. GELFAND: *Heterotrimeric kinesin II is the microtubule motor protein responsible for pigment dispersion in Xenopus melanophores*. *J Cell Biol*, 143(6):1547–58, Dez 1998.
- [86] VALE, R. D. und R. J. FLETTERICK: *The design plan of kinesin motors*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13:745–77, Jan 1997.
- [87] VALE, R. D., T. FUNATSU, D. W. PIERCE, L. ROMBERG, Y. HARADA, und T. YANAGIDA: *Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules*. *Nature*, 380(6573):451–3, Apr 1996.
- [88] VALE, R. D., 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.
- [89] VALE, R. D. und Y. Y. TOYOSHIMA: *Rotation and translocation of microtubules in vitro induced by dyneins from Tetrahymena cilia*. *Cell*, 52(3):459–69, Feb 1988.
- [90] VALENTINE, M. T., P. M. FORDYCE, T. C. KRZYSIAK, S. P. GILBERT, und S. M. BLOCK: *Individual dimers of the mitotic kinesin motor Eg5 step processively and support substantial loads in vitro*. *Nat Cell Biol*, 8(5):470–6, Mai 2006.
- [91] VARGA, V., C. LEDUC, V. BORMUTH, S. DIEZ, und J. HOWARD: *Kinesin-8 motors act cooperatively to mediate length-dependent microtubule depolymerization*. *Cell*, 138(6):1174–83, Sep 2009.
- [92] VISSCHER, K., M. J. SCHNITZER, und S. M. BLOCK: *Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp*. *Nature*, 400(6740):184–9, Jul 1999.
- [93] VUKAJLOVIC, M. Manuskript in Revision, *Molecular Biology of the Cell*.
- [94] WADE, R. H., D. CHRÉTIEN, und D. JOB: *Characterization of microtubule protofilament numbers. How does the surface lattice accommodate?*. *J Mol Biol*, 212(4):775–86, Apr 1990.
- [95] WALKER, R. A., E. D. SALMON, und S. A. ENDOW: *The Drosophila claret segregation protein is a minus-end directed motor molecule*. *Nature*, 347(6295):780–2, Okt 1990.
- [96] WEDAMAN, K. P., D. W. MEYER, D. J. RASHID, D. G. COLE, und J. M. SCHOLEY: *Sequence and submolecular localization of the 115-kD accessory subunit of the heterotrimeric kinesin-II (KRP85/95) complex*. *J Cell Biol*, 132(3):371–80, Feb 1996.

- [97] YAJIMA, J. und R. A. CROSS: *A torque component in the kinesin-1 power stroke.* Nat Chem Biol, 1(6):338–41, Nov 2005.
- [98] YAJIMA, J., K. MIZUTANI, und T. NISHIZAKA: *A torque component present in mitotic kinesin Eg5 revealed by three-dimensional tracking.* Nat Struct Mol Biol, 15(10):1119–21, Okt 2008.
- [99] YAMAZAKI, H., T. NAKATA, Y. OKADA, und N. HIROKAWA: *KIF3A/B: a heterodimeric kinesin superfamily protein that works as a microtubule plus end-directed motor for membrane organelle transport.* J Cell Biol, 130(6):1387–99, Sep 1995.
- [100] YAMAZAKI, H., T. NAKATA, Y. OKADA, und N. HIROKAWA: *Cloning and characterization of KAP3: a novel kinesin superfamily-associated protein of KIF3A/3B.* PNAS, 93(16):8443–8, Aug 1996.
- [101] YARDIMCI, H., M. VAN DUFFELEN, Y. MAO, S. S. ROSENFELD, und P. R. SELVIN: *The mitotic kinesin CENP-E is a processive transport motor.* PNAS, 105(16):6016–21, Apr 2008.
- [102] YILDIZ, A., M. TOMISHIGE, A. GENNERICH, und R. D. VALE: *Intramolecular strain coordinates kinesin stepping behavior along microtubules.* Cell, 134(6):1030–41, Sep 2008.
- [103] YILDIZ, A., M. TOMISHIGE, R. D. VALE, und P. R. SELVIN: *Kinesin walks hand-over-hand.* Science, 303(5658):676–8, Jan 2004.

Danksagung

Zu guter Letzt ein herzliches Dankeschön an alle, die diese Arbeit begleitet haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Matthias Rief ganz herzlich für die Betreuung dieser Doktorarbeit bedanken. Seine Unterstützung in jedweder Hinsicht, insbesondere wenn mal Rückschläge zu verbuchen waren oder einfach gar nichts klappen wollte, aber auch sein kritisches Hinterfragen haben diese Arbeit erst möglich gemacht. Die stets offene Tür zu seinem Büro, aus dem man immer mit hervorragenden Tipps und Ideen herauskam, habe ich im Nachhinein leider viel zu selten genutzt. Man wird lange suchen müssen um einen Doktorvater zu finden, bei dem es möglich ist seinen wissenschaftlichen Interessen in dieser Freiheit nachzugehen, wie ich es erfahren durfte.

Großer Dank gebührt Zeynep Ökten, die das Kinesin-Projekt ursprünglich initiiert hat und die mich in den letzten Jahren im wahrsten Sinne durch dick und dünn begleitet hat – sowohl im Hinblick auf Experimente als auch die letzten neun Monate– wobei es korrekterweise dünn und dick heißen müsste. Unsere gemeinsamen Messzeiten werde ich in sehr guter Erinnerung behalten, die dank ihrem unermüdlichen Einsatz an der Pipette an Effizienz kaum steigerungsfähig waren – auch wenn an manchen Tagen die Mikrotubuli partout nicht so wollten wie wir. Danke auch für alles, was hier keinen Platz mehr findet!

Ein herzliches Dankeschön geht an Manfred Schliwa, der den Fortgang der Experimente immer mit großem Interesse verfolgt hat und stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich weiß es sehr zu schätzen, dass er sich trotz seines Ruhestands als Gutachter für diese Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Christof Gebhardt danke ich für die schöne Zeit als Trapper-Duo zu einer (inzwischen längst vergangenen) Zeit, als die optische Falle noch kein so begehrtes Messinstrument war, für den hervorragenden experimentellen Aufbau, die vielen, hilfreichen Diskussionen und nicht zuletzt für das Korrekturlesen dieser Arbeit, obwohl er schon lange als Postdoc im Land der unbegrenzten Möglichkeiten mit ganz anderen Dingen beschäftigt ist.

Bei meinen Bürokollegen möchte ich mich für die schöne gemeinsame Zeit mit vielen fachlichen und nichtfachlichen Diskussionen und Gesprächen bedanken. Felix Berkemeier und Christine Wurm danke ich für Unterstützung aller Art, ganz besonders im gemeinsamen Endspurt. Felix sei insbesondere auch für mannigfache und unschätzbare Hilfe in Computer-technischen Belagen gedankt! Anja Gieseke danke ich für die Weiterführung des Aktin-Projekts, das ich bei ihr in guten Händen weiß, ebenso Johannes Stigler, der “Bärbel” zu neuem Glanz verholfen hat, und Morten Bertz für seine geduldige Hilfe mit der HPLC-Anlage.

Ein guter Teil meines Dankes geht an Mitarbeiter des Adolf-Butenandt-Instituts der LMU. Felix Müller-Planitz danke ich ganz herzlich für aufgereinigtes ATP, das die Motoren erst richtig in Schwung gebracht hat, und die Durchführung der MALS-Experimente. Dem Team aus der Zellbiologie, allen voran Thi-Hieu Ho und Renate Dombi, ein herzliches Dankeschön für die viele Klonierarbeit und die tollen Proteinpräparationen.

Die Jahre meiner Doktorarbeit waren besonders geprägt durch die freundschaftliche und fröhliche Stimmung am Lehrstuhl, der ja eigentlich eine Gemeinschaft der Lehrstühle E22, E27, E40 und E69 ist. Ein herzliches Dankeschön an Euch alle!

Meinem Mann Michael danke ich für seine Hilfe bei L^AT_EX-Fragen und das Korrekturlesen dieser Arbeit. Seine liebevolle Unterstützung und schier grenzenlose Geduld in allen Lebenslagen sowie seine stete Bereitschaft auch manches biophysikalische Problem zu diskutieren waren und sind von unschätzbarem Wert.