

**Charakterisierung von Domänen des schnellen
konventionellen Kinesins
aus *Neurospora crassa* mit Hilfe C-terminal verkürzter
und chimärer Mutanten**

Dissertation

der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians Universität

München

vorgelegt von

Athina Kallipolitou

aus Thessaloniki, Griechenland

2002

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt.

Athina Kallipolitou

Erstgutachter:	Prof. Dr. Charles N. David
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Hans-Ulrich Koop
Sondergutachter:	Prof. Dr. Manfred Schliwa
eingereicht:	10.07.2002
Tag der mündlichen Prüfung:	29.11.2002

Veröffentlichungen:

Lakämper, S., Kallipolitou, A., Woehlke, G., Schliwa, M., Meyhöfer, E. (2002) Single fungal kinesin motor molecules move processively along microtubules. Manuskript eingereicht.

Kallipolitou, A., Deluca, D., Majdic, U., Lakämper, S., Cross, R., Meyhöfer, E., Moroder, L., Schliwa, M. and Woehlke, G. (2001) Unusual properties of the fungal conventional kinesin neck domain from *Neurospora crassa*. *Embo J*, 20, 6226-6235.

Seiler, S., Kirchner, J., Horn, C., Kallipolitou, A., Woehlke, G. and Schliwa, M. (2000) Cargo binding and regulatory sites in the tail of fungal conventional kinesin. *Nature Cell Biol.*, 2, 333-338.

Tagungsbeiträge:

Kallipolitou, A., Woehlke, G., Schliwa, M. (1999) Kinetic characterization of fast fungal kinesin. 1st Munich Symposium on Cell Dynamics (P17)

Woehlke, G., Kallipolitou, A., Schliwa, M. (2000) Kinetic properties of fast fungal kinesin from *Neurospora crassa*. The American Society for cell biology 40th meeting (A237)

Song, Y., Mueller, J., Marx, A., Woehlke, G., Kallipolitou, A., Schliwa, M., Mandelkow, E. (2000) X-ray Structure of a Fast Kinesin from *Neurospora crassa*. The American Society for cell biology 40th meeting (A226)

Kallipolitou, A., Woehlke, G., Schliwa, M. (2001) Processive behavior of the molekular motor kinesin. 2nd International Symposium on Physics, Chemistry and Biology with Single Molecules (P63)

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1999 bis Oktober 2002 am Adolf-Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität, München unter Anleitung von Prof. Dr. M. Schliwa und Betreuung durch Prof. Dr. C. N. David, Zoologisches Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, München erstellt. Die Arbeit wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Inhalt

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	MIKROTUBULI-ASSOZIIERTE MOTORPROTEINE.....	1
1.2	DAS <i>NEUROSPORA CRASSA</i> KINESIN	3
1.2.1	<i>Strukturelle Besonderheiten der Pilzkinesine</i>	3
1.2.2	<i>Funktionelle Eigenschaften von NcKin.....</i>	4
1.3	DAS BEWEGUNGSMODELL DER KONVENTIONELLEN KINESINE	4
1.4	ZIELE DER VORLIEGENDEN ARBEIT	6
2	MATERIAL UND METHODEN	8
2.1	REAGENZIEEN UND VERBRAUCHSMATERIAL	8
2.2	BIOLOGISCHES MATERIAL	8
2.2.1	<i>Vektoren</i>	8
2.2.2	<i>Bakterienstämme</i>	8
2.2.3	<i>Anzucht und Lagerung von E. coli</i>	9
2.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	9
2.3.1	<i>Gelelektrophorese von DNA in Agarose.....</i>	9
2.3.2	<i>Isolation von DNA aus Agarosegelen</i>	10
2.3.3	<i>Konzentrationsbestimmung von DNA</i>	10
2.3.4	<i>Plasmidpräparation.....</i>	10
2.3.5	<i>Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen</i>	11
2.3.6	<i>Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren.....</i>	11
2.3.7	<i>Herstellung elektrokompenter Zellen und Elektroporation</i>	11
2.3.8	<i>Herstellung PEG kompetenter Zellen und Hitzeschock Transformation</i>	12
2.3.9	<i>Herstellung von SEM kompetenten Zellen.....</i>	12
2.3.10	<i>Identifikation von transformierten E. coli-Klonen</i>	13
2.3.11	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	13
2.3.12	<i>Einführen von Mutationen</i>	14
2.3.13	<i>Oligonukleotide.....</i>	14
2.3.13.1	<i>PCR-Primer für die Herstellung von C-terminal verkürzten NcKin Konstrukten</i>	14
2.3.13.2	<i>Primer zur Herstellung von HsKin-NcKin chimären Konstrukten</i>	16
2.3.13.3	<i>Oligonukleotide für die Sequenzierung.....</i>	19
2.3.14	<i>Herstellung der Konstrukte</i>	20

2.3.14.1	Plasmid pNK 927 und C-terminale verkürzte Derivate.....	20
2.3.14.2	Herstellung von chimären Konstrukten.....	21
2.3.14.3	Zusammenfassung der verwendeten Konstrukte	22
2.4	BIOCHEMISCHE METHODEN.....	24
2.4.1	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)</i>	24
2.4.2	<i>Coomassie-Färbung</i>	24
2.4.3	<i>Isolation von Tubulin</i>	25
2.4.4	<i>Polymerisation von Mikrotubuli</i>	27
2.4.5	<i>Bestimmung der Mikrotubuli-Konzentration</i>	28
2.4.6	<i>Aufreinigung von Kinesin</i>	28
2.4.6.1	Expression von NcKin Proteinen	28
2.4.6.2	Aufreinigung über Mikrotubuli-Affinität	29
2.4.6.3	Chromatografische Reinigung von NcKin	30
2.4.6.4	Chromatografische Reinigung von HsKin-NcKin Chimären	32
2.4.6.5	Bestimmung der Konzentration von Proteinen	33
2.4.7	<i>C-terminaler Verdau von Proteinen</i>	33
2.4.8	Dichtegradienten-Zentrifugation und Gelfiltration	34
2.4.9	<i>Biotinylierung von Cystein-markierten NcKin Konstrukten</i>	36
2.4.10	<i>Motilitätstest</i>	37
2.4.11	<i>ATPase Messungen</i>	38
2.4.11.1	Grundaktivität von Kinesin.....	38
2.4.11.2	Gekoppelter enzymatischer ATPase-Test	39
2.4.11.2.1	Berechnungen zum ATPase-Test.....	41
2.4.11.3	MantADP-Freisetzung-Experiment	41
3	ERGEBNISSE.....	44
3.1	UNTERSUCHUNGEN AN C-TERMINAL VERKÜRZTEN <i>N. CRASSA</i> KINESINKONSTRUKTEN.....	44
3.1.1	<i>Herstellung und Isolierung von C-terminal verkürzten N. crassa Kinesin Konstrukten</i>	47
3.1.2	<i>Oligomerisierung</i>	49
3.1.3	<i>Motilitätstests</i>	52
3.1.4	<i>Kinetische Studien</i>	54
3.1.4.1	Messung der Grundaktivität der verkürzten Konstrukte	54
3.1.4.2	Mikrotubuli-aktivierte ATPase-Aktivität	56
3.1.4.3	ADP-Freisetzung und chemische Prozessivität	60
3.2	UNTERSUCHUNGEN AN HSKIN-NCNIN CHIMÄREN	66

3.1.5	<i>Allgemeine Beobachtungen an chimären Konstrukten</i>	67
3.1.6	<i>HsKin-Chimären mit Halsverbindungs-, Hals- und Scharnierregion von NcKin</i>	70
3.1.7	<i>Chimären mit Elementen der NcKin-Kopfdomäne</i>	70
3.1.8	<i>ATPase-Aktivitäten der Chimären</i>	73
4	DISKUSSION	75
4.1	DIE ROLLE DER NCKIN-KOPFDOMÄNE	75
4.1.1	<i>Die Kernmotordomäne</i>	75
4.1.2	<i>Die Halsverbindung</i>	78
4.2	DIE ROLLE DER NCKIN-HALSDOMÄNE	80
4.2.1	<i>Die Bedeutung der NcKin-Halsdomäne bei der Dimerisierung des Moleküls</i>	80
4.2.2	<i>Der Einfluss der NcKin-Halsdomäne auf die kinetischen Eigenschaften des Moleküls</i>	81
4.3	DIE ROLLE DER NCKIN-SCHARNIERDOMÄNE	85
4.4	AUSBLICK	86
5	ZUSAMMENFASSUNG	88
6	LITERATUR	90
7	DANKSAGUNGEN	98
8	LEBENS LAUF	99

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACES, Aces	N-[2-Acetamido]-2-aminoethansulfonsäure
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP-PNP	Adenosin-5'-[β , γ -imido]-triphosphat
AnKin	<i>Aspergillus nidulans</i> Kinesin
AP100	Arbeitspuffer, 100 mM PIPES
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
BSA	Rinderserum Albumin („Bovine Serum Albumin“)
C-	Carboxy-
CA	Carboanhydrase
CD	Circulardichroismus
CPA	Carboxypeptidase A
CPB	Carboxypeptidase B
D	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DmKHC	Schwere Kette des Kinesins aus <i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
EPR	„Electron Paramagnetic Resonance“

FPLC	„Fast Performance Liquid Chromatography“
FRET	„Fluorescence Resonance Energy Transfer“
g	Erdbeschleunigung, Gramm
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
HsKin	<i>Homo sapiens</i> Kinesin
IPTG	Isopropyl-thiogalaktopyranosid
Kar3	Protein der Kinesin Superfamilie aus der Hefe
Kif1A	Protein der Kinesin Superfamilie
l	Liter
Lactat-DH	Lactat-Dehydrogenase
M	Molarität (mol/l)
MantATP (ADP)	2'-(3')-O-[N-methylanthraniloyl]adenosin 5'-triphosphat (-diphosphat)
min	Minute
Mg	Molekulargewicht in Dalton
Mmkinesin	<i>Mus musculus</i> Kinesin
MT	Mikrotubuli
N-	Amino-
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
Ncd	Kinesin-ähnliches Protein aus <i>Drosophila melanogaster</i>
NcKin	<i>Neurospora crassa</i> -Kinesin
NhKin	<i>Nectria haematococca</i> Kinesin
OD _x	Optische Dichte bei Wellenlänge x

PAA	Polyacrylamid
PEP	Phosphoenolpyruvat
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
P _i	Phosphat
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-[2-ethansulfonsäure]
PK	Pyruvat-Kinase
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
S2	Ultrazentrifugierter zweiter Überstand, bakterieller Rohextrakt
SDS	Natrium-dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SrKin	Syncephalastum racemosum Kinesin
Tab.	Tabelle
TIRF	„Total Internal Reflection Fluorimetry“
Tris	Tris-hydroxymethylammoniummethan
U	Units, Enzymaktivitätseinheit
UmKin2	<i>Ustilago maydis</i> Kinesin 2
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Sofern nicht anders aufgeführt, wurden SI-Einheiten, abgeleitete und dezimale Vielfache von SI-Einheiten verwendet.

1 Einleitung

1.1 Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine

Die Lokalisation von Organellen ist einer der wichtigsten Vorgänge in der Zelle. Hierzu ist eine koordinierte Bewegung von Organellen durch Filament-abhängige Motorproteine nötig. Diese Motorproteine benutzen die Energie der ATP-Hydrolyse, um gerichtete Bewegungen entlang des Zytoskeletts zu ermöglichen. Im Allgemeinen wird der Langstrecken-Transport entlang der Mikrotubuli bewerkstelligt, während Prozesse in der Nähe der Zellmembran durch das Aktomyosin-System übernommen werden. Es gibt zwei Superfamilien Mikrotubuli-abhängiger Motoren: Dyneine und Kinesine. Während die Dyneine funktionell große Proteinkomplexe bilden, reicht bei den Kinesinen eine einzelne Proteinkette aus, um einen intakten Motor zu formieren. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit das Interesse auf Kinesin fokussiert.

Für jede Art von Motor ist die Polarität des Filaments entscheidend. Wie Aktin, sind Mikrotubuli dynamische, polare Strukturen. Sie gehen vom Organisationszentrum (MTOC) aus, das meist in der Nähe des Zellkerns liegt, und wachsen durch das Zytoplasma bis an die Zellperipherie. Das Minusende eines Mikrotubulus ist im MTOC verankert und wächst langsam, während das Plusende schneller wächst. Die Mikrotubuli-Polarität ist Voraussetzung für die direktionale Bewegung von Motorproteinen. Dementsprechend gibt es Plusende- und Minusende-gerichtete Motoren. Die meisten konventionellen Kinesine sind Plusende-gerichtete Motoren.

Mittlerweile sind genügend Kinesinsequenzen bekannt, um eine Vielzahl von Unterfamilien zu identifizieren. Die Gruppe der konventionellen Kinesine wurde als erste beschrieben. Ihr erster Vertreter wurde im Nervengewebe von Tintenfischen und Säugetieren an Hand mikroskopischer *in vitro*-Motilitätstests entdeckt (Vale *et al.*, 1985a, 1985b; Brandy, 1985, Scholey *et al.*, 1985). Tierische konventionelle Kinesine sind aus zwei schweren Ketten und

zwei leichten Ketten aufgebaut. Die niederen Organismen, wie Pilze, besitzen dagegen nur die zwei schweren Ketten. Im Primärsequenzvergleich der schweren Ketten von NcKin und HsKin lässt sich die Homologie in den einzelnen funktionellen Domänen erkennen:

Identität und Ähnlichkeit zwischen NcKin und HsKin:

NcKin/HsKin	Kopf	Hals	Scharnier	Gesamt
Identität/Ähnlichkeit	57 / 67%	31 / 34%	36 / 43%	38 / 47%

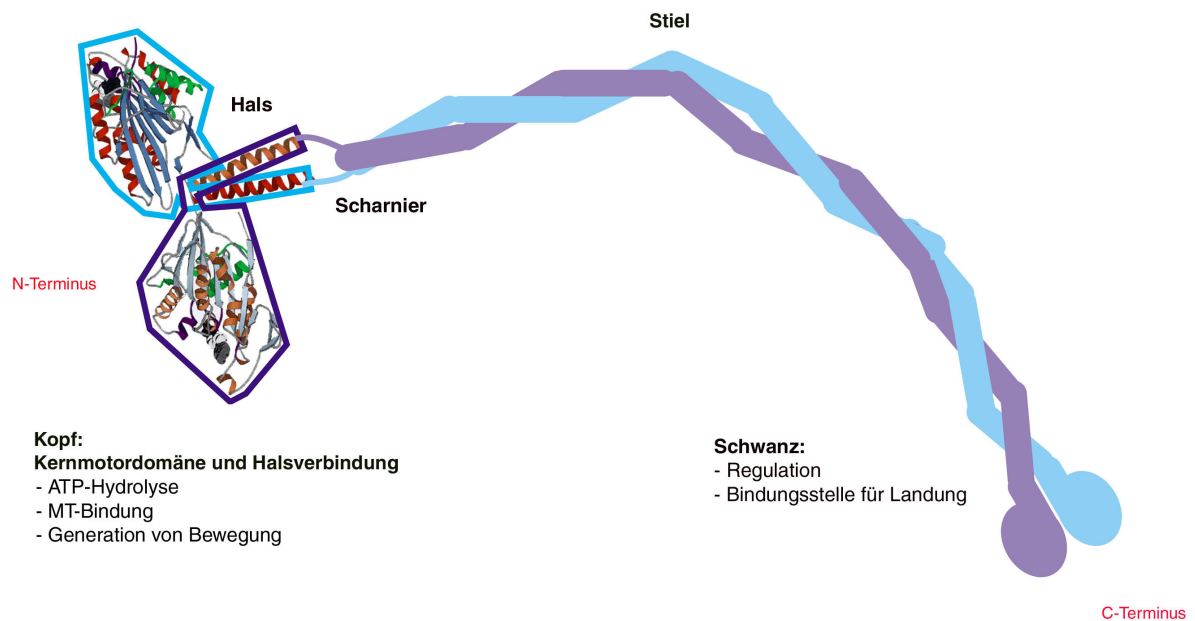


Abbildung 1: Aufbau eines konventionellen Kinesins

Schematische Darstellung der schweren Ketten eines konventionellen Kinesin-Moleküls (Woehlke und Schliwa, 2000). Es ist ein dimeres Molekül dargestellt. Am N-Terminus befinden sich die Motordomäne mit der katalytischen Aktivität und der Mikrotubuli-Bindestelle, gefolgt von der Hals- und Scharnierdomäne. C-terminal befinden sich die Stiel- und die globuläre Schwanzdomäne, die für die Bindung der Fracht verantwortlich ist.

Die schweren Ketten bilden das Hauptgerüst des Moleküls und sind in funktionelle Domänen eingeteilt (Abb. 1). N-terminal liegen die globulären Motordomänen ("Motor Core"), die für die Bindung an den Mikrotubulus und die katalytische Aktivität des Moleküls verantwortlich sind (Woehlke *et al.*, 1997). Das kurze Verbindungsstück ("Neck-Linker") zu der Halsdomäne scheint wichtig für die Motilität des Moleküls zu sein (Rice *et al.*, 1999). Diese beide Domänen zusammen bilden die Kopfreion ("Head"). Die darauf folgende sogenannte Halsdomäne ("Neck") ist in der Lage, eine Superhelix zu bilden, von der bei Tierkinesinen festgestellt wurde, dass sie für die Dimerisierung wichtig ist. Die an die Halsdomäne anschließende flexible Scharnierregion ("Hinge") verbindet den N-terminalen Kopfbereich mit den C-terminalen, sogenannten Stiel und Schwanz Domänen ("Stalk and Tail"). In der Schwanzdomäne befindet sich die Bindestelle für die Ladung, zum Beispiel Vesikel (Kirchner *et al.*, 1999), sowie die Bereiche, die für die regulatorische Interaktion mit der Kopf-Hals Region verantwortlich sind (Seiler *et al.*, 2000). Diese Domänen haben keinen Effekt auf die Motilität des Moleküls *in vitro* (Grummt *et al.*, 1998b; Seiler *et al.*, 2000).

1.2 Das *Neurospora crassa* Kinesin

1.2.1 Strukturelle Besonderheiten der Pilzkinesine

Nachdem ein Reihe konventioneller Kinesine aus Tieren (z.B. Tintenfisch, Rinderhirn, Fliege) beschrieben war, wurde auch aus dem niederen Eukaryoten *Neurospora crassa*, einem Ascomyceten, ein homologes Protein isoliert (Steinberg und Schliwa, 1995). Trotz der sehr ähnlichen Sequenz und Domänenorganisation gibt es auffällige Besonderheiten des Pilzkinesins. Zum einen enthält es keine C-terminal assoziierten leichten Ketten, zum anderen unterscheidet sich die Aminosäuresequenz der Halsregion stark von der der Tierkinesine (Abb. 5). Die Halsdomäne scheint pilzspezifisch zu sein, denn andere Pilzkinesine weisen ähnliche Sequenzen auf (Grummt *et al.*, 1998a; Lehmler *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1998; Requena *et al.*, 2001).

1.2.2 Funktionelle Eigenschaften von NcKin

Die strukturellen Unterschiede von NcKin gehen mit funktionellen Besonderheiten einher. Das auffälligste Merkmal ist die Gleitgeschwindigkeit des Moleküls. Nicht nur NcKin, sondern auch die anderen Pilzkinesine bewegen sich *in vitro* mit Geschwindigkeiten, die etwa drei- bis fünffach höher sind (zwischen 2,0 und 2,6 $\mu\text{m/s}$), als die der tierischen Kinesine (zwischen 0,2 und 0,8 $\mu\text{m/s}$). Durch Studien am *Syncephalastrum* Kinesin (Grummt *et al.*, 1998b) wurde festgestellt, dass außerhalb der Kopfdomäne nicht nur der Hals, wie im Fall der Tierkinesine, sondern auch das Scharnier wichtig für die volle Funktion des Moleküls ist.

Für NcKin wurde gezeigt, dass die C-terminale Schwanzregion an die Kopfreion bindet, was zu einer Regulation der ATPase führt (Seiler *et al.*, 2000). Im Fall von NcKin ist diese Interaktion stärker salzlabil als bei den Tierkinesinen (Hackney, *et al.*, 1992, Coy *et al.*, 1999). Trotz dieser auffälligen Unterschiede ist das Molekül von NcKin, so wie seine tierische Verwandten, mechanisch prozessiv und kann sich mit 8 nm Schritten auf dem Filament bewegen (Crevel *et al.*, 1999).

1.3 Das Bewegungsmodell der konventionellen Kinesine

Die Bewegung konventioneller Kinesin-Moleküle wird mit dem "Modell der alternierenden Köpfe" erklärt (Abb. 2).

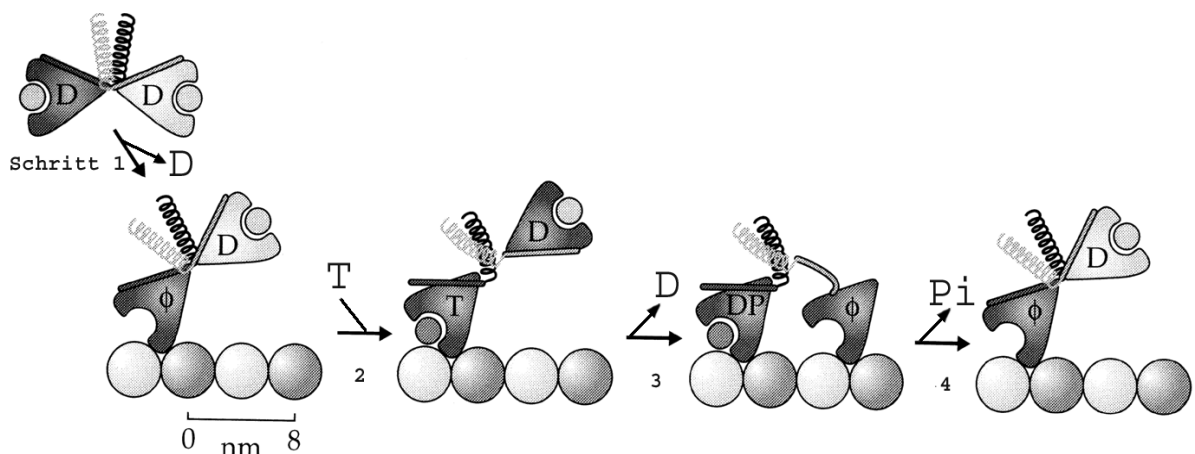


Abbildung 2: *Das Bewegungsmodell der alternierenden Köpfe*

Schematische Darstellung der Koordination der Köpfe der konventionellen Kinesine mit den verschiedenen Nukleotidphasen (Schief und Howard, 2001). Mit T wird ein ATP Molekül bezeichnet und mit D ein ADP. Die Untereinheiten der Mikrotubuli sind als Kreise dargestellt. Weitere Erläuterungen sind im Text zu finden.

Es beschreibt den Reaktionsablauf des Schrittmechanismus wie folgt: Das nicht an Mikrotubuli gebundene Kinesindimer hat beide Köpfe mit ADP besetzt, bis es mit dem Filament in Kontakt kommt. Die Bindung bewirkt, dass derjenige Kopf, der zuerst an das Tubulin bindet, sein Nukleotid verliert (Schritt 1). Der zweite Kopf kann vermutlich aus sterischen Gründen nicht binden. Erst wenn der erste Kopf ein ATP bindet (Schritt 2), erfolgt eine Konformationsänderung, die es dem zweiten Kopf ermöglicht, an den Mikrotubulus zu binden und sein ADP abzugeben (Schritt 3). Es ist umstritten, ob die ATP-Bindung am ersten Kopf ausreicht, um den zweiten Kopf frei zu geben, oder ob ein Hydrolyse-Intermediat hierfür verantwortlich ist (Schief und Howard, 2001). Während der zweite Kopf an eine in Plusrichtung gelegene Tubulin-Untereinheit bindet, hydrolysiert der erste Kopf ATP, so dass Phosphat aus der Bindetasche dissoziieren kann. Der Kopf geht in einen schwach Mikrotubuli-bindenden ADP-Zustand über, löst sich vom Filament, und behält ADP in der Nukleotid-Bindetasche (Schritt 4); An dieser Stelle haben die beiden Köpfe ihre Rolle vertauscht, und der Reaktionsvorgang kann sich wiederholen. Hierdurch ist konventionelles Kinesin in der Lage, viele aufeinander folgende Schritte zu machen, ohne vom Mikrotubulus zu dissoziieren. Diese Eigenschaft wird Prozessivität genannt.

Ein Teil der mechanischen Arbeit kommt dadurch zustande, dass der ungebundene Kopf nur "nach vorne" an eine Mikrotubuli-Bindestelle andocken kann. Das Ablösen des "hinteren" Kopfes könnte einen weiteren Beitrag liefern, weil der "vordere" Kopf den hinteren zu sich hin zieht. Trotz intensiver Bemühungen wurden Unterschritte der 8 nm Schritte bisher nur von einer Arbeitsgruppe gezeigt (Nishiyama *et al.*, 2001) und können daher noch nicht als gesichert gelten. Es ist jedoch unbestritten, dass die Halsverbindung eine wichtige Rolle bei

der Erzeugung von Bewegung spielt (Rice et al., 1999). Der Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe zufolge bindet der erste Kopf an Mikrotubuli und das ADP wird freigesetzt (Schritt 1), währenddessen bleibt die Halsverbindung in einer flexiblen Position. Wenn aber ATP in die Bindetasche dieses Kopfes kommt, wird die Halsverbindung fest am Motorkern assoziiert. Dies bewirkt vermutlich die Bindung des zweiten Kopfes an die vordere Tubulin-Untereinheit. Eine weitere Studie, bei der das Halsverbindungsstück kovalent an die katalytische Domäne gebunden wurde, bestätigt, dass die Flexibilität der Halsverbindung Voraussetzung für die Motilität und Prozessivität des Kinesins ist. In der selben Publikation wurden Moleküle untersucht, bei denen die Superhelix der Halsdomäne nicht in der Lage war zu schmelzen. Dies hatte keinen Einfluss auf die Motilität des Moleküls, jedoch wurde die Prozessivität beeinflusst (Tomishige und Vale, 2000).

1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit

Trotz der hohen Sequenzähnlichkeit von Tier- und Pilzkinesinen sind spezifische Unterschiede festgestellt worden, vor allem im Halsbereich. Weil es bisher keine zufrieden stellende Erklärung der schnellen Gleitgeschwindigkeit von NcKin gibt, liegt es nahe, in diesen pilzspezifischen Sequenzbereichen die Grundlage hierfür zu vermuten. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, welchen Einfluss die einzelnen Kinesin-Domänen auf die Motilität und den ATP-Umsatz haben. Zu diesem Zweck wurden (i) bakterielle Expressionsvektoren hergestellt, die für C-terminal verkürzte Kinesinkonstrukte kodieren. Hierbei wurden zunächst rekombinante Motoren hergestellt, die an den Domänengrenzen endeten, wie sie durch kristallografische Modelle und Sekundärstrukturvorhersagen abgeleitet worden waren. Aufgrund der Ergebnisse an diesen Proteinen wurden weitere C-terminal verkürzte Kinesine konstruiert, die eine genauere funktionelle Kartierung der Scharnierdomäne zum Ziel hatten. Mit diesen Konstrukten wurden kinetische Studien durchgeführt, um ein Gesamtbild von deren ATPase-Aktivität und Prozessivität zu bekommen. Da ähnliche Studien an dem homologen *Drosophila* Kinesin durchgeführt worden waren (Jiang et al., 1997), war ein direkter Vergleich zu diesen

Vertretern der Tierkinesine möglich. (ii) Um den Beitrag der einzelnen Domänen zur hohen Geschwindigkeit von NcKin zu ermitteln, wurden in einem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit gezielt NcKin Domänen in die entsprechenden Bereiche des humanen Kinesins eingeführt, und die entstandenen Chimären auf einen Geschwindigkeitszuwachs getestet.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, von den folgenden Firmen bezogen: Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Biorad (München) Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Roche Diagnostics (Penzberg). Das Verbrauchsmaterial wurde überwiegend von den Firmen Greiner (Frickenhausen), Nunc (Wiesbaden) und Sarstedt (Nümbrecht) geliefert. Die Restriktionsenzyme stammten von Roche Diagnostics (Penzberg), Stratagene (Heidelberg) und New England Biolabs (Schwalbach).

2.2 Biologisches Material

2.2.1 Vektoren

Es wurden folgende Vektoren verwendet:

pT7-7 (Tabor, 1990), pET3a (Novagen, Madison), pET5a (Novagen, Madison), pET-17b (Novagen Madison).

2.2.2 Bakterienstämme

Es wurden folgende *Escherichia coli*-Stämme verwendet:

DH5 α (Sambrook *et al.*, 1989), XL1-Blue (Stratagene, Amsterdam), BL21(DE) (Studier *et al.*, 1990).

2.2.3 Anzucht und Lagerung von *E. coli*

Die Anzucht der Bakterien erfolgte nach Standardmethoden (Sambrook *et al.*, 1989) auf Agarplatte oder in Flüssigkultur (200 rpm). Die Temperatur bei der Aufzucht betrug in der Regel 37°C, wurde aber zur Expression auf 22°C erniedrigt. Zur langfristigen Lagerung wurden 500 µl der Kultur mit 500 µl 50% Glycerin gemischt, bei -80°C eingefroren und gelagert.

Medien: SOB: 2% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,55 mM KCl

LB: 1% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 0,5% NaCl

TP: 2% Bacto-Trypton, 1,5% Hefe-Extrakt, 0,8% NaCl, 0,2% Na₂HPO₄,
0,1% KH₂PO₄;

nach dem Autoklavieren 0,2% Glucose zugeben

LB / Ampicillin: LB mit 100 µg/ml Ampicillin

TP / Ampicillin: TP mit 100 µg/ml Ampicillin

Agarplatten: 1,5% Agar in LB

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Gelelektrophorese von DNA in Agarose

Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach Größe wurde in Gelen von 0,5% bis 1% Agarose vorgenommen. Die Konzentration der Agarose richtete sich nach den zu erwartenden Längen der DNA-Fragmente. Als Puffer fungierte einfach TAE. Zur Erkennung von DNA-Banden war der verflüssigten Agarose zuvor Ethidiumbromid (0,05 µg/ml) beigemischt worden. Die erforderliche Spannung lag zwischen 50 V und 80 V. Die DNA-Präparation wurde vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen Probenpuffer versetzt. Zur Dokumentation wurden die Gele nach

der Auftrennung unter UV-Licht (Transilluminator) mit dem "Eagle Eye System" (Stratagene, Heidelberg) fotografiert.

50fach TAE: 2 M Tris-HCl, pH 7,4, 0,57% Eisessig, 50 mM EDTA, pH 8,0

6fach DNA-Probenpuffer: 30% Glycerin; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol

2.3.2 Isolation von DNA aus Agarosegelen

DNA-Banden wurden nach der Elektrophorese aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die weitere Isolation erfolgte nach dem "Qiaquick Gel Extraction Kit" (Qiagene) Protokoll. Die DNA wurde in 30 μ l Wasser aufgenommen.

2.3.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde fotometrisch über die OD_{260} bestimmt, wobei 50 μ g Doppelstrang-DNA einer OD_{260} von 1 entsprechen (Sambrook *et al.*, 1989).

2.3.4 Plasmidpräparation

Für Plasmidpräparationen im analytischen Maßstab wurden 3 ml LB / Ampicillin mit einer Bakterien-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden sedimentiert und anschließend wurden die Plasmide mit dem Qiagen-Plasmid-Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellers für "Mini-Präparationen" isoliert. Dabei wurde auf die vorgesehene Tip20-Säule verzichtet. Die gereinigte DNA wurde luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen (in der Regel 20 μ l) Wasser aufgenommen. Die Plasmide konnten anschließend für Restriktionsanalysen und Transformationen verwendet werden.

Für die Isolierung von Plasmiden im präparativen Maßstab wurden Übernacht-Kulturen von 100 bis 200 ml verwendet. Die Zellen wurden sedimentiert und, dem Herstellerprotokoll für "Midi"-Präparationen folgend, mit dem Qiagen-Plasmid-Kit aufgearbeitet (inklusive Säule).

Die DNA wurde nach dem Trocknen in der passenden Wasser-Menge (meistens 50 μ l) aufgenommen.

2.3.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA wurde in dem vom Hersteller des Enzyms empfohlenen Puffer durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug mindestens 15 μ l. Für die Spaltung wurden 1-5 U Enzym pro μ g DNA eingesetzt, aber nie mehr als ein Zehntel des Reaktionsvolumens. Der Reaktionsansatz wurde mindestens 1 h bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert.

2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

Der Vektor wurde mit den passenden Enzymen verdaut und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Agarosegel isoliert (s. Kapitel 2.3.2). DNA-Fragmente, die in den geschnittenen Vektor inseriert werden sollten, wurden ebenfalls aus einem Agarose-Gel isoliert. Die Ligation wurde in einem Volumen von 15 μ l angesetzt. Hierfür wurden 50 ng Vektor und ein dreifacher molarer Überschuss an Fragment verwendet. Für die Ligation wurde die T4-DNA Ligase in den mitgelieferten Puffer verwendet. Ligationen ("Blunt-end" und "sticky-end") erfolgten 2,5 h bis über Nacht bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurden 5 μ l des Ansatzes in elektrokompente bzw. SEM oder PEG kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (Inoue *et al.*, 1990, Chung und Miller, 1993).

2.3.7 Herstellung elektrokompenter Zellen und Elektroporation

1 l LB wurde mit 10 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37°C geschüttelt (ca. 2-3 h). Alle verwendeten Gefäße und Lösungen waren steril und auf 4°C gekühlt. Die Qualität der elektrokompenten Zellen hing entscheidend davon ab, dass alle weiteren Schritte auf Eis bzw. mit eiskaltem Wasser durchgeführt wurden. Die

Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4000 g (15 min) geerntet und in 1 l Wasser resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde das Zellpellet in 500 ml Wasser aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend mit 20 ml 10% Glycerin gewaschen und schließlich in 3 ml 10% Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden zu je 45 μ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

Zur Transformation wurden die elektrokompetenten *E. coli* Zellen (Stamm XL1-Blue) auf Eis aufgetaut. Je 45 μ l Zellsuspension wurden zusammen mit 5 μ l Ligationsansatz oder ungefähr 15 ng Plasmid in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Eurogentec, Elektrodenabstand 2mm) gegeben. Nach einem Puls von 2,5 kV, 25 mF, 200 Ohm wurden die Ansätze sofort auf LB / Ampicilin Agar-Platten ausplattiert.

2.3.8 Herstellung PEG kompetenter Zellen und Hitzeschock Transformation

E. coli Zellen (Stamm DH5 α oder BL-21) aus einer Glycerin-Stammkultur wurden zunächst auf einer Agarplatte und dann in einer 3 ml Vorkultur über Nacht angezüchtet (Chung und Miller, 1993). Diese wurde in 100 ml LB-Medium überimpft und bis zu einer OD von 0,2 bis 0,4 wachsen gelassen. Die Zellen wurden 10 min 3500 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml eiskaltem TSS Puffer resuspendiert und in 200 μ l Portionen in flüssigem N₂ eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut. Je 100 μ l Zellsuspension wurden zusammen mit 5 μ l Ligationsansatz oder etwa 15 ng Plasmid in einem vorgekühlten Reaktions-Gefäß gemischt und auf Eis für 30 min inkubiert. Dann wurde der Ansatz bei 42°C für 30 s und auf Eis für 2 min inkubiert und sofort auf eine LP-Ampicillin Agarplatte ausplattiert.

2.3.9 Herstellung von SEM kompetenten Zellen

E. coli Zellen (Stamm DH5 α oder BL-21) aus einer Glycerin-Stammkultur wurden zunächst auf einer Agarplatte und dann in einer 3 ml Vorkultur über Nacht angezüchtet (Inoue *et al.*,

1990). Diese wurde in 250 ml SOB-Medium überimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,6 wachsen gelassen. Die Kultur wurde 10 min auf Eis inkubiert, danach wurden die Zellen abzentrifugiert (GSA Rotor, 2500 rpm 10 min, 4°C) und das Pellet wurde in eiskalter TB Lösung aufgenommen. Die Zellen wurden nochmal abzentrifugiert und das Pellet in 20 ml TP-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 7% DMSO versetzt, in 100 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

TB-Lösung: 10 mM PIPES·KOH pH 6,7

55 mM $MnCl_2$

15 mM $CaCl_2$

250 mM KCl

sterilfiltrieren und bei 4°C aufbewahren

2.3.10 Identifikation von transformierten *E. coli*-Klonen

Nach der Transformation wurde die DNA aus den Bakterienkolonien isoliert (2.3.4). Die DNA wurde mit den passenden Enzymen verdaut und das Ergebnis wurde auf einem Agarose-Gel kontrolliert. Die Plasmide mit den erwarteten Fragmenten wurden zum Sequenzieren geschickt (Medigenomix GmbH, Martinsried) und das Ergebnis im Mac molly Programm überprüft.

2.3.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der "Polymerase Chain Reaction" (PCR). Für Standard-PCR-Reaktionen wurde der "Expand High Fidelity Polymerase Mix" (Roche) mit dem zugehörigen Puffer verwendet. Die Reaktionsansätze enthielten 2 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs, 0,5 μ M von jedem Primer und 0.5 U/50 μ l Expand-Polymerase (mit Exonukleaseaktivität) im Reaktionspuffer. Als Vorlage wurde Plasmid-DNA verwendet. Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde die DNA für 2 min bei 95°C denaturiert. Dann

folgten 30 Zyklen: 95°C 30 s, 55-68°C (je nach Primer unterschiedliche Schmelztemperaturen) 30 s, 72°C 1 min (und nach jedem Zyklus zusätzlich 5 s). Das PCR Produkt wurde nach dem "Qiaquick PCR Purification Kit" Protokoll von Nucleotiden und Enzym getrennt.

2.3.12 Einführen von Mutationen

Für das Einführen von Punktmutationen oder den Austausch mehrerer Aminosäuren wurde eine PCR nach dem ortsspezifischen Mutagenese Protokoll durchgeführt (QuikChange, Stratagene Cloning Systems). Es wurden komplementäre Primer, die die gewünschte Mutation trugen, eingesetzt. Für diesen Zweck muss eine Polymerase ohne Exonuclease-Aktivität verwendet werden. Deswegen wurde die Pwo-Polymerase mit der niedrigsten Fehlerrate verwendet (Peglab, Erlangen). Die Reaktionsansätze enthielten 2 mM MgCl₂, 10 mM dNTPs, 10 bis 25 nM von jedem Primer und 2.5 U/μl Pwo-Polymerase im Reaktionspuffer. Als Vorlage wurde Plasmid-DNA eingesetzt. Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde die DNA für 30 s bei 95°C denaturiert. Dann folgten 15 Zyklen 95°C 30 s, 55°C 1 min, 68°C je nach Länge des Plasmids 2 min/kb. Nach Verlauf der PCR wurden die Ansätze mit dem *DpnI* Enzym verdaut um die methylierte Vorlagen-Plasmid DNA zu entfernen. Nach dem Verdau können die Ansätze in *E. coli* Zellen transformiert werden (s. 2.3.7 und 2.3.8)

2.3.13 Oligonukleotide

2.3.13.1 PCR-Primer für die Herstellung von C-terminal verkürzten NcKin Konstrukten

7-7for:

5'- CTCACTATAGGGAGACCACAACG - 3'

als universeller Primer im T7-Promotor

NK 343:

5'- AACTGCAGTTAGGCCGGGCTGAGTTCG - 3'

Primer für pNK 343 Konstrukt ohne reaktives Cystein

NK 343cys:

5'-AACTGCAGTTAAAAGCATTTACGATGCACAATAGACGGGGCCGGGCTGAGT -3'

Primer für pNK 343 Konstrukt mit reaktivem Cystein

NK 378:

5'- AACTGCAGTTAAGTCTCGCCACCACGCCAC - 3'

Primer für pNK 378 Konstrukt ohne reaktivem Cystein

NK 378cys:

5'-AACTGCAGTTAAAAGCATTTACGATGCACAATAGACGGAGTCTCGCCACCA -3'

Primer für pNK 378 Konstrukt mit reaktivem Cystein

NK 400:

5'- AACTGCAGTTATGTCGAGGCTGATTCGAAG - 3'

Primer für pNK 378 Konstrukt mit reaktivem Cystein

NK 400cys:

5'-AACTGCAGTTAAAAGCATTTACGATGCACAATAGACGGTGTCGAGGCTGAT -3'

Primer für pNK 400 Konstrukt mit reaktivem Cystein

NK 383cys:

5'-AACTGCAGTTAAAAGCATTTACGATCGACAATAGACGGTTTCTCCTTGGGCAC
AGTCTCG - 3'

Primer für pNK 383 Konstrukt mit reaktivem Cystein

NK 391cys:

5'-AACTGCAGTTAAAAGCATTTACGATGCACAATAGACGGCGCGAGCTCCAAAGG

TGG - 3'

Primer für pNK 391 Konstrukt mit reaktivem Cystein

NK 433cys_2:

5'- AACTGCAGTTAAAAGCATTACGATGCACAATAGACGATCCAAGGGCAAG - 3'

Primer für pNK 433 Konstrukt mit reaktivem Cystein

2.3.13.2 Primer zur Herstellung von HsKin-NcKin chimären Konstrukten

hK 560(Ngo)+:

5'- CTGATGCTGAAAGAGCCGGCTGTGAAGAAGAAATTGC - 3'

Primer zum Einführen der *Ngo*MIV Schnittstelle (Position 602) in phK560cys Vektor mittels ortsspezifischer Mutagenese

hK 560(Ngo)-:

5'- GCAATTTCTTCTTCACAGCCGGCTCTTTCAGCATCAG - 3'

Primer zum Einführen der *Ngo*MIV Schnittstelle (Position 602) in phK560cys Vektor mittels ortsspezifischer Mutagenese

HK 560(Kpn)+:

5'- CGTAATGGGGAGACGGTACCTATTGATGAACAG - 3'

Primer zum Einführen der *Kpn*I Schnittstelle (Position 741) in pK560cys Vektor

HK 560(Kpn)-:

5'- CTGTTTCATCAATAGGTACCGTCTCCCCATTACG - 3'

Primer zum Einführen der *Kpn*I Schnittstelle (Position 741) in pK560cys Vektor

7-7for:

5'- CTCACTATAGGGAGACCACAACG - 3'

Primer für phKNm und phKNploop Konstrukt

Nm-:

5'- GCAGTTAACTCCACATTGACACAAACTGTGTTCTTCATCGACTTTGCTCTC - 3'

Primer für phKNm und phKN11 α 4 Konstrukt

Nco-:

5'- CTGCCATGGACAAGATGCTGGTAAAGATTTGC - 3'

Primer für phKNploop Konstrukt

Nco+:

5'- CATGCCATGGCAGCAAACATCGAGTATACCG - 3'

Primer für phKN11 α 4 Konstrukt

NmNL+:

5'- GTCGATCAAGAACAAAGCGAAAGTCAACGCCGAGTTAACTGCAGAACAG
TGG - 3'

Primer zur Herstellung von hKNml mittels ortsspezifischer Mutagenese (s. 2.3.11)

NmNL-:

5'- CCACTGTTCTGCAGTTAACTCGGCGTTGACTTTCGCTTTGTTCTTGATCGAC - 3'

Primer zur Herstellung von hKNml mittels ortsspezifischer Mutagenese

NcNL+:

5'-
GGGCCAAAACAATTAAGAACAAAGCTAAAGTTAACGCTGAGCTCTCCGCAGAA
CAGTGGAAAAAGAAG - 3'

Primer zur Herstellung von phKNcNL mittels ortsspezifischer Mutagenese

NcNL-:

5'- CTTCTTTTTCCACTGTTCTGCGGAGAGCTCAGCGTTAACTTTAGCTTTGTTCTTA

ATTGTTTTGGCCC - 3'

Primer zur Herstellung von phKNcNL mittels ortsspezifischer Mutagenese

NcNeck+:

5'- GGAGTAACTCCGGCCGAGCTCAAGCAG - 3'

Primer für phKNcNeck Konstrukt

NcNeck-:

5'- GGGGTACCGTCTCCCCATTACGCCACACTTGCACTTCGC - 3'

Primer für phKNcNeck Konstrukt

NcHKpn0+:

5'- GGGTACCCAAGGAGAAATGGGTTCCACCTTTGGAGCTCG - 3'

Primer für phKNcH Konstrukt

NK_A425NgoNIV:

5'- AACTGCAGTTAATCCAAGGGCAAGCTGGGAGTGCCGGCTCGGTCTGAGATAG
CAGGGGTCTCG - 3'

Primer für phKNcH Konstrukt

ngomfe-:

5'- CCGGCTCTTTCAGCATCAGTAAAATTCCTATAACTCC - 3'

ngomfe+:

5'- AATTGGAGTTATAGGAAATTTTACTGATGCTGAAAGAG - 3'

zum Entfernen einer Mutation an Position 615 G wurde durch A ausgetauscht, wobei Valin statt Alanin entstanden ist; beide Oligos erhalten eine 5'-Phosphorylierung, um eine gegenseitige Bindung zu ermöglichen

2.3.13.3 Oligonukleotide für die Sequenzierung

NKUNI:

5'- CCGGGTCAGCTATATGGAA - 3'

Primer in der Sequenz von NcKin Vektoren

7-7for:

5'- CTCACTATAGGGAGACCACAACG - 3'

7-7rev:

5'-CGCTGAGATAGGTGCCTCACTG - 3'

universelle Oligos für Sequenzierungen bei allen pET-Vektoren, pT7-7, pIMS und pET3

pK+:

5'- CTTCATGATCCAGAAGGCATGGG - 3'

pK-:

5'- CTTGATCCCTTCTGGTAGATGCC - 3'

Primer in der Sequenz von hK560cys Konstrukt

phKNgoMIV+:

5'- GCGGAACACTATTCAGTGGC - 3'

phKNgoMIV-:

5'- CTGGTGGTTGGTCATTTCC - 3'

Primer in der Sequenz von pK560cys Konstrukt

2.3.14 Herstellung der Konstrukte

2.3.14.1 Plasmid pNK 927 und C-terminale verkürzte Derivate

Folgende Konstrukte wurden zur Verfügung gestellt: pT12.1 (NcKin Volllängen-Konstrukt wurde von Ulrike Majdic kloniert, Doktorarbeit 1999); die Konstrukte pNK 343, pNK 355 und pNK 375_4 wurden von Franz Schwarz (technischer Assistent) kloniert; die pNK 375_2, pNK 433, pNK 480 sowie das verkürzte Konstrukt mit dem deletierten Hals pNK 433 Δ Neck wurden von Günther Woehlke kloniert.

Durch die Klonierung hat das pT12.1 Konstrukt N-terminal 12 zusätzliche Aminosäuren erhalten. Für die Klonierung der Konstrukte pNK 343, pNK 355 und pNK 375_4 wurde der pT12.1 Vektor benutzt. Die Konstrukte haben folglich 12 N-terminale Aminosäuren. Die von Günther Woehlke konstruierten Plasmide pNK 375_2, pNK 433 und pNK 480 enthalten diese 12 Aminosäuren nicht.

Hier wurden das pT12.1 und pNK 375_2 mit *PvuI* (im Ampicillin-Resistenz Gen) und *BamHI* (in der Kopf Sequenz) geschnitten. Das 2.2 kb Stück von pNK 375_2, das einen Teil der Kopfsequenz trägt, wurde mit dem 3.4 kb Stück von pT12.1 ligiert, so dass das NcKin Volllängen-Konstrukt pNK 928 entsteht, das keine 12 N-terminale Aminosäuren enthält.

Für das Konstrukt pNK 343 wurde mittels PCR (für den Primer s. 2.3.13.1) das entsprechende NcKin Fragment hergestellt, und über *BamHI* und *PstI* im pNK 433 Vektor-Hintergrund ligiert. Es war nötig, dieses Konstrukt neu zu klonieren, da die Expressioneffizienz im pIMS Vektor ungenügend war.

Gleich wie beim pNK 343 wurden die Konstrukte pNK 343cys, pNK 378, pNK 378cys, pNK 400, pNK 400cys, pNK 433cys, sowie pNK 383cys und pNK 391cys konstruiert (sämtliche Primer bei 2.3.13.1 zu finden). Am C-Terminus dieser Konstrukte befand sich ein Anhang aus 9 Aminosäuren, der ein reaktives Cystein beinhaltetete ("Cys-Tag": PSIVHRKCF) (Funatsu *et al.*, 1997).

2.3.14.2 Herstellung von chimären Konstrukten

Das HsKin Wildtyp Konstrukt trägt den Namen pK560cys und ist im Hintergrund des Vektors pET-17b (Novagen, Madison) kloniert (Vale *et al.*, 1994). Dieses Plasmid dient der Expression von humanem Kinesin von Aminosäure 1 bis 560 und trägt eine C-terminale, Cystein-haltige Sequenz (vgl. 2.3.14.1). Zuerst wurden an den Grenzen der funktionellen Domänen dieser Sequenz Schnittstellen mittels ortsspezifischer Mutagenese eingeführt (2.3.12): die Schnittstelle *Ngom*I wurde an der Grenze zwischen Scharnier- und Schwanzdomäne eingeführt, *Kpn*I an der Stelle zwischen Hals- und Scharnierdomäne.

Für die Herstellung der HsKin Chimäre mit der NcKin Halsverbindung (phKNcNL) wurde der 9 Aminosäure lange Linker auch mittels ortsspezifischer Mutagenese eingeführt.

Für die anderen Chimären wurde PCR mit passenden Primern durchgeführt. Als Vorlage wurde der Vektor pNK 433 verwendet.

Das Insert mit der NcKin Motorkern Sequenz wurde über *Nde*I und *Hpa*I in das Plasmid pK560cys ligiert, das Ploop-Insert über *Nde*I und *Nco*I, das L11 α 4-Insert über *Nco*I und *Hpa*I, das Hals-Insert über *Hpa*I und *Kpn*I und das Scharnier-Insert von NcKin über den *Kpn*I und *Ngom*I Schnittstellen in dem pK560cys Vektor ligiert (Abb. 3).

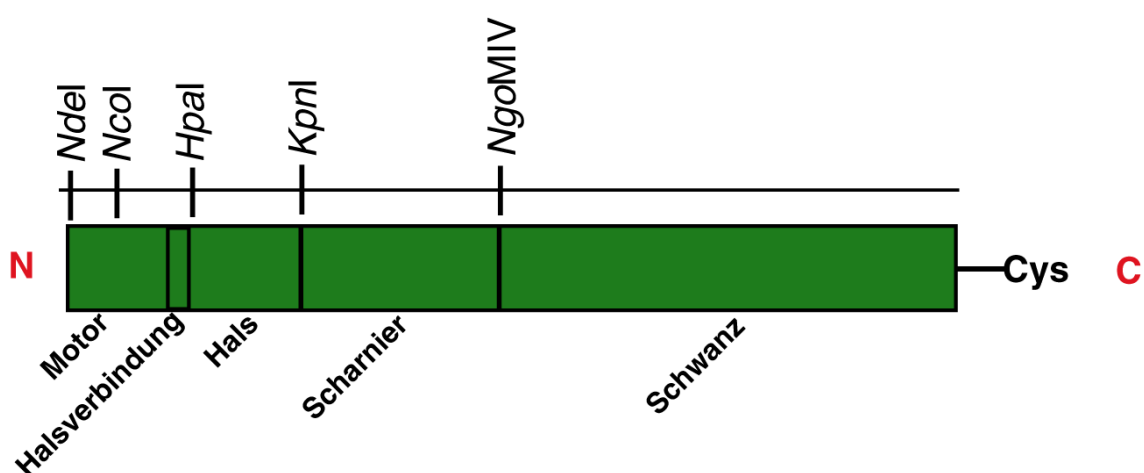


Abbildung 3:

Humanes Wildtyp Kinesin Konstrukt pK560cys_N2K2_2 mit den aufgelisteten Schnittstellen, die für die Herstellung der chimären Konstrukte benutzt worden sind.

2.3.14.3 Zusammenfassung der verwendeten Konstrukte

Vektorname	Proteinbezeichnung	Bemerkung
pNK 928	NcKin 928	Das NcKin Volllängen-Konstrukt
pNK 480	NcKin 480	NcKin Konstrukt bis zu AS 480
pNK 433	NcKin 433	NcKin Konstrukt bis zu AS 433
pNK 433cys_2	NcKin 433	NcKin Konstrukt bis zu AS 433 mit C-terminaler Cystein-Markierung
pNK 433 Δ Neck	NcKin 433 Δ Neck	NcKin Konstrukt bis zu AS 433 mit deletierter Halsdomäne
pNK 400	NcKin 400	NcKin Konstrukt bis zu AS 400
pNK 400cys	NcKin 400	NcKin Konstrukt bis zu AS 400 mit C-terminaler Cystein-Markierung
pNK 391cys	NcKin 391	NcKin Konstrukt bis zu AS 391 mit C-terminaler Cystein-Markierung
pNK 381cys	NcKin 381	NcKin Konstrukt bis zu AS 381 mit C-terminaler Cystein-Markierung
pNK 378	NcKin 378	NcKin Konstrukt bis zu AS 378
pNK 378cys	NcKin 378	NcKin Konstrukt bis zu AS 378 mit C-terminaler Cystein-Markierung
pNK 343	NcKin 343	NcKin Konstrukt bis zu AS 343
pNK 343cys	NcKin 343	NcKin Konstrukt bis zu AS 343 mit C-terminaler Cystein-Markierung

Tabelle 1: NcKin C-terminal verkürzte Konstrukte

Vektorname	Proteinbezeichnung	Bemerkung
pK560cys	HsKin	HsKin Konstrukt von Aminosäure 1 bis 560 mit C-terminaler Cystein-Markierung (Wildtyp)
pK560cys_N2K2_2	HsKin	HsKin Wildtyp Konstrukt mit eingeführten NgoMIV und KpnI Schnittstellen
pNKhKtail	NcKin-HsKin	pK560cys Vektor mit NcKin Sequenzen bis zur Scharnierregion
phKNcNL	NcKin Linker	HsKin Konstrukt mit NcKin Halsverbindung
phKNcNeck_2	NcKin Neck	HsKin Konstrukt mit der NcKin Halsdomäne
phKNcH_N	NcKin Hinge	HsKin Konstrukt mit dem NcKin Scharnier
phKNploop	NcKin Ploop	HsKin Konstrukt mit dem NcKin Motorkern von Aminosäure 1 bis 124
phKNloop11 α 4	NcKin Loop11	HsKin Konstrukt mit dem NcKin Motorkern von Aminosäure 124 bis 332
phKNm	NcKin Motor	HsKin Konstrukt mit dem NcKin Motorkern von Aminosäure 1 bis 332
phKNml	NcKin Motor-Linker	HsKin Konstrukt mit der NcKin Kopf Sequenz (1 bis 342)

Tabelle 2: HsKin-NcKin Chimären

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Proteingemische wurden über diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Dazu wurden 10% Polyacrylamid-(PAA-)Gele von 1 oder 1,5 mm Dicke hergestellt. Herstellung und Lauf der Gele erfolgte mit den Kammern eines Mini-Gelsystems (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) oder des Multigel-Long-Systems (Biometra, München). Die Proben und die Größenstandards ("High Molecular Weight", Sigma; "Low Molecular Weight", Pharmacia) wurden im 6fach Probenpuffer 3 bis 5 min gekocht und direkt danach auf das Gel aufgetragen.

PAA-Lösung: 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid (Biorad)

Laufpuffer: 25 mM Tris, 0,1% SDS, 192 mM Glycin

10fach Stockpuffer für das Sammelgel:

500 mM Tris·HCl, pH 6,8, 0,4% SDS

10fach Stockpuffer für das Trenngel: 1,5 M Tris·HCl, pH 8,8, 0,4% SDS

6fach Probenpuffer: 300 mM Tris·HCl, pH 6,8, 15 mM EDTA, 12% SDS, 30% Glycerin, 15% β -Mercaptoethanol, 0,06% Bromphenolblau

2.4.2 Coomassie-Färbung

Die Gele wurden für etwa 45-60 min gefärbt und nach kurzem Abspülen mit Wasser mit Entfärber entfärbt. Die Gele wurden fotografiert oder gescannt und anschließend zwischen haushaltsüblicher Einmachhaut in einem Spanrahmen getrocknet.

Färbelösung: 7,5% Eisessig, 50% Methanol, 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250

Entfärber: 10% Eisessig

2.4.3 Isolation von Tubulin

Tubulin wurde über drei Polymerisations- und Depolymerisationszyklen und anschließende Ionenaustausch-Chromatografie gereinigt (in Anlehnung an Mandelkow *et al.*, 1985). Unmittelbar nach der Schlachtung entnommene Schweinehirnhälften wurden einzeln in Eis eingebettet. Im Kühlraum wurden Bindegewebe und Blutgefäße entfernt. 700 g Hirn wurde nach Zugabe von 700 ml Puffer A in einem Zerkleinerer (Braun) homogenisiert und anschließend zentrifugiert (GSA-Rotor, 12.000 rpm, 4°C, 90 min). Der Überstand wurde unter Rühren mit 25% Glycerin (Endkonzentration, v/v) und 1,5 mM ATP (Endkonzentration) versetzt. Danach wurde im Wasserbad bei 35°C unter leichtem Schütteln für 20-30 min inkubiert, um das Tubulin zu polymerisieren. Die Mikrotubuli wurden anschließend bei 32°C sedimentiert (vorgewärmte Rotoren und Zentrifugen; Beckman-Rotor 35, 35.000 rpm, 60 min und Rotor TI 45, 40.000 rpm, 45 min). Die Sedimente wurden mit 100 ml Puffer B in zwei 50 ml Glashomogenisatoren (Wheaton) aus Eis resuspendiert. Anschließend wurden die Mikrotubuli für 25 min auf Eis depolymerisiert und die Lösung zentrifugiert (vorgekühlter Rotor und Zentrifuge, Rotor 42.1, 36.000 rpm, 4°C, 30 min). Der Überstand wurde im Wasserbad bei 35°C für 20 min polymerisiert. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 32°C (Rotor 42.1, 33.000 rpm, 60 min). Die sedimentierten Mikrotubuli wurden vereinigt, gewogen, in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Für die weitere Reinigung des Tubulins wurde Phosphocellulose (P-11, Whatman) nach Herstellerangaben aktiviert. Etwa 50 ml P11 Material (entspricht 150 ml Totalvolumen) wurden in eine Säule (1,5 x 10 cm) gepackt. Zum Äquilibrieren des Ionenaustauschers wurde die Säule an die FPLC-Anlage angeschlossen. Bei einer Flussrate von 1 ml/min wurden etwa 3 Säulenvolumen Puffer D+ durchflossen. Parallel dazu wurden 10-20 g Mikrotubuli aufgetaut und in einem Glashomogenisator in 50 bis 100 ml Puffer C für 25 min auf Eis depolymerisiert. Nach der Zentrifugation (Rotor 42.1, 36.000 rpm, 4°C, 30 min) wurde der Überstand mit 10% DMSO versetzt und das Tubulin bei 35°C für 20 min polymerisiert.

Daraufhin wurden die Mikrotubuli sedimentiert (Rotor 42.1, 33.000 rpm, 32°C, 60 min), die Sedimente mit 5 bis 7 ml Puffer D auf Eis in einem 10 ml-Homogenisator resuspendiert und anschließend für 20 min depolymerisiert. Die Tubulin-Lösung wurde zentrifugiert (Rotor Ti 70.1, 34.000 rpm, 4°C, 30 min) und der Überstand mittels einer Peristaltikpumpe (Pharmacia, Amersham) über den Superloop (Pharmacia) auf die Phosphocellulose-Säule aufgetragen. Nachdem die Probe in das Ionenaustauschermaterial eingezogen war, wurde mit Puffer D+ bei einer Flussrate von 0,16 ml/min eluiert. Im Gegensatz zu Mikrotubuli-assoziierten Proteinen bindet Tubulin unter diesen Pufferbedingungen nicht. Mit einem Fraktionssammler wurden 1 ml-Fraktionen aufgefangen. Die Identifikation der Haupt-Fraktionen erfolgte über Mischen von 2 μ l Fraktion mit jeweils 500 μ l Bradford-Reagenz (s. 2.4.5.3). Die am stärksten gefärbten Fraktionen wurden vereinigt und nach Zugabe von 0,1 mM GTP in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

Puffer A:

100 mM PIPES·NaOH, pH 6,9

1 mM MgSO₄,

2 mM EGTA,

0,1 mM ATP,

1 mM DTT

Puffer B:

100 mM PIPES·NaOH, pH 6,9

1 mM MgSO₄

1 mM EGTA

1 mM ATP

1 mM DTT

Puffer C:

500 mM PIPES·NaOH, pH 6,9

1 mM MgSO₄

1 mM EGTA

1 mM ATP

1 mM DTT

Puffer D:

100 mM PIPES·NaOH, pH 6,9

1 mM MgSO₄

1 mM EGTA

Puffer D+: Puffer D mit

0,05 mM ATP

1 mM DTT

2.4.4 Polymerisation von Mikrotubuli

Eingefrorenes Tubulin wurde aufgetaut und zentrifugiert, um denaturiertes Material zu entfernen (Beckman Tischzentrifuge mit Rotor TLA 100.3, 10 min, 4°C, 80.000 rpm). Anschließend wurde 1 mM GTP zugesetzt und für 5 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 20 µM Taxol wurde für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde durch 40% Saccharose in ATPase-Puffer (s. 2.5.2) mit 10 µM Taxol zentrifugiert (Rotor TLA 100.3, 10 min, 22°C, 80.000 rpm). Das Saccharose-Kissen wurde einmal mit ATPase-Puffer gewaschen, dann wurde das Pellet mit ATPase-Puffer mit 20 µM Taxol gewaschen und schließlich darin resuspendiert. Das Endvolumen wurde so eingestellt, dass die Mikrotubuli eine Endkonzentration von etwa 100 µM Tubulin-Dimer aufwiesen. Für ATPase-Tests, bei denen keine genaue Kenntnis der Mikrotubuli-Konzentration erforderlich war, wurde die zusätzliche Reinigung der Mikrotubuli über das Saccharose-Kissen ausgelassen.

2.4.5 Bestimmung der Mikrotubuli-Konzentration

Die Mikrotubuli-Konzentration wurde nach Denaturierung in Guanidinium-HCl im Fotometer bei OD₂₈₀ bestimmt:

90 μ l 6,6 M Guanidinium-HCl, 10 μ l Mikrotubuli (1:10 bzw. 1:5 in ATPase Puffer mit 20 μ M Taxol verdünnt)

90 μ l 6,6 Guanidinium-HCl, 10 μ l ATPase-Puffer mit Taxol, als Nullwert

Die Mikrotubuli-Konzentration berechnet sich bei einer 1:10 Verdünnung der Mikrotubuli nach folgender Formel (Huang und Hackney, 1994):

$$\text{OD}_{280}/10 \cdot 1,03 \cdot \text{Verdünnung} = \text{mg/ml Mikrotubuli}$$

Die molare Mikrotubuli-Konzentration errechnet sich über das Molekulargewicht eines Tubulin-Dimers (etwa 100.000 g/mol).

2.4.6 Aufreinigung von Kinesin

2.4.6.1 Expression von NcKin Proteinen

Frisch transformierte *E. coli*-Zellen wurden als Übernacht-Kultur auf 100 ml TP / Ampicillin-Medium angesetzt wachsen gelassen und danach in 1 bis 2 l TP / Ampicillin-Medium mit 0,2% Glukose überführt. Für die verkürzten Konstrukte wurden die Zellen in einem OD₆₀₀ von etwa 0,7 und für die Chimären von über 1 gebracht. Die Induktion mit 0,1 M IPTG erfolgte bei einer OD₆₀₀ von etwa 0,7 für die verkürzten NcKin-Konstrukte beziehungsweise mindestens 1 für die Chimären. Die Zellen wurden 20 h bei 22°C geschüttelt (220 rpm). Anschließend wurden die Bakterien sedimentiert (GSA Rotor 3000 rpm, 35 min, 4°C), gewogen (1 l ergibt etwa 4 g Zellen) und bei -70°C gefroren.

2.4.6.2 Aufreinigung über Mikrotubuli-Affinität

3 bis 5 g gefrorene Bakterien-Zellen (s. 2.4.6.1) wurden in der dreifachen Volumen-Menge AP100+ / 10 μ M ATP resuspendiert und in 50 ml Röhrchen überführt. Die Bakterien wurden dann mit Ultraschall aufgeschlossen, wobei sie in Eis gekühlt wurden, um eine zu starke Erwärmung zu vermeiden (Branson, Sonifier 250 viermal 30 s, output: 4, duty cycle: constant, 30 s Pause zwischen den Pulsen). Anschließend wurden Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Bakterien abgetrennt (42.000 rpm, 35 min, 4 C) und das Volumen des Überstandes (als S2 bezeichnet) bestimmt. Der S2 wurde mit 20 μ M Taxol, Taxol-stabilisierten Mikrotubuli (0,3 bis 0,5 mg/ml S2), 200 μ M AMP-PNP und Apyrase (5 U/ml) versetzt und dann für 15-60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kinesin-Mikrotubuli-Komplexe wurden abzentrifugiert (42.000 rpm, 30 min, 22 C) und der Überstand (S3) verworfen. Das Pellet (P3) wurde vorsichtig mit AP100 abgespült, in 1 ml KCl-Puffer resuspendiert und anschließend auf 2 ml Saccharose-Kissen geschichtet (Optima-Röhrchen). Durch Zentrifugation (Optima Rotor 100.3, 80.000, 10 min, 22 C) wurden die Kinesin-Mikrotubuli-Komplexe pelletiert und vom nicht polymerisierten Tubulin aufgetrennt. Der Überstand (S4) wurde verworfen und das Pellet (P4) wurde in etwa 200 μ l Ablösepuffer resuspendiert. Das Material wurde etwa 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um ein möglichst vollständiges Ablösen der Motormoleküle von den Mikrotubuli zu gewährleisten. Danach erfolgte die Trennung der Motoren von den Mikrotubuli durch Zentrifugation (80.000 rpm, 10 min, 22 C). Der Überstand (S5) mit dem abgelösten Kinesin wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und auf Eis aufbewahrt. Das Sediment (P5) wurde erneut wie beschrieben mit Elutionspuffer behandelt.

Der S6 Überstand wurde mit dem S5 vereint, mit 20% Glycerin gemischt, in 10-20 μ l Aliquots in flüssigem N₂ gefroren und bei -70 C gelagert.

Lösungen:

100fach PI 1 mg/ml Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor

1 mg/ml TAME

250 µg/ml Leupeptin

100 µg/ml Pepstatin A

100 µg/ml Aprotinin

AP100: 100 mM PIPES·NaOH pH 6,8

2 mM MgCl₂

1 mM EGTA

1mM EDTA

AP100+: AP100 mit 1mM DTT, 200 µM Pefabloc (Roche Diagnostics), 1fach PI

Saccharose-Kissen:

40% Saccharose in AP100

KCl-Puffer: AP100

50 mM KCl

10 µM Taxol

200 µM AMP-PNP

Ablösepuffer: AP100

10 mM ATP

10 mM MgCl₂

200 mM KCl

10 µM Taxol

2.4.6.3 Chromatografische Reinigung von NcKin

Die Präparation der verkürzten Konstrukte erfolgte in einem einstufigen chromatografischen Prozess (Crevel *et al.*, 1999). 3 bis 5 g Zellen wurden in 3fache Volumen-Menge Puffer A mit 75 mM NaCl, Proteaseinhibitoren (200 µM Pefabloc, 1fach PI 1 mM DTT 0.5 mM EGTA

und je eine Spatelspitze DNaseI und Lysozym) resuspendiert. Die Zellen wurden mit Ultraschall aufgebrochen (s. 2.4.6.2) und anschließend 35 min mit 42.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde eine 5 ml SP-High-Trap Sepharose-Säule (Amersham) an die FPLC-Anlage (Amersham) angeschlossen. Die Säule wurde zuerst mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Eichung des an die FPLC angeschlossenen Leitfähigkeitsmessers wurde die Säule zuerst mit Puffer B gewaschen, bis die Ionenstärke konstant blieb. Dieser Wert wurde auf 100%B gesetzt. Dann wurde die Säule mit Puffer A äquilibriert und auf Ionenstärke 0%B kalibriert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand (S2) 3,5fach verdünnt, um die Bindung des Kinesins an das Ionentauscher-Material zu ermöglichen, und mit Hilfe der Peristaltikpumpe direkt auf die Säule beladen. Nach dem Beladen wurde die Säule mit Puffer A weiter gewaschen bis die Absorption E_{280} ein Plateau erreichte. Dann wurde die Elution des Proteins gestartet mit einem manuell erzeugten Stufengradient von 50 mM bis 1 M NaCl (5 bis 100%B, durch Mischen von Puffer A und Puffer B). Der Gradient wurde in 1,5 ml Fraktionen aufgesammelt. Die Identifizierung und Reinheit der Haupt-Fraktionen wurden in einem 10%igen PAA-Gel und deren Aktivität im schnellen ATPase-Test getestet (s. 2.5.1). NcKin eluiert je nach Konstrukt zwischen 50 und 200 mM. Die Fraktionen wurden vereinigt und mit 10 oder 20% Saccharose oder Glycerin zugesetzt und 50 oder 200 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

Lösungen:

Puffer A: 20 mM Na-Phosphat pH 7,4 (pH durch Mischen von 100 mM Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 eingestellt; Dawson, 1982)

5 mM MgCl_2

Puffer B: Puffer A mit 1 M NaCl

die Puffer wurden Vakuum-filtriert und kurz vor der Aufreinigung mit 10 μ M ATP versetzt

100fach PI: s. Kapitel 2.4.6.2

Pefablock

1 M DTT

100 mM ATP

2.4.6.4 Chromatografische Reinigung von HsKin-NcKin Chimären

Die Aufreinigung der chimären Konstrukte erfolgte in Anlehnung an ein etabliertes Protokoll (Ma und Taylor, 1995a). 5 g Zellen wurden in Puffer A1 mit 100 mM NaCl und Inhibitoren (200 μ M Pefabloc, 1fach PI, 1 mM DTT und je eine Spatelspitze DNaseI und Lysozym) gelöst und wie oben beschrieben verarbeitet. Der S2 Überstand wurde zuerst auf eine aktivierte Phosphocellulose Säule (P-11, Whatmann, 2.4.3) beladen, die mit 10% Puffer B1 äquilibriert war. Die Elution der Proteine erfolgte über einen kontinuierlichen Gradient von 10% bis 100% Puffer B. Die Fraktionen des einzigen großen Elutionsmaximums wurden vereint und dreifach mit Puffer A2 verdünnt. Das Eluat wurde dann auf eine mit 20% B äquilibrierte 5 ml SP-High-Trap Sepharose-Säule (Amersham) gebracht. Der Durchfluss wurde mit Puffer A2 zweifach verdünnt und auf eine mit 10% B2 äquilibrierte 5 ml Q-High-Trap Sepharose-Säule beladen. Die Elution erfolgte über einen kontinuierlichen Gradienten 10 bis 100%B2. Die Haupt-Fraktionen wurden vereinigt und wie oben beschrieben aufbewahrt.

Lösungen:

Puffer A1: 25 mM Pipes·NaOH, pH 6,8

2 mM MgCl₂

1 mM EGTA

Puffer B1: Puffer A1 mit 1 M NaCl

Puffer A2: 25 mM Pipes·NaOH, pH 7,2

2 mM MgCl₂

1 mM EGTA

Puffer B2: Puffer A2 mit 1 M NaCl

die Puffer wurden Vakuum-filtriert und kurz vor der Aufreinigung mit 10 μ M ATP versetzt

2.4.6.5 Bestimmung der Konzentration von Proteinen

Die Bestimmung von Proteinmengen wurde mit Bradford-Reagenz (Biorad) vorgenommen. Zu jeder Messung wurde eine Eichgerade (0, 0.5, 1, 2, 5 und 10 μ g) mit Rinder-Serumalbumin (BSA) als Referenzprotein erstellt.

Bei manchen Aufreinigungen war die Verunreinigung bakterieller Proteine recht hoch. Deshalb war die Proteinbestimmung mit dem Bradford-Reagenz nicht aussagekräftig. In diesen Fällen wurde für genauere Proteinbestimmung SDS-PAGE mit verschiedenen Mengen an Protein (3, 5 und 10 μ l) durchgeführt. Die Gele wurden mit Coomassie gefärbt (2.4.2) und im feuchten Zustand mit dem "Eagle Eye System" (Stratagene) mit Auflicht dokumentiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms "NIH-Image" (Macintosh). Dabei wurde zunächst die Dichte der verschiedenen Protein-Banden jeder Spur notiert und daraus der Prozentsatz der Kinesin Bande ausgerechnet. Die aus dem Bradford-Test abgeleitete Konzentration wurde um diesen Faktor korrigiert.

2.4.7 C-terminaler Verdau von Proteinen

Carboxypeptidasen sind Enzyme, die von einem Polypeptid C-terminal Aminosäuren abspalten. Carboxypeptidase A (aus Pankreas) spaltet hauptsächlich Aminosäuren mit aromatischen oder großen aliphatischen Ketten, während Carboxypeptidase B (ebenfalls aus Pankreas) viel mehr die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet. (Ambler, 1972).

Für die CPA (Sigma-Aldrich) wurden etwa 22 μ l Suspension (entsprach 23 U) in 500 μ l gelöst und für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann abgezogen, 100 μ l 1% w/v NaH_2CO_3 zugegeben und auf Eis gestellt. Durch tropfenweise Zugabe von 0,1 N NaOH wurde das Protein gelöst (pH 8 bis 9). Die Probe wurde mit Wasser auf 500 μ l aufgefüllt (Endkonzentration 1 mg/ml). CPA wurde immer frisch angesetzt. Für die CPB (Sigma-

Aldrich) wurde eine 5 mg/ml Stocklösung in Wasser angesetzt und aliquotiert bei -20°C aufbewahrt.

Für den Verdau wurde das Protein-Konstrukt ohne Cystein-Markierung am C-Terminus verwendet. Die Kinesin-Lösung (etwa $50\ \mu\text{l}$) wurde für 1 h bei 22°C mit CPA und CPB im Verhältnis (w/w zu Kinesin) 1:10 oder 1:20 inkubiert und die Reaktion wurde mit 5 mM EDTA auf Eis gestoppt. Bei Metallopeptidasen wie CPA und CPB komplexiert EDTA das Zn^{2+} Metall und inaktiviert sie. Direkt nach der Inkubation wurde das Kinesin in dem gekoppelten ATPase-Test getestet (s.2.4.11.2).

2.4.8 Dichtegradienten-Zentrifugation und Gelfiltration

Die Bestimmung des Oligomerisierungszustandes der Motoren erfolgte im 5 bis 18% (w/v) Saccharose-Dichtegradienten und mittels Gelfiltration (Cantor und Schimmel, 1980).

Die 5, 7, 9, 11, 13, 15 und 18%igen Zuckerlösungen wurden in kaltem Phosphat Puffer A (vgl. 2.4.6.3) mit 50 oder 200 mM NaCl und $10\ \mu\text{M}$ ATP (2.4.5.1) angesetzt. Für einen Stufengradienten wurden von der hochprozentigen zu der niedrigprozentigen Lösung schrittweise $500\ \mu\text{l}$ (totales Gradient-Volumen $3.500\ \mu\text{l}$) in ein Zentrifugen-Röhrchen pipetiert und bei 4°C waagrecht 4 h aufbewahrt, um einen gleichmäßigen und reproduzierbaren Gradienten zu erhalten. Nach dem Auflegen von $300\ \mu\text{l}$ der Probe (Gemisch von 0.5 mg/ml Kinesin und je 0.1 bis 0.5 mg/ml der Standard Proteinen Aldolase $S_{w,20} = 7.4$, BSA $S_{w,20} = 4.3$ und CA $S_{w,20} = 3.2$) wurde der Gradient über Nacht zentrifugiert (Rotor SW 50.1, 37.000 rpm, 13 h, 4°C). Die Fraktionen wurden von unten über einen Schlauch, der über eine Peristaltikpumpe mit einem Fraktionssammler verbunden war, in $300\ \mu\text{l}$ Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden mit SDS-PAGE (2.4.1) aufgetrennt und die Positionen der Proteine im NIH-Image Programm analysiert. Aus der Lage der Referenzproteine wurde eine Standardkurve erstellt (Kaleidagraph, Macintosh), aus der der $S_{w,20}$ des Kinesins abgeleitet wurde.

Für die Gelfiltration wurde eine 500 μl Probe (zwischen 8 und 35 μM Kinesin) mit einer Auftragspritze abgenommen und in einer FPLC-Anlage über eine Sephadex 200-Gelfiltrationssäule (Pharmacia) beladen. Die Säule war vorab mit 1-2 Volumen partikelfreiem und entgastem Laufpuffer (Puffer A mit 50 mM oder 200 mM NaCl) äquibriert worden (Flussrate 0,2 ml/min). Der Verlauf der Auftrennung wurde mit einer UV-Messzelle (Empfindlichkeit 0,05 bis 0,2) und nachgeschaltetem Schreiber (Vorschub: 0,5 ml/min) verfolgt. Das Elutionsvolumen der Probe wurde mit dem der Standardproteine Ferritin ($r_{\text{Stokes}} = 5,9 \text{ nm}$), Aldolase ($r_{\text{Stokes}} = 4,5 \text{ nm}$), BSA ($r_{\text{Stokes}} = 3,55 \text{ nm}$), Carboanhydrase (CA) ($r_{\text{Stokes}} = 2,4 \text{ nm}$ oder Chymotrypsinogen, $r_{\text{Stokes}} = 2,24 \text{ nm}$) und Cytochrom C ($r_{\text{Stokes}} = 1,64 \text{ nm}$) (Roche Diagnostics, Sigma) verglichen. Aus der Regressionsgeraden wurde der Stokes-Radius des Kinesin-Konstrukts errechnet (Andrews, 1970).

Das native Molekulargewicht eines Proteins läßt sich nach folgender Formel aus seinem $S_{w,20}$ -Wert und Stokes-Radius errechnen:

$$M_r = (S_{w,20} \cdot n_A \cdot 6\pi \cdot \eta \cdot r_{\text{Stokes}}) / (1 - v \cdot \rho)$$

Dabei ist:

$S_{w,20}$	Sedimentationskoeffizient in H_2O bei 293 K	$[10^{-13} \text{ s}]$
M_r	Molekulargewicht	$[\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}]$
n_A	Avogadrozahl	$6,023 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
v	spezifisches Volumen des Proteins	$0,725 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$
ρ	Dichte von H_2O bei 293 K	$1 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$
η	Viskosität von H_2O bei 293 K	$10^{-3} \text{ N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$
r_{Stokes}	Stokes-Radius	$[\text{nm}]$

Aus diesen Zahlen ergibt sich:

$$M = 4128 \times S_{w,20} \times r_{\text{Stokes}} [\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}]$$

2.4.9 Biotinylierung von Cystein-markierten NcKin Konstrukten

Für die Motilitätstest (2.4.8) der verkürzten NcKin-Konstrukte mussten diese biotinyliert werden. Das eingeführte C-terminale reaktive Cystein kann mit Biotin-Maleimid konjugiert werden, so dass Motilitätstests auf einer Streptavidin-beschichteten Glasoberfläche möglich waren (Funatsu *et al.*, 1997, Inoue *et al.*, 1997, Itakura *et al.*, 1993). Das Biotin-Maleimid wurde in einer Konzentration von 10 mM in wasserfreiem DMSO gelöst. Ein sechsfacher Überschuss an Biotin-Maleimid wurde zu der Kinesin-Lösung gegeben und für 1 h auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 mM DTT gestoppt und Aggregate durch Zentrifugation (TLA 100.3, 80.000 rpm, 10 min, 4°C) entfernt. Das aktive biotinylierte Kinesin wurde dann über einen Mikrotubuli-Bindungs- und Ablöse-Schritt isoliert (Vale *et al.*, 1985b). Für diesen Zweck wurden Mikrotubuli wie oben beschrieben hergestellt (2.4.4), nur wurde statt ATPase Puffer BRB80 mit 20 μ M Taxol verwendet. Das Kinesin wurde mit drei- bis vierfachem Überschuss an Mikrotubuli und 2 mM AMP-PNP bei Raumtemperatur für ungefähr 10 min inkubiert und danach über ein 40% Saccharose-Kissen abzentrifugiert (80.000 rpm, 10 min, 22°C). Das Pellet wurde mit 5 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 200 mM KCl und 10 μ M Taxol in BRB80 für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um den aktiven Motor von Mikrotubuli abzulösen. Durch Zentrifugation (80.000 rpm, 10 min, 22°C) wurde der Motor von Mikrotubuli getrennt. Der letzte Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Das Protein wurde entweder direkt für die Motilitätstests verwendet, oder in 20 μ l Aliquots, in flüssigem N₂ gefroren und bei -70°C gelagert.

Lösungen:

BRB80: 80 mM Pipes·KOH, pH 6,8

1 mM MgCl₂

1 mM EGTA

Ablösepuffer: BRB80

200 mM KCl

20 μ M Taxol

5 mM ATP

5 mM MgCl₂

2.4.10 Motilitätstest

Die Bewegungsgeschwindigkeit der verschiedenen Kinesin-Konstrukte wurde im *in vitro* Motilitätstest untersucht. Die hierfür benötigten Mikrotubuli wurden ausgehend aus 50 μ l Tubulin-Aliquots (5 mg/ml) polymerisiert und anschließend mit 200 μ l BRB80 und 20 μ M Taxol verdünnt.

Für den konventionellen Multi-Motor-Gleit-Test (Paschal und Vallee, 1993) wurden 5 μ l Enzymlösung auf der Mitte eines Deckglases ausgestrichen. Zur Anheftung der Motormoleküle an das Glas wurde das Deckglas 1 bis 5 min in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert, danach wurden 5 mM MgCl₂, 5 mM ATP und 1 bis 2 μ M Mikrotubuli zugegeben. Die Probenkammer wurde mit einer erwärmten Mischung gleicher Teile Paraffin, Lanolin und Vaseline versiegelt. Die Bewegung von Mikrotubuli wurde bei Phasenkontrast-Einstellung durch ein Zeiss-Axiophot mit nachgeschaltetem "DVS-1000 Image Processing System" (Hamamatsu) und Schwarzweißmonitor (Burle) betrachtet. Zur quantitativen Auswertung wurden die Ereignisse auf Videobändern aufgezeichnet (Videorecorder der Firma Panasonic AG, 6720) und diese im Echtzeitmodus über das "Image Processing System" abgespielt. Um Geschwindigkeiten zu messen, wurde an dem mit einem Objektmikrometer geeichten Bildschirm manuell die Zeit gemessen, die ein Objekt für die Bewegung zwischen zwei markierten Punkten benötigte. Aus den daraus errechneten Geschwindigkeiten von mindestens 20 Mikrotubuli wurde die Standardabweichung errechnet. Die verkürzten Konstrukte wurden in einer Fließkammer getestet (Vale *et al.*, 1985). Diese besteht aus einem Objektträger, auf dem ein Deckglas an der Seite mit zwei Doppel-Klebstreifen befestigt ist, wodurch ein Zwischenraum entsteht. Zuerst wurde die Fließkammer mit 1 mg/ml Streptavidin Lösung für 10 min inkubiert. Mit einer dreifachen Menge an

Blockpuffer wurde die Fließkammer durchgespült und mit biotinyliertem Kinesin (2.4.9) in Blockpuffer gefüllt. Nach ungefähr 10 min wurde die Kammer noch einmal mit der dreifachen Menge an Blockpuffer gewaschen und mit 6 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 200 mM KCl und Mikrotubuli in Blockpuffer gefüllt. Die Bewegung der Mikrotubuli und die Auswertung deren Geschwindigkeit wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Lösungen:

BRB80: siehe 2.4.9

Blockpuffer: 1 mg/ml BSA, 0.8 mg/ml Casein und 20 µM Taxol in BRB80

2.4.11 ATPase Messungen**2.4.11.1 Grundaktivität von Kinesin**

Die Grundaktivität des Kinesin-Moleküls in der Abwesenheit von Mikrotubuli wurde mit radioaktivem [γ -³²P]ATP (Shimizu *et al.*, 2000) gemessen. Kinesin wurde in ATPase-Puffer (2.4.11.1) auf 3, 6 und 0 µM verdünnt. Durch Zugabe von 1 mM [γ -³²P]ATP wurde die Reaktion gestartet und nach verschiedenen Zeiten (0, 5, 10, 20, 30 min) Proben entnommen. Diese wurden mit 0.3 M Perchlorsäure und 1 mM NaH₂PO₄ gemischt, um die Reaktion zu stoppen. Die Proben wurden dann mit Aktivkohle vermisch, um ATP und ADP zu adsorbieren. Nach Zentrifugieren der Proben (13.000 rpm, 5 min, 22°C), wurden 100 µl des Überstands mit dem freien [³²P]-Phosphat in ein neues Eppendorfgesäß überführt. Die Strahlung der Überstände, der Pellets und des Standards (1 mM radioaktives ATP), wurde im Scintillator (Canberra Packard, Frankfurt am Main) im Cerenkov-Modus quantifiziert. Die Grundaktivität von Kinesin wurde aus dem linearen Teil der Reaktion abgeleitet.

2.4.11.2 Gekoppelter enzymatischer ATPase-Test

In diesem Test wird der ATP-Umsatz der Kinesin-Konstrukte im Gleichgewicht ("steady state") gemessen. Hier ist die ATP-Hydrolyse durch die Lactat-Dehydrogenase (LDH) und die Pyruvat-Kinase (PK) an die Oxidation von NADH in NAD^+ geknüpft, was im Fotometer bei 340 nm verfolgt werden kann (Huang und Hackney, 1994a) (Abb. 4).

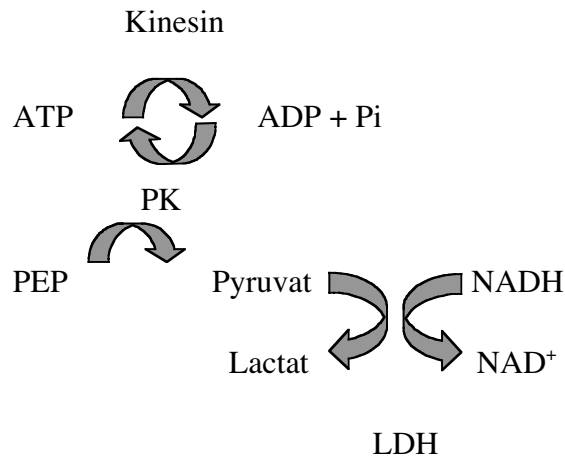


Abbildung 4: Prinzip des gekoppelten ATPase-Tests

Der Umsatz von ATP durch Kinesin wird über die glycolytischen Enzyme Pyruvat-Kinase (PK) und Lactat-Dehydrogenase (LDH) an den Verbrauch von NADH gekoppelt. Als Co-Substrat für die Pyruvat-Kinase wird Phosphoenolpyruvat (PEP) eingesetzt. Die Abnahme der NADH-Konzentration wird fotometrisch verfolgt (E_{340}).

Die eingesetzten Mikrotubuli wurden wie im Kapitel 2.4.4 präpariert.

Der Reaktionsansatz besteht aus folgenden Komponenten:

4 μl ATP (4°C)

4 μl PEP

4 μl NADH

2 μl Hilfs-Enzyme (PK, LDH)

x μl Mikrotubuli

auf 79 μl ATPase-Puffer auffüllen

Start: 1 μl Kinesin (1:1-1:50 verdünnt)

Der Reaktionsansatz wurde in eine 50 μl Quarz-Küvette (Hellma) überführt und über 3 min bei 340 nm im Fotometer (Uvicon 930, Lohhof) verfolgt. Die Steigung im anfänglichen, steilsten Bereich der Kurve wurde bestimmt und notiert. Es wurden Messreihen durchgeführt, bei denen die Mikrotubuli-Konzentration bei sättigender ATP-Konzentration variiert wurde. Die resultierenden Extinktionsabnahmeraten wurden gegen die jeweiligen Mikrotubuli-Konzentrationen aufgetragen und an die Michaelis-Menten Gleichung angepasst (Kaleidagraph Software, Macintosh):

$$y = (B + V_{\max} \cdot [\text{MT}]) / ([\text{MT}] + K_{0,5}\text{MT}).$$

Das Programm extrapoliert maximale Extinktionsabnahmerate [$V_{\max} = \Delta E/\text{min}$] und die halbmaximale Aktivierungskonstante $K_{0,5}\text{MT}$ (μM Tubulin).

Lösungen:

ATPase-Puffer: 12 mM ACES (N-[2-acetamino]-2-aminoethanesulfonic acid)·KOH pH 6,8, 25 mM K-Acetat, 2 mM Mg-Acetat, 0.5 mM EGTA

ATP : 10 mM ATP in H_2O , pH 7,0

Enzym-Mix : 20 μl Lactat-Dehydrogenase (5,5 U/ μl , Glycerin-Lösung, Roche)

20 μl Pyruvat-Kinase (2,0 U/ μl , Glycerin-Lösung, Roche Diagnostics)

60 μl ATPase-Puffer

PEP: Phospho(enol)pyruvate (PEP, Mono-Kaliumsalz, Sigma). Es wurde eine 4 mg/ml Lösung hergestellt und der pH mit 1 M KOH auf 7.0 eingestellt

NADH: Sigma, 2 mg Röhrchen; Inhalt wurde in 640 μl ATPase-Puffer gelöst und ergibt eine NADH-Konzentration von 4 mM

Mikrotubuli-Verdünnungspuffer:

ATPase-Puffer mit 20 μM Taxol

Kinesin-Verdünnungspuffer:

Puffer A oder AP100 (2.4.6.2 und 2.4.6.3), 150 mM NaCl und 1 mg/ml BSA

2.4.11.2.1 Berechnungen zum ATPase-Test

Die Umrechnung der Extinktionsabnahme in die ATP-Konzentration erfolgt über das Lambert-Beersche Gesetz:

$$\Delta E/t = \varepsilon \cdot \Delta c_{\text{NADH}} \cdot d/t$$

wobei:

$\Delta E/t$: Extinktionsänderung pro Zeit

d: Schichtdicke (1 cm)

ε : Extinktionskoeffizient (für NADH; 6,22 / mM/cm)

Da NADH-Oxidation und ATP-Verbrauch im Test 1:1 aneinander gekoppelt sind, ergab sich durch Einsetzen von V_{max} für $\Delta E / t$ nach Umformung die Gleichung:

$$\Delta c_{\text{ATP}} / s = V_{\text{max}} / 6,22 \cdot 60 \quad \mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$$

Berechnung des ATP-Umsatzes (k_{cat}):

Der k_{cat} ist der maximale Substratumsatz eines Enzyms

Unter Verwendung der Proteinkonzentration (2.4.6.5) kann der k_{cat} des jeweiligen Kinesin-Konstruktes aus der maximalen Änderung der ATP-Konzentration $\Delta c_{\text{ATP}} / s$ bezogen auf die Kinesin-Monomer-Konzentration bestimmt werden:

$$k_{\text{cat}} = \Delta c_{\text{ATP}} / (s \cdot [\text{Kinesin}])$$

Daraus ergibt sich die maximale Menge an ATP pro Sekunde, die von einem Kinesin-Kopf hydrolysiert wird.

2.4.11.3 MantADP-Freisetzungsexperiment

Tubulin wurde, wie im 2.4.4, polymerisiert und die Konzentration ausgerechnet.

Damit das an Kinesin gebundene ADP ersetzt werden kann, wurde aufgereinigtes NcKin mit einem vierfachen Überschuss fluoreszierenden MantATPs inkubiert (15 min bei 25°C). Während der Inkubation wurden mehrere "Mini-Spin Column" mit 300 μl (600 μl Totalvolumen) Sephadex G25 (Amersham) gefüllt und kurz abzentrifugiert. Das Material wurde einmal mit ATPase-Puffer (2.4.11.2) gewaschen und dreimal mit 1 mg/ml BSA in ATPase-Puffer abgesättigt. Die BSA-Lösung wurde per Schwerkraft langsam durchfließen gelassen, bevor sie endgültig kurz abzentrifugiert wurde. Um das überschüssige BSA zu entfernen, wurden die Säulchen sechsmal mit ATPase-Puffer mit 200 mM KCl gewaschen. Um den Kinesin-MantADP Komplex von dem überschüssigen MantATP zu trennen, wurden je 100 μl der Probe auf die Säulchen aufgetropft und in frische Reaktionsgefäße abzentrifugiert. Die Fraktionen wurden vereinigt und die Konzentration des Kinesin-MantADP Komplexes wurde mit dem Bradford Reagenz (s. 2.4.6.5) bestimmt.

Die Messung erfolgte im Spektralfluorimeter Aminco Bowman, Modell AB2, mit Anregungswellenlänge bei 365 nm und Emissionswellenlänge bei 445 nm. Die Bandbreite betrug 4 nm auf der Anregungsseite und 2 nm auf Emissionsseite. Die Empfindlichkeit der Messung konnte über einen Sekundärelektronenvervielfacher geregelt werden und wurde zwischen 700 und 850 V eingestellt, so dass das maximale Signal etwa 60% der nutzbaren Ausgabe betrug (3 bis 6 V Ausgabesignal). In einer Küvette (Greiner) wurde 1 ml Ansatz mit ungefähr 100 nM Kinesin in ATPase-Puffer gegeben. Nach Zugabe von 1 mM ATP und jeweils substoichiometrischen Mikrotubuli-Mengen (0 bis 10 nM) wurde die Küvette schnell ins Fluorimeter gebracht und der Abfall der Fluoreszenz wurde zeitlich verfolgt. Die Zeitkurven wurden in das Computerprogramm Kaleidagraph importiert und an eine monoexponentielle Funktion angepasst. Die Raten, die sich aus diesen Kurven ergaben, wurden dann gegen die Mikrotubuli-Konzentrationen aufgetragen, woraus sich eine Gerade ergab. Die Steigung dieser Gerade reflektiert die bimolekulare Binderate ($K_{bi}ADP$ in $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) der Kinesin-Mikrotubuli-Assoziation (Hackney, 1995).

In einer Variation dieses Experimentes wurde die Koordination zweier Köpfe von Kinesin Konstrukten getestet. Kinesin (etwa 100 nM/ml) wurde mit steigenden Mikrotubuli-Konzentrationen von 0 bis 100 nM Endkonzentration im Fluorimeter versetzt. Nach jeder Mikrotubuli-Zugabe wurde das Fluoreszenz-Signal notiert, bis sich ein Plateau einstellte. Anschließend wurde ein großer Überschuss an ATP zugegeben (1 mM), um das MantADP des zweiten Kopfes, sofern vorhanden, frei zu setzen. Dieser Wert entsprach der Grundfluoreszenz für frei vorliegendes MantADP (0%). Die Datenpunkte wurden gegen die Mikrotubuli-Konzentration aufgetragen und die relative Lage des Plateaus bestimmt. Hierbei wurde das Anfangsfluoreszenzsignal als 100% gesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen an C-terminal verkürzten *N. crassa* Kinesinkonstrukten

Zur funktionellen Kartierung von Domänen, die für die Motoraktivität wichtig sind, wurden NcKin Konstrukte hergestellt, die am C-terminalen Ende verkürzt sind. Die Enden dieser Konstrukte wurden so gewählt, dass sie den abgeleiteten Domänengrenzen so gut wie möglich entsprechen (Kozielski *et al.*, 1997, Seeberger *et al.*, 2000). Außerdem sollten die Konstrukte mit den schon untersuchten Verkürzungen des *Drosophila* Kinesins (DmKHC; Jiang *et al.*, 1997) vergleichbar sein (Abb. 5).

	Motor				
NcKin	~~~~MSSSAN	SIKVVARFRP	QNRVEIESGG	QPIVTFQGPD	T.....CT
NhKin1	~~~~~MSSAN	SIKVVARFRP	QNKVELASGG	MPIVSFDGED	T.....CS
AnKin	MASSTSNPSN	TIKVVARFRP	QNKVELASGG	QPIVEFENDE	T.....CS
SrKin	~~~~~MSGN	NIKVVCRFRP	QNSLEIREGG	TPIIDIDPEG	TQLEL.....
UmKin2	~~~~~MSN	NIKVVCRFRP	PNAIEQREGS	DIVVDFSDDG	SLVKLTRGVS
HsKin	~~~MADLAEC	NIKVMCRFRP	LNSEVNRGD	KYIAKFQG..	.EDTVVI...
MmKin	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
DmKHC	~~~~~	~~~~~P	LNDSEEKAGS	KFVVKFPNNV	EENCISI...
NcKin	VDSKEAQGSF	TFDRVFDMSC	KQSDIFDFSI	KPTVDDILNG	YNGTVFAYGQ
NhKin1	LDSKEAQGSF	TFDRVFDMAC	KQQDIFDFSI	RSTVDDILNG	YNGTVFAYGQ
AnKin	INSKEASGSF	TFDRVFPMS	KQTDVFNYSI	APTVDLILNG	YNGTVFAYGQ
SrKin	.KGKEFKGNF	NFDKVFGMNT	AQKDVFDYSI	KTIVDDVTAG	YNGTVFAYGQ
UmKin2	TSGPE.AGGF	VFDKVFPMNT	MQRDVFEFGI	KETVEDVLNG	YNGTIFAYGQ
HsKinASKPY	AFDRVFQSS	SQEQVYNDCA	KKIVKDVLEG	YNGTIFAYGQ
MmKin	~~~~~	~~~RVLPPNT	TQEQVYNACA	KQIVKDVLEG	YNGTIFAYGQ
DmKHCAGKVY	LFDKVFKNPNA	SQEKVYNEAA	KSIVTDVLAG	YNGTIFAYGQ
NcKin	TGAGKSYTMM	GTSIDDPDGR	GVIPRIVEQI	FTSILSSAAN	IEYTVRVSYM
NhKin1	TGAGKSYTMM	GTNIDDDDGR	GVIPRIVEQI	FASIMSSPGT	IEYTVRVSYM
AnKin	TGAGKSYTMM	GSDIDDEVGK	GIIPRIVEQI	FASILTSPSN	IEYTVRLSYM
SrKin	TGSGKTFMTM	GADIDDEKTK	GIIPRIVEQI	FDSIMASPSN	LEFTVKVSYM
UmKin2	TGSGKTFMTM	GSDIDNDNLK	GIIPRITEQI	FENIMASPPH	LEYLVKVSYM
HsKin	TSSGKTHTME	GK.LHDPEGM	GIIPRIVQDI	FNYIYSMDEN	LEFHIKVSYP
MmKin	TSSGKTHTME	GK.LHDPQLM	GIIPRIAHI	FDHIYSMDEN	LEFHIKVSYP
DmKHC	TSSGKTHTME	GV.IGDSVKQ	GIIPRIVNDI	FNHIYAMEVN	LEFHIKVSYY

P-loop

NcKin	EIYMERIRDL	LAPQNDNLPV	HEEKNRGVYV	KGLLEIYVSS	VQEVYEVMMR
NhKin1	EIYMERIRDL	LAPQNDNLPV	HEEKNRGVYV	KGLLEIYVSS	VQEVYEVMMR
AnKin	EIYMERIRDL	LVPQNDNLPV	HEEKSRGVYV	KGLLEIYVSS	VQEVYEVMMR
SrKin	EIYMEKVRDL	LNPSSENLPI	HEDKTKGVYV	KGLLEIYVSS	TDEVYEVMMR
UmKin2	EIYMEKIRDL	LAPQNDNLQV	HEEKNRGVYV	KGLSDFYVGG	QADVYEVMMR
HsKin	EIYLDKIRDL	LDVSKTNLSV	HEDKNRVPYV	KGCTERFVCS	PDEVMDTIDE
MmKin	EIYLDKIRDL	LDVSKTNLAV	HEDKNRVPYV	KGCTERFVSS	PEVMDVIDE
DmKHC	EIYMDKIRDL	LDVSKVNLSV	HEDKNRVPYV	KGATERFVSS	<u>PEVFEVIEE</u>

NcKin	GGNARAVAAT	NMNQESSRSH	SIFVITITQK	NVETGSAKSG	QLFLVDLAGS
NhKin1	GGNARAVAAT	NMNQESSRSH	SIFVITITQK	NVETGSAKSG	QLFLVDLAGS
AnKin	GGNARAVAAT	NMNQESSRSH	SIFVITVTQK	NLETGSAKSG	QLFLVDLAGS
SrKin	GSNNRVVAYT	NMNAESSRSH	SIVMFTITQK	NVDTGAAKSG	KLYLVDLAGS
UmKin2	GGLARAVSST	NMNAESSRSH	SIFLITIQQR	NTETGSAKTG	NLYLVDLAGS
HsKin	GKSNRHVAVT	NMNEHSSRSH	SIFLINVKQE	NTQTEQKLSG	KLYLVDLAGS
MmKin	GKANRHVAVT	NMNEHSSRSH	SIFLINIKQE	NVETEKKLSG	KLYLVDLAGS
DmKHC	GKSNRHIAVT	NMNEHSSRSH	SVFLINVKQE	NLENQKKLSG	<u>KLYLVDLAGS</u>

Switch I Switch II

NcKin	EKVGKTGASG	QTLEEAKKIN	KLSALGMVI	NALTDGKSSH	VPYRDKLTR
NhKin1	EKVGKTGASG	QTLEEAKKIN	KLSALGMVI	NALTDGKSSH	IPYRDKLTR
AnKin	EKVGKTGASG	QTLEEAKKIN	KLSALGMVI	NALTDGKSTH	IPYRDKLTR
SrKin	EKVGKTGASG	QTLEEAKKIN	KSLTALGMVI	NALTDGKSSH	VPYRDKLTR
UmKin2	EKVGKTGASG	QTLEEAKKIN	KLSALGMVI	NALTDGKSSH	IPYRDKLTR
HsKin	EKVSKTGAEG	AVLDEAKNIN	KLSALGNVI	SALAEGS.TY	VPYRDKMTR
MmKin	EKVSKTGAEG	AVLDEAKNIN	KLSALGNVI	SALAEGTKTH	VPYRDKMTR
DmKHC	EKVSKTGAEG	TVLDEAKNIN	KLSALGNVI	SALADGNKTH	IPYRDKLTR

Halsverbindung

NcKin	ILQESLGGNS	RTTLIINCSP	SSYNDAETLS	TLRFGMRAKS	IKNKAKVNAE
NhKin1	ILQESLGGNS	RTTLIINCSP	SSYNDAETLS	TLRFGLRKS	IKNKAKVNAE
AnKin	ILQESLGGNS	RTTLIINCSP	SSYNDAETVS	TLRFGVRAKA	IKNKAKVNAE
SrKin	ILQESLGGNS	RTTLIINCSP	SSYNEAETLS	TLRFGARAKS	IKNKAKVNAD
UmKin2	ILQESLGGNS	RTTLIVNASP	CVYNADETLS	TLRFGVRAKS	IKNKARVNAE
HsKin	ILQDSLGGNC	RTTIVICCSP	SSYNESETKS	TLLFGQRAKT	IKNTVCVNVE
MmKin	ILQDSLGGNC	RSRMFICCSP	SSYNDAETKS	TLMFGQRAKT	IKNTASVNLE
DmKHC	ILQESLGGNA	RTTIVICCSP	ASFNESETKS	TLDGFRRAKT	VKNVVCVNEE

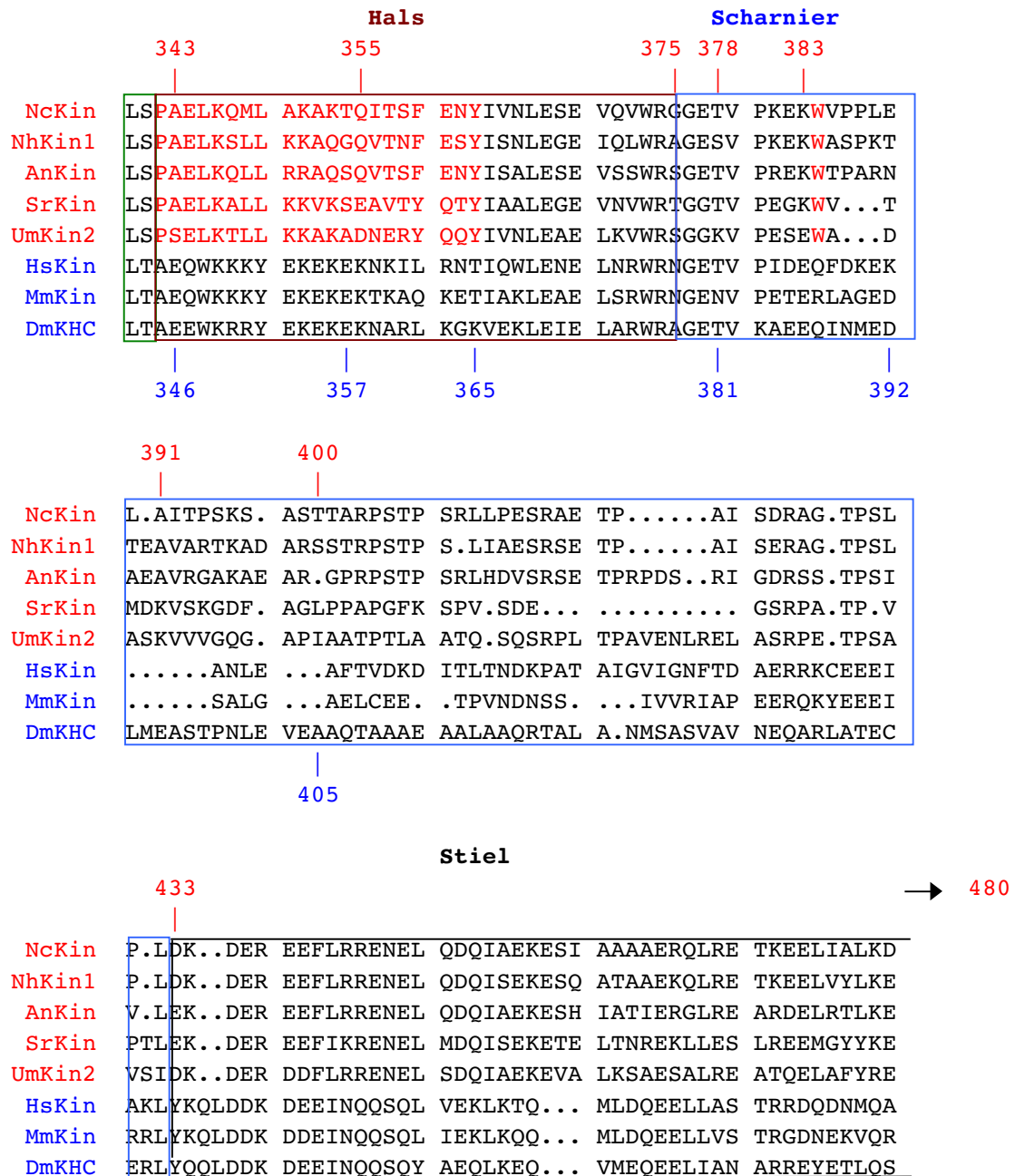


Abbildung 5: Sequenzvergleich des N-terminalen Bereichs verschiedener konventioneller Kinesine

Sequenz-Vergleich vom Motor- bis zum Anfang der Stieldomäne zwischen mehreren Pilzkinesinen (Namen in rot) und Tierkinesinen (Namen in blau). Im Motorbereich sind die konservierten P-Loop-, Switch I- und Switch II-Motive fett hervorgehoben. In der Sequenz sind die im Pilz konservierten Aminosäuren der Hals- und Scharnierregion rot hervorgehoben. Über dem Sequenzvergleich sind die Positionen der C-terminalen NcKin-Verkürzungen in rot angegeben, darunter in blau die vergleichbaren Enden der *Drosophila*-Konstrukte (Jiang et al., 1998).

3.1.1 Herstellung und Isolierung von C-terminal verkürzten *N. crassa* Kinesin Konstrukten

Der Satz der verwendeten N-terminalen Kinesinfragmente umfasste acht Konstrukte, NcKin 343 (Aminosäure 1 bis 343), 375, 378, 383, 391, 400, 433 und 480 (Abb. 5; vgl. 2.3.14). Das kürzeste Konstrukt enthielt nur die Kopfdomäne, das nächste zusätzlich den Hals, die folgenden in zunehmendem Maße Teile des Scharniers, das letzte noch zusätzlich den Anfang des Stiels. Für alle Konstrukte wurden auch Varianten mit einem C-terminalen cysteinhaltigen 9-Peptid ("reaktives Cystein", Funatsu *et al.*, 1997) kloniert, um chemische Koppelungen mit Biotin oder Fluorophoren zu ermöglichen.

Alle Konstrukte konnten in einem T7-Promotor Vektorhintergrund bakteriell exprimiert werden. Es wurde gezeigt, dass die bakteriell exprimierten Konstrukte im Motilitätstest vom aus Pilz gereinigten Motor nicht zu unterscheiden sind (Ulrike Madjic Doktorarbeit).

Alle diese Proteinkonstrukte wurden nach derselben Vorgehensweise exprimiert und aufgereinigt (2.4.6.1). Die einstufige chromatografische Aufreinigung führte zu einer mindestens 85% gereinigten Proteinfraction (Abb. 6).

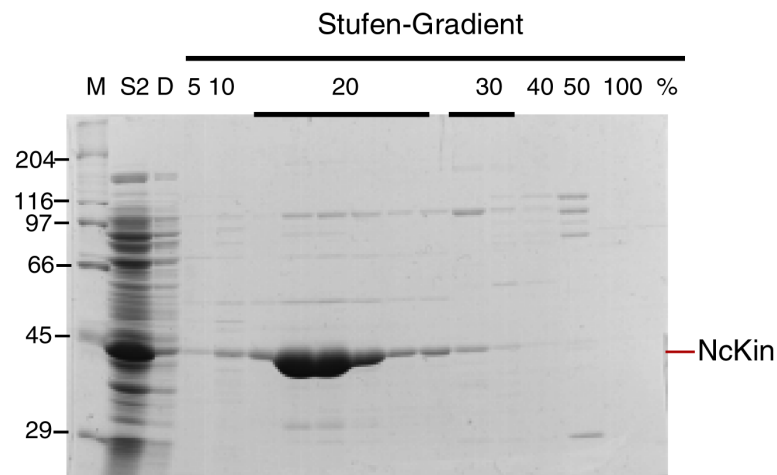


Abbildung 6: *Aufreinigung der verkürzten NcKin Konstrukte*

Coomassie-gefärbtes 10%iges PAA-Gel mit repräsentativen Proben von NcKin 391 Protein-Aufreinigung. E. coli Zellen, die das exprimierte Protein enthielten, wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen und abzentrifugiert (S2). Der Überstand nach Zentrifugation wurde auf eine an der FPLC-Anlage angeschlossene SP-High-Trap Sepharose Säule geladen und über einen Stufen-Gradient mit NaCl eluiert (2.4.6.3). Für alle C-terminal verkürzten Konstrukte ergab sich ein sehr ähnliches Elutionsverhalten.

M: *Protein-Größenstandard*

S2: *Der bakterielle Überstand nach Aufschluss und Zentrifugation*

D: *Durchfluss nach Auftragen auf die SP-Sepharose*

5-100% B: *Der angesetzte Stufen-Gradient durch prozentuales Mischen von Puffer B mit Puffer A (Salzbedingungen von 50 mM bis 1 M NaCl) für die Elution des Kinesins*

3.1.2 Oligomerisierung

Da das Modell der alternierenden Köpfe dimere Motoren voraussetzt, wurde der Oligomerisierungszustand bestimmt. Mit Hilfe von Gelfiltrationen und Dichtegradientenzentrifugationen (2.4.8) wurden Stokes-Radius und Svedberg-Konstante der Proteine gemessen, und hieraus das Molekulargewicht (kDa) abgeleitet (für ein Beispiel vgl. Abb. 7 und 8). Der Vergleich zur errechneten Masse der Polypeptidkette gab Aufschluss über den Oligomerisierungszustand.

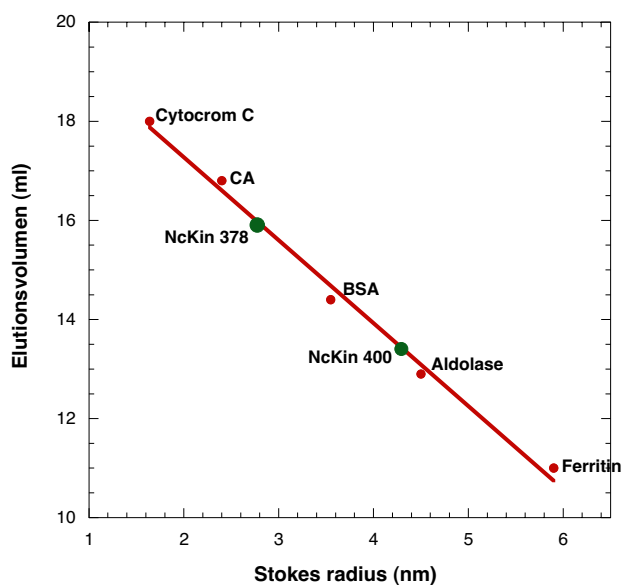


Abbildung 7: Gelfiltrationsexperiment

Beispiel einer Eichgerade einer Gelfiltration mit der Sephadex 200 Säule (2.4.8). Die Elutionsvolumina der Referenzproteine Ferritin ($r_{\text{Stokes}} = 5,9 \text{ nm}$), Aldolase ($r_{\text{Stokes}} = 4,5 \text{ nm}$), Rinderserum-Albumin (BSA, $r_{\text{Stokes}} = 3,55 \text{ nm}$), Carboanhydrase (CA, $r_{\text{Stokes}} = 2,4 \text{ nm}$) und Cytochrom C ($r_{\text{Stokes}} = 1,64 \text{ nm}$) sind gegen ihre Stokes Radien aufgetragen und die Messpunkte an eine lineare Funktion angepasst. Hierüber konnten die Stokes-Radien ermittelt werden, wie hier am Beispiel je einer Präparation des Monomers NcKin 378 und NcKin 400 gezeigt ist.

Die Ergebnisse dieses Experiments sind auf Tabelle 3 dargestellt.

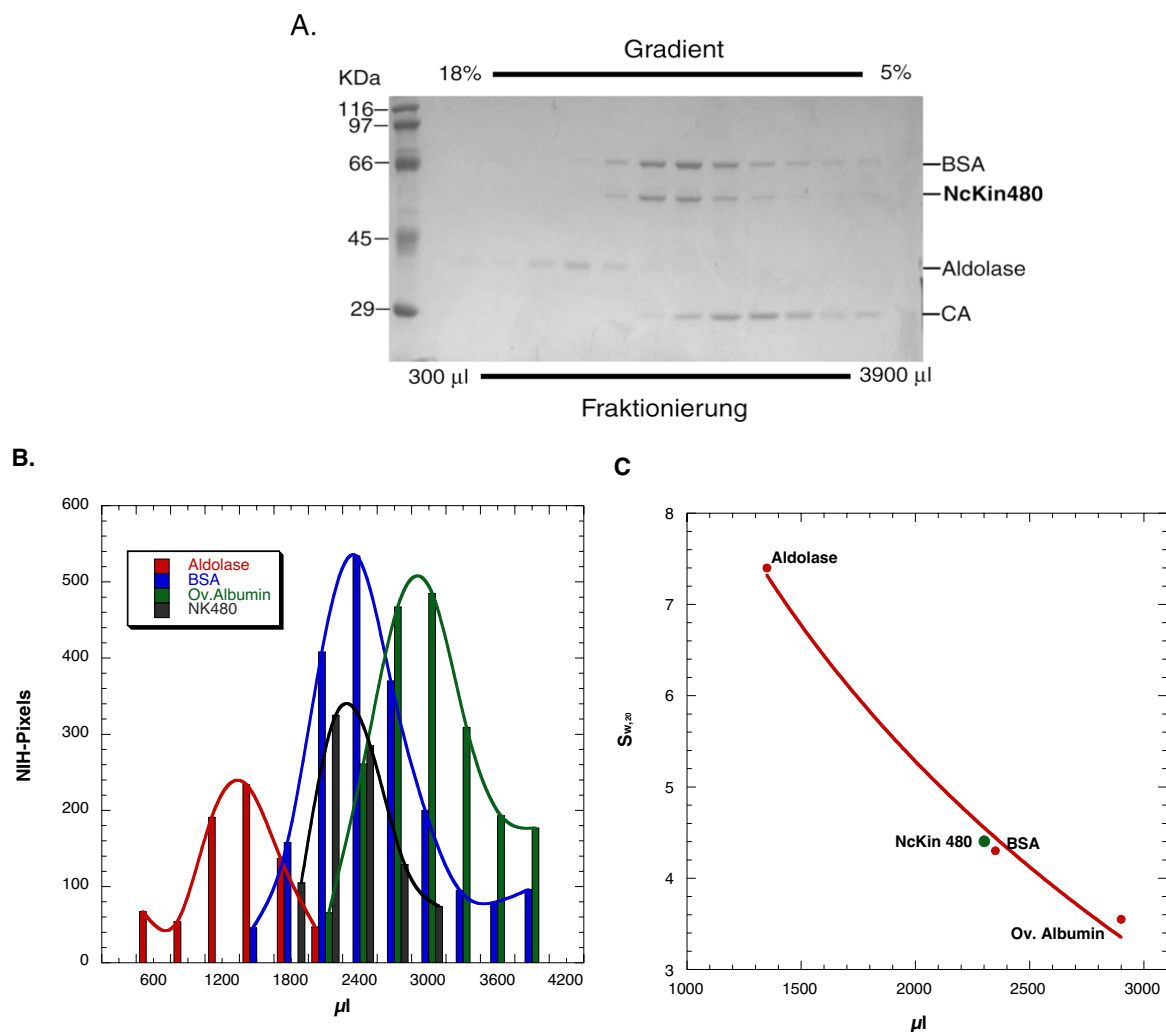


Abbildung 8: Dichtegradientenzentrifugation

A: Coomassie gefärbtes 10%iges PAA Gel von der Fraktionierung des 5-18% Saccharose-Gradienten. Die Referenzproteine Aldolase ($S_{w,20} = 7,4$), BSA ($S_{w,20} = 4,3$), CA ($S_{w,20} = 3,2$) und das Kinesin-Protein (in diesem Beispiel das dimere NcKin 480) wurden jeweils in einer Menge von 0,2 bis 0,5 mg zusammen gemischt und auf dem Gradienten aufgeschichtet. Nach 17 h Zentrifugation wurde der Gradient in 300 μ l Aliquots fraktioniert und analysiert (2.4.8).

B: Die Auswertung der Proteinbanden des Gels erfolgte densitometrisch mit dem Computerprogramm NIH-Image. Hierzu wurden die Coomassie-gefärbten Gele mit einer CCD-Kamera fotografiert und im Computer jeder Fraktion ihre Dichte zugeordnet.

C: Die Sedimentationskoeffizienten ($S_{w,20}$) der Standardproteine wurden gegen das interpolierte Fraktionsvolumen aufgetragen und einer logarithmischen Funktion angepasst. Hierüber konnte dann aus dem ausgerechneten Elutionsmaximum des NcKin Konstrukts dessen $S_{w,20}$ -Wert ausgerechnet werden.

Die Ergebnisse dieses Tests sind in Tabelle 3 dargestellt.

Konstrukt	r_{Stokes} (nm)	$S_{w,20}$	Masse ausgerechnet (kDa)	Masse aus Sequenz (kDa)	Oligomeri- sierungs- Zustand
NcKin 343	$2,8 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,2$	38	37,4	monomer
NcKin 378	$2,9 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,2$	42	41,9	monomer
NcKin 383	$3,6 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,0$	55	42,5	monomer
NcKin 433 Δ Neck	$4,3 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,0$	58	44,2	monomer
NcKin 391	$4,8 \pm 0,1$	$4,6 \pm 0,2$	90	43,4	dimer
NcKin 400	$4,2 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,2$	71	43,8	dimer
NcKin 433	$4,7 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,1$	83	47,2	dimer
NcKin 480	$5,0 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,2$	87	52,8	dimer
NcKin 928 *	$5,6 \pm 0,1$	$9,3 \pm 0,3$	215	105,0	dimer

Tabelle 3:

Oligomerisierungscharakteristika der C-terminal verkürzten Konstrukte. Für jedes Protein-Konstrukt wurden mindestens zwei unterschiedliche Präparationen in Gelfiltrations- und Dichtegradienten-Experimenten getestet.

* Die Oligomerisierungsexperimente für das Volllängen-Konstrukt NcKin 928 wurden von Ulrike Majdic durchgeführt (Doktorarbeit 1999).

In der Tabelle 3 sind die Ergebnisse dieser Experimente aufgelistet. Die kürzeren Proteine NcKin 343 bis NcKin 383 sind monomer; ab einer Länge von 391 Aminosäuren sind die Moleküle dimer. Bei tierischen Kinesinen reichen kürzere Konstrukte, um eine Dimerisierung zu ermöglichen. So ist das zu dem *Neurospora* NcKin 378 homologe *Drosophila* Kinesin Konstrukt DmKHC 381 eindeutig dimer (Jiang *et al.*, 1997). Es ist aus folgenden Gründen anzunehmen, dass NcKin tatsächlich zusätzliche Bereiche benötigt, um zu dimerisieren:

(1) Eine teilweise Degradation konnte ausgeschlossen werden, denn es war möglich, diese Konstrukte am C-terminalen reaktiven Cystein mit Biotin-Maleimid zu markieren und Motilitätstests durchzuführen (2.4.9 und 2.4.10).

(2) Dimerisierung ist ein quantitativer Prozess, der eine Dissoziationskonstante K_d für die Dimerisierung aufweist. Für die Gelfiltrationen der NcKin Konstrukte wurden Konzentrationen von etwa 8 μM verwendet. Das homologe DmKHC 381 dimerisiert schon bei einer Konzentration von 1 μM , was bedeutet, dass die Dissoziationskonstante für NcKin 378 viel höher liegt.

Da in tierischen Kinesinen der Hals eine Superhelix bildet, die die beiden Köpfe zusammenhält, stellte sich die Frage, ob auch NcKin durch die Halsdomäne dimerisiert. Daher wurde noch ein Konstrukt hergestellt, NcKin 433 Δ Neck (2.3.14), das bis zum Scharnier reicht, aber keine Halsdomäne mehr besitzt. Aufgrund der Auswertung der Gelfiltrationen und Dichtegradientenzentrifugationen wurde dieses Konstrukt als Monomer charakterisiert. Folglich ist für die Dimerisierung die Ausbildung der Hals-Superhelix wichtig. Ohne zusätzliche Aminosäuren der Scharnierregion ist diese Struktur jedoch nicht stabil.

In Dichtegradientenzentrifugationen war es möglich, niedrige Ionenstärken zu verwenden. Auch im ATPase-Puffer (Ionenstärke ungefähr 40 mM) blieben die kürzeren Konstrukte monomer, was darauf hindeutet, dass sich zwischen den zwei Köpfen des Dimers nur sehr schwache Salzbrücken ausbilden können. Andernfalls würden unter niederionischen Bedingungen Dimere entstehen.

3.1.3 Motilitätstests

Nachdem der Oligomerisierungszustand der verschiedenen Proteinkonstrukte eindeutig bestimmt war, wurden die Kinesin-Varianten auf ihre Fähigkeit getestet, Mikrotubuli zu bewegen. Es wurde festgestellt, dass die Cystein-Markierung keinen Einfluss auf den ATP-

Umsatz hatte. Deshalb wurden sie für die Motilitäts- und Prozessivitätsstudien weiter verwendet.

Da diese Konstrukte wegen des Fehlens der C-Termini nicht in der Lage waren, auf dem Deckglas zu binden, wurde Biotin-Maleimid am reaktiven Cystein angebracht (2.4.9). Biotin ist in der Lage an Streptavidin zu binden, so dass eine Fließkammer zunächst mit Streptavidin beschichtet werden konnte und hinterher biotinyliertes Kinesin aufgebracht werden konnte. Unter geeigneten Bedingungen konnte dann die Bewegung der Mikrotubuli mit Hilfe von Videomikroskopie beobachtet werden.

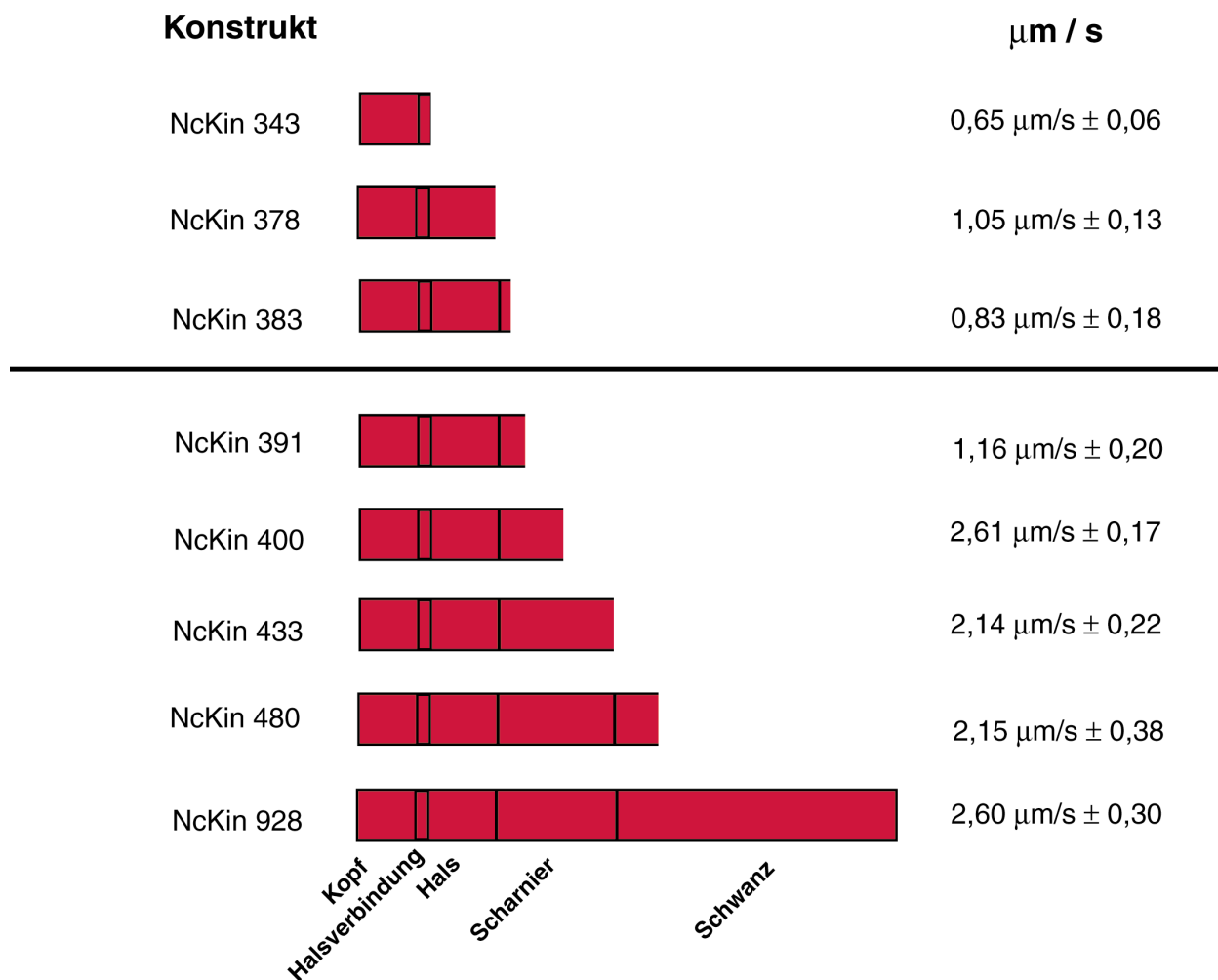


Abbildung 9: Motilitätstests

Schematische Darstellung der NcKin C-terminal verkürzten Konstrukte mit deren Gleitgeschwindigkeiten. Für die verschiedenen Konstrukte wurden diese im videomikroskopischen Motilitätstest ermittelt (2.4.10). Die angegebenen Geschwindigkeiten sind Mittelwerte und Standardabweichung von mindestens 20 Mikrotubuli. Durch den Strich sind die monomeren von den dimeren Konstrukten getrennt.

Alle Proteinkonstrukte waren motil (Abb. 9). Die Motoren NcKin 400, NcKin 433 und NcKin 480 waren in Bezug auf ihre Geschwindigkeit nicht vom NcKin-Wildtyp zu unterscheiden. Das Konstrukt NcKin 391 war langsamer ($1,16 \mu\text{m/s}$) als die anderen Dimere, vermutlich durch sterisch unvorteilhafte Bindung auf der Glasoberfläche. Die monomeren Motoren waren auch in der Lage, Mikrotubuli zu bewegen, allerdings mit viel langsameren Geschwindigkeiten.

3.1.4 Kinetische Studien

Da Motorproteine die Energie für die Bewegung aus der ATP-Hydrolyse beziehen, war es wichtig die Mutanten auch im Hinblick auf ihre ATPase-Eigenschaften zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die basale und die Mikrotubuli-aktivierte ATPase-Aktivität, sowie die ADP-Freisetzung gemessen.

3.1.4.1 Messung der Grundaktivität der verkürzten Konstrukte

Kinesin hat auch in Abwesenheit von Mikrotubuli eine ATPase-Grundaktivität. Diese Basalaktivität gibt Aufschluss darüber, ob der katalytische Mechanismus grundsätzlich funktioniert, und in welchem Grade das Molekül durch Mikrotubuli aktiviert werden kann. Da die Grundaktivität sehr niedrig ist, wurde radioaktives $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ im Test verwendet (2.4.11.1).

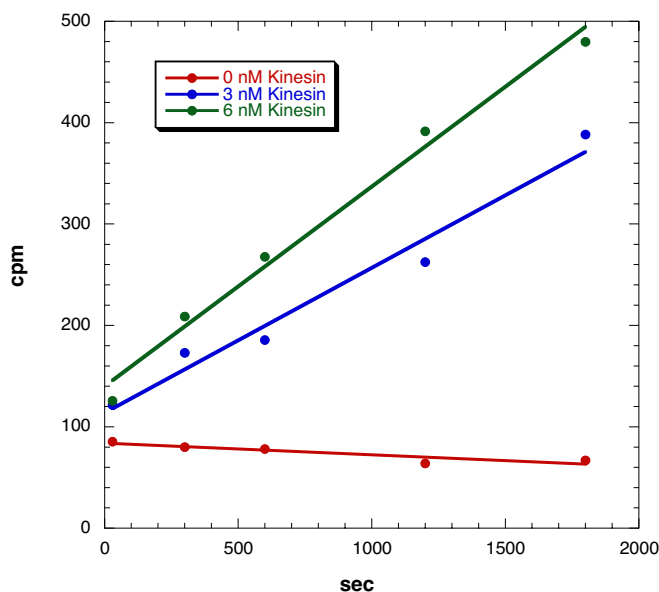


Abbildung 10: Basale ATPase Aktivität

3 und 6 nM Protein-Konstrukt wurden bei Raumtemperatur und in Abwesenheit von Mikrotubuli mit 1 mM $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ gemischt. Die Reaktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mit Perchlorsäure gestoppt (vgl. 2.4.11.1). Die Überstände mit dem freigesetzten $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-Phosphat}$ wurden im Tscherenkow-Modus gemessen. Mit Hilfe des Auswertungsprogramms Kaleidagraph wurde das freigesetzte $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-Phosphat}$ einer Messreihe (in cpm) gegen die Zeiten aufgetragen. Die Steigungen der Kurven (cpm/s) wurden dann um den Leerwert korrigiert (Ansatz ohne Kinesin). Mit Hilfe der Proteinkonzentration im Ansatz wurde dann die basale ATPase-Aktivität der verschiedenen Konstrukte bestimmt.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Mit Hilfe des Auswertungsprogramms Kaleidagraph wurde das freigesetzte $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-Phosphat}$ einer Messreihe (in cpm) gegen die Zeiten linear aufgetragen (Abb. 10). Die Steigungen der Kurven (cpm/s) wurden um den Leerwert korrigiert (Ansatz ohne Kinesin). Die Radioaktivität von 1 mM ATP wurde aus dem Mittelwert der Summe der Überstände und der Pellets einer Messreihe ermittelt. Mit Hilfe der Proteinkonzentration im Ansatz wurde dann die basale ATPase-Aktivität der verschiedenen Konstrukte bestimmt.

Alle getesteten Konstrukte wiesen ohne Mikrotubuli-Zugabe eine ATPase-Aktivität zwischen 0,01 und 0,05 s^{-1} auf (Tab. 4).

Konstrukt	K_0 (s ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	Aktivierung
NcKin 343	0,052 ± 0,012	260 ± 74	5000
NcKin 378	0,015 ± 0,002	27 ± 10	1800
NcKin 383	0,016 ± 0,004	24 ± 4	1500
NcKin 391	0,039 ± 0,006	72 ± 1	1850
NcKin 400	0,026 ± 0,011	84 ± 17	3200
NcKin 433	0,047 ± 0,005	61 ± 8	1300
NcKin 480	0,042 ± 0,016	60 ± 2	1400
NcKin 928	0,010 ± 0,007	57 ± 8	5700

Tabelle 4:

ATPase-Aktivitäten der verkürzten Konstrukte in An- und Abwesenheit von Mikrotubuli. Für jedes Konstrukt wurden mindestens zwei verschiedene Präparationen gemessen.

3.1.4.2 Mikrotubuli-aktivierte ATPase-Aktivität

Durch Zugabe von Mikrotubuli ließ sich der ATP-Umsatz der getesteten Kinesin-Varianten um den Faktor 1300 bis 5000 steigern (Tab. 4). Mit Hilfe der Mikrotubuli-aktivierten ATPase sollte festgestellt werden, ob NcKin auch katalytisch schnell ist, und welche Domänen hierfür verantwortlich sind.

Im gekoppelten enzymatischen ATPase-Test (Huang und Hackney, 1994) wurde der ATP-Umsatz indirekt gemessen (Abb. 11, vgl. 1.4.11.2).

Um die maximale Mikrotubuli-aktivierte ATPase-Rate (k_{cat}) zu ermitteln, wurden Michaelis-Menten-Kurven analysiert, in denen der ATP-Verbrauch pro Zeit gegen die Mikrotubuli-Konzentration aufgetragen wurde (Abb. 4 und 5). Aus diesen Kurven kann man außerdem die Mikrotubuli-Konzentration ablesen, bei der halbmaximale Aktivität erreicht wird ($K_{0,5MT}$). Enzyme mit hoher Affinität zum Substrat haben einen niedrigen $K_{0,5MT}$. (Weil Kinesin

prozessiv ist, kann man die $K_{0,5}$ MT-Werte nicht direkt von der Mikrotubuli-Affinität ableiten; vgl. unten.)

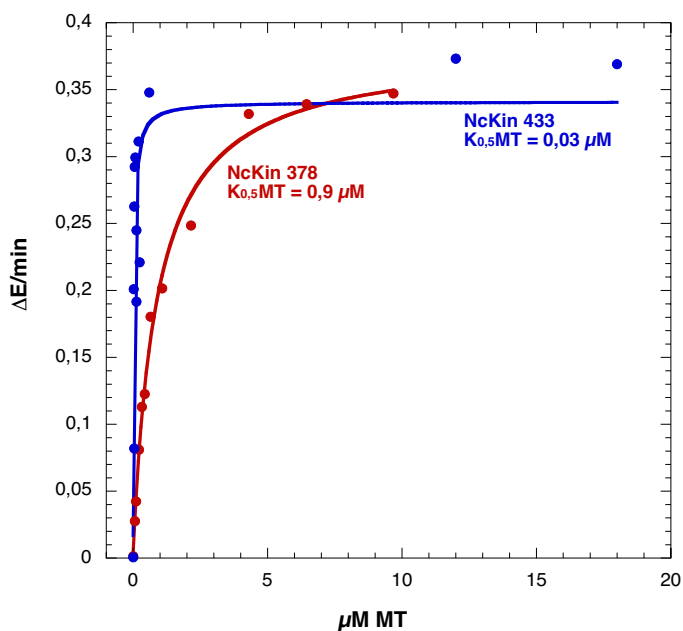


Abbildung 11: Gekoppelter ATPase Test

Michaelis-Menten Kurven der ATPase Messungen (2.4.11.2, 2.4.11.2.1) eines dimeren (NcKin 433, blau) und eines monomeren (NcKin 378, rot) Konstrukts. Etwa 40 nM Protein wurden mit verschiedenen Mikrotubuli-Konzentrationen (0 bis 16 μM, bzw. 0 bis 9 μM) inkubiert. Die Rate der Extinktionsänderung ist in Abhängigkeit von der Mikrotubuli-Konzentration aufgetragen. Die halbmaximale Aktivität des Enzyms ist indirekt proportional der Mikrotubuli-Konzentration. Die Datenpunkte wurden an die folgende hyperbolische Funktion angepasst:

$$y = B + k_{cat} \cdot [MT] / (K_{0,5}MT + [MT]) \quad (B \text{ steht für Hintergrundaktivität}).$$

Die sich daraus ergebenden k_{cat} -Werte sind in Tabellen 4 und 6 wiedergegeben.

Die Messungen ergaben für den Satz der untersuchten Mutanten folgende Ergebnisse: Alle dimeren Konstrukte haben einen ATP-Umsatz von $k_{cat} = 60$ bis 84 s^{-1} , dem Volllängen-Konstrukt NcKin 928 vergleichbar. Der Motorkopf (NcKin 343) hat einen extrem hohen ATP-Umsatz ($k_{cat} = 260 \text{ s}^{-1}$). Das längere NcKin 355, das zusätzliche Sequenzen aus dem Halsbereich enthielt, hatte ähnlich hohe ATPase-Raten, weshalb es nicht weiter untersucht wurde. Die monomeren Proteine mit der ganzen Halsdomäne (NcKin 378 und NcKin 381) haben auffallend niedrige ATPase-Raten von $k_{cat} = 27 \text{ s}^{-1}$ bzw. 24 s^{-1} . Auch bei dem kürzeren

NcKin 375 Konstrukt wurden ähnlich niedrige ATPase-Werte gemessen. Wegen starker Degradation wurde dieses Konstrukt nicht weiter benutzt.

Um auszuschließen, dass die verwendeten NcKin-Präparationen einen großen Anteil inaktivierter Moleküle enthielten, wurden diese Konstrukte stichprobenartig über Mikrotubuli-Affinität (s. 2.4.6.2) aufgereinigt. Durch diesen zusätzlichen Reinigungsschritt werden nur aktive Motoren isoliert, weil nur diese an Mikrotubuli binden und anschließend wieder ATP-abhängig abgelöst werden. ATPase-Tests an den so gereinigten Konstrukten zeigten keine höheren ATPase-Aktivitäten (NcKin 343: 171 s^{-1} statt 260 s^{-1} ; NcKin 378c: 15 s^{-1} statt 27 s^{-1} und NcKin 400: 52 s^{-1} statt 84 s^{-1}).

Die unerwartet niedrigen k_{cat} -Werte der monomeren Konstrukte mit der Halsdomäne, die unter denen der dimeren Konstrukte liegen, wurden auf einen inhibitorischen Effekt der Halsdomäne hin überprüft. Dazu wurden die Konstrukte NcKin 378 und NcKin 381 mit Carboxypeptidase A und B für eine limitierte Zeit verdaut (2.4.7). Carboxypeptidasen spalten spezifisch Aminosäuren vom C-Terminus eines Proteins ab. Im Coomassie gefärbten Gel wurde der Verdau bestätigt (Abb. 12). Es entstand eine Hauptbande, die in der Größenordnung zwischen dem NcKin 343 und NcKin 378 lief, sowie viele noch kleinere Banden. Das genaue Ausmaß des Verdau konnte nicht bestimmt werden.

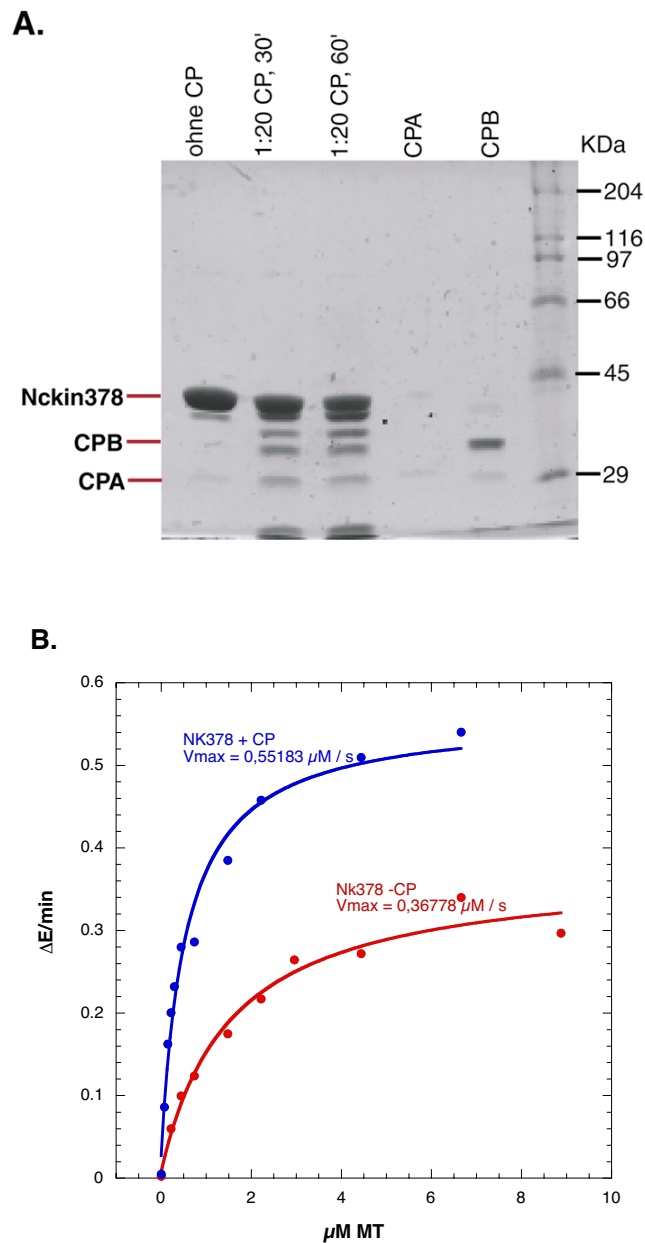


Abbildung 12: C-terminaler Verdau von NcKin 378 mit anschließendem ATPase Test

A: Coomassie-gefärbtes 10%iges PAA-Gel des Verdau des NcKin 378 Konstrukts mit den Carboxypeptidasen A und B (CPA und CPB) (2.4.7). Es wurden 50 μl Protein mit je 1:20 CPA und CPB zur gesamten Proteinmenge zugegeben und der Ansatz wurde für 30 und 60 min bei 22°C inkubiert.

B: Direkt nach der Inkubation wurde ein gekoppelter ATPase Test durchgeführt (Abb. 10). Im Vergleich zur unverdauten Kontrolle ist beim verdauten Protein ein deutlicher Anstieg der maximalen Geschwindigkeit zu beobachten. Die resultierenden k_{cat} Werte sind in der Tabelle 5 zu sehen.

ATPase-Tests vor und nach dem Verdau wurden durchgeführt (Abb. 12, Tab. 5). Die verdauten Konstrukte wiesen eine etwa zweifach höhere ATPase-Rate als die unverdauten Kontrollen auf. Die ATPase Werte waren nicht so hoch wie bei dem monomeren NcKin 343, vermutlich weil der Verdau der Halsdomäne nur partiell geschehen war. Dies bedeutet, dass bei diesen Konstrukten die Hals-Domäne die ATP-Hydrolyse in irgendeiner Art und Weise inhibiert. Erst durch teilweisen Verdau von Hals-Aminosäuren wird ein Teil der Inhibition der Katalyse aufgehoben.

NcKin 378	k_{cat} (s^{-1})
unverdaut	26 ± 3 n = 2
verdaut	50 ± 6 n = 2

Tabelle 5: ATPase-Aktivitäten vor und nach dem C-terminalen Verdau mit Carboxypeptidase A und B.

3.1.4.3 ADP-Freisetzung und chemische Prozessivität

Konventionelle Kinesine zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, als einzelne Dimere auf dem Mikrotubulus zu binden und mehrere Schritte zu machen, bevor sie wieder dissoziieren. Dieses Merkmal wird Prozessivität genannt. Experimentell kann dies in dem mikroskopischen Einzelmolekül-Test nachgewiesen werden, oder durch geeignete biochemische Tests.

Aus den k_{cat} - und $K_{0,5\text{MT}}$ -Werten der gekoppelten ATPase-Tests können zusätzliche Informationen über die Prozessivität dieser molekularen Motoren gezogen werden.

Im Falle einer normalen (nicht prozessiven) enzymatischen Reaktion gibt die Anfangssteigung der Michaelis-Menten-Kurve die apparente bimolekulare Binderate (K_{bi}) des Enzyms zum Substrat an. Sie kann als $k_{\text{cat}} / K_{\text{M}}$ errechnet werden.

Bei einem prozessiven Motor ist die Lage komplizierter, denn das Enzym (Kinesin) dissoziiert nicht nach jedem Reaktionszyklus vom Substrat (Mikrotubuli). In diesem Fall ist der Quotient $K_{\text{bi}}\text{ATPase} = k_{\text{cat}} / K_{\text{M}}$ nicht die „wirkliche“ bimolekulare Binderate zwischen Kinesin und Mikrotubuli, sondern $K_{\text{bi}}\text{ATPase} = K_{\text{cat}} / K_{0,5\text{MT}}$ liegt viel höher als erwartet

(Hackney, 1995). Die "wirkliche" Binderate (K_{bi}) kann durch MantADP-Freisetzungsexperimente festgestellt werden (s. 2.4.11.3).

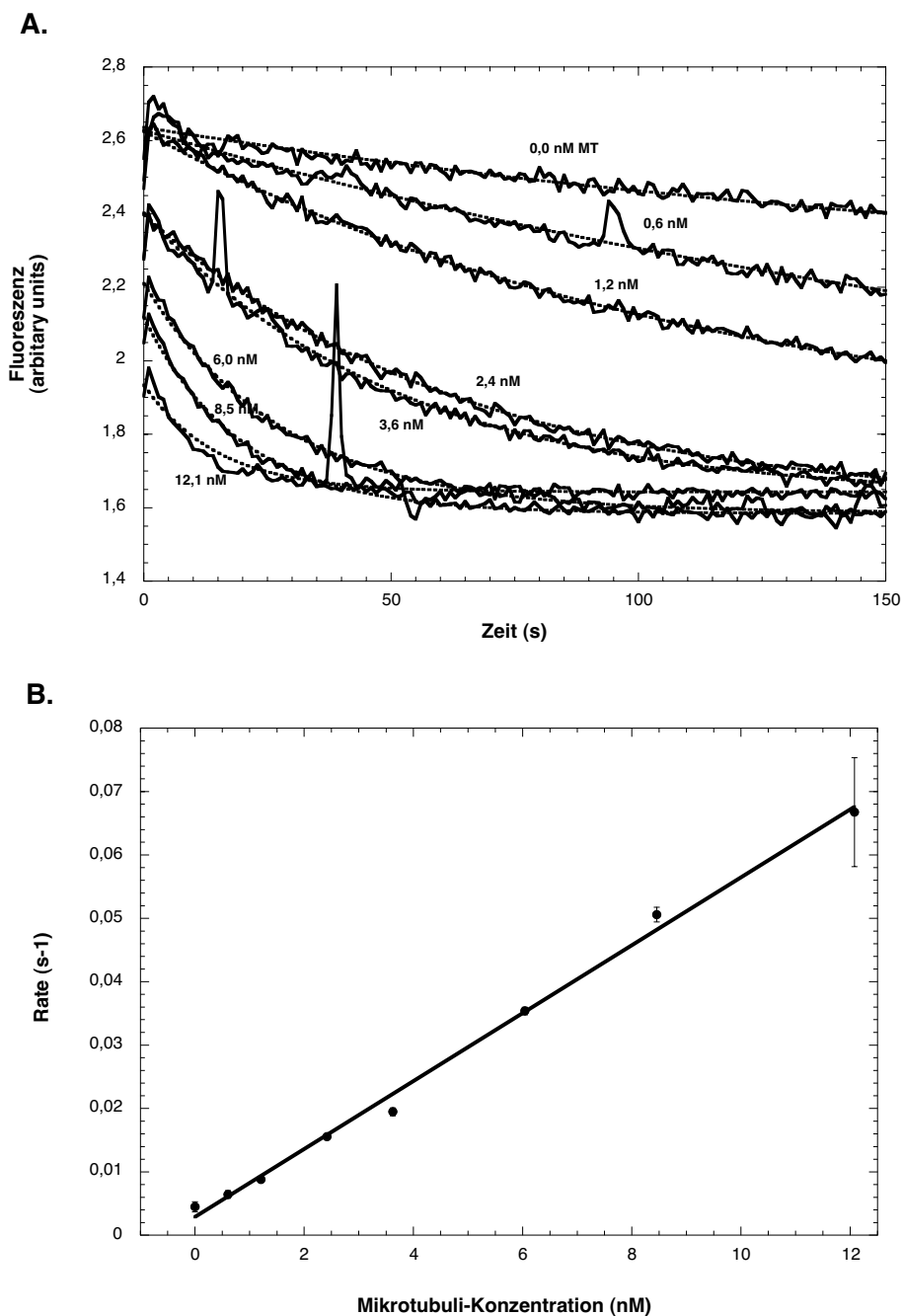


Abbildung 13: MantADP-Freisetzungsexperiment

A: 100 nM Kinesin-MantADP Komplex wurde mit substöchiometrischen Mengen an Mikrotubuli im Überschuss von nicht fluoreszierendem ATP gemischt (2.4.11.3). Die zeitlichen Abnahmen der Fluoreszenz wurden Exponentialfunktionen angepasst.

B: Die aus den Exponentialkurven abgeleiteten Raten wurden gegen die Mikrotubuli-Konzentrationen aufgetragen. Wegen der weit substöchiometrischen Mikrotubuli-Mengen entsteht eine Gerade, deren Steigung die bimolekulare Binde-Konstante k_{biADP} ist.

Für dieses Experiment wurde mit MantADP beladenes NcKin verwendet. MantADP fluoresziert stark, wenn es an Kinesin gebunden ist, und weniger, wenn es freigesetzt wird. Für die Messung wurde eine bestimmte Menge MantADP-Kinesin-Lösung mit jeweils verschiedenen Mengen an Mikrotubuli gemischt. In jeder Reaktion war ein Überschuss an nicht fluoreszierendem ATP (1 mM) vorhanden, um den prozessiven Reaktionszyklus in Gang zu setzen ("pulse-chase"). Der daraufhin erfolgende exponentielle Abfall des Fluoreszenz-Signals wurde registriert und einer Exponentialfunktion angepasst (Abb. 13 A). Die aus dieser Exponentialfunktion abgeleiteten Raten wurden gegen die verwendeten Mikrotubuli-Konzentrationen aufgetragen (Abb. 13 B). Bei den verwendeten niedrigen Mikrotubuli-Konzentrationen führt dies zu einer linearen Abhängigkeit der Raten von der Konzentration, da unter Mikrotubuli-limitierenden Bedingungen die Mikrotubuli-Bindung die Gesamtrate begrenzt, und nicht der ATP-Umsatz (k_{cat}). Die Steigung dieser Gerade spiegelt die bimolekulare Binde rate (k_{biADP}) wider.

Für den untersuchten NcKin Mutantensatz wurden k_{biADP} -Werte zwischen 4.2 und 15.8 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ermittelt (Tab. 6). Sie liegen in einer ähnlichen Größenordnung wie die k_{biADP} -Werte der entsprechenden *Drosophila* und humanen Kinesin-Konstrukte (Jiang *et al.*, 1997; Ma und Taylor, 1995).

Zustand	Konstrukt	k_{cat} (s^{-1})	$K_{0,5\text{MT}}$ (μM)	k_{biATPase} $k_{\text{cat}} / K_{0,5\text{MT}}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{biADP} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$k_{\text{bi}}\text{ratio}$
monomer	NcKin 343	260 ± 74 n = 4	$0,40 \pm 0,23$	650	$15,8 \pm 0,3$	41
monomer	NcKin 378	27 ± 10 n = 4	$0,86 \pm 0,74$	31	$5,0 \pm 0,3$	6
monomer	NcKin 383	24 ± 4 n = 2	$0,47 \pm 0,03$	51	$5,9 \pm 0,5$	9
dimer	NcKin 391	72 ± 1 n = 2	$0,04 \pm 0,01$	2000	$5,3 \pm 0,5$	377
dimer	NcKin 400	84 ± 17 n = 3	$0,05 \pm 0,03$	1680	$4,7 \pm 0,1$	357
dimer	NcKin 433	61 ± 8 n = 4	$0,02 \pm 0,03$	3050	$4,2 \pm 2,5$	726
dimer	NcKin 480	60 ± 2 n = 4	$0,01 \pm 0,01$	6000	$13,9 \pm 2,5$	432
dimer	NcKin 928*	57 ± 8 n = 4	$0,05 \pm 0,04$	1140	**	**

Tabelle 6: Kinetische Charakteristika der C-terminal verkürzten Konstrukte und deren Oligomerisierungszustand.

* Die ATPase Messungen von NcKin 928 wurden von Ulrike Majdic durchgeführt (Doktorarbeit)

** Es war nicht möglich das Volllängen-Konstrukt NcKin 928 mit MantADP zu markieren

Das Verhältnis $k_{bi}ratio = k_{bi}ATPase / k_{bi}ADP$ gibt die Anzahl der ATPase Zyklen an, die nach einer einzigen Bindung eines Kinesin Moleküls an einen Mikrotubulus induziert werden, und wird "chemische Prozessivität" genannt (Hackney, 1995). Beim Vergleich der $k_{bi}ratio$ -Werte der verschiedenen NcKin-Konstrukte stellt man große Unterschiede fest. Die zwei Hals-Konstrukte NcKin 378 und NcKin 383 haben die niedrigsten $k_{bi}ratio$ -Werte. Anscheinend dissoziieren diese Proteine nach nur wenigen katalytischen Zyklen vom Filament. Im Gegensatz dazu ist das homologe DmKHC 381 chemisch prozessiv. Auf der andere Seite haben die dimeren Konstrukte NcKin 391, 400, 433 und 480 hohe $k_{bi}ratio$ -Werte, was darauf hindeutet, dass diese Moleküle für viele ATPase Zyklen auf dem Filament bleiben. Das kurze NcKin 343 ist auch schwach prozessiv, liegt aber mit $k_{bi}ratio = 41$ höher als die längeren Monomere.

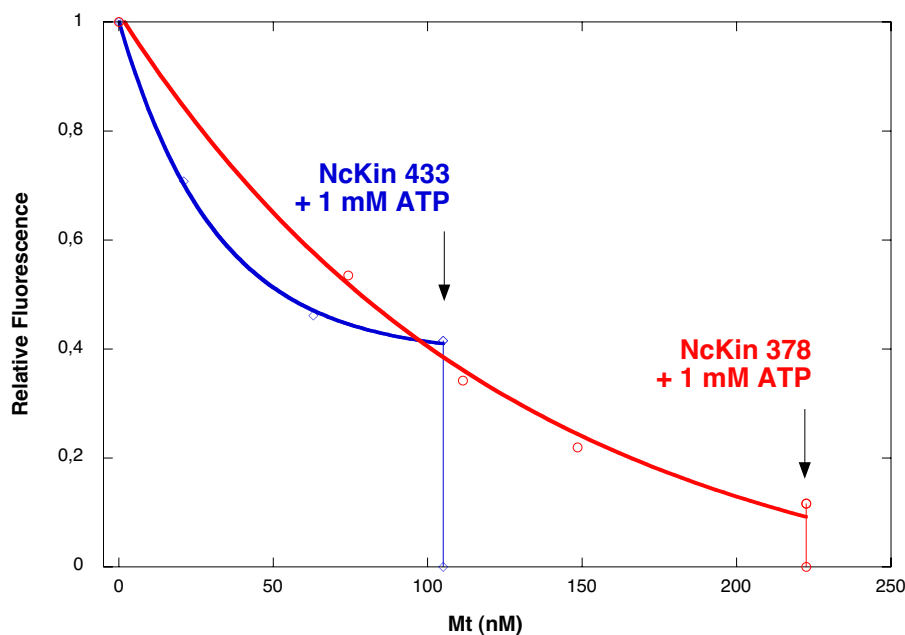


Abbildung 14: MantADP-Dissoziation bei der Bindung von NcKin433 und NcKin 378 an Mikrotubuli

In diesem Experiment wurde die Koordination der beide Köpfe von NcKin-Konstrukten getestet. Je 100 nM der Kinesin-MantADP-Komplexe wurden schrittweise mit kleinen Mikrotubuli-Mengen gemischt bis äquimolare Mengen erreicht waren (2.4.11.3). Anschließend wurde ein Überschuss von nicht fluoreszierendem ATP zugegeben. Bei dem dimeren NcKin433 wird durch Mikrotubuli-Zugabe zunächst etwa 60% des MantADP freigesetzt, der Rest MantADP erst bei Anwesenheit von ATP. Bei dem monomeren NcKin 378 dagegen führt bereits die Mikrotubuli-Zugabe zur fast vollständigen Dissoziation des MantADP, die ATP-Zugabe hat keinen Einfluss auf das Signal. Die durchgezogenen Linien stellen interpolierte Exponentialfunktionen dar.

Durch MantADP-Freisetzungsexperimente kann man Aufschluss über die Koordination der beiden Köpfe eines Kinesindimers gewinnen. Während der erste der beiden Köpfe an den Mikrotubulus bindet und sein ADP verliert, kann der andere Kopf nicht binden. Erst nach Zugabe von ATP kann der zweite Kopf an den Mikrotubulus binden und sein Nukleotid freisetzen (vgl. 1.3). Dieser biochemische Schritt kann in einer Variation des ADP-Freisetzungsexperimentes gezeigt werden. Mit MantADP markiertes Kinesin (Abb. 14, vgl. 2.4.11.3) wurde in der Abwesenheit von ATP mit verschiedenen Mikrotubuli-Mengen gemischt, bis ein Plateau erreicht wurde. Anschließend wurde 1 mM ATP hinzugefügt und notiert, wie sich das Fluoreszenz-Signal weiter änderte. Hierbei wurde das Fluoreszenzsignal zwischen 0 und 100% kalibriert, wobei das Anfangssignal (MantADP-Kinesin ohne Mikrotubuli und ATP) als 100% und das Endsignal (Fluoreszenz nach Mikrotubuli- und ATP-Zugabe) als 0% gesetzt wurde. Durch Zugabe von ATP startet der prozessive Zyklus und Kinesin verliert MantADP vollständig. Wenn die beiden Köpfe eines Dimers perfekt koordiniert wären, würden vor ATP-Zugabe 50% des MantADPs freigesetzt werden, und folglich das Fluoreszenzsignal auf 50% der Gesamtamplitude sinken. Erst nach ATP-Zugabe sollte die andere Hälfte des MantADPs freigesetzt werden.

Im Experiment sieht man diese sequenzielle MantADP-Freisetzung tatsächlich, wenn auch nicht in der idealen Stöchiometrie. NcKin 378 entläßt die gesamte Menge des gebundenen MantADPs allein durch Mikrotubuli-Bindung, schon vor der Zugabe von ATP. Im Gegensatz dazu setzt das dimere NcKin 433 nach der Bindung an Mikrotubuli etwa zwei Drittel seines gebundenen MantADPs frei, und nach Zugabe von ATP das restliche Drittel (Messung NcKin 433 von Friederike Schäfer). Dies deutet auf keinerlei Koordination der Köpfe beim NcKin 378, die jedoch für das Dimer NcKin 433 gezeigt werden konnte.

3.2 Untersuchungen an HsKin-NcKin Chimären

Nachdem die Untersuchungen an C-terminal verkürzten Konstrukten gezeigt hatten, dass die Motordomäne von NcKin (NcKin 343) eine sehr schnelle ATPase (260 s^{-1} , 3.1.42) hat, die aber nicht ausreicht, um einen schnellen Motor zu bilden ($0.65 \mu\text{m/s}$, 3.1.3), wurde versucht, durch chimäre Moleküle aus menschlichem (langsam) und *N. crassa* Kinesin (schnell) herauszufinden, welche Domänen für die hohe Geschwindigkeit des Pilzkinesins verantwortlich sind. Die Chimären basierten auf dem humanen Kinesin, in das NcKin-Anteile integriert wurden, mit der Absicht, einen Funktionsgewinn des menschlichen Kinesins zu finden. Es wurden dimere Konstrukte, die in den Motilitätstests eingesetzt werden konnten, verwendet.

Als Hintergrund für die Herstellung der Chimären wurde das Plasmid hK560cys (HsKin) verwendet (2.3.14.2), das die ersten 560 Aminosäuren des humanen konventionellen Kinesins codiert und im mikroskopischen Motilitätstest ans Deckglas bindet und Mikrotubuli mit Geschwindigkeiten von $0,2$ bis $0,7 \mu\text{m/sec}$ bewegt. Dies entspricht der Wildtyp-Geschwindigkeit und wurde daher in dieser Arbeit zum Vergleich benutzt. Als *N. crassa* Wildtyp-Referenz wurde die Chimäre NcKin-HsKin verwendet, die die funktionellen NcKin-Domänen (Kernmotor, Halsverbindung, Hals und Scharnier) besitzt und mit dem Schwanzbereich des humanen Kinesins fusioniert ist, der das Anheften an Glasoberflächen ermöglicht. Wie an den verkürzten Konstrukten gezeigt wurde, haben Konstrukte mit Anteilen bis zur Scharnierregion motile Eigenschaften wie das Vollängen-NcKin (Geschwindigkeit $2,0$ bis $2,6 \mu\text{m/s}$).

3.1.5 Allgemeine Beobachtungen an chimären Konstrukten

Die Expression des humanen Kinesins sowie der Chimären erwies sich als schwierig. Daher wurde zuerst eine geeignete Expressions- und Reinigungsprozedur etabliert (2.4.6.1). Die beste Protein-Ausbeute entstand nach einer Induktion bei OD_{580} von 1,0 bis 1,5 und einer Induktionszeit von 20 Stunden. Da die Proteinmengen trotzdem im Zellysate relativ niedrig waren, wurde versucht, das Protein während der Reinigung aufzukonzentrieren.

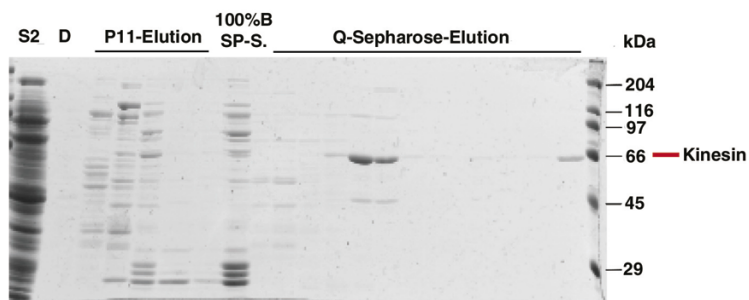
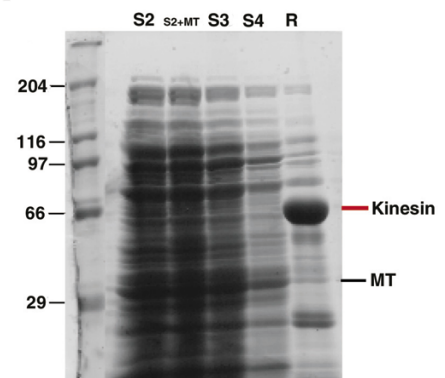
A.**B.**

Abbildung 15: Aufreinigungen von Chimären

E. coli Zellen, die das exprimierte Protein enthielten, wurden im Ultraschall aufgeschlossen und zentrifugiert. Der zentrifugierte Überstand wurde entweder mit der FPLC-Anlage (A, 2.4.6.4) oder über Mikrotubuli-Affinität isoliert (B, 2.4.6.2).

A: Coomassie-gefärbtes 10%iges PAA-Gel mit den wichtigsten Schritten der Aufreinigung von NcKin Linker Protein-Konstrukt. Für die anderen Konstrukte ergaben sich ähnliche Elutionsprofile.

S2: Der bakterielle Überstand nach Aufschluss und Zentrifugation.

D: Durchfluss nach Auftragung von S2 auf die P11-Sepharose Säule.

P11-Elution: Repräsentative Fraktionen der Elution über einen kontinuierlichen Salz-Gradienten.

100%B SP-S.: Vereinigte Hauptfraktionen der SP-Sepharose-Chromatografie.

Q-Sepharose-Elution: Der Durchfluss von der SP-High-Trap-Sepharose wurde auf der Q-High-Trap-Sepharose aufgetragen und das Kinesin über einen kontinuierlichen Gradienten eluiert.

B: Coomassie-gefärbtes 10%iges PAA-Gel der Aufreinigung von NcKin Linker Konstrukt über Mikrotubuli-Affinität. Die anderen chimären Konstrukte zeigten ein ähnliches Bild. Das Kinesin macht ungefähr 60-30% des Gesamtproteins aus.

S2: Der bakterielle Überstand nach Aufschluss und Zentrifugation.

S2+MT: Der bakterielle Überstand gemischt mit Mikrotubuli, AMP-PNP und Apyrase.

S3: Der Überstand nach der Bindung des Kinesins an Mikrotubuli und nach Zentrifugation.

S4: Der Überstand nach dem Resuspendieren des Kinesin-Mikrotubuli-Pellets und Zentrifugation über ein 40%iges Sucrose Kissen.

R: Der Überstand nach dem Ablösen von Kinesin von den Mikrotubuli.

Die Chimären wurden zunächst nach einem dreistufigen chromatografischen Verfahren aufgereinigt, das auf Chromatografie mittels Phosphocellulose-, S- und Q-Sepharose-Material basierte (Ma und Taylor, 1995). Das Zellysate (S2) wurde auf eine P11 Säule geladen und mit einem Salzgradienten von 10 mM bis 1 M NaCl eluiert. Die **Kinesin-Hauptfraktionen** wurden danach auf eine S-Sepharose Säule gegeben, um andere Proteine so gut wie möglich zu entfernen. Der Kinesin-haltige Durchfluss wurde anschließend über eine Q-Sepharose weiter gereinigt (Abb. 15 A). Die Ausbeute und Reinheit waren jedoch nicht befriedigend, insbesondere für die Chimären NcKin Neck und NcKin Loop11, so dass die Konstrukte mittels Mikrotubuli-Affinität gereinigt werden mussten (2.4.6.1). Über diesem

Aufreinigungsweg war das Protein konzentriert genug für die Motilitäts- und ATPase-Tests (Abb. 15 B).

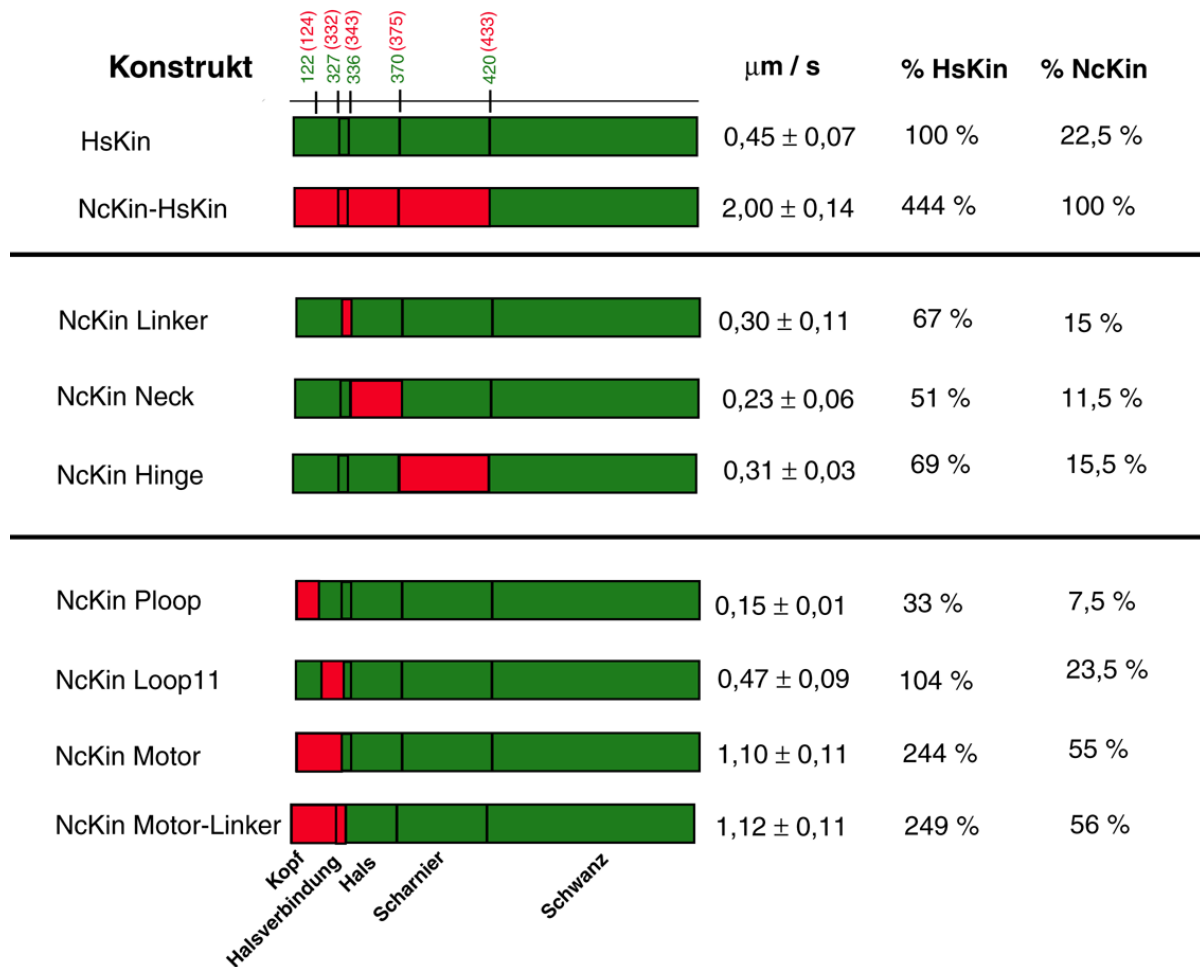


Abbildung 16: Motilitätstests der chimären Konstrukte

Schematische Darstellung der Chimären mit Gleitgeschwindigkeiten

Die grünen Zahlen geben die Grenzen der Domänen in der Zählweise von humanem Kinesin (HsKin) an, die roten in der des Neurospora Kinesins (NcKin).

Die Geschwindigkeiten der verschiedenen Konstrukte wurden im videomikroskopischen Motilitätstest ermittelt (2.4.10). Die angegebenen Geschwindigkeiten sind Mittelwerte und Standardabweichung von mindestens 20 Mikrotubuli in je zwei verschiedenen Präparationen.

Die prozentualen Werte geben die Geschwindigkeit der jeweiligen Chimäre relativ zum Wildtyp an.

3.1.6 HsKin-Chimären mit Halsverbindungs-, Hals- und Scharnierregion von NcKin

Zuerst wurden die einzelnen NcKin-Domänen Halsverbindung, Hals und Scharnier einzeln in das humane Kinesin gebracht, um zu testen, ob sie eine Wirkung auf die Motordomäne haben, und dadurch die Geschwindigkeit des Moleküls beeinflussen.

Im multiplen Motor-Motilitätstest war jedoch keine dieser Chimären so schnell wie die NcKin-HsKin Kontrolle. Die Chimären waren nicht einmal so schnell wie das HsKin Konstrukt (Abb. 16). Die Chimären mit NcKin-Halsverbindung und -Scharnier erreichen um die 70% der HsKin-Gleitgeschwindigkeit. Dies wurde als nicht signifikant betrachtet. Die Chimäre mit dem NcKin-Hals erreicht nur 51% der HsKin-Geschwindigkeit. Offenbar hat der "fremde" Hals die Geschwindigkeit von humanem Kinesin negativ beeinflusst.

3.1.7 Chimären mit Elementen der NcKin-Kopfdomäne

Die Sequenzidentität der Kopfdomäne von Pilz- und Tierkinesinen beträgt mehr als 50%. Die Kristallstruktur der NcKin-Kopfdomäne (Abb. 16A, Song *et al.*, 2001) zeigt große Ähnlichkeit zu den bisher kristallisierten Kinesinen von Mensch (Kull *et al.*, 1996), Ratte (Kozielski *et al.*, 1997), Ncd (Salbin *et al.*, 1996, 1998), Kar3 (Gulik *et al.*, 1996), Kif1A (Kikkawa *et al.*, 2000). Man findet die Nukleotidbindebereiche, P-Loop, Switch I und II auch in NcKin. Im Vergleich der Kristallstrukturen von NcKin und HsKin sind jedoch ein paar Unterschiede in der Nähe der ATPase-Domäne zu erkennen (Abb. 17 A).

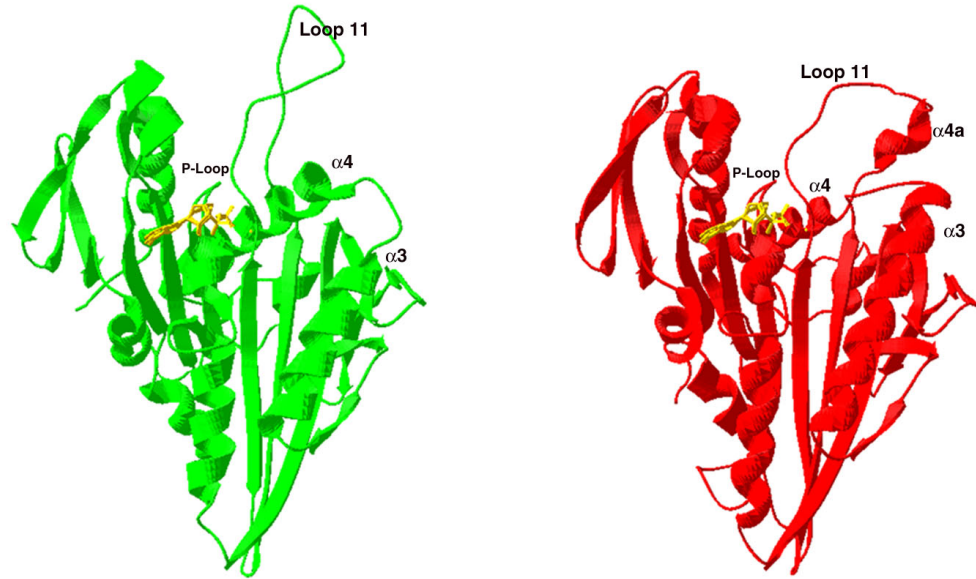
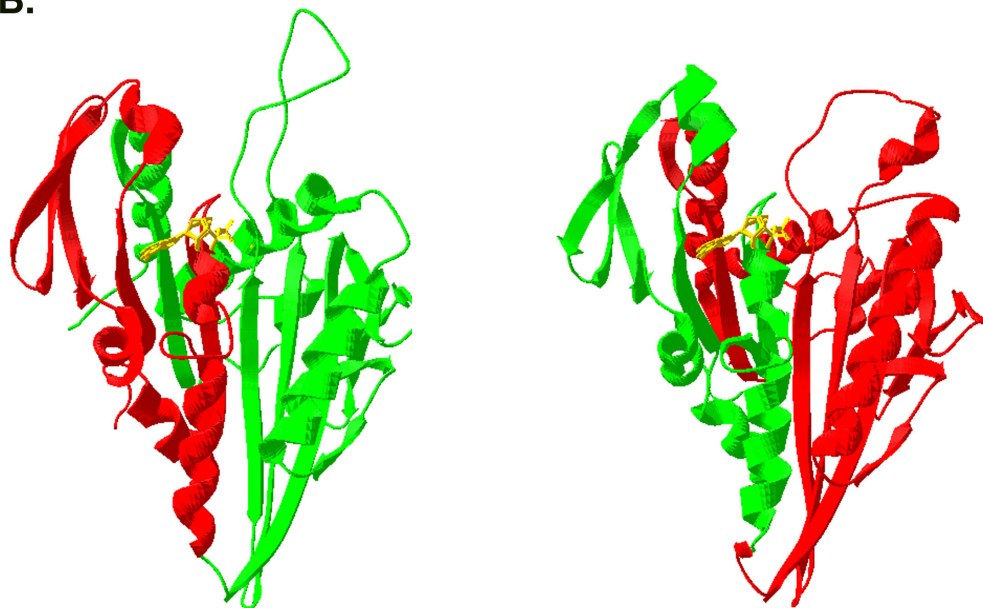
A.**B.**

Abbildung 17: Kristallstrukturen der Kopfdomänen von NcKin und HsKin

A: Kristallstrukturen der Kopfdomänen von HsKin (grün) (Kull et al., 1996) und NcKin (rot) (Song et al., 2001) mit jeweils einem ADP-Molekül (gelb). In dieser Perspektive sind folgende Unterschiede sichtbar: Während HsKin einen modellierten Loop 11 besitzt, ist die entsprechende Struktur in NcKin-Kristall geordnet. Durch den Loop 11 erstreckt sich bei NcKin die Helix $\alpha 4$ bis $\alpha 4a$. Die Helix $\alpha 3$ ist bei NcKin länger.

B: Kristallmodelle von NcKin P-Loop und NcKin Loop 11 Chimären. In Rot sind die NcKin-, in Grün die HsKin-Bereiche dargestellt.

Die Ergebnisse von den Motilitäts- und ATPase-Tests sind jeweils in Abbildung 16 und Tabelle 7 zu sehen.

Aufgrund des Kristallstruktur-Modells wurden drei Chimären hergestellt, um festzustellen, welche der Motor-Domänen die Geschwindigkeit beeinflussen (Abb. 17 B). Eine der Chimären auf dem Hintergrund des humanen HsKin enthält den vorderen Teil des NcKin Motor-Kerns bis zum P-Loop (NcKin Ploop), eine zweite die C-terminale Hälfte des Kopfes mit dem Loop11 und der Halsverbindung (NcKin Loop11), eine dritte den ganzen Motor-Kern (NcKin Motor) und eine vierte die ganze Kopfdomäne von NcKin mit dem Motor-Kern und der Halsverbindung (NcKin Motor-Linker). Die Auswertung der Gleitgeschwindigkeiten der Konstrukte hat zu folgenden Beobachtungen geführt (Abb. 16):

1. Das humane Kinesin-Konstrukt, das die NcKin Kernmotordomäne enthält, hat eine Geschwindigkeit von $1,1 \mu\text{m/s}$. Es ist damit fast doppelt so schnell wie das HsKin Molekül, erreicht aber nicht die Geschwindigkeit vom Wildtyp-NcKin.
2. Der Austausch der N-terminalen und C-terminalen Motor-Kern Bereiche von HsKin durch NcKin (Konstrukte NcKin PLoop und NcKin Loop11) haben nicht zu einer Erhöhung der Geschwindigkeit geführt ($0,15 \mu\text{m/s}$ bzw. $0,47 \mu\text{m/s}$). Der N-terminale Bereich von NcKin (NcKin PLoop) führt sogar zu einer deutlichen Erniedrigung der Geschwindigkeit im Vergleich zu HsKin.
3. Die zusätzliche Einführung der Halsverbindung von NcKin hat die durch den Motor Kern erhöhte HsKin-Geschwindigkeit nicht noch weiter erhöht.

3.1.8 ATPase-Aktivitäten der Chimären

Als nächstes wurden diese Konstrukte im gekoppelten ATPase-Test charakterisiert, um zu kontrollieren, ob die ATPase-Aktivitäten an die motilen Eigenschaften gekoppelt sind (Tab. 7). Als Maß für die Entkopplung wurde das Verhältnis von Gleitgeschwindigkeit v und k_{cat} genommen. Der Wert von HsKin wurde als Referenz auf 100% gesetzt. Nach diesem Maßstab hat die NcKin-HsKin Kontrolle 230% Kopplung, was einen Faktor von mehr als zwei bedeutet. Alle Werte, die nicht diesen Faktor über- oder unterschreiten, wurden daher als nicht signifikant betrachtet.

Konstrukt	k_{cat} (/s)	$K_{0,5}MT$ (μM)	v ($\mu m/s$)	% HsKin (v/k_{cat})
HsKin	48 ± 7	$1,55 \pm 0,95$	$0,45 \pm 0,07$	100
NcKin-HsKin	88 ± 15	$0,23 \pm 0,04$	$2,00 \pm 0,14$	230
NcKin Linker	52 ± 6	$3,00 \pm 0,48$	$0,30 \pm 0,11$	58
NcKin Neck	43 ± 4	$5,21 \pm 2,38$	$0,23 \pm 0,06$	53
NcKin Hinge	30 ± 7	$0,40 \pm 0,16$	$0,31 \pm 0,03$	103
NcKin Ploop	15 ± 0	$1,10 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,01$	100
NcKin Loop11	47 ± 3	$0,20 \pm 0,01$	$0,47 \pm 0,09$	100
NcKin Motor	77 ± 7	$0,60 \pm 0,05$	$1,10 \pm 0,11$	143
NcKin Motor-Linker	102 ± 10	$1,00 \pm 0,14$	$1,12 \pm 0,11$	109

Tabelle 7: ATPase Messungen der chimären Konstrukte und der Wildtyp-Konstrukte HsKin und NcKin-HsKin. Zum Vergleich sind die Gleitgeschwindigkeiten (v $\mu m/s$) der Konstrukte aufgelistet. Aus dem Verhältnis der Gleitgeschwindigkeit und des ATP-Umsatzes wurde die Kopplung jedes Konstruktes relativ zum HsKin-Wildtyp ausgerechnet.

Für jedes Konstrukt wurden zwei verschiedene Präparationen gemessen.

Bei keiner Chimäre wurde eine auffällig hohe ATPase-Aktivität mit einer sehr niedrigen Gleitgeschwindigkeit oder umgekehrt festgestellt. Chimären mit den einzelnen NcKin-Bereichen Halsverbindung (NcKin Linker), Hals (NcKin Neck) und Scharnier (NcKin Hinge), sowie die Chimäre mit dem C-terminalen Teil des Motor-Kerns (NcKin Loop11), haben ATPase-Aktivitäten ähnlich wie das HsKin Molekül. Die Chimäre mit dem N-terminalen NcKin Kopf-Teil (NcKin PLoop) hat entsprechend ihrer sehr niedrigen Geschwindigkeit auch eine sehr niedrige ATPase Rate. Interessant bei diesem Ansatz ist, dass durch Insertion fremder Domänen keine entkoppelte Variante entstand. Die Konstrukte mit dem NcKin Motor-Kern und der Kopfdomäne haben ähnliche ATPase Werte wie das NcKin Wildtyp-Konstrukt. Also besitzt die Kopfdomäne von NcKin zwar die Information für die schnelle ATPase Rate, aber das reicht nicht für eine Erhöhung der Geschwindigkeit.

4 Diskussion

Das Verständnis der Funktion der konventionellen Kinesine gehört zur grundlegenden Forschung der Zellbiologie. Durch die Studie verschiedener tierischer Vertreter wurden in den letzten Jahren viele Erkenntnisse über die Organisation und den Bewegungsmechanismus des Moleküls erworben.

Das konventionelle Kinesin des filamentösen Pilzes *N. crassa* wurde im Jahre 1995 von Steinberg und Schliwa entdeckt. Dieses Kinesin (NcKin) zeichnet sich durch eine außergewöhnlich hohe Gleitgeschwindigkeit von $2,6 \mu\text{m/s}$ aus, bis zu fünffach schneller als tierische Kinesine.

Diese Arbeit beschäftigt sich damit, die funktionelle Bedeutung der einzelnen Domänen dieses Proteins zu identifizieren. Hierzu wurden NcKin-Mutanten charakterisiert und Rückschlüsse auf den kinetischen und biochemischen Mechanismus des Wildtyp Kinesins gezogen.

4.1 Die Rolle der NcKin-Kopfdomäne

4.1.1 Die Kernmotordomäne

Die Kopfdomäne aller Kinesine ist auf Sequenzebene und in der dreidimensionalen Struktur hoch konserviert (Abb. 5, Abb. 16 A). Sie vermittelt die ATPase-Aktivität und ist dadurch Voraussetzung für die Bewegung des Moleküls. Vergleiche einer Reihe von Kinesinen zeigen eine strukturelle Ähnlichkeit zur Nukleotid-Bindedomäne der G-Proteine und Myosine (Vale, 1997, Woelke, 2001). Die Bezeichnungen für die ATP-bindenden Bereiche, P-Loop (Nukleotid-Bindemotiv), Switch I und Switch II, wurden analog auch für die Kinesine übernommen. Das γ -Phosphat vom ATP bildet eine Wasserstoff-Brücke mit der Amid-Gruppe eines konservierten Glycins im Switch II (G234 im Mensch- und G238 im *Neurospora*-Kinesin). Die während der Nukleotidhydrolyse stattfindenden kleinen

Konformationsänderungen in den Switch I und Switch II Regionen führen zu größeren Bewegungen in entfernten Regionen des Moleküls (Hilgenfeld, 1995, Houdusse *et al.*, 2000).

Auch in NcKin ist die Kopfdomäne für die Mikrotubuli-aktivierte ATPase verantwortlich (Abb. 1). Das NcKin 343 Konstrukt, das den minimalen Motor darstellt, d. h. die minimale Kinesinlänge, die für Mikrotubuli-stimulierte ATPase und Motilität nötig ist (vgl. Huang und Hackney, 1994), hat einen extrem hohen ATP-Umsatz (260 s^{-1}). Dieser ist sehr viel höher als beim homologen DmKHC 340 (96 s^{-1} , Jiang *et al.*, 1997). Der NcKin-Kernmotor enthält also Determinanten der hohen Geschwindigkeit. Mit Hilfe von Chimären wurde versucht, diese Determinanten näher zu kartieren. Es wurden im HsKin-Hintergrund Chimären hergestellt, die Teile der NcKin-Kernmotordomäne enthalten, NcKin Motor, NcKin PLoop und NcKin Loop11.

Eine Beschleunigung der Gleitgeschwindigkeit wurde nur bei der Chimäre NcKin Motor beobachtet, die den ganzen katalytischen Kern von NcKin enthält. Trotzdem war diese Chimäre im Motilitätstest nur halb so schnell wie die NcKin-HsKin Chimäre, ($1 \mu\text{m/s}$ statt $2 \mu\text{m/s}$, Abb. 16). Der ATP-Umsatz von NcKin Motor war dem des NcKin-HsKin Konstruktes vergleichbar. Die Kernmotordomäne enthält also die Determinanten für den schnellen ATP-Umsatz und einen Teil der Bereiche, die für die hohe Gleitgeschwindigkeit verantwortlich sind.

Die Chimäre NcKin PLoop enthält die N-terminale Hälfte des Kernmotors mit dem typischen P-Loop Motiv der Nukleotid-Bindetasche G-X-X-X-X-G-K-T/S. Diese Chimäre ist die langsamste von allen bisher getesteten Chimären, sowohl in Bezug auf Motilität als auch auf ATP-Umsatz. Das ist unerwartet, denn in diesem Bereich sind die Kristallstrukturen zwischen NcKin und HsKin sehr ähnlich. Der einzige Unterschied liegt in der besonderen Position von Loop 9 in der NcKin-Kristallstruktur. Da dadurch die Nukleotid-Bindetasche eher weiter ist, wäre ein schnellerer ATP-Austausch und damit eine höhere Geschwindigkeit dieser Chimäre erwartet worden (Kallipolitou *et al.*, 2001, Song *et al.*, 2001). Das Ergebnis dieser Chimäre

zeigt aber, dass die Nukleotid-Bindetasche von NcKin allein nicht in der Lage ist, die schnelle Bewegung zu erzeugen.

Die größeren Unterschiede in der Struktur liegen im C-terminalen Teil des Kernmotors, wo sich die Switch I (L11- α 4-L12- α 5) und Switch II (α 3-L9- α 3a) Regionen befinden. Es zeigte sich, dass Loop11 bei NcKin, im Gegensatz zu den bisher bekannten Strukturen, im Kristall geordnet ist. Durch Loop11 wird die Switch II-Helix α 4 in α 4a und das β -Faltblatt β 7 zu β 7a erweitert. Loop11 ist auch Teil der Mikrotubuli-Bindestelle (β 5-L8, L11, α 4-L12- α 5, Sosa *et al.*, 2001, Woehlke *et al.*, 1997). Für Loop11 wird eine wichtige Rolle bei der losen Bindung des Kopfes an den Mikrotubulus angenommen. Anhand von Polarisationsmikroskopie fluoreszierender Einzelmoleküle konnte gezeigt werden, dass an Mikrotubuli gebundenes Kinesin in der ADP-Phase sehr beweglich ist, aber unbeweglich in der ATP, ADP-Pi oder in der Nukleotid-freien Phase. Aufgrund der zentralen Position zwischen den mobilen Regionen Switch I und Switch II wurde außerdem eine wichtige Funktion von Loop11 in der Koordination lokaler Konformationsänderungen vermutet (Song *et al.*, 2001). Eine wichtige Rolle spielt hier die Bildung von Salzbrücken in den hoch konservierten Bereichen in Switch I (S-S-R-S-H) und Switch II (D-L-A-G-S-E). Bei einer Studie wurde bei den verwandten Kinesinen Kar3 und Ncd die Salzbrücke zwischen den zwei hoch konservierten Resten im Switch I und Switch II zerstört (Jum *et al.*, 2001). Dies führte zu einer Beeinträchtigung der ATPase-Aktivierung dieser Motoren durch Mikrotubuli. In diesem NcKin-Bereich werden drei Salzbrücken gebildet: SbA E240 (Switch II) - R207 (Switch I), SbB D235 (Switch II) - R194 (Switch I) und SbC K275 (Switch II) - R204 (Switch I). Im Vergleich dazu bildet das Molekül von HsKin in diesem Bereich nur eine Switch I interne Salzbrücke E199 (Switch I) - R203 (Switch I) (Song *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass solche Salzbrücken Konformationen stabilisieren, die als Intermediate einer Art Signalkaskade eine Rolle spielen. Aufgrund dieser Überlegungen wäre zu erwarten, dass die Chimäre NcKin Loop11 kinetisch ähnlich wie Wildtyp-NcKin ist. Trotz größerer Unterschiede in diesem Bereich ist die NcKin Loop11 Chimäre, die die C-terminale Hälfte des NcKin-Kernmotors enthält, nicht schneller als HsKin. Auch der ATP-Umsatz ist dem des HsKin Konstruktes vergleichbar. Der einzige

Unterschied zu HsKin ist der viel niedrigere $K_{0,5MT}$ -Wert des NcKin Loop11 Konstruktes ($0,2 \mu\text{M}$ im Vergleich zu $1,55 \mu\text{M}$ für HsKin), ähnlich dem des NcKin-HsKin Konstruktes ($0,23 \mu\text{M}$). Dies könnte auf eine höhere Mikrotubuli-Affinität hindeuten, eventuell durch eine zusätzliche positiv geladene Aminosäure im Loop11, die besser mit dem negativ geladenen C-Terminus der Tubulin-Untereinheit interagieren könnte. Dass weder der N-terminale noch der C-terminale Bereich der Kernmotordomäne allein schnelle Bewegung erzeugen können, deutet darauf hin, dass Interaktionen der beiden Teile hierfür nötig sind. Wie der P-Loop mit den Switch I- und Switch II-Regionen zusammen kooperieren könnte, ist Gegenstand weiterer Forschung.

4.1.2 Die Halsverbindung

Eine entscheidende Rolle scheint die Halsverbindung bei der Generierung der Bewegung zu spielen. Deshalb wurde im Rahmen des Chimärenprojekts die Halsverbindung von NcKin untersucht (Abb. 17). Ein möglicher Mechanismus, wie die Halsverbindung an der Generierung von Motilität beteiligt sein könnte, ist im Folgenden beschrieben (Rice *et al.*, 1999, Abb. 2): Solange das Kinesin in Lösung ist und jeder Kopf ein ADP-Molekül gebunden hat, befindet sich die Halsverbindung in einer nicht geordneten Konformation. Bei der Bindung des einen Kopfes an den Mikrotubulus wird ein ADP freigesetzt. Sobald nun der Nukleotid-freie Kopf ein ATP bindet, dockt die Halsverbindung an die katalytische Domäne an, so dass der ungebundene Kopf zu der vorderen Tubulin-Einheit geführt wird. Die Beobachtung, dass das C-terminal stark verkürzte monomere Konstrukt NcKin 343 im Bewegungstest aktiv ist, wenn auch verlangsamt ($0,65 \mu\text{m/s}$), könnte auf die ATP-abhängige Konformationsänderung der Halsverbindung zurückzuführen sein. Das Modell wurde durch Studien gestützt, bei denen die Halsverbindung von HsKin durch ein künstlich eingeführtes Peptid oder durch Mutagenese verändert wurde, was zu einer 200- bis 500fachen Reduzierung der Gleitgeschwindigkeit führte. Die Veränderungen hatten kaum einen Effekt auf die basalen und Mikrotubuli-stimulierten ATPase-Aktivitäten (Case *et al.*, 2000). Während der Motorkern wichtig für die allosterische Regulation von Mikrotubuli-Bindung und ATPase-Aktivität ist,

funktioniert die Halsverbindung wie ein mechanischer Verstärker der Bewegung. Die Halsverbindung kann mit dem Konverter von Myosin verglichen werden, der kleine Konformationsänderungen im katalytischen Kern des Myosins amplifiziert (Houdusse *et al.*, 1999, Wells *et al.*, 1999).

Die Halsverbindung der Pilzkinesine ähnelt derjenigen der Tierkinesine, weist jedoch im N-terminalen Bereich konservierte Lysinreste (rot) auf:

```
NcKin      KAKVNAELS
HsKin      TVCVNVELT
           .  ** . ** .
```

(mit Punkt sind die homologen, mit Stern die konservierten Aminosäuren notiert)

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von Chimären die Rolle der NcKin-Halsverbindung an der Bewegung des Moleküls untersucht (Abb. 17, Tab. 7). Von dem Vergleich der Motilität und ATPase-Aktivität zwischen HsKin und der Chimäre NcKin Linker sowie zwischen den Chimären NcKin Motor und NcKin Motor-Linker wurde kein signifikanter Einfluss weder in positiver noch in negativer Richtung festgestellt. Die Vermutung, dass, wenn der katalytische Kern von NcKin an der Halsverbindung von NcKin angebracht wird, die ATPase effektiv in Bewegung umgesetzt werden kann, hat sich hier nicht bestätigt. Die Chimäre NcKin Motor-Linker mit der ganzen NcKin-Kopfdomäne im HsKin-Hintergrund ist weiterhin nur halb so schnell wie die „Wildtyp“ NcKin-HsKin Chimäre.

Aufgrund der bisherigen Beobachtungen entstand die Frage, inwieweit die NcKin-Domänen Hals und Scharnier die kinetischen Eigenschaften dieses Moleküls beeinflussen.

4.2 Die Rolle der NcKin-Halsdomäne

4.2.1 Die Bedeutung der NcKin-Halsdomäne bei der Dimerisierung des Moleküls

Bei konventionellen Tierkinesinen bildet die Halsdomäne eine α -helikale Superhelix, durch die die beiden Köpfe des Kinesin-Dimers zusammen gehalten werden (Hackney, 1995, Rosenfeld *et al.*, 1996, Kozielski *et al.*, 1997). Daher wurden in dieser Arbeit der Oligomerisierungszustand der verschiedenen C-terminal verkürzten NcKin Konstrukte untersucht. Diese Untersuchungen haben zu unerwarteten Ergebnissen geführt. Während die bisherigen Daten von verwandten Kinesinen gezeigt haben, dass die Halsdomäne ausreichend für die Stabilisierung des Dimers ist, sieht es bei NcKin anders aus. Eindeutig ist die Beobachtung beim direkten Vergleich zwischen den homologen Konstrukten NcKin 378 und DmKHC 381, die unmittelbar hinter der Halsdomäne enden (vgl. Abb. 5, Jiang *et al.*, 1997). Während DmKHC 381 ein Dimer ist, bleibt NcKin 378 ein Monomer. Kann in diesem Fall der Hals von NcKin keine Superhelix bilden? Nach Superhelix-Vorhersagen mit dem Lupas-Algorithmus (Lupas *et al.*, 1997) sollte die NcKin Halsdomäne sogar besser in der Lage sein, eine Superhelix-Struktur auszubilden. Hierfür spricht die Beobachtung, dass das NcKin 433 Δ Neck Konstrukt, das die Scharnierdomäne, nicht aber die Halsregion enthält, nicht in der Lage ist, zu dimerisieren (Tab. 3). Um die Tendenz, superhelikale Strukturen auszubilden, weiter zu untersuchen, wurden im Labor von Professor Moroder am MPI in Martinsried Studien an synthetischen Peptiden aus der NcKin Halsregion durchgeführt (Doktorarbeit D. Deluca). Das Peptid, entsprechend den Aminosäuren 338 bis 379, ist prinzipiell in der Lage, eine Superhelix zu bilden. Diese Helixbildung ist jedoch stark vom pH-Wert abhängig: nur unter stark sauren Bedingungen (pH 3 bis 5) zeigt dieses Peptid im CD Spektrum die charakteristischen Merkmale einer doppelsträngigen α -Helix (Kallipolitou *et al.*, 2001). Dies weist auf die Wichtigkeit von ionisierten Glutamat-Resten für die Bildung einer Helix hin. Wie Studien an anderen synthetischen Peptiden zeigten, führt die Protonierung einer oder

mehrerer Glutamat-Reste in Helix-Positionen g oder e zu einer Stabilisierung von Superhelices (Kohn *et al.*, 1998). Tatsächlich enthält das NcKin Molekül ein Glutamat (Glu360) in einer e Position, das bei Tierkinesinen nicht vorhanden ist. Im Gegensatz zu den NcKin Peptiden zeigen synthetische Hals-Peptide von menschlichem Kinesin bei neutralem pH α -helikale Strukturen, die wesentlich stabiler als diejenigen von NcKin sind (Morii *et al.*, 1997, Tripet *et al.*, 1997). NcKin Peptide, die thermisch denaturiert werden, können sich nicht wieder in α -Helices zurück falten, sondern nehmen stattdessen β -Faltblatt-Strukturen an (Kallipolitou *et al.*, 2001). Die Peptidstudien zeigten demnach ein komplexes Bild: Obwohl Peptide der Halsregion des NcKin sehr sensitiv auf Änderungen des pH-Wertes reagieren, sind sie in der Lage, superhelikale Strukturen auszubilden. Die fehlende Dimerisierung von NcKin 433 Δ Neck läßt vermuten, dass der Hals auch *in vivo* derartige Strukturen annimmt. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Hals von NcKin notwendig, aber im Gegensatz zu den Tierkinesinen nicht hinreichend für die Dimerisierung des Moleküls ist. Zusätzliche Bereiche aus der Scharnierdomäne sind nötig, um ein stabiles und funktionales Dimer zu bilden.

4.2.2 Der Einfluss der NcKin-Halsdomäne auf die kinetischen Eigenschaften des Moleküls

Ein weiteres unerwartetes Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die Halsdomäne einen Einfluss auf das kinetische Verhalten von NcKin ausübt, sogar, wenn sie nicht als α -helikale Superhelix vorliegt. Die Konstrukte NcKin 378 und 383 haben einen sehr niedrigen ATP-Umsatz (27 bzw. 24 s⁻¹), der unter dem des monomeren NcKin 343 (260 s⁻¹), und sogar unter dem der dimeren Konstrukte liegt (57 bis 84 s⁻¹). Wieso ist die ATPase-Aktivität nicht so hoch wie die des monomeren Konstrukts NcKin 343? Spielt die Halsdomäne hier auch eine Rolle?

Es bieten sich folgende Erklärungen an:

1. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil des Proteins inaktiv vorliegt, weil die basale ATPase-Aktivität dieser Konstrukte um den Faktor 2-3 niedriger ist, als die aller anderen Konstrukte (s. Tab. 4). Dagegen spricht allerdings, dass der ATP-Umsatz nach

Behandlung des NcKin 378 mit Carboxypeptidasen (3.1.4.2) mindestens so groß wie derjenige der voll funktionstüchtigen dimeren Konstrukte wird.

2. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Bindung von NcKin 378 an Mikrotubuli zur Dimerisierung des Moleküls und folgend zu einem voll funktionsfähigen Kinesin führen könnte, und daher einen langsameren k_{cat} als NcKin 343 hätte (Crevel *et al.*, 1999). Diese Hypothese konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. In dem ADP-Freisetzungsexperiment (3.1.4.3) verliert das NcKin 378 fast 100% des gebundenen ADP in Abwesenheit von ATP. Dies spricht für eine totale Entkopplung der beiden Köpfe, was bedeutet, dass das NcKin 378 unter den experimentellen Bedingungen auf dem Mikrotubulus monomer bleibt. Diese Beobachtung wird durch die fast völlig fehlende chemische Prozessivität des NcKin 378 Konstruktes bestätigt. Im Gegensatz dazu setzt das dimere NcKin 433 nur etwa die Hälfte des gebundenen ADP in Abwesenheit von ATP frei, wie es für ein funktionsfähiges Molekül zu erwarten ist. Wahrscheinlich ist die Mikrotubuli-aktivierte Dimerisierung eines monomeren Konstruktes nur möglich, wenn die Kinesin Konzentration viel höher als die der Tubulin-Dimere ist.

3. Eventuell wirkt die nicht helikale Halsdomäne der Konstrukte NcKin 378 und 383 inhibitorisch auf den katalytischen Motor (Abb. 18). Es werden hier Bewegungsmodelle von drei zentralen Konstrukten dieser Arbeit auf dem Hintergrund dieser Annahme diskutiert. Bei dem Kopfkonstrukt NcKin 343 könnte die Halsverbindung in einer flexiblen Konformation vorliegen, in der ATP schnell hydrolysiert wird. Im Fall der monomeren Konstrukte NcKin 378 und 383 könnte der nicht helikale Hals an die Motordomäne binden und somit die ATPase-Aktivität inhibieren. Im Einklang hiermit war es im Zuge dieser Arbeit möglich, bei NcKin 378 einen Teil des Halses durch den Verdau mit Carboxypeptidasen zu entfernen (Abb. 12). Durch diesen Eingriff wurde der ATP-Umsatz dieses Konstruktes um das zweifache erhöht.

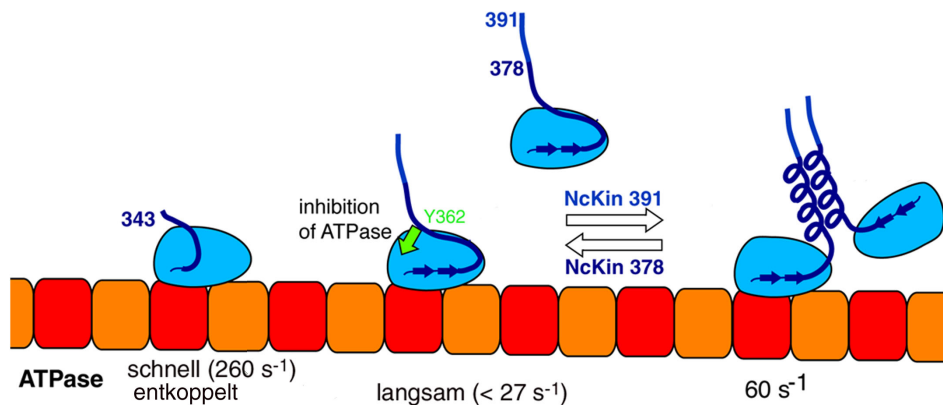


Abbildung 18: Modelle der Bewegung von verschiedenen verkürzten NcKin-Konstrukten auf dem Mikrotubulus

Das NcKin 343 Kopfkonstrukt mit der ungeordneten Halsverbindung hat einen sehr hohen ATP-Umsatz, aber kann diesen nicht in schnelle Gleitgeschwindigkeit umsetzen. Der nicht helikale Hals von NcKin 378 könnte über den konservierten Tyrosinrest (Y362) an die Motordomäne binden, und die dadurch induzierte Konformation der Halsverbindung könnte zu einer langsamen ATPase führen. Durch die zusätzlichen Aminosäuren der Scharnierdomäne in NcKin 391 wird die Bildung einer Superhelix begünstigt, und es entsteht ein funktionsfähiges dimeres Molekül.

Nach Erkenntnissen einer neueren Studie könnte das pilzspezifische Tyrosin Y362 im NcKin-Hals der Grund für die ATPase Inhibition bei den monomeren Konstrukten sein (Friederike Schäfer, Manuskript eingereicht). Durch den Austausch dieses Tyrosins durch Lysin im monomeren NcKin 383 erhöht sich der ATP-Umsatz auf das fünffache (von $k_{\text{cat}} = 24 \text{ s}^{-1}$ auf $k_{\text{cat}} = 115 \text{ s}^{-1}$) und nähert sich damit dem monomeren NcKin 343 an. Im dimeren NcKin 433-Y362K führt diese Mutation zu einer Entkopplung der ATP-Hydrolyse ($k_{\text{cat}} = 260 \text{ s}^{-1}$) und Motilität ($1,0 \mu\text{m/s}$). Im funktionellen Dimer spielt vermutlich dieses Tyrosin eine wichtige Rolle bei der Koordination der beiden Köpfe.

Die zweite wichtige kinetische Eigenschaft, die untersucht wurde, war die Prozessivität der C-terminal verkürzten Konstrukte. Das Bewegungsmodell der "alternierenden Köpfe" erklärt die Prozessivität dadurch, dass die beiden Kinesinköpfe koordiniert sind, und setzt folglich dimere Motormoleküle voraus (Abb. 2). Damit der ungebundene Kopf die nächste

Mikrotubuli-Bindestelle im Abstand von 8 nm erreichen kann, muss nach ATP-Bindung und -Hydrolyse der Abstand der beiden Köpfe auf 8 nm vergrößert werden. Verschiedene Modelle sind dafür entworfen worden: Entweder öffnet sich die superhelikale Halsdomäne (Kozieski *et al.*, 1997, Hoenger *et al.*, 2000), oder die ansonsten angedockte Halsverbindung löst sich vom Motor (Rice *et al.*, 1999). Auch eine Kombination aus beiden Modellen ist denkbar (Mandelkow und Hoenger, 1999). Allerdings gibt es Studien, die die Hypothese des "Aufschmelzens" der Hals-Superhelix widerlegen (Tomishige and Vale, 2000). Wenn das Aufschmelzen der Hals-Superhelix durch Einführen von Disulfidbrücken verhindert wird, ändert sich nichts an der prozessiven Bewegung des Moleküls. Eine weitere Studie, bei der die Halsdomäne durch eine stabile Superhelix ersetzt wurde, zeigte keine Änderung der ATPase-Aktivität und Motilität des Kinesins, und spricht daher ebenso gegen ein Aufschmelzen der Hals-Superhelix (Romberg *et al.*, 1998). Die vorliegende Arbeit konnte hier keine weitere Klarheit bringen. In jedem Fall setzen die Modelle aber die Koordination zweier Köpfe voraus, was erklärt, warum die monomeren Konstrukte NcKin 378 und 383 nicht prozessiv sind.

Die bisherige Diskussion zeigt, dass die Halsdomäne der Pilzkinesine einen starken Einfluss sowohl auf das Dimerisierungsverhalten, als auch auf die katalytischen Eigenschaften der Motordomäne ausübt. Dies legt nahe, dass der besondere Hals von NcKin auch wichtig für die schnelle Motilität des Motors ist und spezifisch auf das Zusammenwirken mit der NcKin-Motordomäne abgestimmt ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit, die anhand von chimären HsKin-NcKin-Konstrukten gewonnen wurden, sprechen für diese Vermutung. So ist die Chimäre NcKin Neck, die den NcKin-Hals im HsKin-Hintergrund enthält, deutlich langsamer als HsKin (Abb. 16). Auch die Prozessivität könnte verringert sein, denn der $K_{0,5MT}$ -Wert im ATPase-Test lag höher als der der anderen Konstrukte. Alternativ könnte dies jedoch auf einer niedrigeren Mikrotubuli-Affinität beruhen, weil der Hals von NcKin weniger positiv geladene Aminosäuren als der Hals von HsKin hat. Es wurde nämlich spekuliert, dass die positiv geladenen Lysinreste des humanen Kinesin-Halses über elektrostatische

Wechselwirkungen mit negativ geladenen Gruppen des Tubulin-C-Terminus die Prozessivität des Moleküls modulieren (Abb. 5, Thorn *et al.*, 2000; Wang und Sheetz, 2000).

4.3 Die Rolle der NcKin-Scharnierdomäne

Aufgrund der geringen Sequenzkonservierung wurde der Scharnierdomäne von konventionellem Kinesin bisher wenig Bedeutung beigemessen. Im Falle von NcKin konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch gezeigt werden, dass das Scharnier essenziell für die Ausbildung einer superhelikalen Halsstruktur ist (vgl. 4.2.1). Wie das Scharnier auf die Halsdomäne wirkt, bleibt jedoch unklar. Die Scharnierdomäne enthält keine Aminosäuren, die die Bildung superhelikaler Strukturen favorisieren, wie bestimmte Heptad-Wiederholungssequenzen (VGALQKG; Kohn *et al.*, 1998, Burkhard *et al.*, 2000). Die Struktur der Scharnierdomäne konnte wegen der Unlöslichkeit entsprechender bakteriell exprimierter Peptide nicht untersucht werden. Das Konstrukt NcKin 391 ist ein Dimer, das sieben Aminosäuren kürzere NcKin 383 allerdings nicht. Die Aminosäuren von 384-391 sind demnach wichtig für die Dimerisierung der Halsdomäne. Insbesondere scheint das konservierte W384 eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Mutante NcKin 433W384C, bei dem die Aminosäure Tryptophan in Position 384 durch Cystein ausgetauscht ist, ist ein Monomer (unveröffentlichte Daten von Manuela Ludwig). Wie diese Aminosäure die Dimerisierung bewirken könnte, ist noch unklar.

Die vorliegende Arbeit zeigte, dass sobald NcKin genügend Anteile des Scharniers enthält, um zu dimerisieren, die kinetischen Eigenschaften und die Motilität nicht signifikant vom Wildtyp-Volllängenkinesin zu unterscheiden waren. Mit Ausnahme von NcKin 391 wiesen alle Dimere Gleitgeschwindigkeiten von 2,61 bis 2,14 $\mu\text{m/s}$ auf (3.13).

Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit früheren Studien (Grummt *et al.*, 1998). Hier führten Deletion oder Substitution von superhelikalen Strukturen oder Verkürzung des Scharniers im verwandten *Syncephalastrum racemosum* Kinesin zu einer Reduktion der Motorgeschwindigkeit und einer Entkopplung des ATP-Umsatzes von der Gleitgeschwindigkeit. Insertion des Scharniers von anderen Species wie *Neurospora* oder

Drosophila führte zu einer vollständigen Restaurierung dieses Effekts. Die Chimäre NcKin Hinge mit dem NcKin Scharnier war ebenfalls etwas langsamer als HsKin (0,3 statt 0,45 $\mu\text{m/s}$). Offenbar bilden Hals und Scharnier eine nicht trennbare Einheit.

4.4 Ausblick

Die vorliegenden Studien zeigten, dass katalytische Aktivität und Motilität zwei Eigenschaften des Kinesin-Moleküls sind, die durch unterschiedliche Domänen bewirkt werden und über unterschiedliche Vorgehensweisen untersucht werden können. Für die Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften des Moleküls sind monomere Konstrukte geeigneter, während für Studien der motilen Eigenschaften dimere Konstrukte aussagekräftiger sind. Daher könnten in zukünftigen Studien zusätzliche monomere HsKin-NcKin-Chimären benutzt werden, um die hypothetische Interaktion von N- und C-terminaler Motorkopfhälfte zu testen. Die Grundlage der schnellen Motilität muss an Dimeren getestet werden, die die NcKin-ATPase-Domäne, d.h. den Kernmotor, enthalten, weil ohne eine schnelle Katalyse keine schnelle Bewegung möglich ist. Die Effektivität der Bewegung dieser Konstrukte könnte noch genauer mit einem Einzelmolekül-Test, der auf totaler interner Reflexion beruht (TIRF-Test) festgestellt werden. Dabei werden einzelne, fluoreszenzmarkierte Motoren bei ihrer Bewegung entlang des Mikrotubulus im Mikroskop beobachtet und so die mechanische Prozessivität bestimmt (Vale *et al.*, 1996). Erste Untersuchungen wurden bereits mit dem Volllängen-NcKin Konstrukt durchgeführt und dabei Aussagen über dessen Prozessivität, Schrittlänge und Krafterzeugung getroffen (Stefan Lakämper, Manuskript eingereicht).

Weiterhin ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit die funktionelle Einheit Hals-Scharnier wichtig. Folgende Selektionsschemata für Mutanten, die schnellere Gleitgeschwindigkeit als HsKin aufweisen, könnten hier vorgeschlagen werden: Einführen oder deletieren von einzelnen Aminosäuren oder Gruppen von Hals und Scharnier in den NcKin Motor oder in die NcKin-HsKin Chimäre. Die mögliche Funktion von Schlüsselaminosäuren könnte auch

durch deren Austausch durch die Aminosäure Alanin untersucht werden. Damit kann deren Funktion gestört werden und neue Erkenntnisse gewonnen werden.

Eine mögliche Interaktion des NcKin-Halses mit der Kopfdomäne wurde durch diese und eine neuere Studie vermutet. Die mögliche Mitwirkung des NcKin-Halses an der Bewegung könnte durch dessen Bindung an die Motordomäne über reversible Disulfidbrücken beobachtet werden. Konstrukte, die die Halsdomäne an den Motorkopf fixiert haben, könnten im Motilitätstest und in den gängigen kinetischen Experimenten untersucht werden. Zusätzlich könnten diese Konformationsänderungen über Fluoreszenz-Resonanz-Transfer (FRET) detektiert werden.

5 Zusammenfassung

Das konventionelle Kinesin von *N. crassa*, NcKin, ist wie alle Kinesine dieser Familie von N- zu C-Terminus in funktionelle Domänen aufgeteilt: katalytischer Motor-Kopf, Halsverbindung, Hals, Scharnier und Schwanzdomäne. In dieser Arbeit wurden die mechanischen und biochemischen Eigenschaften dieses Vertreters der Pilzkinesine untersucht. Als erstes wurden C-terminale Verkürzungen an Kopf-, Hals- und Scharnierdomänen hergestellt. Diese Verkürzungen wurden so eingeführt, dass die resultierenden Konstrukte direkt mit bekannten *Drosophila*-Kinesin Mutanten vergleichbar waren. Es wurde der Oligomerisierungszustand und die kinetischen Eigenschaften, Motilität und ATPase-Aktivität, der NcKin-Konstrukte untersucht. Diese Experimente zeigten, dass die Hals- und Scharnierdomänen des Pilzkinesins im Vergleich zum Tierkinesin zusätzliche Funktionen übernehmen und nicht nur für die Dimerisierung verantwortlich sind, sondern auch das kinetische Verhalten direkt beeinflussen. In dem zweiten Teil dieser Arbeit wurde zusätzlich versucht, direkte Informationen über die Grundlagen der schnellen NcKin-Bewegung zu erlangen. In einem Selektionsschema auf Funktionsgewinn wurden die funktionellen Domänen von NcKin (Kopf, Halsverbindung, Hals und Scharnier) in die entsprechenden Stellen des langsameren menschlichen Kinesins eingeführt. Folgende Aufschlüsse sind in dieser Arbeit über die Funktion des NcKin Moleküls gewonnen worden:

1. Die C-terminal verkürzten Konstrukte zeigten, dass bei NcKin die motilen und enzymatischen Eigenschaften, wie bei Tierkinesinen, von dem Oligomerisierungszustand des Moleküls abhängen. Ein Motor-Molekül ist nur dann voll funktionsfähig, wenn es als stabiles Dimer vorliegt. Bei den Tierkinesinen ist die Hals-Superhelix ausreichend für die Dimerisierung. Im Gegensatz dazu genügt bei NcKin die Halsdomäne nicht. In diesem Fall sind zusätzlich Schlüsselsequenzen im Scharnier für die Stabilisierung der Hals-Superhelix nötig. Bei NcKin bilden daher Hals- und Scharnierdomäne, anders als bei den Tierkinesinen, eine untrennbare Einheit.

2. Schon in früheren Studien wurde die wichtige Rolle des NcKin-Halses bei der Bewegungserzeugung beobachtet. In dieser Arbeit konnte erstmals eine Inhibition der ATPase-Aktivität bei den monomeren Konstrukten, die die Halsdomäne erhalten, beobachtet werden. Die Ergebnisse deuten an, dass der NcKin-Hals aktiv an der Umsetzung der Energiefreisetzung in Bewegung teilnimmt, eventuell durch direkten Kontakt mit der katalytischen Kopfdomäne.

3. Eine zentrale Rolle bei der Bewegung des NcKin-Dimers spielt die Kopfdomäne. Hier befinden sich die Determinanten für die schnelle ATPase-Aktivität. Das NcKin 343 Kopf-Konstrukt hat einen viel höheren k_{cat} -Wert als das homologe DmKHC Konstrukt. Im Kopf befinden sich demnach Bereiche, die für die Umsetzung der schnellen katalytischen Aktivität in schnelle Bewegung verantwortlich sind. Die Motordomäne von NcKin alleine war jedoch nicht ausreichend, um Chimären mit HsKin auf die NcKin-Wildtyp-Geschwindigkeit zu beschleunigen. Dieses Ergebnis weist auf die Wichtigkeit der anderen N-terminalen Domänen, Hals und Scharnier, für die Bewegungserzeugung hin.

6 Literatur

Ambler, R.P. (1972) Enzymatic hydrolysis with carboxypeptidases. *Methods Enzymol*, 25, 143-154.

Andrews, P. (1970) Estimation of molecular size and molecular weights of biological components by gel filtration. *Methods Biochem. Anal.*, 18, 1-53

Brady, S.T. (1985) A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature*, 317, 73-75.

Cantor, C.R. and Schimmel, P.R. (1980) Techniques for the Study of Biological Structure and Function. In *Biophysical Chemistry*. W. H. Freeman, San Francisco, Vol. 2.

Case, R.B., Rice, S., Hart, C.L., Ly, B. and Vale, R.D. (2000) Role of the kinesin neck linker and catalytic core in microtubule-based motility [see comments]. *Curr Biol*, 10, 157-160.

Chung, C., Miller, R.H. (1993) Preparation and storage of competent Escherichia coli cells. *Methods Enzymol*, 218, 621-627.

Coy, D.L., Hancock, W.O., Wagenbach, M. and Howard, J. (1999) Kinesin's tail domain is an inhibitory regulator of the motor domain [see comments]. *Nat-Cell-Biol*, 1, 288-292 issn: 1465-7392.

Crevel, I., Carter, N., Schliwa, M. and Cross, R. (1999) Coupled chemical and mechanical reaction steps in a processive Neurospora kinesin. *Embo J*, 18, 5863-5872.

Funatsu, T., Harada, Y., Higuchi, H., Tokunaga, M., Saito, K., Ishii, Y., Vale, R.D. and Yanagida, T. (1997) Imaging and nano-manipulation of single biomolecules. *Biophys Chem*, 68, 63-72.

Grummt, M., Pistor, S., Lottspeich, F. and Schliwa, M. (1998a) Cloning and functional expression of a 'fast' fungal kinesin. *FEBS Lett*, 427, 79-84.

- Grummt, M., Woehlke, G., Henningsen, U., Fuchs, S., Schleicher, M. and Schliwa, M.** (1998b) Importance of a flexible hinge near the motor domain in kinesin-driven motility. *Embo Journal*, 17, 5536-5542.
- Gulick, A.M., Song, H., Endow, S.A. and Rayment, I.** (1998) X-ray crystal structure of the yeast Kar3 motor domain complexed with Mg.ADP to 2.3 Å resolution. *Biochemistry*, 37, 1769-1776.
- Hackney, D.D.** (1995) Highly processive microtubule-stimulated ATP hydrolysis by dimeric kinesin head domains. *Nature*, 377, 448-450.
- Hilgenfeld, R.** (1995a) How do the GTPases really work? *Nat. Struct. Biol.*, 2, 3-6.
- Hilgenfeld, R.** (1995b) Regulatory GTPases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 5, 810-817.
- Houdusse, A., Kalabokis, V.N., Himmel, D., Szent-Györgyi, A.G. and Cohen, C.** (1999) Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: a novel conformation of the myosin head. *Cell*, 97, 459-470.
- Huang, T. and Hackney, D.** (1994) Drosophila kinesin minimal motor domain expressed in Escherichia coli. Purification and kinetic characterization. *J. Biol. Chem.*, 269, 16493-16501.
- Huang, T., Suhan, J. and Hackney, D.** (1994) Drosophila kinesin motor domain extending to amino acid position 392 is dimeric when expressed in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.*, 269, 16502-16507.
- Inoue C, S.K., Kusano T.** (1990) Thiobacillus ferrooxidans mer operon: sequence analysis of the promoter and adjacent genes. *Gene*, 96, 23-28.
- Inoue, Y., Toyoshima, Y.Y., Iwane, A.H., Morimoto, S., Higuchi, H. and Yanagida, T.** (1997) Movements of truncated kinesin fragments with a short or an artificial flexible neck. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 7275-7280.
- Itakura S, Y.H., Toyoshima YY, Ishijima A, Kojima T, Harada Y, Yanagida T, Wakabayashi T, Sutoh K.** (1993) Force-generating domain of myosin motor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 196, 1504-1510.

- Jiang, W., Stock, M.F., Li, X. and Hackney, D.D.** (1997) Influence of the kinesin neck domain on dimerization and ATPase kinetics. *J Biol Chem*, 272, 7626-7632.
- Kallipolitou, A., Deluca, D., Majdic, U., Lakämper, S., Cross, R., Meyhöfer, E., Moroder, L., Schliwa, M. and Woehlke, G.** (2001) Unusual properties of the fungal conventional kinesin neck domain from *Neurospora crassa*. *Embo J*, 20, 6226-6235.
- Kikkawa, M., Okada, Y. and Hirokawa, N.** (2000) 15 A resolution model of the monomeric kinesin motor, KIF1A. *Cell*, 100, 241-252.
- Kirchner, J., Seiler, S., Fuchs, S. and Schliwa, M.** (1999) Functional anatomy of the kinesin molecule in vivo. *EMBO-J*, 18, 4404-4413 FTXT: Full Text ISSN: 0261-4189.
- Kohn, W.D., Kay, C.M. and Hodges, R.S.** (1998) Orientation, positional, additivity and oligomerization-state effects of internal ion pairs in α -helical coiled-coils. *J. Mol. Biol.*, 238, 993-1012.
- Kozielski, F., Sack, S., Marx, A., Thormahlen, M., Schonbrunn, E., Biou, V., Thompson, A., Mandelkow, E.M. and Mandelkow, E.** (1997a) The crystal structure of dimeric kinesin and implications for microtubule-dependent motility. *Cell*, 91 (7), 985-994.
- Kozielski, F., Schonbrunn, E., Sack, S., Muller, J., Brady, S.T. and Mandelkow, E.** (1997b) Crystallization and preliminary X-ray analysis of the single-headed and double-headed motor protein kinesin. *J Struct Biol*, 119, 28-34.
- Kull, F.J., Sablin, E.P., Lau, R., Fletterick, R.J. and Vale, R.D.** (1996) Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature*, 380, 550-555.
- Lakämper, S., Kallipolitou, A., Woehlke, G., Schliwa, M., Meyhöfer, E.** (2002) Single fungal kinesin motor molecules move processively along microtubules. Manuskript eingereicht.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 356, 722-725.

- Lehmler, C., Steinberg, G., Snetselaar, K.M., Schliwa, M., Kahmann, R. and Bolker, M.** (1997) Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Embo J*, 16, 3464-3473.
- Ludwig, M., Woehlke, G.** (2002) A point mutation in the *N. crassa* kinesin hinge. (In Bearbeitung)
- Lupas, A.** (1997) Predicting coiled-coil regions in proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 7, 388-393.
- Ma, Y.Z. and Taylor, E.W.** (1995a) Kinetic mechanism of kinesin motor domain. *Biochemistry*, 34, 13233-13241.
- Ma, Y.Z. and Taylor, E.W.** (1995b) Mechanism of microtubule kinesin ATPase. *Biochemistry*, 34, 13242-13251.
- Majdic, U.** (1999) Untersuchungen zur Geschwindigkeits- und Polaritätsdetermination bei Kinesinen. Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Mandelkow, E. and Hoenger, A.** (1999) Structures of kinesin and kinesin-microtubule interactions. *Curr-Opin-Cell-Biol*, 11, 34-44 issn: 0955-0674.
- Mandelkow, E.-M., Herrmann, M. and Rühl, U.** (1985) Tubulin Domains Probed by Limited Proteolysis and Subunit-specific Antibodies. *J. Mol. Biol.*, 185, 311-327.
- Morii, H., Takenawa, T. Arisaka, F. and Shimizu T.** (1997) Identification of kinesin neck region as a stable α -helical coiled-coil and its thermodynamic characterization. *Biochemistry*, 36, 1933-1942.
- Nishiyama, M., Muto, E., Inoue, Y. Yanagida, T., Higuchi, H.** (2001) Substeps within the 8 nm step of the ATPase cycle of single kinesin molecules. *Nat Cell Biol*, 3, 425-428.
- Paschal BM and Valle, R.** (1993) Microtubule and axoneme gliding assays for force production by microtubule motor proteins. *Methods Cell Biol*, 39, 65-74.

- Requena, N., Alberto-Segui, C., Winzenburg, E., Horn, C., Schliwa, M., Philippsen, P., Liesel, R., and Fischer, R.** (2001) Conventional kinesin of *Aspergillus nidulans* affects nuclear positioning and enhances microtubule destabilisation. *Mol Microbiol*, 42, 121-132.
- Rice, S., Lin, A.W., Safer, D., Hart, C.L., Naber, N., Carragher, B.O., Cain, S.M., Pechatnikova, E., Wilson-Kubalek, E.M., Whittaker, M., Pate, E., Cooke, R., Taylor, E.W., Milligan, R.A. and Vale, R.D.** (1999) A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature*, 402, 778-784.
- Romberg, L., Pierce, D.W. and Vale, R.D.** (1998) Role of the kinesin neck region in processive microtubule-based motility. *J Cell Biol*, 140, 1407-1416.
- Rosenfeld, S.S., Rener, B., Correia, J.J., Mayo, M.S. and Cheung, H.C.** (1996b) Equilibrium studies of kinesin-nucleotide intermediates. *J Biol Chem*, 271, 9473-9482.
- Sablin, E.P., Case, R.B., Dai, S.C., Hart, C.L., Ruby, A., Vale, R.D. and Fletterick, R.J.** (1998) Direction determination in the minus-end-directed kinesin motor ncd. *Nature*, 395, 813-816.
- Sablin, E.P., Kull, J.F., Cooke, R., Vale, R.D. and Fletterick, R.J.** (1996) Crystal structure of the motor domain of the kinesin-related motor ncd. *Nature*, 380, 555-559.
- Sabrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Schief WR and Howard, J.** (2001) Conformational changes during kinesin motility. *Curr Opin Cell Biol*, 13, 19-28.
- Scholey, J.M., Porter, M.E., Grissom, P.M. and McIntosh, J.R.** (1985) Identification of kinesin in sea urchin eggs, and evidence for its localization in the mitotic spindle. *Nature*, 318, 483-486.
- Schäfer, F., Deluca, D., Majdic, U., Kirchner, J., Schliwa, M., Moroder, L., Woehlke, G.** (2002) A conserved tyrosine in the neck of a fungal kinesin regulates the catalytic motor core. (Manuskript eingereicht).

- Seeberger, C. Mandelkow, E., and Meyer, B.** (2000) Conformational preferences of a synthetic 30mer peptide from the interface between the neck and the stalk regions of kinesin. *Biochemistry*, 39, 12558-12567.
- Seiler, S., Kirchner, J., Horn, C., Kallipolitou, A., Woehlke, G. and Schliwa, M.** (2000) Cargo binding and regulatory sites in the tail of fungal conventional kinesin. *Nature Cell Biol.*, 2, 333-338.
- Shimizu, T., S., T.K., Ruby, A. and Vale, R.D.** (2000) ATPase kinetic characterization and single molecule behavior of mutant human kinesin motors defective in microtubule-based motility. *Biochem.*, 39, 5265-5273.
- Song, Y.H. and Mandelkow, E.** (1993) Recombinant kinesin motor domain binds to beta-tubulin and decorates microtubules with a B surface lattice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 1671-1675.
- Song, Y.H., Marx, A., Muller, J., Woehlke, G., Schliwa, M., Krebs, A., Hoenger, A. and Mandelkow, E.** (2001) Structure of a fast kinesin: implications for ATPase mechanism and interactions with microtubules. *Embo J*, 20, 6213-6225.
- Sosa H, P.E., Moerner WE, Goldstein LS.** (2001) ADP-induced rocking of the kinesin motor domain revealed by single-molecule fluorescence polarization microscopy. *Nat Struct Biol*, 8, 478-480.
- Steinberg, G. and Schliwa, M.** (1995) The *Nerospora* organelle motor: a distant relative of conventional kinesin with unconventional properties. *Mol. Biol. Cell*, 6, 1605-1618.
- Studier FW, R.A., Dunn JJ, Dubendorff JW.** (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, 185, 60-89.
- Tabor S, R.C.** (1990) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Effect of pyrophosphorolysis and metal ions. *J. Biol. Chem.*, 265, 8322-8328.
- Thorn, K.S., Ubersax, J.A. and Vale, R.D.** (2000) Engineering the processive run length of the kinesin motor. *J Cell Biol*, 151, 1093-1100.

- Tomishige, M. and Vale, R.D.** (2000) Controlling kinesin by reversible disulfide cross-linking. Identifying the motility-producing conformational change. *J Cell Biol*, 151, 1081-1092.
- Tripet, B., Vale, R.D. and Hodges, R.S.** (1997) Demonstration of coiled-coil interactions within the kinesin neck region using synthetic peptides. Implications for motor activity. *J Biol Chem*, 272, 8946-8956.
- Vale, R.D., Coppin, C.M., Malik, F., Kull, F.J. and Milligan, R.A.** (1994) Tubulin GTP hydrolysis influences the structure, mechanical properties, and kinesin-driven transport of microtubules. *J Biol Chem*, 269, 23769-23775.
- Vale, R.D. and Fletterick, R.J.** (1997) The design plan of kinesin motors. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 13, 745-777.
- Vale, R.D., Reese, T.S. and Sheetz, M.P.** (1985) Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell*, 42, 39-50.
- Vale, R.D., Schnapp, B. J., Mitchison, T., Steuer, E., Reese, T. S. and Sheetz, M. P.** (1985a) Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro. *Cell*, 43, 623-632.
- Wang, Z. and Sheetz, M.P.** (2000) The C-terminus of tubulin increases cytoplasmic dynein and kinesin processivity [In Process Citation]. *Biophys J*, 78, 1955-1964.
- Wells, A.L., Lin, A.W., Chen, L.Q., Safer, D., Cain, S.M., Hasson, T., Carragher, B.O., Milligan, R.A. and Sweeney, H.L.** (1999) Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards [see comments]. *Nature*, 401, 505-508 issn: 0028-0836.
- Woehlke, G.** (2001) A look into kinesin's powerhouse. *FEBS Lett.*, 508, 291-294.
- Woehlke, G., Ruby, A.K., Hart, C.L., Ly, B., Hom Booher, N. and Vale, R.D.** (1997) Microtubule interaction site of the kinesin motor. *Cell*, 90, 207-216.

Wu, Q., Sandrock, T.M., Turgeon, B.G., Yoder, O.C., Wirsal, S.G. and Aist, J.R. (1998)

A fungal kinesin required for organelle motility, hyphal growth, and morphogenesis. *Mol Biol Cell*, 9, 89-101.

7 Danksagungen

Herrn Prof. Dr. M. Schliwa danke ich sehr herzlich für die interessante Themenstellung und seine ständige Gesprächsbereitschaft und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. C. N. David danke ich besonders für sein Interesse und die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät.

Herrn Dr. Günther Woehlke danke ich für die engagierte Betreuung, auf die ich mich immer verlassen konnte, für die vielen anregenden Diskussionen und tatkräftigen Hilfestellungen im Labor und am Computer.

Herrn Prof. Moroder und Frau Dominga Deluca am MPI für Biochemie, Martinsried danke ich für die mir zu Verfügung gestellten Peptid-Daten.

Ich möchte mich bei meinen Kolleginnen Friederike Schäfer, Kathrin Hahlen und Lucia Driller bedanken, für viel Geduld beim Korrekturlesen dieser Arbeit, sowie die entspannende Unterhaltung zwischendurch.

Manuela Ludwig danke ich für die vielen Hilfestellungen im Labor.

Meinem Freund Roland Pfersich für seine Geduld und Unterstützung.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern für die Unterstützung in allen Bereichen meines Lebens und vor allem während meines Studiums.

8 Lebenslauf

Name: Athina Kallipolitou

Geburtsdatum: 19. 04. 1972

Geburtsort: Thessaloniki

Familienstand: ledig

Nationalität: griechisch

Schulausbildung:

1978 - 1984 Grundschule

1984 - 1987 Gymnasium

1987-1990 Lyceum

Juli 1990 staatliche Prüfungen „Panelladikes“ in den Fächern Biologie, Chemie, Physik und Griechisch

Hochschulausbildung:

1992 - 1995 Grundstudium der Biologie an der FAU Erlangen-Nürnberg

Mai 1995 Vordiplomprüfungen in den Fächern Botanik, Zoologie, Physik, Organische Chemie und Anorganische Chemie; Gesamtnote 1,6

1995 - 1998 Hauptstudium der Biologie

Juli 1997 Diplomprüfungen in den Fächern Genetik (Schwerpunkt), Virologie, Botanik und Pharmazeutische Chemie

1997 - 1998 Diplomarbeit an der medizinischen Virologie der FAU Erlangen-Nürnberg;
Titel: „Interaktionen von *Herpesvirus saimiri*-Tip mit Tap und Lck-Rezeptor-Komplexen“

August 1998 Diplom; Gesamtnote 1,8

1998-2002 Doktorarbeit am Institut für Zellbiologie der LMU, München;
Thema: „Charakterisierung von Domänen des schnellen konventionellen Kinesins aus *Neurospora crassa* mit Hilfe C-terminal verkürzter und chimärer Mutanten“

November 2002 Promotion; Gesamtnote 1,3