

Zusammenfassung

Myosin VI ist ein molekularer Motor, der mehrere 36 nm lange Schritte auf Aktinfilamenten nehmen kann. Der Laufmechanismus von Myosin VI ist jedoch umstritten, weil der Motor grosse Schritte nehmen kann, ohne die dafür erforderliche Hebelarmlänge zu besitzen³⁵. Daher wurde Myosin VI als erste Ausnahme der weitgehend etablierten Hebelarmtheorie angesehen. Es war demnach wichtig zu zeigen, ob Myosin VI trotz seines kurzen Hebelarms 'hand-over-hand' auf Aktinfilamenten laufen kann. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein einzelner Kopf um 72 nm versetzt wird, sobald sich das Protein einen Schritt auf Aktin vorwärts bewegt⁶⁶. Weil diese Distanz der doppelten Schrittweite des Massezentrums von Myosin VI (36 nm) entspricht^{49,74}, demonstriert dieses Ergebnis, dass Myosin VI 'hand-over-hand' auf Aktin läuft. Die Versetzung eines Kopfes um 72 nm impliziert die Existenz eines mechanisch dehnbaren Elements, das die Überbrückung der Distanz zwischen zwei Köpfen ermöglicht.

Eine neue Technologie namens Single molecule High Resolution Colocalization (SHREC) wurde etabliert, die es erlaubt, Distanzen zwischen zwei Fluorophoren in Makromolekülen unter der beugungsbegrenzten Auflösung des emittierten Lichts zu bestimmen⁶⁷. Hierbei wurden zwei spektral nicht überlappende Fluorophore verwendet. Diese wurden separat detektiert und deren Zentrum mit Nanometer Präzision einzeln lokalisiert. Anschließend wurden die Fluoreszenzzentren aufeinander projiziert und die Distanz zwischen ihnen bestimmt. Die SHREC Technologie kann mit einer unteren Auflösungsgrenze von ~10 nm die spektroskopische Kluft zwischen Einzel-Molekül FRET (~10 nm) und der beugungsbegrenzten Fluoreszenzmikroskopie (~250 nm) überbrücken. Das Potential dieser neuen Technologie wurde an dem prozessiven Myosin V Protein getestet. Myosin V kann mit seinen langen Hebelarmen 'hand-over-hand' auf dem Aktinfilament laufen. Das Modell sagte ein periodisches Alternieren der Myosin V Köpfe während des Laufens vorher, das mit Hilfe der SHREC Technologie durch Markierung der beiden Köpfe mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren direkt beobachtet werden konnte.

Die reversible Phosphorylierung der regulatorischen Seitenkette (RLC) vom Wildtyp *Dictyostelium* Myosin II führt zu einer sechsfachen Stimulierung seiner Aktin-aktivierten ATP Hydrolyse¹⁷. Im Gegensatz dazu ist diese Hydrolyse Aktivität der freien Köpfe (S1) unabhängig von der RLC Phosphorylierung. Der molekulare Mechanismus dieser Regulierung ist unbekannt, weil in den bekannten Kristallstrukturen die RLC weit entfernt von der katalytischen Domäne angeordnet ist^{7,10}. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit eine unerwartete Interaktion zwischen dem Kopf und der RLC im *Dictyostelium* Myosin S1 entdeckt. Zudem wirkte die RLC Phosphorylierung inhibierend auf die Kopf-RLC Wechselwirkung. Eine erhöhte Interaktion zwischen dem Kopf und der RLC im unphosphorylierten Zustand deutet auf eine gekrümmte Konformation hin wie sie auch für das unphosphorylierte Myosin II im glatten Muskel im Elektronenmikroskop beobachtet wurde^{24,25}. Die vom Phosphorylierungszustand abhängige Konformationsänderung zusammen mit Strukturinformationen aus früheren Studien, führte zu der Aufstellung eines Modells, das die RLC regulierte Aktinstimulierung der ATP Hydrolyse von *Dictyostelium* Myosin erklärt. In diesem Model führt die Dephosphorylierung der RLC zu einer Konformation des Wildtyp Proteins, die sterisch die Bindung von Aktin an Myosin behindert. Die Aktin Bindung von freien S1 Köpfen wird im Gegensatz dazu durch diese Konformationsänderung nicht beeinflusst.