

Anwendung: Biologische Motoren

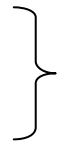
Motorproteine

Myosin

Aktinfilament

Kinesin

Dynein



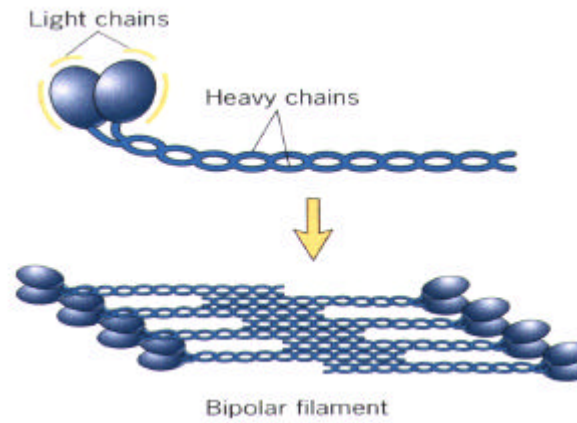
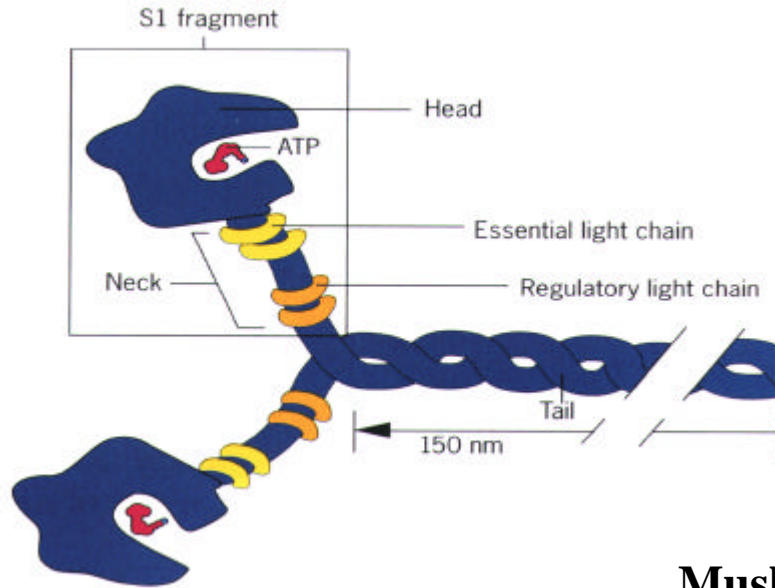
Mikrotubuli

Weitere Motorproteine:

- ATPasen
- Polymerasen
- Helikasen

- gerichtete Translokation entlang eines Transportweges (Filamente)
- Umwandlung chemischer Energie (ATP- Hydrolyse) in mechanische Energie
- Geschwindigkeiten: $\sim 0.02 - 8 \mu\text{ms}^{-1}$
- Kräfte: einige Piconewton
- Aufgaben in der Zelle: z.B. Muskelkontraktion, Transport (Vesikel, Organellen), Zellbewegung, Spindel (Zellteilung)

Myosin

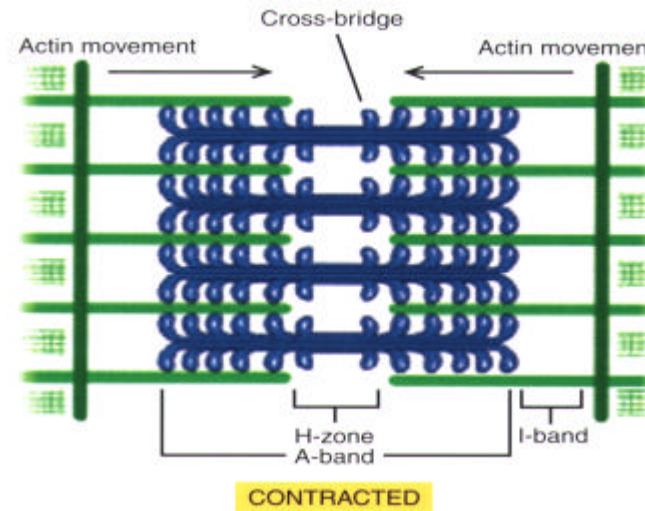
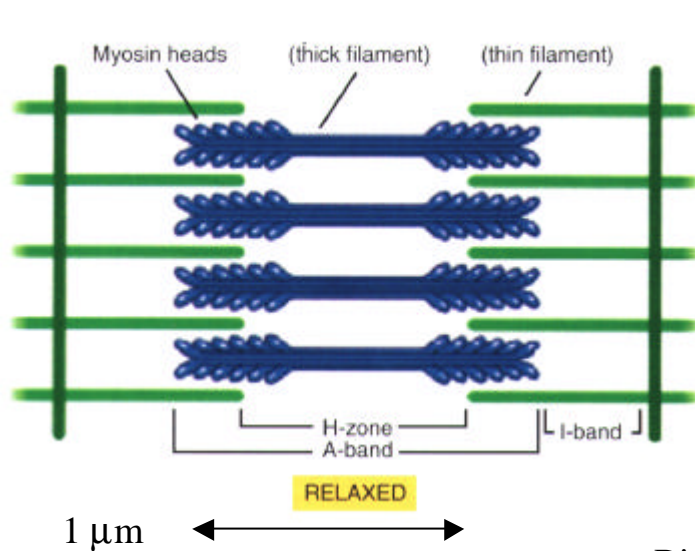


Aktin-filament

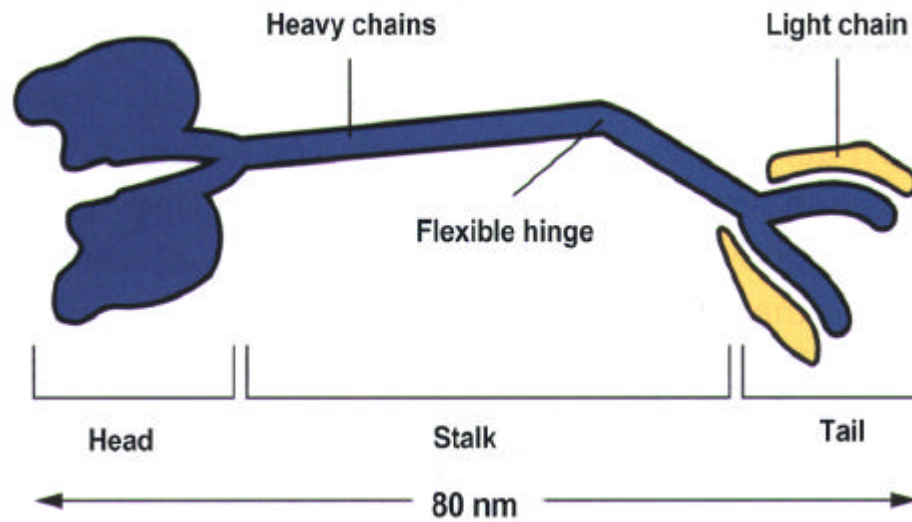


Polarität
↓

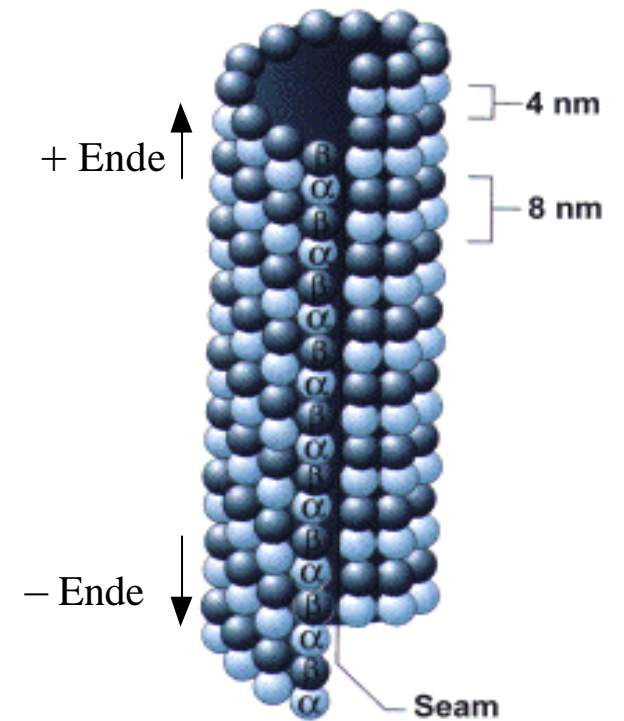
Muskelkontraktion



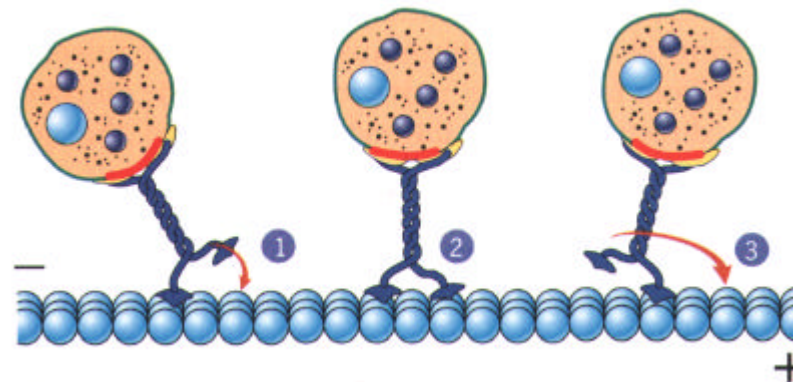
Kinesin



Mikrotubulus



Vesikeltransport



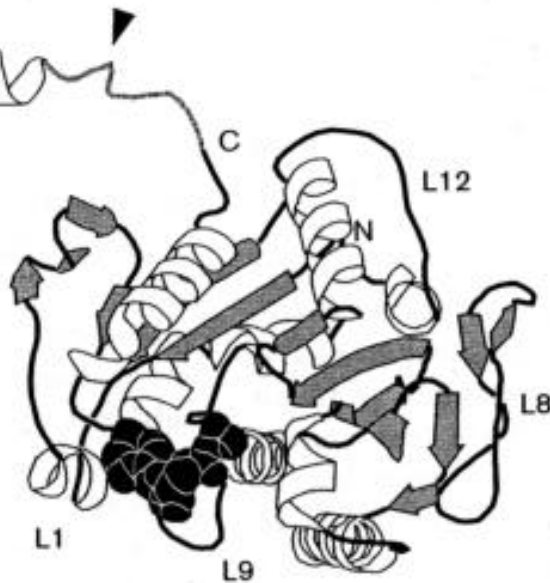
Biospektroskopie

Struktur der Motorproteine

Myosin: S1-Kopfgruppe



Kinesin II
Struktur der Kopfgruppe aus
(Rattenhirn), *Sack et al., 1997*



Myosin II
Struktur der S1-Kopfgruppe
(Huhn) *Vale et al., 1996*

Arbeitszyklus

Katalytischer Zyklus:

- ATP-Hydrolyse
 - Konformationsänderung
- ⇒ Filamentbindung
- ⇒ Kraftschub („power-stroke“)



Zyklische Übergänge von
Bindungszuständen zwischen
Motor und Filament

Anpassung an die biologischen Aufgaben:

„duty ratio“: $r = \tau_{\text{on}} / \tau_{\text{tot}}$

Verhältnis der Zeiten für

fest gebunden (τ_{on}) und Zyklusdauer (τ_{tot})

$r_{\text{KII}} \sim 0.5$ Arbeit als „Einzelmotor“ (**prozessiv**)

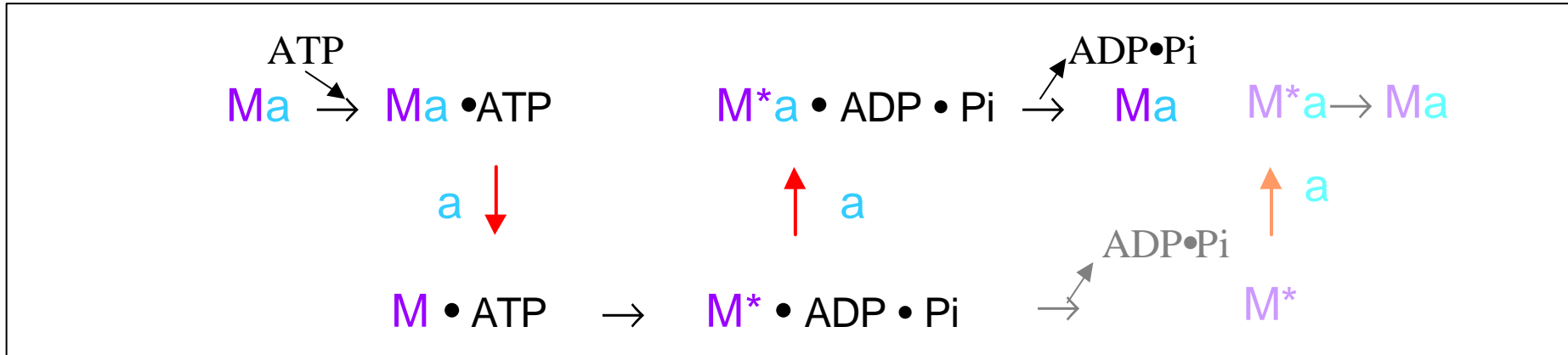
$r_{\text{MII}} \sim 0.01$ Arbeit im „Verbund“ (**nicht prozessiv**)

Koordination im Motor

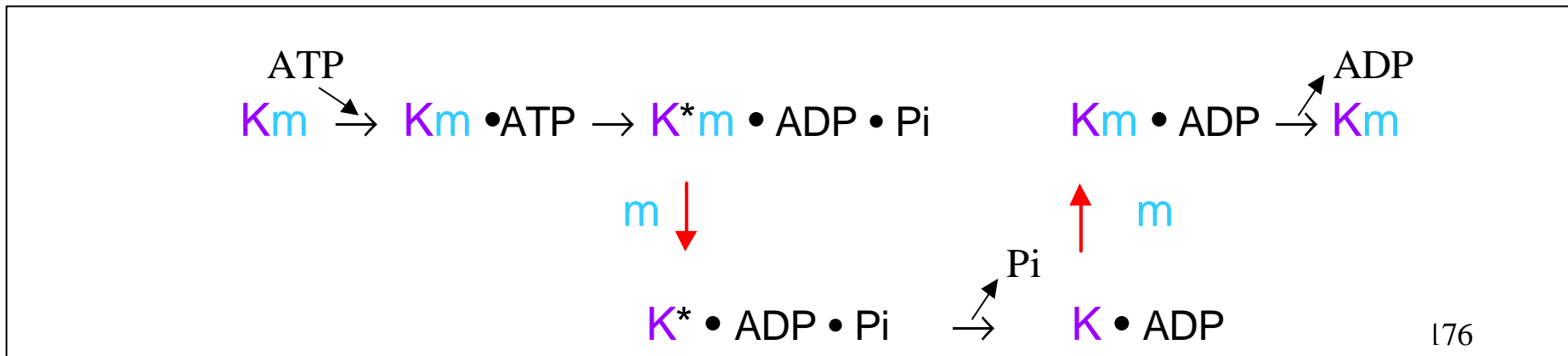
Nukleotid- und Filamentbindung:

Modell für „Zweikopf-Motoren“:
„hand over hand“ Modell

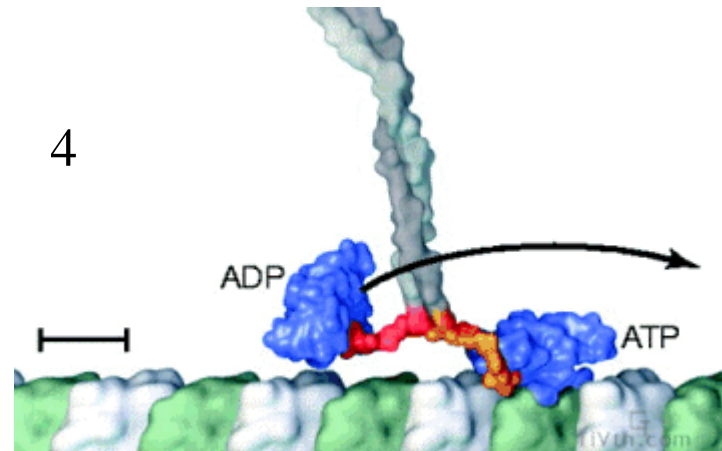
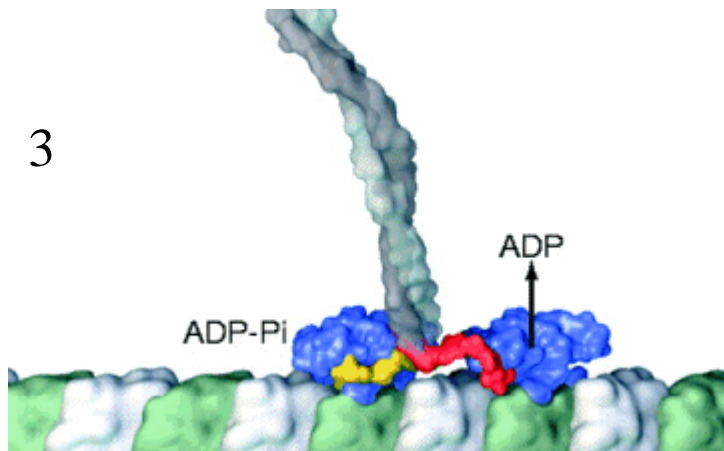
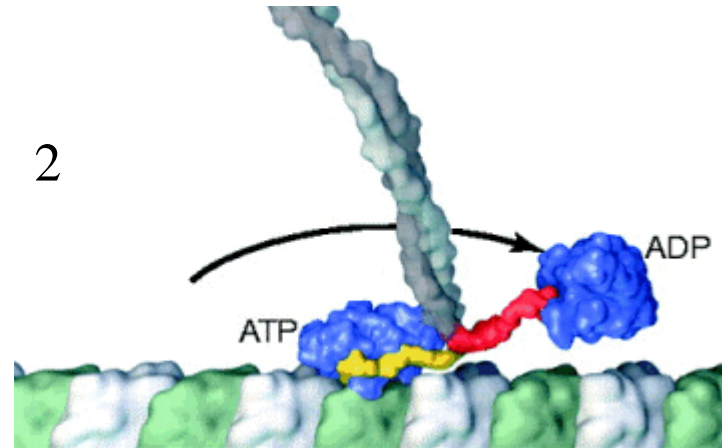
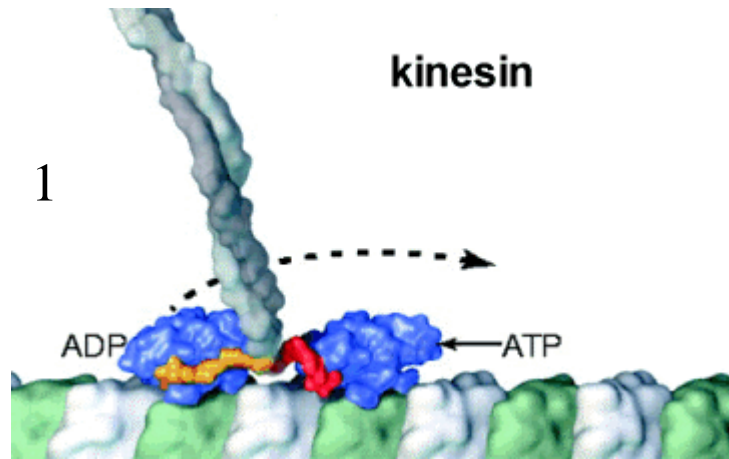
MYOSIN - aktin



KINESIN - mikrotubuli



„hand over hand“ Modell



Motorenentwicklung

Kinesin Unterfamilien

		Richtung	Prozessivität	Biologische Aktivität
<i>Kinesin (konventionell)</i>	Dimer	“plus”-Ende	ja	Membrantransport
<i>Ncd (C-Term)</i>	Monomer	“minus”-Ende	nein	Meiose/Mitose Spindel
<i>KIF1A (KIF1)</i>	Monomer	“plus”-Ende	ja	Axonaler Transport

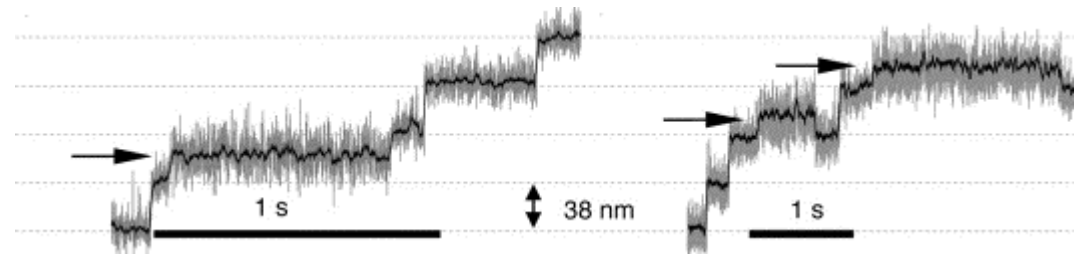
Myosin Unterfamilien

<i>Myosin I</i>	Monomer	“barbed”-Ende (+)	nein	Muskelkontraktion
<i>Myosin II (konventionell)</i>	Dimer	“barbed”-Ende	nein	Muskelkont./ Zellkinese
<i>Myosin V</i>	Dimer	“barbed”-Ende	ja	Membr./mRNA Transp.
<i>Myosin VI</i>	Dimer	“pointed”-Ende (-)	unbk.	Membrantransport

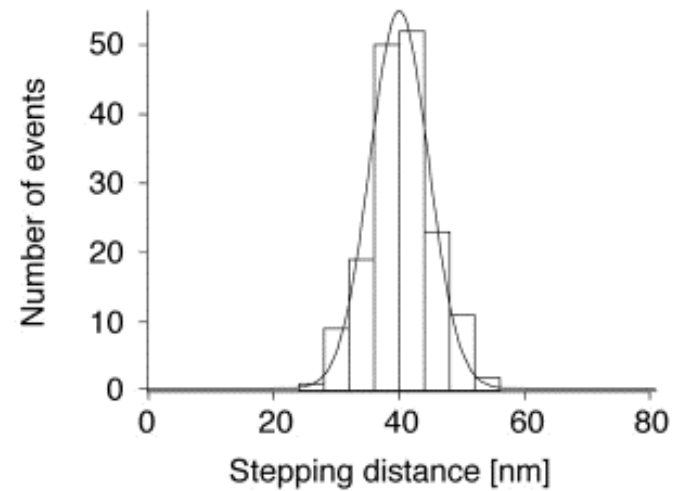
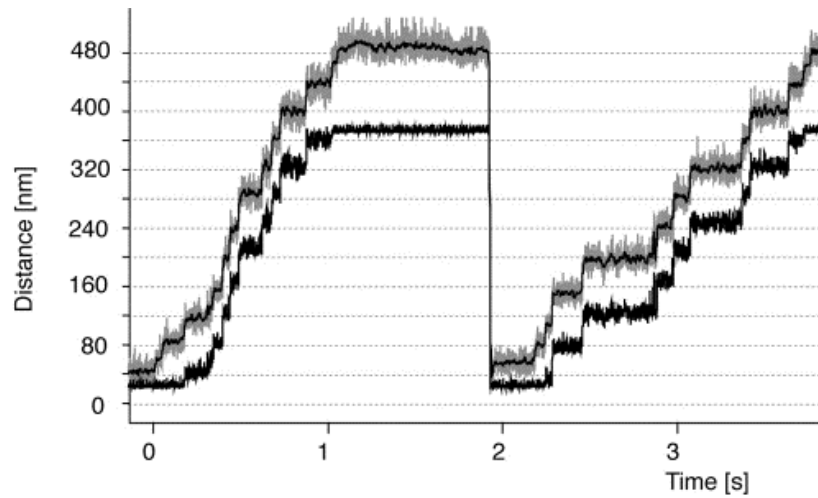
Ratenbestimmender Schritt eines prozessiven Motors

Schrittweiten und
Verweildauern
(für **Myosin V**)

2 pN

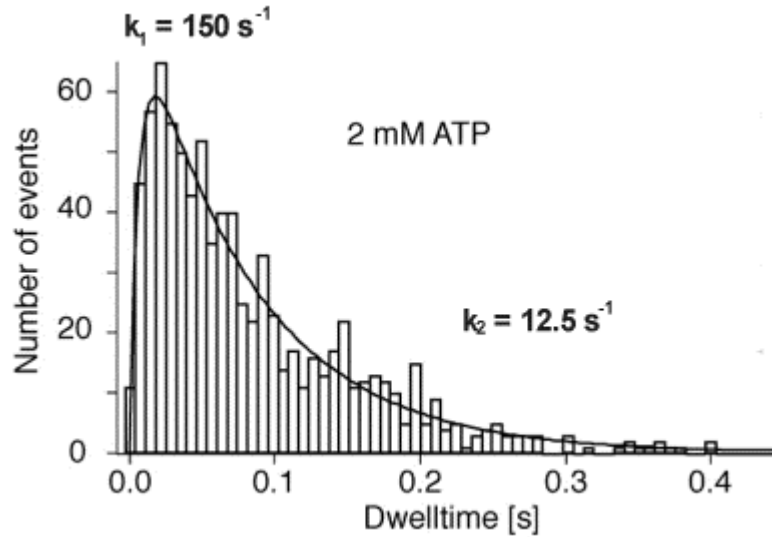


1 pN



Ratenbestimmender Schritt eines prozessiven Motors

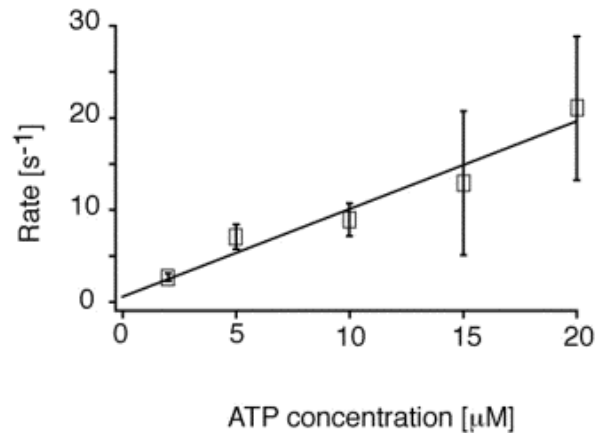
Verteilungen der Verweildauern



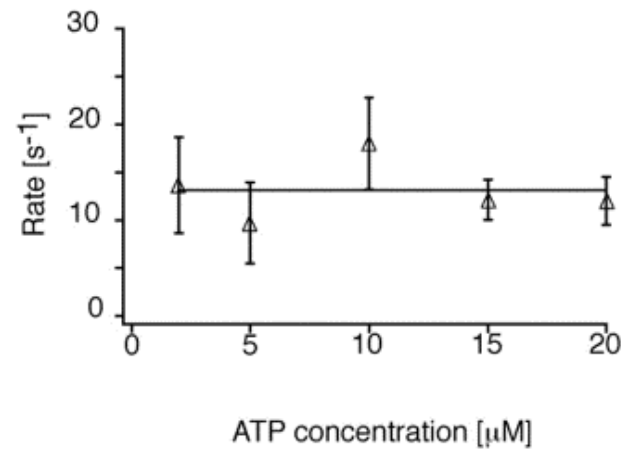
ATP - Hydrolyse und Kraftschub
sind schnelle Prozesse

⇒ Ratenbestimmender Schritt:
ADP-Abgabe

Rate für ATP-Aufnahme

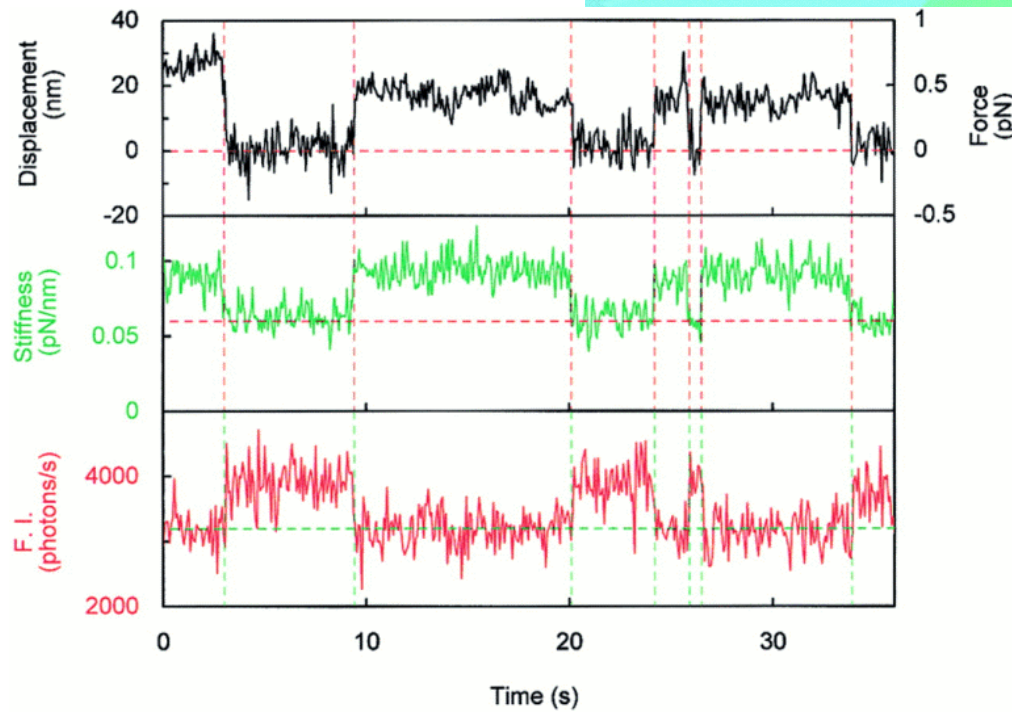
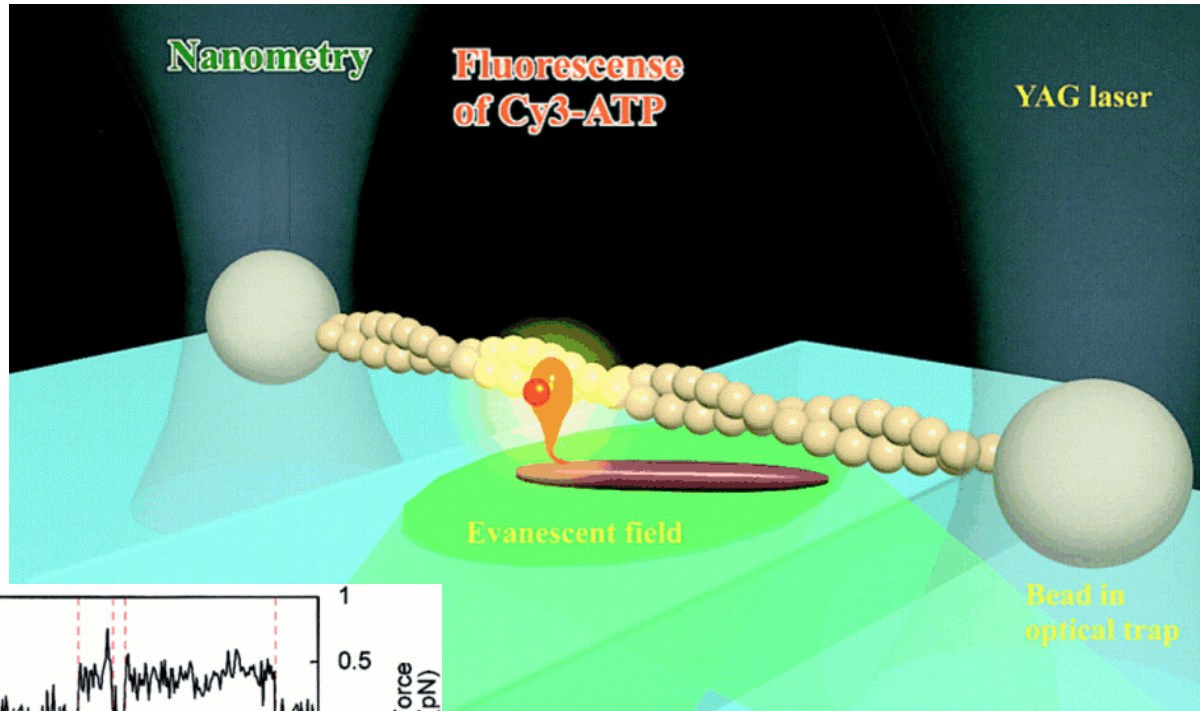


Rate für ADP-Abgabe



Rief et al.
PNAS, 2000

Kopplung: ATP-Hydrolyse und mechanische Bewegung



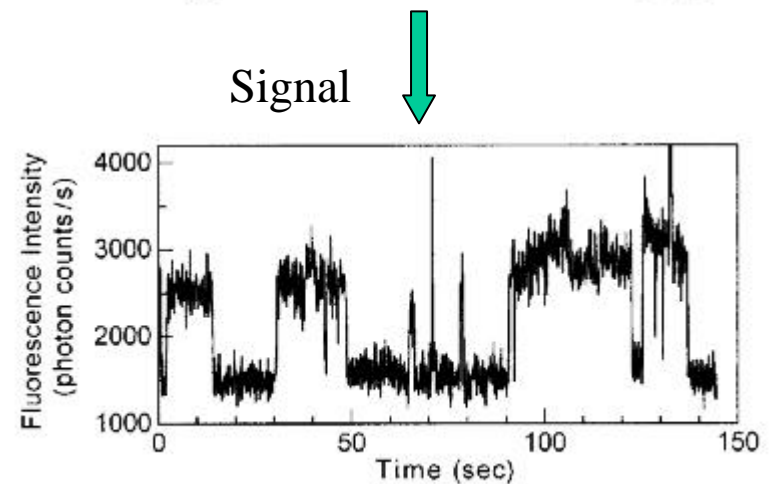
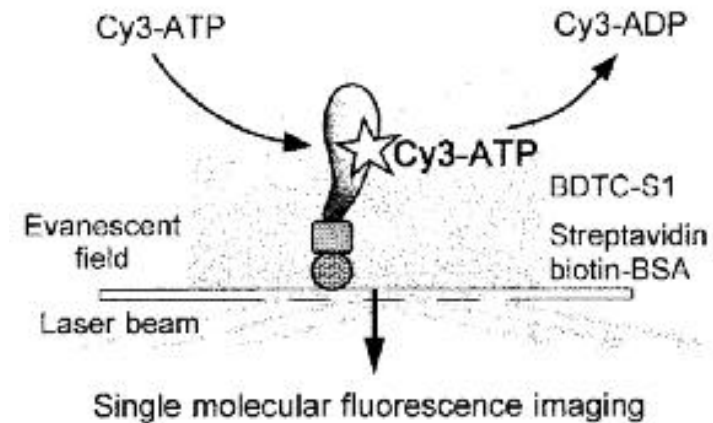
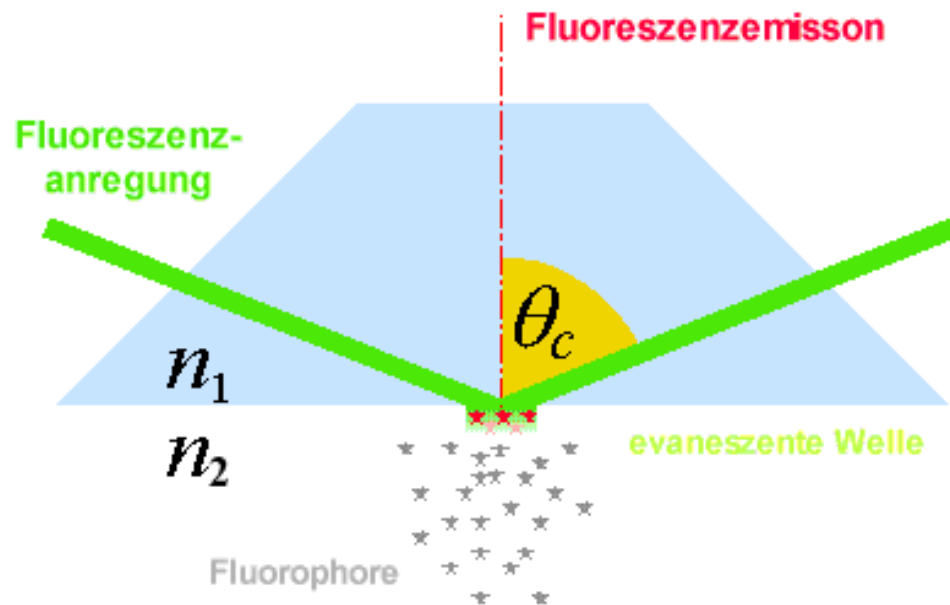
Ishijima et al. Cell, 1998

Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM)

Beobachtung eines einzelnen Fluorophors in einer Probenlösung

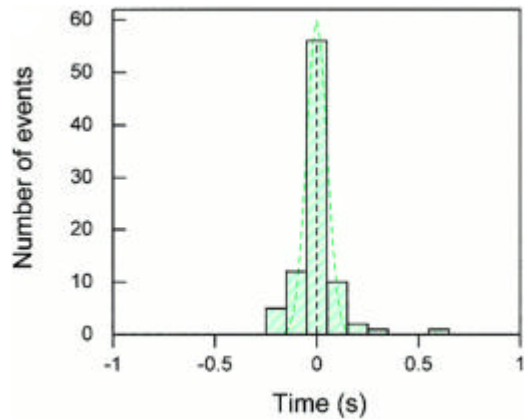
Probleme:

- Sensitivität des Detektors
- Signal/Rausch-Verhältnis
- Unterdrückung der Hintergrundfluoreszenz

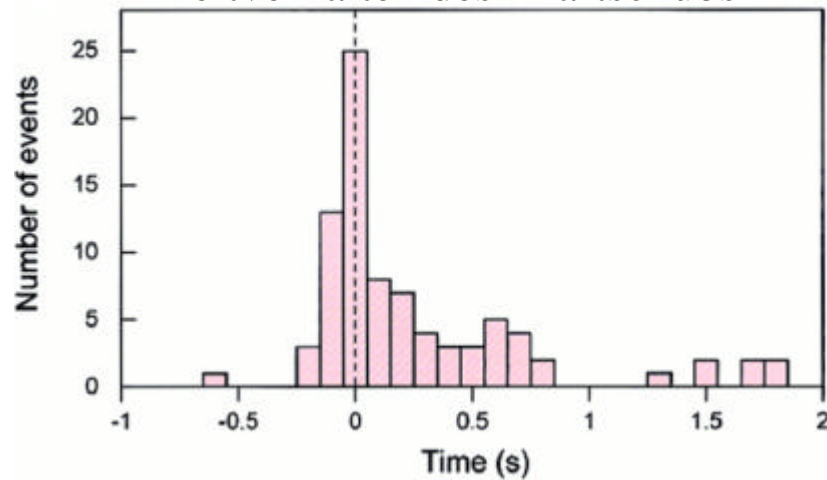


Kopplung: ATP-Hydrolyse und mechanische Bewegung

Zeitverhalten der Filamentablösung



Zeitverhalten des Kraftschubs

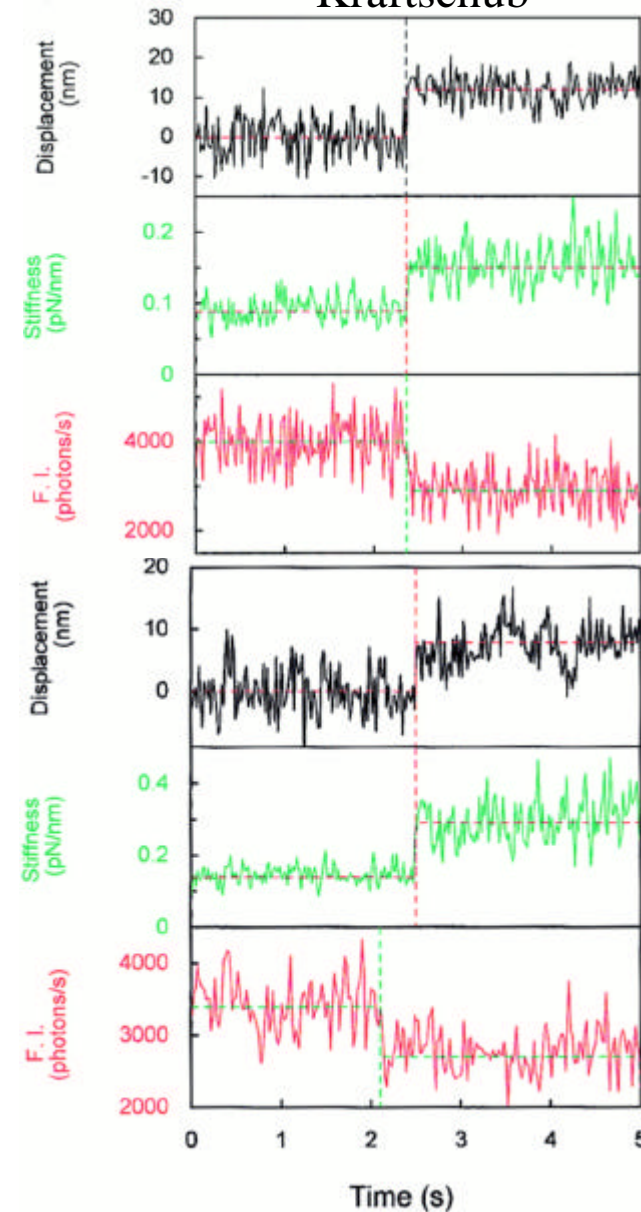


⇒ Energie kann in langlebigen (einige 100 ms)
Konformationszuständen gespeichert werden

Biospektroskopie

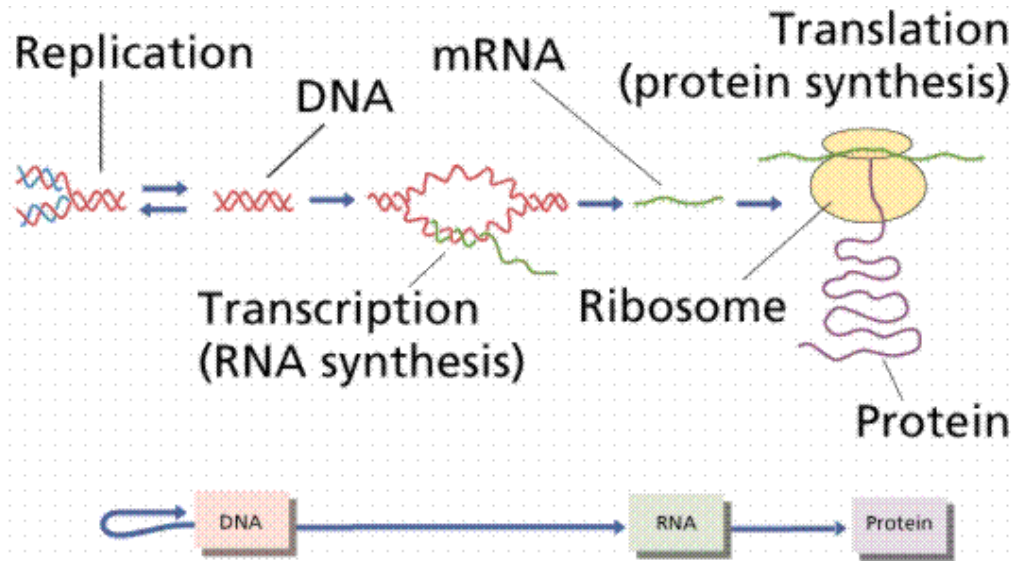
Ishijima et al. Cell, 1998

Kraftschub



Informationsfluss in der Zelle

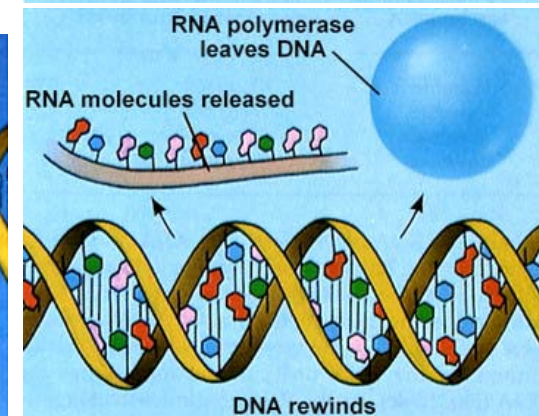
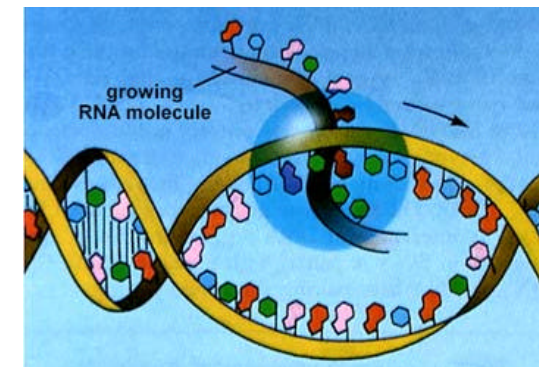
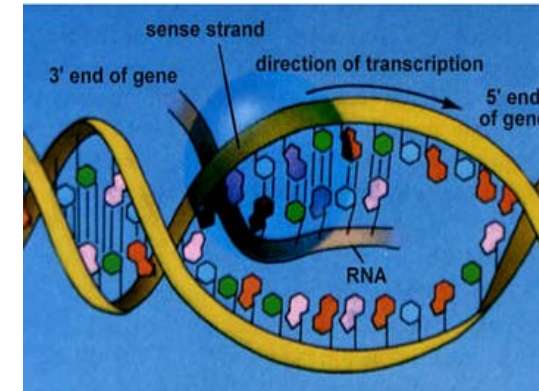
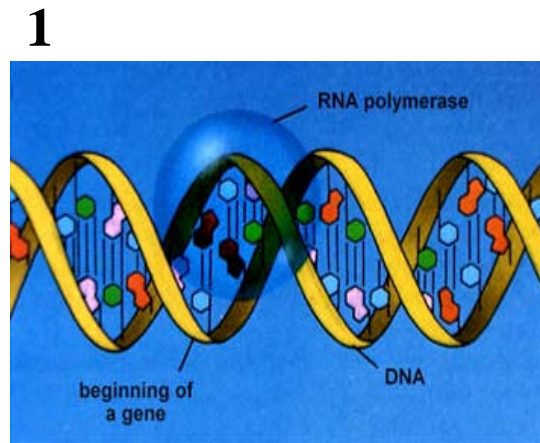
Crick's zentrales Dogma:



Transkription

RNA-Polymerase öffnet den zu lesenden DNA-Bereich und schreibt die Information in Form eines RNA Stranges.

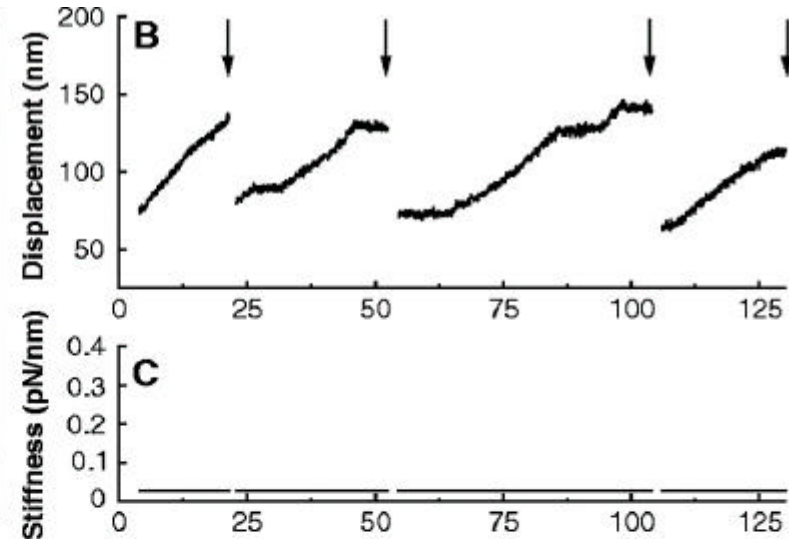
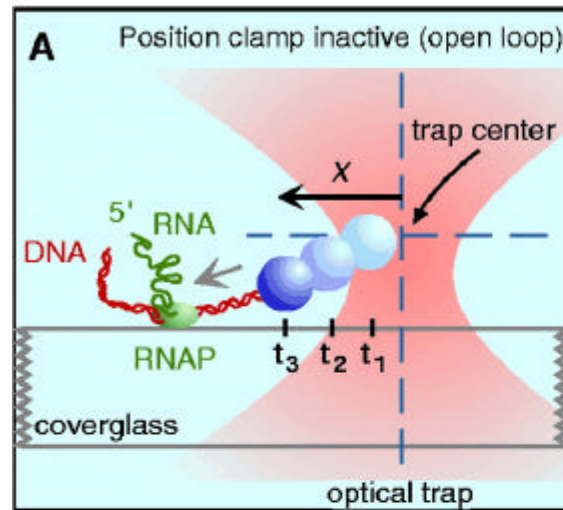
Lesegeschwindigkeit:
10–50 Nukleotide/Sekunde



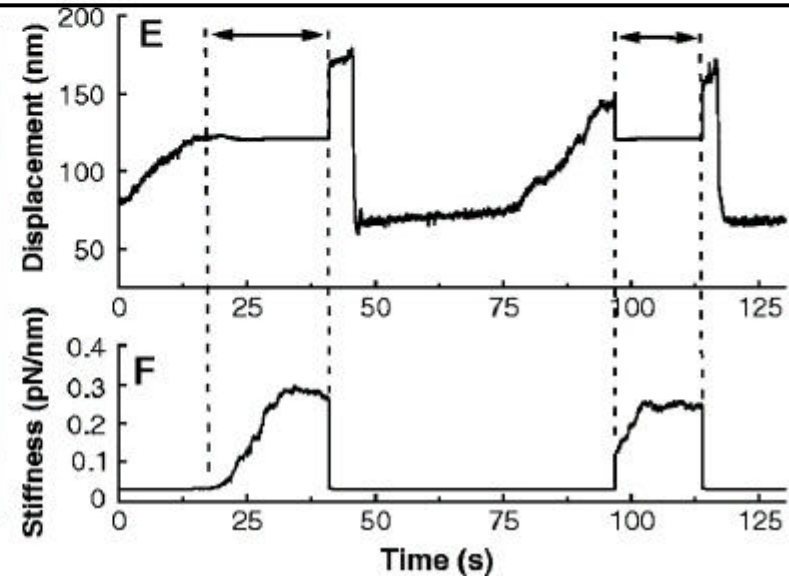
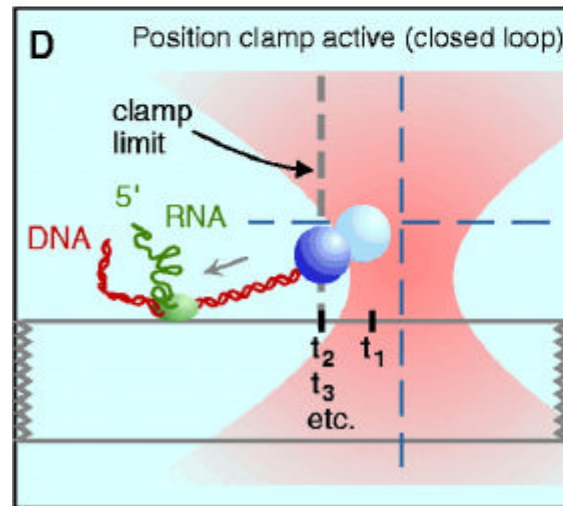
Biospektroskopie

Kraft und Geschwindigkeit der RNA-Polymerase Bewegung

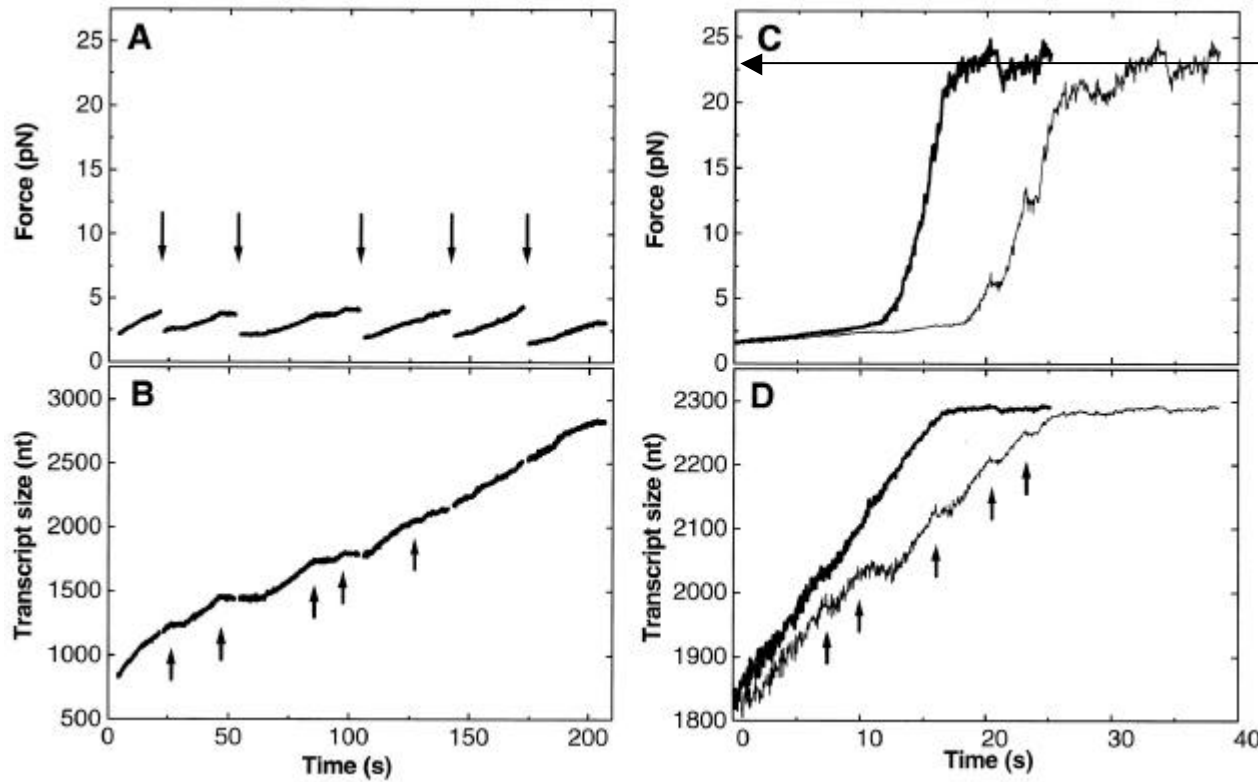
Messung mit „nachgeführter“ Laserfalle
 $\Rightarrow F_{\max} \sim 4 \text{ pN}$



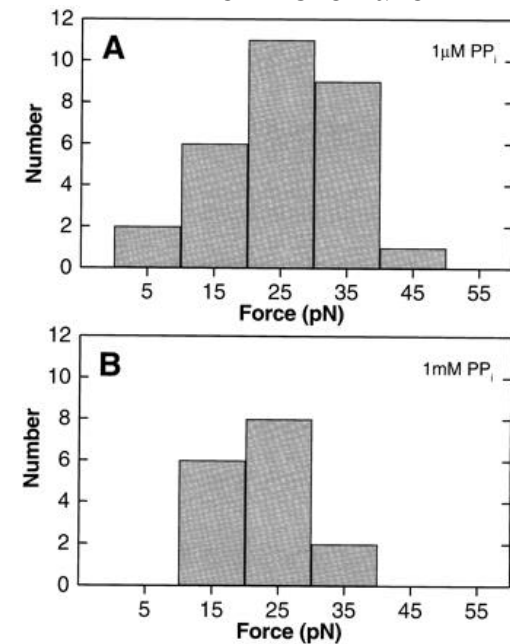
Messung mit „festgehaltener“ Laserfalle
 $\Rightarrow F_{\max} \sim 25\text{-}35 \text{ pN}$



Kraft und Geschwindigkeit der RNA-Polymerase Bewegung



Verteilung der „Feststellkraft“ verschiedener Einzelmoleküle



Für 1 mM NTP, 1 $\mu M PP_i \Rightarrow$ 16 Nukleotide/Sekunde
 (für 1 mM NTP, 1 mM $PP_i \Rightarrow$ 7 Nukleotide/Sekunde)

→ Länge des RNA-Transkripts pro Zeiteinheit zeigt keine besonders starke Abhängigkeit von der Zugkraft

Auflösungsvermögen der Optik

Das Auflösungsvermögen einer Optik wird durch den kleinsten noch auflösbaren Winkel δ_{\min} , wie er in einer Abbildung zweier Punkte durch eine Linse definiert ist, bestimmt:

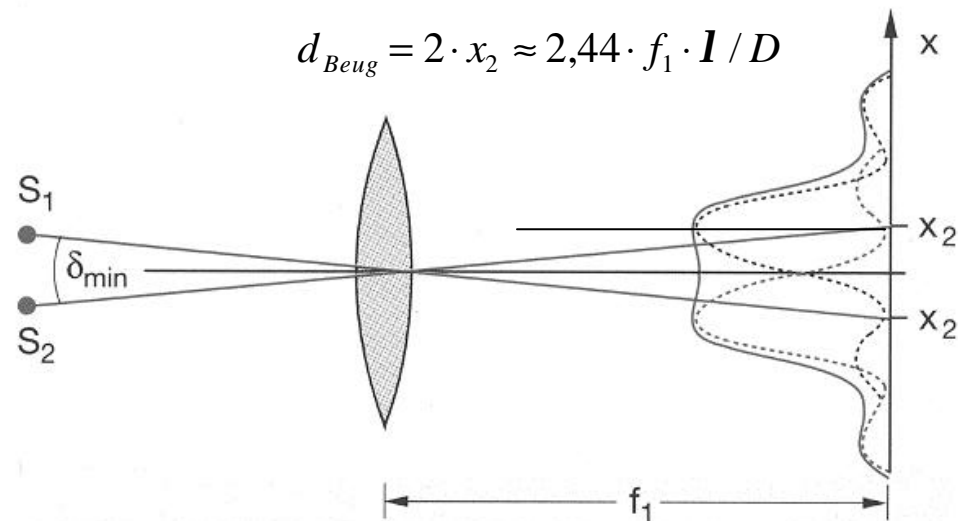
$$\delta_{\min} = 1,22 \cdot \lambda / D$$

Hierbei gibt D den Durchmesser der Linse (bzw. der Instrumentenöffnung) und λ die Wellenlänge des benutzten Lichts an.

Die Betrachtung der beugungsbedingten Intensitätsverteilung der Bilder zweier nahe benachbarter Punkte liefert das anschauliche Verständnis des **Rayleigh-Kriteriums** zum Auflösungsvermögen der Optik:

Zwei Punkte sind im Abbild der Optik gerade noch unterscheidbar, wenn das Maximum der einen Beugungsverteilung mit dem ersten Minimum der anderen Beugungsverteilung zur Deckung kommt (**beugungsbegrenzte Auflösung**).

Veranschaulichung des Rayleigh-Kriteriums zum Auflösungsvermögen einer Optik



Auflösungsvermögen des Mikroskops

Auch beim Mikroskop ist die erreichbare räumliche Auflösung prinzipiell durch die Beugung begrenzt.

$$\Delta x_{\min} = 1,22 \cdot g \cdot \lambda / D$$

Hierbei wird der Abstand vom Objekt zur Objektivlinse g so gewählt, dass die Objektebene in der Brennebene von L_1 liegt, also $g \approx f$ gilt. Der von der Objektivlinse erfasste maximale Öffnungswinkel α ist gegeben durch:

$$2 \sin \alpha / 2 = D / f$$

Dabei wird die Größe D/f die **numerische Apertur (NA)** genannt.

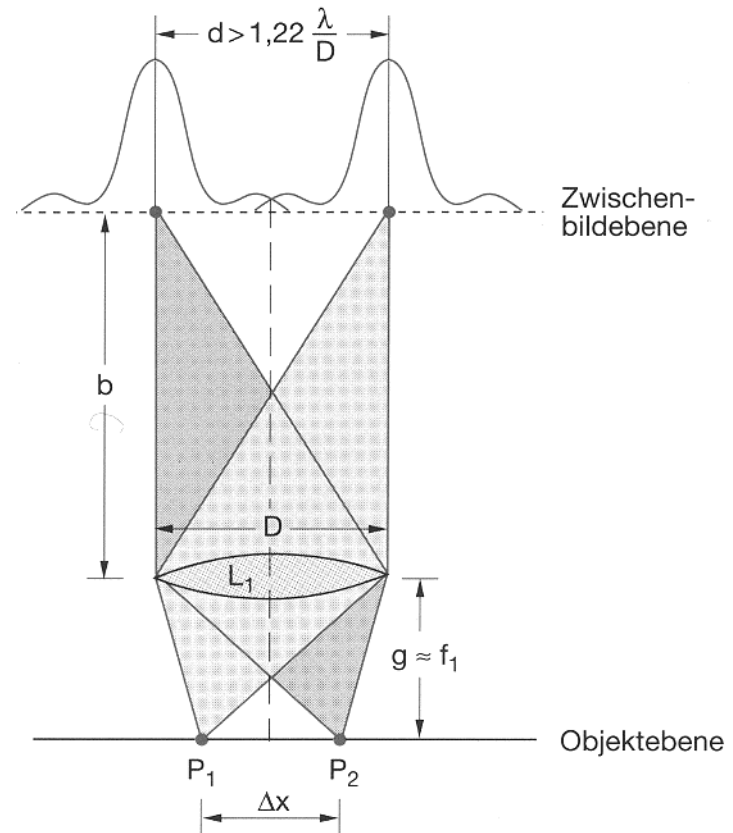
$$\Delta x_{\min} = 1,22 \frac{\lambda}{n \cdot 2 \sin \alpha / 2} = 1,22 \frac{\lambda}{NA}$$

Beispiel:

$$n = 1.5; \sin \alpha / 2 = 0.8 \quad (\alpha \approx 106^\circ)$$

$$\Rightarrow \Delta x_{\min} \approx 0.5 \lambda$$

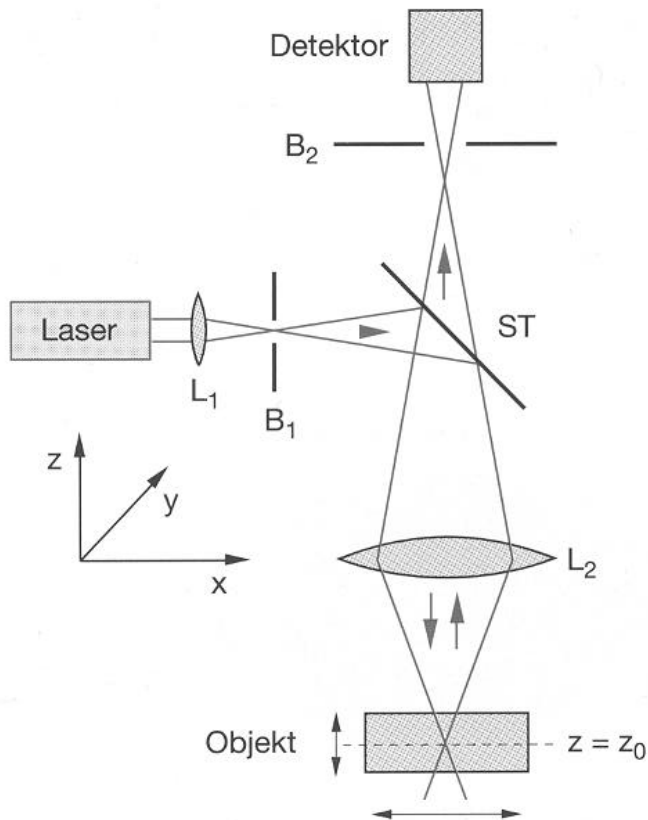
Zur Abbildung von Strukturen $d < 0.5 \lambda$ kann z.B. die **Nahfeldmikroskopie** genutzt werden.



Veranschaulichung des Auflösungsvermögens

Konfokales Mikroskop

Die konfokale Mikroskopie verbindet eine hohe Auflösung senkrecht zur optischen Achse (x - y -Ebene) mit einer **vergleichbaren Auflösung in z -Richtung**.



Es ist durch die folgenden Eigenschaften charakterisiert:

- **extrem kleine Tiefenschärfe**
- Die Lochblende B_2 lässt nur Licht von einer sehr begrenzten Schichtdicke ($z = z_0$) passieren.
- Licht aus anderen Bereichen $z \neq z_0$ kann die Blende nicht passieren (\Rightarrow effektive Streulicht Unterdrückung)
- Durch Verschiebung des Objekts in z -Richtung können die Schichten nacheinander isoliert voneinander abgebildet werden.

Prinzip eines konfokalen Mikroskops