

## **Abteilung Biophysikalische Chemie und Betriebseinheit für Strukturanalyse**

■ Direktor: Prof. Dr. Dietmar J. Manstein

### **Forschungsprofil**

Den Forschungsschwerpunkt des Instituts bilden Arbeiten an molekularen Motoren und motilen Prozessen. Ziel der am Institut für Biophysikalische Chemie durchgeführten Arbeiten ist es ein besseres Verständnis der dynamischen Wechselwirkung von Motorproteinen und ihren Bindungspartnern. Neben ihrer essentiellen Rolle für eine Vielzahl von Transportprozessen spielen Motorproteine auch eine wichtige Funktion für verschiedene Signaltransduktionsprozesse und das korrekte Ablesen und die Erhaltung der Erbinformation. Krankhafte Veränderungen dieser Wechselwirkungen oder ihrer Regulation sind für eine Vielzahl von Erkrankungen verantwortlich. Zu den vererbaren Erkrankungen, die durch die Mutation einzelner Motorproteine verursacht werden, zählen zum Beispiel der fortschreitende Untergang von Nervenzellen und Nervenzellkontakten bei der Alzheimer-Krankheit, zu hypo- oder hypertrophen Kardiomyopathien führende Störungen des Herz-Kreislaufsystems, verschiedenen Formen von Immunschwäche, Störungen der Sinnesorgane, die zu Blindheit und Taubheit führen, und das ungebremste Zellwachstum bei Krebs. Im Fordergrund unsere Arbeiten stehen dabei Fragen der Grundlagenforschung, wie die Aufklärung des Mechanismus der chemomechanischen Energietransduktion durch biologische Motoren. Auf diesem Gebiet und beim Verständnis der Regulation der Motoraktivität haben wir ausgezeichnete Ergebnisse erzielt, auf denen Diagnose- und Therapieansätze aufbauen können.

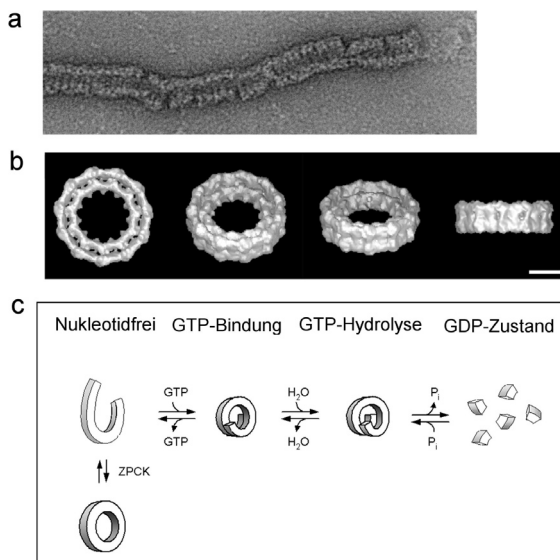
### **Forschungsprojekte**

#### **Struktur und Funktion von Dynamin**

Die GTPasen der Dynamin-Familie erfüllen sehr unterschiedliche biologische Funktionen, wie die Bildung von Membranvesikeln, den Erhalt der Mitochondrienmorphologie und die Abwehr von viralen Pathogenen. Während die biologische Funktion zumeist das Abschnüren von Lipidmembranen zu beinhalten scheint, ist der Mechanismus, nach dem Dynamine diese Funktion erfüllen, ungeklärt. Im Rahmen unserer Arbeiten ist es gelungen Einblicke in die molekulare Organisation von assemblierten Dynaminen zu erlangen. Der Dictyostelium Dynamin A Ringkomplex besteht aus 22 Monomeren, die sich in zwei Lagen zu jeweils zwei konzentrischen Ringen mit 11-facher Rotationssymmetrie anordnen. An der Innenseite des inneren Rings befinden sich spitze Strukturen, die ideal positioniert sind, um eine umwickelte

Lipidmembran zu perforieren.

Die hochaufgelösten Strukturen der GTPase Domänen von Dictyostelium Dynamin A und Ratten Dynamin 1 wurden bestimmt und sie geben erste Aufschlüsse über nukleotidabhängige Konformationsänderungen in dieser Domäne. Für Dynamin 1 konnten wir die Struktur des Apoenzyms mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse bis zu einer Auflösung von 1,9 Å bestimmen. Die Elektronendichte der Nukleotid-bindenden Motive „Switch-1“ und Switch-2“ sind in dieser Struktur sehr gut aufgelöst und befinden sich in der Position, die man bisher für Mitglieder der GTPase-Superfamilie nur im GTP-Zustand beobachtet hat. Die beiden hochkonservierten Argininreste R66 und R67 schränken den Bewegungsraum der Switchmotive stark ein und sind ideal positioniert um Information über den Nukleotidzustand

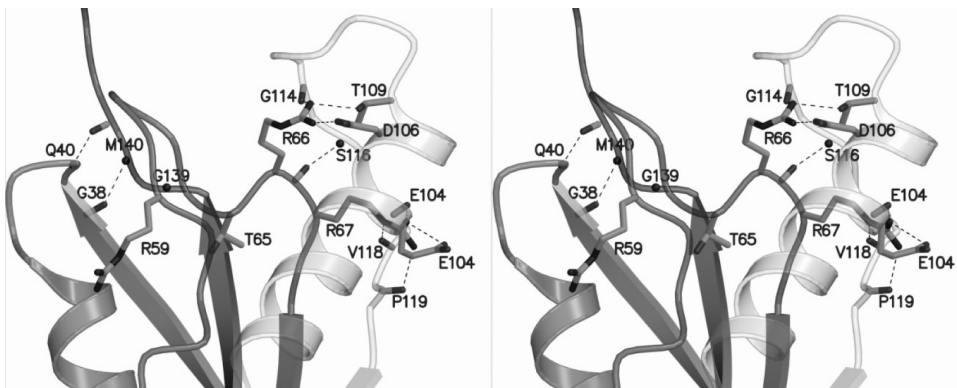


**Abb. 1:** Die elektronenmikroskopische Analyse der nukleotidabhängigen Konformationsänderungen zeigte, daß Dyanmin A bei Bindung eines schwer-hydrolysierbaren GTP-Analogs zu Filamenten assembliert (a). Der nukleotidfreie Ringkomplex (b) reorganisiert sich dabei zu einer Spirale und verkleinert seinen Durchmesser um 20 %. Dies ist der direkte Nachweis, daß der Ringkomplex nukleotidabhängig kontrahiert und daß diese Kontraktion bereits bei GTP-Bindung erfolgt. Damit ist Dynamin A prinzipiell in der Lage, auf eine unwickelte Lipidmembran Kraft auszuüben. Die nachfolgende GTP-Hydrolyse induziert weitere Konformationsänderungen in den Filamenten, die vermutlich zur Abtrennung der Lipidmembran führen. Aus diesen Ergebnissen konnte ein Mechanismus für die Dynamine postuliert werden (c), nach dem die Kombination aus Kontraktion und nachfolgender Streckung der Helix zur Abtrennung der Lipidmembran führt

der Bindungstasche an andere Regionen des Enzyms weiterzuleiten (Abb. 2). Unsere Ergebnisse unterstützen einen Mechanismus bei dem die so genannte GTPase Effektor Domäne (GED) eine ähnliche Rolle spielt wie ein GTPase Aktivierendes Protein (GAP) vom RGS-Typ. Die GAP-Aktivität der GED scheint dabei vom Assemblierungsgrad abzuhängen und der im Switch-1 positionierte Argininrest R59 die Bindung von GTP in einer Weise zu steuern, die ebenfalls vom Assemblierungsgrad abhängig ist.

Ziel weiterer Arbeiten ist es die Funktion und den Mechanismus von verschiedenen Dynaminen aufzuklären. Methodisch werden wir dieses Ziel umsetzen, indem wir zunächst die hochaufgelöste Struktur eines vollständigen Dynamin Monomers lösen. Mit Hilfe dieser Struktur und elektronenmikroskopischen 3D-Rekonstruktionen (siehe Abb. 1b) werden wir ein atomares Modell des Dynamin-Ringkomplexes erzeugen.

Ergänzt werden diese strukturbiochemischen Arbeiten durch molekular-genetische, kinetische und zellbiologische Untersuchungen. Die rekombinanten Proteine für diese Arbeiten werden entweder im Baculovirus System oder in Dictyostelium produziert. Die erfolgreich durchgeführte Darstellung und umfassende Charakterisierung von Dictyostelium Dynamin A und Dynamin B Nullzellen erleichtert die Aufreinigung spezifisch veränderter, rekombi-



**Abb. 2:** Stereoansicht der Nukleotidbindungstasche von Dynamin 1. Hervorgehoben sind Reste die wichtig für die Stabilisierung der „Switch“ Motive sind. Die Region um den P-Loop ist in grün dargestellt, Switch-1 in braun, Switch-2 in blau.

nanter Dynamine und erlaubt es uns Komplementationsexperimente durchzuführen, um die Funktion von Dynamin-Mutanten in vivo zu testen. Die Analyse Dynamin-abhängiger Ereignisse an der Plasmamembran von Dictyostelium-Zellen und in vitro Versuche zur direkten Beobachtung des Abschnürens von Lipidmembranen durch Dynaminmutanten werden mit Hilfe der Evaneszenz-Mikroskopie durchgeführt. Zur erfolgreichen Durchführung des beantragten Projekts können wir auf ein breites Spektrum eigener experimenteller Vorarbeiten und molekularer Werkzeuge zurückgreifen.

■ Projektleiter: D.J. Manstein; Mitarbeiter: T. Reubold, J. Vasileva, R. Fedorov, N. Tzvetkov, A. Rai, ; Kooperationen: M.A. Geeves, University of Kent, UK; K.C. Holmes, MPI für med. Forschung, Heidelberg; S. Eschenburg und A. Wittinghofer, MPI für Mol. Physiologie; F.J. Kull, Dartmouth College, USA; S.L. Schmid, The Scripps Research Institute, USA; R.B. Vallee, Columbia University, USA. Förderung: DFG-Sachbeihilfe

## Weitere Forschungsprojekte

### **Functional Characterization of Myosin Motors**

■ Projektleiter: D.J. Manstein; Mitarbeiter: R. Fedorov, M. Taft, P. Baruch, C. Waßmann; Kooperationen: M.A. Geeves, University of Kent, UK; K.C. Holmes, MPI für med. Forschung, Heidelberg; B. Brenner, MHH; Förderung: DFG-Schwerpunkt „Molecular Motors“

### **Optimierung molekularer Methoden mit Hilfe von gelenkter Evolution**

■ Projektleiter: G. Tsiavaliaris und D.J. Manstein. Mitarbeiter: R. Diensthuber, D. Kathmann, C. Waßmann; Kooperationen: M.A. Geeves, University of Kent, UK; Förderung: DFG-Sachbeihilfe

### **Darstellung der Dynamik und Organisation subzellulärer Strukturen mit Hilfe der 4Pi-Laser-Scanning-Mikroskopie**

■ Projektleiter: D.J. Manstein; Kooperationen: S. Baltrusch, R. Förster, M. Gaestel, E. Kornbaum, A. Kotlyarov, S. Lenzen, U. Seidler, (MHH) und J. Wehland (GBF, Braunschweig); Förderung: DFG-„Highlight 2004“.

### **Molekulare Analyse des Diaphanous-verwandten Formins dDia2 und seiner akzessorischen Proteine**

■ Projektleiter: J. Hans Faix; Mitarbeiter: C. Karre; Kooperationen: K. Rottner, T. Stradal (GBF); Förderung: DFG, FOR 629 „Molekulare Mechanismen zellulärer Motilität“

### **Die Bedeutung molekularer Motoren für die Zelladhäsion und die Bildung von Zelloberflächenfortsätzen**

■ Projektleiter: D.J. Manstein; Mitarbeiter: I. Chizhov, R. Kownatzki, C. Thiel; Kooperationen: J. Faix; J. Wehland (GBF); E.M. Mandelkow und E. Mandelkow (MPI Hamburg); B. Brenner, MHH; Förderung: DFG, FOR 629 „Molekulare Mechanismen zellulärer Motilität“

### **Prozessivität und Direktionalität von Myosinen**

■ Projektleiter: G. Tsiavaliaris Mitarbeiter: P. Baruch, C. Waßmann; Kooperationen: B. Brenner, T. Scholz, J. Faix, D.J. Manstein und C. Urbanke (MHH); J. Wehland (GBF); M.A. Geeves, University of Kent, UK; Förderung: DFG, FOR 629 „Molekulare Mechanismen zellulärer Motilität“.

### **Struktur und Funktion DNA-bindender Proteine**

■ Projektleiterin: Ute Curth; Mitarbeiter: J. Greipel, L. Litz, C. Urbanke und G. Witte; in Kooperation mit R. Fedorov und D. J. Manstein; Förderung: HILF

**Functional analysis of mutant forms of  $\beta$ -myosin isolated from single muscle fibers of patients with hypertrophic cardiomyopathy using fast spectroscopic techniques**

■ Projektleiter: I. Chizhov; Kooperationen: Dr. T. Kraft (Mol. Physiologie, MHH); Förderung: DFG-Sachbeihilfe (TK)

**Neuartige Proteine der  $\alpha$ -Actinin-/Spectrin-Superfamilie**

■ Projektleiterin: E. Korenbaum, Mitarbeiter: L. Srivastava, C. Thiel, U. Kaysser; Förderung: HILF

**Structure-Function Analysis of doublecortin-related protein domains**

■ Projektleiter: D.J. Manstein; Mitarbeiter: R. Fedorov, P. Baruch; Kooperationen: O. Reiner, Weizmann Institute.

**Originalpublikationen**

**Reubold, T. F.**, Eschenburg, S., Becker, A., Leonard, M., Schmid, S. L., Vallee, R. B., Kull, F. J. and **Manstein, D. J.** (2005) Crystal structure of the GTPase domain of rat dynamin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 13093-13098.

**Fujita-Becker, S., Dürrwang, U., Erent, M.**, Clark, R. J., Geeves, M. A. and **Manstein, D. J.** (2005) Changes in  $Mg^{2+}$ -ion concentration and heavy chain phosphorylation regulate the motor activity of a class-I myosin. *J. Biol. Chem.*, 280: 6064-6071.

**Van Dijk, J.**, Lafont, C., **Knetsch, M. L.**, Derancourt, J., **Manstein, D. J.**, Long, E. C. and Chaussepied, P. (2005) Conformational changes in actin-myosin isoforms probed by Ni(II)-Gly-Gly-His reactivity. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 25: 527-537.

Witte, G., **Urbanke, C.** and Curth, U. (2005) Single-stranded DNA-binding protein of *Deinococcus radiodurans*: a biophysical characterization. *Nucleic Acids Res.* 33: 1662-1670.

Dam, J., Velikovskiy, C. A., Mariuzza, R. A., **Urbanke, C.** and Schuck, P. (2005) Sedimentation velocity analysis of heterogeneous protein-protein interactions: Lamm equation modeling and sedimentation coefficient distributions  $c(s)$ . *Biophys J.* 89: 619-634.

Zaremba, M., Sasnauskas, G., **Urbanke, C.** and Siksnys, V. (2005) Conversion of the tetrameric restriction endonuclease Bse634I into a dimer: oligomeric structure-stability-function correlations. *J. Mol. Biol.* 348: 459-478.

Yildiz, O., Doi, M., Yujnovsky, I., Cardone, L., Berndt, A., Hennig, S., Schulze, S., **Urbanke, C.**, Sassone-Corsi, P. and Wolf, E. (2005) Crystal Structure and Interactions of the PAS Repeat Region of the *Drosophila* Clock Protein PERIOD. *Mol Cell* 17, 69-82.

Brasen, C., **Urbanke, C.** and Schönheit, P. (2005) A novel octameric AMP-forming acetyl-CoA synthetase from the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *FEBS Lett.* 579, 477-482.

Matter, H., Kumar, H. S., **Fedorov, R.**, Frey, A., Kotsonis, P., Hartmann, E., Frohlich, L. G., Reif, A., Pfeleiderer, W., Scheurer, P., Ghosh, D. K., Schlichting, I. and Schmidt, H. H. (2005) Structural analysis of isoform-specific inhibitors targeting the tetrahydrobiopterin binding site of human nitric oxide synthases. *J. Med. Chem.* 48: 4783-4792.

Mohammadi, B., Krampfl, K., Cetinkaya, C., **Wolfes, H.**, Dengler, R. and Bufler, J. (2005) Interaction of topiramate with glycine receptor channels. *Pharmacol. Res.* 51: 587-592.

Krampfl, K., Cordes, A. L., Schlesinger, F., **Wolfes, H.** and Bufler, J. (2005) Effects of propofol on recombinant AMPA receptor channels. *Eur. J. Pharmacol.* 511: 1-7.

Padmakumar, V. C., Abraham, S., Braune, S., Noegel, A. A., Tunggal, B., Karakesisoglou, I. and **Korenbaum, E.** (2005) Enaptin, a giant actin-binding protein, is an element of the nuclear membrane and the actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* 295: 330-339.

### Übersichten

Geeves, M. A., **Fedorov, R. and Manstein, D. J.** (2005) Molecular mechanism of actomyosin-based motility. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 1462-1477.

**Manstein, D. J.** (2005) Molecular engineering of myosin. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 359: 1907-1912.

**Faix, J.** and Rottner, K. (2005) The making of filopodia. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 1-8

Schirenbeck, A., Bretschneider, T., Arasada, R., Schleicher, M. and **Faix, J.** (2005). Formins and VASP proteins cooperate in the formation of filopodia. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 1256-1259.

### Buchbeiträge

**Urbanke C., Witte G. and Curth U.** (2005). A Sedimentation Velocity Method in the Analytical Ultracentrifuge for the Study of Protein-Protein Interactions. *Protein-Ligand Interactions - Methods and Applications.* G. U. Nienhaus. Totowa, New Jersey, Humana Press. 505: 101-113.

Jeltsch, A., Hoggett, J. G., and **Urbanke, C.** (2005) Quantitative Data Analysis in Biochemistry and Molecular Biology, in *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine* (Meyers, R. A., Ed.), Wiley-VCH, Weinheim.

### Promotionen

Mirco Müller (Dr. med.) Expression der Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors c-Myb im pGEX-6P-System und biophysikalische Charakterisierung mittels CD- und Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie.

### Diplomarbeiten

Ralph Diensthuber (Dipl. Biochem.) Universität Hannover 2005 „Expression, Reinigung und Kristallisation von Myosin-Fusionsproteinen“

Daniela Kathmann (Dipl. Biochem.) Universität Hannover 2005 „Strukturelle und funktionelle Untersuchung des Fokaladhäsionsproteins  $\beta$ -Parvin.“

Heiko Keller (Dipl. Biochem.) Universität Hannover 2005 „Direkte funktionelle Untersuchung der Eigenschaften von Myosin J aus *Dictyostelium discoideum*“

Roland Knispel (Dipl. Biochem.) Universität Hannover 2005 „Grundlagen für die auto-

matisierte Proteomforschung am Beispiel von *Thermoplasma acidophilum* und deren Anwendung für die Kryoelektronenmikroskopie.“

Nikolai Mischerikow (Dipl. Biochem.) Universität Hannover 2005 „Kinetische Untersuchung von rekombinantem Myosin J aus *Dictyostelium discoideum* in einer flash-photolyse-Apparatur.“

Patrick Gewohn (Dipl. Biol.) Universität Hannover 2005 „Biochemische Charakterisierung Myb-Proteinen“.

Janine Hallerdei (Dipl. Biol.) Universität Hannover 2005 „Untersuchungen zur Bedeutung der intramolekularen Wechselwirkungen von N- und C-Terminus der GTPase-Domäne von Dynamin A aus *Dictyostelium discoideum*.“

Antje Kiesewetter (Dipl. Biol.) Universität Hannover 2005 „Charakterisierung des katalytischen Zentrums von Dynamin A aus *D. discoideum*“

### **Weitere Tätigkeiten in der Forschung**

Dietmar J. Manstein: Gutachter für Deutsche Forschungsgemeinschaft, Wellcome Trust, Medical Research Council, German Israeli Foundation, Association Française contre les Myopathies; Editor des Journal of Muscle Research and Cell Motility, Gutachter für Journal of Biological Chemistry, Journal of Cell Biology, FEBS Journal, EMBO Journal, Nature und weitere Zeitschriften.

J. Hans Faix: Editorial Board Member - Cell Motility and the Cytoskeleton; Gutachter für die Fachjournale EMBO Journal, Journal of Cell Biology, Journal of Cell Science, Journal

of Muscle Research and Cell Motility, Development, Cell Motility and the Cytoskeleton, Experimental Cell Research, European Journal of Cell Biology.

Jürgen Alves: Sprecher des Arbeitskreises Molekulare Biowissenschaften der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie und Mitglied der Sachverständigenkommission beim Institut für medizinische und pharmazeutische Prüfungsfragen; Gutachter für Alexander von Humboldt-Stiftung und die Studienstiftung des Deutschen Volkes; Gutachter für die Fachjournale Analytical Biochemistry, Biological Chemistry und Proteins.