

## Institut für Biophysikalische Chemie

■ **Direktor: Prof. Dr. Dietmar Manstein**

Tel.: 0511 / 532-3700 • E-Mail: manstein.dietmar@mh-hannover.de • www.bpc.mh-hannover.de

### Forschungsprofil

Den Forschungsschwerpunkt des Instituts bilden Arbeiten an molekularen Motoren und motilen Prozessen, die u. a. im Rahmen der Exzellenzinitiative REBIRTH, der DFG-Forschergruppe „Molekulare Mechanismen der Zellmotilität“ und des EU-Verbundprojekts „Molecular Motors-based Nanodevices“ gefördert werden. 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.

Seit 2005 stehen zusätzlich Untersuchungen von Protein-Wirkstoff-Komplexen im Mittelpunkt der Forschungsaktivitäten. Diese Arbeiten haben u. a. zur Aufklärung der 3D-Struktur von mehreren Myosin-Wirkstoffkomplexen geführt. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Françoise H. Routier (Institut für Zelluläre Chemie) haben wir den Reaktionsmechanismus des potentiellen Zielproteins UDP-Galactopyranose-Mutase aus dem humanpathogenen Parasiten *Leishmania major* aufgeklärt. Der Wirkstoff Melophlin A wurde in einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Herbert Waldmann (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund) als Inhibitor von Dynaminen identifiziert. Am Beispiel der Myosinmotordomäne und der Dynamin GTPasen untersuchen wir allosterisches Verhalten innerhalb und zwischen einzelnen Proteindomänen, sowie den Mechanismus der energetischen Kopplung zwischen allosterischer Bindungsstelle und aktivem Zentrum. Den Einfluss von Wirkstoffen auf Protein-Protein Interaktionen untersuchen wir mit Hilfe der Selbstassemblierung von Dynamin- und Aktinisoformen, am Beispiel der Assemblierung eines funktionellen MAPK-Kaskade-Signalkomplexes und Aufklärung seiner Struktur und Dynamik in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand der Partnerproteine (Kooperation mit Prof. Matthias Gaestel, Inst. für Physiologische Chemie), und mit Hilfe der von Cyclin A:Cdk2: p27 gebildeten trimeren Komplexen (Kooperation mit Prof. Nisar Malek, Inst. für Molekularbiologie).

Die methodische Schwerpunkte, die auch durch eine entsprechende apparative Ausstattung im Laborbereich abgesichert sind, bilden: Röntgenkristallstrukturanalyse, zeitaufgelöste CD-, UV/VIS- und Fluoreszenz Spektroskopie, Einzelmolekülmikroskopie, 5D-Lebendzellmikroskopie, hydrodynamische Methoden, Kalorimetrie und Computermodellierung von Proteinen.

In der Lehre sind die wissenschaftlichen Mitarbeiter des Instituts an den Studiengängen Humanmedizin, Zahnmedizin, Biologie, Biomedizin, Biochemie und an der Ausbildung von Doktoranden im Rahmen der HBRS School of Excellence beteiligt.

## Forschungsprojekte

### Funktionelle Charakterisierung von unkonventionellen Myosinmotoren

In früheren Arbeiten haben wir die katalytische Effizienz, Geschwindigkeit, Prozessivität und Bewegungsrichtung von Myosinmotoren aus dem Modellorganismus *Dictyostelium discoideum* gezielt verändert, um zu zeigen welche molekularen Mechanismen der Umwandlung von chemischer Energie in Kraft und Bewegung zugrunde liegen. Im Rahmen des aktuellen Projekts untersuchen wir die Eigenschaften von menschlichen Myosinisoformen, mit dem Ziel die Zusammenhänge von Myosin-abhängigen Transportprozessen und chemischen Signaltransduktionsprozessen aufzuklären. Es ist uns bisher im Rahmen des neuen Projekts gelungen menschliche Myosine der Klassen 2, 5, 7 und 18 in rekombinanter Form zu produzieren. Die rekombinanten menschlichen Myosinisoformen bewegten Aktinfilamente in einem in vitro Motilitätsassay, wodurch es uns möglich war zusätzlich zur Kinetik der ATPase-Reaktion auch die Motoreigenschaften der verschiedenen Myosine im Detail zu untersuchen. Die Untersuchungen konnten auch auf Splice-Varianten und Myosine mit Mutationen in der Kopfdomäne ausgeweitet werden. Mit der erfolgreichen Untersuchung der funktionellen und strukturellen Eigenschaften dieser molekularen Motoren und haben wir wesentliche Voraussetzungen zur Aufklärung ihrer physiologischen Bedeutung für Transport, Kommunikation, Differenzierung und Organogenese erfüllt. Außerdem ermöglichen uns diese Vorarbeiten auch die Entwicklung therapeutischer Anwendungen mit Myosinen als pharmakologischen Zielproteinen.

Im Rahmen von Zusammenarbeiten mit Kollegen in Boston, Dresden, Hannover, Münster und San Diego ist es uns gelungen eine Reihe von Wirkstoffen zu identifizieren, welche die Eigenschaften einzelner Myosinisoformen spezifisch verändern. Bei der Mehrzahl der Wirkstoffe handelt es sich um Naturstoffe, die eine allosterische Aktivierung oder Hemmung der Motoraktivität von Myosinen der Klassen 1, 2, 5, und 9 verursachen. Zusätzlich zu den verschiedenen Klassen von Aktivatoren und Inhibitoren haben wir eine Substanz gefunden, die als potentes pharmakologisches Chaperon für  $\alpha$ -kardiales Myosin wirkt. Pharmakologische Chaperone sind kleine Moleküle, die in der Regel ein bereits gefaltetes Protein durch Bindung an eine spezifische Stelle stabilisieren und es dadurch gegen thermische Denaturierung und proteolytischen Abbau schützen. Interessanterweise bindet die Substanz nicht, wie die große Mehrzahl der bekannten pharmakologischen Chaperone, am aktiven Zentrum, sondern an einer etwa 5 nm entfernten Stelle in der Myosinmotordomäne. Die Aufklärung der Struktur des Myosin-Wirkstoffkomplexes und molekulardynamische Untersuchungen seiner Eigenschaften versprechen allgemein gültige Erkenntnisse über die Bindung und den Wirkmechanismus kleiner Chaperon-Moleküle zu liefern. Dies ist von Bedeutung, da pharmakologische Chaperone ganz allgemein ein erhebliches Potential für therapeutische Anwendungen haben. Offensichtliche Beispiele sind Protein-Fehlfaltungserkrankungen wie Amyloidosen, Mukoviszidose, zystische Fibrose, Parkinson, Alzheimer und Amyotrophe Lateralsklerose. Auch im Fall der Phenylketonurie sind Mutationen im Gen, das die Phenylalanin-Hydroxylase kodiert für die Instabilität dieses Enzyms verantwortlich. In diesem Fall hat sich in jüngster Zeit herausgestellt, dass die bereits seit längerem etablierte, erfolgreiche Behandlung einer Untergruppe von Patienten mit hohen Dosen von Tetrahydrobiopterin auf der Wirkung dieser Substanz als pharmakologisches Chaperon beruht.

Ein weiterer potentieller Einsatzbereich von kleinen Chaperon-Molekülen ist ihre Verwendung in einem in vitro Kontext. Proteine sind als Biopharmazeutika hoch spezifisch und wirksam, aber sowohl bei der Herstellung wie auch während der Lagerung vergleichsweise instabil. Der Einsatz pharmakologischer Chaperone bei Herstellung und Lagerung von Biopharmazeutika verspricht dieses Problem zu lösen. Der in vitro Einsatz von kleinen Chaperon-Molekülen ist ein zentrales Thema in einem weiteren, von der Europäischen Union geförderten Forschungsprojekt (s.u.).

■ Projektleitung: Manstein, Dietmar J. (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Coluccio, Lynne M (Dr.) Boston Biomedical Research Inst., Boston, USA; Ikebe, Mitsuo (Prof. Dr.) University of Massachusetts, Worcester, USA; Geeves, Michael A. (Prof. Dr.) University of Kent, UK; Raunser Stefan (Dr.), MPI für Molekulare Physiologie, Dortmund; Mannherz, Hans-Georg (Dr.), MPI für Molekulare Physiologie, Dortmund; Brenner, Bernhard (Prof. Dr.), Institut für Molekular- und Zellphysiologie; Förderung: DFG

## Weitere Forschungsprojekte

### Struktur und Funktion von Dynamin

■ Projektleitung: Manstein, Dietmar J. (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Eschenburg, Susanne (Dr.), MPI für Molekulare Physiologie, Dortmund; Reubold, Thomas (Dr.), MPI für Molekulare Physiologie, Dortmund; Förderung: DFG (FOR 629 „Molekulare Mechanismen zellulärer Motilität“)

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

■ Projektleitung: Manstein, Dietmar J. (Prof. Dr.); Förderung: DFG

### Charakterisierung der Aktomyosinbindungsstelle

■ Projektleitung: Manstein, Dietmar J. (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Raunser Stefan (Dr.), MPI für Molekulare Physiologie, Dortmund; Mannherz, Hans-Georg (Dr.), MPI für Molekulare Physiologie, Dortmund

### Funktionelle Charakterisierung von unkonventionellen Myosinmotoren

■ Projektleitung: Manstein, Dietmar J. (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Geeves, Michael A. (Prof. Dr.) University of Kent, UK; Förderung: DFG (FOR 629 „Molekulare Mechanismen zellulärer Motilität“)

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

■ Projektleitung: Manstein, Dietmar J. (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Geeves, Michael A. (Prof. Dr.) University of Kent, UK; Förderung: DFG (FOR 629 „Molekulare Mechanismen zellulärer Motilität“)

### Molecular Motors-based Nanodevices

■ Projektleitung: Manstein, Dietmar J. (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Nicolau, Dan V. (Prof. Dr.) The University of Liverpool, UK; Bastiaens, J. J. J. (Senior Director) Philips Research Europe, Eindhoven, Niederlande; Montelius Lars (Prof. Dr.) Lund University, Schweden; Burrage, Kevin (Prof. Dr.) Oxford University, UK; Förderung: EU

### Zellzyklusabhängige Funktionen von Klasse 1 Myosinen

■ Projektleitung: Tsiavaliaris, Georgios (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Geeves, Michael A. (Prof. Dr.) University of Kent, UK.; Förderung: DFG-Sachbeihilfe

### Rebirth Area B -Basic Mechanisms of Tissue Formation

■ Projektleitung: Furch, Marcus (Dr.); Manstein, Dietmar J. (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Martin, Ulrich (Prof. Dr.), HTTG-Chirurgie; Gruh, Ina (Dr.), LEBAO; Kalesse, Markus (Prof. Dr.) Leibniz-Universität-Hannover; Malek, Nisar (Prof. Dr.) Inst. für Molekularbiologie; Gaestel, Matthias (Prof. Dr.) Inst. für Physiologische Chemie; Brenner, Bernhard (Prof. Dr.), Institut für Molekular- und Zellphysiologie; Förderung: DFG

### Charakterisierung der molekularen Interaktion zwischen VASP, Forminen und ihren akzessorischen Proteinen bei der Ausbildung von Filopodien

■ Projektleitung: Faix, Jan (PD Dr.); Kooperationspartner: Dr. Klemens Rottner (HZI Braunschweig), Prof. Dr. Theresia Stradal (HZI Braunschweig), Prof. Dr. John Victor Small (IMBA, Wien), Prof. Michael Schleicher (LMU München), Prof. Dr. Hans-Georg Mannherz (Bochum); Förderung: DFG (FOR 629 „Molekulare Mechanismen zellulärer Motilität“)

**Neue Funktionen von Untereinheiten des SCAR/WAVE-Komplexes bei der Regulation der Aktindynamik**

■ Projektleitung: Faix, Jan (PD Dr.); Kooperationspartner: Rottner Klemens (Dr.) HZI Braunschweig), Jänsch, Lothar (Dr.) HZI Braunschweig, Stradal, Theresia (Dr.) HZI Braunschweig und Small, John Victor (Dr.) IMBA, Wien, Österreich; Förderung: DFG

**Analysis of cytoskeleton dynamics during phagocytosis and cell migration**

■ Projektleitung: Faix, Jan (PD Dr.); Kooperationspartner: Weber, Igor (Prof. Dr.) Rudjer-Boskovic-Institut, Zagreb, Kroatien; Förderung: DAAD

**Wechselwirkung von halogenierten Alkaloiden mit Myosinmotoren**

■ Projektleitung: Manstein, Dietmar J. (Prof. Dr.) und Tsiavaliaris, Georgios (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Gutzeit, Herwig O. (Prof. Dr.) TU Dresden; Knölker, Hans-Joachim (Prof. Dr.) TU Dresden; Fenical, William (Prof. Dr.) Scripps Institution of Oceanography, UCSD, San Diego; Kalesse, Markus (Prof. Dr.) Leibniz-Universität-Hannover; Brenner, Bernhard (Prof. Dr.), Institut für Molekular- und Zellphysiologie; Förderung: DFG, Industriemittel und FCI

**Struktur und Funktion hexamerer DNA-Helikasen**

■ Projektleitung: Alves J. (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Reuter, Monika (PD Dr.) Charité, Berlin; Sonnenberg, Jochen (Dr.) Institut für Biochemische Forschung und Analytik, Hannover

**Originalpublikationen**

Amrute-Nayak M, Diensthuber RP, Steffen W, Kathmann D, Hartmann FK, Fedorov R, Urbanke C, Manstein DJ, Brenner B, Tsiavaliaris G. Targeted Optimization of a Protein Nanomachine for Operation in Biohybrid Devices. *Angew Chem Int Ed Engl* 2010;49(2):312-316

Breitsprecher D, Kiesewetter AK, Linkner J, Faix J. Analysis of actin assembly by in vitro TIRF microscopy. *Methods Mol Biol* 2009;571:401-415

Duppatla V, Bodda C, Urbanke C, Friedhoff P, Rao DN. The C-terminal domain is sufficient for endonuclease activity of *Neisseria gonorrhoeae* MutL. *Biochem J* 2009;423(2):265-277

Fedorov R, Böhl M, Tsiavaliaris G, Hartmann FK, Taft MH, Baruch P, Brenner B, Martin R, Knölker HJ, Gutzeit HO, Manstein DJ. The mechanism of pentabromopseudilin inhibition of myosin motor activity. *Nat Struct Mol Biol* 2009;16(1):80-88

Hotulainen P, Llano O, Smirnov S, Tanhuanpää K, Faix J, Rivera C, Lappalainen P. Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *J Cell Biol* 2009;185(2):323-339

Knoth T, Warburg K, Katzka C, Rai A, Wolf A, Brockmeyer A, Janning P, Reubold TF, Eschenburg S, Manstein DJ, Hubel K, Kaiser M, Waldmann H. The Ras Pathway Modulator Melophilin A Targets Dynamins. *Angew Chem Int Ed Engl* 2009;48(39):7240-7245

Lai FP, Szczodrak M, Oelkers JM, Ladwein M, Acconcia F, Benesch S, Auinger S, Faix J, Small JV, Polo S, Stradal TE, Rottner K. Cortactin promotes migration and platelet-derived growth factor-induced actin reorganization by signaling to Rho-GTPases. *Mol Biol Cell* 2009;20(14):3209-3223

Martin R, Jäger A, Böhl M, Richter S, Fedorov R, Manstein DJ, Gutzeit HO, Knölker HJ. Total Synthesis of Pentabromo- and Pentachloropseudilin, and Synthetic Analogues-Allosteric Inhibitors of Myosin ATPase. *Angew Chem Int Ed Engl* 2009;DOI: 10.1002/anie.200903743

Pingoud V, Wende W, Friedhoff P, Reuter M, Alves J, Jeltsch A, Mones L, Fuxreiter M, Pingoud A. On the divalent metal ion dependence of DNA cleavage by restriction endonucleases of the EcoRI family. *J Mol Biol* 2009;393(1):140-160

Szczepiek M, Mackeldanz P, Moncke-Buchner E, Alves J, Krüger DH, Reuter M. Molecular analysis of restriction

endonuclease EcoRII from *Escherichia coli* reveals precise regulation of its enzymatic activity by autoinhibition. *Mol Microbiol* 2009;72(4):1011-1021

### Übersichtsarbeiten

Faix J, Breitsprecher D, Stradal TE, Rottner K. Filopodia: Complex models for simple rods. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41(8-9):1656-1664

### Abstracts

2009 wurden 18 Abstracts publiziert.

### Promotionen

Ralph P. Diensthuber (Dr. rer. nat.): Struktur-Funktionsanalyse prozessiver und nicht-prozessiver Myosine

Natalie Naue (Dr. rer. nat.): Protein-protein interactions at the replication fork of *E. coli*

### Diplome

Michael Radke: Interaction of myosin motor domains from different classes with small molecule effectors

### Bachelor

Mania Ackermann: Zielgerichtete Mutagenese an unkonventionellen Myosinen

Christine Hinz: Mutagenese an der Motordomäne Myosin IC

Carola Gregor: Untersuchung der Wechselwirkung von EMD 57033 mit der Motordomäne von  $\beta$ -Myosin"

Olga Sphigelman: Untersuchung der Wechselwirkung zwischen der DNA Polymerase III und dem Einzelstrang-DNA bindenden Protein aus *E. coli* mit Hilfe von zielgerichteter Mutagenese

### Weitere Tätigkeiten in der Forschung

Manstein, Dietmar J. (Prof. Dr.): Mitglied des wissenschaftlichen Beirats von ERA\_Instruments (ERA-Net initiative for promoting infrastructure funding in the Life Sciences), Mitglied des Komitees für Synchrotronforschung; Editor des *Journal of Muscle Research and Cell Motility* und von *FEBS Letters*; Gutachter für Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Alexander von Humboldt-Stiftung, Royal Society, Wellcome Trust, Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC), German Israeli Foundation (GIF), Association Française contre les Myopathies (AFM); Gutachter für *Biochemistry*, *Biophysical Journal*, *Journal of Biological Chemistry*, *Journal of Cell Biology*, *FEBS Journal*,

*EMBO Journal*, *Nature*, *Nature Structural and Molecular Biology*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

Alves, Jürgen (Prof. Dr.): 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, die Studienstiftung des Deutschen Volkes und die Netherlands Organisation for Scientific Research (NWO)

Tsiavaliaris, Georgios (Prof. Dr.): Gutachter für National Science Foundation (NSF), *Biochemistry and Langmuir*.

Curth, Ute (PD Dr.): *Acta Crystallographica Section D, Nucleic Acids Research, Biotechnology and Biological Sciences Research Council*

### Patente

D.J. Manstein, R. Fedorov, G. Tsiavaliaris, H.-J. Knölker, R. Martin, J. Kirst, H. O. Gutzeit, M. Böhl, M. Furch: Means for treating myosin-related diseases" (WO/2009/065600), International Application No.: PCT/EP2008/009891; Publication Date: 28.05.2009