

OPEN ACCESS**Repository of the Max Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC)
in the Helmholtz Association**

<https://edoc.mdc-berlin.de/17753/>

**Struktur und Funktion des mechanochemischen Motorproteins
Dynamin**

Faelber K., Daumke O.

This is the final version of the accepted manuscript. The original article has been published in final edited form in:

BIOspektrum
2018 SEP; 24(5): 481-483
2018 AUG 30 (first published online: final publication)
Doi: [10.1007/s12268-018-0949-y](https://doi.org/10.1007/s12268-018-0949-y)

Publisher: [Springer Verlag](#)

Publisher's notice

This is a post-peer-review, pre-copyedit version of an article published in *BIOspektrum*. The final authenticated version is available online at: <https://dx.doi.org/10.1007/s12268-018-0949-y>.

Abschnürung zellulärer Membranen

Struktur und Funktion des mechano-chemischen Motorproteins Dynamin

Katja Faelber¹, Oliver Daumke^{1,2}

1 Kristallographie, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin, Deutschland

2 Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin, Takustraße 3, 14195 Berlin, Deutschland

The GTPase dynamin is a molecular machine that assembles at the neck of clathrin-coated pits and catalyzes the scission of the vesicle neck in a GTPase-dependent fashion [1]. Recent structural work, in combination with biochemical and cell-based experiments, have led to a molecular model of how dynamin functions.

Die GTPase Dynamin ist eine molekulare Maschine, die sich am Hals von Clathrin-umhüllten Membranbläschen anlagert und den Vesikelhals in einer GTPase-abhängigen Reaktion abschnürt [1]. Strukturbiologische Arbeiten, kombiniert mit biochemischen und zellbasierten Experimenten, führten zu molekularen Modellen, die zeigen, wie die Dynamin-Maschine funktioniert.

Dynamin ist das Gründungsmitglied einer mechano-chemischen Enzymfamilie

1989 wurde Dynamin in Vertebraten als mechano-chemisches Protein entdeckt, das an Mikrotubuli bindet und diese bündelt [2]. Bereits zuvor waren temperatursensitive Allele von Dynamin in Fliegen beschrieben worden, die bei einer restriktiven Temperatur zu verminderter Abschnürung synaptischer Vesikel und damit einhergehend zur Lähmung der Fliegen durch fehlende neuronale Signalübertragung führten. Heute ist besonders diese Funktion von Dynamin als einer der Hauptakteure im Endozytose-Prozess gut untersucht.

Eine Reihe verwandter Proteine weisen Sequenz- und Strukturähnlichkeit zum klassischen Dynamin auf: Dynamin-1-like Protein (DNM1L) hat eine zentrale Rolle in der Teilung von Mitochondrien, während Mitofusin und Optic Atrophy 1 (OPA1) die Fusion der äusseren und inneren Mitochondrienmembran katalysieren. Die Familie der Myxovirus-Resistenzproteine

vermittelt antivirale Aktivität gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Viren. Diese Proteine binden nicht nur an Membranen, sondern interagieren auch mit viralen Bestandteilen. Die Interferon-induzierten Guanylate Binding Proteins (GBPs) und Immunity-related GTPases (Irgs) sind gegen intrazelluläre Pathogene aktiv. Atlastine vermitteln Membranfusion am Endoplasmatischen Retikulum, während EHD Proteine Membrankrümmung an intrazellulären Kompartimenten und an Caveolae stabilisieren. Auch in einigen Bakterien sind Dynamin-verwandte Proteine beschrieben worden, deren genau Funktionen oft noch nicht verstanden ist.

Biochemische Eigenschaften von Dynamin

Kurz nach seiner Entdeckung wurde gezeigt, dass sich Dynamin in helikalen Strukturen um den Hals von Clathrin-umhüllten Membranbläschen anordnet und diesen Hals unter GTP-Hydrolyse abschnürt [3]. Eine ähnliche Reaktion konnte auch *in vitro* gezeigt werden: Die Zugabe von isoliertem Dynamin zu Liposomen führt in Anwesenheit eines nicht-hydrolysierbaren GTP Analogons zur Tubulierung von Membranen, wobei Dynamin auch hier helikale Strukturen um die Membranröhrchen ausbildet (Fig. 1A) [4]. In Anwesenheit von GTP werden die Membranröhrchen fragmentiert, analog zur Abschnürungsreaktion am Vesikelhals.

Im Gegensatz zu kleinen GTPasen der Ras Superfamilie hat Dynamin eine niedrige Affinität zu Nukleotiden, im Bereich von 10 μM für GTP. Die basale GTPase Aktivität bei 37 °C liegt bei ca. 1 min^{-1} , d.h. deutlich höher als bei kleinen GTPasen. Sie kann durch Membranbindung 200-fach stimuliert werden. Dies deutet darauf hin, dass Dynamin in einem auto-inhibierten Zustand in Lösung vorliegt und durch Membranbindung aktiviert wird.

Die Struktur von Dynamin

Die molekularen Details, wie sich Dynamin in helikalen Strukturen anordnet, waren lange unklar. Grund dafür war die Eigenschaft von isoliertem Dynamin, bei hohen Konzentrationen unregelmäßige Filamente auszubilden, die sich der Kristall-Züchtung und dadurch der Strukturbestimmung mittels Röntgenkristallographie entzogen. Mutationen, die die Assemblierung verhinderten, hatten daher eine entscheidende Rolle für die strukturelle Charakterisierung von Dynamin GTPasen

Wir konnten mittels Röntgenstrukturanalyse die Struktur des Multi-Domänenproteins Dynamin aufklären (Fig. 1B, C). Die Struktur der konservierten N-terminalen GTPase (G) Domäne zeigte

eine verwandte Struktur zur G Domäne von Ras Proteinen auf. Aufgrund zusätzlicher Strukturelemente wurde sie bereits zuvor als 'Erweiterte G Domäne' beschrieben [5]. Angrenzend an die G Domäne liegt das Bundle Signalling Element (BSE), ein Bündel aus drei Helices [6]. Ein langgezogenes Bündel aus vier Helices, der Stalk, dient der Assemblierung [7; 8]. Die Bindung an negativ-geladene Membranen wird durch eine Pleckstrin Homology (PH) Domäne vermittelt. In der Dynamin-Kristallstruktur bindet sie an eine konservierte Interaktionsfläche im Stalk. Am C-Terminus von Dynamin befindet sich eine Prolin-Arginin reiche Sequenz (PRD). Diese vermittelt die Rekrutierung von Dynamin an den Vesikelhals [9].

Dynamin assembliert über den Stalk

Wir konnten zunächst für die Dynamin-verwandte MxA GTPase [10] und später für Dynamin zeigen, dass der Stalk die Assemblierung von Molekülen in ein helikales Filament vermittelt [7]. Die Stalks ordnen sich dabei in einem zaunartigen Muster an: Eine zentrale Interaktionsfläche vermittelt eine stabile Dimerisierung, während zwei weitere, kleinere Interaktionsflächen die Bildung von Tetrameren und höheren Oligomeren ermöglichen (Fig. 1D). In biochemischen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Mutationen in diesen Interaktionsflächen die Assemblierung von MxA und Dynamin zu helikalen Filamenten verhindern.

Dynamin bildet ein auto-inhibiertes Tetramer aus

Dynamin liegt in Lösung als Tetramer vor [11]. Da die ersten Strukturen mit Hilfe von Assemblierungs-defizienten Mutanten gewonnen wurden, konnte das Tetramer zunächst nicht im Kristall beobachtet werden. Eine andere Mutation ermöglichte jedoch dessen Strukturbestimmung [12].

Das Tetramer ordnet sich über die drei gleichen Stalk-Kontaktflächen an, die wir bereits zuvor für das Oligomer identifiziert hatten (Fig. 1D). Im Tetramer liegen die Stalks aber nicht in einer linearen, sondern in einer gekrümmten Anordnung vor. Interessanterweise entspricht diese Krümmung genau der Membrankrümmung am Vesikelhals, was eine selektive Bindung ermöglicht. Molekül-Dynamik Simulationen zeigten, dass die kleineren Interaktionsflächen geringfügige Rotationen der Stalk Dimere erlauben und so die Dynamin-Helix an Membranröhrchen unterschiedlicher Durchmesser binden kann [7].

Die Assemblierungsfläche der Stalks überlappt mit der Bindestelle der PH Domäne, d.h.

Oligomerisierung über den Stalk und Bindung der PH Domänen an den Stalk schließen sich gegenseitig aus [12]. Die Bindung der PH Domäne an den Stalk verhindert dadurch die Assemblierung weiterer Moleküle und hat daher auto-inhibitorische Funktion. Bei Membranbindung löst sich die PH Domäne vom Stalk und bindet stattdessen an die Kopfgruppen der Lipide. Dadurch wird die weitere Assemblierung über den Stalk ermöglicht. Mutationen in der PH Domänen-Stalk Interaktionsfläche wurden in Patienten gefunden, die an einer Zentronukleären Myopathie leiden: Bei dieser genetischen Krankheit ist die Funktion der peripheren Muskeln beeinträchtigt. Wir und andere konnten zeigen, dass diese Mutationen zu einer erhöhten Aktivität von Dynamin führen [7; 13]. Die Mutationen führen auch in Abwesenheit von Membranen zur Ablösung der PH Domäne vom Stalk und damit zu erhöhter Oligomerisierung. Weitere Studien zeigten, dass diese hyperaktiven Dynaminvarianten zur Fragmentierung der Transversen Tubuli in Muskeln führen und damit die Muskelfunktion beeinträchtigen [14].

Molekulare Grundlage für den Kraftstoss von Dynamin

Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass ein verkürztes G Domänen-BSE Konstrukt in Anwesenheit eines nicht-hydrolysierbaren GTP-Analogons als Dimer im Kristall vorliegt [15]. Die BSE-Domäne ist dabei in einem offenen Zustand relativ zur G Domäne angeordnet (Fig. 1E, links).

Eine zweite Struktur dieses Konstrukts in Anwesenheit eines Übergangszustandes der GTP Hydrolyse bildet auch ein Dimer aus [6]. In diesem Fall ist die BSE eng an die G Domäne in einem geschlossenen Zustand angelagert (Fig. 1E, rechts). Der Übergang von der offenen zur geschlossenen Konformation bedingt eine 70° Rotation der BSE relativ zur G Domäne. Diese Bewegung ist die Grundlage für den Kraftstoss in Dynamin.

Die Kristallstruktur des GDP-AlF₄⁻-beladenen Dimers zeigte auch den Mechanismus der stimulierten GTPase Aktivität auf: Durch Dimerisierung werden die zwei beweglichen Schalter-Regionen in der G Domäne stabilisiert, was zur Platzierung eines katalytischen Wassermoleküls in unmittelbare Nähe des γ -Phosphats im GTP führt. Ein katalytisches Kalium-Ion trägt zur Stabilisierung des Übergangszustandes bei.

Modell für die Vesikelabschnürung

Basierend auf den oben beschriebenen Daten schlugen wir ein molekulares Modell zur Funktion von Dynamin vor (Fig. 2) [16]: Dynamin-Tetramere werden zunächst über die PRD an den Vesikelhals rekrutiert, wobei die Bindung durch die komplementäre Krümmung des Tetramers begünstigt und durch die Adaptierung der kleineren Bindestellen angepasst wird. Die PH Domänen lösen sich von der Stalk-Interaktionsfläche und binden an die Membran, was zur Freisetzung der Assemblierungsflächen im Stalk und dadurch zur Anlagerung weiterer Tetramere führt. Das Dynamin Filament assembliert um den Vesikelhals in einer rechtsgängigen Helix. Nach einer Umrundung des Vesikelhals stehen sich GTP-beladene G Domänen von benachbarten Filamenten gegenüber. Sie dimerisieren, was zur Stimulierung der GTPase Aktivität und folglich zum Kraftstoss über die BSE-Domäne führt. Dabei werden benachbarte Filamente aneinander vorbeigezogen, was ein Zusammenziehen der Helix bzw. eine Verengung des darunterliegenden Membranhalses bedingt. In der GDP-gebundenen Form dissoziieren die G Domänen und das helikale Filament öffnet sich. Die Membranabschnürung könnte während des Zusammenziehens des Vesikelhalses oder der Öffnung des Filaments stattfinden.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB740, SFB958) unterstützt.

Literatur

- [1] Daumke O, and Praefcke GJK (2016) Invited review: Mechanisms of GTP hydrolysis and conformational transitions in the dynamin superfamily. *Biopolymers* 105:580-593
- [2] Obar RA, Collins CA, Hammarback JA, Shpetner HS, and Vallee RB (1990) Molecular cloning of the microtubule-associated mechanochemical enzyme dynamin reveals homology with a new family of GTP-binding proteins. *Nature* 347:256-261
- [3] Takei K, McPherson PS, Schmid SL, and De Camilli P (1995) Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature* 374:186-190
- [4] Hinshaw JE, and Schmid SL (1995) Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* 374:190-192
- [5] Niemann HH, Knetsch ML, Scherer A, Manstein DJ, and Kull FJ (2001) Crystal structure of a dynamin GTPase domain in both nucleotide-free and GDP-bound forms. *EMBO J* 20:5813-5821
- [6] Chappie JS, Acharya S, Leonard M, Schmid SL, and Dyda F (2010) G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity. *Nature* 465:435-440
- [7] Faelber K, Posor Y, Gao S, Held M, Roske Y, Schulze D, Haucke V, Noe F, and Daumke O

- (2011) Crystal structure of nucleotide-free dynamin. *Nature* 477:556-560
- [8] Ford MG, Jenni S, and Nunnari J (2011) The crystal structure of dynamin. *Nature* 477:561-566
- [9] Daumke O, Roux A, and Haucke V (2014) BAR domain scaffolds in dynamin-mediated membrane fission. *Cell* 156:882-892
- [10] Gao S, von der Malsburg A, Paeschke S, Behlke J, Haller O, Kochs G, and Daumke O (2010) Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA. *Nature* 465:502-506
- [11] Ramachandran R, Surka M, Chappie JS, Fowler DM, Foss TR, Song BD, and Schmid SL (2007) The dynamin middle domain is critical for tetramerization and higher-order self-assembly. *EMBO J* 26:559-566
- [12] Reubold TF, Faelber K, Plattner N, Posor Y, Ketel K, Curth U, Schlegel J, Anand R, Manstein DJ, Noe F, Haucke V, Daumke O, and Eschenburg S (2015) Crystal structure of the dynamin tetramer. *Nature* 525:404-408
- [13] Kenniston JA, and Lemmon MA (2010) Dynamin GTPase regulation is altered by PH domain mutations found in centronuclear myopathy patients. *EMBO J* 29:3054-3067
- [14] Chin YH, Lee A, Kan HW, Laiman J, Chuang MC, Hsieh ST, and Liu YW (2015) Dynamin-2 mutations associated with centronuclear myopathy are hypermorphic and lead to T-tubule fragmentation. *Human molecular genetics* 24:5542-5554
- [15] Chappie JS, Mears JA, Fang S, Leonard M, Schmid SL, Milligan RA, Hinshaw JE, and Dyda F (2011) A pseudoatomic model of the dynamin polymer identifies a hydrolysis-dependent powerstroke. *Cell* 147:209-222
- [16] Faelber K, Held M, Gao S, Posor Y, Haucke V, Noe F, and Daumke O (2012) Structural insights into dynamin-mediated membrane fission. *Structure* 20:1621-1628

Korrespondenzadresse:

Oliver Daumke
Kristallographie
Max-Delbrück Centrum für Molekulare Medizin
Robert-Rössle-Straße 10
13125 Berlin, Deutschland
oliver.daumke@mdc-berlin.de

Autoren



Oliver Daumke

1995 – 2000 Biologiestudium, Universität Freiburg, University of Sussex, Universität zu Köln
2001 – 2004 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut in Dortmund / Universität zu Köln bei Alfred Wittinghofer
2004 – 2007 PostDoc am Laboratory of Molecular Biology bei Harvey McMahon
2007 – 2013 Nachwuchsgruppenleiter am Max-Delbrück-Centrum (MDC) in Berlin
Seit 2013 Gruppenleiter am MDC, S-Professor für Strukturbiologie an der Freien Universität Berlin



Katja Fälber

1989 – 1996 Studium der Physik (Diplom), Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Technische Universität Berlin
1997 – 2002 Doktorarbeit am Max-Delbrück-Centrum in Berlin bei Yves Muller und Udo Heinemann
2002 - 2009 PostDoc an der Freien Universität Berlin bei Wolfram Saenger und am Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie bei Bernd Reif
seit 2009 Wissenschaftlerin in der Arbeitsgruppe von Oliver Daumke

Figure 1: Struktur von Dynamin (modifiziert von [16])

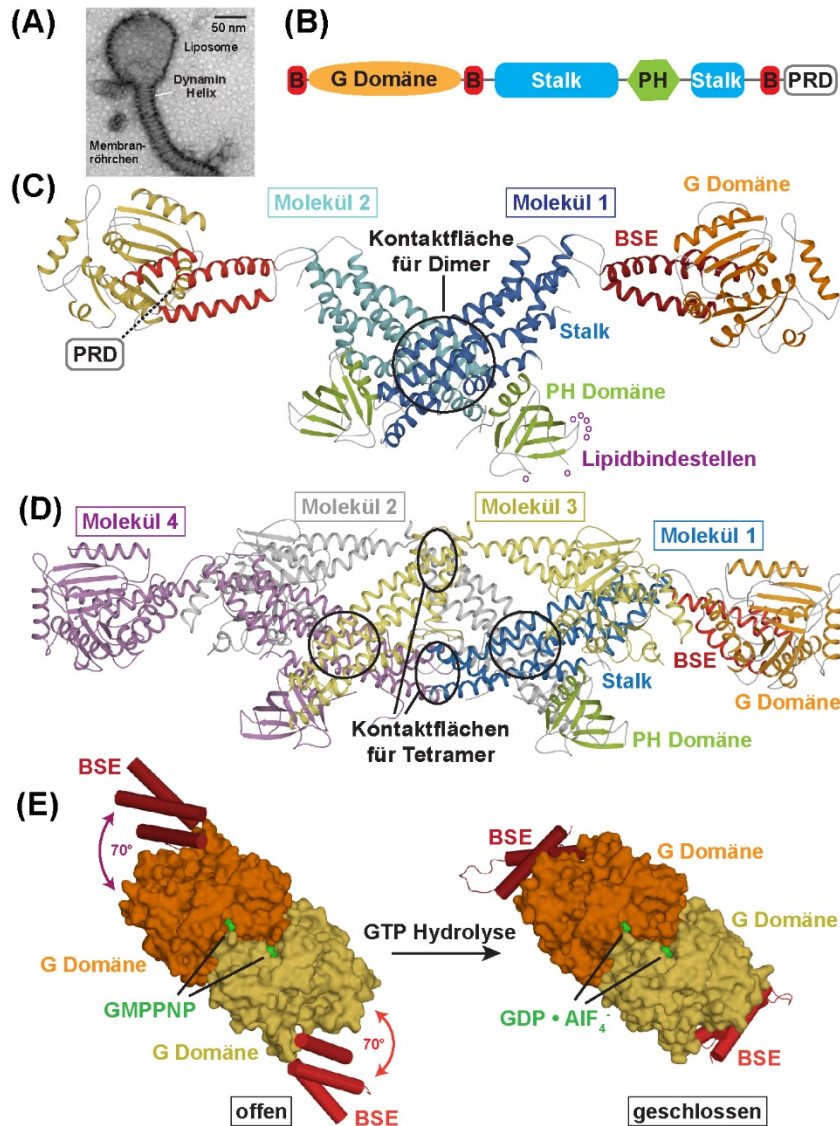


Figure 1: (A) Dynamin tubuliert Liposomen, indem es sich als helikales Filament um die Membran anordnet und so Membranröhrchen stabilisiert. (B) Strukturbasierte Domänenorganisation von Dynamin. B – Bundle Signaling Element. (C) Kristallstruktur des Dynamin Dimers, das über den zentralen Stalk-Kontakt assembliert. (D) Über zwei weitere, kleinere Stalk-Interaktionsflächen werden Tetramere und höhere Oligomere von Dynamin ausgebildet. (E) Struktur von G Domäne-BSE-Dimeren in Anwesenheit eines nicht-hydrolysierbaren GTP-Analogons (links) und eines Analogons des Übergangszustands der GTP-Hydrolyse (rechts). Die Hydrolyse von GTP führt zu einer Umlagerung der BSE Domäne, die als Kraftstoß fungieren kann.

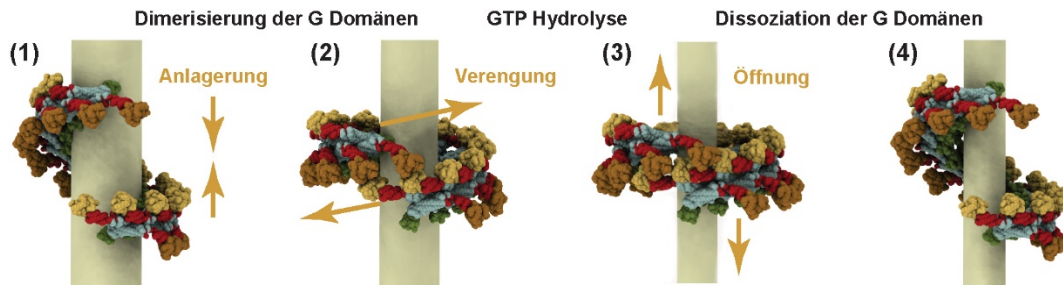


Figure 2: Modell für die Dynamin-vermittelte Membranabschnürung am Vesikelhals (modifiziert von [16]).

(1) Dynamin assembliert am Vesikelhals in einer rechtsgängigen Helix. Sobald das Filament den Hals umschlungen hat, stehen sich GTP-beladene G Domänen (gelb/orange) gegenüber. (2) Die Dimerisierung der G Domänen führt zur Zusammenlagerung der Dynamin Helix. (3) GTP-Hydrolyse induziert einen Kraftstoss, der benachbarte Filamente aneinander vorbeizieht. Dadurch kommt es zur Verengung des Vesikelhalses. (4) In der GDP-gebundenen Form dissoziieren die G Domänen. Die Membranabschnürung könnte während der Verengung des Vesikelhalses oder der Öffnung der Dynaminhelix geschehen.