

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht – Karls – Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biochemiker Boris Klockow
aus Herne

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2001

Thema:

Die GTPase Dynamin A

**Strukturelle und biochemische Hinweise
auf einen molekularen Motor**

Gutachter:

Prof. Dr. Kenneth C. Holmes

Prof. Dr. Felix Wielandααα

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 GTP-bindende Proteine	1
1.1.1 Struktur von GTP-bindenden Proteinen	1
1.1.2 Funktion von GTP-bindenden Proteinen	4
1.2 Die Dynamin-Familie der großen GTP-bindenden Proteine	5
1.3 Dynamin	6
1.3.1 Hinweise auf eine Funktion als molekularer Motor	7
1.3.2 Hinweise auf eine Funktion als molekularer Schalter	7
1.3.3 Dynamin wechselwirkt mit sich selbst	8
1.3.4 Weitere Interaktionspartner von Dynamin	9
1.4 Dynamin-verwandte Proteine	10
1.5 Dynamin A aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	11
1.5.1 <i>Dictyostelium discoideum</i>	11
1.5.2 Dynamin A	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Verwendete Puffer	13
2.1.2 Primer	13
2.1.3 Plasmide	15
2.1.4 Größenstandards	16
2.1.5 Protease-Inhibitoren	16
2.1.6 Medien fuer die Kultivierung von <i>E. coli</i> oder <i>D. discoideum</i>	16
2.1.7 Antibiotika	17
2.1.8 Antikörper	17
2.2 Molekularbiologische Methoden	17
2.2.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	17
2.2.2 Transformation und Selektion von <i>E. coli</i>	18
2.2.3 Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i>	18
2.2.4 Isolierung von Nukleinsäuren	18
2.2.5 Die Polymerase-Kettenreaktion	19
2.2.6 TOPO TA-Cloning	20
2.2.7 Gezielte DNA-Hydrolyse	21
2.2.8 5'-Dephosphorylierung von DNA	21
2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten	21
2.2.10 Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren	22
2.2.11 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	22

2.3	Proteinchemische Methoden	22
2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	22
2.3.2	Western-Blot	24
2.3.3	Enzym-Immunoassay	24
2.3.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	25
2.3.5	Konzentrierung von Proteinlösungen	25
2.3.6	Reinigung von Dynamin A aus <i>D. discoideum</i> -Zellen	26
2.3.7	Ni-NTA-Chromatographie	27
2.3.8	Analytische HPLC	27
2.3.9	<i>Stopped-Flow</i> -Messungen schneller Reaktionen	27
2.3.10	<i>Quenched-Flow</i> -Messungen schneller Reaktionen	28
2.3.11	Lipidbindung	28
2.4	Elektronenmikroskopische Analyse	29
2.4.1	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)	29
2.4.2	Einzelpartikelanalyse und <i>angular reconstitution</i>	30
2.5	Zellbiologische Methoden	31
2.5.1	Kultivierung von <i>D. discoideum</i> -Zellen	31
2.5.2	Konservierung von <i>D. discoideum</i> -Zellen	31
2.5.3	Transformation von <i>D. discoideum</i> -Zellen	32
2.5.4	Zeitaufgelöste Isolierung von Endosomen	32
2.5.5	Isolierung von Mitochondrien	33
3.	Ergebnisse	35
3.1	Klonierungsarbeiten	35
3.1.1	Identifizierung von essentiellen Aminosäuren	35
3.1.2	Generierung von Punktmutationen in Dynamin A	38
3.1.3	Generierung von Dynamin A – Fragmenten	40
3.2	Proteinreinigung aus <i>D. discoideum</i>	41
3.2.1	Reinigung von Dynamin A aus <i>D. discoideum</i>	41
3.2.2	Reinigung von punktmutiertem Dynamin A	43
3.2.2a	Dynamin A D210N	44
3.2.2b	Dynamin A R828A	44
3.2.3	Reinigung von Dynamin A – Fragmenten aus <i>D. discoideum</i>	44
3.2.3a	Reinigung von H-DymA- Δ GED aus <i>D. discoideum</i>	45
3.2.3b	Reinigung von H-DymA-372 aus <i>D. discoideum</i>	46
3.2.4	Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus <i>D. discoideum</i>	47
3.3	Expression von <i>dymA</i> in <i>E. coli</i>	48
3.4	Untersuchung der Lokalisation von Dynamin A	49
3.4.1	Zeitaufgelöste Lysomenreinigung	49
3.4.2	Mitochondrienreinigung	50
3.5	Elektronenmikroskopische Analyse von Dynamin A	51
3.5.1	Nukleotidfreies Dynamin A	51
3.5.2	Dynamin A in der Gegenwart von GppNHp	57
3.5.3	Dynamin A in der Gegenwart von GDP oder GDP+AlF _x	60

3.6	Biochemische Charakterisierung von Dynamin A	61
3.6.1	Assemblierung von Dynamin A in Lösung	61
3.6.2	Lipidbindung von Dynamin A	62
3.6.3	Nukleotidabhängige Proteolyse	63
3.6.4	Bestimmung der Domänenstruktur von Dynamin A	64
3.6.5	Massenspektrometrische Untersuchungen	66
3.7	Kinetische Charakterisierung von Dynamin A	67
3.7.1	Gleichgewichtskinetik von Dynamin A	67
3.7.2	Bestimmung der kinetischen Parameter der Nukleotidbindung	68
3.7.2a	Bindung von TNP-Nukleotiden an Dynamin A	69
3.7.2b	Bindung von mant-Nukleotiden an Dynamin A	70
3.7.2c	Untersuchung der Nukleotid-Dissoziation	72
3.7.3	Bestimmung der kinetischen Parameter der GTP-Hydrolyse	73
3.7.4	Bestimmung der Kooperativität der GTPase-Reaktion	74
4.	Diskussion	75
4.1	Punktmutationen in Dynamin A	75
4.2	<i>In vivo</i> Charakterisierung von Dynamin A	77
4.3	Elektronenmikroskopische Analyse des Dynamin A Ringkomplexes	77
4.3.1	Nukleotidfreies Dynamin A	78
4.3.2	GppNHp-gebundenes Dynamin A	80
4.3.3	GDP-gebundenes Dynamin A	81
4.4	Biochemische Charakterisierung von Dynamin A	82
4.4.1	Nukleotidabhängige Proteolyse	82
4.4.2	Nukleotidabhängige Lipidbindung	82
4.4.3	Kinetische Charakterisierung	83
4.5	Model der Funktionsweise der Dynamine	85
4.6	Dynamine – molekulare Motoren oder molekulare Schalter?	88
5.	Zusammenfassung	91
6.	Literaturverzeichnis	93

Abkürzungsverzeichnis

Arf	Adenosinribosylierungsfaktor
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Ackerschmalwand)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
Ci	Curie (alte Einheit der Radioaktivität)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i> (Fadenwurm)
Da	Dalton (Einheit der relativen Atommasse)
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i> (Sozialamöbe)
DEAE	Diethylaminoethyl
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> (Taufliege)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonulceinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
ds	<i>double stranded</i> (doppelsträngig)
DTT	Dithiothreitol
DVLP	<i>Dnm1p-Vps1p-like protein</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (Darmbakterium)
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EF-Tu	Elongationsfaktor thermisch instabil
Ffh	<i>Fiftyfour homolog</i> (SRP54-Homolog in <i>E.coli</i>)
Fzo	<i>Fuzzy onion</i>
FtsY, FtsZ	Filamentös temperatur-sensitiv Y, Z
GBP	Guanylat-bindendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GppNHp	Guanylylimidodiphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTP γ S	Guanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)
h	Stunde
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i> (Mensch)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazinoethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
<i>K. aerogenes</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i> (Bakterium)
kb	Kilobasen(paare)
k_{cat}	Wechselzahl eines Enzyms
K_D	Dissoziationskonstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
kDa	Kilodalton
k_{obs}	beobachtetes Geschwindikeitskonstante
mant-	Methylantraniloyl-
MCS	<i>multiple cloning site</i> (multitpler Klonierungsbereich)
MES	2-(N-morpholino)-ethansulfonsäure
min	Minute
Mgm1p	<i>Mitochondrial genome maintenance 1 protein</i>
mdGDP	mant-2'-desoxy-Guanosin-5'-diphosphat

mGDP	mant-Guanosin-5'-diphosphat
mGppNHp	mant-Guanylylimidodiphosphat
mGTP	mant-Guanosin-5'-triphosphat
MLK	<i>Mixed-lineage Kinase</i>
NiNTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
PA	Phosphatidylsäure
PC	Phosphatidylcholin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phosphatidylethanolamin
PH	Pleckstrin-homolog
PRD	Prolin-(Arginin-)reiche Domäne
PS	Phosphatidylserin
PtdEth	Phosphatidylethanolamin
PtdIns	Phosphatidylinositol
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bäckerhefe, Bierhefe)
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (Spaltheife)
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH	Src homolog
Src	Sarcoma
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
Rad	Ras in Diabetes
Ran	Ras nukleär
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
Rho	Ras homolog
T _m	<i>melting temperatur</i> (Schmelztemperatur)
TNP-GDP	2',3'-O-(2,4,6-Trinitrocyclohexadienyl)guanosin-5'-diiphosphat
TNP-GTP	2',3'-O-(2,4,6-Trinitrocyclohexadienyl)guanosin-5'-triphosphat
Tris	Tris[hydrozylmethyl]aminomethan
Triton-X 100	Octylphenol-Polyethylenglycol-ether
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitanmonolaureat
U	<i>unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
Vps1p	Vacuoläre Proteinsortierung 1 Protein
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
XTP	Xantosinriphosphat

1. Einleitung

1.1 GTP-bindende Proteine

In vielen fundamentalen zellulären Prozessen nehmen GTP-bindende Proteine teil, wie zum Beispiel in der Proteinbiosynthese, im vesikulären Transport, in der Organisation des Cytoskeletts oder in der intrazellulären Signalweiterleitung (Bourne *et al.*, 1990). Die GTP-bindenden Proteine lassen sich aufgrund ihrer Sequenzhomologie in mindestens fünf Superfamilien einteilen:

1. die Ras-homologen kleinen GTPasen (Subfamilien Ras, Rho/Rac, Ran, Rab, Arf und Rad),
2. die α -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine (Subfamilien $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 12}$),
3. die Translationsfaktoren der Proteinbiosynthese (Subfamilien IF, EF und RF),
4. der Signalerkennungspartikel (z.B. SRP54, Ffh) und sein Rezeptor (z.B. SR α/β , FtsY) und
5. die Dynamamin-verwandten großen GTPasen (z.B. Dynamamin 1, Vps1p, Mgm1, Mx1, hGBP1).

1.1.1 Struktur von GTP-bindenden Proteinen

In den meisten GTP-bindenden Proteinen, deren dreidimensionale Strukturen bekannt ist, besitzt die GTP-bindende Domäne (GTPase-Domäne) eine hochkonservierte Struktur. Sie besteht aus einem zentralen, sechssträngigem β -Faltblatt, das von fünf α -Helices umgeben ist. Diese minimale GTPase-Domäne entspricht der Struktur von Ras (s. Abb. 1.2a; Pai *et al.*, 1989). Bei den anderen GTP-bindenden Proteinen treten Additionen und Insertionen von weitere Strukturelemente auf. Generell bezeichnet man die zugrundeliegende Topologie als *Walker fold* (Walker *et al.*, 1982), die sich aus der relativen Lage der ersten drei Faltblätter zueinander definiert (Abb. 1.1).

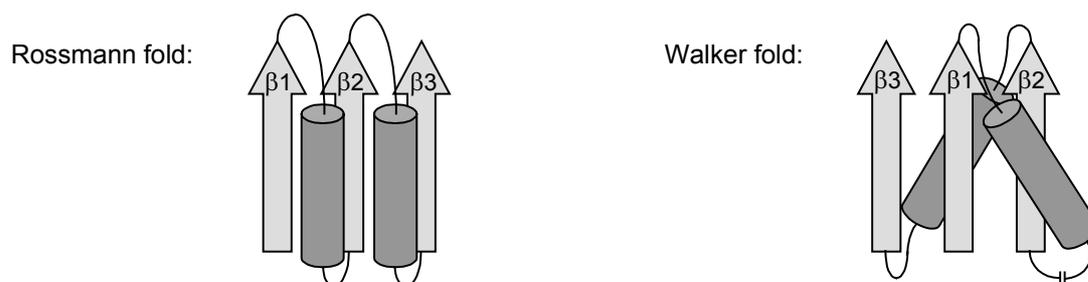


Abb. 1.1: Topologieunterschiede bei Nukleotid-bindenden Proteinen. Beim *Rossmann fold* liegen drei parallele β -Faltblätter in der Reihenfolge 1-2-3 vor, verbunden durch je eine Helix auf einer Seite des zentralen Faltblatts. Beim *Walker fold* liegen drei parallele β -Faltblätter in der Reihenfolge 3-1-2 vor, verbunden durch je eine Helix auf je einer Seite des zentralen Faltblatts, oft mit zusätzlichen β -Faltblättern nach der ersten Helix (nach Kull und Flettrick, 1998).

Manche GTP-bindende Proteine, wie Fzo1 und die Septine, gehören keiner der bisher definierten Superfamilien an. Aus ihrer Sequenz läßt sich aber ableiten, daß ihre GTP-bindenden Domänen ebenfalls eine *Walker fold* Topologie aufweist. Eine grundsätzlich andere Topologie von GTPasen ist bislang nur bei Tubulin und FtsZ gefunden worden, die mit dem *Rossmann fold* (Abb. 1.1; Rao und Rossmann, 1973) eine eigene Familie von GTP-bindenden Proteinen darstellen (Nogales *et al.*, 1998; Kull und Flettrick, 1998).

Neben der hochkonservierten GTPase-Domäne treten in vielen GTP-bindenden Proteinen noch weitere, modulartige Domänen auf, die für die jeweilige biologische Funktion wichtig sind (Abb. 1.2a-e).

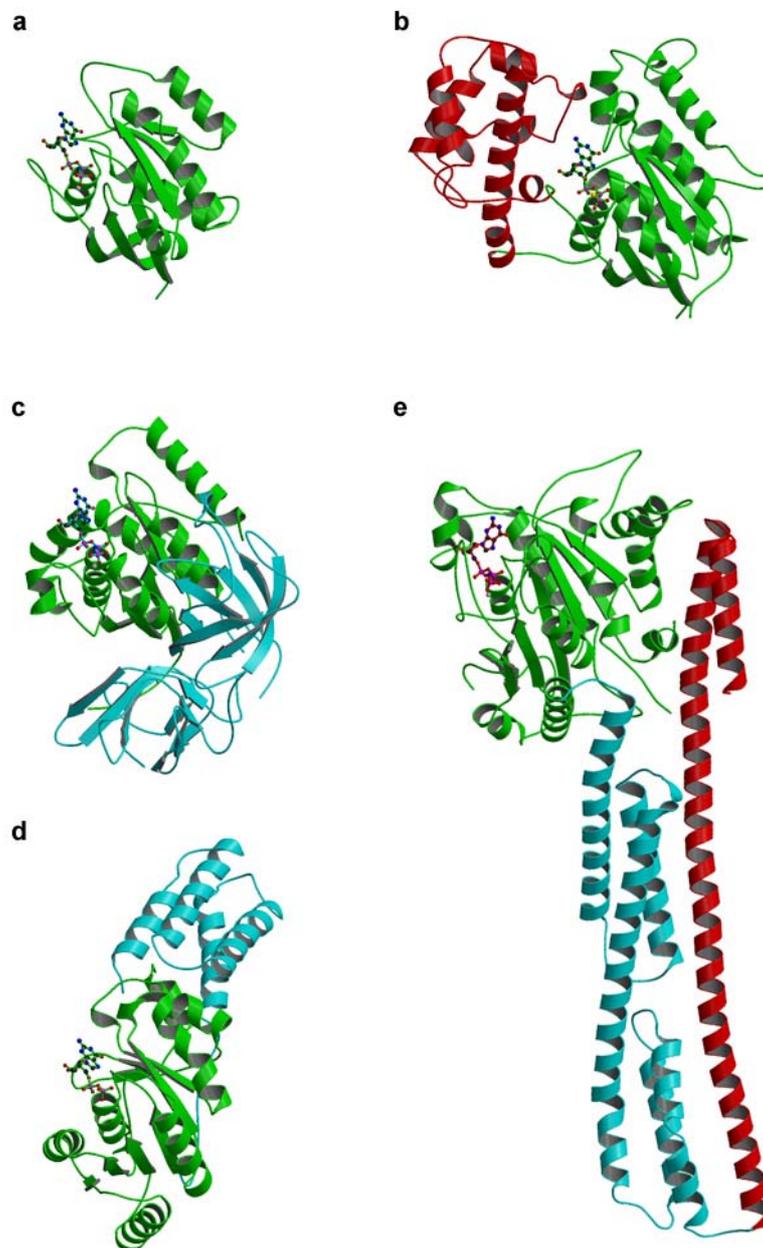


Abb. 1.2: Modulartiger Aufbau von GTPasen. Die Strukturen von Mitgliedern der fünf Superfamilien sind dargestellt. **a)** Ras (Pai *et al.*, 1989), **b)** G_{α} transducin (Noel *et al.*, 1993), **c)** EF-Tu (la Cour *et al.*, 1985), **d)** Ffh (Freymann *et al.*, 1997), **e)** hGBP1 (Prakash *et al.*, 2000). Der modulartige Aufbau mit der konservierten GTPase-Domäne (grün, mit GTP-Analog als Stabmodell) und den zusätzlichen funktionellen Domänen (cyan) wird deutlich. Die helikale Domäne in G_{α} transducin (**b**, rot) agiert als internes GAP. Diese Funktion wird auch für den C-Terminus der großen GTPasen diskutiert (**e**, rot).

Allen GTP-bindenden Proteinen mit *Walker fold* gemeinsam ist die Mg^{2+} -abhängige Bindung von Guaninnukleotiden und die Hydrolyse von GTP zu GDP und freiem Phosphat (P_i). Diese Eigenschaften werden durch hochkonservierte Sequenzmotive vermittelt (Abb. 1.3; Valencia *et al.*, 1991; Bourne *et al.*, 1991). Das erste Motiv GxxxxGKS/T wird Phosphat-Scheife (*P-loop* oder G1) genannt, ist charakteristisch für den *Walker fold* und tritt in diversen Mononukleotid-bindenden Proteinen auf (Walker *et al.*, 1982; Saraste *et al.*, 1990; Via *et al.*, 2000). Der *P-loop* befindet sich stets zwischen dem ersten β -Faltblatt und der nachfolgenden α -Helix und fixiert mit den Amidgruppen der Hauptkette das α - und β -Phosphat des Nukleotids. Zudem ist die Hydroxylgruppe des konservierten Serins an der Koordination des Mg^{2+} -Ions beteiligt. Das zweite Motiv (G2) ist ein singuläres, hochkonserviertes Threonin, das nur an der GTP-Bindung, nicht aber an der GDP-Bindung involviert ist. Die Amidgruppe der Hauptkette des Threonins kontaktiert das γ -Phosphat, während die Hydroxylgruppe der Seitenkette das Mg^{2+} -Ion koodiniert. Auch das Glycin im streng konservierten dritten Bindungsmotiv DxxG (G3) kontaktiert nur das γ -Phosphat und trägt daher selektiv zur Bindung von GTP bei. Da die Bindung von GTP nur im Bereich von G2 und G3 deutliche konformationelle Änderungen induziert, werden diese *switch I* und *switch II* genannt.

G1 (<i>P-loop</i>)	G2 (<i>switch I</i>)	G3 (<i>switch II</i>)	G4
GxxxxGKS/T	T	DxxG	N/TKxD

Abb. 1.3: Hochkonservierte Aminosäuren der GTP-bindenden Proteine vermitteln die Nukleotidbindung. Die konservierten Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben, beliebige Aminosäuren sind mit x bezeichnet.

Das vierte Bindungsmotiv N/TKxD (G4) ist für die spezifische Erkennung der Guaninbase verantwortlich. Die Carboxylgruppe des Aspartat bildet als Akzeptor eine bidentate Wasserstoffbrücke zur Guaninbase aus (Pai *et al.*, 1989). Bei Substitution mit einem Asparagin wird durch die Amidgruppe ein Akzeptor durch einen Donor ersetzt, wodurch die Spezifität von Guanin auf Xantosen wechselt (Abb. 1.4; Hwang und Miller, 1987). Die beiden anderen konservierten Reste stabilisieren die Nukleotidbindungsstelle durch Kontakte zum *P-loop*.

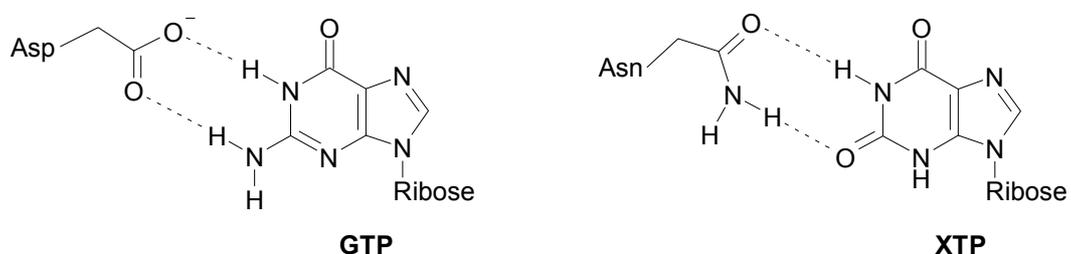


Abb. 1.4: Wechsel der Nukleotidspezifität von GTPasen. Das hochkonservierte Aspartat im Motiv G4 vermittelt als zweifacher Akzeptor von Wasserstoffbrückenbindungen die Spezifität für Guanosinnukleotide. Bei Substitution mit einem Asparagin wird die Bindung von Guanosinnukleotiden sterisch und energetisch ungünstig, statt dessen werden Xanthosinnukleotide gebunden.

1.1.2 Funktion der GTPasen

Die hochkonservierten, GTP-spezifischen Interaktionen von *switch I und II* (G2 und G3) zum γ -Phosphat übersetzen die Bindung von GTP sowie dessen Hydrolyse zu GDP in eine Konformationsänderung des Proteins. Damit können GTP-bindende Proteine prinzipiell in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen, dem GTP-Zustand oder dem GDP-Zustand. Diese Eigenschaft versetzt sie in die Lage als „molekulare Schalter“ zu wirken (Abb. 1.5). Im GDP-gebundenen Zustand sind sie zumeist inaktiv. Die Dissoziation von GDP führt zu einem nukleotidfreien Zustand, der wegen der hohen GTP-Konzentration in der Zelle (50-150 μM , Otero, 1990; 500 μM , Millman und Andrews, 1997) nur als kurzlebiges Intermediat auftritt. Die Bindung von GTP induziert eine Konformationsänderung des Proteins, das daraufhin mit seinen Effektoren interagieren kann. Die Hydrolyse vom GTP zu GDP und Phosphat versetzt das Protein wieder in den inaktiven Zustand. Proteine, die GDP-Dissoziation und GTP-Hydrolyse beeinflussen, regulieren folglich die biologische Aktivität des GTP-bindenden Proteins. Solche Proteine sind die Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), die GTPase-aktivierenden Proteine (GAPs) und Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs).

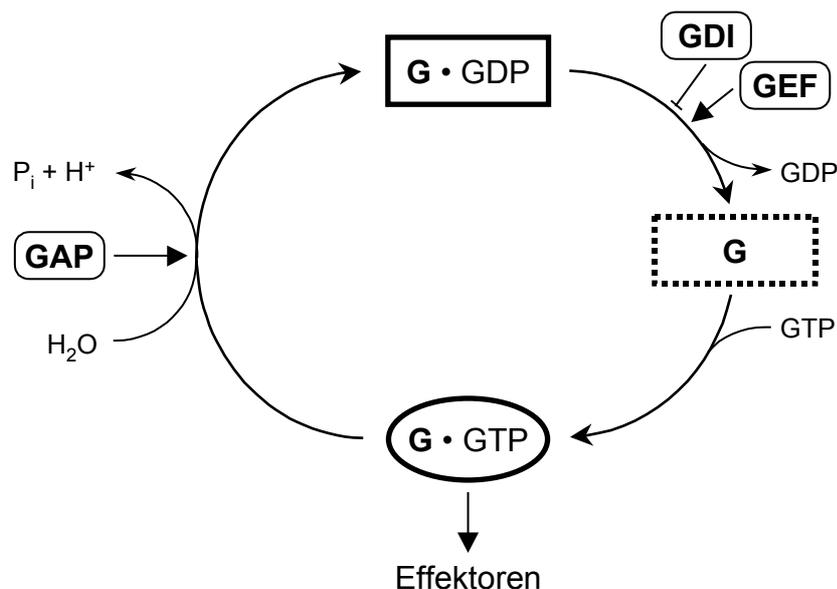


Abb. 1.5: Schalterfunktion der GTP-bindenden Proteine. Nach der Dissoziation des gebundenen GDP ist das GTP-bindende Protein (G) kurzzeitig nukleotidfrei. Durch Bindung von GTP gelangt es in den aktiven Zustand, in dem es Effektoren binden kann. Die Inaktivierung erfolgt durch die Hydrolyse von GTP zu GDP und Phosphat (P_i). Die GDP-Dissoziation wird manchmal durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) beschleunigt oder durch Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDI) blockiert. Die GTP-Hydrolyse kann durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP) beschleunigt werden.

Damit unterscheiden sich die GTPasen als molekulare Schalter funktionell von den ATPasen Myosin, Kinesin und Dynein, die als molekulare Motoren agieren. Obwohl die katalytischen Domänen von GTPasen und ATPasen strukturell ähnlich sind (Vale, 1996), wurde bislang nur für die ATPasen die Umsetzung der nukleotidabhängigen Konformation in eine krafterzeugende Bewegung gezeigt.

1.2 Die Dynamin-Familie der großen GTP-bindenden Proteine

Die großen GTP-bindenden Proteine der Dynamin-Familie sind strukturell ähnlich, aber funktionell höchst unterschiedlich (van der Blik, 1999; McNiven *et al.*, 2000, Danino und Hinshaw, 2001). Die biologische Funktion der Dynamine umfaßt unter anderem die Vesikelgenerierung während der Endocytose, den Erhalt der Mitochondrienmorphologie und die Abwehr von viralen Pathogenen (McNiven *et al.*, 2000). Die strukturelle Ähnlichkeit beinhaltet die hochkonservierte N-terminale GTPase-Domäne von etwa 300 Aminosäuren, eine konservierte C-terminal GTPase-Effektordomäne (GED) von etwa 120 Aminosäuren Länge und eine weniger stark konservierte „Mitteldomäne“ von variabler Länge (Abb. 1.6). In manchen Dynaminen wird zudem noch eine Pleckstrin-homologe Domäne (PHD) sowie eine Prolin-Arginin-reiche Domäne (PRD) vorgefunden (van der Blik, 1999).

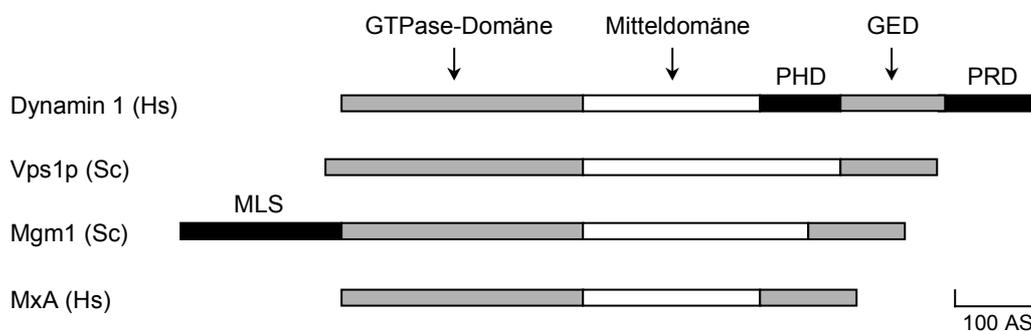


Abb. 1.6: Domänenstruktur der Gründungsmitglieder der Familie der großen GTP-bindenden Proteinen. Alle Mitglieder enthalten eine hochkonservierte G-Domäne, eine Mittel- und eine GTPase-Effektor-Domäne (GED). Manche Dynamine, wie humanes Dynamin 1, haben zwischen der Mitteldomäne und der GED eine Pleckstrin-homologe Domäne (PHD) und eine C-terminale Prolin-Arginin-reiche Domäne (PRD). Andere, wie Mgm1 aus *S. cerevisiae*, verfügen über eine N-terminale Signalsequenz zur Lokalisation in die Mitochondrien (MLS). Hs: *H. sapiens*, Sc: *S. cerevisiae* (verändert nach van der Blik, 1999).

Neben der charakteristischen Domänenstruktur und Größe von 70 bis 100 kDa besitzen die GTPasen der Dynamin-Familie eine vergleichsweise niedrige Nukleotidaffinität und hohe GTPase-Aktivität, sowie die Fähigkeit die GTPase-Aktivität durch Oligomerisierung zu stimulieren (Maeda *et al.*, 1992; Sheptner und Vallee, 1992; Tuma *et al.*, 1994; Warnock *et al.*, 1996; 1997; Binns *et al.*, 1999; 2000). Aufgrund dieser biochemischen Eigenschaften sind sie in der Lage, den GTPase-Zyklus zu durchlaufen, ohne auf GEFs und GAPs angewiesen zu sein. Diese Eigenschaften macht es aber zugleich unwahrscheinlich, daß die Dynamine wie andere GTP-bindende Proteine als molekulare Schalter funktionieren. Tatsächlich gibt es Hinweise, daß sie vielmehr als molekulare Motoren Kraft erzeugen und physikalische Arbeit leisten (Sweitzer und Hinshaw, 1998). Andere Ergebnisse werden so interpretiert, daß auch diese GTPasen als molekulare Schalter agieren und Effektoren regulieren (Sever *et al.*, 1999; 2000a). Die alternativen Modelle für die Funktionsweise der großen GTP-bindenden Proteine – als molekularer Motor oder molekularer Schalter – sollen am Beispiel des humanen Dynamin 1 aufgezeigt werden.

1.3 Dynamin

Das Protein Dynamin (*dynamis*, griechisch: Kraft) wurde erstmals aus Rinderhirn isoliert und als Mikrotubuli-bindende, 100 kDa große ATPase beschrieben, die Mikrotubuli unter ATP-Verbrauch gegeneinander bewegen kann (Paschal *et al.*, 1989; Shpetner und Vallee, 1989). Unabhängig davon wurde Dynamin unter dem Namen Dephosphin als Substrat für die Protein Kinase C identifiziert (Robinson, 1991). Untersuchungen mit gereinigtem Dynamin zeigten dann, daß es Mikrotubuli nicht miteinander verbrückt, sondern spiralförmig umwickelt (Maeda *et al.*, 1992). Zudem konnte GTP als Substrat für Dynamin identifiziert werden (Maeda *et al.*, 1992). Die ursprünglich beschriebene ATP-abhängige Motoraktivität wurde nachträglich mit Verunreinigungen erklärt (Vallee, 1992).

Erste Hinweise auf die Funktion wurden erhalten, als Dynamin als Homolog zum *shibire* Protein aus der Taufliege *D. melanogaster* identifiziert wurde (Chen *et al.*, 1991; van der Bliek und Meyerowitz, 1991). Im *shibire* Protein (*shibire*, japanisch: Lähmung) führt die Punktmutation G273D (ts1) oder G148S (ts2) zur vollständigen, aber reversiblen Lähmung der Fliege bei der unerlaubten Temperatur (Grigliatti *et al.*, 1973). Elektronenmikroskopische Analysen der neuromuskulären Synapsen zeigten eine Verarmung der Synapsen an Neurotransmitter-gefüllten Vesikeln. Statt dessen akkumulieren an der Synapsenmembran Vertiefungen (*membrane invaginations*) und Clathrin-umhüllte Einstülpungen (*clathrin coated pits*), was einen Defekt im Abschnürungsprozeß der Vesikel nahe legt (König und Ikeda, 1989). Es wurde vermutet, daß die am Hals der Membranknospe sichtbaren Proteinringe oligomeres *shibire* ist (Abb. 1.7a-b). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde für das *shibire* Protein eine aktive Rolle bei der Vesikelabschnürung vorgeschlagen (König und Ikeda, 1989).

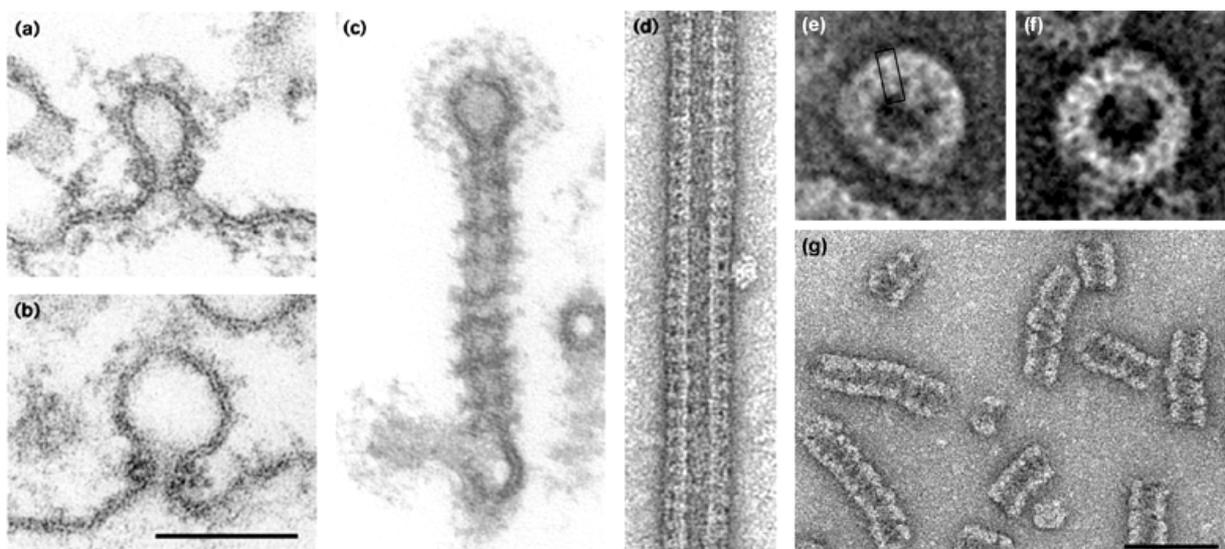


Abb. 1.7: Elektronenmikroskopische Hinweise auf die Funktion von Dynamin in der Vesikelabschnürung. a-b) Synapsenmembran von *D. melanogaster*, die eine Mutation im *shibire* Protein besitzen. Am Hals der naszierenden Vesikel sind elektronendichte Ringe zu sehen. c) Dynamin 1 Spirale um ein cytosolisches Synaptosom nach Zugabe von GTP γ S. d) Nukleotidfreies Dynamin 1 assembliert *in vitro* spiralförmig um Lipidvesikel. e-g) Nukleotidfreies Dynamin 1 assembliert *in vitro* bei geringer Ionenstärke zu Ringen und Stapeln von Ringen. Maßstab in (b): 100 nm für (a-d); Maßstab in (g): 50 nm für (e-f). (aus: Hinshaw, 1999).

Die Fähigkeit von Dynamin Lipidmembranen in helikalen Strukturen zu umwickeln, wurde ebenfalls mittels der Elektronenmikroskopie gezeigt. Bei Zugabe von GTP γ S, einem schwer hydrolysierbarem GTP-Analog, ins Cytosol von Nervenzellen wurden Proteinhelices beobachtet, die Lipidmembranen umwickeln und diese zu langen, tubulären Strukturen formen (Abb. 1.7c; Carter *et al.*, 1993; Takei *et al.*, 1995). Die Proteinspiralen konnten mit Antikörpern als Dynamin-haltig identifiziert werden (Takei *et al.*, 1995). *In vitro* assembliert Dynamin zu Ringen und möglicherweise helicalen Strukturen, die ähnliche Durchmesser wie die Proteinspiralen um Lipidmembranen besitzen (Abb. 1.7e-g; Hinshaw und Schmid, 1995). Die Assemblierung wird begünstigt durch niedrige Ionenstärke, stabile GTP-Analoga oder GDP in Kombination mit γ -Phosphat-Analoga wie Aluminium- oder Beriliumfluorid sowie durch negativ geladene Lipidmembranen (Hinshaw und Schmid, 1995; Takei *et al.*, 1995, 1998, 1999; Carr und Hinshaw, 1997; Sweitzer und Hinshaw, 1998; Stowell *et al.*, 1999).

1.3.1 Hinweise auf eine Funktion als molekularer Motor

Der direkte Nachweis, daß Dynamin in der Lage ist, Membranen zu formen und zu zerschneiden wurde *in vitro* erbracht. Reines Dynamin bindet auch in Abwesenheit von Nukleotiden an negativ geladene Lipidvesikel und formt diese durch Umwickeln zu tubulären Strukturen (Abb. 1.7d; Sweitzer und Hinshaw, 1998). Bei Zugabe von GTP, nicht aber stabilen GTP-Analoga, werden diese Lipidrohren zu Vesikel zerkleinert. Die wenigen Spiralen, die nach GTP-Zugabe verblieben, wiesen einen kleineren Durchmesser auf als die nukleotidfreien Spiralen, daher wurde vorgeschlagen, daß eine Kontraktion der Spirale zur Vesikulierung führt (Sweitzer und Hinshaw, 1998). Andere Experimente mit vorgeformten, starren Lipidrohren aus Galactoceramiden und stark negativ geladenen Phospholipiden zeigten, daß die Dynaminspirale sich bei Hydrolyse streckt (Stowell *et al.*, 1999). Beide Modelle weisen Dynamin als kraftgenerierendes Protein eine aktive Rolle bei der Vesikelabschnürung zu. Damit wäre die GTPase Dynamin kein molekularer Schalter wie die übrigen GTPasen, sondern tatsächlich ein molekularer Motor, wie die ATPasen Myosin, Kinesin und Dynein (Yang und Cerione, 1999; Sever *et al.*, 2000b).

1.3.2 Hinweise auf eine Funktion als molekularer Schalter

Aus Endocytoseexperimenten mit punktmutiertem Dynamin wurde alternativ eine Funktion als molekularer Schalter postuliert. Transformation mit Dynamin, das einen Defekt in der assemblierungs-stimulierten GTPase Aktivität besitzt, induzierte keine Verminderung, sondern vielmehr eine Beschleunigung der Endocytose (Sever *et al.*, 1999). Dabei wurde die Bildung von eingeschnürten Clathrin-umhüllten Einstülpungen, nicht die Abschnürung selbst beschleunigt (Sever *et al.*, 2000a). Diese Ergebnisse wurden so interpretiert, daß Dynamin in dem GTP-Zustand Effektorproteine aktiviert, die dann aktiv die Membranabschnürung durchführen (Sever *et al.*, 1999; 2000a). Allerdings konnte die selektive Bindung von GTP-gebundenem Dynamin bislang nur für Dynamin selbst gezeigt werden (Carr and Hinshaw, 1997; Smirnova *et al.*, 1999). Für alle anderen bislang indentifizierten Interaktionspartner konnte keine Nukleotidselektivität gezeigt werden. Diese Interaktionspartner binden über ihre SH3-Domäne an die C-terminale PRD von Dynamin 1.

Die Frage, ob Dynamin als kraftgenerierender molekularer Motor oder als regulierender molekularer Schalter fungiert, ist bislang nicht beantwortet. Die drei alternativen Mechanismen, wie Dynamin an der Abschnürung von Vesikeln partizipieren könnte, sind in Abbildung 1.8 dargestellt.

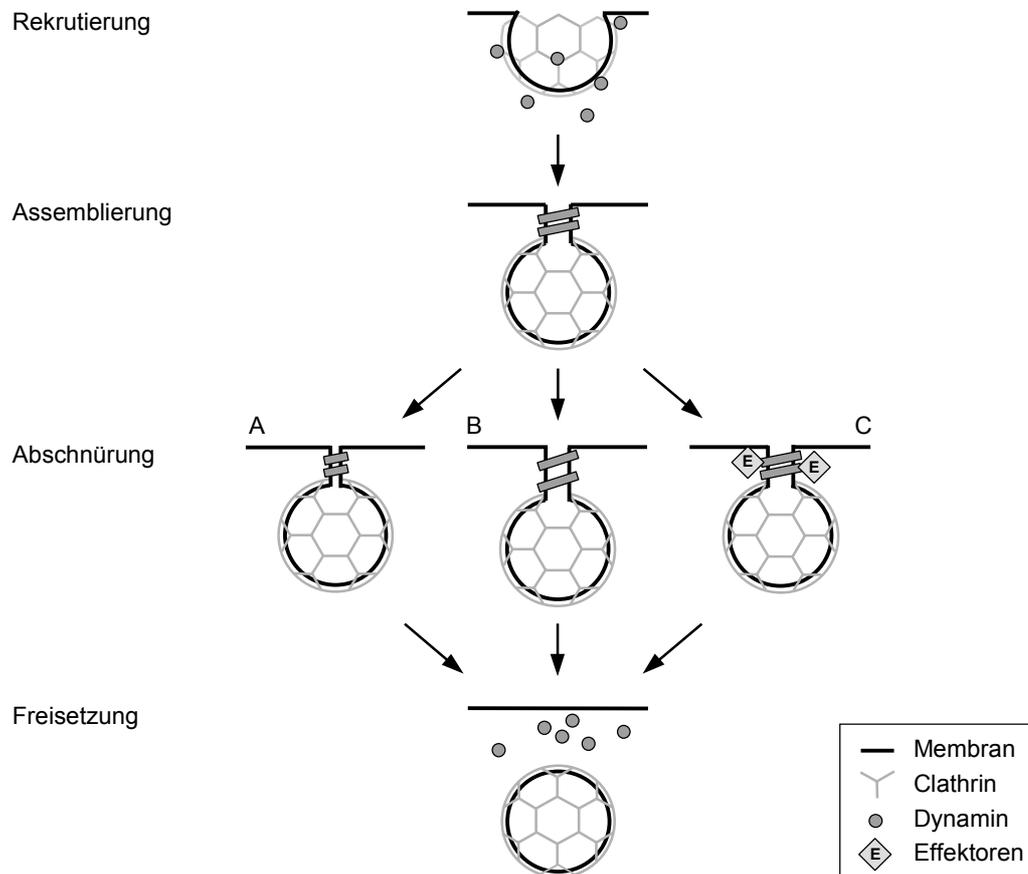


Abb. 1.8: Mechanistische Modelle zur Funktion von Dynamin. Dynamin bindet an Clathrin-umhüllte Vertiefungen (Rekrutierung). Es sammelt sich am Hals des sich einschnürenden Vesikels, und lagert sich zu Ringen oder einer Helix zusammen (Assemblierung). Die Abschnürung des Vesikels erfolgt entweder über eine Verengung der Ringe/Helix (A), durch eine Streckung der Helix (B) oder durch die Bindung von Effektormolekülen, welche die Membran destabilisieren (C). Nach der Abschnürung des Vesikels zerfallen die Ringe/Helix wieder und Dynamin steht zur Endocytose eines weiteren Vesikels zur Verfügung (Freisetzung). (verändert nach Sever *et al.*, 2000b)

1.3.3 Dynamin wechselwirkt mit sich selbst

Die in der Elektronenmikroskopie beobachtete Assemblierung zu Ringen und Spiralen erfordert eine starke Wechselwirkung der Dynamin Monomere untereinander. Diese Wechselwirkung wurde *in vivo* mittels des Zwei-Hybridsystems in Hefe und durch Coimmunopräzipitation gezeigt, sowie *in vitro* mittels Gelfiltration, analytischer Ultrazentrifugation und kovalenter Vernetzung (*cross-link*) nachgewiesen (Tuma und Collins, 1995; Muhlberg *et al.*, 1997; Smirnova *et al.*, 1999; Okamoto *et al.*, 1999; Binns *et al.*, 1999). Hierbei scheint die C-terminale GED als zentrale Assemblierungsdomäne zu funktionieren, da sie sowohl mit der GTPase-Domäne, der Mitteldomäne als auch mit einer weiteren GED interagiert (Shin *et al.*, 1999; Smirnova *et al.*, 1999; Okamoto *et al.*, 1999). Die intermolekulare Interaktion zwischen zwei GED impliziert die Dimerisierung von Dynamin, die in *cross-link*

Experimenten bestätigt werden konnte (Tuma und Collins, 1995). Die Ergebnisse aus der analytischen Ultrazentrifugation legen ein Gleichgewicht zwischen Monomer, Dimer und Tetramer nahe (Muhlberg *et al.*, 1997; Binns *et al.*, 1999; Okamoto *et al.*, 1999). Möglicherweise erfolgt die Oligomerisierung über die als vollständig helikal vorhergesagte GED in Form eines Helixbündels (Smirnova *et al.*, 1999; Okamoto *et al.*, 1999). Derlei Helixbündel aus vier α -Helices sind z. B. für die SNARE-Komplexe, die bei der Vesikelfusion wirken, strukturell bekannt (Sutton *et al.*, 1998). Auch für die Mx-Proteine konnte gezeigt werden, daß der C-Terminus auf die N-terminale GTPase-Domäne bindet und daß diese Interaktion für die Oligomerisierung des Proteins notwendig ist (Di Paolo *et al.*, 1999).

Die Assemblierung von oligomerem Dynamin zu Ringen und Stapeln erhöht die GTPase-Aktivität um 2-5fach (Tuma und Collins, 1994; Warnock *et al.*, 1996, 1997). Die assemblierungsabhängige Stimulierung der GTPase Aktivität kann *in vitro* durch geeignete Oberflächen wie Mikrotubuli oder negativ geladene Membranen induziert werden (Shpetner und Vallee, 1992; Maeda *et al.*, 1992; Tuma *et al.*, 1993; Lin und Gilman, 1996; Lin *et al.*, 1997; Barylko *et al.*, 1998 Binns *et al.*, 1999). Auch Proteine mit zwei SH3-Domänen führen zur Stimulation der GTPase (Barylko *et al.*, 1998) oder Antikörper gegen die PRD, nicht aber die entsprechenden monovalenten F_{ab}-Fragmente (Warnock *et al.*, 1996). Die kooperative GTPase-Aktivität läßt vermuten, daß Dynamin eine intermolekular wirkende GAP-Domäne enthält. Tatsächlich führt die Interaktion der GED mit der GTPase-Domäne zu einer Erhöhung der basalen GTPase-Aktivität (Muhlberg *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1997; Sever *et al.*, 1999). GAPs stimulierten die GTP-Hydrolyse durch Stabilisierung des aktiven Zentrums der GTPase und bringen manchmal eine Arginin-Seitenkette („Arginin-Finger“) in das aktive Zentrum ein, die den Übergangszustand der Hydrolyse stabilisiert (Scheffzek *et al.*, 1998). Wie die assemblierungsabhängige Stimulierung der GTPase Aktivität bei den Dynaminen erfolgt ist bislang nicht geklärt.

Mit Ausnahme der isolierten PHD ist die atomare Struktur von Dynamin bislang nicht bekannt. Möglicherweise enthält das entfernt verwandte humane Guanylatbindende Protein hGBP1 (s. Abb. 1.2e) die hochkonservierten Strukturelemente von Dynaminen (Danino und Hinshaw, 2001): eine globuläre GTPase-Domäne, eine gestreckte Mitteldomäne aus gegenläufigen Helices (*coiled-coil*) und eine einzelne, lange C-terminale Helix, die an die Mitteldomäne und die GTPase-Domäne zurückbindet (Prakash *et al.*, 2000). Die C-terminale Helix entspräche der GED und könnte die Oligomerisierung zu Dimeren und Tetrameren vermitteln. Die PH-Domäne von Dynamin würde in diesem Modell zwischen Mitteldomäne und C-terminaler Helix an einem Ende des Moleküls liegen, die PRD hinter der GED am anderen Ende des Moleküls.

1.3.4 Weitere Interaktionspartner von Dynamin

Dynamin bindet an negativ geladene Phospholipide, vor allem phosphorylierte Phosphatidylinositole (PtdIns) und Phosphatidylsäure (Tuma *et al.*, 1993; Takei *et al.*, 1995; Burger *et al.*, 2000). Die PHD bindet spezifisch PtdIns(4,5)P₂ (Zheng *et al.*, 1996; Salim *et al.*, 1996; Klein *et al.*, 1998; Barylko *et al.*, 1998) und ist essentiell für die Endocytose (Vallis *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999), nicht aber für die

Oligomerisierung (Muhlberg *et al.*, 1997). Über die C-terminale PRD bindet Dynamin an SH3-Domänen, wie z.B. an die von Synaptojanin, Amphiphysin, Endophilin1, Phospholipase C γ , Grb2 und MLK2 (Herskovits *et al.*, 1993a; Gout *et al.*, 1993; Seedorf *et al.*, 1994; McPherson *et al.*, 1996; Shpetner *et al.*, 1996; David *et al.*, 1996; Ringstad *et al.*, 1997; Rasmussen *et al.*, 1998). Diese Bindung rekrutiert Dynamin aus dem Cytosol an die Clathrin-umhüllten Einstülpungen der Membran und ermöglicht die Assemblierung und nachfolgende Endocytose (Shupliakov *et al.*, 1997; Wigge *et al.*, 1997; Scaife *et al.*, 1998). Die Dynamin-bindenden Proteine tragen teilweise selbst zum Prozeß der Endocytose bei. So bildet Amphiphysin mit und ohne Dynamin helikale Strukturen um Lipidmembranen (Takei *et al.*, 1999). Die Lysophosphatidat-acyl-transferasen Endophilin 1 und BARS übertragen langkettige Acyl-CoA-Reste auf Lysophosphatidat und können durch die Änderung der spontane Krümmung der cytosolischen Seite der Membran zur Abschnürung beitragen (Schmidt *et al.*, 1999; Weigert *et al.*, 1999). Endophilin1 ist in der Lage Vesikel zu generieren und ist für die Endocytose essentiell (Ringstad *et al.*, 1997, 1999). Synaptojanin ist in der Lage den bevorzugten Bindungspartner der PH-Domäne von Dynamin PtdIns(4,5)P₂ zu PtdIns(4)P zu spalten und trägt so möglicherweise zur Regulation des Bindungs- und Assemblierungsverhaltens von Dynamin bei.

1.4 Dynamin-verwandte Proteine

Anhand der Homologie innerhalb der GTPase-Domäne wurde eine Vielzahl von Dynamin-verwandten Proteinen identifiziert. Die Einteilung in „echte Dynamine“, die eine PH-Domäne und eine PRD besitzen, und „Dynamin-verwandte Proteine“, die keine PH Domäne oder PRD besitzen, kann dabei kaum mehr aufrecht erhalten werden. Es wurden Dynamin-verwandte Proteine identifiziert, die eine PHD, aber keine PRD enthalten (Mikami *et al.*, 2000) und die weder PHD noch GED noch PRD besitzen (Deletrre *et al.*, 2000; Alexander *et al.*, 2000).

Alternativ wird versucht, die Proteine gemäß ihrer Funktion zu klassifizieren (van der Blik, 1999). Nach der funktionellen Unterscheidung gibt es

- a) Dynamine, die am Vesikeltransport beteiligt sind (z.B. Dynamin 1-3 aus *H. sapiens*, Dynamin 1-3 aus *D. melanogaster*, Dynamin 1 aus *C. elegans*, sowie Vps1p aus *S. cerevisiae*)
- b) Dynamine, die an der Gestaltung von Zellorganellen wie Mitochondrien und Chloroplasten beteiligt sind (z.B. Drp1/Dlp1/DVLP1/Dymple aus *H. sapiens*, Dnm1p aus *S. cerevisiae*, Mgm1p aus *S. pombe* sowie ADL 1-6 aus *A. thaliana*)
- c) die Interferon-induzierten großen GTP-bindenden Proteine (z.B. die Mx Proteine aus *H. sapiens*)

Die ebenfalls Interferon-induzierten p67/p65 Guanylat-bindenden Proteine (GBP) und die p47 Guanylat-bindenden Proteine haben nur eine geringe Homologie in ihrer Aminosäuresequenz zu den Mx-Proteinen. Sie besitzen unterschiedliche Insertionen innerhalb der GTPase-Domäne, kein N/TKxD-Motiv, sondern ein RD-Motiv und keine GED (Prakasch *et al.*, 2000). Ihre ähnliche biologische Funktion als Resistenzproteine gegen Pathogene und ihre ähnliche biochemischen Eigenschaften lassen aber einen gemeinsamen evolutionären Ursprung mit den Mx-Proteinen vermuten.

1.5. Dynamin A aus *Dictyostelium discoideum*

1.5.1 *Dictyostelium discoideum*

Die Sozialamöbe *Dictyostelium discoideum* ist ein niederer Eukaryot, der aufgrund seiner hohen Motilität in der Zellbiologie als Modelorganismus verwendet wird. Die Taxonomie der zellulären Sozialamöben (*Dictyosteliidia*, lateinisch: longitudinal geteilte Stele) sowie der plasmodialen Schleimpilze (*Myxogastriida*, lateinisch: Schleimmagen) ist bislang nicht eindeutig geklärt, da die Zuordnung nach rRNA- und Proteinhomologien teilweise widersprüchlich ist (Baldauf *et al.*, 2000). Zumeist werden sie als monophyletische Gruppe der *Mycetozoa* (*Mycetozoa*, lateinisch: Pilztiere) in der "Kronen-Gruppe" der *Eukaryota* geführt (Baldauf und Doolittle, 1997; Baldauf *et al.*, 2000). Eine zur Zeit weitgehend akzeptierte Einteilung lautet: Superreich *Eukaryota*, Subreich *Neozoa*, Infrareich *Sarcomastigota*, Stamm *Ameoboza*, Substamm *Conosa*, Infrastamm *Mycetozoa*, Superklasse *Dictyostelida* (Cavalier-Smith, 1998).

Die *Mycetozoa* umfassen drei Gruppen von morphologisch diversen Organismen, die in der Literatur als *slime molds* (*slime mold*, englisch: Schleimpilz) bezeichnet werden: die Dictyosteliden, die Myxogastriden und die Protosteliden (Olive und Stoianovitch, 1975; Baldauf, 1999). Die Dictyosteliden sind strikt amöboid, aggregieren unter Hungerbedingungen zu großen, zellulären Aggregaten, die sich wie ein multizellulärer Organismus verhalten (Pseudoplasmodien, Abb. 1.9). Dagegen alternieren die Myxogastriden zwischen amöboiden und flagelaten Formen, die teilweise zu großen, vielkernigen Plasmodien verschmelzen. Die Protosteliden sind morphologisch noch diverser. Die Acrasidae, zu denen die Dictyosteliden zugeordnet waren, sind nun Mitglieder der Heterolobosea, einer Gruppe der Protisten (Roger *et al.*, 1996; Keeling *et al.*, 1998). Die Bezeichnung zellulärer Schleimpilz ist für *D. discoideum* nicht zutreffend, da die *Mycetozoa* keine Pilze sind und keinen Schleim sezernieren.

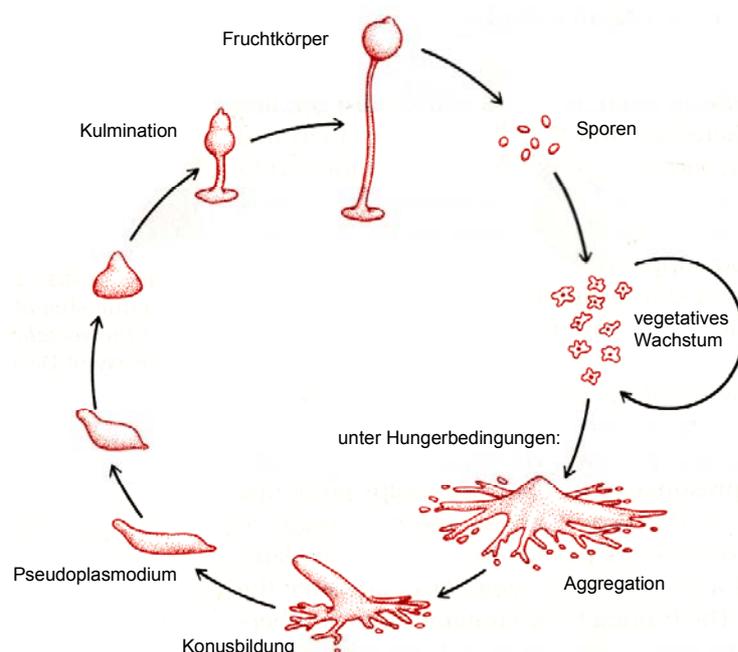


Abb. 1.9: Entwicklungszyklus von *Dictyostelium discoideum*. Die Sozialamöben leben strikt einzellig und ernähren sich von Bakterien und Hefen. Unter Hungerbedingungen aggregieren etwa 10^6 Zellen zu einem beweglichen Pseudoplasmodium, das sich zu einem Fruchtkörpern entwickelt. Bei günstigen Bedingungen werden die Sporen aus dem Fruchtkörpern freigesetzt, aus denen wieder amöboide Zellen entstehen (verändert nach Alberts *et al.*, 1989).

1.5.2 Dynamin A

In *D. discoideum* wurden bislang zwei Dynamin-verwandte Proteine, Dynamin A und Dynamin B, identifiziert (Wienke *et al.*, 1999; Nöthe und Manstein, 1999). Sie enthalten neben der GTPase-Domäne, der Mitteldomäne und der GED zusätzlich eine Domäne von etwa 250 Aminosäuren, die reich an Glutamin, Asparagin und Serin ist (Abb 1.10). Glutamin, Asparagin und Serin bilden die mit Abstand häufigsten Aminosäure-Wiederholungen und werden vor allem in Proteinen von *D. discoideum* gefunden, ihre Struktur und Funktion ist aber nicht bekannt (Subirana und Palau, 1999; Katti *et al.*, 2000). Dynamin B weist zudem eine N-terminale mitochondriale Lokalisierungssequenz auf, die in der Mitochondrienmatrix proteolytisch entfernt wird (Nöthe und Manstein, 1999).

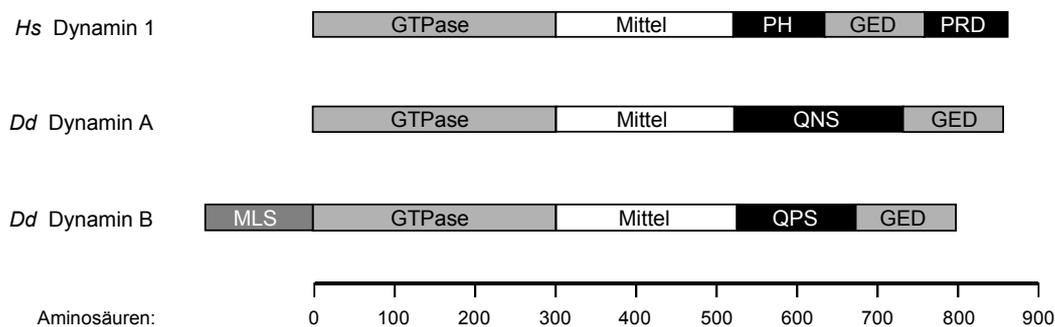


Abb. 1.10: Domänenstruktur von Dynamin A und Dynamin B aus *D. discoideum*. Beide Proteine besitzen wie humanes Dynamin 1 eine konservierte GTPase-, Mittel- und GTPase-Effektor-Domäne (GED). Die mit QNS bzw. QPS gekennzeichnete Domäne ist reich an Glutamin (Q), Asparagin (N) bzw. Prolin (P) und Serin (S), ihre Funktion ist nicht bekannt. Dynamin B besitzt zudem eine N-terminale mitochondriale Lokalisierungssequenz (MLS), die in der Mitochondrienmatrix entfernt wird (Hs: *Homo sapiens*, Dd: *Dictyostelium discoideum*).

D. discoideum Zellen, in denen das *dymA* Gen deletiert wurde, zeigen einen sehr komplexen Phänotyp: Die Zellen zeigen eine verringerte Pinocytose, elongierte Mitochondrien und einen Defekt in der Cytokinese, der zur Ausbildung von langen cytoplasmatischen Brücken am Ende der Zellteilung führt (Wienke *et al.*, 1999). Zerbricht die cytoplasmatische Brücke nicht, so fusionieren die beiden Zellen und bilden eine große, zweikernige Zelle. Durch mehrfach nicht erfolgte Zellteilung entstehen sehr große, vielkernige Zellen. Die Bildung von Fruchtkörpern ist bei *dymA*⁻ Zellen weitestgehend normal, allerdings befindet sich der Fruchtkörper zumeist nur auf halber Höhe des *stalks* (*stalk*, engl.: Stiel). Der komplexe Phänotyp von *dymA*⁻ sowie dessen Aufhebung nach Rekonstitution der Zellen mit dem *dymA* Gen weist auf eine pleiotrope Funktion von Dynamin A hin.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit zellbiologischen, biochemischen und biophysikalischen Methoden die Struktur und Funktion von Dynamin A untersucht werden. Der Einfluß von GTP-Bindung, GTP-Hydrolyse und Produktfreisetzung auf den Assemblierungszustand von Dynamin A sollte untersucht werden. Die *in vivo* Charakterisierung sollte Einblicke in seine Funktion erlauben, die *in vitro* Charakterisierung sollte Struktur-Funktionsbeziehungen in Dynamin A aufdecken und dazu beitragen, die Frage zu beantworten, ob Dynamine molekulare Motoren sind oder als molekulare Schalter funktionieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Puffer

EM (<i>electron microscopy</i>) - Puffer:	50	mM	Tris
	150	mM	NaCl
	1	mM	MgCl
LB ₅₀ (<i>lysis buffer</i>) - Puffer:	50	mM	Tris
	50	mM	NaCl (als Index angegeben)
	5	mM	DTT
	5	mM	Benzamidin
	2.5	mM	EDTA
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>) - Puffer:	80	mM	Na ₂ HPO ₄
	20	mM	NaH ₂ PO ₄
	100	mM	NaCl
TE-Puffer:	10	mM	Tris/HCl, pH 8.0
	1	mM	EDTA, pH 8.0
TAE-Puffer:	40	mM	Tris
	20	mM	Essigsäure
	2	mM	EDTA
TBS (<i>tris buffered saline</i>) - Puffer:	20	mM	Tris/HCl, pH 7.6
	137	mM	NaCl
TBST-Puffer:	20	mM	Tris/HCl, pH 7.6
	137	mM	NaCl
	0,05	%	Tween-20

2.1.2 Primer

Die Primer sind im codierenden Leserahmen geschrieben, korrespondierende Aminosäuren darunter. Schnittstellen für Endonukleasen sind unterstrichen, Codonsubstitutionen sind fett gedruckt, die Streptavidin-Sequenz ist kursiv geschrieben.

-10c (Sequenzierprimer für pDXA, stromaufwärts der MCS, kodierender Strang):

AATAAAAATCAGATCCAAGCT

+1nc (Sequenzierprimer für pDXA, stromabwärts der MCS, nicht-kodierender Strang):

TAAGTTCAAATGG

DW54 (*Xba*I – 3'Ende *dymA372*, nicht-codierender Strang):

ACT TCT AGA TTA ACC ACC AAA TTG TGG ATG TCT CCA ACC GTA GAT CTC ... (s. DW54)
 stop G G F Q P H R W G Y₃₇₂ I₃₇₁ ...

BK01 (D210N, codierender Strang):

GGT GTC ATC AAA TTG AAT TTA ATG GAT AAA GGT ACC GAC GC

BK03 (R828A, codierender Strang):

G GAA TCA CCA CAA ATC TCT AGT AAG GCT AAA TCT TGT AAA GCT ATG ATC G

BK05 (K786A, codierender Strang):

G AAT GTT AAG GAT TCA GTT CCA GCA TCA ATT ATG CAT TTC TTG GTC

BK07 (R60A, codierender Strang):

CCA AGA GGT TCT GGT ATT GTA ACA GCA AGA CCT TTG ATT TTA C

BK09 (P62S, codierender Strang):

GGT TCT GGT ATT GTA ACA AGA AGA TCA TTG ATT TTA CAA TTA ACT C

BK11 (P62G, codierender Strang):

GGT TCT GGT ATT GTA ACA AGA AGA GGT TTG ATT TTA CAA TTA ACT C

2.1.3 Plasmide

- pDXA-3H Actin15-kontrollierter Expressionsvektor für *D. discoideum* für die Synthese von Proteinen mit N-terminalem Heptahistidinpeptid (Manstein *et al.*, 1995).
- pDD Actin15-kontrollierter Expressionsvektor für *D. discoideum* für die Synthese von Proteinen mit N-terminaler Gluthation-S-Transferase (GST)-Fusion, erhalten durch Insertion der GST-codierenden Sequenz aus pGEX-2T (Pharmacia) in pDXA-HC.
- pREP Vektor für das Ddp2 *ORF*-Produkt, für die extrachromosomale Replikation von Vektoren in *D. discoideum* AX2-Zellen (Manstein *et al.*, 1995).
- pQE30 IPTG-induzierbarer, bakterieller Expressionsvektor für die Synthese von Proteine mit N-terminalem Hexahistidinpeptid (Qiagen).

2.1.4 Größenstandards

DNA-Standard:	1 kb Leiter	Gibco BRL
Protein-Standard:	Benchtop	Gibco BRL
	Benchtop Prestained	Gibco BRL

2.1.5 Protease-Inhibitoren

N-CBZ-PA (N-Carbobenzyloxy-Prolin-Alanin)	inhibiert Serinproteasen
ZPCK (N-Carbobenzyloxy-Phenylalanin-chloromethyl-keton)	inhibiert Serinproteasen
TPCK (Tosyl-Phenylalanin-chloromethyl-keton)	inhibiert Serinproteasen
TAME (Tosyl-Arginin-methylester)	inhibiert Serinproteasen
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	inhibiert Serinproteasen
Pepstatin (Isovaleryl-Val-Val-Sta-Ala-Sta)	inhibiert saure Proteasen
Leupeptin (Acetyl-Leu-Leu-Arg-al) (alle Sigma)	inhibiert Serin- und Cysteinproteasen

2.1.6 Medien für die Kultivierung von *E. coli* oder *D. discoideum*

<i>E. coli</i> :	LB-Medium: (pH 7.5)	10	g/l	Casein
		10	g/l	NaCl
		5	g/l	Hefeextrakt
		5	mmol	NaOH
		ad 1l		Wasser
	LB-Agar:	15	g/l	Agar in LB-Medium
<i>D. discoideum</i> :	HL5c-Medium: (pH 6.6)	10	g/l	Protease-Pepton (Oxoid)
		5	g/l	Bacto Hefeextrakt (Oxoid)
		10	g/l	Glucose
		1.2	g/l	KH ₂ PO ₄ (wasserfrei)
		0.4	g/l	Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)
	SM-AGAR (pH 6.4)	10	g/l	Glucose
		10	g/l	Bacto Pepton (Difco)
		10	g/l	Bacto Hefeextrakt (Difco)
		1	g/l	Mg ₂ SO ₄ 7 H ₂ O
		1.9	g/l	KH ₂ PO ₄ (wasserfrei)
		1	g/l	K ₂ HPO ₄ (wasserfrei)
		20	g/l	Bacto Agar (Difco)
	MES-Puffer (pH 6.8)	20	mM	MES pH 6,8
		0.2	mM	CaCl ₂
		2.0	mM	MgCl ₂
MES-Agar	20	g/l	Agar in MES-Puffer	
EP-Puffer (pH 6.3)	10	mM	Natriumphosphat, pH 6.3	
	50	mM	Sucrose	

2.1.7 Antibiotika

β -Lactame wie Penicillin und Ampicillin verhindern die Vernetzung der Peptidglycane der bakteriellen Zellwand; Resistenz wird durch β -Lactamasen vermittelt. Aminoglycoside wie Kanamycin, Streptomycin und G418 (Gentamycin-Derivat Geneticin) binden an die Ribosomen und inhibieren die Translation; Resistenz vermitteln Phosphotransferasen. Peptidynucleoside wie Blastocidin S inhibieren ebenfalls den Aufbau des proteingebundenen Ribosoms; Resistenz wird durch Deaminasen oder Acetyltransferasen vermittelt.

Ampicilin	in LB-Medium: 75 $\mu\text{g/ml}$
Kanamycin	in LB-Medium: 25 $\mu\text{g/ml}$
Penicilin/Streptomycin	in HL5c Medium: 10 U/ml
G418	in HL5c Medium: 10 $\mu\text{g/ml}$
Blasticidin S	in HL5c Medium: 4 $\mu\text{g/ml}$

2.1.8 Antikörper

2.1.8a Erstantikörper (alle IgG):

Anti-Dynamin A (PAD-1, Epitop: Aminosäuren 51-60), aus Kaninchen (Wienke *et al.*, 1999)
 Anti-Dynamin B, aus Kaninchen (Nöthe und Mannstein, 1999)
 Anti-vacuoläre Protonen-ATPase, aus Maus (Fok *et al.*, 1993)
 Anti-Vacuolin (221-1-1), aus Maus (Rauchenberger *et al.*, 1997)
 Anti-GST (R26), aus Kaninchen
 Anti-Pentahistinpeptid, aus Maus (Qiagen)

2.1.8b Zweitantikörper (alle IgG):

Anti-Kaninchen-IgG, Meerrettich-Peroxidase-konjugiert, aus Ziege (Bio-Rad)
 Anti-Kaninchen-IgG, Cy3-konjugiert, aus Ziege (Molecular Probes)
 Anti-Maus-IgG, Meerrettich-Peroxidase-konjugiert, aus Ziege (Bio-Rad)
 Anti-Maus-IgG, Cy3-konjugiert, aus Ziege (Molecular Probes)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

200 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) wurden mit 4 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* XL1 blue angeimpft, bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0.3-0.4$ bei 180 rpm und 37 °C geschüttelt und die Kultur dann mit den nachfolgend benötigten Zentrifugenbechern 15 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden 10 min mit 3000 g bei 4 °C sedimentiert, in 60 ml Puffer 1 resuspendiert und weitere 15 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 4 ml Puffer 2 resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden in 100 μl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Puffer 1:	30	ml	1M KOAc, pH 7.5
	12	g/l	RbCl
	1,5	g/l	CaCl ₂ ·2 H ₂ O
	50	mM	MnCl ₂ ·4 H ₂ O
	150	g/l	Glycerol
ad 1l Wasser, mit 0.2 M Essigsäure auf pH 5.8 einstellen			
Puffer 2:	20	ml	0.5 M MOPS/NaOH, pH 6.8
	1.2	g/l	RbCl
	11	g/l	CaCl ₂ ·2 H ₂ O
	150	g/l	Glycerol
	ad 1l Wasser		

2.2.2 Transformation und Selektion von *E. coli*

Zu 100 µl kompetenten *E. coli* wurden die 10 µl des Ligationsansatzes oder 1-2 µl der Plasmidlösung aus der analytischen DNA-Reinigung gegeben und die Suspension für 30 min auf Eis gestellt. Zur Verbesserung der Aufnahme rate wurden die Zellen für 2 min bei 42 °C inkubiert und nach Zugabe von 1 ml LB-Medium für 30 min bei 37 °C und 180 rpm kultiviert, um den Aufbau der Resistenz zu ermöglichen. Die Zellen wurden sedimentiert, in 150 µl LB-Medium resuspendiert und auf einer LB-Agar Platte mit den gewünschten Selektionsantibiotika ausgestrichen. Die Kulturen wurden für mindestens 12 h bei 37 °C inkubiert (oder über das Wochenende bei Raumtemperatur) bis Kolonien sichtbar wurden.

2.2.3 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*

Zur Herstellung von *E. coli*-Übernachtskulturen wurden 3 ml LB-Medium (ggf. mit 75 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Kanamycin) mit einer Einzelkolonie einer Plattenkultur angeimpft und etwa 12 h bei 180 upm und 37 °C geschüttelt. Zum Anlegen größerer Flüssigkulturen wurden 250 ml LB-Medium mit 100 µl einer Flüssigkultur angeimpft und wie beschrieben geschüttelt. Die Ermittlung der Zelldichten beim Bakterienwachstum erfolgte durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 600 nm in Plastikvönetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Für die Konservierung der *E. coli*-Stämme wurden 1,4 ml einer Übernachtskultur mit 0,7 ml Glycerol gemischt und bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Isolierung von Nukleinsäuren

Die analytische Präparation von Plasmid-DNA aus 1 ml *E. coli* Kultur erfolgte mit dem "Plasmid-Mini-Kit" von Qiagen nach den Angaben des Herstellers. Die quantitative Präparation von Plasmid-DNA aus 100 ml *E.coli* Kultur erfolgte mit dem "Plasmid-Maxi-Kit" von Qiagen, nach den Angaben des Herstellers. Bei mehr als 100 ml *E. coli* Kultur wurden die Anionenaustauschersäulen überladen und nur sehr wenig der gewünschten DNA isoliert. Um die isolierte DNA besser aufnehmen zu

können, wurde abweichend vom Protokoll des Herstellers die mit Isopropanol gefällte DNA annähernd getrocknet, in 300 µl Wasser aufgenommen und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Dort wurde sie mit 700 µl Ethanol gefällt, getrocknet und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

Konzentration und Reinheit von nukleinsäurehaltigen Lösungen wurden durch Messung eines Absorptionsspektrums zwischen 220 und 300 nm in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm mit einem Beckmann DU-650 Spektralphotometer bestimmt. Für die Konzentrationsberechnung wurde die folgende Abschätzung verwendet: $OD_{260} 1.0 = 50 \mu\text{g/ml ds DNA} = 33 \mu\text{g/ml ss DNA}$.

2.2.5 Die Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die spezifische *in vitro* Amplifikation von DNA-Sequenzen ausgehend von kleinsten Mengen an DNA als Matrize (Saiki *et al.*, 1985; Mullis und Faloona, 1987). Durch die temperaturkontrollierte Denaturierung der Matrizen-DNA, Hybridisierung von zwei spezifischen, gegenläufigen Oligonukleotiden (*primer*, englisch: Starter) und anschließender Polymerisationsreaktion wird durch Wiederholung die durch die Primer begrenzte DNA exponentiell amplifiziert. Bei 94 °C erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen Matrize in Einzelstränge, an die sich im zweiten Schritt die Primer spezifisch anlagern können (5 °C unter T_m). Ausgehend von den Primern erfolgt im dritten Schritt (68-72°C) die Polymerisation, die durch eine hitzestabile DNA-Polymerase katalysiert wird. Die Schmelztemperatur T_m der Mutagenese-Primer wurde nach folgender Formel (Stratagene) berechnet:

$$T_m (\text{°C}) = 59.9 + 0.41(\%GC) - 600/N \quad \text{und } N = \text{Anzahl der bp}$$

Mit der Formel $T_m (\text{°C}) = 2(A+T) + 4(G+C)$ werden kürzere Primer ohne Fehlbasenpaarung berechnet. Schmelztemperaturen von 50 - 60 °C erlauben eine ausreichende Spezifität und sollten zwischen den beiden Primern einer PCR um nicht mehr als 2 °C differieren. Primer mit terminalen Basen G oder C erleichtern die Polymerisationsreaktion. Durch intra- oder intermolekulare Wechselwirkung der Primer kann die effektive Konzentration an einzelsträngigen Primer stark vermindert sein. Die Bedingungen für die PCR wurden den Angaben des Herstellers der Polymerase entnommen. Für den Einsatz des Expand HiFidelity PCR System (Roche) wurde die PCR wie folgt durchgeführt:

10x Puffer, pH 8.3:			10 µl
Plasmid-DNA als Matrize:	10-100 ng	0,1-1 pmol	10 µl [2 ng/µl]
Primer (18-25 bp):	100-250 ng	100 pmol	10 µl [10 pmol/µl]
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs):		100 µM	10 µl [1 mM]
Wasser:			add 99.25 µl
Expand HiFi Polymerasen (<i>Taq und Pwu</i>):			0.75 µl

Für die einzelnen Schritte der PCR-Reaktion wurden die Temperaturen und Inkubationsdauern gemäß den Angaben des Hersteller der Polymerase gewählt.

1x	Denaturierung		92 °C	2:00 min
30x	Denaturierung		92°C	0:30 min
	Hybridisierung		$T_m-5^{\circ}\text{C}$	0:30 min
	Elongation	10x	72 °C	1:00 min / kbp
		5x	72 °C	1:30 min / kbp
		5x	72°C	2:00 min / kbp
		5x	72 °C	2:30 min / kbp
		5x	72 °C	3:00 min / kbp
1x	Elongation		72 °C	5:00 min / kbp

Die PCR-Produkte wurden auf Agarosegelen analysiert und mit dem "PCR-Purification"-Kit von Qiagen gereinigt.

2.2.6 TOPO TA-Cloning

Die Generierung von codierender DNA mittels PCR führt zumeist nicht zu ausreichend großen Mengen für die direkte Ligation in Expressionsvektoren für *D. discoideum*. Der TOPO TA-Cloning Kit (Invitrogen) erlaubt die einfache Subclonierung von PCR-Produkten zur Amplifikation in *E. coli*. Die PCR-Produkte besitzen bei Einsatz der *Taq*-Polymerase am 3'-Ende ein zusätzliches Adenin, das zur Subklonierung in den pCR[®]2.1-TOPO Vektor eingesetzt wird. Da der Vektor komplementäre 3'-Überhänge besitzt, ist für die Ligation keine vorherige Restriktion notwendig. Das PCR-Produkt wird in das *lacZ*-Gen von pCR[®]2.1-TOPO ligiert. Läßt man die transformierten *E.coli* anschließend in Gegenwart von X-Gal (Substratanalog der β -Galactosidase) und IPTG (induziert die Expression des *lacZ*-Gens) wachsen, werden erfolgreiche Ligationen durch weiße Bakterienkulturen angezeigt, während die Religationen des Vektors zu blauen Kolonien führen (durch β -Galactosidase gespaltenes X-Gal).

Die Subklonierung von PCR-Fragmenten erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die ligierten Vektoren wurden in *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert. Die mittels dieses Kits erhaltene Insert-DNA muß sehr sorgfältig gereinigt werden (langsame Auftrennung im Agarosegel, Spuren nicht überladen), da sonst Vektor-DNA mitgerissen wird.

2.2.7 Gezielte DNA-Hydrolyse

Die gezielte Hydrolyse von DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen, die spezifisch in palindromischen DNA-Sequenzen schneiden. Für analytische Restriktionen wurde 8 µl aus analytischen DNA-Reinigungen oder 1 µl aus präperativen DNA-Reinigungen eingesetzt. Für die präperative Restriktion wurden einige µg DNA eingesetzt, so daß mit einer abgeschätzten Ausbeute mit 50 % genügend DNA für mehrere Ligationen zur Verfügung stand. Die Reaktionsvolumen wurden so gewählt, daß die eingesetzten 5-10 U der Restriktionsendonukleasen mindestens zehnfach verdünnt wurden, um die Viskosität der Probe niedrig zu halten. Die Wahl des Puffers, der Inkubationstemperatur und -dauer erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Roche oder New England Biolabs). Ggf. wurde die DNA für weitere enzymatische Reaktionen unter anderen Pufferbedingungen mittels des PCR-Purification Kits (Qiagen) gereinigt. Die resultierenden Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.10) nach ihrer Größe getrennt und anhand ihres Laufverhaltens identifiziert.

2.2.8 5'-Dephosphorylierung von DNA

Die Entfernung der 5'-Phosphatgruppen wurde durchgeführt, um eine Religation des linearisierten Vektors ohne Integration des Inserts zu verhindern. Hierzu wurde alkalische Phosphatase aus Garnelen nach den Angaben des Hersteller (United States Biochemical) eingesetzt (für 2.5 µg eines 3.0 kb Plasmids (2.5 fmol 5'-Enden): 0.1 U für 5'-Überhänge oder 0.5 U für 3'-Überhänge). Anschließend wurde das Enzym durch 10minütige Hitzedenaturierung bei 65 °C deaktiviert und der Vektor direkt zur Ligation eingesetzt.

2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die enzymatische Rekombination von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der T4 DNA-Ligase (Roche) durchgeführt. In einem Reaktionsvolumen von 10 µl wurden 50 ng (bei schwierigen Ligationen bis zu 800 ng) dephosphorylierte Vektor-DNA und ein mindestens dreifacher molarer Überschuß der zu insertierenden DNA in Ligationspuffer mit 1 bis 5 U T4 DNA-Ligase versetzt. Die Inkubation erfolgte für 15 min im Ultraschallbad bei 16 °C, gefolgt von einer 30minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Von dem Ligationsansatz wurden 3 µl direkt in eine Transformation eingesetzt.

Ligationspuffer:	50	mM	Tris/HCl (pH 7.6)
	10	mM	MgCl ₂
	10	mM	DTT
	1	mM	ATP
	5	% (w/v)	PEG 8000
	100	µg/ml	BSA

2.2.10 Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren

Die Trennung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte in 1.0 %igen Flachbett-Agarosegelen in TAE-Puffer (Maniatis *et al.*, 1989). Die Proben wurden mit 1/6 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und bei 75 bis 100 V in Minigelen (5 x 8 cm) getrennt. Die DNA wurde durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Zur Abschätzung der Größe und Menge der DNA-Fragmente wurde eine Standard-DNA-Lösung mit Fragmenten bekannter Größe und Menge (Gibco) mitgeführt (s. 2.1.4).

DNA-Probenpuffer:	50	% (v/v) Glycerin
	0,2	% (w/v) SDS
	0,05	% (w/v) Bromphenolblau
	0,05	% (w/v) Xylencyanol
		in 1 x TAE-Puffer

2.2.11 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der größenabhängigen Trennung wurde die DNA aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels des "PCR Purification Kits" (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers zurückgewonnen.

Bei sehr UV-sensiblen Ligationen mußte die DNA ohne Einsatz von UV-Licht zurückgewonnen werden. Dafür wurde am Rand des Agarosegels eine analytische Spur zur Detektion der DNA mit UV-Licht angelegt, die zur Identifizierung des gewünschten Fragments diente. Oberhalb und unterhalb dieser Höhe wurden in der präparativen Spur zwei horizontale Schnitte gemacht, in diese DEAE-Papier eingefügt und für weitere 10 min Spannung angelegt, um die DNA auf das untere DEAE-Papier zu immobilisieren (das obere Papier verhindert die Kontamination mit größeren Fragmenten). Die DNA auf dem unteren Papier wurde je 15 Sekunden in Ethanol, TE-Puffer und wieder Ethanol gewaschen, zweimal in 60 µl 1.5 M LiCl in TE-Puffer bei 65 °C für 10 min eluiert und das Eluat mit 120 µl Wasser, 24 µl 3 M NaOAc, pH 5.2 und 600 µl Ethanol versetzt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde 15 min in der Tischzentrifuge bei 15.000 rpm zentrifugiert, die präzipitierte DNA mit 70 % Ethanol gewaschen und in maximal 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen nach ihrer Größe wurden entweder 10 oder 15 %ige diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet, die eine gute Auflösung in dem Molekulargewichtsbereich zwischen 130 und 50 kDa oder 70 und 20 kDa zeigen (Maniatis *et al.*,

1989). Die zu analysierenden Proben wurden mit 1/4 Probenvolumen 5x-Probenpuffer versetzt, zur vollständigen Denaturierung 1 min bei 95 °C inkubiert und mit konstantem Strom von 35 mA pro Gel (175 V) aufgetrennt. Zur Molmassenabschätzung der Proteinbanden im Gel wurde als Größenstandard ein Gemisch von Markerproteinen eingesetzt (s. 2.1.4).

5x-Probenpuffer:	65	mM	Tris-HCl, pH 6.8
	10	% (v/v)	Glycerin
	100	mM	DTT
	2	% (w/v)	SDS
	0,01	% (w/v)	Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer:	25	mM	Tris-Base
	192	mM	Glycin
	0,1	% (w/v)	SDS

Um den Bereich von 220 bis 5 kDa analysieren zu können wurden 4-12 % NuPAGE™ Gradientengele (Novex/Invitrogen) in Kombination mit MES-Puffer verwendet. Die Trennung erfolgte bei konstanter Spannung von 200 V in 0.6 h.

MES-Puffer:	4.88	g	MES
	3.03	g	Tris
	5.0	g	10 % SDS
	1.025	ml	0.5 M EDTA
	ad 500 ml Wasser		

Zur Detektion der Proteinbanden wurden die Polyacrylamidgele in einer Coomassie-Färbelösung für 30 s in der Mikrowelle erhitzt und dann etwa 15 min in der Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde unter mehrmaligem Wechseln solange entfärbt, bis der Hintergrund weitestgehend farblos war. Nach Inkubation in einer 3 %igen Glycerinlösung wurde es mit der Geltrockenapparatur für 45 min auf 3MM Filter-Papier bei 70 °C im Vakuum getrocknet und in dieser Form aufbewahrt.

Färbelösung:	0,25	% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue G250
	0,25	% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R250
	9,20	% (v/v)	Essigsäure, technisch
	45,40	% (v/v)	Ethanol, technisch
	45,15	%	Wasser
Entfärbelösung:	10 %	(v/v)	Essigsäure, technisch
	5 %	(v/v)	Ethanol, technisch
	85 %		Wasser

2.3.2 Western-Blot

Unter Blotten versteht man den Transfer von Makromolekülen aus einem Gel auf eine immobilisierende Membran. Das Verfahren wurde von E. M. Southern für den Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nitrocellulose eingeführt (Southern, 1974), der entsprechende Transfer von Proteinen aus einem SDS-Polyacrylamidgel (Renart *et al.*, 1979) wird Western-Blot genannt und zumeist elektrophoretisch durchgeführt (Towbin *et al.*, 1979).

Beim semitrockenen Blotten wird das elektrische Feld direkt an das Polyacrylamidgel angelegt (Khyse-Anderson, 1984). Die benötigten Komponenten werden kurz in Transferpuffer gebadet und nachfolgend luftblasenfrei auf der planare Kathode der Blot-Apparatur gestapelt: zwei Lagen Gel-Blot-Papier (Schleicher&Schüll) in der Größe des Polyacrylamidgels, darauf das Polyacrylamidgel, darauf die Nitrocellulose-Membran (Cellulosenitrat BA85, Schleicher&Schüll) und darüber zwei weitere Lagen Gel-Blot-Papier. Nach Aufsetzen der Anode erfolgt der Transfer bei konstantem Strom von 400 mA (40 V) für eine Stunde.

Transferpuffer:	10 mM	Tris
	96 mM	Glycin
	8 % (v/v)	Methanol
	0.04 % (w/v)	SDS

Zur unspezifischen Färbung der Proteinbanden wurde die Membran kurz in eine PonceauS-Färbelösung getaucht. Nach Markierung des Größenstandards und der Bahnen konnte die Membran bei Bedarf zerteilt werden, um die Detektion mit verschiedenen Antikörpern zu ermöglichen.

PonceauS-Färbelösung:	0,2 % (w/v)	PonceauS
	3 % (w/v)	Trichloressigsäure

2.3.3 Enzym-Immunoassay

Der Nachweis der immobilisierten Proteine erfolgt durch Inkubation mit spezifischen Erst- und Zweitantikörpern und einer nachfolgenden Chemilumineszenz-Reaktion. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in 4 % Milchpulver in TBST inkubiert, dann der Erstantikörper (1: 2000 in 4 % Milchpulver in TBST) entweder für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach einem kurzen und zwei 5 minütigen Waschschritten mit TBST wurde der Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper (1:15.000 in TBST) für 1 h bei Raumtemperatur zugegeben. Danach wurde die Membran erneut einmal kurz und zweimal für 5 min mit TBST gewaschen und ggf. ein Waschschriff mit 1M NaCl in TBST angeschlossen. Nach zwei

kurzen Waschschrritten mit Wasser wurde die Membran 1 min mit der 1:4 verdünnten Substratlösung des ECL™ Kits (Amersham Pharmacia) inkubiert. Zur Detektion der Peroxidase-katalysierten Chemilumineszenz (Abb. 2.1) wurde auf die getrocknete Nitrocellulose-Membran für 10 s bis 10 min ein Hyperfilm™ ECL™-Film (Amersham Pharmacia) aufgelegt. Die Chemilumineszenz ist nach 5-10 min maximal und hält für 2-3 h an (Durrant, 1990).

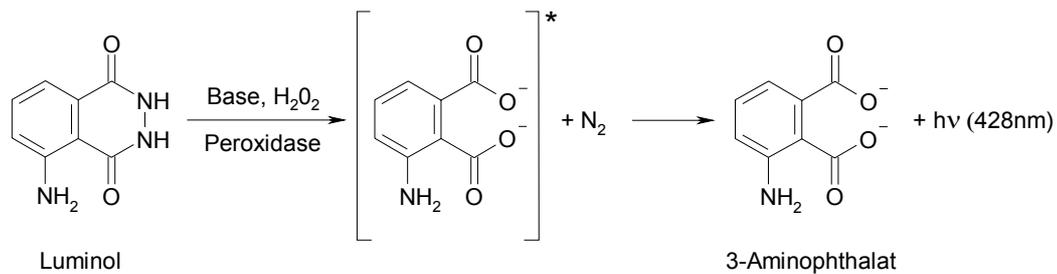


Abb. 2.1: Peroxidase-katalysierte Chemilumineszenz. Die Peroxidase katalysiert die Disproportionierung von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser, der Sauerstoff oxidiert das unter basischen Bedingungen deprotonierte Luminol in einem Radikalmechanismus zu angeregtem 3-Aminophthalat, das beim Übergang in den Grundzustand Licht emittiert, das bei 428 nm sein Maximum hat (Durrant, 1990).

2.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurden zu 950 μl der Bradford-Färbelösung (Pierce) soviel Proteinlösung gegeben, bis der Farbwechsel erkennbar wurde und die Lösung mit Puffer auf 1 ml aufgefüllt. Nach intensiver Mischung wurde nach frühestens 5 min die Absorption bei 595 nm im Photometer gemessen. Anhand einer mit BSA erstellten Kalibriergeraden wurde die Proteinkonzentration errechnet. Bei Dynamin A wurde diese errechnete Proteinkonzentration mit dem Faktor 1.6 multipliziert, der sich aus theoretischen Berechnungen aufgrund der Aminosäurezusammensetzung (Compton und Jones, 1985) sowie aus empirischen Beobachtungen bei der Bestimmung der aktiven Proteinkonzentration ergab (s. 3.7.3).

2.3.5 Konzentrierung von Proteinlösungen

Die Einengung von Proteinlösungen erfolgte bei Volumina < 2 ml in Centricon-Röhrchen (Amicon), ansonsten in Vivaspin-Röhrchen (Viva Science). Bei dieser Anreicherungsmethode wird die einzuengende Flüssigkeit mittels Zentrifugation durch eine Filtermembran gepreßt. Nur Flüssigkeiten und darin gelöste Salze können den Filter passieren, aber keine höhermolekulare Substanzen. Die in dieser Arbeit verwendeten Membranen hatten ein Ausschlußmolekulargewicht von 30 oder 50 kDa, so daß entsprechend größere Proteine zurückgehalten wurden. Die Zentrifugation erfolgte bei 2000 g und 4 °C, bis das erwünschte Volumen erreicht wurde.

2.3.6 Reinigung von Dynamin A aus *D. discoideum*-Zellen

Für die Abschätzung des Expressionsniveaus und des Löslichkeitsverhaltens von Dynamin A in *D. discoideum*-Zellen wurde ein analytisches Extraktionsverfahren angewendet. Dazu wurden 5×10^7 bis 1×10^8 Zellen aus Schüttelkultur oder einer Petrischalen in 600 μ l LB₅₀-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 600 μ l LB₅₀-Puffer mit 1% Triton-X 100 für 15 min auf Eis lysiert. Nach Zentrifugation mit 15.000 rpm bei 4 °C für 30 min wurde der Überstand abgenommen und das Sediment mit 50 μ l LB₅₀-Puffer gewaschen. Nach Zentrifugation für 10 min wurde der Überstand verworfen und das Sediment durch Zugabe von 50 μ l LB₃₀₀-Puffer mit 5 mM GTP und 7.5 mM MgCl₂ mit Hilfe einer Eppendorf-Pistille (zur vollständigen Homogenisierung des Sediments) extrahiert. Nach Zentrifugation für 20 min wurde der Extrakt abgenommen, und das Pellet in 1200 μ l LB₅₀-Puffer resuspendiert, um es in der SDS-PAGE mit dem Überstand vergleichen zu können.

Die präparative Isolierung von Dynamin A aus *D. discoideum* Zellen ging von 10-15 l einer Schüttelkultur mit einer Zelldichte zwischen 5×10^6 und 1×10^7 Zellen/ml aus. Alle Schritte wurden im Kühlraum (4 °C) oder auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden 8 min bei 1000 g sedimentiert, mit 1 l eiskaltem PBS gewaschen, um extrazelluläre Proteasen zu entfernen und, bezogen auf das Zellenfeuchtgewicht, in 10 Volumina LB₅₀-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 10 Volumen LB₅₀-Puffer mit 1% TritonX-100 und 2-fach Protease-Inhibitoren-Mix wurden die Zellen 15 min unter Rühren lysiert und die Lyse unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach Zentrifugation mit 30.000 g für 60 min wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 5 Volumen LB₅₀-Puffer gewaschen und erneut für 10 min zentrifugiert. Zur Extraktion von Dynamin A wurde das Sediment nach Zugabe von 2 Volumen LB₅₀-Puffer mit 5 mM GTP, 7.5 mM MgCl₂ und 1-fach Proteasemix in einem Dounce-Homogenisator intensiv homogenisiert. Das Homogenisat wurde für 20 min bei 20.000 g zentrifugiert und der Überstand über Nacht zweimal gegen 2 l LB₅₀-Puffer dialysiert, um Myosin zu präzipitieren. Nach Zentrifugation bei 5.000 g für 15 min wurde der Überstand mit 3 ml/min auf eine mit LB₅₀-Puffer äquilibrierte DEAE-Chromatographiesäule (Fractogel 650 S (Merck)) aufgetragen. Mit LB₅₀-Puffer wurde solange gewaschen, bis die Absorption des Durchflusses einen konstanten Wert erreicht hatte. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit einem linear aufsteigenden NaCl-Gradienten von 50 mM bis 250 mM NaCl über 60 min mit 1 ml/min. Das Eluat wurde in 3 ml Fraktionen gesammelt und hinsichtlich Zusammensetzung mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert. Zumeist wurde der Durchfluß der DEAE-Chromatographie verwendet, da er mehr angereichertes Dynamin A enthielt als das Eluat. Der Durchfluß wurde über Nacht zweimal gegen 2 l LB₀-Puffer dialysiert, um Dynamin A zu präzipitieren. Nach Zentrifugation bei 5.000 g für 15 min wurde das Präzipitat mit LB₀-Puffer gewaschen und Dynamin A in LB₅₀-Puffer resolubilisiert.

2.3.7 Ni-NTA-Chromatographie

Der vierzählige Chelatbildner Nitrilotriessigsäure (NTA) bindet koordinativ Ni^{2+} -Anionen über vier Koordinationsstellen des Nickels. An eine Matrix gekoppelte Ni-NTA (Qiagen) erlaubt die Reinigung von Oligohistidinpeptiden, die an die verbleibenden zwei Koordinierungsstellen des Nickels binden. Zur Ni-NTA-Affinitätschromatographie ist der für die Dynamin A Reinigung eingesetzte LB_{50} -Puffer nicht geeignet, da er amidhaltig sowie stark reduzierend ist und mit EDTA auch einen Ni-Chelatbildner enthält. Daher wurde statt Tris die amidfreie Puffersubstanz HEPES eingesetzt, die DTT-Konzentration auf 1 mM gesenkt und auf EDTA verzichtet. Zudem wurde 300 mM NaCl zugesetzt, um unspezifische Wechselwirkungen mit der Matrix zu minimieren. Die Elution der gepundenen Peptide erfolgt mit Imidazol, der funktionellen Gruppe der Histidinseitenkette. Durch Zugabe von EDTA wird das Nickel von der NTA entfernt und die Matrix vollständig gereinigt.

2.3.8 Analytische HPLC

Die Identifizierung und Quantifizierung von Nukleotiden erfolgte mittels Umkehrphasen (*reversed phase*)-HPLC isokratisch unter Ionenpaarbedingungen (Tucker *et al.*, 1986). An die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleotide binden die positiv geladenen Tetrabutylammoniumionen, deren hydrophober Anteil die Wechselwirkung mit der C_{18} -Matrix der Säule erhöht. Unter diesen Bedingungen nimmt die Retentionszeit mit steigender Phosphatgruppen zu. Die Kalibrierung des Durchflußphotometers erfolgte mit einem eingewogenen GTP-Standard.

stationäre Phase:	Dynamax C18-Säule, 250 x 4.6 mm (Rainin Instruments)		
mobile Phase:	100 mM	$\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$,	pH 6.5
	10 mM	Tetrabutylammoniumbromid	
	7.5 % (v/v)	Acetonitril	

2.3.9 Stopped-Flow-Messungen schneller Reaktionen

Um die transienten Kinetiken sehr schneller Reaktion fluoreszenzspektroskopisch bestimmen zu können, wurde die *stopped-flow*-Apparatur SX61 der Firma HiTech Scientific verwendet. Bei dieser Methode werden zwei Lösungen, die jeweils einen Reaktanden enthalten, in eine Reaktionskammer injiziert, dabei miteinander vermischt und gleichzeitig das Fluoreszenzsignal verfolgt. Die Totzeit des Geräts, die es zum vollständigen Mischen benötigt, lag bei 2 ms. Alle Messungen wurden im EM_{150} -Puffer bei 20 °C durchgeführt. Jede Messung wurde mindestens fünfmal durchgeführt und daraus der Mittelwert berechnet. Die Aufnahme der Daten sowie die Berechnung der Anisotropie erfolgte durch die mitgelieferte Software KinetAssyst2 (HiTech Scientific).

Für die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte die Excitation der TNP-Nukleotide (Molecular Probes) bei einer Wellenlänge von 406 nm, die Emission wurde hinter einem 530 nm Kantenfilter detektiert. Die Schlitze des Anregungsmonochromators wurden 1-2 mm geöffnet (Bandbreite 1.8-3.6 nm) und der Strom am Sekundärelektronenverstärker (*Photomultiplier*) so eingestellt, daß das Signal 25 % des Maximalsignales betrug. Für die Messung der Anisotropie erfolgte die Excitation der mant-Nukleotide mit parallel polarisiertem Licht der Excitationswellenlänge 364 nm, die parallel polarisierte und die senkrecht polarisierte Emission wurde jeweils hinter einem 389 nm Kantenfilter detektiert.

2.3.10 *Quenched-Flow*-Messungen schneller Reaktionen

Um die Kinetik sehr schneller Reaktion, bei denen kein optisches Signal zur Verfügung steht, bestimmen zu können, wurde ein *quenched-flow* Gerät der Firma Kintec verwendet. Bei dieser Methode werden zwei Lösungen, die jeweils einen Reaktanden enthalten, in eine Reaktionsschlauch injiziert und dabei in < 1ms miteinander vermischt. Nach einer definierten Zeit wird die Reaktion abgebrochen, indem Stop-Lösung (1M Perchlorsäure) die Reaktionslösung aus dem Reaktionsschlauch in ein Auffanggefäß drückt und dabei die Proteine vollständig denaturiert. Dort wird die Lösung sofort mit 8 M KOAc neutralisiert, um die säurekatalysierte Hydrolyse der Reaktionsedukte zu vermeiden.

Zur Analyse der enzymkatalysierten Hydrolyse von GTP zu GDP und anorganischen Phosphor wurde GTP verwendet, dessen α - oder γ -Phosphatgruppe durch das radioaktive Phosphorisotop ^{32}P markiert ist. Die in der GTP-Lösung eingesetzte Aktivität betrug 20 uCi/ml. Das Reaktionsvolumen betrug bei dem verwendeten Gerät etwa 15 μl , das Quenchvolumen 176.3 μl und das Neutralisationsvolumen 60 μl . Nach Zentrifugation wurden 1.5 μl des Überstandes auf Dünnschichtchromatographiefolie (Polygram CEL 300 PEI (Cellose-Polyethylenimin), Machery-Nagel) aufgetragen, getrocknet und die Reaktionsedukte und -produkte mit 350 mM KH_2PO_4 , pH 3.4 als mobile Phase getrennt. Auf die getrocknete Chromatographiefolie wurde ein Phosphoimagerplatte (BAS-MP, Fuji) gelegt und über Nacht bei Raumtemperatur exponiert. Die Quantifizierung von Edukt und Produkt erfolgte mit Hilfe eines Phosphoimagers (BAS 350, Fuji) und der mitgelieferten Software (Image Gauge 3.7).

2.3.11 Lipidbindung

Zur Untersuchung der Lipidbindungsspezifität von Dynamin A wurden die PIP StripsTM von echelon eingesetzt. Hier sind verschiedene synthetische sowie tierische und pflanzliche Phospholipide (einschließlich phosphorylierter Phosphatidylinositole) auf einer Membran immobilisiert. Der Versuch wurde gemäß den Angaben des Herstellers in TBST und 2% Fettsäure-freiem BSA durchgeführt. Die Proteinkonzentration lag bei 0.5 $\mu\text{g/ml}$ oder 20 $\mu\text{g/ml}$. Die Detektion erfolgte mit dem α -Dynamin Antikörper und nachfolgender ECL-Detektion (s. 2.3.3).

2.4 Elektronenmikroskopische Analyse

2.4.1 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Mit Hilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie können Proteinkomplexe von mindestens einigen nm Größe visualisiert werden. Die Elektronen werden beim Durchdringen der Proteine, die kaum große Atome enthalten, nur leicht gebeugt und bilden die dreidimensionale Struktur als zweidimensional Projektion ab.

Als Probenträger diente ein mit einem Kohlefilm beschichtetes Kupfernetz (*grid*, engl.: Raster) mit 300 bis 400 Maschen pro inch (2,54 cm). Der Kohlefilm wird bei $< 10^{-2}$ Pa auf eine frisch aufgebrochene Micaoberfläche aufgedampft und durch langsames Eintauchen in Wasser auf die Wasseroberfläche aufgebracht. Der Film wird mit einzelnen, in Aceton gewaschen *grids* oder mit auf einem Objektträger (durch Besprühen mit 0.25 % MESHcement in Toluol) fixierten *grids* aufgefischt und so auf das Kupfernetz aufgebracht. Unter dem Lichtmikroskop wurde geprüft, ob der Kohlefilm nicht zu stark zerstört war. Weitestgehend intakter Kohlefilm wurde unmittelbar vor der Probenauftragung hydrophil gemacht. Dazu wurde der *grid* einer Glimmentladung ausgesetzt, in Tsukuba 60 s im HDT-400 (Jeol Datum), in Heidelberg 20 s bei $< 0.2 \times 10^{-2}$ Pa und 20 A im CTA 010 (Balzers Union). Durch die Gegenwart von hydrophoben organischen Lösungsmitteln wie Tripropylamin während der Glimmentladung kann das Ausmaß der hydrophilen Eigenschaften der Kohleoberfläche gemildert werden.

Auf den *grid* wurden 5 μ l der zu analysierenden Probe aufgetragen, etwa 3 min bei Raumtemperatur gewartet und dann negativ gefärbt. In Tsukuba wurden dazu drei Tropfen einer 1% Uranylacetatlösung auf den *grid* getropft, restliche Färbelösung mit einem Filterpapier abgezogen und der *grid* 15 min unter einer Schreibtischlampe (60 W Glühbirne) getrocknet. In Heidelberg wurde der Puffer mit einem Filterpapier abgezogen und gleichzeitig ein Tropfen einer 2 % Uranylacetatlösung zugegeben. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt, vor dem Abziehen der restlichen Färbelösung nochmals 1 min gewartet und dann an der Luft getrocknet.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten in Tsukuba an einem Philips Technai F20 mit einer Elektronenkanone (*field emission gun*) bei einer nominellen Vergrößerung von 50.000 (reale Vergrößerung 51.200). Die Beschleunigungsspannung betrug stets 120 kV, die Extraktionsspannung 2800-3200 V, die gunlens 2-3, die spot size 3-5, die Belichtungszeit zumeist 1.0 s. Aufnahmen, die für die Einzelpartikelanalyse ausgewertet wurden, wurden im *low-dose mode* im Defokus von etwa 0.6 μ m aufgenommen. In Heidelberg erfolgten die Aufnahmen an einem Philips EM 400T bei einer nominellen Vergrößerung von 46.000 (reale Vergrößerung 47.200). Die Beschleunigungsspannung

betrug stets 80 kV, die Kondensor-Apertur 30-50 μm , die spotsize 2-3, die Belichtungszeit 0.5-1.0 s. Aufnahmen, die für die Einzelpartikelanalyse ausgewertet wurden, wurden im *low-dose mode* im Defokus von etwa 0.6 μm aufgenommen. Die Dokumentation erfolgte auf elektronensensitiven Filmen SO163 (Kodak). Die Negative wurden in der optischen Bank auf Astigmatismus geprüft und ihre Auflösung bestimmt. Nur weitestgehend stigmatische Bilder mit einer Auflösung besser als 25 Å wurden für die Einzelpartikelanalyse benutzt. Die Negative wurden auf einem Zeiss Scai zunächst mit einer Schrittgröße von 14 μm eingescannt, später mit 7 μm unter Verwendung von γ -Korrekturfaktoren und nachfolgender Mittelung von 2x2 Pixeln. Die Pixelgröße auf den digitalisierten Bildern aus Tsukuba und Heidelberg betrug danach 2.7 Å und 3.0 Å .

2.4.2 Einzelpartikelanalyse und *angular reconstitution*

Die Einzelpartikelanalyse erfolgte unter Verwendung des Programmpakets IMAGIC 5 (Imagic Science Software GmbH) wie unter Ergebnissen beschrieben (Dube et al., 1993; van Heel et al., 1996). Auch die Rekonstruktion der dreidimensionalen Struktur durch *angular reconstitution* (engl.: Winkelrekonstitution) (Serysheva et al., 1995; Schatz et al., 1995; van Heel et al., 1996) erfolgte unter Verwendung des Programmpakets IMAGIC 5. Bei dieser Methode werden alle charakteristischen Ansichten der zu untersuchenden Struktur verwendet, um aus ihnen die zugrundeliegende dreidimensionale Struktur zurückzuprojizieren. Es werden dazu keine Rohdaten, sondern Superpositionen der charakteristischen Ansichten benötigt, die ein ausreichend gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis besitzen. Um aus allen Ansichten die für jede einzelne Ansicht zugrundeliegende Orientierung der dreidimensionalen Struktur zu berechnen, wird das Theorem der gemeinsamen Projektionslinie (engl.: *common line projection theorem*) zugrunde gelegt. Es besagt, daß zwei beliebige zweidimensionale Projektionen einer dreidimensionalen Struktur mindestens eine gemeinsame eindimensionale Projektionslinie besitzen (van Heel, 1987). Es werden daher zunächst alle eindimensionalen Projektionslinien der zweidimensionalen Superpositionen berechnet (Sinogram). Bei der Suche nach gemeinsamen Projektionslinien werden die Sinogramme unterschiedlicher Ansichten Projektionslinie für Projektionslinie miteinander verglichen (Sinogram-Korrelationsfunktion). Wird dies für alle Ansichten gleichzeitig durchgeführt, so können daraus die relativen Orientierungen der Ansichten zueinander (Euler-Winkel) bestimmt werden. Sind die Euler-Winkel bekannt, so kann mit dem *exact filter back projection* Algorithmus eine dreidimensionale Rekonstruktion der Dichteverteilung errechnet werden (Harauz und van Heel, 1986). Aus dieser dreidimensionalen Struktur werden zweidimensionale Projektionen berechnet und durch Vergleich mit den experimentellen Projektionen die dreidimensionale Struktur iterativ verbessert.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Kultivierung von *D. discoideum*-Zellen

D. discoideum Zellen wurden entweder in Petrischalen oder in Schüttelkultur bei 180 rpm in HL5c-Medium bei 21 °C kultiviert. Dem Medium wurde 10 U/ml Penicillin/Streptomycin gegen bakterielle Kontaminationen und 10 µg/ml G418 bzw. 4 µg/ml Blastocidin S für die Selektion von transformierten Zellen zugesetzt. In Schüttelkulturen wurden die Zellen bis zu einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml (die *dymA*-Zellen bis 1×10^6 Zellen/ml) angezogen. Ab 6×10^6 Zellen/ml beginnt die Wachstumskurve in die stationäre Phase überzugehen. Die Zelldichte in Suspension wurde mit Hilfe eines Hämacytometers bestimmt. Kulturen auf Petrischalen wurden bei Erreichen der Konfluenz (manchmal auch etwas später) mit HL5c-Medium abgespült und gegebenenfalls auf eine neue Petrischale übertragen.

Für die Isolierung klonaler Zelllinien wurden Zellen auf SM-Agarplatten (Durchmesser 19 cm) kultiviert. Dazu wurden etwa 100 Zellen zu 600 µl einer Suspension von *Klebsiella aerogenes* Bakterien in MES-Puffer gegeben und auf einer Agarplatte ausgestrichen. Nach ca. zwei Tagen zeigten sich die *D. discoideum* -Kolonien als kleine Freßhöfe (Plaques) auf dem Bakterienrasen. Am Rand der Plaques befinden sich vegetativen Zellen, die aus einer Zelle hervorgegangen sind. Diese wurden mit einer Pipettenspitze abgenommen und aus ihnen eine neue Kultur angelegt.

2.5.2 Konservierung von *D. discoideum*-Zellen

Axenisch gewachsene *D. discoideum* Zellen wurden zweimal mit kaltem MES-Puffer gewaschen und mit einer Dichte von 1×10^8 Zellen/ml resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 600 µl auf einer MES-Agarplatte ausgestrichen und einige Minuten getrocknet. Die Feuchtigkeit auf der Platte erwies sich als wichtiger Parameter für die Fruchtkörperbildung. Die Agarplatten wurden auf den Kopf gestellt und die Zellen entwickelten sich innerhalb von 24 bis 48 h zu Fruchtkörpern. Die Sporen wurden durch heftiges Aufschlagen im Deckel einer Petrischale gesammelt. Die Sporen von drei Agarplatte wurden in 1 ml 10 % Glycerin-Lösung resuspendiert und in 200 µl Aliquots bei -80 °C eingefroren. Zum Animpfen wurde ein Aliquot bei Raumtemperatur aufgetaut und in zwei Petrischalen mit HL5c-Medium aufgeteilt. Die Selektion wurde nach frühestens 24 Stunden begonnen.

Zelllinien, die auch in Gegenwart von 20 % AX2 Zellen keine Fruchtkörper bildeten, mußten als vegetative Zellen eingefroren werden. Zur Konservierung wurden axenisch gewachsene Zellen in eiskaltem HL5c + 10 % (v/v) DMSO bei einer Dichte von 1×10^8 Zellen/ml in 500 µl Aliquots eingefroren. Um den Einfrierprozeß zu verlangsamen, wurden die Aliquots in einen Behälter überführt, der mit einem Handtuch umwickelt wurde und zunächst bei -20 °C für 2 bis 4 h aufbewahrt, bevor sie bei -80 °C gelagert wurden. Eingefrorene Zellen wurden wie Sporen aufgetaut.

2.5.3 Transformation von *D. discoideum*-Zellen

Für die Transformation von *D. discoideum* Zellen wurden Zellen aus Schüttelkultur zweimal in eiskaltem EP-Puffer gewaschen und bei einer Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml in EP-Puffer resuspendiert. 800 μ l dieser Zellsuspension wurden zu 10-20 μ g Plasmid-DNA gegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Außer bei der Transformation von AX3-*orf*⁺-Zellen wurden der Transformationsmischung auch 10 μ g des Plasmids pREP zugefügt, um die Ausschleusung der eingebrachten Plasmide aus transformierten *D. discoideum* Zellen zu verhindern. Die Zellsuspension wurde zur Transformation in eine gekühlte Elektroporationsküvette (Schichtdicke 0,4 cm) überführt und in der *Gene-Pulser*-Apparatur (BioRad) bei 1,2 kV, 25 μ F und 600 Ω , mit einer Zeitkonstanten von etwa 0,7 ms elektroporiert. Nach dem Impuls wurde der Transformationsansatz für 5 min auf Eis gekühlt und danach erneut elektroporiert. Nach weiteren 5 min auf Eis wurde der Transformationsansatz auf zwei Petrischalen mit je 10 ml HL5c-Medium verteilt. 24 h nach der Transformation wurde das Medium gegen Selektionsmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgetauscht. Das Selektionsmedium wurde nahezu täglich gewechselt, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Nach 1 bis 2 Wochen wurden in der Regel die ersten Kolonien sichtbar, die durch Absaugen mittels einer Pipettierhilfe auf 4 cm Petrischalen mit Selektionsmedium überführt wurden. Alternativ konnten die Kolonien auch mit einer Bakterien-Suspension von *K. aerogenes* gemischt und auf SM-Agarplatten ausgestrichen werden.

2.5.4 Zeitaufgelöste Isolierung von Endosomen

Die Reinigung erfolgte nach dem Protokoll von Rodriguez-Paris *et al.* (1992). Zur Herstellung des kolloidalen Eisendextrans wurden 5 ml 1.2 M FeCl₂ (1.193g) und 5 ml 1.8 M FeCl₃ (2.433g) in einem 50ml-Gefäß gemischt und unter Rühren langsam 4.7 ml 32% NH₄OH zugegeben. Die Lösung wurde 2 min bei 5000 g zentrifugiert und das Sediment einmal mit 5% NH₄OH und zweimal mit Wasser gewaschen. Nach Resuspension in 40 ml 0.3 M HCl wurde es bei Raumtemperatur für 30 min geschüttelt, um kolloidales Eisen zu erhalten. Nach Zugabe von 2 g festen Dextran mit einem Molekulargewicht von 40 kDa (Sigma) wurden weitere 30 min geschüttelt. Die Suspension wurde dreimal gegen 2 l kaltes Wasser dialysiert und verbliebene Aggregate durch Zentrifugation bei 27.000 g für 10 min entfernt. Der Überstand enthält das kolloidale Eisendextran. Eine Konzentrationsbestimmung wurde nicht durchgeführt, sondern ein Wert von 10 mg/ml angenommen.

Für das Experiment wurden 2.2×10^{10} Zellen gewaschen und in 110 ml HL5c-Medium bei einer Dichte von 2×10^8 Zellen/ml resuspendiert und bei 180 rpm geschüttelt. Weitere 110 ml HL5c-Medium wurden mit 22 ml des kolloidalen Eisendextrans versetzt (~ 2 mg / ml) und durch einen 0.22 μ m Filter filtriert. Diese Lösung wurde zum Zeitpunkt $t = 0$ min zur Zellkultur gegeben, davon 30 ml abgenommen und separat geschüttelt (Positivkontrolle). Von der Zellkultur wurden nach 3 und 15 min

je 30 ml entnommen (3/0 und 15/0). Nach 15 min wurden die Zellen sedimentiert, zweimal mit eiskaltem HL5c-Medium gewaschen und bei einer Dichte von 1×10^8 Zellen/ml weitergeschüttelt. Nach 15, 30, 60 und 120 min wurden je 30 ml entnommen (15/15, 15/30, 15/60, 15/120) sowie die Positivkontrolle entnommen, die mindestens 120 min mit Eisendextran inkubiert worden war (120/0).

Die Proben wurden nach Entnahme sofort zweimal in eiskaltem Puffer L gewaschen und in 30 ml eiskaltem Puffer L resuspendiert. Die gewaschenen Zellen wurden entweder durch Passage durch einen $0.3 \mu\text{m}$ Filter lysiert oder durch mehrfache Passage durch einen Ball-Homogenisator (EMBL, Heidelberg). Die Lyse wurde unter dem Mikroskop abgeschätzt. Durch sanfte Zentrifugation bei 100 g für 5 min wurden intakte Zellen abgetrennt und die magnetischen Vesikel durch Anlegen eines Magneten MPC-1 (Dynabel) an der Gefäßwand immobilisiert. Bei wenig stringenten Waschbedingungen wurde einmal, bei stringenten Waschbedingungen zweimal mit 30 ml eiskaltem Puffer L gewaschen. Die Vesikel wurden durch Zentrifugation bei 20.000 g für 20 min sedimentiert und das schwach sichtbare Sediment in ein Eppendorf Reaktionsgefäß transferiert. Dort wurde es in 20 μl Probenpuffer kurz aufgeköcht und die koisolierten Proteine mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

Puffer L:	5 mM	Glycin, pH 8.5
	100 mM	Sucrose

2.5.5 Isolierung von Mitochondrien

Die Reinigung erfolgte nach einem Protokoll von Dr. Bettina Ulbricht (unveröffentlichte Daten). Alle Schritte wurden im Kühlraum oder auf Eis ausgeführt. Die Zentrifugationen bei 7.700 g wurden bei 6000 rpm in einem SW41 *swing-out* Rotor (Beckman) durchgeführt. 3×10^9 AX Zellen wurden 5 min bei 800 g sedimentiert, mit 100 ml Puffer M1 gewaschen und mit Puffer M1 mit Protease-Inhibitoren auf 12 ml Endvolumen resuspendiert. Die Zellen wurden durch achtfache Passage durch einen Ball-Homogenisator (EMBL, Heidelberg) lysiert (Ball $10 \mu\text{m}$ kleiner als Kammer). Das Rohlysat wurde mit 12 ml Puffer M2 mit 1 mM DTT, 1 mM ATP und Protease-Inhibitoren verdünnt und zur Abtrennung restlicher Zellen und Zellkerne 10 min bei 800 g zentrifugiert. Das Sediment (800 g, Sed.) wurde verworfen und der Überstand (800 g, Üb.) 10 min bei 7.700g auf 1 ml Sucrosekissen (2.5 M Sucrose) zentrifugiert. Der Überstand (7.700 g, Üb.) mit den löslichen Proteinen wurde abgenommen und verworfen, das auf dem Sucrosekissen aufliegende Sediment mit den Mitochondrien (7.700 g, Sed.) abgenommen und in 12 ml Puffer M2 resuspendiert. Die Suspension wurde 1 min bei 3000 g zentrifugiert, das Sediment (3000 g, Sed.) verworfen und der Überstand (3000 g, Üb.) zweimal 10 min bei 800 g zentrifugiert. Die Sedimente (800 g, Sed.) wurden verworfen und der Überstand (800 g, Üb.)

10 min bei 7.700g auf 0.5 ml Sucrosekissen zentrifugiert. Der Überstand (7.700 g, Üb.) wurde verworfen und das Sediment (7.700g, Sed.) vom Sucrosekissen abgenommen, in 4 ml Puffer M2 resuspendiert und 10 min bei 7.700 g auf 0.5 ml Sucrosekissen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment vom Kissen abgenommen und mit Puffer M2 auf ein Endvolumen von 0.5 ml aufgefüllt.

Puffer M1:	20 mM	HEPES/NaOH, pH 7.2
	250 mM	Sucrose
	1 mM	EDTA
Puffer M2:	20 mM	Tris/HCl, pH 7.6
	250 mM	Mannitol
	4 mM	EDTA

3. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erforschung von Struktur-Funktionsbeziehungen von Dynamin A. Zur Untersuchung der Funktion von Dynamin A wurde zunächst nach konservierten Aminosäuren gesucht, deren Substitution möglichst selektiv zur deutlichen Verminderung der GTP-Bindung, der GTP-Hydrolyse oder der assemblierungsstimulierten GTPase-Aktivität führen könnten. Insbesondere sollte die postulierte intramolekulare Regulation von Dynamin A durch die C-terminale GTPase-Effektor-Domäne (GED) untersucht werden und dazu Dynamin A ohne die GED sowie die GTPase-Domäne und die GED als isolierte Domänen generiert werden.

3.1 Klonierungsarbeiten

3.1.1 Identifizierung von essentiellen Aminosäuren

Die Spezifität von GTPasen für Guaninnukleotide wird durch das Aspartat in der hochkonservierten Sequenz N/TKxD vermittelt (s. Abb. 1.3). Bei Substitution dieses Aspartats mit einem Asparagin wechselt die Spezifität von Guanin- auf Xantosinnukleotide (s. Abb. 1.4). Die Punktmutation D210N in Dynamin A sollte daher die Bindung von GTP verhindern. Die Bindung von XTP kann aufgrund der sehr geringen XTP-Konzentration in der Zelle vernachlässigt werden (Schmidt *et al.*, 1996).

Der hochkonservierten Sequenz DxxG in *switch II* (s. Abb. 1.3) folgt in den Ras-ähnlichen GTPasen, in den G_α-Untereinheiten und in den Elongationsfaktoren zumeist ein Glutamin. Die Substitution dieses partiell konservierten Glutamins führt zu hydrolysedefizienten GTPasen (Bourne *et al.*, 1989). Da bei Dynaminen nach dem DxxG-Motiv eine große, hydrophobe Aminosäure folgt, ist diese Punktmutation nicht anwendbar. Stattdessen wurde die Eigenschaft der Dynamine genutzt, ihre GTPase-Aktivität durch Assemblierung zu stimulieren. Durch die Arbeiten von Schmid und Mitarbeitern konnte die C-terminale GTPase-Effektor Domäne (GED), die zwischen der PH-Domäne und der PRD liegt, als GTPase-aktivierende Domäne identifiziert werden (Muhlberg *et al.*, 1998; Sever *et al.*, 1999). Um die Allgemeingültigkeit dieses Befundes zu prüfen, wurden in der Aminosäuresequenz aller bis dahin bekannten Mitglieder der Dynamin-Familie nach einer homologen Sequenz gesucht. Tatsächlich konnte mit Ausnahme der GBPs stets eine C-terminale Sequenz von etwa 120 Aminosäuren mit hoher Homologie identifiziert werden. Die Homologie der GED zwischen den echten Dynaminen und den Dynamin-ähnlichen Proteinen ist hoch. Dagegen sind die GED der Mgm1-ähnlichen und Mx-Proteine weniger stark homolog. Alle GEDs sind reich an sauren und basischen Aminosäuren (in Dynamin A jeweils 17 %) und daher polar und hydrophil (Abb. 3.1).

sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ihre Funktion nicht untersucht. Neben einer sauren Aminosäure (E820 in DymA) sind auch zwei basische Aminosäuren (K786 und R828 in DymA) vollständig konserviert (Abb. 3.1). Die beiden basischen Aminosäuren sind potentielle Kandidaten für einen Arginin-Finger (R828) sowie ein den Arginin-Finger stabilisierendes Lysin (K786), wie sie für GAPs beschrieben wurden (Scheffzek *et al.*, 1998). Die Sekundärstruktur der GED wird als fast vollständig helikal vorhergesagt, mit einem kurzen *loop*, der das totalkonservierte Arginin R828 trägt (Daten nicht gezeigt). Diese Struktur könnte dem *finger-loop* von GAPs entsprechen, auch wenn keine entsprechende Sequenzhomologie vorliegt (Scheffzek *et al.*, 1998).

Die helikale Domäne der G_{α} -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine (s. Abb. 1.2b) ist eine in die GTPase-Domäne insertierte, interne GAP-Domäne (Markby *et al.*, 1993). Das katalytisch aktive Arginin liegt in *switch I*, dort wo die helikale Domäne wieder in die GTPase-Domäne übergeht (Noel *et al.*, 1993). Dieser intramolekulare Arginin-Finger ermöglicht den G_{α} -Untereinheiten eine hohe intrinsische GTPase-Aktivität, die der von nicht-assemblierten Dynamine entspricht. In Analogie zu den G_{α} -Untereinheiten könnten auch die Dynamine alle katalytisch aktiven Aminosäuren in der GTPase-Domäne tragen. Daher wurde die GTPase-Domäne auf Sequenzhomologien zur GAPs untersucht. Im Bereich des Dynamine-Familienmotivs, das möglicherweise die *switch I* – Region der Dynamine darstellt (Hofmann *et al.*, 1999), liegt eine Homologie zu den essentiellen Aminosäuren der GAP-Domäne des Arf-Domänen-Proteins 1 vor (Abb 3.2; Vitale *et al.*, 1998). Das Arf-Domänen-Protein 1 besitzt eine N-terminale GAP-Domäne, welche die GTPase-Aktivität der C-terminalen Arf-Domäne stimuliert (Vitale *et al.*, 1996). Sollte das Dynamine-Familienmotiv die *switch I*-Region sein, so würde das darin enthaltene totalkonservierte Threonin (T59 in Dynamine A) als G2 Motiv das γ -Phosphat kontaktieren. In diesem Fall sollte das nachfolgende Arginin (R60 in Dynamine A) in der Position sein den Übergangszustand der Hydrolyse zu stabilisieren und stellt damit einen potentiellen Arginin-Finger dar.

ARD1	S	T	K	T	L	A	K	H	R	R	V	P	L
DymA	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>R</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>P</u>	<u>L</u> ⁶³

Abb. 3.2: Sequenzhomologie des Dynamine-Familienmotifs mit den essentiellen Aminosäuren der GAP-Domäne von ARD1. Die GAP-Domäne von ARD1 besitzt fünf für die GAP-Aktivität essentielle Aminosäuren (fett gedruckt), die sich auch im Bereich des Familienmotifs von Dynamine A (unterstrichen) befinden. Das Dynamine-Familienmotiv aus Dynamine A beinhaltet das totalkonservierte Threonin 59 (möglicherweise G2, *switch I*), dem ein ebenfalls totalkonserviertes Arginin folgt. Dieses Arginin 60 befindet sich folglich in einer Position, in der es das γ -Phosphat kontaktieren könnte und so den Übergangszustand der GTP-Hydrolyse stabilisieren könnte.

Bei einer temperatursensitiven Mutation wird durch Temperaturänderung die Proteinfunktion gezielt ausgeschaltet. Die shibire Mutationen ts1 bis ts2 in *D. melanogaster* führen beispielsweise zu temperatursensitivem Dynamin (Grigliatti *et al.*, 1973). Die entsprechenden Mutationen in Dynamin A (ts1: G275D und ts2: G148S) führten aber zu keinem auffälligen Phänotyp in *D. discoideum* (Wienke, persönliche Mitteilung). Für Dynamin aus *C. elegans* wurde die Punktmutation P70S als temperatursensitiv beschrieben (Clark *et al.*, 1997). Das Prolin liegt unmittelbar hinter der Dynamin-Familiensequenz und ist damit möglicherweise in den Konformationsänderungen von *switch I* involviert (Abb. 3.2). Die homologe Aminosäure in Dynamin A ist das Prolin 62, die in Analogie an die Mutation in *C. elegans* durch ein Serin substituiert wurde. Zudem wurde Prolin 62 auch durch ein Glycin substituiert, um eine hohe Flexibilität an dieser Position zu ermöglichen.

3.1.2 Generierung von Punktmutationen in Dynamin A

Zur Untersuchung der Funktion von Dynamin A wurden die folgenden Punktmutationen in die wildtyp Sequenz eingeführt:

R60A	zur Generierung von GTP-Hydrolyse-defizientem Dynamin A
P62S	zur Generierung von temperatursensitivem Dynamin A
P62G	zur Generierung von temperatursensitivem Dynamin A
D210N	zur Generierung von GTP-Bindung-defizientem Dynamin A
K786A	zur Generierung von nicht-assemblierungsstimulierbarem Dynamin A
R828A	zur Generierung von nicht-assemblierungsstimulierbarem Dynamin A

Zunächst wurde versucht die Punktmutation mit Hilfe des Quickchange Kits (Stratagene) nach den Angaben des Herstellers einzuführen. Hierbei werden zwei komplementäre Mutagenese-Primer (*primer*, englisch: Starter, für: hybridisierendes Oligonukleotid) eingesetzt und mittels PCR der gesamte Vektor repliziert. Die Mutagenese war bei Einsatz des 5.6 kb großen bakteriellen Expressionvektors pBS *dymA* als Matrize erfolgreich. So konnte mit den Mutagenese-Primern BK03 und BK04 die Punktmutation R828A in pBS *dymA* eingeführt werden. Dagegen wurde mit dem 9.8 kb großen *Dictyostelium*-Expressionsvektor pDXA-H *dymA* als Matrize nie ein vollständiger Vektor, sondern stets nur kleinere Fragmente erhalten (Daten nicht gezeigt). Die Verlängerung der Elongationsdauer sowie die Substitution der rekombinanten Pfu-Polymerase (Stratagene) durch die native Pfu-Polymerase (Stratagene), die hitzestabilisierte Turbo-Pfu-Polymerase (Stratagene) oder das Expand HiFidelity PCR System (*Taq*- und *Pwu*-Polymerase, Roche) führte zu keinem Erfolg (Daten nicht gezeigt). Vermutlich verhindern der hohe AT-Gehalt und die Länge von pDXA-H *dymA* die vollständige Amplifizierung des Vektors. Die in pBS *dymA* generierte Punktmutation R828A wurde mit *Eco*NI und *Xho*I in pDXA-H *dymA* subkloniert.

Nachfolgend wurde die Mutagenese über einen Megaprimer durchgeführt, bei der mittels PCR mit einem Mutagenese-Primer und einem 3'-Primer zunächst der Megaprimer generiert wird. Dieser dient nach Zugabe eines 5'-Primers als 3'-Primer, um die gewünschte DNA-Sequenz einschließlich der Mutation zu amplifizieren (s. 2.1.2; Picard *et al.*, 1994). Zur Generierung des Megaprimers wurden die in Tabelle 3.1 aufgeführten Mutagenese- und 3'-Primer eingesetzt. Damit wurden die Megaprimer erfolgreich hergestellt (Daten nicht gezeigt). Die nachfolgende PCR mit dem Megaprimer und 5'-Primer war erst erfolgreich, als der generierte Megaprimer gereinigt und nachfolgend in einer zweiten PCR eingesetzt wurde (Daten nicht gezeigt). Die Punktmutation wurde in die *dymA* Sequenz eingebracht, indem das PCR-Produkt mittels der darin enthaltenen Restriktionsschnittstellen in den entsprechend geschnittenen pDXA-H *dymA* ligiert wurde (Tab. 3.1). Die jeweilige Punktmutation wurde abschließend durch Sequenzierung bestätigt.

Mutation	Mutagenese-Primer	3'-Primer	Megaprimer	5'-Primer	PCR-Produkt
R60A	BK07	DW34 (<i>PinAI</i>)	534 bp	-10c (<i>SacI</i>)	759 bp
P62S	BK09	DW34 (<i>PinAI</i>)	528 bp	-10c (<i>SacI</i>)	759 bp
P62G	BK11	DW34 (<i>PinAI</i>)	528 kb	-10c (<i>SacI</i>)	759 bp
D210N	BK02	-10c (<i>SacI</i>)	725 kb	DW35 (<i>PinAI</i>)	1160 kb
K786A	BK06	DW39 (<i>Van91I</i>)	888 bp	DW44 (<i>XbaI</i>)	1082 bp
R828A	BK03/BK04	Quickchange-PCR mit pBS <i>dymA</i> zu pBS <i>dymA</i> R828A, <i>EcoNI/XhoI</i> -Subklonierung der Punktmutation in pDXA-H <i>dymA</i>			

Tabelle 3.1: PCR-generierte Punktmutationen in *dymA*. Die gewünschte Punktmutation wurde mittels PCR und den dargestellten Primern generiert. Mit Ausnahme der Punktmutation R828A wurde erst ein Megaprimer generiert und dann das vollständige PCR-Produkt. Dieses wurde mit den in Klammern genannten Restriktionsschnittstellen in den Vektor pDXA-H *dymA* ligiert. Die Punktmutation R828A wurde mittels des Quickchange-Kits in pBS *dymA* generiert und in pDXA-H *dymA* subkloniert. Alle Punktmutationen wurden durch Sequenzierung bestätigt.

Mit der dargestellten Methode konnten alle gewünschten Punktmutationen erfolgreich in pDXA-H *dymA* eingeführt werden. Bei der Punktmutation K786A lag eine zweite Mutation N794D vor. Da die K786A Mutation 1999 in der Literatur als ineffektiv beschrieben wurde, wurde sie nicht weiter verfolgt (Sever *et al.*, 1999).

3.1.3 Generierung von Dynamin A - Fragmenten

Um die Funktion der GED zu untersuchen wurden verschiedene Dynamin A Fragmente konstruiert. Dazu wurde mittels PCR die C-terminale GED entfernt (*dymA Aged*), sowie die GED als isolierte Domäne kloniert (*ged*). Zusätzlich wurden zwei Formen der etwa 300 Aminosäuren großen GTPase-Domäne kloniert. Neben der vermutlich minimalen GTPase-Domäne mit den ersten 304 Aminosäuren (*dymA 304*) wurde auch ein etwas längeres Fragment generiert, das die ersten 372 Aminosäuren umfaßt (*dymA 372*). Dieses Fragment enthält die GGARI-Box, eine kurze Sequenz innerhalb der Mitteldomäne mit hoher Homologie zwischen allen Mitgliedern der Dynamin-Familie. Die Funktion der GGARI-Box ist bislang unbekannt.

Zur Klonierung der *dymA* Fragmente wurden Teile der codierende Sequenz des *dymA* Gens mittels PCR (s. 2.2.5) amplifiziert. Die eingesetzten Primer definierten die Länge des Fragments und enthielten Restriktionsschnittstellen für die Ligation in die Expressionsvektoren (Tab. 3.2). Zudem wurden 3'-Primer eingesetzt die wahlweise ein Streptavidin-Peptid (+*St*) codieren. Streptavidin (GGFQPHRWG) bindet mit sehr hoher Affinität an Biotin ($K_D \sim 10^{-15}$ M) und ermöglicht somit eine alternative Affinitätschromatographie (Airenne *et al.*, 1999).

pDXA-H	5'-Primer	3'-Primer	PCR-Produkt
<i>dymA304</i>	DW43GA (<i>XhoI</i>)	DW 46N(<i>XbaI</i>)	936 bp
<i>dymA304+St</i>	DW43GA (<i>XhoI</i>)	DW 47(<i>XbaI</i>)	963 bp
<i>dymA372</i>	DW43GA (<i>XhoI</i>)	DW54 (<i>XbaI</i>)	1126 bp
<i>dymA372+St</i>	DW43GA (<i>XhoI</i>)	DW55 (<i>XbaI</i>)	1153 bp
<i>dymA Aged</i>	DW43GA (<i>XhoI</i>)	DW51 (<i>XbaI</i>)	2228 bp
<i>dymA Aged+St</i>	DW43GA (<i>XhoI</i>)	DW52 (<i>XbaI</i>)	2255 bp
<i>ged</i>	DW50GA (<i>XhoI</i>)	DW44 (<i>XbaI</i>)	392 bp
<i>ged+St</i>	DW50GA (<i>XhoI</i>)	DW45 (<i>XbaI</i>)	419 bp
pQE30	5'-Primer	3'-Primer	PCR-Produkt
<i>dymA 304</i>	-10c (<i>SacI</i>)	DW46N (<i>XbaI/SmaI</i>)	996 bp
<i>dymA 372</i>	-10c (<i>SacI</i>)	DW54 (<i>XbaI/SmaI</i>)	1200 bp
<i>ged</i>	DW50GA (<i>Sall/XhoI</i>)	+1nc (<i>HindIII</i>)	869 bp

Tabelle 3.2: PCR-generierte Fragmente von Dynamin A. Die gewünschten Fragmente wurden mittels PCR und den dargestellten Primern generiert. Das PCR-Produkt wurde mit den in Klammern genannten Restriktionsschnittstellen innerhalb der Primer entweder in den eukaryotischen Expressionsvektor pDXA-3H oder in den bakteriellen Expressionsvektor pQE30 ligiert (*Sall/XhoI*: *Sall* kompatibel mit *XhoI*; *XbaI/SmaI*: *XbaI* schneiden, zum stumpfen Ende auffüllen, kompatibel mit *SmaI*).

Die PCR mit der nativen, der rekombinanten oder der hitzestabilisierten *Pfu*-Polymerase (Stratagene) ergaben nahezu keine Ausbeute. Gute Ausbeuten wurden erst bei Einsatz des Expand HiFidelity PCR System (Roche) erzielt, bei dem zwei Polymerasen eingesetzt werden (neben der *Taq*- auch die *Pwo*-Polymerase, die eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität besitzt). Die 2.2 kb großen PCR-Produkte *dymA* *Δged* und *dymA* *Δged+St* wurden mittels des TOPO TA-Cloning Kits (Invitrogen) subkloniert, in *E. coli* amplifiziert und mit *XhoI* und *XbaI* in den Expressionsvektor pDXA-3H ligiert. Diese Ligation gelang erst, als bei der Präparation der DNA auf den Einsatz von UV-Licht weitestgehend verzichtet wurde (s. 2.2.11). Dieses Vorgehen generiert sieben Codons zwischen den Histidincodons am 5'-Ende und dem Start-ATG von *dymA*. Analog erfolgte die Klonierung der C-terminalen GED mit und ohne C-terminalen Strep-Tag ebenfalls mit *XhoI* und *XbaI* in pDXA-3H. Die GTPase-Domänen der Länge 304 und 372 wurden durch Frau Ursula Rühl mit *XhoI* und *XbaI* in pDXA-3H und in pDD-GST (für die Expression von GST-Fusionsproteinen) kloniert.

Für die bakterielle Herstellung von Dynamin A oder Fragmenten von Dynamin A wurde der bakterielle Expressionvektor pQE30 (Qiagen) eingesetzt, der ein N-terminales Hexahistidinpeptid codiert. Aus pDXA-H *dymA* wurde mit *SacI* und *HindIII* die codierende Sequenz des *dymA* Gens gewonnen und in den mit *SacI* und *HindIII* linearisierten Vektor pQE30 ligiert. Dieses Vorgehen generierte acht Codons zwischen den Histidincodons am 5'-Ende und dem Start-ATG von *dymA*. Am 3'-Ende liegt hinter dem Stop-TAA eine 391 bp lange nicht-codierende Sequenz (genomische, 3'-flankierende Sequenz). Die GTPase-Domäne 304 und 372 wurden mittels PCR generiert (Tab. 3.2), das 3'-Ende mit *XbaI* geschnitten, dieses mit dem Klenow-Fragment zum stumpfen Ende aufgefüllt und das 5'-Ende mit *SacI* geschnitten. Dieses Fragment wurde in den mit *SacI* und *SmaI* linearisierten Vektor pQE30 ligiert. Dieses Vorgehen generierte ebenfalls acht Codons zwischen den Histidincodons am 5'-Ende und dem Start-ATG von *dymA*. Die GED-codierende Sequenz wurde mittels PCR amplifiziert (Tab. 3.2), das PCR-Produkt mit *XhoI* und *HindIII* geschnitten und in den mit *SacI* (kompatibel mit *XhoI*) und *HindIII* linearisierten Vektor pQE30 ligiert. Diese Klonierungsstrategie führte zu 14 Codons zwischen dem Histidincodons am 5'-Ende und dem ersten Codon der *ged*, sowie 391 bp nicht-codierender Sequenz hinter dem Stop-Codon.

3.2 Proteinreinigung aus *D. discoideum*

3.2.1 Reinigung von Dynamin A aus *D. discoideum*

Die Reinigung von Dynamin A erfolgte in Anlehnung an die Reinigung rekombinanter Myosin-Motordomänen, bei der das Protein zunächst sedimentiert und nachfolgend durch Nukleotidzugabe resolubilisiert wird (Manstein und Hunt, 1995). Vorteil des Sedimentierens ist die schnelle Abtrennung der löslichen, endogenen Proteasen sowie die starke Anreicherung des Proteins nach der

Extraktion aus dem Sediment. Die Reinigung von Dynamin A erfolgte auf Grundlage des Protokolls von Dr. Dirk Wienke und Dr. Renu Batra und wurde in Zusammenarbeit mit Hartmut Niemann und Thomas Reubold optimiert. Die Reinigung von Dynamin A ist unter 2.3.6 beschrieben und in Abb. 3.3 beispielhaft dargestellt.

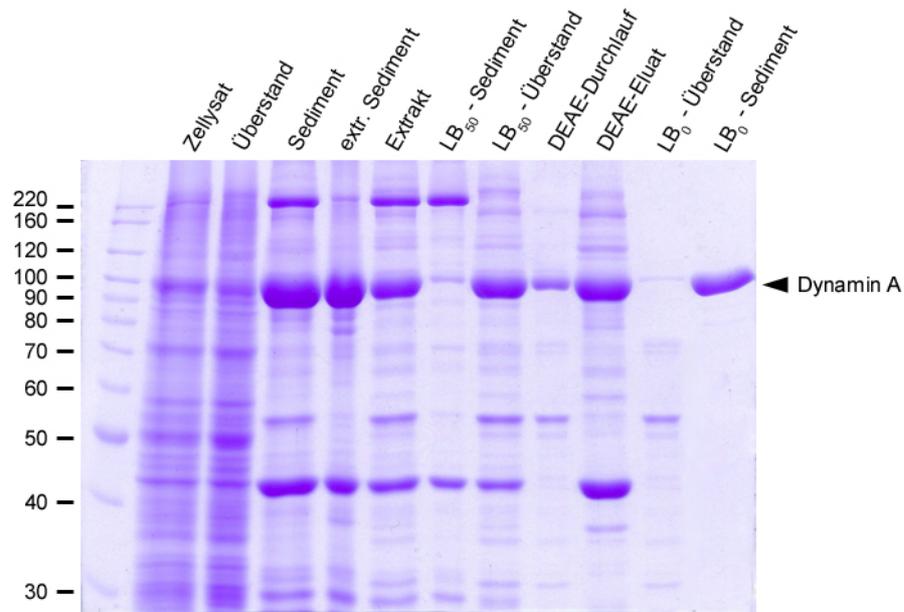


Abb. 3.3: Reinigung von Dynamin A aus *D. discoideum*. Im Zellysat ist Dynamin A (96 kDa) sichtbar. Durch Zentrifugation wird es im Sediment angereichert und daraus durch Extraktion mit 5 mM GTP teilweise wieder solubilisiert (vgl. extr. Sediment und Extrakt). Im Extrakt liegen vor allem Myosin II (220 kDa), Dynamin A (96 kDa) und Aktin (43 kDa) vor. Durch Dialyse gegen LB_{50} wird Myosin weitestgehend und Aktin teilweise präzipitiert (LB_{50} -Sediment), während Dynamin A im Überstand bleibt (LB_{50} -Überstand). Hochmolekulare Kontaminationen und restliches Aktin werden bei der Passage der DEAE-Säule entfernt (DEAE-Durchlauf). Die Elution des an die DEAE-Matrix gebundenen Dynamin A ist stark durch Aktin kontaminiert (DEAE-Eluat). Durch Dialyse gegen LB_0 wird Dynamin A präzipitiert, während die niedermolekularen Kontaminationen im Überstand zurückbleiben (LB_0 -Überstand). Das in LB_{50} resolubilisierte Dynamin A (LB_0 -Sediment) hat nach Abschätzung aus dem SDS-Polyacrylamidgel eine Reinheit von > 95 %.

Nach der Zellyse mit 0.5 % Triton und Zentrifugation erfolgte die Extraktion von Dynamin A aus dem Sediment mit 10 mM GTP in LB_{300} . Die Ausbeute variierte zwischen ~ 5 % und ~ 50 % (Abb. 3.3 und 3.4a). Es wurden die Intensität des Homogenisierens, die Inkubationsdauer, die NaCl-Konzentration, die GTP-Konzentration und der Lieferant des GTP variiert, es konnte aber kein Parameter gefunden werden, der eine gute Extraktion gewährleistet. Da die Extraktion auch mit 5 mM GTP gelang, wurde nachfolgend mit 5 mM GTP extrahiert. Durch Dialyse gegen LB_{50} wurden Myosin II und Teile des Aktins präzipitiert und der Dialyseüberstand nachfolgend auf eine DEAE-Säule gegeben. Der Anteil an Dynamin A, der an den mäßig-starken Anionenaustauscher band, variierte ebenfalls. Zumeist lag mehr Dynamin A im Durchlauf vor als an die Matrix gebunden

wurde. Zudem eluierte gebundenes Dynamin A gleichmäßig über einen großen Bereich des NaCl-Gradienten, oft zusammen mit Aktin (Abb. 3.4b). Dagegen enthielt der Durchlauf kein Aktin mehr und neben Dynamin A nur noch wenige andere Proteine (Abb. 3.4b). Durch Dialyse gegen LB_0 wurde Dynamin A präzipitiert, gewaschen und wieder in LB_{50} aufgenommen. Bei geringen Dynamin A Konzentrationen erfolgte keine Präzipitation von Dynamin A. Dann wurde der Dialyseüberstand auf eine MonoQ-Säule (starker Anionentauscher) gegeben, der Durchlauf aufgefangen sowie Dynamin A mit ansteigenden NaCl-Konzentrationen eluiert und die kontaminationsfreien Fraktionen verwendet.

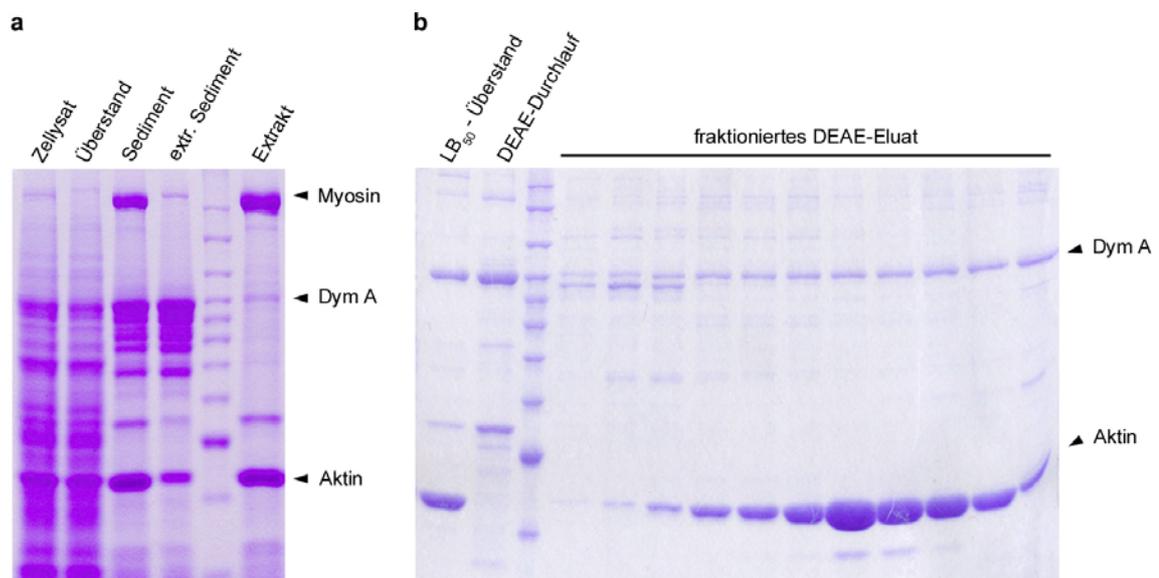


Abb. 3.4: Geringe Reproduzierbarkeit bei der Reinigung von Dynamin A. a) Die Extraktion von Dynamin A aus dem Sediment gelang nicht immer. Während Myosin und Aktin stets gut extrahiert wurden, verblieb Dynamin A manchmal im Sediment und ließ sich auch durch mehrfache Extraktion nicht resolubilisieren. b) Die Elution von Dynamin A von der DEAE-Matrix mit Hilfe eines NaCl-Gradienten erfolgte manchmal derartig gleichmäßig, daß keine Reinigung erzielt werden konnte. Es wurde daher mit dem DEAE-Durchlauf weitergearbeitet, der kein Aktin mehr enthielt.

3.2.2 Reinigung von punktmutiertem Dynamin A

Aus dem Sediment des Zellysats wurde Dynamin A durch GTP extrahiert, in geringem Umfang auch durch ATP, aber nicht durch XTP (Abb. 3.5a). Zudem war auch das schwer-hydrolysierbare GTP-Analog GppNHp nicht in der Lage Dynamin A aus dem Sediment zu resolubilisieren. Dies weist auf die Notwendigkeit der GTP-Hydrolyse für die Extraktion hin und kann als Hinweis auf hydrolysedefiziente Punktmutanten genutzt werden.

3.2.2a Dynamin A D210N

Die analytische Reinigung von H-DymA-D210N zeigt, daß die Punktmutation D210N zu keinem Wechsel der Nukleotidspezifität führte. Das Protein wurde weiterhin durch GTP, nicht aber durch XTP aus dem Sediment resolubilisiert (Abb. 3.5b).

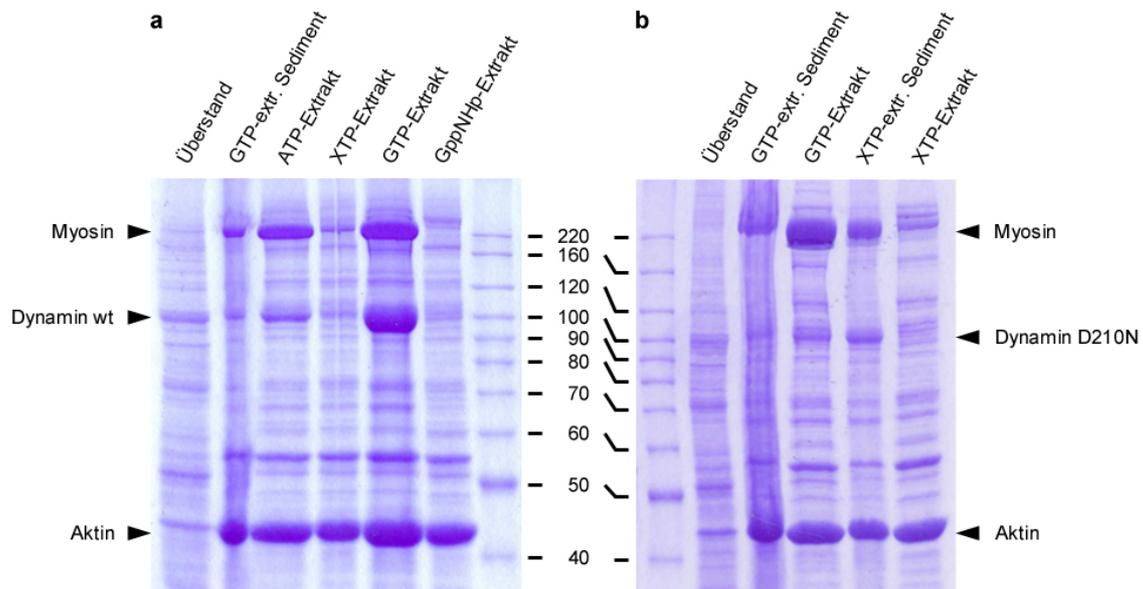


Abb. 3.5: Die Punktmutation D210N führt nicht zum Wechsel der Nukleotidspezifität von Dynamin A. Analytische Extraktion von H-DymA und H-DymA-D210N zur Bestimmung der Nukleotidspezifität. **a)** H-DymA wird durch GTP größtenteils extrahiert, durch ATP nur gering und fast nicht durch XTP. Mit dem schwer-hydrolysierbaren GTP-Analog kann H-DymA nicht resolubilisiert werden. **b)** Auch H-DymA-D210N wird durch GTP extrahiert, aber nicht durch XTP. H-DymA D210N liegt nach GTP-Extraktion überwiegend im Extrakt vor, nach XTP-Extraktion im Sediment.

3.2.2b Dynamin A R828A

Die Punktmutation R828A führt zu keiner Veränderung des Extraktionsverhaltens des Proteins. Es kann durch GTP-Zugabe größtenteils aus dem Sediment resolubilisiert werden und nach dem Protokoll für die Reinigung von Dynamin A gereinigt werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 Reinigung von Dynamin A – Fragmenten aus *D.discoideum*

In *D. discoideum* Zellen wurden verschiedene Fragmente von Dynamin A mit N-terminalem Hexahistidin-Peptid (s. 3.1.1) hergestellt: Die GTPase-Domäne mit 304 Aminosäuren (H-DymA-304) oder mit 372 Aminosäuren (H-DymA-372), Dynamin A ohne die C-terminale GED (H-DymA ΔGED) sowie die GED selbst (H-GED). Die GTPase-Domäne und die GED wurden zusätzlich auch als GST-Fusionprotein exprimiert (GST-DymA-304, GST-DymA-372, GST-GED), um die Löslichkeit zu erhöhen und eine alternative Affinitätschromatographie einsetzen zu können. Die

dymA-Fragmente wurden in *D. discoideum* zumeist weniger stark exprimiert als die vollständige *dymA*-Sequenz. Zudem ging die Expression teilweise stark zurück oder sogar verloren (Abb. 3.6).

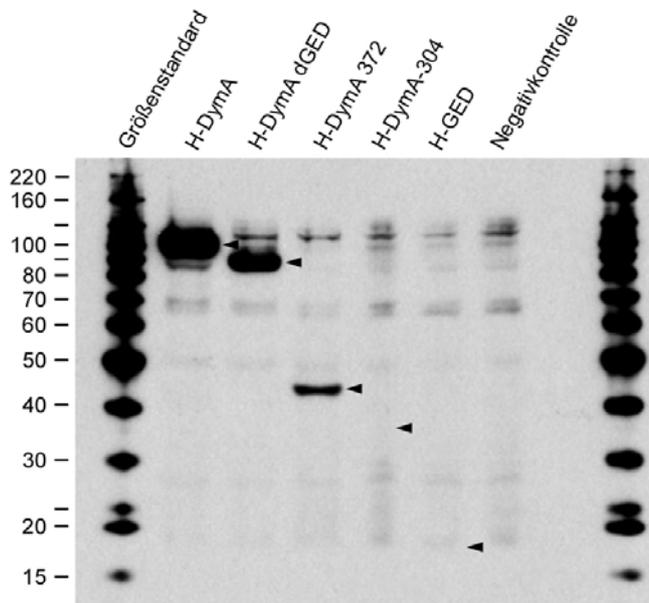


Abb. 3.6: Expression von H-*dymA* und H-*dymA*-Fragmenten in *D. discoideum*. Zellysate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine geblottet und mit einem anti-Histidin-Antikörper detektiert (Pfeile). H-DymA, H-DymA Δ GED und H-DymA-372 wurden nachgewiesen, nicht aber H-DymA-304 (36 kDa) und H-GED (17 kDa).

3.2.3a Reinigung von H-DymA- Δ GED aus *D. discoideum*

Die mit pDXA-H *dymA* Δ ged transformierten Zellen überexprimierten das C-terminal verkürzte Dynamamin A etwa 10fach (Abb. 3.7). Bei der analytischen Reinigung zeigte sich, daß im Gegensatz zum endogenen Dynamamin A das C-terminal verkürzte Protein weniger gut löslich ist und durch GTP nicht aus dem Sediment extrahiert werden kann (Abb. 3.7). Die Zugabe von 0, 250, 500 oder 1000 mM NaCl führte zu keiner signifikanten Veränderung des Löslichkeits- oder Extraktionsverhaltens (Daten nicht gezeigt). Da die geringe Löslichkeit des Proteins möglicherweise auf die Entfernung des C-Terminus beruht, wurde auf die Reinigung von H-DymA Δ GED verzichtet und statt dessen die Reinigung von voraussichtlich löslichen Domänen versucht.

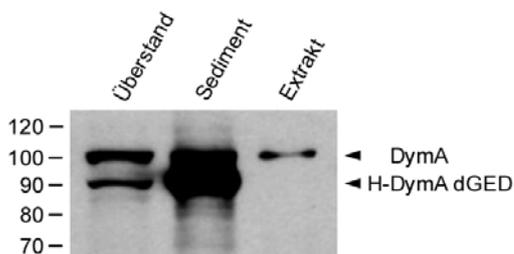


Abb. 3.7: Immunoblot der analytischen Reinigung von H-DymA Δ GED. Nach der Zellyse liegen endogenes Dynamamin A (96 kDa) und C-terminal verkürztes Dynamamin A (90 kDa) im Überstand vor. Im Sediment ist H-DymA Δ GED stark angereichert, es läßt sich aber nicht wie das endogene Dynamamin A durch GTP-Extraktion resolubilisieren.

3.2.3b Reinigung von H-DymA-372 aus *D. discoideum*

H-DymA-372 wurde gut exprimiert und lag teilweise löslich vor. Es wurde daher versucht, H-DymA-372 mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie zu reinigen (s. 2.3.7, Abb. 3.8a). Nach der Zellyse wurde das Rohlysat nur 30 min mit 10.000 g bei 4 °C zentrifugiert, um die Sedimentation von H-DymA-372 zu minimieren. Das Protein lag anschließend annähernd paritätisch im Überstand und im Sediment vor. Das lösliche Protein bindet aber nicht an die Ni-NTA-Matrix. Der Durchfluß enthielt gleiche Mengen an H-DymA-372 wie der aufgetragene Überstand. Entsprechend enthielt die Elution mit 50-250 mM Imidazol kein H-DymA-372 (Abb. 3.8a). Der Versuch H-DymA-372 mit 10 mM GTP aus dem Sediment zu extrahieren führte, selbst bei sehr sanfter Zentrifugation mit 5.000 g, zu keiner Resolubilisierung (Abb. 3.8b).

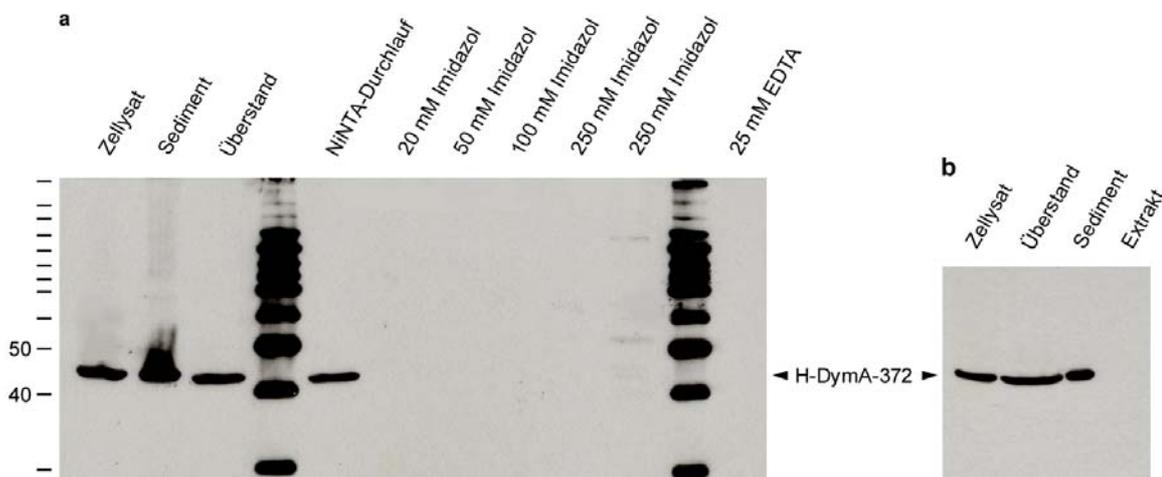


Abb. 3.8: Reinigung von H-DymA-372 aus *D. discoideum*. a) Ni-NTA-Chromatographie von H-DymA-372. Die Expression von H-dymA-372 ist im Zellysat sichtbar. Nach sanfter Zentrifugation liegt H-DymA-372 sowohl im Sediment als auch im Überstand vor. Das lösliche H-DymA-372 bindet nicht an die Ni-NTA-Matrix (vgl. Überstand und Ni-NTA-Durchlauf). Die mit Imidazol oder EDTA eluierte Fraktionen enthalten kein H-DymA-372. b) H-DymA-372 läßt sich auch nach sanfter Zentrifugation nicht durch GTP aus dem Sediment extrahieren.

Die Klonierung der *dymA*-Fragmente in pDXA-3H erfolgte stets über PCR-generierte *XhoI*- und *XbaI*-Schnittstellen, wodurch hinter den Histidincodons am 5'-Ende ein in *D. discoideum* selten benutztes Arginin-Codon (CGA) eingeführt wird. Da dies ein Grund für die geringe Expression sein könnte, wurde das *XhoI*-generierte 5'-Ende mit dem 5'-Ende aus pDXA-H *dymA* ersetzt. pDXA-H *dymA* wurde nicht mit *XhoI* und *XbaI* kloniert (Wienke *et al.*, 1999) und zeigte gute Expression (s. Abb. 3.6). Das 5'-Ende der codierenden Sequenz aus pDXA-H *dymA* (-10 bp bis +627 bp) wurde mit *HindIII* und *BamHI* herausgeschnitten und in den mit *HindIII* und *BamHI* linearisierten Vektor pDXA-H *dymA*-304 und pDXA-H *dymA*-372 ligiert. Diese Substitution führte allerdings zu keiner signifikanten Verbesserung der Expression einer der beiden *dymA*-Konstrukte (Daten nicht gezeigt).

3.2.4 Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus *D. discoideum*

Die Expression von GST-*dymA-304* und GST-*dymA-372* war gut (Daten nicht gezeigt). Dagegen konnte die GST-GED oft nur in geringen Mengen oder gar nicht nachgewiesen werden. Bei manchen Klonen lag mehr Glutathion-S-Transferase (27 kDa) als GST-GED Fusionsprotein (41 kDa) vor (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise wurde hier die GED durch eine endogene Protease entfernt.

Die Affinitätschromatographie von GST-DymA-304 mittels Glutathion (GSH)-Sephharose (Pharmacia) führte nicht zur erwünschten Anreicherung des GST-Fusionsproteins. Die Matrix wird stark durch endogene Proteine belegt, so daß nur geringe Mengen des gewünschten GST-Fusionsproteins binden (Abb. 3.9). Zudem ist die Ausbeute der Thrombin-vermittelten Abspaltung des GST-Fusionsanteils nur gering (< 50%). Für die Reinigungen von Proteinen aus *D. discoideum* scheint die (GSH)-Affinitätschromatographie als erster Chromatographieschritt wenig geeignet zu sein.

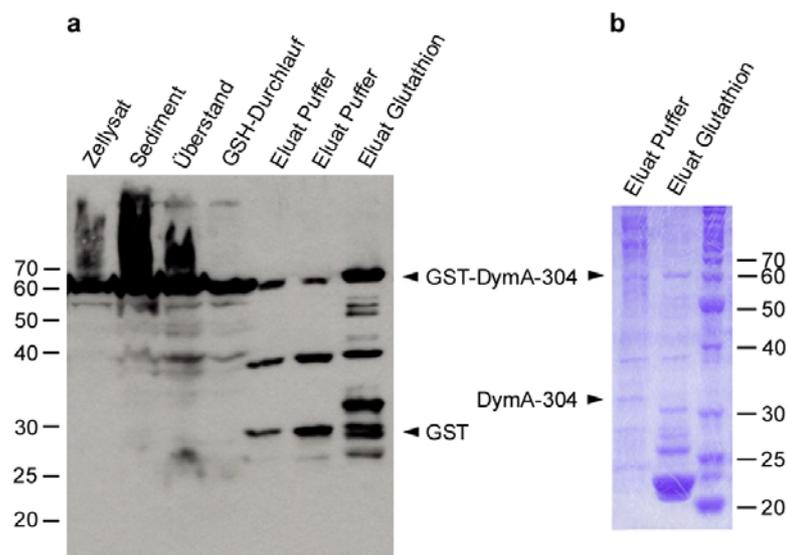


Abb. 3.9: GSH-Affinitätschromatographie von GST-DymA-304. **a)** GST-spezifischer Immunoblot, **b)** Coomassiegefärbetes SDS-Polyacrylamidgel. Das Fusionsprotein (60 kDa) kann im Immunoblot (a) nachgewiesen werden. Der lösliche Anteil (a: Überstand) passiert die GSH-Matrix zumeist (a: GSH-Durchlauf). Nach der Thrombin-vermittelten Spaltung werden neben diversen Proteinen nur geringe Mengen DymA-304 (33kDa) eluiert (b: Eluat Puffer). Bei Elution mit Glutathion (a,b: Eluat Glutathion) wird sichtbar, daß weniger als 50% des Fusionsprotein durch Thrombin gespalten wurde. Zudem wird deutlich sichtbar, daß diverse andere Proteine, die teilweise vom Anti-GST-Antikörper erkannt werden, an die GSH-Matrix binden. Eine Anreicherung von H-DymA-304 konnte mittels GSH-Affinitätschromatographie nicht erzielt werden.

3.3 Expression von *dymA* in *E. coli*

Im Vergleich zu *D. discoideum* besitzt das bakterielle Expressionssystem *E. coli* einige Vorteile: die effizientere Transformation mit rekombinanter DNA, die schnellere Selektion transformierter Organismen und schnellere Anzucht großer Zellmengen aufgrund der geringen Generationszeit sowie die starke Überexpression des rekombinanten Gens. Es wurde daher versucht Dynamin A und Fragmente von Dynamin A in *E. coli* zu exprimieren. Es wurden zwei verschiedene *E. coli* Stämme verwendet: SG13009 [pREP] (Qiagen, empfohlener Stamm für Expression aus pQE-Vektoren) und BL21 Codon+ (Stratagene, Expressionsstamm mit tRNAs für in *E. coli* selten verwendete Codons).

In SG13009 [pREP] wurde bei Expression von *H-dymA* sowie den Fragmenten *H-dymA-304* und *H-dymA-372* nur unlösliches Protein erhalten. Weder durch Variation der Temperatur (37 °C - 21 °C), noch der Induktionsdauer (2 -24 h), noch der IPTG-Konzentration (1.0 - 0.1 mM) konnte lösliches Protein erhalten werden. Das mittels Immunoblot nachgewiesene Protein befand sich stets ausschliesslich im Sediment (Daten nicht gezeigt).

Da die *D. discoideum* DNA teilweise in *E. coli* selten benutzte Codons enthält, wurde die Expression im *E. coli* Stamm BL21 Codon+ (Stratagene) versucht. Bei 21°C wurden *H-dymA-372* und *H-dymA-304* gut exprimiert, lagen aber vollständig im Sediment vor (Daten nicht gezeigt). Da die Bakterien nach der IPTG-Induktion kaum weiterwuchsen, sondern als weiße, fadenartige Strukturen ausfielen, wurde die Induktionsdauer auf 4 h begrenzt. Unter diesen Bedingungen wurde lösliches H-DymA-304 erhalten, das teilweise an eine Ni-NTA-Matrix band. Die Mengen erschienen aber zu gering und die Kontamination durch andere Proteine zu stark, um die Reinigung weiterzuverfolgen (Abb. 3.10).

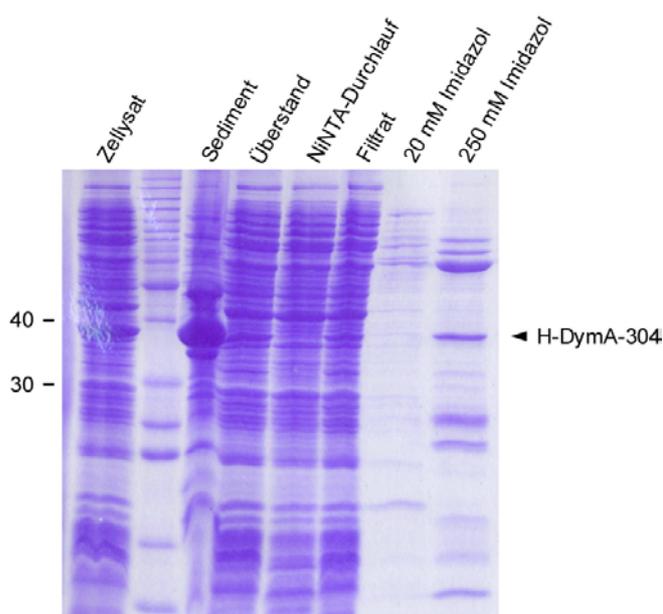


Abb. 3.10: Ni-NTA-Affinitätschromatographie von H-DymA-304. Die Überexpression des Proteins war im Zellysat zu erkennen. Nach Zentrifugation bei 10.000 g lag es vor allem im Sediment vor. Aufgrund der sanften Zentrifugation war der Überstand noch trüb und mußte vor der Auftragung auf die Chromatographiesäule durch einen 0.45 µm Filter filtriert werden. H-dymA-304 wurde weitestgehend durch die Ni-NTA-Matrix gebunden und nach einem Waschschrift mit 20 mM Imidazol mit 250 mM Imidazol eluiert. Das Eluat enthielt neben anderen Proteinen auch H-DymA-304.

3.4. Untersuchung der Lokalisation von Dynamin A

3.4.1 Zeitaufgelöste Lysomenreinigung

Dynamin A ist ein cytosolisches Protein, das auf endosomalen Vesikeln mit Vacuolin kolokalisiert (Wienke *et al.*, 1999). Daraus leitet sich die Hypothese ab, daß Dynamin A an diese Vesikel bindet und durch Abschnürungsprozesse an deren Formgebung beteiligt ist. Die Kolokalisation mit Vakuolin konnte in der Immunfluoreszenz bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Um die Lokalisation von Dynamin A an endocytotischen Vesikeln zeitlich auflösen zu können, wurde die zeitabhängige Isolierung der Vesikel mittels Eisendextran versucht (s. 2.5.4). Die isolierten Vesikel wurden durch Aufkochen in Probenpuffer lysiert und die kogereinigten Proteine mittels Immunoblot detektiert. Zunächst konnte Dynamin A in den frühen Proben und in der Positivkontrolle, die 120 min mit Eisendextran inkubiert wurde, nachgewiesen werden (Abb. 3.11a). Bei Einsatz des Ball-Homogenisator und Anwendung stringenter Waschbedingungen (um die Anreicherung nicht-lysierter, mit Eisendextran behafteten Zellen zu minimieren) wurden zwar Membranen isoliert, allerdings konnte auf ihnen kein Dynamin A nachgewiesen werden (Abb. 3.11b). Vermutlich ist der eingesetzte Magnet nicht stark genug, um unter stringenten Waschbedingungen genügende Vesikel anzureichern.

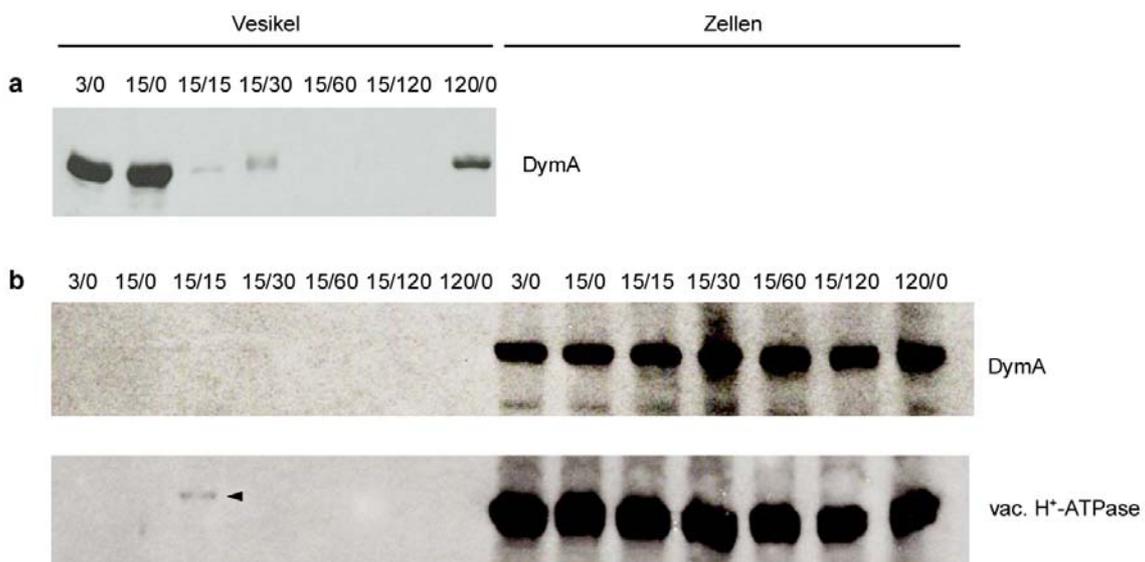


Abb. 3.11: Zeitaufgelöste Isolierung von endocytotischen Vesikeln mit Eisendextran. AX2 Zellen wurden für 15 min mit Eisendextran inkubiert, gewaschen und für weitere 120 min ohne Eisendextran kultiviert. Proben wurden nach 3 und 15 min Inkubation mit Eisendextran genommen (3/0, 15/0), sowie nach dem Waschen nach 15, 30, 60 und 120 min (15/15, 15/30, 15/60, 15/120). Als Positivkontrolle diente eine 120 min mit Eisendextran inkubierte Probe (120/0). Die magnetischen Vesikel wurden isoliert und mittels Immunoblot auf die Anwesenheit von Dynamin A und vakuoläre Protonen-ATPase geprüft. **a)** Ergebnis bei Filterlyse und wenig stringenten Waschbedingungen. Dynamin A wird vor allem in den ersten beiden Proben nachgewiesen, sowie in der Positivkontrolle. **b)** Ergebnis bei Einsatz des Ball-Homogenisators und stringenten Waschbedingungen. Dynamin A kann auf den Vesikeln nicht nachgewiesen werden, die vakuoläre Protonen-ATPase läßt sich schwach bei 15/15 Vesikeln nachweisen (Pfeil). Als Positivkontrolle für die eingesetzten Antikörper dient ein Zellysat.

3.4.2 Mitochondrienreinigung

Da die *dymA* Zellen elongierte Mitochondrien aufweisen, wurde für Dynamin A eine Funktion bei der Erhaltung der Morphologie der Mitochondrien postuliert (Wienke *et al.*, 1999). Es wurde daher versucht Dynamin A auf gereinigten Mitochondrien nachzuweisen. Die Mitochondrien wurden mittels differenzieller Zentrifugation aus *D. discoideum* gereinigt (s. 2.5.5) und ihre Reinigung mittels Immunoblot dokumentiert (Abb. 3.12). Der Marker für Mitochondrien, Mitoporin, konnte angereichert werden, aber Dynamin A ging während der Reinigung verloren. Das meiste Dynamin A lag im Cytosol vor, geringe Mengen korrelierten mit der Anwesenheit der vacuolären Protonen-ATPase, was auf eine Lokalisation von Dynamin A auf endosomalen oder vacuolären Vesikeln schließen läßt. Dynamin B, das eine mitochondriale Lokalisierungssequenz trägt, konnte dagegen erwartungsgemäß mit den Mitochondrien angereichert werden.

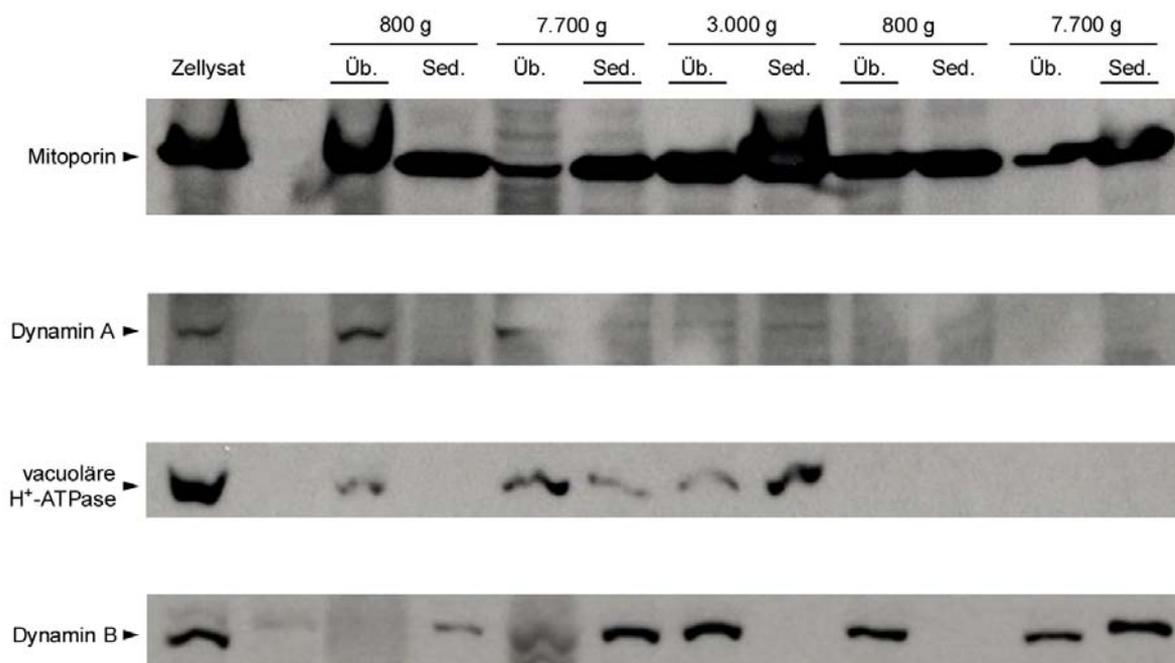


Abb. 3.12: Differenzielle Mitochondrienreinigung aus *D. discoideum*. Aus AX2 Zellen wurden Mitochondrien durch differenzielle Zentrifugation isoliert (s. 2.5.5). Nach der Lyse der Zellen wurde wie angegeben zentrifugiert und jeweils mit der unterstrichenen Fraktion weitergearbeitet. Das mitochondriale Mitoporin dient als Marker für die Anreicherung von Mitochondrien. Dynamin A bleibt während nach der zweiten Zentrifugation (7.700 g) weitestgehend im Überstand und wird verworfen. Die geringe Menge im Sediment korreliert mit der Anwesenheit der vacuolären Protonen-ATPase, die in der nachfolgenden Zentrifugation (3.000 g) abgetrennt wird. Diese Korrelation läßt vermuten, daß Dynamin A eher auf endosomalen und vacuolären Membranen lokalisiert ist als an Mitochondrien. Dagegen läßt sich Dynamin B, das eine mitochondriale Lokalisierungssequenz trägt, gut mit Mitochondrien anreichern.

3.5 Elektronenmikroskopische Analyse von Dynamin A

Um die Struktur und Funktion von Dynamin A zu verstehen, wurde dessen Assemblierungsverhalten im Transmission-Elektronenmikroskop untersucht. Für das Verständnis der Ergebnisse ist es wichtig zu verstehen, daß in der Transmissionselektronenmikroskopie jene Elektronen detektiert werden, die durch die zu untersuchende Struktur hindurchdringen. Somit wird nicht nur die Oberfläche der Struktur betrachtet, sondern vollständig durch sie hindurch gesehen. Die dreidimensionale Struktur wird auf dem planaren Detektor als zweidimensionales Bild abgebildet. Folglich ist dieses zweidimensionale Bild eine Projektion der dreidimensionalen Struktur.

Um *in vitro*-Artefakte zu minimieren, wurden alle Versuche zum Assemblierungsverhalten von Dynamin A bei annähernd physiologischer Ionenstärke in EM-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.0; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl₂) durchgeführt. Dabei wurde zunächst Dynamin A eingesetzt, das abweichend vom beschriebenen Protokoll (s. 2.3.6) durch Elution von der DEAE-Säule gereinigt wurde. Dieses Protein wurde freundlicherweise von Hartmut Niemann zur Verfügung gestellt.

3.5.1 Nukleotidfreies Dynamin A

In der Abwesenheit von Nukleotiden formte Dynamin A regelmäßige Ringe mit einem Außendurchmesser von 32 nm. Zudem formte es einige filamentartige Assemblierungen, die entweder Stapel von individuellen Ringen oder eine kontinuierliche Spirale sein können (Abb. 3.14). Auch einige kleiner Partikel, vermutlich nicht-assembliertes Dynamin A, waren zu beobachten.

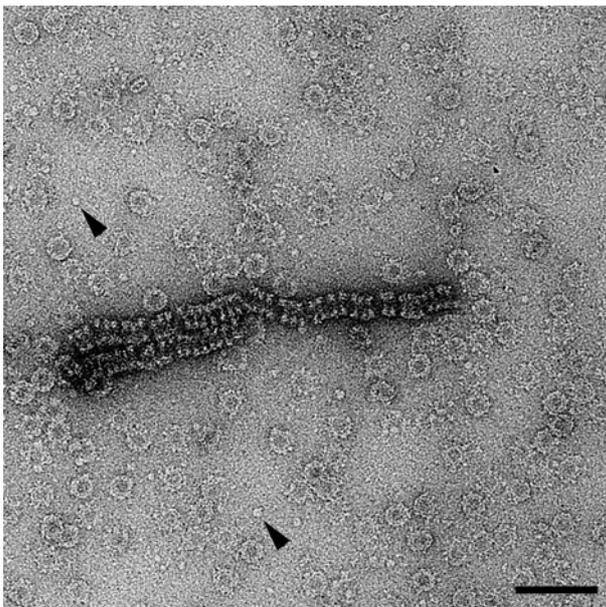


Abb. 3.14: Elektronenmikroskopische Aufnahme von nukleotidfreiem Dynamin A. Dynamin A formt regelmäßige Ringe und einige unregelmäßige filamentartige Assemblierungen. Diese können Stapel von individuellen Ringen oder eine kontinuierliche Helix sein. Einige kleinere Fragmente, vermutlich nicht-assembliertes Dynamin A, sind ebenfalls zu sehen. Der Balken entspricht 100 nm.

Die filamentartigen Assemblierungen tendierten dazu, sich zu großen, parallelen Bündeln zusammenzulagern, was eine detaillierte Analyse verhinderte. Einzelne filamentartige Assemblierungen waren zu unregelmäßig, um sie mit Fourier-Transformation zu untersuchen. Dagegen konnten die regelmäßig geformten Ringe mittels Einzelpartikelanalyse untersucht werden.

Bei der Einzelpartikelanalyse (*single particle analysis*) werden eine Vielzahl von Einzelbildern mit geringem Signal-zu-Rausch Verhältnis analysiert, um damit Superpositionen mit einem deutlich besseren Signal-zu-Rausch Verhältnis generieren zu können. In dieser Arbeit wurde dazu eine Symmetrieanalyse benutzt, die keine Vorlage für die Ausrichtung der zu untersuchenden Struktur benutzt, sondern diese aus den Strukturen selbst generiert (Abb. 3.14a-g; Dube *et al.*, 1993). Von den digitalisierten elektronen-mikroskopischen Aufnahmen wurden 898 Aufsichten der Ringkomplexe ausgewählt und analysiert (Abb. 3.14a). Im ersten Schritt wurden die Ringe zunächst zentriert. Dazu wurden sie zu einem Bild summiert, dieses Bild durch Rotation um den Mittelpunkt gemittelt und anschließend alle individuellen Ringe an dieser Vorlage durch ausschließlich translationale Bewegung ausgerichtet. Nach vier Wiederholungen waren die Ringe zentriert.

Durch eine multivariable statistische Analyse (MSA) wurden alle 898 Aufsichten gemäß ihrer gegenseitigen Ähnlichkeit in 90 Klassen aufgeteilt (Abb. 3.14b). Nun konnten die Symmetrieeigenschaften der Ringe mit der Eigenvektoranalyse untersucht werden (van Heel und Frank, 1981). Die Eigenvektoren eines Datensatzes beschreiben die Hauptunterschiede der individuellen Bilder zum gemittelten Bild und sind damit eine alternative Darstellung des gesamten Datensatzes. Da die Eigenvektoren selbst Bilder sind, illustrieren die resultierenden Eigenbilder die Unterschiede der individuellen Bilder des Datensatzes (van Heel, 1984; 1989). Sie visualisieren dabei auch die symmetrischen Eigenschaften der zu untersuchenden Struktur (Dube *et al.*, 1993). Für die Aufsichten auf den nukleotidfreien Dynamin A Ringkomplex zeigten die Eigenbilder eine klare 11-fache Rotationssymmetrie an (Abb. 3.14c). Das Fehlen von anderen Rotationssymmetrien demonstriert, daß die Ringkomplexe einheitlich aufgebaut waren.

Die 90 Klassen wurden durch Rotation gegeneinander ausgerichtet (Abb. 3.14d) und anschließend durch eine erneute MSA gemäß ihrer gegenseitigen Ähnlichkeit in 9 Klassen eingeteilt. Diese Klassen waren alle ähnlich (Abb. 3.14e), daher wurde die bestdefinierte Klasse als Referenz ausgewählt für die nachfolgende Ausrichtung aller individuellen Ansichten verwendet. Da die 11-fache Rotationssymmetrie des Ringkomplexes einwandfrei nachgewiesen werden konnte, wurde diese Vorlage rotationsymmetrisch gemittelt und so das Signal-zu-Rausch Verhältnis nochmals verbessert.

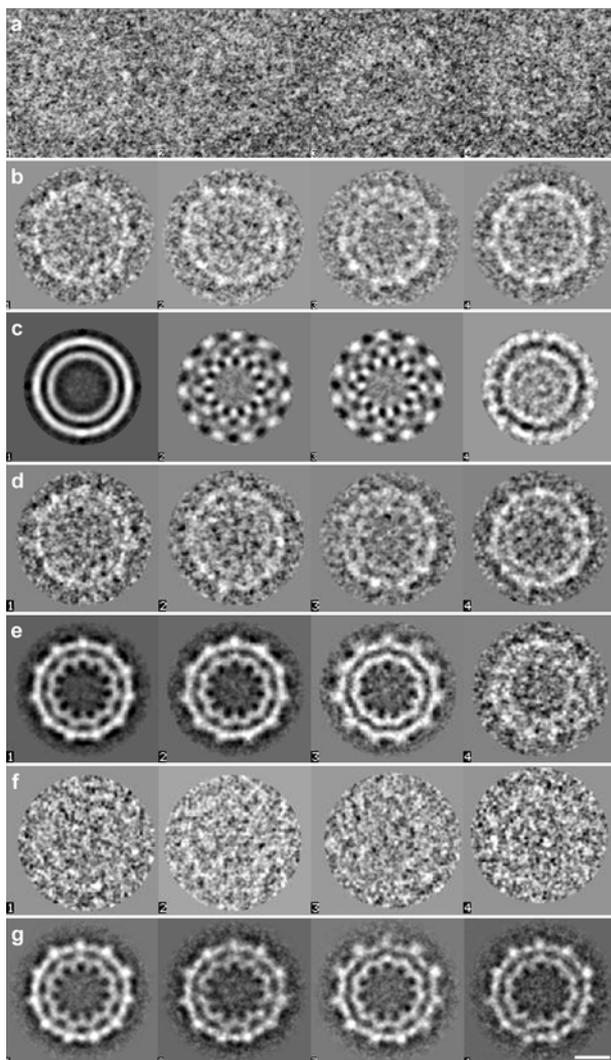


Abb. 3.14: Einzelpartikelanalyse der Aufsichten des nukleotidfreien Dynamin A Ringkomplexes. **a)** Vier der 989 individuellen Aufsichten, die für die Analyse ausgewählt wurden. Diese Rohdaten sind stark verrauscht. **b)** Vier der 90 Klassen, die nach der MSA-Klassifizierung der lediglich zentrierten Aufsichten erhalten wurden. Zwei konzentrische Ringe werden erkennbar. **c)** Die vier ersten Eigenbilder der Eigenvektoranalyse. Das erste entspricht dem gemittelten Bild aller individuellen Aufsichten des Datensatzes. Die nächsten zwei Eigenbilder (identische, um 90° phasenverschobene symmetrische Wellenmuster) illustrieren den wichtigsten Unterschied der individuellen Aufsichten: die unterschiedliche Ausrichtung einer 11-fach symmetrischen Komponente. In den nachfolgenden Eigenbildern sich keine weiteren Symmetrien erkennbar, was den gleichförmigen Aufbau der Ringkomplexe dokumentiert. **d)** Vier der 90 Klassen nach gegenseitiger Ausrichtung, die nun gleich orientiert sind. **e)** Vier der 9 Klassen, die nach der MSA-Klassifizierung der 90 gleichorientierten Klassen erhalten wurden. Die sehr ähnlichen Klassen zeigen alle zwei konzentrische Ringe mit je 11-facher Symmetrie. Die Klasse 1 diente als Vorlage für die anschließende Ausrichtung aller individuellen Aufsichten. **f)** Vier der 898 individuellen Aufsichten nach Ausrichtung auf die Vorlage aus (e). **g)** Alle vier Klassen, die nach MSA-Klassifizierung der ausgerichteten individuellen Aufsichten erhalten wurden. Die hohe Ähnlichkeit erlaubt die Summierung aller individuellen Aufsichten zu einer Superposition. Der Balken entspricht 10 nm.

Da der Ringkomplex in der Aufsicht in prinzipiell zwei verschiedenen Orientierungen vorliegen kann (nach oben oder nach unten orientiert, flip oder flop) wurden die 898 Einzelbilder in einer Multireferenz-Analyse (MRA) an der Referenz (flip) und seinem Spiegelbild (flop) ausgerichtet (Abb. 3.14f). Die nachfolgende Klassifizierung der Einzelbilder mittels MSA in 12 oder vier Klassen führte zu Superpositionen ohne erkennbare Unterschiede (Abb. 3.14g), was den identischen Aufbau der Ringkomplexe bestätigt und die Summierung aller 898 Einzelbilder zu einer Superposition erlaubt. Die resultierende Superposition zeigt die Aufsicht durch den nukleotidfreien Dynamin A Ringkomplex mit einer Auflösung von 25 \AA (Abb. 3.15). Die Auflösung wurde mittels Fourier Ringkorrelation ermittelt, wobei die ausgerichteten Bilder des Datensatzes in zwei Subdatensätze geteilt werden, deren Summen miteinander verglichen werden und die signifikanten Unterschiede (oberhalb der dreifachen Standardabweichung) bestimmt werden.

Die Superposition (Abb. 3.15) zeigt, daß der Ringkomplex aus zwei konzentrischen Ringen besteht, die beide eine 11-fache Rotationssymmetrie aufweisen. Von den globulären Dichten auf dem äußeren Ring stellt geringe Dichte die Verbindung zum inneren Ring her, der wiederum spitze Strukturen Richtung Mittelpunkt ausbildet. Der maximale Außendurchmesser des Ringkomplexes beträgt 32 nm, der minimale Innendurchmesser (zwischen den Enden der spitzen Strukturen des inneren Ringes) beträgt 12 nm. Um den Durchmesser des 11-fach rotationssymmetrischen Ringes besser beschreiben zu können, wurde der Ringkomplex durch Rotation um den Mittelpunkt gemittelt und der Durchmesser des äußeren und des inneren Rings mit 26 nm und 18 nm festgestellt. Die Symmetrie der beiden Ringe impliziert, daß sich der Ringkomplex aus 11 asymmetrischen Einheiten zusammensetzt, wobei jede asymmetrische Einheit ein Segment des inneren und des äußeren Ringes enthält.

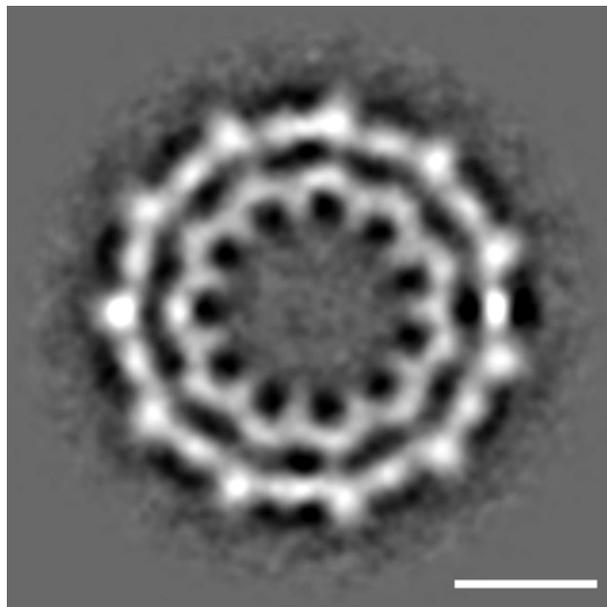


Abb. 3.15: Aufsicht durch den nukleotidfreien Dynamin A Ringkomplex. Der Ringkomplex besteht aus zwei konzentrischen Ringen (äußerer und innerer Ring), die beide eine 11-fache Rotationssymmetrie aufweisen. Die Durchmesser der beiden Ringe betragen 26 nm bzw. 18 nm. Der innere Ring formt an seiner Innenseite spitze Strukturen aus. Die Superposition aus 898 individuellen Aufsichten hat ein Auflösungsvermögen von 25 Å. Der Balken entspricht 10 nm.

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der nukleotidfreien Ringkomplexe waren teilweise auch Seitenansichten von einzelnen Ringkomplexen zu sehen, die auf der Seite stehend in der Färbelösung eingebettet waren (s. auch Abb. 3.22). Da diese Seitenansichten senkrecht zu den Aufsichten stehen, konnte aus ihnen die strukturelle Information gewonnen werden, die zur Generierung einer dreidimensionalen Karte des Dynamin A Ringkomplexes benötigt wird. Es wurden 310 Seitenansichten mittels Einzelpartikelanalyse wie oben beschrieben untersucht und eine

Superposition der Seitenansichten generiert (Abb. 3.16). Die Seitenansicht hat eine geringe Auflösung, besonders im Inneren des Ringkomplexes, da sich die 11 Untereinheiten in der Seitenansicht (oder besser: Seitendurchsicht) grundsätzlich nicht zur Superposition bringen lassen. Zudem kann bei der Ausrichtung der Einzelbilder die Rotationsvariation der einzelnen Ringkomplexe nicht nachträglich korrigiert werden, wie es bei den Aufsichten möglich ist. Dennoch sind der äußere und der innere Ring als hohe Dichte am Rande der Seitenansicht eindeutig zu erkennen. Die Seitenansicht besitzt eine Symmetrieebene, die impliziert, daß der Ringkomplex aus zwei, einander zugewandten Lagen besteht. Da dies in der Aufsichten nicht erkennbar ist, müssen die beiden Lagen sehr gut superpositionieren, wenn sie entlang der zentralen Achse beobachtet werden.

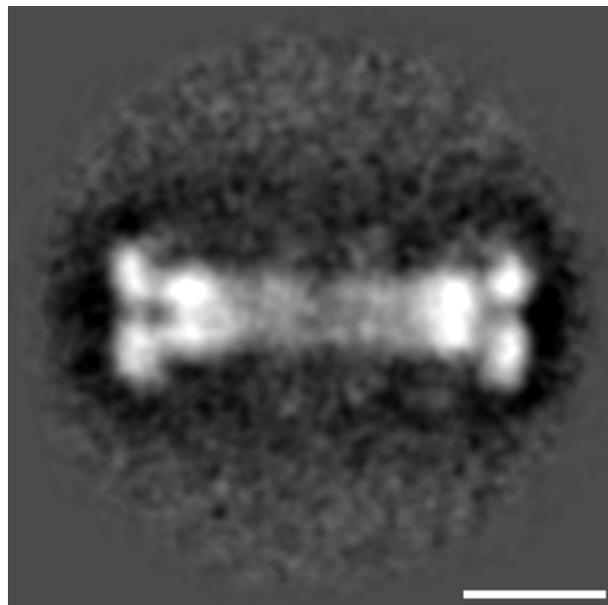


Abb. 3.16: Superposition von 310 Seitenansichten des nukleotidfreien Dynamin A Ringkomplex. Der Ringkomplex besitzt eine Symmetrieebene und besteht daher aus zwei einander zugewandten Lagen. An den Rändern sind der innere und der äußere Ring sichtbar. Sie bilden zusammen eine T-förmige Silhouette. Der Balken entspricht 10 nm.

Aus den Superpositionen der Aufsichten und der Seitenansichten wurde die dreidimensionale Karte des nukleotidfreien Dynamin A Ringkomplexes berechnet. Statt der Superposition aller Seitenansichten wurden die in zehn Klassen aufgeteilte Seitenansichten verwendet, da sie weniger negative Interferenz beinhalten und verschiedene Seitenansichten darstellen (Daten nicht gezeigt). Die zugrundeliegende Methode der Berechnung einer dreidimensionalen Struktur aus zweidimensionalen Projektionen heißt Winkelrekonstitution (engl.: *angular reconstitution*) und ist unter 2.4.2 kurz erklärt. Die resultierende dreidimensionale Karte (Abb. 3.17) bestätigt die Hypothese, daß der Ringkomplex aus zwei, einander zugewandten Lagen aufgebaut ist. Damit besteht der gesamte

Ringkomplex aus 22 asymmetrischen Einheiten, die jeweils innerhalb einer Lage ein Segment des äußeren und des inneren Ringes umfassen. Die in den beiden Lagen benachbarten asymmetrischen Untereinheiten bilden eine einzelne, kegelartige Struktur an der Innenseite des inneren Rings. Möglicherweise bilden sie ein funktionelles Dimer. Um die Anzahl der Dynamin A Moleküle innerhalb des Ringkomplexes abschätzen zu können, wurde das Volumen der dargestellten Karte berechnet. Die errechnete Wert von 2.1 MDa entspricht exakt 22 Dynamin A Molekülen mit je 96 kDa. Daraus resultiert, daß die asymmetrische Einheit ein Dynamin A Molekül enthält.

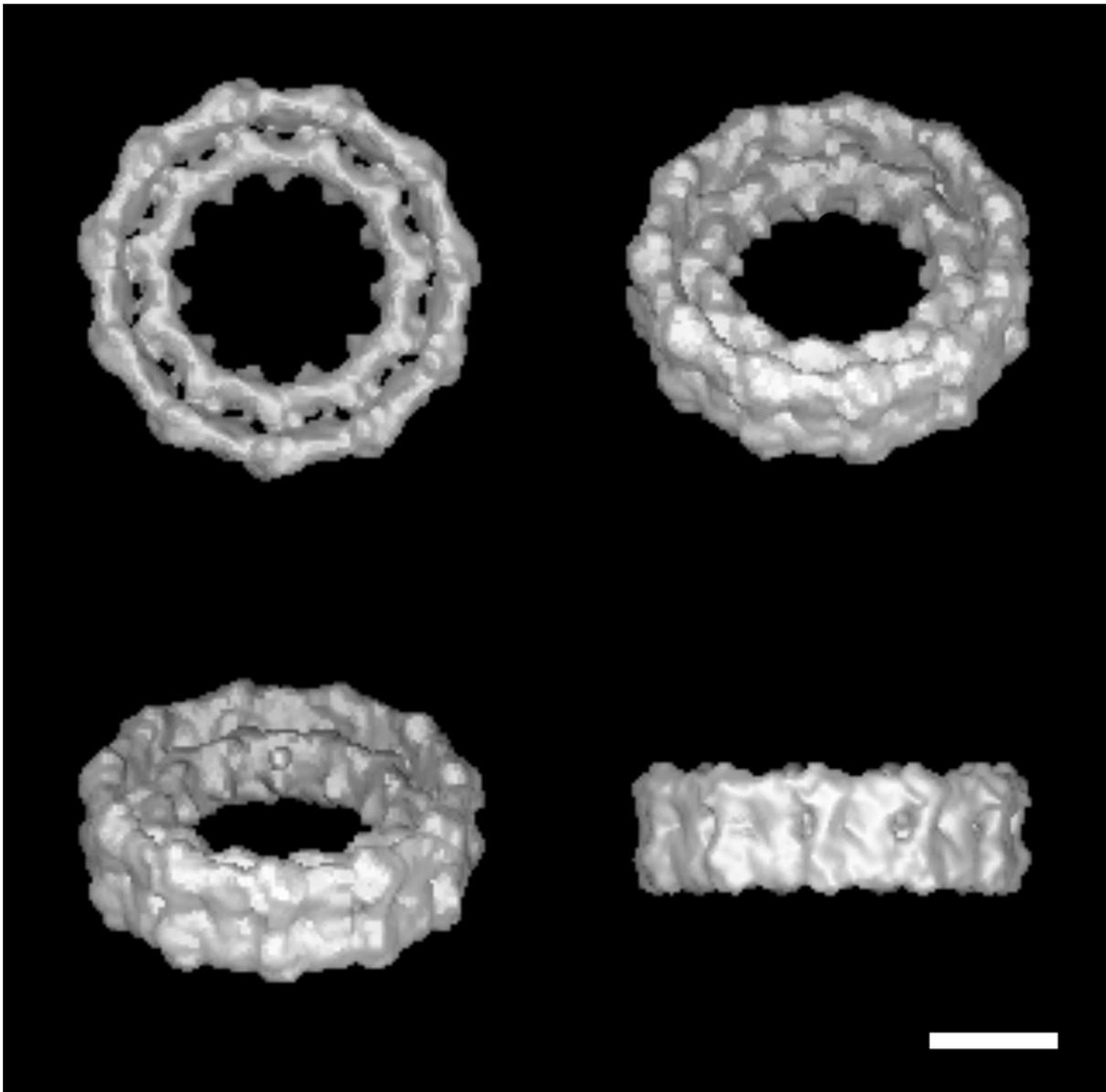


Abb. 3.17: Dreidimensionale Struktur des nukleotidfreien Dynamin A Ringkomplex. Aus der Superposition der 898 Aufsichten sowie 10 Klassen der 310 Seitenansichten wurde durch *angular reconstitution* die dargestellte Struktur berechnet. Aus dem Volumen läßt sich die Masse des Komplexes mit 2.1 MDa abschätzen. Der Balken entspricht 10 nm.

3.5.2 Dynamin A in der Gegenwart von GppNHp

Mit dem schwer-hydrolysierbaren GTP-Analog GppNHp kann der GTP-gebundene Zustand nachgestellt werden. Um sicherzustellen, daß GppNHp während der Inkubation vor der Färbung nicht hydrolysiert wird, wurde die GppNHp-Hydrolyserate von Dynamin A durch analytische HPLC (s. 2.3.8) bestimmt. Nach 12 Stunden bei 20 °C war keine Hydrolyse von 1 mM GppNHp durch 1 µM Dynamin A erfolgt, während 1 mM GTP mit $\tau_{1/2} = 70$ min hydrolysiert worden war (Abb. 3.18).

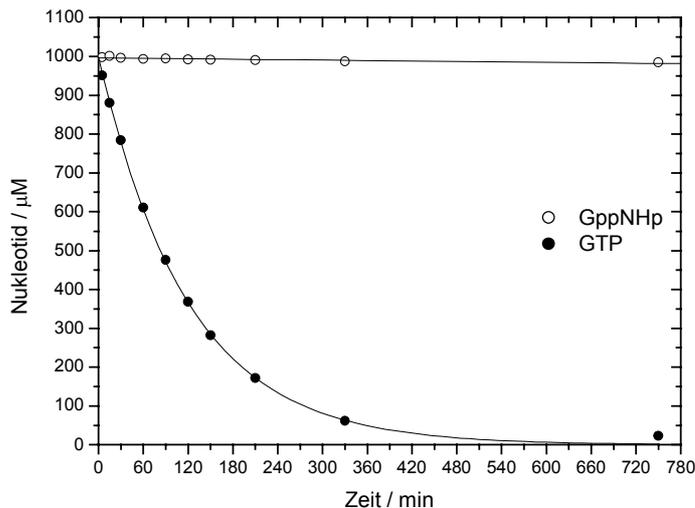


Abb. 3.18 Hydrolyse von GTP und GppNHp durch Dynamin A. 1 µM Dynamin A wurde bei 20 °C mit 1 mM GTP oder 1 mM GppNHp inkubiert. Während GTP vollständig zu GDP hydrolysiert wird, konnte nach 12 Stunden keine Hydrolyse von GppNHp detektiert werden.

Nach Zugabe von 1 mM GppNHp zu nukleotidfreiem Dynamin A wurden weniger Ringe und mehr filamentartige Assemblierungen als im nukleotidfreien Zustand beobachtet. Die Assemblierungen waren regelmäßig und eng gepackt und wiesen eine Interring-Abstand von ~ 10 nm auf (Abb. 3.19).

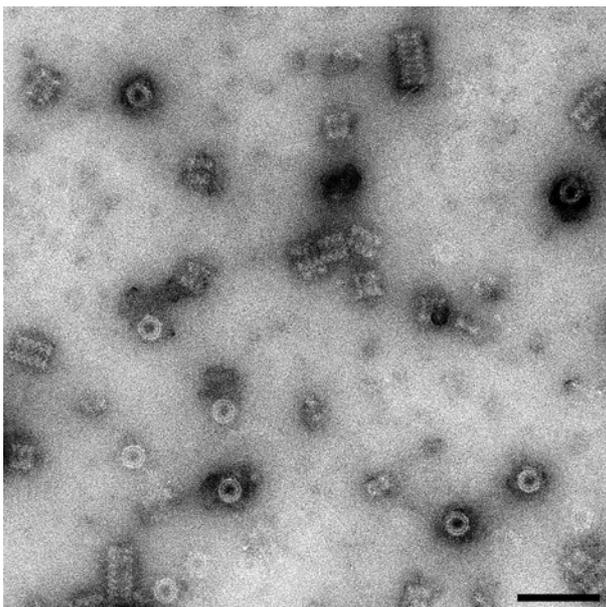


Abb. 3.19: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Dynamin A in Gegenwart von GppNHp. Dynamin A formt eng gepackte und sehr regelmäßige filamentartige Assemblierungen mit einem Interring-Abstand von etwa 10 nm. Es sind viel weniger Ringe zu sehen als in der Abwesenheit von Nucleotiden. Der Balken entspricht 100 nm.

Um diese Konformationsänderung zu untersuchen, wurden 954 Aufsichten der verbliebenen ringähnlichen Strukturen ausgewählt und wie oben beschrieben mittels Einzelpartikelanalyse untersucht. Schon die individuellen Bilder der ringartigen Strukturen wiesen stark unterschiedliche Durchmesser auf (Abb. 3.20a). Nach MSA-Klassifizierung in 95 Klassen bestätigte die Analyse der Eigenbilder, daß die Durchmesservariationen der Hauptunterschied zwischen den individuellen Bildern ist (Daten nicht gezeigt). Dies impliziert, daß die ringähnlichen Strukturen nach Zugabe von GppNHp ihren Durchmesser verändert haben. Die 95 Klassen wurden durch Rotation gegeneinander ausgerichtet und durch erneute MSA in 20 Klassen eingeteilt. Aus diesen 20 Klassen wurden vier gut definierte ringartige Strukturen mit unterschiedlichen Durchmessern ausgewählt und mit ihren Spiegelbildern als Referenz für die Ausrichtung aller 954 ringartigen Strukturen mittels MRA eingesetzt (Daten nicht gezeigt). Durch MSA-Klassifizierung in acht 8 Klassen wurden ringartige Strukturen erhalten, die nicht nur stark unterschiedliche Durchmesser aufweisen, sondern auch unterschiedliche strukturelle Details enthalten (Abb. 3.20b). So ist die ringartige Struktur mit dem größten Durchmesser (Klasse 1) vollständig definiert, aber mit abnehmenden Durchmesser (von Klasse 1 nach 8) verschimmt die Trennung von innerem und äußerem Ring zunehmend bis sie in der Struktur mit dem kleinsten Durchmesser vollständig verschwommen ist (Klasse 8). Gleichzeitig wird im Inneren der Struktur Dichte sichtbar, die mit abnehmenden Durchmesser intensiver wird. Diese graduellen Veränderungen lassen vermuten, daß die große ringartige Struktur (Klasse 1) sich zu Strukturen mit kleineren Durchmessern (Klasse 8) reorganisieren kann, oder umgekehrt. Da der nukleotidfreie Dynamin A Ringkomplex eher der Struktur in Klasse 1 als der in Klasse 8 ähnelt, scheint GppNHp die Bildung von ringartigen Strukturen mit kleinerem Durchmesser zu induzieren.

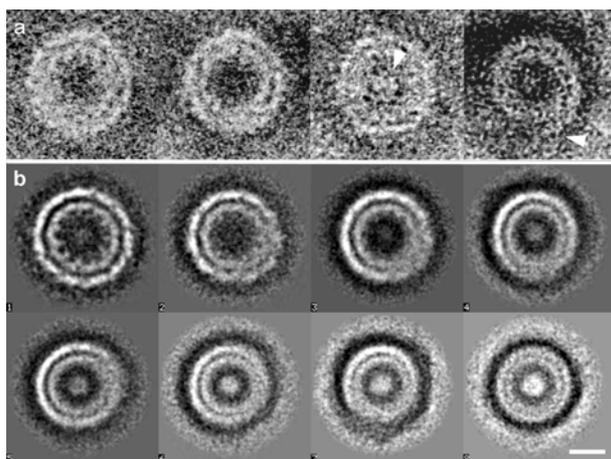


Abb. 3.20: Durchmesservariation des Dynamin Ringkomplexes in Gegenwart von GppNHp. **a)** Vier individuelle Ansichten, die für die Analyse ausgewählt wurden. Bereits in den Rohdaten sind die unterschiedlichen Durchmesser erkennbar. Manchmal ist das Ende der Proteinkette sichtbar (Pfeile) **b)** Acht Klassen, die nach MSA-Klassifizierung der 954 individuellen Ansichten erhalten wurden, zeigen die Durchmesserunterschiede. Mit abnehmenden Durchmesser (von Klasse 1 nach 8) verschimmt ein größer werdendes Segment der Ringstruktur. Der Balken entspricht 10 nm.

Um diese Hypothese zu testen wurden die großen und die kleinen ringartigen Strukturen getrennt analysiert, zum einen die 184 Einzelbilder der Klasse mit großem Durchmesser (Klasse 1) und zum anderen die drei Klassen mit ähnlich kleinem Durchmesser (Klassen 6-8). Die resultierenden

Superpositionen zeigen drei wesentliche Unterschiede auf: Erstens besitzt die große ringartige Struktur (Abb. 3.21a) einen durchschnittlichen äußeren und inneren Durchmesser von 26 nm bzw. 18 nm, identisch mit dem nukleotidfreien Dynamin A Ringkomplex, während die kleine ringartige Struktur (Abb. 3.21b) einen durchschnittlichen äußeren und inneren Durchmesser von 21 nm und 15 nm besitzt. Die unterschiedlichen Durchmesser zeigen, daß der Ringkomplex durch Bindung von GppNHp seinen Durchmesser um bis zu 20 % verkleinert. Zweitens weist weder die Superposition noch die Analyse der Eigenbilder auf eine Rotationssymmetrie der kleinen ringartigen Struktur hin, während für die große ringartige Struktur in der Superposition und in den Eigenbildern eine 11-fache Symmetrie erkennbar wird (Abb. 3.21a). Die Verminderung des Durchmessers scheint mit dem Verlust der 11-fache Rotationssymmetrie einherzugehen. Drittens bleibt in der kleinen ringartigen Struktur ein kleiner Bereich innerhalb der ansonsten gut definierten Struktur verschwommen (Abb. 3.21b Pfeilspitze), während die große ringartige Struktur vollständig definiert ist.

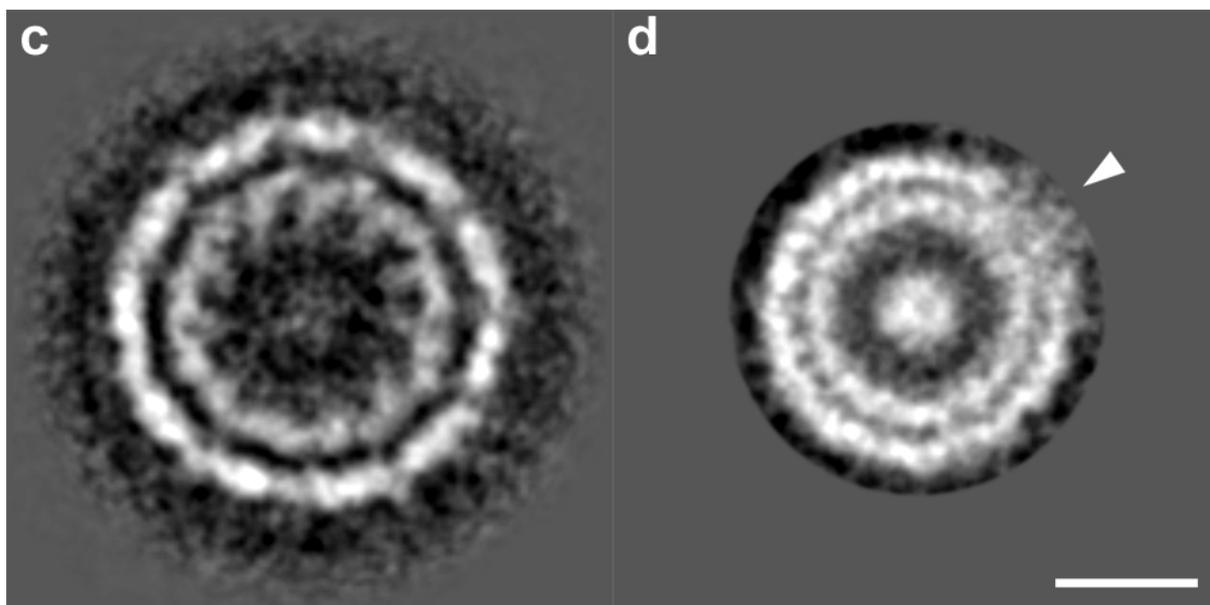


Abb. 3.21 Superposition von ringartigen Strukturen in der Gegenwart von GppNHp. a) Superposition von 184 Aufsichten mit großem Durchmesser. Der äußere und innere Ring haben Durchmesser von 26 nm bzw. 18 nm. Die in der Eigenvektoranalyse festgestellte 11-fache Symmetrie des Komplexes wird anhand struktureller Details sichtbar, wie den spitzen Strukturen an der Innenseite des inneren Rings. **b)** Superposition von 188 Aufsichten mit kleinem Durchmesser, die vermutlich Aufsichten durch stehende Helices darstellen. Der äußere und der innere Ring haben Durchmesser von 21 nm bzw. 15 nm. Weder Rotationssymmetrie noch strukturelle Details konnten aufgelöst werden. Zudem bleibt in kleines Segment der ringartigen Struktur stark verschwommen. Der Balken entspricht 10 nm.

Diese Unterschiede zeigen, daß die beiden Superpositionen unterschiedlich organisierte Strukturen darstellen und lassen vermuten, daß die große ringartige Struktur eine Superposition von Aufsichten durch individuelle Ringkomplexe ist, während die kleine ringartige Struktur eine Superposition von

Aufsichten durch kurze Helices darstellt. Diese Interpretation kann die aufgezeigten Unterschiede in den Superposition erklären. Zum einen ist die Anzahl der asymmetrischen Einheiten innerhalb einer Helixwindung nicht zwangsläufig ganzzahlig. In diesem Fall superpositionieren die asymmetrischen Einheiten bei der Betrachtung entlang der zentralen Achse nicht, so daß die Rotationssymmetrie nicht mehr detektierbar ist und die strukturellen Details aufgrund mangelnder Superposition verloren gehen. Zum anderen sind die Enden einer Helix möglicherweise labil und tragen beim Mitteln der Bilder zum Verschwimmen eines kleinen Segmentes bei. Diese Labilität wird bei manchen Einzelbildern tatsächlich beobachtet, wenn das Ende der Proteinkette sichtbar wird (Abb. 3.20a, Pfeile). Fällt das Ende in das Innere der Helix, so generiert es dort Dichte. Mit zunehmender Länge der Helix sollte das Ende besser im Inneren fixiert werden, was die zunehmende Dichte am Mittelpunkt der ringartigen Strukturen erklären könnte (Abb. 3.20b). Zusammenfassend zeigt die Analyse der Aufsichten eine klare Reorganisation und damit verbundene Kontraktion des Ringkomplex bei Bindung von GppNHp.

3.5.3 Dynamin A in der Gegenwart von GDP oder GDP+AIF_x

GDP und AIF_x können den Übergangszustand der Hydrolyse nachstellen, wie es für die G_α-Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine und für den Ras-RasGAP-Komplex gezeigt wurde (Sondek *et al.*, 1994; Scheffzek *et al.*, 1997). Nach Inkubation von nukleotidfreiem Dynamin A mit GDP und AIF_x für 10 min bei Raumtemperatur oder 20 Stunden auf Eis, wurden individuelle Ringe und einige wenige filamentartig Assemblierungen beobachtet (Abb. 3.22a). 900 Ringe wurden wie oben beschrieben mittels Einzelpartikelanalyse untersucht. Die Analyse der Eigenbilder zeigte eine 11-fache Symmetrie, aber keine Durchmesservariation für die Ringe auf (Daten nicht gezeigt). Die Superposition des Ringkomplexes in der Anwesenheit von GDP+AIF_x (Abb. 3.22b) gleicht der Superposition des nukleotidfreien Ringkomplex (s. Abb. 3.15). Sie besitzen identische Durchmesser und ähnliche strukturelle Details wie die globuläre Masse auf dem äußeren Ring und die spitzen Strukturen an der Innenseite des inneren Rings.

Um sicherzustellen, daß die Präformation des nukleotidfreien Ringkomplexes nicht die Ausbildung des Übergangszustandes verhindert, wurde zu nukleotidfreiem Dynamin A GTP gegeben. Nachdem durch analytische HPLC die vollständige Umsetzung zu GDP bestätigt worden war, wurde AIF_x zugegeben, um die Formation des Übergangszustandes zu induzieren. Diese Art der Probenvorbereitung brachte keine Änderung im Vergleich zur direkten Zugabe von GDP und AIF_x zu nukleotidfreiem Dynamin A.

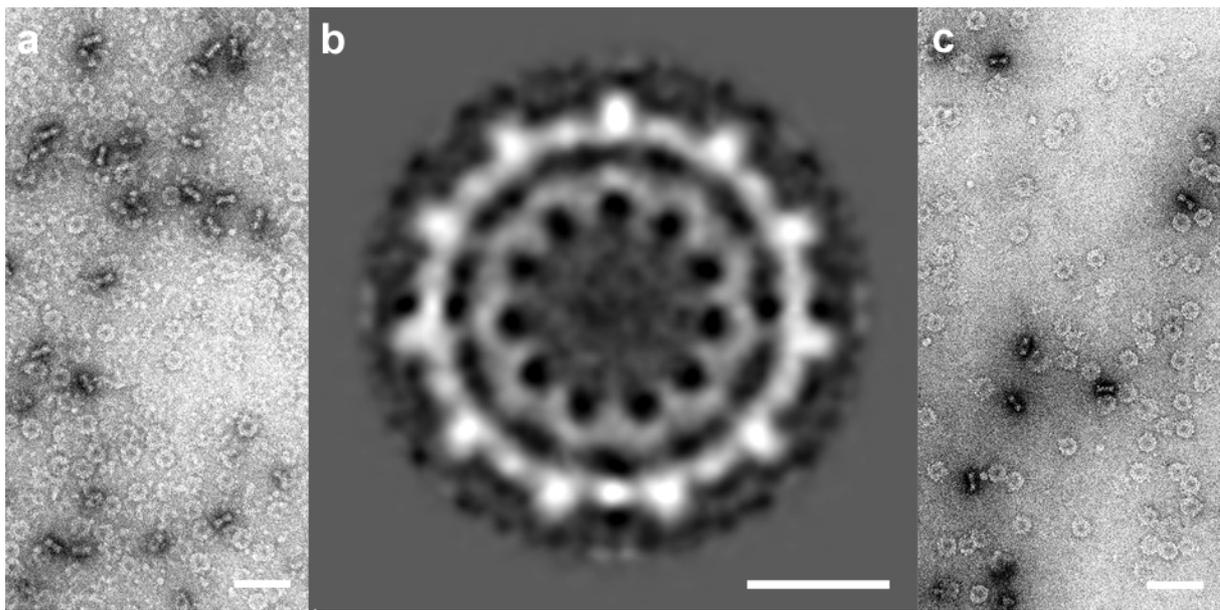


Abb. 3.22: Vergleich von Dynamin A in der Gegenwart von GDP+AIF_x und in der Gegenwart von GDP. a) Dynamin A Ringkomplexe in der Gegenwart von GDP+AIF_x nach 20 h Inkubation. Aufsichten und Seitenansichten von individuellen Ringkomplexen sind zu sehen. b) Superposition von 900 Aufsichten des Dynamin A Ringkomplexes in der Gegenwart von GDP+AIF_x. Der äußere und innere Ring haben Durchmesser von 26 nm bzw. 18 nm, identisch zum nukleotidfreien Ringkomplex. c) Dynamin A Ringkomplexe in der Gegenwart von GDP nach 20 h Inkubation. Wie in (a) werden Aufsichten und Seitenansichten von individuellen Ringkomplexen beobachtet. Der Balken in (a) und (c) entspricht 100 nm, der Balken in (b) entspricht 10 nm.

Bei Inkubation von nukleotidfreien Dynamin A Ringkomplexen mit GDP für 10 min bei Raumtemperatur oder 20 Stunden auf Eis, oder nach Umsatz von 1 mM GTP wurden einzelne Ringe und einige irreguläre filamentartige Assemblierungen beobachtet, identisch zu den Beobachtungen in der Gegenwart von GDP+AIF_x (Abb. 3.22c). 516 Einzelbilder wurden wie oben beschrieben mittels Einzelpartikelanalyse untersucht und eine Superposition erhalten, die keine signifikanten Unterschiede zu der in der Gegenwart von GDP+AIF_x aufwies (Daten nicht gezeigt).

3.6 Biochemische Charakterisierung von Dynamin A

3.6.1 Assemblierung von Dynamin A in Lösung

Die nukleotidabhängige Ausbildung von filamentartigen Assemblierungen wie sie mittels der Elektronenmikroskopie beobachtet wurden, wurden in Lösung getestet. Dazu wurde Dynamin A in EM₁₅₀-Puffer entweder ohne oder mit 1 mM GDP, GDP+AIF_x, GppNHp oder GTPγS inkubiert. Nach Zentrifugation bei 100.000 g wurden der Überstand und das Sediment mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.23). Dynamin A blieb vollständig löslich, außer nach Inkubation mit GppNHp oder GTPγS, wonach es vollständig im Sediment vorlag. Dies bestätigt das Modell, wonach stabile filamentartige

Assemblierungen nur in Gegenwart von schwer-hydrolysierten GTP-Analoga auftreten. Wurde die Konzentration an GTP γ S von 1 mM auf 10 μ M und damit unter die K_M von GTP (68 μ M, s. 3.7.1) reduziert so blieb Dynamin A löslich (Abb. 3.23).

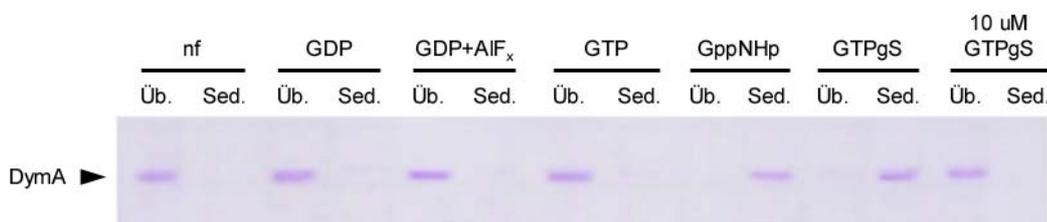


Abb. 3.23: Nukleotidabhängigkeit der Löslichkeit von Dynamin A. 1 μ M Dynamin A bleibt in Abwesenheit von Nukleotiden und in Gegenwart von GTP, GDP+AIF $_x$ oder GDP nach Zentrifugation bei 100.000 g löslich. In Gegenwart der schwer-hydrolysierten GTP-Nukleotidanaloga GppNHp oder GTP γ S sedimentierte es. Bei Nukleotidkonzentrationen deutlich unter der K_M von GTP bleibt es dagegen löslich (Üb.: Überstand, Sed.: Sediment, GTP γ S: GTP γ S, μ M: μ M).

3.6.2 Lipidbindung von Dynamin A

Die nukleotidabhängige Fähigkeit zu assemblieren hat direkten Einfluß auf die lipidbindenden Eigenschaften von Dynamin A. Die Lipidbindung wurde mittels PIP-StripsTM (echelon) untersucht, auf denen 16 verschiedene Phospholipide, einschließlich phosphorylierter Phosphatidylinositole, an definierten Positionen punktförmig immobilisiert sind. Nach Inkubation mit 0.5 μ g/ml Dynamin A in Gegenwart von 1 mM GppNHp oder 1 mM GDP konnte keine Bindung an die Lipide nachgewiesen werden. Bei Inkubation von 20 μ g/ml Dynamin A konnte in Gegenwart von GppNHp die Bindung an Phosphatidylinositol (PtdIns), an einfach, zweifach oder dreifach phosphoryliertes PtdIns sowie an Phosphatidylsäure (PA) nachgewiesen werden. Die Lipidbindung ist strikt nukleotidabhängig, da in Gegenwart von GDP keine Bindung von Dynamin A an die Lipide zu detektieren war (Abb. 3.24)

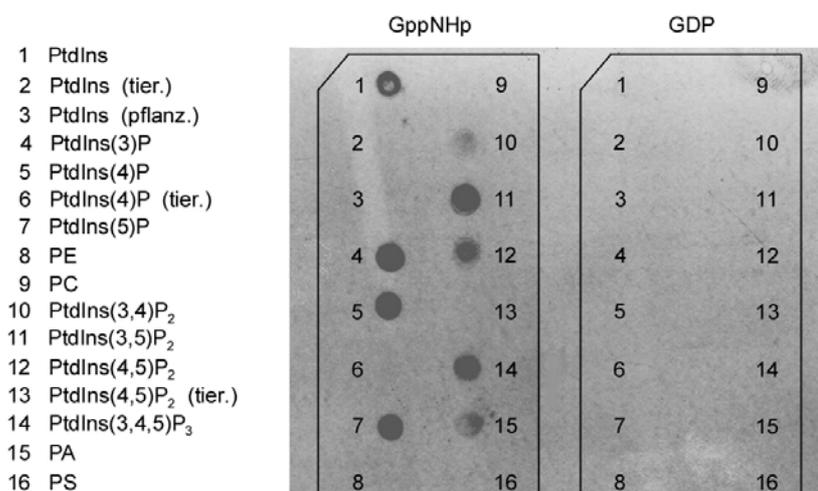


Abb. 3.24: Nukleotidabhängige Lipidbindung von Dynamin A. PIPstripsTM wurden mit 20 μ g/ml Dynamin A und 1 mM GppNHp oder GDP inkubiert. Gebundenes Dynamin A wurde mit einem Antikörper detektiert. Nur in der Gegenwart von GppNHp bindet Dynamin A an synthetisches PtdIns, PtdInsP, PtdInsP₂, PtdInsP₃ und PA.

3.6.3 Nukleotidabhängige Proteolyse

Die elektronenmikroskopisch beobachteten konformationellen Änderungen von Dynamin A bei GppNHp-Bindung wurden durch nukleotidabhängige Trypsin-Proteolyse untersucht. In Gegenwart von GppNHp wird der Abbau des 60 kDa und des 14 kDa Fragmentes verhindert, der in Abwesenheit von Nukleotid oder in Anwesenheit von GDP oder GDP+AIF_x auftritt (Abb. 3.25).

Das in der TEM-Analyse eingesetzte Dynamin A (nachfolgende Dynamin A* genannt) bildete sehr regelmäßige, vor allem aber sehr stabile Ringkomplexe. Die hohe Stabilität der Ringkomplexe wird durch die geringe Empfindlichkeit gegenüber der Trypsin-Proteolyse dokumentiert. Im Ringkomplex vorliegendes Dynamin A* bildet ein fast 80 kDa großes Trypsin-stabiles Fragment, unabhängig vom Nukleotidzustand (Abb. 3.25).

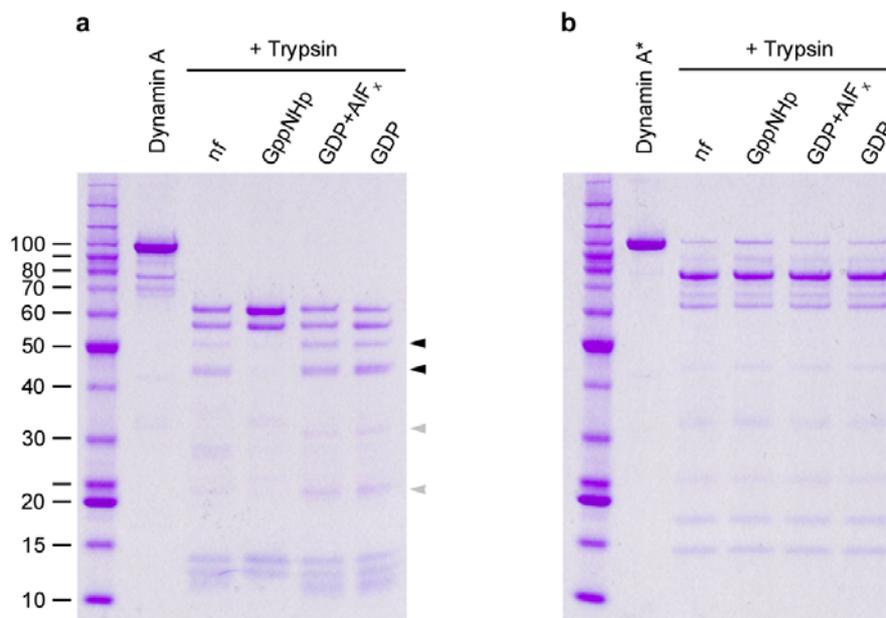


Abb. 3.25: Nukleotidabhängige Proteolyse von Dynamin A. Dynamin A wurde 24 h mit dem jeweiligen Nukleotid inkubiert und anschließend 24 h durch Trypsin proteolysiert. **a)** Dynamin A wird in Gegenwart von GppNHp teilweise vor der Trypsin-Proteolyse geschützt (schwarze Pfeile). Die Fragmentbildung in Gegenwart von GDP+AIF_x und GDP ist identisch. Sie unterscheidet sie sich im Bereich von 40-20 kDa etwas von der in Abwesenheit von Nukleotid (graue Pfeile). **b)** Das in der EM eingesetzte Dynamin A* zeigt einen deutlichen, nukleotidunabhängigen Proteolyse-Schutz. Dieser Schutz beruht vermutlich auf der hohen Stabilität des Ringkomplex, in der dieses Protein vorliegt.

Tatsächlich wird der Ringkomplex durch Trypsin-Proteolyse nicht zerstört, sondern bleibt erhalten. Der trypsinierte Ringkomplex zeigt im Elektronenmikroskop keine sichtbar veränderte Morphologie gegenüber dem nativen Ringkomplex (Daten nicht gezeigt). Der Unterschied zwischen Dynamin A und Dynamin A* konnte nachfolgend durch massenspektrometrische Analyse identifiziert werden.

3.6.4 Bestimmung der Domänenstruktur von Dynamin A

Die elektronenmikroskopische Analyse zeigt, daß Dynamin A mit sich selbst wechselwirkt und einen Ringkomplex ausbilden kann. Um die Domänenstruktur des Monomers zu bestimmen, wurde Dynamin A spezifischen Proteolysen unterzogen. Eingesetzt wurden fünf verschiedene Proteasen, die mit ihren unterschiedlichen Spezifitäten nahezu alle Aminosäuren abdecken (Tab. 3.3).

Protease	Spezifität	hydrolysiert C-terminal von
1. Chymotrypsin	aromatischen Aminosäuren	Trp, Tyr und Phe
2. Subtilisin	saure Aminosäuren und kleine Aminosäuren	Asp und Glu Gly, Ala und Val
3. Trypsin	basische Aminosäuren	Arg und Lys
4. Papain	basische Aminosäuren, aber auch weniger spezifisch	Arg und Lys Glu, His, Gly und Tyr
5. Elastase	kleine oder ungeladene Aminosäuren	Gly, Ala, Val, Leu, Ile und Ser

Tabelle 3.3: Für die zeitaufgelöste Proteolyse von Dynamin A eingesetzte Proteasen. Die angegebenen Spezifitäten der fünf Proteasen umfassen in ihrer Summe nahezu alle Aminosäuren. Es wurden 0.1 mg/ml Dynamin A mit 2 µg/ml Protease (6-40 U/mg) auf Eis inkubiert. Nach bestimmten Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung gestoppt und die Fragmente in der SDS-PAGE analysiert (s. Abb. 3.26). Die Identifizierung erfolgt durch die massenspektroskopische Analyse der vollständig trypsinisierten Fragmente.

Die Fragmente wurden anschließend durch massenspektroskopische Analyse ihrer Trypsin-Fragmente identifiziert. Dabei wurde deutlich, daß die N-terminale GTPase- und Mitteldomäne (57 kDa) eine weitestgehend protease-stabile Einheit bilden und zudem die C-terminale GED (14 kDa) vor Proteolyse schützen (Abb. 3.26a-e). Alle Proteasen hydrolysieren die Peptidkette zunächst in der QNS, so daß ein etwa 80 kDa großer N-Terminus und ein gut 15 kDa großer C-Terminus entstand. Der N-Terminus wurde auf ~ 60 kDa (Chymotrypsin), 58 kDa (Subtilisin), 62 kDa (Trypsin) oder 59 kDa (Papain) verkleinert, der die GTPase- und Mitteldomäne enthielt. Nur bei Elastase wurde nach langer Inkubation ein 40 kDa großes, N-terminales Fragment erhalten. Dieses Fragment enthielt die vollständige GTPase-Domäne und endete kurz hinter der GGARI-Box (Aminosäuren 368-372). Der C-Terminus wurde von über 15 kDa immer auf 12-14 kDa verkleinert und erwies sich dann als protease-stabil. Diese Stabilität ging nur verloren, als bei Einsatz der Elastase der N-Terminus deutlich unter 60 kDa degradiert wurde. Möglicherweise kann der N-Terminus die GED dann nicht mehr vollständig binden und sie so vor Proteolyse schützen.

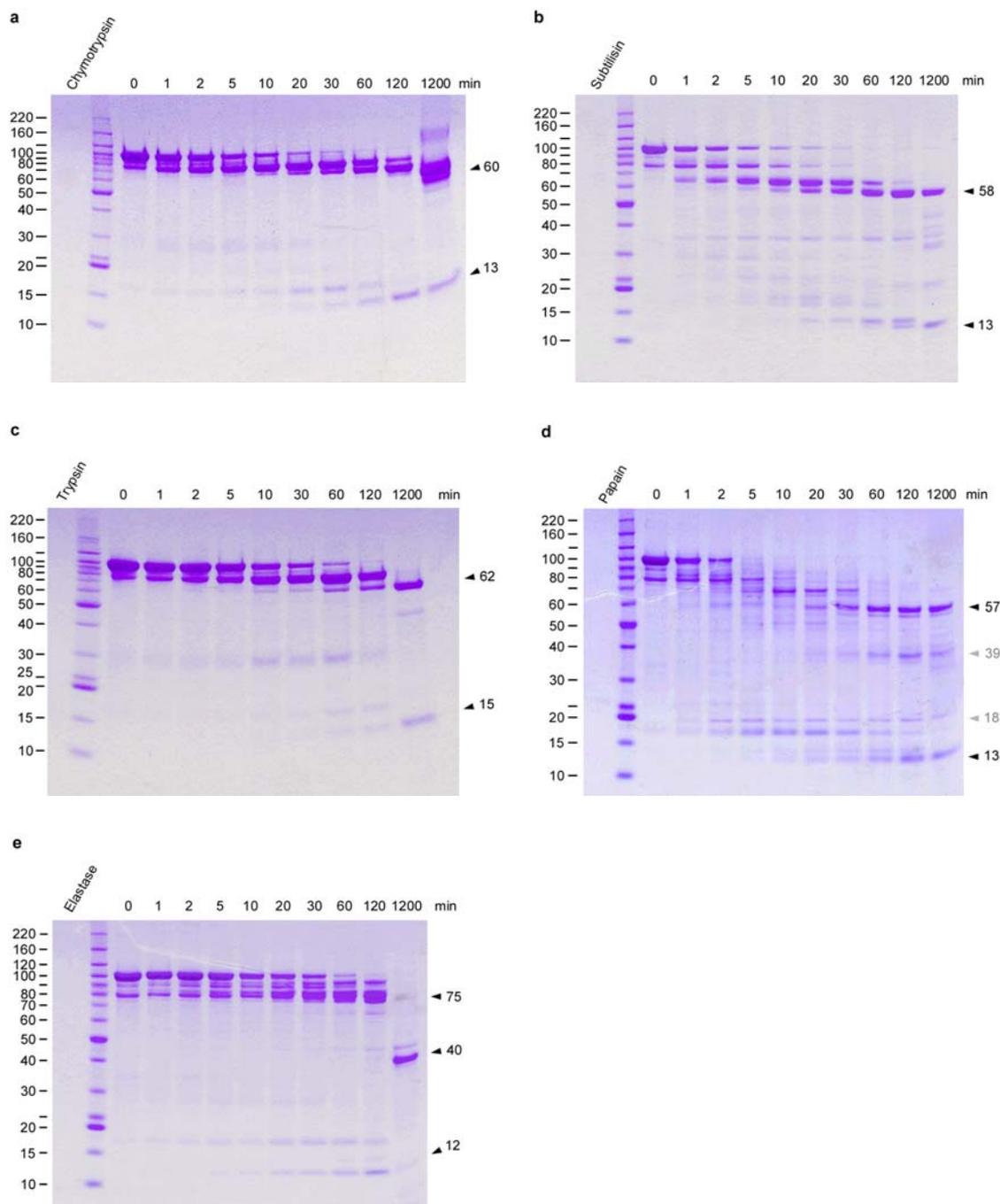


Abb. 3.26: Proteolyse von Dynamin A. Die zeitaufgelöste Proteolyse von Dynamin A durch fünf verschiedene Proteasen zeigt, daß die N-terminale GTPase- und Mitteldomäne (~ 57 kDa) eine protease-stabile Einheit bilden, welche die C-terminale GED (14 kDa) vor Proteolyse schützt. **a)** Chymotrypsin, **b)** Subtilisin, **c)** Trypsin, **d)** Papain, **e)** Elastase. Die Proteolyse erfolgte über die Generierung eines ~ 80 kDa Fragmentes und der dessen Degradation auf ~ 60 kDa (N-terminale GTPase- und Mitteldomäne). Das C-terminale Fragment wurde auf 12-14 kDa abgebaut, ist dann aber stabil. Wird die N-terminale 60 kDa Domäne weiter abgebaut, so verliert die GED ihre Proteasestabilität (e: 1200 min). Nur Papain schneidet teilweise innerhalb der GTPase-Domäne. Dabei wird ein ~ 18 kDa großes, N-terminales Fragment entfernt (d: graue Pfeile).

3.6.5 Massenspektrometrische Untersuchungen

Im Rahmen der massenspektrometrischen Analyse der Proteolyse-Fragmente, die durch Herrn Andreas Schlosser in der Arbeitsgruppe Prof. Wolf Lehmann am DKFZ in Heidelberg durchgeführt wurden, wurde Dynamamin A auch auf mögliche posttranslationale Modifikationen untersucht. Bei der Bestimmung des Molekulargewichts wurde eine um 42 Da höhere Masse als die mit 96.105 Da berechnete Masse festgestellt. Durch Tandem-Massenspektrometrie, bei der selektiv Fragmente innerhalb einer Stoßkammer weiter fragmentiert und analysiert werden können, konnte gezeigt werden, daß Dynamamin A N-terminal acetyliert wird. Diese N-terminale Acetylierung erfolgt am Methionin 1 und erfolgt quantitativ. Weitere Modifikationen konnten ausgeschlossen werden.

Die massenspektrometrische Analyse erlaubte auch die Identifizierung von zwei kovalenten Modifikationen, die nur bei dem in der Elektronenmikroskopie eingesetzten Dynamamin A* auftraten. Zunächst wurde die vollständige N-terminale Acetylierung von Dynamamin A* durch Tandem-MS bestätigt (Daten nicht gezeigt). Das Molekulargewicht von Dynamamin A* lag um etwa 600 Da über der berechneten Masse von 96.147 Da. Durch Fragmentierung konnten zwei Peptide identifiziert werden, die jeweils um 296 Da schwerer waren als das korrespondierende Peptid von Dynamamin A. Die beiden Peptide enthalten mit je einem Cystein nur eine reaktive Seitenkette. Es wird daher vermutet, daß an diese beiden Cysteine, C375 und C831, in der Reinigung eingesetzte Protease-Inhibitoren kovalent gebunden wurden. Das dritte Cystein in Dynamamin A, C429, war dagegen nicht modifiziert worden.

Für die zusätzliche Masse von zweimal 296 Da kommt aus dem in der Reinigung eingesetzte Protease-Inhibitor-Mix nur N-Carbobenzyloxy-Phenylalanin-chloromethyl-ke-ton (ZPCK) in Frage. Haloketone reagieren mit nukleophilen Seitenketten wie Thiolgruppe unter Substitution des Halogens (Rossmann *et al.*, 1974), womit die zusätzliche Masse erklärt werden könnte (Abb. 3.27).

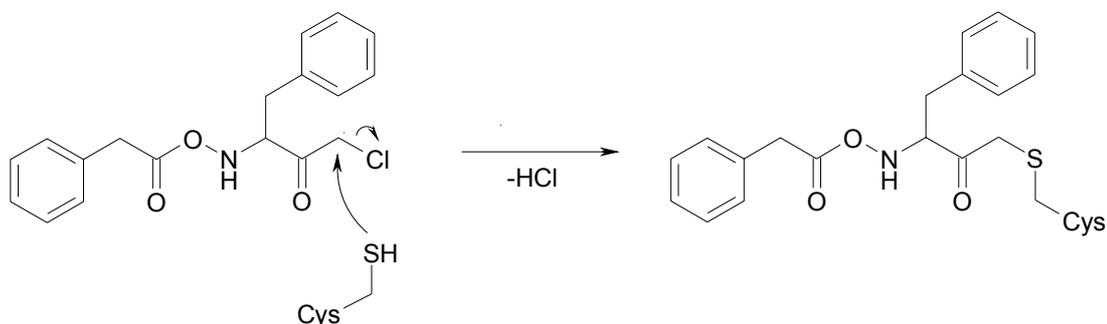


Abb. 3.27: Kovalente Modifikation von reaktiven Cysteinen in Dynamamin A. Der Protease-Inhibitor ZPCK (M = 332 Da) wird durch die Thiolgruppe des Cysteins nukleophil angegriffen. Nach Abgang des Chlorids wird der N-Carbobenzyloxy-Phenylalanin-methylen-Rest (M = 296 Da) als Thioether gebunden.

3.7 Kinetische Charakterisierung von Dynamin A

Um die nukleotidabhängigen Konformationsänderungen von Dynamin A kinetisch beschreiben zu können, wurde die Kinetik der GTPase-Aktivität von Dynamin A untersucht. Dazu wurden der GTPase-Zyklus unter quasi-stationären Bedingungen analysiert, sowie die transienten Kinetiken der Einzelschritte, GTP-Bindung, GTP-Hydrolyse und GDP-Dissoziation.

3.7.1 Gleichgewichtskinetik von Dynamin A

Zunächst wurden die maximale Hydrolysegeschwindigkeit (k_{cat}) und die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) von Dynamin A bestimmt. 1 μM Dynamin A wurde mit 50-1400 μM GTP bei 20 °C inkubiert und die GTP-Hydrolyse mittels analytischer HPLC verfolgt (s. 2.3.9). Der gemessene GTP-Umsatz wurde gegen die Inkubationszeit aufgetragen und an den Reaktionsverlauf eine monoexponentielle Funktion angepaßt (Abb. 3.28a). Mit der ersten Ableitung dieser Funktion im Punkt $t = 0$ min konnte die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bestimmt werden. Nach Auftragung dieser beobachteten Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}) gegen die eingesetzte GTP-Konzentration konnte durch Anpassung der Michaelis-Menten-Gleichung an diese Werte die maximale GTP-Hydrolysegeschwindigkeit k_{cat} sowie die Michaelis-Menten-Konstante K_M für 1 μM Dynamin A bestimmt werden (Abb. 3.28b). Aus den Messwerten wurde $k_{\text{cat}} = 0.17 \text{ s}^{-1}$ und $K_M = 68 \mu\text{M}$ errechnet.

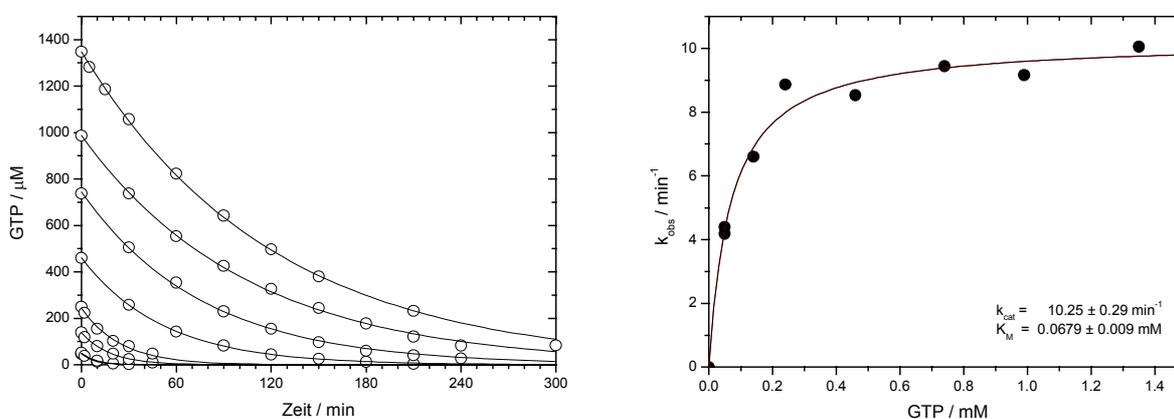


Abb. 3.28: Michaelis-Menten-Kinetik von 1 μM Dynamin A. a) Die Hydrolyse von 50-1400 μM GTP durch 1 μM Dynamin A wurde mittels analytischer HPLC bestimmt. An den Reaktionsverlauf wurde eine monoexponentielle Funktion ($[\text{GTP}] = [\text{GTP}]_0 \cdot e^{-kt}$) angepaßt und aus der Steigung zum Zeitpunkt $t = 0$ min die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt. b) Die Geschwindigkeitskonstante k_{obs} wurde gegen die eingesetzte GTP-Konzentration aufgetragen und an diese Werte die Michaelis-Menten-Gleichung ($k_{\text{obs}} = k_{\text{cat}} / (1 + K_M / [\text{GTP}])$) angepaßt. Es wurde eine maximale GTPase-Aktivität von $k_{\text{cat}} = 0.17 \text{ s}^{-1}$ und eine Michaelis-Menten-Konstante von $K_M = 68 \mu\text{M}$ erhalten.

3.7.2 Bestimmung der kinetischen Parameter der Nukleotidbindung

Da die Nukleotidbindung ein schneller Prozess ist, wurden die transienten Kinetiken der Nukleotidassoziation und -dissoziation fluoreszenzspektrometrisch in einer *stopped flow*-Apparatur gemessen (s. 2.6.9). Dazu wurden zwei unterschiedlich fluoreszenz-markierte Nukleotide eingesetzt (Abb. 3.29).

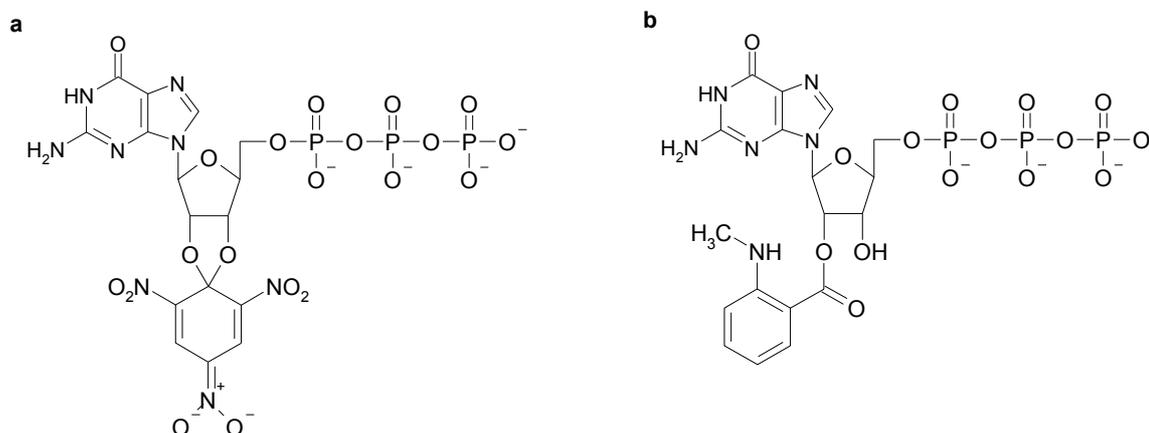


Abb. 3.29: Struktur der eingesetzten fluoreszenz-markierten Nukleotide. a) 2',3'-Trinitrophenyl-markiertes GTP (TNP-GTP), **b)** 2'-Methylantraniloyl-markiertes GTP (mGTP), das im Gleichgewicht mit dem 3'-markierten mGTP steht. Die Isomerisierung wird verhindert, wenn statt der Ribose eine Desoxyribose eingesetzt wird (mdGTP).

Zunächst wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität bei Bindung von 2',3'-Trinitrophenyl (TNP) - markierten Guaninnukleotiden (Molecular Probes) an nukleotidfreies Dynamin A gemessen. Die Fluoreszenz dieser Nukleotide ist in polaren Lösungsmitteln gering und erhöht sich, wenn die Umgebung weniger polar wird, z.B. bei Bindung an ein Protein. Bei GTPasen und bei ATPasen ist diese Fluoreszenzzunahme zumeist ein Reaktion mit vorgelagertem Gleichgewicht: Die Bildung eines Kollisionskomplexes erfolgt schnell und reversibel (K_1), aber ohne Signaländerung und erst die nachfolgende Bindung des Nukleotids (k_2) führt zu der Konformationsänderung, die eine Signaländerung bewirkt (Bagshaw *et al.*, 1974; John *et al.*, 1990; Binns *et al.*, 2000). Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k_{obs} ist daher zweiter Ordnung: $k_{\text{obs}} = K_1 + k_2$.

Zusätzlich wurde die Änderung der Anisotropie bei Bindung von 2'- oder 3'-Methylantraniloyl (mant) - markierten Nukleotiden an nukleotidfreies Dynamin A als Meßsignal verwendet. Die Änderung der Anisotropie beruht auf der Änderung der Rotationsgeschwindigkeit des Fluorophors und korreliert daher direkt mit der Bindung des Nukleotids an das Protein (Brownbridge *et al.*, 1993). Der Fluorophor wird mit parallel polarisiertem Licht angeregt, die Intensitäten des parallel und des senkrecht polarisierten Fluoreszenzlichts (I_p und I_s) gemessen und daraus die Anisotropie $r = [(I_p/I_s)-1] / [(I_p/I_s)+2]$ errechnet. Für die Anisotropiemessungen wurden mant-Nukleotide eingesetzt, da diese auch in Lösung ein gutes Fluoreszenzsignal erzeugen.

3.7.2a Bindung von TNP-Nukleotiden an Dynamin A

Mit TNP-Nukleotiden wurde die Bindung von GTP und von GDP an nukleotidfreies Dynamin A untersucht. Da TNP-GDP nicht käuflich zu erwerben ist, wurde 1M TNP-GTP mit $1\mu\text{M}$ Dynamin A in 12 h (10 Halbwertzeiten) zu TNP-GDP umgesetzt. Aufgrund der niedrigen Nukleotidaffinität von Dynamin A mußten hohe Nukleotidkonzentrationen eingesetzt werden. Die hohe Konzentration an ungebundenem Nukleotid führte zu einem schlechten Signal-zu-Rausch Verhältnis (Abb. 3.30a-b): Die Signaländerung durch Nukleotidbindung war bei niedrigen Nukleotidkonzentrationen aufgrund der niedrigen GTP-Affinität von Dynamin A klein, bei hohen Nukleotidkonzentrationen war das Signal aufgrund des hohen Anteils an ungebundenem Nukleotid stark verrauscht. Daher konnten TNP-Nukleotide nur in einem kleinen Konzentrationsbereich eingesetzt werden (Abb. 3.30c-d).

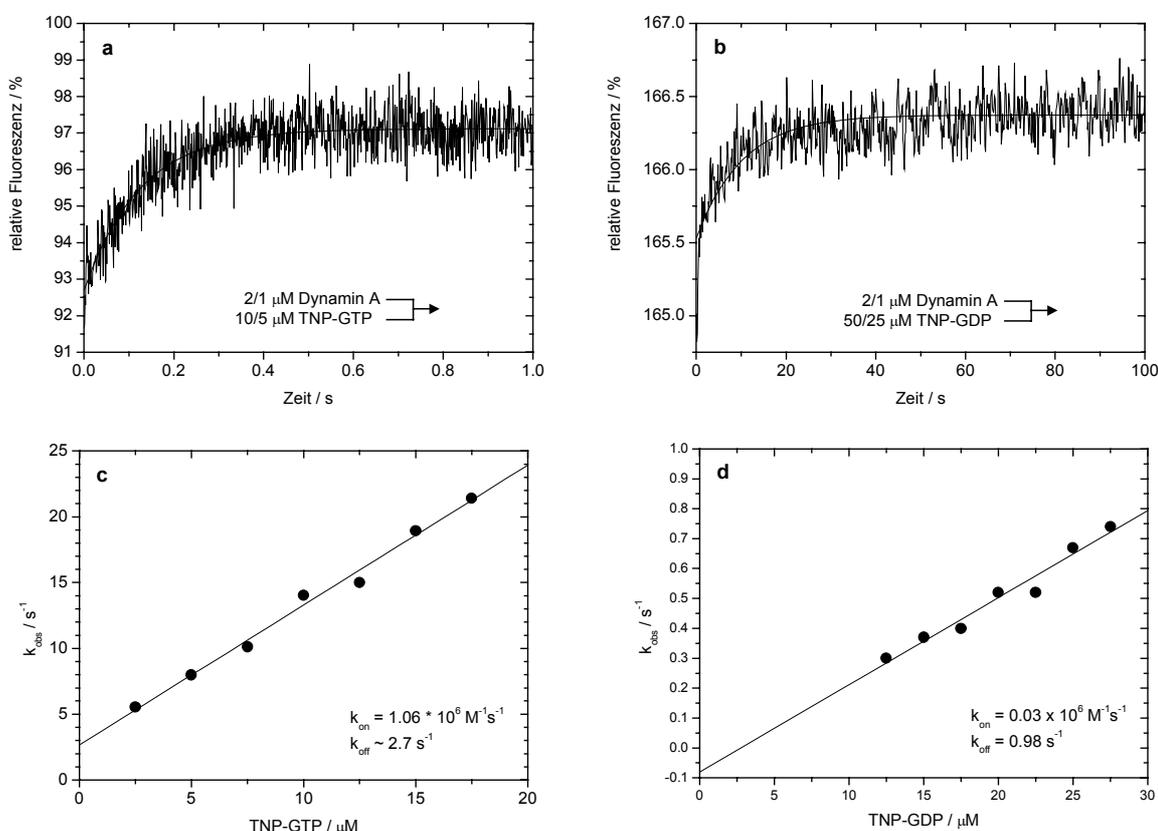


Abb. 3.30: Bindung von TNP-markiertem GTP und GDP an nukleotidfreies Dynamin A. TNP-GTP bindet viel schneller an Dynamin A als TNP-GDP. **a-b)** Änderung der Fluoreszenzintensität bei Bindung von (a) $5\mu\text{M}$ TNP-GTP oder (b) $25\mu\text{M}$ TNP-GDP an $1\mu\text{M}$ nukleotidfreies Dynamin A (Mittelwert aus acht Messungen). Durch Angleichen einer monoexponentiellen Funktion wurde k_{obs} bestimmt. **c)** Aus der Regressiongeraden durch die k_{obs} wurde die Geschwindigkeitskonstante der TNP-GTP Assoziation $k_{\text{on}} = 1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erhalten. Aus dem Achsenabschnitt konnte die Geschwindigkeitskonstante der TNP-GTP Dissoziation mit $k_{\text{off}} = 3 \text{ s}^{-1}$ abgeschätzt werden. **d)** Aus der Regressiongeraden durch die k_{obs} der TNP-GDP Assoziation wurde die Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{on}} = 3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erhalten. Die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation $k_{\text{off}} = 1.0 \text{ s}^{-1}$ wurde direkt durch Verdrängung mit unmarkiertem GTP bestimmt. Daraus errechnen sich die Dissoziationskonstanten K_{D} (TNP-GTP) = $2.5\mu\text{M}$ und K_{D} (TNP-GDP) = $34\mu\text{M}$.

Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} wurden gegen die eingesetzten Nukleotidkonzentrationen aufgetragen und aus der Steigung der Regressionsgeraden die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation k_{on} bestimmt (Abb. 3.30c-d). Für die Assoziation von TNP-GTP wurde so $k_{\text{on}} = 1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erhalten und für die Assoziation von TNP-GDP $k_{\text{on}} = 0.03 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Damit bindet TNP-GTP fast 40-mal schneller an nukleotidfreies Dynamin A als TNP-GDP.

Da GTP nach Bindung hydrolysiert wird, kann die Dissoziation von TNP-GTP nicht direkt beobachtet werden. Unter den gewählten Bedingungen entspricht aber der Ordinatenabschnitt der Regressionsgeraden der Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation k_{off} . Aus der Extrapolation der Regressionsgeraden wurde für TNP-GTP $k_{\text{off}} = 2.7 \text{ s}^{-1}$ erhalten. Die Dissoziation von TNP-GDP konnte dagegen durch Verdrängung mit einem 100-fachen Überschuß an unmarkiertem GTP direkt beobachtet werden (Daten nicht gezeigt) und mit $k_{\text{off}} = 1.0 \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden. Damit kann für beide Nukleotide die Affinität zu Dynamin A quantifiziert werden. Die Dissoziationskonstante $K_{\text{D}} = k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$ beträgt für TNP-GTP $K_{\text{D}} = 2.5 \text{ }\mu\text{M}$ und für TNP-GDP $K_{\text{D}} = 34 \text{ }\mu\text{M}$. Die Konstanten sind in der Tabelle 4.1 zusammengefaßt.

Nukleotid	$k_{\text{on}} / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_{\text{off}} / \text{s}^{-1}$	$K_{\text{D}} / \mu\text{M}$
TNP-GTP	1.1×10^6	2.7	2.5
TNP-GDP	3×10^4	1.0	34

Tab. 4.1: Kinetische Parameter der Bindung von TNP-markierten Nukleotiden an nukleotidfreies Dynamin A. Die Konstanten wurden durch die Messung der TNP-Fluoreszenzintensität bei Nukleotidbindung erhalten.

3.7.2b Bindung von mant-Nukleotiden an Dynamin A

Die Messung der Anisotropie zeigte bei Bindung von mant-Nukleotiden an Dynamin A ein deutlich besseres Signal-zu-Rausch Verhältnis als die beschriebene Messung der TNP-Fluoreszenzintensität (Abb. 3.31a-b). Damit wurde die Messung von Assoziationsgeschwindigkeiten über einen größeren Konzentrationsbereich ermöglicht als dies mit TNP-Nukleotiden möglich war (Abb. 3.31c-d).

Für die Messung der Anisotropieänderung wurde mGTP und mGppNHp eingesetzt. Mit dem schwerhydrolysierbaren GTP-Analog mGppNHp kann die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation direkt bestimmt werden, die als Anhaltspunkt für die Geschwindigkeit der GTP Dissoziation dient. Alternativ kann die Abschätzung der GTP Dissoziation auch aus dem Ordinatenabschnitt der Regressionsgeraden für die Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeit von mGTP erfolgen.

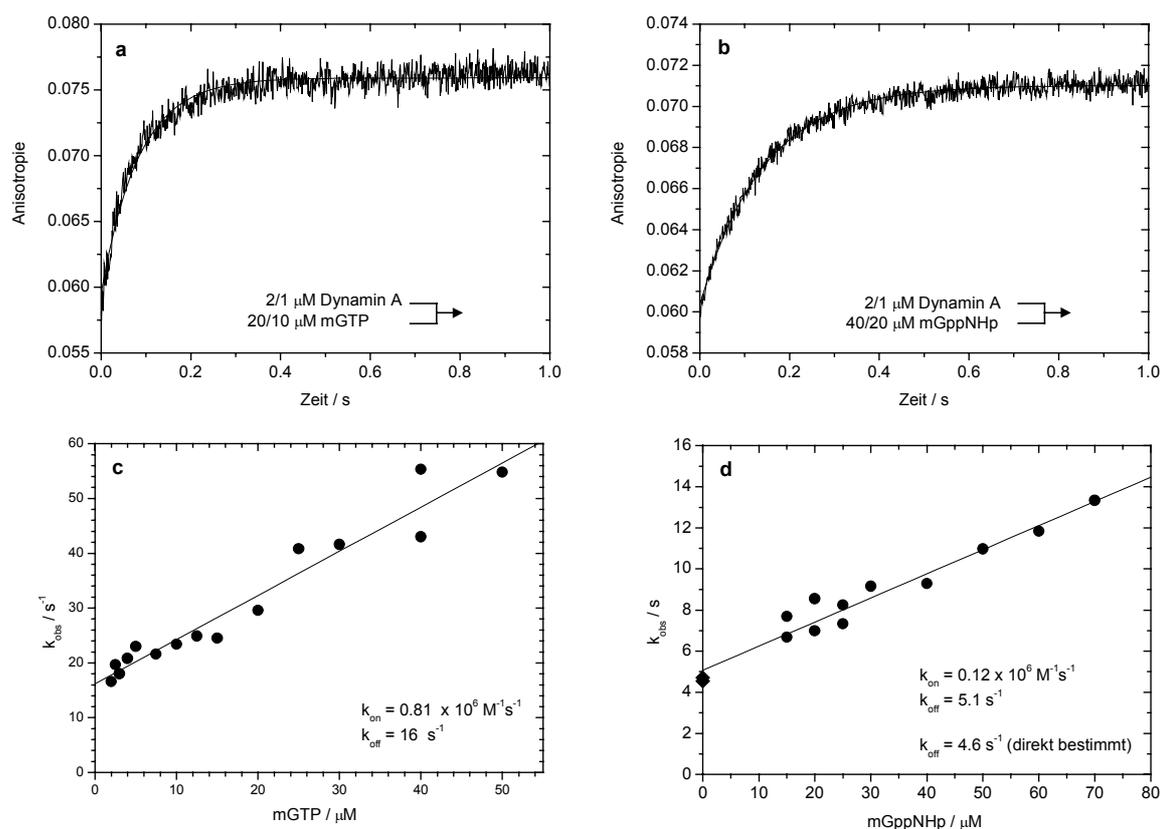


Abb. 3.31: Bindung von mGTP und mGppNHp an nukleotidfreies Dynamin A. **a-b)** Änderung der Anisotropie bei Bindung von (a) 10 μM mGTP oder (b) 20 μM mGppNHp an 1 μM nukleotidfreies Dynamin A (Mittelwert aus acht Messungen). Durch Angleichen einer monoexponentiellen Funktion wurde k_{obs} bestimmt. **c)** Aus der Regressiongeraden durch die k_{obs} der mGTP Assoziation wird die Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{on}} = 0.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erhalten. Aus dem Achsenabschnitt kann die Geschwindigkeitskonstante der mGTP Dissoziation mit $k_{\text{off}} = 16 \text{ s}^{-1}$ abgeschätzt werden. **d)** Die Geschwindigkeitskonstante der mGppNHp Dissoziation $k_{\text{off}} = 4.6 \text{ s}^{-1}$ kann direkt durch Verdrängung mit unmarkiertem Nukleotid bestimmt werden. Aus der Regressiongeraden durch die k_{obs} der mGppNHp Assoziation (●) und Dissoziation (◆) wird $k_{\text{on}} = 0.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erhalten. Daraus errechnen sich die Dissoziationskonstanten K_{D} (mGTP) = 20 μM und K_{D} (mGppNHp) = 38 μM .

Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} wurden gegen die eingesetzte Nukleotidkonzentrationen aufgetragen und aus den Regressionsgeraden die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation von mGTP und mGppNHp bestimmt (Abb. 3.31c-d). Für mGTP wurde $k_{\text{on}} = 0.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erhalten, für mGppNHp $k_{\text{on}} = 0.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die Assoziationsgeschwindigkeit von mGTP entspricht damit der von TNP-GTP ($k_{\text{on}} = 1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Dagegen liegt die Assoziationsgeschwindigkeit von mGppNHp deutlich unterhalb der von mGTP.

Die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation von mGppNHp wurde direkt durch Verdrängung mit unmarkiertem GTP bestimmt (Daten nicht gezeigt). Mit $k_{\text{off}} = 4.6 \text{ s}^{-1}$ liegt sie deutlich unter der abgeschätzten Geschwindigkeitskonstante für die mGTP-Dissoziation ($k_{\text{off}} = 16 \text{ s}^{-1}$), entspricht aber

der abgeschätzten Geschwindigkeitskonstante für die TNP-GTP Dissoziation ($k_{\text{off}} = 2.7 \text{ s}^{-1}$). Aus den mittels Anisotropiemessung bestimmten Geschwindigkeitskonstanten berechnen sich die Affinitäten von mGTP und mGppNHp für Dynamin A mit $K_D(\text{mGTP}) = 20 \text{ } \mu\text{M}$ und $K_D(\text{mGppNHp}) = 38 \text{ } \mu\text{M}$. Die Konstanten sind in der Tabelle 4.2 zusammengefaßt.

Nukleotid	$k_{\text{on}} / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_{\text{off}} / \text{s}^{-1}$	$K_D / \mu\text{M}$
mGTP	0.8×10^6	16	20
mGppNHp	0.1×10^6	4.6	38

Tab. 4.2: Kinetische Parameter der Bindung von mant-Nukleotiden an nukleotidfreies Dynamin A. Die Konstanten wurden durch die Messung der Anisotropie der mant-Fluoreszenz bei Nukleotidbindung erhalten.

3.7.2c Untersuchung der Nukleotid-Dissoziation

Um die Bindung von AlF_x in der Gegenwart von GDP zu prüfen, wurde die Dissoziation von mdGDP in Gegenwart von AlF_x gemessen. Sollte AlF_x als γ -Phosphat Analog den Übergangszustand der GTP-Hydrolyse nachstellen, so sollte die Dissoziation verlangsamt werden. Wie in Abbildung 3.32 gezeigt hat die Gegenwart von AlF_x keinen Einfluß auf die Dissoziation von mdGDP. Daher muß angenommen werden, daß AlF_x nicht an GDP-gebundenes Dynamin A bindet.

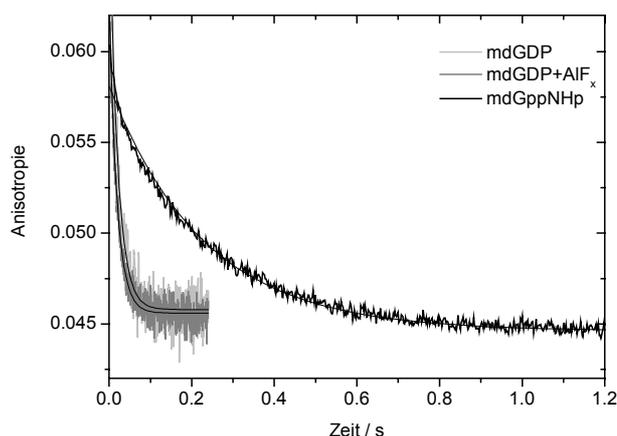


Abb. 3.32: Dissoziation von mdGDP in Gegenwart und in Abwesenheit von AlF_x . Die Dissoziation von mdGDP wird durch die Gegenwart von AlF_x nicht verlangsamt. $2/1 \text{ } \mu\text{M}$ Dynamin A + $40/20 \text{ } \mu\text{M}$ mdGDP wurden mit $4/2 \text{ mM}$ GTP gemischt und die Dissoziation von proteingebundenem mdGDP durch Anisotropiemessung verfolgt (hellgrau). Der 100fache Überschuß an GTP verhindert die Reassoziaton von mdGDP. Die Präinkubation des Proteins mit AlF_x ($40/20 \text{ } \mu\text{M}$ AlCl_3 + $10/5 \text{ mM}$ NaF) verlangsamte die mdGDP Dissoziation nicht (dunkelgrau). Dagegen dissoziiert das GTP-Analog mGppNHp deutlich langsamer von Dynamin A (schwarz).

3.7.3 Bestimmung der kinetischen Parameter der GTP-Hydrolyse

Die Hydrolysegeschwindigkeit von Dynamin A wurde in *quenched flow* Experimenten bestimmt. Dabei wurde nukleotidfreies Dynamin A mit GTP gemischt, die Reaktion nach definierten Zeitpunkten gestoppt und die Reaktionsprodukte analysiert (s. 2.3.10). Da das Protein nukleotidfrei in die Reaktion eingebracht wird, erfolgt der erste GTP-Umsatz durch Bindung und nachfolgende Hydrolyse, während alle nachfolgenden Umsatzrunden erst die Dissoziation der Hydrolyseprodukte erfordern. Wenn die Produktfreisetzung langsamer als die Hydrolyse erfolgt, so verlangsamt sich die Hydrolyserate nach dem ersten GTP-Umsatz.

Um diese Änderung messen zu können, müssen innerhalb des ersten GTP-Umsatzes nachweisbare Mengen an GDP und P_i generiert werden. Es wurden daher 80/40 μM Dynamin A eingesetzt und 800/400 μM GTP. Diese GTP-Konzentration stellt sicher, daß die Nukleotidbindung schnell im Vergleich zur Hydrolyse erfolgt (k_{on} (400 μM GTP) = 440 s^{-1}) und daß die nachfolgenden GTP-Umsätze bei quasi-stationärer GTP-Konzentration erfolgen. Der zeitliche Verlauf der GTP-Hydrolyse von Dynamin A ist in Abb. 3.33 dargestellt. Nach einem zunächst steilen Anstieg der Hydrolyseprodukte (Aufbruchphase, englisch: *burst*) innerhalb der ersten 600 ms ist eine deutliche Verlangsamung der GTP-Hydrolyserate beim Übergang in die quasi-stationäre Phase zu erkennen.

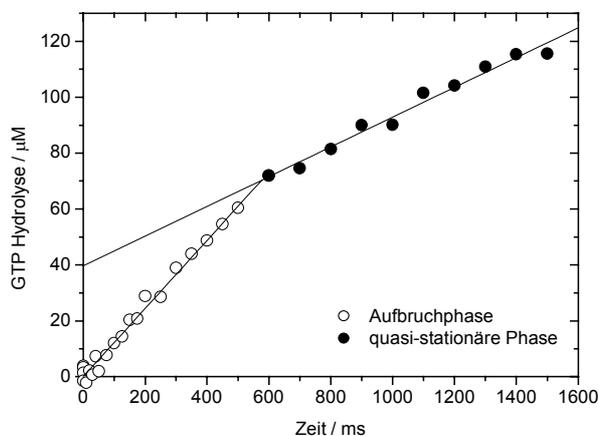


Abb. 3.33: *Quenched flow* Experiment zur Bestimmung der Hydrolyserate von Dynamin A. In einer *quenched flow*-Apparatur wurde 80/40 μM Dynamin mit 800/400 μM GTP (20 $\mu\text{Ci/ml}$) gemischt und die Reaktion nach definierten Zeitpunkten gestoppt (s. 2.3.10). Der Anteil an hydrolysiertem GTP wurde bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. In der Aufbruchphase (\circ) erfolgt die GTP-Hydrolyse mit maximaler Geschwindigkeit $k_{\text{max}} = 3.0 \text{ s}^{-1}$, bevor nach etwa 600 ms die Produktfreisetzung geschwindigkeitsbestimmend wird und der quasi-stationäre Zustand (\bullet) mit $k_{\text{cat}} = 1.3 \text{ s}^{-1}$ erreicht wird.

Die Geschwindigkeit der Hydrolyse läßt sich aus der Steigung der Regressionsgeraden der Werte bis 600 ms mit $k_{\text{max}} = 3.0 \text{ s}^{-1}$ bestimmen. Die nachfolgende langsamere Hydrolyserate $k_{\text{cat}} = 1.3 \text{ s}^{-1}$ beschreibt den vollständigen GTPase-Zyklus einschließlich der Produktfreisetzung unter quasi-

stationären Bedingungen. Die verringerte Geschwindigkeit unter quasi-stationären Bedingungen zeigt, daß die Produktfreisetzung geschwindigkeitsbestimmend ist. Sie entspricht der experimentell bestimmten Geschwindigkeitskonstante der TNP-GDP Dissoziation von $k_{\text{off}} = 1.0 \text{ s}^{-1}$ (s. Tab. 4.1).

3.7.4 Bestimmung der Kooperativität der GTPase-Reaktion

Die Geschwindigkeitskonstante der GTPase-Aktivität unter quasi-stationären Bedingungen ist bei Einsatz von $40 \text{ }\mu\text{M}$ Dynamin A ($k_{\text{cat}} = 1.3 \text{ s}^{-1}$) etwa 10fach höher als die entsprechende Geschwindigkeitskonstante bei Einsatz von $1 \text{ }\mu\text{M}$ Dynamin A ($k_{\text{cat}} = 0.12 \text{ s}^{-1}$). Dieser Unterschied läßt auch für Dynamin A eine Kooperativität der GTPase-Aktivität vermuten. Es wurden daher die Geschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion in Abhängigkeit der Proteinkonzentration bestimmt. Hierzu wurden zwischen $1\text{-}40 \text{ }\mu\text{M}$ Dynamin A mit 1 mM GTP inkubiert und die Reaktion nach frühestens 1 s abgebrochen, wenn der quasi-stationäre Zustand bereits erreicht worden war. Die beobachtete GTP-Hydrolyse wurde gegen die Zeit aufgetragen und aus der Regressionsgeraden die Reaktionsgeschwindigkeit unter quasi-stationären Bedingungen bestimmt. Die Auftragung dieser Reaktionsgeschwindigkeit gegen die eingesetzte Dynamin-Konzentration zeigt die Kooperativität der GTPase von Dynamin A (Abb. 3.34). Die absoluten Werte der GTPase-Aktivität k_{cat} sind etwa um den Faktor 2 zu klein: Für die unstimulierte GTPase-Aktivität ($1 \text{ }\mu\text{M}$ Dynamin) wird $k_{\text{cat}} = 0.17 \text{ s}^{-1}$ erwartet (s. 3.7.1) für die maximal stimulierte GTPase-Aktivität ($40 \text{ }\mu\text{M}$ Dynamin A) $k_{\text{cat}} = 1.3 \text{ s}^{-1}$ (s. 3.7.3). Der Aktivitätsverlust des Proteins mag in Ein- und Ausfriervorgängen begründet liegen, stört aber nicht die Kooperativität der GTPase-Aktivität.

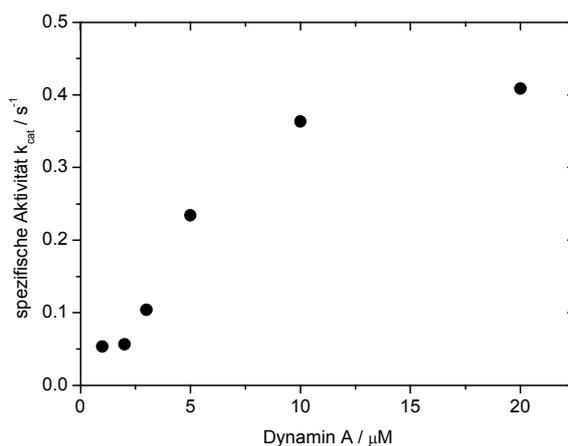


Abb. 3.34: Kooperativität der GTPase-Aktivität von Dynamin A. Die spezifische Aktivität von Dynamin steigt mit der Proteinkonzentration sigmoidal an. Bei niedrigen Proteinkonzentrationen bis etwa $2 \text{ }\mu\text{M}$ Dynamin A erfolgt die GTP-Hydrolyse noch nicht kooperativ. Mit zunehmender Proteinkonzentration wird die spezifische Aktivität größer und erreicht bei $> 20 \text{ }\mu\text{M}$ ihren Maximalwert. Die absoluten Werte der spezifischen Aktivität sind um den Faktor 2 zu klein (s. Text).

4. Diskussion

4.1 Punktmutationen in Dynamin A

Die Punktmutationen in der GTPase-Domäne von Dynamin A wurden nach theoretischen Überlegungen generiert (s. 3.1.1), ohne Kenntnis der Struktur von Dynamin A. Inzwischen wurde die Kristallstruktur der GTPase-Domäne von Dynamin A im atomaren Detail bestimmt (Abb. 4.1, Niemann *et al.*, 2001). Die Richtigkeit der gemachten Annahmen kann nun überprüft werden.

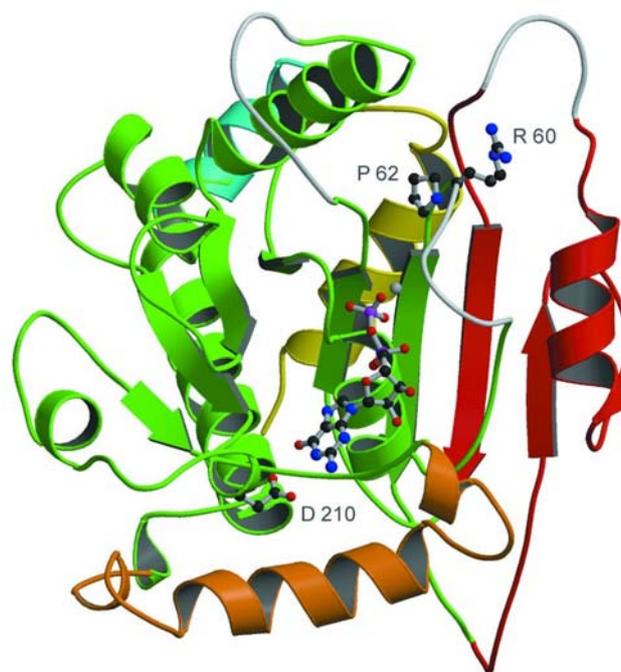


Abb. 4.1: Struktur der GTPase-Domäne von Dynamin A im Komplex mit MgGDP. Die Struktur der GTPase-Domäne besitzt wie Ras einen *Walker fold* (grün) mit diversen Insertionen (gelb, orange und rot). Schlecht definierte *loop*-Bereiche sind hellgrau dargestellt. Das Nukleotid GDP und die Aminosäuren R 60, P 62 und D 210 sind als Stabmodell dargestellt. R 60 könnte in der GTP-Konformation das γ -Phosphat kontaktieren. P 62 liegt in der Peripherie des hydrophoben Kerns der Domäne. D 210 bildet eine bidentale Wasserstoffbrücke zur Guaninbase aus.

Das Dynamin-Familienmotiv (in Dynamin A: L51-R60) ist die *switch I*-Region der Dynamine. Der entsprechende *loop* ist in der GDP-Konformation flexibel und daher schlecht definiert. Bei GTP-Bindung wird sich die *switch I*-Region auf das Nukleotid zubewegen und das Arginin 60 könnte das γ -Phosphat kontaktieren. Damit ist das Arginin 60 ein potentieller Kandidat für einen Arginin-Finger in Dynaminen. Tatsächlich vermindert die homologe Substitution R66A in Dynamin 1 die GTPase-Aktivität um etwa 90% (Marks *et al.*, 2001).

Das Prolin 62 ist bereits Teil des hydrophoben Kerns und seine Substitution könnte insbesondere bei erhöhter Temperatur die Struktur der benachbarte Nukleotidasche stark verändern. Die fehlende Temperatursensitivität der beiden Punktmutationen P62S und P62G mag an der niedrigen optimalen Temperatur für *D. discoideum* und der geringen Temperaturtoleranz der Zellen liegen. Bei der homologen Punktmutation in *C. elegans* lagen zwischen der erlaubten und der nicht-erlaubten Temperatur (15 °C und 25 °C) zehn Grad Celsius (Clark *et al.*, 1997), bei *D. discoideum* waren nur Temperaturschwankungen von 5 °C möglich (16 °C bis 21 °C).

Das Aspartat 210 des N/TKxD-Motivs befindet sich in der erwarteten Position, um die Guaninbase über zwei Wasserstoff-Brückenbindungen zu kontaktieren und somit die Nukleotidspezifität zu definieren. Allerdings ist die Seitenkette auch in Anwesenheit des Nukleotids wenig gut definiert, was auf eine flexible Bindungstasche schließen läßt. Dies spiegelt sich auch in den geringen strukturellen Änderungen bei GDP-Bindung und der geringen GDP-Affinität von Dynamin A wider ($K_D = 34 \mu\text{M}$). Auch die homologe Punktmutation D208N im humanen Dynamin 1 führt zu keiner Änderung des Phänotyps oder der Lokalisation innerhalb der Zelle (Herskovits *et al.*, 1993). Möglicherweise reicht die einfache Punktmutation D210N nicht aus, um eine Wechsel der Nukleotidspezifität herbeizuführen. So führte in der $G\alpha$ -Unterheit G_0 die homologe Substitution D273N erst in Verbindung mit Q205L zum Wechsel der Nukleotidspezifität (Yu *et al.*, 1997).

Die der Punktmutation K786A homologen Mutation in Dynamin 1 hatte keinen Effekt auf die GTPase-Aktivität (Sever *et al.*, 1999). Die starke Konservierung dieses Lysins und des davor liegenden Prolins (s. Abb. 3.1) läßt aber vermuten, daß K786 an einer intra- oder intermolekularen Wechselwirkung teilnimmt, die keinen direkten Einfluß auf die *in vitro* GTPase-Aktivität hat.

Die Funktion des totalkonservierten Arginins in der GED ist umstritten, da nach Substitution durch Alanin widersprüchliche Ergebnisse erhalten wurden. Schmid und Mitarbeiter leiteten aus *in vitro* Experimenten mit der isolierten GTPase-Domäne und GED eine Funktion als intramolekularer (*cis*-) Arginin-Finger ab, der durch intermolekulare (*trans*-) Wechselwirkung mit anderen GEDs aktiviert wird (Sever *et al.*, 1999). Dagegen konnten McMahon und Mitarbeiter keine Verminderung der GTPase-Aktivität von 0.5 μM Dynamin 1 R725A nachweisen, aber *in vivo* einen Defekt in der Assemblierungsfähigkeit beobachtet (Marks *et al.*, 2001), ähnlich der K694A Mutation (Sever *et al.*, 1999). Damit scheinen die Mutationen in der GED vor allem die Assemblierungsfähigkeit und damit die assemblierungsstimulierte GTPase-Aktivität zu vermindern. Aus strukturellen Daten ist ein Arginin-Finger innerhalb der GED unwahrscheinlich, da die GED vermutlich weit entfernt vom gebundenen Nukleotid an die GTPase-Domäne bindet (Prakash *et al.*, 2000; Niemann *et al.*, 2001).

4.2 *In vivo* Charakterisierung von Dynamin A

Die *in vivo* Charakterisierung von Dynamin A inklusive der Punktmutanten und Fragmente führte zu keinen nennenswerten Ergebnissen. Die Plasmide mit dem manipulierten *dymA* Sequenz wurde in *dymA*⁻ Zellen eingebracht, für eine Charakterisierung fehlte allerdings ein einfacher Nachweis der Dynamin A - Funktion *in vivo*. Als Parameter wurden das Wachstum in Schüttelkultur, die Morphologie der Zelle, insbesondere die Ausbildung cytoplasmatischer Brücken, die Position des Sporenkopfs der Fruchtkörper und die Endocytose von FITC-Dextran genutzt. Keiner dieser Parameter ließ sich als gut reproduzierbares, verlässliches Kriterium für die *in vivo* Funktion von Dynamin A etablieren. So zeigten die Wachstumskurven große Variabilität, einschließlich der *dymA*⁻ Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Häufigkeit der Ausbildung von cytoplasmatischen Brücken variiert schon bei *dymA*⁻ Zellen so stark, daß diese anhand dieses Kriterium nicht immer identifizierbar sind (Daten nicht gezeigt). Die Position des Sporenkopf war bei den transformierten *dymA*⁻ Zellen sehr variabel und stark von der Feuchtigkeit der Agarplatte abhängig (Daten nicht gezeigt). Die Aufnahme von FITC-Dextran konnte exakt und reproduzierbar gemessen werden, allerdings streuten die Werte nach der Normierung auf die Zellmenge sehr stark (Daten nicht gezeigt). Eine Identifizierung von funktionellem und nicht-funktionellem Dynamin erschien auf dieser Basis nicht möglich. Die Charakterisierung der Dynamin Funktion mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde nicht weiter verfolgt, da der zur Verfügung stehende Antikörper gegen Dynamin A auch in *dymA*⁻ Zellen Epitope erkennt. Möglicherweise erkennt der Antikörper *in vivo* andere GTPasen, die ebenfalls das Familienmotiv besitzen (z.B. annotiertes Gen *genef* 04731: NIVETNIGTRRPL). Die Charakterisierung mittels YFP-gekoppelten Dynamins wurde ebenfalls nicht mit Nachdruck verfolgt, da der wildtyp Phänotyp durch Rekonstitution von *dymA*⁻ Zellen mit rekombinantenem YFP-Dynamin A nicht wieder hergestellt wird (basierend auf der Anwesenheit von langen cytoplasmatischen Brücken und der Position der Sporenköpfe, Daten nicht gezeigt). Vermutlich beeinträchtigt die Anwesenheit des YFP-Fusionsanteil die Assemblierungsfähigkeit von Dynamin A. Weitere Versuche zur *in vivo* Charakterisierung wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht unternommen, statt dessen wurde die *in vitro* Analyse von Dynamin A durchgeführt.

4.3 Elektronenmikroskopische Analyse des Dynamin A Ringkomplexes

Mit der Elektronenmikroskopie kann die Struktur großer Proteinkomplexe analysiert werden, deren Kristallisation bislang nicht gelungen ist und deren Größe eine NMR-basierte Analyse verhindern. Da Dynamine in ihrer biologisch aktiven Form assembliert vorliegen, ist die Elektronenmikroskopie für die Analyse der Funktion von Dynamin sehr gut geeignet.

4.3.1 Nukleotidfreies Dynamin A

Mit der elektronenmikroskopischen Analyse von Dynamin A in verschiedenen Nukleotidzuständen werden neue strukturelle und mechanistische Details der GTPasen der Dynamin-Familie beschrieben. Die Assemblierung von Dynamin A zu Ringen, Stapeln und Helices zeigt, daß auch Dynamine ohne PH-Domäne und PRD die gleichen Strukturen wie Dynamin 1 bilden können. Dies wurde bereits aus Sedimentationsversuchen mit DVLP1 vermutet (Shin *et al.*, 1999). Desweiteren erfolgt auch die selektive Bindung an teilweise phosphorylierte Phosphatidylinositole auch ohne die Anwesenheit einer PH-Domäne, wie für Dynamin A gezeigt wurde (s. 3.6.2). Folglich erscheinen die PH-Domäne und die PRD, die nur in Dynamin und im pflanzlichen ADL3 gefunden werden (Danino und Hinshaw, 2001) nur zusätzliche, regulative Domänen zu sein. Folgerichtig oligomerisiert Dynamin 1 auch nach Deletion der PRD (Carr and Hinshaw, 1997; Zhang and Hinshaw, 2001).

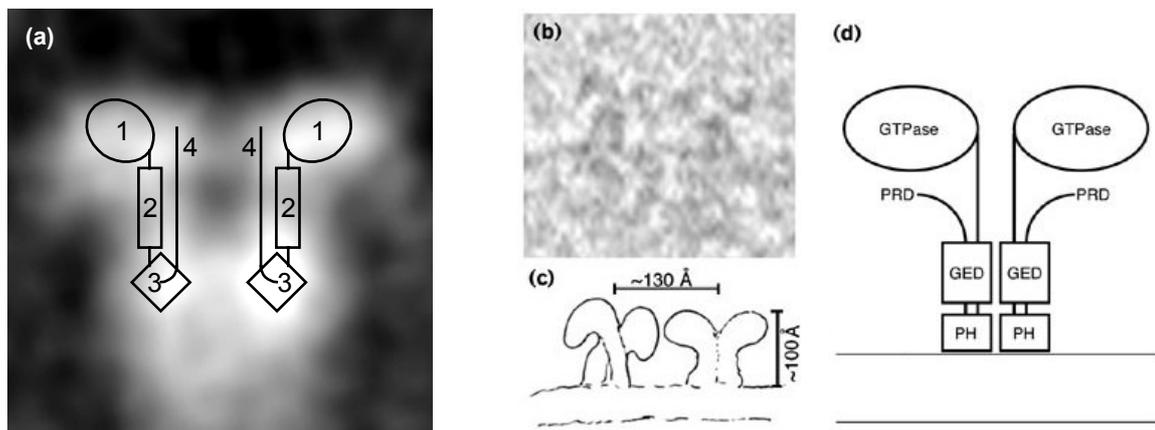


Abb. 4.2: Seitenansicht von Dynamin A und Dynamin 1. Beide Seitenansichten zeigen eine T-förmige Silhouette, die eine Dimerisierung nahe legt. **a)** Teil der Seitenansicht des nukleotidfreien Dynamin A Ringkomplexes mit der vorgeschlagenen Anordnung eines Dynamin A Dimers (1: GTPase, 2: Mitteldomäne, 3: QNS, 4: GED; diese Arbeit), **b)** elektronenmikroskopische Aufnahme von auf einer Lipidoberfläche assembliertem nukleotidfreiem Dynamin 1, **c)** schematische Darstellung von (b), **d)** vorgeschlagene Anordnung eines Dynamin 1 Dimers (b-d aus: Hinshaw, 1999).

Die Ringe und Stapel von Dynamin A sind denen von humanem Dynamin 1 sehr ähnlich (Hinshaw und Schmid, 1995; Hinshaw, 1999; Zhang und Hinshaw, 2001). Auch die Seitenansichten des Dynamin A Ringkomplexes weisen die gleiche Silhouette auf wie die T-förmigen Wiederholungen von Dynamin 1-umwickelten Lipidröhren (Abb. 4.2). Die Seitenansichten von Dynamin A und von Dynamin 1 lassen beide vermuten, daß der Ringkomplex aus Dimeren besteht, bei dem die zwei Monomere entweder unmittelbar benachbart sind oder sich gegenseitig überlappen. Diese Hypothese wird von der dreidimensionalen Karte von oligomerisiertem, C-terminal verkürztem Dynamin 1 unterstützt (Abb. 4.3, Danino und Hinshaw, 2001). Durch Ultrazentrifugation konnte zudem gezeigt

werden, daß Dynamine Dimere und Tetramere bilden (Carr und Hinshaw, 1997; Muhlberg *et al.*, 1997, Binns *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 1999). Oligomerisierung ist möglicherweise ein grundlegende Eigenschaft der GTPasen der Dynaminfamilie: Die Mx Proteine liegen in Lösung vorwiegend als Trimere vor (Melén *et al.*, 1992) und das entfernt verwandte humane GBP1 liegt in Abhängigkeit von seinem Nukleotidzustand als Monomer, Dimer oder Tetramer vor (Praefcke *et al.*, 1999). Zudem wurde die Assemblierung zu helikalen Strukturen bei den Mx Proteinen der Maus (*M. musculus*) und bei Phragmoplastin der Sojabohne (*G. max*) beobachtet (Nakayama *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2000).

Die vorgeschlagene Position des Dynamin A Dimers innerhalb des Komplexes (Abb. 4.2) entspricht der vorgeschlagenen Position von Dynamin 1 (Hinshaw, 1999; Zhang und Hinshaw, 2001). Für beide Modelle wurde die Struktur des hGBP1 (Prakash *et al.*, 2000) zugrunde gelegt. Die GTPase-Domäne wird in den äußeren Rings positioniert, die Mitteldomäne bildet innerhalb des Übergangs zum inneren Ring Kontakte zu den benachbarten Molekülen aus, der innere Ring vermittelt den Kontakt zur Lipidmembran und die GED bindet über die Mitteldomäne zurück an die GTPase-Domäne. Diese Anordnung würde zum Schutz der Mitteldomäne und der GED führen, wie sie bei allen Proteaseexperimenten beobachtet wurde, während die QNS vollständig hydrolysiert wurde (s. 3.6.4).

Auch die Organisation des nukleotidfreien Dynamin A Ringkomplexes ähnelt der des GppCH₂p-gebundenen, helikalen Komplexes von Dynamin 1 ΔPRD (Abb. 4.3, Zhang und Hinshaw, 2001). Beide Komplexe weisen eine ähnliche Rotationssymmetrie auf, verfügen über einen inneren und äußeren Ring und enthalten vermutlich Dimere als Assemblierungseinheit. Diese Ähnlichkeit bestätigt die Beispielhaftigkeit von Dynamin A für strukturelle Aussagen über Dynamine allgemein.

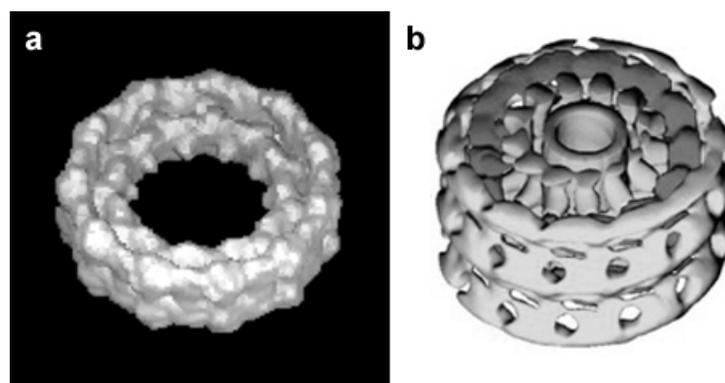


Abb. 4.3: Vergleich der Komplexstruktur von nukleotidfreiem Dynamin A und GppCH₂p-gebundenem Dynamin 1 ΔPRD. Die Komplexstrukturen weisen die gleiche Organisation in äußeren und inneren Ring auf. **a)** Der nukleotidfreie Dynamin A Komplex ist ein geschlossener Ring mit 11-facher Rotationssymmetrie (diese Arbeit). **b)** Der GppCH₂p-gebundene Dynamin 1 ΔPRD Komplex ist eine Helix mit etwa 13 Untereinheiten pro Windung (Zhang und Hinshaw, 2001).

4.3.2 GppNHp-gebundenes Dynamin A

Die Bindung von GppNHp an den nukleotidfreien Dynamin A Ringkomplex führt zur Bildung von filamentartigen Assemblierungen, die Stapel der präformierten Ringkomplexe zu sein scheinen. Dies geht konform mit der Assemblierung von Dynamin 1 in der Gegenwart von schwer-hydrolysierbaren GTP-Analoga (Takei *et al.*, 1995; 1998; Carr und Hinshaw, 1997; Smirnova *et al.*, 1999). Zusätzlich erscheint die Bindung von GppNHp die Formation von Helices zu induzieren, deren Durchmesser kleiner ist als der des Ringkomplexes im nukleotidfreien oder GDP-gebundenem Zustand. Die resultierende Helix besitzt daher vermutlich weniger als elf Dimere pro Windung, was zu dem beobachteten Verlust der Rotationssymmetrie und der strukturellen Details führt. Auch für Dynamin 1 wurde eine derartige Verengung in der Gegenwart von schwer-hydrolysierbaren GTP-Analoga beobachtet (Zhang und Hinshaw, 2001). Eine frappierend ähnliche Reorganisation wird bei der Assemblierung des Tabakmosaik Virus beobachtet. Hier kommt es bei Bindung der viralen RNA an einen zweilagigen Ringkomplexes mit 17 Untereinheiten pro Lage zu einer Reorganisation zu einer Helix mit $16 \frac{1}{3}$ Untereinheiten pro Windung. Diese Reorganisation ist *in vitro* stark vom pH und der Ionenstärke der Probe abhängig und zumeist werden sowohl Ringkomplexe als auch Stapel von Ringen und Helices beobachtet.

Die Analyse der Aufsichten der ringartigen Strukturen in der Gegenwart von GppNHp unterstützt die Schlußfolgerung, daß die Verringerung des Durchmessers durch eine Reorganisation des Ringkomplexes erfolgt, die zum Verlust der 11-fachen Symmetrie führt; Ringkomplexe, die in Gegenwart von GppNHp ihre 11-fache Symmetrie aufrecht erhalten, besitzen folgerichtig einen unveränderten Außendurchmesser von 32 nm. Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß die Stabilität des nukleotidfreien Ringkomplexes die Ausbildung einer Helix unter den experimentellen Bedingungen verhindert. Die massenspektrometrisch nachgewiesene Modifikation von Dynamin A durch den Protease-Inhibitor ZPCK zu Dynamin A* könnte diese Stabilität erklären. Die hydrophoben N-Carbobenzyloxy-Phenylalanin-methylketon-Reste an zwei exponierten Cysteinen in der Mitteldomäne und in der GED bildet möglicherweise hydrophobe Wechselwirkungen aus und verhindern so die Dissoziation des Komplexes. Die bemerkenswerte Stabilität wird durch seine Persistenz bei 300 mM NaCl demonstriert, während der Dynamin 1 Ringkomplex nur bei geringer Ionenstärke stabil ist und bei 150 mM NaCl zerfällt (Hinshaw und Schmid, 1995).

Diese hohe Stabilität könnte auch die Bildung der filamentartigen Assemblierungen bei Zugabe von GppNHp beeinflussen. Der Außendurchmesser dieser Assemblierungen beträgt etwa 30 nm, was auf die Präsenz nicht-kontrahierter Ringkomplexe schließen läßt, die sich zu einem Stapel zusammengelagert haben. Bei der Bindung von GppNHp an präformierte Ringkomplexe könnte die

Stapelbildung kinetisch bevorzugt gegenüber der Ausbildung einer Helix sein. Durch die Wechselwirkungen innerhalb und zwischen den Ringen stabilisiert könnte der Stapel an Ringen ein nicht-produktiver Zustand sein, während einzelne Ringkomplexe die stabilisierenden Wechselwirkung durch Bindung von GppNHp überwinden können und sich zu einer Helix reorganisieren können, wie es in den Aufsichten beobachtet wurde. Prinzipielle führt die Bindung von GppNHp zu einer Intensivierung der Dynamamin-Dynamamin-Wechselwirkung, die dann zur Bildung von Stapeln oder Helices führt. Da jedoch der nukleotidfreie Zustand ein nicht-physiologischer Zustand ist, ist die Bildung von nukleotidfreien Ringkomplexen *in vivo* äußerst unwahrscheinlich. Vielmehr wird die Bildung einer Helix nach GTP-Bindung *in vivo* vermutlich nur die Assemblierung von Dynamamin A Dimeren umfassen und nicht die Reorganisation eines Ringkomplexes.

4.3.3. GDP-gebundenes Dynamamin A

In der Gegenwart von GDP, GDP•AlF_x oder nach der Hydrolyse von GTP liegen die Ringkomplexe als einzelne Ringe und nur selten als filamentartige Assemblierung vor. Damit weisen sie ähnliche Strukturen wie im nukleotidfreien Zustand auf. Während die Bindung von GDP wurde durch die Messung der transienten Kinetiken ($K_D = 34 \mu\text{M}$, s. 3.7.2) und durch den nukleotidabhängigen Trypsinverdau (s. 3.6.2) bestätigt werden konnte, konnte die Annahmen, daß GDP•AlF_x den Übergangszustand der Hydrolyse simuliert nicht bestätigt werden. Da GDP•AlF_x in Dynamamin 1 und hGBP1 einen von GDP unterschiedlichen Zustand induziert (Carr und Hinshaw, 1997; Stowell *et al.*, 1999; Praefcke *et al.*, 1999), ist es möglich, daß die Stabilität der Ringkomplexe die Ausbildung des Übergangszustandes verhindert. Folglich könnte der Zustand in der Gegenwart von GDP•AlF_x der GDP-Zustand sein.

Davon unabhängig bestehen deutliche strukturelle Unterschiede zwischen dem GppNHp- und dem GDP/GDP•AlF_x-gebundenen Zustand. In der Gegenwart von GppNHp werden häufig filamentartige Assemblierungen ausgebildet, die eng und sehr regelmäßig gepackt sind. Dagegen werden in der Gegenwart von GDP oder GDP•AlF_x nur wenige filamentartige Assemblierungen beobachtet, die zudem locker und unregelmäßig sind. Dieser Unterschied läßt vermuten, daß die nach GTP-Bindung gebildeten filamentartigen Assemblierungen während oder direkt nach der GTP-Hydrolyse dissoziieren. Zudem kontrahieren die Ringkomplexe in der Gegenwart von GDP oder GDP•AlF_x nicht wie sie es in der Gegenwart von GppNHp tun. Diese strukturellen Unterschiede lassen vermuten, daß nach den GTP-induzierten konformationellen Änderungen weitere konformationelle Änderungen während der GTP-Hydrolyse und/oder Phosphatfreisetzung erfolgen.

4.4 Biochemische Charakterisierung von Dynamin A

4.4.1 Nukleotidabhängige Proteolyse

Die nukleotidabhängige Proteolyse des ZPCK-modifizierten Dynamin A* durch Trypsin zeigt die starke Wechselwirkung der Dynamin A* Monomere innerhalb des Ringkomplexes (s.3.6.2). Dynamin A* wurde zwar ein- bis zweimal durch Trypsin geschnitten, aber der Ringkomplex zerfiel nicht. Die Trypsin-Resistenz war unabhängig vom Nukleotidzustand und beruht daher auf der Bildung des Ringkomplexes, nicht auf der Bildung von filamentartigen Assemblierungen.

Die nukleotidabhängige Proteolyse von Dynamin A durch Trypsin zeigte dagegen die erwartete nukleotidabhängige Trypsin-Resistenz. Durch Zugabe von GppNHp wurde Dynamin A partiell vor der Proteolyse durch Trypsin geschützt, vermutlich durch die Assemblierung zu Spiralen. Bei der Zugabe von GDP wird nur eine geringfügig anderes Fragmentmuster erhalten als in Abwesenheit von Nukleotid. Offensichtlich treten bei GDP-Bindung keine größeren Konformationsänderungen auf. Dies konnte durch die Kristallstruktur der Dynamin A GTPase-Domäne mit und ohne GDP bestätigt werden (Niemann *et al.*, 2001). Die Gegenwart von AlF_x führt zu keiner Veränderung des Fragmentmusters, was die Vermutung unterstützt, daß AlF_x keine Konformationsänderung gegenüber dem GDP-gebundenem Zustand induziert.

4.4.2 Nukleotidabhängige Lipidbindung

Die GppNHp-abhängige Bindung von Dynamin A an negativ geladene Phospholipide zeigt zum einen die Abhängigkeit der Affinität vom Assemblierungszustand und zum anderen die Selektivität für negativ geladene Lipidoberflächen. Nicht-assembliertes Dynamin A besitzt keine nennenswerte Affinität für Phospholipide, wohl aber assembliertes Dynamin A. Die Avidität mehrerer Bindungsstellen ist zumeist höher als die Summe der Affinitäten der einzelnen Bindungsstellen. Dies wurde auch für kovalent dimerisierte PH-Domänen von Dynamin 1 beobachtet (Klein *et al.*, 1998). Der Aviditätseffekt legt nahe, daß *in vivo* nur GTP-gebundenes Dynamin A an negativ geladene Lipidmembranen bindet. Damit begünstigen Lipidoberflächen selektiv die Bildung von Spiralen.

Die Spezifität für negativ geladene Phospholipide, insbesondere phosphorylierte Phosphoinositole entspricht der Affinität von humanem Dynamin 1, dessen isolierte PH-Domäne selektiv PtdIns(4)P und (4,5)P₂ bindet (Zheng *et al.*, 1996; Salim *et al.*, 1996). Dynamin A besitzt keine PH-Domäne, die lipidbindende Domäne ist daher nicht bekannt. Im vorgeschlagenen Modell erfolgt die Lipidbindung durch die QNS-reiche Domäne, die an der Innenseite des Ringkomplex liegen würde (Abb. 4.2a). Sie könnte die selektive Bindung von assemblierten Dynamin A vermitteln und somit zur Zielsteuerung von GTP-gebundenem Dynamin A beitragen.

4.4.3 Kinetische Charakterisierung

Die kinetische Untersuchung der GTPase-Aktivität führte zu zwei herausragenden Ergebnissen: zum einen wurde die Kooperativität der GTPase-Aktivität gezeigt (s. 3.7.4), zum anderen wurde die Produktfreisetzung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der assemblierungsstimulierten GTPase-Aktivität identifiziert (s. 3.7.3).

Die Kooperativität der GTPase-Aktivität wurde zunächst durch die Assemblierung von Dynamin auf Mikrotubuli oder Lipidmembranen und dem damit verbundenen GTPase-stimulierenden Effekt entdeckt (Tuma und Collins, 1994; Lin *et al.*, 1997). Es konnte aber gezeigt werden, daß sie eine intrinsische Eigenschaft von Dynaminen ist (Warnock *et al.*, 1996; Prakash *et al.*, 2000; diese Arbeit). Wie aus Tabelle 4.1 ersichtlich ist die Kooperativität von Dynamin A vergleichsweise groß und erfolgt erst bei sehr hohen Proteinkonzentrationen. Die bislang charakterisierten Dynamine erreichen dagegen ihre maximale Aktivität bereits in Konzentrationsbereichen, bei den Dynamin A noch nicht kooperativ arbeitet. Zudem besitzt Dynamin A eine viel höhere basale und stimulierte GTPase-Aktivität als Dynamin 1 und ähnelt damit eher Dynamin 2 (Tab. 4.1).

Protein	basale GTPase		stimulierte GTPase		Steigerung
Dynamin A	0.17 s ⁻¹	2 µM	1.3 s ⁻¹	40 µM	8 x
Dynamin 1 ^a	0.03 s ⁻¹	0.5 µM	0.15 s ⁻¹	2 µM	5 x
Dynamin 2 ^a	0.5 s ⁻¹	0.1 µM	1.3 s ⁻¹	0.5 µM	3 x
hGBP1 ^b	0.17 s ⁻¹	0.1 µM	0.9 s ⁻¹	3 µM	5 x

Tabelle 4.1: Kooperativität der GTPase-Aktivität von Mitgliedern der Dynamin-Familie. Die GTPase-Aktivität k_{cat} ist mit der jeweilige Proteinkonzentration angegeben. Die Angaben über die basale GTPase-Aktivität von Dynamin 1 schwanken zwischen $< 0.01 \text{ s}^{-1}$ (Maeda *et al.*, 1992; Herskovits *et al.*, 1993) und 0.38 s^{-1} (Tuma *et al.*, 1993). ^a aus: Warnock *et al.*, 1997; ^b aus: Prakash *et al.*, 2000.

Die eigentliche GTP-Hydrolyse erfolgt bei maximaler Stimulierung der GTPase-Aktivität gut doppelt so schnell wie die Produktfreisetzung ($k_{\text{max}} = 3.0 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}} = 1.3 \text{ s}^{-1}$). Damit ist die Produktfreisetzung bei hohen Proteinkonzentration geschwindigkeitsbestimmend. Aus der Messung der TNP-GDP-Dissoziation von 1 µM Dynamin A ($k_{\text{off}} = 1.0 \text{ s}^{-1}$) wird ersichtlich, dass die Produktfreisetzung scheinbar unabhängig von der Dynamin-Konzentration ist und konstant bei $\sim 1 \text{ s}^{-1}$ liegt. Damit sollte bei der konzentrationsabhängigen Stimulierung der GTPase-Aktivität ein anderer Schritt als die Produktfreisetzung beschleunigt werden, und erst bei hohen Proteinkonzentrationen wird die vermutlich konstante Produktfreisetzung geschwindigkeitsbestimmend. Die Bestimmung des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts bei kleinen Proteinkonzentrationen war mit der angewandten

Methode nicht möglich, da der zu detektierende GTP-Umsatz zu klein ist. Der geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei niedrigen Proteinkonzentrationen kann aber indirekt identifiziert werden (Abb. 4.4): Da in einer vereinfachten Darstellung der GTPase-Reaktion nur GTP-Bindung, GTP-Hydrolyse und Produktfreisetzung auftreten, die GTP-Bindung auch bei niedrigen Proteinkonzentrationen schnell ist ($k_{\text{on}} = 1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und die Produktfreisetzung mit $k_{\text{off}} = 1.0 \text{ s}^{-1}$ als konstant angesehen wird, wird der Hydrolyseschritt bei Reaktionsgeschwindigkeiten unter 1.0 s^{-1} geschwindigkeitsbestimmend. Damit stehen alle transienten Kinetiken von Dynamin A im Einklang mit den Kinetiken unter quasi-stationären Bedingungen.

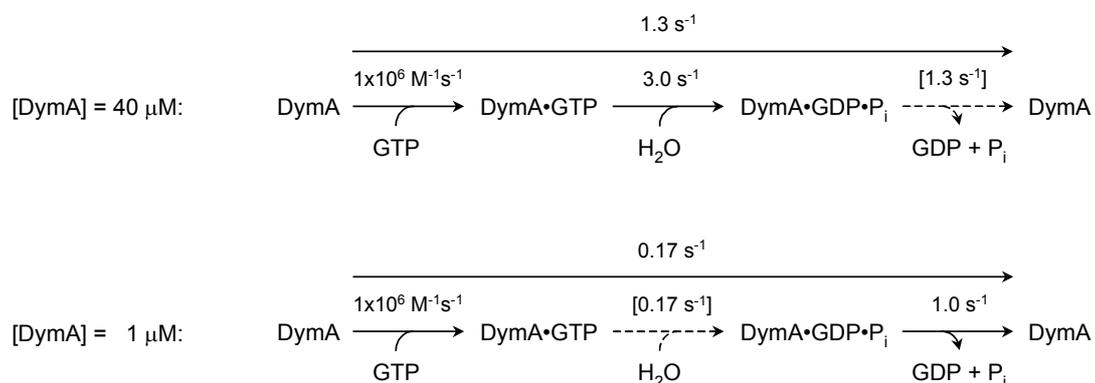


Abb. 4.4: Vereinfachte Darstellung der GTPase-Reaktion von Dynamin A bei hohen und bei niedrigen Proteinkonzentrationen. Die Gesamtreaktion wird in die drei Schritte GTP-Bindung, GTP-Hydrolyse und Produktfreisetzung eingeteilt. Die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten sind angegeben (abgeleitete Konstanten in eckigen Klammern) und der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist gestrichelt dargestellt. Die Bindung von GTP erfolgt unabhängig von der Proteinkonzentration und schnell ($k_{\text{on}} = 1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Bei hohen Proteinkonzentrationen (40 µM) konnte die GTP-Hydrolyse ($k_{\text{max}} = 3.0 \text{ s}^{-1}$) und die Gesamtreaktion ($k_{\text{cat}} = 1.3 \text{ s}^{-1}$) experimentell bestimmt werden. Damit entfällt der geschwindigkeitsbestimmende Schritt auf die Produktfreisetzung. Bei niedrigen Konzentrationen konnte die Gesamtreaktion ($k_{\text{cat}} = 0.17 \text{ s}^{-1}$) und die TNP-GDP-Dissoziation ($k_{\text{off}} = 1.0 \text{ s}^{-1}$) experimentell bestimmt werden. Damit entfällt der geschwindigkeitsbestimmende Schritt auf die GTP-Hydrolyse.

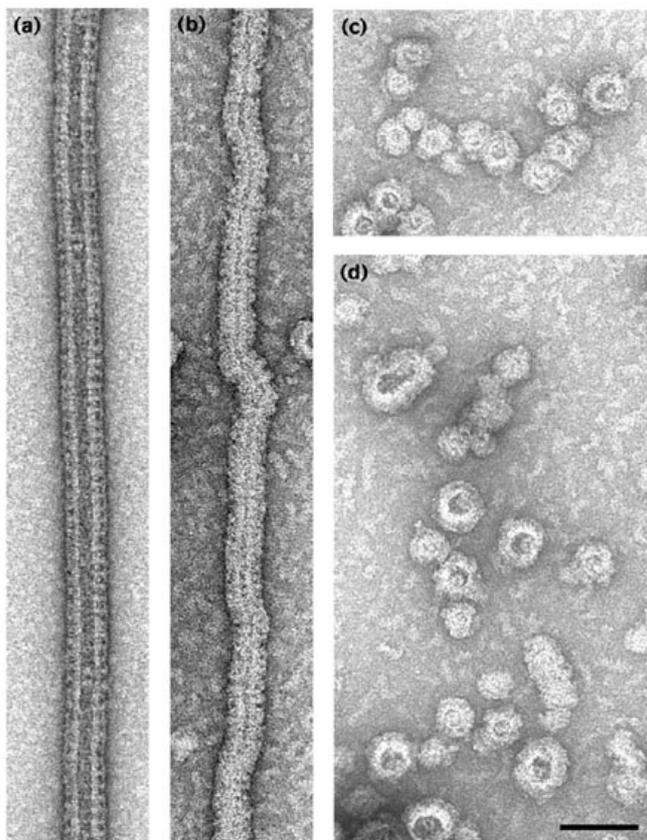
Bislang ist nur eine Studie über transiente Kinetiken von Dynaminen publiziert. Für 2.5 µM Dynamin 2 wurde als geschwindigkeitsbestimmende Schritt die GTP-Hydrolyse experimentell bestimmt (Binns *et al.*, 2000). Die GTPase-Aktivität von $k_{\text{cat}} = 0.0061 \text{ s}^{-1}$ lag aber mehr als 200-fach niedriger als in anderen Arbeiten über Dynamin 2 beschrieben (Warnock, 1997).

Der Wechsel des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts könnte die Assemblierung von Dynaminen begünstigen. Während nicht-assembliertes Dynamin durch die langsame GTP-Hydrolyse vergleichsweise lange in der GTP-Konformation vorliegt und assemblieren kann, wird nach Assemblierung die GTP-Hydrolyse beschleunigt und die für die biologische Funktion notwendigen Konformationsänderungen können mit der notwendigen Geschwindigkeit durchgeführt werden.

4.5 Model der Funktionsweise der Dynamine

Die elektronenmikroskopische Analyse der Dynamin A Komplexstruktur und die kinetische Untersuchung der GTPase-Aktivität erlaubt neue Einblicke in die Funktionsweise von Dynaminen. Sie zeigen, dass die beiden vorgeschlagenen Mechanismen für die kraftgenerierende Funktion der Dynamine, die Kontraktion und die Streckung der Helix, während des GTPase Zykluses auftreten und zur Membranabschnürung beitragen können.

Zuvor wurde durch Sweitzer und Hinshaw (1998) gezeigt, daß nukleotidfreies Dynamin 1 *in vitro* an



Lipidvesikel bindet und Röhren von 50 nm Durchmesser formt (Abb.4.5a). Die Zugabe von GTP transformiert die meisten Röhren zu Dynamin 1-umhüllten Vesikeln von 60 nm Durchmesser, einige wenige Röhren blieben aber erhalten und wiesen einen Durchmesser von nur noch 40 nm auf (Abb. 4.5b-d). Diese kontrahierten Röhren wurden als intermediäre Strukturen interpretiert, die nach der GTP-Hydrolyse und unmittelbar vor der Dissoziation zu Vesikeln auftreten.

Abb. 4.5: Dynamin 1 vesikuliert Lipidröhren unter GTP-Verbrauch. Nukleotidfreies Dynamin 1 bildet um eine PtdSer-Membran eine Helix von ~50 nm Durchmesser (a). Nach Zugabe von GTP werden teils Dynamin-umwickelte, kontrahierte Röhren von ~40 nm Durchmesser (b) erhalten, zumeist aber Dynamin-dekorierte Vesikel von ~60 nm Durchmesser (c-d). (aus: Hinshaw, 1999). Der Balken entspricht 100 nm.

Dagegen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, daß die Ausbildung von eng gepackten Helices mit kleinem Durchmesser bereits durch GTP-Bindung erfolgt, ohne die Notwendigkeit der GTP-Hydrolyse. Dies konnte inzwischen auch für Dynamin 1 gezeigt werden (Zhang und Hinshaw, 2001). Damit erfolgen bereits bei der GTP-Bindung die ersten beiden Schritte zur Membranabschnürung: die Helixbildung und die Kontraktion.

Zur vollständigen Membranabschnürung ist eine 20%ige Kontraktion des Durchmessers der Dynaminhelix, wie sie bei Bindung von GppNHp beobachtet wurde, vermutlich nicht ausreichend

(Kozlov *et al.*, 1999). Tatsächlich zeigen experimentelle Ergebnisse, daß die Helixformation um Membranen für die Membranabschnürung nicht ausreichend ist, sondern auch die GTP-Hydrolyse erfordert (Takei *et al.*, 1995, 1998; Sweitzer und Hinshaw, 1998; Marks *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2001). Folglich sind für die nachfolgende GTP-Hydrolyse weitere konformationelle Änderungen zu erwarten, die zur Membranabschnürung führen. Die Beobachtung dieses Übergangszustandes ist schwierig, aber aus theoretischen Überlegungen wurde die Streckung der Helix vorgeschlagen (Kozlov, 1999). Eine solche Streckung der Helix bei GTP-Hydrolyse wurde *in vitro* für Dynamin 1 experimentell gezeigt (Stowell *et al.*, 1999). Dazu wurden vorgeformten, starre Lipidröhrchen (*lipid nanotubes*) eingesetzt, die zwar keine Kontraktion oder Vesikulierung der Membran zulassen, die aber die Messung der Helixstreckung erlaubten. Bei GTP-Hydrolyse erhöhte sich die Ganghöhe der Helix von 11 nm auf 20 nm (Abb. 4.6; Stowell *et al.*, 1999).

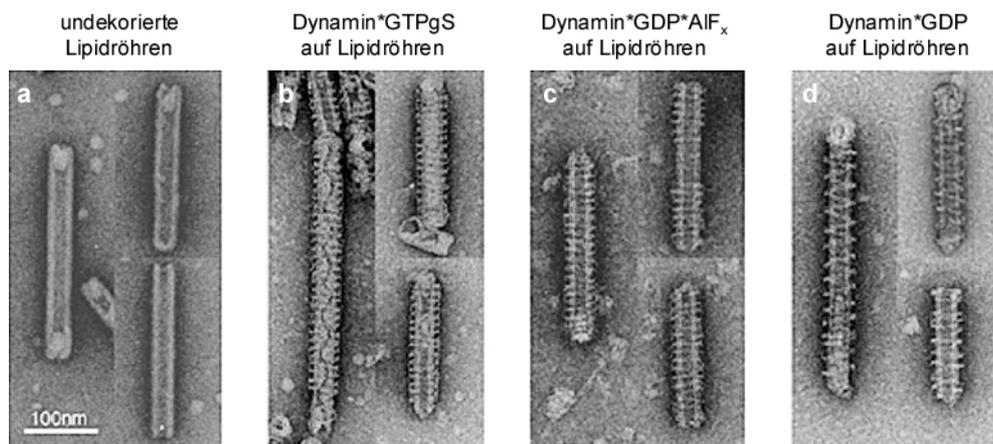


Abb. 4.6: Streckung der Dynaminhelix bei GTP-Hydrolyse. Galactoceramid-haltige Lipidmembranen bilden Lipidröhrchen mit einem konstanten Durchmesser von 28 nm (a). Dynamin bindet an die Lipidröhrchen, die 10 % PtdIns(4,5)P₂ enthalten und formt Helices. In Gegenwart des schwer-hydrolysierbaren GTP-Analogs GTPγS (b) und in Gegenwart von GDP+AlF_x (c) besitzt die Helix eine geringe Ganghöhe (11 nm). Nach Hydrolyse von GTP wird eine deutlich vergrößerte Ganghöhe (20 nm) beobachtet. Die Stabilität der Lipidröhre verhindert eine mögliche Kontraktion und Vesikulierung. (aus Stowell *et al.*, 1999)

Für Dynamin A wurde ebenfalls eine Veränderung der Ringpackung von 10 nm Wiederholungen auf wenig regelmäßige Wiederholungen von etwa 15 nm beobachtet, wenn die eng gepackten Stapel im GppNHp-gebundenen Zustand mit den filamentartigen Assemblierungen in den anderen Nukleotidzuständen verglichen werden.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit und den publizierten Ergebnissen anderer Gruppen kann nun ein Mechanismus für die Membranabschnürung durch die Dynamine postuliert werden (Abb. 4.7). Die GTP-Bindung induziert die Assemblierung zu Helices um eine Lipidoberfläche, deren Einschnürung zu einer engen Röhre und die teilweise Penetration durch die Dynamine. Durch die Oligomerisierung wird das aktive Zentrum der GTPase-Domäne stabilisiert, die dadurch die GTP-Hydrolyse effizienter katalysiert. Eine derartige Beschleunigung der GTP-Hydrolyse wird bei den GAPs der G_{α} -Untereinheiten (RGS, für: *regulator of G-protein signalling*) beobachtet. Ob dabei, in Analogie zu den GAPs der Ras-ähnlichen GTPasen, auch katalytisch aktive Aminosäuren in die GTPase-Domäne eingebracht werden, kann bislang nicht beantwortet werden. Die GTP-Hydrolyse führt zu den konformationellen Änderungen, die zum Zerreißen der Membran führen, vermutlich durch die Streckung der Helix.

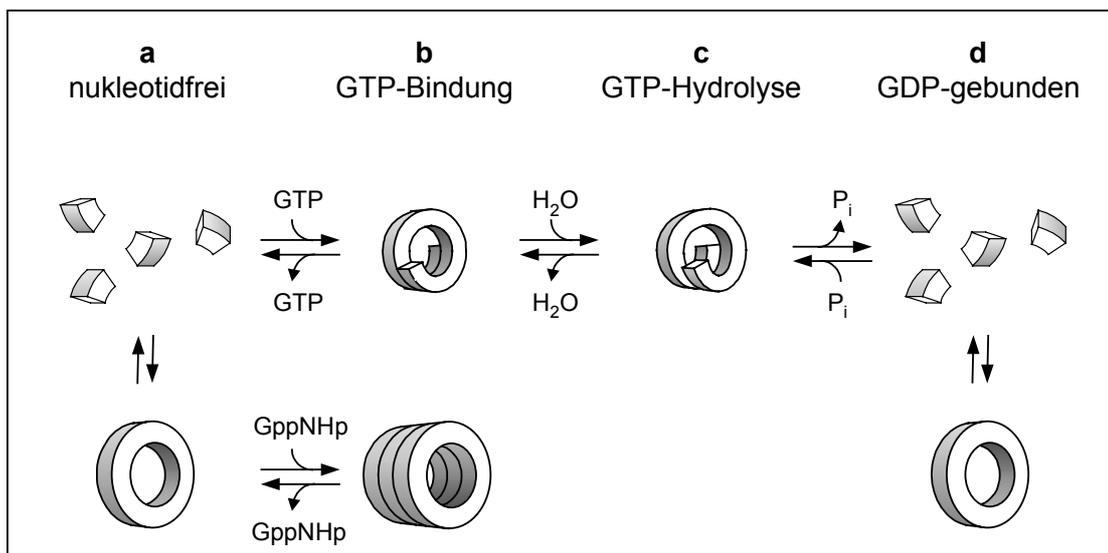


Abb. 4.7: Modell der Funktionsweise der Dynamine. Das Modell enthält alle beobachteten Strukturen von Dynamin A, mit dem vorgeschlagenen Mechanismus der Kraftgenerierung durch Dynamine in der oberen Reihe. **(a)** Dynamin dimere (obere Reihe) formt in der Abwesenheit von Nucleotiden Ringkomplexe (untere Reihe). Dies ist eine nicht-physiologische Beobachtung, da *in vivo* stets Nucleotide zugegen sind. **(b)** Bei GTP-Bindung assemblieren die Ringe zu Stapeln (untere Reihe), während die Dynamin Dimere zu kurzen, eng gepackten Helices assemblieren (obere Reihe). Diese Helix besitzt einen kleineren Durchmesser als der nukleotidfreie Ringkomplex. **(c)** Obwohl nicht direkt beobachtet, induziert die GTP-Hydrolyse weitere Konformationsänderungen, die zu Dissoziation der Helix führen, vermutlich über eine Streckung der Helix wie sie durch McMahon and Mitarbeiter gezeigt wurde (Stowell *et al.*, 1999; Marks *et al.*, 2001). Die Streckung der engen Helix könnte zum Zerreißen der Membran führen (Kozlov, 1999, 2000). **(d)** Nach Phosphatfreisetzung dissoziiert die GDP-gebundenen Helix zu Dimeren (obere Reihe). Der GDP-gebundene Ringkomplex ist ein Resultat der hohen Stabilität der nukleotidfreien Ringkomplexe. Dieses Modell enthält keine Rekrutierungsfaktoren (negativ geladene Lipidmembranen, PRD bindende Proteine) die schnelle Helixformation begünstigen oder Lipid-modifizierende Enzyme (Endophilin, BARS), die zu einer Änderung der spontanen Krümmung der Membran beitragen.

Diese Modell geht konform mit den theoretischer Analyse der Membranabschnürung durch Kozlov (2001), in der die Kombination von Verengung und Streckung der Helix sowie die Veränderung der spontanen Krümmung der Membran für den Zusammenbruch der Lipidröhre und damit den Abriß der Membran verantwortlich gemacht wird. Die Dissoziation der Helix konnte bislang nicht gezeigt werden, wird aber für den GDP-Zustand postuliert, der im Gleichgewicht mit dem nukleotidfreien Zustand steht. Damit schließt sich der GTPase-Zyklus und reaktiviert Dynamin für einen aktiven Beitrag zu Membranabschnürung.

Um den Mechanismus der Membranabschnürung *in vivo* vollständig beschreiben zu können, müssen vermutlich noch weitere Komponenten berücksichtigt werden, wie z.B. die Veränderung der Lipidzusammensetzung (Schmidt *et al.*, 1999; Weigert *et al.*, 1999) und Lipid-Protein-Wechselwirkung. Der Lipidkontakt wird bei Dynamin A vorraussichtlich durch die spitzen Strukturen im Inneren des inneren Rings hergestellt. Diese sind ideal positioniert, um die umwickelte Membran zu kontaktieren und möglicherweise zu perforieren. Experimentelle Ergebnisse zeigen, daß Dynamin 1 tatsächlich in eine Lipidschicht eindringt (Burger *et al.*, 2000). Diese Penetration erfolgt vor allem in Lipidschichten hinein, die eine negativ geladene Kopfgruppe tragen, wie die Phosphatidylsäure oder phosphorylierte Phosphatidylinositole (Burger *et al.*, 2000) - exakt jene Lipide, an die GTP-gebundenes Dynamin A bindet (3.6.2).

4.6 Dynamine – molekulare Motoren oder molekulare Schalter?

Eine Vielzahl von Eigenschaften der Dynamine weist auf eine Funktion als kraftgenerierende Strukturproteine hin. Dazu gehört ihre Fähigkeit an Membranen zu binden (Takei *et al.*, 1995, 1998; Burger *et al.*, 2000, diese Arbeit), sich in diese zu insertieren (Burger *et al.*, 2000), dort zu helikalen Strukturen zu oligomerisieren (Takei *et al.*, 1995; Sweitzer und Hinshaw, 1998; diese Arbeit) und die Komplexstruktur bei GTP-Bindung sowie bei GTP-Hydrolyse stark zu verändern (Sweitzer und Hinshaw, 1998; Stowell *et al.*, 1999; Zhang und Hinshaw, 2001; diese Arbeit). Damit sind Dynamine prinzipiell in der Lage auf die umschlossene Membran Kraft auszuüben. Die Messung dieser Kraft als Nachweis der Kraftgeneration durch Dynamine ist bislang experimentell noch nicht gelungen. Der dazu erforderliche experimentelle Aufbau ist extrem anspruchsvoll, denn die sehr kleine Kraft wirkt nur sehr kurze Zeit auf eine flexible und nur einige nm dicke Lipidröhre, die infolge der Kraftausübung zerfällt.

Auch die Ergebnisse mit punktmutierten Dynaminen lassen eher den Schluß zu, daß Dynamine kraftgenerierende Motorproteine und keine regulierenden Schalterproteine sind. Prinzipiell sollten

Motorproteine bei der Arretierung in einem beliebigen Zustand inaktiv werden, dagegen sollten Schalterproteine bei einer Arretierung im GTP-Zustand dauerhaft aktiv, in jedem anderen Zustand aber inaktiv werden. Die Mutation K44A, bei der das hochkonservierte Lysin im *P-loop* substituiert wird, führt in Dynamin 1 zur Verminderung der GTP-Affinität und der GTP-Hydrolyse (Damke *et al.*, 1994). Während die verminderte GTP-Affinität in beiden Modellen zu einer Verminderung der Aktivität führt, sollte die verminderte GTP-Hydrolyse den GTP-Zustand verlängern und daher einen Motor verlangsamen, aber einen Schalter aktivieren. Dynamin 1 K44E wirkt in COS-7 Zellen dominant negativ, bildet filamentartige Strukturen und führt zur Verminderung der Dynamin-abhängigen Endocytose (Herskovits *et al.*, 1993), was auf eine Funktion als Motorprotein hinweist. Gleiche Ergebnisse wurden mit Dynamin K44A in HeLa-Zellen erhalten (Damke *et al.*, 1994). Der dominant negative Effekt impliziert, daß Dynamin K44E/A einen dauerhaften Komplex mit einem Protein bildet, das durch wildtyp Dynamin nur transient gebunden wird. Bei Assemblierung mit endogenem Dynamin 1 ist das GTP-Bindungs- und Hydrolyse-defiziente Dynamin 1 K44E/A vermutlich in der Lage, die zur Kraftgenerierung erforderlichen Konformationsänderungen innerhalb der Dynaminhelix zu blockieren und damit die nachfolgende Dissoziation der Helix zu verhindern. Konsequenterweise geht der dominant negative Effekt bei C-terminal verkürztem Dynamin K44E, das nicht mehr assemblieren kann, verloren (Herskovits *et al.*, 1993). Dagegen ist nicht ersichtlich, wie eine Schalterfunktion des endogenen Dynamins durch die Anwesenheit von Dynamin 1 K44E/A gestört werden sollte, zumal nun gezeigt werden konnte, daß Dynamin 1 K44E *in vivo* verstärkt im GTP-Zustand vorliegt (Jeong *et al.*, 2001).

Bei Substitution des konservierten Threonins innerhalb des Familienmotifs der Dynamine (T65 in Dynamin 1, T59 in Dynamin A) wird die GTP-Bindung weitestgehend nicht beeinträchtigt, aber die GTP-Hydrolyse stark verlangsamt (Ponten *et al.*, 2000; Marks *et al.*, 2001). Mit dieser Mutante konnten wie bei Dynamin K44E lange intrazelluläre, mit Dynamin dekorierte Membraneinstülpungen beobachtet werden (Marks *et al.*, 2001). Zudem konnte mit Dynamin T65A durch mehrere Gruppen gezeigt werden, daß die GTP-Hydrolyse für die Dynamin-abhängige Endocytose essentiell ist, womit eine Schalterfunktion weitestgehend auszuschließen ist (Marks *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2001)

Die Ergebnisse, die zur Postulierung der Schalterfunktion geführt hatten, bleiben schwierig zu interpretieren. Die Substitution einer konservierten Aminosäure der GED, entweder Lysin K694 oder Arginin R725 (R828 in Dynamin A) führte zu einer Verminderung der assemblierungs-stimulierten GTPase (Sever *et al.*, 1999). Mit diesen beiden Mutationen wurden *in vivo* statt einer Verlangsamung eine Beschleunigung der Bildung von noch nicht abgeschnürten Vesikeln (*constricted coated pits*) beobachtet (Sever *et al.*, 2000a). Beide Beobachtungen konnte durch andere Gruppen nicht bestätigt werden (Marks *et al.*, 2001). Die Schlußfolgerung, daß Dynamine als regulative

Schalter funktionieren ist auch keineswegs zwingend. Die beiden Mutationen verändern scheinbar das Assemblierungsverhalten und damit indirekt die GTPase-Aktivität (Marks *et al.*, 2001). Der experimentelle Nachweis derartiger Änderungen ist mitunter sehr anspruchsvoll. So weist Dynamin 1 K142A eine normale Hydrolyse auf und vermindert dennoch die Dynamin-abhängige Endocytose. Die elektronenmikroskopische Analyse zeigt, daß in Dynamin K142A die GTP-Hydrolyse von den nachfolgenden Konformationsänderungen entkoppelt ist und zu keiner Streckung der Dynaminhlex in der Lage ist (Marks *et al.*, 2001). Damit unterstützt auch die Punktmutation K142A das Model der Dynamine als kraftgenerierende Motorproteine.

Möglicherweise ist der Übergang von molekularen Schaltern zu molekularen Motoren bei den GTPasen fließend. Für beide Funktionen sind nukleotidinduzierte Konformationsänderungen essentiell, die einen Affinitätswechsel zu interagierenden Proteinen bewirken (Vale, 1996). Diese interagierende Proteine sind im Fall der molekularen Motoren die Filamente des Cytoskeletts und im Falle der molekularen Schalter diverse Effektoren. Die Voraussetzung für die Kraftgenerierung, wie sie bei den Motorproteinen auftritt, ist die Amplifizierung der kleinen nukleotidinduzierten Konformationsänderung in eine große Bewegung. In Myosin erfolgt diese Amplifizierung zunächst innerhalb der Motordomäne und wird über die Konverterdomäne auf einen Hebelarm übertragen (Geeves und Holmes, 1999; Houdusse und Sweeney, 2001). Ein derartiger Hebelarm fehlt den Ras-ähnlichen GTPasen und den G_{α} -Untereinheiten völlig (s. Abb. 1.2a-b). Bei den Transkriptionsfaktoren EF-Tu und IF2/eIF5B erfolgt dagegen eine Übertragung der nukleotidinduzierten Konformationsänderungen der GTPase-Domäne auf die anderen Domänen, die sich nachfolgend um bis zu 90° drehen oder bis zu 4.6 Å bewegen (Berchtold *et al.*, 1993; Roll-Mecak *et al.*, 2000). Für Dynamine ist eine vergleichbare Amplifizierung denkbar, da sie über mindestens drei Domänen verfügen (s. Abb. 1.4). Durch die Assemblierung zu Ringen und Spiralen werden diese Strukturänderungen noch multipliziert und konnten in dieser Arbeit für den Dynamin A Ringkomplex visualisiert werden. Damit sind auch einige GTPasen prinzipiell in der Lage Kraft zu generieren. Der experimentelle Nachweis dieser Kraft stellt eine große Herausforderung für die Grundlagenforschung dar.

5. Zusammenfassung

Die GTPasen der Dynamin-Familie besitzen eine einheitliche Domänenstruktur, erfüllen aber sehr unterschiedliche biologische Funktionen, wie die Vesikelgenerierung in der Endocytose, 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 dieser Arbeit wurde das Protein Dynamin A aus dem eukaryotischen Modellorganismus *Dictyostelium discoideum* (Sozialamöbe) verwendet, um den Mechanismus der Dynamine zu untersuchen. Nach der Optimierung der Reinigung von Dynamin A aus *D. discoideum* konnte mit Hilfe der Elektronenmikroskopie gezeigt werden, daß Dynamin A zu Ringen assembliert, die denen von humanem Dynamin 1 stark ähneln. Aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden Projektionen der Aufsicht und der Seitenansicht des nukleotidfreien Dynamin A Ringkomplex erstellt und daraus die dreidimensionale Struktur des Ringkomplexes berechnet. Diese Struktur erlaubt erstmals Einblicke in die molekulare Organisation von assemblierten Dynaminen. Der 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 elektronenmikroskopische Analyse der nukleotidabhängigen Konformationsänderungen zeigte, daß Dynamin A bei Bindung eines schwer-hydrolysierbaren GTP-Analogs zu Filamenten assembliert. Der nukleotidfreie Ringkomplex 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 umwickelte 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, nach dem die Kombination aus Kontraktion und nachfolgender Streckung der Helix zur Abtrennung der Lipidmembran führt.

Die GTP-induzierte Assemblierung von Dynamin A wird durch negativ geladene Lipidmembranen unterstützt. Es wurde gezeigt, daß Dynamin A nur im GTP-gebundenen Zustand an Phospholipide bindet, und zwar spezifisch an phosphorylierte Phosphatidylinositole und Phosphatidylsäure. Diese

Lipide sind folglich Rekrutierungsfaktoren, die zur Zielsteuerung und Anreicherung von GTP-gebundenem Dynamin A an eine bestimmte Membran beitragen.

Durch die kinetische Charakterisierung von Dynamin A konnte eine klare Kooperativität der GTPase-Aktivität gezeigt werden. Dynamin A steigert seine GTPase-Aktivität konzentrationsabhängig um den Faktor 8 und beschleunigt dabei den zunächst langsamen Hydrolyseschritt, bis bei hohen Konzentrationen die Produktfreisetzung geschwindigkeitsbestimmend wird. Die Kooperativität erlaubt zum einen die Assemblierung von GTP-gebundenem Dynamin A durch die langsame GTP-Hydrolyse von nicht-assemblierten Dynamin A sowie die konzertierte GTP-Hydrolyse von assemblierten Dynamin A durch die Beschleunigung der GTP-Hydrolyse im assemblierten Zustand.

Die in dieser Arbeit vorgestellten strukturellen und biochemischen Untersuchungen von Dynamin A legen eine aktive Rolle in der Membranabschnürung nahe, in der das Protein nukleotidabhängig an speziellen Lipidmembranen assembliert, diese zu einer engen Röhre formt und nachfolgend zerreißt. Damit kommt den GTPasen der Dynamin-Familie eine kraftgenerierende Funktion zu, die sich von der etablierten Funktion der GTPasen als molekulare Schalter abhebt.

6. Literaturverzeichnis

- Airenne, K.J., Marjomaki, V.S. und Kulomaa, M.S. (1999). Recombinant avidin and avidin-fusion proteins. *Biomol. Eng.* **16**, 87-92.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M. Roberts, K. und Watson, J.D. (1989). *Molecular Biology of the cell*. Second edition. Garland Publishing. New York & London.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., Bhattacharya, S.S. und Wissinger, B. (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat. Genet.* **26**, 211-215.
- Bagshaw, C.R., Eccleston, J.F., Eckstein, F., Goody, R.S., Gutfreund, H. und Trentham, D.R. (1974). The magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase of myosin. Two-step processes of adenosine triphosphate association and adenosine diphosphate dissociation. *Biochem J.* **141**, 351-364.
- Baldauf, S.L. und Doolittle, W.F. (1997). Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12007-12012.
- Baldauf, S.L. (1999). A search for the origin of animals and fungi: comparing and combining molecular data. *Am. Naturalist* **154**, S178-S188.
- Baldauf, S.L., Roger, A.J., Wenk-Siefert, I. und Doolittle, W.F. (2000). A Kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* **290**, 972-976.
- Barylko, B., Binns, D.D., Lin, K.M., Atkinson, M.A., Jameson, D.M., Yin, H.L. und Albanesi, J.P. (1998). Synergistic activation of dynamin GTPase by Grb2 and phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* **273**, 3791-3797.
- Binns, D.D., Barylko, B., Grichine, N., Atkinson, M.A., Helms, M.K., Jameson, D.M., Eccleston, J.F. und Albanesi, J.P. (1999). Correlation between self-association modes and GTPase activation of dynamin. *J. Protein Chem.* **18**, 277-290.
- Binns, D.D., Helms, M.K., Barylko, B., Davis, C.T., Jameson, D.M., Albanesi, J.P. und Eccleston, J.F. (2000). The mechanism of GTP hydrolysis by dynamin II: a transient kinetic study. *Biochemistry* **39**, 7188-7196.
- Berchtold, H., Reshetnikova, L., Reiser, C.O., Schirmer, N.K., Sprinzl, M. und Hilgenfeld, R. (1993). Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements. *Nature* **365**, 126-132.
- Bourne, H.R., Landis, C.A. und Masters, S.B. (1998). Hydrolysis of GTP by the alpha-chain of Gs and other GTP binding proteins. *Proteins* **6**, 222-230.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. und McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**, 125-132.

- Brownbridge, G.G., Lowe, P.N., Moore, K.J., Skinner, R.H. und Webb, M.R. (1993). Interaction of GTPase activating proteins (GAPs) with p21ras measured by a novel fluorescence anisotropy method. Essential role of Arg-903 of GAP in activation of GTP hydrolysis on p21ras. *J. Biol. Chem.* **268**, 10914-10919.
- Burger, K.N.J., Demel, R.A., Schmid, S.L. und de Kruijff, B. (2000). Dynamin is membrane-active: lipid insertion is induced by phosphoinositides and phosphatidic acid. *Biochemistry* **39**, 12485-12493.
- Carr, J.F. und Hinshaw, J.E. (1997). Dynamin assembles into spirals under physiological salt conditions upon the addition of GDP and gamma-phosphate analogues. *J. Biol.Chem.*, **272**, 28030-28035.
- Carter, L.L., Redelmeier, T.E., Woollenweber, L.A. und Schmid, S.L. (1993). Multiple GTP-binding proteins participate in clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* **120**, 37-45.
- Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **73**, 203-266.
- Chen, M.S., Obar, R.A., Schroeder, C.C., Austin, T.W., Poodry, C.A., Wadsworth, S.C. und Vallee RB. (1991). Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a Drosophila gene involved in endocytosis. *Nature* **351**, 583-586.
- Clark, S.G., Shurland, D.L., Meyerowitz, E.M., Bargmann, C.I., van der Bliek, A.M. (1997). A dynamin GTPase mutation causes a rapid and reversible temperature-inducible locomotion defect in *C. elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10438-10443.
- Compton, S.J. und Jones, C.G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* **151**, 369-374.
- Damke, H., Baba, T., Warnock, D.E. und Schmid, S.L. (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J. Cell Biol.* **127**, 915-934.
- Danino, D. und Hinshaw, J.E. (2001). Dynamin family of mechanoenzymes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 454-460.
- David, C., McPherson, P.S., Mundigl, O. und de Camilli P. (1996). A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 331-335.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., Astarie-Dequeker, C., Lasquelléc, L., Arnaud, B., Ducommun, B., Kaplan, J. und Hamel, C.P. (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat. Genet.* **26**, 207-210.
- Di Paolo, C., Hefti, H.P., Meli, M., Landis, H., und Pavlovic, J. (1999). Intramolecular backfolding of the carboxyl-terminal end of MxA protein is a prerequisite for its oligomerisation. *J. Biol. Chem.* **274**, 32071-32078.
- Dube, P., Tavares, P., Lurz, R. und van Heel, M. (1993). The portal protein of bacteriophage SPP1: a DNA pump with 13-fold symmetry. *EMBO J.*, **12**, 1303-1309.
- Durrant, I. (1990). Light-based detection of biomolecules. *Nature* **346**, 297-298.

- Erickson, H.P. (2000). Dynamin and FtsZ: missing link in mitochondrial and bacterial division. *J. Cell Biol.* **6**, 1103-1105.
- Fok, A.K., Clarke, M., Ma, L. und Allen, R.D. (1993). Vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase of *Dictyostelium discoideum*. A monoclonal antibody study. *J Cell Sci.* **106**, 1103-1113.
- Freyman, D.M., Keenan, R.J., Walter, P. und Stroud, R.M. (1997). Structure of the conserved GTPase domain of the signal recognition particle. *Nature* **385**, 361-364.
- Geeves, M.A. und Holmes, K.C. (1999). Structural mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 687-728.
- Gout, I., Dhand, R., Hiles, I.D., Fry, M.J., Panayotou, G., Das, P., Truong, O., Totty, N.F., Hsuan, J., Booker, G.W., et al. (1993). The GTPase dynamin binds to and is activated by a subset of SH3 domains. *Cell* **75**, 25-36.
- Grigliatti, T.A., Hall, L., Rosenbluth, R. und Suzuki, D.T. (1973). Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. XIV. A selection of immobile adults. *Mol. Gen. Genet.* **120**, 107-114.
- John, J., Sohmen, R., Feuerstein, J., Linke, R., Wittinghofer, A. und Goody, R.S. (1990). Kinetics of interaction of nucleotides with nucleotide-free H-ras p21. *Biochemistry* **29**, 6058-6065.
- Harautz, G und van Heel, M. (1986). Resolution criteria for three dimensional reconstructions. *Optik*, **73**, 146-156.
- Heilker, R., Spiess, M. und Crottet, P. (1999). Recognition of sorting signals by clathrin adaptors. *Bioessays* **21**, 558-567.
- Herskovits, J.S., Shpetner, H.S., Burgess, C.C. und Vallee, R.B. (1993a). Microtubules and Src homology 3 domains stimulate the dynamin GTPase via its C-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 11468-11472.
- Herskovits, J.S., Burgess, C.C., Obar, R.A. und Vallee, R.B. (1993b). Effects of mutant rat dynamin on endocytosis. *J. Cell Biol.* **122**, 565-78.
- Hill, E., van der Kaay, J., Downes, C.P. und Smythe, E. (2001). The role of dynamin and its binding partners in coated pit invagination and scission. *J. Cell Biol.* **152**, 309-324.
- Hinshaw, J.E. und Schmid, S.L. (1985). Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* **374**, 190-192.
- Hinshaw, J.E. (1999). Dynamin spirals. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 260-267.
- Hofmann, K., Bucher, P., Falquet, L. und Bairoch, A. (1999). The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 215-219.
- Houdusse, A. und Sweeney, H.L. (2001). Myosin motors: missing structures and hidden springs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 182-194.
- Jeong, M.J., Yoo, J., Lee, S.S., Lee, K.I., Cho, A., Kwon, B.M., Moon, M.J., Park, Y.M. und Han, M.Y. (2001). Increased GTP-binding to dynamin II does not stimulate receptor-mediated endocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 136-142.

- Katti, M.V., Sami-Subbu, R., Ranjekar, P.K. und Gupta, V.S. (2000). Amino acid repeat patterns in protein sequences: Their diversity and structural-functional implications. *Prot. Science* **9**, 1203-1209
- Keeling, P.J., Deane, J.A. und McFadden, G.I. (1998). The phylogenetic position of alpha- and beta-tubulins from the Chlorarachnion host and Cercomonas (Cercozoa). *J. Eukaryot. Microbiol.* **45**, 561-570.
- Keenan, R.J., Freymann, D.M., Walter, P. und Stroud, R.M. (1998). Crystal structure of the signal sequence binding subunit of the signal recognition particle. *Cell* **94**, 181-191.
- Klein, D.E., Lee, A., Frank, D.W., Marks, M.S. und Lemmon, M.A. (1998). The pleckstrin homology domains of dynamin isoforms require oligomerization for high affinity phosphoinositide binding. *J. Biol. Chem.* **273**, 27725-27733.
- Klug, A. (1999). The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **354**, 531-535.
- Koenig, J.H. und Ikeda, K. (1989). Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockage of membrane retrieval. *J. Neurosci.* **9**, 3844-3860.
- Kosaka, T. und Ikeda, K. (1983). Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*, *shibire^{ts1}*. *J. Cell Biol.*, **97**, 499-507.
- Kozlov, M.M. (1999). Dynamin: possible mechanism of "Pinchase" action. *Biophys J.*, **77**, 604-616.
- Kozlov, M.M. (2001). Fission of biological membranes: interplay between dynamin and lipids. *Traffic*, **2**, 51-65.
- Kull, F.J. und Flettrick, R.J. (1998). Is the tubulin/FtsZ fold related to the G-protein fold? *Trends Cell Biol.* **8**, 306-307.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209.
- la Cour, T.F., Nyborg, J., Thirup, S. und Clark, B.F. (1985). Structural details of the binding of guanosine diphosphate to elongation factor Tu from *E. coli* as studied by X-ray crystallography. *EMBO J.* **4**, 2385-2388.
- Lee, A., Frank, D.W., Marks, M.S. und Lemmon, M.A. (1999). Dominant-negative inhibition of receptor-mediated endocytosis by a dynamin-1 mutant with a defective pleckstrin homology domain. *Curr. Biol.* **9**, 261-264.
- Lin, H.C. und Gilman, A.G. (1996). Regulation of dynamin I GTPase activity by G protein betagamma subunits and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **271**, 27979-27982.
- Lin, H.C., Barylko, B., Achiriloaie, M. und Albanesi, J.P. (1997). Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate-dependent activation of dynamins I and II lacking the proline/arginine-rich domains. *J. Biol. Chem.* **272**, 25999-26004.

- Maeda, K., Nakata, T., Noda, Y., Sato-Yoshitake, R. und Hirokawa, N. (1992). Interaction of dynamin with microtubules: its structure and GTPase activity investigated by using highly purified dynamin. *Mol. Biol. Cell* **3**, 1181-1194.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- Manstein, D.J., Schuster, H.P., Morandini, P. und Hunt, D.M. (1995). Cloning vectors for the production of proteins in *Dictyostelium discoideum*. *Gene* **162**, 129-134.
- Manstein, D.J. und Hunt, D.M. (1995). Overexpression of myosin motor domains in *Dictyostelium*: screening of transformants and purification of the affinity tagged protein. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **16**, 325-332.
- Margolin, W. (2000). Organelle division: Self-assembling GTPases caught in the middle. *Curr. Biol.* **10**, R328-R330.
- Markby, D.W., Onrust, R. und Bourne, H.R. (1993). Separate GTP binding and GTPase activating domains of a G alpha subunit. *Science* **262**, 1895-1901.
- Marks, B., Stowell, M.H., Vallis, Y., Mills, I.G., Gibson, A., Hopkins, C.R. und McMahon, H.T. (2001). GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* **410**, 231-235.
- McNiven, M.A., Cao, H., Pitts, K.R., und Yoon, Y. (2000). The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 115-120.
- McPherson, P.S., Garcia, E.P., Slepnev, V.I., David, C., Zhang, X., Grabs, D., Sossin, W.S., Bauerfeind, R., Nemoto, Y. und De Camilli, P. (1996). A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature* **379**, 353-357.
- Melén, K., Ronni, T., Broni, B., Krug, R.M., von Bonsdorff, C.-H. und Julkunen, L. (1992). Interferon-induced Mx proteins form oligomers and contain a putative leucine zipper. *J. Biol. Chem.*, **267**, 25898-25907.
- Mikami, K., Iuchi, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. und Shinozaki, K. (2000). A novel Arabidopsis thaliana dynamin-like protein containing the pleckstrin homology domain. *J. Exp. Bot.* **51**, 317-318.
- Miller, J.D., Bernstein, H.D. und Walter, P. (1994). Interaction of *E. coli* Ffh/4.5 S ribonucleoprotein and FtsY mimics that of Mammalian signal recognition particle and its receptor. *Nature* **367**, 657-659
- Millman, J.S. und Andrews, D.W. (1997). Switching the model: A concerted mechanism for GTPases in Protein Targeting. *Cell* **89**, 673-676.
- Montoya, G., Svensson, C., Lührink, J. und Sinning, I. (1997). Crystal structure of the NG domain from the signal-recognition particle receptor FtsY. *Nature* **385**, 365-368.
- Muhlberg, A.B., Warnock, D.E. und Schmid, S.L. (1997). Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. *EMBO J.* **16**, 6676-6683.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.

- Nakayama, M., Yazaki, K., Kusano, A., Nagata, K., Hanai, N. und Ishihama, A. (1993). Structure of mouse Mx1 protein. Molecular assembly and GTP-dependent conformational change. *J. Biol. Chem.*, **268**, 15033-15038.
- Niemann, H.H., Knetsch, M.L.W., Scherer, A., Manstein, D.J. und Kull, F.J. (2001) Manuskript eingereicht
- Noel, J.P., Hamm, H.E. und Sigler, P.B. (1993). The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP gamma S. *Nature* **366**, 654-663.
- Nöthe, H.B. und Manstein, D.J. (1999). Functional characterization of Dictyostelium dynamin B. *Mol. Biol. Cell* **10**, Supl. 314A.
- Nogales, E., Downing, K.H., Amos, L.A. und Löwe, J. (1998). Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 451-458.
- Okamoto, P.M., Tripet, B., Litowski, J., Hodges, R.S. und Vallee, R.B. (1999). Multiple distinct coiled-coils are involved in dynamin self-assembly. *J. Biol. Chem.* **274**, 10277-10286.
- Olive, L.S und Stoianovitch. (1975). *The Mycetozoans*. Academic Press, New York
- Otero A.D. (1990). Transphosphorylation and G-protein activation. *Biochem. Pharmacol.* **39**, 1399-1404.
- Pai, E.F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K.C., John, J. und Wittinghofer, A. (1989). Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* **341**, 209-214.
- Paschal, B.M., Obar, R.A. und Vallee, R.B. (1989). Interaction of brain cytoplasmic dynein and MAP2 with a common sequence at the C-terminus of tubulin. *Nature* **342**, 569-572.
- Picard, V., Ersdal-Badju, E., Lu, A. und Bock, S.C. (1994). A rapid and efficient one-tube PCR-based mutagenesis technique using Pfu DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **22**, 2587-2591.
- Ponten, A., Sick, C., Weeber, M., Haller, O. und Kochs, G. (1997). Dominant-negative mutants of human MxA protein: domains in the carboxy-terminal moiety are important for oligomerization and antiviral activity. *J. Virol.* **71**, 2591-2599.
- Powers, T. und Walter, P. (1995). Reciprocal stimulation of GTP hydrolysis by two directly interacting GTPases. *Science* **269**, 1422-1424.
- Praefcke, G.J.K., Geyer, M., Schwemmle, M., Kalbitzer, R.H. und Herrmann, C. (1999). Nucleotide-binding characteristics of human guanylate-binding protein 1 (hGBP1) and identification of the third GTP-binding motif. *J. Mol. Biol.*, **292**, 321-332.
- Prakash, B., Praefcke, G.J.K., Renault, L., Wittinghofer, A. und Herrmann, C. (2000). Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins. *Nature* **403**, 567-571.
- Rao, S.T. und Rossmann, M.G. (1973). Comparison of super-secondary structures in proteins. *J. Mol. Biol.* **76**, 241-256.
- Rasmussen, R.K., Rusak, J., Price, G., Robinson, P.J., Simpson, R.J. und Dorow, D.S. (1998). Mixed-lineage kinase 2-SH3 domain binds dynamin and greatly enhances activation of GTPase by phospholipid. *Biochem. J.* **335**, 119-124.

- Rauchenberger, R., Hacker, U., Murphy, J., Niewohner, J. und Maniak, M. (1997). Coronin and vacuolin identify consecutive stages of a late, actin-coated endocytic compartment in *Dictyostelium*. *Curr Biol.* **7**, 215-218.
- Renart, J., Reiser, J. und Stark, G.R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 3116-3120.
- Ringstad, N., Nemoto, Y. und De Camilli, P. (1997). The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8569-8574.
- Robinson, P.J. (1991). Dephosphin, a 96,000 Da substrate of protein kinase C in synaptosomal cytosol, is phosphorylated in intact synaptosomes. *FEBS Lett.* **282**, 388-392.
- Rodriguez-Paris, J.M., Nolta, K.V. und Steck, T.L. (1993). Characterization of lysosomes isolated from *Dictyostelium discoideum* by magnetic fractionation. *J. Biol. Chem.* **268**, 9110-9116.
- Roger, A.J., Smith, M.W., Doolittle, R.F. und Doolittle, W.F. (1996). Evidence for the Heterolobosea from phylogenetic analysis of genes encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Eukaryot. Microbiol.* **43**, 475-85.
- Roll-Mecak, A., Cao, C., Dever, T.E. und Burley, S.K. (2000). X-Ray structures of the universal translation initiation factor IF2/eIF5B: conformational changes on GDP and GTP binding. *Cell* **103**, 781-792.
- Rossmann, T., Norris, C. und Troll, W. (1974). Inhibition of macromolecular synthesis in *Escherichia coli* by protease inhibitors. Specific reversal by glutathione of the effects of chloromethyl ketones. *J. Biol. Chem.* **249**, 3412-3417.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Salim, K., Bottomley, M.J., Querfurth, E., Zvelebil, M.J., Gout, I., Scaife, R., Margolis, R.L., Gigg, R., Smith, C.I., Driscoll, P.C., Waterfield, M.D. und Panayotou, G. (1996). Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J.* **15**, 6241-6250.
- Saraste, M., Sibbald, P.R. und Wittinghofer, A. (1990). The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 430-434.
- Scaife, R., Venien-Bryan, C. und Margolis, R.L. (1998). Dual function C-terminal domain of dynamin-1: modulation of self-assembly by interaction of the assembly site with SH3 domains. *Biochemistry* **37**, 17673-17679.
- Schatz, M., Orlova, E.V., Dube, P., Jager, J. und van Heel, M. (1995). Structure of *Lumbricus terrestris* hemoglobin at 30 Å resolution determined using angular reconstitution. *J. Struct. Biol.* **114**, 28-40.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmüller, L., Lautwein, A., Schmitz, F. und Wittinghofer, A. (1997). The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*, **277**, 333-338.

- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R. und Wittinghofer, A. (1998). GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 257-262.
- Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A.V., Witke, W., Huttner, W.B. und Soling, H.D. (1999). Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* **401**, 133-141.
- Schmidt, G., Lenzen, C., Simon, I., Deuter, R., Cool, R.H., Goody, R.S. und Wittinghofer, A. (1996). Biochemical and biological consequences of changing the specificity of p21ras from guanosine to xanthosine nucleotides. *Oncogene* **12**, 87-96.
- Seedorf, K., Kostka, G., Lammers, R., Bashkin, P., Daly, R., Burgess, W.H., van der Blik A.M., Schlessinger, J. und Ullrich, A. (1994). Dynamin binds to SH3 domains of phospholipase C gamma and GRB-2. *J. Biol. Chem.* **269**, 16009-16014.
- Serysheva, I.I., Orlova, E.V., Chiu, W., Sherman, M.B., Hamilton, S.L. und van Heel, M. (1995). Electron cryomicroscopy and angular reconstitution used to visualize the skeletal muscle calcium release channel. *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 18-24.
- Sever, S., Muhlberg, A.B. und Schmid, S.L. (1999). Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature* **398**, 481-486.
- Sever, S., Damke, H. und Schmid, S.L. (2000a). Dynamin:GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* **150**, 1137-1148.
- Sever, S., Damke, H. und Schmid, S.L. (2000b). Garrotes, springs, ratchets, and whips: putting dynamin models to the test. *Traffic* **1**, 385-392.
- Shin, H.-W., Takatsu, H., Mukai, H., Munekata, E., Murakami, K., und Nakayama, K. (1999). Intermolecular and interdomain interactions of a dynamin-related GTP-binding protein, Dnm1p/Vps1p-like protein. *J. Biol. Chem.*, **274**, 2780-2785.
- Shupliakov, O., Low, P., Grabs, D., Gad, H., Chen, H., David, C., Takei, K., De Camilli, P. und Brodin, L. (1997). Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science* **276**, 259-263.
- Shpetner, H.S. und Vallee, R.B. (1989). Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell* **59**, 421-432.
- Shpetner, H.S. und Vallee, R.B. (1992). Dynamin is a GTPase stimulated to high levels of activity by microtubules. *Nature* **355**, 733-735.
- Shpetner, H.S., Herskovits, J.S. und Vallee, R.B. (1996). A binding site for SH3 domains targets dynamin to coated pits. *J. Biol. Chem.* **271**, 13-16.
- Sigal, I.S., Gibbs, J.B., D'Alonzo, J.S., Temeles, G.L., Wolanski, B.S., Socher, S.H. und Scolnick, E.M. (1986). Mutant ras-encoded proteins with altered nucleotide binding exert dominant biological effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 952-956.
- Smirnova, E., Shurland, D.L., Newman-Smith, E.D., Pishvae, B. und van der Blik, A.M. (1999). A model for dynamin self-assembly based on binding between three different protein domains. *J. Biol. Chem.* **274**, 14942-14947.

- Sondek, J., Lambright, D.G., Noel, J.P., Hamm, H.E. und Sigler, P.B. (1994). GTPase mechanism of G-proteins from the 1.7-Å crystal structure of transducin alpha-GDP-AIF₄. *Nature*, **372**, 276-279.
- Southern, E.M. (1974). An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose. *Anal. Biochem.* **62**, 317-318.
- Stowell, M.H.B., Marks, B., Wigge, P. und McMahon, H.T. (1999). Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nature Cell Biol.*, **1**, 27-32.
- Subirana, J.A. und Palau, J. (1999). Structural features of single amino acid repeats in proteins. *FEBS Letters*, **448**, 1-3.
- Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R. und Brunger, A.T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**, 347-353.
- Sweitzer, S.M. und Hinshaw, J.E. (1998). Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* **93**, 1021-1029.
- Takei, K., McPherson, P.S., Schmid, S.L. und De Camilli, P. (1995). Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature* **374**, 186-190.
- Takei, K., Haucke, V., Slepnev, V., Farsad, K., Salazar, M., Chen, H. und De Camilli, P. (1989). Generation of coated intermediates of clathrin-mediated endocytosis on protein-free liposomes. *Cell* **94**, 131-141.
- Takei, K., Slepnev, V.I., Haucke, V. und De Camilli, P. (1999). Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Cell Biol.* **1**, 33-39.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Tucker, J., Sczakiel, G., Feuerstein, J., John, J., Goody, R.S. und Wittinghofer, A. (1986). Expression of p21 proteins in *Escherichia coli* and stereochemistry of the nucleotide-binding site. *EMBO J.*, **5**, 1351-1358.
- Tuma, P.L., Stachniak, M.C. und Collins, C.A. (1993). Activation of dynamin GTPase by acidic phospholipids and endogenous rat brain vesicles. *J. Biol. Chem.* **268**, 17240-17246.
- Tuma, P.L. und Collins, C.A. (1994). Activation of dynamin GTPase is a result of positive cooperativity. *J. Biol. Chem.* **269**, 30842-30847.
- Tuma, P.L. und Collins, C.A. (1995). Dynamin forms polymeric complexes in the presence of lipid vesicles. Characterization of chemically cross-linked dynamin molecules. *J. Biol. Chem.* **270**, 26707-26714.
- Vale, R.D. (1996). Switches, latches, and amplifiers: common themes of G proteins and molecular motors. *J. Cell Biol.* **135**, 291-302.
- Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A. und Sander, C. (1991). The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* **30**, 4637-4648.

- Vallee, R.B. (1992). Dynamin: motor protein or regulatory GTPase. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **13**, 493-496.
- Vallis, Y., Wigge, P., Marks, B., Evans, P.R. und McMahon, H.T. (1999). Importance of the pleckstrin homology domain of dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Curr. Biol.* **9**, 257-260.
- van der Blik, A.M. und Meyerowitz, E.M. (1991). Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila* shibire gene associated with vesicular traffic. *Nature* **351**, 411-414.
- van der Blik, A.M. (1999). Is dynamin a regular motor or a master regulator? *Trends Cell Biol.*, **9**, 96-102.
- van Heel, M. und Frank, J. (1981). Use of multivariate statistics in analysing the images of biological macromolecules. *Ultramicroscopy*, **6**, 187-194.
- van Heel, M. (1984). Multivariate statistical classification of noisy images (randomly oriented biological macromolecules). *Ultramicroscopy*, **13**, 165-183.
- van Heel, M. (1987). Angular reconstitution: A posteriori assignment of projection directions for 3D reconstruction. *Ultramicroscopy*, **21**, 111-124.
- van Heel, M. (1989). Classification of very large electron microscopical image data sets. *Optik*, **82**, 114-126.
- van Heel, M., Harauz, G. und Orlova, E.V. (1996). A new generation of the IMAGIC image processing system. *J. Struct. Biol.*, **116**, 17-24.
- Via, A., Ferre, F., Brannetti, B., Valencia, A. und Helmer-Citterich, M. (2000). Three-dimensional view of the surface motif associated with the P-loop structure: cis and trans cases of convergent evolution. *J. Mol. Biol.* **303**, 455-465.
- Vitale, N., Moss, J. und Vaughan, M. (1996). ARD1, a 64-kDa bifunctional protein containing an 18-kDa GTP-binding ADP-ribosylation factor domain and a 46-kDa GTPase-activating domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1941-1944.
- Vitale, N., Moss, J. und Vaughan, M. (1998). Molecular characterization of the GTPase-activating domain of ADP-ribosylation factor domain protein 1 (ARD1). *J. Biol. Chem.* **273**, 2553-2560.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. und Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**, 945-51.
- Warnock, D.E., Terlecky, L.J. und Schmid, S.L. (1995). Dynamin GTPase is stimulated by crosslinking through the C-terminal proline-rich domain. *EMBO J.* **14**, 1322-1328.
- Warnock, D.E., Hinshaw, J.E. und Schmid, S.L. (1996). Dynamin self-assembly stimulates its GTPase activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 22310-22314.
- Warnock, D.E., Baba, T. und Schmid, S.L. (1997). Ubiquitously expressed dynamin-II has a higher intrinsic GTPase activity and a greater propensity for self-assembly than neuronal dynamin-I. *Mol. Biol. Cell.* **8**, 2553-2562.
- Watts, D.J. und Ashworth, J.M. (1970). Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem J.* **119**, 171-174.

- Weigert, R., Silletta, M.G., Spano, S., Turacchio, G., Cericola, C., Colanzi, A., Senatore, S., Mancini, R., Polishchuk, E.V., Salmons, M., Facchiano, F., Burger, K.N., Mironov, A., Luini, A. und Corda, D. (1999). CtBP/BARS induces fission of Golgi membranes by acylating lysophosphatidic acid. *Nature* **402**, 429-433.
- Wienke, D.C., Knetsch, M.L.W., Neuhaus, E.M., Reedy, M.C. und Manstein, D.J. (1999). Disruption of a dynamin homologue affects endocytosis, organelle morphology, and cytokinesis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 225-243.
- Wigge, P., Vallis, Y. und McMahon, H.T. (1997). Inhibition of receptor-mediated endocytosis by the amphiphysin SH3 domain. *Curr. Biol.* **7**, 554-560.
- Yang, W. und Cerione, R.A. (1999). Endocytosis: Is dynamin a 'blue collar' or 'white collar' worker? *Curr. Biol.* **9**, R511-514.
- Yu, B., Slepak, V.Z. und Simon, M.I. (1997). Characterization of a G_oα mutant that binds xanthine nucleotides. *J. Biol. Chem.* **272**, 18015-18019.
- Zhang, P. und Hinshaw, J.E. (2001). Three dimensional reconstruction of dynamin in the constricted state. *Nat. Cell Biol.*, im Druck.
- Zhang, Z., Hong, Z. und Verma, D.P. (2000). Phragmoplastin polymerizes into spiral coiled structures via intermolecular interaction of two self-assembly domains. *J. Biol. Chem.*, **275**, 8779-8784.
- Zheng, J., Cahill, S.M., Lemmon, M.A., Fushman, D., Schlessinger, J. und Cowburn, D. (1996). Identification of the binding site for acidic phospholipids on the pH domain of dynamin: implications for stimulation of GTPase activity. *J. Mol. Biol.* **255**, 14-21.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Kenneth C. Holmes danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die Einblicke in die Funktionsweise der Myosin-Motoren und für die Übernahme des Erstgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Felix Wieland möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für seine Diskussionsbereitschaft danken.

PD Dr. Dietmar J. Manstein möchte ich für die Bereitstellung eines außerordentlich weiten Methodenspektrums danken, für die Gewährleistung großer wissenschaftlicher Freiheit und für sein großes Vertrauen, daß er mir und dem Projekt entgegengebracht hat.

Bei Dr. Keiko Hirose und Dr. Toshihiko Akiba bedanke ich mich herzlich für die geduldige Einführung in die Elektronenmikroskopie während meines Aufenthaltes in Tsukuba. Mein Dank gilt dort allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Dr. Keiko Hirose und Dr. Taro Uyeda für das freundliche und stets hilfsbereite Entgegenkommen in Japan.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Willem Tichelaar, für die Hilfe bei der Elektronenmikroskopie und der Auswertung der Daten, für sein Interesse, seine Hilfsbereitschaft und seine Kritik. Für seine Diskussionsbereitschaft danke ich auch Dr. Dean R. Madden.

Dr. F. Jon Kull danke ich für sein Interesse, seine Diskussionsbereitschaft, sein Bestreben Doktoranden zu fördern und für die sozialen Aktivitäten. Ich habe viel von ihm lernen können.

Herrn Prof. Dr. Wolf Lehmann und Andreas Schlosser danke ich für die ausgezeichneten massenspektrometrischen Analysen von Dynamin A.

Bei Frau Dr. Britta Brügger bedanke ich mich für ihre freundlichen Hinweise zu der Durchführung von Experimenten zur Lipidbindung von Dynamin A.

Wulf Haubensak gilt mein Dank für seinen Hinweis auf den starken Einfluß von UV-Licht auf die Ausbeuten von Ligationen.

Mein Dank gilt all denen, die zum Gelingen einer Doktorarbeit am MPI beitragen, insbesondere Frau Anke Hennemann im Sekretariat Biophysik, die Bibliotheksverwaltung Frau Jutta Astor und Herr Ramon Grenadillo (*your librarian at work*), die Organisatoren des Doktoranden-Seminars Günther Kümmerle und Endre Majorovits, Herr Roland und Frau Bauder im Einkauf, die Spül- und Medienküche und die Werkstatt. Für das wissenschaftliche Umfeld danke ich allen Mitgliedern der Abteilung Biophysik und der Nachwuchsgruppe Ionenkanalstruktur.

Bei Dr. Heike Nöthe, Dr. Marcus Furch, Dr. Muriel Erent, Dr. Setsuko Fujita-Becker, Sabine Zimmermann, Ursula Rühl, Anna Scherer, Ulrike Dürrwang, Nora Eifler, Martin Kollmar und Georgios Tsiavaliaris bedanke ich mich für die gute Laborgemeinschaft.

Ich möchte mich herzlich bei Dr. Gerrit Praefcke bedanken, für seine Hilfsbereitschaft, für seinen Enthusiasmus und seine Freundschaft.

Hartmut Niemann und Thomas Reubold danke ich ganz besonders für ihre Unterstützung, ihre Diskussionsbereitschaft und Freundschaft über den Laboralltag hinaus.

Dem Boehringer Ingelheim Fonds in Person von Frau Monika Beutelspacher und Herrn Dr. Hermann Fröhlich möchte ich ausdrücklich für die vorbildhafte Unterstützung, die Finanzierung des Aufenthalts in Japan, vor allem aber für die hohe persönliche Aufmerksamkeit danken.

Meinen Eltern gilt mein ganz persönlicher Dank. Sie habe mich stets gefördert und unterstützt, auch über große Distanzen hinweg.

Carolina, Dir danke ich für Deine aufmunternden Worte und Taten, und für Deine Partnerschaft.