

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Diplom-Chemiker Thomas Reubold
aus Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung: 13.06.2003

Thema:

**Röntgenstrukturanalyse der GTPase-Domäne von Dynamin 1
und der Motordomäne von Myosin II**

Gutachter:

Prof. Dr. Jürgen Wolfrum
Prof. Dr. Dietmar J. Manstein

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	2
1.1 Dynamin	2
1.2 Myosin	8
2. Material und Methoden	18
2.1 Molekularbiologie	18
2.1.1 Nährmedien und Puffer	18
2.1.2 Oligonukleotide und Plasmide	18
2.1.3 Reinigung von Plasmid-DNA	19
2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	19
2.1.5 DNA-Restriktion	20
2.1.6 Gelelektrophoretische Trennung und Isolierung von DNA-Fragmenten	21
2.1.7 5'-Dephosphorylierung von DNA	21
2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten	21
2.1.9 TOPO-TA-Klonierung	22
2.1.10 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	22
2.1.11 Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i>	23
2.1.12 Transformation und Selektion von <i>E. coli</i>	23
2.2 Kultivierung von <i>D. discoideum</i>	23
2.2.1 Nährmedien und Puffer	23
2.2.2 Antibiotika	24
2.2.3 Kultivierung von <i>D. discoideum</i> -Zellen	24
2.2.4 Transformation und Selektion von <i>D. discoideum</i> -Zellen	25
2.2.5 Konservierung von <i>D. discoideum</i> -Zellen	25
2.3 Proteinchemie	26
2.3.1 Allgemeine Puffer	26
2.3.2 Proteaseinhibitoren	26
2.3.3 Antikörper	26
2.3.4 Säulen und Säulenmaterial	27
2.3.5 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	27
2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
2.3.7 Western-Blot	29
2.3.8 Enzym-Immunoassay	30
2.3.9 Analytische Proteinreinigung aus <i>D. discoideum</i>	31
2.3.10 Reinigung von Dynamin A	31
2.3.11 Reinigung der Dynamin 1-GTPase-Domäne als Myosin II - Fusionsprotein	33
2.3.12 <i>Steady-state</i> -Kinetik	34
2.3.13 Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM)	36

2.4	Röntgenkristallographische Experimente	36
2.4.1	Kristallisation	36
2.4.2	Herstellung von Schweratom-Derivatkristallen	37
2.4.3	Einfrieren von Kristallen zur Datensammlung	38
2.4.4	Datensammlung	39
2.4.5	Datenauswertung	39
2.4.6	Lösung des Phasenproblems	41
2.4.7	Erstellung und Verfeinerung des Strukturmodells	42
3.	Ergebnisse	44
3.1	Biochemische Charakterisierung von <i>Dictyostelium</i> Dynamin A	44
3.1.1	Reinigung von Wildtyp-Dynamin A	44
3.1.2	Reinigung von R828A-Dynamin A	45
3.1.3	<i>Steady-state</i> -Kinetik von Wildtyp- und R828A-Dynamin A	47
3.1.4	Elektronenmikroskopische Untersuchung von R828A-Dynamin A	48
3.1.5	Co-Reinigung von <i>vaults</i> mit R828A-Dynamin A	49
3.2	Röntgenstrukturanalyse des Fusionsproteins MyD1	51
3.2.1	Konstruktion des Expressionsplasmids pM765-Dyn I	51
3.2.1	Reinigung des Fusionsproteins MyD1	51
3.2.2	Kristallisation des Fusionsproteins	52
3.2.3	Datensammlung und Datenreduktion	54
3.2.4	Lösung und Verfeinerung der Kristallstruktur von MyD1	57
3.3	Kristallstruktur der GTPase-Domäne von Dynamin 1	63
3.3.1	Globale räumliche Struktur	63
3.3.2	Die Nukleotidbindungsstelle	66
3.4	Kristallstruktur der Motordomäne von MyosinII in einer neuen Konformation	71
3.4.1	Domänenbewegung in der Motordomäne von Myosin II	71
3.4.2	Nukleotidbindungsstelle und Bewegung der Schalter <i>switch I</i> und <i>switch II</i>	77
4.	Diskussion	83
	Literaturverzeichnis	94
	Abkürzungen	105
	Herstellernachweis	106

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Strukturen der GTPase-Domäne von Dynamin 1 aus *Rattus norvegicus* sowie der Motordomäne von Myosin II aus *Dictyostelium discoideum* in atomarem Detail aufgeklärt werden.

Die vorgelegte Kristallstruktur der nukleotidfreien GTPase-Domäne von Dynamin 1 zeigt, daß die GTPase-Domäne in Säugerdynamin sehr ähnlich gefaltet ist wie in Dynamin A aus *D. discoideum*. Das vorgelegte Strukturmodell enthält alle Schlaufenbereiche und erlaubt somit erstmals die vollständige Beschreibung der Nukleotidbindungsregion eines Dynamins. Im Gegensatz zu anderen GTPasen ist das *switch I*-Threonin, das für die GTP-Koordination wichtig ist, in Dynamin 1 in seiner katalytisch aktiven Konformation gehalten. Desweiteren konnte anhand des Strukturmodells für Arg59 eine Funktion als Beschleuniger der GTP-Hydrolyse vorgeschlagen werden.

Die Kristallstruktur der Myosin-Kopfdomäne zeigt eine neue Konformation des Motorproteins, in der sich beide nukleotidbindenden Schalter in der offenen Stellung befinden. Dieser bislang nicht beobachtete Zustand wird in einer neuen Nomenklatur als O/O-Konformation bezeichnet.

Aus dem Strukturmodell wird deutlich, daß Nukleotid- und Aktinbindungsstelle nicht nur über *switch II*, sondern auch über *switch I* miteinander kommunizieren können. Umschalten von *switch I* verändert über das zentrale Faltblatt die Geometrie der Aktinbindungsstelle am äußeren Ende der 50K-Spalte. Dabei sind die Schalterstellungen nicht vollständig entkoppelt. *Switch I* kann erst öffnen, wenn *switch II* bereits offen ist.

In der O/O-Konformation ist *switch II* weiter geöffnet als bisher beobachtet, was in Kombination mit der offenen Stellung von *switch I* zur Freisetzung von ADP führen kann.

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte das bisherige Bild des Akto-Myosin-ATPase-Zyklus ergänzt werden, indem neben der Stellung von *switch II* auch die Stellung von *switch I* berücksichtigt wird. Nach dem Kraftschlag und der Dissoziation von Phosphat durch Öffnen von *switch II* muß *switch I* öffnen, um auch ADP freizusetzen. Nach Erreichen des Rigorzustands schließt sich *switch I* mit der Bindung von ATP und der Myosinkopf dissoziiert vom Aktinfilament. Die O/O-Konformation kann im Akto-Myosin-ATPase-Zyklus in unmittelbarer Nähe zum Rigorzustand eingeordnet werden.

1. Einleitung

1.1. Dynamin

Dynamin 1 wurde erstmals zusammen mit Mikrotubuli aus Kälberhirn isoliert (Paschal *et al.*, 1987; Shpetner und Vallee, 1989) und zunächst als Mikrotubuli-assoziiertes ATP-abhängiges Motorprotein klassifiziert. Diese Klassifizierung wurde später revidiert, da eine Assoziation mit Mikrotubuli *in vivo* nicht nachgewiesen werden konnte (Scaife und Margolis, 1990; Noda *et al.*, 1993) und die Sequenz des Dynamin 1-Gens eine GTP-bindende Domäne enthält, die sehr homolog ist zu den GTP-bindenden Domänen anderer großer GTPasen (Obar *et al.*, 1990).

Die tatsächliche Funktion von Dynamin 1 wurde geklärt, als das *shibire*-Gen aus *Drosophila melanogaster* sequenziert und als Dynamin-Homolog identifiziert wurde (van der Bliek und Meyerovitz, 1991; Chen *et al.*, 1991). Fliegen, die bestimmte Punktmutationen im Dynamin-homologen Gen tragen, zeigen oberhalb einer kritischen Temperatur eine reversible Paralyse (Grigliatti *et al.*, 1973; Poodry *et al.*, 1973). Diese Paralyse wird durch die Blockade der Neubildung Neurotransmitter-gefüllter Vesikel an der präsynaptischen Membran verursacht (Kosaka und Ikeda, 1983; Koenig und Ikeda, 1983 und 1989). An den präsynaptischen Membranen der Nervenzellen von *shibire*-Fliegen ist eine Akkumulation Clathrin-ummantelter Einstülpungen zu erkennen, deren Halsregionen von proteinhaltigen Ringen umgeben sind (Abbildung 1.1). Da diese Anhäufung in Wildtyp-Synapsen nicht beobachtbar war, wurde vermutet, daß die Ringe mit Dynamin assoziiert

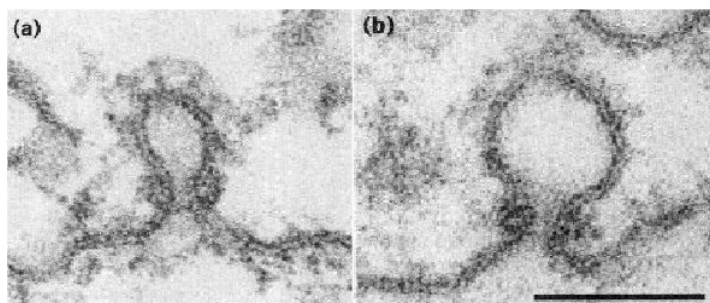


Abb. 1.1: Clathrin-ummantelte Einstülpungen an Nervenenden von *Drosophila shibire*. Die Häuse der entstehenden Vesikel sind mit proteinhaltigen Ringen dekoriert. Der Balken entspricht 100 nm (aus Kosaka und Ikeda, 1983)

sind. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde auch für Dynamin 1 eine Funktion in der Clathrin-vermittelten Endozytose vorgeschlagen. Diese Annahme wurde durch die Identifizierung von Dynamin-Punktmutanten mit stark reduzierter GTP-Bindung bestätigt, die bei Expression in Säugerzellen die Endozytose inhibieren (van der Blik *et al.*, 1993; Herskovits *et al.*, 1993a; Damke *et al.*, 1994). Dynamin 1 konnte in proteinhaltigen Ringen immunochemisch nachgewiesen werden, die um Synaptosomen aus Rattenhirn dekoriert waren (Takei *et al.*, 1995).

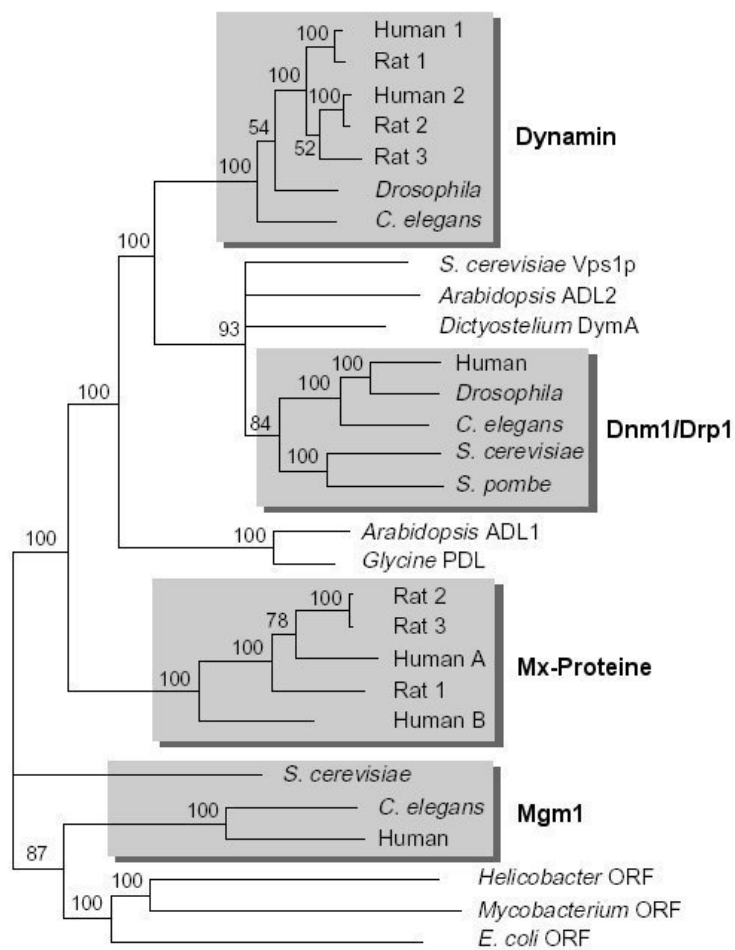


Abb. 1.2: Familie der Dynamine. Dynamine sind auf der Basis ihrer Sequenzhomologien verschiedenen Gruppen zugeordnet. Mitglieder der Dynamin-Gruppe sind in den vesikulären Transport involviert. Die Proteine der Dnm1/Drp1- und der Mgm1-Gruppe beeinflussen die Morphologie der Mitochondrien. Mx-Proteine spielen eine Rolle bei der Bekämpfung viraler Infektionen in Wirbeltieren. (nach van der Blik, 1999).

Dynamin 1 wird der Familie der dynaminartigen Proteine (im Folgenden als Dynamine bezeichnet) aus der Superfamilie der GTP-bindenden und -hydrolysierenden Proteine zugerechnet (Abbildung 1.2). In Säugern wurden außer Dynamin 1 zwei weitere Dynamine identifiziert, die unterschiedliche Gewebsspezifität aufweisen. Dynamin 1 ist ausschließlich in Nervenzellen lokalisiert, Dynamin 2 wird ubiquitär produziert (Cook *et al.*, 1994; Sontag *et al.*, 1994). Dynamin 3 wurde zunächst als Testes-spezifische Isoform isoliert (Nakata *et al.*, 1993), später jedoch auch in Lunge, Gehirn und Herz gefunden (Cook *et al.*, 1996; Cao *et al.*, 1998). Durch alternatives Spleißen existieren in Ratten mindestens 27 Dynamin-Isoformen, für die jeweils spezifische Funktionen angenommen werden (Cao *et al.*, 1998). Dynamine wurden auch in vielen anderen Organismen nachgewiesen, z.B. DRP-1 in *Caenorhabditis elegans* (Clark *et al.*, 1997), Vps1p, Dnm1p und Mgm1p in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Rothman und Stevens, 1986; Gammie *et al.*, 1995; Jones und Fangman, 1992), Dynamin A und B in der Sozialamöbe *Dictyostelium discoideum* (Wienke *et al.*, 1999; Nöthe und Manstein, 1999), ADL1 und 2 im Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana* (Park *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 1998), Phragmoplastin in der Sojabohne (Gu und Verma, 1996) und CmDnm1 in der Rotalge *Cyanidioschyzon merolae* (Nishida *et al.*, 2003).

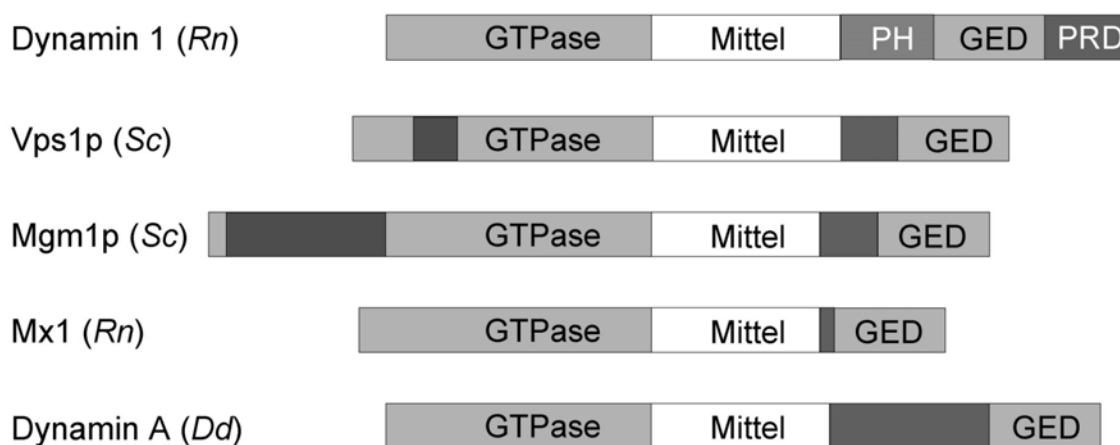


Abb. 1.3: Domänenstruktur einiger Mitglieder der Dynamin-Familie. Drei Domänen sind in allen Familienmitgliedern enthalten, eine N-terminale GTPase-Domäne, eine Mittel-Domäne und eine GTPase-Effektor-Domäne (GED). Dynamine aus der Dynamin-Gruppe besitzen zudem noch eine Pleckstrin-Homologie-Domäne sowie eine prolinreiche Domäne. Andere Dynamine enthalten Einschübe variabler Länge zwischen Mittel-Domäne und GED, Mgm1p verfügt über eine N-terminale Extension.

Allen Dynaminen gemein sind eine hochkonservierte ca. 300 Aminosäuren große N-terminale GTPase-Domäne, eine GTPase-Effektor-Domäne (GED) (mitunter auch als Assemblierungsdomäne bezeichnet), sowie eine Mitteldomäne bislang unbekannter Funktion. Einige Dynamine enthalten zudem Pleckstrin-Homologie-Domänen (PHD), die an Lipidmembranen binden können (Rebecchi und Scarlata, 1998), sowie prolinreiche Domänen (PRD), die spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln (Kay *et al.*, 2000) (Abbildung 1.3).

GTPasen sind als molekulare Schalter in eine Vielzahl verschiedenartiger zellulärer Prozesse involviert (Bourne *et al.*, 1990), wie z.B. Signaltransduktion, Proteinsynthese, Zelldifferenzierung und -proliferation, Regulation des vesikulären Transports und Membrantranslokation von Proteinen. Sie hydrolysieren Guanosintriphosphat (GTP) zu Guanosindiphosphat (GDP) und durchlaufen während ihres Reaktionszyklus verschiedene Zustände, die mit konformationellen Änderungen gekoppelt sind: die nukleotidfreie Form, die GTP-gebundene Form, den Übergangszustand der Hydrolyse und den GDP-gebundenen Zustand. Die Funktion der GTPasen als molekulare Schalter beruht auf ihrer Fähigkeit, im GTP-gebundenen Zustand an Effektormoleküle zu binden, der Schalter ist „eingeschaltet“. Die Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP beendet die Effektorwechselwirkung, der Schalter wird „ausgeschaltet“. Der Anteil der Moleküle im GTP-Zustand wird durch zwei Größen bestimmt, nämlich die Hydrolysegeschwindigkeit des gebundenen GTP und die Dissoziationsgeschwindigkeit von GDP (Bourne *et al.*, 1990). Kleine GTPasen besitzen sehr geringe intrinsische GTP-Hydrolysegeschwindigkeiten ($\sim 5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) (John *et al.*, 1989) und hohe Nukleotidaffinitäten ($\sim 10^{-11} \text{ M}$) (Feuerstein *et al.*, 1987; John *et al.*, 1990), was sich in geringen GDP-Dissoziationsgeschwindigkeiten niederschlägt. Zur Beschleunigung dieser Schritte dienen verschiedene Hilfsproteine. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) katalysieren die Hydrolyse von GTP, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit bis zu 10^5 -fach erhöht wird (Gideon *et al.*, 1992), und überführen die GTPase dadurch in die inaktive Form. Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) destabilisieren die Bindung von GDP und beschleunigen so den Nukleotidaustausch (Bourne *et al.*, 1991). Durch die hohe intrazelluläre GTP-Konzentration ist der nach GDP-Dissoziation vorliegende nukleotidfreie

Zustand sehr kurzlebig, demnach begünstigen GEFs die Bildung der aktiven, signalübertragenden Form der GTPase.

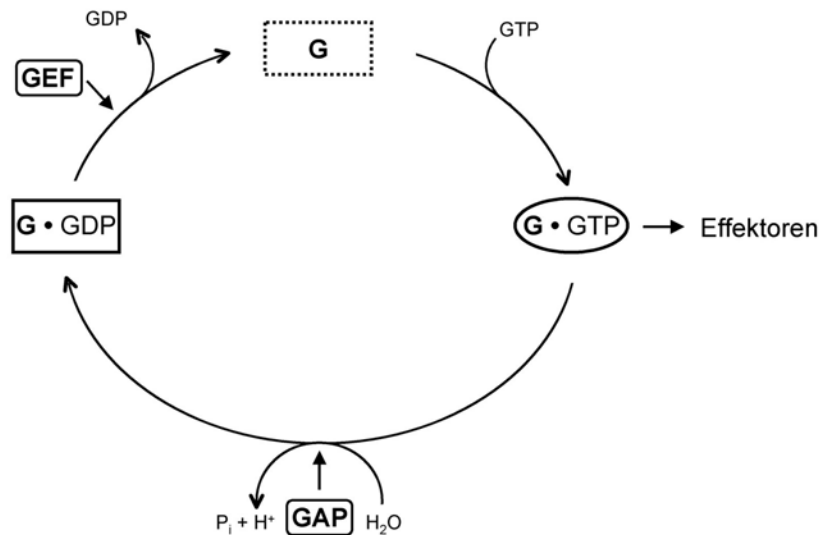


Abb. 1.4: GTPase-Zyklus. Im GTP-gebundenen Zustand ist die GTPase als Schalter aktiv und kann an ihre Effektoren binden. Die GTP-Hydrolyse wird durch GAPs beschleunigt, die GTPase wird dadurch in den GDP-gebundenen inaktiven Zustand überführt. GEFs beschleunigen die Dissoziation von GDP, der Zyklus beginnt durch GTP-Bindung von Neuem.

Dynamine zeichnen sich durch eine für GTPasen ungewöhnlich hohe basale GTPase-Aktivität ($8-30 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), sowie eine vergleichsweise geringe Nukleotidaffinität ($K_M \sim 10-100 \mu\text{M}$), (Song und Schmid, 2003) aus. Aufgrund dieser Eigenschaften sind Dynamine zur GTP-Hydrolyse und zum Nukleotidaustausch nicht auf Hilfsproteine angewiesen, die Existenz externer Dynamin-spezifischer GEFs und GAPs scheint daher unwahrscheinlich. Die GED-Untereinheit in Dynaminen scheint jedoch GTPase-stimulierende Funktion auszuüben. Alle bisher untersuchten Dynamine oligomerisieren unter bestimmten Bedingungen *in vitro* zu Ringen und Helices (Hinshaw und Schmid, 1995; Takei *et al.*, 1995 und 1998; Carr und Hinshaw, 1997; Sweitzer und Hinshaw, 1998; Kochs *et al.*, 1998; Shin *et al.*, 1999; Stowell *et al.*, 1999; Zhang *et al.* 2000; Klockow *et al.*, 2002). Diese Oligomerisierung bewirkt eine Stimulation der GTPase-Aktivität (Shpetner und Vallee, 1992; Herskovits *et al.*, 1993b; Tuma *et al.*, 1993; Tuma und Collins, 1994; Warnock *et al.*, 1996; Barylko *et al.*, 1998). Es konnte nachgewiesen werden, daß die GED für die Oligomerisierung essentiell ist (Okamoto *et al.*, 1999; Smirnova *et al.*, 1999) und direkt mit

der GTPase-Domäne wechselwirkt (Muhlberg *et al.*, 1997; Smirnova *et al.*, 1999). Es wird kontrovers diskutiert, ob die GED hierbei eine klassische GAP-Funktion ausübt, in der die Seitenketten bestimmter Aminosäuren der GED in das aktive Zentrum der GTPase-Domäne eingebracht werden, um die Hydrolysegeschwindigkeit heraufzusetzen (Sever *et al.* 1999; Marks *et al.*, 2001; Eccleston *et al.*, 2002).

Die genaue Funktionsweise der Dynamine konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden. Es existieren sowohl Hinweise auf eine Funktion als Regulatorprotein, als auch als Motorprotein. Im regulatorischen Modell soll Dynamin im GTP-gebundenen Zustand Effektormoleküle rekrutieren, die ihrerseits die Abtrennung des Vesikels bewirken. Das Modell basiert auf einer Studie mit punktmutiertem Dynamin 1 (Sever *et al.*, 1999), in dessen GED ein hochkonservierter Argininrest durch Alanin ersetzt ist. Die Mutante zeigt bei gleichbleibender basaler Hydrolysegeschwindigkeit eine deutlich verringerte Stimulierung der Aktivität durch Oligomerisierung. In Transfektionsstudien zeigte diese Mutante eine Beschleunigung der Endozytoserate, die damit erklärt wurde, daß das mutierte Dynamin durch die verminderte GTPase-Aktivität länger im eingeschalteten Zustand verbleibt und somit die Zeitspanne für die Wechselwirkung mit Effektormolekülen verlängert wird. Die Befunde von Sever *et al.* konnten von anderen Gruppen nicht reproduziert werden (Marks *et al.*, 2001; Eccleston *et al.*, 2002), vielmehr waren in diesen Studien sowohl die kinetischen Parameter beider Mutanten mit denen des Wildtypproteins vergleichbar, als auch die Endozytoseraten.

Alternativ zu diesem regulatorischen Modell wurden Modelle vorgeschlagen, in denen Dynamin als Mechanoenzym die chemische Energie der GTP-Hydrolyse zur Kraftgenerierung nutzt. Die Zugabe von GTP zu mit Dynaminhelices dekorierten Lipid tubuli führt zur deren Zerkleinerung in Vesikel (Sweitzer und Hinshaw, 1998). Die wenigen verbleibenden Tubuli zeigen einen deutlich verringerten Durchmesser. Dies und die Ähnlichkeit der Dynaminarrangements mit den Strukturen in den Halsregionen von Clathrin-ummantelten Einstülpungen (Kosaka und Ikeda, 1983) führten zu einem Modell, in dem Dynamin durch Kontraktion der Helix die Abschnürung neugebildeter Vesikel von der Plasmamembran bewirkt (Sweitzer und Hinshaw, 1998). Ein weiteres Modell entstand aus der Beobachtung, daß sich in Dynaminhelices, die um starre, nichtflexible Lipidmembranen

dekoriert sind, bei GTP-Zugabe der Abstand der einzelnen Ringe vergrößert (Stowell *et al.*, 1999). Danach würde Dynamin ein entstehendes Vesikel nicht durch Kontraktion der Helix von der Membran abschnüren, sondern durch Überdehnung des Vesikelhalses.

1.2 Myosin

Molekulare Motoren oder Motorproteine sind in der Lage, aus bei der Hydrolyse von ATP freiwerdender chemischer Energie Kraft zu generieren und daraus gerichtete Bewegung zu erzeugen. In eukaryontischen Zellen wurden bislang drei verschiedene Klassen solcher Motoren identifiziert, die sich entlang der Filamente des Zytoskeletts bewegen und an einer Vielzahl verschiedener zellulärer Prozesse beteiligt sind. Man unterscheidet Dyneine (Karki und Holzbaur, 1999; King, 2000), Kinesine (Verhey und Rapoport, 2001; Shea und Flanagan, 2001) und Myosine (Baker und Titus, 1998; Mermall *et al.*, 1998; Sokac und Bement, 2000; Tuxworth und Titus, 2000).

Dyneine und Kinesine sind Mikrotubuli-assoziierte Motoren, die sich an den polaren Filamenten in entgegengesetzte Richtungen bewegen. Die meisten bisher bekannten Kinesine bewegen sich zum Plus-Ende der Filamente (Mandelkow und Johnson, 1998) und sind in den Transport von Vesikeln und Organellen involviert (Hirokawa *et al.*, 1998). Dagegen wandern Dyneine zum Minus-Ende der Mikrotubuli in Richtung des Centrosoms (Harrison und King, 2000). Zytosolische Dyneine üben ebenfalls Transportfunktionen aus, desweiteren verursacht Dynein die Rotationsbewegung der bakteriellen Flagellen und der Cilien unizellulärer Eukaryonten (Walczak und Nelson, 1994).

Myosine bilden eine Familie von Aktin-assoziierten Motorproteinen, deren gemeinsames Merkmal eine hochkonservierte globuläre Motor- oder Kopfdomäne ist (Schliwa, 2003). Muskelmyosin wurde bereits Mitte des 19. Jahrhunderts entdeckt. Bis heute wurde eine Vielzahl verschiedener Myosine in verschiedenen Organismen identifiziert, die auf Grundlage der Sequenzhomologien ihrer Motordomänen in bislang 17 verschiedene Klassen eingeteilt wurden (Hodge und Cope, 2000).

Außer der Motordomäne besitzen Myosine eine Halsdomäne und eine Schwanzdomäne, die weniger gut konserviert sind. In der Motordomäne sind die Bindungsstellen zur Interaktion mit ATP und Aktin lokalisiert. Hier wird ATP zu ADP und Phosphat hydrolysiert und die daraus entstehende chemische Energie wird in mechanische Energie umgewandelt. Über eine komplexe Mechanik wird die erzeugte Energie in Bewegung umgesetzt. In der Halsdomäne befinden sich Bindungsstellen für calmodulinartige leichte Ketten mit der Konsensus-Sequenz IQxxxRGxxxRK (Bähler und Rhoads, 2002). Pro Molekül sind bis zu sechs solcher IQ-Motive vorhanden. Die Schwanzdomänen weisen die geringste Sequenzhomologie auf und unterscheiden sich stark in ihrer Länge. Manche Schwanzdomänen sind in der Lage, superspiralisierte Strukturen zu bilden und fungieren als Dimerisierungsdomänen zur Bildung doppelköpfiger Myosine. Mitunter sind funktionelle Untereinheiten vorhanden, die auch in anderen Proteinen vorkommen. Dazu zählen unter anderem SH3-Domänen, die spezifische Wechselwirkungen mit prolinreichen Domänen vermitteln (Mayer und Gupta, 1998), FERM-Domänen, die Interaktionen mit Membranproteinen ermöglichen (Chishti *et al.*, 1998) und GAP-Domänen (Abschnitt 1.1).

Die bestuntersuchten Vertreter der Myosin-Familie sind Myosine der Klasse II, im Folgenden als Myosin bezeichnet. Myosin ist in höheren Eukaryonten essentieller Bestandteil von Muskelgewebe. Dabei liegt Myosin als Homodimer vor, das aus zwei schweren Ketten, sowie jeweils zwei regulatorischen und essentiellen leichten Ketten aufgebaut ist. Im Muskel bildet Myosin durch Zusammenlagerung mehrerer Schwanzregionen die dicken Filamente (Miroshnichenko *et al.*, 2000).

Die heute allgemein akzeptierte Sichtweise der Muskelbewegung geht davon aus, daß die Kontraktion durch Gleiten der aus Myosin gebildeten dicken Filamente und der aus Aktin bestehenden dünnen Filamente gegeneinander verursacht wird (Huxley und Hanson, 1954; Huxley und Niedergerke, 1954). Myosinfilamente zeigen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen Ausstülpungen, die als *Querbrücken* bezeichnet wurden (Huxley, 1957 und 1958) und, wie sich später zeigte, zum Großteil aus Myosinköpfen bestehen. Diese binden an Aktinfilamente und verschieben sie unter ATP-Verbrauch parallel zum Myosinfilament.

Aufgrund dieser frühen elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde das Modell der schwingenden Querbrücken postuliert (Abbildung 1.5) (Huxley, 1969; Lymn und Taylor, 1971). Dabei binden die Myosinköpfe im nukleotidfreien Zustand fest an Aktinfilamente (Abbildung 1.5). Diese Anordnung wird als *Rigorkomplex* oder starker Bindungszustand (engl.: *R-state*) bezeichnet. Die Bindung von Magnesium-ATP an den Myosinkopf bewirkt dessen schnelle Dissoziation vom Aktinfilament. Myosin hydrolysiert dann ATP zu den Produkten ADP und Phosphat, die auch nach Beendigung der Hydrolyse fest mit dem Protein assoziiert sind. Bei erneuter Bindung des Myosinkopfes an das Aktinfilament werden die Hydrolyseprodukte freigesetzt und eine Konformationsänderung des Myosins wird induziert. Es wurde angenommen, daß es eine Bewegung des Myosinkopfes ist, die das Aktinfilament parallel zum Myosinfilament verschiebt.

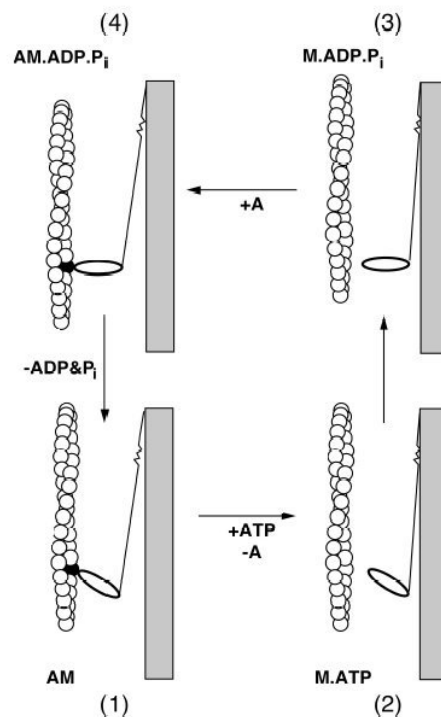


Abb. 1.5: Lymn-Taylor-Zyklus. Der graue Balken symbolisiert das aus Myosin-Schwanzregionen aufgebaute dicke Filament, das Aktinfilament ist als Helix dargestellt, die aus kugelförmigen Aktinmonomeren aufgebaut ist. Die Myosin-Querbrücke besteht aus der oval gezeichneten Kopfdomäne und aus der als Linie dargestellten Schwanzdomäne (aus Geeves und Holmes, 1999).

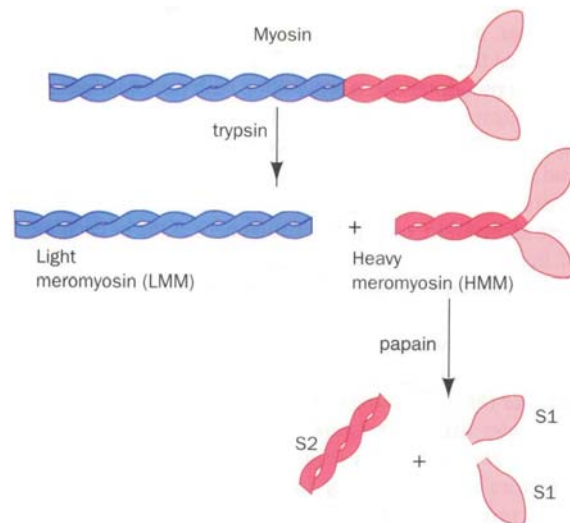


Abb. 1.6: Das proteolytische Spaltungsmuster von Myosin II. (aus Voet und Voet, 1995).

Das Myosinhomodimer wird, basierend auf den Ergebnissen aus schrittweisem proteolytischen Verdau des Gesamtproteins, in Untereinheiten eingeteilt. Die Protease Trypsin schneidet Myosin innerhalb der superspiralisierten Schwanzregion, dabei entstehen zwei Fragmente, HMM (von engl.: *heavy meromyosin*) und LMM (von engl.: *light meromyosin*) (Abbildung 1.6).

Der Verdau von HMM mit Papain liefert die Fragmente S1 und S2 (S für engl.: *subfragment*). S1 enthält noch Teile der Halsregion, daran sind jeweils eine regulatorische und essentielle leichte Kette gebunden. Weiterer tryptischer Verdau des S1-Fragmentes ergibt drei Subfragmente, die nach ihrem Molekulargewicht als 25K-, 50K- und 20K-Domänen bezeichnet werden (Mornet *et al.*, 1979). Die atomare Struktur des S1-Fragments aus Skelettmuskeln des Haushuhns (*Gallus gallus*) wurde im nukleotidfreien Zustand kristallographisch bestimmt (Rayment *et al.*, 1993b). Dabei zeigte sich, daß die drei Subfragmente keine funktionalen Untereinheiten darstellen, sondern durch für Proteasen zugängliche Schlaufenbereiche miteinander verbunden sind. Die Motordomäne besitzt eine globuläre Struktur, in der ein zentrales siebensträngiges β -Faltblatt von zahlreichen α -Helices umgeben ist (Abbildung 1.7). Alle drei Subfragmente sind an der Bildung dieses Faltblatts beteiligt.

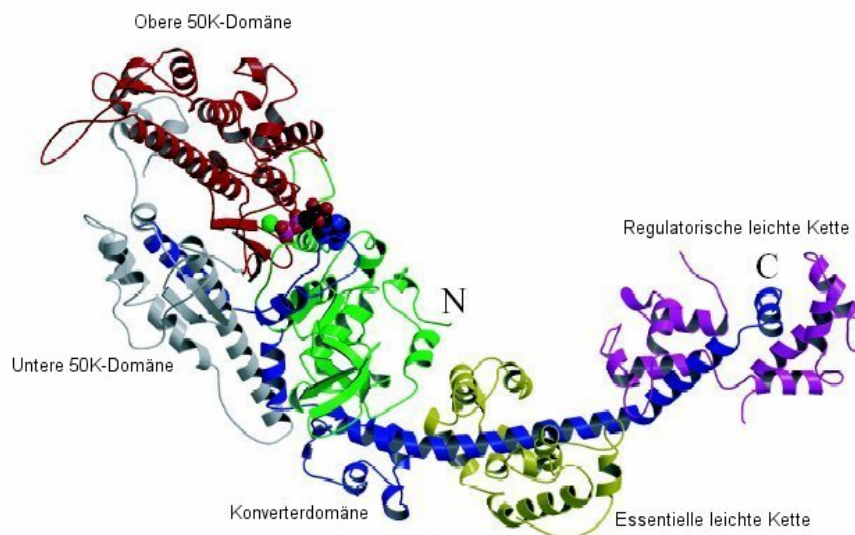


Abb. 1.7: Domänenstruktur des S1-Fragmentes von Myosin aus dem Haushuhn. Die proteolytischen Fragmente sind farblich hervorgehoben: die N-terminale 25K-Domäne in grün, die obere 50K-Domäne in rot, die untere 50K-Domäne in grau, die C-terminale 20K-Domäne in blau. Die Halsregion trägt zwei calmodulinartige leichte Ketten, in magenta und gelb gezeigt (aus Geeves und Holmes, 1999).

Die N-terminale 25K-Domäne enthält eine β -Faltstruktur unbekannter Funktion. Die 50K-Domäne ist durch einen Spalt in zwei Teile unterteilt, nämlich die obere und die untere 50K-Domäne (Rayment *et al.*, 1993b). Die C-terminale 20K-Domäne enthält den Konverter (Houdusse und Cohen, 1996), welcher die durch ATP-Hydrolyse verursachten Konformationsänderungen auf die Halsregion überträgt.

Die Nukleotidbindungsstelle liegt zwischen der 25K-Domäne und der oberen 50K-Domäne und ist von der Aktinbindungsstelle, die durch Teile der beiden 50K-Domänen gebildet wird, ca. 40 Å weit entfernt. Beide Bindungsstellen kommunizieren miteinander über die *switch I*- und *switch II*-Helices, die abhängig vom Nukleotidzustand verschiedene Positionen einnehmen können (Spudich, 2001). Die Nukleotidbindung wird durch vier Konsensussequenz-Motive vermittelt, die sich in Schlaufenbereichen befinden. Die Adenosin-Bindungsschleife enthält die Aminosäuresequenz NPxxxxxxY und bindet die Adeninbase durch Wasserstoffbrücken zu Basenstickstoffatomen. Die Phosphatbindungsschleife (*P-loop*) mit dem Sequenzmotiv GESGAKT und eine *switch I* genannte Schleife (AKTxxN(N/D)NSSR) koordinieren Sauerstoffatome der Phosphatgruppen des Nukleotids, das zweite Serin koordiniert das Magnesiumion. Die

Schleife *switch II* (DI(S/A/Y/F)GFE) bindet über das Hauptkettenstickstoffatom eines Glycinrests im Übergangszustand der Hydrolyse ein Sauerstoffatom des γ -Phosphats. In manchen Konformationen der Myosin-Motordomäne sind *switch I* und *switch II* durch eine Salzbrücke aus einem Argininrest in *switch I* und einem Aspartatrest in *switch II* miteinander verbunden. Die Möglichkeit, diese Salzbrücke zu formieren, ist essentiell für die ATP-Hydrolyse-Aktivität von Myosin (Furch *et al.*, 1999).

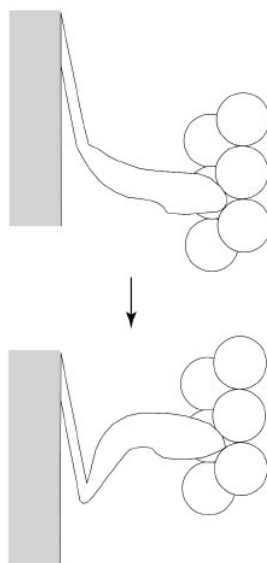


Abb. 1.8: Konformationsänderung eines Myosin-Moleküls während des Kraftschlags. Die größte konformationelle Änderung erfährt der C-terminale Teil der Querbrücke, die Motordomäne ändert ihre Orientierung relativ zum Aktinfilament nur minimal. Der graue Balken symbolisiert das aus Myosin-Schwanzregionen aufgebaute dicke Filament, das Aktinfilament ist als Helix dargestellt (aus Geeves und Holmes, 1999).

Das Modell der schwingenden Querbrücken wurde modifiziert, als aus spektroskopischen und strukturellen Untersuchungen (Cooke, 1986) klar wurde, daß die Myosinköpfe ihre Orientierung relativ zum Aktinfilament nur minimal verändern. Der Kraftschlag wird also nicht durch Bewegung der Myosinköpfe relativ zum Aktinfilament ausgeführt, sondern vielmehr durch Bewegung der C-terminalen Schwanzregion relativ zum Myosinkopf. Die Schwanzregion fungiert dabei als Hebelarm (Holmes, 1997) (Abbildung 1.8).

Abbildung 1.9 zeigt schematisch die Hauptschritte der Wechselwirkung von filamentösem Aktin mit Myosin unter Berücksichtigung der Hebelarmbewegung. Der Aktomyosin-Rigorkomplex dissoziiert durch Bindung von ATP an Myosin (a). *Switch II*

schließt sich und bewirkt eine Konformationsänderung der Konverter-Domäne und des Hebelarms. Die Hydrolyse von ATP resultiert in einem metastabilen ternären Komplex aus Myosin und den Hydrolyseprodukten ADP und Phosphat (P_i) (**b**). Erneute Bindung an Aktin induziert die Öffnung von *switch II* durch eine Konformationsänderung und die Freisetzung von Phosphat und der Kraftschlag des Hebelarms können stattfinden. Die Reihenfolge dieser Einzelschritte konnte bislang nicht geklärt werden, ebenso ist noch unklar, ob Myosin dabei stark oder schwach an Aktin gebunden ist (Geeves und Holmes, 1999; Houdusse und Sweeney, 2001). (**c**). ADP-Dissoziation stellt den Rigorzustand wieder her (**d**).

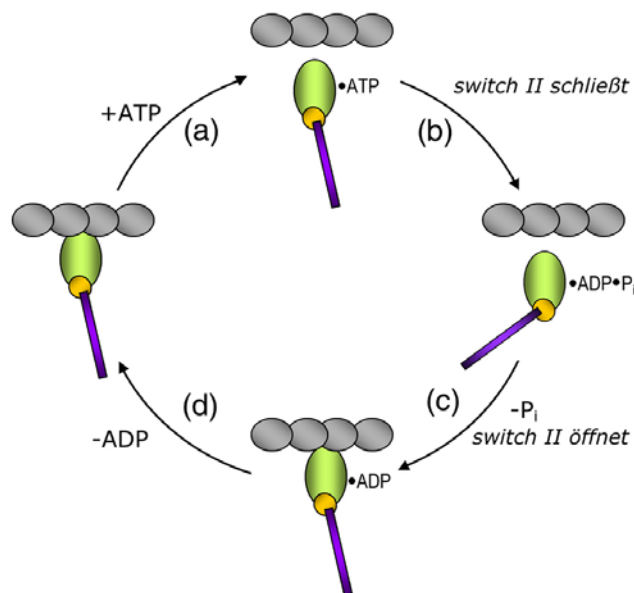


Abb. 1.9: Schema des Aktomyosin-ATPase-Zyklus. Graue Ovale entsprechen filamentösem Aktin, die Motordomäne von Myosin ist in grün dargestellt, die Konverterdomäne ist gelb hervorgehoben, die Schwanzregion ist violett.

Bis heute sind 30 Kristallstrukturen der Motordomäne von Myosin II aus verschiedenen Organismen veröffentlicht worden (PDB, Berman *et al.*, 2002). Diese Kristallstrukturen können in drei Kategorien eingeteilt werden. Die erste Kategorie umfaßt Strukturen, in denen Myosin mit ATP-Analoga oder ADP ligandiert ist oder kein Nukleotid enthält (Rayment *et al.*, 1993; Fisher *et al.*, 1995; Gulick *et al.*, 1997; Bauer *et al.*, 2000). Darin ist *switch II* teilweise ungeordnet und beteiligt sich nicht an der Koordination des γ -Phosphats, sofern vorhanden. Diese Konformation wird in der Literatur als „offen“ bezeichnet.

Die zweite Kategorie umfaßt Strukturen von Myosin in Komplex mit Verbindungen wie MgADP.VO_4 (Fisher *et al.*, 1995) und MgADP.AIF_4 (Smith und Rayment, 1996), die den Übergangszustand der ATP-Hydrolyse simulieren. In diesen Strukturen bildet der Amidstickstoff des Glycins in *switch II* eine Wasserstoffbrückenbindung zum γ -Phosphat-Analog. Dieser Zustand wird als „geschlossen“ bezeichnet. Eine weitere signifikante Änderung gegenüber der offenen Konformation zeigt sich in der Position der Konverterdomäne und des Hebelarms. Der Übergang vom offenen in den geschlossenen Zustand bewirkt eine Beugung des äußeren Endes der *switch II*-Helix (auch *relay*-Helix) und der assoziierten Schlaufe um ca. 24° (Abbildung 1.10). Diese Konformationsänderung



Abb. 1.10: Unterschiedliche Konformationen der *switch II*-Helix und der assoziierten Konverterdomäne im offenen und geschlossenen Zustand. Das Schließen von *switch II* bewirkt eine Beugung des distalen Teils der *switch II*-Helix um ca. 24° . Der Konverter (in blau) und der nachfolgende Hebelarm (in gelb) werden dadurch um ca. 70° nach oben bewegt (aus Geeves und Holmes, 1999).

wird von der Konverter-Domäne auf den Hebelarm übertragen, der dabei um ca. 70° aus seiner Ausgangsposition in Richtung des spitzen Endes des Aktinfilamentes schwingt (Abbildung 1.11). Desweiteren findet eine Rotationsbewegung der unteren relativ zur oberen 50K-Domäne statt (Fisher *et al.*, 1995), wodurch sich die Spalte zwischen beiden Domänen verengt. Die Salzbrücke zwischen *switch I* und *switch II* bleibt dabei intakt. Die dritte Kategorie wird als *detached* (engl.: abgelöst) bezeichnet und enthält Strukturen, in denen Myosin aus *Aequipecten irradians* (Atlantische Bucht-Kammuschel) entweder mit MgADP (Houdusse *et al.*, 1999) oder ATP-Analoga (Houdusse *et al.*, 2000) ligandiert ist. Darin ist die sogenannte *SH1*-Helix des Konverters entwunden. Dies führt zu einer Stellung des Konverters, die den nachfolgenden Hebelarm nahezu parallel zum Aktinfilament ausrichten würde.

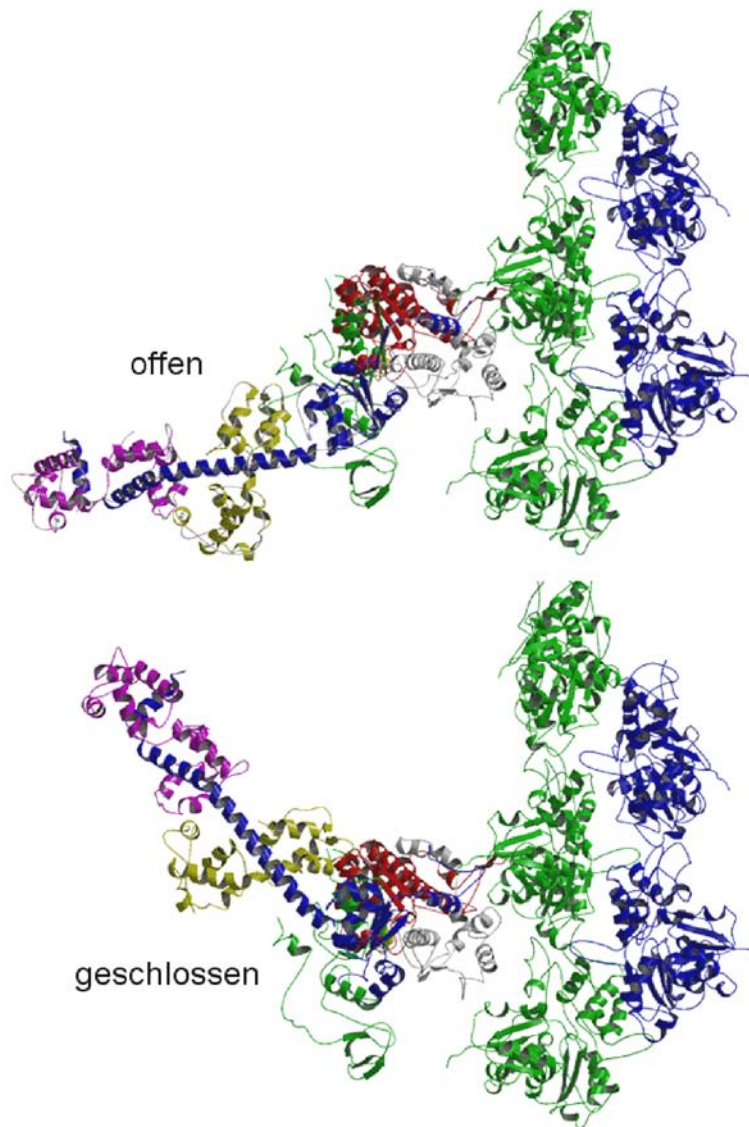


Abb. 1.11: Rekonstruktionen der Zustände vor (unten) und nach (oben) dem Kraftschlag. Dazu wurde der Hebelarm aus der Struktur von nukleotidfreiem S1 (Rayment *et al.*, 1993) an die Strukturen von Myosin-MgADP.VO₄ (Smith und Rayment, 1996) bzw. -MgADP.BeF_x (Fisher *et al.*, 1995) aus *Dictyostelium* angefügt (Holmes, 1996 und 1997). Die korrekte Orientierung wurde durch Überlagerung der Konverterdomänen ermittelt (aus Geeves und Holmes, 1999).

Die Einordnung der existierenden Kristallstrukturen von Myosin in den Aktomyosin-ATPase-Zyklus wird kontrovers diskutiert (Houdusse und Sweeney, 2001). Sicher scheint, daß die Strukturen aus allen drei Kategorien Zustände zeigen, in denen Myosin mit geringer Affinität an Aktin bindet (Houdusse und Sweeney, 2001). Die geschlossenen Strukturen entsprechen mit hoher Wahrscheinlichkeit dem Zustand während der ATP-Hydrolyse (Geeves und Holmes, 1999; Houdusse *et al.*, 1999; Houdusse und Sweeney, 2001).

Schwierigkeiten bereitet die Zuordnung der übrigen Kategorien. Die offenen Strukturen konnten nicht nur mit ADP, sondern auch mit ATP und dessen Analoga erzeugt werden und werden einem schwach Aktin-gebundenen ADP-Zustand nach Phosphatfreisetzung zugeordnet (Houdusse und Sweeney, 2001) oder auch einem frühen Myosin-ATP-Komplex kurz nach Dissoziation des Rigorkomplexes (Geeves und Holmes, 1999).

Die *detached*-Konformation wurde als ATP-Zustand vor der Hydrolyse klassifiziert (Houdusse *et al.*, 1999), oder auch, aufgrund der außergewöhnlichen Hebelarmposition, als schwach Aktin-bindender Zustand nach dem Kraftschlag beschrieben (Cooke, 1999). Wenn der Myosinkopf nach dem Kraftschlag nicht schnell genug von Aktin dissoziiert, könnte der Weitertransport des Aktinfilaments das Myosin gewissermaßen überstrecken (*drag stroke*), was zur Schwächung der Aktin-Bindung und zur Dissoziation führen könnte.

In allen bislang publizierten Strukturen wurde immer die gleiche Konformation von *switch I* beobachtet. Es ist jedoch anzunehmen, daß nicht nur *switch II*, sondern auch *switch I* im Verlauf des Aktomyosin-Zyklus öffnet und schließt. Mutmaßlich zeigen die bekannten Strukturen *switch I* im geschlossenen Zustand. Die Öffnung von *switch I* könnte wesentlich sein für die Freisetzung der Hydrolyseprodukte. Wie eine offene Konformation von *switch I* aussehen könnte und welchen Einfluß das Öffnen des Schalters auf die Konformation des restlichen Myosinkopfes ausüben würde, konnte bisher nicht gezeigt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Molekularbiologie

2.1.1 Nährmedien und Puffer

TAE-Puffer

40 mM Tris

20 mM Essigsäure

2 mM EDTA

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7.6

1 mM EDTA, pH 8.0

LB-Medium

10 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl

LB-Agar

15 g/l Agar in LB-Medium

mit 5 N NaOH auf pH 7,0 einstellen
und 30 min bei 121 °C autoklavieren

Ampicillin

100 mg/ml in Wasser

2.1.2 Oligonukleotide und Plasmide

TR-02 (XhoI, 5'Ende *dynI*)

5'-GTC-ACT-CGA-GGG-CAA-CCG-CGG-CAT-GGA-AG-3'

TR-03 (XbaI, 3'Ende der *dynI*-GTPase-Domäne)

5'-ACC-TCT-AGA-TTA-CAG-CTG-GCT-CTG-CAG-TTT-G-3'

M13R2 (Sequenzier-Primer stromaufwärts für MyD1)

5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

M13F (Sequenzier-Primer stromabwärts für MyD1)

5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'

- pCR[®] 2.1-TOPO** Vektor zur direkten Subklonierung von PCR-Produkten mit TA-Überhängen (Invitrogen).
- pM765mcs** *D. discoideum* Expressionsvektor zur Herstellung von Myosinfusionsproteinen mit N-terminalem Heptahistidinpeptid unter Kontrolle des konstitutiven actin15-Promoters (Manstein *et al.*, 2001).

2.1.3 Reinigung von Plasmid-DNA

Zur analytischen Reinigung von Plasmid-DNA aus 1.5 ml *E. Coli*-Kultur wurde das „Plasmid-Mini-Kit“ von Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Für die präparative Reinigung von Plasmid-DNA aus 100 ml *E. coli*-Kultur wurde das „Plasmid-Maxi-Kit“ eingesetzt. Konzentration und Reinheit der resultierenden DNA-Lösungen wurde durch Aufnahme eines Absorptionsspektrums zwischen 220 und 300 nm in Quarzküvetten der Schichtdicke 1 cm mit einem DU-650 Spektralphotometer (Beckman) bestimmt. Die Konzentration wurde gemäß der folgenden Abschätzung berechnet: $OD_{260} 1.0 = 50 \mu\text{g/ml}$ dsDNA.

2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ist es möglich, DNA-Sequenzen unter Einsatz kleinster DNA-Mengen als Matrize hochspezifisch *in vitro* zu vervielfältigen (Saiki *et al.*, 1985; Mullis und Faloona, 1987). Die Matrizen-DNA wird bei 94 °C denaturiert, um anschließend bei niedrigerer Temperatur (5 °C unter T_m) die Bindung zweier spezifischer, gegenläufiger Oligonukleotide (*primer*, englisch: Starter) zu ermöglichen. Der nächste Schritt ist die durch eine hitzestabile DNA-Polymerase katalysierte Polymerisationsreaktion, die abhängig vom gewählten Primer bei 68-72 °C durchgeführt wird. Erneute Denaturierung startet dann den nächsten Reaktionszyklus. Die Schmelztemperatur der Primer kann nach folgender Formel abgeschätzt werden:

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

Für die Amplifizierung der GTPase-Domäne von Dynamin 1 wurde der folgende Reaktionsansatz verwendet:

- 5 µl 10x Puffer, pH 9.5
- 5 µl Plasmid-DNA als Matrize
- je 1 µl Primer
- 2 µl Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)
- 1 µl Expand HiFidelity Polymerase-Mix
- 35 µl Wasser

Die Zeiten und Temperaturen für die einzelnen Reaktionsschritte waren wie folgt:

Denaturierung	1x	94 °C	4 min
Synthesezyklen	25x		
Denaturierung		94 °C	1 min
Hybridisierung		48 °C	2 min
Elongation		72 °C	1 min
Elongation	1x	72 °C	10 min

Die PCR-Produkte wurden auf Agarosegelen analysiert und mit Hilfe des PCR-Purification-Kits (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben gereinigt.

2.1.5 DNA-Restriktion

Die spezifische Spaltung von DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen. Zu analytischen Zwecken wurden dazu 8 µl DNA-Lösung aus analytischen DNA-Reinigungen oder 1 µl aus präparativen DNA-Reinigungen eingesetzt. Für präparative Restriktionen wurden einige µg DNA eingesetzt, um ausreichend Material für mehrere Ligationsansätze zur Verfügung zu haben. Die Puffer wurden gemäß den Herstellerangaben (Roche oder Fermentas) ausgewählt, die Inkubationszeit betrug 1 h bei 37 °C. Die erhaltenen Fragmente wurden mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt.

2.1.6 Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten und Isolierung

DNA-Fragmentgemische lassen sich anhand ihrer Größe durch Agarose-Gelelektrophorese auftrennen. Die Konzentration der Agarose bestimmt, welche DNA-Fragmentgrößen im Gel getrennt werden können. Innerhalb dieser Arbeit wurden 1 %-ige Gele verwendet. Die Proben wurden mit 1/6 ihres Volumens an Probenpuffer versetzt und bei einer Spannung von 100 V in Minigelen (5 x 8 cm) getrennt. Die DNA wurde durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und durch Vergleich mit einer parallel aufgetrennten Standard-DNA-Lösung mit Fragmenten bekannter Größe (*1 kb DNA Ladder*, Invitrogen) identifiziert.

DNA-Probenpuffer

50 % (v/v) Glycerin

0.2 % SDS

0.05 % Bromphenolblau

0.05 % Xylencyanol

in TAE-Puffer

2.1.7 5'-Dephosphorylierung von DNA

Um eine Religation des Plasmids zu verhindern, wurden vor der Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Plasmide von deren 5'-Enden die Phosphatgruppen entfernt. Dazu wurde alkalische Phosphatase aus Garnelen gemäß den Angaben des Herstellers (United States Biochemical) verwendet. Anschließend wurde das Enzym durch eine 10-minütige Hitzebehandlung deaktiviert und das dephosphorylierte Plasmid zur Ligation eingesetzt.

2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die enzymatisch katalysierte Rekombination von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Roche) durchgeführt. Dazu wurde die dephosphorylierte Plasmid-DNA

mit dem zu inserierenden DNA-Fragment in einem Reaktionsvolumen von insgesamt 10 μ l gemischt. Nach Zugabe von je 1 μ l 10x Ligasepuffer und 1 μ l Ligase (Roche) wurde der Ansatz für 2 h bei 20 °C inkubiert.

Ligationspuffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.6

10 mM MgCl₂

10 mM DTT

1 mM ATP

5 % (w/v) PEG8000

100 μ g/ml BSA

2.1.9 TOPO-TA-Klonierung

Das TOPO-TA-System erlaubt die einfache Subklonierung von PCR-Produkten zur Amplifizierung in *E. coli*. Die eingesetzte *Taq*-Polymerase schafft einen Adenin-Überhang am 3'-Ende, der direkte Ligation in den pCR[®]2.1-TOPO-Vektor zulässt. Das PCR-Produkt wird in das *lacZ*-Gen des Plasmids integriert. Die Subklonierung erfolgt gemäß den Angaben des Herstellers (Invitrogen). Nach der Transformation (Abschnitt 2.1.14) in *E. coli* XL1-Blue-Zellen werden die Zellen (**Hersteller**) in Gegenwart von X-Gal (Substratanalog der β -Galactosidase) und IPTG (induziert die Expression des *lacZ*-Gens) vermehrt. Weiß gefärbte Bakterienkulturen zeigen erfolgreiche Ligationen an, während Religation des Plasmids zu Blaufärbung führt.

2.1.10 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

200 ml LB-Medium ohne Antibiotikum wurden mit 4 ml eine Übernachtskultur von *E. coli*-XL1-Blue inokuliert, bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ = 0.3-0.4 geschüttelt und dann für 15 min auf Eis gestellt. Die optische Dichte (OD) wird bei 600 nm in Einwegplastikküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm spektrophotometrisch bestimmt.

Die Zellen wurden bei 3000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, in 60 ml Puffer 1 resuspendiert und nochmals 15 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 4 ml Puffer 2 resuspendiert, in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.1.11 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*

Zur Herstellung von *E. coli*-Übernachtskulturen wurden 2 ml LB-Medium (ggf. mit 75 µg/ml Ampicillin) mit einer Einzelkolonie einer Plattenkultur inokuliert und ca. 12 h bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. Für größere Mengen wurden 250 ml LB-Medium mit 100 µl Flüssigkultur inokuliert und wie beschrieben geschüttelt. Zur Konservierung der selektierten *E. coli*-Stämme wurden 1.4 ml einer Übernachtskultur mit 0.7 ml Glycerol gemischt und bei -80 °C aufbewahrt.

2.1.12 Transformation und Selektion von *E. coli*

100 µl kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit 10 µl eines Ligationsansatzes oder ca. 1 µg DNA aus einer analytischen DNA-Reinigung gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Verbesserung der Plasmid-Aufnahme wurden die Zellen anschließend noch für 30 s bei 42 °C inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf einer LB-Agar-Platte mit Ampicillin ausgestrichen und für ca. 18 h bei 37 °C inkubiert.

2.2 Kultivierung von *D. discoideum*

2.2.1 Nährmedien und Puffer

Elektroporationspuffer

10 mM Kaliumphosphat, pH 6.1

50 mM Sucrose

Bonner's Lösung

0.6 g/l NaCl

0.75 g/l KCl

HL5C

5 g/l	Protease-Pepton
2.5 g/l	Casein-Pepton
5 g/l	Bacto-Hefeextrakt
0.3 g/l	CaCl ₂
2.5 g/l	Bacto-Trypton
10 g/l	D-Glucose
1.2 g/l	KH ₂ PO ₄ (wasserfrei)
0.4 g/l	Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)

pH mit NaOH auf 6.6 einstellen und
30 min bei 121 °C autoklavieren.

MES-Puffer

20 mM	MES-KOH, pH 6.8
2 mM	MgCl ₂
0.2 mM	CaCl ₂

MES-Agar

20 g/l Difco-Bacto-Agar in MES-Puffer

2.2.2 Antibiotika

Penicillin/Streptomycin	10000 U/ml
G 418	20 mg/ml in Wasser

2.2.3 Kultivierung von *D. discoideum*-Zellen

D. discoideum-Zellen lassen sich in Petrischalen oder in Schüttelkultur bei 180 rpm kultivieren. Als Nährmedium dient in beiden Fällen HL5c, dem zur Vermeidung von Bakterienbefall 10 U/ml Penicillin/Streptomycin und G 418 in geeigneter Konzentration (meist 10-20 µg/ml) zur Selektion transformierter Zellen zugegeben wird. Auf Petrischalen wachsende Zellen werden mit HL5c abgespült, sobald die Platten konfluent geworden sind. Axenisch (in Schüttelkultur) wachsende Zellen werden bis zu einer Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml angezüchtet und dann mit frischem Nährmedium verdünnt. Hierbei sollte die Zelldichte 1×10^5 Zellen/ml nicht unterschreiten.

2.2.4 Transformation und Selektion von *D. discoideum*-Zellen

Zur Transformation werden ORF⁺-Zellen aus Schüttelkultur bei einer Dichte von $3-6 \times 10^6$ Zellen/ml durch Zentrifugation geerntet und zweimal in eiskaltem EP-Puffer gewaschen. Die Zellen werden in EP-Puffer bei einer Dichte von 0.8×10^7 Zellen/ml resuspendiert. Für einen Transformationsansatz werden je 800 µl dieser Suspension in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß mit 20 µg Plasmid-DNA gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wird in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Schichtdicke 0.4 cm) überführt und in der *Gene-Pulser*-Apparatur (Bio-Rad) bei 1.2 kV, 3 mF und 600 Ω mit einer Zeitkonstanten von etwa 0.7 ms elektroporiert. Danach wird der Transformationsansatz für 5 min auf Eis gekühlt und erneut elektroporiert. Nach weiteren 5 min auf Eis werden die Zellen auf drei Petrischalen mit je 10 ml HL5c verteilt. Nach 24 h wird das Nährmedium entfernt und durch frisches Medium mit G 418 Selektionsmarker ersetzt. Das Medium wird in der gleichen Weise alle zwei Tage gewechselt, bis Kolonien entstanden sind. Diese werden mit einer Pipettierhilfe auf Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen in je 0.5 ml HL5c übertragen.

2.2.5 Konservierung von *D. discoideum*-Zellen

D. discoideum-Zellen aus Schüttelkultur werden zweimal mit kaltem MES-Puffer gewaschen und bei einer Dichte von 2×10^8 Zellen/ml resuspendiert. Von dieser Suspension werden 0.3 ml auf einer MES-Agarplatte ausgestrichen und etwa 5 min getrocknet. Die Platten werden umgekehrt stehengelassen. Nach 24 bis 48 h ist die Fruchtkörperbildung abgeschlossen und die Sporen können durch heftiges Aufschlagen der Platte im Deckel gesammelt werden. Es empfiehlt sich, die Sporen von drei Platten in einem Deckel zu sammeln. Die geernteten Sporen werden in 1 ml 10 %-igem Glycerol suspendiert und in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zum Animpfen wurde ein Aliquot bei 37 °C aufgetaut und auf zwei Petrischalen mit je 10 ml HL5c-Medium verteilt.

2.3 Proteinchemie

2.3.1 Allgemeine Puffer

TBS (*tris buffered saline*)-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

PBS (*phosphate buffered saline*)-Puffer

80 mM Na_2HPO_4

20 mM NaH_2PO_4

100 mM NaCl

2.3.2 Proteaseinhibitoren

Mix 1

(100x in Ethanol; bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ lagern)

10 mg/ml N_α -p-Tosyl-L-Argininmethylester (TAME)

8 mg/ml N_α -p-Tosyl-L-phenylalaninchloromethylketon (TPCK)

0.2 mg/ml Pepstatin A

0.5 mg/ml Leupeptin

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

8.8 mg/ml in Ethanol (bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ lagern)

Benzamidin

5 mM (als Festsubstanz zugesetzt)

2.3.3 Antikörper

Kaninchen-IgG, Anti-Dynamin A (PAD-1, Epitop: Aminosäuren 51-60)

(Wienke *et al.*, 1999)

Maus-IgG, Anti-Pentahistidin (Qiagen)

Ziegen-IgG, Anti-(Kaninchen IgG), Meerrettichperoxidase-Konjugat (Bio-Rad)

Ziegen-IgG, Anti-(Maus IgG), Meerrettichperoxidase-Konjugat (Bio-Rad)

Kaninchen-IgG, Anti-Vault; von Prof. Dr. Leonard Rome, University of California, San Francisco, USA (Vasu und Rome, 1995)

Maus-IgG, Anti-Coronin

von Dr. M. Maniak, MPI für Biochemie, Martinsried (de Hostos *et al.*, 1991)

Maus-IgG, Anti- α -Tubulin (SIGMA)

2.3.4 Säulen und Säulenmaterial

Fractogel TSK DEAE-650 (S)	Merck
Ni-NTA superflow	Qiagen
Superdex 200 (XK26/60)	Amersham Pharmacia
Superose6 (HR10/30)	Amersham Pharmacia
Mono Q (HR 5/5)	Amersham Pharmacia

Für die Ionentauscher- und Ni-NTA-Materialien wurden XK16/20 Leersäulen von Amersham Pharmacia verwendet.

2.3.5 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentration von Proteinlösungen läßt sich durch die Methode von Bradford bestimmen (Bradford, 1976). Dazu wird eine kleine Menge der Lösung (üblicherweise 1-20 μ l) in einer 1 ml Einwegplastikküvette mit 950 μ l Bradford-Reagenz versetzt und das Volumen wird mit Wasser auf 1 ml ergänzt. Nach Mischen durch mehrfaches Wenden der Küvette wird die Absorption bei 595 nm in einem Spektrophotometer bestimmt und die

Konzentration anhand einer Eichgeraden bestimmt. Die Konzentration errechnet sich durch Multiplikation des Kehrwerts der Eichgeradensteigung mit der gemessenen Absorption, sofern 1 µl Proteinlösung eingesetzt wird.

Bradford-Reagenz:

100 mg Coomassie brilliant blue werden in 50 ml 95 %-igem Ethanol gelöst und mit 100 ml 86 %-iger Phosphorsäure versetzt. Nach Auffüllen mit Wasser auf einen Liter wird die Lösung durch *Gel-Blotting*-Papier (Schleicher & Schuell) gefiltert und bei 4 °C aufbewahrt.

2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteingemische lassen sich durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrer Größe auftrennen. Abhängig vom abzubildenden Größenbereich wurden Gele mit einem Acrylamidgehalt von 8-15 % verwendet. Es wurden Minigele mit 10, 12 oder 15 Taschen (Größe 8 x 6 cm, Dicke 1 mm) verwendet. Flüssige Proteinproben werden mit einem Viertel ihres Volumens 5x Probenpuffer gemischt und für 10 min auf 95 °C erhitzt. Mit Sedimenten wird nach gründlicher Homogenisation in 1x Probenpuffer (1 Teil 5x Probenpuffer, 4 Teile Wasser) ebenso verfahren. Abhängig von der Taschengröße werden 10-15 ml Probe pro Tasche geladen. Die Laufzeit beträgt ca. 70 min bei einer Spannung von 200 V und einem Strom von 35 mA pro Gel. Die Gele werden mit Coomassie-Färbelösung für 1 h gefärbt und in schnellem Entfärber für 30 min oder in langsamem Entfärber über Nacht entfärbt.

Protein-Standards:

Benchtot™ Ladder Marker (Invitrogen)

Benchtot™ Prestained Ladder Marker (Invitrogen)

10x SDS Laufpuffer (Vorratslösung)

30 g/l Tris

144 g/l Glycin

10 g/l SDS

4x Trenngel-Puffer

1.5 M Tris, pH 8.8

0.4 % SDS

5x Probenpuffer

100 mM	Tris, pH 6.8
4 %	SDS
2 %	β -Mercaptoethanol
20 %	Glycerol
0.2 %	Bromphenolblau

4x Sammelgel-Puffer

0.5 M	Tris, pH 6.8
0.4 %	SDS

Coomassie-Färbelösung

2 g	Coomassie brilliant blue R250
0.5 g	Coomassie brilliant blue G250
50 ml	Methanol
450 ml	Ethanol
100 ml	Essigsäure 99 %
400 ml	Wasser

Entfärber, schnell

45 %	Ethanol
10 %	Essigsäure 99 %

Entfärber, normal

5 %	Ethanol
7.5 %	Essigsäure 99 %

Die Farbstoffe werden unter Rühren in Methanol aufgelöst, nacheinander werden Ethanol und Essigsäure zugegeben, danach wird mit 400 ml Wasser aufgefüllt und filtriert.

2.3.7 Western-Blot

Proteine in einem Gel lassen sich durch elektrophoretischen Transfer auf einer Nitrocellulosemembran immobilisieren (Renart *et al.*, 1979, Towbin *et al.*, 1979). Dieses Verfahren wird in Anlehnung an die von E. M. Southern entwickelte Methode zum Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nitrocellulose (Southern, 1974) *Western-Blotting* genannt.

Beim im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich angewandten semitrockenen Blotten wird das elektrische Feld direkt an das Elektrophoresegel angelegt (Khyse-Anderson, 1984). Die auf Größe des Gels zurechtgeschnittenen Einzelkomponenten werden kurz in Transferpuffer getränkt und dann luftblasenfrei auf der Kathode der Blotapparatur übereinandergeschichtet: drei Lagen *Gel-Blotting*-Papier (Schleicher & Schuell), Polyacrylamid-Gel, Nitrocellulose-

membran und nochmals drei Lagen *Gel-Blotting*-Papier. Die Anode wird aufgesetzt und der Transfer erfolgt bei konstantem Strom von 400 mA für eine Stunde.

Transferpuffer

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

Die Blotmembranen können optional für 2 min in PonceauS-Färbelösung gefärbt werden, um das Anzeichnen des Größenstandards zu ermöglichen. Danach werden die Membran durch wiederholtes Waschen mit TBST wieder entfärbt.

PonceauS-Färbelösung

0.2 % (w/v) PonceauS
3 % (w/v) Trichloressigsäure

2.3.8 Enzym-Immunoassay

Die auf der Blot-Membran immobilisierten Proteine lassen sich durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern und einer anschließenden chemilumineszenten Reaktion nachweisen.

Zunächst wird die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei Raumtemperatur mit einer 4 %igen Lösung von Milchpulver in TBST inkubiert. Dann folgt die Inkubation mit einer Lösung des gegen das gesuchte Protein gerichteten Erstantikörpers (1:2000 in TBST) für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Nach drei je 10-minütigen Waschschritten mit TBST erfolgt die Inkubation mit dem gegen den Erstantikörper gerichteten Meerrettichperoxidase-gekoppelten Zweitantikörper. Nach weiteren drei Waschschritten wird die Membran für 1 min mit einer Mischung aus je 1 ml der beiden Substratlösungen des ECL™-Kit (Amersham Pharmacia) und 8 ml Wasser

inkubiert. Die Chemilumineszenz wird durch Auflegen eines Hyperfilm™ ECL™-Films für 30 s bis 1 h visualisiert.

2.3.9 Analytische Proteinreinigung aus *D. discoideum*

Von einer konfluenten Petrischale (9 cm) mit *D. discoideum* wird das Nährmedium entfernt und die Zellen werden auf der Platte einmal mit ca. 5 ml Bonner's Lösung gewaschen. Die Zellen werden dann in 1 ml Bonner's Puffer von der Platte ab gespült und in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß für 7 min bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die in 600 µl Lyse-Puffer suspendierten Zellen werden durch Zugabe von 600 µl Lyse-Puffer mit 1 % Triton® TX-100 und Protease-Inhibitoren für 30 min auf Eis lysiert. Der Ansatz wird für 30 min bei 13000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Sediment wird mit 60 µl Extraktionspuffer mit 10 mM des geeigneten Nukleotids (ATP für MyD1, GTP für Dynamin A) unter Zuhilfenahme eines Mikropistills homogenisiert. Nach erneuter zwanzigminütiger Zentrifugation werden Überstand und Sediment getrennt durch SDS-PAGE analysiert.

2.3.10 Reinigung von Dynamin A

Als Ausgangsmaterial zur präparativen Herstellung von Dynamin A dienen *D. Dictyostelium*-Zellen des Stammes HDM21 (Wienke, 1998), die aus 10-12 l Schüttelkultur bei einer Zelldichte von $5-8 \times 10^6$ Zellen/ml durch achtminütige Zentrifugation bei 1000 g gewonnen wurden. Alle Arbeitsschritte wurden im Kühlraum bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden mit 1 l eiskaltem LP (ohne Benzamidin und DDT) gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das Sediment wurde im 9-fachen Volumen (1 g Zellen = 1 ml) LP suspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 10 Zellvolumina LP mit 1% Triton® X-100 und 2-fach Protease-Inhibitoren-Mix unter leichtem Rühren für 20 min auf Eis lysiert. Das Lysat wurde für 1 h bei 30000 g und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Sediment-Pellets wurden in je 20 ml LP (mit Protease-Inhibitoren) gewaschen. Nach erneuter 15-minütiger Zentrifugation wurden die Pellets mit dem

zweifachen Volumen Extraktionspuffer in einem Dounce-Homogenisator (Wheaton) gründlich homogenisiert. Das Homogenisat wurde für 20 min bei 20000 g zentrifugiert und der Überstand zweimal gegen LP₅₀ über Nacht dialysiert, um das enthaltene Myosin als Aktin-Rigor-Komplex zu präzipitieren. Im Verlauf der Arbeit zeigte sich, daß auch ein vierstündiger Dialyseschritt ausreicht, um das Myosin quantitativ zu entfernen. Nach Zentrifugation bei 3000 g für 15 min wurde der Dialyseüberstand auf eine mit LP₅₀ äquilibrierte DEAE-Säule (Fractogel 650 S, Merck) aufgetragen. Die Säule wurde solange mit LP₅₀ gewaschen, bis die UV-Absorption des Durchflusses einen konstanten Wert erreicht hatte. Das gebundene Protein wurde mit einem linear ansteigenden Gradienten von 50 bis 500 mM NaCl von der Säule eluiert und in 2-3 ml Fraktionen gesammelt. Die Zusammensetzung der Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE analysiert und saubere Fraktionen wurden vereinigt und konzentriert. Meist enthielt der Durchfluß deutlich mehr Dynamin als das Eluat, in diesen Fällen wurde der Durchfluß über Nacht zweimal gegen LP (ohne Benzamidin und DDT) dialysiert. Das präzipitierte Protein wurde mit frischem Dialysepuffer gewaschen und unter vorsichtigem Rühren wieder in Aufbewahrungspuffer gelöst und nach Zusatz von 3 % Sucrose aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

LP₅₀

50 mM Tris-HCl, pH 8.0
2 mM EDTA
0.2 mM EGTA
5 mM Benzamidin
2 mM DTT
50 mM NaCl

LP₅₀₀

50 mM Tris-HCl, pH 8.0
2 mM EDTA
0.2 mM EGTA
5 mM Benzamidin
2 mM DTT
500 mM NaCl

LP (Lysepuffer)

50 mM Tris-HCl, pH 8.0
2 mM EDTA
0.2 mM EGTA
5 mM Benzamidin
2 mM DTT

Extraktionspuffer

50 mM	Tris-HCl, pH 8.0
2 mM	EDTA
0.2 mM	EGTA
300 mM	NaCl
12 mM	MgCl ₂
10 mM	GTP

Aufbewahrungspuffer

50 mM	Tris-HCl, pH 8.0
150 mM	NaCl
1 mM	MgCl ₂

2.3.11 Reinigung der Dynamin 1-GTPase-Domäne als Myosin II - Fusionsprotein

Dictyostelium-Zellen wurden wie im vorigen Abschnitt beschrieben gezüchtet, geerntet und lysiert, die Lysedauer betrug 1 h. Nach der Zentrifugation wurden die Pellets mit je 20 ml Extraktionspuffer mit Protease-Inhibitoren, jedoch ohne Nukleotide gewaschen und wie beschrieben mit Extraktionspuffer homogenisiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 20000 g wurde der Extraktionsüberstand auf eine mit Niedrigsalzpuffer äquilibrierte 25 ml NiNTA-Säule (Leersäule: Amersham Pharmacia; Matrix: Qiagen) aufgetragen. Die Säule wurde nacheinander jeweils solange mit Niedrigsalzpuffer, Hochsalzpuffer und Niedrigsalzpuffer mit 50 mM Imidazol gewaschen, bis die UV-Absorption einen konstanten Wert erreicht hatte. Das Protein wurde durch einen linearen Gradienten von 50 mM bis 500 mM Imidazol von der Säule eluiert und in 3 ml Fraktionen gesammelt. Die Zusammensetzung der Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Fraktionen, die vorwiegend MyD1 enthielten, wurden vereinigt und zweimal gegen Aufbewahrungspuffer dialysiert. Die Proteinlösung wurde auf ca. 5 mg/ml konzentriert und auf eine mit Aufbewahrungspuffer mit 150 mM NaCl äquilibrierte Sephadex 200 Gelfiltrationssäule (Amersham Pharmacia) aufgetragen. Die Peakfraktionen wurden vereinigt, auf 18 mg/ml konzentriert und nach Zusatz von 3 % Sucrose und Aliquotierung in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Niedrigsalzpuffer

50 mM	Hepes-NaOH, pH 7.3
30 mM	Kaliumacetat
5 mM	Benzamidin

Hochsalzpuffer

50 mM	Hepes-NaOH, pH 7.3
300 mM	Kaliumacetat
5 mM	Benzamidin

Extraktionspuffer

50 mM	Hepes-NaOH, pH 7.3
30 mM	Kaliumacetat
300 mM	NaCl
14 mM	Magnesiumacetat
7 mM	β -Mercaptoethanol
10 mM	ATP
2 mM	GTP

Aufbewahrungspuffer

50 mM	Tris-HCl, pH 8.0
150 mM	NaCl
1 mM	MgCl ₂
5 mM	DTT

Imidazolpuffer

500 mM	Imidazol, pH 7.3
5 mM	Benzamidin

2.3.12 *Steady-state-Kinetik*

Für die Untersuchung der enzymatischen Aktivität von Dynamin A im stationären Zustand wurde der bereits für Myosin-ATPase-Messungen (Berghäuser, 1975) verwendete *PK/LDH-Assay* eingesetzt (Abbildung 2.1). Dabei wird durch Hydrolyse gebildetes GDP durch

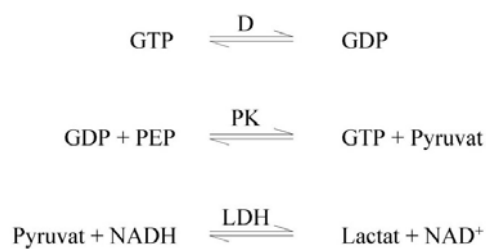


Abb. 2.1: Schema des gekoppelten Enzym-Aktivitätstests.
D: Dynamin, PK: Pyruvatkinase, LDH: Lactatdehydrogenase

Pyruvat-Kinase-katalysierte Phosphorylierung mit im Überschuß vorliegenden PEP als Substrat wieder zu GTP umgesetzt, so daß die GTP-Konzentration konstant gehalten wird. Das PEP wird dabei zu Pyruvat umgesetzt, welches unter Beteiligung von Lactat-Dehydrogenase von NADH reduziert wird. Die Oxidation von NADH zu NAD^+ läßt sich spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgen.

Aus der zeitabhängigen linearen Abnahme der Absorption wird bei bekannten Konzentrationen der Reaktionspartner die Reaktionsgeschwindigkeit des Dynamins berechnet werden. Der Extinktionskoeffizient $\epsilon(340 \text{ nm})$ von NADH beträgt $6.3 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, die Schichtdicke d der Meßküvette beträgt 1 cm. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz kann aus diesen Größen und der gemessenen zeitlichen Absorptionsänderung $\Delta A/\text{min}$ die Änderung der NADH-Konzentration mit der Zeit berechnet werden. Die Änderung der NADH-Konzentration entspricht der Änderung der GTP-Konzentration.

$$\Delta A = \epsilon_{\text{NADH}} \cdot \Delta[\text{NADH}] \cdot d$$

$$\Delta[\text{NADH}] = \Delta A / \epsilon_{\text{NADH}} \cdot d$$

Bei bekannter Dynaminkonzentration läßt sich nun die Geschwindigkeitskonstante des GTP-Umsatzes berechnen.

$$k_{\text{cat}} = \Delta c(\text{GTP}) / (\Delta c(\text{Dynamin}) \cdot 60 \text{ s}) \cdot \text{s}^{-1}$$

Reaktionslösung

50 mM	Tris-HCl, pH 8.0
150 mM	NaCl
1 mM	GTP
1 mM	MgCl ₂
0.3 mM	NADH
0.8 mM	Phosphoenolpyruvat (PEP)
4 µl/ml	Lactatdehydrogenase (LDH)
4 µl/ml	Pyruvatkinase (PK)

2.3.13 Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM)

Proteinproben zur elektronenmikroskopischen Analyse wurden mit EM-Puffer (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl) auf ca. 0.1 mg/ml verdünnt. Die Aufnahmen wurden von Dr. Willem Tichelaar und Frau Helga Claasen an einem EM 400T Elektronenmikroskop (Philips) angefertigt.

2.4 Röntgenkristallographische Experimente

2.4.1 Kristallisation

Zur Kristallisation des Fusionsproteins MyD1 wurde ausschließlich das Hängetropfenverfahren (McPherson, 1976; 1990) angewendet. Dieses Verfahren beruht darauf, eine konzentrierte Proteinlösung über Dampfdiffusion in den übersättigten Zustand zu überführen. Dazu wurden 4 µl der Proteinlösung mittig auf runde Deckgläschen (Durchmesser 21 mm, Hampton) pipettiert. Die Deckgläser wurden anschließend mit dem Tropfen nach unten über die Vertiefungen einer VDX-Platte (24 Vertiefungen, Hampton) gesetzt, die 700 µl der Reservoirlösung enthielten. Die Kontaktflächen zwischen VDX-Platte und Deckgläsern waren zuvor mit viskoser Siliconpaste (*Baysilone mittelviskos*, Bayer) versehen worden, um die Reservoirs während des Äquilibrierungsvorganges luftdicht mit den Deckgläsern abzuschließen.

Um ausgewachsene Kristalle zu stabilisieren, wurden zu jedem Tropfen 4 µl Erntepuffer gegeben.

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Proteinlösungen:

50 mM	Tris pH 8.0
5-6 % w/v	PEG-8000
145-165 mM	NaCl
0.5 mM	EGTA
3 mM	MgCl ₂
5 mM	DTT
1% w/v	2-Methyl-2,4-pentandiol
9 mg/ml	MyD1

Reservoirlösungen:

50 mM	Tris pH 8.0
10-12 % w/v	PEG-8000
140-170 mM	NaCl
1 mM	EGTA
5 mM	MgCl ₂
5 mM	DTT
2% w/v	2-Methyl-2,4-pentandiol

Erntelösung:

50 mM	Tris pH 8.0
12-14 % w/v	PEG-8000
140-170 mM	NaCl
1 mM	EGTA
5 mM	MgCl ₂
5 mM	DTT
2% w/v	2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD)

2.4.2 Herstellung von Schweratom-Derivatkristallen

Um Schweratome an die Proteinmoleküle im Kristall zu binden, können native Kristalle über einen längeren Zeitraum in schweratomhaltiger Erntelösung inkubiert werden. Art und Konzentration des Schweratoms müssen dabei so gewählt werden, daß der entstandene Derivatkristall isomorph bleibt zum ursprünglichen Kristall, d.h. daß die Positionen der Proteinatome im Kristall durch die Anbindung der Schweratome nur in sehr geringem Maße verändert werden.

Der zur Phasenlösung des Fusionsproteins MyD1 verwendete Kristall wurde in Erntelösung mit 100 µM Methylquecksilberchlorid transferiert und bei 4 °C für 14 Stunden in dieser Schweratom-Lösung belassen.

2.4.3 Einfrieren von Kristallen zur Datensammlung

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Beugungsdaten wurden an tiefgefrorenen Kristallen gemessen. Durch die Verwendung von tiefen Temperaturen wird die Entstehung von Strahlenschäden im Kristall drastisch vermindert (Rodgers, 1994).

Um Kristalle von biologischen Makromolekülen unbeschadet einfrieren zu können, muß die Bildung von kristallinem Eis im Kristallwasser und in der den Kristall umgebenden Mutterlauge unterdrückt werden. Dazu werden der Mutterlauge geeignete Frostschutzmittel, wie z.B. Glycerol, Ethylenglycol oder Polyethylenglycol niederen Molekulargewichts (Garman und Schneider, 1997), zugesetzt, die ein glasartiges Frieren des Kristallwassers und der Mutterlauge bewirken.

Die Kristalle wurden vor dem Einfrieren für kurze Zeit in der Kryolösung inkubiert. Danach wurde der Kristall mit einer kleinen Schlaufe (*Cryo loops*, Hampton) aus der Kryolösung aufgenommen und mitsamt dieser Kryoschlaufe in flüssigem Propan eingefroren. Anschließend wurden die Kryoschlaufen mit Hilfe eines Transfersystems (*crystal cap system*, Hampton) in ein Dewargefäß (Taylor-Wharton) mit flüssigem Stickstoff überführt und dort bis zur Messung gelagert. Zur Messung wurden die Kristallschlaufen in einen Strom aus verdampftem Stickstoff (Oxford Cryosystems) gebracht und so während des gesamten Beugungsexperiments bei 100 K gehalten.

Im Falle der MyD1-Kristalle zeigte eine Kryolösung mit 25 % Glycerol in Beugungstests ausreichende Frostschutzeigenschaften, jedoch bewirkte der direkte Transfer der Kristalle von normaler Erntelösung in die Kryolösung eine Fragmentierung der Kristalle in zahlreiche Splitter. Um die Kristalle schonend an die Endkonzentration anzugleichen, wurden sie zunächst mit einer Kryoschlaufe in 20 µl Erntepuffer transferiert. Dann wurden insgesamt 20 µl Erntepuffer mit 50 % Glycerol in Portionen von 1-2 µl in größtmöglichem Abstand zum Kristall zum Tropfen hinzugefügt. Nach jeder Zugabe folgte eine 3-minütige Inkubationsphase.

2.4.4 Datensammlung

Sämtliche dieser Arbeit zugrunde liegenden Beugungsdaten wurden im Drehkristallverfahren (Arndt und Wonacott, 1977) gemessen. Der hierzu verwendete Kameraaufbau entspricht der einfachen Geometrie einer Arndt-Wonacott Oszillationskamera. Der kollimierte monochromatische Röntgenstrahl trifft senkrecht auf die Spindelachse, um die der Kristall während der Belichtung gedreht wird. Der Röntgendetektor ist in variierbarem Abstand zum Kristall auf einer Schiene montiert, die parallel zum einfallenden Strahl verläuft. Die Detektorfläche steht senkrecht zur Strahlrichtung.

Die Beugungsdatensätze von nativen MyD1 Kristallen wurden mit monochromatischer Synchrotronstrahlung der Wellenlänge 0.93927 \AA am Meßplatz ID14-4 des ESRF (Grenoble, Frankreich) auf einem *Quantum4* CCD-Detektor (ADSC) aufgenommen.

Die Beugungsdaten des Methylquecksilberchlorid-Derivatkristalles von MyD1 wurden mit Hilfe eines konventionellen *Elliot GX-18* Röntgenerators (Enraf-Nonius) gemessen, der mit 35 kV und 50 mA betrieben wurde. Als Anodenmaterial diente Kupfer, dessen charakteristische K_{α} -Strahlung eine Wellenlänge von 1.542 \AA liefert. Als Detektor wurde ein *MAR345 image plate Scanner* (X-ray research) verwendet.

2.4.5 Datenauswertung

Die gebeugte Intensität eines Reflexes auf einer Beugungsaufnahme ist abhängig von der atomaren Zusammensetzung der Moleküle in der Einheitszelle des Kristalls. Die Intensität $I(hkl)$ eines Reflexes mit den Millerschen Indizes hkl ist proportional zum Quadrat der Amplituden des komplexen Strukturfaktors $F(hkl)$ (siehe z.B. Drenth, 1994).

Um aus den gemessenen Beugungsmustern die Strukturfaktoramplituden bestimmen zu können, müssen zunächst jedem Reflex die korrekten Millerschen Indizes entsprechend der beugenden Netzebenenschar zugeordnet werden. Die Millerschen Indizes und die Lage eines Reflexes auf der Detektorebene ergeben sich aus der genauen Kenntnis der geometrischen Parameter des Beugungsexperimentes. Neben der Wellenlänge des

einfallenden Strahls, dem Abstand zwischen Kristall und Detektorebene sowie der Größe des Drehbereichs während der Beugungsaufnahme, die bekannt sein müssen, sind dies vor allem die Kantenvektoren der Einheitszelle sowie die Orientierung des Kristalls relativ zum Detektor und zum einfallenden Strahl, die aus den Beugungsaufnahmen mit Hilfe eines Computerprogramms bestimmt werden müssen. Zur Bestimmung der Intensitäten der einzelnen Reflexe wird an jedem Beugungsort eine Integrationsmaske angelegt, die Reflexform und lokale Untergrundstreuung berücksichtigt. Die Intensitätswerte aller zum Reflexbereich gezählten Pixel werden aufsummiert und dem entsprechenden Zahlentripel hkl als integrierte Intensität zugeordnet. Die integrierten Intensitäten werden auf Absorptions- und Polarisierungseffekte und um den Lorentzfaktor korrigiert (Drenth, 1994) und zusammen mit den zugehörigen Miller-Indizes und der Standardabweichung der integrierten Intensität vom lokalen Untergrund in eine Datei geschrieben.

Bevor die Rohdaten zur Berechnung der Strukturfaktoramplituden weiterverwendet werden können, müssen die Reflexintensitäten auf ein gemeinsames Intensitätsniveau skaliert werden. Hierbei wird ausgenutzt, daß in jedem Datensatz *symmetrie-äquivalente* Reflexe vorhanden sind. Die Intensität dieser Reflexe sollte theoretisch gleich sein. Schwankungen in den Strahlbedingungen, unterschiedlich starke Absorptionseffekte unter verschiedenen Beugungswinkeln und veränderter Kristallorientierung, Fehler in der Bestimmung der Integrationsmasken usw. führen dazu, daß die Intensitäten symmetrie-äquivalenter Reflexe in der Praxis voneinander abweichen. Diese Abweichungen können in Form des sogenannten R_{sym} -Wertes als Maß für die Güte der gemessenen Beugungsdaten genommen werden:

$$(2.4.1) \quad R_{\text{sym}} = \frac{\sum \sum | \langle I(hkl)_i \rangle - I(hkl)_i |}{\sum \sum I(hkl)_i}$$

Summiert wird hierbei über alle symmetrie-äquivalenten Reflexe hkl und die Anzahl i (von 1 bis N) der äquivalenten Intensitätsmessungen. $I(hkl)_i$ ist die Intensität der i -ten Messung zu einem Reflex, $\langle I(hkl)_i \rangle$ stellt den Mittelwert der N äquivalenten Messungen dar.

Die Arbeitsschritte zur Bestimmung der Reflexintensitäten wurden für sämtliche Beugungsdaten von MyD1 mit Hilfe des Programmes XDS (Kabsch, 1993) durchgeführt. Für die Skalierung der Intensitäten wurde das Programm XSCALE (Kabsch, 1993)

verwendet. Die Strukturfaktoren wurden aus den skalierten Intensitäten mit dem Programm XDSCONV (Kabsch, 1993) berechnet.

2.4.6 Lösung des Phasenproblems

Die Elektronendichteverteilung $\rho(xyz)$ um die Atome in der Einheitszelle des Kristalls berechnet sich als Fourier-Transformation über die Strukturfaktoren $\mathbf{F}(hkl)$ aus allen symmetrisch unabhängigen Reflexen:

$$\begin{aligned} (2.4.2) \quad \rho(xyz) &= 1/V \sum \sum \sum \mathbf{F}(hkl) \cdot \exp(-2\pi i(hx+ky+lz)) \\ &= 1/V \sum \sum \sum F(hkl) \cdot \exp(i\alpha(hkl)) \cdot \exp(-2\pi i(hx+ky+lz)) \end{aligned}$$

Hierbei steht V für das Volumen der Elementarzelle. Summiert wird über h , k und l von $-\infty$ bis $+\infty$. Im Zweiten Schritt der Gleichung ist der komplexe Strukturfaktor $\mathbf{F}(hkl)$ umgeschrieben in das Produkt aus seiner Amplitude $F(hkl)$ und dem zugehörigen Phasenterm $\exp(i\alpha(hkl))$.

Aus den im Beugungsexperiment gemessenen Reflexintensitäten lassen sich nur die Strukturfaktoramplituden $F(hkl)$ ableiten (Abschnitt 2.4.5). Die zur Berechnung der Elektronendichteverteilung ebenfalls notwendigen Phasenwinkel $\alpha(hkl)$ entziehen sich einer direkten Messung. Um dieses sogenannte *Phasenproblem* zu lösen gibt es prinzipiell zwei unterschiedliche Vorgehensweisen: die *Methode des molekularen Ersatzes* (Rossmann, 1972) und die *Methode des isomorphen Ersatzes* (siehe z.B. Stout und Jensen, 1989).

Molekularer Ersatz kann angewendet werden, wenn die zu lösende Struktur nur kleine Veränderungen gegenüber einem bereits bestehenden Strukturmodell erwarten läßt. Das Ausgangsmodell, das einer geeigneten bekannten Struktur entliehen ist, wird in die Einheitszelle des Meßsystems eingepaßt. Aus dem eingepaßten Startmodell werden dann erste Phasenwinkel berechnet und zusammen mit den gemessenen Strukturfaktoramplituden in der Fourier-Reihe (Gleichung 2.4.2) entwickelt.

Beim isomorphen Ersatz werden Schweratome an die Proteinmoleküle im Kristall gebunden (Abschnitt 2.4.2). Aus den Intensitätsunterschieden, die sich zwischen den Reflexen des

nativen Kristalls und eines Schweratom-Derivatkristalls durch die Streubeiträge der gebundenen Schweratome ergeben, lassen sich die Phasenwinkel berechnen. Stehen nur die Beugungsdaten eines Schweratom-Derivatkristalles zur Verfügung (SIR, von engl.: *Single Isomorphous Replacement*), sind die berechneten Phasen nicht eindeutig. Um die Phasen eindeutig bestimmen zu können, werden die Beugungsdaten eines weiteren, vom ersten Derivat verschiedenen Schweratom-Derivatkristalles in die Phasenberechnung einbezogen (MIR, von engl.: *Multiple Isomorphous Replacement*) oder, falls vorhanden, die anormalen Signale des Schweratom-Derivatdatensatzes (SIRAS, von engl.: *Single Isomorphous Replacement including Anomalous Signals*). Als Voraussetzung für die Phasenberechnung müssen die Positionen der Schweratome in der Einheitszelle des Kristalls lokalisiert werden. Dies geschieht über die Analyse der Patterson-Funktion (Stout und Jensen, 1989) der Differenzen zwischen den Reflexintensitäten im nativen Datensatz und Schweratom-Derivat-Datensatz (SIR Patterson) oder der anormalen Differenzen in den Schweratom-Derivat-Beugungsdaten (SAD Patterson, von engl.: *Single Anomalous Dispersion*).

Die MyD1-Struktur wurde mit SIRAS gelöst. Für die Einzelschritte zur Phasenlösung wurden die entsprechenden Routinen des Programmpaketes CNS (Brünger *et al.*, 1998) verwendet. Rotations- und Translationssuchen für den ursprünglich versuchten molekularen Ersatz wurden ebenfalls mit Unterprogrammen von CNS durchgeführt.

2.4.7 Erstellung und Verfeinerung des Strukturmodells

Ausgehend von einer Elektronendichtekarte, die aus einer Kombination der durch SIRAS bestimmten Phasenwinkel und den gemessenen Strukturfaktoramplituden berechnet wurde, konnte ein erstes Strukturmodell für das MyD1-Fusionsprotein erstellt werden. Dabei wurden den Bereichen höchster Elektronendichte Atomlagen des Proteins zugeordnet. Dieses Strukturmodell wurde anschließend in einem rechnergestützten Verfahren verfeinert. Dabei wird die Stereochemie des Modells auf ideale Zielwerte hin optimiert und die thermischen und positionellen Parameter aller Atome werden so verändert, daß sich die aus dem aktuellen Modell berechneten Strukturfaktoramplituden $F_{\text{calc}}(\text{hkl})$ den gemessenen

Strukturfaktoramplituden $F_{\text{obs}}(\text{hkl})$ angleichen. Da der Konvergenzradius dieser Minimierungsprozedur gering ist, werden größere Veränderungen und Erweiterungen des aktuellen Strukturmodells "per Hand und Auge" vorgenommen. In sich wiederholenden Zyklen aus automatischer Verfeinerung und manueller Korrektur wird das Strukturmodell solange optimiert, bis die Strukturfaktoramplituden $F_{\text{calc}}(\text{hkl})$ und $F_{\text{obs}}(\text{hkl})$ in bestmöglicher Übereinstimmung sind. Die Abweichung dieser Werte voneinander ist ein Maß für die Güte der verfeinerten Struktur und läßt sich als sogenannter *kristallographischen R-Faktor* R_{cryst} ausdrücken:

$$(2.4.3) \quad R_{\text{cryst}} = \frac{\sum |F_{\text{obs}}(\text{hkl}) - F_{\text{calc}}(\text{hkl})|}{\sum F_{\text{obs}}(\text{hkl})} \times 100$$

Die Summe läuft über alle symmetrie-unabhängigen Reflexe hkl.

Berechnet man den R-Faktor aus einer statistisch ausgewählten kleinen Teilmenge von symmetrie-unabhängigen Reflexen, die bewußt nicht zur Verfeinerung der Struktur verwendet wurden, erhält man den freien R-Faktor R_{free} , der eine realistischere Abschätzung des Modellfehlers darstellt (Brünger *et al.*, 1993).

Modellbau und manuelle Anpassung des Strukturmodells von MyD1 an die Elektronendichte wurden mit Hilfe des Programms O (Jones *et al.*, 1991) durchgeführt. Für die automatische Verfeinerung und die Erstellung der Elektronendichtekarten wurden die entsprechenden Routinen des Programmpaketes CNS (Brünger *et al.*, 1998) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Biochemische Charakterisierung von *Dictyostelium* Dynamin A

3.1.1 Reinigung von Wildtyp-Dynamin A

Dynamin A liegt in der Zelle größtenteils zytosolisch vor, etwa 10 % sind jedoch mit zytoskelettären Bestandteilen assoziiert. Diese Eigenschaft kann ausgenutzt werden, um eine erste Anreicherung von Dynamin A zu erzielen (Wienke, 1998).

Analog zum Reinigungsprotokoll für Myosin-Motordomänen (Manstein und Hunt, 1995) wurden die Zellen mit 0.5 % Triton lysiert und anschließend zentrifugiert. Hierdurch wird Dynamin A zusammen mit unlöslichen Zytoskelett- und Membranbestandteilen sedimentiert und zügig von endogenen Proteasen und anderen zytosolischen Proteinen abgetrennt. Durch Homogenisierung des Sediments mit 5 mM GTP in LP₅₀ konnten bis zu 60 % des Dynamin A extrahiert werden. Das mitextrahierte Myosin und Teile des Aktins wurden durch Dialyse gegen LP₅₀ präzipitiert und durch Zentrifugation abgetrennt.

Um das restliche Aktin abzutrennen, wurde der Dialyseüberstand auf eine mit LP₅₀ äquilibrierte DEAE-Anionentauschersäule aufgetragen. Unter diesen Bedingungen bindet Aktin an das Säulenmaterial während Dynamin A im Durchfluß bleibt. Als Hauptkontaminationen waren zwei Banden im Bereich von 50-55 kD sichtbar, die durch Western-Blotting als Tubulin bzw. Coronin identifiziert werden konnten. Diese und andere lösliche Kontaminationen wurden durch Dialyse gegen LP (ohne Benzamidin und DTT) entfernt. Das im Dialyseschritt präzipitierte Dynamin A wurde abzentrifugiert, mit Nullsalzpuffer gewaschen und in Aufbewahrungspuffer gelöst. Nach Zugabe von 3 % Sucrose wurde die Proteinlösung aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proteinkonzentration betrug typischerweise 5-6 mg/ml, die Gesamtausbeute lag durchschnittlich bei ca. 70 mg Dynamin A aus ca. 80 g Zellen.

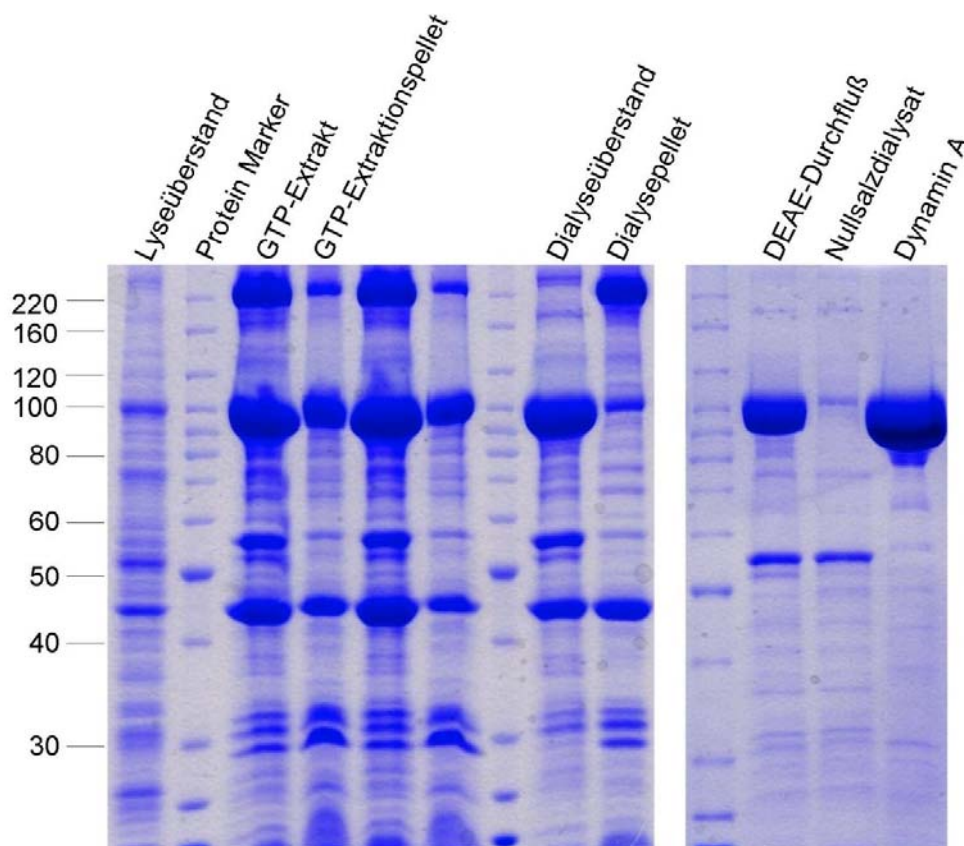


Abb. 3.1: Reinigung von Wildtyp-Dynamin A aus *D. discoideum*. Dynamin A (96 kD) wird zusammen mit Myosin II (220 kD) und Aktin (43 kD) pelletiert. Extraktion mit Mg^{2+} -GTP bewirkt Resolubilisierung von ca. 60 % des Dynamins (GTP-Extrakt). Dialyse gegen LP_{50} präzipitiert das gesamte Myosin und Teile des Aktins (Dialysepellet), das Dynamin verbleibt im Dialyseüberstand. Passage durch eine DEAE-Säule entfernt das restliche Aktin, Dynamin A ist im Durchfluß noch fast vollständig vorhanden. Die Dialyse gegen LP bewirkt Präzipitation des Dynamins, während die meisten Kontaminanten im Überstand zurückbleiben (Nullsalzdialysat). Das ausgefällte Dynamin A wird dann in Aufbewahrungspuffer gelöst. Die Reinheit des gelösten Proteins wurde anhand des Gels auf > 98 % geschätzt.

3.1.2 Reinigung von R828A-Dynamin A

Um die Auswirkung des Austausches R828A in der GTPase-Effektor-Domäne von Dynamin A auf die GTPase-Aktivität des Proteins zu untersuchen, wurde diese Punktmutation in das Wildtyp-Protein eingeführt (Klockow, 2001).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten erstmals größere Mengen von sehr sauberem R828A-Dynamin A gewonnen werden. Das Mutantenprotein kann nicht in gleicher Weise gereinigt werden wie das Wildtypprotein. Die Präzipitation durch Dialyse gegen

Nullsalzpuffer ist nur oberhalb einer bestimmten Dynamin-Konzentration erfolgreich. Aufgrund des deutlich niedrigeren Expressionsniveaus der Mutante wurde diese kritische Grenze stets unterschritten. Daher wurde nach der DEAE-Säule zur weiteren Reinigung eine Mono Q-Säule eingesetzt.

Nach Bindung an die Mono Q-Säule zeigte das Protein in verschiedenen Präparationen unterschiedliches Elutionsverhalten. Teils eluierte Dynamin A über einen großen Bereich, teils war in den Elutionsfraktionen des Salzgradienten kein Protein enthalten, sondern eluierte erst nach fortgesetztem Waschen mit Hochsalzpuffer (300 mM NaCl). Ausbeute und Reinheit des Proteins waren nicht verlässlich reproduzierbar, ebenso ließ sich das Protein nur in einer von sieben Präparationen auf Konzentrationen höher als 1.5 mg/ml einengen. Abbildung 3.2 zeigt die Elutionsfraktionen des besten Präparationsergebnisses. Die präparative Reinigung von R828A-Dynamin A lieferte in diesem Fall ca. 12 mg Protein aus 80 g Zellen in einer Reinheit von ungefähr 95 % (aus Coomassie-Gel abgeschätzt, Abbildung 3.2). Die Proteinkonzentration betrug 4 mg/ml, die Proteinlösung wurde nach Zusatz von 3 % Sucrose aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

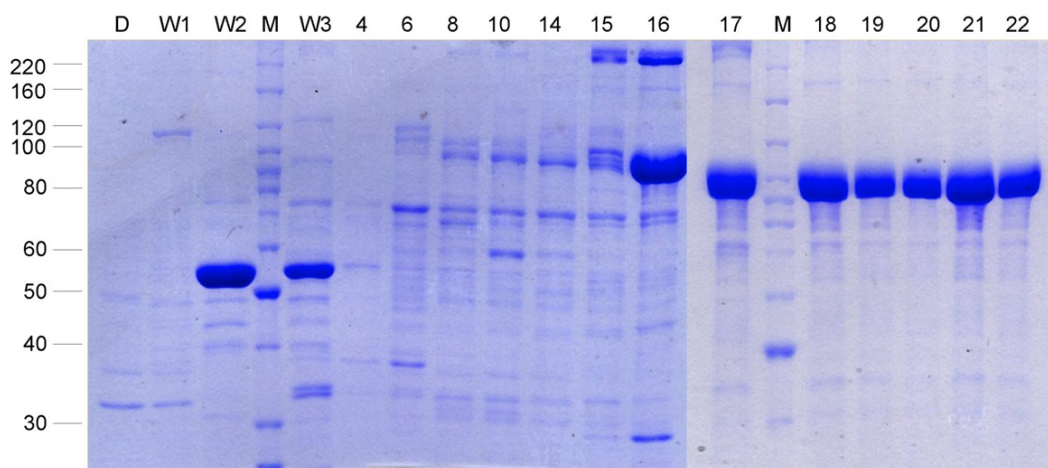


Abb. 3.2: Reinigung von R828A-Dynamin A mittels Mono Q-Chromatographie. Der Säulen-Durchfluß (D) enthält kein Dynamin A, die Hauptkontaminationen (ca. 55 kD) aus Coronin und Tubulin werden durch mehrere Waschschrte (W1-W3) entfernt. R828A-Dynamin A wird nicht durch den Salzgradienten eluiert (Fraktionen 4-15), sondern erst durch nachträgliches Spülen mit Hochsalzpuffer (300 mM NaCl) (Fraktionen 16-22). Die Reinheit wurde anhand des Gels auf > 95 % geschätzt. Der Proteinmarker ist mit M bezeichnet.

3.1.3 *Steady-state-Kinetik* von Wildtyp- und R828A-Dynamin A

Der GTP-Umsatz von Wildtyp-Dynamin A und von R828A-Dynamin A wurde mit Hilfe des PK/LDH-Assay (Abschnitt 2.3.12) unter quasi-stationären Bedingungen bestimmt. Hierbei wurden Konzentrationen von 1 bis 15 μM Protein bei konstanter GTP-Konzentration von 1 mM eingesetzt. Für das Wildtyp-Protein stieg der GTP-Umsatz pro Dynamin A-Molekül linear von 0.063 s^{-1} bei 1 μM Protein auf 0.34 s^{-1} bei 15 μM Protein an. Dagegen zeigte die Mutante zwar eine vergleichbare basale Aktivität von 0.048 s^{-1} bei 1 μM Protein, der GTP-Umsatz pro Dynamin A-Molekül blieb jedoch auch bei Erhöhung der Proteinkonzentration auf bis zu 15 μM konstant (Abbildung 3.3). Bei dem gezeigten Diagramm handelt es sich um Einzelmessungen. Speziell von R828A-Dynamin stand nur die begrenzte Proteinmenge aus der besten Präparation (Abschnitt 3.1.2) zur Verfügung,

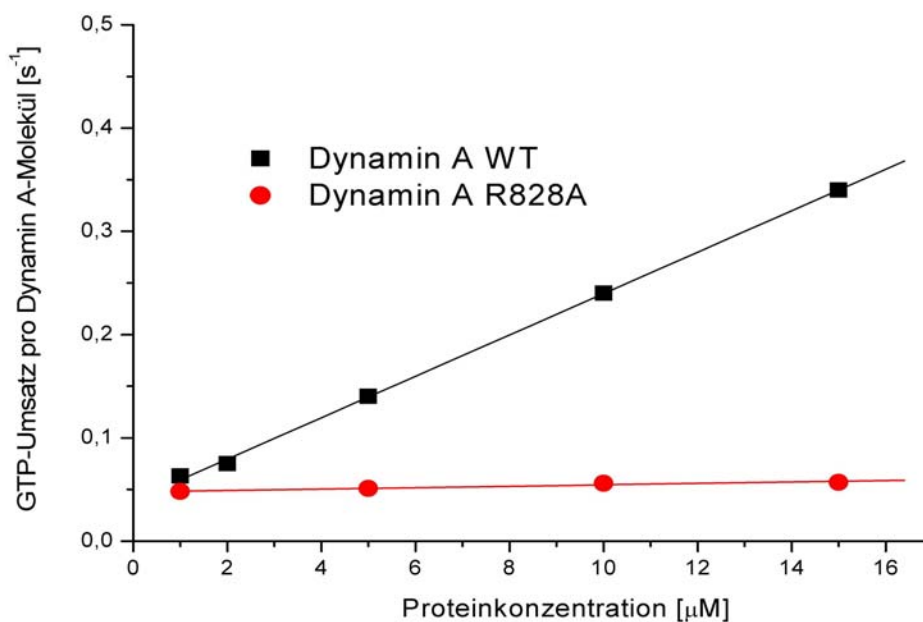


Abb. 3.3: *Steady-state-Kinetik* von Wildtyp- und R828A-Dynamin A. Die spezifische GTPase-Aktivität des Wildtypproteins steigt mit wachsender Proteinkonzentration an, dagegen bleibt die Aktivität des Mutantenproteins auch bei höheren Proteinkonzentration nahezu konstant.

da nur dieses Protein auf die erforderliche Endkonzentration von 3.0 mg/ml eingeeignet werden konnte. Dennoch können die hier vorgelegten Daten als Hinweis dafür gesehen werden, daß der kooperative Effekt, der im Wildtyp bei höherer Proteinkonzentration zu

einer Steigerung der GTPase-Aktivität führt, durch den Austausch R828A unterbunden wird.

3.1.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung von R828A-Dynamin A

Wildtyp-Dynamin A ist im nukleotidfreien Zustand vorwiegend zu Ringen und kurzen Stapeln von Ringen zusammengelagert (Klockow *et al.*, 2002). Diese Assemblierung von Dynamin A zu höhermolekularen Strukturen ist gekoppelt mit einer Stimulation der GTPase-Aktivität (Klockow, 2002), wie auch im Rahmen dieser Arbeit für das Wildtyp-Protein bestätigt werden konnte (Abschnitt 3.1.3). Das Fehlen des kooperativen Effekts bei R828A-Dynamin A führte zu der Überlegung, daß die Oligomerisierungseigenschaften des Mutantenproteins gestört sein könnten.

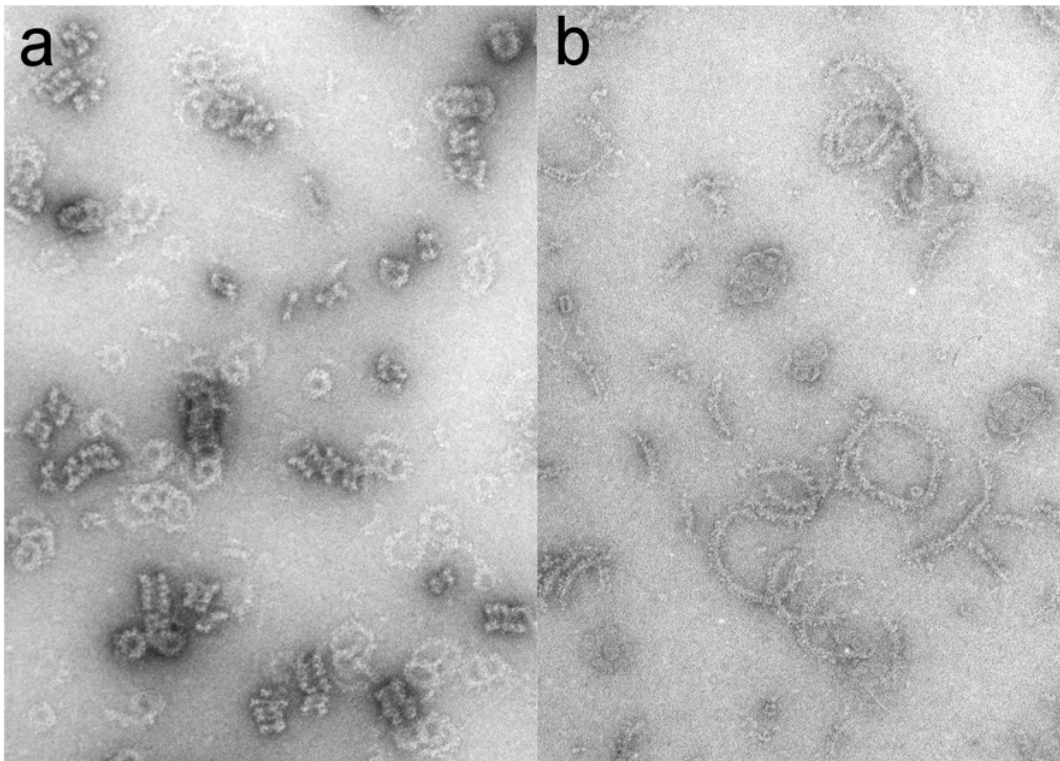


Abb. 3.4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von nukleotidfreiem Wildtyp- und R828A-Dynamin A. Die Aufnahmen zeigen 50000-fache Vergrößerung, 1 cm entspricht ca. 60 nm. Wildtyp-Dynamin A liegt vorwiegend in Form von Ringen und gestapelten Ringen vor (**a**). R828A-Dynamin A bildet hauptsächlich elongierte fadenförmige Strukturen (**b**).

In den hier durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen an nukleotidfreiem Dynamin A zeigte sich ein deutlich verändertes Oligomerisierungsverhalten der Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Während in den Aufnahmen des Wildtyp-Proteins die in der Literatur beschriebenen ring- und helixförmigen Strukturen sichtbar sind, zeigten sich für R828A-Dynamin A vorwiegend elongierte filamentöse Aggregate (Abbildung 3.4). Diese fadenförmigen Strukturen zeigten sich in allen Chargen des Mutantenproteins aus unterschiedlichen Präparationen. In keinem der Fälle konnten die Dynamin-typischen Stapel von Ringen beobachtet werden.

3.1.5 Co-Reinigung von *vaults* mit R828A-Dynamin A

Bei der Auswertung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen von R828A-Dynamin A fielen charakteristisch geformte Gebilde auf, die als sogenannte *vaults* (engl.: Gewölbe)

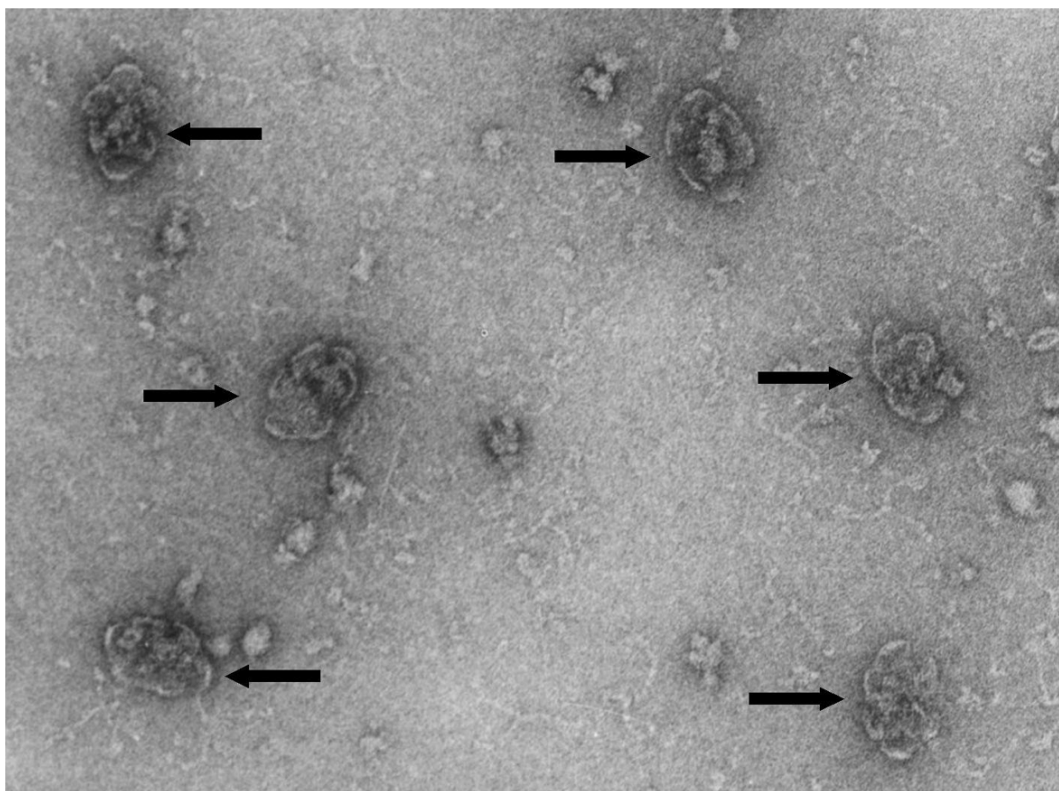


Abb. 3.5: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *vaults* in einer Präparation von Dynamin-R828A. *Vaults* sind mit Pfeilen markiert. Die Aufnahme zeigt 50000-fache Vergrößerung, 1 cm entspricht ca. 35 nm.

identifiziert werden konnten (Abbildung 3.5). *Vaults* sind zytoplasmatische Ribonukleoprotein-Partikel, die offenbar in allen eukaryontischen Organismen vorkommen (Kederhsa *et al.*, 1990).

In verschiedenen Präparationen von R828A-Dynamin A konnten *vaults* immunochemisch nachgewiesen werden. Dazu wurde ein Western-Blot mit Proteinproben aus verschiedenen Präparationen von Wildtyp- und Mutanten-Dynamin A durchgeführt. Hierzu wurde der gegen *Dictyostelium-vaults* gerichtete Erstantikörper „Bob“ verwendet, der freundlicherweise von Prof. Dr. Leonard Rome, University of California, San Francisco, USA, zur Verfügung gestellt worden war (Vasu und Rome, 1995). In allen drei getesteten Proteinpräparationen von R828A-Dynamin A waren *vaults* vorhanden, dagegen enthielt keine der getesteten Wildtypproben *vaults* (Abbildung 3.6).

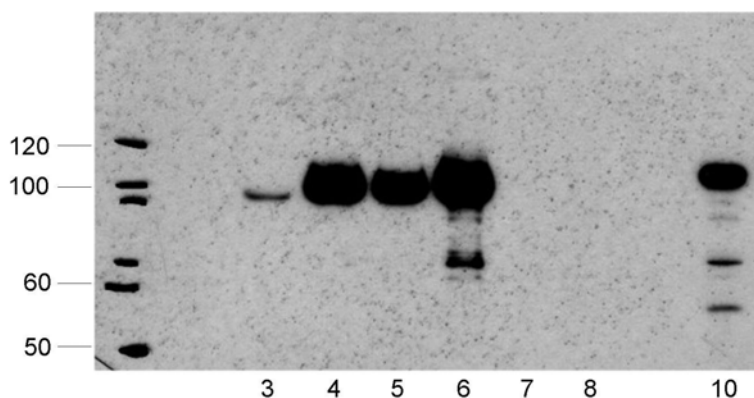


Abb. 3.6: Western-Blot zum Nachweis von *vaults* in Präparationen von R828A-Dynamin A. Der *vault*-spezifische Antikörper Bob zeigt lediglich mit Proben von R828A-Dynamin A Immunoreaktivität (3-6). Die Spuren mit Wildtypprotein zeigen kein Signal (7-8). Spur 10 zeigt ORF⁺-Gesamtzelllysate als Positivkontrolle.

3.2 Röntgenstrukturanalyse des Fusionsproteins MyD1

3.2.1 Konstruktion des Expressionsplasmids pM765-Dyn I

Für die Konstruktion des Expressionsvektors wurde mittels PCR ein DNA-Fragment isoliert und vervielfältigt, das für die ersten 304 Aminosäuren der GTPase-Domäne von Dynamamin 1 kodiert. Als Matrize hierfür diente DNA aus Insektenzellen, die mit einem Baculovirus-Dynamamin 1-Konstrukt transfiziert waren (Niemann, 2002). Ca. 5 Milligramm Insektenzellen wurden in 50 μ l TE-Puffer für 10 min auf 65 °C erhitzt und 1 μ l dieser Lösung wurde in der nachfolgenden PCR-Reaktion mit den Primern TR-02 und TR-03 eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde in den pCR[®]2.1-TOPO-Vektor kloniert und das resultierende Plasmid wurde in *E. coli* amplifiziert. Das Dynamamin-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *XbaI* aus dem Vektor herausgeschnitten und in den ebenfalls mit *XhoI/XbaI* linearisierten Vektor pM765mcs ligiert. Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* transformiert, positive Klone wurden durch Restriktionsanalyse identifiziert und in *E. coli* vervielfältigt. Die Transformation von *Dictyostelium* ORF⁺-Zellen mit dem Plasmid und die anschließende Selektion positiver Klone wurde wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben durchgeführt.

3.2.1 Reinigung des Fusionsproteins MyD1

Die Reinigung des Myosin II-Dynamamin 1-GTPase-Fusionsproteins (MyD1) folgte weitgehend dem für Myosin-Motordomänen beschriebenen Protokoll (Manstein und Hunt, 1995). Das Fusionsprotein wurde zusammen mit Aktin und Myosin pelletiert und durch Homogenisation mit 10 mM ATP wieder resolubilisiert. Das Fusionsprotein bildete ca. 80 % des Gesamtproteingehaltes des ATP-Extraktes. Die Proteinlösung wurde auf eine Ni-NTA-Säule gegeben und nach gründlichem Waschen mit einem Imidazolgradienten eluiert (Abbildung 3.7).

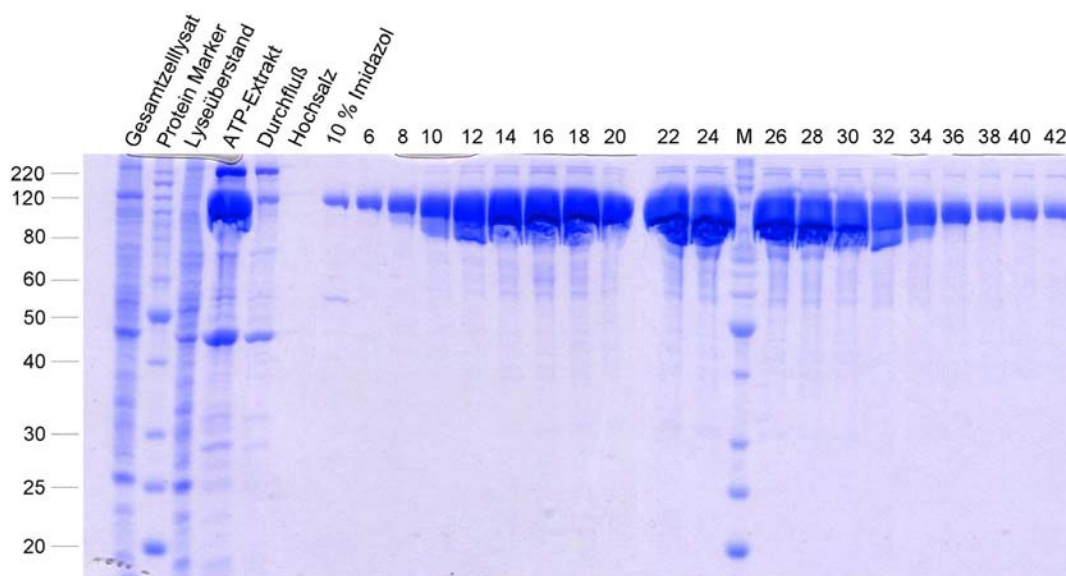


Abb. 3.7: Reinigung des Myosin-Dynamin-Fusionsproteins MyD1. Das Fusionsprotein ist auf dem Coomassie-Gel als Bande bei 120 kD erkennbar. Die Fraktionen der NiNTA-Säule mit dem höchsten Proteingehalt (Fraktionen 12-32) wurden vereinigt und über einen Gelfiltrationsschritt von Kontaminationen bereinigt.

Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden vereinigt und auf ca. 6 mg/ml konzentriert. Die konzentrierte Proteinlösung wurde zur Abtrennung der höhermolekularen Verunreinigungen auf eine mit Aufbewahrungspuffer äquilibrierte Superdex 200 Gelfiltrationssäule gegeben. Der Großteil des Proteins eluierte als Monomer bei ca. 120 kD, ein kleiner Teil befand sich im Ausschlußvolumen. Die Peakfraktionen wurden auf eine Proteinkonzentration von 18 mg/ml eingengt und nach Zusatz von 3 % Sucrose in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Ausbeute lag bei ca. 100 mg Fusionsprotein aus 80 g Zellen, die Reinheit wurde anhand des Coomassie-Gels (Daten nicht gezeigt) auf > 96 % geschätzt.

3.2.2 Kristallisation des Fusionsproteins

Die Motordomäne von *Dictyostelium* Myosin II wurde bereits mehrfach mit Polyethylenglykol (PEG) als Fällungsmittel erfolgreich kristallisiert (Fisher *et al.*, 1995; Gulick *et al.*, 1997; Bauer *et al.*, 2000). Unter der Annahme, daß der Myosinteil des Fusionsproteins MyD1 wesentlich an der Kristallpackung beteiligt sein würde, wurden drei verschiedene PEGs (10-12 % PEG8000, 11-13 % PGM5000 und 12-14 % PEG4000) als

Fällungsmittel zur Kristallisation von MyD1 getestet. Gleichzeitig wurde die Konzentration von NaCl im Kristallisationspuffer variiert (140, 170, 200 mM). pH-Wert, Konzentrationen weiterer Additive in der Kristallisationslösung und Umgebungstemperatur wurden konstant gehalten. Diese Ansätze lieferten bei 4 °C im Hängetrophenverfahren Kristalle in Konzentrationsbereichen von 10-12 % PEG8000 und 140-170 mM NaCl. Die Reservoirösungen enthielten desweiteren 50 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 2 % 2-Methylpentan-1,3-diol (MPD) und 5 mM DTT. Die Tropfen wurden 1:1 aus

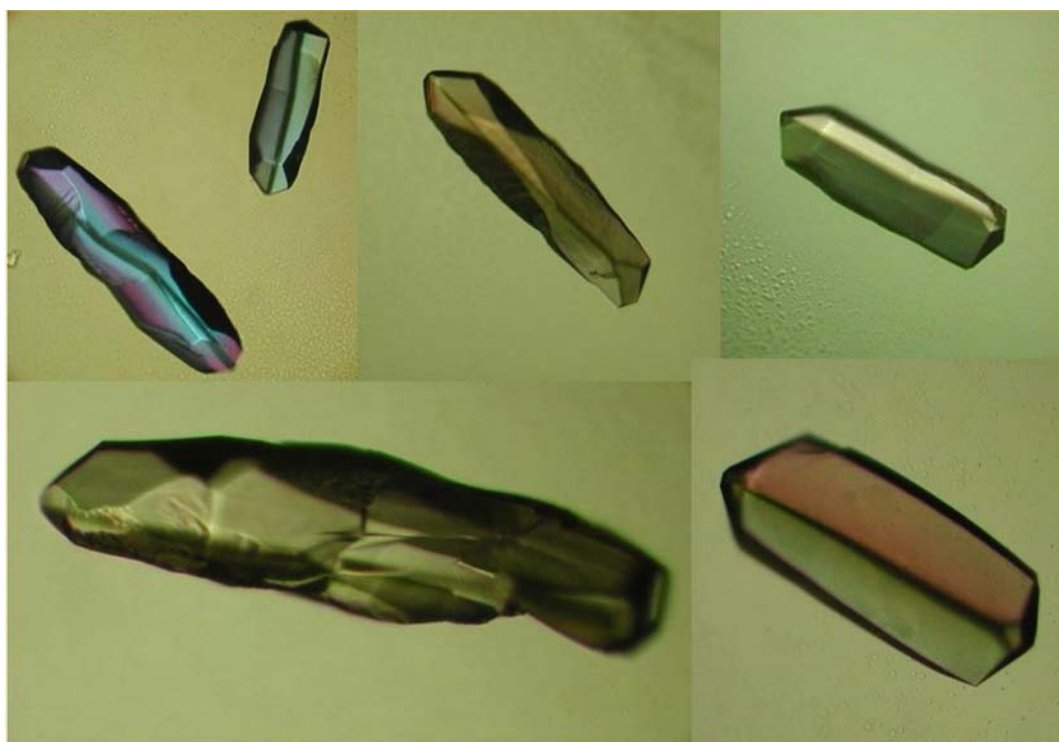


Abb. 3.8: Kristalle der Myosin-Dynamin-Fusion (MyD1). Die Kristalle wuchsen typischerweise innerhalb von 3-5 Tagen auf eine maximale Größe von ca. 600 x 120 x 120 μm .

Reservoirlösung und Proteinlösung (18 mg/ml MyD1 in Aufbewahrungspuffer) gemischt. In 20 % der Tropfen bildeten sich innerhalb von 3-5 Tagen typischerweise 1-2 Kristalle (Abbildung 3.8). Um Tropfen, in denen sich keine Kristalle geformt hatten, zur Kristallbildung anzuregen, wurde *micro-seeding* (Thaller *et al.*, 1985) mit feinerzrömmerten Kristallen angewendet. Die dabei entstandenen Kristalle zeigten jedoch deutlich schlechtere Beugungseigenschaften als spontan gewachsene Kristalle. In Gegenwart von 2 mM Mg²⁺-ADP bildeten sich generell keine Kristalle.

3.2.3 Datensammlung und Datenreduktion

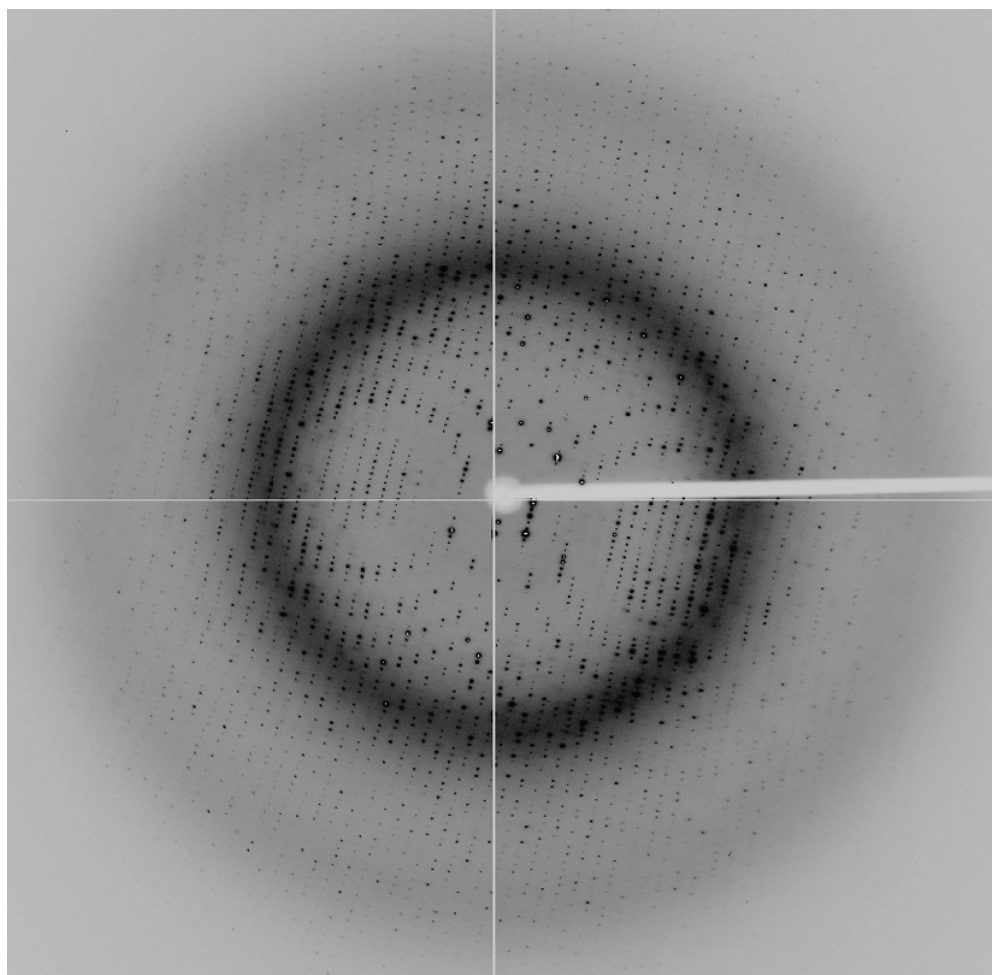


Abb. 3.9: Beugungsbild eines nativen MyD1-Kristalls.

Alle zur Strukturlösung verwendeten Beugungsdaten wurden im Drehkristallverfahren bei tiefen Temperaturen gemessen. Die Kristalle wurden dabei wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben behandelt.

Am Meßplatz ID14-4 des ESRF in Grenoble wurden mit Synchrotronstrahlung der Wellenlänge 0.93927 \AA Beugungsdaten von zwei verschiedenen nativen Kristallen aufgenommen. Hierzu wurden die Kristalle bei einem Abstand von 160 mm bzw. 180 mm zwischen Kristallposition und Detektoroberfläche in Einzelschritten von 0.5° bzw. 0.25° um insgesamt 90° rotiert. Die Belichtungszeit pro Rotationsaufnahme betrug jeweils 1 s. Um Beugungsdaten aus den Bereichen sehr niedriger Auflösung nachzusammeln, wurde von

jedem der beiden Kristalle ein zweiter Datensatz gemessen bei einem größeren Kristall-zu-Detektor-Abstand von 200 mm bzw. 300 mm und einem Drehbereich von 1.0° pro Aufnahme. Die Beugungsdaten beider Kristalle wurden zu einem Datensatz kombiniert, der 99.1 % aller nicht-redundanten Reflexe im Auflösungsbereich von 20-1.9 Å enthält (Tabelle 3.1).

Auflösung [Å]	Anzahl der Reflexe		Vollständigkeit [%]	R-symm [%]	I/ σ (I)
	beobachtet	unabhängig			
∞ - 20.0	0	0	0.0	-	-
20.0 - 15.0	1566	139	100.0	9.4	26.4
15.0 - 10.0	6757	505	100.0	7.7	28.6
10.0 - 6.0	46208	2486	100.0	8.2	30.3
6.0 - 5.0	45263	2241	100.0	8.9	29.2
5.0 - 4.0	102107	5010	100.0	8.9	28.9
4.0 - 3.0	288885	13848	100.0	10.1	26.0
3.0 - 2.7	151869	8817	100.0	10.5	23.0
2.7 - 2.5	108340	8404	100.0	11.0	18.7
2.5 - 2.2	176877	19057	99.9	11.7	15.2
2.2 - 2.0	182379	19712	99.9	13.7	12.6
2.0 - 1.9	104933	12446	94.9	17.1	9.6
Total	1215184	92665	99.1	9.8	18.1

Tab. 3.1: Güte des nativen Datensatzes von MyD1. *Vollständigkeit* bedeutet, wieviel Prozent aller symmetrie-unabhängigen Reflexe aus einem Auflösungsbereich tatsächlich gemessen wurden. *R-symm* ist gemäß Gleichung 2.4.1 definiert. *I/ σ (I)* gibt das mittlere Intensität-zu-Untergrund-Verhältnis der beobachteten Reflexe an.

Ein Methylquecksilberchlorid-Derivatkristall (Abschnitt 2.4.2) wurde mit CuK_α -Strahlung eines konventionellen Röntgenerators gemessen. Bei einem Kristall-zu-Detektor-Abstand von 200 mm wurde der Kristall in Einzelschritten von 0.5° um insgesamt 200° rotiert. Die Belichtungszeit pro Rotationsaufnahme betrug 700 s. Um überbelichtete Reflexe

aus den Bereichen niedriger Auflösung nachzusammeln, wurde ein zweiter Datensatz mit einer zweifach geringeren Belichtungsdauer und einem größeren Kristall-zu-Detektor-Abstand von 260 mm aufgenommen. Ausgehend von der gleichen Startorientierung wurde der Kristall in 1°-Schritten insgesamt um 200° gedreht. Die Beugungsdaten wurden zu einem Derivatdatensatz kombiniert, der 98.5 % aller symmetrie-unabhängigen Reflexe im Auflösungsbereich von 20-2.25 Å enthält (Tabelle 3.2).

Auflösung [Å]	Anzahl der Reflexe		Vollständigkeit [%]	R-symm [%]	I/σ(I)
	beobachtet	unabhängig			
∞ – 20.0	0	0	0.0	-	-
20.0 – 18.0	114	29	80.6	5.3	18.9
18.0 – 16.0	237	56	98.2	4.8	19.6
16.0 – 14.0	359	86	97.7	5.3	19.6
14.0 – 12.0	713	162	98.2	6.0	18.8
12.0 – 10.0	3500	299	100.0	5.4	33.3
10.0 – 6.0	30656	2493	100.0	5.7	34.7
6.0 – 5.0	28438	2251	99.8	6.0	35.9
5.0 – 4.0	63784	5008	99.7	5.3	40.4
4.0 – 3.0	126550	13772	99.2	6.4	27.4
3.0 – 2.7	71022	8757	98.7	10.7	17.3
2.7 – 2.6	31034	3841	98.9	13.8	13.9
2.6 – 2.5	36377	4499	98.8	15.7	12.2
2.5 – 2.3	92135	11381	98.0	20.0	9.8
2.3 – 2.25	27710	3447	96.0	27.7	7.3
Total	512629	56081	98.5	7.5	20.7

Tab. 3.2: Güte des Derivat-Datensatzes von MyD1. *Vollständigkeit* bedeutet, wieviel Prozent aller symmetrie-unabhängigen Reflexe aus einem Auflösungsbereich tatsächlich gemessen wurden. *R-symm* ist gemäß Gleichung 2.4.1 definiert. *I/σ(I)* gibt das mittlere Intensität-zu-Untergrund-Verhältnis der beobachteten Reflexe an.

Sowohl native als auch derivatisierte Kristalle konnten der orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$ zugeordnet werden und enthalten 1 Molekül in der asymmetrischen Einheit des Kristalls. Die Schraubenachsen ließen sich anhand der für die Raumgruppe charakteristischen systematischen Auslöschungen verifizieren, die sich in entsprechenden Fehlstellen in der Liste der indizierten Reflexe widerspiegeln. Die Abmessungen der rechteckigen Einheitszelle sind in Tabelle 3.3 aufgelistet.

	a	b	c	α	β	γ
nativ	57.42	126.99	160.81	90.0	90.0	90.0
Derivat	57.51	127.08	161.03	90.0	90.0	90.0

Tab. 3.3: Parameter der Einheitszelle von nativen und derivatisierten MyD1-Kristallen. Die Kristalle gehören der orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$ an. Die Zellabmessungen sind in Å, die Winkel in ° angegeben.

3.2.4 Lösung und Verfeinerung der Kristallstruktur von MyD1

Ursprünglich sollte die Struktur des MyD1-Fusionsproteins durch Molekularen Ersatz (siehe Abschnitt 2.4.6) mit einer bestehenden Struktur der Motordomäne von Myosin II gelöst werden. Myosin stellt 73 % des Fusionsproteins, so daß die Phaseninformation aus einem korrekt in die Einheitszelle eingepaßten Myosin-Suchmodell die Berechnung einer Ausgangselektronendichte für das gesamte Fusionsprotein ermöglichen sollte. Als Suchmodell wurden 3 verschiedene Strukturmodelle der Motordomäne von Myosin II (PDB-Einträge 1JX2 und 1JWY von Niemann *et al.*, 2002; PDB-Eintrag 1FMV von Bauer *et al.*, 2000) eingesetzt, die jeweils ohne assoziierte Wassermoleküle verwendet wurden und teilweise um größere Schlaufenbereiche oder um die hochbewegliche Konverter-Region verkürzt wurden. Keines der Suchmodelle lieferte Lösungen in der Rotations- und Translationssuche.

Die Phasenwinkel für die Strukturlösung des MyD1-Fusionsproteins konnten aus den Differenzen der Strukturfaktoramplituden eines nativen MyD1-Beugungsdatensatzes und eines Methylquecksilberchlorid-Derivatdatensatzes unter Berücksichtigung der anormalen

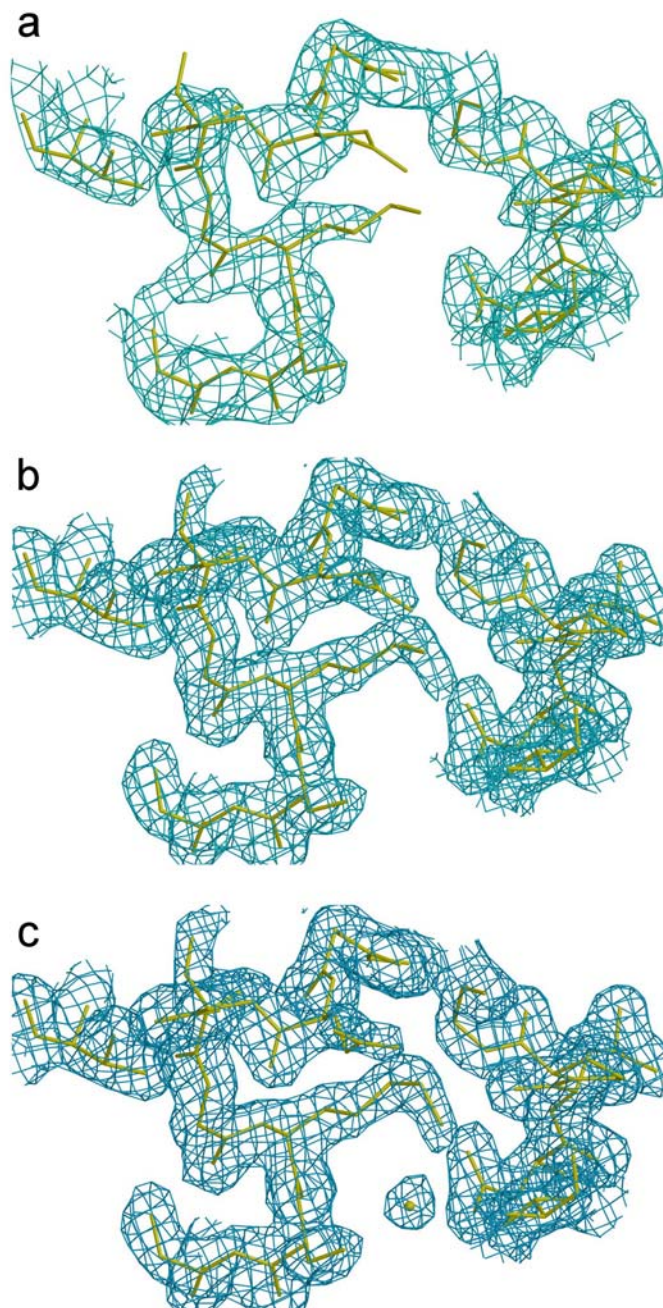


Abb. 3.10: Elektronendichtekarten im Verlauf der Verfeinerung. Die Ausschnitte zeigen jeweils die 1σ über dem Untergrundrauschen konturierte Elektronendichte aus einer $(2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}})$ -Fouriersynthese. In gelb ist das aktuelle Strukturmodell überlagert, wobei die Atomlagen an den Knickpunkten der Stäbe angenommen werden.

(a) Ausgangsdichte aus den mit SIRAS ermittelten Phasenwinkeln.
(b) $(2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}})$ -Elektronendichte und Strukturmodell nach dem 5. Verfeinerungszyklus.
(c) $(2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}})$ -Elektronendichte und Strukturmodell nach dem letzten Verfeinerungszyklus.

Streubeiträge berechnet werden (SIRAS, siehe Abschnitt 2.4.6). Durch SAD- und SIR-Differenzpatterson-Rechnungen konnten 6 Bindungsstellen für Methylquecksilberchlorid

eindeutig identifiziert werden, die zu einem hohen Prozentsatz in der Gesamtheit der MyD1-Moleküle des Kristalls mit Schweratomen besetzt waren. Ausgehend von dem aus diesen Schweratomlagen berechneten Phasensatz konnte eine erste Elektronendichtekarte erstellt werden, die es erlaubte, 90 % aller Nicht-Wasserstoffatome des MyD1-Fusionsproteins in der Einheitszelle des Kristalls zu positionieren.

Dieses Startmodell wurde in insgesamt 16 Minimierungszyklen verfeinert. In jedem Durchgang wurden Elektronendichten aus $(2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}})$ - und $(F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}})$ -Fouriersynthesen berechnet, wobei F_{obs} die gemessenen Strukturfaktoramplituden darstellen und F_{calc} die aus dem aktuellen Modell berechneten Strukturfaktoramplituden, und dem aktuellen Strukturmodell überlagert. Mit Hilfe eines Computergraphiksystems wurden Veränderungen und Erweiterungen des Strukturmodells gemäß der Elektronendichteverteilung vorgenommen, die in automatischen Verfeinerungszyklen optimiert wurden. Durch die Verfeinerungsprozedur konnte der kristallographische R-Faktor (Gleichung 2.4.3) und der freie R-Faktor (Abschnitt 2.4.7) für den Auflösungsbereich von 20.0 Å bis 1.9 Å von anfänglichen 48.3 % bzw. 47.9 % auf Endwerte von 18.5 % bzw. 22.4 % reduziert werden. Das Endmodell (Abbildung 3.11) enthält 8520 (Nicht-Wasserstoff-)Atome des MyD1-Fusionsproteins, die den Aminosäureresten 2-765 von Myosin II aus *D. discoideum*, 6 Resten des *Linker*-Bereichs der Fusion und 6-304 aus Dynamin 1 entsprechen, sowie 754

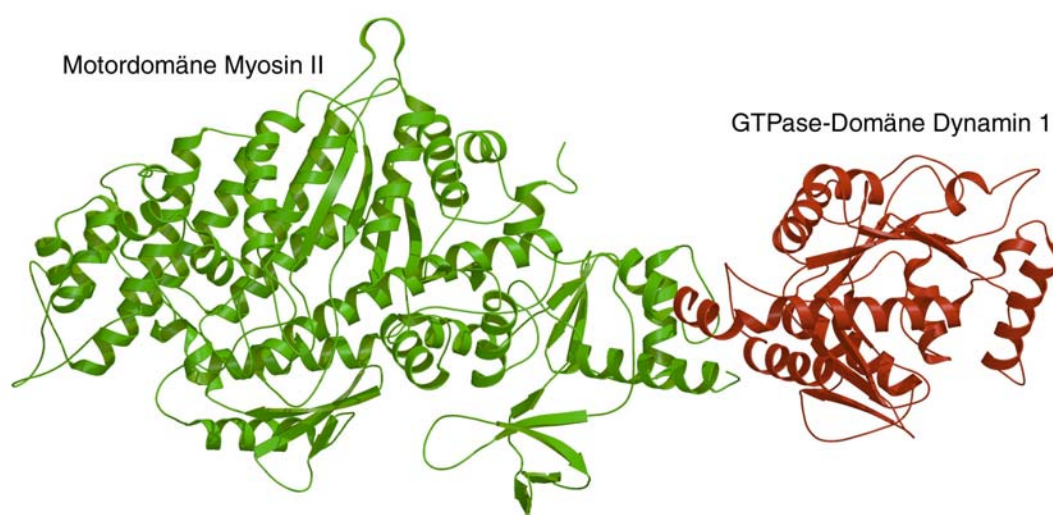


Abb. 3.11: Faltung des MyD1-Fusionsproteins aus dem Strukturmodell des letzten Verfeinerungszyklus. Myosin und die sichtbaren Bereiche des Linkers sind grün dargestellt, die GTPase-Domäne von Dynamin 1 in rot.

	Anzahl Atome (ohne H)	mittlerer B-Faktor [Å²]
Myosin	6191	29.8
Dynamin1	2329	33.7
alternative Positionen	104	29.3
Wassermoleküle	754	37.4

Tabelle 3.4: Bestandteile des verfeinerten Strukturmodells und deren mittlere Temperaturfaktoren.

Wassermoleküle. Alle Atomlagen wurden als vollständig besetzt verfeinert, bis auf die Seitenketten von insgesamt 23 Aminosäureresten, die als Zweifachkonformationen mit halber Besetzungszahl modelliert wurden. Der mittlere Koordinatenfehler wurde zu 0.19 Å bzw. 0.07 Å abgeschätzt, je nachdem ob der Fehler nach Luzzati (1952) oder nach Read (1986) bestimmt wurde.

Tabelle 3.4 listet die mittleren Temperaturfaktoren für verschiedene Anteile des MyD1-Strukturmodells. Der sogenannte *B-Faktor* oder Temperaturfaktor trägt der Ortsunschärfe eines Atoms im Strukturmodell Rechnung, die sich unter anderem aus thermischen Gitterschwingungen, Fehlordnungen des Kristalls und der Flexibilität eines Molekülbereiches ergibt. Je größer der einem Atom zugeordnete B-Faktor, um so beweglicher ist dieses Atom. Dies spiegelt sich auch darin wider, daß die Elektronendichte in Bereichen mit höheren B-Faktoren weniger stark aus dem Untergrundrauschen heraus gehoben ist und breiter verschmiert ist als in Bereichen mit niedrigeren B-Faktoren.

In Abbildung 3.12 ist der Verlauf der Temperaturfaktoren für die Proteinhauptketten gezeigt. Erwartungsgemäß zeigen sich in Bereichen des Moleküls, die nicht in Sekundärstrukturelementen stabilisiert sind, höhere Temperaturfaktoren als innerhalb von β -Faltblatt- oder α -Helix-Regionen. Die relativ niedrigen Durchschnittswerte für die Temperaturfaktoren (Tabelle 3.4) spiegeln wider, daß dem weitaus größten Teil der Strukturmodelle wohldefinierte und klar vom Untergrundrauschen abgehobene Elektronendichte zugrunde liegt. Nur in sehr wenigen Bereichen, die in Abbildung 3.12 angeschrieben sind, liegen die zugeordneten B-Werte über 50 Å².

Der Ramachandran-Plot (Ramakrishnan und Ramachandran, 1965) der verfeinerten Strukturen zeigt (Abbildung 3.13), daß die Faltung der Hauptkette in beiden Proteinmodellen sehr gut erlaubten Konformationen entspricht. 98.9 % und 99.2 % der Nicht-Glycin-Reste der Myosin II-Motordomäne bzw. der Dynamin 1-GTPase-Domäne nehmen Kombinationen von dihedralen Winkeln an, die typisch sind für die Faltung einer Polypeptidkette und im Ramachandran-Plot in den sogenannten *erlaubten Bereichen* liegen. Nur insgesamt 10 Nicht-Glycin-Reste zeigen dihedrale Winkel, die in Proteinen selten oder gar nicht beobachtet werden. Alle 10 Reste liegen in sehr beweglichen Schlaufenregionen der Moleküle mit sehr schwach ausgeprägter Elektronendichte. Die Hauptkettenkonformation dieser Reste kann als Artefakt der automatischen Verfeinerung angesehen werden.

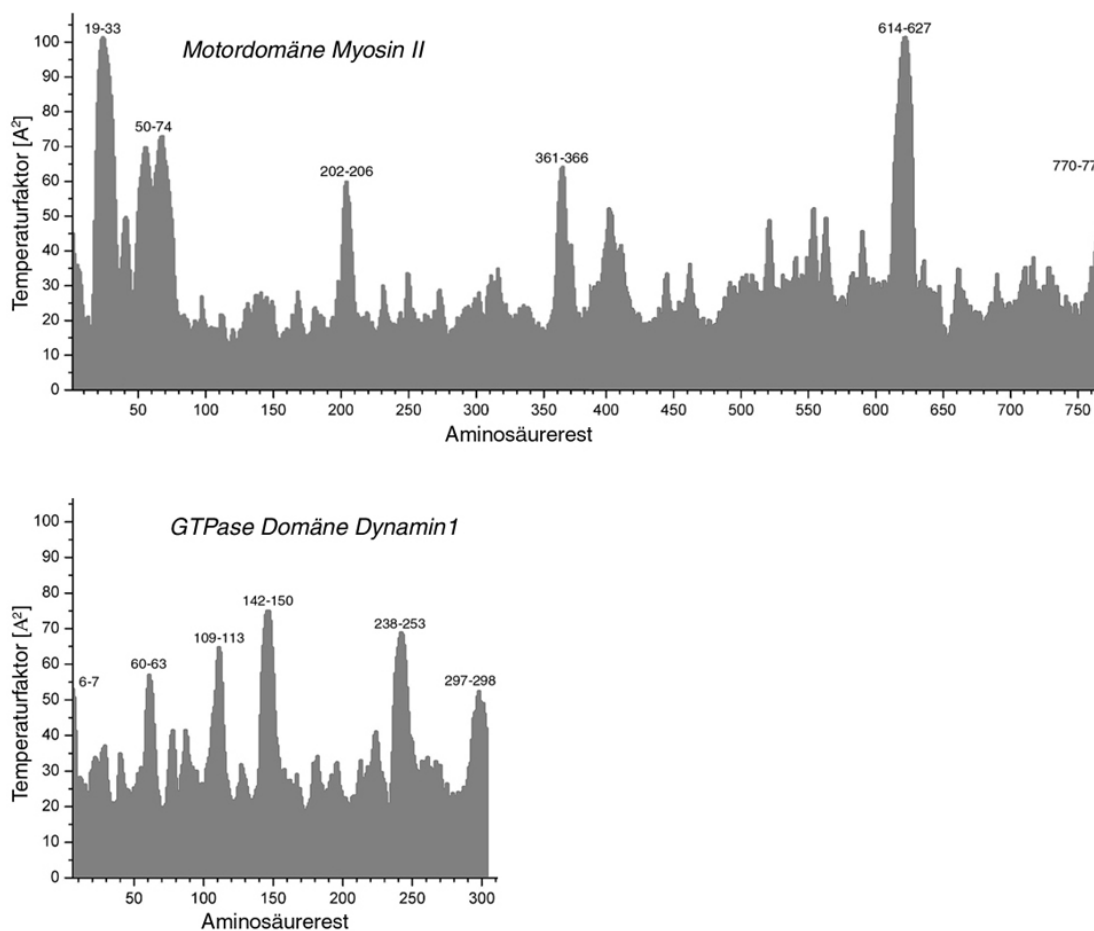


Abb. 3.12: Verlauf der Temperaturfaktoren für das Kettenrückgrat der Motordomäne von Myosin II und der GTPase Domäne von Dynamin 1. Für jeden Aminosäurerest sind die B-Faktoren über die Hauptkettenatome N, C α , C und O gemittelt. Für Bereiche mit B-Faktoren über 50 Å² sind die entsprechenden Restnummern im Histogramm angegeben.

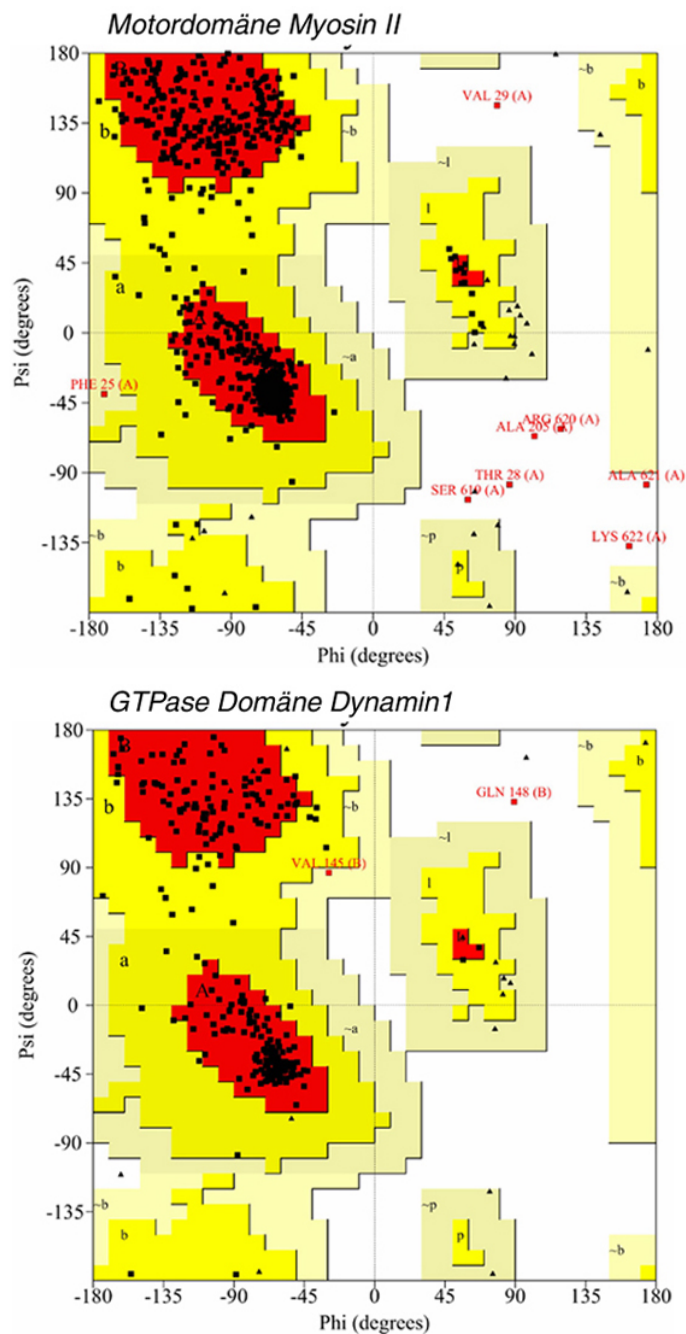


Abb. 3.13: Ramachandran-Plot (generiert mit PROCHECK, Laskowski, 1993) für die Strukturmodelle der Motordomäne von Myosin II (oben) und der GTPase-Domäne von Dynamin 1 (unten) nach dem letzten Verfeinerungszyklus. Die auftretenden Kombinationen der dihedralen Winkel (Φ , Ψ) der Hauptkette sind für Glycin-Reste durch Dreiecke dargestellt und für alle übrigen Reste durch Quadrate symbolisiert. Stereochemisch erlaubte Bereiche sind grau schattiert, dabei sind Regionen, deren Winkelkombinationen die Sekundärstrukturelemente β -Faltblatt, rechtshändige α -Helix oder linkshändige α -Helix beschreiben, dunkelgrau hervorgehoben.

3.3 Kristallstruktur der GTPase-Domäne von Dynamin 1

3.3.1 Globale räumliche Struktur

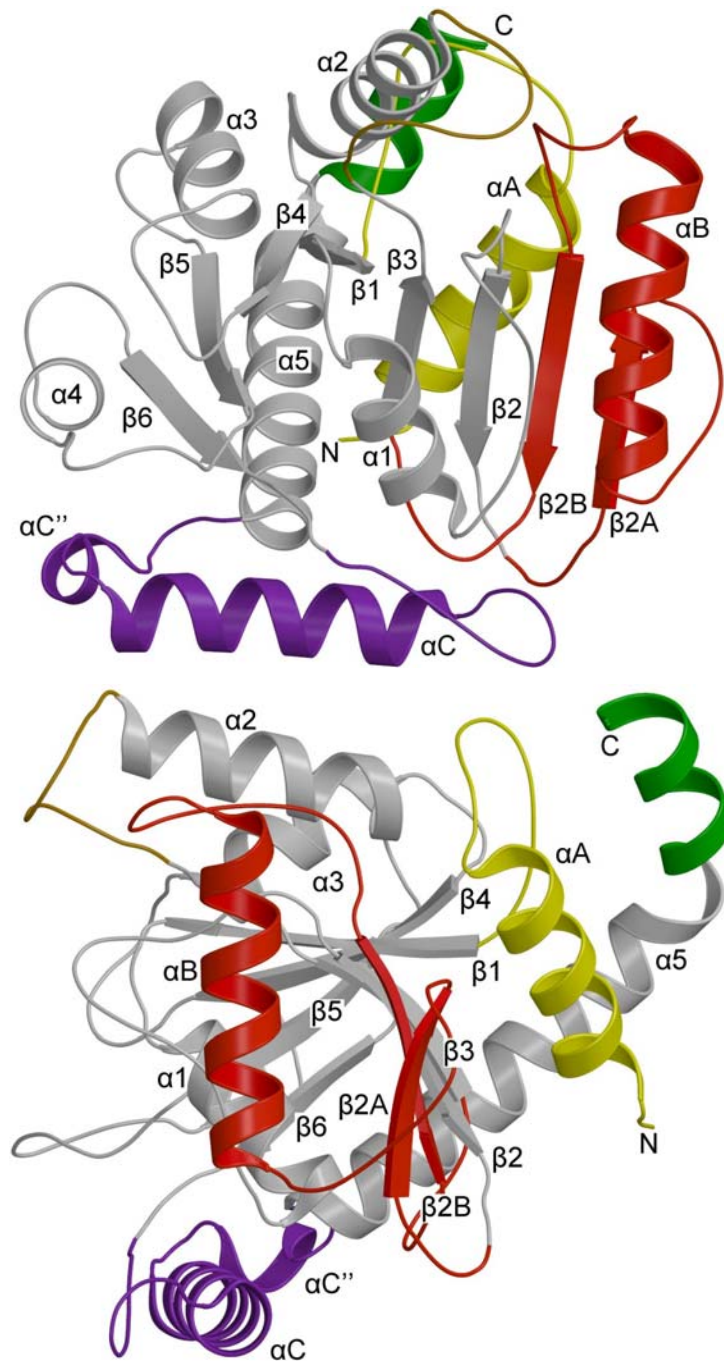


Abb. 3.14: Faltung der Dynamin 1-GTPase-Domäne in zwei verschiedenen Orientierungen. Die Blickrichtung der unteren Abbildung ist relativ zur oberen Abbildung um 90° um die Senkrechte gedreht. Sekundärstrukturelemente, die der Ras-Faltung entsprechen, sind grau gefärbt, Erweiterungen der Ras-Faltung sind farbig hervorgehoben.

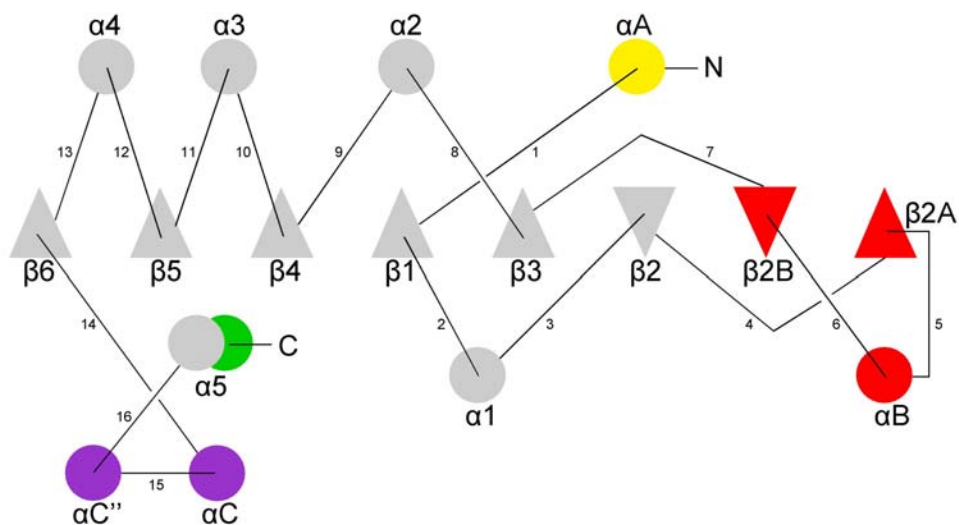


Abb. 3.15: Topologie der Dynamin 1-GTPase-Domäne. Die Farbkodierung entspricht derjenigen in Abbildung 3.14. Dreiecke, die mit der Spitze nach oben zeigen, symbolisieren aufsteigende β -Stränge, solche, deren Spitze nach unten zeigt, absteigende. Die Orientierung entspricht der Aufsicht auf das zentrale Faltblatt, so daß aufsteigende Stränge auf den Betrachter zu weisen. α -Helices sind als Kreise dargestellt. Schlaufenregionen sind als Striche dargestellt die mit den Nummern der jeweiligen Schlaufen versehen sind.

Die GTPase-Domäne von Dynamin 1 faltet sich aus einer durchgehenden 304 Aminosäuren langen Polypeptidkette. Den Kern des Proteins bildet ein achtsträngiges β -Faltblatt aus sechs parallelen und zwei antiparallelen Strängen. Dieses zentrale Faltblatt ist von sieben Helices und 2 Einzelhelixwindungen umgeben (Abbildungen 3.14 und 3.15).

Die Faltung der GTPase-Domäne von Dynamin 1 stellt eine Erweiterung der klassischen G-Domänen-Faltung (Kjeldgaard *et al.*, 1996) dar, die unter anderem in Ras, dem prototypischen Vertreter der GTPasen-Superfamilie, vorkommt. Die Faltungselemente, die Ras und Dynamin 1 gemeinsam sind, sind räumlich sehr ähnlich angeordnet. Dies zeigt sich in einer Überlagerung des α -Kettenverlaufs der beiden Proteine (Abbildung 3.16). In Ras umgeben fünf α -Helices ein sechssträngiges zentrales β -Faltblatt (Pai *et al.*, 1989). Das zentrale Faltblatt der Dynamin 1-GTPase-Domäne ist gegenüber Ras um zwei Stränge ($\beta 2A$ und $\beta 2B$) erweitert. $\beta 2A$ ist parallel zu $\beta 2$, $\beta 2B$ ist parallel zu allen anderen Strängen des Faltblatts (Abbildungen 3.14 und 3.16). Desweiteren besitzt die Dynamin 1-GTPase-Domäne eine zusätzliche Einzelwindungshelix, sowie vier zusätzliche α -Helices, von denen eine die C-terminale Helix $\alpha 5$ verlängert. Durch ein innerhalb der Dynamin-Familie totalkonserviertes Prolin ist das letzte Drittel von $\alpha 5$ abgelenkt.

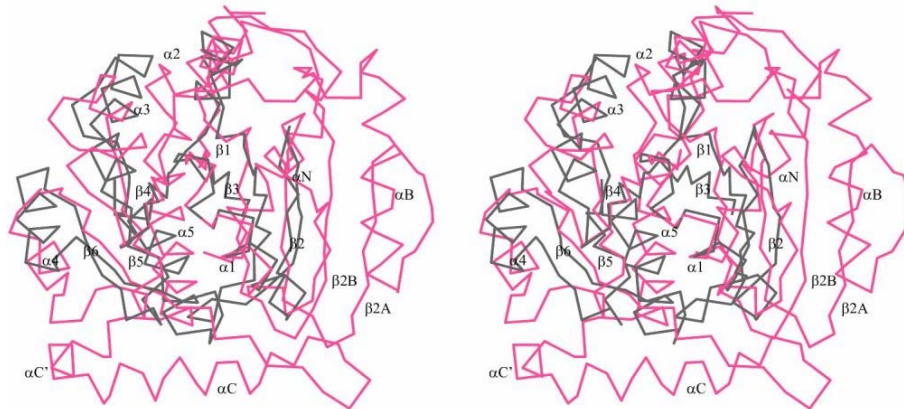


Abb. 3.16: Stereoabbildung des α -Kettenverlaufs der GTPase-Domäne von Dynamin 1 (magenta) im Vergleich zu Ras (grau). Zur Überlagerung wurden die Abstände von 85 strukturell äquivalenten α -Atome nach der Methode der kleinsten Quadrate minimiert. Die mittlere Abweichung beträgt 1.91 Å. Als Strukturmodell für Ras diente hierbei die mit GDP ligandierter Form (Eintragscode 1Q21 der Brookhaven Proteindatenbank).

Der abgeknickte Teil von Helix $\alpha 5$ interagiert über hydrophobe Seitenketten mit der N-terminalen Helix αA (Abbildung 3.14). Dabei ergibt die Anordnung der Seitenketten innerhalb der Helices ein Reißverschlussähnliches Wechselwirkungsmuster (Abbildung 3.17). Beide Helices bilden eine hydrophobe Furche, die teilweise durch die C-terminale Helix der Motordomäne von Myosin II besetzt ist.

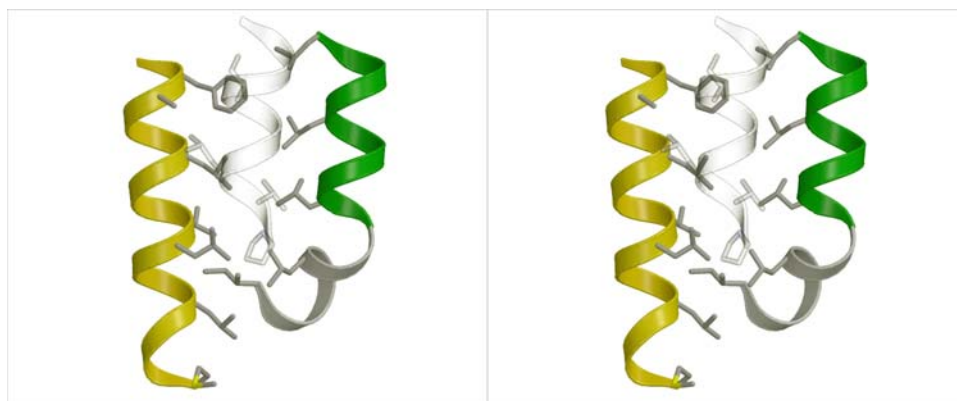


Abb. 3.17: Stereoabbildung der hydrophoben Furche in der GTPase-Domäne von Dynamin 1. Helix αA ist in gelb dargestellt, der abgeknickte Teil von $\alpha 5$ in grün. In transparentem Grau ist der Teil der C-terminalen Helix der Myosin II-Motordomäne dargestellt, der in der Kristallstruktur mit der hydrophoben Furche von Dynamin 1 wechselwirkt.

Die GTPase-Domäne von Dynamin 1 ist sehr ähnlich gefaltet wie die GTPase-Domäne von Dynamin A aus *D. discoideum* (Abbildung 3.18). Die Überlagerung von 242 strukturell

äquivalenten Ca -Atomen beider Proteine ergab eine mittlere Abweichung von 0.74 \AA im Vergleich zur nukleotidfreien Dynamin A-Struktur (Niemann *et al.*, 2002; PDB-Eintrag 1JX2), bzw. 0.80 \AA im Vergleich zur GDP-gebundenen Struktur (Niemann *et al.*, 2002; PDB-Eintrag 1JWY). Signifikante Unterschiede bestehen in den Schlaufen zwischen $\beta 2$ und $\beta 2A$ (Schleife 4) und zwischen $\beta 6$ und αC (Schleife 14). Schleife 4 ist in Dynamin 1 um acht Reste kürzer als in Dynamin A. Die Schlaufenspitze besteht aus zwei Threoninen, die in Dynamin A durch Aspartate ersetzt sind. Schleife 14 ist in Dynamin A durch eine einzelne Helixwindung verkürzt, während diese Schleife in Dynamin 1 weiter in den Solvensbereich hineinragt.

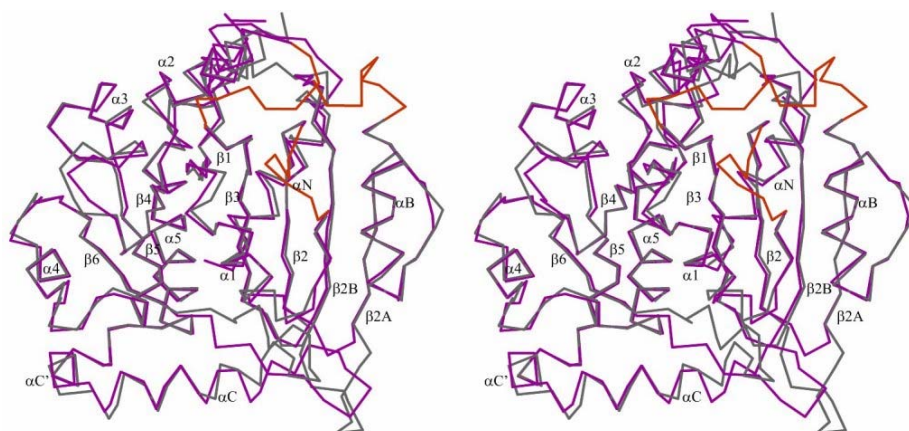


Abb. 3.18: Überlagerung der Hauptketten der GTPase-Domänen von Dynamin A im nukleotidfreien Zustand und Dynamin 1 (Stereodarstellung). Zur Überlagerung wurden 242 strukturell äquivalente Ca -Atome ausgewählt. Dynamin A ist grau eingefärbt, Dynamin 1 ist in violett gezeigt. Schlaufenbereiche, die in der Struktur von Dynamin A nicht definiert sind, sind in Dynamin 1 rot gefärbt. Die mittlere Abweichung beträgt 0.74 \AA .

3.3.2 Die Nukleotidbindungsstelle

GTPasen sind in der Lage, Guaninnukleotide durch Interaktion mit den vier Konsensus-Elementen G-1 bis G-4 zu binden. Amidstickstoff- und Carbonylsauerstoffatome der Phosphatbindungs-Schleife (G-1, $^{38}\text{GGQSAGKS}^{45}$ in Dynamin 1) bilden Wasserstoffbrücken zu den Sauerstoffatomen der α - und β -Phosphate des Nukleotids aus. *Switch I* (G-2) besteht aus einem konservierten Threonin (Thr65 in Dynamin 1), welches das Mg^{2+} -Ion koordiniert. Das Aspartat in *switch II* (G-3, $^{136}\text{DLPG}^{139}$ in Dynamin 1) koordiniert indirekt

über ein Wassermolekül ebenfalls das Mg^{2+} -Ion. Der Amidstickstoff des Glycins aus *switch II* bildet eine Wasserstoffbrücke zu einem der Sauerstoffatome des γ -Phosphates in GTP. Das Aspartat aus dem Motiv G-4 ($^{205}TKLD^{208}$ in Dynamin 1) bindet die Guaninbase über zwei Wasserstoffbrücken zu je einem exo- bzw. endocyclischen Stickstoffatom. Der aliphatische Teil der Lysinseitenkette wechselwirkt hydrophob mit dem Ringsystem der Guaninbase.

Obwohl kein GTP-Analog in der vorliegenden Struktur der Dynamin 1-GTPase-Domäne gebunden ist, sind alle vier Nukleotidbindungsmotive starr genug, um in der Elektronendichtekarte sichtbar zu sein. Die Lage der Nukleotidbindungsmotive innerhalb der GTPase-Domäne von Dynamin 1 ist in Abbildung 3.19 veranschaulicht, die vier Motive sind farblich hervorgehoben. Die Farbkodierung wird in den nachfolgenden Abbildungen der Nukleotidbindungsstelle beibehalten.



Abb. 3.19: Lage der Nukleotidbindungsmotive in der GTPase-Domäne von Dynamin 1. Die Nukleotidbindungsmotive sind farblich hervorgehoben: G1 (*P-loop*) in grün, G2 (*switch I*) in braun, G3 (*switch II*) in dunkelblau und G4 in türkis.

In der nukleotidfreien GTPase-Domäne von Dynamin 1 bildet Lys44 aus G-1 Wasserstoffbrücken zum Carbonylsauerstoff von Leu137, zu einem der beiden terminalen Sauerstoffe aus Asp136 (G-3) und zum Wassermolekül W1. Ser45 bildet Wasserstoffbrücken zu W1. Thr65 bildet eine Wasserstoffbrücke zu einem der beiden

Seitenkettensauerstoffe von Asp136. Thr205 in G-4 bildet eine Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoff von Ala42 (Abbildung 3.20).

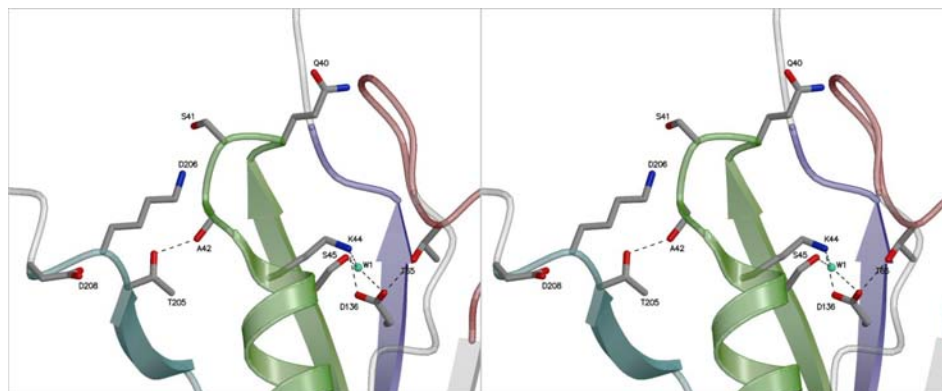


Abb. 3.20: Die Nukleotidbindungsstelle von Dynamin 1 (Stereoabbildung). Seitenketten, die für Nukleotidbindung und -hydrolyse essentiell sind, sind als *stick*-Modell dargestellt mit Kohlenstoffatomen in grau, Sauerstoffatomen in rot und Stickstoffatomen in blau.

Die Lage von Thr65 wird durch Wechselwirkung von flankierenden Resten mit benachbarten Strukturelementen stabilisiert. Die Guanidiniumgruppe von Arg67 bildet Wasserstoffbrücken zu Sauerstoffatomen von Glu104, Val118 und Pro119, sowie eine Salzbrücke zu Glu104. Glu104 ist Bestandteil der Helix α B, Val118 und Pro119 befinden sich im Übergang zwischen Schlaufe 5 und dem Strang β 2B. Die Guanidiniumgruppe von Arg66 bildet Wasserstoffbrücken zu Sauerstoffatomen der Reste Thr109, Asn112 und Gly114, sowie eine Salzbrücke zu Asp106. Der Hauptkettenstickstoff von Arg66 koordiniert über Q123 die Seitenkette von Thr105, der Carbonylsauerstoff von Arg66 bildet eine Wasserstoffbrücke zum Hauptkettenstickstoff von Ser116. Thr109, Asn112, Gly114 und Ser116 befinden sich in der Schlaufe 5, Asp106 ist Teil von α B. Der Amidstickstoff von Val64 koordiniert über Q2 den Amidstickstoff von Gly139, dessen Äquivalent in den GTP-Strukturen anderer GTPasen an der γ -Phosphatkoordination beteiligt ist.

Die Nukleotidbindungsstellen von Dynamin 1 und Dynamin A sind sich bis auf das Fehlen von G-2 strukturell sehr ähnlich. Die Überlagerung von jeweils 16 $C\alpha$ -Atomen (alle Aminosäurereste in G-1, G-3 und G-4) ergab eine mittlere Abweichung von 0.43 Å für den Vergleich mit der nukleotidfreien Struktur der Dynamin A-GTPase-Domäne, bzw. 0.67 Å für den Vergleich mit der GDP-gebundenen Struktur. Lage und Konformation der

Seitenketten in Dynamin 1 und Dynamin A stimmen gut überein (Abbildung 3.21). Positioniert man das Nukleotid aus der Dynamin A-GTPase-Struktur so, wie es sich aus der vorstehenden Überlagerung ergibt, resultieren keine gravierenden sterischen Kollisionen zwischen Atomen der Nukleotidbindungsstelle von Dynamin 1 und dem GDP-Molekül aus der Dynamin A-Struktur.

Um die Position von *switch 1* im Hinblick auf die potentielle Bindung von GTP beurteilen zu können, wurden Teile der Nukleotidbindungsstelle der Dynamin 1-GTPase-Domäne mit

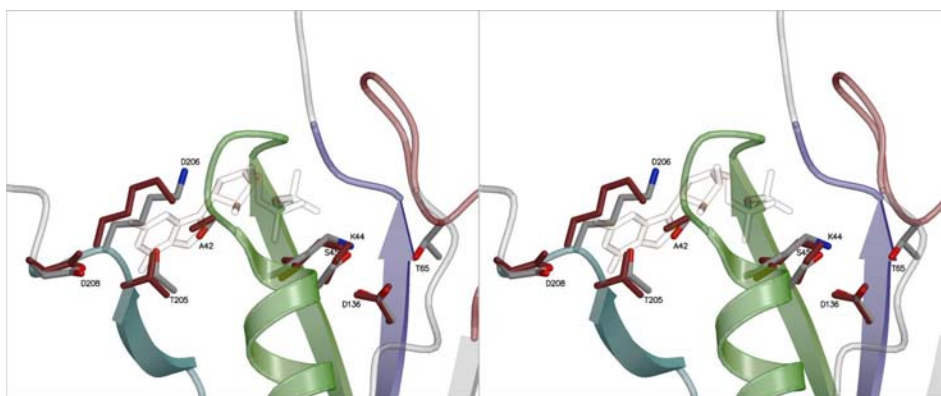


Abb. 3.21: Überlagerung der Nukleotidbindungsstellen von Dynamin 1 und Dynamin A-GDP (Stereodarstellung). Die Struktur von Dynamin 1 ist wie in Abbildung 3.20 dargestellt, zusätzlich sind die äquivalenten Seitenketten von Dynamin A in braun dargestellt. Das GDP-Molekül aus der Dynamin A-Struktur ist transparent gezeichnet.



Abb. 3.22: Überlagerung der Nukleotidbindungsstellen von Dynamin 1 und Ras-GTP (Stereodarstellung). Die Sekundärstrukturelemente von Ras, das GppNHp, sowie das Magnesiumion und zwei Wassermoleküle sind transparent dargestellt. Die Koordination des Magnesiumions ist durch gestrichelte Linien angedeutet.

den äquivalenten Positionen der Kristallstruktur von Ras im GTP-gebundenen Zustand (Pai *et al.*, 1990; PDB-Eintrag 5P21) überlagert. Als Referenzatome dienten dabei die C α -Atome von Lys44, Ser45, Thr65, Asp136 und Asp208 aus den Bindungsmotiven G-1 bis G-4 und die dazu äquivalenten Atome in Ras (Abbildung 3.22).

Die Überlagerung zeigt eine gute Übereinstimmung sowohl zwischen den Sekundärstrukturelementen der beiden Nukleotidbindungsstellen, als auch zwischen deren Seitenketten. Viele der an der GTP-Bindung beteiligten Aminosäuren befinden sich auch im nukleotidfreien Zustand von Dynamin 1 bereits in Orientierungen, die zur Bindung eines Nukleotids geeignet wären. Die Abstände, die sich für die Wechselwirkung von Dynamin 1 mit GTP ergäben, wenn das GTP-Molekül wie in Ras platziert wäre, sind zusammen mit den tatsächlichen Abständen in Ras in Tabelle 3.5 aufgelistet.

Atom GTPase	Atom GTP	Ras	Dynamin 1
Lys44 (NZ)	β -P (O)	3.02	3.15
Ser45 (OG)	β -P (O)	3.20	2.52
Ser45 (N)	β -P (O)	2.90	2.89
Ser46 (N)	α -P (O)	2.81	3.08
Gly139 (N)	γ -P (O)	2.97	2.81
Ser45 (OG)	Mg ²⁺	2.26	2.78
Thr65 (OG1)	Mg ²⁺	2.20	3.86
Thr65 (N)	γ -P (O)	3.01	3.79
Asp136 (OD1)	H ₂ O	2.66	2.85

Tabelle 3.5: Abstände der wichtigsten Wechselwirkungen zwischen GTPase und GTP. Die Seitenketten sind nach der Sequenz von Dynamin 1 numeriert. Die Atome der Aminosäurenreste sind nach der Nomenklatur der Proteindatenbank PDB bezeichnet.

Die Abstände zwischen Dynamin 1 und dem modellierten GTP-Molekül liegen fast ausnahmslos im Erwartungsrahmen. Auch die Wechselwirkung des streng konservierten Gly139 aus *switch II* mit einem der Sauerstoffatome der γ -Phosphatgruppe entspricht mit 2.81 Å dem erwarteten Wert. Ausnahmen bilden die Interaktionen der Seitenkettensauerstoffatome von Ser45 und Thr65 mit dem Magnesiumion. Die

Bindungsabstände sind mit 2.78 Å bzw. 3.86 Å für die Seitenketten von Ser45 bzw. Thr65 um ca. 0.5 Å bzw. 1.65 Å länger als die entsprechenden Abstände in Ras. Die Bindung zwischen dem Amidstickstoff von Thr65 und dem Phosphatsauerstoff ist in Dynamin 1 ca. 0.8 Å länger als in Ras. Thr65 müßte sich also für eine tatsächliche GTP-Bindung näher zum Magnesiumion und zur γ -Phosphatgruppe hinbewegen.

3.4 Kristallstruktur der Motordomäne von Myosin II in einer neuen Konformation

3.4.1 Domänenbewegung in der Motordomäne von Myosin II

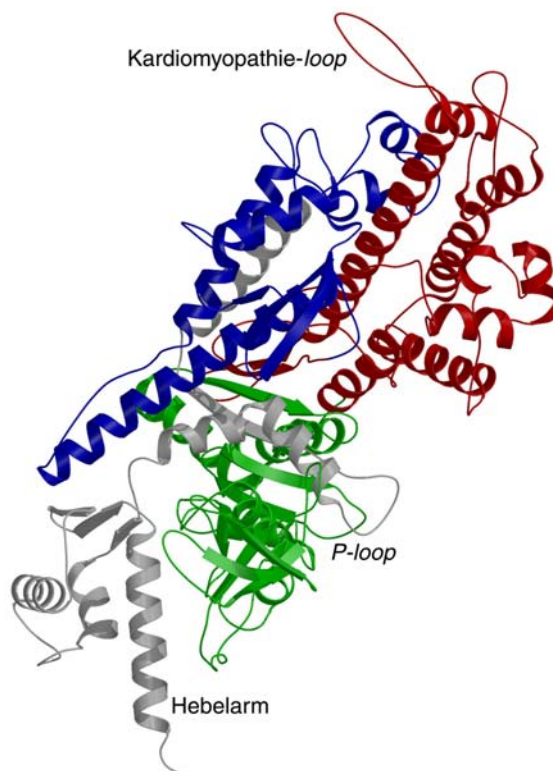


Abb. 3.23: Faltung der Myosin II-Motordomäne aus MyD1. Die Domänen sind farblich hervorgehoben: N-terminale 25K-Domäne in grün, obere 50K-Domäne in rot, untere 50K-Domäne in blau, C-terminale 20K-Domäne in grau. Der Hebelarm ist in der Position wie nach dem Kraftschlag.

Die vorliegende Kristallstruktur der Motordomäne von Myosin II aus *D. discoideum* zeigt eine bislang nicht beobachtete Konformation (Abbildung 3.23), die keiner der drei Kategorien (Abschnitt 1.2) aus *offen*, *geschlossen* oder *detached* zugeordnet werden kann. Da das Myosin aus MyD1 ohne Nukleotid kristallisiert wurde, wäre eine offene Konformation zu erwarten gewesen. Optimierte Überlagerung der Hauptketten von MyD1-Myosin und einer offenen Struktur (PDB-Eintrag 1MMA von Gulick *et al.*, 1997; diese Struktur wird im Folgenden als Referenzstruktur für eine offene Konformation verwendet) über den gesamten Myosinkopf ohne die Konverterregion zeigt jedoch, daß beide Konformationen nicht übereinstimmen (Abbildung 3.24). Die mittlere Abweichung für die C α -Atome der Aminosäuren 2-680 ist mit 3.13 Å sehr hoch.



Abb. 3.24: Verlauf der Hauptkette der Myosin II-Motordomäne aus MyD1 (rot) im Vergleich zur offenen Myosin-Konformation (schwarz, PDB-Eintrag 1MMA). Zur Überlagerung wurden die C α -Atome der Aminosäuren 2-680 als Referenz verwendet.

Überlagert man die beiden Strukturen über den *P-loop*, so zeigt sich, daß die gesamte 50K-Domäne herausgeschoben ist aus ihrer Lage in der offenen Konformation (Abbildung 3.25). Im Vergleich zur geschlossenen Konformation (Schlichting *et al.*, unveröffentlicht; Geeves und Holmes 1999; diese Struktur wird im Folgenden als Referenzstruktur für eine geschlossene Konformation verwendet) ist diese Verschiebung noch ausgeprägter. So ist z.B. die Spitze des Kardiomyopathie-loops aus der oberen 50K-Domäne von den

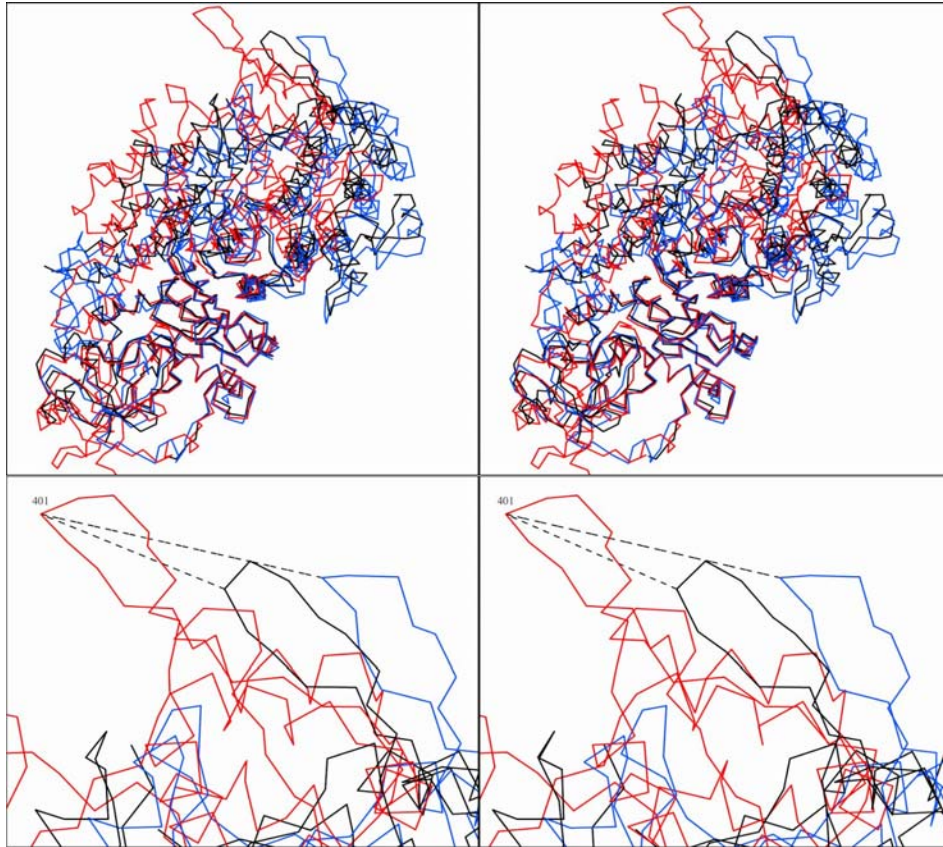


Abb. 3.25: Überlagerung der drei Myosin-Konformationen (neu: rot, offen: schwarz, geschlossen: blau) über die $C\alpha$ -Atome 173-190 des *P-loop*-Motivs (Stereodarstellung). Unteres Segment: Detailausschnitt der oberen 50K-Domäne im Bereich des *Kardiomyopathie-loops*. Die gestrichelten Linien verbinden die Spitze des *Kardiomyopathie-loops* in der neuen Konformation mit den äquivalenten Lagen in der offenen und der geschlossenen Konformation.

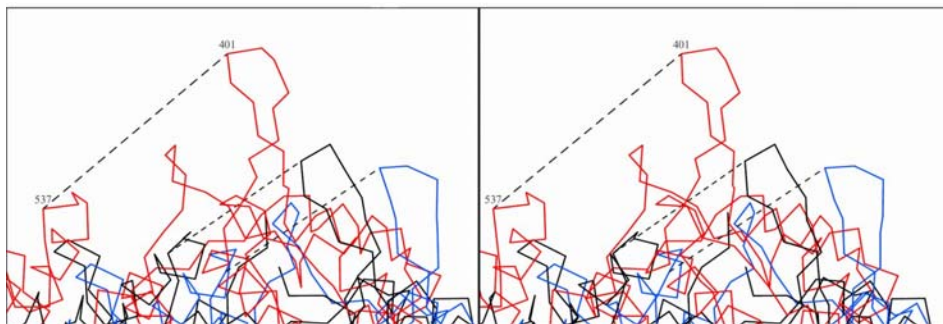


Abb. 3.26: Überlagerung der drei Myosin-Konformationen wie in Abbildung 3.25 (neu: rot, offen: schwarz, geschlossen: blau) (Stereodarstellung). Die gestrichelten Linien verbinden die Spitze des *Kardiomyopathie-loops* in der neuen Konformation mit einem Referenzatom in der unteren 50K-Domäne.

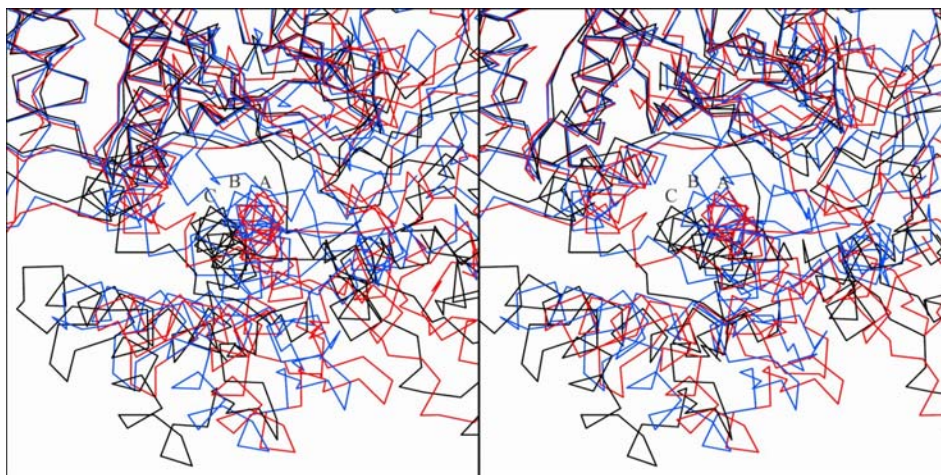


Abb. 3.27: Annäherung der *switch II*-Helix (A: in der neuen Konformation, rot; B: in der geschlossenen Konformation, blau; C: in der offenen Konformation, schwarz) an Bereiche der oberen 50K-Domäne. Als Referenz für die optimierte Überlagerung dienten die Ca -Atome 209-454 der oberen 50K-Domäne.

entsprechenden Positionen in der offenen bzw. geschlossenen Struktur 16.7 \AA bzw. 20.0 \AA entfernt. Die 50K-Domäne bewegt sich dabei nicht als Ganzes, sondern auch die Subdomänen verschieben sich gegeneinander. Der Abstand zwischen der Spitze des Kardiomyopathie-*loops* zu einem Referenzpunkt in der unteren 50K-Domäne vergrößert sich um 8.8 \AA bzw. 6.1 \AA gegenüber der offenen bzw. geschlossenen Konformation (Abbildung 3.26). Durch die Verschiebung der beiden Subdomänen nähert sich die *switch II*-Helix aus der unteren 50K-Domäne zwei Faltblatt-Strängen der oberen 50K-Domäne (Abbildung 3.27). Eine solche Annäherung ist auch im Vergleich zwischen der offenen und

obere 50K	untere 50K	neu	offen	geschlossen
R238 (NH1)	E459 (OE1)	2.74 \AA	-	2.90 \AA
R238 (NH2)	E459 (OE2)	2.93 \AA	-	3.08 \AA
S237 (O)	S456 (OG)	2.85 \AA	-	2.94 \AA
S266 (OG)	E467 (OE2)	2.99 \AA	-	3.10 \AA
R232 (NH2)	I460 (O)	3.31 \AA	-	3.09 \AA

Tabelle 3.6: Polare Wechselwirkungen im unteren Teil der 50K-Spalte. Angegeben sind die jeweiligen Wechselwirkungspartner aus der unteren und oberen 50K-Domäne, sowie die Abstände in der neuen Myosin-Konformation (neu), der offenen Konformation (offen) und der geschlossenen Konformation (geschlossen).

geschlossenen Konformation sichtbar und wurde als partielles Schließen der 50K-Spalte bezeichnet (Fisher *et al.*, 1995). Die Überlagerung der oberen 50K-Domänen aller drei Konformationen zeigt, daß diese Verschiebung der Helix in der vorliegenden Struktur noch deutlicher ausgeprägt ist. Durch das partielle Schließen der Spalte ergeben sich neue polare Wechselwirkungen zwischen der unteren und oberen 50K-Domäne, die in der offenen Konformation nicht vorhanden sind (Tabelle 3.6).

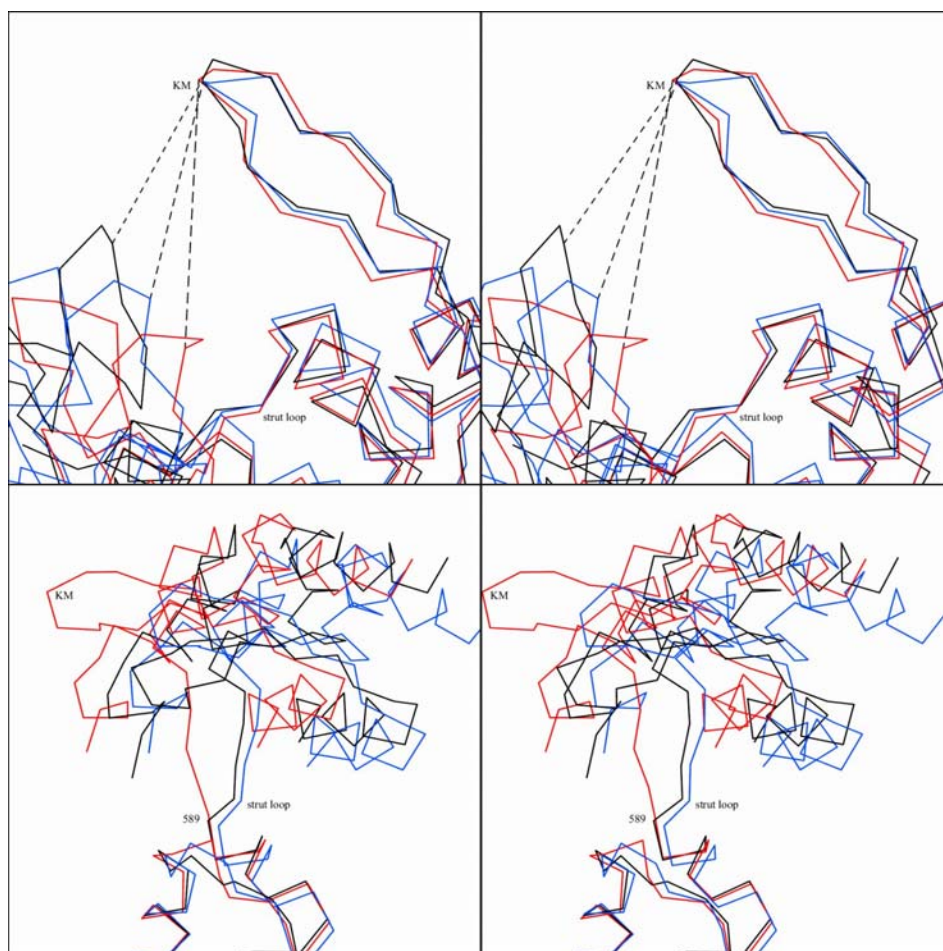


Abb. 3.28: Verschiebung der 50K-Subdomänen gegeneinander durch Auffächern des *strut loop*. Die Ca -Kette der neuen Myosin-Konformation ist in rot gezeichnet, die der offenen Konformation in schwarz, die der geschlossenen Konformation in blau. KM bezeichnet den Kardiomyopathie-loop. Oben: Als Referenz für die optimierte Überlagerung dienen, wie in Abbildung 3.27, die Ca -Atome der oberen 50K-Domäne. Die gestrichelten Linien verbinden jeweils die Spitze des KM mit einem Referenzatom in der unteren 50K-Domäne. Unten: Als Referenz für die optimierte Überlagerung dienen die Ca -Atome 507-538 und 631-646 der unteren 50K-Domäne.

Ein Teil der Verschiebung der beiden 50K-Domänen gegeneinander geht darauf zurück, daß der sogenannte *strut loop*, eine Schlaufe zwischen der oberen und unteren Domäne, auffächert (Abbildung 3.28). In der neuen Myosin-Konformation entfernt sich der *strut loop* bereits ab Lys589 weit von seiner Lage in der offenen oder geschlossenen Konformation. Dies wird durch Umklappen der Peptidbindung zwischen Lys589 und dem nachfolgenden Rest ermöglicht.

Die Umlagerung der 50K-Domäne und ihrer Subdomänen kann auf eine Konformationsänderung des zentralen Faltblatts (Abbildung 3.29) zurückgeführt werden. Die drei äußeren Stränge des Faltblatts sind gegenüber dem Faltblatt der offenen Konformation verdreht (Abbildung 3.30). Diese drei Stränge bilden die Übergänge zwischen der 50K-Domäne und dem übrigen Protein. Das Auffächern des Faltblatts ab dem

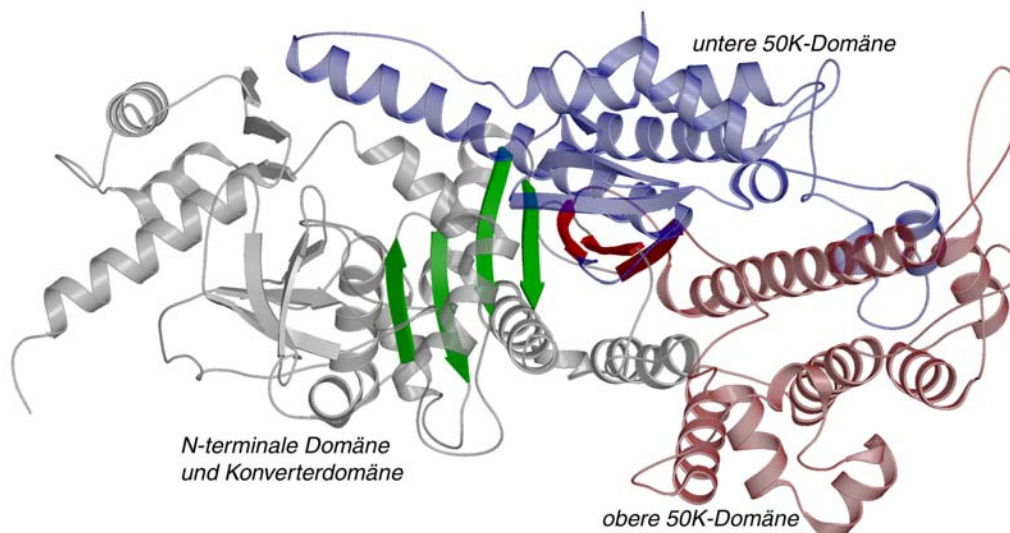


Abb. 3.29: Lage des zentralen Faltblatts in der Motordomäne. Die in rot gezeichneten Stränge des Faltblatts trennen die obere 50K-Domäne von der N-terminalen Domäne und der Konverterregion.

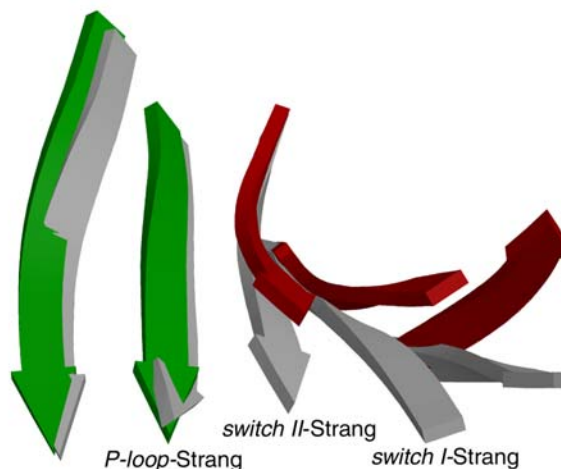


Abb. 3.30: Verdrehung der äußeren drei Stränge (rot) des zentralen Faltblatts (rot und grün) im Vergleich zur offenen Konformation (grau). Die Blickrichtung entspricht der Orientierung in Abbildung 3.29.

switch II-Strang verschiebt die gesamte 50K-Domäne relativ zur N-terminalen Domäne. Der äußere Strang des Faltblatts und der benachbarte *switch I*-Strang bilden den Übergang zwischen der N-terminalen Domäne und der oberen 50K-Domäne. Der *switch II*-Strang trennt die obere von der unteren 50K-Domäne. Das unterschiedliche Ausmaß der Verdrehung des Faltblatts bewirkt die Verschiebung der Subdomänen gegeneinander.

Die konformationellen Änderungen des Faltblatts sind eng gekoppelt mit einer Bewegung des gesamten *switch I*-Motives, die im nachfolgenden Abschnitt beschrieben werden.

3.4.2 Nukleotidbindungsstelle und Bewegung der Schalter *switch I* und *switch II*

Adeninnukleotide werden in Myosin über die Phosphatbindungsschleife (*P-loop*), sowie die Schleifen *switch I* und *switch II* gebunden (Abbildung 3.31). Die Hauptkettenamide des *P-loop* bilden dabei Wasserstoffbrückenbindungen zu den Sauerstoffatomen der α - und β -Phosphate des Nukleotids (Abbildung 3.32). Die Wechselwirkungen mit dem Nukleotid werden in *switch I* durch ein hochkonserviertes Sequenzmotiv ²³⁶SSR²³⁸ (die Bezifferung

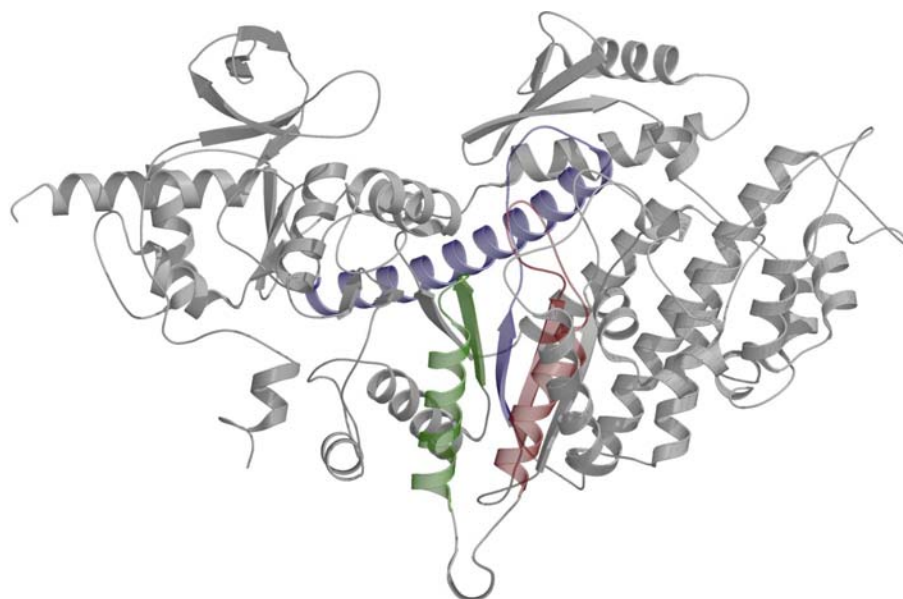


Abb. 3.31: Lage der Nukleotidbindungsmotive in der Myosin-Motordomäne. Die Nukleotidbindungsmotive sind zusammen mit flankierenden Sekundärstrukturelementen farblich hervorgehoben: *P-loop* in grün, *switch I* in rotbraun, *switch II* in violett. Die Farbkodierung wird in den folgenden Abbildungen der Nukleotidbindungsstelle beibehalten.

der Aminosäurereste bezieht sich dabei auf *Dictyostelium* Myosin II) vermittelt, in dem die Seitenkette des ersten Serins eine Wasserstoffbrückenbindung zum γ -Phosphat des Nukleotids bildet (nur bei ATP). Das zweite Serin koordiniert das bei Anwesenheit eines Nukleotids stets vorhandene Mg^{2+} -Ion. Die Argininseitenkette ist in der Lage, eine Salzbrücke zu dem hochkonservierten Glutamat 459 in *switch II* zu bilden. Threonin 186 in *switch I* und Aspartat 454 in *switch II* koordinieren über je ein Wassermolekül indirekt das Mg^{2+} -Ion. Der Amidstickstoff des konservierten Glycins 457 in *switch II* stabilisiert durch eine Wasserstoffbrücke zum γ -Phosphat den Übergangszustand der ATP-Hydrolyse.

Als Kriterium zur Kategorisierung der Kristallstrukturen von Myosin in offen oder geschlossen diente bislang die Position von *switch II*. *Switch II* gilt als geschlossen, wenn der Amidstickstoff des konservierten Glycins eine Wasserstoffbrücke zur γ -Phosphatgruppe des Nukleotids ausbildet (Abbildung 3.32 oben). Liegt *switch II* zu weit entfernt von der γ -Phosphatgruppe, um diese Wechselwirkung zu erfüllen, gilt *switch II* als offen (Abbildung 3.32 mitte). *Switch I* wurde in dieser Nomenklatur nicht berücksichtigt, da er sich in allen

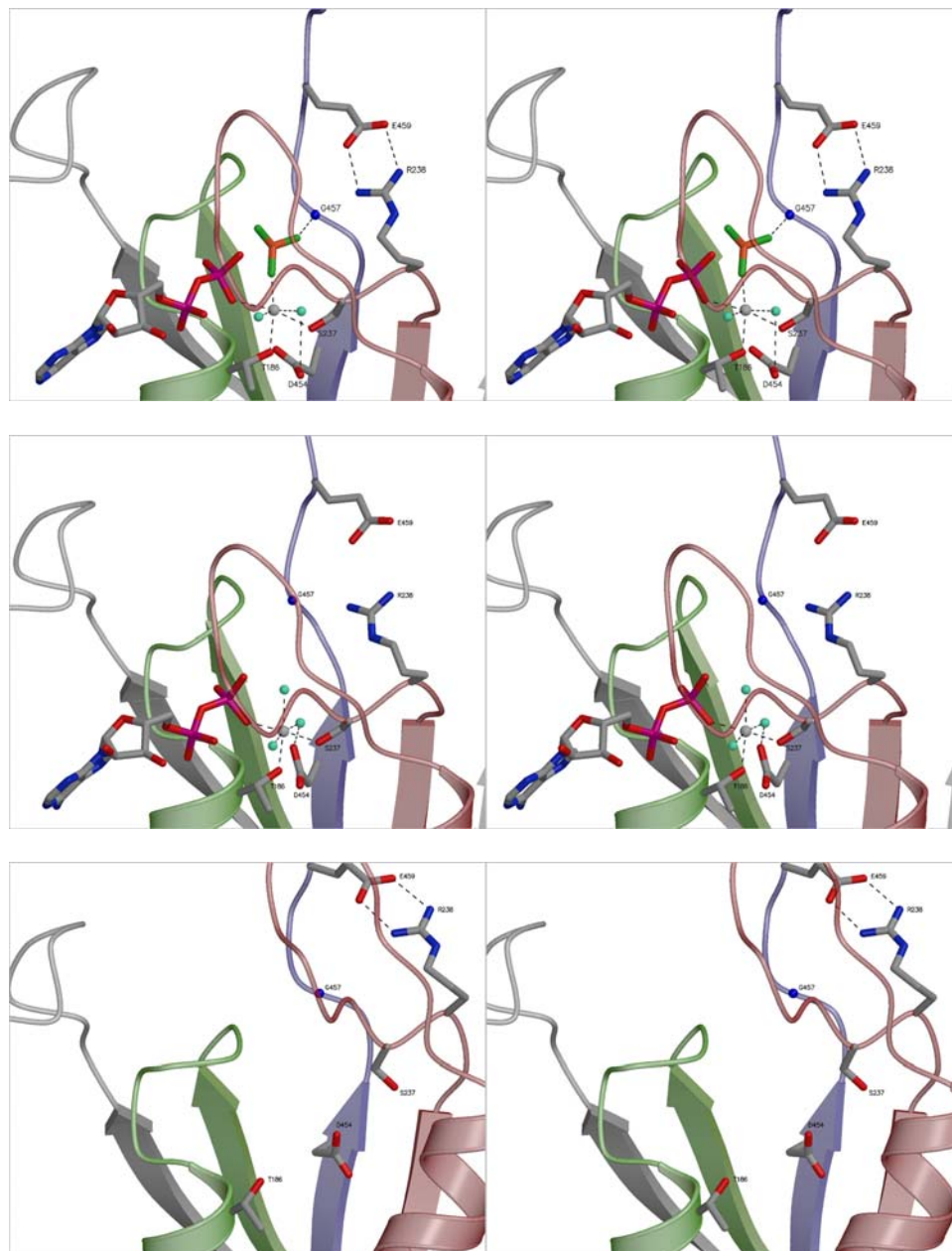


Abb. 3.32: Die Nukleotidbindungsstelle in der geschlossenen (oben) und offenen (mitte) Konformation von Myosin, sowie in der vorliegenden neuen Konformation (unten). *P-loop*, *P-loop*-Helix und *P-loop*-Strang sind grün gezeichnet; *switch I*, *switch I*-Helix und *switch I*-Strang sind rotbraun gefärbt; *switch II* und *switch II*-Strang sind violett dargestellt. Das Magnesiumion ist als graue Kugel dargestellt, Wassermoleküle als türkise Kugeln. Die gestrichelten Linien deuten polare Wechselwirkungen an.

bislang publizierten Strukturen in der gleichen Stellung befindet, die als geschlossen angesehen wird. In dieser Stellung koordiniert die Seitenkette des zweiten Serins aus *switch I* das Magnesiumion.

Das vorgelegte Strukturmodell zeigt erstmals *switch I* in einer grundlegend anderen Stellung (Abbildung 3.32 unten). Dabei ist das *switch I*-Motiv aus Helix, Schlaufe und Strang um mehrere Ångström gegenüber der *P-loop*-Helix verschoben. Dadurch entfernt sich Serin237 weit von der Magnesiumbindungsstelle (Tabelle 3.6) und kann nicht mehr zur Koordination des Magnesiumions beitragen. Diese Stellung des *switch I* kann als *offen* bezeichnet werden.

<i>switch I</i>		G/G	G/O	O/O
S236 (OG)	γ -P (O)	3.8 Å	3.3 Å	7.4 Å
S237 (OG)	Mg ²⁺	2.4 Å	2.1 Å	8.1 Å
<i>switch II</i>				
D454 (OD1)	Mg ²⁺	4.3 Å	4.1 Å	6.9 Å
G457 (N)	γ -P (O)	2.9 Å	8.0 Å	9.4 Å
<i>switch I</i>	<i>switch II</i>			
R238 (NH1)	E459 (OE1)	2.9 Å	6.9 Å	2.7 Å
R238 (NH2)	E459 (OE2)	3.1 Å	7.2 Å	2.9 Å

Tabelle 3.6: Abstände zwischen *switch I*, *switch II* und Nukleotid in den drei Myosin-Konformationen. Die Position des γ -Phosphats und des Magnesiumions wurden aus dem Liganden MgADP.BeF₃ der G/G-Struktur abgeleitet.

Die in dieser Arbeit vorgestellte neue Konformation von Myosin kann mit der bisherigen Nomenklatur nicht adäquat beschrieben werden. Daher wird hier ein neues Benennungssystem für Myosin-Konformationen vorgeschlagen, das die Stellungen von *switch II* und *switch I* einbezieht. In bisher als "geschlossen" eingestuften Strukturen sind beide Schalter geschlossen. Daher wird diese Konformation im Folgenden als G/G (für geschlossen/geschlossen) bezeichnet. In den bisher als "offen" kategorisierten Strukturen ist *switch I* geschlossen und *switch II* offen. Deshalb wird diese Konformation nun G/O (für geschlossen/offen) genannt. Die neue Konformation von Myosin mit offenem *switch I* und offenem *switch II* kann so als O/O klassifiziert werden.

Durch Öffnen von *switch I* formiert sich die Salzbrücke zwischen Arg238 und Glu459 wieder, die im Übergang von der G/G- in die G/O-Konformation getrennt worden ist (Abbildung 3.32 und Tabelle 3.6). Bei offenem *switch I* liegt *switch II* noch weiter von der Nukleotidbindungsstelle entfernt als in der G/O-Konformation. Dadurch kann neben Gly457 auch Asp454 nicht mehr zur Koordination des Magnesiumions beitragen.

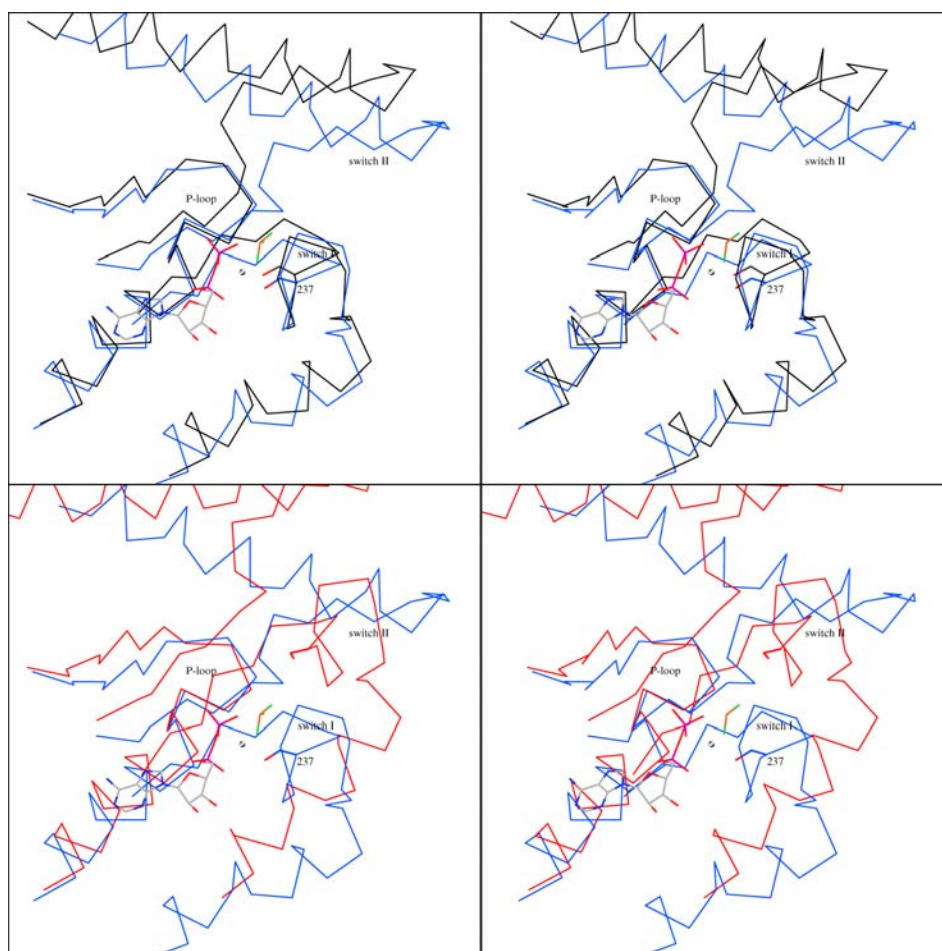


Abb. 3.33: Verschiebung der Schalter relativ zum Nukleotid (Stereodarstellungen). Die α -Ketten der drei Myosinkonformationen (O/O: rot, G/O: schwarz, G/G: blau) wurden über die α -Atome 173-190 des *P-loop*-Motivs als Referenz optimiert überlagert. Die Lage der Hydrolyseprodukte wird durch den Liganden MgADP.BeF₃ der G/G-Struktur gezeigt. Sauerstoffatome sind rot gezeichnet, Stickstoffatome blau, Phosphoratome magenta, das Berylliumatom orange, Fluoratome grün. Das Magnesiumion ist als graue Kugel dargestellt. Die Schlaufenbereiche der G/G-Konformation und die Lage von Ser237 sind beschriftet.

Überlagert man G/G-Konformation und O/O-Konformation mit dem *P-loop*-Motiv als Referenz, zeigt sich, daß die offene Stellung von *switch I* mit einer geschlossenen Stellung von *switch II* kollidieren würde (Abbildung 3.33). Demnach kann sich *switch I* nur öffnen, wenn *switch II* bereits offen ist.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, neben der strukturellen Charakterisierung der GTPase-Domäne von Dynamin 1 und einer neuen Konformation der Motordomäne von Myosin II, biochemische Untersuchungen an Dynamin A aus *Dictyostelium discoideum* durchgeführt.

In *D. discoideum* wurden bislang drei verschiedene Dynamine identifiziert, Dynamin A, Dynamin B und Dynamin C, von denen ersteres bereits zellbiologisch (Wienke *et al.*, 1999) und strukturell (Klockow *et al.*, 2002; Niemann *et al.*, 2002) charakterisiert ist. Dynamin A zeigt eine Stimulation seiner GTPase-Aktivität durch konzentrationsabhängige Oligomerisierung zu ring- und helixförmigen Strukturen. In *quenched flow* Experimenten zeigte Wildtyp-Dynamin A über einen Konzentrationsbereich von 1 bis 20 μM einen sigmoidalen Anstieg der GTPase-Aktivität auf das Zehnfache des Ausgangswertes (Klockow, 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß diese Kooperativität durch das Entfernen einer Argininseitenkette der GED durch die Mutation R828A aufgehoben wird (Abbildung 3.3). Gleichzeitig ist das Mutantenprotein nicht in der Lage, zu den dynamintypischen helikalen Strukturen zu oligomerisieren (Abbildung 3.4), die eng mit der Stimulation der GTPase-Aktivität assoziiert sind (Hinshaw und Schmid, 1995; Takei *et al.*, 1995). Dies deutet darauf hin, daß der kinetische Effekt der Mutante auf die Verhinderung der korrekten Oligomerisierung des Proteins zurückzuführen ist.

Das hier verwendete Testsystem besitzt generell eine geringere Auflösung als das von Klockow verwendete *quenched flow*-System. Zwar konnte der konzentrationsabhängige Anstieg der Hydrolysegeschwindigkeit für das Wildtyp-Protein bestätigt werden, über den genauen Kurvenverlauf ist jedoch keine Aussage möglich.

Für die zu R828A äquivalente Mutante in Dynamin 1 wurde eine stimulationsinhibierende Wirkung beschrieben (Sever *et al.*, 1999), dagegen zeigten weitere Studien für Dynamin 1 und Dynamin 2 keinen solchen Effekt (Marks *et al.*, 2001; Eccleston *et al.*, 2002). In allen diesen Arbeiten wurde die GTPase-Aktivität von Dynamin gemessen, das entweder um Mikrotubuli oder um Nanotubuli aus synthetischen Lipiden assembliert war. In den beiden letztgenannten Studien zeigte Mutanten-Dynamin im assemblierten Zustand eine dem

Wildtyp-Protein vergleichbare GTPase-Aktivität. Ob ein katalytischer Argininrest an der Stimulation der GTPase-Aktivität beteiligt ist, kann auch anhand der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse nicht gültig beantwortet werden. Da aufgrund der unterschiedlichen Versuchsbedingungen die Ergebnisse dieser Arbeit mit denen der erwähnten Studien nicht direkt vergleichbar sind, wäre es wünschenswert, die Experimente mit mutiertem Dynamin 1 unter den Versuchsbedingungen dieser Arbeit zu wiederholen und die Dynamin 1-Mutante elektronenmikroskopisch zu untersuchen. Gleichermäßen könnte die Dekoration von Dynamin A-R828A um Mikrotubuli oder Lipidnanotubuli darüber Aufschluß geben, ob der Stimulationsdefekt durch Bereitstellung einer geeigneten Schablone für die Oligomerisierung kompensiert werden kann. Die Gesamtheit der verfügbaren Daten spricht gegen die Existenz eines klassischen Argininfingers in der GED. Dennoch zeigen die vorgelegten Daten, daß das konservierte Arginin essentiell ist für die Oligomerisierungsfähigkeit und damit für die GTPase-Aktivität von Dynamin A.

R828A-Dynamin A zeigt neben den strukturellen und kinetischen Unterschieden zum Wildtyp-Protein auch abweichendes Verhalten in der Reinigung. Die kinetische Charakterisierung wurde dadurch erschwert, daß das Mutantenprotein bei höheren Konzentrationen zur Präzipitation neigt. So konnten bei Konzentrierungsversuchen mit handelsüblichen Proteinkonzentratoren oberhalb von ca. 1.5 mg/ml makroskopische Aggregate beobachtet werden. Die Vermutung liegt nahe, daß dies auf die veränderte Struktur des oligomeren Proteins zurückzuführen ist. Wildtyp-Dynamin-Monomere sind innerhalb der ringförmigen Oligomere einem periodischen Muster folgend angeordnet (Zhang und Hinshaw, 2001; Klockow *et al.*, 2002), so daß bestimmte definierte Bereiche der Monomere für Interaktionen mit weiteren Ringen nicht zugänglich sind. Zwar ist die Anordnung der Monomere innerhalb der filamentösen Aggregate des Mutantenproteins nicht bekannt, jedoch kann angenommen werden, daß darin auch Bereiche exponiert sind, die in Wildtyp-Oligomeren verdeckt sind. Diese Bereiche könnten bei höherer Proteinkonzentration durch Wechselwirkung der einzelnen Filamente untereinander die Bildung sehr großer Aggregate verursachen.

Veränderte Interaktionseigenschaften von R828A-Dynamin A könnten auch die Ursache für die beobachtete Co-Reinigung von *vaults* sein. *Vaults* wurden erstmals 1986 in Präparationen gereinigter Clathrin-ummantelter Vesikel aus Rattenleber identifiziert (Kedersha und Rome, 1986) und später auch in zahlreichen anderen Organismen nachgewiesen (Kedersha *et al.*, 1990). Teile der *vault*-Population einer Zelle sind mit dem Aktin-Zytoskelett co-lokalisiert (Kedersha und Rome, 1990). Da die höchsten *vault*-Konzentrationen zudem in hochmotilen Zellen wie Makrophagen und *D. discoideum* enthalten sind, wurde zunächst eine Funktion in der Zellmotilität angenommen (Kedersha und Rome, 1990). Später zeigte sich, daß die Hauptproteinkomponente von Ratten-*vaults* homolog ist zu einem humanen Protein, das an der Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegen Chemotherapeutika beteiligt ist (Scheffer *et al.*, 1995). Daher wurde auch für *vaults* eine Funktion im Transport von cytotoxischen Substanzen aus dem Zellkern postuliert (Scheffer *et al.*, 1995 und 2000). Bisher konnte die Funktion von *vaults* allerdings nicht eindeutig bestimmt werden (Suprenant, 2002).

Vaults interagieren mit Mikrotubuli und können zusammen mit diesen gereinigt werden (Hammil und Suprenant, 1997). Dieser Effekt kann als Ursache für die Reinigung von *vaults* mit R828A-Dynamin A ausgeschlossen werden, da das gesamte vorhandene Tubulin durch die Mono Q-Säule vom Dynamin A abgetrennt wird (Abbildung 3.2). Ob die beobachtete Co-Reinigung von *vaults* mit R828A-Dynamin A auf einer Wechselwirkung der Proteine beruht oder ein Reinigungsartefakt darstellt, kann aufgrund der unterschiedlichen Präparationsbedingungen für Wildtyp- und Mutantenprotein nicht sicher beurteilt werden. Die Reinigung verläuft bis zum DEAE-Chomatographie-Schritt für beide Proteine identisch (Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2), danach folgt für das Mutantenprotein eine weitere Chromatographie-Säule, während das Wildtypprotein durch Dialyse gegen Puffer geringer Ionenstärke präzipitiert wird.

Um beurteilen zu können, ob die Anreicherung von *vaults* auf einer spezifischen Wechselwirkung mit R828A-Dynamin A beruht, wären weitere Experimente nötig, die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnten. Zum einen könnte immunochemisch getestet werden, ob der Überstand der Dialyse in der Wildtyppräparation *vaults* enthält. Zum anderen könnte der Durchfluß der DEAE-Säule an Stelle des Dialyseschritts auf eine Mono Q-Säule aufgetragen werden um festzustellen, ob

im Eluat *vaults* vorhanden sind. Desweiteren könnte das Präparationsprotokoll für das Mutantenprotein auf *Dictyostelium*-Zellen angewendet werden, die kein Dynamin A produzieren (Wienke *et al.*, 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals der GTPase-Domäne eines Säugerdynamins in atomarem Detail strukturell aufgeklärt werden. Die vorgelegte Kristallstruktur der GTPase-Domäne von Dynamin 1 aus *Rattus norvegicus* ähnelt in hohem Maße der Struktur der GTPase-Domäne von Dynamin A. Die Aminosäuresequenzen beider Proteine sind zu 60 % identisch (van der Bliek und Meyerovitz, 1991; Chen *et al.*, 1991; Wienke *et al.*, 1999), so daß eine gute strukturelle Übereinstimmung in den sequenzhomologen Bereichen zu erwarten war. Signifikante Unterschiede in der Faltung bestehen lediglich innerhalb der Schlaufenbereiche 4 und 14 (Abbildungen 3.15 und 3.18). Schlaufen 4 und 14 flankieren eine größere Einbuchtung in die GTPase-Domäne und könnten somit bestimmend sein für die Interaktion mit weiteren Dynamindomänen oder anderen Proteinen. Die Aminosäuresequenz von Schlaufe 14 unterscheidet sich in Dynamin 1 nur in 4 von 13 Resten von der Sequenz in Dynamin A. Die Konformation beider Schlaufen ist jedoch sehr unterschiedlich (Abbildung 3.18). Schlaufe 4 ist in Dynamin 1 um acht Aminosäurereste kürzer als in Dynamin A. Innerhalb der Dynamin-Familie ist die Aminosäuresequenz dieser Region sehr variabel. In manchen Dynaminen ist dieser Bereich zwischen den Strängen $\beta 2$ und $\beta 2A$ gegenüber Dynamin 1 um bis zu 44 Reste erweitert. Aufgrund dieser Diversität wurde Schlaufe 4 bereits als Wechselwirkungsort für potentielle Interaktionspartner vorgeschlagen (Niemann *et al.*, 2002).

Die hydrophobe Furche zwischen den terminalen Helices αA und $\alpha 5$ (Abbildung 3.17) stellt möglicherweise auch in Dynamin 1 einen Wechselwirkungsort zwischen der GTPase-Domäne und der GED dar. Eine solche Funktion wurde bereits für die hydrophobe Furche in der GTPase-Domäne von Dynamin A vorgeschlagen (Niemann *et al.*, 2002). Die Struktur des humanen Guanylat-bindenden Proteins (hGBP) wird trotz geringer Homologie der Aminosäuresequenzen als Modell der Domänenstruktur von Dynamin angesehen (Prakash *et al.*, 2000a). In hGBP kontaktiert die helikale C-terminale Domäne die GTPase-Domäne.

Die GEDs von Dynaminen sind nach Vorhersagen der Sekundärstruktur helikal. Desweiteren konnte für Dynamin 1 durch *yeast-two-hybrid*-Analyse gezeigt werden, daß die ersten 322 Aminosäuren mit der GED wechselwirken (Smirnova *et al.*, 1999).

Generell sind die hydrophoben Reste der Furche innerhalb der Dynamin-Familie hochkonserviert (Abbildung 4.1). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Dynamin-GEDs zeigt eine hohe Konservierung von vier in regelmäßigen Abständen zueinander befindlichen Paaren hydrophober Aminosäuren (Abb. 4.2). In den Helices αA und $\alpha 5$ sind pro Helixwindung ein bis zwei hydrophobe Aminosäurereste enthalten, so daß zwischen diesen beiden Helices eine durchgängige hydrophobe Kontaktfläche gebildet wird. Der größere Abstand der hydrophoben Motive in der mutmaßlichen GED-Helix reflektiert möglicherweise den transienten Charakter einer Wechselwirkung mit der GTPase-Domäne.

	x x	x x x	x	x x	x		x	x	x	x x																															
8	L	I	P	L	V	V	N	R	L	Q	D	A	F	S	A	I	-	-	-	-	-	-	H	I	R	D	T	L	P	G	L	R	N	K	L	I	Q	301	RnDyn1		
11	L	I	P	V	I	V	N	R	V	Q	D	A	F	S	Q	L	-	-	-	-	-	-	-	H	I	R	D	T	L	P	T	L	R	D	S	L	M	Q	303	CeDyn	
4	L	I	P	V	I	I	N	K	L	Q	D	V	F	N	T	V	-	-	-	-	-	-	-	H	I	R	D	C	L	P	E	L	K	T	R	I	L	N	309	HsDRP1	
4	L	I	P	V	I	I	N	K	L	Q	D	V	F	A	T	L	-	-	-	-	-	-	-	H	I	R	N	C	L	P	A	L	K	A	R	V	L	S	311	CeDRP	
4	L	I	S	T	I	I	N	K	L	Q	D	A	L	A	P	L	-	-	-	-	-	-	-	-	H	I	R	Q	T	L	P	E	I	K	A	K	I	I	E	343	ScVps1
7	L	I	P	T	V	I	N	K	L	Q	D	V	M	Y	D	S	-	-	-	-	-	-	-	-	H	I	R	D	K	L	P	D	I	K	T	K	L	V	N	340	ScDnm1
4	L	I	P	V	I	L	N	K	L	Q	D	V	F	N	T	L	-	-	-	-	-	-	-	-	H	I	R	D	T	L	P	D	L	K	V	K	V	I	S	303	DdDymA
137	L	L	P	I	I	L	N	K	L	Q	E	N	A	A	L	I	-	-	-	-	-	-	-	-	H	I	R	D	T	F	P	S	V	K	N	Q	I	K	R	322	DdDymB

Abb. 4.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen aus dem Bereich der N-terminalen Helix (links) und der C-terminalen Helix (rechts) der GTPase-Domänen verschiedener Dynamine. Rn: *Rattus norvegicus*, Ce: *Caenorhabditis elegans*, Hs: *Homo sapiens*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Dd: *Dictyostelium discoideum*.

	x x		x x																																						
661	T	I	R	N	L	V	D	S	Y	M	A	I	V	N	K	T	V	R	D	L	M	P	K	T	I	M	H	L	M	I	N	N	T	K	E	F	I	F	S	E	RnDyn1
655	T	I	R	N	L	V	D	S	Y	M	R	I	I	T	K	T	I	K	D	L	V	P	K	A	V	M	H	L	I	V	N	Q	T	G	E	F	M	K	D	E	CeDyn
647	V	I	E	R	L	I	K	S	Y	F	L	I	V	R	K	N	I	Q	D	S	V	P	K	A	V	M	H	F	L	V	N	H	V	K	D	T	L	Q	S	E	HsDRP1
615	I	I	E	R	L	I	R	N	Y	F	I	I	V	R	K	N	I	Q	D	S	V	P	K	A	I	M	A	L	L	V	N	F	V	R	D	N	L	Q	S	E	CeDRP
620	V	I	K	L	L	I	S	S	Y	F	N	I	V	K	R	T	I	A	D	I	I	P	K	A	L	M	L	K	L	I	V	K	S	K	T	D	I	Q	K	V	ScVps1
672	L	I	K	R	L	I	V	S	Y	F	D	I	I	R	E	M	I	E	D	Q	V	P	K	A	V	M	C	L	L	V	N	Y	C	K	D	S	V	Q	N	R	ScDnm1
764	L	I	R	E	L	L	I	S	Y	F	N	I	V	K	N	V	K	D	S	V	P	K	S	I	M	H	F	L	V	N	Q	S	K	E	H	I	Q	N	E	DdDymA	
727	L	L	R	R	L	L	L	A	Y	N	D	I	A	Q	F	N	L	Q	Q	N	T	M	K	L	V	S	L	L	L	I	D	K	S	K	D	I	L	Q	K	E	DdDymB
	x x		x x																																						
701	L	L	A	N	L	Y	S	C	G	D	Q	N	T	L	M	E	E	S	A	E	Q	A	Q	R	R	D	E	M	L	R	M	Y	H	A	L	K	E	A	L	S	RnDyn1
695	L	L	A	H	L	Y	Q	C	G	D	T	D	A	L	M	E	E	S	Q	I	E	A	Q	K	R	E	E	M	L	R	M	Y	H	A	C	K	E	A	L	P	CeDyn
687	L	V	G	Q	L	Y	K	S	S	L	L	D	D	L	L	T	E	S	E	D	M	A	Q	R	R	K	E	A	A	D	M	L	K	A	L	Q	G	A	S	Q	HsDRP1
655	L	V	R	Q	L	Y	K	P	D	E	M	D	D	L	L	A	E	T	E	D	M	A	Q	R	R	R	D	T	L	E	T	M	K	A	L	Q	A	S	V	CeDRP	
660	L	L	E	K	L	Y	G	K	Q	D	I	E	E	L	T	K	E	N	D	I	T	I	Q	R	R	K	E	C	K	M	V	E	I	L	R	N	A	S	Q	ScVps1	
712	L	V	T	K	L	Y	K	E	T	L	F	E	E	L	L	V	E	D	Q	T	L	A	Q	D	R	E	L	C	V	K	S	L	G	V	Y	K	K	A	A	T	ScDnm1
804	L	V	A	A	L	Y	K	E	E	L	F	D	E	L	L	E	E	S	P	Q	I	S	S	K	R	K	S	K	A	M	I	E	I	L	R	K	A	N	E	DdDymA	
767	L	I	D	S	L	Y	D	Q	S	S	V	D	Q	L	L	R	E	N	E	L	V	V	A	K	R	N	E	C	I	Y	K	L	D	L	L	K	K	A	K	K	DdDymB

Abb. 4.2: Hydrophobe Motive in den Aminosäuresequenzen der GEDs verschiedener Dynamine. Rn: *Rattus norvegicus*, Ce: *Caenorhabditis elegans*, Hs: *Homo sapiens*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Dd: *Dictyostelium discoideum*.

Anders als in den beiden Strukturmodellen der Dynamin A-GTPase-Domäne (Niemann *et al.*, 2002) sind im Strukturmodell der GTPase-Domäne von Dynamin 1 die Schlaufenbereiche 3, 5 und 8 sichtbar, die sich zwischen dem Rand der hydrophoben Furche und der Nukleotidbindungsstelle befinden. Zwar deuten höhere B-Faktoren auf größere Flexibilität hin (Abbildung 3.12), dennoch sind die Hauptkettenverläufe der Schlaufen in der mit 0.7σ konturierten Elektronendichtekarte deutlich zu erkennen. Schlaufenbereich 3 entspricht *switch I*, der während der Katalyse über einen Threoninrest an der Koordination von GTP beteiligt ist (Bourne *et al.*, 1990). Somit zeigt das vorgelegte Modell erstmals die gesamte Nukleotidbindungsstelle eines Dynamins im atomaren Detail.

Vergleicht man die Kristallstrukturen verschiedener GTPasen im nukleotidfreien oder GDP-gebundenen Zustand mit der entsprechenden GTP-gebundenen Form, so zeigen sich für die *switch I*- und *switch II*-Motive unterschiedliche Konformationen (Vetter und Wittinghofer, 2001). Das Ausmaß dieser Änderungen und deren Einfluß auf die Konformationen flankierender Sekundärstrukturelemente ist für verschiedene GTPasen sehr unterschiedlich (Vetter und Wittinghofer, 2001). So verschiebt sich z.B. das *switch I*-Threonin in hGBP1 im Übergang vom nukleotidfreien in den GTP-gebundenen Zustand um mehr als 6 Å (Prakash *et al.*, 2000a und 2000b). Die Threoninseitenkette ist in nukleotidfreien und GDP-gebundenen Strukturen im allgemeinen von der Nukleotidbindungsstelle abgewandt und klappt bei GTP-Bindung in Richtung des Nukleotids. Vergleicht man die Kristallstruktur der GTPase-Domäne von Dynamin 1 mit den GTP-Strukturen von hGBP1 (Prakash *et al.*, 2000b) und Ras (Pai *et al.*, 1990), so zeigt sich, daß Position und Orientierung von Thr65 in Dynamin 1 eher der GTP-Konformation entsprechen als der nukleotidfreien. In Dynamin 1 folgen auf das konservierte Threonin zwei Arginine, die über Wasserstoffbrücken, sowie zwei Salzbrücken mit Helix α B, Strang β 2B und Schlaufe 5 wechselwirken (s. Abschnitt 3.3). Die beiden Argininreste sind innerhalb der Dynamin-Familie hochkonserviert (Abbildung 4.3), fehlen jedoch in den meisten anderen GTPasen (Bourne *et al.*, 1991). Durch die Wechselwirkungen der Argininseitenketten mit festeren Bereichen des Proteins wird Thr65 in seiner der GTP-Bindungsstelle zugewandten Position fixiert, was sich auch in relativ niedrigen Temperaturfaktoren für Threonin und die beiden Arginine äußert

(Abbildung 3.12). Es ist daher anzunehmen, daß in Dynamin 1 im Gegensatz zu anderen GTPasen keine größere Umlagerung von *switch I* erfolgt, wenn GTP gebunden wird.

```

52 V G R D F L P R G S G I V T R R P L 69 RnDyn1
54 V G K D F L P R G S G I V T R R P L 71 CeDyn
46 V G R D L L P R G T G I V T R R P L 63 HsDRP1
48 V G R D F L P R G T G I V T R R P L 65 CeDRP
50 V G R D F L P R G T G I V T R R P L 67 ScVps1
49 V G R D F L P R G T G I V T R R P L 66 ScDnm1
46 V G R D F L P R G S G I V T R R P L 63 DdDymA
178 V G R D F L P R G S G L V T R R P L 195 DdDymB

```

Abb. 4.3: Vergleich der Aminosäuresequenzen im Bereich um *switch I* der GTPase-Domänen verschiedener Dynamine. Rn: *Rattus norvegicus*, Ce: *Caenorhabditis elegans*, Hs: *Homo sapiens*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Dd: *Dictyostelium discoideum*.

Wie bereits diskutiert wurde, ist unklar, ob die GED zur GTP-Hydrolyse einen katalytisch aktiven Argininrest in die GTPase-Domäne von Dynaminen einbringt. Ein solcher Argininrest könnte jedoch auch bereits in der GTPase-Domäne selbst enthalten sein, wie z.B. für die α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine gezeigt werden konnte (Hamm und Gilchrist, 1996). Von allen Argininen, die innerhalb der GTPase-Domäne von Dynaminen konserviert sind, liegen in Dynamin 1 nur Arg 59, Arg 66 und Arg 67 nahe genug am Hydrolyseort.

Arg66 und Arg67 weisen von der Nukleotidbindungsstelle weg und stabilisieren die Ausrichtung von Thr65 für die Koordination des Nukleotids. Die Umorientierung einer der beiden Seitenketten würde simultan die Threonin-Seitenkette aus ihrer für die Koordination des Magnesiumions notwendigen Lage entfernen. Zudem sind beide Seitenketten in Wasserstoffbrückenbindungen oder Salzbrücken zum umgebenden Protein involviert. Daher können Arg66 und Arg67 nicht die Rolle eines katalytischen Arginins übernehmen.

Hingegen befindet sich Arg59 im Schlaufenbereich, der dem Threonin vorausgeht und nur wenige Wechselwirkungen mit angrenzenden Strukturelementen zeigt. Die Seitenkette von Arg59 ist lediglich über ein Wassermolekül mit Glu102 aus der Helix α B verbunden. Eine Konformationsänderung der Schlaufe könnte die Guanidiniumgruppe von Arg59 in die Nähe des Nukleotid- γ -Phosphats bringen, ohne die Lage von Thr65 und damit die Magnesium-Koordination zu stören. Daher ist eine katalytische Funktion von Arg59 denkbar.

Die vorgelegte Kristallstruktur von Myosin II zeigt erstmals eine Myosin-Konformation mit offenem *switch I*. Öffnen von *switch I* geht einher mit einer partiellen Auffächerung des zentralen Faltblatts, die zu einer Umlagerung der 50K-Domäne führt und die Spalte zwischen den 50K-Subdomänen im inneren Teil verengt.

Eine Umlagerung des zentralen Faltblatts wurde bisher nur in Arf-ähnlichen kleinen GTPasen beobachtet, die dadurch zwischen den Konformationen für GTP- bzw. GDP-Bindung umschalten (Pasqualato *et al.*, 2002). In Arf-ähnlichen GTPasen verschieben sich drei Faltblattstränge so gegeneinander, daß das Wasserstoffbrückenbindungsmuster um zwei Reste verschoben wird. Dagegen bleibt in Myosin das Wasserstoffbrückenbindungsmuster zwischen den Faltblattsträngen beim Wechsel zwischen den Konformationen erhalten, wodurch ein geschmeidiges Laufen des Motors möglich ist.

Bislang existiert noch keine Kristallstruktur, die dem Rigorzustand von an Aktin gebundenem Myosin entsprechen würde. Die Kristallstruktur von nukleotidfreiem Myosin S1 aus dem Haushuhn wurde zunächst als Rigorzustand klassifiziert, da sich die Struktur gut in die Elektronendichtekarte von dekoriertem Aktin einpassen ließ (Rayment *et al.*, 1993a; Schröder *et al.*, 1993). Später zeigte sich jedoch, daß diese Struktur der G/O-Konformation entspricht.

Die Eigenschaften des Rigorzustands wurden von Geeves und Holmes (1999) postuliert. Im Rigorzustand sollte Myosin demnach sehr geringe Nukleotid- und Phosphataffinitäten besitzen und katalytisch inkompetent sein. Der Hebelarm müßte sich in der Position nach dem Kraftschlag befinden, wobei *switch II* weiter geöffnet sein sollte als in der G/O-Konformation. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Myosin S1 aus glattem Muskel zeigen, daß sich die Spalte der 50K-Domäne beim Übergang in den Rigorzustand schließt (Volkman *et al.*, 2000). Dies geschieht durch eine Verschiebung von Strukturelementen der oberen 50K-Domäne, während die untere 50K-Domäne am Aktinfilament fixiert bleibt.

Die O/O-Konformation von Myosin kann kein Nukleotid binden und ist dadurch katalytisch inkompetent. Wesentliche Wechselwirkungspartner für das Magnesiumion und das Nukleotid liegen in der offenen Stellung von *switch I* und der beobachteten weit geöffneten Stellung von *switch II* nicht mehr nahe genug am Bindungsort (Abbildung 3.32

und Tabelle 3.6). Desweiteren sind die beiden 50K-Domänen in der O/O-Konformation weiter gegeneinander verschoben als bisher in anderen Myosin-Konformationen beobachtet wurde (Abbildungen 3.26 und 3.27). Ob die Positionierung der 50K-Subdomänen in der O/O-Konformation der von Volkmann *et al.* (2000) beobachteten geschlossenen Spalte entspricht, kann aus der Kristallstruktur allein nicht beurteilt werden.

Unter Einbeziehung der strukturellen Informationen über die O/O-Konformation kann erstmals der gesamte Ablauf der Produktfreisetzung rekonstruiert werden.

Aus kinetischen Untersuchungen gilt als gesichert, daß Phosphat vor ADP freigesetzt wird (Trentham *et al.*, 1976; Geeves *et al.*, 1984). Durch eine Aktin-induzierte Konformationsänderung öffnet sich die Phosphatbindungstasche der G/G-Konformation. Es wird angenommen, daß sich dabei *switch II* öffnet (Geeves und Holmes, 1999; Houdusse und Sweeney, 2001). Die offene Stellung von *switch II*, wie sie in der G/O-Konformation beobachtet wird, beeinträchtigt jedoch nicht die Koordination des Nukleotids durch Proteinatome (Abbildung 3.32).

Die vorliegende O/O-Struktur zeigt, daß die ADP-Bindungstasche durch Verschiebung von *switch I* geöffnet (Abbildung 3.33) und die Magnesiumkoordination zerstört wird. Durch Öffnen von *switch I* wird Ser237 aus der Koordinationssphäre des Magnesiumions entfernt. Aus Mutationsstudien an Myosin II aus *D. discoideum* geht hervor, daß Ser237 für die Nukleotidbindung essentiell ist (Shimada *et al.*, 1997). Geeves und Holmes (1999) haben formuliert, daß ADP durch Schwächung der Magnesiumkoordination freigesetzt wird. Dabei wurde allerdings *switch I* nicht berücksichtigt, sondern es wurde vorgeschlagen, daß nach Phosphatfreisetzung eine weitere Aktin-induzierte Konformationsänderung *switch II* weiter öffnet und dadurch die Wasser-vermittelte Wechselwirkung von Asp454 mit dem Magnesiumion verloren geht. Eine solche Verschiebung von *switch II* weiter weg von der Nukleotidbindungsstelle ist in der O/O-Konformation zu beobachten (Abbildung 3.33 und Tabelle 3.6).

Anhand der Kristallstruktur der O/O-Konformation von Myosin wird klar, daß Nukleotid- und Aktinbindungsstelle nicht nur über *switch II*, sondern auch über *switch I* miteinander kommunizieren können. Umschalten von *switch I* verändert über das zentrale Faltblatt die

Geometrie der Aktinbindungsstelle am äußeren Ende der 50K-Spalte. Es ist anzunehmen, daß auch umgekehrt Aktin-induzierte Veränderungen der 50K-Spalte ein Umschalten von *switch I* bewirken können.

Dabei können sich *Switch I* und *switch II* nicht völlig unabhängig voneinander bewegen. *Switch I* kann nicht öffnen, solange *switch II* geschlossen ist. Beim Übergang vom G/G- in den O/G-Zustand würde *switch I* mit *switch II* kollidieren (Abbildung 3.33). Ebenso kann *switch II* sich nicht wieder schließen, solange *switch I* offen ist. *Switch I* kann nur in seine geschlossene Position ausweichen, da die umgebenden Strukturelemente eine Seitwärtsbewegung von *switch I* verhindern. Außerdem wirken die Wechselwirkungen zwischen *switch I*-Strang und dem benachbarten *switch II*-Strang, wie auch die Salzbrücke Arg238-Glu459 zwischen *switch I* und *switch II*, einer Seitwärtsbewegung entgegen. Die Abfolge der Einzelereignisse von Öffnen und Schließen der Schalter ist also durch die Architektur des Proteins vorgegeben. Damit erscheint die Existenz eines O/G-Zustandes unwahrscheinlich.

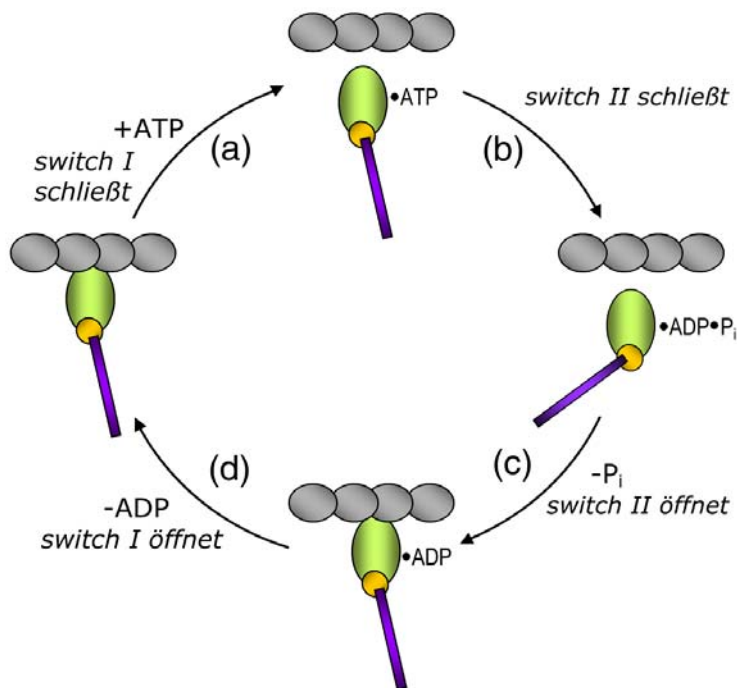


Abb. 4.4: Schema des Aktin-Myosin-ATPase-Zyklus unter Berücksichtigung der Stellung von *switch I*. Die Symbole sind identisch mit Abbildung 1.9.

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Röntgenstrukturanalyse von Myosin II ergänzen das bisherige Bild des Akto-Myosin-ATPase-Zyklus (Abbildung 4.4).

Nach dem Kraftschlag und der Dissoziation von Phosphat durch Öffnen von *switch II* (c) muß *switch I* öffnen, um auch ADP freizusetzen (d). Nach Erreichen des Rigorzustands schließt sich *switch I* mit der Bindung von ATP und der Myosinkopf dissoziiert vom Aktinfilament (a).

Die Eigenschaften des hier vorgelegten Strukturmodells entsprechen in hohem Maße denen des von Geeves und Holmes (1999) postulierten Rigorzustands. Auch wenn aus der Kristallstruktur nicht hervorgeht, ob die Orientierung der 50K-Subdomänen der Geometrie des Rigorzustandes entspricht, muß die O/O-Konformation im Akto-Myosin-ATPase-Zyklus zumindest in unmittelbarer Nähe zum Rigorzustand eingeordnet werden.

Literaturverzeichnis

Arndt, U.W. und Wonacott, A.J. (Hrsg.) (1977). The rotation method in crystallography. North Holland Publishing Co., Amsterdam.

Bahler, M. und Rhoads, A. (2002). Calmodulin signaling via the IQ motif. *FEBS Lett.* **20**, 107-113.

Baker, J.P. und Titus, M.A. (1998). Myosins: matching functions with motors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 80-86.

Barylko, B., Binns, 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.

Bauer, C.B., Holden, H.M., Thoden, J.B., Smith, R. und Rayment, I. (2000). X-ray structures of the apo and MgATP-bound states of *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain. *J. Biol. Chem.* **275**, 38494-38499.

Berghäuser, J. (1975). Reactive arginine in adenylate kinase. *Biochim. Biophys. Acta* **397**, 370-376.

Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. und Bourne, P.E. (2000). The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235-242.

Bourne, H.R., Sanders, D.A. und McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**, 125-132.

Bourne, H.R., Sanders, D.A., und McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**, 117-127.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Brünger, A.T. (1993). Assessment of phase accuracy by cross validation: the free R value. Methods and applications. *Acta Cryst.* **D49**, 24-36.

Brünger A.T., Adams P.D., Clore G.M., DeLano W.L., Gros P., Grosse-Kunstleve W., Jiang J.-S., Kuszewski J., Nilges M., Pannu N.S., Read R.J., Rice L.M., Simonson T. und Warren G.L. (1998). Crystallography and NMR System (CNS): A new software system for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.* **D54**, 905-921.

Cao, H., Garcia, F. und McNiven, M.A. (1998). Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **9**, 2595-2609.

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.

Chen, M.S., Obar, R.A., Schroeder, C.C., Austin, T.W., Poodry, C.A., Wadsworth, S.C. und Vallee, R.B. (1991). Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a *Drosophila* gene involved in endocytosis. *Nature* **351**, 583-586.

Chishti, A.H., Kim, A.C., Marfatia, S.M., Lutchman, M., Hanspal, M., Jindal, H., Liu, S.C., Low, P.S., Rouleau, G.A., Mohandas, N., Chasis, J.A., Conboy, J.G., Gascard, P., Takakuwa, Y., Huang, S.C., Benz, E.J. Jr., Bretscher, A., Fehon, R.G., Gusella, J.F., Ramesh, V., Solomon, F., Marchesi, V.T., Tsukita, S., Tsukita, S., Arpin, M., Louvard, D., Tonks, N.K., Anderson, J.M., Fanning, A.S., Bryant, P.J., Woods, D.F. und Hoover, K.B. (1998). The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem.Sci.* **23**, 281-282.

Clark, S.G., Shurland, D.L., Meyerowitz, E.M., Bargmann, C.I. und van der Blik, 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.

Cook, T.A., Urrutia, R. und McNiven, M.A. (1994). Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 644-648.

Cook, T., Mesa, K. und Urrutia, R. (1996). Three dynamin-encoding genes are differentially expressed in developing rat brain. *J. Neurochem.* **67**, 927-931.

Cooke, R. (1986). The mechanism of muscle contraction. *CRC Crit Rev. Biochem.* **21**, 53-118. Review.

Cooke, R. (1999). Myosin structure: does the tail wag the dog?. *Curr. Biol.* **9**, R773-R775.

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.

De Hostos, E.L., Bradtke, B., Lottspeich, F., Guggenheim, R. und Gerisch, G. (1991). Coronin, an actin binding protein of *Dictyostelium discoideum* localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits. *EMBO J.* **10**, 4097-4104.

Drenth, J. (1994). Principles of protein X-ray crystallography. Springer, NewYork.

Eccleston, J.F., Binns, D.D., Davis, C.T., Albanesi, J.P. und Jameson, D.M. (2002). Oligomerization and kinetic mechanism of the dynamin GTPase. *Eur. Biophys. J.* **31**, 275-282.

Feuerstein, J., Kalbitzer, H.R., John, J., Goody, R.S. und Wittinghofer, A. (1987). Characterisation of the metal-ion-GDP complex at the active sites of transforming and nontransforming p21 proteins by observation of the ¹⁷O-Mn superhyperfine coupling and by kinetic methods. *Eur. J. Biochem.* **162**, 49-55.

Fisher, A.J., Smith, C.A., Thoden, J.B., Smith, R., Sutoh, K., Holden, H.M. und Rayment, I. (1995). X-ray structures of the myosin motor domain of *Dictyostelium discoideum* complexed with MgADP·BeF_x and MgADP·AlF₄⁻. *Biochemistry* **34**, 8960-8972.

Furch, M., Fujita-Becker, S., Geeves, M.A., Holmes, K.C., und Manstein, D.J. (1999). Role of the salt-bridge between switch-1 and switch-2 of *Dictyostelium* myosin. *J. Mol. Biol.* **290**, 797-809.

- Gammie, A.E., Kurihara, L.J., Vallee, R.B., und Rose, M.D. (1995).** DNMI, a dynamin-related gene, participates in endosomal trafficking in yeast. *J. Cell Biol.* **130**, 553-566.
- Garman, E. und Schneider, T.R. (1997).** Macromolecular cryocrystallography. *J. Appl. Cryst.* **30**, 211-237.
- Geeves, M.A., Goody, R.S. und Gutfreund H. (1984).** Kinetics of acto-S1 interaction as a guide to a model for the crossbridge cycle. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* **5**, 351-61.
- Geeves, M.A. und Holmes, K.C. (1999).** Structural mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 687-728.
- Gideon, P., John, J., Frech, M., Lautwein, A., Clark, R., Scheffler, J.E. und Wittinghofer, A. (1992).** Mutational and kinetic analyses of the GTPase-activating protein (GAP)-p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity. *Mol. Cell Biol.* **12**, 2050-2056.
- 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.
- Gu, X. und Verma, D.P. (1996).** Phragmoplastin, a dynamin-like protein associated with cell plate formation in plants. *EMBO J.* **15**, 695-704.
- Gulick, A.M., Bauer, C.B., Thoden, J.B. und Rayment, I. (1997).** X-ray structures of the MgADP, MgATP γ S, and MgAMPPNP complexes of the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain. *Biochemistry* **36**, 11619-11628.
- Hamill, D.R. und Suprenant, K.A. (1997).** Characterization of the sea urchin major vault protein: a possible role for vault ribonucleoprotein particles in nucleocytoplasmic transport. *Dev. Biol.* **190**, 117-128.
- Hamm, H.E. und Gilchrist, A. (1996).** Heterotrimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 189-196.
- Harrison, A. und King, S.M. (2000).** The molecular anatomy of dynein. *Essays Biochem.* **35**, 75-87.
- Herskovits, J.S., Burgess, C.C., Obar, R.A. und Vallee, R.B. (1993a).** Effects of mutant rat dynamin on endocytosis. *J. Cell Biol.* **122**, 565-578.
- Herskovits, J.S., Bugess, C.C., Obar, R.A. und Vallee, R.B. (1993b).** Microtubules and Src homology 3 domains stimulate the dynamin GTPase via its C-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11468-11472.
- Hinshaw, J.E. und Schmid, S.L. (1995).** Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* **374**, 190-192.
- Hirokawa, N., Noda, Y. und Okada, Y. (1998).** Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 60-73.
- Hodge, T. und Cope, M.J.T.V. (2000).** A myosin family tree. *J. Cell Sci.* **113**, 3353-3354.

-
- Holmes, K.C. (1997).** The swinging lever arm hypothesis of muscle contraction. *Curr. Biol.* **7**, R112-R118.
- Houdusse, A. und Cohen, C. (1996).** Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2Å resolution: implications for regulation. *Structure* **4**, 21-32.
- Houdusse, A., Kalabokis, V.N., Himmel, D., Szent-Györgyi, A.G. und Cohen, C. (1999).** Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: a novel conformation of the myosin head. *Cell* **97**, 459-470.
- Houdusse, A., Szent-Györgyi, A.G. und Cohen, C. (2000).** Three conformational states of scallop myosin S1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 11238-11243.
- Houdusse, A. und Sweeney, H.L. (2001).** Myosin motors: missing structures and hidden springs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 182-194.
- Huxley, A.F. und R.M. Niedergerke (1954).** Structural changes in muscle during contraction. Interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* **173**, 971-973.
- Huxley, H.E. und Hanson, J. (1954).** The cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* **173**, 973-976.
- Huxley, H.E. (1957).** The double array of filaments in cross-striated muscle. *Biophysic. and Biochem. Cytol.* **3**, 631-648.
- Huxley, H.E. (1958).** The contraction of muscle. *Scientific American* **199**, 66-82.
- Huxley, H.E. (1969).** The Mechanism of Muscular Contraction. *Science* **164**, 1356-1365.
- John, J., Schlichting, I., Schiltz, E., Rösch, P. und Wittinghofer, A. (1989).** C-terminal truncation of p21H preserves crucial kinetic and structural properties. *J. Biol. Chem.* **264**, 13086-13092.
- 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. *Biochem.* **29**, 6058-6065.
- Jones, B.A. und Fangman, W.L. (1992).** Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes & Development* **6**, 380-389.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. und Kjeldgaard, M. (1991).** Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst.* **A47**, 110-119.
- Kabsch, W. (1993).** Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *Journal of Applied Crystallography* **26**, 795-800.
- Kang, S.G., Jin, J.B., Piao, H.L., Pih, K.T., Jang, H.J., Lim, J.H. und Hwang, I. (1998).** Molecular cloning of an Arabidopsis cDNA encoding a dynamin-like protein that is localized to plastids. *Plant Mol. Biol.* **38**, 437-447.

- Karki, S. und Holzbaur, E.L. (1999).** Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 45-53.
- Kay, B.K., Williamson, M.P. und Sudol, M. (2000).** The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* **14**, 231-241.
- Kedersha, N.L. und Rome, L.H. (1986).** Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: large structures contain a single species of small RNA. *J. Cell Biol.* **103**, 699-709.
- Kedersha, N.L. und Rome, L.H. (1990).** Vaults: large cytoplasmic RNP's that associate with cytoskeletal elements. *Mol. Biol. Rep.* **14**, 121-122.
- Kedersha, N.L., Miquel, M.C., Bittner, D. und Rome, L.H. (1990).** Vaults. II. Ribonucleoprotein structures are highly conserved among higher and lower eukaryotes. *J. Cell Biol.* **110**, 895-901.
- King SM. (2000).** The dynein microtubule motor. *Biochim. Biophys. Acta.* **1496**, 60-75.
- Kjeldgaard, M., Nyborg, J. und Clark, B.F. (1996).** The GTP binding motif: variations on a theme. *Faseb J.* **10**, 1347-1368.
- Klockow, B. (2001).** Die GTPase Dynamin A – Strukturelle und biochemische Hinweise auf einen molekularen Motor. *Dissertation an der Universität Heidelberg.*
- Klockow, B., Tichelaar, W., Madden, D., Niemann, H.H., Akiba, T., Hirose, K. und Manstein, D.J. (2002).** The dynamin A ring complex: molecular organization and nucleotide-dependent conformational changes. *EMBO J.* **21**, 240-250.
- Kochs, G., Trost, M., Janzen, C. und Haller, O.(1998).** MxA GTPase: oligomerization and GTP-dependent interaction with viral RNP target structures. *Methods* **15**, 255–263.
- Koenig, J.H. und Ikeda, K. (1983).** Evidence for a presynaptic blockage of transmission in a temperature- sensitive mutant of Drosophila. *J. Neurobiol.* **14**, 411-419.
- 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).** Possible temperature-dependent blockage of synaptic vesicle recycling induced by a single gene mutation in Drosophila. *J. Neurobiol.* **14**, 207-225.
- 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.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. und Thornton, J.M. (1993).** PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**, 283-291.

- Luzzati, P.V. (1952).** Traitement statistique des erreurs dans la détermination des structures cristallines. *Acta Cryst* **5**, 802.
- Lynn, R.W. und E.W. Taylor (1971).** Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis of actomyosin. *Biochemistry* **10**, 4617-4624.
- Mandelkow, E. und Johnson, K.A. (1998).** The structural and mechanochemical cycle of kinesin. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 429-433.
- 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.
- Manstein, D.J., Kull, F.J., Knetsch, M.L.W. und Niemann, H.H. (2001).** Protein expression and structure solution using specific fusion vectors. *Patentantrag 01100762.2-2118*.
- 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.
- Mayer, B.J. und Gupta, R. (1998).** Functions of SH2 and SH3 domains. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **228**, 1-22.
- McPherson, A. (1976).** The growth and preliminary investigations of protein and nucleic acid crystals for X-ray diffraction analysis. *Methods Biochem. Anal.* **23**, 249-345
- McPherson, A. (1990).** Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur. J. Biochem.* **189**, 1-23.
- Mermall, V., Post, P.L. und Mooseker, M.S. (1998).** Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* **279**, 527-533.
- Miroshnichenko, N.S., Balanuk, I.V. und Nozdrenko, D.N. (2000).** Packing of myosin molecules in muscle thick filaments. *Cell Biol. Int.* **24**, 327-333
- Mornet, D., Pantel, P., Audemard, E. und Kassab, R. (1979).** The limited tryptic cleavage of chymotryptic S-1: an approach to the characterization of the actin site in myosin heads. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **89**, 925-932.
- Muhlberg, A.B., Warnock, D.E. und Schmid, S.L. (1997).** Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. *EMBO J.* **16**, 6676-83.
- 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.
- Nakata, T., Takemura, R. und Hirokawa, N. (1993).** A novel member of the dynamin family of GTP-binding proteins is expressed specifically in the testis. *J. Cell Sci.* **105**, 1-5.
- Niemann, H.H., Knetsch, M.L., Scherer, A., Manstein, D.J. und Kull, F.J. (2001).** Crystal structure of a dynamin GTPase domain in both nucleotide-free and GDP-bound forms. *EMBO J.* **20**, 5813-5821.

- Niemann, H.H. (2002).** X-ray crystallographic studies of dynamin GTPases: crystal structure of the dynamin A GTPase domain. *Dissertation an der Universität Heidelberg*.
- Nishida, K., Takahara, M., Miyagishima, S., Kuroiwa, H., Matsuzaki, M. und Kuroiwa, T. (2003).** Dynamic recruitment of dynamin for final mitochondrial severance in a primitive red alga. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**, 2146-2151.
- Noda, Y., Nakata, T. und Hirokawa, N. (1993).** Localization of dynamin: widespread distribution in mature neurons and association with membranous organelles. *Neurosciences* **55**: 113-127.
- Nöthe, H.B. und Manstein, D.J. (1999).** Functional characterization of *Dictyostelium* dynamin B. *Mol. Biol. Cell* **10**, Supl. 314A.
- Obar, R.A., Collins, C.A., Hammarback, J.A., Shpetner, H.S. und Vallee, R.B. (1990).** Molecular cloning of the microtubule-associated mechanochemical enzyme dynamin reveals homology with a new family of GTP-binding proteins. *Nature* **347**, 256-261.
- 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.
- Pai, E.F., Kabsch, W., Kregel, 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.
- Pai, E.F., Kregel, U., Petsko, G.A., Goody, R.S., Kabsch, W. und Wittinghofer, A. (1990).** Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J.* **9**, 2351-2359.
- Park, J.M., Kang, S.G., Pih, K.T., Jang, H.J., Piao, H.L., Yoon, H.W., Cho, M.J. und Hwang, I. (1997).** A dynamin-like protein, ADL1, is present in membranes as a high-molecular-mass complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Phys.* **115**, 763-771.
- Paschal, B.M., Shpetner, H.S. und Vallee, R.B. (1987).** MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. *J. Cell Biol.* **105**: 1273-1282.
- Pasqualato, S., Renault, L. und Cherfils, J. (2002).** Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for 'front-back' communication. *EMBO Rep.* **3**, 1035-41.
- Poodry, C.A., Hall, L. und Suzuki, D.T. (1973).** Developmental properties of Shibire: a pleiotropic mutation affecting larval and adult locomotion and development. *Dev. Biol.* **32**, 373-386.
- Prakash, B., Praefcke, G.J., Renault, L., Wittinghofer, A. und Herrmann, C. (2000a).** Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins. *Nature* **403**, 567-571.

- Prakash, B., Renault, L., Praefcke, G.J., Herrmann, C. und Wittinghofer, A. (2000b).** Triphosphate structure of guanylate-binding protein 1 and implications for nucleotide binding and GTPase mechanism. *EMBO J* **19**, 4555-4564.
- Ramakrishnan, C. und Ramachandran, G.N. (1965).** Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations. II. Allowed conformations for a pair of peptide units. *Biophys. J.* **5**, 909-933.
- Rayment, I., Holden, H.M., Whittaker, M., Yohn, C.B., Lorenz, M., Holmes, K.C. und Milligan, R.A. (1993a).** Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* **261**, 58-65.
- Rayment, I., Rypniewski, W.R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, Benning, M.M., Winkelmann, D.A., Wesenberg, G. und Holden, H.M. (1993b).** Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* **261**, 50-58.
- Read, R.J. (1986).** Improved Fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors. *Acta Cryst.* **A42**, 140-149.
- Rebecchi, M.J. und Scarlata, S. (1998).** Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 503-528.
- 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.
- Rodgers, D.W. (1994).** Cryocrystallography. *Structure* **2**, 1135-1140.
- Rossmann, M.G. (Hrsg.) (1972).** The molecular replacement method. *Int. Sci. Rev. Ser.* **13**, Gordon & Breach, New York.
- Rothman, J.H. und Stevens, T.H. (1986).** Protein sorting in yeast: mutants defective in vacuole biogenesis mislocalize vacuolar proteins into the late secretory pathway. *Cell* **47**, 1041-1051.
- 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.
- Scaife, R. und Margolis, R.L. (1993).** Biochemical and immunochemical analysis of rat brain dynamin interaction with microtubules and organelles in vivo and in vitro. *J. Cell Biol.* **111**: 3023-3033.
- Scheffer, G.L., Wijngaard, P.L., Flens, M.J., Izquierdo, M.A., Slovak, M.L., Pinedo, H.M., Meijer, C.J., Clevers, H.C. und Scheper, R.J. (1995).** The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat. Med.* **1**, 578-582.
- Scheffer, G.L., Schroeijers, A.B., Izquierdo, M.A., Wiemer, E.A. und Scheper, R.J. (2000).** Lung resistance-related protein/major vault protein and vaults in multidrug-resistant cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **12**, 550-556.
- Schliwa, M (Hrsg.) (2003).** Molecular motors. Wiley-VCH, 2003.

- Schröder R.R., Manstein D.J., Jahn W., Holden H., Rayment I., Holmes K.C. und Spudich J.A. (1993).** Three-dimensional atomic model of F-actin decorated with *Dictyostelium* myosin S1. *Nature* **364**, 171-174.
- Sever, S., Muhlberg, A.B. und Schmid, S.L. (1999).** Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature* **398**, 481-486.
- Shea, T.B. und Flanagan, L.A. (2001).** Kinesin, dynein and neurofilament transport. *Trends Neurosci.* **24**, 644-648.
- Shimada, T., Sasaki, N., Ohkura, R. und Sutoh, K. (1997).** Alanine scanning mutagenesis of the switch I region in the ATPase site of *Dictyostelium discoideum* myosin II. *Biochem.* **36**, 14037-43.
- 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.
- 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.
- 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.
- Smith, C.A. und Rayment, I. (1996).** X-ray structure of the magnesium(II).ADP.vanadate complex of the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain to 1.9 Å resolution. *Biochem.* **35**, 5404-5417.
- Sokac, A.M. und Bement, W.M. (2000).** Regulation and expression of metazoan unconventional myosins. *Int. Rev. Cytol.* **200**, 197-304.
- Song, B.D. und Schmid, S.L. (2003).** A molecular motor or a regulator? Dynamin's in a class of its own. *Biochem.* **42**, 1369-1376.
- Sontag, J.M., Fykse, E.M., Ushkaryov, Y., Liu, J.P., Robinson, P.J. und Südhof, T.C. (1994).** Differential expression and regulation of multiple dynamins. *J. Biol. Chem.* **269**, 4547-4554.
- 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.
- Spudich, J.A. (2001).** The myosin swinging cross-bridge model. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 387-392.
- Stout, G.H. und Jensen, L.H. (1989).** X-ray structure determination. John Wiley & Sons, New York.

- Stowell, M.H., Marks, B., Wigge, P. und McMahon, H.T. (1999).** Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat. Cell Biol.* **1**, 27-32.
- Sweitzer, S.M. und Hinshaw, J.E. (1998).** Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* **93**, 1021-1029.
- Suprenant, K.A. (2002).** Vault ribonucleoprotein particles: sarcophagi, gondolas, or safety deposit boxes? *Biochem.* **41**, 14447-14454.
- 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.
- Thaller, C., Eichele, G., Weaver, L.H., Wilson, E., Karlsson, R. und Jansonius, J.N. (1985).** Seed enlargement and repeated seeding. *Methods Enzymol.* **114**, 132-135.
- 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.
- Trentham, D.R., Eccleston, J.F. und Bagshaw, C.R. (1976).** Kinetic analysis of ATPase mechanisms. *Q. Rev. Biophys.* **9**, 217-281.
- 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.
- Tuxworth, R.I. und Titus, M.A. (2000).** Unconventional myosins: anchors in the membrane traffic relay. *Traffic* **1**, 11-18.
- 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., Redelmeier, T.E., Damke, H., Tisdale, E.J., Meyerowitz, E.M. und Schmid, S.L. (1993).** Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J. Cell Biol.* **122**, 553-563.
- van der Blik, A.M. (1999).** Functional diversity in the dynamin family. *Trends Cell Biol.* **9**, 96-102.
- Vasu, S.K. und Rome, L.H. (1995).** Dictyostelium vaults: Disruption of the major proteins reveals growth and morphological defects and uncovers a new associated protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 16588-16594.
- Verhey, K.J. und Rapoport, T.A. (2001).** Kinesin carries the signal. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 545-550.
- Vetter, I.R. und Wittinghofer, A. (2001).** The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*. **294**, 1299-1304.

-
- Voet, D. und Voet, J.G. (1995).** *Biochemistry*. John Wiley & Sons, New York.
- Volkman, N., Hanein, D., Ouyang, G., Trybus, K.M., DeRosier, D.J. und Lowey, S. (2000).** Evidence for cleft closure in actomyosin upon ADP release. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1147-55.
- Walczak, C.E. und Nelson, D.L. (1994).** Regulation of dynein-driven motility in cilia and flagella. *Cell Motil. Cytoskel.* **27**, 101-107.
- Warnock, D.E., Hinshaw, J.E. und Schmid, S.L. (1996).** Dynamin self-assembly stimulates its GTPase activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 22310-22314.
- Wienke, D.C., Knetsch, M.L., 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.
- Wienke, D.C. (1998).** Funktionelle Charakterisierung von Dynamin A aus *Dictyostelium discoideum*. Technische Universität Darmstadt.
- Zhang, P. und Hinshaw, J.E. (2001).** Three-dimensional reconstruction of dynamin in the constricted state. *Nat. Cell. Biol.* **3**, 922-926.
- Zhang, Z., Hong, Z. und Verma, D.P.S. (2000).** Phragmoplastin polymerizes into spiral coiled structures via intermolecular interaction of two selfassembly domains. *J. Biol. Chem.* **275**, 8779-8784.

Abkürzungsverzeichnis

ADL	<i>Arabidopsis dynamin-like</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
Da	Dalton (Einheit der relativen Atommasse)
<i>D. discoideum (Dd)</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i> (Sozialamöbe)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DEAE	Diethylaminoethyl
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosintriphosphat
GED	GTPase-Effektor-Domäne
GEF	Gunaninnukleotidaustauschfaktor
GTP	Guanosindiphosphat
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazinoethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasenpaare
M	molar
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
Mgm1p	<i>Mitochondrial genome maintenance 1 protein</i>
min	Minute
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglycol
PHD	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRD	prolinreiche Domäne
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
s	Sekunde
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH3	Src
TBS	<i>tris buffered saline</i>
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
Vps1p	<i>Vacuolar protein sorting 1 protein</i>

Herstellernachweis

ADSC	Area Detector Systems Cooperation, Poway, USA
Amersham Pharmacia	Freiburg, Deutschland
Bayer	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Beckman	Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA
Bio-Rad	München, Deutschland
Enraf-Nonius	Delft, Holland
Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
Hampton	Hampton Research, Laguna Niguel, USA
Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Oxford Cryosystems	Oxford, Großbritannien
Philips	Philips GmbH, Hamburg, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
Roche	Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Schleicher & Schuell	Düren, Deutschland
Taylor-Wharton	Husum, Deutschland
United States Biochemical	Cleveland, USA
Wheaton	Millville, USA
X-Ray Research	Norderstedt, Deutschland

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Jürgen Wolfrum möchte ich für die Betreuung dieser interdisziplinären Arbeit danken.

Prof. Dr. Dietmar J. Manstein danke ich für die Bereitstellung eines hochinteressanten Themas, für die Gewährleistung großer wissenschaftlicher Freiheit und für sein großes Vertrauen, das er mir und dem Projekt entgegengebracht hat.

Herrn Prof. Dr. Kenneth C. Holmes danke ich für die Bereitstellung von Forschungsmitteln und eines Arbeitsplatzes, sein Interesse an meiner Arbeit und für seine Weihnachtsfeiern.

Bei Dr. Heike Nöthe, Dr. Muriel Erent, Dr. Setsuko Fujita-Becker, Dr. Georgios Tsiavaliaris, Dr. Ulrike Dürrwang, Dr. Martin Kollmar, Dr. Geraldina Santandrea, Sabine Zimmermann, Ursula Rühl, Anna Scherer, Roman Grydziuk, Monika Reichert, Carina Wagner, Christian Waßmann, Renate Schuhmann und Nora Eifler bedanke ich mich für die gute Laborgemeinschaft.

Hartmut Niemann und Boris Klockow danke ich ganz besonders für ihre Unterstützung und ihre Freundschaft außerhalb des Labors.

Ganz besonderer Dank geht an Dr. Susanne Eschenburg und Dr. Andreas Becker für ihre kompetente Einführung in die Welt der Proteinkristallographie.

Bei Anna Scherer bedanke ich mich für wertvolle Hilfe bei praktischen Belangen der Proteinkristallisation.

Ich danke Dr. Wolfgang Kabsch und Dr. Karin Fritz-Wolf für ihre Hilfsbereitschaft und ihr offenes Ohr bei Fragen jedweder Art.

Dr. Willem Tichelaar und Frau Helga Claasen danke ich herzlich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Mein Dank gilt außerdem 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, Frau Bauder im Einkauf, die Spül- und Medienküche, sowie die Haustechnik und die Werkstatt. Für das produktive wissenschaftliche Umfeld danke ich allen Mitgliedern der Abteilung Biophysik.

Ein herzlicher Dank geht an Susanne Voltmer und den Stein des Anstoßes für die entscheidenden Impulse.

Dr. Susanne Eschenburg danke ich besonders für die Unterstützung auf den „letzten Metern“ der Arbeit.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern, die mich in all meinen Vorhaben stets tatkräftig unterstützt haben.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbst durchgeführt habe und mich dabei keiner anderen als der genannten Quellen und Hilfen bedient habe.

Heidelberg, den 29.04.2003