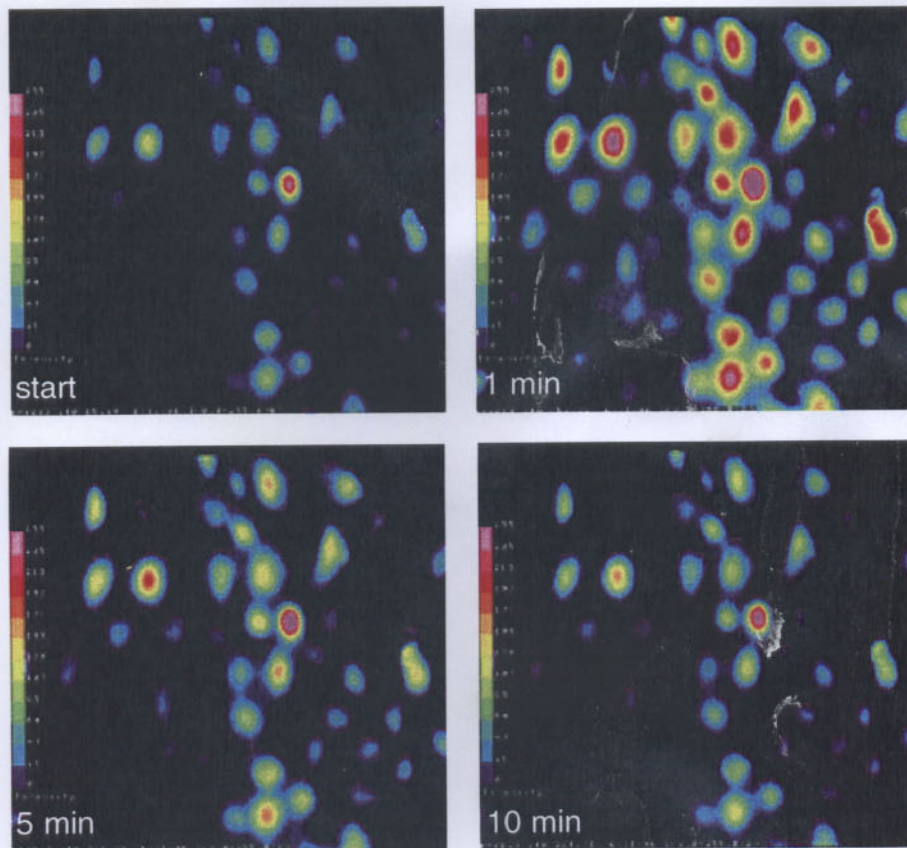




Eva Kluwe

# Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie

Dortmund



Jahresbericht 1996  
Annual Report 1996

Teil I / Part I

*Jahresbericht*

*Annual report*

**1996**

*TEIL I: Forschungsergebnisse, Entwicklungen und  
Veröffentlichungen*

*PART I: Research Results, Developments and Publications*

*Direktor:  
Prof. Dr. R.S. Goody*

*Februar 1997 / February 1997*

*Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie  
Rheinlanddamm 201  
44139 Dortmund*

**Titelbild:** Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration in Nierenzellen der Ratte: Veränderungen der Fluoreszenzintensität des Kalziumindikators Fura-2 nach Zugabe von ATP (Video-Mikroskopie)

**Ergebnisse:** Dr. Hanna Tinel

**Cover:** Determination of intracellular calcium concentration in cells of rat kidney: Changes in fluorescence of the calcium indicator Fura-2 after addition of ATP (Video Imaging)

**Results:** Dr. Hanna Tinel

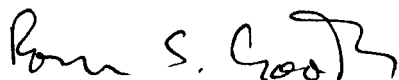
## Vorwort

Liebe Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter,  
liebe Damen und Herren,

das Jahr 1996 war ein wichtiges in der Geschichte unseres Institutes. So haben wir eine Fachbeiratssitzung und die Grundsteinlegung des neuen Institutsgebäudes erlebt. Das positive Ergebnis der Beiratssitzung gibt Grund zur Freude, und ich möchte mich im Namen des Kollegiums bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für die gemeinsame Anstrengung im Dienste der Forschung bedanken. Hier geht es natürlich nicht nur um diejenigen, die an der Vorbereitung und Durchführung der Sitzung unmittelbar beteiligt waren, sondern um alle, die in den Jahren zuvor direkte oder indirekte Beiträge zu Forschungsergebnissen geliefert haben.

In einem Jahr, in dem nur zu deutlich klar wurde, in welcher schwieriger finanzieller Situation sich die Max-Planck-Gesellschaft befindet, war die Grundsteinlegung ein besonders freudiges Ereignis. Wir können sie als Grundsteinlegung nicht nur des Institutsgebäudes sondern als Grundlage für die Zukunft der molekularphysiologischen Forschung in Dortmund betrachten.

Das kommende Jahr wird ein ähnlich wichtiges sein. Auf der negativen Seite müssen wir Möglichkeiten finden, mit den neuen Sparmaßnahmen der Max-Planck-Gesellschaft umzugehen. Andererseits soll die anstehende Etablierung der vierten Abteilung im Rahmen des Kooperationsvertrages mit der Universität Dortmund als positives Zeichen im Sinne der Zukunft des Instituts betrachtet werden.



Professor Dr. R.S. Goody  
(Geschäftsführender Direktor)

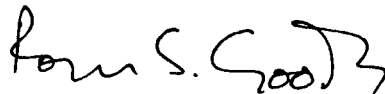
## Preface

Dear colleagues,  
dear readers,

The year 1996 was an important one in the history of our institute, including as it did a meeting of our Scientific Advisory Board and the foundation ceremony for the new institute building. We can all be well satisfied with the result of the evaluation, and on behalf of all directors I would like to thank everyone who participated in the common effort to make the institute into a first rate research organisation. This includes, of course, not only those who were directly involved with the site visit, but all who have contributed directly or indirectly to our research output over the past few years.

In a year in which the difficult financial situation of the Max-Planck-Society was only too apparent, the foundation ceremony was a particularly pleasant event. We can regard it not only as the foundation of the new building, but also as a basis for the future of molecular physiological research in Dortmund.

The coming year will be similarly important. On the negative side, we will have to find ways of dealing with cuts in research expenditure in Max-Planck-Institutes in former West Germany. On the other hand, the planned establishment of a fourth department within the framework of the cooperation with the University of Dortmund must be regarded as a positive sign for the institute's future.



Prof. Dr. R.S. Goody  
(Managing Director)

## INHALTSÜBERSICHT LIST OF CONTENTS

Teil A: Forschungsergebnisse, Entwicklungen und Veröffentlichungen  
Part A: Research results, developments and publications

<b>Abteilung I: Strukturelle Biologie</b>	1
<b>(Leitung Prof. Dr. A. Wittinghofer)</b>	
<b>Department I: Structural Biology</b>	
<b>(Head: Prof. Dr. A. Wittinghofer)</b>	
Arbeitsgruppe Dr. J. Becker	2
Arbeitsgruppe Dr. C. Block	3
Arbeitsgruppe Dr. R. Cool	4
Arbeitsgruppe Dr. Ch. Herrmann	5
Arbeitsgruppe Dr. J. Kuhlmann	6
Arbeitsgruppe Dr. O. Müller	7
Arbeitsgruppe Dr. N. Opitz	8
Arbeitsgruppe Dr. I. Vetter	9
Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Wittinghofer	10
<b>Abteilung II: Epithelphysiologie</b>	11
<b>(Leitung Prof. Dr. R.K.H. Kinne)</b>	
<b>Department II: Epithelial Physiology</b>	
<b>(Head: Prof. Dr. R.K.H. Kinne)</b>	
Arbeitsgruppe PD Dr. E. Kinne	12
Arbeitsgruppe Prof. Dr. R.K.H. Kinne	13
Arbeitsgruppe Dr. C.T. Lin	14
Arbeitsgruppe PD Dr. F. Wehner	15
Arbeitsgruppe Dr. A. Werner	16
Arbeitsgruppe PD Dr. K. Zierold	17
<b>Abteilung III: Physikalische Biochemie</b>	18
<b>(Leitung Prof. Dr. R.S. Goody)</b>	
<b>Department III: Physical Biochemistry</b>	
<b>(Head: Prof. Dr. R.S. Goody)</b>	
Arbeitsgruppe Dr. M. Engelhard	19
Arbeitsgruppe Dr. M. Geeves	20
Arbeitsgruppe Prof. Dr. R.S. Goody	21
Arbeitsgruppe Dr. J. Reinstein	22
Arbeitsgruppe Dr. A. Scheidig	23
Arbeitsgruppe Dr. I. Schlichting	24
Arbeitsgruppe Dr. R. Seidel	25
Arbeitsgruppe Dr. E. Weinhold	26
Arbeitsgruppe Dr. B. Wöhrl	

<b>z.Z. dem Kollegium direkt unterstellte Arbeitsgruppen</b>	27
<b>Independent research groups subordinate to the managing director</b>	
Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Acker	28
Arbeitsgruppe Dr. M.A. Delpiano	29
Arbeitsgruppe PD Dr. M. Markus	30
Arbeitsgruppe Prof. Dr. S.C. Müller	31
Arbeitsgruppe Dr. Th. Plesser	32
Arbeitsgruppe Dr. H. Prinz	33
<b>Emeriti</b>	34
<b>Emeriti</b>	
Prof. Dr. B. Hess	35
Prof. Dr. E. Heinz	
Prof. Dr. D.W. Lübbers	36
<b>Zentrale Einrichtungen</b>	37
<b>Central Facilities</b>	
Mikrosensoren und Dünnschichttechnik (H. Baumgärtl)	38
Zentrale Einrichtung Elektronische Meßgeräte und Digitaltechnik (M. Grote)	39
Zentrale Einrichtung für funktionelle Morphologie (PD Dr. H. Hentschel)	40
Zentrale Einrichtung Präzisionsgerätebau und Entwicklung (R. König)	41
Zentrale Einrichtung für Mikrobiologie und Biotechnologie (Dr. D. Kuschnitz)	42
Zentrale Einrichtung für Zellkultur und Immunologie (Dr. F. Pietruschka)	43
Zentrale Einrichtung EDV (Dr. Th. Plesser)	44
Zentrale Einrichtung Synthese und Sequenzierung (PD Dr. H.-J. Wieker)	45
Glastechnik (D. Seiler)	46
<b>Liste der Publikationen</b>	
<b>Publications</b>	
1. 1996 erschienene oder im Druck befindliche Originalarbeiten in referierten Zeitschriften (ohne Abstracts)	47
1. Publications in refereed journals, published in 1996 or presently in press (no meeting abstracts)	
2. Andere Veröffentlichungen	55
2. Other publications	
<b>Index</b>	58

**Abteilung I:**

**Strukturelle Biologie**

**(Leiter: Prof. Dr. A. Wittinghofer)**

**Department I:**

**Structural Biology**

**(Head: Prof. Dr. A. Wittinghofer)**

## Arbeitsgruppe Dr. J. Becker

Mitarbeiter: R. ABeuer, R. Hillig, C. Koerner, M. Linari, M. Schulte-Spechtel

### 1. Einleitung:

Im Mittelpunkt unserer Arbeit steht die Aufklärung der Struktur und Funktion von Ran. Ran ist ein rasverwandtes, GTP-bindendes Protein, das essentiell für den Transport von Proteinen in und aus dem Zellkern ist und möglicherweise auch an der Zellzykluskontrolle beteiligt ist.

### 2. Struktur und Funktionsanalyse von Ran:

14 verschiedene Punktmutanten von Ran wurden in *E. coli* exprimiert und gereinigt, biochemisch und zellbiologisch analysiert. Biochemisch wurde die Interaktion von Ran Mutanten Protein mit Ran Bindungsprotein (RanBP1), mit dem Guaninnukleotid austauschfaktor RCC1 und dem GTPase stimulierenden Protein RanGAP1 untersucht. Die Ran Mutanten lassen sich in vier Gruppen einteilen. Ran Proteine, deren Interaktion mit RanBP1 gestört ist, Ran Proteine, die nicht mehr mit RanGAP1 oder RCC1 interagieren und Mutanten Proteine, die keine veränderten Eigenschaften aufweisen. Die zellbiologische Analyse der Ran Mutanten Proteine (in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Melchior, Scripps Res. Inst., La Jolla) ergab, daß alle Mutanten, die nur noch eingeschränkt mit regulatorischen Proteinen interagierten, unfähig waren, den Transport von nukleären Proteinen in den Zellkern *in vitro* zu vermitteln. lieferten Hinweise, daß die Mutanten den Transportprozess in unterschiedlichen Stadien hemmen. Im folgenden wird die Interaktion dieser Ran Mutanten mit weiteren Komponenten des nukleären Transportsystems untersucht werden.

### 3. Struktur und Funktionsanalyse von RanGAP1

RanGAP1 bewirkt eine ca. 25.000fache Erhöhung der GTP-Hydrolyseaktivität von Ran. Die Aktivierung der GTP Hydrolyse ist essentiell für die Funktion von Ran. In Zusammenarbeit mit Prof. Volker Gerke (Uni Münster) wurden von RNA1, dem homologen Gen zu RanGAP1 in Hefe, Deletionsmutanten hergestellt. Die biochemischen Untersuchungen zeigten, daß eine saure Region am C-terminalen Ende von Rna1p für die Interaktion mit Ran benötigt wird. Einerseits zeigen Deletionsmutanten, in denen die saure Region sukzessive deletiert wurde, eine verringerte oder keine GAP-Aktivität. Quervernetzungsuntersuchungen zeigen, daß diese Mutantenproteine nicht mehr in der Lage sind, Ran zu binden. Wahrscheinlich ist die saure Region für eine bindungskompetente Konformation von RanGAP1 nötig. Im Rahmen der Strukturaufklärung von RanGAP1 haben wir Kristalle von Rna1 dem *S. pombe* Homolog von RanGAP1 erhalten. Diese Kristalle ermöglichen mittels Synchrotronstrahlung (DESY) eine Strukturauflösung von bis zu 2,8 Å.

### 4. Andere Aktivitäten:

Im vergangenen Jahr ist es gelungen, das 2-Hybridssystem zur Suche von interagierenden Proteinen zu etablieren. Erste Screens mit RPGR, dem Gen, das an der Entstehung der Erbkrankheit Retinitis Pigmentosa beteiligt ist, haben Proteine identifiziert, die mit RPGR interagieren und helfen werden, den Mechanismus der Krankheitsentstehung zu klären.

### 1. Introduction:

The group is studying the structure and function of Ran. Ran is a small GTP-binding protein which is essential for nucleo-cytoplasmic transport and is also involved in cell cycle regulation.

### 2. Structure and function analysis of Ran:

14 different Ran point mutants were generated expressed in *E. coli*. The interaction of these altered Ran proteins with the interacting proteins RanBP1, RCC1, and RNA1 were analyzed using fluorescence spectroscopy and radioactive filter assays. Based on these results the different mutant proteins could be divided into four groups so far; mutant proteins that do not interact with RanBP1, proteins that do not interact with RCC1 or RanGAP1 and mutant proteins with no apparent change in biochemical characteristics. Shortly the interaction of Ran mutants with other proteins of the nuclear import machinery will be examined. The cell biological analysis of the mutant Ran proteins was done in collaboration with Dr. Frauke Melchior (Scripps Research Institute, La Jolla). Mutants that exhibited a severe biochemical defect were also unable to facilitate nuclear transport *in vitro*. Comparing different mutants with fluorescent microscopy techniques, our observations indicated that these mutant proteins inhibited import at different stages. All mutants were dominant as they inhibited nuclear import of proteins into the nucleus even in the presence of excess amounts of wild type Ran. Analogous mutations of the yeast analog of ran, GSP1 were lethal when expressed in yeast.

### 3. Structure and function analysis of RanGAP1

RanGAP1 increases the hydrolysis of Ran-bound GTP about 25.000fold. In collaboration with Prof. Volker Gerke (Universität Münster) a series of deletion mutants of RNA1 the counterpart of RanGAP1 in yeast were produced, expressed in *E. coli*, purified and their catalytic activity determined. The domain structure of RanGAP1 and homologous proteins can be roughly divided into the leucine rich repeats at the amino terminal end constituting about two thirds of the protein, a highly acidic region constituted almost entirely by aspartic and glutamic acid residues followed by the carboxy terminal end with no particular characteristics. Analysis of the deletion mutant reveals that the acidic part is needed for the interaction with Ran. Successive removal of the acidic part causes partial and then total loss of GAP activity while the removal of the C-terminal end has no apparent effect on enzyme activity. Furthermore, C-terminal deletion mutants are unable to bind Ran as shown by cross link experiments indicating that the acidic domain is needed to keep RanGAP1 in a Ran binding competent form. Attempting to solve the 3D structure of RanGAP1, we succeeded in obtaining crystals which diffract up to a resolution of 2.8 Å using a synchrotron beamline (DESY).

### 4. Additional activities:

The 2-Hybrid Screen was established to search for interacting proteins. Initial Screens using RPGR, a newly discovered gene indicated in the hereditary disease Retinitis Pigmentosa yielded very promising results. RPGR was chosen since it has considerable homology to the guanine exchange factor of Ran, RCC1.



## Arbeitsgruppe Dr. C. Block

Mitarbeiter: B. Jaitner, M. Daub, J. Jöckel, B. Voss

### Struktur-Funktionsbeziehungen bei der Aktivierung von MAPkinase Modulen

Die Arbeitsgruppe untersucht Struktur-Funktionsbeziehungen in der Signaltransduktion durch Ras und Rho. Ziel der Arbeit ist es den Mechanismus der Aktivierung des durch Ras bzw Rho kontrollierten MAP-kinase Moduls aufzuklären. Wesentliches Charakteristikum dieser Aktivierung ist die Bindung der ersten Kinase in der Sequenz des MAP-kinase Moduls (Raf, PKC1) an den molekularen Schalter Ras oder Rho. Als methodische Ansätze zur Untersuchung verwenden wir primär:

- Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen, spektroskopische Untersuchung gereinigter Proteine und quantitative Bestimmung der Affinität interagierender Proteine *in vitro* mittels Surface-Plasmon-Resonance- (BIAcore, Zusammenarbeit mit Dr. J. Kuhlmann) und Fluoreszenz-Spektroskopie (Zusammenarbeit mit Dr. C. Herrmann).
- Semiquantitative Bestimmung der Affinität interagierender Proteine und Protein-domänen *in vivo* mit Hilfe des Doppelhybrid-Systems in Hefe (Zusammenarbeit mit J. Becker). Identifizierung interagierender Proteine durch Genbank-Screening mittels des Doppelhybrid-Systems.
- Quantifizierung der Ras/MAP-kinase induzierten Genexpression *in vivo* mittels eines Ras/ERK spezifischen Luciferase-Reporterassays.

Für die Interaktion zwischen Rho und PKC1 konnten wir im Doppelhybrid-System zeigen, daß diese Interaktion über die Zink-Finger Domänen von PKC1 vermittelt wird. Zur Untersuchung der Aktivierung von Raf durch Ras wurden, ausgehend von der Kristallstruktur des Rap1A/Raf-RBD Komplexes die Aminosäuren in Raf-RBD mutiert, die an der Bindung von Raf-RBD an das Ras-homologe Protein Rap1A beteiligt sind. Da die Effektor-domäne von Rap1A zwar weitgehend homolog aber nicht identisch mit der Ras-Effektor-domäne ist, wurden darüberhinaus weitere Aminosäuren mutiert für die die Möglichkeit einer Interaktion mit Ras angenommen wurde. In dieser Arbeit wurde der individuelle quantitative Beitrag der einzelnen Aminosäuren zur Bindungsaffinität *in vitro* analysiert. Zusätzlich konnten die Interaktionen identifiziert werden, die für die Spezifität der Ras/Raf versus Rap/Raf Interaktion verantwortlich sind. Mittels des Reporterassays konnten wir zeigen, daß die Affinität der Interaktion zwischen Ras und Raf einen limitierenden Faktor bei der Kontrolle der Genexpression durch Ras darstellt.

### Structure-activity analysis of MAPkinase module activation

Our group investigates structure-function relationships involved in Ras downstream signalling. Our aim is to elucidate the mechanism of activation of the so-called MAP-kinase modules by Ras or Rho. Binding of Ras to Raf is a pivotal step of activation of Raf by Ras and is responsible for many mitogenic signalling events. The same principle applies to activation of PKC1 by Rho. To investigate these questions we have now established:

- Expression and purification of recombinant proteins, spectroscopic investigation of purified proteins and determination of the binding affinity of interacting proteins *in vitro* by surface plasmon resonance spectroscopy (in collaboration with Dr. J. Kuhlmann) and fluorescence spectroscopy (in collaboration with Dr. C. Herrmann).
- Semiquantitative determination of the binding affinity of interacting proteins *in vivo* using the yeast two-hybrid system (in collaboration with J. Becker). Identification of interacting proteins by screening employing the yeast two hybrid screen.
- Quantitation of Ras/MAP-kinase induced gene expression *in vivo* employing a luciferase-reporter gene assay driven by a promoter which is specific for Ras/ERK mediated signalling.

Using the two hybrid method we were able to show that the interaction between Rho1 and its downstream effector PKC1 is mediated via the PKC zinc finger domain. Based upon the crystal structure of the Rap1A/Raf-RBD complex we have mutated residues of Raf-RBD which were found to constitute the protein-protein interaction surface of the crystal structure. Since the effector domain of Rap1A is highly homologous but not identical to the Ras effector domain, we have also mutated amino acids which were postulated to interact with Ras but not with Rap1A. We have quantified the contribution of individual amino acids of Raf-RBD to the binding affinity *in vitro*. This demonstrates that a minority of interacting amino acids confers the major part of binding affinity. Furthermore, we have identified residues which define the specificity of the Ras/Raf-RBD interaction. Using the reporter gene assay we have analysed the Ras/Raf regulated gene expression *in vivo*. Our data reveal an empirical semilogarithmic correlation between dissociation constants and Raf induced gene activity. This quantitative structure-activity investigation may provide a general approach to correlate structure guided biochemical analysis with biological function of protein-protein interactions.

## Arbeitsgruppe Dr. R. Cool

Mitarbeiter: Christiane Theiß, Bettina Bauer, Christian Lenzen, Naciye Güllüm

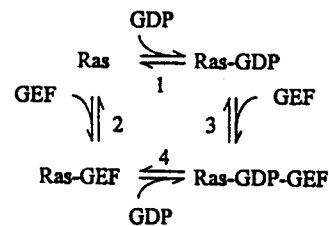
In 1996 haben wir unsere Versuche fortgesetzt die Interaktion zwischen Ras Proteinen und ihren Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) zu charakterisieren. GEFs aktivieren die Ras Proteine durch eine Beschleunigung der GDP-Dissoziationsrate, wonach cytosolisches GTP an Ras bindet und das Ras•GTP dann das nächste Protein in der Signaltransduktionskette aktiviert. Die Austauschreaktion ist ein mehr-stufiger Prozeß und führt über die Formation eines transienten ternären Komplexes Ras-GDP-GEF und eines stabilen nukleotid-freien Komplexes Ras-GEF. Das Schema zeigt die Komplexe, die sich zwischen die 3 Komponenten Ras, GDP und GEF bilden. Im Falle von H-ras und der katalytischen Domäne von Cdc25Mm haben wir mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen die Dissoziationskonstanten  $K_{D1}$  (=9 pM) und  $K_{D2}$  (=2 nM) bestimmen können, während der  $K_{D3}$  mit 100-300  $\mu$ M nur abgeschätzt werden konnte. Unser System erlaubt die Charakterisierung der Effekte von Mutationen in Ras oder Cdc25Mm auf die Interaktion zwischen beiden Proteinen. Eine wichtige Klasse von Ras Mutanten ist die der dominant-negativen Mutanten. Diese Ras Mutanten titrieren den GEF aus und hemmen so die Signaltransduktionskette. Wir haben zeigen können, daß dieser Effekt durch eine verringerte Nukleotidaffinität der Mutante verursacht wird, eventuell kombiniert mit einer Verringerung der  $K_{D2}$  und / oder  $K_{D3}$  Werte und daß diese Mutanten nicht mit dem Effektormolekül interagieren können. Wir haben eine dominant-negative Mutante konstruieren können, die in biologischen Experimenten 10-fach stärker hemmt als die üblicherweise benutzte S17N Mutante.

Die kleinste katalytisch aktive Austauschdomäne von Cdc25Mm wurde durch limitierte Proteaseverdauung vom Komplex Cdc25Mm•H-ras ermittelt. Dieses Konstrukt ist für uns aus mehreren Gründen wichtig: Erstens weil der Komplex mit H-ras kristallisiert werden konnte, zweitens, weil abgeleitete Konstrukte von anderen Austauschfaktoren, so wie der Rap1-Austauschfaktor C3G und das RalGEF die bisher nicht in löslicher Form in *E. coli* exprimiert werden konnten, jetzt als aktive Domäne isolierbar sind. Demzufolge können nun auch Spezifitätsstudien durchgeführt werden. Ähnliche Konstrukte der GEFs hSos1 und Bud5p sind in Vorbereitung.

Spezifitätsstudien werden außerdem durchgeführt, um die Interaktion der Ras-bindenden Domäne (RBD) von den RalGEF-ähnlichen Proteinen Rlf und Rgl mit Ras und Rap Proteinen zu charakterisieren. Diese GEFs sind wahrscheinlich wichtig für einen „cross-talk“ zwischen unterschiedlichen Signalketten. Möglicherweise hat die Bindung and die RBD auch Einfluß auf die GEF Aktivität.

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. H. Acker haben wir die Rolle von Rac in der Aktivierung von NAD(P)H Oxidase in der hepatoma Zelllinie HepG2 untersucht. Weitere Informationen über dieses System sind im Jahresbericht von Herrn Prof. Dr. Acker beschrieben.

In 1996 we have continued our efforts to characterise the interaction between Ras proteins and their guanine nucleotide exchange factors (GEFs). GEFs activate Ras proteins by stimulating the GDP dissociation rate, after which cytosolic GTP can bind to Ras and Ras•GTP activates the next protein in the signal transduction pathway. The exchange reaction is a multiple-step process and involves the formation of a transient ternary complex Ras-GDP-GEF and a stable nucleotide-free complex Ras-GEF. Using fluorescence, we could determine the dissociation constants  $K_{D1}$  (=9 pM) and  $K_{D2}$  (=2 nM) for H-ras and the catalytic domain of Cdc25Mm, and estimate the  $K_{D3}$  to be 100-300  $\mu$ M. Our system allows the measurement of the effects of mutations in Ras or Cdc25Mm on the interactions between both proteins. An important class of mutants is the one of the dominant-negative mutants. These mutants inhibit signal transduction by sequestration of the GEF. We could demonstrate that the dominant-negative effect is a consequence of a decrease in the nucleotide affinity, eventually combined to a decrease in  $K_{D2}$  and / or  $K_{D3}$ , and that these mutants are not able to interact with their effector molecule. We could construct a dominant-negative mutant that in biological experiments shows a 10-fold stronger inhibition compared to the usually used S17N mutant.



The smallest catalytic exchange domain of Cdc25Mm was defined by limited protease treatment of the complex Cdc25Mm•H-ras. This minimal domain is important for several reasons: first, its complex with H-ras could be crystallised, and second, similar constructs of other GEFs, e.g. Rap1-GEF C3G and RalGEF that so far could not be produced in bacteria in soluble form, could be isolated as active proteins from *E. coli*. Consequently, studies to elucidate the mechanism of specificity of GEFs for their substrates could be started. Similar constructs of the GEFs hSos1 and Bud5p are in progress.

Specificity studies are also in progress to study the interaction of the Ras-binding domains (RBD) of the RalGEF-like proteins Rlf and Rgl with Ras and Rap proteins. These GEFs might be involved in „cross-talking“ between different signal transduction pathways. The binding of Ras/Rap proteins to the RBD possibly affects the GEF activity.

In collaboration with Prof. Dr. Acker we also worked on the role of Rac in the activation of NAD(P)H oxidase in the hepatoma cell line HepG2. More details concerning this system are to be found in the „Jahresbericht“ of Prof. Dr. Acker.

## Arbeitsgruppe Dr. Ch. Herrmann

Mitarbeiter: P. Grünwald, T. Linnemann, G. Praefcke, S. Wohlgemuth

Die Ras ähnlichen Proteine haben bei verschiedenen zellulären Vorgängen eine zentrale Funktion, wie z. B. beim Kern-In/Export, in der Signaltransduktion oder bei der Organisation des Cytoskeletts. Sie sind nur in ihrer GTP-gebundenen Form aktiv, so daß sie durch Nukleotid-Austauschfaktoren bzw. GTPase beschleunigende Proteine reguliert werden können. Die Ras-Unterfamilie besteht aus jeweils verschiedenen Isoformen von Ras, Rap, R-Ras, TC21 und Ral. Neben Ras, welches in 30% menschlicher Tumoren in der onkogenen Form gefunden wird, sind auch für TC21 transformierende Eigenschaften beschrieben worden.

Die untereinander hoch homologen Ras-Proteine leiten das jeweilige Signal durch Interaktion mit verschiedenen Effektorproteinen weiter. Letztere weisen untereinander keinerlei Homologie in der Primärsequenz auf, dennoch binden sie in gleicher Weise an die Mitglieder der Ras-Unterfamilie außer an Ral. Ziel unserer Arbeit ist es, mit biochemischen und biophysikalischen Arbeitsmethoden die Bindungsspezifitäten und damit die physiologisch relevanten Bindungspartner herauszustellen. Unterstützt durch strukturelle Untersuchungen wird auf molekularer Ebene gezeigt, wie innerhalb einer Proteinfamilie die beobachteten spezifischen Unterschiede in der Wechselwirkung mit den unterschiedlichen Effektoren ermöglicht werden.

Für die Effektorproteine Raf, Ral-GEF und Byr2 konnten die minimalen Proteindomänen definiert werden, die für die Bindung an die Ras-Proteine verantwortlich sind. Es konnten bestimmte Aminosäuren in diesen Proteinen sowie in Ras und in Rap identifiziert werden, die die gefundenen Unterschiede der Affinitäten bewirken. Auf struktureller Ebene hat sich gezeigt, daß diese Proteine eine gemeinsame Topologie aufweisen, die ihnen die gleichartige Wechselwirkung mit Ras ermöglicht (Raf in der Röntgenstruktur, Ral-GEF in der NMR-Struktur und Byr2 bisher nur durch ein Programm für die Vorhersage von Sekundärstrukturen). Für andere Effektoren wie PI(3)-Kinase und AF6 ist es bisher nicht gelungen, eine funktionell intakte Ras-Bindungsdomäne zu erhalten und biochemisch zu charakterisieren.

In einem weiteren Forschungsprojekt wird der GTPase-Mechanismus von hGBP1 untersucht. Dieses ist ein Interferon induziertes Protein, welches GTP bindet und dieses zu GDP und GMP hydrolysiert. Von den fünf für GTP bindende Proteine typischen Sequenzmotiven lassen sich in diesem Protein nur zwei finden. Es handelt sich möglicherweise um eine neue Klasse GTP bindender Proteine.

Ras like proteins play a pivotal role in many cellular processes, e. g. Ran in nuclear in- and export, Ras in signal transduction and Rho proteins in cytoskeleton organisation. Since they are active only in their GTP-bound form they are regulated by nucleotide exchange factors and GTPase activating proteins. The Ras subfamily consists of Ras, Rap, R-Ras, TC21 and Ral. Transformation of cells has been reported not only for Ras which is found to 30% in its oncogenic form in human tumors but also for TC21.

The Ras subfamily proteins which are highly homologous to each other transmit the signal by interaction with effector proteins. The latter proteins do not share any primary sequence homology though they bind to the members of the Ras subfamily except Ral in the same manner. With biochemical and biophysical methods we aim to elucidate binding specificities among these proteins and by this to define interaction partners in physiological terms. Aided by structural investigations we want to find out how the observed specificities between the homologous Ras proteins on the one hand and the different effectors on the other hand are achieved on the molecular level.

The minimal protein domains which are responsible for Ras binding could be defined for the effectors Raf, Ral-GEF and Byr2. Distinct amino acid residues in these proteins as well as in Ras and Rap were identified which are responsible for the observed differences in affinities. By structural analysis it turned out that these effectors have the same topology which explains the same type of interaction with Ras (Raf by X-ray analysis, Ral-GEF by NMR spectroscopy and Byr2 by secondary structure prediction). For other effector proteins like PI(3)-kinase and AF6 we did not manage so far to obtain a Ras binding domain of full integrity.

Another research project deals with the mechanism of GTP hydrolysis by hGBP1. This is an interferon induced GTP-binding protein which yields as products of hydrolysis GDP and GMP. Only two out of five sequence motifs which are conserved among GTP binding proteins are found in this protein. Possibly this is a new class of GTP binding proteins.

### 1. Interaktion p24<sup>Ran</sup> mit Ran-bindenden Proteinen

Die zellkernassoziierte GTPase p24<sup>Ran</sup> spielt eine essentielle Rolle bei nuklearen Transportvorgängen. Im laufenden Jahr wurden die Untersuchungen der Wechselwirkung zwischen p24<sup>Ran</sup> und dem cytosolischen Protein RanBP1 weitgehend abgeschlossen. Hierbei konnte gezeigt werden, daß die Erkennung von Ran in seiner GTP-Struktur durch RanBP1 hochspezifisch mit Dissoziationskonstanten um  $5 \times 10^{-9}$  M erfolgt, während die Entfernung des sauren C-Terminus von Ran bzw. die GDP-gebundene Form des Proteins einen Abfall der Bindungsstärke um den Faktor 10.000 bewirken. Hierbei befinden sich die mit fluoreszenzspektroskopischen Methoden bzw. Oberflächen-Plasmon-Resonanz ermittelten Daten in guter Übereinstimmung.

Der circulare Dichroismus von Komplexen aus Ran\*GMPPNP und RanBP1 liefert Hinweise auf signifikante Sekundärstrukturumlagerungen bei der Ausbildung des Ran-RanBP1-Heterodimers. Entsprechende Veränderungen für Ansätze mit RanBP1 und der Diphosphat-Form von Ran wurden nicht gefunden. Kristallisationsexperimente mit Ran\*GMPPNP und RanBP1 bzw. den Ran-bindenden Domänen aus RanBP2/Nup358 lieferten bislang keine verwertbaren Kristalle.

Neben RanBP1 und RanBP2 wurden weitere Ran-Interaktionspartner untersucht. Hierbei konnte unter in-vitro-Bedingungen mit Säugerproteinen keine spezifische Wechselwirkung zwischen p10/NTF2 und Ran (in der Literatur für die GDP-Form von Ran beschrieben) gezeigt werden, während laufende Arbeiten mit Importin-90 eine hohe Affinität dieses Importproteins gegenüber Ran\*GTP erkennen lassen.

In drei Kooperationsprojekten sollen weiterhin die biochemischen Eigenschaften der mit dem Ran-Zyklus korrelierten Proteine gtr11 bzw. RagA/RagB geklärt werden sowie über NMR-Analytik zusätzliche strukturelle Informationen zu den Ran-Bindungsdomänen von RanBP2 ermittelt werden.

### 2. Weitere Arbeiten

Verschiedene monoklonale Antikörper gegen GST sowie gegen His-Tag-Strukturen wurden im Surface Plasmon Resonance System (BIAcore) hinsichtlich Bindungsstärke für das Antigen und Stabilität untersucht. Weiterhin erfolgt(e) in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen der Abteilung die Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen APC (Tubulinbindungsregion) und Tubulin sowie cdc42 und WASP-Konstrukten.

In Kooperation mit der Universität Karlsruhe wurde bereits die zelluläre Lokalisation von synthetisch hydrophob modifizierten Peptiden der C-terminalen N-Ras-Sequenz nach Mikroinjektion über konfokale Fluoreszenzmikroskopie verfolgt.

In Vorbereitung eines molekular-toxikologisch ausgerichteten Projektes wurde weiterhin die quantitative Isolierung genomischer DNA aus kultivierten Harnblasenepithelzellen standardisiert.

### 1. Interaktion between p24<sup>Ran</sup> and Ran-binding proteins

The nuclear GTPase p24<sup>Ran</sup> plays an important role in nuclear transport. In 1996 we studied the interaction between p24<sup>Ran</sup> and RanBP1, a cytosolic protein. It could be shown that Ran in its GTP-bound state is recognized by RanBP1 with high specificity and a  $K_D$  of 5 nM. The truncation of the acidic C-terminus of Ran or Ran in its GDP-state leads to a decrease in affinity towards RanBP1 by a factor of 10.000. There is a good agreement between data from fluorescence-spectroscopy and surface plasmon resonance.

Circular dichroism measurements of complexes consisting of Ran\*GMPPNP and RanBP1 gave hints on significant changes in secondary structure by formation of the Ran-RanBP1-heterodimer. No equivalent changes were detected for mixtures of RanBP1 and Ran\*GDP. Several approaches to cocrystallize Ran\*GMPPNP and RanBP1 or Ran-binding-domains of RanBP2 did not yield crystals that could be used for X-ray analysis.

In addition to RanBP1 and RanBP2 more Ran-interacting proteins were studied. Using in-vitro-assays with mammalian proteins no specific interaction could be shown for p10/NTF2 and Ran as described in the literature (for Ran\*GDP). Actual experiments to quantify the interaction between Ran\*GTP and Importin- $\beta$  indicate high affinities between both proteins.

Three cooperations run in the Ran-field. Two of them have the aim to get information about biochemical properties of the Ran-cycle correlated proteins gtr11 and RagA/RagB. In the third cooperation structural information of the Ran-binding-domains of RanBP2 should be received by NMR-measurements of the proteins.

### 2. Additional projects

Several monoclonal antibodies directed against GST or His-Tag-Structures were tested in binding-affinity for substrate and stability in the SPR-system (BIAcore<sup>TM</sup>). In cooperations with other groups of the department additional protein-interactions were investigated. Binding affinities between APC (tubuline-binding-region) and tubuline and between cdc42 and WASP-constructs were measured or are in work.

In a cooperation-project with the university of Karlsruhe the cellular localisation of synthetic hydrophobic-modified peptides of the C-terminal sequence of N-Ras was studied after microinjection by confocal fluorescence-microscopy.

In preparation of a molecular-toxicological project quantitative isolation of genomic DNA from cultured primary epithelial cells was established.

## **Arbeitsgruppe Dr. O. Müller**

Mitarbeiter: J. Deka, R. Deuter, U. Fichtl, D. Franz, D. Hirschl, I. Hoffmann, J. Linz, I. Nimmrich

Die Arbeitsgruppe untersucht die Ursachen der Krebsentstehung und der Tumorprogression auf molekulargenetischer, biochemischer und zellulärer Ebene. Für die Entstehung menschlicher Tumoren sind DNA-Veränderungen in den beiden Genklassen der Tumor Suppressorgene und der Proto-Onkogene verantwortlich. Aus der genauen Spezifizierung der DNA-Mutationen, aber auch aus der biochemischen Charakterisierung der Genprodukte können wichtige Schlüsse für mögliche Ansätze neuartiger Diagnose- und Therapietechniken gezogen werden.

### **1. Projekt: Analyse von DNA-Veränderungen in Tumor- und Stuhlproben von Darmkrebspatienten (R. Deuter, J. Linz)**

In DNA aus menschlichen Darmtumoren wurden bisher nicht beschriebene Veränderungen in verschiedenen Proto-Onkogenen und Tumor Suppressorgenen detektiert. Diese Informationen sind die Grundlage für die Entwicklung einer neuartigen molekulargenetischen Diagnosemethode von Darmtumoren. Zellen eines Darmtumors werden laufend in den Stuhl abgeschilfert. Daher sind die in Stuhl-DNA detektierten Veränderungen wichtige Hinweise für die Diagnose eines Tumors. Da DNA aus Stuhlproben einen Überschuss an nicht mutierter DNA aus gesunden Zellen enthält, stellt die Detektion tumorspezifischer Mutationen ein Problem dar. Dies konnte mit einer Methode gelöst werden, die bekannte Verfahren zur Detektion und zur Vermehrung definierter DNA-Abschnitte kombiniert. Dadurch konnten erstmals Veränderungen im APC-Gen in Stuhl-DNA von Patienten mit Darmtumoren detektiert werden.

### **2. Projekt: Identifikation neuer tumorrelevanter Gene (I. Nimmrich)**

Ein Hauptkandidat eines möglichen Gens, das die durch Mutationen eingeleitete Tumorentwicklung modifiziert, ist das Gen für die Phospholipase A2 (PLA2). Die Chromosomen- und Sequenzanalyse von DNA aus Blut und Tumoren von Patienten mit Darmtumoren zeigte, dass eine tumormodifizierende Wirkung des PLA2-Gens sehr unwahrscheinlich ist, dass jedoch in chromosomaler Nachbarschaft dieses Gens ein nicht identifiziertes Tumor Suppressorgen liegt.

### **3. Projekt: Proteinstudien (J. Deka, U. Fichtl, D. Franz, D. Hirschl, I. Hoffmann)**

Die biochemische Charakterisierung eines Proteins ist der entscheidende Schritt bei dessen Einordnung in den zellulären Zusammenhang. Die Bindung des Tumor Suppressorproteins APC an das Strukturprotein Tubulin wurde quantitativ und qualitativ mit biochemischen Methoden charakterisiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Katalyse der Polymerisation von Tubulin durch das APC-Protein möglicherweise eine wichtige Rolle bei der tumorsupprimierenden Funktion des Proteins spielt. Außerdem wurden, nach der Strukturaufklärung eines Fragments des APC-Proteins, weitere Schritte zur Strukturaufklärung verschiedener Tumor Suppressorgene durchgeführt. Dazu wurden Fragmente der Tumor Suppressorproteine APC,  $\beta$ -Catenin und hMSH2 exprimiert und gereinigt. Der nächste Schritt wird die Strukturanalyse dieser Proteine sein.

The group examines the reasons for tumor initiation and progression on molecular genetic, biochemical and cellular levels. DNA-alterations in tumor suppressor genes and proto-oncogenes are responsible for the initiation and growth of human tumors. The exact specification of these DNA-mutations, but also the biochemical characterization of the corresponding gene products may lead to novel techniques in diagnosis and therapy.

### **1st Project: Molecular genetic analysis of DNA alterations in tumor tissue and stool samples from patients with colorectal cancer (R. Deuter, J. Linz)**

Unknown somatic alterations in several different proto-oncogenes and tumor suppressor genes were detected in DNA from human colorectal tumors. Based on these results a novel non-invasive technique for the diagnosis of colorectal tumors was developed. Cells of a bowel tumor are continuously shed into the feces. Thus the mutations detected in stool DNA should give important hints for the presence of a tumor. Since DNA out of stool contains an excess of non-mutated DNA from normal cells the detection of tumor specific mutations is difficult. This problem was solved by the development of a new method which combines known techniques for detection and amplification of DNA fragments. By this new technique somatic mutations in the tumor suppressor gene APC were detected in stool DNA from patients with colorectal tumors.

### **2nd Project: Identification of new tumor relevant genes (I. Nimmrich)**

The phospholipase A2 (PLA2) is a candidate gene which modifies tumor progression initiated by DNA mutations. The chromosomal and sequential analysis of DNA from blood and tumors from patients with colorectal tumors indicated that a tumor progression modifying effect of the PLA2 gene is unlikely. Nevertheless, the results show the existence of another yet unidentified tumor suppressor gene located close to PLA2 in the same chromosomal region.

### **3. Project: Protein studies (J. Deka, U. Fichtl, D. Franz, D. Hirschl, I. Hoffmann)**

The biochemical characterization of a protein is a crucial step for the definition of its intracellular function. The binding of the tumor suppressor protein APC to the cytoskeletal protein tubulin was characterized quantitatively and qualitatively by biochemical methods. The results show that the catalysis of the tubulin polymerisation by APC may be important for the tumor suppressing function of the protein. Furthermore, experiments were performed to solve the three-dimensional structures of several tumor suppressor proteins. Fragments of the tumor suppressor proteins APC,  $\beta$ -Catenin and hMSH2 were expressed and purified. The next step will be the crystallization and the X-ray analysis of these proteins.

**Allgem. Thematik :**

Intrazelluläre Messung physiologischer Parameter (pH, pCa, pO<sub>2</sub>, etc.) mit Hilfe geeigneter Fluoreszenzindikatoren auf Basis der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie, physiko-chemische und spektroskopische Charakterisierung der verwendeten Indikatoren (in vitro und intrazellulär), Entwicklung spezifischer Eichverfahren und Auswertemethoden im Falle interferierender Phänomene (intrazell. Umverteilung der Indikatoren, intermolekul. Wechselwirkungen), experiment. Charakterisierung zellulärer Regulationsprozesse, Ansätze einer theoret. Beschreibung zugrundeliegender Regulationsfunktionen sowie computergestützte Simulation komplexer Regulationsvorgänge, 3D-Rekonstruktion und Animation digitaler Datensätze zur Visualisierung.

**Intrazelluläre pH- und pCa-Messungen in Tumorzellen mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie (KLRM)**

(in Zusammenarbeit mit H. Acker, B. Bölling, E. Merten, T. Porwol)

Das Indikator-Tandem Ca-GREEN-1/tm-RHODAMINE ist besonders geeignet in Verbindung mit der konfokalen Laser-Rastermikroskopie zur Aufzeichnung intrazellulärer Ca-Verteilungen wie auch raum-zeitlicher Veränderungen von Ca-Konzentrationen im Hinblick auf Untersuchungen zur cytosolischen Ca-Homöostase sowie intrazellulärer Signalübertragung in Verbindung mit Wachstumskontrolle, Apoptose, und Sauerstoff-sensing. Da die Darstellung intrazellulärer Ionenverteilungen eine topographisch invariante intrazelluläre Eichung und eine weitgehende intrazelluläre Integrität der Farbstoffe erfordert, sind Ca-GREEN-1 und tm-RHODAMINE aufgrund ihres vernachlässigbaren Proteinfehlers, homogener intrazellulärer Verteilung und hoher Photostabilität das Indikatorpaar der Wahl. Zur intrazellulären Anwendung müssen die Farbstoffe jedoch mikroinjiziert werden, wobei die Zellmembran leider relativ häufig in Mitleidenschaft gezogen wird, so daß es zu einer erhöhten Farbstoff-Freisetzung und zu einer Störung der in situ Eichung kommt (infolge kurzzeitigen Einstroms extrazellulärer Lösung mit hohem Ca-Gehalt während der Injektionsprozedur). Infolgedessen wurde eine Alternative auf Basis der Acetoxymethylester-Form der Indikatoren Ca-GREEN-1 und carboxy-SNARF-1 (ein gut charakterisierter pH-Indikator) entwickelt um die Beladung der Zellen mit den Indikatoren zu erleichtern und zugleich die Möglichkeit zur simultanen intrazellulären pCa- und pH-Messung zu eröffnen, die im Hinblick auf die inherente pH-Querempfindlichkeit (und eine Korrekturmethode) der üblichen Ca-Indikatoren von besonderer Bedeutung ist. Zur Zeit werden in situ Eichungen der Indikatoren in HepG2 Zellen mit Hilfe des dynamischen Eichverfahrens ausgeführt. Weitere Untersuchungen werden sich mit 3D-Rekonstruktionen zytosolischer Ca-Verteilungen (basierend auf Sequenzen 2D-Ratiobilder) und entsprechender Animationen der digitalen Datensätze zwecks Visualisierung befassen.

**General Subject :**

Intracellular measurements of physiological parameters (pH, pCa, pO<sub>2</sub>, etc.) on the basis of fluorescent indicators and confocal laser scanning microscopy, physico-chemical and spectroscopical characterisation of the applied indicators (in vitro and intracellularly), development of specialized calibration procedures and evaluation methods in case of interfering phenomena (e.g. intracellular redistribution of indicators, unspecific intermolecular interactions), experimental characterisation of cellular regulation processes, approaches to a theoretical description of basic regulation functions as well as computer-aided simulation of complex regulation processes, 3D reconstruction and animated data visualization.

**Intracellular pH- und pCa-measurements in tumor cells using confocal laser scanning microscopy (CLSM).**

(in collaboration with H. Acker, B. Bölling, E. Merten, T. Porwol)

The indicator tandem Ca-GREEN-1/tm-RHODAMINE seems to be particularly suited in conjunction with confocal laser scanning microscopy for monitoring intracellular calcium topographies as well as spatio-temporal variations of calcium distributions in order to study cytosolic calcium homeostasis and intracellular signaling in conjunction with growth control, apoptosis and oxygen sensing. Since ion-imaging requires a topographically invariant intracellular calibration and a high degree of intracellular integrity of the dyes, Ca-GREEN-1 and tm-RHODAMINE, both conjugated separately to dextran molecules, seems to be the indicator-pair of choice due to its virtually negligible protein-error, homogeneous intracellular distribution and high photostability. However, implementation of the indicator-pair requires microinjection, which, unfortunately, often seems to injure the cells to an extent resulting in enhanced cellular dye-leakage as well as calibration distortions caused by instantaneous influx of extracellular solution (high calcium content) during the injection procedure (presumably due to insufficient tightening of the injection capillary by the plasma membrane). As a consequence, an alternative based on the acetoxymethyl ester forms of Ca-GREEN-1 and carboxy-SNARF-1 (a well characterized pH-indicator) was evaluated in order to facilitate indicator loading and, in addition, to provide the ability for simultaneous intracellular measurements of pH and pCa, which is of particular importance in view of a correction method regarding the inherent pH cross-sensitivity of calcium sensitive fluoroprobes. At present, in situ calibrations of the indicators are performed in HepG2 cells according to a dynamic calibration procedure (as described previously). Further investigations will deal with 3D reconstructions of cytosolic calcium distributions based on sequences of 2D ratio-images constituted from non-invasive optical sections as well as suitable animated data visualization.

## Arbeitsgruppe Dr. I. Vetter

Mitarbeiter: A. Arndt, M. Rudolph

### Allgemeine Thematik:

Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen bzw. Proteinkomplexen mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse, Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in Hinblick auf die Signaltransduktion.

#### 1) cdc42-WASP complex (M. Rudolph)

Es konnte gezeigt werden, daß verschiedene Fragmente des WASP-Proteins (WAS = Wiskott-Aldrich-Syndrom) GTP-abhängig an die GTPase cdc42 binden. Die mit cdc42 gebildeten Komplexe wurden biochemisch charakterisiert. In Zusammenarbeit mit P. Bayer konnte die NMR-Struktur eines 7.5 kDa großen Fragmentes von WASP aufgeklärt werden. Die postulierte cdc42/rac-Bindungsregion liegt in einer wohldefinierten loop-Struktur vor. Weitere Experimente mit größeren WASP-Fragmenten sind geplant.

#### 2) ralA-Rlip

Der Komplex zwischen menschlichem ralA und Rlip (von der Arbeitsgruppe R. Cool zur Verfügung gestellt) erwies sich als zu instabil. Es konnte jedoch ralA alleine kristallisiert werden, was aufschlußreiche Informationen über die Strukturunterschiede zu p21ras liefert. Die Struktur wurde mit „Molecular Replacement“ gelöst, wobei ein modifiziertes ras-Molekül als Suchmodell diente. Die Verfeinerung der Struktur bis zu einer Auflösung von 1.8 Å ist fast abgeschlossen.

#### 3) ran/Importin $\beta$ -Komplex

In Zusammenarbeit mit D. Görlich's Gruppe (Heidelberg) sowie J. Becker's Gruppe konnte der Komplex zwischen ran und einem Fragment des ran-bindenden Proteins Importin  $\beta$  kristallisiert werden. Ran und Importin  $\beta$  sind in den Kerntransport involviert. Die Kristalle streuen bis mindestens 3 Å (Raumgruppe ist monoklin P2, mit einer Einheitszelle von 66.9 109.5 115.4 90.0 100.1 90.0). Die Kristalle sind extrem empfindlich und im Röntgenstrahl nicht stabil, wir versuchen daher Einfrieren bzw. Stabilisierung durch Vernetzung. Gleichzeitig reinigen wir ein größeres Fragment von Importin  $\beta$ , das einen stabileren Komplex bildet.

#### 4) PIA (Protein Interface Analysis)

Es wurde ein Programm zur Visualisierung von Interaktionen in Proteinkomplexen entwickelt, welches Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen zusammen mit den Kontaktflächen sowie den wasserunzugänglichen Oberflächen darstellt. Dies ermöglicht eine detaillierte Analyse sowie ein Verständnis der Kräfte, die die Komplexbildung beeinflussen.

### General field:

Determination of the three-dimensional structure of proteins and protein complexes, respectively. Investigation of protein-protein interactions with respect to signal transduction mechanisms.

#### 1) cdc42-WASP complex (M. Rudolph)

It could be shown that various fragments of the protein that causes the Wiskott-Aldrich syndrome (WASP) bind to the small GTPase cdc42 in a GTP-dependent manner. The different complexes were characterized biochemically. The NMR structure of a 7.5 kDa fragment was solved in collaboration with P. Bayer and revealed a well-defined loop structure of the proposed cdc42/rac binding region. Further experiments with larger fragments of WASP are in progress.

#### 2) ralA-Rlip

The complex between the human ralA protein and Rlip (provided by R. Cool's group) proved to be too unstable to crystallize, but ralA by itself could be crystallized in the GDP form, providing interesting information about the differences as compared to p21ras. The structure was solved by molecular replacement using a truncated ras molecule as a search model, the refinement of the structure up to 1.8 Å is almost finished.

#### 3) ran/Importin $\beta$ complex

In collaboration with D. Görlich's group (Heidelberg) and J. Becker's group we crystallized the complex of ran and a large fragment of the ran-binding protein importin  $\beta$ . Ran and importin  $\beta$  are proteins involved in nuclear transport. The complex ran-importin  $\beta$  was purified and crystals could be grown which diffracted to at least 3 Å. The spacegroup is monoclinic P2 with unit cell dimensions of 66.9 109.5 115.4 90.0 100.1 90.0. The crystals are extremely fragile and unstable in the beam, therefore we attempt to either crosslink or freeze the crystals. In parallel, we are purifying a different fragment of importin  $\beta$  that promises to form a more stable complex.

#### 4) PIA (Protein Interface Analysis)

A program was developed to visualize the interactions occurring in protein interfaces as a two-dimensional projection. Hydrogen bonds, hydrophobic and electrostatic interactions are displayed together with the contact and the water excluded surfaces which allows a detailed analysis and understanding of the forces governing complex formation.

1. Die dreidimensionale Struktur der katalytischen Domäne des Ras-spezifischen GTPase-aktivierenden Proteins p120-GAP, GAP-334 wurde aufgelöst. Sie besteht aus zwei helikalen Domänen, von denen eine die katalytische Domäne ist. Die konservierten Reste aller Ras-GAPs bilden eine Schale, die auf der Grundlage einer Reihe von biochemischen und genetischen Studien als aktive Seite identifiziert werden kann. Auf der Basis dieser Studien wurde ein Modell für die Interaktion zwischen Ras und GAP erstellt.
  2.  $\alpha$ Proteine - nicht Ras verwandte Proteine - binden  $\text{AlF}_4^-$ , welches sich an der  $\gamma$ -Phosphat bindenden Stelle befindet und den Übergangszustand der GTPase-Reaktion nachahmt. Wir haben bewiesen, daß Ras und Ras-verwandte Proteine  $\text{AlF}_4^-$  mit stöchiometrischen Mengen korrespondierender GAPs binden können. Dies unterstützt den Gedanken, daß GAP den Übergangszustand der GTPase-Reaktion stabilisiert. Onkogene GTPase Mangelmutanten von Ras und Mutanten von GAP und Neurofibromin, welche Arginin-Reste benötigen, sind nicht in der Lage, die Bindung von  $\text{AlF}_4^-$  zu unterstützen.
  3. Die katalytische Domäne des Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors, für Rap spezifisch, C3G, wurde als kleines Fragment, ähnlich dem Ras-spezifischen GEF Cdc25, in *E. coli* exprimiert. Es stimuliert die mGDP/GTP-Dissoziation von Rap und ist für Rap1A und Rap1B spezifisch, aber es wirkt weder auf Rap2A und Rap2B, noch auf H-, N- und K-Ras, Ral und Bud1. Die Rap-Mutante S17N wurde präpariert und es wurde in Analogie zu Ras(S17N) eine erhöhte Dissoziationsrate des GXP festgestellt, die noch zusätzlich durch C3G stimuliert werden kann. Überraschenderweise jedoch zeigt Rap(S17N) keine inhibierende Wirkung auf die GEF-Aktivität des C3G-Wildtyp Rap1. Dies gibt Grund zu der Annahme, daß Rap (S17N) nicht als dominant-negativer Inhibitor der Rap-Funktion einsetzbar ist.
  4. Der GTP-als-Base-Mechanismus der GTP-Hydrolyse wurde durch folgende Messungen unterstützt: die Hydrolyserate und die  $\text{pK}_a$ -Werte verschiedener Ras-Mutanten wurden ermittelt und in einem „linear-free-energy-relation“ Plot dargestellt, wo sie eine Gerade bilden. Das Ersetzen von  $\text{Mg}^{2+}$  durch  $\text{Mn}^{2+}$  an der aktiven Seite und Änderung des  $\text{pK}_a$  des  $\gamma$ -Phosphats erhöhte die GTP-Hydrolyse-Rate um eine Größenordnung. Die kristallographische Darstellung der Ras-GppCp-Mn<sup>2+</sup> Struktur zeigt ein einzelnes, an der aktiven Seite des Enzyms gebundenes Metallion. Die GAP katalysierte Ras-Reaktion kann in Gegenwart von  $\text{Mn}^{2+}$  auf bis zu  $100 \text{ s}^{-1}$  beschleunigt werden.
  5. Es wurden weitere Effektoren von Ras in *E. coli* exprimiert und ihre Interaktion mit Ras und Rap untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die Ras Bindungsdomäne von Ral-GEF, RGF-RBD sehr viel stärker an Rap1 als an Ras bindet. Dies steht im Widerspruch zu dem, was für Raf-RBD festgestellt wurde, wo Ras eine 100-fach festere Bindung als Ras eingeht. Diese unterschiedlichen Bindungseigenschaften sind teilweise begründet in der unterschiedlichen Ladung in Position 31 von Ras und Rap. Die NMR-Struktur von RGF-RBD wurde in Zusammenarbeit mit H.R. Kalbitzer (MPI Heidelberg) aufgelöst; außerdem wurden Kristalle des Ras-byr2-Komplexes für die Röntgenanalyse gewonnen.
1. The three-dimensional structure of the catalytic domain of the Ras-specific GTPase-Activating Protein p120-GAP, GAP-334 was solved. It consists of two helical domains, one of which is the catalytic domain. The conserved residues of all Ras-GAPs are centered around a shallow groove which based on a large number of biochemical and genetic studies can be identified as the active site. Based on those studies a model for the interaction between Ras and GAP has been presented.
  2.  $\alpha$  proteins, but not Ras-related proteins bind  $\text{AlF}_4^-$  which is located in the  $\gamma$ -phosphate binding site and mimics the transition state of the GTPase reaction. We have shown that Ras and Ras-related proteins can bind  $\text{AlF}_4^-$  in the presence of stoichiometric amounts of their respective GAPs. This supports the notion that GAP stabilizes the transition state of the GTPase reaction. GTPase deficient oncogenic mutants of Ras and mutants of GAP or neurofibromin which lack arginine residues are unable to support binding of  $\text{AlF}_4^-$ .
  3. The catalytic domain of the guanine-nucleotide exchange factor specific for Rap, C3G, was expressed in *E. coli* as a minimal fragment similar to that of the Ras-specific GEF Cdc25. It stimulates dissociation of mGDP/GTP from Rap and is specific for Rap1A and Rap1B, but does not act on Rap2A and Rap2B, neither on H-, N- and K-Ras, Ral and Bud1. The Rap mutant S17N was prepared and found to have, in analogy to Ras(S17N), an increased dissociation rate of GXP, which can be further stimulated by C3G. However surprisingly, Rap(S17N) does not inhibit the GEF activity of C3G on wildtype Rap1. This suggests that it should not be useful as a dominant negative inhibitor of Rap function.
  4. The GTPase-as-base mechanism of GTP hydrolysis was further supported by measuring the rate of hydrolysis and  $\text{pK}_a$  of several Ras mutants and plot these data in a linear-free-energy relation plot, where they form a straight line. The replacement of  $\text{Mg}^{2+}$  by  $\text{Mn}^{2+}$  in the active site increases the rate of GTP hydrolysis by about one order of magnitude, again by changing the  $\text{pK}_a$  of the  $\gamma$ -phosphate. The crystal structure of the Ras-GppCp-Mn<sup>2+</sup> structure shows a single metal ion bound in the active site of the enzyme. The GAP catalyzed reaction of Ras can be increased to  $100 \text{ s}^{-1}$  in the presence of  $\text{Mn}^{2+}$ .
  5. Further effectors of Ras have been expressed in *E. coli* and their interaction with Ras and Rap has been investigated. It could be shown that the Ras-Binding domain of Ral-GEF, RGF-RBD, binds much tighter to Rap1 than to Ras, opposite to what has been found for Raf-RBD where Ras binds 100 fold tighter than Ras. This difference is partly due to the difference in charge in position 31 on Ras and Rap. The NMR structure of RGF-RBD has been solved in collaboration with H.R. Kalbitzer (MPI Heidelberg) and crystals of the Ras-byr2 complex suitable for X-ray analysis have been obtained.



**Abteilung II:**

**Epithelphysiologie**

**(Leiter: Prof. Dr. R.K.H. Kinne)**

**Department II:**

**Epithelial physiology**

**(Head: Prof. Dr. R.K.H. Kinne)**

### **Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin abhängige Proteinkinase und Sorbittransport in Zellen der dicken aufsteigenden Henleschen Schleife (TALH)**

Der Transport für das organische Osmolyt Sorbit in einer mikrosomalen Membranfraktion, die aus einer permanenten Zellkultur von TALH Zellen gewonnen werden kann, wird durch die gleichzeitige Anwesenheit von ATP, Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> stimuliert. Die stimulierende Wirkung von ATP ist auch dann noch erhalten, wenn ATP nach zehnmütiger Vorphosphorylierung der Membranen durch Zugabe von D-Glukose und Hexokinase total entfernt wird. Durch Verwendung verschiedener Hemmstoffe für Proteinkinasen konnte eine Beteiligung von PKC (PKC Inhibitor Protein) und PKA (KT 5720 und niedrige Konzentrationen von Staurosporin) ausgeschlossen werden. Staurosporin zeigte erst in hohen Konzentrationen (40 nM) eine hemmende Wirkung. Daneben hemmt auch Trifluoperazin in Konzentrationen von 10 bis 100 mM (40-90%). Diese Resultate weisen darauf hin, daß eine Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin abhängige Proteinkinase Bestandteil der Signaltransduktionskette ist, die bei hypotonem Schock zur erhöhten Freisetzung von Sorbit aus TALH Zellen führt (in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. R. Kinne).

### **Expression eines Magnesiumtransportsystems in *Xenopus laevis* Oocyten**

Ziel dieses Projektes ist es, das von uns in der Niere von Regenbogenforellen beschriebene Transportsystem für Mg<sup>2+</sup> in *Xenopus* Oocyten zu exprimieren. Deshalb wurden zunächst unbehandelte Oocyten auf ihre basale Mg<sup>2+</sup> Transportrate mit Hilfe von elektrophysiologischen Methoden untersucht. Zwischen Zellinnerem und Zelläußeren besteht eine elektrochemische Potentialdifferenz für Mg<sup>2+</sup> von bis zu 1:1000. Trotz dieser enormen Triebkraft konnten aber keine Mg<sup>2+</sup> Bewegungen über die Membran erfaßt werden. In Anwesenheit des Ionophors A23187 stiegen sowohl der Mg<sup>2+</sup> Strom über die Membran als auch die Konzentration an intrazellulärem Mg<sup>2+</sup> an. Wegen seiner niedrigen endogenen Mg<sup>2+</sup> Transportrate erscheint der Oocyt daher ein geeignetes System für die Injektion von mRNA aus Nierengewebe der Regenbogenforelle zur Expression, funktionellen Analyse und Klonierung des Mg<sup>2+</sup> Transportsystems zu sein (Dr. F. Wehner, J. Luig, H. Schütz) (in Zusammenarbeit mit Prof. K. Beyenbach, Ithaca, N.Y.).

### **Lokalisation der Interaktion von Quecksilber mit dem Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2-Cl<sup>-</sup> Kotransportsystem**

Der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup>-Kotransporter wird durch Quecksilberchlorid (HgCl<sub>2</sub>) gehemmt. Dies hat besonders bei chronischen Vergiftungen Störungen des Elektrolythaushaltes zur Folge. Unsere bisherigen Studien an isolierten Plasmamembranen aus der Rektaldrüse des Dornhais konnten keinen Aufschluß darüber geben, an welcher Seite der Plasmamembran HgCl<sub>2</sub> mit dem Transportmolekül reagiert. Deshalb haben wir unsere Untersuchungen auf intakte T84 Zellen, eine menschliche Kolonkarzinomzelle, ausgedehnt, in denen das Transportprotein immunologisch nachgewiesen worden ist. In Transportversuchen mit <sup>86</sup>Rb zeigte sich, daß T84 Zellen eine hohe Aktivität des Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup>-Kotransporters besitzen, der eine ähnliche Empfindlichkeit und Selektivität gegenüber HgCl<sub>2</sub> zeigt wie die Rektaldrüse. Die Hemmung durch HgCl<sub>2</sub> ist bereits nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten signifikant und kann durch Glutathion, das nicht membrangängig ist, völlig aufgehoben werden. Daraus schließen wir, daß die Bindungsstelle für HgCl<sub>2</sub> am Transportprotein an der extrazellulären Seite der Zellmembran lokalisiert ist (in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. R. Kinne).

### **Putative role of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in regulation of hypotonicity-induced sorbitol transport in cells of the thick ascending limb of Henle's loop (TALH)**

Our recent studies had indicated that ATP, calcium and magnesium are mandatory for optimum activity of the sorbitol transport system present in a light microsomal membrane fraction derived from TALH cells kept in culture at 300 mosmol. The stimulation by ATP was observed even after complete removal of ATP after a 10 minute pre-phosphorylation period by addition of D-glucose and hexokinase. Neither protein kinase C seems to be involved nor protein kinase A since the inhibitor KT 5720 had no effect on transport and staurosporine exerted an inhibitory effect of about 60% only when used in concentrations as high as 40 nM. Inhibition of sorbitol transport was also found with trifluoperazine, a calmodulin-specific inhibitor, over the range from 10 to 100 mM (40-90%). We thus conclude that a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase plays a pivotal role in the activation of the hypotonicity-induced sorbitol efflux from TALH cells (together with Prof. Dr. R. Kinne).

### **Expression of Mg<sup>2+</sup> transport systems in *Xenopus oocytes***

The first clear identification of an electrodiffusive transport pathway for Mg<sup>2+</sup> in renal brush border membrane vesicles of the rainbow trout has been encouraging to pursue expression studies in *Xenopus* oocytes for the purpose of a functional analysis of its properties. Therefore, the physiology of Mg<sup>2+</sup> was investigated in normal oocytes of stage V and VI. Intracellular electrochemical potentials of Mg<sup>2+</sup> as measured with conventional and Mg<sup>2+</sup>-selective electrodes are up to 1000-fold smaller than extracellular electrochemical potentials. In spite of the large driving force there are no measurable transmembrane macroscopic Mg<sup>2+</sup> currents in dual electrode voltage-clamp experiments. However, in the presence of A23187 membrane current and intracellular Mg<sup>2+</sup> concentration increase in parallel. Thus, normal oocytes represent an ideal situation for expressing the electrodiffusive Mg<sup>2+</sup> transport system (Dr. F. Wehner, J. Luig, H. Schütz) (together with Prof. K. Beyenbach, Ithaca, N.Y.).

### **Studies on the sidedness of mercury inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> cotransport in intact T84 cells**

In previous studies on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> cotransport in isolated plasma membranes from shark rectal gland we found that 1. anorganic mercury but not organic mercurials inhibit the transport system, and 2. mercury inhibits at a site located at one of the plasma membrane surfaces. A conclusion whether the interaction with mercury occurs at the intra- or the extracellular surface could not be drawn. We therefore turned to a colon cancer cell line (T84) in which the presence of the cotransport protein had been demonstrated immunologically. <sup>86</sup>Rb flux measurements showed that T84 cells contain a functionally active Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> cotransport with a sensitivity and selectivity to mercurial compounds comparable to that of the shark rectal gland. Furthermore, inhibition by mercury occurs already within 2 minutes of incubation time and the inhibition is rapidly and completely reversible after addition of a membrane impermeant scavenger such as glutathione. It is concluded that the site at which mercury exerts its inhibitory action on the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> cotransport is located at the extracellular face of the plasma membrane (together with Prof. Dr. R. Kinne).

## Molekulare Physiologie und vergleichende Biologie des epithelialen Transports

### 1. Natrium-D-Glukosekotransportsysteme der Niere

An Bürstensaummembranvesikeln von verschiedenen Fischnieren konnten neben der unterschiedlichen Stöchiometrie auch unterschiedliche Affinitäten zur Glukose und von uns synthetisierten C-6 Diazirino-derivaten gefunden werden. Danach scheinen Systeme mit einer 2:1 Stöchiometrie ( $\text{Na}^+$ /Glukose) eine zusätzliche hydrophobe Bindungsdomäne für die  $\text{CH}_2$ -Gruppe in der C6-Position des Zuckers zu besitzen, die eine höhere Affinität für Glukopyranosen bewirkt (Dr. H. Kipp, Dr. E. Kinne). Dadurch gewinnen die von uns initiierten Versuche, aus der Forellenniere das  $\text{Na}^+$ -Glukosekotransportsystem mit der 1:1 Stöchiometrie zu klonieren und es mit klonierten Systemen mit einer 2:1 Stöchiometrie zu vergleichen, eine erhöhte Bedeutung für die Struktur-Funktionsanalyse des Transporters (J. Luig, H. Schütz). Die photosensiblen Diazirinoderivate scheinen auch dazu geeignet, andere zuckerbindende Proteine zu markieren. So reagieren sie z.B. effektiv mit der in Bürstensaummembranen vorkommenden Trehalase (Dr. H. Kipp).

Zur Ermöglichung weiterer biochemischer und biophysikalischer Arbeiten wurde der renale Natrium-Glukosekotransporter permanent in CHO-Zellen exprimiert. Die erhaltenen Zellklone zeigen eine etwa  $10^5$ -fache höhere Transportaktivität. Der Transporter ist immunhistochemisch an der Membranoberfläche sowie in intrazellulären Vesikeln in Clustern nachzuweisen (Dr. J. Kormanec, Ch. Pfaff, P. Glitz, Dr. P. Herter; in Zusammenarbeit mit Dr. J.-T. Lin).

### 2. Natrium-Phosphat-Kotransportsystem

Im Gegensatz zu den in Expressionsversuchen an *Xenopus* Oozyten erhobenen Befunden (siehe Bericht AG Dr. A. Werner), erweist sich das intestinale Natrium-Phosphatkotransportsystem der Flunder in Transportstudien an isolierten Bürstensaummembranvesikeln als nur sehr schwach elektrogen; dies könnte auf einen wesentlichen Einfluß der Membranlipide oder auf eine Regulation in situ (Phosphorylierung, etc.) des Transportsystems hinweisen (in Zusammenarbeit mit Dr. E. Kinne).

### 3. Transportsysteme für organische Osmolyte in Sammelrohrzellen der inneren Medulla der Niere

Die Sammelrohrzellen benutzen eine Vielzahl von organischen Osmolyten, um ihr Volumen trotz der stark schwankenden Osmolarität der extrazellulären Flüssigkeit konstant zu halten. Pharmakologische und zellbiologische Untersuchungen an isolierten Zellen und differenzierten Primärkulturen sowie die Analyse von Signaltransduktionswegen (G-Proteine,  $\text{Ca}^{2+}$ , Arachidonsäure) haben gezeigt, daß die Zellen anscheinend spezifische Transportsysteme für Sorbit, Betain und Glycerophosphorylcholin besitzen, die durch unterschiedliche intrazelluläre Signalketten reguliert werden. Taurin und Myoinositol benutzen einen gemeinsamen Transportweg, der mit dem von uns charakterisierten schwellungsaktivierten Anionenkanal identisch ist. Die Regulation dieser Kanäle, insbesondere durch Proteinkinasen und Phosphatasen wird z. Zt. untersucht (Dr. B. Ruhfus; in Zusammenarbeit mit Dr. F. Wehner).

## Molecular Physiology and Comparative Biology of Epithelial Transport

### 1. Renal sodium-D-glucose cotransport systems

In studies comparing the characteristics of sodium-glucose cotransport in brush border vesicles isolated from various fish species it was observed that transport systems with a stoichiometry of 2:1 (sodium/glucose) (SGLT1) apparently possess a hydrophobic domain in the substrate (glucose) binding pocket that interacts with the  $\text{CH}_2$ -group at the C6 position of the pyranose. This additional interaction contributes to the higher affinity of these systems for glucopyranosides and the diazirino derivatives prepared in our laboratory compared to transport systems with a 1:1 stoichiometry (Dr. H. Kipp, Dr. E. Kinne).

Experiments have been initiated to clone the latter systems in order to compare its structure-function relation with SGLT1, that has been cloned before by our group (J. Luig, H. Schütz).

The photo-activatable diazirino sugars appear also to be suitable to label other proteins that contain sugar recognition sites such as the brush border membrane trehalase (Dr. H. Kipp).

For further biochemical and biophysical studies SGLT1 was permanently overexpressed in CHO cells. The cell clones obtained have an about  $10^5$ -fold higher sodium-dependent D-glucose uptake activity. The transporter can be shown by immuno-scanning electron microscopy to be expressed in clusters on the membrane surface and in intracellular vesicles (Dr. J. Kormanec, Ch. Pfaff, P. Glitz, Dr. P. Herter; in cooperation with Dr. J.-T. Lin).

### 2. Sodium-phosphate cotransport system

The recently cloned renal and intestinal flounder sodium-phosphate cotransport system was further characterized in brush border membrane vesicles isolated from the flounder intestine. In contrast to the results obtained in expression experiments using *Xenopus* oocytes (see report Dr. A. Werner) the electrogenicity of the transporter in the brush border vesicles was rather weak, suggesting a modulating effect of membrane lipids on the transporter or regulation in situ by phosphorylation, for example (in cooperation with Dr. E. Kinne).

### 3. Transport systems for organic osmolytes in renal inner medullary collecting duct (IMCD) cells

During concentration or dilution of the urine IMCD cells are exposed to rapid and large changes in the osmolality of the extracellular medium. They regulate their intracellular osmolality predominantly by using organic osmolytes. Pharmacological and physiological investigations on isolated cells and differentiated primary cell cultures as well as the analysis of the signal transduction pathways ( $\text{Ca}^{2+}$ , arachidonic acid, G proteins) revealed that the efflux pathways for sorbitol, betaine, and glycerophosphorylcholine are separate entities and regulated differently. Taurine and myoinositol seem to share a common pathway that is identical with the swelling-activated anion channel characterized by electrophysiological means. The regulation of these channels by protein kinases and phosphatasen is currently under investigation (Dr. B. Ruhfus; in cooperation with Dr. F. Wehner).

**Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des Na<sup>+</sup>/D-Glukose-Kotransportsystems (SGLT1)**

**A: Direkte Identifizierung und Charakterisierung der Bindungsstellen des Kotransporters für D-Glukose und Phlorizin**

- Eine Reihe von Glukosiden (zum Teil von unserer Gruppe synthetisiert) mit aliphatischen und aromatischen Aglukonresten verschiedener Kettenlänge oder Geometrie wurden als spezifische Proben für die Analyse der 3-dimensionalen Struktur der Bindungsstellen am aktiven Zentrum des Kotransporters ausgewählt. Die Hemmwirkung dieser Verbindungen wurde getestet. Die meisten Verbindungen wurden dann der QSAR-Analyse zugeführt. In Übereinstimmung mit früheren Studien darf der Abstand des Aglukonteils zum C1-Atom der Glukose 10 Å nicht überschreiten, um eine gute Wechselwirkung zwischen Aglukon und hydrophoben Regionen des Kotransporters zu ermöglichen. Ferner testeten wir die Konformation von Phlorizin in physiologischer Lösung mittels NMR-Studien, Computermodellierung und Fluoreszenzmessungen. Die Ergebnisse zeigen, daß die zwei aromatischen Ringe des Phlorizins eine von der Kristallstruktur abweichende, stapelartige Anordnung annehmen (zusammen mit Dr. Weinlich).

- Weitere Antikörper, PAN-2 und -3 wurden gegen die Aminosäuresequenzen bei 256+ und das C-terminale Ende hergestellt. Im Gegensatz zu dem früheren Antikörper AB317, der gegen das N-terminale Ende entwickelt wurde und spezifisch für SGLT1 in der Nierenrinde von Kaninchen war, konnte PAN-3 SGLT1 in verschiedenen Geweben erkennen. Zum erstenmal konnte das mit SGLT1-zusammenhängende Polypeptid bei 72kD in einem hohen Reinheitsgrad immunopräzipitiert werden.

- Bürstensaummembranen von Kaninchennieren oder Zellmembranextrakte von transfizierten CHO-Zellen wurden mit 10 µM α-Iodoacetamid [<sup>14</sup>C]phlorizin bei pH 8.5 inkubiert. Eine [<sup>14</sup>C]-markierte Hauptbande bei 72 kD wurde als identisch zu der von dem Antikörper erkannten Bande auf dem Westernblot festgestellt. Dieses Polypeptid konnte auch durch Immunopräzipitation gewonnen werden. Zur Zeit sind wir mit der Isolation dieses Polypeptids und der Identifizierung der radioaktiv markierten Aminosäuren beschäftigt.

**B: Expressionssysteme für den Kotransporter für Studien der Topographie, Produktion und posttranslationalen Prozessierung**  
Die dem SGLT1 des Kaninchens entsprechende cDNA wurde in verschiedene eukaryontische Expressionsvektoren, pZeoSV, pGFPN1 und pYeDP1/8-10 für die Etablierung eines transienten Expressionssystems in COS-7, eines stabilen Überexpressionssystems in CHO bzw. eines Hefeexpressionssystems kloniert. Alle Systeme wurden für die Expression des SGLT1 mit Northern- und Western-Analysen erfolgreich getestet. Die Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-α Methylglukosid (AMG) in COS-7-Zellen war 8 bis 9-fach höher als die Na<sup>+</sup>-unabhängige Aufnahme, bei Zugabe von 0.5 mM Phlorizin wurde eine vollständige Hemmung beobachtet. Die stabil transfizierten CHO-Zellen zeigten ein enorm hohes Niveau der Expression von SGLT1 (20 bis 30 fach höher als bei Xenopus Oocyten oder COS-7-Zellen). Für die COS-7-Zellen war es möglich ein 6xHis-tag an verschiedenen Positionen des SGLT1 durch Mutagenese einzuführen. Dies führte zu Modifikationen der Transportaktivität. Diese Zellen sollen in Zukunft zur Bestimmung der Topologie des Transportsystems benutzt werden. Für das Hefeexpressionssystem wurde das klonierte Plasmid pYeDP-SGLT1 in einen temperaturempfindlichen Hefestamm, *S.cerevisiae* NY17 eingeschleust. Die Zellen wurden zunächst bei einer Temperatur von 23°C gezüchtet. Die Kultur wurde dann vor dem Ernten für 2,5 Stunden auf 37°C gebracht. Dabei kommt es zu einer Akkumulation sekretorischer Vesikel, in deren Membran sich SGLT1 befinden sollte. Zur Zeit sind wir mit der Isolation und Charakterisierung der Vesikel beschäftigt. Dieses Modellsystem dient zum einen den Untersuchungen der cytoplasmatischen Seite des Kotransporters, zum anderen soll es als Ausgangsmaterial für die Isolierung des Transportproteins dienen (zusammen mit Dr. R. Kinne und Chr. Pfaff).

**Structural and functional characterization of the Na<sup>+</sup>/D-glucose-Cotransport System (SGLT1)**

**A: Direct identification and characterization of the binding site of the cotransporter for D-glucose and/or phlorizin**

- A series of glucosides (partly synthesized in our group) with varied aglucone residues including alkyl- and aryl chains of different length and geometries were selected to probe the 3-D structure at the center of the glucose binding site. The inhibitory effects of these compounds on the Na/D-glucose cotransport as a function of the parameters were tested. Most compounds were then subjected to QSAR analysis. In agreement with previous studies the distance of the aglucone part to the C1 atom of the glucose molecule should not exceed 10 Å in order to achieve effective interactions with the hydrophobic regions of the cotransporter. Furthermore the conformation of phlorizin in a physiological solution was tested using n.m.r. studies, computer modeling and fluorescence measurements. The results suggest that the two aromatic rings of phlorizin tend to adopt a stacked position that is different from the crystal structure [in cooperation with Dr. Weinlich].

- Further polyclonal anti-peptide antibodies (PAN-2 and -3) were developed against the amino acid sequences 256+ and the C-terminus, respectively. In contrast to the AB317, that was developed earlier against the N-terminus and is specific for SGLT1 in rabbit kidney cortex, Pan 3 recognizes SGLT1 in different tissues. Using Pan 3 we were able to immunoprecipitate the SGLT1-related polypeptide to a high degree of purity and we obtained immunogold staining both in the kidney cortex and in transfected cell lines (together with Dr. P. Herter).

- Brush-border membranes isolated from the rabbit kidney or cell membrane extracts from transfected CHO cells were incubated with 10 µM α-iodoacetamido [<sup>14</sup>C]phlorizin at pH 8.5. A major [<sup>14</sup>C] labelled band in the vicinity of 72kD was found to be identical to that labeled by PAN 3. This polypeptide could be immunoprecipitated. We are presently in progress to isolate this polypeptide and to determine the radioactively labeled amino acids.

**B: Establishment of expression systems for studies on topography, production and posttranslational procession of the SGLT1**

cDNA encoding rabbit SGLT has been cloned into different eucaryotic expression vectors, pZeoSV, pGFPN1 and pYeDP1/8-10 for establishing a transient expression system in COS-7, a stable over-expression system in CHO and a yeast expression system, respectively. In all systems successful expression of the SGLT1 could be demonstrated by Northern and Western analysis. [<sup>14</sup>C]-α-methylglucoside uptake by COS-7 was found to be 8 to 9 fold higher than the basal values (Na<sup>+</sup>-independent) and was completely abolished by 0.5 mM phlorizin. The stably transfected CHO cells showed an enormously high level of expression of the SGLT1 (20 to 30 fold higher than those of the Xenopus oocytes or of COS-7 cells). For the transfected COS-7 cells it was possible to introduce 6xHis tags into different positions of the SGLT1 by mutagenesis leading to modification of cotransport activities. These cells will be used further to define the topology of the transporter. For the yeast expression system, the plasmid pYeDP-SGLT1 was transfected into a temperature-sensitive yeast strain, *S.cerevisiae* NY17. The cells were grown at a permissive temperature at 23°C and then shifted to 37°C before harvest to induce accumulation of secretory vesicles in which SGLT1 is supposed to be incorporated. This model will allow access to the cytosolic side of the cotransporter and provide the starting material for large scale purification (together with Dr. R. Kinne and Chr. Pfaff).

Der initiale Vorgang bei der regulatorischen Volumenzunahme (RVI) von Ratten-Leberzellen besteht in einer Erhöhung des intrazellulären  $\text{Na}^+$ , das dann über die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase gegen  $\text{K}^+$  ausgetauscht wird. Durch elektrophysiologische Messungen mit intrazellulären Mikroelektroden, fluorometrische Bestimmung von Zell-pH und -Pufferkapazität, sowie Quantifizierung der Furosemid-abhängigen  $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme konnte gezeigt werden, daß  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiport und  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Symport im Verhältnis 4:1:1 zur Erhöhung des intrazellulären  $\text{Na}^+$  beitragen. Dieses Verhältnis bestätigte sich in Messungen des RVI mit Hilfe konfokaler Laser-Rastermikroskopie unter Verwendung verschiedener Inhibitoren ( $10^{-5}$  und  $10^{-3}$  mol/l Amilorid und/oder  $10^{-4}$  mol/l Furosemid).

In einigen Systemen zeigen  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit und  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase eine deutliche pH-Abhängigkeit. Die ausgeprägte Zell-Alkalinisierung, die in Hepatozyten unter hypertone Stress durch Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiportes erfolgt (s.o.), könnte somit an der Stimulierung von  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit und  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase beteiligt sein. Messungen mit intrazellulären Mikroelektroden in Ionen-Substitutionsversuchen sowie Bestimmungen der Ouabain-abhängigen  $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme bei veränderten intrazellulären pH-Werten zeigten jedoch klar, daß ein solcher Mechanismus am RVI von Ratten-Leberzellen nicht beteiligt ist.

Veränderungen des intrazellulären  $\text{Na}^+$  von Ratten-Leberzellen unter hypertone Stress wurden mit Hilfe eines Video-Imaging-Systems fluorometrisch quantifiziert. Diese Messungen sind die Basis für geplante parallele Bestimmungen von Zell- $\text{Na}^+$  (mit dem Farbstoff SBFI) und -pH (mit BCECF) zur differentiellen Untersuchung der Aktivierungsmechanismen von  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit und  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiport während des RVI. Messungen mit dem Farbstoff Fura-2 zeigen, daß Veränderungen des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  am RVI von Ratten-Leberzellen nicht beteiligt sind.

Die Einzelkanal-Eigenschaften des volumenaktivierten  $\text{Na}^+$ -Kanals von Ratten-Leberzellen werden z.Zt. mit Hilfe der 'patch-clamp'-Technik untersucht. Sammelrohr-Zellen der Rattenniere (IMCD) besitzen einen Anionen-Kanal, der durch hypotonen Streß aktiviert wird. Die Einzelkanal-Eigenschaften dieses Kanals wurden mit der 'patch-clamp'-Methode in der 'whole cell'- und in der 'outside out'-Konfiguration untersucht und zwar mit Hilfe von Rauschanalysen sowie in diskreten Einzelkanal-Ableitungen. Auf diese Weise konnte die Leitfähigkeit des Kanals in den Bereichen von -100 bis -50 mV und +50 bis +120 mV zu 34 bzw. 77 pS bestimmt werden. Die Strom-Spannungs-Beziehung des einzelnen Kanals ähnelt sehr der makroskopischen auswärts-gerichteten  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit und die Offenwahrscheinlichkeit des aktivierten Kanals ist nahe 1.

Nach Expression des  $\text{Na}^+$ -D-Glukose-Kotransporters in CHO (chinese hamster ovary)-Zellen (vgl. Dr. C.T. Lin) zeigen diese in Anwesenheit von  $\alpha$ -Methylglukose eine erhebliche Depolarisation des Membranpotentials und eine parallele Abnahme des Eingangswiderstandes - beides Ausdruck der elektrogenen Aufnahme der Substanz über den Transporter.

Elevation of cell  $\text{Na}^+$  which is thereafter exchanged for  $\text{K}^+$  via  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase plays the key role in the regulatory volume increase (RVI) of rat hepatocytes. In intracellular recordings with conventional and ion-sensitive microelectrodes, fluorometric determinations of cell pH and buffer capacity, as well as measurements of furosemide-sensitive  $^{86}\text{Rb}^+$  uptake, it became evident that the relative contribution of  $\text{Na}^+$  conductance,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -antiport, and  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  symport to this increase in cell  $\text{Na}^+$  equals 4:1:1. This ratio could be confirmed in measurements of RVI by means of confocal laser-scanning microscopy using different transport inhibitors ( $10^{-5}$  and  $10^{-3}$  mol/l amiloride and/or  $10^{-4}$  mol/l furosemide).

In some preparations,  $\text{Na}^+$  conductance and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase exhibit a significant dependence on cell pH. In this respect, the pronounced cell alkalization of rat hepatocytes under hypertonic stress via activation of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange (see above) may serve as the triggering mechanism in the activation of  $\text{Na}^+$  conductance and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. However, as intracellular recordings in ion-substitution experiments as well as determinations of ouabain-sensitive  $^{86}\text{Rb}^+$  uptake at alkaline cell pH clearly showed, such a mechanism is not involved in the RVI of rat hepatocytes.

Changes of cell  $\text{Na}^+$  in rat hepatocytes under hypertonic stress were monitored on a video-imaging system by use of the fluorescent dye SBFI. To elucidate the mechanisms of activation of  $\text{Na}^+$  conductance as well as  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport a parallel quantification of cell  $\text{Na}^+$  and cell pH with BCECF is currently in preparation. Measurements with the fluorescent dye Fura-2 reveal that changes in cell  $\text{Ca}^{2+}$  are not involved in the RVI of rat hepatocytes.

In patch-clamp experiments, the single-channel properties of volume-activated  $\text{Na}^+$  channels in rat liver cells are currently under investigation.

Single-channel properties of the volume-activated  $\text{Cl}^-$  conductance of rat inner medullary collecting duct (IMCD) cells were studied by means of the patch-clamp technique in the whole cell and in the outside-out configuration. Measurements were performed by noise analysis and in single channel recordings. Unitary conductances could be defined for the voltage range of -100 to -50 mV and between +50 and +120 mV and chord conductances of 34 and 77 pS, respectively, could be calculated. The overall current-to-voltage relationship very much resembles that of the macroscopic  $\text{Cl}^-$  conductance and the open probability of the activated channel is close to unity.

After expression of  $\text{Na}^+$ -D-glucose cotransport (c.f. to Dr. C.T. Lin), CHO (chinese hamster ovary) cells exhibit a significant depolarization of membrane voltage and a concomitant decrease in input resistance upon addition of  $\alpha$ -methyl glucose, both, reflecting electrogenic uptake of the compound.

## Arbeitsgruppe Dr. A. Werner

Mitarbeiter: Dr. B. Hülseweh, B. Kohl, H. Rimpel, B. Schölermann, U. Strunck

### Funktionelle und zelluläre Aspekte des Na/P<sub>i</sub> Kotransports

Der Na/P<sub>i</sub> Kotransporter (Flunder NaPi-II), isoliert aus Flunderniere und Darm, stellt ein vielseitiges Modellsystem zur Untersuchung von molekularen Eigenschaften der NaPi-II-Proteinfamilie und zur Aufklärung grundlegender zellulärer Prozesse dar. Das Fischsystem unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von den Säugersystemen: (i) Flunder NaPi-II wird in verschiedenen Nephron-Abschnitten und im Darm exprimiert. Je nach physiologischen Bedingungen entweder apikal oder basolateral in den epithelialen Zellen. (ii) Es wird ein Antisense-Transkript zu Flunder-NaPi-II exprimiert. (iii) Flunder NaPi-II cRNA induziert in *Xenopus* Oocyten einen phosphatabhängigen Strom, welcher 10x größer ist als der von entsprechender Säuger cRNA. Dies ermöglichte die elektrophysiologische Charakterisierung des Transportsystems im steady state und pre-steady state. (Zusammenarbeit mit C.A. Wagner, Tübingen und Dr. I.C. Forster, Zürich).

Antisense RNA: Wir haben aus Flundergonaden eine cDNA mit partieller Homologie aber entgegengesetzter Orientierung zu Flunder NaPi-II isoliert (IPAN). Mit immunhistologischen Methoden konnten wir zeigen, daß Ipan und NaPi-II auf Gewebeschnitten von Niere und Darm an der apikalen Membran kolokalisiert sind. In Gonaden von Flunderweibchen wird IPAN transient in Oocyten eines mittleren Reifestadiums exprimiert.

Struktur-Funktionsanalysen: Um die Topologie des Na/P<sub>i</sub> Kotransportsystems aufzuklären haben wir eine Reihe von Mutationen erzeugt und diese in *Xenopus* Oocyten exprimiert. Das vorgeschlagene Modell (8 Transmembranregionen (TMR), N- und C-Terminus intrazellulär) ist nicht endgültig bestätigt, es mehren sich jedoch die Indizien für seine Richtigkeit. Der C-Terminus ist erforderlich für die Insertion des Transporters in die Membran. TMR 1-3 und TMR 4-8 falten sich unabhängig voneinander: Die Coexpression dieser beiden Konstrukte induzieren einen Na/P<sub>i</sub> Flux vergleichbar dem Wildtyp, andere Kombinationen (TMR 1 + TMR 2-8; TMR 1-5 + TMR 6-8) induzieren keinen P<sub>i</sub> Flux.

Intrazelluläres Sorting: Um zu testen welche Faktoren das Sorting des Kotransporters zur apikalen bzw. basolateralen Membran beeinflussen, haben wir Karpfen an verschiedene Umweltbedingungen (Salinität, P<sub>i</sub>-Verfügbarkeit) adaptiert. Zur Kontrolle haben wir außerdem mittels PCR NaPi-II aus Karpfen kloniert und sequenziert.

### Functional and cellular aspects of Na/P<sub>i</sub> cotransport

The Na/P<sub>i</sub> cotransport system from winter flounder kidney and intestine (flounder NaPi-II) turned out to be a versatile system to study molecular properties of the NaPi-II protein family or basic cellular processes (sorting, gene expression). Three hallmarks distinguish the fish system from its mammalian counterparts: (i) flounder NaPi-II protein is expressed in different parts of the nephron and in intestine and can be sorted to the apical or the basolateral membrane. (ii) An antisense transcript is involved in the expression of flounder NaPi-II. (iii) The fish NaPi-II cRNA induces a phosphate related current (*I<sub>p</sub>*) in *Xenopus laevis* oocytes which is about 10 times larger than the one obtained with mammalian cRNAs. This allowed an electrophysiological characterization of flounder NaPi-II induced *I<sub>p</sub>* including steady state and pre-steady state analysis. This was done in collaboration with C.A. Wagner (Tübingen) and Dr. I.C. Forster (Zürich).

Antisense regulation: Recently, we have cloned a cDNA showing partial homology to flounder NaPi-II with an opposite orientation (IPAN). In order to investigate a putative IPAN encoded protein (Ipan) we generated an antiserum against the C-terminal 16 amino acids. The antiserum was used for detection of Ipan on cross-sections of flounder gonads, kidney and intestine. Parallel sections were stained with an antiserum against flounder NaPi-II protein. Interestingly, Ipan and NaPi-II protein seem to be colocalized in kidney and intestine, predominantly at the apical membrane (intestine, collecting tubule). In flounder female gonads Ipan is expressed transiently in mid-size oocytes (NaPi-II is not detected). Therefore, Ipan has two putative functions, one involves regulation of P<sub>i</sub> transport, the other seems to interfere with oogenesis.

Structure-function: A series of different mutations have been generated to test the topology of the Na/P<sub>i</sub> cotransport system. This includes deletion constructs as well as cleaved transporters. The different constructs were expressed in *Xenopus* oocytes. Thus far, the proposed model (8 transmembrane regions (TMR), N-/C-termini intracellular) was not challenged. The C-terminus is mandatory for the correct insertion of the protein into the membrane. Furthermore, TMR 1-3 and TMR 4-8 seem to fold independently: coexpression of the two constructs induces a Na/P<sub>i</sub> flux, whereas other combinations, TMR 1 + TMR 2-8 or TMR 1-5 + TMR 6-8, don't.

Intracellular sorting: To test factors which might influence the sorting of NaPi-II protein to either apical or basolateral membrane (salinity, P<sub>i</sub> availability) carps were adapted to different conditions. For control reasons, carp NaPi-II was cloned and sequenced using a PCR-approach.

### **1. Analytische Elektronenmikroskopie (AEM)**

Die Verteilung chemischer Elemente in Zellen und Geweben wurde mit der Röntgenmikroanalyse Kryoschnitten im Rastertransmissionselektronenmikroskop gemessen und mit dem jeweiligen Funktionszustand korreliert. Im Jahr 1996 wurden mit dieser Methode vor allem drei biologische Fragestellungen untersucht:

- Die Wirkung von Cadmium auf die Elektrolytenzusammensetzung in kultivierten Rattenleberzellen. Cadmium im Kulturmedium bewirkt eine Umkehr des intrazellulären K/Na-Verhältnisses von ca. 7 - 10 auf Werte < 1. In einer CO<sub>2</sub>-haltigen Atmosphäre ist Cadmium deutlich weniger toxisch als an Luft. Zink kann die toxische Wirkung von Cadmium auf das K/Na-Verhältnis verringern. AEM-Untersuchungen über die Wirkung anderer Schwermetalle (Hg, Tl, Pb) auf Elektrolyten in Leberzellen sind in Arbeit.
- Ionentransport in den Malpighi-Gefäßen der Drosophila Larve (in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. A. Wessing, Universität Giessen). Unsere AEM-Untersuchungen haben zu einem neuen Modell des epithelialen Ionentransportes in Malpighi-Gefäßen geführt: Kalium wird durch ein apikales Transportsystem bestehend aus V-ATPase und H/K-Antiporter ins Lumen transferiert. Carboanhydrase im Golgi-ER Komplex liefert Protonen zum Betrieb der V-ATPase. Glykosaminoglykane aus dem Golgi-ER Komplex wirken als vorübergehende apikale Kaliumspeicher zur Erleichterung des Kalium-Transportes.
- Biomineralisierung in Hartgewebe (in Zusammenarbeit mit Dr. H.-P. Wiesmann, Universität Münster). Elementverteilungsbilder von Kryoschnitten des Schneidezahns der Ratte legen nahe, daß Magnesium und Kalium an der Dentinbildung beteiligt sind.

### **2. Konstruktion eines Kryo-Rasterkraftmikroskopes.**

Dieses Projekt zielt auf die hochauflösende Abbildung biologischer Membranen und Zelloberflächen ohne Kontrastierungsmittel bei tiefer Temperatur mit einem Rasterkraftmikroskop. Das hierzu konstruierte Experimentiergerät (Ultrahochvakuumbehälter mit Kryostat) ermöglicht die kraftmikroskopische Abbildung von Testpräparaten (80 nm große Latexkugeln) bei 118 K mit der gleichen Qualität wie bei Raumtemperatur in Luftatmosphäre. Nun können die Untersuchungen auf biologische Testpräparate (Gold-gekoppelte Antikörper und isolierte Membranen) ausgedehnt werden.

### **1. Analytical electron microscopy (AEM)**

The distribution of chemical elements in cells and tissues was measured by X-ray microanalysis of cryosections in the scanning transmission electron microscope and correlated with the particular functional state. In 1996 essentially three biological problems were investigated by means of this method:

- The effect of cadmium on the electrolyte ion composition in cultured rat liver cells. Cadmium in the culture medium causes inversion of the intracellular K/Na-ratio of 7 - 10 under control conditions to values < 1. In an atmosphere containing CO<sub>2</sub> cadmium is clearly less toxic than in air. The toxic effect of cadmium on the intracellular K/Na-ratio can be reduced by zinc. AEM studies on the effect of other heavy metals (Hg, Tl, Pb) on electrolyte ions in rat liver cells are in progress.
- Ion transport in the Malpighian tubules of Drosophila larva (in collaboration with Prof. Dr. A. Wessing, University of Giessen). Our AEM studies have led to a new model of epithelial ion transport in Malpighian tubules: K is transferred into the lumen by an apical transport system consisting of V-ATPase and K/H-antiport. Carbonic anhydrase provides protons to drive V-ATPase. Glycosaminoglycans delivered by the Golgi-ER complex act as transient K stores close to the apical cell membrane to facilitate K transport.
- Biomineralization in hard tissue (in collaboration with Dr. H.-P. Wiesmann, University of Münster). Elemental maps obtained from cryosections of the rat incisor indicate that magnesium and potassium are involved in dentine formation.

### **2. Construction of a cryo scanning force microscope.**

This project aims at imaging biological membranes and cell surfaces without any metal stain at low temperature by scanning force microscopy. The experimental setup consisting of an ultra high vacuum container with cryostat allows scanning force microscopic imaging of test specimen (latex beads 80 nm in size) at 118 K with the same quality as at room temperature in air. Thus, studies can be extended to biological test specimens (gold coupled antibodies and isolated membranes).

**Abteilung III:**

**Physikalische Biochemie**

**(Leiter: Prof. Dr. R.S. Goody)**

**Department III:**

**Physical Biochemistry**

**(Head: Prof. Dr. R.S. Goody)**



## Arbeitsgruppe Dr. M. Engelhard

Mitarbeiter: Z. Ahmed, A. Doerner, M. Eilers, I. Hohenfeld, B. Lüttenberg, M. Peters, A. Prein, A. Scholz, J. Sydor, A. Wegener

### 1. Energietransduktion in *Natronobacterium pharaonis*

Die Atmungskette von *N. pharaonis* wurde weiter untersucht. Im vorhergehenden Jahr konnte die Aminosäuresequenz von Cytochrome  $ba_3$  bestimmt werden. Im abgelaufenen Berichtszeitraum wurde das Protein zur Homogenität mit allen vier Untereinheiten aufgereinigt. Die Untereinheiten I und II sowie eine der kleinen Peptide wurde durch N-terminale Sequenzierung identifiziert. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, daß Halocyanin an Cytochrome  $ba_3$  bindet. Dies ist ein Hinweis darauf, daß Halocyanin der Elektronendonator von Cytochrome  $ba_3$  ist. (S. Mattar) Unter aeroben Bedingungen reguliert *N. pharaonis* den cytoplasmatischen pH auf 7.7 ein, woraus sich ein negativer pH-Gradient ergibt. Diese für die Energiegewinnung ungünstigen Bedingungen werden durch ein hohes Membranpotential von -280 mV kompensiert, was zu einer 'Proton motive force' von -180 mV führt. Die oxidative Phosphorylierung kann durch typische Blocker der Atmungskette inhibiert werden. Geringe Sauerstoffpartialdrucke führen zu einer Erniedrigung des Membranpotentials (-260 mV). Werden die Zellen belichtet, steigt das Membranpotential wieder zurück auf -280 mV. Für diese Lichtreaktion ist Halorhodopsin verantwortlich eine einwärts gerichtete Chloridpumpe. Es wird vorgeschlagen, daß die Photophosphorylierung an das Membranpotential gekoppelt ist, welches wiederum durch den Chloridgradienten verursacht wurde. (R. Wittenberg, in Zusammenarbeit mit M. Lübben)

### 2. Bakterielle Rhodopsine

**Bacteriorhodopsin:** Der Mechanismus der Licht-aktivierten Protonenpumpe von Bacteriorhodopsin (BR) setzt reversible Konformationsänderungen des Proteins voraus. Es wird vermutet, daß diese Änderungen an spezifischen Stellen der Helices stattfinden. Eine teilweise Zuordnung gelang mit dem ortsspezifischen Einbau von [ $^{13}\text{C}$ ]-Cys in ortsspezifisch mutierten BR. Durch zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie konnte sowohl eine Position an der Konformationsänderungen stattfinden als auch die Kinetik bestimmt werden. (M. Eilers, in Zusammenarbeit mit F. Siebert)

**Sensory Rhodopsin II** (siehe auch R. Seidel): Sensory Rhodopsin II von *N. pharaonis* wurde in Pho81 exprimiert und aufgereinigt. Das Absorptionsmaximum wird bei Ansäuerung bathochrom verschoben. In Analogie zu BR kann aus dieser Beobachtung geschlossen werden, daß Asp75 protoniert wird. Diese Erklärung wird durch das rot-verschobene Maximum der Asp75Asn Mutante unterstützt. (B. Lüttenberg, J. Sidor, G. Schmies)

In weiteren Experimenten konnte mit Hilfe der 'Black Lipid Membrane' Technik sowie der Expression von pSRII in Oocyten gezeigt werden, daß dieser Photorezeptor gleichzeitig eine Protonenpumpe ist. Ob diese Beobachtung für die Signaltransduktion von Bedeutung ist, muß in zukünftigen Untersuchungen nachgewiesen werden. (B. Lüttenberg, R. Seidel, in Zusammenarbeit mit E. Bamberg)

### 1. Energy transduction in *Natronobacterium pharaonis*

The respiratory chain of *N. pharaonis* was further elucidated. In the previous year, the amino acid sequence of cytochrome  $ba_3$  had been determined. It was now possible to purify the enzyme to homogeneity with all four subunits. Subunit I and subunit II as well as a small subunit could be identified by N-terminal sequencing. In further experiments, it could be shown, that cytochrome  $ba_3$  forms a complex with halocyanin. This observation indicates, that halocyanin is the electron donor to the terminal oxidase. (S. Mattar)

During aerobic growth of *N. pharaonis* the intracellular pH of the bacteria was determined to be 7.7 resulting in a pH-gradient which is opposite to that encountered in mitochondria or non alkaliphilic bacteria. These unfavourable conditions are compensated by a membrane potential of -280 mV. The resulting proton motive force of -180 mV is sufficient for the synthesis of ATP with a stoichiometry of  $3 \text{ H}^+ / \text{ATP}$ . The oxidative phosphorylation can be inhibited by typical blockers of the respiratory chain. Under low oxygen tension the membrane potential drops to -260 mV which is adequate to sustain life but not cell division. Illumination of bacteria which are kept under these conditions with light between 500 nm and 600 nm results in an increase of the membrane potential to -280 mV and consequently the capability of the cells to divide. The pigment responsible for this alternative source of energy is halorhodopsin, a light activated inward directed chloride pump. It is proposed that the photophosphorylation is coupled to the membrane potential generated by a chloride gradient. (R. Wittenberg, in collaboration with M. Lübben)

### 2. Bacterial rhodopsins.

**Bacteriorhodopsin:** The light activated proton pump mechanism of bacteriorhodopsin requires reversible conformational changes of the protein. These alterations are thought to occur at specific sites of the helices. In order to assign the sites, BR was muted, replacing certain amino acids by Cys. Incorporation of [ $^{13}\text{C}$ ]-Cys into BR led to site specific isotope labeled samples. From time-resolved FTIR measurements not only the site of the conformational changes can be assigned, but also the time of the switch can be determined. (M. Eilers, in collaboration with F. Siebert)

**Sensory rhodopsin II** (see also R. Seidel): Sensory rhodopsin II from *N. pharaonis* has been expressed in Pho81 and was purified almost to homogeneity. Its absorption maximum can be bathochromically shifted by acidification. In analogy to BR one can conclude that Asp75 becomes protonated. This observation is substantiated by the red-shifted absorption maximum of the Asp75Asn mutant. Apparently, the removal of a negative charge from the counterion complex is causing the bathochromic shift. (B. Lüttenberg, J. Sidor, G. Schmies)

In further experiments, using 'Black Lipid Membranes' and expression of pSRII in oocytes, it could be shown that pSRII can function as a proton pump. If this observation is relevant to the signal transduction mechanism remains to be elucidated. (B. Lüttenberg, R. Seidel, in collaboration with E. Bamberg)

## Arbeitsgruppe Dr. M.A. Geeves

Mitarbeiter: N. Adamek, G. Holtermann, R. Maytum (seit Feb.), Dr I. Chizhov (seit Juli)

Die Fähigkeit schnelle Reaktionen in vielen biologischen Systemen zu untersuchen ist durch die Menge der zur Verfügung stehenden gereinigten Proteine begrenzt. Das Protein könnte zum Beispiel bei sehr geringem Gewebeanteil vorhanden sein, schwer zu isolieren, und ein angemessenes bakteriologisches Expressionssystem könnte nicht verfügbar sein. Wir (S.K.) untersuchten Möglichkeiten, die Leistungsfähigkeit des derzeitigen stopped-flow Apparates zu verbessern und haben gezeigt, dass mit angemessenen Fluoreszenz Labels die Interaktion zwischen Actin und Myosin Untereinheit 1 bei Konzentrationen von 5 nM untersucht werden kann. Der derzeitige Apparat braucht 0,7 ml Musterlösung und erlaubt somit die Vervollständigung von vielen kurzlebigen kinetischen Messungen mit ~10 µg eines jeden Proteins. Weitere entscheidende Reduktionen der Mengen sind möglich, falls das gebrauchte Volumen reduziert werden kann. Wir (I.C.) benutzen zur Zeit umschlossenes ATP um Reaktionen mit den gleichen durch Fluoreszenz bestimmten Proteinen bei Volumen von 20 µl in Gang zu setzen, was vermuten läßt, dass die Mengen an benötigtem Protein bis zu < 1 µg reduziert werden können. Diese Methoden werden die Charakterisierung von Actin und Myosin von einzelnen Muskelfasern ermöglichen, entweder von Biopsien vom normalen und kranken Muskel oder von mutierten Proteinen, die sich im *Drosophila* Flugmuskel zeigen.

In Zusammenarbeit mit D. Manstein (MPI Hd) sind wir der Hypothese nachgegangen, dass der lichtkettenbindende Bereich (LCBK) von Myosin S1 als Hebelarm fungiert, um geringfügige Veränderungen im Motorbereich zu verstärken und so Kraft und Bewegung im Aktomyosinsystem zu erzeugen. Wir haben jetzt gezeigt, dass im Dictyostelium Myosin II das LCBK vollständig entfernt werden kann, ohne das biochemische Eigentum des Motorbereiches zu beeinträchtigen und dass künstliche Hebelarme (eine  $\alpha$ -actinin feste strukturelle Einheit) das LCBK ersetzen und Geschwindigkeiten von Actin-Bewegungen produzieren können, die proportional zur Länge des Hebelarms sind, Beobachtungen, die mit der Hebelarm-Hypothese übereinstimmen.

Die Anwesenheit von Tropomyosin (Tm) in Actinfasern verleiht der Actin-Myosin Interaktion Kooperativität. Das Ausmaß der Kooperativität erweitert sich bis weit hinter eine einzelne Actin<sub>7</sub>Tm strukturelle Einheit. Wir (R.M. & S.S.L. Boston) haben die relativen Rollen von Tm Länge und Tm-Tm Interaktionen untersucht, indem wir das Ausmaß der Kooperativität definierten. Wir benutzten natürlich vorkommende Varianten von Tm, die dieselbe Länge aber unterschiedliche Tm-Tm Kontakte (skeletthafte vs. glatte Muskel Tm) oder Tm's von unterschiedlichen Längen (Fibroblasten Tm's und Hefe Tm's) besitzen. Diese Untersuchungen behaupten, dass die Stärke der Tm-Tm Interaktion das dominante Merkmal in der Kooperativität der Fasern ist.

The ability to study fast reactions in many biological systems is limited by the quantity of purified protein available. For example the protein may be present at very low levels in tissue, difficult to isolate and a suitable bacterial expression system may be unavailable. We (S.K.) have been examining ways to increase the efficiency of current stopped-flow apparatus and have shown that with appropriate fluorescence labels the interaction between actin and myosin subfragment 1 can be studied at concentrations as low as 5 nM. The current apparatus uses 0.7 ml of sample and thus allows many transient kinetic measurements to be completed using ~10 µg of either protein. Further major reductions in quantities may be possible if the volumes used can be reduced. We (I.C.) are now using caged ATP to initiate reactions with the same fluorescently labelled proteins in volumes of 20 µl suggesting that the quantities of protein required can be reduced to < 1 µg. These methods will allow characterisation of actin and myosin from single muscle fibres, either from biopsies of normal and diseased muscle or of mutated proteins expressed in *Drosophila* flight muscle.

In collaboration with D. Manstein (MPI HD) we have tested the hypothesis that the light chain binding domain (LCBD) of myosin S1 acts as a lever arm to amplify small structural changes in the motor domain and so produce force and movement in the actomyosin system. We have now shown that in Dictyostelium myosin II the LCBD can be removed entirely without affecting the biochemical properties of the motor domain and that artificial lever arms (an  $\alpha$ -actinin rigid structural unit) can replace the LCBD and produce velocities of actin movement which are proportional to the length of the lever arm, observations which are consistent with the lever arm hypothesis.

The presence of tropomyosin (Tm) on actin filaments confers cooperativity on the actin-myosin interaction. The extent of the cooperativity extends beyond a single actin<sub>7</sub>Tm structural unit. We (R.M. & S.S.L. Boston) have been examining the relative roles of Tm length and Tm-Tm interactions in defining the extent of cooperativity. We have used naturally occurring variants of Tm which have the same length but different Tm-Tm contacts (skeletal vs. smooth muscle Tm) or Tm's of different lengths (fibroblast Tm's and yeast Tm's). These studies suggest that the strength of the Tm-Tm interaction is the dominant feature in the filament cooperativity.

## Arbeitsgruppe Prof. Dr. R.S. Goody

Mitarbeiter: Dr. P. Bayer, R. Krebs, M. Souquet, Dr. S. Thrall, K. Vogel-Bachmayr, Dr. B. Wöhrl, Dr. T. Restle, M. Wischniewski

### HIV

Mutanten der Reversen Transkriptase, die HIV-1 eine Resistenz gegen Nukleosidinhibitoren verleihen, sind mit kinetischen Methoden eingehend untersucht worden. Eine Mutante, die fünf für die Resistenz gegen 3'-Azidothymidine (AZT) verantwortliche Amino austausche besitzt, zeigte in allen Einzelschritten des kinetischen Mechanismus eine unveränderte Empfindlichkeit gegenüber der aktiven Form von AZT (AZT-triphosphat). So bleibt der Mechanismus der Resistenz rätselhaft. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass Austausch einer einzelnen Aminosäure (Methionin 184 zu Valin) zu einer ausgeprägten Resistenz gegen die aktive Form eines weiteren Nukleosidinhibitors (3-Thiacytidine bzw. 3-TC) führt, sowohl auf der Ebene der Reversen Transkriptase wie auf der Virusebene. Unsere Studien zeigten, dass der chemische Schritt in dem Polymerisationsmechanismus bei dieser Mutante für die natürlichen Nukleotide weitgehend unverändert bleibt, für das Triphosphat von 3-TC aber stark gehemmt ist. Für den unterschiedlichen Korrelationsgrad zwischen *in vitro* und *in vivo* Eigenschaften der unterschiedlichen Mutanten gibt es keine befriedigende Erklärung. Die Aufklärung dieses Widerspruchs ist aber von Bedeutung, da die zwei untersuchten Inhibitoren in Kombination zu vielversprechenden Effekten bei der Behandlung von AIDS führen.

Zur weiteren Charakterisierung des natürlichen Initiationskomplexes für die Reverse Transkriptase bei HIV-Infektionen haben wir RNA/RNA Duplexe als Primer/Template Komplexe untersucht. Die Kinetik der Initiation ist für solche Duplexe, die der Initiationssituation *in vivo* nahekommen, ganz anders als für DNA/DNA Duplexe (entspricht der Situation bei Plusstrangsynthese *in vivo*). Wir haben ein RNA Molekül hergestellt, das Eigenschaften eines Primer- und eines Templatemoleküls in einer Kette vereint. Dieses Molekül (ein überlanges tRNA) scheint als Analog des komplizierteren RNA/RNA Primer/Templatemoleküls des Initiationskomplexes zu fungieren und kann in strukturellen und mechanistischen Untersuchungen eingesetzt werden.

### GTPasen

In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Marino Zerial (EMBL, Heidelberg) wurde eine XTP-spezifische Mutante des kleinen GTP-bindenden Proteins Rab5 charakterisiert und für die Untersuchung der Rolle dieses Proteins bei Membranfusion untersucht. Durch Einsatz von radioaktiv-markierten XTP und XTP ( $\gamma$ -S) konnte gezeigt werden, dass GTP- bzw. XTP-Spaltung nicht von Membranfusion abhängig ist, sondern dass die GTPase Reaktion als Schaltuhr zur Kontrolle von Membranfusionsereignissen dient.

### HIV

Mutants of HIV-1 reverse transcriptase which are associated with resistance to nucleoside drugs have been investigated with respect to their kinetic properties. A mutant which has 5 amino acid exchanges characteristic for resistance to 3'-azidothymidine (AZT) showed an unchanged sensitivity towards the active form of AZT (AZT-triphosphate) in all individual steps of the kinetic mechanism. Thus, the basis for the resistance to this drug remains puzzling. In contrast, it could be shown that exchange of a single amino acid (methionine 184 to valine) leads to a marked resistance to the active form of a further nucleoside inhibitor (3-thiacytidine, or 3-TC), both at the level of the virus and in experiments on the isolated mutant. Our studies show that the chemical step in the polymerisation mechanism for this mutant is unchanged with respect to wild-type enzyme, but strongly inhibited for 3-TC triphosphate. At present there is no satisfactory explanation for the difference in the correlation between *in vivo* and *in vitro* data for the two types of resistance. Solving this problem is of importance, since use of the two inhibitors in combination has led to promising results for the chemotherapy of AIDS.

For the further characterisation of the natural initiation complex for the reverse transcriptase in HIV-infections, we have examined RNA/RNA duplexes as primer/template complexes. The kinetics of initiation for such complexes, which are similar to those in the natural initiation complex, are quite different from those of DNA/DNA complexes (corresponding to plus-strand synthesis *in vivo*). We have prepared an RNA molecule which has properties of a primer and a template molecule in one strand. The molecule (an overlength tRNA) appears to function as an analogue of the complicated RNA/RNA primer/template molecule of the natural initiation complex, and can be used for mechanistic and structural studies.

### GTPasen

In collaboration with the group of Marino Zerial (EMBL, Heidelberg), we have studied an XTP-specific mutant of the small GTP-binding protein Rab5. This mutant was used to study the cell-biological role of the problem in membrane fusion. Using radioactively labelled XTP and XTP ( $\gamma$ -S), it was shown that GTP-(or in this case XTP-) cleavage is not dependent on membrane fusion, but that the GTPase reaction functions as a timer for membrane fusion events.

## Arbeitsgruppe Dr. Joachim Reinstein

Mitarbeiter: Dr. Ralf Seidel, Dagmar Klostermeier, Petra Herde, Lars Packschies, Thomas Veit, Yvonne Grömping

**Klonierung und Expression des DnaK-GrpE-DnaJ kodierenden Operons von *Thermus thermophilus*.** Das gesamte, für die molekularen Chaperone DnaK, DnaJ und GrpE (DnaKth, DnaJth, GrpEth) kodierende Operon von *Thermus thermophilus* wurde durch PCR kloniert und sequenziert. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind sehr homolog zu den entsprechenden Chaperonen anderer Organismen. Darüber hinaus wurde ein offenes Leseraster von 78 Aminosäuren gefunden (DAF78) von dem berichtet wurde (Motohashi et al., *J.Biol.Chem.* 271:17343-17348, 1996), daß es essentiell für die Wechselwirkung von DnaK mit dem ATPase stimulierenden Faktor DnaJ wäre. Die Proteine werden in *E. coli* expremiert und sind funktionell. Laufende Studien beinhalten transienten-kinetische Untersuchungen des ATPase Zyklus von DnaKth, des Nucleotidaustauschfaktors GrpEth und des ATPase stimulierenden Faktors DnaJth sowie Kristallisationsversuche um durch Röntgenstrukturanalyse zusätzliche strukturelle Information zu erhalten.

**Kristallstruktur and Kinetik von Übergangszustandanalogen der UMP/CMP Kinase (in Zusammenarbeit mit Dr. Ilme Schlichting).** Die -3D Strukturen von UMP/CMP-Kinase (UK) des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* komplexiert mit Übergangszustandanalogen wurde bestimmt (1.6 bis 2.2 Å). Die Proteinkristalle enthalten ADP, CMP, Mg<sup>2+</sup> und entweder Aluminiumfluorid oder Berylliumfluorid als Übergangszustandanaloge. Um ein Gesamtbild zu erhalten wurden die kinetischen Parameter der Wechselwirkung dieser Analoge mit UK durch steady state and stopped flow Techniken bestimmt. Ein Vergleich mit den Strukturen des spezifischen and asymmetrischen Bisubstratinhibitors P<sup>1</sup>-(adenosine 5')-P<sup>5</sup>-(uridine 5')-pentaphosphate (UP<sub>5</sub>A) oder ADP:CMP ohne AlF<sub>3</sub> zeigt Umlagerungen katalytischer Aminosäuren, hauptsächlich Argininen vor der Katalyse. Das momentane Bild läßt vermuten, daß Mg<sup>2+</sup> mit den assoziierten Wassermolekülen und K19 ein festes Gerüst für die Phosphorylübertragungsreaktion zur Verfügung stellen, während die 3 Arginine (R131, R137, R148) Ladungen stabilisieren, die sich während dieser Reaktion entwickeln. Nach den Positionen dieser Arginine scheint es, wie wenn sich negative Ladung hauptsächlich bei der übertragenen Phosphorylgruppe entwickelt, aber nicht an den Phosphatbrückensauerstoffen, konsistent mit einem eher assoziativen Phosphorylübertragungsmechanismus.

**Cloning and expression of the DnaK-GrpE-DnaJ coding operon of *Thermus thermophilus*.** The complete operon coding for the molecular chaperones DnaK, DnaJ and GrpE (DnaKth, DnaJth, GrpEth) from *Thermus thermophilus* was cloned by PCR and sequenced. The derived amino acid sequences are highly homologous to corresponding chaperones from other organisms. In addition, an open reading frame of 78 amino acids (DAF78) was found that was reported (Motohashi et al., *J.Biol.Chem.* 271:17343-17348, 1996) to be crucial for the interaction of DnaK and the ATPase stimulating factor DnaJ. The proteins are expressed in *E. coli* and functional. Current studies include transient kinetics on the ATPase cycle of DnaKth, the nucleotide exchange brought about by GrpEth and ATPase stimulation by DnaJth. In addition, the structure of the 78 amino acid protein DAF78 may be solved by NMR if suitable quantities can be obtained (with Peter Bayer) and crystallization attempts aim to gain structural information by X-ray crystallography.

**Crystal structure and kinetics of transition state analogs of UMP/CMP kinase (in collaboration with Ilme Schlichting).** The three-dimensional structures of the UMP/CMP-kinase (UK) from the slime mold *Dictyostelium discoideum* complexed with transition state analogs were determined at high resolutions (1.6 to 2.2 Å). The protein crystals contain ADP, CMP, Mg<sup>2+</sup> and either aluminum fluoride or beryllium fluoride as transition state analogs. To obtain a complete picture, the kinetic parameters for the interaction of these analogs with UK were determined by steady state and stopped flow techniques. Comparison with the structure of complexes with the specific and asymmetric bisubstrate inhibitor P<sup>1</sup>-(adenosine 5')-P<sup>5</sup>-(uridine 5')-pentaphosphate (UP<sub>5</sub>A) or ADP:CMP without transition state analogs indicate rearrangements of catalytic amino acid residues, mainly arginines, prior to catalysis. The current picture suggests that Mg<sup>2+</sup> with the associated water molecules and K19 provide a template and rigid scaffold for the phosphoryl transfer reaction whereas 3 arginines (R131, R137, R148) stabilize charges that develop during this reaction. According to the positions of these arginines it appears that negative charges mainly develop at the transferred phosphoryl group, but not at the phosphate bridging oxygens, consistent with a more associative phosphoryl transfer mechanism.

## Arbeitsgruppe Dr. Axel Scheidig

Mitarbeiter: K. Alexandrov, A. Beste, Ch. Burmester, F. Eßmann, A. Geiger, M. Grün, U. Hoffmann, K. Illner, I. Simon

### Analyse der Struktur-Funktions-Beziehung von Biomakromolekülen

Ein Hauptprojekt ist die Untersuchung der Maschinerie der post-translationalen Geranylgeranylierung von Rab-Proteinen, welche aus Rab-Protein, dem 'Rab escort protein' (REP) und der heterodimeren Geranylgeranyltransferase (GGTase) besteht. Wir arbeiten mit den entsprechenden Proteinen aus verschiedenen Organismen, welche in Insektenzellen oder in *E. coli* exprimiert werden. Die *in vitro* Prenylierung von Rab wurde etabliert und die Bildung des ternären Rab:REP:GGTase Komplexes charakterisiert. Die Bestimmung der kinetischen Konstanten wird derzeit durchgeführt. Weiterhin untersuchen wir Rabaptin, ein Protein welches mit der GTP-gebundenen Form von Rab5 wechselwirkt. Die Expression des mit einem His-tag versehenen Wildtyp-Proteins und der Rab bindenden Domäne erfolgt in *E. coli*. Dieses Projekt ist eine Zusammenarbeit mit Marino Zerial vom EMBL in Heidelberg.

Die Wechselwirkung zwischen Proteinen und RNA ist Gegenstand der strukturellen Charakterisierung des Signalerkennungspartikels (SRP) aus *E. coli*. Dieses Projekt ist eine Zusammenarbeit mit Wolfgang Wintermeyer und Georg Lentzen von der Universität Witten-Herdecke. Das *E. coli* p48 hat eine GTP bindende Domäne im N-terminalen Bereich des Proteins und eine Methionin-reiche Domäne (M-Domäne) im C-terminalen Bereich. Die M-Domäne beinhaltet die Epitope für die Peptidbindung und die RNA-Bindung. Wir haben mit der Kristallisation von p48 und der 4.5S RNA alleine und im Komplex begonnen. Weiterhin arbeiten wir an der Expression verschiedener Konstrukte der C-terminalen M-Domäne.

Für die Charakterisierung von strukturellen Änderungen in Proteinkristallen (zeitaufgelöste Röntgenstrukturanalyse) arbeiten wir mit sogenannten 'caged' Verbindungen. Wir haben einen neuen Beleuchtungsaufbau entwickelt und die Untersuchung mit der Tieftemperaturtechnik kombiniert. Für die Steuerung des Experimentes und die Synchronisierung mit der Datenmessung befassen wir uns mit der Entwicklung eines Mikro-Fluoreszenzspektralphotometers. Die laufenden Untersuchungen werden mit Wildtyp p21 (Residuen 1-166) durchgeführt. Weitere kleine GTP-bindende Proteine und Proteinkinasen werden derzeit für diese Anwendung ausgetestet.

Weiterhin befassen wir uns mit der Charakterisierung von Rep78, einem Protein aus dem adeno-assoziierten Virus Typ-2 (AAV-2). Dieses Projekt ist eine Zusammenarbeit mit Georg Sczakiel am DKFZ in Heidelberg. Wir konnten bereits die Expression, Reinigung und Renaturierung des Proteins etablieren und erste kinetische Charakterisierungen durchführen.

### Analysis of the structure-function relationship of biomacromolecules

One of the main focuses is the investigation of the machinery for post-translational geranylgeranylation of Rab proteins consisting of the Rab protein, the Rab escort protein (REP) and the heterodimeric geranylgeranyltransferase (GGTase). We are working with the corresponding proteins from different organisms using expression in insect cells and in *Escherichia coli*. We were able to establish the *in vitro* prenylation of Rab and could characterize the formation of the ternary Rab:REP:GGTase complex. Determination of the kinetic constants is in progress. In parallel we are studying a protein called Rabaptin which is interacting with the GTP-bound form of Rab5. The expression of the full-length protein and the Rab binding domain as a His-tagged protein is carried out in *E. coli*. This project is a collaboration with Marino Zerial at the EMBL in Heidelberg.

The interaction between proteins and RNA is topic of the structural characterization of the signal recognition particle (SRP) of *E. coli*. This project is a collaboration with Wolfgang Wintermeyer and Georg Lentzen at the University of Witten-Herdecke. The *E. coli* p48 contains a GTP binding domain in the N-terminal part of the protein and a methionine rich domain (M-domain) in the C-terminal part. The M-domain includes the peptide-binding and the RNA-binding epitope of the p48. We have started the crystallization of p48 and the 4.5S RNA alone and in complex. Furthermore, we are working on an expression system for different constructs of the C-terminal M-domain.

In order to characterize structural changes in protein crystals (time-resolved X-ray crystallography) we are working with so-called 'caged' compounds. We have designed a new light-illumination setup and combined it with a low-temperature approach. For the evaluation of the experiment and its synchronization with the data collection we are developing a fluorescence micro spectrophotometer. The current investigations are carried out with wild-type p21 (residues 1-166) and will be extended to other small GTP-binding proteins as well as to protein kinases.

Further work involves the characterization of the Rep78 protein of adeno-associated virus type 2 (AAV-2) which is a collaboration with Georg Sczakiel at the DKFZ in Heidelberg. We could establish the expression, purification and renaturation of the protein and the kinetic characterization is in progress.

## Arbeitsgruppe Dr. I. Schlichting

Mitarbeiter: S. Höning, G. Holtermann, D. Klostermeier, A. Lavie, T. Schneider, J. Vojtechovsky

Wir interessieren uns für das Zusammenspiel von Struktur und Funktion in Proteinen und untersuchen dieses im wesentlichen röntgenkristallographisch. Für das Verständnis des Reaktionsmechanismus eines Enzyms oder Proteins reicht es nämlich nicht aus, den zeitlichen Ablauf der Reaktion zu kennen; zur vollständigen Beschreibung des molekularen Mechanismus ist auch die Kenntnis der Raumstrukturen der Ausgangs- und Endzustände sowie die aller Zwischenstufen notwendig. Letztere kristallographisch zu bestimmen, ist aufgrund der großen Kluft zwischen der üblicherweise nur sehr kurzen Lebensdauer von Intermediaten einerseits und der langen Meßzeit andererseits, nicht trivial. Ein großer Teil unserer Arbeit besteht daher darin, Wege zu finden, Reaktionen in Kristallen schnell, schonend und gleichmäßig zu starten, Nachweismethoden zu etablieren, mittels derer die Umwandlung der Reaktanden im Kristall verfolgt werden kann und die Intermediate lange genug für die Datensammlung zu stabilisieren.

In den letzten Jahren haben wir vor allem die Ligandenbindung an die Hämproteine Myoglobin und Cytochrom P450 untersucht. Im Fall von P450 wurde der nur wenige Minuten existierende aktive Komplex mit dem Substrat Sauerstoff mittels Diffusion im Kristall gebildet. Anschließend wurden die Röntgendaten cryokristallographisch erfaßt. Durch Radiolyse durch die Röntgenstrahlen wurde aus dem P450.O<sub>2</sub> Komplex das nächste Intermediat im Reaktionszyklus gebildet, bei dem nur noch ein Sauerstoffatom am Hämeisen gebunden ist (Oxy(per)ferryl). Dieser Zustand ist bei Raumtemperatur so kurzlebig, daß er bis jetzt noch nicht experimentell nachgewiesen wurde. Insofern stellen unsere Ergebnisse einen Durchbruch auf dem Gebiet der P450-Forschung dar.

Neben kinetischer Kristallographie führen wir auch konventionellere Studien durch wie die Kristallisation von Chaperon Proteinen oder die Strukturbestimmung von verschiedenen Nukleotidkomplexen von Thymidilatkinase.

We are interested in understanding the workings of proteins or enzymes. This requires knowledge of the dynamic behavior of the molecules, the kinetics of their specific reactions (which include binding of ligands etc.) and the three-dimensional structures of the states occurring along the reaction pathway. In general, the structure determination of short-lived intermediates is not straight forward experimentally due to the large gap between the short time scales of protein motions and enzymatic reactions on one side and the long data acquisition times for conventional X-ray data collection techniques on the other side. Ways out of this dilemma are provided by collecting diffraction data on a very short time scale as has been made feasible through the use of Laue technique at high-intensity synchrotron X-ray sources or by prolonging the life times of the intermediates to be studied to experimentally convenient time scales by working at cryogenic temperatures (cryo crystallography). We are using a combination of mono- and polychromatic X-ray diffraction techniques at ambient and cryogenic temperatures to study e.g. intermediates in the reaction catalyzed by the monooxygenase cytochrome P450. Diffusion of the substrate oxygen was used to generate the crystalline Michaelis complex that has a half life of 5 minutes at 4 C. The diffraction data were collected from a crystal kept at cryogenic temperature. Radiolysis by the X-ray beam was used to generate the next intermediate occurring along the reaction pathway: an oxy(per)ferryl complex that has one oxygen atom bound to the heme iron. This complex is so short lived at ambient temperatures that it has never been observed experimentally in P450 before. Thus, a direct observation of this complex is considered a major breakthrough.

Beside doing kinetic crystallography, we are also doing more „conventional“ crystallography which includes the structure determination of thymidilate kinase and attempts to crystallize molecular chaperones.

**Klonierung und Expression von DnaK, DnaJ und GrpE aus *Thermus thermophilus* (Zusammenarbeit mit J. Reinstein)**

Das DnaK-Operon aus *Thermus thermophilus* wurde identifiziert und mit Hilfe der PCR kloniert. Das resultierende 5.5 Kbasen umfassende genomische Fragment wurde vollständig sequenziert. Das Operon enthält die Gene für DnaK (67 kDa), DnaJ (31 kDa) und GrpE (20 kDa). Zusätzlich wurde ein weiterer, für 78 Aminosäuren kodierender offener Leserahmen gefunden (DafA), für den kürzlich gezeigt werden konnte, dass das Genprodukt eine wichtige Rolle für die Wechselwirkung von DnaK mit DnaJ spielt (Motohashi et al.(1996), *J. Biol. Chem.* 271, 17343-17348). Die verschiedenen Gene wurden in Expressionsvektoren unter Kontrolle des T7-Promotors kloniert und in *E. coli* exprimiert. Die produzierten thermostabilen Proteine waren löslich und funktionell.

**Konstruktion von UMP/CMP Kinase Mutanten und Expression in *E. coli* (Zusammenarbeit mit J. Reinstein)** Für kinetische Messungen sowie Struktur-untersuchungen wurden verschiedene Mutationen der UMP/CMP Kinase aus *Dictyostelium discoideum* hergestellt. Die Mutanten K19Q, K19R, A37G und N97Q wurden in geeignete Vektorsysteme kloniert und in *E. coli* exprimiert.

**Expression des Sensorischen Rhodopsin II aus *Natronobacterium pharaonis* (Zusammenarbeit mit M. Engelhard)** Für die Expression des *N. pharaonis* Sensorischen Rhodopsin II (pSRII) wurde ein Expressionssystem etabliert (B. Lüttenberg). Als Wirt wurde ein dem *N. pharaonis* ähnlicher Organismus, der *Halobacterium salinarium* Stamm Pho81/w verwendet. Dieser Stamm exprimiert selbst keines der bekannten halobacteriellen Retinal-Proteine. Zur Konstruktion des Expressionsvektors wurde ein *E.coli* / *H.salinarium* Shuttle-Vektor (pBL7Novo) verwendet. Das pSRII-Gen wurde unmittelbar hinter eine Sequenz kloniert die den Bakterioopsin-(bop)-Promoter enthält, sowie einen Bereich der für die ersten 15 Aminosäuren des Bakterioopsins kodiert. Diese Aminosäuren werden posttranslational vom pSRII abgespalten, nachdem es in die Membran eingebaut wurde. Mit diesem Expressionssystem werden große Mengen funktionelles pSRII (etwa 1 mg/L Zellkultur) erhalten, wie durch Messung des Photozyklus gezeigt werden konnte.

**Cloning and expression of DnaK, DnaJ and GrpE from *T. thermophilus* (collaboration with J. Reinstein)**

The dnaK-operon from *Thermus thermophilus* was identified and cloned by a PCR based strategy and the resulting 5.5 kbase genomic DNA fragment was sequenced. The operon comprises the genes coding for DnaK (67 kDa), DnaJ (31 kDa) and GrpE (20 kDa). In addition, a short open reading frame coding for 78 amino acids was identified. It has recently been shown that the gene product (DafA) is important for the interaction of DnaK with DnaJ (Motohashi et al.(1996), *J. Biol. Chem.* 271, 17343-17348). The different genes were cloned in expression vectors under control of the T7-promoter and expressed in *E. coli*. The resulting thermostable proteins are soluble and functional.

**Construction of UMP/CMP kinase mutants and expression in *E. coli* (collaboration with J. Reinstein)**

For kinetic and structural studies we have constructed several mutants of UMP/CMP kinase from *Dictyostelium discoideum*. The mutants K19Q, K19R, A37G and N97Q were cloned in an appropriate plasmid vector and overexpressed in *E. coli*.

**Overexpression of the *Natronobacterium pharaonis* Sensory Rhodopsin II (collaboration with M. Engelhard)**

An expression system for overexpression of the *N. pharaonis* sensory rhodopsin II (pSRII) has been established (B. Lüttenberg). As host we used a related organism, the *Halobacterium salinarium* strain Pho81/w, which is deficient in expressing the other known halobacterial retinal proteins. An *E.coli* / *H.salinarium* shuttle vector (pBL7Novo) was used for the construction of the expression vector. The pSRII-gene was fused directly behind a sequence consisting the bacterioopsin (bop)-promoter and a region coding for the first 15 amino acids of bacteriorhodopsin. These amino acids are posttranslationally cleaved from pSRII after membrane assembly. With this expression system we obtained high amounts (about 1 mg/L cellculture) of functional pSRII as shown by photocycle measurements.

### Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen an DNA-Methyltransferasen

Die DNA-Methylierung wird bei einer Vielzahl von Organismen beobachtet und ist an sehr unterschiedlichen biologischen Prozessen, wie z.B. dem Schutz vor endogenen Restriktionsendonukleasen, der Reparatur von Basenfehlpaarungen nach der Replikation und der Regulation der Genexpression, beteiligt. Verantwortlich für die DNA-Methylierung sind die DNA-Methyltransferasen (DNA-MTasen), die die Übertragung der aktivierten Methylgruppe des Cofaktors S-Adenosyl-L-methionin auf N6 von Adenin und N4 bzw. C5 von Cytosin katalysieren. Da sich die Basen im Inneren der DNA-Helix befinden, stellt sich grundsätzlich die Frage, wie die DNA-MTasen an ihre Zielbase herankommen. Eine Antwort auf diese Frage lieferte die dreidimensionale Struktur der C5-cytosinspezifischen DNA-MTase aus *Haemophilus haemolyticus* (*M.HhaI*) im Komplex mit ihrem DNA-Substrat (Klimasauskas et al. (1994) *Cell* 76, 357-369). In diesem Protein-DNA-Komplex ist die Zielbase einfach um 180° aus der DNA herausgeklappt, so daß sie der katalytischen Maschinerie des Enzyms zugänglich wird.

Zur Untersuchung der Frage, ob dieser Basen-Ausklapp-Mechanismus auch von anderen DNA-MTasen genutzt wird, haben wir mit Hilfe der Festphasen-DNA-Synthese die unnatürliche Base 2-Aminopurin als Fluoreszenzsonde in DNA eingeführt. Da die 2-Aminopurinfluoreszenz innerhalb der DNA durch Stapelwechselwirkungen stark herabgesetzt ist, sollte sie bei einem Herausklappen der Base erheblich ansteigen. Im Einklang mit dieser Überlegung steht die Beobachtung, daß die 2-Aminopurinfluoreszenz bei Titrationen mit *M.HhaI* stark ansteigt. Titrationen mit der adeninspezifischen DNA-MTase aus *Thermus aquaticus* (*M.TaqI*) ergeben ebenfalls einen starken Anstieg der 2-Aminopurinfluoreszenz. Dies liefert einen direkten Hinweis darauf, daß auch die adeninspezifischen DNA-MTasen einen Basen-Ausklapp-Mechanismus benutzen. Mit Hilfe dieser Fluoreszenzsonde sollte es außerdem möglich sein, die Kinetik des Herausklappens der Zielbase näher zu untersuchen. Derartige Stopped-Flow-Experimente mit *M.HhaI* und *M.TaqI* werden z.Z. in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

Des Weiteren haben wir eine detaillierte kinetische Analyse (Steady-State und Pre-Steady-State) von *M.TaqI* durchgeführt und festgestellt, daß die Methylgruppenübertragung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Somit muß das Herausklappen der Zielbase schneller als die Methylgruppenübertragung verlaufen.

Außerdem konnten wir die Bindungsstelle für das herausgeklappte Adenin in *M.TaqI* durch ortsspezifische Mutagenese zweier aromatischer Aminosäuren (Y108 und F196) lokalisieren. Da der Ersatz von Y108 oder F196 durch nicht aromatische Aminosäuren zu einer dramatischen Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit führt, sollten  $\Pi$ -Wechselwirkungen bei der Stabilisierung des herausgeklappten Adenins bzw. beim katalytischen Mechanismus von *M.TaqI* eine wichtige Rolle spielen. Zusätzlich haben wir N-terminale Deletionsmutanten von *M.TaqI* hergestellt, die eine Kokristallisation von *M.TaqI* mit dem DNA-Substrat ermöglichen sollen.

Darüber hinaus haben wir einen Cofaktorbindingstest für *M.TaqI* entwickelt, der es uns erlaubt, die strukturellen Determinanten der Cofaktorbinding mit Hilfe von synthetischen Cofaktoranaloga näher zu untersuchen.

### Structure-Aktivität Studies of DNA methyltransferases

DNA methylation is found in many organisms, ranging from prokaryotes to eucaryotes, and is involved in many different biological functions, including protection against endogenous restriction endonucleases, repair of DNA mismatches after replication and regulation of gene expression. DNA methylation is catalyzed by DNA methyltransferases (DNA MTases), which transfer the activated methyl group of the cofactor S-adenosyl-L-methionine to N6 of adenine and N4 or C5 of cytosine. Since the bases are hidden in the interior of the DNA helix, the question arises, how the DNA MTases reach their target bases. An answer to this question was provided by the three-dimensional structure of the DNA MTase from *Haemophilus haemolyticus* (*M.HhaI*) in complex with its DNA substrate (Klimasauskas et al. (1994) *Cell* 76, 357-369). In this protein DNA complex the target base is simply flipped out of the DNA by 180°, so that it is accessible to the catalytic machinery of the enzyme.

In order to investigate, whether other DNA MTases also use such a base flipping mechanism, we have incorporated the fluorescent base 2-aminopurine into DNA by solid phase DNA synthesis. 2-Aminopurine should be an ideal fluorescence probe for DNA base flipping, because its fluorescence is highly quenched in DNA by base stacking interactions, and it should increase, if the base is flipped out of the DNA. In accordance with these considerations, we see a dramatic increase of the 2-aminopurine fluorescence upon titration with *M.HhaI*. Titration with the adenine-specific DNA MTase from *Thermus aquaticus* (*M.TaqI*) also results in a large increase of the 2-aminopurine fluorescence, which directly indicates that the adenine-specific DNA MTases also use a base flipping mechanism. In addition, this fluorescence probe should be useful to monitor the kinetics of base flipping. Such stopped-flow experiments with *M.haI* and *M.TaqI* are currently under investigation. We have also performed a detailed kinetic analysis (steady state and pre-steady state) of *M.TaqI* and could demonstrate that the methyl group transfer is the rate limiting step for the *M.TaqI* catalyzed reaction. This already shows that the base flipping process must be faster than the methyl group transfer.

In addition, we have localized the binding site for the extrahelical adenine in *M.TaqI* by site-directed mutagenesis. Replacement of each of the two aromatic amino acids Y108 and F196 with non-aromatic amino acids leads to a drastic reduction of the catalytic rate. This demonstrates that  $\Pi$ -interactions might be important to stabilize the extrahelical adenine and/or play a critical role in the catalytic mechanism. We have also developed a mutagenesis method to create a library for the expression of N-terminal deleted proteins. This method was used to prepare N-terminal deleted mutants of *M.TaqI*, which will be used for the cocrystallization of *M.TaqI* in complex with its DNA substrate.

Furthermore, we have developed a cofactor binding assay for *M.TaqI* which allowed us to analyze the structural determinants of the cofactor binding using synthetic cofactor analogues.



**Z. Z. dem Kollegium**  
**direkt unterstellt Arbeitsgruppen**  
**Strukturelle Biologie**

**Independent research groups**  
**subordinate to the managing**  
**director**

Bei der Aufklärung der intrazellulären Signalkaskade, die zur sauerstoffdruckabhängigen Genexpression und Ionenkanalaktivität führt, gelangen weitere Schritte. Diese Signalkaskade besteht aus Hämproteinen und intrazellulären Scavengersystemen, die in Abhängigkeit des Sauerstoffdruckes den intrazellulären Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies (ROI) wie  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $OH$ ,  $^1O_2$  kontrollieren, sowie Transkriptionsfaktoren oder speziellen Kalium- und Calciumkanälen, die durch Interaktion mit diesen ROI ihre Bindung an spezifische Enhancerelemente oder ihre Porenweite verändern. Bei der spektrophotometrischen Untersuchung von zellulären Hämproteinen erhält man Mischspektren, die mit Hilfe eines Dekonvolutionsverfahrens unter Verwendung von Basisspektren in ihre Einzelkomponenten zerlegt sowie in ihrem relativen Redoxzustand charakterisiert werden können. Dadurch waren wir in der Lage, an HepG2 Zellen, die in Abhängigkeit vom Sauerstoffdruck Erythropoietin (Epo) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) bilden, neben den bekannten Zytocromen der Atmungskette ein Zytocrom  $b_{558}$  zu identifizieren, das zellmembranständig in signifikanter Abhängigkeit von Rac1 ROI produziert. Cobalt, das wie Hypoxie zu einer gesteigerten Produktion von Epo und VEGF führt, scheint einmal isoliert den Redoxzustand des Zytocrom  $b_{558}$  zu verändern und zum anderen die Aktivität der Glutathionperoxidase, die den intrazellulären Gehalt an ROI kontrolliert, zu steigern. Eine durch Eisenchelatoren hemmbare lokale Fenton Reaktion, die wir in der Nähe des Zellkernes von HepG2 Zellen dreidimensional visualisieren konnten, degradiert  $H_2O_2$  zu  $OH$ . Hypoxie, Cobalt und Eisenchelatoren wie Desferrioxamine führen entsprechend unserer Befunde in einer gemeinsamen Endstrecke über die Fenton Reaktion zu einer Verminderung der intrazellulären  $OH$ , wodurch Transkriptionsfaktoren wie HIF dimerisieren und an das Epo- oder VEGF-Enhancerelement binden. Derselbe Mechanismus scheint auch für primäre Hepatozyten zu gelten, die mit Hilfe dieser perinukleären, lokalen Fenton Reaktion spezifische Genexpressionen in Abhängigkeit vom Sauerstoffdruck steuern. Da  $H_2O_2$  und  $^1O_2$  die schnelle Inaktivierung von Kaliumkanälen (A-Typ) durch Interaktion mit Cystein- oder Histidylgruppen des Porenproteins hemmen oder fördern können, wurde begonnen, am Glomus caroticum der Ratte durch in situ Hybridisierung Kaliumkanäle der Typ I Zellen zu identifizieren. Der dabei charakterisierte calciumabhängige Kaliumkanal soll exprimiert in Fibrozyten auf seine Interaktion mit verschiedenen ROI in patch clamp Experimenten untersucht werden, um so den Mechanismus der  $PO_2$  abhängigen Inaktivierung zu verstehen.

Die von uns entwickelte Methode der dreidimensionalen Visualisierung von optischen Schnitten, wie sie die konfokale Lasermikroskopie liefert, wurde intensiv dazu benutzt, um die Invasion von Tumorzellen in künstlichen Kollagenmatrixen darzustellen. Dabei gelang es, die drei Parameter Zellvolumen, Enzymlokalisierung und Kollagenstruktur in einem Bild aus unterschiedlichen Blickrichtungen darzustellen. Deutlich werden zelluläre Invadopodien mit Kathepsinbesatz sichtbar, die in die Kollagenmatrix eindringen. Kathepsin scheint dabei nahe am Zellkern produziert in diese Zellausläufer transportiert worden zu sein. In einer weiterführenden Studie wurde gezeigt, daß eine signifikante Tubulinverdichtung an den Invadopodien auftritt, was auf einen erhöhten Stofftransport hinweisen könnte. Die Kollagenmatrix erfährt in der Nähe dieser Invadopodien eine deutliche Umorganisation der Struktur.

The molecular mechanism of intracellular signal cascades involved in  $PO_2$  dependent gene expression and ion channel activity is the main issue of this research group. This signal cascade consists of heme proteins and intracellular scavenger systems controlling in dependence on  $PO_2$  the intracellular content of reactive oxygen species (ROI) like  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $OH$ ,  $^1O_2$  as well as transcription factors or special potassium and calcium channels, which by interaction with ROI change the binding to specific enhancer elements or respectively the corresponding pore width. Light absorption spectra of cellular heme proteins can be analysed by deconvolution for the composition of single cytochromes and the relative redox states of the cytochromes. This procedure revealed in HepG2 cells producing in dependence on  $PO_2$  erythropoietin (Epo) and vascular endothelial growth factor (VEGF) beside respiratory cytochromes a cell membrane located cytochrome  $b_{558}$  producing in significant dependence of Rac1 ROI. Cobalt enhancing like hypoxia Epo and VEGF production changes the redox state of cytochrome  $b_{558}$  but increases also the activity of the glutathion peroxidase important factors for the control of ROI acting as second messengers. A local Fenton reaction as visualized by confocal laser microscopy in 3D reconstructions degrades in HepG2 cells mediated by iron  $H_2O_2$  to  $OH$ . Hypoxia, cobalt and iron chelators like desferrioxamine stimulate Epo or VEGF gene expression corresponding to our investigations by a reduced intracellular level of  $OH$  which might trigger the dimerisation of specific transcription factors like HIF. The same perinuclear Fenton reaction could be observed in primary hepatocytes which are described to regulate gene expression in dependence on  $PO_2$ . Type I cells of the carotid body possess A-type potassium channels which are known from other cells to regulate the inactivation current in dependence on  $H_2O_2$  and  $^1O_2$  being scavenged by cysteine and histidine groups of the channel protein. In situ hybridisation could identify a calcium dependent potassium channel in type I cells which transiently expressed in fibrocytes will be tested in its sensitivity towards ROI by patch clamp studies to understand the  $PO_2$  dependent inactivation of those channels.

Studies on invasion of human tumor cells into artificial collagen matrices have been carried out by threedimensional reconstruction of optical slices as obtained by confocal laser microscopy. The developed method visualizes for the first time three parameters like cell volume, enzyme localisation and collagen structure from different sights either using colour prints or video clips. The cellular invadopodia penetrating the collagen matrix were equipped at their surface with cathepsin probably involved in degrading collagen for facilitating invasion. Cathepsin produced in perinuclear structures are transported for this purpose into the invadopodia. We could visualize furthermore that tubulin is located in the invadopodia at a higher concentration than in the rest of the cell probably indicating an enhanced transport and transfer rate. The collagen matrix close to the invadopodia undergoes a significant reorganisation of the structure.

**Allgemeine Thematik:** Die Arbeitsgruppe befaßt sich mit der Untersuchung der elektrophysiologischen und molekularen Funktion von ionalen Kanälen und deren Beteiligung an den Signal-Umwandlungs Mechanismen von Zellen wie Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Glomuszellen, welche eine entscheidende Rolle in der Homöostasis des kardiovaskulären Systems spielen.

**1. Wirkung von pH auf die  $K^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Kanal Leitfähigkeit und auf die Membranpolarität von Kapillarenendothelzellen.** Es ist bekannt, daß pH einen deutlichen Effekt auf den Blutfluß in verschiedenen vaskulären Gebieten hat. Die Ursache ist dennoch nicht ganz klar. Erniedrigung des extrazellulären pH ( $pH_o$ ) beeinflusst die elektrischen Eigenschaften von  $K^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Strömen von Hirnkapillaren-Endothelzellen, die von Pietruschka in diesem Institut als eine Zelllinie etabliert wurden. Sowohl auswärts  $K^+$ - als auch einwärtsgerichtete  $Ca^{2+}$ -Ströme wurden durch stufenweise Erniedrigung des  $pH_o$  (7.4, 7.0, 6.8) reversibel unterdrückt. Weitere Versuche sollen aufklären wie sich die Membranpolarität unter diesen  $pH_o$  Änderungen verhält, und ob der  $pH_o$  oder der  $pH_i$  die Ursache für diese Antwort sein kann.

**2. Die Bedeutung extrazellulärer  $Mg^{2+}$  Ionen in der Entwicklung von Vasospamen, verursacht durch Alkohol oder Kokain.** (Zusammarb.: Dr. Burton M. Altura, SUNY at Brooklyn, New York, U.S.A.). In Versuchen mit der Spannungsklemme, konnten wir zeigen, daß erhöhte  $Mg^{2+}$  Konzentration sowohl  $K^+$ - als auch  $Ca^{2+}$ -Ströme von Endothelzellen unterdrückt. Weiterhin konnten wir beweisen, daß eine kritische Erniedrigung dieses Ions, die Oberflächenladung der Membran und dadurch die Aktivationskinetik des  $Ca^{2+}$ -Kanals stört. Neuere Versuche mit  $Ba^{2+}$  als Ladungsträger enthüllten die Wirkung von Ethylalkohol, welcher in kleinsten Mengen (20 mM), die Leitfähigkeit des  $Ca^{2+}$ -Kanals unterdrückt. Es ist bekannt, daß chronische oder hohe Alkohol Aufnahme, wie auch Kokaine, einen Vasospasmus im Gehirn verursachen können. Niedrige  $Mg^{2+}$  Konzentration wirkt dabei potenzierend. Weitere Versuche sollen die elektrophysiologischen und zellulären Zusammenhänge dieser vaskulären Antwort aufklären.

**3. Charakterisierung von Gesamtströmen in einer pankreatischen Zelllinie BMRPA.430 und deren Beteiligung in der Tumorentstehung.** (Zusammarb.: Dr. Josef Michl, SUNY at Brooklyn, New York, U.S.A.). Die Fragestellung dieser Untersuchung ist die Aufklärung der funktionellen Beteiligung von ionalen Kanälen in Acinarpankreaszellen in der Tumorentstehung, welche durch eine spezifische karzinogene Substanz (N-nitrosamine) verursacht werden kann. In Versuchen mit der Spannungsklemme konnten wir mit einer normalen  $K^+$  Lösung, unerwartet, nur  $Ca^{2+}$ -Ströme mit hoher Aktivierungsschwelle beobachten. Nur  $K^+$ - Ströme wurden dagegen in sphärischen und resuspendierten Zellen gefunden. Weitere Versuche sollen aufklären, ob eine polarisierte Verteilung dieser ionalen Kanäle die Ursache für diese unterschiedliche Stromexpression sein kann.

**General proposals:** The laboratory is devoted to the study of the electrophysiological and molecular function of ion channels and their contribution to the signal-transduction coupling in those cells like endothelial cells, vascular smooth muscle cells and carotid body cells, that play important roles in the homeostasis of the cardiovascular system. The methodological approaches are electrophysiology and biophysical techniques.

**1. Effect of pH in the conductance of  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  channels and in the membrane polarity of capillary endothelial cells.** It is known that pH has marked effects on blood flow in several vascular beds. The underlying mechanisms remain ill understood. The conductance of voltage-gated channels (carried by  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  ions) of brain capillary endothelial cells (BCECs), a cell line established by Pietruschka in our Institute, is affected by low environmental pH ( $pH_o$ ). Outwardly rectifying  $K^+$  currents were reversibly depressed when the  $pH_o$  was lowered from 7.4 to 7.0 (HEPES containing medium). Similar stepwise changes in  $pH_o$  (7.4, 7.0, 6.8.) also reversibly and gradually reduced the maximum current amplitude of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels. Further experiments are planned to search possible changes in the membrane polarity and to elucidate whether changes in  $pH_o$  or  $pH_i$  may be the main reason for such effects on channel conductance.

**2. The role of environmental  $Mg^{2+}$  ions in the cerebrovasospasm (Stroke) induced by alcohol or cocaine.** (In collaboration with Dr. Burton Altura, SUNY at Brooklyn, New York, U.S.A.). In voltage-clamp experiments we found that an increase in extracellular  $Mg^{2+}$  concentration [ $Mg^{2+}$ ] $_o$  (1.2 to 4.8 mM) depressed conductance in  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  channels in BCECs. Further on, we demonstrated that a decrease in [ $Mg^{2+}$ ] $_o$  (1.2 to 0.3 mM), created a negative screening on the cell membrane affecting thereby the activation kinetic of a T-type  $Ca^{2+}$  channel. By using  $Ba^{2+}$  as charge carrier, we recently observed that alcohol in a very low concentration (20 mM) depressed  $Ca^{2+}$  channel conductance. It is known that chronic or high ingestion of alcohol or cocaine can result in cerebral vasospasm (Stroke) and that low [ $Mg^{2+}$ ] $_o$  in blood potentiates this effect. Experiments with different alcohol, cocaine and  $Mg^{2+}$  concentrations, should give more insight in the underlying mechanisms.

**3. Characterization of whole-cell currents in a pancreatic cell line, BMRPA.430 and their role on tumor genesis.** (in collaboration with Dr. Josef Michl, SUNY at Brooklyn, New York, U.S.A.) The aim of this study is the functional role of ion channels of pancreatic cells in the tumor genesis induced by the tobacco smoke-specific carcinogen N-nitrosamine (NNK). In voltage-clamp experiments with confluent cells, using a normal extracellular  $K^+$  solution, only high voltage-activated  $Ca^{2+}$  currents were found. Conversely, in resuspended and spherical single cells only outward  $K^+$  currents were observed. Further experiments will clarify whether a polarized channel distribution could account for this differential current expression.

## Arbeitsgruppe PD Dr. M. Markus

Mitarbeiter: I. Kusch, A. Czajka, F. Niese, T. Schulte, K. Kötter, M. Woltering, D. Böhm

1. Es wurde ein Modell erstellt, um das Wachstum von Blutgefäßen zu simulieren. Dieses Modell beruht auf der Wechselwirkung zwischen Turingscher Morphogenese und Genschalter. Insbesondere konnte die Ausrichtung eines solchen Wachstums auf Tumoren berechnet werden; diese Ausrichtung erlaubt den Übergang von einer Latenzphase, in der der Tumor nur durch Diffusion ernährt wird und einige mm Größe nicht überschreitet, zu einer Wachstumsbeschleunigung durch Blutversorgung. Stimuliert wird dieser Übergang durch die Bildung von TAF („tumour angiogenesis factor“), welches im Modell berücksichtigt wurde. Durch geeignete Umformulierungen läßt sich der Algorithmus auch auf das Wachstum von Insektentracheen und ihrer Regenerationsprozesse adaptieren.

2. Turbulenz in der durch Licht kontrollierbaren Belousov-Zhabotinsky-Reaktion, welche formale Analogien mit der spannungskontrollierbaren Fibrillation eines Herzmuskels zeigt, wurde mit einem zellulären Automaten simuliert. Dabei ergaben sich Übergänge von Spiralwellen zu Wellenfrontinstabilitäten und von diesen zu einer Wellenfetzendynamik, die gut mit experimentellen Beobachtungen übereinstimmen.

3. Es wurde ein verblüffend einfaches optisches Rückkopplungssystem experimentell beobachtet und simuliert: eine Welle in einem lichtempfindlichen anregbaren Medium läuft vor ihrem eigenen Spiegelbild davon. Dies kann man verwenden, um unerwünschte Strukturen an den Rand des Mediums zu treiben und damit zu eliminieren.

4. Untersuchungen von amphiphilen Phasen, welche von Wasser umgeben sind, wurden weitergeführt. Wir fanden konvektive Strömung in zwei Längenskalen: Rollen im Wasser im cm-Bereich und Zellen im Tensid im Submillimeter-Bereich. Das Tensid aggregiert an den Ecken der Zellen und wird dann durch die Rollenströmung am Boden des Mediums auseinandergezogen. Es ergeben sich neuartige, extrem geradlinige Aggregate, welche hunderte Male länger sind als breit.

1. A model for the simulation of the growth of blood vessels was set up. This model is based on the interaction of Turing morphogenesis and genetic switches. In particular, we calculated the orientation of this growth towards tumours. This process allows the transition from a latent phase, in which the tumour is nourished solely by diffusion and does not surpass a few mm in size, to a growth acceleration via vascularization. The transition is stimulated by the production of the so-called tumour angiogenesis factor, which was included in the model. Proper reformulations allow to adapt the algorithm to the growth of insect trachea and their regeneration processes.

2. Turbulent patterns in the light controlled Belousov-Zhabotinsky reaction, which is formally analogous to voltage controllable fibrillation of heart muscle, was simulated with a cellular automaton. This automaton leads to transitions from spiral waves to wave front instabilities („ripples“) and from these to a „frazzle gas“ in satisfactory agreement with experimental observations.

3. An astonishingly simple optical feedback device was observed experimentally and simulated numerically: a wave in a light-sensitive excitable medium drifts away from its ever-accompanying mirror-image. This phenomenon can be used to eliminate unwanted structures by driving them to the border of the medium, where they are extinguished.

4. Investigations involving amphiphilic substances surrounded by water were continued. Convective motion in two length scales was found: rolls in the water in the order of cm, and cells in the tenside in the submillimeter range. The tenside aggregates at the vertices of the cells and is elongated by virtue of the large-scale convection at the bottom of the medium. The result is the appearance of novel, extremely straight aggregates, with length-width ratios of several hundred.

## Arbeitsgruppe Prof. Dr. S.C. Müller

Mitarbeiter: I. Beyer, M. Böckmann, M. Dahlem, D.-M. Goldschmidt, A. Kosa, O. Kotnyek, Th. Mair, K. Matthiessen, B. Neumann, B. Schmidt, D. Stock, A. Warda, V.S. Zykov

### Allgemeine Thematik: Chemische und biologische Wellen

Zur externen Beeinflussung und Kontrolle der sich in der Belousov-Zhabotinsky-Reaktion ausbreitenden Wellen wurden weitere Experimente und numerische Simulationen durchgeführt. In der lichtempfindlichen, mit einem Ruthenium-Komplex katalysierten Variante dieser Reaktion wurde eine effiziente Rückkopplungsmethode verwendet, mit der die Auswirkung einer Folge von kurzen Lichtpulsen auf die Dynamik einer einzelnen oder eines Paares von mäandrierenden Spiralspitzen untersucht wurde. Jeder Puls wird genau dann ausgelöst, wenn die steile Wellenfront einen vorgesehenen Messpunkt erreicht (lokale Rückkopplung). Es ließ sich zeigen, daß bisher unbekannte, komplexe Bahnen der Spiralspitze entstehen, indem diese sich asymptotisch neuartigen stabilen Trajektorien („Attraktoren“) annähert. Dabei deutet sich an, daß in einem Spiralaar jeweils eine Spiralspitze ihre Dynamik dem gegenläufigen Partner aufzwingt, also einen weiteren Attraktor synchron entstehen läßt. Die experimentellen Befunde wurden durch numerische Simulationen auf der Basis eines modifizierten Zwei-Variablen-Oregonatormodells bestätigt. Es wurden auch Simulationen zu globalen Rückkopplungseffekten in endlich ausgedehnten Medien durchgeführt, die je nach Vorzeichen und Phase zu Stabilisierung oder zum Auslösen von Spiralen führen. Ebenfalls im Hinblick auf eine externe Kontrollmöglichkeit der Wellendynamik, und zwar global durch die Gasphase über der reaktiven Schicht, wurde die Rolle des Luft-sauerstoffs mittels EPR-Messungen weiter untersucht, insbesondere in den teilweise radikalischen Reaktionsschritten bei der durch CE (IV) katalysierten anaeroben und aeroben Oxidation einiger organischer Säuren (Malon- und Glyoxylsäure). Die gemessene Abhängigkeit der Verbrauchsdaten von Anfangskonzentrationen konnte auf eine für den Reaktionsverlauf charakteristische Verzweigungsstruktur des verantwortlichen Mechanismus zurückgeführt werden. Durch Vergleich von Strömungsprofilen mit Simulationen von Dr. H. Wilke, Berlin, konnten als vorrangige Ursache von an Wellen beobachteter Konvektion chemisch verursachte Gradienten in der Oberflächenspannung identifiziert werden. Um die Rolle von Dichteänderungen zu untersuchen, wurde die konvektive Deformation von Wellen in Kapillaren, in denen keine freie Oberfläche herrscht, beobachtet. Die hier auftretende Konvektion zeigte gegenüber Experimenten mit freier Oberfläche einige neuartige, bisher nicht verstandene Verhaltensweisen. Für die biologischen Erregungswellen in der „Spreading Depression“ (SD) haben wir die Dispersionsrelation unter verschiedenen Bedingungen bestimmt, wodurch ein unmittelbarer Vergleich mit anderen erregbaren Medien erleichtert wird. In der oszillierenden Glykolyse im Hefeextrakt wurden die präparativen Anfangsbedingungen zur Erzeugung kreis- und spiralförmiger NADH- und Proton-Wellen optimiert. Die Konstruktion eines kontinuierlichen Gelreaktors wurde vorangetrieben, der für die erstmalige Beobachtung von stationären Turing-Strukturen in einem biochemischen Oszillator vorgesehen ist.

### General topic: Chemical and biological waves

Further experiments and numerical simulations concerning the external control of waves propagating in the Belousov-Zhabotinsky reaction have been performed. In a light-sensitive system catalyzed by a Ruthenium complex an effective feedback mechanism was introduced. The effect of a sequence of short light impulses on the dynamics of a single meandering spiral tip and of a pair of tips was investigated. Each stimulus is applied at a moment that corresponds to the passage of the steep wave front through a particular measuring point of the excitable medium (local feedback). It was shown that the introduction of such a feedback results in two new dynamical regimes named entrainment and resonance attractors. The findings indicate that in a pair of spiral waves one of the tips tends to force its dynamics onto its counterrotating partner. The experimental results are consistent with a modified 2 component-Oregonator. Also, studies of global feedback effects in confined domains of excitable medium were performed which yielded a stabilization or annihilation of the spirals, depending on the sign and phase of the feedback parameter. Another global method for externally controlling the wave dynamics may be found in changing the gas phase above a reactive layer. For this purpose the role of oxygen in this reaction was studied further using EPR measurements, for elucidating, in particular, radicalic reaction steps in the anaerobic and aerobic oxidation of malonic and glyoxylic acid by ceric ions. The measured dependence of the consumption rates on the initial concentrations could be attributed to a characteristic branched pathway of the responsible mechanism.

Surface tension gradients arising from the local reaction could be identified as the major driving force for convection observed in a liquid Belousov-Zhabotinsky preparation by comparing height profiles of measured velocity with simulations performed by Dr. H. Wilke, Berlin. To elucidate the role of density changes, studies of systems without a free surface were undertaken by observing convective waves deformations in a liquid reagent in a capillary. Here we found a convective behaviour quite different from the case of a free surface which is not fully understood yet. For biological excitation waves occurring in the phenomenon of retinal spreading-depression (SD) we have established the dispersion relation (speed vs. wavelength) under various different conditions, such that a direct comparison with other excitable media is now possible. During oscillatory glycolysis in yeast extract the preparative initial conditions for the generation of circular and spiral-shaped NADH and proton waves were optimized. A special continuous flow gel reactor for the first observation of stationary Turing patterns in a biochemical oscillator was constructed.

Der Schwerpunkt der Arbeiten der AG Biomathematik liegt zur Zeit auf der numerischen Analyse der Dynamik der Spiralspitze im Zentrum von Spiralwellen in erregbaren Medien. Experimente und numerische Simulationen zeigen eine enorme Vielfalt an schleifenförmigen Bahnen der Spiralspitze. Eine systematische Analyse der Muster in Abhängigkeit von den Modellparametern wurde durch Berechnung der Powerspektren der Bahnen für das Oregonator Modell der Belousov-Zhabotinsky Reaktion und für das FitzHugh-Nagumo Modell der Nervenleitung durchgeführt. Die Untersuchungen wurden jetzt ausgedehnt auf den Transportmechanismus im Medium, die Diffusion. Der normierte Diffusionskoeffizient  $D_2$  des Inhibitors wurde relativ zum normierten Diffusionskoeffizienten des Aktivators  $D_1 = 1$  im Intervall  $0 < D_2 < 1$  variiert. Bei  $D_2 = 0.33$  entsteht eine zweite Frequenz, die zu einer epizyklischen Bewegung der Spiralspitze führt. Bemerkenswert bei dieser Verzweigung ist die starke Deformation, die die Spiralspitze während ihres Umlaufs im Spiralzentrum erfährt (K.-H. Müller, Th. Plesser).

Ein weiterer Arbeitsschwerpunkt in Zusammenarbeit mit I. Chizhov (Abt. 3) ist der Photozyklus von Bacteriorhodopsin. Basierend auf einem allgemeinem Schema von Reaktionen mit vier Reaktanden wurde ein halbautomatisches Verfahren entwickelt, daß alle möglichen Reaktionen 1. Ordnung beinhaltet, die mit vier Intermediaten möglich sind. Das Verfahren erlaubt es nun in effizienter Weise Sätze von intrinsischen Ratenkonstanten durchzuspielen, die mit den gemessenen apparenten Raten vereinbar sind. Darüber hinaus werden Spektren berechnet, aufgrund derer eine Entscheidung über die Validität der intrinsischen Raten möglich ist.

Die Anwendung dieses Verfahrens auf den Photozyklus von Bacteriorhodopsin hat gezeigt, daß die Daten nicht mit den bisher diskutierten einfachen Mechanismen vereinbar sind. Diese Untersuchungen gaben unter anderem den Anstoß zur Entwicklung eines Modells mit Übergängen zwischen schnellen Gleichgewichten, wie sie in einem Protein auftreten können.

Die entwickelten Techniken werden zur Zeit auf eine Reihe anderer Photoproteine angewandt (K.-H. Müller).

The focus of our research is at present the numerical analysis of the complex tip motion of spiral waves in excitable media. Experiments and numerical simulations dealing with such waves disclose a plethora of complex trajectories of tip motion. A systematic power spectrum analysis of spiral tip trajectories as a function of the model parameters has been done for the Oregonator model of the Belousov-Zhabotinsky reaction and for the Fitz-Hugh-Nagumo model of nerve conduction.

The investigations have been extended to the transportmechanism in the medium, i.e. to diffusion. The normalized diffusion coefficient  $D_2$  of the inhibitor was varied relative to the diffusion coefficient of the activator  $D_1$  in the interval  $0 < D_2 < 1$ . At  $D_2 = 0.33$  emerges a second frequency resulting in an epizyclic motion of the tip of the spiral. It is interesting to note that this bifurcation is correlated with a strong deformation of the tip during its revolution in the core of the spiral. (K.-H. Müller, Th. Plesser).

Another topic of research in collaboration with I. Chizhov (Abt. 3) is the analysis of the photocycle of bacteriorhodopsin. A semi-automatic procedure based on a general scheme of first order reactions with four intermediates was developed. The method makes it feasible to play in an efficient manner with sets of intrinsic rate constants compatible with measured apparent rates. Spectra calculated in the framework of this procedure are an additional measure for the reliability of the selected intrinsic rate constants.

The application of this procedure to the photocycle of bacteriorhodopsin shows that the data are not compatible with simple mechanisms discussed so far. This investigations gave an impact for the development of a model with transitions between fast equilibria.

Now the is applied to other photoproteins (K.-H. Müller)

**Allgemeine Thematik:** Massenspektrometrie und Ligandenbindung

**Projekt 1: Massenspektrometrie von Proteinen.**

Die Massenspektrometrie von biologischen Makromolekülen hat in den letzten zehn Jahren einen enormen Fortschritt erfahren. Das Problem bestand vor allem darin, größere polare Moleküle in das Vakuum eines Massenspektrometers zu überführen. Für MALDI Geräte wurde es dadurch gelöst, daß Moleküle, die an der Oberfläche eines Trägers adsorbiert sind, im Massenspektrometer gezielt mit Hilfe eines Laserblitzes desorbiert werden.. Bei der in dieser Arbeitsgruppe verwendeten Methode (ESI) werden kleine Tröpfchen, die polare Makromoleküle in Lösung enthalten, in das Vakuum des Massenspektrometers gesaugt. Dadurch, daß keine Ionisierungsenergie aufgewendet werden muß, können die zu untersuchenden Moleküle unfragmentiert gemessen werden. So lassen sich beispielsweise alle tryptischen Fragmente eines Proteins bestimmen. Wenn diese dann in einem Folgeschritt gezielt an den Peptidbindungen fragmentiert werden, können aus den Massenspektren Sequenzinformationen erhalten werden. Der Vergleich von partiell sequenzierten tryptischen Fragmenten mit den bestehenden DNA-Datenbanken erlaubt schon heute in den meisten Fällen eine eindeutige Identifizierung der ursprünglichen Proteine. Wenn die Tröpfchen hinreichend klein sind ("nanospray") können auf diese Weise Proteine aus 2-D Polyacrylamid-Gelen eindeutig zugeordnet werden. Im nächsten Jahr (1997) soll diese Technik unter anderem zur Untersuchung unterschiedlich differenzierter Zellen verwendet werden.

**Projekt 2: Bindungsstudien**

Die Untersuchungen der Bindung verschiedener pharmakologischer Klassen von Liganden an den spannungsabhängigen  $Ca^{++}$ -Kanal konnten im Jahr 1996 abgeschlossen werden. Sie führten zu einem relativ einfachen Verständnis des molekularen Bindungsmechanismus. (H. Prinz, Habilitationsschrift Innsbruck 1995, und T. Brauns, H. Prinz, et al. Biochemistry 1997 (zur Publikation angenommen). Die Untersuchungen zum Bindungsmechanismus von ras und seinen Mutanten (Zusammenarbeit mit Christian Lenzen, Robbert Cool und Alfred Wittinghofer) stehen kurz vor dem Abschluß.

**General Subjects:** Mass Spectrometry of Proteins and Ligand Binding Studies

**Project 1: Mass Spectrometry of Proteins**

Mass spectrometry of biological macromolecules has seen an enormous development during the last ten years. The main obstacle had been the transfer of large polar molecules into the vacuum of a mass spectrometer. One solution to this problem is the direct transfer of dried molecules from a solid surface inside the mass spectrometer (as in former field desorption (FD) methods which lead to MALDI). The other approach is the transfer of small droplets containing macro-molecular ions into the vacuum of a mass spectrometer (ESI = Electro-Spray Ionization). Reducing the size of the droplets lead to the unique opportunity of performing mass-spectrometric analysis of tryptic fragments from a silver-stained protein dot of a 2-D polyacrylamid gel. The peptides can be fragmented in an additional step inside the mass spectrometer, so that sequence information can be obtained. On the background of the increasing wealth of genomic information stored in DNA data banks, this leads to an unambiguous identification of silver-stained dots from a 2-D gel by tryptic fingerprints and by mass spectroscopy. Setting up the equipment was a main issue in the year 1996.

**Project 2: Ligand Binding Studies.**

One project (The binding mechanism of different pharmacological classes of ligands and L-type  $Ca^{++}$ -antagonists. (collaboration with Thomas Brauns, Jörg Striessnig and Hartmut Glossmann, Innsbruck University, Austria)) has been successfully completed in 1996. It lead to a relatively simple understanding of the molecular mechanism of  $Ca^{++}$ -antagonists binding to the voltage dependent L-type  $Ca^{++}$ -Channel. For Review see: Prinz, H. Habilitationsschrift Innsbruck 1995 and for the most recent publication: Brauns, T., Prinz, H., Kimball, S. D., Haugland, R. P., Striessnig, J. and Glossmann H.: L-type calcium channels: Binding domains for dihydropyridine and benzothiazepines are located in close proximity to each other. Biochemistry 1997 (in the press). The second project (The binding mechanism of ras and its mutants (collaboration with Christian Lenzen, Robbert Cool and Alfred Wittinghofer)) still needs a finishing touch.





In einem kurzen Artikel in Science haben wir kürzlich die Frage aufgeworfen, ob Selbstorganisation auf molekularer Ebene in biologischen Systemen nur eine einfache Kopie der makroskopischen Phänomene repräsentiert oder neue Arten von Selbstorganisation in solchen Systemen existieren. In darauffolgenden Untersuchungen charakteristischer Zeiten bei diffusionskontrollierten, allosterischen enzymatischen Reaktionen in kleinen Raumbereichen hat sich gezeigt, daß die Entwicklung starker kinetischer Wechselwirkungen und Korrelationen in Reaktionssystemen mit Dimensionen unter einem Mikrometer und weniger als tausend Enzymen möglich ist. Sobald katalytische Zyklen einzelner Enzyme gleicher Funktion im ganzen Volumen gekoppelt sind, zeigt die Enzympopulation ein Verhalten wie ein einzelnes stark korreliertes System, das wir als molekulares Netzwerk beschrieben haben.

Dieses Verhalten wurde an einem einfachen Reaktionsmodell untersucht. Betrachtet man als hypothetisches Beispiel eine enzymatische Reaktion, bei der die Bindung eines Substratmoleküls allosterisch durch die Produktmoleküle aktiviert wird, so kann ein Produkt nicht nur das Enzym, aus dem es entstanden ist, aktivieren, sondern zugleich auch alle anderen responsiven Enzyme. Die Reaktion ist beschränkt auf einen kleinen Raumbereich, der nur einige hundert Enzyme enthält. Die Dauer eines einzelnen katalytischen Zyklus in solch einem Volumen ist wesentlich größer als die diffusive Durchmischungszeit wie auch die Transportzeit, die ein Produktmolekül braucht, um ein Enzym zu treffen. Das Substrat wird kontinuierlich zugeführt und dessen Konzentration ist im wesentlichen konstant.

Wir fanden, daß mit dem Anwachsen der allosterischen Aktivierung die katalytischen Zyklen der Enzyme im gesamten Volumen synchronisieren. Das führt zu periodischem „Spiking“ in der katalytischen Aktivität der gesamten Population, wie man es in der Zeitabhängigkeit der Substratumwandlungsrate beobachten kann. In einem Spike werden gleichzeitig von einem großen Teil der Enzyme Produktionsmoleküle freigegeben. Die Frequenz der Spikes ist bestimmt durch die Dauer eines einzelnen molekularen katalytischen Zyklus, so daß die Periodendauer in der Größenordnung einer Millisekunde liegt. Simulationen, statistische und analytische Untersuchungen des ausserordentlich robusten Modells haben Eigenschaften von Hysterese im Übergang zum Spiking, sowie komplexe intermittente Zustände und Instabilitäten höherer Ordnung im Zustand des periodischen Spiking aufgezeigt. Dabei kann die Wechselwirkung als Substrat- und Produktaktivierung oder Hemmung realisiert sein. Die experimentelle Analyse dieses Verhaltens wird vorbereitet. [In Zusammenarbeit mit Dr. A. Michailov (Humboldtstipendiat), Dr. D. Zanette (Humboldtstipendiat) und P. Stange, der inszwischen seine Diplomarbeit über Teilaspekte dieses Arbeitsgebietes fertiggestellt hat.]

Recently, in a perspective article in Science, we have asked the question, whether selforganisation in biological systems at the molecular level represents only a simple copy of macroscopic phenomena or whether new types of selforganisation exist. In subsequent investigations of the characteristic times of diffusion-controlled allosteric enzyme reactions in small spatial volumes we found, that the evolution of strong kinetic interactions and correlations in reactionsystems with dimensions in the micrometerrange and less than thousand interacting enzymes might well occur. As soon as the catalytic cycles of a set of enzymes of equal function in the given volume are coupled, the total enzyme population displays properties of a strongly correlated system, which we define as a molecular network. Thus, any single allosteric enzyme, the substrate binding of which is allosterically activated not only by its own product molecule but also by the products generated by any other allosteric enzyme of the same function group, becomes a member of such a network, and feeds automatically its own products toward the binding sites of the other responsive enzymes of the group. The reaction is restricted to small spatial volumes containing only a few hundred enzymes of a given set. The time of each individual catalytic cycle in such a volume is much larger than the diffusive mixing time as well as the transport time the product molecule needs to meet a proper target enzyme. A constant substrate concentration must be maintained by a proper substrate input rate. Above a critical threshold of allosteric activation synchronization of the catalytic cycles of the enzyme set in the volume is observed, yielding a periodic spiking of the function of the enzyme population. During each spike a large number of the enzyme of the set release simultaneously their products. The spike frequency depends on the turnover time, the period being in the millisecond range. However, the occurrence of more than one spiking enzyme group in a set were observed yielding phase different spiking peaks of each of the group. Simulation, statistical and analytical investigations of this rather robust model showed various properties such a hysteresis of the transition to spiking, complex intermittancy and higher order instabilities during periodic spiking. Furthermore, it was found that the synchronizing interactions can be generated by substrate- and product- activation as well as - inhibition. The prerequisites for experimental studies of these properties are currently analysed. [ In coll. with Dr. A. Michailov and Dr. D. Zanette, both supp. by the Humboldt foundation, and Dipl. Phys. P. Stange, Berlin ].

**Emeritusarbeitsgruppe Prof. Dr. D.W. Lübbers**

Studentische Hilfskräfte: S. Mischke, F. Beiderwieden, T. Köster

**Projekt 1: O<sub>2</sub>-Flux-Messungen an der menschlichen Haut (Untersuchung zur Physiologie der normalen und pathologischen Sauerstoff- und Substratversorgung der Haut)**

(D.W. Lübbers, T. Köster in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. P. Altmeyer, Dr. M. Stücker, L. Schulze, R. Ziemann, Dermatologische Klinik der Universität Bochum)

Die neuartige, im Max-Planck-Institut entwickelten O<sub>2</sub>-Flux-Messanordnung (Meßsystem Flox) konnte soweit verbessert werden, daß erste klinische Messungen des Sauerstoff-Fluxes an der gesunden und durchblutungsgestörten Haut in der Dermatologischen Klinik der Universität Bochum durchgeführt werden konnten. Die Untersuchungen werden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

**Projekt 2: Simulationsrechnung zur Messung des Gasaustausches durch die Haut mit der O<sub>2</sub>-Fluxoptode**

(D.W. Lübbers, F. Beiderwieden in Zusammenarbeit mit Dr. H. Karpf, H. Hartmann, AVL Graz)

Mit dem im Max Planck Institut entwickelten Simulationsmodell der Sauerstoffaustauschprozesse in der menschlichen Haut wurde versucht, Messergebnisse der O<sub>2</sub>-Fluxmessungen zu simulieren, um den Einfluss der verschiedenen Parameter bei der Sauerstoffversorgung der Haut herauszuarbeiten.

**Projekt 3: Quantitative Reflexionsfotometrie der menschlichen Haut**

(D.W. Lübbers, F. Beiderwieden gemeinsam mit Prof. Dr. P. Altmeyer, Dr. Stücker, Dr. Ihrig, Dermatologische Klinik der Universität Bochum, Dr. Heise, Institut für Spektrochemie Dortmund, Dr. H. Jungmann, Krebsforschung Herdecke e.V., Dr. J. Hoffmann, Bremen)

Mit einem neuartigen schnellregistrierenden Reflexionsfotometer werden Reflexionsspektren der Haut unter verschiedenen klinischen Bedingungen aufgenommen. Diese Spektren werden mit verschiedenen Auswertmethoden analysiert, um herauszuarbeiten welche Auswertmethode die sichersten Resultate liefert. Lichteindringtiefe in die Haut und das Streuverhalten der Haut werden besonders berücksichtigt.

**Projekt 4: Nichtinvasive Messung der pH - Verteilung auf der Gehirnrinde nach operativer Versorgung von Patienten mit Schädelhirntraumen**

(D.W. Lübbers gemeinsam mit Prof. K. Cammann, Dr. B. Ross, Lehrstuhl für analytische Chemie der Universität Münster, Prof. Dr. M.R. Gaab, Neurochirurgische Klinik der Universität Greifswald, Privatdozent Dr. P. Czerney)

Es wurden weitere Vorarbeiten zur Entwicklung eines flächenförmigen, flexiblen optischen pH-Sensors (NIR-pH-Fensteroptode) durchgeführt, mit dem die lokale pH-Verteilung auf der Gehirnoberfläche erfaßt werden kann.

**Project 1: Oxygen-flux measurements on the human skin (Physiological investigations of the normal and pathological supply of oxygen and substrates of the human skin)**

(D.W. Lübbers, T. Köster in cooperation with Prof. Dr. P. Altmeyer, Dr. M. Stücker, L. Schulze, R. Ziemann, Dermatologische Klinik der Universität Bochum)

The new O<sub>2</sub>-flux measuring system (measuring system Flox) could be improved so that first clinical measurements in the Dermatologische Klinik of the University Bochum could be performed. The project is supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

**Project 2: Calculation to simulate the gas exchange through the skin during the application of the O<sub>2</sub> Fluxoptode**

(D.W. Lübbers, F. Beiderwieden in cooperation with Dr. H. Karpf, H. Hartmann, AVL Graz)

The simulation model developed in the Max Planck Institut has been applied to analyse the influence of different parameters on the oxygen supply of the human skin using data of the clinical measurements.

**Project 3: Quantitative reflection fotometry of the human skin**

(D.W. Lübbers, F. Beiderwieden in cooperation with Prof. Dr. P. Altmeyer, Dr. Stücker, Dr. Ihrig, Dermatologische Klinik der Universität Bochum, Dr. Heise, Institut für Spektrochemie Dortmund, Dr. H. Jungmann, Krebsforschung Herdecke e.V., Dr. J. Hoffmann, Bremen)

A new rapid scanning reflection fotometer by which a large spectral range can be registered in less than a hundredth of a second, is used to record reflection spectra of the human skin under different clinical conditions. To find out by which evaluation method the best quantitative results can be obtained different evaluation methods are applied. The penetration depth of the radiation into the skin and the scattering of the skin are especially considered.

**Project 4: Non-invasive measurement of the pH-distribution on the surface of the brain cortex after surgical treatment of patients with head-trauma**

(D.W. Lübbers in cooperation with Prof. K. Cammann, Dr. B. Ross, Lehrstuhl für analytische Chemie der Universität Münster, Prof. Dr. M.R. Gaab, Neurochirurgische Klinik der Universität Greifswald, Privatdozent Dr. P. Czerney)

Further preliminary studies were carried out to construct a two-dimensional flexible optical pH-sensor (NIR-pH-window optode) by which the local pH distribution on the brain surface can be measured.

**Zentrale Einrichtungen**

**Central facilities**

Neben der Wahrnehmung sicherheitstechnischer Aufgaben beschäftigte sich die Arbeitsgruppe im Berichtszeitraum mit folgenden Projekten:

**1. Herstellung dünner Schichten für optische Filter im Rahmen des ESA-Projekts XMM sowie für den Röntgensatelliten ABRAXIS**

In Zusammenarbeit mit K.H. Stephan (MPI für extraterrestrische Physik, Garching) wurden dünne Polypropylenfolien mit Aluminium im RF-Sputteringverfahren beschichtet, um für die bordseitige Teleskopkamera optische Filter für die Strahlung vom weichen Röntgenbereich bis zum nahen Infrarot zu erhalten (s. Report 95). Ferner wurden optische Filter für den geplanten Röntgenkleinsatellit ABRIXAS (A BRoad-band Imaging X-ray All-sky Survey Satellite) gefertigt. ABRIXAS soll während der geplanten Lebensdauer von 3 Jahren hauptsächlich aktive Galaxien entdecken, in deren Zentrum vermutlich schwarze Löcher Gravitationsenergie in hochenergetische Strahlung umwandeln. Der Start des Satelliten soll 1999 mit einer COSMOS Rakete in eine 580 km Umlaufbahn mit 51° Inklination erfolgen.

**2. Weiterentwicklung und Applikation von elektrochemisch arbeitenden  $pO_2$ -Nadelelektroden**

a) In Fortführung der wissenschaftlichen Kooperation mit M. Biefang und D. Zinkler (Lehrstuhl für Tierphysiologie, Bochum) wurden mit verbesserten Nadelelektroden  $O_2$ -Kinetiken im Umfeld salzwasserüberfluteter Strandcollembolen gemessen. Die Ergebnisse wurden in einer Diplomarbeit zusammengefaßt.

b) Unsere Nadelelektroden finden gegenwärtig in der Bionik zur Untersuchung bioenergetischer Prozesse weitere Anwendung. Im Rahmen des „*Kawachi Millibioflight Project*“ wurden von Yutaka Komai (Tsukuba Research Consortium, Japan) erstmals direkte  $pO_2$ -Messungen in der Flugmuskulatur von Nachtfaltern während des Fluges durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß die Muskelbewegung während des Insektenfluges zur effektiven Steigerung des Gasaustausch ausgenutzt werden kann.

c) Die im Vorjahr beschriebenen Untersuchungen (s. Report 1995) im Zusammenhang mit dem mikrobiellen Abbau von Chlorbenzolen (TU-Berlin) und der Abwasserreinigung (Universität Bremen) wurden fortgesetzt. Ziel ist es, aerobe und anaerobe Abbauprozesse, die sich gegenseitig beeinflussen, auf kleinstem Raum zu koppeln, um die Effizienz solcher Systeme zu steigern. Dabei zeigen Polyurethan-Schaumwürfel von ca. 1 cm<sup>3</sup> besonders interessante Eigenschaften. Dieses Material besitzt gegenüber Alginatkugeln aufgrund seiner hohen Porosität eine stark vergrößerte Oberfläche mit besonderen Grenzflächenaktivitäten, Transport- und Permeabilitätsverhalten, welche sich vorteilhaft auf die biologische Abbauleistung auswirken. Am membrangebundenen Biofilm wurden  $pO_2$ -Profile aufgenommen und quantifiziert, um die  $O_2$ - und Substratversorgung zu optimieren. Das Projekt wird fortgesetzt.

Apart from preception of safety regulations the activities of this group concentrated on the following projects:

**1. Production of thin films for optical filters in connection with the ESA-Project XMM as well as for the X-ray satellite ABRIXAS**

In cooperation with K.H. Stephan (MPI für extraterrestrische Physik, Garching) we coated thin polypropylene foils with Al-layers by means of RF-sputtering technique to get optical filters for the telescope camera for radiation in the range of soft X-ray to close infrared radiation (s. report 1995). In addition optical filters for the planned small satellite ABRIXAS (A BRoad-band Imaging X-ray All-sky Survey Satellite) were made. During its life-time of about 3 years, ABRIXAS will discover mainly active galaxies. In the centres of these galaxies, presumably black holes convert gravitational energy into high energy radiation. the satellite will be launched 1999 with a COSMOS rocket into an orbit of 580 km, 51° inclination.

**2. Further development and applications of electrochemical  $pO_2$  needle electrodes**

a) We continued the scientific cooperation with M. Biefang and D. Zinkler (Lehrstuhl für Tierphysiologie, Bochum). By means of improved needle electrodes we measured  $O_2$ -kinetics in the environment of collembols *Anurida maritima* overflowed with salt water. The results are published in a dissertation.

b) Our needle electrodes are currently used in the field of bionics for the investigation of bioenergetic processes. For the first time local  $pO_2$  measurements in a flight muscle of a hawk moth were directly measured during flight by Yutaka Komai (*Kawachi Millibioflight Project*, Tsukuba Research Consortium, Japan). In this study it could be shown that muscle movement is effectively used to augment the gas exchange in an insect flight.

c) The described investigations in 1995 (s. report) were continued in connection with the microbial degradation of chlorobenzenes (TU-Berlin) as well as the purification of sewage (Universität Bremen). The aim of these studies is to combine aerobic and anaerobic processes at the smallest space to increase the efficiency of such systems. Cubes of about 1 cm<sup>3</sup> of Polyurethan-foam show special properties. Due to the high porosity of the foam cubes the effective surface is increased and special boundary layer activities as well as transport and permeability of substances have a favourable effect on the decomposition performance. To optimize the oxygen supply of bioreactors  $pO_2$  profiles in membrane bound biofilms were measured and quantified. This project will be continued.

## **ZE Elektronische Meßgeräte und Digitaltechnik**

Leiter: Dip.-Ing. M. Grote

Mitarbeiter: H. Brand, F.-K. Keinemann, P. Klein, P. Morcinietz, H. Schlüter, G. Weidemann

### **1. Entwicklungsbereich:**

Im Jahr 1996 wurde eine Monochromator-Steuerung entwickelt und gebaut, die es zuläßt, daß dieser voll durch einen PC gesteuert werden kann. Filter- und Gitterumschaltung werden über DC-Motoren durchgeführt. Der Rechner gibt hierzu die verlangte Position vor und die Steuerung führt daraufhin diese Befehle aus und meldet den Vollzug an den Rechner zurück. Die Spalt- und Gitterverstellung erfolgt über gesteuerte Schrittmotoren direkt vom Rechner aus.

Als weiteres wurde eine Zeitsteuerung für eine LN<sub>2</sub>-Nachfülleinrichtung zum Elektr. Mikroskop gebaut. In weitem Bereich variable Zeiten bestimmen die Füll- und Pausenintervalle. Ein Sensor überwacht den Überlauf und greift entsprechend seiner Voreinstellung in den Nachfüllzyklus ein.

Eine bereits vorhandene Multi-Ventilsteuerung wurde überarbeitet und nachgebaut. Für einen ebenfalls bestehenden A/D Wandler des IP-Scanners wurde ein schneller 12 Bit Volladdierer zur Mittelwertbildung angefertigt.

### **2. Service-Bereich:**

In diesem Bereich wird die Instandhaltung und Wartung der elektrischen und elektronischen Geräte aus dem Institutsbereich durchgeführt. Im letzten Jahr haben sich drei Schwerpunkte bei der Reparatur ausgebildet:

- a) Thermostate der Firma Haake
- b) Heiz- und Magnetrührer
- c) elektrische Pipetten.

Daneben wurden insbesondere Reparaturen an Destilliergeräten, Elektrophoresen und Zentrifugen durchgeführt.

### **3. Kommunikationsbereich:**

In diesem Bereich wurde der Ausbau und die Instandhaltung des elektrischen Datennetzes, insbesondere der Ausbau des 100 Mhz-Netzes durchgeführt; ebenso die Wartung von Netzdruckern, Workstations und Laufwerken.

### **1. Development domain**

In 1996, a monochromatic illuminator gear was developed and built, which allows that the monochromatic illuminator can be controlled entirely by a PC/computer. Filter as well as grid switch-over is carried out by DC - motors. To this, the computer gives the position demanded and the gear executes these orders and thereupon reports the completion (back) to the computer.

In addition, a time control for an LN<sub>2</sub> - refill device for the electron microscope was built. Predominantly variable periods (?) control the filling intervals. A sensor supervises the overflow and influences the refill cycle (?) corresponding to its pointing.

A multi - valve gear, which already exists, was reworked and copied. A quick 12 Bit Volladdierer for mean value forming was manufactured for an A/D wand transformer of the IP - Scanner, which also exists already.

### **2. Service domain**

In this domain the maintenance of electric and electronic devices of the institute is carried out. Last year, 3 focal points formed during reparations:

- a) thermostats of the Haake company
- b) heating- and -----
- c) electric pipettes.

Furthermore, particularly reparations of distillers, electrophoresises and centrifuges were carried out.

### **3. Communication domain**

In this domain the extension and maintenance of the electric datanet, particularly the extension of the 100 mps-net was carried out, as well as the maintenance of net printers, workstations and drives.

## Zentrales Laboratorium für funktionelle Morphologie

Leiter: PD Dr. H. Hentschel

Mitarbeiter: A. Friedrich, R. Haubrock, D. Sylvester, H. Winkler

Als Dienstleistungen im Bereich Lichtmikroskopie (LM) und Elektronenmikroskopie (EM), einschließlich Präparation von Suspensionen, Zellen und Geweben wurden durchgeführt:

a) Anleitung und Hilfe für Arbeiten mit Epifluoreszenz und Differential-Interferenz-Kontrast am Axiophot; Einweisung am Kryostat und am Transmissions-Elektronenmikroskop.

b) Histologische Schnittserien (Kryostat, Paraffin) und morphologische Kontrollen von Zell-Kulturen im LM und EM (Auftraggeber in Klammern):

Colon, Tumor- und Kontrollgewebe (P. Herter, O. Müller); Ratten-Nieren (P. Herter, R.K.H. Kinne); Hautregenerate nach Bestrahlung und Transplantation (N. Hartmann, R.K.H. Kinne); Harnblasen-Zellen (Föllmann, Flieger); Gefrierbrüche (K. Zierold, B. Bechinger); Aufdampfen von dünnen leitenden Schichten auf Raster-EM-Präparaten (P. Herter, K. Zierold); Jejunum (F. Pietruschka); Leberzellen (T.C. Lin); Kaninchen-Nieren (P. Herter, T.C. Lin); Killifisch-Niere (E. Kinne); negative staining von Tubulin in Anwesenheit von APC (J. Deka) weitere Einzelheiten siehe Bericht AG O. Müller; Ultrastrukturelle Analysen von *E. coli* in Zusammenhang mit der Produktion von sensorischem Rhodopsin (I. Hohenfeld, M. Engelhard).

Wissenschaftliche Arbeit wurde in folgenden Projekten geleistet (Kooperation in Klammern):

Immunocytochemische Lokalisierung des  $\text{NaP}_i\text{-II}$  Kotransportsystems aus der Flunder und eines Antisense Proteins in Organen von Teleostern (AG A. Werner, S. Quabius, M. Elger).

Im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes am Mount Desert Island Biological Laboratory wurde mit einer speziell entwickelten Perfusions-Technik Gewebe für Immunocytochemie gewonnen. Das  $\text{NaP}_i\text{-II}$ -Kotransport-System wurde in zwei Segmenten des Nierenkanälchens lokalisiert: im sekretorischen proximalen Tubulus PII und im darauf folgenden Sammelrohrsystem. Aus der intrazellulären Verteilung (überwiegend basolateral im PII und überwiegend apikal im Sammelrohr), schließen wir auf proximale Sekretion und distale Resorption von Phosphat. Wir glauben, daß vergleichbare Mechanismen der Phosphatkontrolle unter Extrembedingungen und pathologischen Veränderungen auch in der Säugetier-niere wirksam sind.

In Gonaden, Niere und Darm der Flunder wurde das Antisense-Protein (B. Hülseweh, A. Werner) immunhistochemisch dargestellt. Es ist z.T. mit dem  $\text{NaP}_i\text{-II}$  Protein kolokalisiert.  $\text{NaP}_i\text{-II}$  und Antisense-Protein wurden auch in Geweben von Karpfen und Zebrafisch nachgewiesen. Inkubationen und photographische Dokumentation wurden standardisiert, um den Vergleich der Immunreaktionen verschiedener Antikörper untereinander und im Vergleich zu den Kontrollen (Peptidschutz, Präimmenserum) zu optimieren.

Ultrastrukturelle Untersuchungen am Pronephros. Transmissions-EM-Bearbeitung von Embryonen des Zebrafischlings (60 - 84 h post fertil.) belegten die Ausbildung von Nierenkörperchen und proximalem Tubulus in dieser frühesten Wirbeltier-Niere. Wir untersuchen z.Zt. in Zusammenarbeit mit Iain Drummond, Marc Fishman, Massachusetts General Hospital Boston, Verlustmutanten von diesem Modellfisch zum besseren Verständnis genetisch bedingter Fehlentwicklungen in der Nephrogenese.

We provided service for lightmicroscopical (LM) and electronmicroscopical (EM) projects, including preparation of suspensions, cells and tissues:

a) Training and help, involving work with epifluorescence and differential interference contrast with the Axiophot, at the cryostat and at the transmission electron microscope.

b) Preparation of series of histological sections (cryostat, paraffin) and morphological controls of cell cultures by LM and EM (coworkers in brackets): Colon, tissue from tumors and controls (P. Herter, O. Müller); rat kidney (P. Herter, R.K.H. Kinne); proximal tubule cells (P. Herter, L. Renfro, R.K.H. Kinne); regenerating skin after irradiation and transplantation (N. Hartmann, R.K.H. Kinne); urinary bladder epithelial cells (B. Föllmann, A. Flieger); freeze-fracture replicas (K. Zierold, B. Bechinger); coating of scanning EM preparations with conducting material (P. Herter, K. Zierold); jejunum (F. Pietruschka); liver cells (T.C. Lin); rabbit kidneys (T.C. Lin, P. Herter); kidneys of killifish (E. Kinne); negative staining of tubulin in the presence of APC (J. Deka, for details, see report of O. Müller); ultrastructural analyses of *E. coli* producing sensory rhodopsin (I. Hohenfeld, M. Engelhard).

We contributed scientifically to the following projects (cooperations):

Immunocytochemical localization of  $\text{NaP}_i\text{-II}$  cotransport system from flounder and an antisense protein in organs of teleost fish (AG Werner, S. Quabius, M. Elger).

During studies at the Mount Desert Island Biological Laboratory, tissue for immunological experiments was prepared by a special perfusion technique. The  $\text{NaP}_i\text{-II}$  cotransport system was localized in two segments of the renal tubule: in the secretory proximal tubule PII and in the subsequent collecting tubule-collecting duct system (CT/CD). By the intracellular distribution (predominantly basolateral in PII and predominantly apical in CT/CD), we conclude that phosphate is secreted proximally and reabsorbed distally. We believe that similar mechanisms of phosphate control are working in mammalian kidney in extreme physiological or pathological conditions. The antisense protein (B. Hülseweh, A. Werner) was revealed by immunohistochemistry in gonades, kidney and intestine of flounder. The protein is partly colocalized with the  $\text{NaP}_i\text{-II}$  transporter.  $\text{NaP}_i\text{-II}$  and antisense protein were also found in tissue of carp and zebrafish. Incubations and photographic documentation were standardized for comparing the immunoreaction with different antibodies and for comparison with controls (incubation in the presence of antigenic peptide or with preimmune serum):

Ultrastructural studies of pronephros. Transmission-EM of embryos of zebrafish (60 - 84 h post fertil.) gave evidence of the formation of renal corpuscles and proximal tubules in this very early vertebrate kidney. Presently, we are investigating mutants of this model fish. This will improve our understanding of genetic disorders in renal development (in collaboration with Iain Drummond and Marc Fishman, Massachusetts General Hospital, Boston).

## ZE Präzisionsgerätebau und Entwicklung (PGE)

Leiter: R. König

Mitarbeiter: U.Babst; J.Besler; G.Beyer; D.Brümann; W.Brüseke; B.Fieber; H.Heinings bis 31.03.1996; P.Jantschik; N.Klein; J.Ruhnnow; H.Sprave (vom 30.01. bis 31.05.1996)

1. A.Wittinghofer: Maßanfertigung von Labortischen; Probenständer aus PVC für Eppendorfgeläße; Elektrophoresekammern für SDS - und Agarose - Gele
2. Ch.Block: Maßanfertigung von Labortischen; Chromatographiesäulen zur Proteinaufreinigung; Probenständer aus PVC für Eppendorfgeläße; Edelstahl-Einschübe für -80°C-Schränke; Elektrophoresekammern für SDS - und Agarose - Gele; Blotkammern
3. N.Opitz: Lasermontage am Laser-Raster-Mikroskop
4. R.Cool: Probenständer aus PVC für Eppendorfgeläße
5. Ch.Herrmann: Probenständer aus PVC für Eppendorfgeläße; LM-Kühlblöcke für Proben in Eppendorfgeläßen; Standregale; Elektrophoresekammern für SDS - und Agarose - Gele; Maßanfertigung von Labortischen
6. J.Kuhlmann: Maßanfertigung von Labortischen; Extrusionsapparat; Standregale; Probenständer aus PVC für Eppendorfgeläße
7. O.Müller: Edelstahl-Einschübe für -80°C-Schränke; LM-Kühlblöcke für Proben in Eppendorfgeläßen; Probenständer aus PVC für Eppendorfgeläße
8. I.Vetter: Maßanfertigung von Labortischen; Chromatographiesäulen zur Proteinaufreinigung
9. R.Kinne: Biomedizin: Dr.Jäger Städtische Kliniken und FH-Dortmund; Venenkammer zur Austestung von Vena cava-Filtern
10. J.Kormanec: Probenständer aus PVC für Eppendorfgeläße; Zentrifugenadapter
11. E.Kinne: Trockentürme; Probenständer aus PVC
12. Ch.Lin: Elektrophoresekammern für SDS - und Agarose - Gele
13. F.Weher: Aufbau eines elektrophysiologischen Meßplatzes; Temperiereinheit für Versuchslösungen; Versuchskammer; Gerätetisch und Umbau eines 6 /1-Ventils für 'video imaging'-System; Feinjustiereinrichtung für Laser (CLSM); Versuchskammer und Faraday-Käfig für 'patch clamp'-Aufbau; Versuchskammer für Mikroinjektionen
14. A.Werner: Chromatographiesäulen zur Proteinaufreinigung; Maßanfertigung von Labortischen
15. K.Zierold; D.Badt: Kryotransfer-System für ein Kryokraftmikroskop zur Abbildung von Membranen und Zellen im gefrorenen Zustand; Einfriergerät zur Kryofixierung bei definierter Umgebungstemperatur; Cryostanzen; Probensteller
16. R.Goody: Image Plate Scanner zur Auslesung von Image Phosphorplatten als Detektoren für die Biophysik und Molekularbiologie (Ch.Burmester); Maßanfertigung von Labortischen; Probenständer aus PVC für Eppendorfgeläße; Behälter für radioaktive Abfälle aus PMMA
17. M.Geeves; G.Holtermann: Drucksprungreaktionskammer zur Messung von fluorometrischen Relaxationszeiten von Proteinen; Küvettenhalter für Multiplier
18. T.Restle; F.Pietruschka: Maßanfertigung von Labortischen
19. B.Wöhrl: Chromatographiesäulen zur Proteinaufreinigung; Maßanfertigung von Labortischen
20. I.Schlichting: Lochblechkästen für Tiefkühlshränke (-80°) zur Aufbewahrung von Langzeitproben; 200 bar-O<sub>2</sub>-Druckkammer; Standregale
21. A.Scheidig: Maßanfertigung von Labortischen; Probenhalter für Goniometerkopf; Detektionsspiegel für Flumix; Edelstahl-Einschübe für -80°C-Schränke; Probenständer aus PVC für Eppendorfgeläße
22. D.Schäfer: Edelstahlgehäuse für Video-Kamera
23. H.Hentschel: Maßanfertigung von Labortischen; 500 vergoldete Probensteller als Präparathalter zur Kryoultramikrotomie
24. T.Plesser: Schallschutz für EDV-Schrank
25. W.Zimelka: Auffangwannen für das Chemikalienlager
26. D.Lübbbers: Umbau des Geräteturmes für das Floxmeßgerät
27. M.Engelhard; I.Tchijov: Umbau einer Step-scan-Monochromator-Steuerung
28. H.Acker: Standregale; Lärmschutz für Ventilator am Laser; Verklebung von Coverslips auf Glasringe für die Zellkultur
29. S.C.Müller: Gel-Strip-Reaktor mit Kühlbox
30. M.Delpiano: Superfusionskammer für patch clamp aus Makrolon
31. Probenständer für Eppendorfgeläße aus PVC und PMMA; diverse PTFE;PVC und PMMA-Elektrophoresekämme; Wartung von Vakuumpumpen
1. A.Wittinghofer: made-to-measure laboratory tables; PVC sample holder for Eppendorf-vessels; electrophoresis chambers for SDS and agarose gels
2. Ch.Block: made-to-measure laboratory tables; chromatography columns for protein purification; PVC sample holder for Eppendorf-vessels; fine steel drawers for -80°C cupboards; electrophoresis chambers for SDS and agarose gels; blot chambers
3. N.Opitz: laser setting up on the laser-grid-microscope
4. R.Cool: PVC sample holder for Eppendorf-vessels
5. Ch.Herrmann: PVC sample holder for Eppendorf-vessels; LM-cooling blocks for samples in Eppendorf-vessels; shelves; electrophoresis chambers for SDS and agarose gels; made-to-measure laboratory tables
6. J.Kuhlmann: made-to-measure laboratory tables; extrusion apparatus; shelves; PVC sample holder for Eppendorf-vessels
7. O.Müller: fine steel drawers for -80°C cupboards; LM-cooling blocks for samples in Eppendorf-vessels; PVC sample holder for Eppendorf-vessels
8. I.Vetter: made-to-measure laboratory tables; chromatography columns for protein purification
9. R.Kinne: Biomedizin: Dr. Jäger; Städt. Kliniken and FH Dortmund; vein chamber for testing vein cava-filters
10. J.Kormanec: PVC sample holder for Eppendorf-vessels; centrifuge adapter
11. E.Kinne: drying towers; PVC sample holder
12. Ch.Lin: electrophoresis chambers for SDS and agarose gels
13. F.Weher: setting up of an electrophysiological measuring place, tempering unit for experiment liquids; experiment chamber; device table and rebuilding of a 6 /1-ventil for 'video imaging'-system; fine adjustment for laser (CLSM); experiment chamber and faraday-cage for 'patch-clamp'-establishment; experiment chamber for microinjections
14. A.Werner: chromatography columns for protein purification; made-to-measure laboratory tables
15. K.Zierold; D.Badt: cryo-transfer system for a cryo-force-microscope for frozen membranes and cells; freezer for cryo-fixation with adjustable temperature; cryo-stamps; sample plate
16. R.Goody: image plate scanner for selection of image phosphor-plates as detectors for biophysics and molecular biology (Ch. Burmester); made-to-measure laboratory tables; PVC sample holder for Eppendorf-vessels; container for radioactive waste consisting of PMMA
17. M.Geeves; G.Holtermann: pressure-jump-reaction chamber for measurement of fluorescent relaxation times of proteins; cuvette holder for multiplier
18. T.Restle; F.Pietruschka: made-to-measure laboratory tables
19. B.Wöhrl: chromatography columns for protein purification; made-to-measure laboratory tables
20. I.Schlichting: sheet-metal boxes for deep-freezers (-80°C) for storage of long-term samples; 200 bar-O<sub>2</sub> pressure chamber; shelves
21. A.Scheidig: made-to-measure laboratory tables; sample holder for goniometer-head; detection mirror for flumix; fine steel drawers for -80°C cupboards; PVC sample holder for Eppendorf-vessels
22. D.Schäfer: fine steel body for video camera
23. H.Hentschel: made-to-measure laboratory tables; 500 gilded sample plates as slide-holder for kryoultramicrotomy
24. Th.Plesser: sound proofing for EDP cupboard
25. W.Zimelka: catch basin for chemical stock
26. D.W.Lübbbers: rebuilding of device tower for flox measuring device
27. M.Engelhard; I.Tchijov: rebuilding of a step-scan-monochromator-control system
28. H.Acker: shelves; noise protection for ventilator on laser, sticking together of cover-slips on glass rings for cell culture
29. S.C.Müller: gel-strip reactor with cooling box
30. M.Delpiano: superfusion chamber for patch clamp from macrolon
31. sample holder for Eppendorf-vessels consisting of PVC and PMMA; diverse PTFE; PVC and PMMA electrophoresis combs; servicing of vacuum pumps

## Zentrales Laboratorium für Mikrobiologie und Biotechnologie

Leiter: Dr. D. Kuschmitz

Mitarbeiter: P. Hähnert, Ch. Jantschik, H. Ristau, I. Schlieker, G. Wehmeier, C. Ulbrich, A. Bilke

### Allgemeine Thematik und Aufgaben

Die Anforderungen der wissenschaftlichen Abteilungen nach sterilen Nährmedien (6953 L) und Agarplatten (14067), sowie an die Anzucht von rekombinanten *E. coli* (89 Fermenterläufe, 1671 L) waren deutlich größer als im Vorjahr. In Schüttelkulturen wurden angezogen *Natronobact. pharaonis* und *Halobact. salinarium* (je 140 L). Eine Testreihe zum Aufschluß von Mikroorganismen mit dem kontinuierlich arbeitenden Hochdruckhomogenisator **Microfluidizer** ergab: Bei Drucken von etwa 1000 Bar (14000 psi) wurden *E. coli* in einem Durchlauf zu >90 % und Hefe in 5 Durchläufen zu 95 % aufgeschlossen. Dieses Gerät wird ab Dezember zur allgemeinen Benutzung verfügbar sein.

#### 1. Projekt: Optimierung der Biotechnologie rekombinanter Mikroorganismen

Die Kontrolleinheiten der Fermenter Biostat B und C wurden mit verbesserter Software ausgerüstet, das Fermenter Kontrollsystem Micro/MFCS/DOS wurde durch MFCS/Win (auf Windows NT Basis) ersetzt. Dies bedeutet: Doppelte Kaskadenregelung für den pO<sub>2</sub>-stat Betrieb, verbessertes Management der Fermenter Controller durch MFCS und genügend Kapazität für die Programmierung von Fed Batch Verfahren.

#### 2. Projekt: FTIR-spektroskopische Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Hefe H<sup>+</sup>- und der SR Ca<sup>++</sup>-ATPase (EEC Research Project)

mit C. Ulbrich, K. Gerwert (Bochum), A. Troullier, I. Dupont (Grenoble)

Die Reaktionszyklen von P-ATPasen (E1/E2 ATPasen) lassen sich umkehren. Die Energie von Ionengradienten wird dabei in das chemische Potential von ATP umgewandelt. Der erste Schritt ist die Bildung von Enzym-aspartyl-PO<sub>4</sub>, die in einer hydrophoben Tasche des Enzyms in Gegenwart von Mg spontan erfolgt. Wir haben angefangen, diese Reaktion bei der SR Ca-ATPase FTIR spektroskopisch zu untersuchen, mit dem Ziel, die Bindungsverhältnisse der active site und ihre physikalisch chemische Struktur zu bestimmen. Um die Reaktion zu starten und um die IR-Differenzbanden eindeutig zuzuordnen zu können wurde caged-PO<sub>4</sub> und caged-P<sup>18</sup>O<sub>4</sub> synthetisiert. Die Versuche, die optimalen Bedingungen für die Experimente zu finden, sind noch nicht abgeschlossen. Da ein Random Bindungsmechanismus von Phosphat und Mg an das Enzym angenommen wird, wird in den komplementären Versuchen die Reaktion durch photolytische Freisetzung von Mg aus caged-Mg gestartet.

### General subject and duty

The requirements of the scientific departments for sterile media (6953 L) and agar plates (14067) for microbiological work as well as for the cultivation of recombinant *E. coli* (89 fermentor runs) were substantially higher than in the last year. *Natronobact. pharaonis* and *Halobact. salinarium* (140 L each) were cultivated in flasks with shakers. In a test series the disruption of microorganisms with the high pressure homogenizer **microfluidizer** was examined. At a pressure of approx. 1000 bar (14000 psi) *E. coli* was disrupted > 90 % in one run, yeast was disrupted 95 % in 5 runs. The microfluidizer will be available for general use in december.

#### 1st Project: Improvement of the biotechnology of recombinant microorganisms

The control units of the two fermentors Biostat B and C were equipped with improved software, the fermentor control system Micro/MFCS/DOS was replaced by MFCS/win. This means: twofold cascade control for running the fermentors in the pO<sub>2</sub>-stat mode, improved management of the fermentor controllers by MFCS and sufficient capacity for fed batch programming.

#### 2nd Project: FTIR spectroscopic investigation of the yeast H<sup>+</sup>- and the sr Ca<sup>++</sup>-ATPase (EEC Research Project)

C. Ulbrich, K. Gerwert (Bochum), A. Troullier, I. Dupont (Grenoble)

The reaction cycles of P-ATPasen (E1/E2-ATPasen) are reversible. This way the energy of ion gradients is transformed into the chemical potential of ATP. The first step in the reverse direction is the spontaneous formation of enzyme-asp-PO<sub>4</sub> in presence of Mg in a hydrophobic pocket of the enzyme. We have begun to study this reaction on the sr Ca-ATPase by FTIR spectroscopy with the aim to determine binding relations in the active site and to characterize its physico-chemical structure. In order to start the reaction and to assign IR-difference bands unequivocally, caged-PO<sub>4</sub> as well as caged-P<sup>18</sup>O<sub>4</sub> was synthesized. The test series to find the optimal experimental conditions is not yet finished. Because a random mechanism is assumed for binding of phosphate and Mg to the enzyme, the reaction is also started by photolytic liberation of Mg from caged-Mg.



## **ZE für Zellkultur und Immunologie**

Leiterin: Dr. F. Pietruschka

Mitarbeiter: D. Goehrke, A. Langerak

### **1) Polyklonale Antikörper**

Polyklonale Antikörper (PAK) wurden in Kaninchen produziert, einmal gegen ein C-terminales Fusionsprotein des Na-Ph-Transporters und gegen Peptide aus dem C-terminalen Bereich des Photorezeptors und des Transducers aus Halobakterien. Diese Peptide erwiesen sich als wenig immunogen. Da inzwischen die entsprechenden Proteine zur Verfügung stehen, sollen nun PAK gegen diese produziert werden. Wir machten PAK gegen APC und gegen ein Peptid aus der Sequenz von APC. Für Dr. A. Engels (MPI für Strahlenchemie) wurden Antikörper gewonnen gegen ein GST-gekoppeltes Polypeptid (DmRh1) aus dem Sehpigment von *Drosophila*. Außerdem machten wir PAK gegen Exopolysaccharide aus *Aspergillus flavus*.

### **2) Monoklonale Antikörper**

Es wurden monoklonale Antikörper (MAK) von Hybridomazellen gewonnen, die durch Fusion von Milzzellen aus immunisierten Mäusen und Myelomazellen (NSO-Zellen) entstanden waren. Dabei wurde unter anderem ein Projekt aus dem vergangenen Jahr, die Herstellung von MAK gegen  $\beta$ -Catenin, fortgesetzt. Diese Antikörper wurden außer im ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) in der Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten des menschlichen Darms getestet. Sie zeigten da eine Bindung an die laterale Zellmembran der Epithelzellen. Für dieselbe Arbeitsgruppe machen wir MAK gegen APC. Sie werden ebenfalls auf menschlichen Darmschnitten und auf HCT-Zellen, die das intakte Protein haben sollen, getestet. Außerdem machen wir Antikörper gegen ein Peptid aus der Sequenz von APC. Das Peptid koppelten wir, um es immunogen zu machen, vor der Immunisierung an kationisiertes BSA. Beide Projekte sind noch nicht abgeschlossen.

In Zusammenarbeit mit Dr. M. Lübben (Ruhr-Universität Bochum) wurden Antikörper gegen ein Cyo A-Fragment (Cytochromoxidase) gemacht. Es wurden Mak ausgewählt, die im ELISA eine hohe Extinktion hatten, aber im Westernblot keine oder nur geringe Bindung zeigten. Aus den entsprechenden Hybridomazellklonen sollen über die mRNA die Fv-Fragmente der Antikörper hergestellt werden zur Kokristallisation mit der Cytochromoxidase.

In Zusammenarbeit mit Dr. B. Scharf (Harvard University, Cambridge MA) wurden MAK gegen Che y hergestellt. Che y ist an der chemosensorischen Signaltransduktion von *E. coli* beteiligt.

Weiter werden MAK gegen die Bindungsdomäne von Gal4 aus Hefe gemacht. Die Antikörper sollen zum Expressionsnachweis dienen. Mäuse wurden immunisiert mit Ran Bp1, einem Bindungsprotein von Ran, und mit extrazellulären Polysacchariden aus *Aspergillus flavus*, um hier auch monoklonale Antikörper zu erhalten.

### **1) Polyclonal antibodies**

Polyclonal antibodies (Pab) were produced in rabbits against a c-terminal fusion protein of the Na-Ph-Transporter and against peptides from the c-terminal region of the photoreceptor and the transducer of halobacteria. With these peptides we yielded only a weak immune response. As meanwhile the corresponding proteins are expressed, Pab against them shall be produced. We made Pab against APC and against a peptide out of the sequence of APC. For Dr. A. Engels (MPI for Strahlenchemie) antibodies were raised against a GST-coupled polypeptide (DmRh1) from the visual pigment of *Drosophila*. Besides we made Pab against exopolysaccharides from *Aspergillus flavus*.

### **2) Monoclonal antibodies**

Monoclonal antibodies (Mab) were raised in hybridoma cells, which were grown out by fusion of spleen cells from immunized mice and myeloma cells (NSO-cells). One project from the last year was continued, the production of Mab against  $\beta$ -catenin. These antibodies were tested in the ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) and in immunofluorescence on frozen sections of the human colon. Here they showed a binding to lateral plasma membrane of the epithelial cells. For the same group we make Mab against APC. The peptide was coupled to cationized BSA before immunization to yield an enhanced immune response. Both projects are not yet concluded.

In cooperation with Dr. M. Lübben (Ruhr-Universität Bochum) antibodies were made against a Cyo A-fragment (cytochromoxidase). Mab were chosen, which had a high extinction in the ELISA, but showed no or little binding in the western blot. From the corresponding hybridoma clones and their mRNA the F<sub>v</sub> fragments of the antibodies are supposed to be prepared for cocrystallization with cytochromoxidase.

In cooperation with Dr. B. Scharf (Harvard University, Cambridge MA) Mab against Che y were produced. Che y is involved in the chemosensory signal transduction in *Escherichia coli*.

Furthermore Mab are made against the binding domain of Gal4 from yeast. With these antibodies the expression of the protein shall be proved. Mice were immunized with Ran Bp1, a protein that binds to Ran, and with extracellular polysaccharides from *Aspergillus flavus* to get monoclonal antibodies, too.

## **ZE EDV**

Leiter: Dr. Th. Plesser

Mitarbeiter: H. Billich, B. Brennecke, H.-J. Deymann, K. Dreher, J. Huber, H. Kritzler, G. Siedenberg, L. Teckhaus

Die Zentrale Einheit EDV betreut im Institut das lokale Netz (LAN) mit allen angeschlossenen DV Komponenten, die Online-Labordatenerfassung der Arbeitsgruppen und die internationale Konnektivität. Das LAN ist über das WiN (Wissenschaftsnetz des DFN Vereins) mit allen wissenschaftlichen Netzen der Welt verbunden. In den Netzen stehen lokal, d.h. im Institut, und weltweit verschiedene Dienste (Services) auf Rechnern, sogenannten Servern, zur Verfügung.

Beispiele für Services sind: Programmbibliotheken, Datenbasen, Infosysteme, e-Mail, News, Fax, Drucken, Rechenleistung, Online-Labordatenerfassung, usw.. Im lokalen Netz werden die meisten Services durch SUN Workstations erbracht.

Die Services können mit Hilfe von sogenannten Clients in Anspruch genommen werden. Clients sind Rechner am Arbeitsplatz, die spezifische Softwarekomponenten für das Zusammenspiel mit den verschiedenen Services enthalten. Zur Zeit werden Rechner mit den Betriebssystemen UNIX, MS-DOS/Windows und MacOS als Clients eingesetzt.

Das Netz, die Rechnerbasis und die Services werden von den Mitarbeitern der ZE-EDV konzeptionell entwickelt, installiert und betreut. Im Jahre 1996 ist das LAN besonders stark im Bereich der PC und grafischen Workstations gewachsen.

Es sind ca. 150 Nutzer registriert, deren Daten etwa 100 GB Plattenspeicher belegen. Zur Sicherung der Datenbestände wurde ein vollautomatisches Backup-System mit 48 DLT Tapes und 2 Leseinheiten installiert. Inkrementelle Backups aller Filesysteme im Netzwerk werden nachts durchgeführt. Ein Backup des gesamten Bestandes wird einmal im Monat an einem Wochenende gefahren.

Die große Zahl der Rechner und der wachsende Datenbestand haben eine teilweise Umstellung des Netzes von 10 Mbit/s auf 100 Mbit/s notwendig gemacht. Im Zuge dieser Beschleunigung wurde das Netz mit schnellen Switches nach den Regeln der strukturierten Verkabelung neu konfiguriert.

Weitere Informationen finden sich auf dem IWW (Institut Wide Web) Server.

The 'Zentrale Einheit EDV' manages the local network (LAN) of the institute with the integrated computers, the other equipment for data processing and data acquisition and the international connectivity to wide area networks as well. The LAN has a gateway to the WiN, the German scientific network, which is connected with most other scientific networks world wide. The networks provide the scientists in the institute with a large number of services offered on servers around the world.

Examples of Services :

Program libraries, Databases, Infosystems, e-Mail, News, Fax, Printing, Computing Power, Online-Data Acquisition, etc. Most of the local services run on SUN workstations.

A client is a necessary prerequisite to make use of the services. Clients are desktop computers equipped with specific software for the complex client server interaction. Today we use desktop computers with the operating systems UNIX, MS-DOS/Windows and MacOS as clients.

The local network, the computer resources and the various services are planned, installed and maintained by the staff of the ZE-EDV. In 1996 the LAN expands especially with respect to the number of PC and graphics workstations.

150 users are registered in the network information system. The ZE-EDV administrates for the user about 100 GB of disk memory. An automatic backup system with 48 DLT tapes and two reading units was introduced in order to be able to recover the data in any case of disk crash or similar events. Incremental backups of all filesystems in the network are done every night and total backups once per month over a weekend.

The increasing number of computers and of the amount of data made it necessary to speed up the network backbone from 10 to 100 Mbit/s. At the same time FastEthernet Switches coupled with a redesign of the network have been installed.

Further information is available on the IWW (Institute Wide Web) server.

## **ZE Synthese und Sequenzierung**

Leiter PD Dr. H.-J. Wieker

Mitarbeiter: Dr. J. Block, W. Hecker, K.-H. Wüster

### **Protein-Sequenzierung:**

Obgleich 1996 die Zusammenarbeit mit Arbeitsgruppen der Ruhr-Universität Bochum und der Uni/GSH Essen nur noch 14 % der Sequenzierungen ausmachte, wurde die Zahl der Sequenzierungen gegenüber 1995 um 40 % gesteigert: Für 143 Sequenzierungen wurden 2.012 Abbauschritte analysiert, hochgerechnet auf das ganze Berichtsjahr.

### **Oligonucleotid-Synthese:**

In der ersten Jahreshälfte wurden die Oligo-Synthesen noch mit dem Oligo 1000, danach mit dem Oligo 1000M, einem 8-Säulen-Gerät, durchgeführt. Die Oligonucleotide wurden über NAP-Säulen gereinigt, bei besonderen Anforderungen auch mittels HPLC, und die meisten Oligos wurden mittels analytischer HPLC kontrolliert. Hochgerechnet auf das ganze Berichtsjahr wurden 750 Oligos mit 21.000 Basen synthetisiert; das entspricht einer Steigerung um 40 % gegenüber 1995.

### **DNA-Sequenzierung:**

Die DNA-Sequenzierungen wurden mit einem ABI Model 373 im Cycle-Sequencing nach der Dye-Terminator-Methode mit Taq-Polymerase und fluoreszenzmarkierten Dideoxynucleotiden durchgeführt. Je nach Qualität der gelieferten Proben können mehr als 600 Basen gelesen werden. Die von uns ermittelten Sequenzen werden so aufbereitet, daß sie vom User direkt aus dem Datennetz übernommen werden können. Hochgerechnet auf das ganze Berichtsjahr wurden auf 130 Gelen 4.000 Sequenzierungen durchgeführt.

### **Molekularbiologische Software:**

58 Benutzer im Institut konnten 1996 mit der Version 8.1 des „Wisconsin Sequence Analysis Package (GCG)“ und der Erweiterung „Extended GCG (EGCG) 8.1“ arbeiten. Programme und Datenbanken befinden sich nun auf einer eigenen 9 Gbyte Festplatte. Seit November 1996 wird als Server die Maschine „cs“ eingesetzt, die die Programme schneller als die „gcg“ ausführt. Die entsprechenden Umstellungen wurden bei allen Benutzern vorgenommen. Nach wie vor haben Interessenten Zugriff auf die zusätzlichen, schon im Arbeitsbericht 1995 genannten UNIX-Programme: „Genetic Data Environment (GDE)“, „ShadyBox“, „Showprint“, „Nentrez“, „ASCDB“ u.a. Diese Programme werden ständig auf den neuesten Stand gebracht.

### **Protein Sequencing:**

Although the collaboration with colleagues from the Ruhr-Universität Bochum and from the Uni/GSH Essen decreased to only 14 %, the total number of sequences increased by 40 %: For the determination of 143 sequences it was necessary to analyse 2,012 reaction cycles (calculated for the whole year).

### **Oligonucleotide Synthesis:**

During the first half-year the oligonucleotides were synthesized on an Oligo 1000, then on an Oligo 1000 M with 8 columns. The oligonucleotides were purified on NAP Columns, in special cases by HPLC, and the quality was controlled by analytical HPLC. Calculated for the whole year, 750 oligonucleotides with 21,000 bases were synthesized, i.e. 40 % more than in 1995.

### **DNA-Sequencing:**

Using an ABI Model 373, DNA sequencing was performed as cycle sequencing according to the dye terminator method, using Taq Polymerase and dideoxynucleotides labeled with fluorescent dyes. Depending on the quality of the samples, more than 600 bases can be read. The sequences identified by us are directly transferred to the user via data net. Calculated for the whole year, 4,000 sequences were analysed, using 130 gels.

### **Software for Molecular Biology:**

58 users in our institute are registered to use version 8.1 of the „Wisconsin Sequence Analysis Package (GCG)“ including the extension „Extended GCG (EGCG) 8.1“. Programs and data bases are now being stored on a 9 GB hard disk. Since November 1996 programs are executed by the new server „cs“ which performs faster than the machine „gcg“. Accompanying this change the setups for all users had to be brought up-to-date. As in previous years, interested users have access to additional UNIX-programs, already mentioned in the report for 1995, i.e. „Genetic Data Environment (GDE)“, „Shady Box“, „Showprint“, „Nentrez“, „ASCDB“, and others. These programs are going to be updated constantly.

## Glastechnik

D. Seiler

Es wurden in der Glastechnik auf Grund der fortschreitenden wissenschaftlichen Aufgabenstellung Glasapparaturen und spezielle Glasgeräte wie folgt im einzelnen hergestellt:

**AG Prof. Wittinghofer:** Gelelektrophorese Scheiben  
**AG Dr. Ahmadian:** Glasplattenaufsätze  
**AG Dr. Herrmann:** Waschflaschenaufsätze  
**AG Dr. Becker:** Ansaugschliffaufsätze, Gelelektrophorese Scheiben  
**AG Dr. Kuhlmann:** Filterplatten, Neutralfilter für Küvetten  
**AG Dr. Müller:** Dreiwege Ventile, Gelelektrophorese Scheiben  
**AG Dr. Vetter:** Glassäulen  
**AG Prof. Kinne:** Glasbifurcation Y-Stück  
**AG Dr. Kinne-Saffran:** Mantelgefäße mit Fritteneinsätzen  
**AG Dr. Lin:** Kühlfallen, Gelelektrophorese Scheiben klein und groß, Drygalski-Spatel  
**AG Dr. Wehner:** Ringkammern aus Quarz, Leitungssysteme, 1 Kanal und 6 Kanal Kühler, Glasfilter, Abdeckungen für Glaslunge, Mikro-T Stücke  
**AG Dr. Werner:** Gelelektrophorese Scheiben  
**AG Prof. Goody:** Gelelektrophorese Scheiben  
**AG Dr. Geeves:** Quarzglas-Miniaturküvetten, Optische Filter (rund)  
**AG Dr. Weinhold:** Tieftemperaturreaktionsgefäß, Destillationsbrücken, Kühlfinger, Kühlfallen, Argon T-Stücke, Halsspitzkolben 3 ml, Übergangsstücke, Chromatographie-Säulen  
**AG Dr. Seidel:** Schikanekolben  
**AG Dr. Reinstein:** Spezielle Druckschlenk-Gefäße, Schikanekolben, Gelelektrophorese Scheiben, Kühlfallen  
**AG Dr. Restle:** Glasplatten  
**AG Dr. Schlichting:** Glasreaktionsgefäße mit Ventilen, Glassäulen, Schikanekolben, Fritteneinsätze mit Lochbohrungen, Retorten, Gelelektrophorese Scheiben  
**AG Dr. Wöhr:** Kapilar-Säulen mit Konus innen, Schikanekolben  
**AG Dr. Scheidig:** Mikrodestillationsbrücken, Optische Filter (rund), Gelelektrophorese Scheiben  
**ZE H. Baumgärtl:** Schlaufenreaktor, spezielle Kapilar-Steigröhren  
**ZE Dr. Wieker:** Spezialkühlfallen mit Mehrwegeventil  
**ZE Dr. Kuschmitz:** CaF<sub>2</sub> Fenster mit Nut-Fräsung, Schliffhähne, Übergangsstücke  
**ZE R. Bartkewitz:** Hochleistungskühler  
**AG Prof. Lübbers:** Spezial-Waschflasche, Steigrohre, Mehrwegeventile für Floxmeßgerät  
**AG Prof. Acker:** Mikro-Ringe für Krebszellen  
**AG Prof. Müller:** Glaskammer Platten  
**AG Dr. Delpiano:** Filter für Superfusionsanlage, Umbau der Superfusionsanlage  
**AG Dr. Markus:** Ring-Meßschalen  
Krebsforschung Dr. Ahmadian: Gelelektrophorese-Scheiben

Due to the progressing scientific task in the field of glass engineering, glass appliances and special glass devices have been manufactured in particular as follows:

**working group Prof. Wittinghofer:** gel electrophoresis plates  
**working group Dr. Ahmadian:** glass plates attachments  
**working group Dr. Herrmann:** washing bottles attachments  
**working group Dr. Becker:** induction ground glass attachments, gel electrophoresis plates  
**working group Dr. Kuhlmann:** filter plates, neutral filters for cuvettes  
**working group Dr. Müller:** three-way valves, gel electrophoresis plates  
**working group Dr. Vetter:** glass columns  
**working group Prof. Kinne:** glass bifurcation y-fragment  
**working group Dr. Kinne-Saffran:** ----- with frit attachments  
**working group Dr. Lin:** cooling traps, gel electrophoresis plates small and large, drygalski-spatula  
**working group Dr. Wehner:** doughnut out of quartz, wiring system, 1-channel and 6-channel condenser, glass filter, coverings for glass lung, micro-T-parts  
**working group Dr. Werner:** gel electrophoresis plates  
**working group Prof. Goody:** gel electrophoresis plates  
**working group Dr. Geeves:** quartz glass-miniature cuvettes, optical filter (spherical)  
**working group Dr. Weinhold:** low-temperature reaction vessel, distillation bridges, cooling finger, cooling traps, argon T-fragments, ----- 3 ml, fillet wings, chromatography columns  
**working group Dr. Seidel:** trap pistons  
**working group Dr. Reinstein:** special -----vessels, trap pistons, gel electrophoresis plates, cooling traps  
**working group Dr. Restle:** glass plates  
**working group Dr. Schlichting:** glass reaction vessels with valves, glass columns, trap pistons, frit ---- with augerings, retorts, gel electrophoresis plates  
**working group Dr. Wöhr:** capillary columns with cone inside, trap pistons  
**working group Dr. Scheidig:** micro distillation bridges, optical filter (spherical) gel electrophoresis plates  
**ZE H. Baumgärtl:** -----, special capillary-----  
**ZE Dr. Wieker:** special cooling traps with multipath valve  
**ZE Dr. Kuschmitz:** CaF<sub>2</sub> window with fluting, ground glass taps (?), fillet wings  
**ZE R. Bartkewitz:** high-power condenser  
**working group Prof. Lübbers:** special washing bottle, lifting tube, multipath valves for flox-measuring-device  
**working group Prof. Acker:** micro-rings for cancer cells  
**working group Prof. Müller:** glass chamber plates  
**working group Dr. Delpiano:** filter for superfusion system/control  
**working group Dr. Markus:** ring-measuring dishes

**Liste der Publikationen**  
**List of publications**

**1. 1996 erschienene oder im Druck befindliche Originalarbeiten in referierten Zeitschriften (ohne Abstracts)**  
**1. Publications in refereed journals, published in 1996 or presently in press (no meeting abstracts)**

**Abteilung I: Strukturelle Biologie (Prof. Dr. A. Wittinghofer)**

- M.R. Ahmadian, L. Wiesmüller, A. Lautwein, F.R. Bischoff, A. Wittinghofer:  
„Structural Differences in the Minimal Catalytic Domains of the GTPase-Activating Proteins p120<sup>GAP</sup> and Neurofibromin“  
J. Biol. Chem. **271**: 16409-16415 (1996)
- Y. Azuma, H. Seino, T. Seki, S. Uzawa, C. Klebe, T. Ohba, A. Wittinghofer, N.k Hayashi, T. Nishimoto:  
„Conserved histidine residues of RCC1 are essential for nucleotide exchange on Ran“  
J. Biochem. **120**: 82-91 (1996)
- J. Becker, W. Walter, W. Yan, E.A. Craig:  
„Functional interaction of cytosolic hsp70 and a DbpA-related protein, Ydj1p, in protein translocation in vivo“  
Mol. Cell. Biol. **16**: 4378-4386 (1996)
- M. Beissinger, C. Paulus, P. Bayer, H. Wolf, P. Rösch, R. Wagner:  
„Sequence-specific resonance assignments of the <sup>1</sup>H-NMR spectra and structural characterization in solution of the HIV-1 transframe protein p6“  
Eur. J. Biochem. **237**: 383-392 (1996)
- C. Block, R. Janknecht, C. Herrmann, N. Nassar, A. Wittinghofer:  
„Quantitative structure-activity analysis correlating Ras/Raf interaction *in vitro* to Raf activation *in vivo*“  
Nature Struct. Biol. **3**: 244-251 (1996)
- G.D. Borasio, A. Markus, R. Heumann, C. Chezzi, A. Sampietro, A. Wittinghofer, V. Silani:  
„Ras p21 protein promotes survival and differentiation of human embryonic neural crest-derived cells“  
Neuroscience **73**: 1121-1127 (1996)
- R. Cetin, I.M. Krab, P.H. Anborgh, R.H. Cool, T. Watanabe, T. Sugiyama, K. Izaki, A. Parmeggiani:  
„Encyloxin IIa: an inhibitor of protein biosynthesis that acts on elongation factor Tu and the ribosome“  
EMBO J. **15**: 2604-2611 (1996)
- R. Deuter, J. Linz, S. Pietsch, G. Winde, S. Hentsch, O. Müller:  
„DNA alterations in sporadic colorectal tumors do not correlate with tumor staging diagnosed by the TNM system“  
Cancer Letters (in press)
- M. Geyer, T. Schweins, C. Herrmann, T. Prisner, A. Wittinghofer, H.R. Kalbitzer:  
„Conformational transitions in free p21<sup>H-ras</sup> and in p21<sup>H-ras</sup> complexed with the effector protein Raf-RBD and the GTPase activating protein GAP“  
Biochemistry **35**: 10308-10320 (1996)
- C. Herrmann, G. Horn, M. Spaargaren, A. Wittinghofer:  
„Differential interaction of the Ras family GTP-binding proteins H-Ras, Rap1A and R-Ras with the putative effector molecules Raf-kinase and Ral-Guanine nucleotide exchange factor“  
J. Biol. Chem. **271**: 6794-6800 (1996)
- D. Hirschl, P. Bayer, O. Müller:  
„Secondary structure of an armadillo single repeat from the APC protein“  
FEBS Letters **383**: 31-36 (1996)
- F. McCormick, A. Wittinghofer:  
„Interactions between Ras proteins and their effectors“  
Current Opinion in Biotechnology **7**: 449-456 (1996)
- R. Mittal, M.R. Ahmadian, R.S. Goody, A. Wittinghofer:  
Formation of a transition state analog of the Ras GTPase reaction by Ras•GDP, tetrafluoroaluminate and GTPase-activating proteins“  
Science **273**: 115-117 (1996)
- N. Nassar, G. Horn, C. Herrmann, C. Block, R. Janknecht, A. Wittinghofer:  
„Ras/Rap effector specificity determined by charge reversal“  
Nature Struct. Biol. **3**: 723-729 (1996)
- N. Opitz, T. Porwol, E. Merten, H. Acker:  
„Problems encountered in cytoplasmic Ca<sup>2+</sup>-measurements of human melanoma cells using the Ca<sup>2+</sup>-sensitive fluoroprobe FURA-RED“  
Eur. Biophysics J. (submitted)
- T. Porwol, E. Merten, N. Opitz, H. Acker:  
„3D imaging of Rhodamine 123 fluorescence distribution in human melanoma cells by means of confocal laser scanning microscopy“  
Acta Anatomica (in press)

- K. Scheffzek, W. Kliche, L. Wiesmüller, J. Reinstein:  
„Crystal structure of the complex of UMP/CMP kinase from *Dictyostelium discoideum* and the bisubstrate inhibitor  $P^1$ -(5'-adenosyl)  $P^5$ -(5'-uridylyl) pentaphosphate ( $UP_5A$ ) and  $Mg^{2+}$  at 2.2 Å: Implications for water-mediated specificity“  
*Biochemistry* 35: 9716-9727 (1996)
- K. Scheffzek, A. Lautwein, W. Kabsch, M.R. Ahmadian, A. Wittinghofer:  
„Crystal structure of the GTPase-activating domain of human p120GAP and implications for the interaction with Ras“  
*Nature* 384: 591-596 (1996)
- G. Schmidt, Ch. Lenzen, I. Simon, R. Deuter, R.H. Cool, R.S. Goody, A. Wittinghofer:  
„Biochemical and biological consequences of changing the specificity of p21ras from guanosine to xanthosine nucleotides“  
*Oncogene* 12: 87-96 (1996)
- T. Schweins, M. Geyer, H.R. Kalbitzer, A. Wittinghofer, A. Warshel:  
„Linear free energy relationships in the intrinsic and GAP activating protein-stimulated guanosine 5'-triphosphate hydrolysis of p21<sup>ras</sup>“  
*Biochemistry* 35: 14225-14231 (1996)
- T. Schweins, K. Scheffzek, R. Abheuer, A. Wittinghofer:  
„The role of the metal ion in the p21<sup>ras</sup> catalyzed GTP-hydrolysis:  $Mn^{2+}$  versus  $Mg^{2+}$ “  
*Journal of Molecular Biology* (in press)
- T. Schweins, A. Warshel:  
„Mechanistic analysis of the observed linear free energy relationships in p21<sup>ras</sup> and related systems“  
*Biochemistry* 35: 14232-14243 (1996)
- I.R. Vetter, W.A. Baase, D.W. Heinz, J.-P. Xiong, S. Snow:  
„Protein Structural Plasticity Exemplified by Insertion and Deletion Mutants in T4 Lysozyme“  
*Protein Science* (in press)
- G. Winde, K.W. Schmid, B Brandt, O. Müller, H. Osswald:  
„Clinical and genomic influence of sulindac on rectal mucosa in familial adenomatous polyposis (FAP)“  
*Diseases of the Colon & Rectum* 39 (in press)
- A. Wittinghofer:  
„Deciphering the alphabet of G proteins: The structure of the  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  heterotrimer“  
*Structure* 4: 357-361 (1996)
- A. Wittinghofer, N. Nassar:  
„How Ras-related proteins talk to their effectors“  
*TIBS* 21: 488-491 (1996)
- R.M.F. Wolthuis, B. Bauer, L.J. Van't Veer, A.M.M. De Vries-Smits, R.H. Cool, M. Spaargaren, A. Wittinghofer, B.M.T. Burgering, J.L. Bos:  
„Ral GDS-like factor (Rlf) is a novel Ras and Rap1A associating protein“  
*Oncogene* 13, 353-362 (1996)

#### **Abteilung II: Epithelphysiologie (Prof. Dr. R.K.H. Kinne)**

- B. Bechinger:  
„Towards Membrane Protein Design: pH-sensitive Topology of Histidine-containing Polypeptides“  
*J. Mol. Biol.* 263: 768-775 (1996)
- S.H. Boese, F. Wehner, R.K.H. Kinne:  
„Taurine permeation through swelling-activated anion conductance in rat IMCD cells in primary culture“  
*Am. J. Physiol.* 271: F498-F507 (1996)
- S.H. Boese, R.K.H. Kinne, F. Wehner:  
„Single-channel properties of swelling-activated anion conductance in rat inner medullary collecting duct cells“  
*Am. J. Physiol.* 271: F1224-F1233 (1996)
- L.M. Dinkelborg, R.K.H. Kinne, M.K. Grieshaber:  
„Transport and metabolism of L-glutamate during oxygenation, anoxia, and reoxygenation of rat cardiac myocytes“  
*Am. J. Physiol.* 270: H1825-H1832 (1996)
- C.A. Freire, R.K.H. Kinne, E. Kinne-Saffran, K.W. Beyenbach:  
„Electrodiffusive transport of Mg across renal membrane vesicles of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*“  
*Am. J. Physiol.* 270: F739-F748 (1996)
- H. Kipp, J.-T. Lin, R.K.H. Kinne:  
„Interactions of alkylglucosides with the renal sodium/D-glucose cotransporter“  
*Biochim. Biophys. Acta* 1282: 124-130 (1996)

- H. Kipp, R.K.H. Kinne, J.-T. Lin:  
„Synthesis of the photoaffinity label [ $1'$ - $^{14}$ C]-6C-(azimethyl)octylglucoside and its reaction with isolated renal brush border membranes“  
Analyt. Biochem. (in press)
- B. Kohl, P. Herter, B. Hülseweh, M. Elger, H. Hentschel, R.K.H. Kinne, A. Werner:  
„Na-P<sub>i</sub> cotransport in flounder: same transport system in kidney and intestine“  
Am. J. Physiol. **270**: F937-F944 (1996)
- S. Lambotte, M. Veyhl, M. Köhler, A.I. Morrison-Shetlar, R.K.H. Kinne, H. Koepsell:  
„The human gene of a protein that modifies Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransport“  
DNA and Cell Biol. **15**: 769-777 (1996)
- E. Okamoto, R.K.H. Kinne, J. Sökeland:  
„Interferons modify in vitro proliferation of human bladder transitional cell carcinoma in the presence of doxorubicin“  
J. Urol. **156**: 1492-1495 (1996)
- B. Ruhfus, H.G. Bauernschmitt, R.K.H. Kinne:  
„Properties of a polarized primary culture from rat renal inner medullary collecting duct (IMCD) cells“  
In Vitro Cell. & Dev. Biol. (in press)
- B. Ruhfus, R.K.H. Kinne:  
„Hypotonicity-activated efflux of taurine and myoinositol in rat inner medullary collecting duct cells: Evidence for a major common pathway“  
Kidney Blood Press. Res. **19**: 317-324 (1996)
- B. Ruhfus, H. Tinel, R.K.H. Kinne:  
„Role of G-proteins in the regulation of organic osmolyte efflux from isolated rat renal inner medullary collecting duct cells“  
Pflügers Arch. **433**: 35-41 (1996)
- H. Tinel, F. Wehner, R.K.H. Kinne:  
„Arachidonic acid as second messenger for hypotonicity-induced calcium transients in rat IMCD cells“  
Pflügers Arch. (in press)
- F. Wehner, R.K.H. Kinne, E. Petzinger:  
„Second International Ringberg Conference: „Cell Biology and Molecular Basis of Liver Transport““  
Hepatology **24**: 259-267 (1996)
- A. Wessing, K. Zierold:  
„The importance of the Golgi complex for epithelial ion transport in *Drosophila* Malpighian tubules, studied by electron microscopy, cytochemistry and X-ray microanalysis“  
Eur. J. Cell Biol. **69**: 116-127 (1996)
- A. Wessing, K. Zierold, G. Bertram:  
„Carbonic anhydrase supports electrolyte transport in *Drosophila* Malpighian tubules. Evidence by X-ray microanalysis of freeze-dried cryosections“  
J. Insect Physiol. (in press)
- H.-P. Wiesmann, U. Plate, K. Zierold, H.J. Höhling:  
„Potassium is involved in apatite biomineralization“  
J. Dental Res. (in press)
- H.-P. Wiesmann, T. Tkotz, U. Joos, K. Zierold, U. Stratmann, T. Szuwart, U. Plate, H.J. Höhling:  
„Magnesium in early dentine mineral of rat incisor“  
Bone Mineral Res. (in press)
- L.B. Zimmerhackl, K. Rostasy, G. Wiegele, A. Rasenack, C. Wilhelm, M. Lohner, M. Brandis, R.K.H. Kinne:  
„Tamm-Horsfall protein as a marker of tubular maturation“  
Pediatr. Nephrol. **10**: 448-452 (1996)

**Abteilung III:** Physikalische Biochemie (Prof. Dr. R.S. Goody)

- M.R. Ahmadian, U. Hoffmann, R.S. Goody, A. Wittinghofer:  
„Individual rate constants for the interaction of Ras proteins with GTPase-activating proteins determined by fluorescence spectroscopy“  
Biochemistry (in press)
- I. Angert, C. Burmester, C. Dinges, H. Rose, R.R. Schröder:  
„Elastic and inelastic scattering cross-sections of amorphous layers of carbon and vitrified ice“  
Ultramicroscopy **63**: 181-192 (1996)
- M. Anson, S.E. Kurzawa, M.A. Geeves & D.J. Manstein:  
„Myosin motors with artificial lever arms“  
EMBO J. **15**: 6069-6074 (1996)

- E.J. Arts, S.R. Stetor, X. Li, J.W. Rausch, K.J. Howard, B. Ehresmann, T.W. North, B. Wöhrl, R.S. Goody, M.A. Wainberg, S.F.J. LeGrice:  
„Initiation of (-) strand DNA synthesis from tRNA<sup>Lys,3</sup> on lentiviral RNAs: Implications of specific HIV-1 RNA-tRNA<sup>Lys,3</sup> interactions inhibiting primer utilization by retroviral reverse transcriptases“  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 10063-10068 (1996)
- P. Bayer, D. Klostermeier:  
„Spectroscopic investigations of HIV-1 tat and related peptides in aqueous solution“  
Biophysical Chemistry (in press)
- S. Benner, T. Jermann, J. Opitz, S. Raillard, T. Zankel, K. Trautwein-Fritz, J. Stackhouse, M. Ciglic, M. Haugg, N. Trabesinger-Rüf, E. Weinhold:  
"Developing new synthetic catalysts. How nature does it"  
*Acta Chemica Scandinavica* **50**: 243-248 (1996)
- I. Chizhov, D. Chernavskii, M. Engelhard, K.-H. Müller, B.V. Zubov, B. Hess:  
„Spectrally silent transitions in the Bacteriorhodopsin Photocycle“  
Biophysical Journal **71**: 2329-2345 (1996)
- M. Engelhard, S. Finkler, G. Metz, F. Siebert:  
„Solid-state <sup>13</sup>C-NMR of [(3-<sup>13</sup>C)Pro]bacteriorhodopsin and [(4-<sup>13</sup>C)Pro]bacteriorhodopsin: Evidence for a flexible segment of the C-terminal tail“  
Eur. J. Biochem. **391**: 1-8 (1996)
- M. Engelhard, B. Scharf, F. Siebert:  
„Protonation changes during the photocycle of sensory rhodopsin II from *Natronobacterium pharaonis*“  
FEBS Letters **395**: 195-198 (1996)
- R.S. Goody:  
„Motor proteins. A two-way structure“  
Nature Medicine **380**: 483-484 (1996)
- M.S. Hasson, I. Schlichting, M.M. McGowen, E.M. Woolridge, J.W. Kozarich, G.A. Petsker, D. Ringe:  
„Characterization of two Crystal Forms of 3-Carboxy-cis-cis-muconate Lactonizing Enzyme from *Pseudomonas putida*“  
Acta Cryst. D (in press)
- U. Jakob, T. Scheibel, S. Bose, J. Reinstein, J. Buchner:  
„Assessment of the ATP binding properties of Hsp90.“  
J. Biol. chem. **271**: 10035-10041 (1996)
- E.M. Jacoby, I. Schlichting, W. Kabsch, C.B. Lanturs, L. Krauth-Siegel:  
„Crystal Structure of T. Cruzi trypanosome reductase mepacrine complex at 2.9 Å resolution“  
Proteins **24**, 73-81 (1996)
- S.E. Kurzawa, M.A. Geeves:  
„A novel stopped flow method for measuring the affinity of actin for myosin head fragments using µg quantities of proteins“  
J. Muscle Res. & Cell Motil. **17**: 669-676 (1996)
- S.E. Kurzawa, D.J. Manstein, M.A. Geeves:  
„Dictyostelium discoidium myosin II: Characterisation of functional myosin motor fragments“  
Biochem. (in press)
- M. Mcguire, L.J. Carroll, L. Yankie, S.H. Thrall, D. Dunawaymariano, O. Herzberg, B. Jayaram, B.H. Haley:  
„Determination of the nucleotide binding site within clostridium symbiosum pyruvate phosphate dikinase by photoaffinity labeling, site-directed mutagenesis and structural analysis“  
Biochemistry **35 (26)**: 8544-8552 (1996)
- R. Mittal, M.R.Ahmadian, R.S. Goody, A. Wittinghofer:  
„Formation of a transition state analog of the Ras GTPase reaction by Ras.DGP, tetrafluoroaluminate and GTPase-activating proteins“  
Science **273**: 115-117 (1996)
- C.W. Müller, G.J. Schlauderer, J. Reinstein, G.E. Schulz:  
„Adenylate kinase motions during catalysis - an energetic counterweight balancing substrate-binding“  
Structure **4**: 147-156 (1996)
- S. Neuhofen, H. Theysen, J. Reinstein, W.E. Trommer, P.D. Vogel:  
„Nucleotide Binding to the Heat Shock Protein DnaK as Studied by ESR Spectroscopy“  
Eur. J. Biochem. **240**: 78-82 (1996)
- H. Pélicano, G. Divita, A. Elalaoui, T. Daiboun, M. Shafiee, G. Maury, R.S. Goody, J.-L. Imbach:  
„Ligand binding properties of bovine liver adenosine kinase“  
Nucleosides & Nucleotide **14**: 473-476 (1996)
- H. Pélicano, G. Maury, A. Elalaoui, M. Shafiee, J.-L. Imbach, R.S. Goody, G. Divita:  
„Substrate binding properties and inhibition of bovine liver adenosine kinase“  
Eur. J. Biochem. (in press)



- J.R. Rausch, E.J. Arts, B.M. Wöhrl, S.F.J. Le Grice:  
„Involvement of C-terminal structural elements of Equine Infectious Anemia Virus Reverse Transcriptase in DNA polymerase and ribonuclease H activities“  
*J. Mol. Biol.* **257**: 500-511 (1996)
- S.U. Reiffert, K. Jaquet, L.M.G. Heilmeyer, Jr., M.D. Ritchie & M.A. Geeves:  
„Bisphosphorylation of cardiac troponin I regulates Ca<sup>2+</sup>-dependent binding of myosin subfragment S1 to reconstituted thin filaments“  
*FEBS Lett.* **384**: 43-47 (1996)
- K. Rittinger, D. Negre, G. Divita, M. Scarabel, C. Bonod-Bidaud, R.S. Goody, A.J. Cozzone, J.-C. Cortay:  
„*Escherichia coli* isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase: overproduction and kinetics of interaction with its substrates by using intrinsic fluorescence and fluorescent nucleotide analogues“  
*Eur. J. Biochem.* **237**: 247-254 (1996)
- V. Rybin, O. Ullrich, M. Rubino, K. Alexandrov, I. Simon, M.C. Seabra, R.S. Goody, M. Zerial:  
„GTPase activity of Rab5 acts as a timer for endocytic membrane fusion“  
*Nature* **383**: 266-269 (1996)
- B. Scharf, R. Wittenberg, M. Engelhard:  
„Electron transfer proteins from the haloalkaliphilic Archaea *Natronobacterium pharaonis*: Possible components of the respiratory chain include cytochrom bc and a terminal oxidase cytochrome ba<sub>3</sub>“  
*Biochemistry* 1996 (in press)
- K. Scheffzek, W. Kliche, L. Wiesmüller, J. Reinstein:  
„Crystal structure of the complex of UMP/CMP Kinase from *Dictyostelium discoideum* and the bisubstrate inhibitor P<sup>1</sup>-(5'-Adenosyl) P<sup>5</sup>-(5'-Uridyl) Pentaphosphate (UP<sub>5</sub>A) and Mg<sup>2+</sup> at 2.2 Å: Implication for water-mediated specificity“  
*Biochemistry* **35**: 9716-9727 (1996)
- G. Schluckebier, M. Kozak, N. Bleimling, E. Weinhold, W. Saenger:  
"Differential binding of *S*-adenosylmethionine, *S*-adenosylhomocysteine and sinefungin to the adenine-specific DNA methyltransferase *M.TaqI*"  
*J. Mol. Biol.* (in press)
- G. Schmidt, C. Lenzen, I. Simon, R. Deuter, R.H. Cool, R.S. Goody, A. Wittinghofer:  
„Biochemical and biological consequences of changing the specificity of p21<sup>ras</sup> from guanosine to xanthosine nucleotides“  
*Oncogene* **12**: 87-96 (1996)
- I. Simon, M. Zerial, R.S. Goody:  
„Kinetics of interaction of Rab5 and Rab7 with nucleotides and magnesium ions“  
*J. Biol. Chem.* **271**: 20470-20478 (1996)
- H. Theyssen, H.-P. Schuster, L. Packschies, B. Bukau, J. Reinstein:  
„The Second Step of ATP Binding to DnaK Induces Peptide Release“  
*J. Mol. Biol.* **263**: 657-670 (1996)
- S. Thrall, J. Reinstein, B. Wöhrl, R.S. Goody:  
„Evaluation of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase primer tRNA binding by fluorescence spectroscopy: specificity and comparison to primer/template binding“  
*Biochemistry* **35**: 4609-4618 (1996)
- F. Vawda, K.W. Ranatunga & M.A. Geeves:  
„Effects of hydrostatic pressure on fatiguing muscle fibres“  
*J. Muscle Res. & Cell Motil.* **17**: 631-636 (1996)
- R. Wittenberg, B. Bechinger, M. Lübbers, M. Engelhard:  
„Energy transduction in archaeal haloalkaliphile *Natronobacterium pharaonis*: Chloride gradients are coupled to ATP synthesis“  
*Biochemistry* 1996 (in press)

### **Zentrale Einrichtungen**

- M. Baum, H. Hentschel, M. Elger, E. Brown, S. Hebert, H.W. Harris:  
„Homologs of an extracellular calcium/polyvalent cation sensing receptor (CaR) are localized to the apical surfaces of specific epithelial cells in organs critical for ionic homeostasis in the elasmobranchs, *Squalus acanthias* and *Raja erinacea*, as well as teleosts *pseudopleuronectes americanus*, *Oncorhynchus mykiss* and *Fundulus heteroclitus*“  
*Bull MDIBL* **35**: 31-32 (1996)
- H. Baumgärtl, D.W. Lübbers, W. Zimelka:  
„Effects of puncturing on the measurement of local oxygen pressure using polarographic needle electrodes within semisolid polymeric networks - simultaneously measurements of local pO<sub>2</sub> and mechanical pressure“  
*Biotechnol. Bioeng.* (in press)
- H. Baumgärtl, W. Zimelka, D.W. Lübbers:  
„Effects of puncturing on the measurement of local oxygen pressure using polarographic microelectrodes“  
*Adv. Exp. Med. Biol.* (in press)

- M. Elger, A. Werner, P. Herter, B. Kohl, R.K.H. Kinne, H. Hentschel:  
„Basolateral and apical localization of Na-Pi cotransport system in renal tubule cells in the marine teleost, *Pleuronectes americanus*“  
(submitted)
- M. Gautel, E. Lehtonen, F. Pietrusckka:  
„Assembly of the cardiac I-band region of titin/connectin: expression of the cardiac-specific regions and their structural relation to the elastic segments“  
*J. of Muscle Res. and Cell Mot.* **17**: 449-461 (1996)
- H. Hentschel, M. Elger:  
„Renal morphology of the killifish, *Fundulus heteroclitus*“  
*Bull MDIBL* **35**: 40-42 (1996)
- P. Herter, M. Elger, B. Kohl, L. Renfro, H. Hentschel, R.K.H. Kinne, A. Werner:  
„Immunohistochemical localisation of a NaPi 2-cotransport system in the kidney and intestine of winter flounder (*Pleuronectes americanus*)“  
*Bull MDIBL* **35**: 28-30 (1996)
- B. Kohl, P. Herter, B. Hülseweh, M. Elger, H. Hentschel, R.K.H. Kinne, A. Werner:  
„Na-Pi cotransport in flounder: Same transport system in kidney and intestine“  
*Am. J. Physiol.* **270**: F937-F944 (1996)
- D.W. Lübbers, H. Baumgärtl:  
„Heterogeneities and profiles of oxygen pressure in brain and kidney as examples of the pO<sub>2</sub> distribution in the living tissue (in press)
- F. Scheibe, H. Haupt, H. Baumgärtl:  
„Effects of experimental cochlear thrombosis on oxygenation and auditory function of the inner ear“  
*Eur. Arch. Otorhinolaryngol* (in press)

#### **z.Z. dem Kollegium direkt unterstellte Arbeitsgruppen**

- M. Böckmann, B. Hess, S.C. Müller:  
„Temperature gradients traveling with chemical waves“  
*Phys. Rev. E.* **53**: 5498-5501 (1996)
- M. Dahlem, S.C. Müller:  
„Self-induced splitting on Z-type rotation of spiral-shaped spreading depression waves in chicken retina“  
*Experimental Brain Research* (in press)
- M.A. Delpiano, B.M. Altura:  
„Modulatory effect of extracellular Mg<sup>2+</sup> ions on K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents of capillary endothelial cells from rat brain“  
*FEBS Letters* **394**: 335-339 (1996)
- M. Diewald, K. Matthiessen, S.C. Müller, H. Brand:  
„Oscillatory hydrodynamic flow due to concentration dependence of surface tension“  
*Phys. Rev. Lett.* **77**: 4466-4468 (1996)
- A.K. Dutt, S.C. Müller:  
„Bistability in an uncatalyzed bromate oscillator in a continuously fed stirred tank reactor“  
*J. Chem. Phys.* **104**: 583-586 (1996)
- W. Ehleben, T. Porwol, J. Fandrey, W. Kummer, H. Acker:  
„Cobalt and desferrioxamine reveal crucial members of the oxygen sensing pathway in HepG2 cells“  
*Kidney International* (in press)
- M. Essand, P. Lögdahl, S. Nilsson, M. Wartenberg, H. Acker, J. Carlsson:  
„Retention and processing of the monoclonal anti-prostate E4 antibody after binding to prostatic adenocarcinoma DU 145 cells“  
*Cancer Imm. & Immunother.* **43**: 39-43 (1996)
- J. Fandrey, W. Ehleben, T. Porwol, S. Frede, H. Acker, W. Jelkmann:  
„Iron chelator antagonize the hydrogen peroxide dependent inhibition of erythropoietin production; interference with a putative signal from the oxygen sensor“  
*Kidney International* (in press)
- M. Gassmann, J. Fandrey, S. Bichet, M. Wartenberg, H.H. Marti, C. Bauer, R.H. Wenger, H. Acker:  
„Oxygen supply and oxygen-dependent gene expression in differentiating embryonic stem cells“  
*PNAS* **93**, **7**: 2867-2872 (1996)
- S. Grill, V.S. Zykov, S.C. Müller:  
„Spiral wave dynamics under pulsatory modulation of excitability“  
*J. Phys. Chem.* **100**: 19082-19088 (1996)

- W. Kummer, H. Acker:  
„Cytochrome b<sub>558</sub> and hydrogen peroxide production in small intensely fluorescent cells of sympathetic ganglia“  
Histochemistry and Cell Biology (in press)
- I. Kusch, M. Markus:  
„Mollusc shell-pigmentation: cellular automaton simulations and evidence for undecidability“  
Journal of theoretical Biology **178**: 333-340 (1996)
- K. Matthiessen, H. Wilke, S.C. Müller:  
„Influence of surface tension changes on hydrodynamic flow induced by traveling chemical waves“  
Phys. Rev. E. **53**: 6056-6060 (1996)
- T. Mair, S.C. Müller:  
„Traveling NADH and proton waves during oscillatory glycolysis in vitro“  
J. Biol. Chem. **271**: 627-630 (1996)
- M. Markus, T. Hahn, I. Kusch:  
„A novel quantification of cellular automata“  
J. Parallel Comp. (in press)
- M. Markus, I. Kusch, A. Ribeiro, P. Almeida:  
„Class 4 cellular automata simulating diverse physical systems“  
Int. J. Bifurcation & Chaos **6**: 1817-1827 (1996)
- A.P. Muñuzuri, M. Markus:  
„Cellular automata model and measurements of autowave splitting“  
Int. J. Bifurcation & Chaos **6**: 1837-1844 (1996)
- A.P. Muñuzuri, M. Markus:  
„Simple optical feedback loop: excitation waves and their mirror image“  
Physical Review E (in press)
- Z.S. Nagy-Ungvarai, J. Ungvarai, J. Enderlein, S.C. Müller:  
„Effective rate constant of the ferriin reduction in the BZ reaction“  
Faraday Trans (in press)
- B. Neumann, O. Steinbock, S.C. Müller, N. Dalal:  
„The oxidation of glyoxylic acid by cerium (IV): Oxygen-induced enhancement of the primary radical concentration“  
J. Phys. Chem. **100**: 12342-12348 (1996)
- T. Porwol, E. Merten, N. Opitz, H. Acker:  
„3D imaging of Rhodamine 123 fluorescence distribution in human melanome cells by means of confocal laser scanning microscopy“  
Acta Anatomica (in press)
- B. Schmidt, S.C. Müller:  
„Forced parallel drift of spiral shaped waves in the Belousov-Zhabotinsky Reaction“  
Phys. Rev. E. (in press)
- D. Stock, S.C. Müller:  
„3D reconstruction of scroll waves in the Belousov-Zhabotinsky-Reaction using optical tomography“  
Physica D **96**: 396-403 (1996)
- A.-R. Strohmaier, T. Porwol, H. Acker, E. Spiess:  
„Tomography of cells by confocal laser scanning microscopy and computer assisted thress dimensional image reconstruction. Localization of cathepsin B in invading tumor cells in vitro“  
Cytochemistry and Histochemistry (in press)
- M. Wartenberg, H. Acker:  
„Induction of cell death by doxorubicin in multicellular spheroids as studied by confocal laser scanning microscopy“  
Anticancer Res. **16**: 573-580 (1996)
- V.S. Zykov, S.C. Müller:  
„Spiral waves on circular and spherical domains of excitable medium“  
Physica D **97**: 322-332 (1996)

### **Emeriti**

- B. Hess:  
„Periodic patterns in biochemical reactions“  
Quart. Rev. Biophysics (in press)
- P. Hartmann, W. Ziegler, D.W. Lübbers:  
„Fluorescence lifetime imaging of the skin PO<sub>2</sub>: Intrumentation and results“  
In: Ince et al (Eds.): Oxygen transport to tissue XVIII, Plenum Press, New York (1996)
- D.W. Lübbers:  
„Oxygen electrodes and optodes and their application in vivo“  
In: Ince et al (Eds.): Oxygen transport to tissue XVII, Plenum Press, New York (1996)

- D.W. Lübbers, H. Baumgärtl:  
„Heterogeneities and profiles of oxygen pressure in brain and kidney as examples of the PO<sub>2</sub> distribution in the living tissue“  
Kidney International **51** (1996)
- D.W. Lübbers, T. Köster, G.A. Holst:  
„O<sub>2</sub> flux optode. A new sensing principle to determine the oxygen flux and other gas diffusions“  
In: Ince et al (Eds.): Oxygen transport to tissue XVII, Plenum Press, New York (1996)
- M. Böckmann, B. Hess, S.C. Müller:  
„Temperatur gradients travelling with chemical waves“  
Physical Review E **53**, 5498-5501 (1996)

## 2. Andere Veröffentlichungen

### 2. Other publications

#### **Abteilung I:** Strukturelle Biologie (Prof. Dr. A. Wittinghofer)

- C. Herrmann, N. Nassar:  
„Ras and its effectors“  
Progress in Biophysics and Molecular Biology (in press)
- B. Jaitner, J. Becker, A. Wittinghofer, C. Block:  
„*In vivo* quantitative assessment of Ras/Raf interaction using the two-hybrid system“  
In: L.M.G. Heilmeyer (Ed.): Structure and function of interacting protein domains in signal and energy transduction“ (in press)
- N. Opitz, T. Porwol, E. Merten, H. Acker:  
„On the protein-error of the calcium-sensitive fluorescent indicator Fura-Red“  
In: J. Slavik (Ed.): Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes, Plenum Press: 108-113 (1996)
- N. Opitz, T. Porwol, E. Merten, H. Acker:  
„Cytoplasmic ion imaging: Evidence for intracellular calibration heterogeneities of ion-sensitive fluorophores“  
In: J. Slavik (Ed.): Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes, Plenum Press: 114-119 (1996)
- I.R. Vetter, M.W. Parker, F. Pattus, D. Tsernoglou:  
„Insights into Membrane Insertion Based on Studies of Colicins“  
Protein Toxin Structure, ed. M.W. Parker, 1996 R.G. Landes Company

#### **Abteilung II:** Epithelphysiologie (Prof. Dr. R.K.H. Kinne)

- J. Biber, M. Custer, S. Maganin, G. Hayes, A. Werner, M. Lötscher, B. Kaissling, H. Murer:  
„Renal Na/P<sub>i</sub>-cotransporters“  
Kidney Int. 49: 981-985 (1996)
- E. Heinz, R.K.H. Kinne:  
„Osmoregulatory mechanisms“  
in: Encyclopedia of Science and Technology, 8th Edition. McGraw-Hill, New York (in press)
- P. Herter, M. Elger, B. Kohl, L. Renfro, H. Hentschel, R.K.H. Kinne, A. Werner:  
„Immunohistochemical localisation of a NaPi 2-cotransport system in the kidney and intestine of winter flounder (*Pleuronectes americanus*)“  
Bull. MDIBL 35: 28-30 (1996)
- R.K.H. Kinne:  
„Grundlagenforschung in der molekularen Physiologie“  
in: *Dortmund - Industrie- und Dienstleistungszentrum Westfalens*  
Th. Reichmann (Ed.), pp. 379-386; Verlag Lensing-Wolff GmbH, Dortmund
- J.-T. Lin, R.K.H. Kinne:  
„Glucose transporters in the kidney“  
in: Principles of Medical Biology, E.E. Bittar (Ed.), JAI Press, Inc., Greenwich, CT, USA (in press)
- H. Tinel, F. Wehner, R.K.H. Kinne:  
„Cell volume measurements using confocal laser scanning microscopy“  
In: J. Slavic (Ed.): Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes, Plenum Press, New York: 282-287 (1996)
- A. Wessing, K. Zierold:  
„Am Anfang ist der Wasserstoff“  
Gießener Universitätsblätter (in press)
- K. Zierold:  
„Cryofixation: The bridge between analytical electron microscopy and cell biology“  
Microscopy and Analysis, January 1996, 11 - 13 (1996)

#### **Abteilung III:** Physikalische Biochemie (Prof. Dr. R.S. Goody)

- P.D. Vogel, S. Neuhofen, H. Theyssen, J. Reinstein, W.E. Trommer:  
„Investigating nucleotide-binding to the heat-shock protein Dnak using esr-spectroscopy“  
Biophys. J. 70, WP321-P321 (1996)

#### **Zentrale Einrichtungen**

- Th. Plessner:  
„Das Leistungsangebot der GWDG für die Institute der Max-Planck-Gesellschaft: Rückblick und Perspektiven“  
In: F. Brinkmeier (Ed.): Rechner, Netze, Spezialisten, Göttingen: GWDG Bericht 41: 115-121 (1996)

- Th. Plesser, P. Wittenburg (Eds):  
Forschung und wissenschaftliches Rechnen. Beiträge zum Heinz-Billing-Preis 1995  
Göttingen: GWDG-Bericht 42 (1996)
- Th. Plesser, P. Wittenburg:  
Vorwort  
In: Th. Plesser, P. Wittenburg (Eds.): Forschung und wissenschaftliches Rechnen: Beiträge zum Heinz  
Billing Preis 1995, Göttingen: GWDG-Bericht 42 (1996)
- F. Scheibe, H. Haupt, H. Baumgärtl:  
„Effects of experimental cochlear thrombosis on oxygenation and auditory function of the inner ear“  
Eur. Arch. Otorhinolaryngol (in press)

#### **z.Z. dem Kollegium direkt unterstellte Arbeitsgruppen**

- M. Böckmann, K. Matthiessen, B. Hess, S.C. Müller:  
„Influence of local temperature and density inhomogeneities on chemical excitation waves“  
In: H. Engel, F.-J. Niedernostheide, H.-G. Purwins, E. Schöll (Eds.): Self-Organization in Activator-  
Inhibitor-Systems, Wissenschaft und Technik Verlag, Berlin: 158-163 (1996)
- M.A. Delpiano:  
„Metabolic Inhibitors Affect the Conductance of Low Voltage-Activated Calcium Channels in Brain  
Capillary Endothelial Cells“  
P. Zapata, C. Eyzaguirre and T. Torrance (Eds.), Frontiers in Arterial Chemoreception, Plenum Press, New  
York: 109-113 (1996)
- M.A. Delpiano, B.M. Altura:  
„Transmembrane Currents in Capillary Endothelial Cells are Modulated by External  $Mg^{2+}$  Ions“  
P. Zapata, C. Eyzaguirre and T. Torrance (Eds.), Frontiers in Arterial Chemoreception, Plenum Press, New  
York: 115-118 (1996)
- T. Mair, S.C. Müller:  
„Self-organization in glycolysis-influence of pyruvate and ATPase“  
Folia Microbiol.
- M. Markus:  
„Unvorhersagbarkeit - auf verschiedenen Systemebenen - mit Beispielen aus den Naturwissenschaften“  
In: P. Weingartner (Ed.): Grenzfragen Bd. 22, Alber, Freiburg: 111-146 (1996)
- M. Markus, J. Tamames:  
„Fat fractals in Lyapunov space“  
In: C.A. Pickover (Ed.): Fractal Horizons, St. Martin's Press, New York: 333-348 (1996)
- K. Matthiessen, S.C. Müller:  
„Chemically driven convection in the Belousov-Zhabotinsky-Reaction“  
In: L. Ratke, H. Walter, B. Feuerbacher (Eds.): Materials and Fluids Under Low Gravity, Lect. Notes in  
Physics, Springer, Berlin Heidelberg: 371-384 (1996)
- S.C. Müller:  
„Experiments on Excitation Waves“  
In: J. Parisi, S.C. Müller, W. Zimmermann (Eds.): Nonlinear Physics of Complex Systems, Lect. Notes in  
Physics, Springer, Berlin Heidelberg, 133-148 (1996)
- S.C. Müller, V.S. Zykov:  
„External control of rotating excitation waves“  
In: H. Engel, F.-J. Niedernostheide, H.-G. Purwins, E. Schöll (Eds.): Self-Organization in Activator-  
Inhibitor-Systems, Wissenschaft und Technik Verlag, Berlin: 74-79 (1996)
- Th. Plesser, K.-H. Müller:  
„Numerical Analysis of the Dynamics of Spiral Tips in excitable Media: The Effects of Inhibitor Diffusion“  
In: H. Engel, F.J. Niedernostheide, H.G. Purwins, E. Schöll (Eds.): Selbstorganisation, Berlin: Wissenschaft &  
Technik Verlag (1996)
- V.S. Zykov, S. Grill, S.C. Müller:  
„Order and chaos in excitable media under external forcing“  
In: R.G. Harrison et al (Eds.): Experimental Chaos, World Scientific, Singapore 1996
- V.S. Zykov, A.S. Mikhailov, S.C. Müller:  
„Spiral waves on a sphere: New computational results“  
In: H. Engel, F.-J. Niedernostheide, H.-G. Purwins, E. Schöll (Eds.): Self-Organization in Activator-  
Inhibitor-Systems, Wissenschaft und Technik Verlag, Berlin: 108-113 (1996)

#### **Emeriti**

- B. Hess:  
„Selforganization in Chemical and Biological Systems“  
in: „From Simplicity to Complexity“ - Part II (ed. K. Mainzer, A. Müller, W. Saitzer) Vieweg, Wiesbaden, p.  
103-111 (1996)

- P. Stange, A. Mikhailov, B. Hess:  
„Self-organization of enzymic reactions in mesoscopic systems“  
in: „Self-Organization in Activator-Inhibitor Systems: Semiconductors, Gas-Discharge and Chemical Active Media (eds. H. Engel, F.-J. Niedernostheide, H.-G. Purwins, E. Schoell), Wissenschaft und Technik Verlag, Berlin, pp. 223-227 (1996)

—#—  
β-Catenin 7; 43

—2—  
2-Aminopurine 26

—3—  
3D reconstruction 8; 28

—A—  
AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> 10  
AAV-2 23  
actin 20  
aerobic and anaerobic processes 38  
alcohol 29  
algorithm 32  
and proto-oncogenes 7  
animated data visualization 8  
antipeptide antibodies 14  
antisense transcript 16  
APC 7; 43  
apoptosis 8  
attractors 31

—B—  
Belousov-Zhabotinsky reaction 30; 31  
bioenergetic processes 38  
biofilms 38  
Bio-Imaging 8  
Biom mineralization 17  
bionics 38  
biophysical analysis 6  
bioreactors 38  
biotechnology 42  
brush-border membranes 14  
Byr2 5

—C—  
C3G 10  
Ca<sup>2+</sup>/calmodulin protein kinase 12  
cadmium 17  
caged-Mg 42  
caged-P<sup>18</sup>O<sub>4</sub> 42  
caged-PO<sub>4</sub> 42  
calcium homeostasis 8  
capillary endothelial cells 29  
Carbonic anhydrase 17  
cardiac fibrillation 30  
carotid body 28  
carp kidney 40  
catalytic mechanism 26  
cdc42 9  
cell Ca<sup>2+</sup> 15  
cell K<sup>+</sup> 15  
cell line 29  
cell Na<sup>+</sup> 15  
cell pH 15  
cell volume regulation 15  
cellular automata 30  
CHO cells 14  
Cl channel 15  
client 44  
collembols *Anurida maritima* 38

colorectal tumors 7  
confocal laser microscopy 28  
confocal laser scanning microscopy 8  
confocal laser-scanning microscopy 15  
convection 31; 32  
COS-7 14  
cryo crystallography 24  
cryosections 17  
cytochrome 19  
cytochromoxidase 43

—D—  
DafA 25  
diazirinoglucosides 13  
dictyostelium discoideum 25  
Dictyostelium myosin II 20  
differential interference contrast 40  
dispersion relation 31  
dissociation rate 4  
DNA base flipping 26  
DNA methylation 26  
DNA methyltransferases 26  
DnaJ 25  
DnaK 25  
DNA-mutations 7  
DNA-Sequencing 45  
dominant-negative 4  
drug design 3

—E—  
EDV 44  
effectors 5  
electrophysiology 15  
ELISA 43  
enzyme synchronization 35  
EPR measurements 31  
erythropoietin 28  
ESA-Project XMM 38  
excitable media 30; 31; 32  
expression of transport proteins 13  
Extended GCG (EGCG) 8.1 45

—F—  
feedback mechanism 31  
Fenton reaction 28  
fermentors 42  
flounder kidney 13; 40  
fluorescence 20  
fluorescence probe 26  
fluorescent indicators 8  
fluorometry 15  
FTIR spectroscopy 42

—G—  
Gal4 43  
GAP 2; 10  
gas exchange 38  
gas exchange through the skin 36  
GEFs 4  
gene expression 16; 28  
glucosides 14  
glycolysis 31  
glyoxylic acid 31  
GrpE 25  
GTPase-Activating Protein 10  
GTPase-as-base mechanism 10  
GTP-binding protein 2; 21



guanine nucleotide exchange factors 4  
guanine-nucleotide exchange factor 10

—H—

HepG2 cells 28  
hGBP1 5  
high pressure homogenizer 42  
HIV-1 reverse transcriptase 21  
hMSH2 7  
hydrophobic modification 6

—I—

immunochemistry 40  
immunofluorescence 43  
immunoprecipitation 14  
importin  $\beta$  9  
inhibitor 21  
initiation complex 21  
insect flight 38  
insect trachea 30  
interactions occurring in protein interfaces 9  
Intracellular pH- und pCa-measurements 8  
ion channel conductivity 28  
ion transport 17

—K—

kidney 15  
kinase 22  
kinetic 21  
kinetic crystallography 24

—L—

LAN 44  
Laue technique 24  
liver 15; 17  
local pO<sub>2</sub> measurements 38

—M—

magnesium transport 12  
malonic 31  
Malpighian tubules 17  
meandering 31  
membrane fusion 21  
mercury 12  
mesoscopic selforganization 35  
MFCS/win 42  
Mg<sup>2+</sup> 29  
microbial degradation 38  
microfluidizer 42  
mitogenic signalling 3  
molecular networks of enzymes 35  
monoclonal antibodies 43  
morphogenesis 30  
multi-exponentials 32  
mutagenesis 14  
Mutants 21  
myosin subfragment 20

—N—

Na<sup>+</sup> channel 15  
Na, K, 2 Cl cotransport 12  
Na/D-glucose cotransport 14  
Na/P<sub>i</sub> cotransport 16  
NAD(P)H oxidase 4  
NADPH oxidase 28

NaP<sub>i</sub>-II cotransport system 40  
natronobacterium pharaonis 25  
nephrogenesis 40  
network 44  
Non-invasive measurement of the pH-distribution 36  
nuclear transport 6  
nucleo-cytoplasmic transport 2  
nucleoside 21  
nucleotide 22

—O—

O<sub>2</sub>-flux 36  
O<sub>2</sub>-kinetics 38  
Oligonucleotide Synthesis 45  
oocytes 16  
optical feedback 30  
optical filters 38  
Oregonator model 31  
organic osmolyte 12  
organic osmolyts 13  
over-expression 14  
oxygen sensing 8; 28  
oxygen supply 38

—P—

patch-clamp 15  
pH 29  
phosphoryl transfer 22  
PI(3)-kinase 5  
pO<sub>2</sub> needle electrodes 38  
pO<sub>2</sub> profiles 38  
polyclonal antibodies 43  
pronephros 40  
protein complexes 9  
Protein Sequencing 45  
protein-error 8  
protein-protein interactions 9  
proton waves 31  
proximal tubule 40  
purification of sewage 38

—Q—

QSAR analysis 14  
Quantitative Laser-Mikroskopie 8

—R—

Ral-GEF 10  
Rab proteins 23  
rac1 protein 28  
Raf 3; 5  
ralA 9  
Ral-GEF 5  
Ran 2; 6; 9  
Ran BP1 43  
RanBP1 6  
Rap 10  
Ras 3; 6; 10  
Ras subfamily 5  
Ras-binding domains 4  
Ras-byr2 10  
Ras-GppCp-Mn<sup>2+</sup> 10  
RBD 4  
RCC1 2  
reactive oxygen species 28  
reflection fotometry 36  
renal corpuscle 40  
respiratory chain 19  
Retinitis Pigmentosa 2

RF-sputtering 38  
Rlip 9

—S—

S-adenosyl-L-methionine 26  
scanning force microscope 17  
sensory rhodopsin II 25  
server 44  
SGLT1 14  
signal recognition particle (SRP) 23  
signal transduction 4; 12; 19  
simultaneous intracellular measurements of pH and pCa  
8  
sodium-D-glucose cotransporter 13  
sodium-phosphate-cotransporter 13  
Software for Molecular Biology 45  
solid phase DNA synthesis 26  
sorbitol 12  
sorting 16  
spatio-temporal variations 8  
spiral 32  
spiral waves 30  
spirals 31  
spreading-depression 31  
sr Ca-ATPase 42  
stopped-flow 20  
Structure-Activity Studies 26  
structure-function analysis 3  
structure-function relationship 23  
surface plasmon resonance 6

—T—

T84 cells 12  
tenside aggregates 30  
Thermus thermophilus 22; 25  
thick ascending limb of Henle's loop 12  
time-resolved X-ray crystallography 23  
topology 16  
transfection 14  
transient expression 14

transition state analogs 22  
transmission electron microscope 40  
tropomyosin 20  
trout kidney 13  
tumor suppressor genes 7  
tumour angiogenesis factor 30  
turbulence 30  
Turing 30  
Turing patterns 31

—U—

UMP:GMP kinase 25

—V—

vascularization 30  
volume regulation 13

—W—

WASP 9  
wave front instabilities 30  
winter flounder 16  
Wisconsin Sequence Analysis Package (GCG) 45  
WWW 44

—X—

Xenopus laevis 16  
Xenopus laevis oocyte expression 12  
X-ray microanalysis 17

—Y—

yeast 14

—Z—

zebrafish 40