

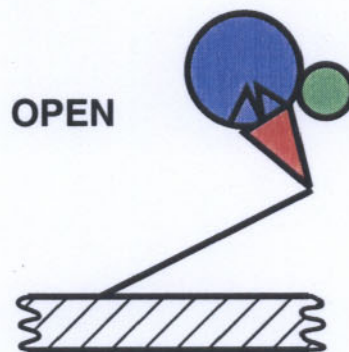
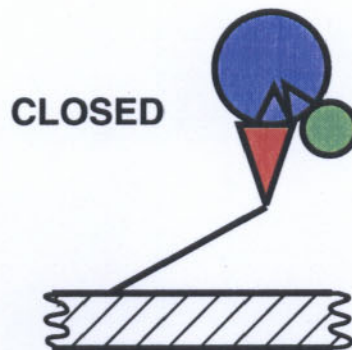
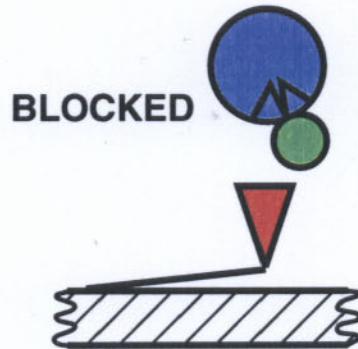
Max-Planck-Institut für molekulare
Physiologie

Dortmund

MPI f. molekulare Physiologie

0 2. Okt. 2000

Geschäftsführung



Jahresbericht 1995

Jahresbericht

Annual report

1995

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

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

Dortmund, Februar 1996

Vorwort

Liebe Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter,
sehr geehrte Damen und Herren,

im dritten Jahr nach der Zusammenlegung der alten Institute kann man etwas über das, was in dieser Zeit erreicht wurde, nachdenken. Festzustellen ist, daß zu der schon etablierten Abteilung (Abteilung II; Epithelphysiologie) zwei voll ausgebaute Abteilungen (I + III) hinzugekommen sind, die durch umstrukturierte zentrale Einrichtungen unterstützt werden. Gerade in diesem Bereich hat es eine erfreuliche Entwicklung gegeben, so daß viele für die moderne Biowissenschaften wichtigen Methoden für das Institut zur Verfügung stehen. In dieser Hinsicht, wie auch in Bezug auf die wissenschaftliche Leistung der Abteilungen und der anderen Gruppen, braucht das Institut keinen Vergleich zu scheuen. Als Indiz für die Produktivität des Instituts kann man feststellen, daß im Jahr 1995 ca. 135 wissenschaftliche Veröffentlichungen hervorgegangen sind. Auch wenn solche nackte Zahlen keine direkte Bedeutung haben, kann man feststellen, daß eine hohe Zahl von Publikationen in angesehenen Zeitschriften erschienen sind. Ein anderes Maß für den Erfolg des Instituts ist das stark gestiegene Volumen von Drittmitteln, die eingeworben werden, wobei die Etablierung eines Sonderforschungsbereichs der Deutschen Forschungsgemeinschaft zusammen mit der Universität Bochum einen besonderen Erfolg und eine Bereicherung der Forschungslandschaft in unserer Gegend darstellt.

Das kommende Jahr ist in der Geschichte des Instituts ein wichtiges, da im Herbst mit dem Neubau des Institutsgebäudes begonnen wird. Auch wenn dies vorübergehend zu einer gewissen Störung der Arbeit in den kommenden 2 bis 3 Jahren führen kann, eröffnet die Umsiedlung auf den Universitätscampus neue, vielversprechende Möglichkeiten für die Zukunft.

Ich wünsche allen Mitarbeitern ein erfolgreiches Jahr, sowohl innerhalb wie außerhalb des Instituts.

Dear colleagues,
dear readers,

in the third year since the fusion of the two old institutes we can take stock of what has been achieved. In concrete terms, two fully equipped departments have been established in addition to the already existing one, as well as a number of central facilities. In the latter area, there has been a very favourable development, so that many techniques needed in the modern biological sciences are now at the disposal of the research groups. In this respect, as well as with respect to the scientific productivity of the institute, we now have a research laboratory which can compete at a very high level in international terms. An indicator of the productivity are the ca. 135 scientific publications which came from the institute in 1995. While such statistics alone are not meaningful, it is clear that a large percentage of these papers is in high impact journals. Another sign of success is the large increase in grants from outside granting agencies, which are at a level which is by no means automatic for a Max-Planck-Institute. The establishment of a joint research grant with the University of Bochum is a particular success and an important development for research in the Ruhr area.

The coming year is an important one in the history of the institute, since work on the new building on the campus of the University of Dortmund begins in autumn. Despite minor disturbances to current work over the next 2 - 3 years due to this activity, the move to the University opens up new possibilities for the future of the institute.

I wish all members of the institute a successful year, both inside and outside the laboratory.

INHALTSÜBERSICHT LIST OF CONTENTS

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

Abteilung I: Strukturelle Biologie	1
(Leitung Prof. Dr. A. Wittinghofer)	
Department I: Structural Biology	
(Head: Prof. Dr. A. Wittinghofer)	
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
Abteilung II: Epithelphysiologie	11
(Leitung Prof. Dr. R.K.H. Kinne)	
Department II: Epithelial Physiology	
(Head: Prof. Dr. R.K.H. Kinne)	
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
Abteilung III: Physikalische Biochemie	18
(Leitung Prof. Dr. R.S. Goody)	
Department III: Physical Biochemistry	
(Head: Prof. Dr. R.S. Goody)	
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

z.Z. dem Kollegium direkt unterstellte Arbeitsgruppen	27
Independent research groups subordinate to the managing director	
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. Plessner	32
Arbeitsgruppe Dr. H. Prinz	33
Emeriti	34
Emeriti	
Prof. Dr. B. Hess	35
Prof. Dr. D.W. Lübbers	36
Zentrale Einrichtungen	37
Central Facilities	
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. Kuschmitz)	42
Zentrale Einrichtung für Zellkultur und Immunologie (Dr. F. Pietruschka)	43
Zentrale Einrichtung EDV (Dr. Th. Plessner)	44
Zentrale Einrichtung Synthese und Sequenzierung (PD Dr. H.-J. Wieker)	45
Zentrale Einrichtung Glastechnik (Dr. D. v. Wulffen)	46
Liste der Publikationen	
Publications	
1. 1994 erschienene oder im Druck befindliche Originalarbeiten in referierten Zeitschriften (ohne Abstracts)	47
1. Publications in refereed journals, published in 1995 or presently in press (no meeting abstracts)	
2. Andere Veröffentlichungen	55
2. Other publications	
Index	57

Abteilung I:

Strukturelle Biologie

(Leiter: Prof. Dr. A. Wittinghofer)

Department I:

Structural Biology

(Head: Prof. Dr. A. Wittinghofer)

Arbeitsgruppe: Dr. J. Becker

Mitarbeiter: R. Aßheuer, P. Grünewald, R. Hillig, C. Koerner

1. Einleitung: Im Mittelpunkt unserer Arbeit steht die Aufklärung der Struktur und Funktion von Ran. Ran ist ein GTP-bindendes Protein, das an der Regulation des Transports von Proteinen in und aus dem Zellkern und möglicherweise an der Zellzykluskontrolle beteiligt ist.

2. Struktur und Funktionsanalyse von Ran: Mutationen in Ran wurden mit Hilfe der bereits gelösten Kristallstruktur ausgewählt und mittels PCR eingeführt. Ziel ist es Aminosäuren zu identifizieren, die für die Wechselwirkung mit Ran regulierenden Proteinen wichtig sind. Dazu wurden geladene Aminosäuren, deren Reste keine intramolekularen Wechselwirkungen eingehen, zu Alanin mutiert. Dadurch sollten Informationen über Strukturen gewonnen werden, die für die Regulation und damit für die Funktion von Ran wichtig sind. Die Interaktion von veränderten Ran Proteinen mit regulierenden Proteinen RCC1, RanBP1 und RanGAP1 soll nun mittels der Fluoreszenzspektroskopie untersucht werden. Erste Ergebnisse zeigen, daß die Entfernung der Ladungen am carboxy-terminalen Ende von Ran keinerlei Auswirkung auf die Nukleotidbindung und -hydrolyse hat, jedoch die Affinität zu RanBP1 100fach verringert ist. In Zusammenarbeit mit Dr. Frauke Melchior (Scripps Research Institute, La Jolla) wurde gezeigt, daß die carboxy-terminal mutierten Proteine den Proteinimport in Zellkerne inhibieren und dies auch in Gegenwart von nicht veränderten Proteinen. Somit handelt es sich hier um dominante Mutationen, die einen guten Ausgangspunkt für die Identifizierung weiterer mit Ran wechselwirkender Proteine sind.

3. Struktur und Funktionsanalyse von RanGAP1: RanGAP1 bewirkt eine bis zu 25.000fache Erhöhung der GTP-Hydrolyse Aktivität von Ran. In Zusammenarbeit mit Prof. Volker Gerke (Universität Münster) wurden von RNA1, dem homologen Gen zu RanGAP1 in Hefe, Deletionsmutanten hergestellt. Die Proteine wurden exprimiert, gereinigt und ihre katalytische Aktivität bestimmt. RanGAP1 und homologe Proteine werden in drei Domänen unterteilt, einer amino-terminalen, 'Leucin Rich Repeats'-Region, einer sauren hauptsächlich Glutamin- und Asparaginsäure enthaltenen Region und einer carboxy-terminalen. Die Untersuchungen der Deletionsmutanten zeigen, daß das carboxy-terminale Ende für die Katalyse nicht gebraucht wird. Deletionsmutanten, in denen die saure Region zur Hälfte deletiert ist, zeigen eine verringerte Aktivität und keine Aktivität ist nachweisbar, wenn der gesamte saure Zwischenteil entfernt wurde. Weiterhin wird die Kristallisation von RanGAP1 und homologen Proteinen aus *S. Pombe* und *S. cerevisiae* angestrebt.

4. Klonierung und Untersuchung von NTF2: NTF2 ist ein Protein das bei Proteinreinigungen von Ran mitgereinigt wird. Da die Funktion dieses Proteins unbekannt ist und um zu untersuchen, ob es an der Regulation von Ran beteiligt oder möglicherweise ein Effektormolekül von Ran ist, wurde NTF2 mittels RT-PCR aus *S. cerevisiae* kloniert. Das bakteriell exprimierte NTF2 aus Hefe und aus HeLa Zellen bindet an Ran in der GDP gebundenen Form von Ran, hat jedoch keinerlei Auswirkung auf die GTP-Hydrolyse oder Nukleotiddissoziation.

1. Introduction: The group is studying the structure and function of Ran. Ran is a small GTP-binding protein which facilitates nucleo-cytoplasmic transport and is also in cell cycle regulation.

2. Structure and function analysis of Ran: Using PCR facilitated site directed mutagenesis we introduced point mutations as selected sites within the human Ran gene. The mutations were selected using the previously solved crystal structure of Ran with the intent to select for amino acids which might be important for the regulation and function of Ran. Therefore charged residues which are not involved in intramolecular interactions were replaced by alanine. The mutated Ran genes were expressed in *E. coli* and purified. The interaction of these altered Ran proteins with the interacting proteins in RanBP1, RCC1, and RNA1 is currently being investigated using fluorescence spectroscopy. Initial results indicate that the removal of negatively charged amino acids at the carboxy terminal end of Ran has no effect on nucleotide binding and hydrolysis. However, the affinity to RanBP1 is decreased 100fold. In collaboration with Dr. Frauke Melchior (Scripps Research Institute, La Jolla), it was shown that these mutants inhibit import of proteins into the nucleus in vitro even in the presence of sufficient amounts of wild type Ran. Therefore these mutants are dominantly negative and provide a valuable opportunity to identify further proteins interacting with Ran.

3. Structure and function analysis of RanGAP1: RanGAP1 increases the hydrolysis of Ran-bound GTP about 25,000fold. In collaboration with Prof. Volker Gerke (University 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 aminoterminal 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 c-terminal end is not required for catalytic activity, removing half of the acidic region reduces the activity significantly while removal of the acidic region abolishes the catalytic activity entirely. After establishing the protein purification for RanGAP1 and its yeast counterparts we are also attempting to determine their 3D-structure by X-ray crystallography.

4. Cloning and analysis of NTF2: NTF2 was discovered as a protein which copurified with Ran. As the function of this protein is unknown we wanted to know whether it is involved in the regulation of Ran or whether it might be even a effector molecule of Ran. Therefore we cloned the yeast homologue of NTF2 using RT-PCR. The bacterially expressed NTF2 binds to Ran preferentially in its GDP bound form, however it has no influence on GTP hydrolysis or nucleotide dissociation.

Arbeitsgruppe Dr. C. Block
Mitarbeiter: B. Jaitner, B. Voss

Struktur-Funktionsbeziehungen beim Downstream-Signalling von p21^{ras}

Die Arbeitsgruppe untersucht Struktur-Funktionsbeziehungen in der Signaltransduktion durch p21^{ras}. Ziel der Arbeit ist es den Mechanismus der Aktivierung des durch p21^{ras} kontrollierten MAP-kinase Moduls (Raf/MEK/ERK) aufzuklären. Wesentliches Charakteristikum dieser Aktivierung ist die Bindung der ersten Kinase in der Sequenz des MAP-kinase Moduls (Raf) an den molekularen Schalter p21^{ras}. 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 Proteindomänen *in vivo* mit Hilfe des Doppelhybrid-Systems in Hefe. 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.

Ausgehend von der Kristallstruktur des Rap1A/Raf-RBD Komplexes wurden die Aminosäuren in Raf-RBD mutiert, die an der Bindung von Raf-RBD an das Ras-homologe Protein Rap1A beteiligt sind. Da die Effektordomäne von Rap1A zwar weitgehend homolog aber nicht identisch mit der Ras-Effektordomäne 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 konnte eine Interaktion zwischen Ras und Raf-RBD identifiziert werden, die eine wesentliche Differenz in der Interaktion von Rap1A mit Raf-RBD zur Bindung von Ras an Raf RBD darstellt. 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 Ras downstream signalling

Our group investigates structure-function relationships involved in p21^{ras} downstream signalling. Our aim is to elucidate the mechanism of activation of the so-called MAP-kinase module (Raf/MEK/ERK) by p21^{ras}. Binding of Ras to Raf is a pivotal step of activation of Raf by Ras and is responsible for many mitogenic signalling events. To investigate this question 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. Identification of interacting proteins by screening employing the yeast two hybrid screen.
- Quantification 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.

Based upon the crystal structure of the Rap1A/Raf-RBD complex we have mutated residues of Raf-RBD which are 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 an interaction site which is highly important in Ras/Raf-RBD interaction, which is not seen in the Rap1A/Raf-RBD crystal structure due to differences between the effector domains of Ras and Rap1. 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: B. Bauer, N. Gülüm, C. Lenzen, C. Theiss

Das Hauptinteresse unserer Gruppe gilt den Guanin-nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs: guanine nucleotide exchange factors), die die Freisetzung von gebundenem GDP von ras-Proteinen katalysieren. Die GEF Aktivität ist für die Zelle essentiell, da sie die Bindung von GTP an die ras (-ähnlichen) Proteine erlaubt und dadurch die spezifischen Signalübertragungswege aktiviert, an denen das ras-Protein beteiligt ist. GEFs sind Proteine mit einer ungefähren Molekülmasse von 160 kD. Sie enthalten mehrere strukturelle Untereinheiten, die wichtig sind für die Wechselwirkung mit anderen Makromolekülen, wie zum Beispiel die Proline-reichen Regionen und die Pleckstrin-homologe Domäne. Außerdem enthalten rasGEFs eine Region von ungefähr 200 Aminosäuren, die die Austauschdomäne darstellt. Diese Domäne ist homolog zu der katalytischen Region von CDC25, dem ersten aus Hefe isolierten ras GEF.

Um den molekularen Mechanismus der katalysierten Freisetzung von Nukleotid zu untersuchen, führten wir Studien mit fluoreszenz-markierten Guaninnukleotiden durch, zusammen mit BiaCore Experimenten, bei denen wir GST-fusioniertes p21ras einsetzten. Wie erwartet, zeigen p21ras und C-CDC25Mm*p21ras*GDP eine geringe Affinität und eine hohe Dissoziationsrate, die die GEF-abhängige Stimulation der Freisetzung des Nukleotids von p21ras repräsentiert. Unser System erlaubt uns, die genauen Effekte von Mutationen, wie S17N und D199N zu analysieren. So konnten wir zeigen, daß der dominant-negative Effekt dieser Mutanten fast ausschließlich ein Resultat der verringerten Nukleotid-affinität ist und weniger der höheren Affinität zu GEF. In anderen Mutationsstudien unter Verwendung von CDC25Mm und anderen GEFs werden zur Zeit die Interaktionsstellen zwischen ras Protein und GEF, sowie der Mechanismus der Spezifität untersucht. Des Weiteren wurden Mikrokristalle des Komplexes CDC25Mm*p21ras* erhalten, die in absehbarer Zeit zu kristallographisch analysierbaren Kristallen führen sollen.

Kürzlich wurde erkannt, daß eine gewisse Anzahl von GEFs auch als Effektormoleküle fungieren können. Wir untersuchten C-terminale Fragmente von zwei Proteinen mit hoher Homologie zu RafGEF, RGL und rok. Während rok einen K_D zu den GTP-Komplexen von H-ras und rap1A von ungefähr 0,5 μ M zeigt, scheint sich RGL mehr wie RafGEF zu verhalten: eine Affinität zu H-ras im mikromolaren Bereich und eine 100-fach stärkere Affinität zu rap1A. Andere mögliche Effektormoleküle, wie zum Beispiel ral-bindende Proteine werden zur Zeit untersucht.

The main interest of our group are the guanine nucleotide exchange factors (GEFs) that stimulate the release of bound GDP on ras proteins. GEF activity is essential for the cell, since it allows the binding of GTP to the ras(-like) proteins and thereby activates the specific signal transduction pathway(s) in which the ras protein is involved. GEFs are proteins of considerable length of up to 160 kDa, and contain several structural building blocks that are important for interaction with other macromolecules, e. g. the Pleckstrin homology domain, and Proline-rich regions. In addition, rasGEFs contain a region of approximately 200 amino acids that comprises the exchange domain and which is homologous to the catalytic region of the first isolated rasGEF, CDC25 from yeast.

To elucidate the molecular mechanism of the catalysed release of nucleotide, we have used studies with fluorescently labelled guanine nucleotides, combined with BiaCore experiments using GST-fused p21ras. As expected, the p21ras and C-CDC25Mm*p21ras*GDP is characterized by a low affinity and a high dissociation rate, which represents the GEF-dependent stimulation of release of nucleotide from p21ras. Our system allowed us to analyse the exact effects of mutations such as S17N and D119N. Thus, we could determine that the dominant-negative effect of these mutants is mostly a result of their decreased nucleotide affinity and not so much of a higher affinity for the GEF. Other mutational studies using CDC25Mm and other GEFs are in progress to elucidate the interaction sites between ras protein and GEF, and the mechanism of specificity. Furthermore, microcrystals of the complex C-CDC25Mm*p21ras have been obtained, which will hopefully lead to diffractable crystals.

Recently it has been recognised that a number of GEFs can also act as effector molecules. We have analysed the C-terminal fragments of two proteins with strong homology to RafGEF, RGL and rok. Whereas rok displays K_D 's for the GTP complexes of H-ras and rap1A of approximately 0.5 μ M, RGL seems to be more like RafGEF: μ M-affinity for H-ras, and a 100-fold stronger affinity for rap1A. Other putative effector molecules, e. g. ral-binding proteins, are currently under investigation.

Arbeitsgruppe Dr. Ch. Herrmann

Mitarbeiter: S. Wohlgenuth

In der Übertragungskette von Wachstums- und Differenzierungssignalen von der Zellwand zum Zellkern nehmen Ras ähnliche Proteine eine wichtige Schalterfunktion ein, wobei sie im aktivierten Zustand das Signal an Effektoren weiterleiten. Da es einerseits einige homologe Ras-Proteine gibt und andererseits verschiedene mögliche Effektoren gefunden wurden, liegt an dieser Stelle ein komplexer Knotenpunkt verschiedener Signalwege vor. Ziel unserer Untersuchungen ist die Zuordnung der einzelnen Ras Proteine zu ihren jeweiligen Effektoren und die Charakterisierung der Wechselwirkungen auf molekularer Ebene.

Es wurden zunächst die Ras bindenden Proteindomänen (RBD) von zwei Effektoren isoliert, Raf-Kinase und Ral-GEF. Für die quantitative Bestimmung ihrer Bindungsaffinitäten gegenüber den Ras-Proteinen, H-Ras, Rap-1A, TC21 und R-Ras, wurde die inhibitorische Wirkung ausgenutzt, die diese Effektoren auf die Nukleotiddissoziation haben. Es zeigten sich spezifische Unterschiede zwischen den einzelnen Bindungspartnern, da die Affinitätskonstanten in einem Bereich von drei Zehnerpotenzen gefunden wurden. Während R-Ras und TC21 an beide Effektoren mit mikromolarer Affinität binden, wurde für H-Ras gefunden, daß es 100 mal stärker an Raf-Kinase ($K_d = 20$ nM) als an Ral-GEF bindet, und für Rap wurde die umgekehrte Spezifität beobachtet - es bindet 100 mal stärker an Raf-GEF ($K_d = 10$ nM) als an Raf-Kinase. In Zusammenarbeit mit Gudrun Horn konnte durch eine Mutationsanalyse gezeigt werden, daß Aminosäure 31 (K in Rap, E in Ras) verantwortlich für diese Unterscheidung ist. In der von Nicolas Nassar gelösten Röntgenstruktur des Rap-RafRBD Komplexes wurde K84 auf der Raf-Seite als der Diskriminator ausgemacht. Welche Aminosäure im Ral-GEF die beobachtete Spezifität bestimmt, konnte noch nicht geklärt werden. Die GTP-Hydrolysegeschwindigkeit von Ras und Rap wird durch die Wechselwirkung mit RalGEF etwas verlangsamt, während Raf keinen Einfluß darauf hat.

Es wurden die Bindungskonstanten zwischen zahlreichen Mutanten von Ras und von RafRBD bestimmt, um die Interaktion der beiden Proteine auf molekularer Ebene zu charakterisieren. In Mikroinjektionsexperimenten an PC12-Zellen in Zusammenarbeit mit Gudula Schmidt bzw. mit Hilfe eines Reporterassays in RK13-Zellen in Zusammenarbeit mit Christoph Block wurde eine gute Korrelation der gemessenen Ras/Raf-Affinitäten mit den biologischen Aktivitäten gefunden. Die Amplitude der Störung von der Interaktion zwischen Ras und seinem Effektor wirkt sich also quantitativ auf die zelluläre Antwort aus, d. h. dies ist ein geeigneter Angriffspunkt, um mit zu entwickelnden Wirkstoffen die Signaltransduktion in transformierten Zellen zu modulieren.

Ras like proteins play an important role in mediating signals for growth or differentiation from the plasma membrane to the nucleus. Switched to the GTP state they activate their downstream effector molecules. This might be a nodal point of different signal pathways or a point for crosstalk since there are a number of closely related Ras proteins interacting with a set of putative effectors feeding into different pathways. We have characterised these interactions on a molecular level and we can suggest now which of these interactions have physiological relevance.

The Ras binding domains (RBD) of two effectors, Raf-kinase and Ral-GEF, have been isolated. Their inhibitory effect on the nucleotide dissociation was used for the quantification of the binding affinities towards the Ras proteins, H-Ras, Rap-1A, TC21 and R-Ras. The binding constants found range over three orders of magnitude indicating different specificities among these proteins. H-Ras binds 100 fold more tightly to Raf-kinase ($K_d = 20$ nM) than to Ral-GEF and Rap-1A vice versa binds 100 fold more tightly to Ral-GEF ($K_d = 10$ nM) than to Raf-kinase whereas R-Ras and TC21 interact with both effectors with micromolar affinity. In collaboration with Gudrun Horn residues in Rap being different from Ras were mutated and aminoacid 31 (K in Rap, E in Ras) turned out to be responsible for the difference in specificities of Ras and Rap. The threedimensional structure of the Rap/RafRBD complex was solved by Nicolas Nassar and here K84 in Raf could be identified as the discriminating residue. The corresponding aminoacid in Ral-GEF responsible for the observed specificity is not yet identified. The rate of GTP hydrolysis by Ras and Rap is little decreased by the interaction with Ral-GEF whereas binding of Raf does not change it.

In order to characterise the interaction of Ras and Raf on a molecular level residues in Ras and RafRBD implicated in binding were mutated and the affinity constants were measured. In experiments microinjecting mutated Ras proteins into PC12 cells taking the neurite outgrowth as readout or transfecting mutated Raf into RK13 cells using a coupled reporter gene assay in collaboration with Gudula Schmidt and Christoph Block, respectively, a good correlation between the Ras/Raf-affinities measured in vitro and the biological activities was found. The extent of perturbation of the interaction between Ras and its effector is quantitatively reflected by the cellular answer. This demonstrates that the Ras/Raf binding is a suitable point of attack for drugs which are meant to modulate the transduction of growth signals in Ras transformed cells.

Arbeitsgruppe Dr. J. Kuhlmann

Mitarbeiter: C. Nowak, cand. biol. M. Plaß, Dipl.-Chem. C. Volponi, Dipl.-Biol. C. Villa-Braslavski

1. Interaktion p24^{Ran} mit Ran-bindenden Proteinen

Die zellkernassoziierte GTPase p24^{Ran} spielt eine essentielle Rolle beim Import von Proteinen in den Zellkern von Eukaryonten sowie beim Export von mRNA aus dem Nukleus heraus. In Analogie zu p21^{Ras} existieren auch für Ran Austauschfaktoren, GTPase aktivierende Proteine und Effektoren, die Ran in der GTP-gebundenen Form erkennen. Gegenstand der Untersuchungen waren die Erkennung von p24^{Ran} durch das cytosolische Protein RanBP1 und die Charakterisierung der dynamischen Wechselwirkung mit Hilfe fluoreszenzspektroskopischer, kinetischer (Stopped-Flow, Surface Plasmon Resonance) und stationärer (Titrationsexperimente) Methoden. Neben RanBP1 kommen dabei in aktuellen Untersuchungen auch GST-Fusionsproteine der Ran-bindenden Domänen von RanBP2 zum Einsatz, einem 300 kD großen Protein aus dem Kernporenkomplex. Weiterhin wird im Zuge des Projektes die Kristallisation des Komplexes aus Ran und RanBP1 vorangetrieben.

2. Erkennung von p21^{Ras} durch Effektoren unter Verwendung von festphasenassoziierten Proteinen

Unter Nutzung der Surface Plasmon Resonance Technologie wurde die Erkennung von p21^{Ras} und seinem Austauschfaktor cdc25 sowie der Ras-bindenden Domäne von Raf-Kinase untersucht. Im ersten Fall wurde ein GST-Ras-Fusionsprotein an eine mit anti-GST-Antikörpern kovalent beladene Dextranmatrix hochaffin gekoppelt und nachfolgend mit cdc25 inkubiert, im zweiten Fall kam ein GST-Konstrukt der Raf-Kinase als erster Ligand zum Einsatz, welches mit Konzentrationsreihen von Ras*GMPPNP bzw. Ras*GDP inkubiert wurde.

3. Einfluß der posttranslationalen Modifikation von p21^{Ras} auf das Bindungsverhalten von Effektorproteinen

Bei der physiologischen Aktivierung von Ha-Ras ist der posttranslationale Einbau von Farnesyl- und Palmitatgruppen für den Einbau in die Plasmamembran der Zelle essentiell. Um den Effekt dieser Modifikation auf die Interaktion mit zellulären Bindungspartnern zu untersuchen, wurden erste Vorversuche unter Verwendung einer lipidhomologen Oberflächenstruktur in der Surface Plasmon Resonance durchgeführt. Prozessiertes Ha-Ras stammt in diesen Vorversuchen aus Expressionsansätzen im Baculovirus-System.

4. Weitere Projekte

Im Rahmen von Kooperationsansätzen wurden Arbeiten zum Aufbau eines molekulargenetisch-biophysikalischen Verfahrens zur Detektion mutagener Ereignisse in Primärzellkulturen sowie die Charakterisierung von natürlichen und synthetischen anti-CD4-Antikörpern durchgeführt.

1. Interaction between p24^{Ran} and Ran-binding proteins

p24^{Ran}, a nuclear GTPase, plays an important role in import of proteins into the nucleus and export of mRNA into the cytosol. In analogy to p21^{Ras} there exist nucleotide-exchange factors, GTPase-activating proteins and effectors, which recognize Ran in the GTP bound form. Our approach was to investigate the interaction between p24^{Ran} and the cytosolic protein RanBP1 by using fluorescence spectroscopy, stopped-flow kinetics and surface plasmon resonance to yield dynamic and stationary data. In addition to RanBP1 we are using GST-fusion proteins of the Ran-binding-domains of RanBP2, a 300 kD protein, which is part of the nuclear pore complex. Furthermore, we attempt to crystallize the complex of Ran and RanBP1.

2. Recognition of p21^{Ras} by effector-peptides using solid-phase-associated proteins

Taking advantage of the surface plasmon resonance technology, we investigated the recognition of p21^{Ras} by its exchange-factor cdc25 and the Ras-binding-domain of Raf-kinase. In the first case a GST-Ras fusion-protein was bound with high affinity to a dextran-matrix, covalent coupled with anti-GST-antibodies. The binary complex was incubated with cdc25 to get dynamic and stationary data. In the second case we used a GST-construct of Raf-kinase as the first ligand and used concentration-rows of Ras*GMPPNP bzw. Ras*GDP to determine binding affinities.

3. Influence of post-translational modifications on p21^{Ras} on binding-behaviour of effector-proteins

To activate Ha-Ras physiologically it is necessary to introduce farnesyl- and palmitate-groups at the C-terminus of the protein. This posttranslational modification is essential for the integration of Ha-Ras into the plasma membrane. To mimic the effect of modification and membrane association we try to use a lipidhomologue structure in the surface plasmon resonance. First approaches have been done, using processed Ha-Ras from expression in the baculovirus system.

4. Additional projects

In cooperation with other groups we try to establish a new molecular-genetic and biophysical assay to detect mutagenic events in primary cell cultures after treatment with cancerogenic agents. Furthermore, we try to characterize natural and synthetic antibodies directed against the T-helper-Cell surface protein CD4.

Arbeitsgruppe Dr. O. Müller

Mitarbeiter: J. Deka, R. Deuter, U. Fichtel, Dr. D. Hirschl, J. Linz, I. Nimmrich, D. Twiehaus

Die Arbeitsgruppe untersucht die Ursachen der Krebsentstehung und der Tumorprogression auf molekulargenetischer, biochemischer und zellulärer Ebene.

1. Projekt: Molekulargenetische Analyse von DNA-Veränderungen in Tumorgewebe und Stuhlproben von Darmkrebspatienten (R. Deuter, J. Linz, I. Nimmrich) Für die Entstehung menschlicher Tumoren sind DNA-Veränderungen in den beiden Genklassen der Tumor Suppressorogene und der Proto-Onkogene verantwortlich. Die Art und Anzahl der DNA-Veränderungen korreliert mit der Herkunft und dem Stadium der meisten Tumoren. Aus der genauen Spezifizierung der DNA-Mutationen können daher wichtige Schlüsse für Diagnose und Therapie gezogen werden. Die Arbeitsgruppe befaßt sich mit der Analyse von Veränderungen in verschiedenen Proto-Onkogenen und Tumor Suppressorogenen, die aus der DNA menschlicher Darmtumoren isoliert wurden. Dabei konnten mehrere bisher nicht bekannte DNA-Veränderungen in verschiedenen Tumor Suppressorogenen detektiert werden. Das Ziel dieser Analyse ist die Korrelation der detektierten Mutationen mit dem pathologisch diagnostizierten Stadium des jeweiligen Tumors. Die dabei gewonnenen Informationen stellen die Grundlage dar für die Entwicklung einer neuartigen molekulargenetischen nicht invasiven Diagnosemethode von Darmtumoren. Für diese Diagnostik wird körpereigene DNA aus Stuhlproben isoliert und analysiert. Da Zellen eines Darmtumors laufend in den Stuhl abgeschilfert werden, stellen die dabei detektierten DNA-Veränderungen signifikante Hinweise für die Diagnose eines Tumors dar. Als erster Schritt wurde eine neue Methode zur DNA Isolierung aus Stuhl entwickelt. Wichtigster Schritt dieser Methode ist die Entfernung PCR-inhibierender und DNA-schädigender Substanzen mit Hilfe einer Adsorptionsmatrix.

2. Projekt: Eukaryotische Expression rekombinanter Proteine (Dirk Twiehaus) Der Hauptnachteil bakteriell exprimierter rekombinanter Proteine ist der Mangel an posttranslationalen Modifikationen. Für viele funktionelle Studien sind daher eukaryotisch exprimierte Proteine besser geeignet. Verschiedene Tumor Suppressor- und Proto-Onkoproteine wurden, auch als Serviceleistung für andere Arbeitsgruppen der Abteilung, in guter Ausbeute mit Hilfe eines eukaryotischen Expressionssystems (Insektenzellen) hergestellt.

3. Projekt: Proteinstrukturelle Studien (J. Deka, U. Fichtel, D. Hirschl) Die genaue Kenntnis der dreidimensionalen Struktur eines Proteins läßt wichtige Schlüsse auf dessen biochemische und intrazelluläre Funktionen zu. Das Armadillo Sequenzmotiv ist eine sich wiederholende Domäne in vielen verschiedenen Proteinen. Die Sekundärstruktur eines einzelnen synthetischen Armadillo Motivs des Tumor Suppressorproteins APC wurde durch kernmagnetische Resonanzspektroskopie aufgeklärt. Die gelöste Struktur ist ein erster Schritt bei der Aufklärung der Struktur des gesamten APC Proteins und anderer Armadillo Proteine. Weitere Fragmente der Tumor Suppressorproteine APC, β -Catenin und hMSH2 wurden in Bakterien exprimiert und gereinigt. Der nächste Schritt ist die röntgenkristallographische Strukturanalyse dieser Proteine.

The research topic is the molecular cancer research with focus on the reasons for tumor progression on molecular genetic, biochemical and cellular level.

1. Projekt: Molecular genetic analysis of DNA alterations in tumor tissue and stool samples of patients with colorectal carcinomas (R. Deuter, J. Linz, I. Nimmrich). The development of human tumors is accompanied by DNA alterations in the two gene classes of the tumor suppressor genes and the proto-oncogenes. The chromosomal region and the number of mutations correlate with the source and the progression state of most tumors. Thus the specificity of the DNA alterations gives important hints for diagnosis and therapy. The mutations in several proto-oncogenes and tumor suppressor genes are analysed from genomic DNA of human colorectal tumors. By this method several different yet unknown DNA alterations were detected. The aim of these analysis is the correlation of the detected gene mutations with the tumor progression state which is classified by classical histochemical methods. The results of these analysis will be the basis for the development of a novel non-invasive diagnosis method of colorectal tumors. This technique is based on the purification and analysis of chromosomal DNA out of stool samples. Since cells of a colorectal tumor are continuously shed into the feces, the detected DNA alterations may be significant parameters for tumor diagnosis. As a first step a new method for the DNA purification out of stool was developed. The method is based on the removal of DNA damaging and PCR inhibiting substances such as bile acids by the use of an adsorption matrix.

2. Project: Eukaryotic expression of recombinant proteins (D. Twiehaus) The main disadvantage of bacterial expressed recombinant proteins is their lack of posttranslational modifications. For many functional studies eukaryotic expressed proteins are needed. A system for the expression of proteins in insect cells was used to express several different tumor suppressor and proto-oncoproteins. Expression services were also performed for other working groups of the department.

3. Project: Structural studies of tumor suppressor proteins (J. Deka, U. Fichtel, D. Hirschl) The exact knowledge of the three dimensional structure of a protein may open important insights into its biochemical and intracellular functions. The armadillo motif is a repeating sequence domain of several proteins with different intracellular functions. The secondary structure of a single synthetic armadillo motif of the tumor suppressor protein APC was solved by nuclear magnetic resonance spectroscopy. The solved structure is a first step towards the solution of the APC full length protein and other armadillo protein structures. Other fragments of the tumor suppressor proteins APC, β -catenin and hMSH2 were expressed in bacteria and purified. The next aims are the crystallization and X-ray structural analysis of these proteins.

Arbeitsgruppe Dr. N. Opitz

Allgemeine Thematik

Intrazelluläre Messung physiologischer Parameter (pH, pCa, pO₂, etc.) mit Hilfe geeigneter Fluoreszenz-indikatoren 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 (intrazelluläre Umverteilung der Indikatoren, intermolekulare Wechselwirkungen), experimentelle Charakterisierung zellulärer Regulationsprozesse, Ansätze einer theoretischen Beschreibung zugrundeliegender Regulationsfunktionen sowie computergestützte Simulation komplexer Regulationsvorgänge.

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)

Schwerpunkte der diesjährigen Untersuchungen bildeten erneut Messungen zu intermolekularen Wechselwirkungen verschiedener Ca²⁺-empfindlicher Indikatoren mit intrazellulären Substanzen (insbesondere Proteine). Im Rahmen von in-vitro Versuchen wurde dazu mit Hilfe von BSA (bei konstantem Calciumgehalt) die Proteinabhängigkeit der Extremratios charakterisiert. Im Falle des Indikators Fura-Red fanden wir zum Beispiel, daß bereits bei 0.1 mg/ml BSA-Gehalt der Lösung ca. 50 % der Indikatormoleküle an Proteine gebunden sind. Die Proteinabhängigkeit kann dabei formal wie die Ca²⁺-Abhängigkeit beschrieben werden, d. h. auf der Basis zweier Extremratios und eines apparenten pK_d-Wertes. Da die Proteinabhängigkeiten der Ca²⁺-dissoziierten wie aus -assoziierten Indikatorkomponente recht ähnlich verlaufen, scheint die Ca²⁺-Bindung keinen wesentlichen Einfluß auf die Proteinbindung auszuüben. Infolgedessen dürften unterschiedliche Bindungsstellen für Ca²⁺ und BSA vorliegen. Dagegen führt die Proteinbindung des Farbstoffs zu einer drastischen Verringerung der Ca²⁺-Affinität (wie bereits 1994 berichtet). Weitere Untersuchungen erfolgten im Hinblick auf pH-Querempfindlichkeiten der Ca²⁺-Indikatoren. Auf Basis der neuen SGI-Workstation (Indy) konnten erste Videosequenzen der intrazellulären Ca²⁺-Eichung erstellt werden, die es erlauben, den Proteineinfluß auf die Eichung zu visualisieren.

Zur Darstellung der Heterogenität der intrazellulären pH-Eichung erfolgten schließlich zahlreiche intrazelluläre pH-Messungen. Mit Hilfe geeigneter Auswertalgorithmen ist es dabei möglich, die Experimente auf Störeinflüsse zu kontrollieren und Eichungen bis auf Pixelcluster-Ebene hinab (mittels workstation) durchzuführen und mehrdimensional anzufitten (T. Porwol).

General subject

Intracellular measurements of physiological parameters (pH, pCa, pO₂, etc.) on the basis of fluorescent indicators and confocal laser scanning microscopy, physico-chemical and spectroscopical characterization of the applied indicators (in vitro and intracellularly), development of specialized calibrations procedures and evaluation methods in case of interfering phenomena (e. g. intracellular redistribution of indicators, unspecific intermolecular interactions), experimental characterization of cellular regulation processes, approaches for a theoretical description of basic regulation functions as well as computer-aided simulation of complex regulation processes.

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

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

Emphasis of this year's investigations has been placed again upon measurements concerning intermolecular interactions of various calcium-sensitive indicators with intracellular substances, particularly proteins. For that purpose in-vitro experiments have been performed to characterize the protein dependences of the extreme ratios using bovine serum albumin (BSA) at constant calcium concentration. For instance, in case of the fluorescent indicator FURA-RED it was found that already 0.1 mg/ml BSA suffice to bind about 50 % of indicator molecules. The protein dependence can be described theoretically in an analogous form to the calcium dependence, i. e. on the basis of two extreme ratios and an apparent pK_d-value. Since the course of the protein dependences of the calcium-associated as well as -dissociated indicator components is quite similar, binding of calcium does not seem to affect substantially the protein affinity of the indicator. As a consequence, different binding sites may be concluded. In contrast, protein binding of the indicator leads to a drastical reduction of the calcium affinity (approx. factor 30) as already reported in 1994. Further investigations were performed in view of pH cross-sensitivities of different calcium indicators (as reported in literature for FURA-II and INDO-1). Using the new SGI-workstation (Indy) first video sequences of the intracellular Ca²⁺-calibration could be generated (animated data visualization) in order to demonstrate the protein influence upon the in-situ calibration of the indicator.

Finally, to describe the heterogeneity of intracellular pH calibrations, numerous intracellular pH measurements were performed. Thanks to suitable evaluation algorithms it is possible now to control the experiments with regard to different disturbances and to conduct calibration procedures down to the level of a few pixel (pixel-cluster) by fitting the data via non-linear regression analysis using the workstation (T. Porwol).

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. rac/cdc42-PAK Komplex (M. Rudolph)

Die biochemische und strukturelle Untersuchung des Komplexes der p65^{PAK}-Protein Kinase mit den p21-ähnlichen GTP-bindenden Proteinen rac1 bzw. cdc42 soll Aufschluß über den molekularen Mechanismus der Aktivierung der Kinase geben. Bindung von rac1/cdc42 an p65^{PAK} führt zu einer Autophosphorylierung der Kinase und damit zur Aktivierung sowie zu einer nachfolgenden Reduktion der Affinität zwischen den beiden Proteinen, so daß sich der Komplex wieder auflöst. Dies legt nahe, daß p65^{PAK} auch *in vivo* den Zielpartner für rac1 bzw. cdc42 darstellt und direkt an der Signaltransduktion beteiligt ist. rac1 konnte bereits exprimiert und gereinigt werden, während die Präparation von cdc42 und p65^{PAK} erst im Anfangsstadium ist.

2. ran/ranBP1 Komplex

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe J. Kuhlmann soll versucht werden, den Komplex von ran mit dem ran-bindenden Protein ranBP1 zu kristallisieren. ran ist ein am Kerntransport beteiligtes Protein, ranBP1 ist ein GDI-Protein (GDP Dissociation Inhibitor), welches ran mit hoher Affinität komplexiert. Der Proteinkomplex liegt bereits in hochreiner Form vor, es werden zur Zeit Kristallisationsbedingungen gesucht.

3. rna1, NTF1

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe J. Becker werden die Proteine rna1, ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP), welches mit ran interagiert, und NTF1, ein im Kerntransport involviertes Protein, untersucht. Von rna1 aus *S. cerevisiae* konnten Kristalle erhalten werden, die bis 4 Å streuen, aber schlecht reproduzierbar sind. Zur Zeit wird daran gearbeitet, weitere Kristalle von NTF1 zu erhalten sowie ein ran1-homologes Protein aus *S. pombe* zu reinigen, welches stabiler als rna1 aus *S. cerevisiae* ist und somit evtl. bessere Kristalle bildet.

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. rac/cdc42-PAK complex (M. Rudolph)

Structural and biochemical investigations of the complex between the p21^{ras}-related proteins rac1 (or cdc42) and the p65^{PAK} protein kinase should reveal the molecular mechanism of activation of the kinase. The kinase complexes specifically with rac1 (or cdc42), leading to kinase autophosphorylation and activation. The active kinase has a decreased affinity for rac1/cdc42, resulting in the subsequent dissociation of the complex. This suggests that p65^{PAK} might represent the target of rac1/cdc42 *in vivo* as well as *in vitro*, thus taking part in signal transduction. The expression and purification of rac1 is well established now, whereas the preparation of cdc42 and p65^{PAK} is in progress.

2. ran/ranBP1 complex

In collaboration with J. Kuhlmann's group we started to crystallize the complex of ran and the ran-binding protein ranBP1. ran is a protein involved in nuclear transport, ranBP1 is a GDI-protein (GDP Dissociation Inhibitor), that binds ran with high affinity. The complex ran-ranBP1 was already isolated with high purity, attempts to find crystallization conditions are in progress.

3. rna1, NTF1

In collaboration with J. Becker's group the proteins ran1 and NTF1 are investigated. rna1 is a GTPase activating protein (GAP) interacting with ran, NTF1 is involved in nuclear transport. Crystals diffracting to 4 Å were obtained from rna1 from *S. cerevisiae*, whereas NTF1 yielded crystals that were diffracting to 2 Å, but were difficult to reproduce. Currently, we are trying to reproduce the NTF1 crystals as well as purifying a rna1-homologue from *S. pombe* that is more stable than rna1 from *S. cerevisiae* and thus is likely to form better crystals.

Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Wittinghofer

Mitarbeiter: Dr. R.M. Ahmadian, Dr. N. v.d. Berghe, G.Horn, Dr. R. Mittal, Dr. N. Nassar, L. Renault, G. Schmidt, Dr. K. Scheffzek, P. Stege, Dr. R. v. Pogge von Strandmann, D. Vogt

1. Die dreidimensionale Struktur von RafRBD im Komplex mit Rap1A wurde mit einer Auflösung von 2,2 Å bestimmt. Dabei zeigte sich, daß zwischen Rap und der Ras bindenden Domäne (RBD) von Raf ein kontinuierliches antiparalleles β -Faltblatt ausgebildet ist. RBD hat eine sehr ähnliche Topologie wie Ubiquitin und wie die Immunglobulin-bindende Domäne (IBD) von Protein G aus Streptokokken, und in der Struktur des Komplexes von IBD mit einem Fab Fragment ist die gleiche Art der Proteinwechselwirkung zu sehen. Die vier antiparallelen b-Stränge, die das Faltblatt zwischen den beiden Proteinen bilden, können mit den vier b-Strängen des Rap-RafRBD Komplexes deckungsgleich überlagert werden. Möglicherweise ist hiermit ein neuer allgemeiner Typ der Interaktion von Proteinen gefunden.
 2. In einer Mutationsanalyse von Rap1A zeigte sich, daß der Austausch der Aminosäuren Glu/Lys in Position 30/31 gegen Asp/Glu (so wie in Ras) genügt, um die hohe Bindungsstärke von Ras zu Raf zu erreichen. Die Röntgenstruktur von dieser Mutante im Komplex mit RafRBD wurde gelöst (1.4 Å). Es zeigte sich, daß die Einführung von Glu anstatt Lys eine Interaktion mit Lys84 im RafRBD erlaubt, welche im Wildtyp Komplex nicht möglich ist.
 3. Der pKa-Wert vom g-Phosphat im RasGTP kann für eine Reihe von Mutanten mit der GTP-Hydrolysegeschwindigkeit in eine Energie-Beziehung gebracht werden (LFER, linear free energy relation). Daraus folgt für den GTPase Mechanismus, daß das g-Phosphat die allgemeine Base ist, welche das nukleophile Wasser deprotoniert und damit aktiviert. Dieser Mechanismus könnte allgemein für alle GTPasen gelten und er wurde inzwischen auch schon für andere Proteine wie z. B. Myosin vorgeschlagen.
 4. Die in unserem Labor entwickelten LMM-(leichtes Meromyosin) Vektoren wurden für die Expression von zahlreichen Proteinen und Proteinfragmenten genutzt und es zeigte sich, daß sogar so große Proteine wie Ras-GAP oder Rap-GAP exprimiert und durch einen einfachen Präzipitations-/Dialyse-Zyklus angereichert werden können, wobei diese Proteine ihre volle enzymatische Aktivität behalten. Das mit dieser Methode gewonnene NF1-Fragment wurde für kinetische Studien der Interaktion mit Ras verwendet. Mit Hilfe der Stop-flow Methode wurde sowohl für die Bindung der beiden Proteine wie auch für die GTP-Hydrolyse je ein Fluoreszenzsignal gefunden, mit deren Hilfe die Interaktionen und GTPase-Aktivitäten von Wildtyp und mutierten Proteinen untersucht werden können.
 5. Von der katalytischen Untereinheit von Ras-GAP wurden für die Röntgen-Strukturanalyse geeignete Kristalle erhalten. Nach der Methode des multiplen isomorphen Ersatzes wurde eine Elektronendichtekarte gewonnen, mit der nun ein Molekülmodell gebaut wird.
1. The three-dimensional structure of RafRBD in complex with Rap1A was solved to 2.2 Å. It showed that the GTP-binding protein forms a continuous antiparallel β -sheet with the Ras-Binding Domain (RBD), where two strands from each molecule are used. RBD has a topology very similar to that of ubiquitin and an Immunoglobulin-Binding Domain (IBD) from Streptococcal Protein G. Incidentally the structure of a complex between IBD and the constant heavy chain of a Fab fragment shows the same type of protein-protein interaction. The four antiparallel β -strands which form the interprotein β -sheet are superimposable with the four strands from the RafRBD-Rap complex. It appears that the formation of such an interprotein β -sheet is a new type of protein-protein interaction that may turn out to be more common.
 2. A mutational analysis of Rap1A revealed that a Glu/Lys \rightarrow Asp/Glu mutation at position 30/31 was sufficient to achieve as tight binding to Raf as Ras. The X-ray structure of this mutant in complex with RafRBD and of similar mutants was solved to a resolution of 1.4 Å. It shows that the substitution of Glu for Lys at position 31 introduces a favourable interaction with residue Lys84 of RafRBD which is absent in the Rap-RafRBD complex.
 3. A mechanism for the GTPase of Ras was elaborated which suggests that the terminal phosphate of protein bound GTP is the general (or specific) base which activates the nucleophilic water. The proposal was based on NMR and biochemical studies which showed that the rate of GTP cleavage can be correlated with the pKa of the g-phosphate in a linear-free energy relationship. This mechanism could be general for all GTPases and in the meantime it has also been proposed for other proteins such as myosin.
 4. The LMM (light meromyosin)-based vectors developed in our group have been used to express a variety of proteins and protein fragments and it turned out that even large proteins such as Ras-GAP or Rap-GAP can be expressed and enriched by a simple dialysis/precipitation procedure and that these proteins are enzymatically highly active. The NF1 fragment produced by the same method was used to study the kinetics of the Ras-RasGAP interaction by stopped-flow techniques. It was found that the rapid binding of Ras-GTP to NF1 and the hydrolysis reaction can each be monitored by a fluorescence signal and this can be used to study the reaction with wildtype and mutant proteins.
 5. Crystals of the catalytic domain of GAP-334 have been obtained which are suitable for X-ray crystallography. With the multiple isomorphous replacement method an electron density map has been produced which is now used to build a model of the molecule.

Abteilung II:
Epithelphysiologie

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

Department II:
Epithelial physiology

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

Arbeitsgruppe PD Dr. E. Kinne

Mitarbeiter: J. Luig, Ch. Pfaff, H. Schütz

Charakterisierung des osmotisch regulierten Sorbit-Transportsystems in Zellen der dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife (TALH)

An Mikrosomen, isoliert aus TALH-Zellen, wurden Transportuntersuchungen mit radioaktiv markiertem Sorbit durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigen, daß der Zeitverlauf von Sorbit nichtlinear ist, d.h. einer passiven Äquilibration gleicht. Er ist außerdem temperaturabhängig. Kinetisch zeigt der Transport eine sehr geringe Affinität, bzw. ist kaum sättigbar, was auf einen Kanal als Transportweg hinweist. Die Sorbitaufnahme ist von der Anwesenheit von ATP, Kalzium, Magnesium und GTP im Inkubationsmedium abhängig. ATP- γ -S und GTP- γ -S sind ohne Wirkung. Diese Resultate weisen darauf hin, daß die Permeabilität der Zellmembran für Sorbit durch Änderungen im intrazellulären Kalzium reguliert werden kann, dadurch daß G-Proteine und eine Proteinkinase aktiviert werden. Die Mechanismen dieser Aktivierung werden z.Zt. untersucht.

Identifizierung eines Magnesiumkanals in Bürstensaummembranen der Forellenniere

Der proximale Tubulus der Forellenniere ist ein ideales Modell für Studien des Magnesiumtransportes. Werden die Fische in Süßwasser gehalten, resorbieren die Tubuluszellen Mg aus dem Primärharn, bei Adaptation an Meereswasser sezernieren sie Mg. Wir haben deshalb eine Bürstensaummembranfraktion aus der Forellenniere isoliert und mit Hilfe von ^{28}Mg versucht, die zellulären Mechanismen, die diesem Transport unterliegen, aufzuklären. Bisher konnten folgende Befunde erhoben werden: 1. Der Transport von Mg ist sehr stark abhängig vom Membranpotential, 2. Bivalente Kationen hemmen in der Reihenfolge $\text{Mg} > \text{Ca} > \text{Sr} > \text{Ba}$ und 3. stimulieren, wie PCMB und PCMBS den Transport. Die Resultate weisen auf die Anwesenheit eines Transportproteins hin, das eher die Eigenschaften eines Kanals als die eines klassischen Carriers hat (gemeinsam mit C. Freire und K. Beyenbach; Ithaca).

Wirkung von Quecksilber-haltigen Substanzen auf den Na-K-2Cl-Kotransporter in Plasmamembranen der Rektaldrüse des Haiisches

Nachdem wir in vorangegangenen Arbeiten die Eigenschaften des Na-K-2Cl-Kotransporters detailliert charakterisiert haben, haben wir nun Untersuchungen begonnen, in denen die Wirkung von HgCl_2 , Methylquecksilber, PCMB und PCMBS auf den Rubidium-, Natrium- und Chloridfluß durch dieses System untersucht werden. Dabei zeigte sich, daß HgCl_2 , aber nicht organische Quecksilber-verbindungen mit dem Transporter an der paraplasmatischen Seite in Wechselwirkung treten. Die Wechselwirkung erfolgt nahe oder direkt an der Kalium-Bindungsstelle des Kotransporters. Diese Befunde haben Bedeutung für das Verständnis der nephrotoxischen Wirkung von Quecksilber (gemeinsam mit R. Kinne).

Characterization of the osmotically regulated sorbitol transport system in the cells of the thick ascending limb of Henle's loop (TALH)

A continuous TALH cell line generated in our laboratory uses exclusively sorbitol as an organic osmolyte. When grown filters to confluency these cells release the newly synthesized sorbitol mainly into the apical compartment when the medium osmolality (Ch. Pfaff). The results of the transport studies using a light microsomal fraction derived from TALH cell cultures kept at 300 mosmol can be summarized to date as follows: Sorbitol is taken up in a non-linear time course and in a temperature-dependent manner. The transport is hardly saturable suggesting either a very low affinity of the transporter or a transport mechanism more similar to a channel than to a classical carrier. Sorbitol uptake is strongly dependent on the presence of ATP, calcium, magnesium, and to a certain extent also GTP. ATP and GTP analogues, such as ATP- γ -S and GTP- γ -S, did not exert this effect. These data suggest that the permeability of the cell membranes for sorbitol might be regulated by changes in intracellular calcium involving G-proteins and a protein kinase. Current investigations seem to have ruled out the participation of protein kinase C since the PKC inhibitory protein had no effect even at concentrations as high as 10 μ .

Identification of a magnesium channel in brush border membranes isolated from rainbow trout kidney

The proximal tubule of trout kidney is ideally suited to study epithelial Mg transport because of its high absorptive capacity for magnesium when the fish is kept in fresh water. In isolated brush border membranes uptake of ^{28}Mg was found to be increased in the presence of inside negative voltages. Alkaline-earth cations displayed the selectivity sequence VII ($\text{Mg} > \text{Ca} > \text{Sr} > \text{Ba}$) for cis-inhibition of ^{28}Mg uptake. Mg efflux was trans-inhibited by La and Gd, and Mg uptake was cis-inhibited by Mn. The sulphydryl-group reagents PCMB and PCMBS stimulated both Mg uptake and efflux. These results suggest the presence of an electrodiffusive pathway for Mg transport in trout renal membrane vesicles (together with C.A. Freire, F. Beyenbach, Ithaca)

Interaction of mercurials with the Na,K-2Cl cotransporter in plasma membranes isolated from dogfish rectal gland

Based on our detailed characterization of the properties of this cotransporter we have now studied the action of HgCl_2 , methylmercury, PCMB and PCMBS on ^{86}Rb , ^{22}Na and ^{36}Cl uptake via this cotransport system. HgCl_2 but not organic mercurials interact with the transporter at the paraplasmic side of the membrane. The site of interaction seems to be at or near the potassium binding domain. (together with R. Kinne).

Arbeitsgruppe Prof. Dr. R.K.H. Kinne

Mitarbeiter: D. Mägdefessel, Dr. P. Herter, C. Retting, B. Ruhfus, W. Wegrzyn

Molekulare Physiologie und vergleichende Biologie des epithelialen Transports

Natrium-D-Glukose-Kotransportsysteme der Niere

Im vergangenen Jahr wurde die kinetische Analyse der Natrium-Glukose-Kotransportsysteme in verschiedenen evolutionär interessanten Tierarten fortgesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, daß in der Forellenniere, einem frühen Wirbeltier, im Gegensatz zu Untersuchungen an Kaninchen und anderen Säugetieren, nur ein Natrium-Kotransportssystem vorkommt, das eine 1:1 Stöchiometrie zeigt und in seinen anderen Eigenschaften zwischen dem 2:1 System der Nierenmedulla und dem 1:1 System des Nierencortex steht (gemeinsam mit Dr. C.A. Freire und Prof. K.W. Beyenbach, Ithaca). Da andererseits in der Rochenniere nur das 2:1 System vorkommt, ist jetzt die Möglichkeit gegeben, mit RT-PCR und Klonungsstrategien die strukturellen Unterschiede der Kotransporter zu analysieren und damit Hinweise auf die Struktur-Funktions-Beziehung zu erhalten

Natrium-Phosphat-Kotransportsystem

In der Flunderniere wurde das in den Bürstensaummembranen vorhandene Na-P_i-Kotransportssystem im Hinblick auf seine Spezifität, Affinität und Stöchiometrie untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß die kinetischen Eigenschaften nicht mit denen eines kürzlich von uns ebenfalls aus der Flunderniere klonierten Na-P_i-Kotransportssystem übereinstimmen. Jetzt durchgeführte, histochemische Untersuchungen zeigen, daß letzteres System nur in den basolateralen Membranen des tubulären Segments P2 vorkommt (gemeinsam mit H. Hentschel, B. Kohl, A. Werner und W. Wegrzyn).

Transportsysteme für organische Osmolyte in Zellen der inneren Medulla der Niere

Im vergangenen Jahr wurden, mit Hilfe von HPLC und Transportstudien mit Isotopen, die wesentlichen Transportwege für organische Osmolyte charakterisiert, die bei der Volumenregulation nach Schwellung im hypotonem Medium eine Rolle spielen. Dabei zeigt sich, daß die Transportsysteme sich sowohl im Hinblick auf die zelluläre Lokalisation, durch ihre Empfindlichkeit gegen Hemmstoffe und durch ihre Signaltransduktionswege unterscheiden. Am klarsten ist z.Zt. das Bild für Sorbit, welches als Signal die Erhöhung des intrazellulären Kalziums benutzt. Diese Erhöhung führt zu einer Aktivierung des Transporters in der Anwesenheit von ATP und GTP. Diese Erhöhung ist wahrscheinlich durch eine Calmodulin-abhängige Proteinkinase gesteuert (B. Ruhfus).

Molecular physiology and comparative biology of epithelial transport

Renal sodium-D-glucose transport: functional evolution

Using isolated brush border membranes from trout kidney the kinetic parameters and the stoichiometry of the sodium-D-glucose cotransporter were determined. In this early vertebrate only one transport system with a sodium/glucose stoichiometry of one was found (together with C.A. Freire, K. Beyenbach, E. Kinne). Since previous studies showed a single 2:1 system in skate kidney, the two systems will now be compared at the protein and DNA level. RT-PCR and cloning strategies are employed to determine regions of structural homology of the transporters (together with J.-T. Lin, J. Luig, H. Schütz).

Sodium-phosphate cotransport systems

In the flounder proximal tubule it was demonstrated that the kinetic properties of the renal transport system as determined in luminal brush border membrane vesicles differ from those found after expression of the recently cloned renal transporter in oocytes, suggesting a different intracellular location. Morphological studies demonstrated that, indeed, the latter transporter is only present in the basal-lateral plasma membranes of the S₂ segment, but not in the apical membrane (together with H. Hentschel, B. Kohl, A. Werner).

Organic osmolyte release systems in renal medullary collecting duct (IMCD) cells.

Primary cultures of IMCD cells were obtained with a high transepithelial electrical resistance that show well developed tight junctional complexes and extensive lateral and basal interdigitations. The apical cell surface is covered with short blunt microvilli and carries a cilium (electronmicroscopical investigations: H. Hentschel).

These cells possess a lactate transport system and the sodium-dependent ASC system almost exclusively at the basal cell side. Efflux of sorbitol and betaine occurs only across the basal-lateral membranes. Myoinositol and taurine leave the cell predominantly across the basal cell side whereas GPC is released to an almost equal extent across both membranes.

According to activation studies (osmotic threshold) and pharmacological studies there seem to exist two different efflux systems for taurine: One is identical with the taurine channel identified in patch clamp experiments (see F. Wehner, St. Boese).

Only sorbitol release is dependent on a hypotonicity-induced increase in intracellular calcium. Accordingly, its dependence on G-proteins, stimulators of intracellular calcium release such as arachidonic acid or inhibitors such as TMB8 can be explained by the concomitant changes in intracellular calcium (in collaboration with H. Tinel and F. Wehner).

Betaine release is also stimulated by mastoparan and arachidonic acid and inhibited by PTX, however, in a calcium-independent manner. Sorbitol and taurine release are also inhibited when the intracellular ATP content is reduced.

Arbeitsgruppe: Dr. C.T. Lin

Mitarbeiter: H. Kipp, Dr. J. Kormanec, K. Rosenthal, H. Sauerwald, S. Wielert

Biochemische, immunologische und molekularbiologische Methoden zur strukturellen und funktionellen Aufklärung des Na⁺/D-Glukose-Kotransportsystems

Wir verfolgen z.Zt. zwei Forschungsthemen: Das erste ist die Aufklärung der Topologie des Na⁺/D-Glukose-Kotransportsystems (SGLT1). Es laufen zwei Projekte gleichzeitig: 1. Antikörper wurden gegen synthetische Peptide von verschiedenen Regionen des Glukose-Kotransporters erzeugt. Die immunologischen Reaktionen der Antikörper wurden mit Hilfe von Western Blots getestet. Bis jetzt zeigt AB317 eine starke und spezifische Reaktion mit dem Kotransporter. Die Antikörper sollen später an transfizierten Zellen, die den Glukose-Kotransporter überexprimieren, eingesetzt werden. 2. Ein Epitop von 6x His-tag wird in den verschiedenen Positionen in die cDNA des SGLT1-Gen eingeschoben und dann mit dem Expressionsvektor pGFP-N1 kloniert. Die Expression wird dann nach der Transfektion von verschiedenen Säugetier-Zellen mit Hilfe eines Antikörpers gegen den His-tag untersucht. Mit diesen beiden Methoden erwarten wir ausreichende Informationen über die strukturelle Topologie des Kotransporters zu bekommen.

Das zweite Ziel ist die Charakterisierung der Eigenschaften und Struktur der spezifischen Bindungsstellen für die Substrate und Inhibitoren. Drei Projekte dienen der Erreichung dieses Ziels: 1. Untersuchung der Eigenschaften der Bindungsstelle durch die Verwendung einer Reihe von Alkylglukosiden mit verschiedenen Kettenlängen und Struktur der Alkylanteile in Transportstudien und durch die Durchführung von QSAE/CoMFA-Analysen für eine Reihe von Phlorizin-ähnlichen Verbindungen und sowie für die Alkylglukoside mittels molecular modeling. Unsere Ergebnisse sprechen dafür, daß es neben der primären Bindungsstelle für den Pyranosidring unterschiedliche hydrophobische Domänen für den aromatischen Anteil des Phlorizinmoleküls und der Alkylreste gibt. 2. Affinitäts- und Photoaffinitätsmarkierung: [¹⁴C]Iodoacetamido-Phlorizin (IAP) und 6-Diazirinyll-¹⁴C]octyl-glucosid (DOG) wurden synthetisiert und für die Markierung der Bürstensaummembran von Kaninchennieren benutzt. Dies erlaubt das zugehörige Polypeptide des Kotransporters während der Reinigung mit Hilfe der trägerfreien Isoelektrofokussierung (Rotofor) und auf dem Gel festzustellen. Es wird zusätzlich festgestellt, ob das markierte Polypeptid auch mit dem AK317 identifiziert werden kann. 3. Die Konstruktion eines over-expression Systems: Dies wird z.Zt. in Hefe durchgeführt (Stamm FKY282 und sek. Mutant NY17), unter Anwendung des Expressionsvektors pYeDP1/8-10, der einen gal-induzierbaren Promotor enthält.

Biochemical, immunological, and molecular elucidation of the structure and function of the Na⁺/D-glucose cotransport system

Two major areas of research have been pursued to achieve our ultimate goals: The first one is the elucidation of the topology of the Na⁺/D-glucose cotransport system (SGLT1). For this purpose two parallel approaches are undertaken: (1) Antibodies were raised against the synthetic oligopeptides from different positions of the SGLT1 amino acid sequences, including intracellular and extracellular loops. Antibodies were tested with regard to their immunological response on Western Blot. The N-terminal antibody AB317 shows so far a strong and specific interaction with the cotransporter. The positive antibodies will then be tested on the transfected mammalian cells. (2) 6x His (epitope-tagged) tag will be inserted into different positions of the SGLT1 cDNA and cloned into the expression vector pGFP-N1 and expressed in mammalian cells. Both approaches should give information about the orientation, i.e. the structural topology of the Na⁺/D-glucose cotransporter.

The second area are the continuing studies on the nature and structure of the specific binding sites for substrates or inhibitors. Three parallel approaches are being carried out: (1) Exploration of the nature of the binding sites by determining the specific binding/transport behaviors of a series of alkylglucosides with various aliphatic chain-length and by establishment of QSAR/CoMFA analysis for a series of phlorizin analogs and alkylglucosides with computer-assisted molecular modeling. Our results suggest that, in addition to the primary binding site for the pyranoside ring, there might be different hydrophobic domains for the aromatic parts of the phlorizin and alkyl chains. (2) Affinity and photoaffinity labeling: [¹⁴C]iodoacetamidophlorizin (IAP) and 6-diazirinyll-¹⁴C]octyl-glucoside (DOG) synthesized in our group, were used to irreversibly conjugate with the isolated rabbit brush border membranes. This allows to specifically identify the glucose transport-related polypeptide during purification with carrier-free isoelectrofocussing (Rotofor) and on SDS-PAGE. In addition, it will be tested whether the labeled polypeptide can also be identified with the AB317. (3) Construction of an overexpression system: This is carried out in yeast strains using the suppression vector YeDP1/8-10 containing a gal-inducible promoter.

Arbeitsgruppe PD Dr. F. Wehner

Mitarbeiter: G. Beetz, St. Boese, A. Giffey, S. Rosin-Steiner, Dr. H. Tinel

(1) Die regulatorische Volumenzunahme von Rattenleberzellen erfolgt über eine Erhöhung des intrazellulären Na^+ , das dann über die Na^+/K^+ -ATPase gegen K^+ ausgetauscht wird. Na^+ gelangt hierbei im wesentlichen über die Aktivierung einer Leitfähigkeit in die Zelle [Wehner et al., 1995]. Hieraus ergibt sich die Frage, welche Funktion die parallel erfolgende Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers hat. Es wird deshalb z.Zt. untersucht, wie sich eine Alkalinisierung des Zytosols auf die Na^+ -Leitfähigkeit und die Na^+/K^+ -ATPase von Hepatozyten auswirkt (G. Beetz, A. Giffey, S. Rosin-Steiner, H. Tinel).

(2) Bromsulphthalein (BSP) ist ein Substrat des Bilirubin-Transportweges von Leberzellen. In intrazellulären Ableitungen führt BSP zu einer dosis-abhängigen, sättigbaren Erhöhung der K^+ -Leitfähigkeit, die durch die Gallensäuren Cholal/Taurocholal kompetitiv gehemmt/stimuliert wird. Die Aktivierung der K^+ -Leitfähigkeit durch BSP erfolgt weder über Veränderungen des zellulären pH-Wertes, der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration, noch des zellulären Volumens (G. Beetz, A. Giffey, H. Tinel).

(3) Die Untersuchung des Anionen-Kanals von Sammelrohrzellen der Rattenniere (IMCD-Zellen), der durch hypotonen Stress aktiviert wird, [Sauer et al., 1995] wurde fortgeführt. Unter symmetrische Cl^- - und Taurin-Bedingungen in der „patch-clamp whole-cell“ Konfiguration zeigt der Kanal eine sehr ähnliche Empfindlichkeit für eine Vielzahl von Inhibitoren. Außerdem ist die Aktivierungscharakteristik unter beiden experimentellen Bedingungen nahezu identisch. Hierdurch wird die Hypothese bestätigt, daß der Kanal die Freisetzung des organischen Osmolyten Taurin während der regulatorischen Volumen-Abnahme vermittelt. Zur Aktivierung des Kanals ist die Anwesenheit von intrazellulärem ATP notwendig, nicht aber dessen Hydrolyse. Nach Übergang in den aktivierten Zustand zeigt der Kanal eine sehr hohe Offen-Wahrscheinlichkeit [Boese et al., in press] (> 0.99 ; St. Boese).

(4) Im Rahmen der regulatorischen Volumen-Abnahme von IMCD-Zellen findet eine Ca^{++} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern statt (Tinel et al., 1994). Diese wird über G-Proteine, die Phospholipasen C und D, sowie Arachidonsäure vermittelt [Tinel et al., submitted](H. Tinel).

We analyze hepatic and renal ion transport processes by means of electrophysiological and microfluorometric techniques. In particular, we are interested in the mechanisms of cell volume regulation.

(1) In rat hepatocytes, regulatory volume increase is mediated by a rise in cell Na^+ which is then exchanged for K^+ after activation of the Na^+/K^+ -ATPase. This increase in cell Na^+ is mainly achieved via conductive Na^+ entry, while the contribution of Na^+/H^+ exchange appears to be minor [Wehner et al., 1995]. This raises the question if cell alkalization via Na^+/H^+ exchange may serve as the triggering mechanism for the activation of Na^+ conductance and/or Na^+/K^+ -ATPase. This hypothesis is currently under investigation by use of intracellular (Na^+ sensitive) microelectrodes and $^{86}\text{Rb}^+$ uptake experiments (G. Beetz, A. Giffey, S. Rosin-Steiner, H. Tinel).

(2) In intracellular recordings with conventional microelectrodes, we find that bromsulphthalein (BSP), which enters hepatocytes via the bilirubin pathway, leads to a dose-dependent and saturable increase in K^+ conductance. This effect is competitively inhibited by the unconjugated bile acid cholal and stimulated by the conjugated bile acid taurocholal. The activation of K^+ conductance by BSP is neither mediated by changes in cell pH, cell Ca^+ , nor cell volume. The function of this cross-talk is not yet clear. It may reflect a negative feedback inhibition of (electrogenic) BSP uptake. (G. Beetz, A. Giffey, H. Tinel).

(3) In rat inner medullary collecting duct (IMCD) cells, hypotonic stress leads to the activation of an anion channel [Sauer et al., 1995]. In whole-cell patch-clamp experiments under symmetrical Cl^- and taurine conditions, Cl^- and taurine conductances exhibit similar sensitivities to a variety of anion channel blockers. In addition, the activation profile of anion currents under both experimental conditions is similar. These results further support the hypothesis that taurine release under hypotonic stress occurs, at least in part, via anion channels. Channel activation depends on intracellular ATP but not on its hydrolysis. Once activated osmotically, the channel exhibits a very high open probability [Boese et al., in press] (> 0.99 ; St. Boese).

(4) The regulatory volume decrease of rat IMCD cells is paralleled by a Ca^{++} release from intracellular stores. This Ca^{++} release is mediated via G-proteins, phospholipases C and D, and arachidonic acid [Tinel et al., submitted] (H. Tinel).

Arbeitsgruppe Dr. A. Werner

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

Unsere Arbeitsgruppe untersucht den epithelialen Transport von anorganischem Phosphat (P_i). Im Mittelpunkt steht ein Na/ P_i Kotransportsystem, das der Familie NaPi-II zugeordnet wird. Wir haben die Flunder als Modellsystem gewählt, da hier signifikante Unterschiede in Sequenz und Gewebeverteilung auftreten im Vergleich mit den klonierten Säugetiertransportern. Hingegen sind die kinetischen Eigenschaften von Ratten- und Flunder NaPi-II kaum zu unterscheiden. Daraus folgt, daß im Fischsystem die strukturellen Voraussetzungen für P_i Transport konserviert sind. Die Untersuchung der Topologie von NaPi-II bildet ein Schwerpunkt unserer Forschung. Das zweite Thema umfaßt die zelluläre Regulation von NaPi-II. Drittens befassen wir uns mit der (intrazellulären) Lokalisation von Flunder NaPi-II. Diese Aspekte sind wichtig, da die Flunder in der Niere P_i resorbiert wie auch sezerniert. Struktur: Das Modell von NaPi-II sagt acht transmembranspannende Regionen voraus. Durch einen langen hydrophilen Loop wird das Protein quasi in zwei Untereinheiten geteilt. Wir konstruierten zwei unabhängige cDNAs, die für den ersten, beziehungsweise zweiten Teil des NaPi-II Proteins kodieren. Beide Klone wurden funktional charakterisiert mit Hilfe von *Xenopus* Oocyten. Wurden die cRNAs einzeln injiziert, konnte kein erhöhter P_i Transport gemessen werden. Die cRNAs gemeinsam injiziert führte zu einem massiv stimulierten Na/ P_i Kotransport (vergleichbar mit der Wildtyp Kontrolle). Wir kombinieren vier Strategien, um die Topologie von NaPi-II aufzuklären. (i) Drei Antikörper gegen N- Terminus, C- Terminus und gegen aa 388-441 von Flunder NaPi-II, (ii) Mutationen und Proteolyse, (iii) in vitro Translation mit Mikrosomen und (iv) Oocyten-Expression in Kombination mit Immunofluoreszenz-Messungen. Die einzelnen Schritte funktionieren. Nun versuchen wir, die verschiedenen Expressionssysteme mit den geeigneten Nachweismethoden zu kombinieren. Zelluläre Regulation: Wir haben einen NaPi-II homologen cDNA Klon isoliert ausgehend von Flunder Gonaden mRNA. Die DNA kodiert nicht für den erhofften "Mini P_i -Transporter", sondern besteht aus NaPi-II identischen Sequenzen in entgegengesetzter Orientierung. Der offene Leserahmen kodiert für ein basisches Protein von 68aa. Die Wirkungsweise dieses Antisense Produktes ist nicht klar. Eine Hybridisierung von Sense- und Antisense Produkt scheint nicht wahrscheinlich, da eine Koexpression der RNAs in Oocyten die Stimulierung des Na/ P_i Kotransports nicht beeinflusst. Lokalisierung von Flunder NaPi-II: Wir konnten sowohl NaPi-II mRNA (mittels mikrodissozierter Tubuli und RT-PCR) wie auch das entsprechende Protein im sekretorischen Teil des Flundernephrons nachweisen. Intrazellulär ist der Transporter in der basolateralen Membran lokalisiert. Dies weist auf die Beteiligung von NaPi-II an der P_i -Sekretion hin. Die Flunder exprimiert NaPi-II auch im Darm. Dort konnte gezeigt werden, daß das Transportprotein apikal sortiert wird. Flunder NaPi-II Protein scheint je nach Fütterungszustand entweder in der Membran integriert zu sein (Fütterungsperiode) oder aber in subapikalen Vesikeln (Fastenzeit) vorzuliegen.

We are interested in the epithelial transport of inorganic phosphate (P_i). We focus on a Na/ P_i cotransport system (NaPi-II) which has been cloned from several vertebrates. Winter flounder has been chosen as a model system because flounder NaPi-II exhibits distinct differences in amino acid sequence and tissue distribution compared to the mammalian transporters. The kinetic properties (affinities for Na and P_i , pH dependency) are indistinguishable between rat and flounder NaPi-II after expression in *Xenopus laevis* oocytes. Therefore, we assumed that the structural requirements for transport are conserved. Our research concentrates on structural aspects of a Na/ P_i cotransport system (flounder NaPi-II) and its regulation on cellular level. Furthermore, we determined the (intracellular) localization of flounder NaPi-II for two reasons. (i) In contrast to mammals, flounder kidney both reabsorbs and secretes P_i . (ii) Flounder expresses NaPi-II in kidney and intestine. Structure: A model of the transport protein predicts eight transmembrane spanning regions. After the first three hydrophobic domains a large hydrophilic loop divides the protein into two "units". We constructed two independent cDNAs encoding either the first or the second part of NaPi-II protein. Both clones were tested for function in *Xenopus* oocytes. If the cRNAs were injected separately, no increase in Na/ P_i transport activity was detected. The two cRNAs combined provoked a stimulation to the wild type control level. We combine four different approaches to elucidate topological features of NaPi-II: (i) three antibodies against N-terminus, C-terminus, and amino acid 388-441 of flounder NaPi-II, (ii) site-directed mutagenesis and proteolysis, (iii) in vitro translation in the presence of microsomes, and (iv) expression in oocytes in combination with immunofluorescence. To presence, the single experiments have been performed successfully. The problems we are working on consist in combining the different expression systems with the appropriate detection. Cellular regulation: We have cloned a cDNA (~700bp) homologous to NaPi-II from flounder gonads. To our surprise, the clone does not encode a "mini" phosphate carrier but represents an antisense transcript of flounder NaPi-II. It contains intron as well as exon sequences of the original NaPi-II gene. The open reading frame codes for a basic protein (isoelectric point : 12) of 68 amino acids. The mode of action of this antisense product is unclear. However, a hybridization to the sense transcript seems unlikely since coexpression of the RNA species in *Xenopus laevis* oocytes does not interfere with the stimulation of Na/ P_i cotransport activity. Localization of flounder NaPi-II: We could localize NaPi-II related mRNA by the means of microdissection followed by reverse transcription-PCR and its cognate protein by immunohistochemistry. The transporter was confined to the secretory part of the tubule at the basolateral membrane. These findings would indicate that NaPi-II contributes to tubular secretion of P_i . Interestingly, the identical protein expressed in intestine was localized apically. Whether the protein is integrated in the membrane or stored in subapical vesicles seems to depend on the feeding status of the animals.

Arbeitsgruppe PD Dr. K. Zierold

Mitarbeiter: Dr. D. Badt, S. Dongard, T. Staniszewski

Die Forschungsaktivitäten meiner Arbeitsgruppe konzentrieren sich auf zwei Mikroskopie-Methoden:

1. Analytische Elektronenmikroskopie an Zellen

Das Ziel der analytischen Elektronenmikroskopie besteht darin, den Funktionszustand der Zellen mit der intrazellulären Kompartimentierung chemischer Elemente zu korrelieren. Hinsichtlich des räumlichen Auflösungsvermögens und der analytischen Empfindlichkeit ist die Rastertransmissionselektronenmikroskopie in Verbindung mit der energiedispersiven Röntgenmikroanalyse an 100 nm dicken Kryoschnitten hierzu die geeignetste Technik. Sie erforderte allerdings die Entwicklung und Verbesserung von Kryopräparationsverfahren. Die Methode wurde auf zahlreiche biologische Fragestellungen angewendet, vor allen zur Erforschung des Elektrolytentransports in Epithelien. Zum Beispiel:

- Die Elementverteilung in Rattenleberzellen wurde gemessen in Abhängigkeit von Bedingungen bei der Gewebeentnahme, der Kryofixierung, der Zellisolierung und Kultivierung sowie von der Anwesenheit von Hemmstoffen und toxischen Metallen im Kulturmedium. Insbesondere das intrazelluläre K/Na-Verhältnis hat sich als sehr empfindlicher Parameter der Zellvitalität erwiesen.
- Die Malpighi-Gefäße der Drosophila-Larve sind ein experimentell geeignetes Modellsystem zur Untersuchung des Ionentransports in intakten Epithelien (Zusammenarbeit mit A. Wessing, Gießen). In letzter Zeit haben wir die Rolle des Golgi-Apparats und des Enzyms Carboanhydrase für den Ionentransport und die in der Zelle gefundenen Kaliumgradienten untersucht.
- Zur Untersuchung von Ionen-Transportprozessen in Pflanzen wurde in mykorrhizierten Fichtenwurzeln die Verteilung von Ionen (Cl, K, Ca) und von aufgenommenen Tracern (Sr, Cs) mit Elementverteilungsbildern dargestellt (Zusammenarbeit mit B. Frey, Birmensdorf, Schweiz).

2. Konstruktion eines Kryo-Rasterkraftmikroskops

Dieses Projekt zielt auf die hochauflösende Abbildung biologischer Membranen und Zelloberflächen ohne Kontrastierungsmittel bei tiefer Temperatur mit einem Rasterkraftmikroskop. In Zusammenarbeit mit der mechanischen Werkstatt des Instituts wurde ein Ultrahochvakuum-Behälter mit einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Kryostat konstruiert. Damit kann ein für Ultrahochvakuum geeignetes Kraftmikroskop auf eine Temperatur bis 123 K gekühlt werden. Zunächst wird die Arbeitsweise des Mikroskops hinsichtlich der erreichbaren Auflösung, Temperaturdrift und Schwingungsverhalten bei tiefer Temperatur an geeigneten Testpräparaten (z.B. Glimmer, Purpur-Membran) überprüft. Anschließend soll ein Kryotransfer-System angeschlossen werden, um in definierten Zuständen kryofixierte Zelloberflächen und Membran Proteine abzubilden.

The research activities of my working group concentrate on two methods of microscopy:

1. Analytical electron microscopy of cells

The aim of analytical electron microscopy is to correlate the functional state of the cells with the intracellular compartmentation of chemical elements. Scanning transmission electron microscopy combined with energy dispersive X-ray microanalysis of 100 nm thick freeze-dried cryosections was found to be the most feasible method with respect to spatial resolution and analytical sensitivity. The reliable use of this method required to improve and to develop suitable cryopreparation techniques. The method was applied to study various biological problems, mainly electrolyte ion transport in epithelia. For example:

- The elemental composition of rat liver cells was measured as depending on tissue sampling and cryofixation, isolation of cells, culture conditions and on inhibitors or toxic metals added to the culture medium. In particular the intracellular K/Na-ratio proved to be a very sensitive parameter indicating cell viability.
- The Malpighian tubules of Drosophila larva turned out to be a feasible model system to study ion transport in intact epithelia (in collaboration with A. Wessing, Gießen). Recently, we studied the importance of the Golgi complex and the role of the carbonic anhydrase activity for ion transport and the potassium gradients found within the cells.
- The distribution of ions (Cl, K, Ca) and of tracers (Sr, Cs) in mycorrhizal roots of spruce was imaged by elemental mapping (collaboration with B. Frey, Birmensdorf, Switzerland).

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. In collaboration with the machine shop of the institute, an ultra high vacuum container with cryostat, cooled by liquid nitrogen, was constructed. A commercially available scanning force microscope, compatible with ultra high vacuum, can be cooled within the cryostat down to 123 K. After testing the microscope performance (resolution, temperature drift, vibrations) at low temperature by measurements of known test specimens (mica, purple membrane), the experimental setup will be equipped with a cryotransfer system to make possible imaging of cell surfaces and membrane proteins immobilized by cryofixation in defined functional states.

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: M. Eilers, I. Hohenfeld, B. Lüttenberg, S. Mattar, R. Müller, M. Peters, B. Scharf, A. Scholz, J. Sydor, R. Wittenberg

1. Energietransduktion in *Natronobacterium pharaonis*

N. pharaonis, ein aerobes haloalkaliphiles Archaeobakterium, exprimiert vergleichbar mit Eubakterien große Konzentrationen von Redoxproteinen. Die Atmungskette dieser Species wurde weiter untersucht und einzelne Komponenten aufgereinigt, charakterisiert und sequenziert. Die Aminosäuresequenz von Cytochrome ba_3 konnte bestimmt werden. Der Proteinkomplex besteht aus vier Peptiden, wobei die beiden großen Untereinheiten Ähnlichkeiten und Homologien zu anderen Cytochrom c Oxydasen aufweisen. Zusätzlich konnte auch die Primärstruktur einer Succinatdehydrogenase bestimmt werden. Die Reinigung und Charakterisierung der Hauptkomponenten der natronobakteriellen Atmungskette, sowie die Bestimmung ihrer Redoxpotentiale ermöglichen nun einen ersten Einblick in die Physiologie der Atmungskette dieser haloalkaliphilen Spezies (B. Scharf, S. Mattar, R. Wittenberg).

Als alkaliphile Spezies ist *N. pharaonis* durch einen inversen pH Gradienten charakterisiert, der der 'Proton Motive Force' entgegengerichtet ist. Diese ungünstige Bedingung wird durch ein hohes Membranpotential kompensiert (-280 mV). Unter anaeroben Wachstum können die Bakterien einen Chlorid-Gradienten zur ATP Synthese ausnutzen, der durch die Licht getriebene Chloridpumpe Halorhodopsin generiert wird (R. Wittenberg).

2. Bakterielle Rhodopsine

Halorhodopsin: Nach Anregung durch Licht pumpt Halorhodopsin Chlorid über die Membran in das Cytoplasma der Bakterien. Der Mechanismus hat große Ähnlichkeit zum Protonentransfer in Bakteriorhodopsin. Der Photozyklus kann mit 7 Exponentialen angenähert werden und läßt sich unter der Annahme von 'spectrally silent transitions' mit einem sequentiellen irreversiblen Modell beschreiben (I. Chizov, M. Geeves). Die Chlorid-Aufnahme kann nicht mit der Bindungskonstante von Chlorid an hologenfreies Halorhodopsin, die durch Stop Flow Messungen bestimmt wurde, korreliert werden.

Sensory Rhodopsin II: siehe R. Seidel

3. Zellfreie Proteinbiosynthese

Die zellfreie Proteinbiosynthese von *Sensory Rhodopsin II* läßt sich mit relativ hohen Ausbeuten erzielen. Diese Beobachtung ist eine wichtige Voraussetzung sowohl für die Rekonstitution des Retinal Chromophors, als auch für die Einführung von artifiziellen Aminosäuren. Um dieses letztere Ziel zu erreichen, wurden die Bausteine für die in situ Synthese der aminoacylierten tRNA hergestellt (M. Eilers, I. Hohenfeld, R. Seidel).

1. Energy transduction in *Natronobacterium pharaonis*

N. pharaonis, an aerobic haloalkaliphilic archaeobacterium, synthesizes, like alkaliphilic eubacteria, high concentrations of redox proteins. The respiratory chain was further elucidated and the purification and characterization of the most abundant components have been accomplished. The amino acid sequence of cytochrome ba_3 has been deduced from the ORF which comprises two major subunits as well as two small peptides. Sequence homologies to other oxidases define this membrane protein as a cytochrome c oxydase. Furthermore, a membrane bound SDH was purified and the amino acid sequence was also determined. The purification and characterization of main components of the aerobic respiratory chain of *N. pharaonis* and the determination of their redox-potentials establish a first insight into the physiology of the respiratory chain of this haloalkaliphilic species (B. Scharf, S. Mattar, R. Wittenberg).

As alkaliphilic species *N. pharaonis* is characterized by an inverse pH gradient across the membrane which counteracts the proton motive force. This unfavourable condition is overcome by a high membrane potential of -280 mV. Under anaerobic growth the bacteria can utilize a chloride gradient as energy source which is generated by the light driven chloride pump halorhodopsin (R. Wittenberg).

2. Bacterial rhodopsins

Halorhodopsin: On light excitation halorhodopsin pumps chloride into the cytoplasm of the bacteria. The mechanism is closely related to the proton transfer in bacteriorhodopsin. The analysis of the photocycle of halorhodopsin reveals at least 7 exponentials. These data can be described by a sequential irreversible mechanism by assuming spectrally silent transitions. The chloride uptake cannot be correlated to the binding constant of chloride to blue halorhodopsin measured by Stop Flow techniques (I. Chizov, M. Geeves).

Sensory rhodopsin: see R. Seidel

3. Cell free protein syntheses

The cell free synthesis of sensory rhodopsin can be achieved with relatively high yields. This is a necessary requirement for the reconstitution of the chromophore as well as the introduction of artificial amino acids. In order to accomplish this latter goal, the building blocks for the final in situ generation of amino acylated amber tRNA have been synthesized (M. Eilers, I. Hohenfeld, R. Seidel).

Arbeitsgruppe Dr. M.A. Geeves

Mitarbeiter: N. Adamek, G. Holtermann, Dr. M. Ritchie, S. Kurzawa

Charakterisierung mutierter Muskelproteine von Nicht-Säugetern

Wir haben Fortschritte hinsichtlich der Charakterisierung von Myosin-Fragmenten in *Dictyostelium discoideum* (mit Dr. D. Manstein), der Exprimierung von Aktin-Mutanten in *Drosophila* (mit Dr. J. Sparrow) und der Exprimierung von Hefe-Tropomyosin in *E. coli* (mit Dr. M. Konrad) gemacht. Alle Proteine sind nun in Mengen von 1 - 100 mg verfügbar. Bezüglich des Myosins haben wir bewiesen, daß ein aus 1-763 Aminosäuren aufgebautes Myosin-Protein die kleinste funktionelle Einheit des gesamten Proteins darstellt und daß die beiden leichten Ketten, die mit dem Myosinkopf verbunden sind, nicht für seine Funktion notwendig sind. Für Aktin haben wir die biochemische Charakterisierung des Wildtyps und dreier Punktmutationen abgeschlossen; außerdem können wir überexprimiertes Tropomyosin aus *E. coli* isolieren.

Dr. Olga Nikolaeva hat die Eigenschaften von Myosin charakterisiert, das an der aktiven Stelle ADP und ein Phosphat analog (BeF_3^- , AlF_4^- , ScF^- oder Vanadat) Sowohl bei der 'differential scanning calorimetry' als auch in Protein-Fluoreszenz-Studien erscheint die Proteinstruktur signifikant unterschiedlich von der des Apo-Proteins und des M.ADP Zustandes. Es scheint, daß diese gute Analoge der M.ATP und M.ADP.Pi steady state-Komplexe darstellen. Diese Komplexe sind bedeutsam, da sie die einleitende Verbindung mit Aktin vor dem 'power stroke' eingehen, der die Kraft zwischen Aktin- und Myosinfilamenten im Muskel generiert. Innerhalb von 3 Monaten war Dr. Nikolaeva in der Lage die Interaktion von M.ADP.BeF- und M.ADP.AIF-Komplexen mit Aktin zu charakterisieren. Hierzu bediente sie sich stopped-flow-Methoden und Fluoreszenz-Labels, entweder an Aktin oder ADP gebunden. Dieses zeigt, daß der Komplex mit BeF_3^- ein gutes Analogon von M.ATP und daß der Komplex mit AlF_4^- ein gutes Analogon von M.ADP.Pi darstellt.

Dr. S.S. Lehrer: Vorausgehend hatten wir fluoreszenz-markiertes Tropomyosin am dünnen Filament eingesetzt, um das An/Ab-Schalten des dünnen Filaments in Abhängigkeit von der Interaktion mit den Myosinköpfen zu untersuchen. Bei den ersten Studien benutzten wir S1 (ein Myosinfragment mit einem Köpfchen). Der Einsatz von HMM (ein Myosinfragment mit zwei Köpfchen) brachte Information über eine ausgeprägte Kooperativität zwischen den zwei Köpfchen. In Abwesenheit von ATP binden beide Köpfchen an das Filament und zwingen es in die Aus-Stellung. Zugabe von ATP löst die Myosinköpfchen vom Aktin. Wenn 80% der Köpfchen gelöst sind, wechselt das Filament in die Aus-Stellung. Bei HMM, aber nicht bei S1, kann eine Fraktion von Köpfchen ATP hydrolysieren und sich wieder mit dem Filament verbinden, was die Abschaltung des Filaments verzögert. Diese Beobachtung könnte wichtig sein, da sie beinhaltet, daß die beiden Köpfchen von HMM alternierend arbeiten könnten, so daß immer ein Köpfchen am Aktinfilament gebunden bleibt.

Characterisation of mutant muscle proteins from non-mammalian sources

We have made significant progress on characterising myosin fragments in *Dictyostelium discoideum* (with Dr. D. Manstein), actin mutants expressed in *Drosophila* (with Dr. J. Sparrow) and yeast Tropomyosin expressed in *E. coli* (with Dr. Konrad). All proteins are now available in 1 - 100 mg quantities. For myosin we have established that a myosin of amino acids 1-763 is the smallest biochemically functional unit of the whole protein and that both light chains normally associated with the myosin head are not essential. For actin we have completed the biochemical characterisation of the wild type actin and three point mutations. For TM we have demonstrated that we can isolate overexpressed TM from *E. coli*.

Dr. Olga Nikolaeva has characterised the properties of myosin which has ADP and a phosphate analogue bound at the active site (BeF_3^- , AlF_4^- , ScF^- or Vi). In both differential scanning calorimetry and protein fluorescence studies the protein structure appears to be significantly different from both that in the apo-protein and in M.ADP, and suggests that these may be good analogues of the M.ATP and M.ADP.Pi steady-state complexes. These complexes are important, since they make the initial complex with actin before the „power stroke“ which generates the force between actin and myosin filaments in muscle. In three months Dr. Nikolaeva was able to characterise the interaction of the M.ADP. BeF_3^- and M. ADP. AlF_4^- complexes with actin using stopped flow methods and fluorescent labels attached to either actin or ADP. These suggest that the complex with BeF_3^- is a good analogue of M.ATP and that with AlF_4^- is a good analogue of M.ADP.Pi.

Dr. S.S. Lehrer: We had previously used a fluorescent label covalently attached to tropomyosin on the thin filament to report the *on/off* state change of the thin filament in response to interaction with myosin heads. The previous studies used S1 (a single headed fragment of myosin) but HMM (a two headed fragment) showed evidence of pronounced cooperativity between the heads. Thus, in the absence of ATP both heads bind to the filament and force it into the on state. Addition of ATP releases the heads from actin and when 80% of the heads are released, then the filament switches to the off-state. However, for HMM, but not for S1, a fraction of the heads can hydrolyse ATP and rebind to the filament, thus slowing the rate at which the filament switches off. This observation may be important, since it suggests that the two heads of HMM can operate alternately, thus keeping one head attached to the filament.

Arbeitsgruppe Prof. Dr. R.S. Goody

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

HIV Unsere detaillierten kinetischen Studien führten zu der Formulierung des kinetischen Mechanismus der DNA-Polymerisation der Reversen Transkriptasen von HIV-1 und HIV-2. Auf der Grundlage dieser Information können nun die Wirkungsmechanismen der zwei wichtigsten Inhibitorclassen definiert werden (beide werden in der AIDS-Therapie eingesetzt). Wir haben eine Reihe von Mutanten der Reversen Transkriptase gereinigt, um das schwerwiegende Problem der Arzneimittelresistenz von Patienten, die mit Nucleosid- oder Nonnucleosidinhibitoren behandelt wurden, studieren zu können. Die Modifikation der Inhibitorinteraktion mit diesen resistenten Mutanten kann nun charakterisiert und auf einzelne Schritte im Mechanismus bezogen werden. Wir sind besonders daran interessiert, den Mechanismus der Resensibilisierung von Mehrfachmutanten gegenüber Nucleosidinhibitoren zu verstehen, da das für das Design einer Kombinationschemotherapie mit mehreren Wirkstoffen von Bedeutung ist. Die Dimerisierungsreaktion der Reversen Transkriptasen von HIV-1 und HIV-2 wurde eingehend untersucht. Es wurde gezeigt, daß die Dimerisierung ein Zwei-Schritt-Prozeß ist und daß das anfänglich entstehende Dimer, obwohl es stabil ist, als DNA-Polymerase inaktiv ist. Untersuchungen zur Inhibition des Dimerisierungsprozesses werden nun durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß Peptide, die Regionen aus dem Interfacebereich der beiden RT-Untereinheiten beinhalten, effektive Inhibitoren sind. Sie sind der Ausgangspunkt für die Entwicklung von Peptiden oder Peptidomimetika als chemotherapeutische Wirkstoffe.

GTPasen Die Einzelschritt-Kinetiken der kleinen GTPasen Rab5 und Rab7 (die am zielgerichteten Proteintransport und Proteintypen in der Zelle beteiligt sind) wurden untersucht und mit anderen kleinen GTP-bindenden Proteinen verglichen. Die Ergebnisse wurden unter Einbeziehung der noch unveröffentlichten 3-D Struktur von Rab7 und im Kontext der biologischen Eigenschaften der Proteine überprüft und erklärt. Ähnliche Studien mit dem ribosomalen Faktor EF-Tu führten zu einer detaillierten Untersuchung der Kinetik des von EF-Ts katalysierten Nucleotidaustausch-Mechanismus (Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von M. Sprinzl, Bayreuth). Wie bereits bei anderen Systemen dieses Typs, die in Zusammenarbeit mit der Gruppe von F. Wittinghofer untersucht worden sind, zeigten diese Studien, daß die Austauschaktivität nicht GDP-spezifisch sondern eine allgemeine Nucleotidaustauschaktivität ist. Zusammen mit der kürzlich bestimmten 3-D Struktur des EF-Tu.EF-Ts Komplexes sollten diese Daten dazu beitragen, den Mechanismus eines solchen Austauschprozesses auf atomarer Ebene zu definieren. Solche Prozesse (d.h. Kommunikation zwischen Bindestellen von Nucleotiden und anderen Ligandenbindestellen) sind für die Biologie von zentraler Bedeutung, da sie an einfachen Austauschreaktionen, an nucleotidabhängigen Interaktionen mit Effektoren, an nucleotidabhängigen Interaktionen mit „docking“-Proteinen, an Chaperonenaktivität und an Energie-transduktionsmechanismen beteiligt sind.

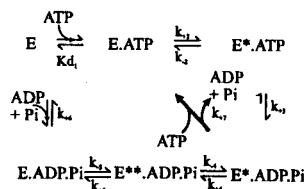
HIV Our detailed kinetic studies have led to formulation of the kinetic mechanism of DNA-polymerisation for HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptases. On the basis of this information, the mechanisms of action of the two most important classes of inhibitors (both of which are used for AIDS-therapy) can now be defined. We have prepared a series of reverse transcriptase mutants to study the serious problem of drug resistance in patients treated both with the nucleoside-inhibitors and the non-nucleoside inhibitors. The modification of interaction with these inhibitors in the resistant mutants can now be characterized and related to individual steps in the mechanism. We are particularly interested in understanding the mechanism of resensitization towards nucleoside inhibitors in multiple mutants, since this is of importance for the design of multidrug chemotherapy. The dimerisation reaction of the reverse transcriptases from HIV-1 and HIV-2 have been investigated in detail. It was shown that dimerisation is a two-step process, and that the initially produced dimer, while stable, is inactive as a DNA-polymerase. Studies aimed at inhibiting the dimerisation process are in progress, and peptides derived from the interface between the two subunits have been shown to be effective inhibitors. They are the starting point for the development of peptides or peptidomimetics as chemotherapeutic agents.

GTPases The single-step kinetics of the small GTPases Rab5 and Rab7 (involved in protein sorting and trafficking in the cell) have been investigated and compared with other small GTP-binding proteins. The results have been examined and explained with reference to the as yet unpublished 3-D structure of Rab7 and in the context of the cell biological properties of the proteins. Similar studies on the ribosomal factor EF-Tu have been extended to a detailed examination of the kinetics of the mechanism of nucleotide exchange catalysed by EF-Ts (collaboration with the group of M. Sprinzl, Bayreuth). These have shown that, as for other systems of this type investigated in collaboration with the group of A. Wittinghofer, the exchange activity is not a GDP-specific effect, but a general nucleotide-exchange activity. Together with the recently determined 3-D structure of the EF-Tu.EF-Ts complex, these data should help to define the mechanism of such exchange processes at the atomic level. Such processes (i.e. communication between nucleotide and other ligand binding sites) are of central importance for biology, being involved in simple exchange reactions, nucleotide-dependent interactions with effectors, nucleotide-dependent interactions with "docking" proteins, chaperone activity and in energy transduction mechanisms.

Arbeitsgruppe Dr. Joachim Reinstein

Mitarbeiter: P. Herde, H. Theyssen, H.-P. Schuster, D. Klostermeier, L. Packschies

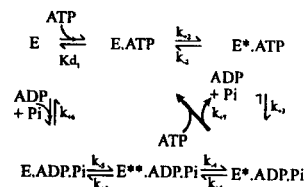
Molekulare Chaperone: Die Anwendung der neuen fluoreszierenden Nukleotidanaloge MABA-ADP und MABA-ATP in Verbindung mit dem nukleotidfreiem molekularen Chaperon DnaK und der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz von DnaK führte uns zu der folgenden Beschreibung des katalytischen Zyklus von DnaK.



ATP bindet an DnaK in einem Zweischrittbindungsmechanismus mit einem anfänglich schwachen Komplex ($K_{d1} = 7.3 \mu\text{M}$) der schnell gebildet wird, gefolgt von einem zweiten, langsamen Schritt mit $k_{+2} = 1.5 \text{ s}^{-1}$ und $k_{-2} \leq 1.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ der gleich oder langsamer als die beobachtete Ratenkonstante der Hydrolyse mit $k_{+3} = 1.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ist. Schritt 2 scheint von zentraler Bedeutung für die Aktivität des Chaperons zu sein da er mit der Peptidfreisetzung gekoppelt ist, die durch die Bindung von ATP bewirkt wird ($k_{\text{off peptide}} = 3.4 \text{ s}^{-1}$). Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um eine Konformationsänderung die DnaK von einem hochaffinen Zustand zu einem niedrigaffinen Zustand im Sinne der Peptidbindung schaltet. Die Population der verschiedenen konformationellen Zustände von DnaK scheint hauptsächlich von den zwei ratenlimitierenden Schritten des Gesamtzyklus abzuhängen. Ratenlimitierend ist die ATPase Aktivität mit $k_{+3} = 1.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ gefolgt von der Produktfreisetzung mit $k_{+7} = 7.5$ bis $15 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Der hauptsächlich besetzte Zustand in diesem unstimulierten ATPase Zyklus ist $\text{E}^* \cdot \text{ATP}$, die Form von DnaK die eine niedrige Affinität für Peptide besitzt im Gegensatz zu $\text{E}^* \cdot \text{ADP} \cdot \text{Pi}$ welches wahrscheinlich einen hochaffinen Zustand im Sinne der Peptidbindung besitzt. Wegen der Ähnlichkeit der Ratenkonstanten mit denen $\text{E}^* \cdot \text{ATP}$ und $\text{E}^* \cdot \text{ADP} \cdot \text{Pi}$ abgebaut werden sind diese beiden wichtigen Enzymzustände ideal geeignet um durch einen ATPase stimulierenden Faktor (DnaJ) der k_{+3} steigert und dadurch die Population von $\text{E}^* \cdot \text{ATP}$ versus $\text{E}^* \cdot \text{ADP} \cdot \text{Pi}$ erhöht, und einen Nukleotid austauschfaktor (GrpE) der k_{+7} steigert und dadurch den entgegengesetzten Effekt haben würde. Der ATPase Zyklus von DnaK bewirkt dadurch eine empfindliche Balance von mindestens 2 Enzymformen die anscheinend in ihrer Affinität und Austauschraten des Peptides alternieren und stellt hiermit einen zyklischen Puffer für Peptide und entfaltete Proteine da, der durch die chemische Energy von ATP angetrieben wird.

UMP/CMP-Kinase: Die Struktur von UMP/CMP-Kinase von *dictyostelium discoïdum* komplexiert mit dem Bisubstratinhibitor UP_5A wurde in Kolaboration mit Dr. Klaus Scheffzek durch Röntgenkristallographie gelöst und brachte uns neue Erkenntnisse wie NMP:ATP Phosphotransferasen Substratspezifität erreichen.

Molecular chaperons: The application of the novel fluorescent nucleotide analogs MABA-ADP and MABA-ATP in combination with the nucleotide free molecular chaperone DnaK and the intrinsic tryptophan fluorescence of DnaK led us to the following description of the catalytic cycle of DnaK



ATP binds to DnaK in a two step binding mechanism with an initial weak complex ($K_{d1} = 7.3 \mu\text{M}$) that is formed rapidly followed by a second slow step with $k_{+2} = 1.5 \text{ s}^{-1}$ and $k_{-2} \leq 1.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ that is equal or smaller than the observed rate constant of hydrolysis with $k_{+3} = 1.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Step 2 appears to be central for the activity of the chaperone since it correlates with peptide release caused by the binding of ATP ($k_{\text{off peptide}} = 3.4 \text{ s}^{-1}$) and is presumably a conformational change that switches DnaK from the high affinity state to the low affinity state of peptide binding.

The population of the different conformational states of DnaK appears to be dependent mainly on two steps of the overall cycle. Rate limiting is the ATPase activity with $k_{+3} = 1.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ followed by product release with $k_{+7} = 7.5$ to $15 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. The state that would be predominantly occupied in this unstimulated ATPase cycle is $\text{E}^* \cdot \text{ATP}$, the form of DnaK that we showed to have low affinity for peptides as opposed to $\text{E}^* \cdot \text{ADP} \cdot \text{Pi}$ which is likely to constitute a high affinity state for peptide binding.

Because of the similarity of the rate constants by which $\text{E}^* \cdot \text{ATP}$ and $\text{E}^* \cdot \text{ADP} \cdot \text{Pi}$ decompose, these two important enzyme states are well suited to be regulated by an ATPase stimulating factor (DnaJ) that increases k_{+3} and thus decreases the population of $\text{E}^* \cdot \text{ATP}$ versus $\text{E}^* \cdot \text{ADP} \cdot \text{Pi}$, and a nucleotide exchange factor (GrpE) that increases k_{+7} and would therefore have the opposite effect. The ATPase cycle of DnaK thus brings about a delicate balance of at least 2 enzyme forms that apparently alternate in their affinity and exchange rates of peptide and thus constitutes a cycling buffer for peptides or unfolded proteins that is driven by the chemical energy of ATP.

UMP/CMP-kinase: The structure of UMP/CMP-kinase from *dictyostelium discoïdum* complexed with the bisubstrate inhibitor UP_5A solved in collaboration with Dr. Klaus Scheffzek by X-ray crystallography has allowed us to gain new insights how NMP:ATP phosphotransferases achieve specificity.

Arbeitsgruppe Dr. A.J. Scheidig

Mitarbeiter: A. Beste, C. Burmester, U. Hoffmann, K. Illner

Analyse der Struktur-Funktions-Beziehung von Biomakromolekülen:

Die Röntgenstreuung an Einkristallen ermöglicht die Strukturanalyse mit atomarer Auflösung. Für das Verständnis der Wirkungsweise und Regulation von Proteinen sowie deren Wechselwirkung mit anderen Komponenten der Zelle (Peptide, Nukleotide, weitere Proteine, RNA und DNA etc.) nimmt die Kenntnis dieser dreidimensionalen Struktur eine Schlüsselstellung ein. In günstigen Fällen ist es zusätzlich möglich, die Reaktion im Proteinkristall ablaufen zu lassen und simultan die stattfindenden strukturellen Änderungen im Protein mittels einer speziellen Technik, der Röntgenstrukturanalyse, zeitaufgelöst zu verfolgen.

In unserer Gruppe werden verschiedene Systeme strukturell analysiert. Besonderes Augenmerk richtet sich hierbei auf die Analyse von Mehrkomponenten-Systemen wie Protein-Protein-, Protein-DNA- und Protein-RNA-Komplexen. Das aktuelle Forschungsinteresse gilt der strukturellen Analyse von am vesikulären Transport beteiligten Proteinen (Rab5, Rab5-GDI und Rabaptin), von Proteinkinasen (IDH K/P und MLCK) sowie der p48 Komponente des Signalerkennungspartikels aus *E. coli* im Komplex mit 4.5S RNA.

Weiterhin beschäftigen wir uns mit der methodischen Entwicklung der zeitaufgelösten Röntgenkristallographie. Schwerpunkt hier ist die Konstruktion eines Fluoreszenz-Spektralphotometers für die synchrone und streuunabhängige Verfolgung von Reaktionen in Kristallen.

Analysis of the structure-function relationship of biomacromolecules

With the technique of single crystal X-ray diffraction it is possible to determine the structure of proteins and other biomacromolecules with atomic resolution. The knowledge of the three dimensional structure represents an important step for the understanding of the function and regulation of enzymes, as well as the interactions of proteins with other components of the cell (such as peptides, nucleotides, other proteins, RNA and DNA etc.). In some special cases it is even possible to perform the enzymatic reaction inside the crystal and by the use of time-resolved X-ray diffraction techniques to monitor the conformational rearrangements of the protein connected to the reaction.

In our group we are mainly focussed on the structural analysis of complexes formed between different proteins or between proteins and DNA and RNA, respectively. Currently we are working on proteins involved in the vesicular transport (Rab5, Rab5-GDI und Rabaptin), on protein kinases (IDH K/P und MLCK) and the p48 component of the signal recognition particle of *E. coli* in complex with its 4.5S RNA.

Furthermore, we are working on the development of a micro fluorescence spectralphotometer for the online combination with time-resolved crystallography. The goal is to monitor and to control the progress of the reaction in the crystal with two independent methods: X-ray diffraction and fluorescence spectroscopy.

Arbeitsgruppe Dr. I. Schlichting

Mitarbeiter: D. Klostermeier, Dr. A. Lavie, Dr. 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 Verlauf 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 (1). Ein großer Teil unserer Arbeit besteht deshalb 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 Komplex mit dem Substrat Sauerstoff mittels Diffusion gebildet; anschließend wurden die Röntgendaten Laue- oder cryokristallographisch erfaßt. Im Fall von Myoglobin wurde Licht zur Spaltung der Bindung zwischen Kohlenmonoxid (CO) und dem Häm-Eisen verwendet, um ein Intermediat der Ligandenbindung zu bilden, in dem sich das CO noch in der Bindungstasche befindet. Dieser Zustand 'lebt' bei Raumtemperatur nur milliardstel Sekunden; um ihn ausreichend für die Röntgendatensammlung zu stabilisieren, wurden die Kristalle auf Heliumtemperaturen (20 K) gekühlt. Diese Messungen stellten nicht nur einen technischen Meilenstein in der Tieftemperatur-Proteinkristallographie dar, sondern erlaubten auch Aussagen über den Mechanismus der Ligandenbindung in Myoglobin im speziellen und der Familie der Hämproteine im allgemeinen (2). Diese Untersuchungen haben wir fortgeführt und neben einem weiteren Zwischenzustand die strukturellen Ursachen für die drei spektroskopisch unterscheidbaren Konformationen des gebundenen CO anhand von Datensätzen atomarer Auflösung charakterisiert. Neben zeitaufgelöster Kristallographie führen wir auch konventionellere Studien durch wie die Kristallisation etwa von Chaperon-Proteinen oder die Strukturbestimmung von Thymidilat-Kinase.

We are interested in understanding the workings of proteins or enzymes. This requires knowledge of the dynamic behaviour 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 passway. 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 the *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*) (1). We are using a combination of mono- and polychromatic X-ray diffraction techniques at ambient and cryogenic temperatures to study intermediates in the reactions performed by two oxygen binding heme proteins, namely the mono-oxygenase cytochrome p450 and the oxygen-storage protein myoglobin (Mb). Diffusion of the substrate oxygen is used to generate the crystalline Michaelis complex in the case of p450. In the case of myoglobin, photolysis is used to split the bond between the ligand and the heme iron to generate intermediates in the binding process. Since these states decay on a sub-nanosecond time scale at room temperature, we use cryogenic temperatures (down to 20K) to stabilize them long enough for monochromatic X-ray data collection. In addition to a photo-relaxed state of the dissociated Mb-carbonmonoxide (CO) complex (2), we collected several Mb data sets to high and atomic (1.1 Å) resolution. The latter allowed us to identify the structural origin of the three main conformers of Mb-CO as seen by spectroscopy.

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

(1) Schlichting, I.: „Die vierte Dimension in der Kristallographie“, *Chemie in unsere Zeit*, **29**, 230-240, (1995)

(2) Schlichting, I., Berendzen, J., Phillips, G.N.Jr. und Sweet, R.M.: „Crystal structure of photolysed carbonmonoxy-myoglobin“, *Nature*, **371**, 808-812, (1994)

Arbeitsgruppe Dr. R.P. Seidel
Mitarbeiter: M. Hülseweh

Die Phototaxis in den halophilen Archaeobakterien wird durch zwei Membranrezeptoren das Sensorische Rhodopsin I und II vermittelt. Der für die photophobe Reaktion verantwortliche Rezeptor, das Sensorische Rhodopsin II, und der zugehörige Transducer (HtrII) aus dem haloalkaliphilen Bakterium *Natronobacterium pharaonis* wurden im letzten Jahr kloniert und sequenziert (Seidel et al., 1995).

Für weitere funktionelle und strukturelle Untersuchungen verfolgen wir drei unterschiedliche Wege, um ein geeignetes Expressionssystem zu entwickeln. In einem ersten Versuch wurde ein Expressionsvektor konstruiert, in dem das sopII-Gen unter der Kontrolle des T7-Promotors steht. Diese Konstrukte sind in *E. coli* Zellen sehr effektiv. Ein hauptsächliches Problem dieses heterologen Expressions-Systems liegt noch in der Ausbildung von Proteinaggregaten. Zur Zeit untersuchen wir die Bedingungen für die Aufreinigung, Solubilisierung sowie der funktionellen Rekonstitution des Proteins mit *all-trans* Retinal in Lipid-Detergenz-Micellen.

Zusätzlich arbeiten wir an der Entwicklung eines homologen Expressions-Systems (B. Lüttenberg). Da bisher noch keine geeigneten Transformations- und Selektionsmethoden für *N. pharaonis* entwickelt wurden, arbeiten wir zur Zeit mit einem *Halobacterium salinarium* Expressionssystem, für welches bereits etablierte Methoden zur Verfügung stehen.

Als dritten Ansatz haben wir SRII mit Hilfe eines zellfreien Expressionssystems produziert. Diese Methode erlaubt uns letztlich einen orts-spezifischen Einbau von Isotopen markierten Aminosäuren in das Protein.

Phototaxis in halophilic archaeal species is mediated by two integral membrane proteins, the Sensory Rhodopsins I and II. The receptor for the photophobic response the Sensory Rhodopsin II (SRII) and its transducer HtrII has been cloned and sequenced previously (Seidel et al., 1995).

For further functional and structural analysis three different approaches to over-express SRII were pursued. In a first attempt, we constructed an expression vector with the gene under control of the T7-promotor, which works efficient in *E. coli* cells. The main problem with this heterologous expression system is still the tendency of the expressed protein to form aggregates. At present, we are investigating the conditions for purification, solubilization and functional reconstitution of the protein with *all-trans* retinal in mixed lipid-detergent-micelles.

In addition to the heterologous expression system, a homologous expression system is established (B. Lüttenberg) which should enable us to obtain functional SRII. So far, suitable transformation and selection methods for *Natronobacterium pharaonis* have not been developed. Thus, a *Halobacterium salinarium* expression system was additionally chosen for which the methods are already established.

In a third approach, SRII was expressed in a cell-free system. This method would finally allow the site-specific introduction of isotope labeled amino acids.

Arbeitsgruppe Dr. E. Weinhold

Mitarbeiter: N. Bleimling, B. Holz, M. Pignot, H. Pues, J. Wölcke

Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen an DNA-Methyltransferasen: Die DNA-Methylierung wird sowohl bei den Prokaryonten als auch bei Eukaryonten angetroffen und stellt formal eine Erhöhung des Informationsgehalts der DNA dar. Sie ist an einer Vielzahl von biologischen Funktionen beteiligt (Schutz vor endogenen Restriktionsendonukleasen, Reparatur von Basenfehlpaarungen und Regulation der Genexpression) und wird von den DNA-Methyltransferasen (DNA-MTasen) katalysiert, die die aktivierte Methylgruppe des Cofaktors *S*-Adenosyl-L-methionin auf N6 von Adenin und N4 bzw. C5 von Cytosin übertragen.

Schwerpunkt unserer Arbeitsgruppe ist die Untersuchung der Beziehung zwischen Struktur und Aktivität der adeninspezifischen DNA-MTase aus *Thermus aquaticus* (*M.TaqI*), deren 3-D Struktur im Komplex mit dem Cofaktor durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt wurde. Leider ist es bisher noch nicht gelungen, *M.TaqI* im Komplex mit dem DNA-Substrat zu kristallisieren, so daß wir zur Untersuchung der molekularen Wechselwirkungen zwischen *M.TaqI* und der DNA einen biochemischen Ansatz verfolgen. *M.TaqI* katalysiert die Methylierung von Adenin innerhalb der doppelsträngigen 5'TCGA3'-Sequenz. Steady-state-kinetische Untersuchungen von *M.TaqI* haben gezeigt, daß DNA-Substrate mit Pyrimidinbasen in 3'-Nachbarschaft zum Adenin größere Umsatzgeschwindigkeiten liefern, als Substrate mit Purinbasen. Dieser kinetische Effekt korreliert mit der geringeren Basenstapelungsenergie zwischen Adenin und einer Pyrimidinbase im Vergleich zu der größeren Stapelungsenergie zwischen Adenin und einer Purinbase. Es liegt also nahe, daß die Basenstapelung zwischen Adenin und seinem 3'-Nachbarn während der Katalyse aufgehoben wird.

Wir haben außerdem ein DNA-Analogon synthetisiert, in dem das Adenin fehlt. Dieses DNA-Analogon bindet in einem Gel-Mobilitätstest im Vergleich zu dem normalen DNA-Substrat ca. 30mal besser an *M.TaqI*, was zunächst erstaunlich erscheint. Ein entsprechendes Bindungsverhalten wurde aber auch für eine C5-Cytosin-DNA-MTase (*M.HhaI*) beobachtet, so daß ein ähnlicher DNA-Bindungsmechanismus für beide Enzyme naheliegt. Die Struktur von *M.HhaI* konnte im Komplex mit der DNA durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden und zeigt, daß *M.HhaI* die zu methylierende Base vollständig aus der DNA herausklappt.

Des Weiteren haben wir das Adenin innerhalb der Erkennungssequenz durch das fluoreszierende 2-Aminopurin ersetzt. 2-Aminopurin kann wie Adenin mit Thymin ein Basenpaar bilden, und seine Fluoreszenz ist innerhalb von doppelsträngiger DNA stark herabgesetzt. Durch Titration dieses DNA-Analogons mit *M.TaqI* steigt die 2-Aminopurin-Fluoreszenz bis auf das Zehnfache, was direkt auf eine extrahelikale Zielbase im *M.TaqI*-DNA-Komplex hindeutet.

Zusammengefaßt zeigen diese Ergebnisse, daß der bisher nur für C5-Cytosin-DNA-MTasen beschriebene Basen-Ausklappmechanismus auch von einer adeninspezifischen DNA-MTase benutzt wird.

Structure-Activity Studies of DNA Methyltransferases: Many organisms ranging from prokaryotes to eukaryotes expand the information content of their genome through methylation of specific DNA sequences. DNA methylation is catalysed 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 and is involved in many biological functions, including protection against endogenous restriction endonucleases, repair of DNA mismatches and regulation of gene expression.

We are studying the DNA-MTase from *Thermus aquaticus* (*M.TaqI*), which is a very interesting target for structure-activity studies, because its 3-D structure in complex with the cofactor has been elucidated by X-ray crystallography. Since cocrystallisation of *M.TaqI* with the DNA substrate has proved to be difficult, we have chosen a biochemical approach to gain further insight into the protein-DNA interaction. *M.TaqI* catalyses the methylation of adenine within the double stranded 5'TCGA3' DNA sequence. We have performed a detailed kinetic analysis of *M.TaqI* and found out that steady state kinetic rates depend on the nature of the 3'-neighbour base of the target adenine. In general, DNA containing the pyrimidine bases thymine or cytosine next to adenine give higher rates than DNA containing the purine bases adenine or guanine. This observed kinetic effect correlates inversely with the lower base stacking energies between purine and pyrimidine bases compared to those between two purine bases. A contribution of the energy needed to break the base stacking between the adenine and its 3'-neighbour to the rate-limiting step is therefore suggested.

We have also introduced a stable abasic site into double stranded oligonucleotides and measured binding to *M.TaqI* in a gel mobility shift assay. We observed that binding of *M.TaqI* to DNA bearing an abasic site at the target position is enhanced about 30 fold compared to regular DNA. This observation is surprising. However, a similar binding effect was obtained for a C5-cytosine-DNA-MTase (*M.HhaI*), which has been studied by X-ray crystallography and flips out its target base in the protein-DNA complex. This result points to a common mechanism of *M.TaqI* and *M.HhaI* in handling the target base.

In addition to the abasic site, we have introduced the fluorescent 2-aminopurine base into oligonucleotides. 2-Aminopurine can base pair with thymine and its fluorescence is highly quenched in DNA. Upon titration of DNA bearing 2-aminopurine at the target site with *M.TaqI*, the 2-aminopurine fluorescence is enhanced about 10 fold. This observation directly points to an extra helical target base in the *M.TaqI*-DNA complex.

In summary, these results give the first experimental evidence, that a base flipping mechanism described for C5-cytosine-DNA-MTases also operates in an adenine specific DNA-MTase.

**Z.Zt. dem Kollegium
direkt unterstellte
Arbeitsgruppen**

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

Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Acker

Mitarbeiter: B. Bölling, W. Ehleben, E. Merten, T. Porwol, M. Wartenberg

Das dreidimensionale Wachstum von Tumoren kann in der Gewebekultur mit Hilfe der multizellulären Sphäroidkultur unter Verwendung von menschlichen Tumorzelllinien oder Biopsiematerial von Tumorpatienten nachvollzogen werden. Die antiproliferative Wirkung verschiedener Therapieverfahren (Bestrahlung, Zytokine, Zytostatika oder Gentherapie), die mit Hilfe dieses Gewebekulturmodells beobachtet werden kann, ist vergleichbar mit der Wirkung im Patienten. Mikromilieubedingungen charakterisiert durch einen Quotienten aus PO_2 -pH Gradienten innerhalb der Sphäroide tragen entscheidend zur Effizienz von Bestrahlungen bei. Ein hoher Quotient, wie er bei oxidativem Stoffwechsel zu finden ist, kann mit einer hohen Strahlenempfindlichkeit korreliert werden (Kolonkarzinom), während ein niedriger Quotient, wie er typisch für einen glykolytischen Stoffwechsel ist, mit einer niedrigen Strahlenempfindlichkeit einhergeht (Glioblastom). Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen, die den zellulären Vitalitäts- (Calcein) oder Lethalitätszustand (Lucifer Yellow, Ethidium Homodimer) anzeigen, wurde die zytostatische Wirkung von Doxorubicin (400 nM, 48 hrs) an menschlichen Prostatatumorzellen in der Sphäroidkultur visualisiert. Sphäroide mit einem Durchmesser $< 150 \mu m$ waren resistent gegenüber der Behandlung, während in Sphäroiden $> 350 \mu m$ eine ansteigende Zahl von abgetöteten Zellen zu bemerken war. Da wir bei den größeren Sphäroiden eine zentrale Anreicherung von Doxorubicin fanden, scheint die Effizienz dieses Zytostatikums von einer längeren, kritischen Medikamentenkonzentration im Gewebe abzuhängen. Interferon β und γ haben eine ausgezeichnete antiproliferative Wirkung bei menschlichen Melanomtumorzellen in der Monolayerkultur, während diese Wirkung in der Sphäroidkultur sehr abgeschwächt wird, ähnlich der Situation im Patienten. Studien über die Kinetiken des Zellzyklus zeigen, daß Interferon β DNA-Synthese, Apoptose und Angiogenesefaktorproduktion (VEGF) erhöht, während Interferon γ DNA-Synthese erniedrigt, Apoptose erhöht und keine Effekt auf die VEGF Produktion hat. Da H_2O_2 diese Effekte zu vermitteln scheint, haben wir uns mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie auf die computerunterstützte 3D-Rekonstruktion der intrazellulären H_2O_2 Verteilung in Tumorzellen konzentriert. Die VEGF Produktion in Tumorzellen wird durch den Sauerstoffdruck gesteuert. Menschliche Leberkrebszellen besitzen dazu eine zellmembranständige NAD(P)H Oxidase, die den Redoxzustand der Zelle durch eine PO_2 abhängige H_2O_2 Produktion beeinflusst und dadurch als Sauerstoffsensoren die DNA-Bindungs-fähigkeit von Transkriptionsfaktoren wie HIF1 bestimmt als auch die Genexpression (VEGF oder Erythropoietin) steuert. Dieser Mechanismus scheint auch für die Steuerung von Ionenkanälen in Neuronen, in Lungengefäßen und sekretorischen Zellen des Glomus caroticum oder der neuroepithelialen Lungkörperchen verantwortlich zu sein. Die Aufklärung dieses Signalweges wäre für die Etablierung einer Gentherapie zur Unterdrückung der Tumorangiogenese wichtig.

The three-dimensional growth of tumour cells as observed in vivo can be simulated in vitro by means of multicellular spheroid tissue culture either using established human tumour cell lines or biopsy material from tumour patients. The degree of growth retardation of tumour cells in this tissue culture model in response to various types of therapeutic modalities (radiation, cytostatics, cytokines or gene therapy) is very similar to the situation in vivo. One main factor determining the efficacy of radiation is the micro-environment, as characterised by the quotient PO_2 - versus pH gradient inside the multicellular spheroids as measured by microelectrodes. A high quotient, indicating an oxidative metabolism, is related to high radiation sensitivity (e.g. human colon carcinoma cells) whereas a low quotient, indicating glycolytic metabolism, is connected to radiation resistance (e.g. human malign glioma). Applying fluorescent dyes indicating vitality (calcein) or lethality (lucifer yellow, ethidium homodimer), the efficacy of cell killing by doxorubicin (400 nM, 48 hrs) was visualised on human prostate cancer spheroids. Spheroids of diameter $< 150 \mu m$ were resistant to doxorubicin treatment whereas spheroids of a diameter $> 350 \mu m$ showed an impaired growth accompanied by an increased amount of lethal cells. Since doxorubicin accumulates in the central necrotic core of larger spheroids, as visualised by autofluorescence, the efficacy of this treatment seems to depend on a constant critical drug concentration over a long time period. Interferon β and γ (500U/ml) have a pronounced antiproliferative effect on human melanoma cells in monolayer culture which is impaired in spheroid culture of the same cells, reflecting the situation in patients. Detailed cell kinetic studies reveal that interferon β increases DNA synthesis and apoptosis as well as vascular endothelial growth factor (VEGF) production, whereas interferon γ decreases DNA synthesis and increases apoptosis without any effect on VEGF production. Since H_2O_2 seems to mediate these interferon induced effects, we have concentrated on 3D reconstructions of H_2O_2 levels in human tumour cells by means of confocal laser microscopy. Great care was taken to minimize physical artifacts in 3D reconstructions. Computerised videoanimations of the 3D images help to localise the different cellular structures involved in H_2O_2 production. VEGF production by tumour cells is regulated by the ambient oxygen partial pressure, a process called oxygen sensing. We could show on human liver cancer cells that an NAD(P)H oxidase determines the redox state of the cell by generating H_2O_2 in dependence on PO_2 under mediation of a rac protein and influences herewith as an oxygen sensor the DNA binding capacity of transcription factors like HIF1 with a subsequent activation of different genes like VEGF or erythropoietin. This mechanism is also involved in ion channel gating of neurons, lung vessels and secretory cells of carotid body and lung neuroepithelial bodies. The investigation of this oxygen sensing signal pathway is an important step in applying gene therapy to tumours for inhibiting angiogenesis.

Allgemeine Thematik: Unser Hauptanliegen ist die Aufklärung der Transduktionmechanismen, die spezialisierte Zellen im Kardiovaskulärsystem (Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Typ-I Zellen des Karotiskörper) besitzen, um ihre Funktion aufrechtzuerhalten, wenn sie chemischen Reizen (Hypoxie, Anoxie, Ionenmangel, Zellgifte, etc) in der Blutbahn ausgesetzt sind. Für diesen Zweck werden der Gesamtstrom sowie auch die Einzelkanalaktivität von isolierten und superfundierten Zellen, mittels der Patch-Clamp-Technik in Voltage-Clamp-Versuchen, untersucht.

1. Effekt von Hypoxie und Inhibitoren des Stoffwechsels auf die Transmembranströme der Endothelzellen aus Kapillaren des Rattenhirns. Es wurde gefunden, daß in einer Endothelzelllinie (E49) die Leitfähigkeit von Spannungsabhängigen Membranströmen (K^+ und Ca^{2+}), durch Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes, Zyanit oder 2,4-Dinitrophenol beeinflusst werden kann. Durch diesen Stoffwechselstreß erfahren viele Zellen (60%) eine Hyperpolarisation ihrer Zellmembran. Experimentelle Hinweise sprechen für die Beteiligung von ATP-abhängigen K^+ Kanälen in dieser Antwort. Ebenfalls sind Ca^{2+} Kanäle beteiligt, da sie durch Stoffwechselblocker gehemmt werden. Da die Gefäßerweiterung im Gehirn, die durch die oben genannten Reize verursacht wird, eng verbunden mit einer Zellhyperpolarisation einhergeht, sind diese Befunde von Bedeutung, um die Rolle der Endothelzellen in der Kreislaufregulation zu erklären.

2. Die modulatorische Wirkung von extrazellulären Mg^{2+} Ionen auf die Gesamtströme von Kapillarendothelzellen und glatten Muskelzellen aus der Rattenaorta. (Zusammenarb.: Burton Altura, State University of New York, USA). Patch-Clamp-Versuche haben gezeigt, daß Änderungen der extrazellulären Mg^{2+} Konzentration die elektrischen Eigenschaften der Zellmembran beeinflusst. Erhöhung von Mg^{2+} im Superfusat von 1.2 auf 4.8 mM blockiert K^+ Ströme. Da auch Ca^{2+} Ströme gehemmt werden, spricht dieser Effekt für die Beteiligung von Ca^{2+} -abhängigen K^+ Kanälen. Niedriges Mg^{2+} (0.3 mM) aktiviert K^+ - und hemmt Ca^{2+} - Ströme. Messungen an Ca^{2+} - Strömen zeigen, daß dadurch die Oberflächenladung der Membran gestört wird, und die "Steady-State-Inactivation" ändert sich zu negativen Werten. Weitere Untersuchungen an glatten Muskelzellen sollen klären, ob die Gefäßerweiternde Wirkung von niedrig Mg^{2+} durch dieses Phänomen zu erklären ist.

3. Pharmakologische und elektrische Eigenschaften von Niederspannungsaktivierten Ca^{2+} Kanälen von Endothelzellen. (Zusammenarb.: Adolfo Cavalié, Universität Heidelberg). Diese Zellen besitzen überwiegend schnell inaktivierende Ca^{2+} Kanäle, mit einer Schwelle bei -50 mV und Strommaximum bei -25 mV. Sie sind nicht beeinflusst durch Dihydropyridine. Diese Ca^{2+} Kanäle, die auch Temperatur- und pH-empfindlich sind, können eine wichtige Rolle in der Regulation des intrazellulären Ca^{2+} während der Zellantwort auf Substanzen, die den Gefäßtonus verändern, spielen.

General proposals: Our principal goal deals with the better understanding of the transducing mechanisms that cells, specially those directly involved in the homeostasis of the cardiovascular system (endothelial cells, smooth muscle cells, carotid body type I cells), exhibit in order to preserve their physiological function when exposed to some environmental challenge (hypoxia, anoxia, ionic deficiency, metabolic poisons). For this proposal transmembrane currents as well as single ionic channels of isolated and superfused cells in culture have been studied with the patch-clamp technique in voltage-clamp experiments.

1. Effect of hypoxia and metabolic poisons on transmembrane currents of rat brain capillary endothelial cells. The conductance of voltage-activated transmembrane currents (K^+ and Ca^{2+}) found on an endothelial cell line (E49) is affected by low environmental P_{O_2} , cyanide and 2,4 dinitrophenol. This metabolic stress leads, in most cells (60%), to a hyperpolarization of the cell membrane. Experimental evidence supports the activation of ATP-regulated K^+ channels for the hyperpolarization. In addition, voltage-gated Ca^{2+} channels are also involved, as they are depressed by inhibitors of cell metabolism. Since the brain vasodilation produced by these agents is closed related to cell hyperpolarization, these results are of physiological relevance to explain the role of endothelial cells in the cardiovascular system.

2. The modulatory effect of extracellular Mg^{2+} ions on transmembrane currents of capillary endothelial and aorta smooth muscle cells. (In collaboration with Burton Altura, State University of New York, USA). Recent patch-clamp experiments done on capillary endothelial cells have shown that changes in extracellular Mg^{2+} concentration significantly affect the electrical properties of the cell membrane. Increase in bath Mg^{2+} from 1.2 to 4.8 mM blocks K^+ currents. Since Ca^{2+} currents are also markedly depressed, this effect may be operated through Ca^{2+} -dependent K^+ channels. Low Mg^{2+} (0.3 mM) unexpectedly enhances K^+ and depresses Ca^{2+} currents. Studies on "pure" inward currents have shown that low Mg^{2+} disturbs surface charges of the cell membrane and shifts, by about 15 mV, the steady-state inactivation to more negative values. Further studies on smooth muscle cells (rat aorta) are planned to corroborate the contention that extracellular Mg^{2+} is affecting the contractility of blood vessels by a channel-depending mechanism.

3. Pharmacological and electrical properties of low voltage-activated Ca^{2+} channels on endothelial cells. (in collaboration with Adolfo Cavalié, University of Heidelberg). Capillary endothelial cells exhibit predominantly fast inactivating, low voltage-activated Ca^{2+} channels. They have a threshold for activation at a potential of -50 mV with a peak maximum at -25 mV and are almost not affected by dihydropyridine derivatives. These channels, that have to be further studied in their temperature- and pH-sensitivity, should play an important role in the regulation of intracellular Ca^{2+} during the cellular response to agents that affect the contractility of blood vessels.

Arbeitsgruppe Dr. M. Markus

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

1. Erregungswellen in der durch Licht kontrollierbaren Ruthenium-katalysierten Belousov-Zhabotinsky-Reaktion sind u.a. deshalb interessant, weil sie formale Analogien zu den spannungskontrollierbaren Wellen im Herzmuskel zeigen.

Die Bedingungen für die von uns 1994 entdeckten Wellenfrontinstabilitäten ("ripples" und "frazzle gas" - analog zur Herzfibrillation) mußten umformuliert werden: die Destabilisierung erfolgt nicht nur bei extrem niedriger [Ru], sondern auch bei Standard [Ru], jedoch höherer [O₂].

Nach einem Lichtpuls wurden erstmals Wellenaufspaltungen gemessen und simuliert. Diese Aufspaltungen führten zu überraschenden Beobachtungen: i) Ist die gespaltene Welle eine Spirale (Analogon zur paroxysmalen Tachykardie), so löschen sich die Spaltprodukte gegenseitig aus; ii) Werden zwei kollidierende Wellen gespalten, so durchdringen sie sich - nach einer Zeit T_s des statischen Verharrens - wie Solitonen. T_s ist steuerbar und stimmt mit unabhängigen theoretischen Ergebnissen der Gruppe von P. Coulet (Nizza) überein.

2. Methoden der Chaoskontrolle, wie sie z. B. beim Design von Herzdefibrillatoren eine Rolle spielen, wurden anhand numerischer Beispiele verglichen. Dabei ergaben sich die kleinsten Steuergrößen bei Ansteuerung instabiler Fixpunkte (Methode von Ott et al.) im Gegensatz zu periodischen Phasenvariablen-Modulationen (z. B. Matías-Güemez-Methode).

3. Simulationen der Pigmentierung von Muschelshalen wurden weitergeführt. Aufgrund der Unkenntnis der exakten biochemischen Kinetik wurde ein linguistisches (statt algebraisches) Minimalmodell - genauer, ein einfacher, auf der Turing'schen Morphogenese basierender zellulärer Automat - erstellt. Dieses Modell reichte aus, um sog. „unentscheidbare“ Prozesse zu beschreiben. Diese Prozesse liefern Muster, die aperiodisch zwischen vorhersagbaren und unvorhersagbaren Verhalten wechseln. In der alternativen, komplizierteren Formulierung von H. Meinhardt bedarf die Simulation dieser Muster bis zu sechs Differentialgleichungen mit größtenteils spekulativen kinetischen Termen.

4. Es wurde begonnen, das Verhalten amphiphiler Substanzen in strömenden Medien experimentell zu untersuchen. Als erste Ergebnisse ergaben sich gegenseitig abstoßende, zylindrische Aggregate (Durchmesser: ca. 200 μm), welche verblüffend geradlinig über einer Länge von einigen cm verlaufen.

1. Excitation waves in the light-controlled ruthenium-catalyzed Belousov-Zhabotinsky-reaction are interesting - among other reasons - because they have formal analogies with the voltage-controlled waves in heart muscle.

We had to reformulate the conditions for the wavefront instabilities we discovered in 1994 ("ripples" and "frazzle gas" - analogous to cardiac fibrillation): destabilisation occurs not only at extremely low [Ru], but also at standard [Ru] and higher [O₂].

For the first time, wave splitting after a light pulse was observed and simulated. Such splitting leads to the following remarkable observations: i) If the splitted wave is a spiral (analogous to paroxysmal tachycardia), then the splitting-products annihilate each other; ii) If two colliding waves are splitted, then they penetrate into each other - following a time T_s with zero speed - like solitons. T_s can be controlled and agrees with independent theoretical results by the group of P. Coulet (Nizza).

2. Different methods for controlling chaos (as they are relevant e.g. in the design of cardiac defibrillators) were compared using numerical examples. We found minimization of controlling magnitudes when directing the trajectory to an unstable fixed point (method by Ott et al.), as compared to periodic modulation of phase variables (e. g. method by Matías & Güemez).

3. Simulations of pigmentation patterns on mollusc shells were continued. Owing to the general ignorance of the exact biochemical kinetics, we devised a linguistic (instead of algebraic) minimum model, namely a cellular automaton based on Turing's model of morphogenesis. This automaton was sufficient for the simulation of so-called "undecidable" processes, which yield patterns alternating aperiodically between predictable and unpredictable behaviour. In the alternative, more complex approach by H. Meinhardt, such patterns require up to six differential equations containing mostly speculative kinetic terms.

4. We started to investigate the behaviour of amphiphilic substances in streaming media. First results yielded cylindrical aggregates (diameters around 200 μm) repelling each other, and maintaining astonishingly exact linearity over a length of several cm.

Arbeitsgruppe Prof. Dr. S.C. Müller

Mitarbeiter: I. Beyer, M. Böckmann, M. Dahlem, S. Grill, 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

Die externe Beeinflussung und Kontrolle der sich in der Belousov-Zhabotinsky-Reaktion ausbreitenden Wellen haben erheblich an Bedeutung gewonnen, seitdem in der lichtempfindlichen, mit einem Ruthenium-Komplex katalysierten Variante dieser Reaktion eine effiziente Rückkopplungsmethode verwendet wird. Untersucht wurde die Auswirkung einer Folge von kurzen Lichtpulsen auf die Dynamik einer mäandrierenden Spiralspitze. Jeder Puls wird genau dann ausgelöst, wenn die steile Wellenfront einen vorgegebenen Meßpunkt erreicht. Es ließ sich zeigen, daß bisher unbekannte, komplexe Bahnen der Spiralspitze entstehen, indem sich die Spiralspitze asymptotisch neuartigen stabilen Trajektorien („Attraktoren“) annähert. Die experimentellen Befunde wurden durch numerische Simulationen auf der Basis eines modifizierten Zwei-Variablen-Oregonatormodells bestätigt. Ebenfalls im Hinblick auf eine externe Kontrollmöglichkeit der Wellendynamik, und zwar global durch die Gasphase über der reaktiven Schicht, wurde die Rolle des Luftsauerstoffs weiter untersucht. EPR Messungen führten zur Identifizierung des Peroxymalonyl-Radikals bei der aeroben Oxidation von Malonsäure durch den Katalysator Ce(IV). Die Vorhersagen eines einfachen Reaktionsmechanismus zur Rolle des molekularen Sauerstoffs stimmen gut mit kinetischen Studien dieses wichtigen radikalischen Intermediats überein.

Lokale Temperaturmessungen in einer Wellenfront (in Zusammenarbeit mit Prof. B. Hess, Heidelberg) zeigen eine Erwärmung um 40 mK. Aufgrund der beobachteten Flußrichtung schließt dies die Temperatur als treibende Kraft für die chemisch induzierte Konvektion in der Belousov-Zhabotinsky-Reaktion aus und weist auf die entscheidende Rolle der lokalen chemischen Zusammensetzung hin.

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 gelang erstmals die Erzeugung und Beschreibung kreis- und spiralförmiger NADH und Proton-Wellen. Die Spirdynamik hängt stark von der Konzentration des positiven Effektors AMP ab.

General topic:

Chemical and biological waves

Recently, the external forcing and control of excitation waves traveling in thin layers of the Belousov-Zhabotinsky reaction have moved into the focus of interest, especially since one uses an efficient feedback method in the light sensitive ruthenium-catalyzed variant of this reaction. The effect of a sequence of short light impulses on the dynamics of a meandering spiral wave was investigated. Each stimulus is applied at a moment that corresponds to the passage of the wave front through a particular measuring point of the excitable medium. It was shown that the introduction of such a feedback results in two new dynamical regimes named entrainment and resonance attractors. The experimental results are consistent with numerical simulations performed with the two-component Oregonator model. Another global method for externally controlling the wave dynamics may be found in changing the gas phase above the reactive layer. For this purpose the role of oxygen in this reaction was studied further. EPR measurements provided evidence for the formation of the peroxymalonyl radical in the aerobic oxidation of malonic acid by ceric ions. A simple reaction mechanism for the role of molecular oxygen was proposed that agrees well with kinetic studies of this radical intermediate.

Local temperature measurements (in collaboration with Prof. B. Hess, Heidelberg) show a small heating by 40 mK in a propagating front. Considering the direction of the observed flow leads to the conclusion that temperature is not the driving force of chemically induced convection in the Belousov-Zhabotinsky reaction. This points to the crucial role of the local chemical composition of the medium.

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 circular and spiral-shaped NADH and proton waves were detected and characterized for the first time. The spiral dynamics depends markedly on the concentration of the positive effector AMP.

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 Reaction und für das FitzHugh-Nagumo Modell der Nervenleitung durchgeführt. Die Untersuchungen brachten folgende Ergebnisse: 1) Die Bahnen der Spiralspitzen können als lineare Kombinationen von Kreisbahnen beschrieben werden. 2) Die verschiedenen Peaks in den Powerspektren können als Struktur- oder Formfrequenzen klassifiziert werden. Strukturfrequenzen bestimmen die grobe Struktur und Geometrie der Muster, d.h. die Zahl und Größe der Schleifen. Die Formfrequenzen sind verknüpft mit der genauen Form der Schleifen. 3) Das Zusammenspiel von bis zu neun Frequenzen erzeugt ein reguläres Bahnmuster von hoher Komplexität. Die Analyse zeigt, daß die Trajektorien nicht chaotisch sind. Es konnte geklärt werden, daß die in der Literatur als chaotisch klassifizierten Bahnen durch den Integrationsalgorithmus zustande gekommen sind. 4) Die Spiralwelle außerhalb der Kernregion, in der sich die Spiralspitze bewegt, ist unabhängig von der Komplexität der Bewegung der Spitze. Die Spirale ist allein durch die Komponente im Powerspektrum bestimmt, die zur Kreisbahn mit der höchsten Radialgeschwindigkeit gehört (K.-H. Müller, Th. Plesser).

Das spezifische Verhalten eines erregbaren Mediums wird bestimmt durch die nichtlineare Kinetik der autokatalytischen Prozesse und durch die Transportmechanismen im Medium. Viele neue Phänomene treten auf, wenn neben der Diffusion auch Konvektion als Transportmechanismus ins Spiel kommt. Modelle und numerische Methoden wurden entwickelt, um die im Experiment beobachtete durch chemische Wellen der Belousov-Zhabotinsky Reaktion angetriebene Konvektion zu verstehen. (Th. Plesser; H. Wilke, Berlin; K.H. Winters and A. Cliffe, Harwell).

Ein weiterer Arbeitsschwerpunkt ist in Zusammenarbeit mit I. Chizhov (Abt. 3) der Photozyklus von Bacteriorhodopsin. Die in der Arbeitsgruppe entwickelten numerischen Methoden zur simultanen multi-exponential Analyse von Meßreihen aus verschiedenen Experimenten wurde angewandt auf Daten, die in 4 nm Schritten im Spektralbereich von 300 bis 700 nm gemessen wurden. Die Experimente wurden bei Temperaturen zwischen 0 to 40°C in 4°C Schritten durchgeführt. In jedem Experiment begann die Datenerfassung 100 ns nach Initiation der Reaktion durch einen Laserblitz und wurde erst am Ende des Photozyklus gestoppt. Die Ergebnisse der Analyse wurden in Modellsimulationen genutzt zur Berechnung der Intermediatkonzentrationen des Photozyklus (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 FitzHugh-Nagumo model of nerve conduction.

The analysis shows: 1) The tip trajectories are linear combinations of cyclic orbits. 2) The various peaks in the power spectra can be classified as structure or shape frequencies, respectively. Structure frequencies determine the coarse structure and geometry of the pattern, i.e. the number and the size of their loops. Shape frequencies are related with the detailed shape of the loops. 3) The interplay of up to nine structure frequencies generates regular tip trajectories of high complexity. The analysis shows that the trajectories are not chaotic. It could be demonstrated that trajectories identified as chaotic in the literature are a result of the numerical method used for the integration of the partial differential equations. 4) The spiral wave outside the core region is independent of the complexity of the motion of the tip. The spiral is solely determined by the structure component in the power spectrum with the highest circular speed, i.e. with the largest product of radius times frequency. (K.-H. Müller, Th. Plesser)

The specific behaviour of an excitable medium is determined by the non-linear kinetics of the autocatalytic and the transport mechanisms in the system. Many new features appear when convection comes into play in addition to diffusion. Models and numerical techniques have been developed to analyse observed chemically driven convection induced by waves in the Belousov-Zhabotinsky reaction (Th. Plesser; H. Wilke, Berlin; K.H. Winters and A. Cliffe, Harwell)

Another topic of research is the analysis of the photocycle of bacteriorhodopsin in collaboration with I. Chizhov (Abt. 3). The numerical methods developed for the simultaneous multi-exponential analysis of data measured by different techniques are applied to data sets measured in steps of 4 nm in a spectral interval from 300 to 700 nm. The experiments were carried out in a temperature range from 0°C to 40°C in 4°C intervals. Data acquisition began in each experiment 100 ns after initiation of the reaction by a laser flash and was stopped at the end of the photocycle, i.e. after milliseconds or some seconds at low temperature, respectively. The results of the data analysis are used for model calculations of the concentration of the photocycle intermediates. (K.-H. Müller)

Allgemeine Thematik: Analyse der Ligandenbindung von Proteinen**1. Projekt:** Der Bindungsmechanismus von Ca^{++} -Antagonisten an einem spannungsabhängigen Kalziumkanal.

(in Zusammenarbeit mit Jörg Striessnig, Thomas Brauns und Hartmut Glossmann, Universität Innsbruck, Österreich)

Die Konkurrenz der Bindung eines fluoreszierenden Benzothiazepins durch nicht-fluoreszierende Dihydropyridine ermöglicht Aussagen über den Bindungsmechanismus der beiden pharmakologischen Klassen von Ca^{++} -Antagonisten und dem L-Typ Kalziumkanal. Weil die Veränderung der Fluoreszenz des Benzothiazepins nur von der Struktur des Dihydropyridins, nicht aber von seiner pharmakologischen Potenz abhängt, kann auf eine direkte isosterische Wechselwirkung der beiden Liganden geschlossen werden. Umgekehrt erscheinen allosterische Modelle, wie sie bisher zur Erklärung der pharmakologischen Wirkungen der verschiedenen Ca^{++} -Antagonisten verwendet wurden, eher unwahrscheinlich.

2. Projekt: Der Bindungsmechanismus von *ras* und *ras*-Mutanten

(in Zusammenarbeit mit Cristian Lenzen, Robbert Cool und Alfred Wittinghofer)

Nach der erfolgreichen vollständigen Analyse der Austauschkinetik bei dem *ras*-ähnlichen G-Protein *ran* (Ch. Klebe, H. Prinz, A. Wittinghofer und R. Goody (1995), *Biochemistry* 34, 12543-12552) wurde die Kinetik der Austauschreaktion bei *ras* und seinem Austauschfaktor CDC25 untersucht (Ch. Lenzen, H. Prinz, R. H. Cool, J. Kuhlmann und A. Wittinghofer, in Vorbereitung). Auf der Basis dieser vollständigen Analyse wird zur Zeit die Hemmung der Austauschreaktion durch *ras*-Mutanten *in vitro* und *in vivo* berechnet.

3. Projekt: Der Aufbau eines Elektrospray-Massenspektrometers

Zur Analyse Wechselwirkungen von Proteinen und Liganden und zur Bestimmung von Proteinen und Proteinfragmenten wird ein Labor für Massenspektroskopie aufgebaut.

General Subject: Binding of Ligands to Proteins**Project 1:** The binding mechanism of different pharmacological classes of ligands and L-type Ca^{++} -antagonists

(collaboration with Jörg Striessnig, Thomas Brauns and Hartmut Glossmann, Innsbruck University, Austria)

A fluorescent benzothiazepine was synthesized in order to study its interaction with L-type Ca^{++} -channels. The binding kinetics were followed by a marked change in the fluorescence signal. The velocity of the association reaction was decreased in the presence of non-fluorescent dihydropyridines, although no competition could be detected in equilibrium experiments. Data were analyzed with a simple model assuming two binding sites and competition for the initial location. Such an isosteric model was further supported by the observation that the fluorescence of the ternary complexes depended on the chemical composition of the non-fluorescent dihydropyridines rather than on their pharmacological potency. In contrast, commonly applied allosteric models cannot reconcile these findings.

Project 2: The binding mechanism of *ras* and its mutants

(collaboration with Cristian Lenzen, Robbert Cool and Alfred Wittinghofer)

Having completed an analysis of the exchange reaction for *ran*, a *ras*-like G-protein (Ch. Klebe, H. Prinz, A. Wittinghofer und R.S. Goody (1995), *Biochemistry* 34, 12543-12552), the accelerated dissociation of a fluorescent GDP from *ras* and its mutants was studied under various conditions. Further studies are aimed at the understanding of the action of oncogenic mutants. With a complete model for the binding of all ligands involved we hope to be able to calculate all our observations *in vitro* and *in vivo* on the basis of independently determined rate constants.

Project 3: Electrospray mass-spectroscopy

Electrospray mass spectroscopy is being started as a new project. We hope to be able to determine patterns of differential expression of proteins.

Emeriti

Emeriti

Arbeitsgruppe Prof. Dr. B. Hess

Mitarbeiter: Dr. I. Chizhov

Die Untersuchung thermaler Übergänge im Photozyklus von Bakteriorhodopsin und die Quantenausbeute der Bleichung des Pigments wurde fortgeführt: von besonderem Interesse war die Entdeckung der großen Übergangsentropie des N-O-Übergangs im Zyklus, der auf eine komplexe strukturelle Konformationsänderung hinweist. Zur Zeit werden spektroskopische Daten über einen großen Temperatur- sowie pH-Bereich analysiert und mit einem neuen Fittingprogramm zu einer neuen Formulierung des Photozyklusses ausgearbeitet, in dem auch intermediäre, spektroskopisch nicht erfaßbare Schritte von Konformationsänderungen berücksichtigt werden (in Zusammenarbeit mit I. Chizhov und M. Engelhard).

Mein Hauptinteresse konzentriert sich auf die Probleme der mikroskopischen Selbstorganisation in lebenden Zellen. Diese Arbeiten (in Zusammenarbeit mit Alexander Mikhailov mit Unterstützung durch die Thyssen-Stiftung sowie ein Alexander-von-Humboldt-Forschungsstipendium für Prof. Zanette) führten zu folgenden Ergebnissen: Biochemische Subsysteme in lebenden Zellen operieren häufig mit nur einer sehr kleinen Anzahl von Enzymmolekülen. Ihr Zusammenspiel kann daher nicht durch klassische Massenwirkungskinetik beschrieben werden, die nur für große Zahlen von reagierenden Molekülen anwendbar ist. Theoretische Untersuchungen der charakteristischen Zeitdauer enzymatischer Reaktionen in kleinen Zellen und subzellulären Räumen zeigen, daß jeweils zwei Makromoleküle innerhalb eines Volumens im Mikrometerraum jeweils einmal pro Sekunde zusammenstoßen und daß daher die Übergangszeit, die für den Transport eines Mediatormoleküls auf ein Zielenzym oder -rezeptor notwendig ist, der Dauer eines katalytischen Zyklus eines einzelnen Enzymmoleküls vergleichbar ist. Wenn diese Bedingungen erfüllt sind, bildet ein enzymatisches Subsystem ein kohärentes molekulares Netzwerk mit starker Zeitkorrelation zwischen den katalytischen Umsetzungen der einzelnen Enzymmoleküle der Gruppe. Theoretische Untersuchungen einer irreversiblen enzymatischen Reaktion, die durch ein allosterisches Produkt sich selbst aktiviert, zeigen, daß in kleinen räumlichen Volumina der Übergang zu kohärentem Pulsverhalten einer Enzymgruppe durch das Vorliegen starker Korrelationen zwischen der Reaktion und dem Zustand der einzelnen enzymatischen Moleküle charakterisiert ist. Dieses Verhalten konnte durch einen stochastischen Ansatz nachgewiesen werden, und wird zur Zeit in größeren Netzen sowie durch entsprechende Mastergleichungen analysiert.

Weitere Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Vorkommen starker thermaler hydrodynamischer Fluktuationen im Zytoplasma lebender Zellen. Aus diesen Untersuchungen folgt, daß intensive Fluktuationen innerhalb der Zelle zum Vesikeltransport beitragen können. Die Ergebnisse langjähriger Untersuchungen über periodische Reaktionen und Muster werden zur Zeit in Form eines Review-Artikels für „Quarterly Review of Biophysics“ unter dem Titel „Periodic Patterns in Biochemical Reactions“ dargestellt.

Investigations on the cyclic thermal transitions in the photocycle of bacteriorhodopsin and the quantum yield of bleaching of the pigment: Of special interest was the discovery of high transition entropies of the N-O-transition which indicates complex structural conformation changes. Currently, spectroscopic data obtained over a large temperature as well as pH range and novel fitting procedure lead to a new formulation of the photocycle implying intermediary steps of large conformation changes (in collaboration with I. Chizhov and M. Engelhard).

My major current interest concentrates on problems of microscopic self-organization in living cells. This work (in collaboration with A. Mikhailov, support by the Thyssen Foundation and a Alexander von Humboldt Award for A. Mikhailov, and a new Alexander von Humboldt Award for D. Zanette) led to the following major results:

Biochemical subsystems of a living cell may operate with only a few thousand enzyme molecules and their response can be triggered by the entrance of individual molecules of a certain species. This mode of operation is not described by classical chemical kinetics, which deals with large numbers of reacting molecules. Theoretical estimates for the characteristic times of enzymic reactions in small cells and cellular compartments show that any two macromolecules within a micrometer-size volume meet each other each second and that the transit time, required for a mediator molecule to meet a target enzyme, is comparable to the duration of a catalytic round for a single enzyme, is comparable to the duration of a catalytic round for a single enzyme molecule. When these conditions are satisfied, an enzymic subsystem represents a coherent molecular network with persistent strong temporal correlations between the catalytic events of individual enzyme molecules. Theoretical studies of an irreversible enzymic reaction with allosteric product activation reveals that, in small spatial volumes, it can undergo a transition to coherent spiking regime characterized by the presence of strong correlations between reaction events and the states of individual enzyme molecules.

Further studies revealed the presence of strong thermal hydrodynamic fluctuation in the cytoplasm of living cells. It was suggested that these intensive fluctuations may be utilized by biological vesicles inside the cell to produce a directed drift to the targets. A possible mechanism of partial rectification of thermal fluctuation is based on the effect of active navigation: i.e. on the controlled response of vesicles to velocity fluctuations.

Arbeitsgruppe Prof. Dr. D.W. Lübbers

Mitarbeiter: S. Mieschke, A.-M. Treeck, F. Beiderwieden, T. Köster

Projekt 1: O₂-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, R. Ziemann, L. Schulze, Dermatologische Klinik der Universität Bochum) Umfangreiche Testmessungen mit der im Max-Planck-Institut entwickelten O₂-Flux-Messanordnung (Meßsystem Flox) zeigten, daß Verbesserungen erarbeitet werden mußten, um einen klinischen Einsatz möglich zu machen. Die Verbesserungen bezogen sich vorwiegend auf die Erhöhung der Meßempfindlichkeit und die Verbesserung der Thermostatisierung. Ebenso wurde die Aufsetztechnik des Meßkopfes auf die Haut optimiert. Der klinische Einsatz ist für Januar 1996 vorgesehen.

Projekt 2: Simulationsrechnung zur Messung des Gasaustausches durch die Haut mit der O₂-Fluxoptode. (Lübbers, F. Beiderwieden in Zusammenarbeit mit Dr. H. Karpf, H. Hartmann, AVL Graz) Es wurde ein Simulationsmodell entwickelt, das erlaubt, den Einfluß der Sensorfolie der O₂-Fluxoptode auf den Sauerstofffluß der Haut zu untersuchen. Die Sensorfolie muß so ausgelegt werden, daß sie die O₂-Verteilung auf der Haut nicht beeinflußt, so daß ein quantitatives Bild des O₂-Fluxes erhalten wird (OFFLIM: O₂-Flux Fluorescence Lifetime Imaging)

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, das große spektrale Bereiche in schneller als einhundertstel Sekunden durchmessen kann, 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 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 wird ein flächenförmiger, flexibler, optischer pH-Sensor (pH-Fensteroptode) entwickelt, mit dem das lokale pH der Gehirnoberfläche erfaßt wird. Es ist gelungen, einen entsprechenden pH-Indikator zu synthetisieren, der im nahen Infrarot absorbiert. Wenn dieser Indikator in eine entsprechende Sensorfolie eingebettet ist, wird es möglich sein von außen mit einem NIR-Sensor den lokalen pH durch die intakte Schädeldecke zu messen und so Notsituationen frühzeitig zu erkennen.

Project 1: Oxygen measurements on the human skin (Physiological investigations of the normal and pathological supply of oxygen and substrates to the human skin). (D.W. Lübbers, T. Köster in cooperation with Prof. Dr. P. Altmeyer, Dr. M. Stücker, R. Ziemann, L. Schulze, Dermatologische Klinik der Universität Bochum)

Practical application of the O₂-flux measuring system (measuring system Flox) demonstrated that further developments were necessary to facilitate the clinical application. The sensitivity of the sensor and its temperature control could be improved. Furthermore the fixation on the skin was optimized. Clinical application is planned for January 1996.

Project 2: Calculation to simulate the gas exchange through the skin during the application of the O₂ Fluxoptode. (D.W. Lübbers, F. Beiderwieden in cooperation with Dr. H. Karpf, H. Hartmann, AVL Graz) A simulation model has been developed by which the influence of the sensor foil of the O₂-Fluxoptode on the O₂-flux into the skin can be investigated. To obtain a quantitative image of the O₂-flux the properties of the sensor foil must be selected in such a way that the foil does not influence the O₂-pattern of the skin (OFFLIM: O₂-Flux Fluorescence Lifetime Imaging).

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 large spectral ranges 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) A two-dimensional flexible optical pH-sensor (pH-window optode) will be developed by which the local pH-distribution on the brain surface can be measured. It has been succeeded to synthesize a pH-indicator which absorbs in the near infrared spectral range. With such an indicator embedded in a suitable sensor foil, it will be possible by using NIR radiation to measure the local pH of the brain surface through the intact skull. In some emergency situations the pH change is an important warning symptom which allows an early non-invasive diagnosis.

Zentrale Einrichtungen

Central facilities

Mikrosensoren und Dünnschichttechnik

Arbeitsgruppe: Chem.-Ing. H. Baumgärtl

Mitarbeiter: G. Malinkewitz (1/2), W. Zimelka

Die Aktivitäten der Arbeitsgruppe konzentrierten sich im Berichtszeitraum auf zwei Schwerpunktprogramme:

1. Konstruktion und Applikation von pO_2 -Nadelelektroden zur Untersuchung mikrobieller Systeme, Bodenkleinarthropoden sowie multizellulärer Tumorsphäroide.
2. Herstellung dünner Schichten für optische Filter im Rahmen des ESA-Projekts "XMM".

Zu 1.: Im Zusammenhang mit dem mikrobiellen Abbau von Chlorbenzolen, werden mit B. Selent (Institut für Technischen Umweltschutz, TU Berlin) verschiedene Möglichkeiten der biologischen Entfernung persistenter Substanzen untersucht. Ziel ist es, aerobe und anaerobe Prozesse in einem Mikroreaktor auf engstem Raum zu koppeln, um die Abbauleistung der Dechlorierung zu optimieren.

-Die 1990 mit G. Özoguz (Institut für Umwelttechnik, Universität Bremen) aufgenommene Untersuchungen zur Abwasserreinigung wurden fortgesetzt und erstmals Messungen direkt am Biofilm im Abwasserreaktor durchgeführt. Die Ergebnisse werden in der Dissertation von G. Özoguz beschrieben. Ähnliche Untersuchungen werden am Biofilm zum Abbau flüchtiger Aromaten mit U. Schindler (Prüfungsamt für Wasser- und Abfallwirtschaft, TU München) durchgeführt.

-In Fortführung der 1992 begonnenen Experimente zur pO_2 -Messung im Umfeld einzelner Hornmilben, haben wir in Kooperation mit D. Zinkler (Lehrstuhl für Tierphysiologie, Uni. Bochum) erstmals versucht, Sauerstoff im Lumen einzelner Darmabschnitte von Triatomen zu analysieren. Die Untersuchungen spielen vor allem in der Parasitologie bei der Aufklärung von Infektionsmechanismen eine wichtige Rolle und werden im Rahmen einer Dissertation weitergeführt.

-Die Forschungsarbeiten von H. Acker an multizellulären Tumor-Sphäroiden machten es erforderlich, mehrere Mikrokoaxialelektroden zur polarographischen Sauerstoffpartialdruckmessung bereitzustellen (s. Bericht H.Acker).

Zu 2.: Die europäische Raumfahrtbehörde ESA baut mit XMM (X-Ray Multi Mirror Systems) ein Röntgenobservatorium, das Ende dieses Jahrzehnts in eine Erdumlaufbahn gebracht werden soll. Das Observatorium wird in einer Kollaboration von einem internationalen Konsortium entwickelt. Aufgrund unserer langjährigen Erfahrungen mit dünnen Schichten, die wir u.a. auch bei den Satelliten-Projekten ROSAT, SPEKTROSAT und EXOSAT (s.Arbeitsberichte 1978-1990) in Zusammenarbeit mit K.H. Stephan (MPI für Extraterrestrische Physik, Garching) gewonnen haben, versuchen wir mit Hilfe der Hochfrequenzkathodenzerstäubung ultradünne Polypropylenfolien beidseitig mit je $10 \mu g/cm^2$ Aluminium zu beschichten, um für die Teleskopkamera optische Filter für die Strahlung vom weichen Röntgenbereich bis zum nahen Infrarot zu erhalten. Die Flugfilter sollen Ende 1996 der XMM-Mission zur Verfügung stehen. Ein Ausgleich der finanziellen Aufwendungen wird wie in der früher praktizierten Weise erfolgen.

The activities of this group concentrated on two main programs:

1. Construction and application of pO_2 -needle electrodes to examine microbial systems, little terrestrial arthropoda and multicellular tumour spheroids.
2. Production of thin films for optical filters in cooperation with the ESA-project „XMM“

1. In connection with the microbial degradation of chlorobenzenes, we examine different possibilities of biological removal of persistent substances (in cooperation with B. Selent, Institut für Technischen Umweltschutz, TU Berlin). Our intention is to combine aerobic and anaerobic processes in a micro-reactor having a very small volume to optimize the decomposition performance of the dechlorination.

- The examinations on purification of sewage started in 1990 with G. Özoguz (Institut für Umwelttechnik, Bremen). For the first time measurements were carried out direct at the biofilm in the sewage reactor. The results have been described in the thesis by G. Özoguz. Similar examinations at the biofilm for degradation of volatile aromatic compounds are carried out together with U. Schindler (Prüfungsamt für Wasser- und Abfallwirtschaft, TU München).

- We continued the experiments on pO_2 -measurements in the environment of single oribatid mites started 1990. In cooperation with D. Zinkler (Lehrstuhl für Tierphysiologie, Universität Bochum) we analysed for the first time the behaviour of oxygen within the lumen of single parts of the intestine of Triatoma. These examinations are especially important in the parasitology for the analysis of infection mechanisms. The investigations will be continued and used for a dissertation.

- For the research of H. Acker on multi-cellular tumour spheroids it was necessary to provide several microcoaxial needle electrodes which were used to measure polarographically the oxygen partial pressure (see report of H. Acker).

2. The European Space Authority ESA builds in cooperation with XMM (X-ray multi mirror systems) a X-ray observatory, which should be brought into the earth's orbit by the end of the decade. The observatory is developed in collaboration with an international consortium. Due to our long-standing experience with thin films, which was established at the satellite projects ROSAT, SPEKTROSAT and EXOSAT (see also working reports 1978-1990) in collaboration with K.H. Stephan (MPI für Extraterrestrische Physik, Garching), we try by means of the RF-Sputtering technique to coat ultrathin polypropylen films on both sides with $10 \mu/cm^2$ aluminium layers to get optical filters for the telescope camera for the radiation in the range of soft X-ray to close infrared radiation. The filters should be ready and at the XMM-mission's disposal by the end of 1996. The financial expenditure will be balanced as usual.

Zentrale Einrichtung - Elektronische Meßgeräte und Digitaltechnik

Arbeitsgruppe M. Grote

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

1. Entwicklungsbereich

a) Im Jahre 1995 wurde ein Temperaturregler entwickelt und gebaut, der neben einer hohen Konstanz der Temperatur noch weitere Kriterien zu erfüllen hatte. Verlangt wurde die Einhaltung einer Regelabweichung von $\pm 0,1^\circ\text{C}$, im Bereich zwischen $30-45^\circ\text{C}$ und eine hohe Störstrahlungssicherheit, da diese Regeleinheit in einer elektrophysiologischen Apparatur zur Anwendung kommen sollte. Unter Verwendung eines Universalreglers der Firma Jumo, Typ Jumo Dicon SM, und einem kontinuierlich regelndem Niederspannungsheizkreis konnten alle Vorgaben erfüllt werden.

b) Weiter wurde eine von einem PC steuerbare Pipettiereinrichtung gebaut, die in ihrer Mechanik und Elektronik den örtlichen Bedingungen angepaßt wurde. Alle Zustände sind setzbar und kontrollierbar.

c) Eine Umschaltbox zur Umleitung von manuellen und systemgesetzten Befehlen für Mikro-Manipulatoren wurde ebenfalls im Verlauf des Jahres gebaut.

2. Service-Bereich

In diesem Bereich, der zuständig ist für die Instandhaltung und Wartung von elektrischen und elektronischen Geräten aus dem Institutsbereich, wurden die angefallenen Reparaturen fast ausnahmslos durch eigenes Personal erledigt. Bedingt durch die Umstrukturierung des Instituts und den Wechsel der Arbeitsgebiete in den Abteilungen wurde eine erhebliche Anzahl von Geräten ins Lager genommen und durch Beurteilung der Einsatz- und Verwendbarkeit eingestuft. Zum Jahresende wurden nicht verwendungsfähige Geräte zum Verkauf oder zum Verschrotten freigegeben. Die turnusmäßige Überprüfung der elektrischen Geräte entsprechend den VDE-Vorschriften wurde in den drei Abteilungen des Instituts mit Hilfe von zwei studentischen Hilfskräften weitestgehend abgeschlossen.

3. Kommunikationsbereich

a) Aufbau eines lokalen Datennetzes im Verwaltungsbereich. Für die verschiedenen Verwaltungsbereiche wurden zwei unabhängige Teilnetze zum Anschluß mehrerer Arbeitsplatzrechner und Drucker installiert.

b) Das Lokale Datennetz (LAN) wurde weiter ausgebaut (s. auch Arbeitsbereich 1994). Zahlreiche Umbauten, sowie Teilersatz fehlerhafter Kabelabschnitte waren notwendig. Der Einbau neuer Twisted-Pair-Kabel wurde fortgesetzt.

c) In der zentralen Telefonanlage (HICOM 300) wurde die Hardware des Computers für die monatliche Gebührenabrechnung verbessert.

4. Digitalbereich

Aufbau, Erweiterung, Pflege und Reparatur von vorhandenen und neuen Rechnern und Peripheriegeräten in Zusammenarbeit mit der ZE-EDV (PC, Workstation, Macintosh, Drucker und Plattenlaufwerke). Betreut werden ca. 170 PC'S, 40 Workstations, 27 Laserdrucker und ca. 150 eingetragene Nutzer (Stand: Ende 1995).

1. Apparatus development

a) In 1995, we developed and built a thermostat with high constancy of temperature. Required was a deviation of $\pm 0,1^\circ\text{C}$ in the temperature range between $30-45^\circ\text{C}$. Because this thermostat was to be used in an electro-physiological apparatus. There was also a requirement for low electrical interference. By using a universal controller (Jumo, type Jumo Dicon SM), and a continually regulated low voltage heating circuit, we were able to fulfill all requirements.

b) We built a computer-controlled titrator, which mechanics and electronics had to fit into local conditions. All states can be set and checked.

c) During the course of the year, we also constructed a switching system for the diversion of manual and system-set commands for micro-manipulators.

2. Service area

The maintenance group is responsible for electrical and electronic equipment in the institute. The repairs incurred were nearly all carried out by our own staff. A large amount of equipment was put on store and was classified with respect to usability, due to the restructuring of the institute and the change of the applications in the departments. By the end of the year non-usable equipment had been released for sale or for scrap. The regular inspection of electrical equipment in the three departments of the institute corresponding to the VDE-rules (legal requirement) has nearly been finished with the help of two students.

3. Communication area

a) Construction of a local data net in the administration floor. In order to connect several computers and printers, two independent networks were installed for the different administration areas.

b) The local data net (LAN) was extended (see also 1994 report). Numerous modifications, including partial replacement of defective cables, were necessary. We continued to install new twisted-pair cables.

c) The hardware of the central phone system (HICOM 300) for the monthly charge invoice was improved.

4. Digital area

Construction, extension, maintenance and repair of existing and new computers and periphery equipment in collaboration with the Central Facility - EDV (PC, workstations, Macintosh, printer and disk drives). We are responsible for about 170 computers, 40 workstations, 27 laser printers and about 150 registered users (end of 1995).

**Zentrales Laboratorium für Funktionelle Morphologie
Arbeitsgruppe PD Dr. H. Hentschel**

Mitarbeiter: U. Feldmann, A. Friedrich, R. Haubrock, D. Sylvester, G. Trogemann, H. Winkler

In der Zentralen Einrichtung Funktionelle Morphologie wurden an Zellen und Geweben Untersuchungen, vorwiegend mit licht- und elektronenmikroskopischen Techniken, durchgeführt. Zum Einsatz kamen u.a. Fluoreszenzmikroskopie, Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) und Rasterelektronenmikroskopie. Im Vordergrund standen Markierungen mit Verfahren der Affinitätszytochemie und Immunhistochemische Techniken. Im Berichts-Zeitraum wurde an folgenden Projekten gearbeitet. Einzelheiten zur Thematik der Projekte finden sich in den Arbeitsberichten der beteiligten Wissenschaftler (Namen in Klammern).

1. Immunhistochemische Lokalisierung des Na-Pi-II-Transporters in Niere und Darm der Flunder (A. Werner, P. Herter, Abt. II)
2. Immunhistochemische Untersuchung zur Topographie des Na-D-Glucose Transporters in der Kaninchen-Niere (C.T. Lin, Abt. II)
3. Morphologie von IMCD-Primärkulturen (B. Ruhfus, Abt. II)
4. Immunelektronenmikroskopie von Kernporen-assoziierten Proteinen der Hefe (J. Becker, Abt. I)
5. Immunhistochemische Untersuchungen an Biopsien von an Polyposis Erkrankten (O. Müller, P. Herter, Abt. I, Abt. II)
6. Immunhistochemische Untersuchungen an Fibroblasten (G. Schmidt, P. Herter, Abt. I, Abt. II)
7. Affinitätszytochemie mit Lektinen an Nieren verschiedener Vertebraten. Hier wurden eine Reihe von spezifischen Markern für bestimmte Strukturen, Nephronsegmente, Interstitium, Endothel) in Warm- und Kaltblüter-Nieren ermittelt. Diese Befunde ermöglichen eine eindeutige Zuordnung der Bauelemente der Niere in den Immunhistochemischen Untersuchungen.
8. In Zusammenarbeit mit der AG K. Zierold wurden Elementkonzentrationen in Chloridzellen und im proximalen Tubulus der Niere ermittelt. Die gefundenen Werte und ihre Bedeutung für die Transportprozesse im Rahmen von Elektrolyt- und Wasserhaushalt der Organismen werden zur Publikation vorbereitet.

The Central Facility for functional Morphology was involved in the study of cells and tissues with light and electron microscopical techniques. We used Fluorescence microscopy, Transmission electron microscopy (TEM) and Scanning electron microscopy (SEM) for lectin cytochemistry and immunoelectron microscopy. Studies were performed in a number of different projects (for information, see also the reports by the investigators shown in parentheses).

1. Immunohistochemical localization of a Na-Pi-II transporter in the kidney and the intestine of flounder (A. Werner, P. Herter, Abt. II)
2. Immunohistochemical study of the topography of the Na-D-Glucose transporter in the rabbit kidney (C.T. Lin, Abt. II)
3. Morphology of IMCD primarycell cultures (B. Ruhfus, Abt. II)
4. Immunoelectron microscopy of proteins associated with nuclear pores of the yeast (J. Becker, Abt. I)
5. Immunohistochemical study of biopsies of human colon polyposis (O. Müller, Abt. I, P. Herter, Abt. II)
6. Immunohistochemical study of fibroblasts (G. Schmidt, Abt. I, P. Herter, Abt. II)
7. Affinity cytochemistry with lectins of kidneys of various vertebrates. These studies revealed a number of markers, specific for renal structures, such as nephron segments, interstitial cells, vascular endothelium. The results give tools for the identification of renal structures in immunohistochemical investigations of the kidney.
8. In collaboration with the AG K. Zierold, we measured elemental concentrations in cells by analytical EM (EDX) of ultrathin cryosections with STEM. The objects of the study were chloride cells and proximal tubule cells, both of which are involved in processes of electrolyte- and water regulation in the body.

ZE-Präzisionsgerätebau und Entwicklung (PGE)**Arbeitsgruppe R. König**

Mitarbeiter: U. Babst, J. Besler, G. Beyer, D. Brümman, W. Brüseke, B. Fieber, H. Heinings, P. Jantschik, N. Klein, W. Rüller, J. Ruhnow

1. A. Wittinghofer: Probenständer aus PVC für Eppendorfgefäße, Standregale für den Kühlraum
2. M. Ahmadian, R. Cool, Ch. Herrmann: Chromatographiesäulen zur Proteinaufreinigung
3. Ch. Block: Chromatographiesäulen zur Proteinaufreinigung, Elektrophoresekammern für SDS- und Agarose-Gele
4. J. Becker: Chromatographiesäulen zur Proteinaufreinigung, LM-Kühlblöcke für Proben in Eppendorfgefäßen, Standregale
5. J. Kuhlmann: Chromatographiesäulen zur Proteinaufreinigung, Minisäulen aus PMMA, Spezialeküvette für das CD-Spektrometer, Titrationsvorrichtung, Elektrophoresekammern für SDS- und Agarose-Gele
6. O. Müller: Chromatographiesäulen zur Proteinaufreinigung, LM-Kühlblöcke für Proben in Eppendorfgefäßen, Elektrophoresekammern für SDS- und Agarose-Gele
7. N. Nassar: Chromatographiesäulen zur Proteinaufreinigung, Objektträgerhalter aus PTFE
8. R. Kinne, Biomedizin: Dr. Jäger, Städt. Kliniken und FH-Dortmund, Venenkammer zur Austestung von Vena cava-Filtern
9. E. Kinne: Trockentürme, Bloteinheit
10. Ch. Lin: Elektrophoresekammern für SDS- und Agarose-Gele, Vakuumsaugblock
11. F. Wehner: Mikromanipulator-Halterung, Wärmetauschereinheit, Perfusionssystem mit Steuerung (Meßplatz 2), Temperiereinheit für 6 Gefäße (Meßplatz 7), Versuchskammer für Filtereinsätze mit Elektrodenhalter (Meßplatz 2)
12. A. Werner: Anpassung von Mikromanipulatoren an die Oocyten-Apparatur
13. K. Zierold, D. Badt: Kryokraftmikroskop zur Abbildung von Membranen und Zellen im gefrorenen Zustand, Einfriergerät zur Kryofixierung bei definierter Umgebungstemperatur, Cryostanzen, Vorrichtung zur Kryofixierung im NMR, Probenhalter
14. R. Goody: Lochblechkästen für Tiefkühlschränke (-80°C) zur Aufbewahrung von Langzeitproben, Gradientenmischer, Vorrichtungen zur Wartung des GX-18 Gerätes, Anschluß des N₂- und Luftkühlsystems, Chromatographiesäulen zur Proteinaufreinigung
15. M. Geeves, G. Holtermann: Drucksprungreaktionskammer zur Messung von fluorometrischen Relaxationszeiten von Proteinen, Tank für ein Einhängethermostaten
16. E. Weinhold: Behälter für radioaktive Abfälle aus PMMA, Küvettenhalter
17. B. Wöhrl: Behälter für radioaktive Abfälle aus PMMA, Radioaktiv-Abschirmungen aus PMMA
18. I. Vetter: Elektrophoresekammern für SDS- und Agarose-Gele, Vorrichtungen zur Wartung des GX-18-Gerätes, Chromatographiesäulen zur Proteinaufreinigung, Anschlüsse für LN₂-Behälter
19. A. Scheidig: Goniometerkopf-Erweiterung mit Pinhalterung, Chromatographiesäulen zur Proteinaufreinigung
20. H. Hentschel: Mikro-Justierschrauben für das Zeiss Objektiv 902
21. D. Schäfer: Schallschutzkabine für ein Kühlaggregat
22. D. Lübbers: Kalibrierkammer für 3 Optoden
23. H. Acker: Kammer für Zellcalciummessungen, Kammer für Redoxmessungen von Proteinen
24. S.C. Müller: Halterung für Hg-Lampe, thermostatisierbarer Küvettenhalter mit Küvette, Kolben und Halterungen für Fortunaspritzen
25. M. Delpiano: Temperierblock für Superfusionsgefäße, Superfusionskammer für patch clamp
26. M. Markus: Optischer Aufbau
27. Probenständer für Eppendorfgefäße aus PVC und PMMA, diverse PTFE Elektrophoresekämme, diverse Labortische (Sondermaße u. z.T. Aufkantungen)

1. A. Wittinghofer: PVC sample holder for Eppendorf-vessels: shelves for the cooling chamber
2. M. Ahmadian, R. Cool, Ch. Herrmann: chromatography columns for protein purification
3. Ch. Block: chromatography columns for protein purification: electrophoresis chamber for SDS and agarose gels
4. J. Becker: chromatography columns for protein purification, LM-cooling blocks for samples in Eppendorf-vessels, shelves
5. J. Kuhlmann: chromatography columns for protein purification. mini-columns consisting of PMMA, special cuvettes for the CD-spectrometer, titration device, electrophoresis chambers for SDS and agarose gels
6. O. Müller: chromatography columns for protein purification. LM-cooling blocks for probes in Eppendorf-vessels, electrophoresis chambers for SDS and agarose gels
7. N. Nassar: chromatography columns for protein purification. slide holder consisting of PTFE
8. R. Kinne, Biomedizin: Dr. Jäger, Städt. Kliniken und FH-Dortmund, vein chamber for testing vein-cava-filters
9. E. Kinne: drying towers, blotting chamber
10. Ch. Lin: electrophoresis chambers for SDS and agarose gels. vacuum pump block
11. F. Wehner: holder for micromanipulators, heat exchanger. perfusion system with controlling system (setup 2), temperature controlling system for 6 vessels (setup 7), testing chambers for filter elements with electrode-holder (setup 2)
12. A. Werner: adjustment of micromanipulators for the oocytin-apparatus
13. K. Zierold, D. Badt: cryo-force-microscope for frozen membranes and cells, freezer for cryo-fixation with adjustable temperature, cryo-stamps, apparatus for cryofixation in the NMR. sample plate
14. R. Goody: sheet-metal boxes for deep-freeze (-80°), gradient-miners, equipment for servicing the GX-18 unit, junction for N₂- and air-cooling system, chromatography columns for protein purification
15. M. Geeves, G. Holtermann: pressure-jump-reaction chamber for measurements of fluorescent relaxation times of proteins, tank for thermostat-insert-unit
16. E. Weinhold: container for radioactive waste consisting of PMMA, cuvette holder
17. B. Wöhrl: container for radioactive waste consisting of PMMA, radioactivity shield consisting of PMMA
18. I. Vetter: electrophoresis chambers for agarose and SDS-gels. equipment for servicing the GX-18 unit, chromatography columns for protein purification, delivery connection for LN₂-tanks
19. A. Scheidig: pin-holder for a goniometer-head, chromatography columns for protein purification
20. H. Hentschel: micro-adjustment screws for the Zeiss-objective 902
21. D. Schäfer: sound proofing cabin for a refrigeration unit
22. D. Lübbers: calibration chamber for 3 optodes
23. H. Acker: experimental chamber for measurements of [Ca²⁺], experimental chamber for redox-measurements of proteins
24. S.C. Müller: mounting support for a Hg-lamp, thermostat cuvette-insert with cuvette, piston and holder for 'Fortuna-syringes'
25. M. Delpiano: temperature block for superfusion-vessels, superfusion chamber for patch-clamp measurements
26. M. Markus: optical setup
27. sample holder for Eppendorf-vessels consisting of PVC and PMMA, diverse PTFE electrophoresis combs, diverse labor-tables (special size and partly chamfers)

Zentrales Laboratorium für Mikrobiologie und Biotechnologie
Arbeitsgruppe Dr. D. Kuschmitz

Mitarbeiter: P. Hähnert, Ch. Jantschik, H. Ristau, I. Schlieker, G. Wehmeier

Allgemeine Thematik und Aufgaben

Versorgung der wissenschaftlichen Abteilungen und Arbeitsgruppen mit sterilen Nährmedien (5667 L) und Agarplatten (9078 Platten) für mikrobiologische Arbeiten; Anzucht von rekombinanten *E. coli* in Fermentern (77 Fermenterläufe).

1. Projekt: Optimierung der Biotechnologie rekombinanter Mikroorganismen

Mit der Inbetriebnahme des in situ sterilisierbaren Fermenters BIOSTAT C (30 L Arbeitsvolumen) und der Vernetzung der beiden Fermenter BIOSTAT B und C mit dem Fermenter Kontroll System Micro MFCS ist der technische Aufbau eines leistungsfähigen Biotechnikums abgeschlossen worden. Für die Bestimmung von Zelldichten wurde ein kombiniertes Entgasungs-Durchflußküvetten System entwickelt, das die parallele Messung kleiner Zelldichten im Transmissions- und großer Zelldichten im Reflexions-Modus ermöglicht.

2. Projekt: FTIR-spektroskopische Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Hefe H^+ - und der SR Ca^{++} -ATPase (EEC Research Project)

M. Knauf, Ch. Allin und C. Ulbrich gemeinsam mit R. Goody (Abt. III) und K. Gerwert (Bochum)

Enzym Zyklen und Teilreaktionen davon müssen in einem 6 μ dünnen Proteinfilm durch photolytische Freisetzung von Substraten, z.B. ATP, aus inerten caged Substraten gestartet werden. Die direkteste Methode IR Banden zweifelsfrei zuzuordnen und somit, wegen kinetischer und spektraler Überlappung, zwischen Photolyse und sich anschließenden chemischen Reaktionen der frei gesetzten cage Gruppe einerseits und der eigentlichen Enzymreaktion andererseits unterscheiden zu können, ist eine geeignete Isotopen-markierung. Zum ersten Mal wurde ein ^{13}C -aged ATP synthetisiert. Damit kann jetzt der spektrale Bereich, in dem Protonierungen-Deprotonierungen angezeigt werden, in parallelen Experimenten analysiert werden. Die Änderung einer Bande bei 1265 cm^{-1} , die ein der ATP Hydrolyse ähnliches kinetisches Verhalten zeigte, konnte so der Phenyl-CO Schwingung des Photoproduktes Nitrosoacetophenon zugeordnet werden; sie ist keine hochfrequente Schwingung des P=O Bindungssystems. Um das aktive Zentrum um das phosphorylierte Intermediat E-asp-P, ausgehend von den E1 und E2 Formen der ATPasen, zu charakterisieren, wurden caged ATP (γ - $^{18}O_1$) und caged $^{18}O_4$ -Phosphat synthetisiert.

General subject and duty

Supplying the scientific departments and laboratories with sterile media (5760 L) and agar plates (9078 plates) for microbiological work; cultivation of recombinant *E. coli* in fermentors (77 runs).

1. Project: Improvement of the biotechnology of recombinant microorganisms

With the installation and start up of the in situ sterilizable fermentor BIOSTAT C (30 L working volume) and with the connection of the two fermentors BIOSTAT B and C with the fermentor control system micro MFCS the technical build up of a powerful laboratory for biotechnological tasks has been completed. A combined debubbling-flow-cuvette was developed for the determination of cell densities, which allows to measure in parallel turbidity at low cell densities in the transmission mode and turbidity at high cell densities in the reflexion mode.

2. Project: FTIR spectroscopic investigation of the reaction mechanism of the yeast H^+ - and of the SR Ca^{++} -ATPase (EEC Research Project)

M. Knauf, Ch. Allin and C. Ulbrich in cooperation with R. Goody (Dep. III) and K. Gerwert (Bochum)

The enzyme cycle and its partial reactions have to be started in a 6 μ thin protein film by the photolytic liberation of substrates, e.g. ATP from inert caged substrates. The most straightforward way to unequivocally assign IR bands and thus to differentiate, because of kinetic and spectral overlap, between photolysis and subsequent chemical reactions of the liberated cage group on the one hand and of the enzyme reaction on the other hand, is isotope labeling. For the first time a ^{13}C -caged ATP was synthesized: γ -[1-(2-nitrophenyl)-1,2- ^{13}C -ethyl]-ATP. The most interesting spectral range, where deprotonation-protonation reactions in the enzyme cycle of both ATPases are expected, can now be analyzed in parallel experiments. A band change at 1265 cm^{-1} with similar kinetics to the ATP hydrolysis could thus be assigned to the phenyl-CO bond vibration of the photoproduct nitroso-acetophenone; it is not a high frequency vibration of a P=O bond system. In order to characterize the active site around the phosphorylated intermediate E-asp-P, starting from both conformations E1 and E2, caged ATP (γ - $^{18}O_1$) and caged $^{18}O_4$ -phosphate were synthesized.

Zentrale Einrichtung für Zellkultur und Immunologie
Arbeitsgruppe Dr. F. Pietruschka
 Mitarbeiter: D. Goehrke, A. Langerak

1) Polyklonale Antikörper

Polyklonale Antikörper wurden in Kaninchen produziert gegen 4 Peptide gekoppelt an Fusionsprotein und gegen RAL-GDS, 1344 β , 3 mh, Methyltransferase, Halocyanin, Cytochrom bc, Luziferase, ein 14 mer Peptid (aus der Sequenz von Ran fap 1) gekoppelt an CBSA, Rna1p, Ntf1p und Rock Protein. Die Antiseren gegen die Peptide, die an Fusionsprotein an gekoppelt waren, zeigten viele Antikörper gegen das Fusionsprotein. Durch fortgesetztes Boosten der Tiere sollen mehr Antikörper gegen die Peptide erzeugt werden.

2) Monoklonale Antikörper

Wir produzierten monoklonale Antikörper gegen 3 weitere Domänen von Titin, einem Riesenprotein aus dem Muskel. Zwei von diesen Antikörpern wurden erfolgreich eingesetzt, um Titin in der Immunoelektromikroskopie im Herzmuskel zu markieren. Bei der 3. Domäne schien das Epitop im elektronenmikroskopischen Schnitt nicht zugänglich zu sein. Außerdem produzierten wir Antikörper gegen ein phosphoryliertes Peptid. Leider zeigten die Antikörper keine Bindung an das nativ phosphorylierte Protein. Der Versuch soll im nächsten Jahr wiederholt werden. In einem weiteren Projekt produzierten wir Antikörper gegen Rap, ein cytoplasmatisches Protein von 20 KD. Da wir bei den ersten Versuchen nur IgM's erhielten, koppelten wir das Antigen an KLH und immunisierten außer Balb c 3 weitere Mausestämme einschließlich eines Auszuchtstammes. Vielleicht hatten wir so wenig Erfolg, weil dem Antigen die C-terminalen Aminosäuren fehlen. Wir produzierten Antikörper gegen GST und β -Catenin. Das letztere ist noch nicht abgeschlossen.

1) Polyclonal antibodies

Polyclonal peptides were raised in rabbits against 4 peptides coupled to fusion protein and against RAL-GDS, 1344 β , Bmh, Methyltransferase, Halocyanin, Cytochrom bc, Luciferase, a 14 mer peptide (of Ran fap 1) coupled to cBSA, Rna1p, Ntf1p and rock protein. The antisera against the peptides coupled to fusion proteins were found to have many antibodies against the fusion protein. Continued boosting the animals should help to produce more antibodies against the peptides.

2) Monoclonal antibodies

We have produced monoclonal antibodies against 3 further domains of titin, a giant protein of the muscle. Two of these antibodies were successfully used to stain titin in immunoelectron microscopy in heart tissue. In the case of the third domain the epitope seemed to be not accessible in electron microscopic section. We produced antibodies against a phosphorylated peptide, but the antibodies did not bind to the native phosphorylated protein. This is to be repeated next year. Another project was to produce antibodies against Rap, a cytoplasmic protein of 20 KD. Since we only obtained IgM's, we coupled the antigen to KLH before immunization and tried three other mouse strains besides Balb c, including outbred mice. Perhaps we had so little success because the c-terminal amino acids of the protein are missing in our antigen. We made monoclonals against GST and β -Catenin. The latter work is still in progress.

Zentrale Einrichtung - EDV Arbeitsgruppe 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. Nach Abschluß der Ethernet-Verkabelung verfügen jetzt die Räumlichkeiten aller wissenschaftlichen Arbeitsgruppen über Möglichkeiten zur Anbindung von Rechnern (Workstations, PC, etc.) an das lokale Netzwerk. 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, Datenbanken, Infosysteme, electronic Mail, News, Fax, Drucken, Rechenleistung, Online-Labordatenerfassung, etc. Services, die auf Servern im Institut installiert sind, werden über das lokale Netz mit einer wesentlich höheren Datenrate abgewickelt als die Nutzung von weltweiten Services. 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 Macintosh als Clients eingesetzt.

Im Jahre 1995 ist das LAN wie im Vorjahr wieder besonders stark im Bereich der PC und grafischen Workstation gewachsen. Zur Zeit sind ca. 140 PC, 40 Workstations (SUN, Silicon Graphics) und 27 Laserdrucker in das Netz integriert. Es sind ca. 150 Nutzer registriert, deren Daten etwa 100 GB Plattenspeicher belegen und für die rund 35 Services betreut werden. Weitere Informationen finden Sie im IWW (Institute Wide Web). Das Netz, die Rechnerbasis und die Services werden von den Mitarbeitern der ZE-EDV konzeptionell entwickelt, installiert und betreut.

Das elektronische Informationssystem IWW (Institute Wide Web): Die ZE-EDV betreibt im lokalen Netz einen Server, der in der Technologie des WWW (World Wide Web) Informationen für die Mitarbeiter des Instituts bereitstellt. Die Informationen sind für jeden zugänglich, der mit einem WWW Browser Zugang zum LAN des MPI hat. Der IWW Server ist gegen die Außenwelt abgeschottet, d. h. die Informationen sind im Internet bzw. im WWW (World Wide Web) nicht sichtbar! Als Browser empfiehlt und unterstützt die ZE-EDV Netscape.

Zur Zeit ist das System noch im Aufbau. Die ZE-EDV stellt den technischen Rahmen für das Informationssystem zur Verfügung. Innerhalb dieses Rahmens können sich die Abteilungen, Arbeitsgruppen, Zentralen Einrichtungen, etc. selbst darstellen.

The 'Zentrale Einheit EDV' manages the local network (LAN) of the institute with the integrated computers, the other equipment for data processing and acquisition and the international connectivity of the institute via Internet as well.

All groups in the institute have the possibility to integrate their workstations, personal computers, printers and other equipment into the LAN, since most of the rooms and laboratories are provided with Ethernet adapters. The LAN has a gateway to the WiN, the German scientific network, allowing via Internet access to other scientific networks world wide.

Examples of Services :

Program libraries, Databases, Infosystems, electronic Mail, News, Fax, Printing, Computing Power, Online-Data Acquisition, etc. Services provided on servers in the LAN run with significantly higher data transmission rates than world wide services. Most of the local services run on SUN workstations.

Services are accessible to clients. Clients are computers on the desk equipped with specific software for the complex client server interaction. At the moment computers with the operating systems UNIX, MS-DOS/Windows and Macintosh are in use as Clients.

In 1995 the growth rate of the LAN was similar to the year before, especially strong for PC and graphics workstations. We now have about 140 PCs, 40 workstations (SUN, Silicon Graphics) und 27 laser printers installed and 150 users are registered in the network information system. The ZE-EDV administrates for the user 100 GB of disk memory and supports about 35 services. Further information may be found in the IWW (Institute Wide Web). The local network, the computer resources and the various services are planned, installed and supported by the staff of the ZE-EDV.

The electronic information system IWW (Institute Wide Web): The ZE-EDV runs a server in the local network, which provides information for the employees of the institute with the technology of the WWW (World Wide Web). The information is readable for anyone who has access to the LAN of the MPI via a WWW browser. The IWW server is protected, i.e. the information is not visible to the Internet and the WWW (World Wide Web)! The Netscape browser is recommended for browsing the information in the IWW. Netscape is supported by the ZE-EDV.

Zentrale Einrichtung - Synthese und Sequenzierung Arbeitsgruppe PD Dr. H.-J. Wieker

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

Protein-Sequenzierung:

Auch in 1995 lief die Protein-Sequenzierung kontinuierlich und störungsfrei, wobei die fruchtbare Zusammenarbeit mit Arbeitsgruppen der Ruhr-Universität Bochum und der Uni/GSH Essen fortgesetzt wurde. Es wurden 97 Sequenzierungen mit 1.500 Abbauschritten und den zugehörigen Analysen durchgeführt.

Oligonucleotid-Synthese:

In 1995 wurden alle Oligo-Synthesen mit dem Oligo 1000 (Beckman) durchgeführt. Die Oligonucleotide wurden über NAP-Säulen gereinigt, bei besonderen Anforderungen auch mittels HPLC. Außerdem wurde fast jedes Oligo mittels analytischer HPLC kontrolliert. Im Berichtsjahr wurden 528 Oligos mit 14.840 Basen synthetisiert; das entspricht einer Steigerung um 64% gegenüber 1984.

DNA-Sequenzierung:

Seit Mai 1995 werden von der ZE-SuS auch DNA-Sequenzierungen auf der Basis von Fluoreszenzmarkierungen durchgeführt (ABI Model 373). Die Sequenzierungen erfolgten bisher nur im Cycle-Sequencing nach der Dye-Terminator-Methode mit Taq-Polymerase und gelabelten Dideoxynucleotiden. Je nach Qualität der gelieferten Proben können 500 - 600 Basen gelesen werden. Die von uns ermittelten Sequenzen werden so aufbereitet, daß sie vom User direkt aus dem Datennetz übernommen werden können. - Dieser neue Service wurde so gut angenommen, daß bereits 1.323 Sequenzierungen durchgeführt wurden.

Molekularbiologische Software:

Die Ende 1994 installierte GCG-Version 8.0 ist z.Z. für 49 Benutzer im Institut zugänglich. Wie im Falle von GCG 7.3 wurde diese neue Version durch das „Extended GCG (EGCG 8)“ erweitert, und es stehen nun 171 Programme zur Verfügung. - Nach dem Start von GCG haben Interessenten, neben ENTREZ und SHADYBOX, Zugriff auf:

- SHOWPRINT: Ansicht und Ausdruck der GCG-Programmdokumentation im Postscript-Format.
- GENETIC DATA ENVIRONMENT (GDE): Modulierbares Programmpaket mit graphischer Benutzeroberfläche, enthält u.a. das Alignment-Programm CLUSTAL und das Phylogenie-Paket PHYLIP.
- ASCDB: Genetische Karten und Sequenzen von Chromosomen der Bäckerhefe.

Auch für DOS/Windows-PCs und Macintosh-PowerPCs wurden etliche kleinere Programme installiert.

Protein-Sequencing:

As in previous years, we continued to offer the service of protein sequencing, partially in fruitful collaboration with colleagues from the Ruhr-Universität Bochum and from the Uni/GSH Essen. For the determination of 97 sequences it was necessary to analyse 1.500 reaction cycles.

Oligonucleotide Synthesis:

In 1995 all oligonucleotides were synthesized on an Oligo 1000 (Beckman). The oligonucleotides were purified on NAP Columns, in special cases by HPLC, and the quality was controlled by analytical HPLC. In the year under report 528 oligonucleotides with 14.840 bases were synthesized, i.e. 64% more than in 1994.

DNA Sequencing:

Since May 1995 the ZE-SuS performs DNA sequencing, using an ABI Model 373. Sequencing was done 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, 500 - 600 bases can be read. The sequences identified by us are directly transferred to the user via e-mail or data net. Since May 1995 1323 sequences have been determined.

Software for Molecular Biology:

The GCG-Version 8.0, installed at the end of 1994, is now accessible for 49 users. As in the case of GCG 7.3, „Extended GCG (EGCG 8)“ was added to this new version. Thus 171 programs are available. -Starting GCG, the user can call, besides ENTREZ and SHADYBOX, these programs:

- SHOWPRINT: view and output of GCG program documentations in post-script format.
- GENETIC DATA ENVIRONMENT (GDE): a modular program package with a graphical user interface containing the phylogeny package PHYLIP and the alignment program CLUSTAL.
- ASCDB: Genetic maps and sequences of chromosomes from baker's yeast.

In addition, a series of small programs for DOS/Windows-PCs and Macintosh-Power-PCs were installed.

Arbeitsgruppe Dr. D. v. Wulffen

Mitarbeiter: D. Seiler

- #1. Acker: Äquilibriergefäße, Glasringe und Glasfilter, Einleitungs-Glasrohre
- #2. Engelhard: Filtrationseinheiten, Glassäulen, Schwanz-Hähne mit abgewinkeltem Glas-Kern-Schliff 14.5mm, Kolbenflaschen, Gel-Ohrenplatten
- #3. Goody: Gaseinleitungsrohre m. Fritten, Trockenrohre m. Hahn, Schlenkrohre mit Hahn, Kolbenflaschen, Instandsetzung div. Glasgeräte mit N.S. Kernen und Hülsen sowie mit div. Durchgangshähnen
- #4. Wittinghofer: Glaseinsätze f. Kühlfallen (Savant) aus 95 mm, Duran 50 Glasrohr Neuanfertigung
- #5. Kuschmitz: Flußrohre aus Dwan 50 Glas kompl. Glas-Destillationsanlage. Schlauchverbinder und Muster. Kühlfallen. Anfertigung von Pipetten und Glasbögen
- #6. Lin: Erlenmeyer umgearbeitet, diverse Glasgefäße rep. u. ergänzt. Drigalski-Spatel (groß) 1 Kühlfalle angefertigt. 3 Feuchtigkeitssperren mit Durchgangshahn m. N.S. 29
- #7. Azubis: Glasstäbe und Laborgläser angefertigt
- #8. Biomedizin: Herr Rose und Jäger Glasrohre nach Angaben umgearbeitet
- #9. S.Müller: Flachglasscheibe nach Angabe
- #10. Hentschel: Diverse Glasgefäße rep. u. neu angefertigt. Perfusionsflaschen mit Hahn. Glas-Küvetten
- #11. Weinhhold: Erlenmeyer Rundkolben Bechergläser m. Meßzylinder rep. und Neuanfertigung. Chromatographie-Säulen mit Ritaflo-Hähnen. Schliffübergangsstücke N.S. 10 auf N.S. 14,5
- #12. E. Kinne: Filtrations-Aufsätze mit Schliff-Verbindungen 29/32
- #13. Baumgärtl: Anfertigung von Eichengefäßen für Elektrodenbau. Glasscheiben u. Muster div. Glasscheiben
- #14. Herrmann: Glasbehälter mit zwei Glaseinfillstutzen mit Oliven
- #15. Seidel: 100 ml-Kolben mit zwei Schikanen versehen
- #16. O. Müller: Glasplatten gesäumt und geschliffen
- #17. Zierold: Glasgefäße nach Zeichnung für Elektronenmikroskop
- #18. Markus: Uhrengläser schleifen und einpassen, 15 Glasscheiben 4 mm rund geschliffen Milchglasscheiben
- #19. Sieland: Flachglasscheiben spiefelfrei f. Vergrößerungsapparat. Milchglasscheiben
- #20. Wehner: Petrischalen mit Deckel, Liebig-Kühler mit Kapillarrohr, Teflon-Hahn mit Olive, Präferationsgefäß
- #21. Kiese: T-Stücke
- #22. Becker: Glasstäbe: Sequenzierungsplatten
- #23. Grote: Glasscheiben f. Meßgeräte
- #24. Kuhlmann: 10 Filterplatten 20 mm Ø, P3 eingeschliffen
- #25. Geeves: 2 ltr. Erlenmeyer-Kolben mit Schikanen versehen, Schneiden und Schleifen von Glasfiltern
- #26. Pietruschka: Glaszylinder umgearbeitet, rep. von Magnetrührern
- #27. Reinstein: Druckfeste Schlenkgefäße mit seitlichem Teflon-Hähnen, Schliffröhrchen, Rundkolben m. Einschmelzung
- #28. Wieker: Abänderung von Meßzylindern
- #29. Block: Dreiwege-Hahn, Glas-Spatel
- #30. S.Müller: Runde Glasscheiben m. Muster
- #31. Delpiano: Superfusionsgefäße m. Fritten
- #32. Bechinger: Saugflaschen m. Erlenmeyer-Kolben umgearbeitet
- #1. Acker: Equilibration vessels, glass rings and glass filters, glass tubes
- #2. Engelhard: Filtration units, glass columns, taps, piston bottles
- #3. Goody: Glass tubes with frits, drying tubes with taps, tubes with taps, piston bottles, repair of several glass devices
- #4. Wittinghofer: Glass insets for cooling traps (Savant) out of 95 mm Dwan 50 glass tube, new construction
- #5. Kuschmitz: Flow tubes out of Dwan 50 glass, entire glass destilling plant, hose connectors and samples; cooling traps, construction of pipettes
- #6. Lin: Erlenmeyer flasks modified, several glass vessels repaired; Drigalski-spatula (big); construction of 1 cooling trap, 3 moisture blockades with taps
- #7. Apprentices: Construction of glass rods and laboratory glass ware
- #8. Biomedizin: work on glass tubes according to indications given by Mr. Rose and Mr. Jäger
- #9. S.C. Müller: flat glass plate according to indications
- #10. Hentschel: Varied glass vessels repaired. and newly built, perfusion bottles with taps, glass cuvettes
- #11. Weinhold: Erlenmeyer round flasks, glass cups and graduated cylinder, repaired and newly built, chromatography columns with Rotaflo-taps, Adaptor for N.S. 10 to N.S. 14,5
- #12. E. Kinne: Filtration-attachment with ground glass connections 29/32
- #13. Baumgärtl: Construction of calibration vessels for building of electrodes, glass plates according to samples, several glass plates
- #14. Herrmann: Glass vessels with two filling devices with olives
- #15. 100 ml flasks with two traps
- #16. O. Müller: Glass plates, edged and ground
- #17. Zierold: Glass vessels according to drawing for the electron microscope
- #18. Markus: Grinding and fitting of watch glasses, 15 glass plates 4 mm round cut, milk glass plates
- #19. Sieland: Flat, non-reflecting glass plates for enlarger, milk glass plates
- #20. Wehner: Petri dishes with cover, Liebig condensor with capillary tube, teflon-tap with olive, preparation vessel
- #21. Kiese: T-pieces
- #22. Becker: Glass bars: sequencing plates
- #23. Grote: Glass plates for measuring devices
- #24. Kuhlmann: 10 filtering plates 20 mm Ø, P3 cut
- #25. Geeves: 2 liter Erlenmeyer flask with traps, cutting and grinding of glass filters
- #26. Pietruschka: Glass cylinder transformed, repair of magnetic stirrers
- #27. Reinstein: Shaking vessels resistant to pressure with side teflon-taps, tubes, round flask according to requirements
- #28. Wieker: Modification of measuring cylinders
- #29. Block: Three-way tap, glass spatula
- #30. S. Müller: Round glass plate with sample
- #31. Delpiano: Superfusion vessel with frits
- #32. Bechinger: Modification of suction bottles with Erlenmeyer flasks

Liste der Publikationen

1. 1995 erschienene oder im Druck befindliche Originalarbeiten in referierten Zeitschriften (ohne Abstracts)

1. Publications in refereed journals, published in 1995 or presently in press (no meeting abstracts)

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

- M.R. Ahmadian, R. Kreutzer, B. Blechschmidt, M. Sprinzl:
„Site-directed mutagenesis of *Thermus thermophilus* EF-Tu: the substitution of threonine-62 by serine or alanine“
FEBS Letters **377**:253-257 (1995)
- Y. Azuma, H. Seino, T. Seki, S. Uzawa, C. Klebe, T. Ohba, A. Wittinghofer, N. Hayashi, T. Nishimoto:
„Analysis of RCC1-repeat by alanine-scanning mutagenesis: sites essential for guanine nucleotide exchanging activity“
Mol. Cell. Biol. (in press)
- J. Becker, F. Melchior, V. Gerke, F.R. Bischoff, H. Ponstingl, A. Wittinghofer:
„RNA1 encodes a GTPase activating protein specific for Gsp1p, the Ran/TC4 homologue of *Saccharomyces cerevisiae*.“
J. Biol. Chem. **270**:11860-11865 (1995)
- C. Block, A. Wittinghofer:
„Switching to Rac and Rho“
Structure **3**:1281-1284 (1995)
- P.R. Clarke, C. Klebe, A. Wittinghofer, E. Karsenti:
„Regulation of Cdc2/cyclin B activation by Ran, a Ras-related GTPase“
J. Cell Science **108**:1217-1225 (1995)
- R. Deuter, S. Pietsch, S. Hertel, O. Müller:
„A method for preparation of fecal DNA suitable for PCR“
Nucleic Acids Research **23**:3800-3801 (1995)
- C. Herrmann, G. Horn, M. Spaargaren, A. Wittinghofer:
„Differential interaction of the Ras family GTP-binding proteins H-Ras, Rap1A and R-Rs with the putative effector molecules Raf-kinase and Ral-GEF“
J. Biol. Chem. (in press)
- C. Herrmann, G.A. Martin, A. Wittinghofer:
„Quantitative analysis of the complex between p21^{ras} and the Ras-binding domain of the human Raf-1 protein kinase“
J. Biol. Chem. **270**:2901-2905 (1995)
- C. Klebe, F.R. Bischoff, H. Ponstingl, A. Wittinghofer:
„Interaction of the nuclear GTP-binding protein Ran with its regulatory proteins RCC1 and RanGAP1“
Biochemistry **34**:639-647 (1995)
- C. Klebe, H. Prinz, A. Wittinghofer, R.S. Goody:
„The kinetic mechanism of Ran — nucleotide exchange catalyzed by RCC1“
Biochemistry **34**:12543-12552 (1995)
- Ch. Lenzen, R.H. Cool, A. Wittinghofer:
„Analysis of intrinsic and CDC25-stimulated guanine nucleotide exchange of p21^{ras}-nucleotide complexes by fluorescence measurements“
Methods Enzymol. **225**:95-109 (1995)
- Ch. Lenzen, R. Cool, A. Wittinghofer:
„Analysis of intrinsic and CDC25-stimulated guanine nucleotide exchange of p21^{ras}-nucleotide complexes by fluorescence measurements“
In: W.E. Balch, C.J. Der, A. Hall (Eds.): „Small GTPases and their regulators, Part A, Ras Family“ *Methods in Enzymology* **255**:95-109 (1995)
- N. Nassar, G. Horn, C. Herrmann, A. Scherer, F. McCormick, A. Wittinghofer:
„The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue“
Nature **375**:554-560 (1995)
- H. Rensland, J. John, R. Linke, I. Simon, I. Schlichting, A. Wittinghofer, R.S. Goody:
„Substrate and product structural requirements for binding of nucleotides to H-ras p21: the mechanism of discrimination between guanosine and adenosine nucleotides“
Biochemistry **34**:593-599 (1995)
- M.F. Richter, M. Schwemmle, C. Herrmann, A. Wittinghofer, P. Staeheli:
Interferon-induced MxA Protein: GTP Binding and GTP Hydrolysis Properties“
J. Biol. Chem. **270**:13512-13517 (1995)
- K. Scheffzek, C. Klebe, K. Fritz-Wolf, W. Kabsch, A. Wittinghofer:
„Crystal structure of the nuclear Ras-related protein Ran in its GDP-bound form“
Nature **374**:378-381 (1995)

- A.J. Scheidig, S.M. Franken, J.E.T. Corrie, G.P. Reid, A. Wittinghofer, E.F. Pai, R.S. Goody:
„X-ray crystal structure analysis of the catalytic domain of the oncogene product p21^{H-ras} complexed with caged GTP and mant dGppNHp“
J. Mol. Biol. **253**:132-150 (1995)
- T. Schweins, M. Geyer, K. Scheffzek, A. Warshel, H.R. Kalbitzer, A. Wittinghofer:
„Substrate-assisted catalysis as a mechanism for GTP hydrolysis of p21^{ras} and other GTP-binding proteins“
Nature Structural Biology **2**:36-44 (1995)
- M. Schwemmle, M.F. Richter, C. Herrmann, N. Nassar, P. Staeheli:
"Unexpected Structural Requirements for GTPase Activity of the Interferon-Induced MxA Protein"
J. Biol. Chem. **270**: 13518-13523 (1995)
- L. Wiesmüller, K. Scheffzek, W. Kliche, R.S. Goody, A. Wittinghofer, J. Reinstein:
„Crystallization and preliminary X-ray analysis of UMP/CMP-kinase from *Dictyostelium discoideum* with the specific bisubstrate inhibitor P¹-(adenosine 5')-P⁵-(uridine 5')-pentaphosphate (UP₅A)“
FEBS Lett. **363**:22-24 (1995)
- A. Wittinghofer, C. Herrmann:
„Ras-effector interactions, the problem of specificity“
FEBS Lett. **369**:52-56 (1995)

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

- S. Boese, F. Wehner, R.K.H. Kinne:
„Taurine permeation through swelling-activated anion conductance in rat inner medullary collecting duct cells in primary culture“
Am. J. Physiol. (in press)
- L.M. Dinkelborg, R.K.H. Kinne, M.K. Grieshaber:
„Characterization and pH dependence of L-glutamate transport in sarcolemmal vesicles from rat hearts“
Am. J. Physiol. **268**:H194-H201 (1995)
- L.M. Dinkelborg, R.K.H. Kinne, M.K. Grieshaber:
„Transport and metabolism of L-glutamate during oxygenation anoxia and reoxygenation of isolated adult rat heart myocytes“
Am. J. Physiol. (in press)
- C.A. Freire, E. Kinne-Saffran, K.W. Beyenbach, R.K.H. Kinne:
„Na-D-glucose cotransport in renal brush-border membrane vesicles of an early teleost (*Oncorhynchus mykiss*)“
Am. J. Physiol. **269**: R592-R602 (1995)
- C.A. Freire, R.K.H. Kinne, E. Kinne-Saffran, K.W. Beyenbach:
„Evidence for a magnesium channel in renal proximal tubules“
J. Am. Soc. Nephrol. **6**(3) (1995)
- 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. (in press)
- R.W. Grunewald, I.I. Weber, R.K.H. Kinne:
„Renal inner medullary sorbitol metabolism“
Am. J. Physiol. **269**:F696-F701 (1995)
- R.W. Grunewald, I.I. Weber, R.K.H. Kinne:
„Renal inner medullary sorbitol metabolism“
Am. J. Physiol. **269**:F696-F701 (1995)
- E. Kinne-Saffran, R.K.H. Kinne:
„The contribution of marine biology to biomedical research: past, present, future“
Helgoländer Meeresuntersuch. **49**:45-56 (1995)
- E. Kinne-Saffran, Ch. Pfaff, R.K.H. Kinne:
„Regulation of sorbitol release in a cell line derived from the thick ascending limb of henle's loop (talh)“
J. Am. Soc. Nephrol. **6**(3) (1995)
- R.K.H. Kinne, H. Schütz, E. Kinne-Saffran:
„The effect of cadmium chloride in vitro on sodium-glutamate cotransport in brush border membrane vesicles isolated from rabbit kidney“
Toxicol. Appl. Pharmacol. **135**:216-221 (1995)
- B. Kohl, P. Herter, B. Hülseweh, M. Elger, H. Hentschel, R.K.H. Kinne, A. Werner:
„Na/Pi cotransport in flounder: The same transport system in kidney and intestine“
Am. J. Physiol. (in press)
- A.T. Nies, R.K.H. Kinne, E. Kinne-Saffran, M.K. Grieshaber:
„Urate transport in *Homas maericanus* hepatopancreas: studies on membrane vesicles and R cells“
Am. J. Physiol. **269**:R339-R349 (1995)
- H. Sauer, R.K.H. Kinne, F. Wehner:
„Activation of a Cl⁻ conductive pathway in primary cultures of rat inner medullary collecting duct (IMCD) cells under hypotonic stress“
Biochim. Biophys. Acta **1239**:507-535 (1995)

- M. Thie, B. Harrach-Ruprecht, H. Sauer, P. Fuchs, A. Albers, H.-W. Denker:
„Cell adhesion to the apical pole of epithelium: a function of cell polarity“
European Journal of Cell Biology 66:180-191 (1995)
- F. Wehner, H. Sauer, R.K.H. Kinne:
„Hypertonic stress increases the Na⁺ conductance of rat hepatocytes in primary culture“
J. Gen. Physiol. 105:507-535 (1995)
- 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. (in press)
- H.-P. Wiesmann, H.J. Höhling, K. Zierold, R. Barckhaus:
„Elemental distributions in predentine associated with dentine mineralization in rat incisor“
Connective Tissue Research 33:179-184 (1995)
- K. Zierold, H. Hentschel, F. Wehner, A. Wessing:
„X-ray microanalysis of epithelial cells: Aspects of cryofixation“
Sanning Microscopy Suppl. 8:117-127 (1994/1995)
- L.B. Zimmerhackl, K. Rostasy, G. Wiegele, A. Rasenack, C. Wilhelm, M. Lohner, M. Brandis, R.K.H. Kinne:
„Tamm-Horsfall protein as marker of tubular maturation“
Pediat. Nephrol. (in press)

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

- M. Anson, D.R. Drummond, M.A. Geeves, E.S. Hennessey, M.D. Ritchie, J.C. Sparrow:
„Actomyosin kinetics and *in vitro* motility of wild-type *Drosophila* actin and the effects of two mutations in the *Act88F* gene“
Biophys. J. 68:1991-2003 (1995)
- A. Buchberger, H. Theyssen, H. Schröder, J.S. McCarthy, G. Virgallita, P. Milkereit, J. Reinstein, B. Bukau:
„Nucleotide-induced conformational-changes in the ATPase and substrate-binding domains of the DnaK chaperone provide evidence for interdomain communication“
J. Biol. Chem. 270:16903-16910 (1995)
- G. Divita, K. Rittinger, Ch. Geourjon, G. Deléage, R.S. Goody:
„Dimerization kinetics of HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptase. A two step process“
J. Mol. Biol. 245:508-521 (1995)
- G. Divita, J.G. Baillon, K. Rittinger, J.-C. Chermann, R.S. Goody:
„Interface peptides as structure-based human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitors“
J. Biol. Chem. 270:28642-28646 (1995)
- G. Divita, K. Rittinger, T. Restle, U. Immendörfer, R.S. Goody:
„Conformational stability of dimeric HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptases“
Biochemistry 34:16337-16346 (1995)
- M.A. Geeves, J.P. Branson, P.J. Attwood:
„The kinetics of nucleotide binding to pyruvate carboxylase“
Biochem. 34:11846-11854 (1995)
- M.A. Geeves, P.B. Conibear:
„The role of three-state docking of myosin with actin in force generation“
Biophys. J. 68:194-201s (1995)
- J.D. Head, M. Ritchie, M.A. Geeves:
„Characterization of the equilibrium between blocked & closed states of muscle thin filaments“
Europ. J. Biochem. 227:694-699 (1995)
- E. Jacoby, I. Schlichting, C. Lanturis, W. Kabschif, L. Kranth-Siegel:
„The crystal structure of *T. cruzi* trypanothion reductase mepacrine complex“
Proteins (in press)
- D. Manstein, H.-P. Schuster, P. Morandini, D.M. Hunt:
„Cloning vectors for the production of proteins in *Dictyostelium discoideum*“
Gene 162:129-134 (1995)
- J.S. McCarty, A. Buchberger, J. Reinstein, B. Bukau:
„The role of ATP in the Functional Cycle of the DnaK Chaperone System“
J. Mol. Biol. 249:126-137 (1995)
- C.W. Müller, G.J. Schlauderer, J. Reinstein, G.E. Schulz:
„Adenylate kinase motions during catalysis, an energetic counterweight balancing substrate binding“
Structure 4(2):147-156 (1995)
- H. Pelicano, 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 (1995)

- H. Rensland, J. John, R. Linke, I. Simon, I. Schlichting, A. Wittinghofer, R.S. Goody:
„Substrate and product structural requirements for binding of nucleotides to H-ras p21: the mechanism of discrimination between guanosine and adenosine nucleotides“
Biochemistry 34:593-599 (1995)
- K. Rittinger, G. Divita, R.S. Goody:
„Human immunodeficiency virus reverse transcriptase substrate-induced conformational changes and the mechanism of inhibition by nonnucleoside inhibitors“
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8046-8049 (1995)
- S.S. Schaertl, S.S. Lehrer, M.A. Geeves:
„Separation and characterization of the two functional regions of troponin involved in muscle thin filament regulation“
Biochem. Dec. 1995
- A.J. Scheidig, S.M. Franken, J.E.T. Corrie, A. Wittinghofer, E.F. Pai, R.S. Goody:
„X-ray crystal structure analysis of the catalytic domain of the oncogene product p21H-ras complexed with caged GTP and mant dGppNHp: Structure analysis of complexes between a protein and substrate analogues used for biophysical studies“
J. Mol. Biol. 253:132-150 (1995)
- A.J. Scheidig, S.M. Franken, J.E.T. Corrie, G.P. Reid, A. Wittinghofer, E.F. Pai, R.S. Goody:
„X-ray crystal structure analysis of the catalytic domain of the oncogene product p21^{H-ras} complexed with caged GTP and mant dGppNHp“
J. Mol. Bio. 253:132-150 (1995)
- R. Seidel, B. Scharf, M. Gautel, K. Kleine, D. Oesterhelt, M. Engelhard:
„The primary structure of sensory rhodopsin II: A member of an additional retinal protein subgroup is coexpressed with its transducer, the halobacterial transducer of rhodopsin II“
Proc. Natl. Acad. Sci. 92:3036-3040 (1995)
- D.A. Smith, M.A. Geeves:
„A strain dependent crossbridge cycle for muscle I“
Biophys. J. 69:524-537 (1995)
- D.A. Smith, M.A. Geeves
„A strain dependent crossbridge cycle for muscle II. Steady-state behaviour.“
Biophys. J. 69:538-552 (1995)
- F. Vawda, K.W. Ranatunga, M.A. Geeves:
„Pressure induced changes in the isometric contractions of single intact frog muscle at low temperatures“
J. Muscle Res. & Cell Motil. 16:412-419 (1995)
- C. Veigel, R.D. von Maydell, R. Wiegand-Steubing, R.S. Goody, R.H.A. Fink:
„The influence of ionic strength on relaxation from rigor induced by flash photolysis of caged-ATP in skinned murine skeletal muscle fibres“
Pflügers Arch., Eur. J. Physiol. 430:994-1003 (1995)
- A. Wagner, I. Simon, M. Sprinzl, R.S. Goody:
„Interaction of guanosine nucleotides and their analogs with elongation factor Tu from *Thermus thermophilus*“
Biochemistry 34:12535-12542 (1995)
- U.F. Wehmeier, B.M. Wöhrl, J. W. Lengeler:
„Molecular analysis of the phosphoenolpyruvate-dependent L-sorbose:phosphotransferase system from *Klebsiella pneumoniae* and of its multidomain structure“
Mol.Gen.Genet. 246:610-618 (1995)
- E.G. Weinhold, S.A. Benner:
„Engineering yeast alcohol dehydrogenase. Replacing Trp54 by Leu broadens substrate specificity“
Protein Eng. 8:457-461 (1995)
- L. Wiesmüller, K. Scheffzek, W. Kliche, R.S. Goody, A. Wittinghofer, J. Reinstein:
„Crystallization and preliminary X-ray analysis of UMP/CMP-kinase from *Dictyostelium discoideum* with the specific bisubstrate inhibitor p1-(adenosine 5')-P5-(uridine 5')-pentaphosphate (UP5A)“
FEBS Letters 363:22-24 (1995)
- B.M. Wöhrl, M. Georgiadis, A. Telesnitsky, W. Hendrickson, S. F. J. Le Grice:
„Footprinting analysis of replicating murine leukemia virus reverse transcriptase and a polypeptide lacking the C-terminal RNase H domain“
Science 267:96-99 (1995)
- B.M. Wöhrl, E. Arnold, C. Tantillo, S. F. J. Le Grice:
„An expanded biochemical and structural model of translocating human immunodeficiency virus reverse transcriptase“
Biochemistry 34:5343-5350 (1995)
- S.K.A. Woodward, M.A. Geeves, D.J. Manstein:
„Kinetic characterisation of the catalytic domain of *Dictyostelium discoideum* myosin“
Biochem. (in press)

Zentrale Einrichtungen

- H. Baumgärtl, K. Kritzler, W. Zimmelka, D. Zinkler:
„Local PO₂ measurements in the environment of submerged soil microarthropods“
Acta Oecologica 15:781-789 (1994)
- H. Baumgärtl, W. Zimmelka, D.W. Lübbers:
„Effects of puncturing on the measurement of local oxygen pressure using polarographic microelectrodes“
Adv. Exp. Med. Biol. (in press)
- B. Kohl, S. Hülseweh, P. Herter, M. Elger, H. Hentschel, A. Werner:
„The sodium phosphate cotransport system is present in kidney and intestine of flounder, *Pseudopleuronectes americanus*“
Am. J. Physiol. (in press)
- Th. Plesser:
„Spiral waves, organizers of temporal and spatial order in excitable media“
Journal of the Autonomic Nervous Systems (in press)

z.Z. dem Kollegium direkt unterstellte Arbeitsgruppen

- H. Acker, D. Xue:
„Mechanisms of oxygen sensing in the carotid body in comparison to other oxygen sensing cells“
NIPS 10:211-217 (1995)
- M. Bode, D. Ruwisch, S. Schütz, M. Alonso, V. Pérez-Muñuzuri, V. Pérez-Villar, M. Markus:
"Parallel analog computation of coupled biological oscillators"
J. of Biological Systems 3:81-93 (1995)
- M. Bode, D. Rumisch, S. Schütz, M. Alonso, V. Pérez-Muñuzuri, V. Pérez-Villar, M. Markus:
"Parallel analog computation of coupled biological oscillators"
J. of Biological Systems 3:81-93 (1995)
- A.K. Dutt, S.C. Müller:
„Bistability in an uncatalyzed bromate oscillator in a continuously fed stirred tank reactor“
J. Chem. Phys. (in press)
- M. Gassmann, M. Wartenberg, T. McClanahan, J. Fandrey, S. Bichet, R. Kreuter, H. Acker, C. Bauer:
„Differentiating embryonic stem cells as an in vitro model of early erythropoiesis“
Toxic in vitro 9,4:429-438 (1995)
- 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 (in press)
- A. Görlach, B. Bölling, G. Holtermann, J. Schwachofer, J. Carlsson, H. Acker:
„Changes in growth, PO₂ and pH after exposure to oxamate: Studies of two human tumour cell lines growing as multicellular spheroids“
Int. J. Oncol. 7:831-839 (1995)
- S. Grill, V. Zykov, S.C. Müller:
„Feedback-controlled dynamics of meandering spiral waves“
Phys. Rev. Lett. 75:3368-3371 (1995)
- M. Köhler, S.C. Müller:
„Frozen chemical waves in the Belousov-Zhabotinsky reaction“
J. Phys. Chem. 99:980-983 (1995)
- F. Krüger, Zs. Nagy-Ungvarai, S.C. Müller:
„Influence of Organic Acids on Oscillations and Waves in the Ferrous-catalyzed Belousov-Zhabotinsky reaction“
Physica D 84:95-102 (1995)
- W. Kummer, H. Acker:
„Immunohistochemical demonstration of 4 subunits of neutrophil NAD(P)H oxidase in type I cells of carotid body“
J. Appl. Physiol. 78:1904-1909 (1995)
- I. Kusch, M. Markus:
"Mollusc shell pigmentation: cellular automaton simulations and evidence for undecidability"
J. of Biol. Systems, 3: 999-1011 (1995)
- Th. Mair, S.C. Müller:
„Selforganized circular and spiral NADH waves in a yeast extract“
Biol. Chem. (in press)
- Th. Mair, S.C. Müller:
„Traveling NADH and proton waves during oscillatory glycolysis in vitro“
J. Biol. Chem. (in press)
- M. Markus:
"Lyapunov-Diagramme"
Spektrum der Wissenschaft (4), April, 66-73 (1995)
- M. Markus, P. Almeida, I. Kusch:
„Class IV cellular automata simulating diverse physical systems“
Intern. J. of Bifurcation and Chaos (in press)

- M. Markus, I. Kusch:
"Cellular automata for modelling the shell pigmentation of molluscs"
J. of Biological Systems **3**,136-143 (1995)
- M. Markus, K. Stavridis:
„Observation of Chemical Turbulence in the Belousov-Zhabotinsky Reaction“
International Journal of Bifurcation and Chaos **4** (5):1233-1243 (1995)
- K. Matthiesen, S. C. Müller:
„Global flow waves in chemically induced convection“
Phys. Rev. E **52**:492-495 (1995)
- A.P. Muñuzuri, M. Markus:
"Cellular Automata Model and Measurements of Autowave Splitting"
International Journal of Bifurcation and Chaos (in press)
- B. Neumann, S. C. Müller, M.J.B. Hauser, O. Steinbock, R.H. Simoyi, N.S. Dalal:
„Identification and kinetic study of the peroxy malonyl radical in the aerobic oxidation of malonic acid by Ce (IV)“
J. Am. Chem. Soc. Comm. **117**:6372-6373 (1995)
- Th. Plesser, K.-H. Müller:
„Fourier analysis of the complex motion of a spiral tip in excitable media“
Int. J. Bifurcation and Chaos **5**, No. 4:1071-1084 (1995)
- M.K. Ram Reddy, M. Dahlem, V.S. Zykov, S.C. Müller:
„The effect of an illumination jump on wave propagation in the Ru-catalyzed Belousov-Zhabotinsky reaction“
Chem. Phys. Lett. **236**:111-116 (1995)
- M.K. Ram Reddy, Z. Szlavik, Zs. Nagy-Ungvarai, S.C. Müller:
„Influence of light on the inorganic part of the ruthenium-catalyzed Belousov-Zhabotinsky reaction“
J. Phys. Chem. **99**:15081-15085 (1995)
- J. Ross, A. Arkin, S.C. Müller:
„On experimental evidence for touring structures“
J. Phys. Chem. **99**:10417-10419 (1995)
- O. Steinbock, S.C. Müller:
„Spatial attractors in aggregation patterns of dictyostelium discoideum“
Z. Naturforschung **50c**:275-281 (1995)
- D. Stock, S.C. Müller:
„3D reconstruction of scroll waves in the Belousov-Zhabotinsky reaction using optical tomography“
Physica D (in press)
- M. Wartenberg, H. Acker:
„Quantitative recording of vitality patterns in living multicellular spheroids by confocal microscopy“
Micron (in press)

Emeriti

- M. Böckmann, B. Hess, S.C. Müller:
„Temperature gradients travelling with chemical waves“
Phys. Rev. E (in press) (1995)
- L. Caspary, J. Thum, A. Creutzig, D.W. Lübbers, K. Alexander:
„Quantitative reflection spectrophotometry: spatial and temporal variation of Hb oxygenation in human skin“
Int. J. Microcirc. **15**:131-136 (1995)
- B. Hess, A. Mikhailov:
„Microscopic self-organization in living cells: a study of time matching“
J. theor. Biol. **176**: 181-184 (1995)
- B. Hess, A. Mikhailov:
„Microscopic self-organization in biological cells“
Cell Biology and Molecular Basis of Liver Transport
(eds. F. Wehner, E. Petzinger), Projekt-Verlag, Dortmund, 253-259 (1995)
- B. Hess, A. Mikhailov:
„Transition from molecular chaos to coherent spiking of enzymic reactions in small spatial volumes“
Biophys. Chem. (in press) (1995)
- G.A. Holst, T. Köster, E. Voges, D.W. Lübbers
„FLOX - an oxygen-flux-measuring system using a phase-modulation method to evaluate the oxygen-dependent fluorescence lifetime“
Sensors and Actuators **B29**:231-239 (1995)
- D.W. Lübbers:
„Optical sensors for clinical monitoring“
Acta Anaesthesiol Scand **104**:37-54 (1995)
- A. Mikhailov, B. Hess:
„Fluctuations in living cells and intracellular traffic“
J. theor. Biol. **176**: 185-192 (1995)

2. Andere Veröffentlichungen 2. Other publications

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

- C. Block, A. Wittinghofer:
„Switching to Rac and Rho“
Structure 3:1281-1284 (1995)
- N. Opitz, E. Merten, H. Acker:
„Local intracellular ion measurements with luminescent indicators using confocal laser scanning microscopy“
Proc. SPIE 2508:90-101 (1995)
- N. Opitz, T. Porwol, E. Merten, H. Acker:
„Cytoplasmic ion imaging: evidence for intracellular calibration heterogeneity of ion-sensitive fluorophores“
In: J. Slavik (Ed.): Fluoresc. Microscopy and Fluorescence Probes
Proc. Prague-Conf., Plenum Publish. Corp. (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.): Fluoresc. Microscopy and Fluoresc. Probes
Proc. Prague-Conf., Plenum Publ. Corp. (in press)
- A. Wittinghofer, A. Valencia:
„Three-dimensional structure of Ras and Ras-related proteins“
In: M. Zerial, L.A. Huber (Eds.): Guidebook to the Small GTPases
OUP/Sambrook Tooze Publications (1995)

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

- R.K.H. Kinne, A. Kleinzeller:
„The epithelial membrane“
In: A. Kleinzeller (Ed.): A History of Biochemistry: Exploring the Cell Membrane, Elsevier Science BV,
Amsterdam: 279-306 (1995)
- R.K.H. Kinne, B. Ruhfus, H. Tinel, S. Boese, F. Wehner, E. Kinne-Saffran:
„Renal organic osmolytes: Signal transduction pathways and release mechanisms“
In: N.G. de Santo, G. Capasso (Eds.): Acid-Base and Electrolyte Balance. Molecular, Cellular and Clinical
Aspects, Istituto Italiano per gli Studi Filosofici, Cosenza: 237-242 (1995)
- R.K.H. Kinne:
„Amino acid transporters“
Curr. Opin. Nephrol. Hypertension 4:412-415 (1995)
- R.K.H. Kinne, S. Boese, E. Kinne-Saffran, B. Ruhfus, H. Tinel, F. Wehner:
„Osmoregulation in the renal papilla: Membranes, messengers, molecules“
Kidney Int. (in press)
- R.K.H. Kinne:
„Max-Planck-Institut Dortmund: Grundlagenforschung in der molekularen Physiologie“
In: Dortmund - Industrie- und Dienstleistungszentrum Westfalens, Verlag Lensing-Wolff (in press)
- C.-T. Lin, R.K.H. Kinne:
„Glucose transport in the kidney“
Nephrology Module of Principle of Molecular Biology (submitted)
- H. Tinel, F. Wehner, R.K.H. Kinne:
„Cell volume measurements using confocal laser scanning microscopy“
In: Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes, Plenum Press, New York (in press)
- F. Wehner, H. Sauer, R.K.H. Kinne:
„Ionic mechanisms of volume regulation“
In: F. Wehner, E. Petzinger (Eds.): Cell Biology and Molecular Basis of Liver Transport, Projekt Verlag,
Dortmund: 92-101 (1995)
- K. Zierold:
„Transmissionselektronenmikroskopie“
In: H. Robenek (Ed.): Mikroskopie in Forschung und Praxis, GIT-Verlag Darmstadt, 129-183 (1995)

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

- R.S. Goody:
„Rational drug design and HIV: Hopes and limitations“
Nature Medicine 1:519-520 (1995)
- R.S. Goody:
"Grundlagenforschung als Voraussetzung für die Prävention und Therapie von AIDS"
MPG-Jahrbuch (in press)
- R.S. Goody (Ed.):
"Proteine"
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

- A.J. Scheidig:
„Time-resolved crystallography on p21^{H-ras}“
In: P.M. Rentzepis (Ed.): Time-resolved electron and x-ray diffraction
Proc. SPIE **2521**: 278-289 (1995)
- I. Schlichting:
„Die vierte Dimension in der Kristallographie“
Chemie in unserer Zeit **29**:230-240 (1995)
- J. Wölcke, E. Weinhold:
„Substrate Specificity of the DNA Methyltransferase from *Thermus aquaticus*: Influence of the 3'-Neighbor Base“
Biol. Chem. Hoppe Seyler (Special Supplement) **376**:S169 (1995)

Zentrale Einrichtungen

- Th. Plessner:
„Heinz-Billing-Preis verliehen“
MPG Spiegel **1**:35 (1995)
- P. Wittenburg, Th. Plessner:
„WWW-Server/Browser als Informationsdrehzscheibe im Lokalen Netz“
In: D. Wall (Ed.): Organisation und Betrieb von DV-Versorgungssystemen, Wiesbaden: Deutscher Universitäts-Verlag: 163-176 (1995)
- Th. Plessner, P. Wittenburg (Herausgeber)
„Forschung und wissenschaftliches Rechnen. Beiträge zum Heinz Billing-Preis 1994“
Göttingen: GWDG-Bericht **40** (1995)
- Th. Plessner, P. Wittenburg
Vorwort
In: Th. Plessner, P. Wittenburg (Eds.): Forschung und wissenschaftliches Rechnen. Beiträge zum Heinz-Billing-Preis 1994, Göttingen: GWDG-Bericht **40** (1995)

z.Z. dem Kollegium direkt unterstellte Arbeitsgruppen

- H. Acker:
„Invited Editorial on O₂-dependence of pregnenolone and aldosterone synthesis in mitochondria from bovine zona glomerulosa cells“
J. Appl. Physiol. **78**(5):1623-1624 (1995)
- H. Acker, J. Hescheler:
„Oxygen - sensitive neurosecretion of carotid body type I cells“
In: H. Schertübl, J. Hescheler (Eds.): The electrophysiology of neuroendocrine cells, CRC Press, Boca Rota, New York, London, Tokyo, 347-360 (1995)
- M. Markus:
"Numerical models of hallucinations"
'Worlds of Consciousness' (Hrsg. von M. Schlichting, H. Leuner), VWB-Verlag, Berlin, 131-140 (1995)
- M. Markus, J. Tamames:
"Fat fractals in Lyapunov space"
'Fractals in the Future' (Hrsg. von C.A. Pickover) St. Martin's Press, N.Y., (in press)
- K. Matthiesen, S. C. Müller:
„Chemically induced convection in the Belousov-Zhabotinsky reaction“
Lect. Notes in Physics (in press)
- A.S. Mikhailov, V.S. Zykov:
„Spiral waves in weakly excitable media“
In: R. Kapral, K. Showalter (Eds.): Chemical waves and patterns (Kluwer Ac. Publ.), 119-162 (1995)
- S.C. Müller, Th. Plessner:
„Spiral waves dynamics“
In: K. Showalter, R. Kapra (Eds.): Chemical Waves and Patterns, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers: 57-92 (1995)
- S. C. Müller, A. Warda, V.S. Zykov:
„Spiral waves in bounded excitable media“
In: E. Mosekilde, O.G. Mouris (Eds.): Modelling the Dynamics of Biological Systems, Springer Ser. Syn., Berlin, Heidelberg, **65**:7-22 (1995)

Emeriti

- B. Hess:
„Selforganization in Chemical and Biological Systems“
In: K. Mainzer, A. Müller, W. Saitzer (Eds.): From Simplicity to Complexity - Part II
Vieweg, Wiesbaden (1995)
- B. Hess:
„The Anna-Monika-Foundation - an endeavour in Depression Research“
Pharmacopsychiat. **28**: 2-3 (1995)

- B. Hess:
„Some physical constraints of molecular evolution“
Biology International (in press) (1995)
- D.W. Lübbers, T. Köster, G.A. Holst:
„Hybrid fiber optical sensor for determining the oxygen partial pressure and the oxygen flux in biomedical applications“
In: J.R. Lakowicz (Ed.): Advances in Fluorescence Sensing Technology II, Proceedings Vol. **2388**:407-518 (1995)
- D.W. Lübbers:
„Chemical in vivo monitoring by optical sensors in medicine (Sensors and Actuators B Chemical 1993)“
In: R. Willsch, R.T.Kersten, B.J. Thompson: Fiber Optic Sensors, SPIE Milestone Series Vol. **MS108**, SPIE Optical Engineering Press: 557-566 (1995)

Index

- β-Catenin 7
- 2-Aminopurine 26
- 3D reconstructions 28
- 3D-chemical waves 31
- 3D-reconstruction 31
- Abasic site 26
- Actin 20
- Algorithm 32
- Alkylglucoside 14
- Aminoacid analysis 31
- Amphiphilic substances 30
- Animated data visualization 8
- Anion transport 15
- Antibodies 14
- Antisense transcript 17
- APC 7
- Archae 25
- Archael respiratory chain 19
- Armadillo 7
- Attractors 31
- Belousov-Zhabotinsky reaction 31
- Belousov-Zhabotinsky-Reaction 30
- Benzothiazepine 33
- BIAcore 6
- Biotechnology 42
- Blue copper protein 19
- Bromosulphthalein 15
- Brush border membrane 12
- Caged substrates 42
- Cardiac fibrillation 30
- Catalytic mechanism 26
- CDC25 4; 6
- cdc42 9
- cDNA 14
- Cell viability 17
- Cellular automation 30
- Cellular regulation process 8
- Cellular self-organization 35
- Chaperones 22
- Chemical waves 31
- Cl⁻-conduction 15
- Client 44
- CLUSTAL 45
- Colorectal tumors 7
- Confocal laser scanning microscopy 8; 15
- Confocal microscopy 28
- Controlling chaos 30
- Convection 31; 32
- Cooperativity 20
- Crosstalk 5
- Cryo-crystallography 24
- Cryopreparation 17
- Crystallography 9
- Cytochrome oxidase 19
- Dictyostelium 20
- Dihydropyridine 33
- Dispersion relation 31
- DNA 23
- DNA alterations 7
- DNA methylation 26
- DNA methyltransferases 26
- DNA sequencing 45
- DNA-polymerase 21
- Dominant-negative 4
- Drosophila 20
- Drug design 3
- EDV 44
- Effector 4
- EF-Tu 21
- EGCG-Package 45
- Electrolyte ion transport 17
- Electrolyte transport 15
- Electromicroscopy 40
- Electron Microscopy 17
- Electronics 39
- Electrophysiology 15
- Electrospray mass spectrometer 33
- Elemental Mapping 17
- Endothelial cells 29
- Enzymatic mechanism 22
- Epithelia 17
- Epitopetag 14
- EPR measurements 31
- Eukaryotic expression 7
- Evaluation algorithms 8
- Exchange factor 4
- Excitable media 31; 32
- Facilitated dissociation 33
- Feedback method 31
- Fermentors 42
- Fluorescence 4; 22
- Fluorescence spectroscopy 26
- Fluorescent indicators 8
- Fluorescence 6
- FTIR Spectroscopy 42
- Fusion protein 43
- GCG-Package, Version 8 45
- GDE-Package 45
- GDP 33
- GEF 33
- Global fit 33
- Glycolyse 31
- GTP 12
- GTPase 2
- GTPase reaction 10
- GTPase-activating protein 10
- GTP-binding protein 10
- Halorhodopsin 19
- Heart muscle 30
- Heterogeneity of intracellular pH calibrations 8
- HIV 21

- hMSH2 7
 Human colon carcinoma 28
 Human liver cancer cells 28
 Human malign glioma 28
 Human melanoma cells 28
 Human prostate cancer 28
 Hypoxia 29

 Immunocytochemistry 40
 Immunoelectron microscopy 43
 Interaction 5
 Interferon β 28
 Intracellular Ca^{2+} 15
 Intracellular calcium 13
 Intracellular K^+ 15
 Intracellular Na^+ 15
 Intracellular redistribution 8
 Ion transport 17
 Ionic channel 29
 Isosteric models 33
 Isotope labeling of caged substrates
 ^{13}C , ^{18}O 42

 K/Na-ratio 17
 Kidney 15; 40
 Kinases 22
 Kinetic 6
 Kinetic crystallography 24
 Kinetic models 33
 Kinetics 22

 LAN 44
 Laue technique 24
 Lectins 40
 Liver 15; 17
 L-type calcium channel 33

 Magnesium channel 12
 Malpighian tubules 17
 Microbial degradation 38
 Microbiology 42
 Microcirculation 36
 Microelectrodes 28
 Microfluorometric technique 15
 Mitogenic signalling 3
 Monoclonal antibodies 43
 Multicellular spheroid 28
 Multi-exponentials 32
 Muscle 20
 Myoglobin 24
 Myosin 20

 Na^+/D -glucose cotransport 14
 Na^+ -conduction 15
 $\text{Na},\text{K}-2\text{Cl}$ cotransporter 12
 Na/Pi cotransport 17
 NAD(P)H oxidase 28
 NADH-waves 31
 Network 39; 44
 NMR 23
 ntf1 9
 Nuclear Transport 2
 Nucleotide 22

 Oligonucleotide synthesis 26
 Oligonucleotide-synthesis 45
 Optical filters 38
 Optical sensors 36
 Oregonator model 31
 Organic osmolyte 13
 Oribatid mites 38
 Oxygen partial pressure 38
 Oxygen supply 36

 p21Ras 6
 p24ran 6
 Pak-kinase 9
 Patch clamp 15
 Patch-clamp 29
 pCa 8
 Peptides 43
 Periodical reactions 35
 pH 8; 28
 pH cross-sensitivities 8
 Phorbhodopsin 25
 Photoaffinity labeling 14
 Photoreceptor 25
 Phototaxis 19; 25
 Pigmentation patterns on mollusc shells 30
 Pixel-Cluster 8
 pO_2 8; 28
 pO_2 -needle electrodes 38
 Polyclonal antibodies 43
 Protein 23
 Protein Complexes 9
 Protein dependences 8
 Protein sequencing 45
 Protein-DNA interaction 26
 Protein-protein interactions 9
 Proton waves 31
 Proto-oncogenes 7

 QSAR 14

 Rab 21; 23
 Rac 9
 Raf 3; 5
 Raf-kinase 10
 RalGEF 5
 ran 9; 33
 ran binding protein 9
 Ran/TC4 2
 RanBP1 6
 RanGAP 2
 Rap 5
 Rap 1A 10
 Ras 3; 4; 5; 10; 33
 Ras-binding domain 10
 Receptor 33
 Reflectance photometry 36
 Regulation 39
 Reverse transcriptase 21
 RF-Sputtering technique 38
 RNA 23
 rna1 9
 Ruthenium complex 31

- S-Adenosyl-L-methionine 26
- Scanning force microscope 17
- Scanning transmission electron microscopy 17
- Sensory rhodopsin 19
- Server 44
- Service 39
- SGLT 14
- Signal transduction 4; 5; 9; 19; 25
- Skin 36
- Smooth Muscle cells 29
- Sodium-D-glucose cotransporter 13
- Sodium-phosphate cotransport systems 13
- Software, molecularbiological 45
- Sorbitol 12
- Spatial pattern formation 35
- Spiral 32
- Spreading depression 31
- Steady state kinetics 26
- Stopped-flow 6; 17
- Structure analysis 23
- Structure-activity studies 26
- Structure-function analysis 3
- Synchrotron 20

- Tachycardia 30
- Taurine 13; 15

- TC4 6
- Thick ascending limb of Henle's loop 12
- Thin films 38
- Topology 14; 17
- Triatoma 38
- Tropomyosin 20
- Troponin 20
- Trout kidney 12
- Tumor suppressor genes 7
- Tumour cells 28
- Turbidity 42
- Turing's model 30

- Video sequences 8
- Volume regulation 15

- Wavefront instabilities 30
- World Wide Web 44

- Xenopus laevis oocyte expression 17
- X-ray diffraction 23
- X-ray microanalysis 17

- Yeast extract 31
- Yeast H⁺-ATPase 42