

Diss ETH No. 10636

**DIF-1 3(5) DECHLORINASE, A NOVEL
CYTOSOLIC DECHLORINATING ENZYME IN
*DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM***

A DISSERTATION SUBMITTED TO THE
**Swiss Federal Institute of Technology
Zürich**

FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

PRESENTED BY
OLIVER NAYLER
DIPL. NATW. ETH
BORN 28TH AUGUST 1964
CITIZEN OF ABTWIL, AARGAU



ACCEPTED ON THE RECOMMENDATION OF
PROF. K. H. WINTERHALTER, EXAMINER
DR. R. R. KAY, CO-EXAMINER

1994

Zusammenfassung

Der Entwicklungszyklus des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* wird durch Nahrungsmangel ausgelöst, worauf die amöboiden Zellen den chemotaktischen Wirkstoff cAMP ausscheiden und aggregieren. Etwa 10^5 Zellen bilden einen zuerst lockeren Zellhaufen, der sich zu einem kompakten, halbkugeligen Aggregat formt. Dieser enge Zellverbund elongiert nun senkrecht zu einer fingerförmigen Struktur, die umfällt und als wurmähnliches Gebilde eine nahrungsreichere Umgebung suchen kann. Aus diesem "Wurm" bildet sich ein reifer Fruchtkörper bestehend aus Sporen- und Stielzellen (Gerisch, 1987). Undifferenzierte Amöben werden durch DIF-1 (Differentiation Factor 1), einem dichlorinierten Alkylphenon (1-((3,5-dichloro-2,6-dihydroxy-4-methoxy)phenyl)hexan-1-on), welches von den Zellen produziert und ins Medium ausgeschieden wird, zur Differenzierung als Stielzellen angeregt, was sich durch die Induktion stielzellspezifischer Gene äussert (Kay und Jermyn, 1983; Kay et al., 1983; Town et al., 1976; Brookman et al., 1982; Kay et al., 1992). Weil DIF-1 zugleich sporzell-spezifische Gene unterdrückt (Kopachik et al., 1983; Williams et al., 1987; Berks und Kay, 1990), könnten die Proportionen der zwei Zelltypen durch die Menge an DIF-1 im Zellaggregat bestimmt werden. Es wurde vermutet, dass DIF-1 Synthese und DIF-1 Metabolismus einer strikten Kontrolle unterliegen, um die Konzentration von DIF-1 im Medium zu regulieren (Kay et al., 1993; Insall et al., 1992).

Diese Arbeit beschreibt die Entdeckung des ersten metabolischen Schrittes *in vitro*, wobei gezeigt wird, dass DIF-1 durch ein zytosolisches Enzym (DIF-1 3(5) Dechlorinase), mit Hilfe von Glutathion als Cofaktor (in physiologischer Konzentration), einfach dechloriniert wird. Dabei wird DIF-3 produziert, welches nur noch 7% der ursprünglichen Bioaktivität besitzt. Es wird ferner gezeigt, dass DIF-3 von mikrosomalen Enzymen, welche vermutlich den P450 Enzymen ähnlich sind, weiter metabolisiert wird.

Um die Enzymaktivität dieser Dechlorinierungsreaktion quantitativ zu messen wurde ein sehr empfindliches System entwickelt, wobei tritiiertes DIF-1 und Dünnschichtchromatographie (um Substrat und Produkt zu trennen) verwendet wurden.

Der gemessene K_m Wert der Dechlorinase für DIF-1 ist 70nM, was den physiologischen Konzentrationen nahe kommt. Die Enzymaktivität wird durch 1μ M DIF-2 (dem Pentan-1-on Analog von DIF-1) oder 5μ M DIF-3 (dem Produkt) halbmaximal inhibiert. Weitere dem Substrat strukturell verwandte Moleküle wurden untersucht, aber keines konnte die Enzymaktivität inhibieren. DIF-1 3(5) Dechlorinase wurde durch 100nM Aurothioglucose, einem Inhibitor von sogenannten Selenocystein-Enzymen, halbmaximal inhibiert.

Gelfiltrationsexperimente lassen vermuten, dass DIF-1 3(5) Dechlorinase ein multimeres Protein ist und wahrscheinlich aus zwei Untereinheiten von je 30-35kDa besteht. Wenn das Enzym mit 100nM DIF-1 vorinkubiert wurde, konnte das Gleichgewicht zwischen Monomer und Multimer zugunsten des Multimers verschoben werden.

Verschiedene biochemische Reinigungsschritte wurden entwickelt und werden im Detail beschrieben. Es war nicht möglich die einzelnen Schritte zu kombinieren und das Enzym vollständig zu reinigen, was hauptsächlich auf die Instabilität des Enzyms während den Säulenschritten und auf die zu kleine Ausgangsmenge (d.h. der Menge an Enzym, welche von einer einzelnen Zelle produziert wird) zurückzuführen war. In einem Reinigungsversuch wurden die einzelnen Fraktionen einer Gelfiltrationssäule auf ihre Enzymaktivität hin untersucht und mit ^{125}I -DIF-1 radioaktiv markiert. In Polyacrylamidgelen gelang es, ein Protein von etwa 35kDa zu identifizieren, welches sowohl mit der Enzymaktivität in den untersuchten Fraktionen übereinstimmte als auch radioaktiv markiert war. Die Markierung mit ^{125}I -DIF-1 wurde mit 100nM nicht-radioaktivem DIF-1 verhindert. Diese Resultate lassen vermuten, dass dieses Protein der DIF-1 3(5) Dechlorinase entsprechen könnte. Das Reinigungsverfahren muss aber noch entscheidend verbessert werden um das Protein in grösserer Menge zu isolieren. Erst die Klonierung und Sequenzierung des entsprechenden Genes oder die Herstellung von Antikörpern wird eine definitive Identifizierung des Enzyms ermöglichen.

Die Methoden, die im Verlaufe dieser Arbeit entwickelt wurden (es war praktisch unmöglich auf publizierte Standardmethoden zurückzugreifen), werden sich in Zukunft nützlich erweisen um das Protein weiter zu untersuchen. Die Reinigung des Enzyms aus einer überproduzierenden (mutanten) Zelle wird nun mit Hilfe dieser Methoden möglich werden.

Die Enzymaktivität ist während dem Entwicklungszyklus von *Dictyostelium discoideum* reguliert. In der entscheidenden Phase, in welcher die Proportionen von Stiel- und Sporenzellen bestimmt werden, ist das Enzym maximal aktiv und ist nicht detektierbar in vegetativen Zellen. Im "Wurm" Stadium, in welchem die Zelltypen strikt getrennt in einem anterioren Teil (Stielzellen) oder posterioren Teil (Sporenzellen) vorliegen, ist die Enzymaktivität nur im anterioren Teil messbar. Weil die Konzentration von DIF-1 im posterioren Teil ist am grössten und im anterioren Teil sehr klein ist, kann man vermuten, dass DIF-1 durch das Enzym nur im vorderen Teil abgebaut wird und dass dadurch der gemessene DIF-1 Gradient gebildet wird (Nayler et al., 1993, Insall et al. 1992, Kay et al., 1993).

Abstract

Development of *Dictyostelium* is initiated by starvation. The initially separate amoebae first aggregate, in response to relayed cAMP signals, to form mounds of up to 10^5 cells. Each mound then transforms into a sausage-shaped first finger and eventually forms a fruiting body consisting of a cellular stalk supporting a droplet of spores (Gerisch, 1987). Developing amoebae are directed to stalk cell differentiation by the action of a chlorinated alkyl phenone known as DIF-1 (1-((3,5-dichloro-2,6-dihydroxy-4-methoxy)phenyl)hexan-1-one), which was first recognised by its ability to induce isolated amoebae to differentiate into stalk cells (Kay and Jermyn, 1983; Kay et al., 1983; Town et al., 1976).

DIF-1 is made de novo during development and released into the medium (Brookman et al., 1982; Kay et al., 1992). It rapidly induces expression of genes specific to the prestalk/stalk pathway of differentiation and represses expression of genes specific to the prespore/spore pathway (Kopachik et al., 1983; Williams et al., 1987; Berks and Kay, 1990). DIF-1 levels in the aggregate, and hence perhaps the proportion of prestalk and prespore cells, are likely to be controlled by the balance between DIF-1 production and breakdown (Kay et al., 1993; Insall et al., 1992). It was shown previously that DIF-1 is rapidly metabolized into a series of more polar compounds by living cells (Traynor and Kay, 1991).

This thesis reports the discovery of the enzymatic activity catalyzing the first step in DIF-1 metabolism, the formation of DM1 (DIF Metabolite 1; now known to be DIF-3) by a mono-dechlorination. A very sensitive enzyme assay was developed, using (^3H)-DIF-1 and a TLC system to separate DIF-1 from the product, DIF-3. DIF-1 3(5) dechlorinase is present in the high-speed supernatant of cell lysates and uses glutathione, at physiological concentrations, as cofactor. Kinetic measurements indicate a K_m for DIF-1 of about 70nM. The enzymatic activity is inhibited by DIF-2 (the pentan-1-one analogue of DIF-1) with a $K_{i50}=1\mu\text{M}$ (concentration of inhibitor at 50% inhibition) and DIF-3 ($K_{i50}=5\mu\text{M}$), which presumably act as substrates, but other compounds structurally related to DIF-1 were much less effective. Aurothioglucose, an inhibitor of selenocysteine enzymes, inhibited DIF-1 3(5) dechlorinase with $K_{i50}=100\text{nM}$.

DIF-1 3(5) dechlorinase may be a multimeric enzyme composed of two subunits of 30-35kDa molecular mass each. The equilibrium between monomer and multimer may be shifted towards the higher molecular mass form upon prolonged incubation with the substrate DIF-1.

Different biochemical purification procedures were investigated and are described in detail. However, the low abundance and an instability

of the enzyme on columns prevented to purify the enzyme to homogeneity. Following several purification steps, the final fractions of a high resolution gel filtration column were labelled with ^{125}I -DIF-1 and analysed on polyacrylamide gels. A polypeptide of approximately 35kDa correlated with the enzymatic activity measured in these fractions and was also radioactively labelled. As the labelling was competed with 100nM cold DIF-1, this protein may be DIF-1 3(5) dechlorinase, but only a greatly improved purification scheme and ultimately the cloning and sequencing of this protein will provide conclusive evidence.

The methodologies and the conditions which have been developed will facilitate further studies of the protein and may allow the protein to be highly enriched or even purified, especially if an overproducing mutant becomes available.

DIF-1 3(5) dechlorinase activity is developmentally regulated and controlled by a negative feedback loop. It is essentially absent from growing cells and increases at the end of aggregation to reach a first peak of activity at the first finger stage, with a further rise at culmination. In slugs, DIF-1 3(5) dechlorinase is confined to the anterior compartment and hence prestalk cells. As DIF-1 levels are highest at the posterior end, it can be imagined, that DIF-1 3(5) dechlorinase acts as a local sink and is directly responsible for the reverse DIF-1 gradient (Nayler et al., 1993, Insall et al.1992, Kay et al., 1993).