

**Expression von humanem Typ-1 Porin
in *Xenopus* Oozyten
und Studien zu seiner Funktionalität**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Biologie

der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Christian Schwarzer

aus Gehrden

November 2000

Angefertigt in der Abteilung Immunchemie am
Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Bartolomaeus

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Norbert Hilschmann

„Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier ∞ ISO 9706“

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Material	4
2.1 Bakterienstämme.....	4
2.2 Eukaryontische Zellen	4
2.3 Tiere	4
2.4 Nährmedien.....	4
2.4.1 Medien für Bakterienkulturen.....	5
2.4.2 Medien für Hefekulturen.....	5
2.4.3 Medien für Zellkulturen	5
2.4.4 Medien für <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	6
2.5 Lösungen und Puffer.....	6
2.6 Plasmide.....	8
2.7 Oligodesoxyribonukleotide.....	14
2.7.1 Oligonukleotid-Primer für Nukleotidsequenzanalysen.....	14
2.7.2 Oligonukleotid-Primer für Polymerase-Kettenreaktionen und Nukleotidsequenzanalysen.....	15
2.8 Enzyme, Nukleinsäuren und Antikörper.....	15
2.9 Chemikalien, Feinmaterialien und Kits	17
2.10 Geräte.....	19
3 Methoden	22
3.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden	22
3.1.1 Synthese von Oligonukleotiden	22
3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	22
3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion.....	23
3.1.4 Reinigung von PCR-Produkten.....	23
3.1.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	23
3.1.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	24
3.1.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	24
3.1.8 Ligation	24
3.1.9 Klonierung von DNA-Fragmenten	25

3.1.10 Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i>	25
3.1.11 Transformation von <i>E. coli</i>	25
3.1.11.1 Chemische Transformation nach Inoue <i>et al.</i> (1990).....	25
3.1.11.2 Elektroporation kompetenter Zellen	26
3.1.12 Isolierung von Plasmid-DNA.....	27
3.1.12.1 Plasmid-Isolierung analytisch	27
3.1.12.2 Plasmid-Isolierung präparativ	27
3.1.13 DNA-Sequenzanalyse	28
3.1.13.1 Sequenzierung von DNA mit dem A.L.F.-Sequenziergerät.....	28
3.1.13.2 Sequenzierung von DNA mit dem ABI Prism™ 377-Sequenziergerät.....	29
3.1.14 <i>In vitro</i> -Transkription.....	30
3.1.15 Denaturierende Gelelektrophorese von RNA	30
3.1.16 <i>In vitro</i> -Translation	31
3.2 Methoden für das Two-Hybrid System.....	31
3.2.1 mRNA Isolierung aus H2LCL-Zellen.....	32
3.2.2 cDNA-Synthese	32
3.2.3 Synthese einer pMyr-cDNA Bank	33
3.2.4 Kultivierung der Hefezellen.....	34
3.2.5 Präparation kompetenter Hefezellen.....	35
3.2.6 Transformation kompetenter Zellen.....	35
3.2.7 Durchmusterung der H2LCL cDNA-Bank im Cyto-Trap™ Two-Hybrid System	36
3.2.8 Präparation von Plasmid-DNA aus Hefezellen.....	37
3.3 Allgemeine proteinchemische Methoden.....	38
3.3.1 Azeton-Fällung.....	38
3.3.2 Trichloressigsäure-Fällung.....	38
3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
3.3.4 Proteintransfer auf PVDF-Membranen	39
3.3.5 Immunologische Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen.....	39
3.3.6 Enzymatische Detektion biotinylierter Proteine auf PVDF-Membranen	40
3.3.7 Methoden zur Expression und Isolierung rekombinanter Proteine.....	40
3.3.7.1 Präparation von <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLys [pGEX-Tctex1 oder pGEX-ΔPBP74]- Gesamtzellextrakten.....	40
3.3.7.2 Isolierung von rekombinantem Tctex1 und ΔPBP74.....	41

3.3.7.3 Überlagerungsassay.....	41
3.3.8 Versuche mit künstlichen Lipid-Doppelmembranen	42
3.4 Zellbiologische Techniken.....	43
3.4.1 Kultivierung von H2LCL-Zellen	43
3.4.2 Kultivierung von HeLa-Zellen.....	44
3.4.3 Bestimmung der Zellzahl	44
3.4.4 Transiente Transfektion von HeLa-Zellen	44
3.4.5 Indirekte Immunfluoreszenz	45
3.4.6 Kernfärbung	45
3.4.7 Fluoreszenzmikroskopie	46
3.4.8 Expression in <i>Xenopus</i> Oozyten	46
3.4.8.1 Operative Entnahme.....	46
3.4.8.2 Präparation der Oozyten.....	47
3.4.8.3 Mikroinjektion.....	47
3.4.8.4 Proteinchemische Charakterisierung heterolog exprimierter Proteine.....	47
3.4.8.5 Fluoreszenzmikroskopie	48
3.4.8.6 Raster-Elektronenmikroskopie.....	48
3.4.8.7 2-Elektroden Voltage clamp	49
4 Ergebnisse.....	51
4.1 Heterologe Expression von hVDAC1 in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	51
4.1.1 Konstruktion der hVDAC1-Plasmide	51
4.1.2 <i>In vitro</i> -Transkription und Translation	53
4.1.3 Plasmalemmale Lokalisierung der heterolog exprimierten Proteine	54
4.1.3.1 Lichtmikroskopische Daten	54
4.1.3.2 Konfokal-lasermikroskopische Daten	56
4.1.3.3 Rasterelektronenmikroskopische Daten.....	57
4.1.4 Biochemische Analyse heterolog exprimierter hVDAC1-Konstrukte.....	58
4.1.5 Elektrophysiologische Messungen an <i>Xenopus</i> Oozyten.....	60
4.1.5.1 Strom-Spannungsmessungen in modifizierter Barth'scher Lösung.....	60
4.1.5.2 Strom-Spannungsmessungen mit applizierten Modulatoren	61
4.2 Nachweis von hVDAC1-Interaktionspartnern im Two-Hybrid System.....	63
4.2.1 Konstruktion der H2LCL-cDNA Bank im Vektor pMyr.....	63
4.2.2 Konstruktion des pSos-Vektors mit hVDAC1	63

4.2.3 Überprüfung der hVDAC1-Wirkung auf das temperatursensitive Zellwachstum.....	63
4.2.4 Interaktions-Assay	64
4.2.5 Identifizierung der mit hVDAC1 interagierenden Proteine	66
4.2.6 Bestätigung der Bindungsspezifität der interagierenden Proteine	67
4.2.7 Proteinchemische Verifizierung der ermittelten Protein/Protein-Interaktionen	69
4.2.7.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem Tctex1	69
4.2.7.2 <i>In vitro</i> -Assoziation von hVDAC1 und Tctex1 im Überlagerungsassay.....	71
4.2.7.3 Expression und Aufreinigung von rekombinantem Δ PBP74.....	72
4.2.7.4 <i>In vitro</i> -Assoziation von hVDAC1 und Δ PBP74 im Überlagerungsassay	73
4.2.8 Lokalisierungsstudien der interagierenden Proteine in HeLa-Zellen	75
4.2.8.1 Kolokalisierung von hVDAC1 mit Tctex1	75
4.2.8.2 Kolokalisierung von hVDAC1 mit PBP74	77
4.2.8.3 Lokalisierung von hVDAC1 in Hela-Zellen.....	79
4.2.9 Funktionelle Auswirkung der Interaktionspartner auf hVDAC1.....	82
4.2.9.1 Einzelkanalgröße und Spannungsabhängigkeit von hVDAC1	83
4.2.9.2 Einfluß von rTctex1 auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von hVDAC1	84
4.2.9.3 Einfluß von r Δ PBP74 auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von hVDAC1	86
5 Diskussion	89
5.1 VDAC im Kontext der Mitochondrien und der Plasmamembran.....	89
5.2 Heterologe Expression in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	91
5.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Befunde zur Expression von hVDAC1 in der Zellmembran von <i>Xenopus</i> Oozyten	92
5.2.2 Elektronenmikroskopische Befunde zur Expression von hVDAC1 in der Zellmembran von <i>Xenopus</i> Oozyten	93
5.2.3 Biochemische Bestätigung der heterolog exprimierten Proteine	95
5.2.4 Voltage clamp Messungen an <i>Xenopus</i> Oozyten.....	96
5.3 VDAC im Kontext von Anionen-Kanälen an der Plasmamembran	97
5.4 Nachweis von hVDAC1-bindenden Proteinen mit Hilfe des Two-Hybrid Systems	101
5.4.1 Charakterisierung von Tctex1	103
5.4.2 Charakterisierung von PBP74.....	105

5.5 Stand der Translokation und Lokalisierung von VDAC1.....	108
5.6 Stand der Diskussion zur Funktion von VDAC1.....	112
5.7 Ausblick.....	116
6 Zusammenfassung	118
7 Abkürzungsverzeichnis	120
8 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	122
9 Literaturverzeichnis	125

1 Einleitung

Unter der Bezeichnung Porine wurden ursprünglich transmembranale Kanalproteine der äußeren Membran gramnegativer Bakterien zusammengefaßt. Diese bakteriellen Proteine liegen als Homotrimere vor, deren Untereinheiten jeweils einen einzelnen Kanal darstellen (Nikaido, 1993). Dieser wird durch 16 oder 18 die Membran durchspannende antiparallele β -Faltblätter der in unterschiedlichen Bakterien 30 bis 50 kDa großen Proteine gebildet (Benz und Bauer, 1988; Weiss *et al.*, 1991; Cowan *et al.*, 1992; Buchanan, 1999). Die Funktion bakterieller Porine besteht im Stoffaustausch zwischen Organismus und Umwelt, wobei hydrophilen Stoffwechselprodukten und Nährstoffen bis zu einer Größe von 600 Da das Passieren der äußeren Membran ermöglicht wird, größere Moleküle aber zurückgehalten werden (Nikaido, 1994).

Ein diesen bakteriellen Porinen strukturell und funktionell entsprechendes Protein wurde von Schein *et al.* (1976) in der Mitochondrienfraktion von *Paramecium aurelia* identifiziert. Seither ließen sich in allen eukaryontischen Zellen homologe Proteine mit einer Größe um 30 kDa (Sorgato und Moran, 1993) in der äußeren Mitochondrienmembran darstellen (Colombini, 1979; Benz, 1994). Hier bilden sie Kanäle mit einer Ausschlußgrenze von 3000 Da (Lindén *et al.*, 1982) und fungieren beim Metabolitaustausch zwischen Mitochondrien und dem Zytoplasma (Benz *et al.*, 1988). Während deutliche Unterschiede in den Primärstrukturen der Proteine verschiedener Spezies vorliegen, sind ihre elektrophysiologischen Eigenschaften *in vitro* stark konserviert. Die Kanäle sind durch eine hohe Einzelkanalleitfähigkeit und eine deutliche Spannungsabhängigkeit, die einen Wechsel der Ionenselektivität von Anionen zu Kationen beinhaltet, charakterisiert (Benz, 1994; Ludwig *et al.*, 1986). Aufgrund dieses Verhaltens wird eukaryontisches Porin synonym als VDAC (*Voltage-dependent Anion-selective Channel*) bezeichnet (Schein *et al.*, 1976).

Das Dogma einer ausschließlich mitochondrialen Expression von VDAC wurde durch die Darstellung des Proteins an der Plasmamembran humaner B-Lymphozyten durch Thinnes *et al.* (1989) widerlegt. In nachfolgenden Studien wurde dieser Befund verifiziert und darüber hinaus die plasmalemmale Expression des Kanalproteins unter Verwendung monoklonaler Antikörper gegen den acetylierten N-Terminus des Proteins in weiteren Zell- und Gewebetypen nachgewiesen (Babel *et al.*, 1991; Cole *et al.*, 1992; Jakob *et al.*, 1995; Reymann *et al.*, 1995; Eben-Brunnen *et al.*, 1998). Für diese Experimente konnte eine

immunologische Kreuzreaktion mit einer von Blachly-Dyson *et al.* (1994) identifizierten VDAC2-Isoform durch die Spezifität der Antikörper für das humane Typ-1 VDAC (hVDAC1) ausgeschlossen werden (Winkelbach *et al.*, 1994). Weitere Studien zeigen die Lokalisation von VDAC in Caveolae (Bàthori *et al.*, 1999), in Synaptosomen des elektrischen Organs von *Torpedo marmorata* und *T. uscellata* (Shafir *et al.*, 1998), in der *Postsynaptic Density Fraction* aus Nervenzellen der Ratte (Moon *et al.*, 1999) und in der Plasmamembran von *Xenopus laevis* Oozyten (Steinacker *et al.*, 2000). Durch Lokalisierung von VDAC im sarkoplasmatischen Retikulum (Junankar *et al.*, 1995; Jürgens *et al.*, 1995; Shoshan-Barmatz *et al.*, 1996) und in Endosomen (Reymann *et al.*, 1998) konnte darüber hinaus die extramitochondriale Expression von VDAC1 in intrazellulären Membranen nachgewiesen werden.

Plasmamembran- und mitochondrienständiges VDAC1 stimmen in der Primärstruktur überein und besitzen identische biophysikalische Eigenschaften (Stadtmüller *et al.*, 1999; Benz *et al.*, 1992; Thinner *et al.*, 1994). Isoliertes VDAC1 zeigt nach Insertion in die künstliche Lipid-Doppelmembran eine charakteristische Einzelkanalleitfähigkeit um 4 nS in 1 M KCl. Dieser vollständig geöffnete Zustand ist bei Spannungen um 0 mV meßbar und schließt sich partiell bei Potentialabweichungen über ± 30 mV. Die Anionenselektivität des geöffneten Zustandes wechselt bei Erhöhung des angelegten Potentials zu einer starken Kationenselektivität (Colombini, 1980; Benz *et al.*, 1992; Benz, 1994; Ludwig *et al.*, 1986).

Eine Assoziation des Mitochondrien-ständigen VDAC1 mit ATP und den Hexo-, Glycerol- und Kreatinkinasen zeigt dessen Beteiligung am Metabolithaushalt der Zelle (Rostovtseva und Colombini, 1997; Adams *et al.*, 1991; Kottke *et al.*, 1988; McCabe, 1994). Jüngere Studien beinhalten darüber hinaus eine Funktion von VDAC1 im Rahmen der Apoptose. Es ist als Bestandteil der mitochondrialen *Permeability Transition Pore* (PTP) am Cytochrom C Efflux ins Zytosol, einem Auslöser der apoptotischen Caspase-Kaskade, beteiligt und wird direkt durch pro- und anti-apoptotische Proteine der BCL-2 Familie reguliert (Crompton, 1999; Shimitzu *et al.*, 2000a und 2000b).

Unter dem Gesichtspunkt seiner plasmalemmalen Expression ist die Regulation der Porengröße von VDAC1 von entscheidender Bedeutung. Ohne dessen strikte Regulation ist die Existenz eines elektrochemischen Gradienten über die Zellmembran aufgrund der für das isolierte Molekül ermittelten elektrophysiologischen Eigenschaften nicht möglich. Durch die Expression von VDAC1 in verschiedenen Zelltypen und zellulären Membranen werden

variable Regulationsmechanismen als Basis für kompartiment- und gewebespezifische Funktionen nahegelegt. Diese Hypothese wird durch die plasmalemmale Assoziation von VDAC mit dem GABA_A-Rezeptor in bovinen Nervenzellen (Bureau *et al.*, 1992) oder der Kolokalisierung mit dem CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) in Epithelzellen (Puchelle *et al.*, 1993) unterstützt.

Die Identifikation von VDAC als molekulare Basis eines Maxi-Chloridkanals durch Patch clamp Experimente (Janisch *et al.*, 1993; Dermietzel *et al.*, 1994; Buettner *et al.*, 2000) zeigen einerseits die Regulation von VDAC im physiologischen Kontext, da auf VDAC basierende Ströme erst nach Ausreißen des an der Patch-Pipette befindlichen Membranbereiches gemessen wurden. Da der Kanal nicht im *cell attached* Modus an der intakten Membran gesehen wurde, steht der Kanal *in vivo* unter der Kontrolle eines Modulators, der nach Ausreißen der Membran nicht mehr mit VDAC assoziiert ist. Andererseits verdeutlichen die Studien eine Kanalfunktion des plasmalemmalen VDAC. Zusammen mit Befunden, wonach hVDAC1 am Gadolinium-induzierten Schwellen und an der RVD (*Regulatory Volume Decrease*) von B-Lymphozyten und HeLa-Zellen involviert ist (Thinnes *et al.*, 2000a und 2000b), läßt sich derzeit eine Funktion des Kanalproteins bei der zellulären Volumenregulation annehmen.

Trotz der oben aufgeführten Befunde zur Lokalisation des VDAC1 in eukaryontischen Zellen existieren Zweifel an einer extramitochondrialen Expression des Kanalproteins, die auf Studien basieren, nach denen VDAC1 nur in Mitochondrien lokalisiert ist (Yu *et al.*, 1995; Yu und Forte, 1996).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Lokalisierung des Kanalproteins an der Zellmembran unabhängig von den in früheren Studien eingesetzten anti-hVDAC1 Antikörpern eindeutig aufzuklären. Hierfür wurden EGFP- und FLAG-markiertes hVDAC1 in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und charakterisiert (Schwarzer *et al.*, 2000). Funktionelle Erkenntnisse über Transport, Lokalisierung und Regulation des hVDAC1 *in vivo* sollten darüber hinaus durch die Identifikation von mit hVDAC1 interagierenden Proteinen mit Hilfe eines Two-Hybrid Systems gewonnen werden.

2 Material

2.1 Bakterienstämme

BL21(DE3)pLys (Studier und Moffat, 1986)

E. coli B F⁻ *dcm ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3) [pLsys Cam^r]*

DH5α (Hanahan, 1983)

F⁻, end A1, *hsdR1* (rk⁻, mk⁻) supE44, thi1, recA1, gyrA96(Nal^r), RELA1, Δ(*arbF-lacTYA*) U169, Φ80Δ*lacZ*ΔM15

XL10-Gold (STRATAGENE, La Jolla, USA)

Tet^r Δ(*mcrA*)183 Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyeA96 relA1 lac Hte [F⁺proAB *lacI^q*ZΔM15 Tn10 (Tet^r) Tn5 (Kan^r) Amy]

2.2 Eukaryontische Zellen

Saccharomyces cerevisiae cdc25H (STRATAGENE, La Jolla, USA)

Metα *ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-901 leu2-3 112 cdc25-1 Gal⁺*

HeLa

Adherent wachsende Zelllinie eines humanen epitheloiden Cervix-Carcinoms (DMSZ GmbH, Braunschweig)

H2LCL (Wernet, 1976)

Epstein-Barr-Virus (EBV) transformierte humane lymphoblastoide B-Zelllinie.

2.3 Tiere

Xenopus laevis Weibchen (bis 100 mm, #A0005), bezogen über Dipl. Biol. Horst Kähler (Hamburg), wurden bei 18 bis 20 °C und konstantem hell-dunkel-Rhythmus in Aquarien gehalten.

2.4 Nährmedien

Die zur Kultivierung von *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzten Nährmedien wurden 30 min bei 120 °C und 1 bar autoklaviert. Feste Medien enthielten zusätzlich 1,5 bis 1,7 % (w/v) Agar. Die abgekühlten Lösungen wurden anschließend mit Antibiotika versetzt (Ampicillin: 50 µg/ml, Kanamycin 35 µg/ml, Chloramphenicol: 30 µg/ml). Zellkulturmedien und Lösungen zur Kultivierung von *Xenopus laevis* Oozyten wurden vor Gebrauch steril filtriert.

2.4.1 Medien für Bakterienkulturen

LB-Medium: 1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,0

NZY-Medium: 0,5 % (w/v) NaCl, 0,2 % (w/v) MgSO₄ x 7 H₂O, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NZ Amin, pH 7,5

SOB-Medium: 2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl, 2,5 mM KCl, pH 7,0, 10 mM MgCl₂ und 10 mM MgSO₄ wurden nach dem Autoklavieren zugesetzt.

SOC-Medium: SOB-Medium, das nach dem Autoklavieren mit Glukose zu einer Endkonzentration von 20 mM versetzt wurde.

2YT-Medium: 1,6 % (w/v) Trypton, 1,0 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl, pH 7,0

2.4.2 Medien für Hefekulturen

YPAD-Medium: 1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Bacto Pepton, 2 % (w/v) Dextrose, 0,004 % (w/v) Adeninsulfat

SD/Glu(UL⁻)-Medium: 1,7 g Nitrogen Base ohne Aminosäuren, 5 g Ammoniumsulfat und 20 g Dextrose wurden in 900 ml bidest. Wasser gelöst. Festes SD/Glu(UL⁻)-Medium enthielt zusätzlich 17 g Agar. Nach dem Autoklavieren wurde der Ansatz mit 100 ml 10 x Dropout Lösung versetzt.

SD/Gal(UL⁻)-Medium: 1,7 g Nitrogen Base ohne Aminosäuren, 5 g Ammoniumsulfat, 20 g Galaktose und 10 g Raffinose wurden in 900 ml bidest. Wasser gelöst. Festes SD/Gal(UL⁻)-Medium enthielt zusätzlich 17 g Agar. Nach dem Autoklavieren wurde der Ansatz mit 100 ml 10 x Dropout Lösung versetzt.

10 x Dropout-Lösung: 300 mg L-Isoleucin, 1500 mg L-Valin, 200 mg L-Adeninhemisulfat, 500 mg L-Arginin/HCl, 200 mg L-Histidin/HCl x H₂O, 500 mg L-Lysin/HCl, 200 mg L-Methionin, 500 mg L-Phenylalanin, 500 mg L-Tryptophan, 500 mg L-Tyrosin, 1000 mg L-Glutaminsäure und 400 mg L-Serin wurden in 950 ml bidest. Wasser gelöst und autoklaviert. 1000 mg L-Asparaginsäure und 2000 mg L-Threonin wurden in 50 ml bidest. Wasser gelöst, steril filtriert und dem Ansatz vor Gebrauch zugeführt.

2.4.3 Medien für Zellkulturen

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): mit 4500 mg Glukose/l, ohne Natriumpyruvat, je 50 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 10 % (v/v) FKS

Fötale Kälber Serum (FKS): wurde vor Gebrauch 30 min bei 56 °C dekomplementiert.

RPMI 1640-Medium: 2 mM L-Glutamin, 10 µg/ml Natriumpyruvat, 100 µg/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 0,35 µl/ml β-Mercaptoethanol, 2 mg/ml NaHCO₃, 10 % (v/v) FKS

2.4.4 Medien für *Xenopus laevis* Oozyten

Modifizierte Barth'sche Lösung: 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0,41 mM CaCl₂, 0,33 mM Ca(NO₃)₂, 0,82 mM MgSO₄, 2,4 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, je 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin

Ca²⁺-freie Modifizierte Barth'sche Lösung: wie Mod. Barth'sche Lösung ohne CaCl₂ und Ca(NO₃)₂

2.5 Lösungen und Puffer

Absättigungslösung: 5 % (w/v) Magermilchpulver, 25 mM Tris/HCl pH 7,4, 150 mM NaCl

Benetzlösung: 2 % (v/v) L- α -Diphytanoyl-phosphatidylcholin in Chloroform

Blockierungspuffer: (Overlay): 25 mM Tris/HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,5 % (w/v) Rinderserumalbumin, 0,25 % (v/v) Tween 20, 12 mM β -Mercaptoethanol

Blockierungspuffer (REM): 5 % (v/v) Ziegennormalserum in Waschpuffer (REM)

Coomassie-Färbelösung: 25 % (v/v) Ethanol, 8 % (v/v) Essigsäure, 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250

DEPC-Wasser: Bidest. Wasser wurde mit 0.1% (v/v) DEPC versetzt, über Nacht inkubiert und autoklaviert

DNA-Probenpuffer: 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % Xylen Cyanol FF, 0,33 % (v/v) Glycerin

Elutionspuffer: 10 mM Glutathion-SH in 50 mM Tris/HCl pH 8,0

Entfärber: 25 % (v/v) Ethanol, 8 % (v/v) Essigsäure

Fixierlösung (REM): 3 % (v/v) Glutaraldehyd, 4 % (w/v) Paraformaldehyd in modifizierter Barth'scher Lösung ohne Antibiotika

Glutaraldehydlösung: 2 % (v/v) Glutaraldehyd in PBS (Xeno)

Hypotone Lösung (REM): 200 mM K-Aspartat, 20 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7,4 (titriert mit KOH)

Inkubationspuffer (REM): 1,0 % (v/v) Ziegennormalserum in Waschpuffer

Laemmli Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS

LiSORB-Puffer: 100 mM LiOAc, 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 M Sorbitol, autoklaviert

Lysis-Puffer: 2,5 M LiCl, 50 mM Tris/HCL pH 8,0, 4 % Triton X-100, 62,5 mM EDTA

Membranlösung: 1 % (v/v) L- α -Diphytanoyl-phosphatidylcholin in n-Decan

10 x MOPS-Puffer: 200 mM 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure pH 7,0, 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA

NBT-Lösung: 75 mg/ml NBT in 70 % (v/v) N-N'-Dimethylformamid

P1-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 μ g/ml *RNaseA*

P2-Puffer: 200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS

P3-Puffer: 3M Kaliumacetat pH 5,5

PBS: 140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄

PBS (GST): 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄

PBS (Xeno): 137 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄

PEG/LiOAc-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM LiOAc pH 7,5, 40 % (w/v) PEG 3350

Ponceau S-Färbelösung: 15 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Methanol, 0,25 % (w/v) Ponceau-S

Protein Probenpuffer: 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 10 % (v/v) Glycerin, 2,3 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol

Puffer-1: 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl

Puffer-2: 1 % (w/v) Casein in Puffer 1

Puffer-3: 100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM EDTA

Puffer-4: 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA

QBT-Puffer: 750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15 % (v/v) Ethanol, 0,15 % (v/v) Triton X-100

QC-Puffer: 1M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15 % (v/v) Ethanol

QF-Puffer: 1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8,5

Ringer-Lösung: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM Glukose, 10 mM HEPES, pH 7,4

RNA-Loading-Puffer: 500 μ l deionisiertes Formamid, 70 μ l 14,3 x MOPS, 180 μ l Formaldehyd (37 % (v/v))

RNA-Probenpuffer: 50 % (v/v) Glycerin, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 1 mM EDTA

Sammelgelpuffer: 5 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (Gewichtsverhältnis 29,2:0,8), 0,1 % (w/v) SDS, 125 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,12 % (v/v) TEMED, 0,62 % (v/v) 10 %iges APS

Solubilisierungs-Puffer: 20 mM Natriumacetat, 2 % Nonident P40, pH 5,0

Substratlösung: 45 µl NBT-Lösung, 35 µl X-Phosphat-Lösung in 5 ml Puffer 3

TBE-Puffer: 89 mM Tris/Borat pH 8,3, 2 mM EDTA

TBE-Puffer (ALF): 100 mM Tris, 83 mM Borsäure, 1 mM EDTA

TBS-Puffer: 25 mM Tris/HCl pH 7,4, 150 mM NaCl

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,4, 7,5 bzw. 8,0, 0,1 mM EDTA

Transferpuffer A: 300 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol

Transferpuffer B: 25 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol

Transferpuffer C: 25 mM Tris/Borat pH 9,0, 0,1 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol

Trenngelpuffer: 10 % oder 12 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (Gewichtsverhältnis 29,2:0,8), 375 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,17 % (v/v) TEMED, 0,83 % (v/v) 10 %iges APS

Trocknungslösung: 50 % (v/v) Methanol, 2 % (v/v) Glycerin 0,1 %

Waschpuffer (REM): 0,1 % (w/v) Gelantine, 0,8 % (w/v) Rinderserumalbumin in PBS (Xeno)

X-Phosphat-Lösung: 50 mg/ml in N-N'-Dimethylformamid

2.6 Plasmide

pBluescript SK (+) (STRATAGENE, La Jolla, USA)

Als Ausgangsvektor wurde pBluescript SK (+) verwendet, in den unter Benutzung der *Bam*HI- und *Sal*I-Restriktionsschnittstellen die für den Leserahmen von hVDAC1 kodierende cDNA einkloniert wurde. Dieses Plasmid fungierte als Basis für die Umklonierung des hVDAC1 in andere Vektoren. Das Ampicillin Resistenzgen und der ColE1 Replikationsursprung dienen zur Selektion und Propagation des Plasmids in *E. coli*. Die Genkarte dieses Vektors ist in Abbildung 1 dargestellt.

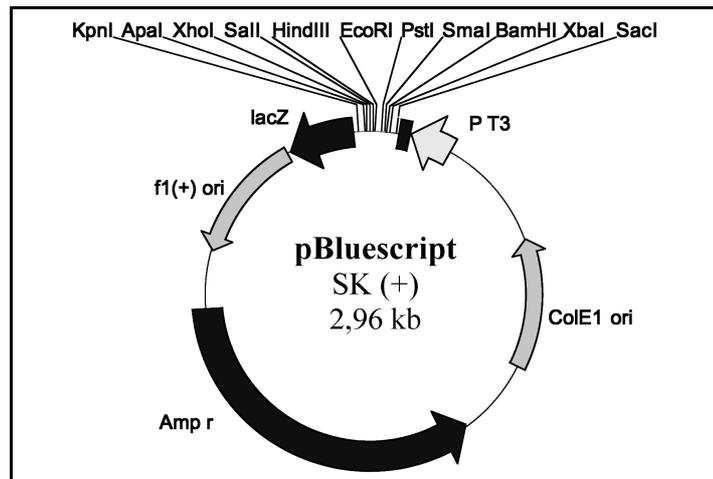


Abbildung 1: Genkarte des Vektors pBluescript SK (+)

Bezeichnungen: fl(+)-ori: Replikationsursprung bei Infektion mit Helferphagen; lacZ: Gen für α-Komplementation bei blau/weiß Selektion; ColE1 ori: Replikationsursprung von *E. coli*; Amp^r: Ampicillinresistenzgen; P_{T3}: T3 Promotor.

pSGEM

Dieser Transkriptionsvektor ist ein Abkömmling des pGEM 3Z (PROMEGA, Madison, USA). Die *multi cloning site* wurde durch die des pBluescript SK ersetzt. Diesen Bereich flankierend wurden nicht translatierte Regionen (UTRs) des γ-Globulins eingesetzt. Eine am 3'-Ende eingefügte *NheI*-Schnittstelle diente zur Linearisierung des Plasmides (Abbildung 2).

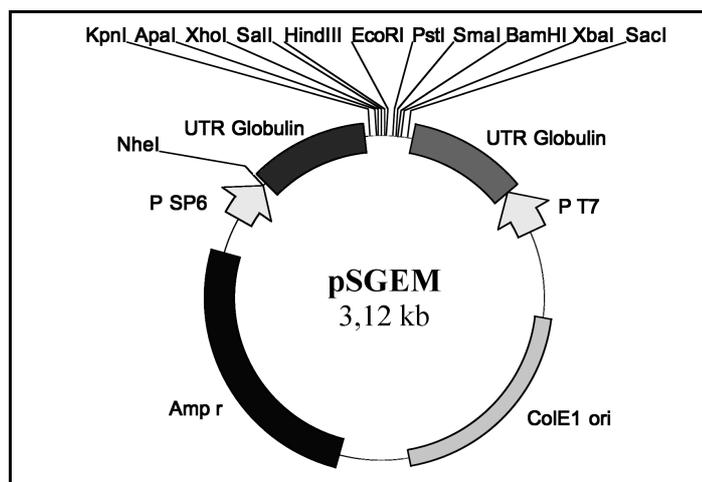


Abbildung 2: Genkarte des Transkriptions Vektors pSGEM

Bezeichnungen: P_{T7}: T7 Promotor; P_{SP6}: SP6 Promotor; UTR Globulin: Gen für nicht translatierte Bereiche des γ-Globulins; ColE1 ori: Replikationsursprung in *E. coli*; Amp^r: Ampicillinresistenzgen.

Der T7-Promotor ermöglicht *in vitro* die spezifische Transkription einklonierter cDNA-Fragmente. Der ColE1 Replikationsursprung und das Ampicillin Resistenzgen erlauben die Propagation und die Selektion des Plasmides in *E. coli*. Der Vektor wurde freundlicher Weise von Prof. Dr. M. Hollmann, Ruhr-Universität Bochum, zur Verfügung gestellt.

pEGFP-N1 (CLONTECH, Palo Alto, USA)

In diesen eukaryontischen Expressionsvektor wurde unter Benutzung der *XhoI*- und *PstI*-Restriktionsschnittstellen die für den *Leserahmen* von hVDAC1 kodierende cDNA einkloniert. Das Insert kodiert für C-terminal mit EGFP fusioniertes hVDAC1. Das resultierende EGFP-Fusionsprotein emittiert, nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm, eine Strahlung, die in der mikroskopischen Auswertung grün erscheint. Das Kanamycin Resistenzgen und der pUC Replikationsursprung dienen zur Selektion und Propagation des Plasmids in *E. coli*. Die Translationseffizienz in Eukaryonten wird durch eine am 5' Ende eingefügte Kozak-Sequenz gesteigert. Eine konstitutive Expression wird durch den Cytomegalievirus-Promotor ermöglicht (Abbildung 3).

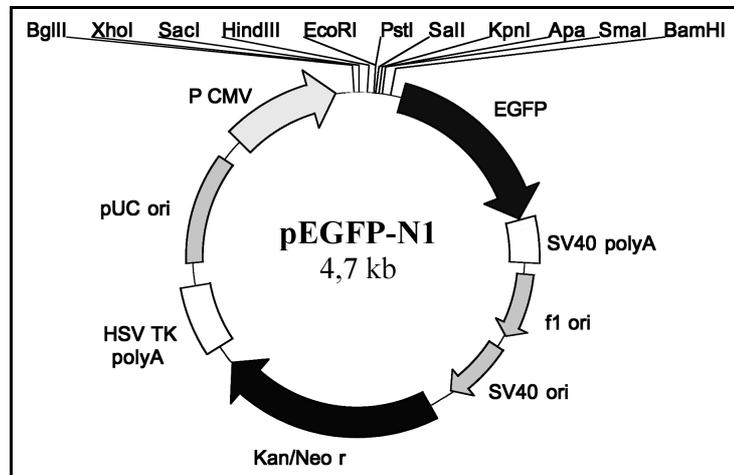


Abbildung 3: Genkarte des Expressionsvektors pEGFP-N1

Bezeichnungen: P_{CMV}: Cytomegalievirus Promotor; EGFP: Gen für das *Enhanced Green Fluorescent Protein*; SV40 polyA: Polyadenylierungssignal; f1 ori: Replikationsursprung für Einzelstrang DNA; SV40 ori: Replikationsursprung in Säugerzellen; Kan/Neo^r: Gene für Kanamycin- und Neomycinresistenz; HSV TK polyA: Polyadenylierungssignal der Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase; pUC ori: Replikationsursprung in *E. coli*.

Dieses Plasmid wurde einerseits zur Expression des Fusionsproteins durch transiente Transfektion von HeLa-Zellen eingesetzt. Andererseits diente es als Ausgangsplasmid zur Umklonierung des für das Fusionsprotein hVDAC1/EGFP kodierende Inserts in den Transkriptionsvektor pSGEM.

pEGFP-C3 (CLONTECH, Palo Alto, USA)

Der in Abbildung 4 dargestellte Vektor diente zur Expression von N-terminal an hVDAC1 fusioniertes EGFP nach transienter Transfektion von HeLa-Zellen. Die hVDAC1-cDNA wurde hierfür in die *XhoI*- und *PstI*-Restriktionsschnittstellen eingebracht. Das Kanamycin Resistenzgen und der pUC Replikationsursprung dienen zur Selektion und Propagation des Plasmids in *E. coli*. Die Translationseffizienz in Eukaryonten wird durch eine am 5' Ende eingefügte Kozak-Sequenz gesteigert. Eine konstitutive Expression wird durch den Cytomegalievirus-Promotor ermöglicht.

Dieses Plasmid wurde ebenfalls zur Umklonierung des für das Fusionsprotein EGFP/hVDAC1 kodierende Inserts in den Transkriptionsvektor pSGEM verwendet.

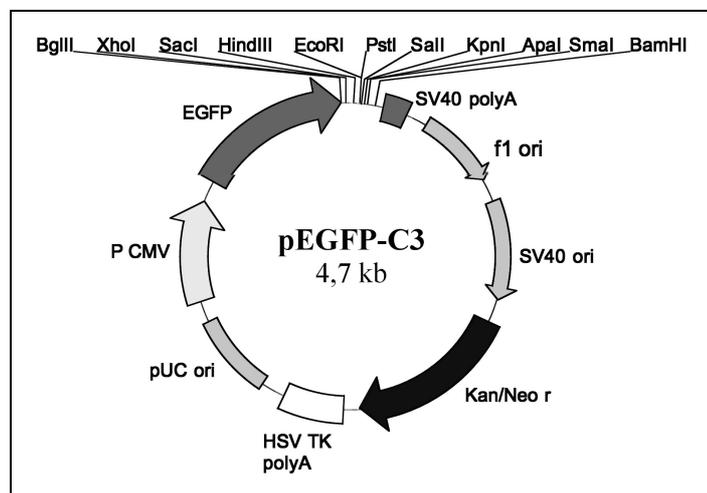


Abbildung 4: Genkarte des Expressionsvektors pEGFP-C3

Bezeichnungen: P_{CMV}: Cytomegalievirus Promotor; EGFP: Gen für das *Enhanced Green Fluorescent Protein*; SV40 polyA: Polyadenylierungssignal; f1 ori: Replikationsursprung für Einzelstrang DNA; SV40 ori: Replikationsursprung in Säugerzellen; Kan/Neo^r: Gene für Kanamycin- und Neomycinresistenz; HSV TK polyA: Polyadenylierungssignal der Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase; pUC ori: Replikationsursprung in *E. coli*.

pGEX-KG (Guan und Dixon, 1991)

Zur Synthese heterologer GST-Fusionsproteine wurde der pGEX-KG Expressionsvektor eingesetzt. Die Expression des Fusionsproteins in *E. coli* wird durch den tac-Promotor kontrolliert und kann durch IPTG spezifisch induziert werden (Abbildung 5). Eine Thrombinschnittstelle am C-Terminus der Glutathion S-Transferase ermöglicht die Abspaltung des reinen, durch die einklonierte cDNA kodierten Proteins. Das Ampicillin

Resistenzgen und der pBR322 Replikationsursprung ermöglichen die Selektion und Vervielfältigung des Plasmids in *E. coli*.

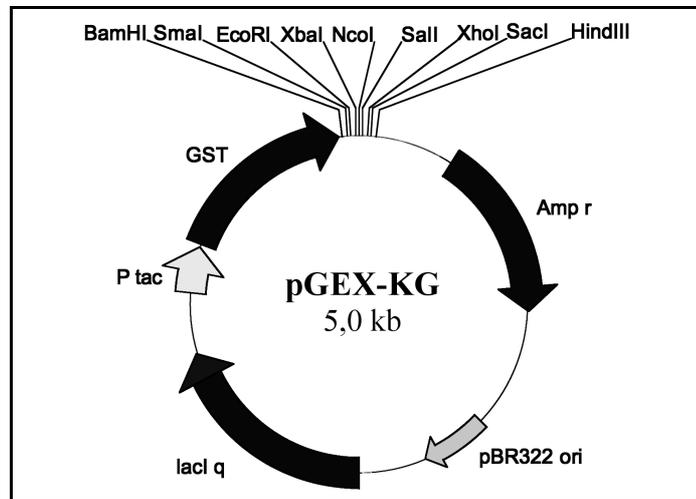


Abbildung 5: Genkarte des Expressionsvektors pGEX-KG

Bezeichnungen: GST: Gen für die Glutathion S-Transferase aus *Schistosoma japonicum*; P_{tac}: tac Promotor; Amp^r: Ampicillinresistenzgen; pBR322 ori: Replikationsursprung in *E. coli*; lacI^q: Gen für das Repressorprotein des lac-Operons

pMyr (STRATAGENE, La Jolla, USA)

Dieser CytoTrapTM Two-Hybrid System Vektor diente zur Expression einer H2LCL cDNA-Bank in *Saccharomyces cerevisiae* cdc25H. Die cDNA wurde in die *EcoRI*- und *XhoI*-Schnittstellen der *multi cloning site* ligiert. Ein am 5'-Ende der einklonierten cDNA liegender Nucleinsäureabschnitt kodiert für ein Myristylierungssignal, welches exprimierte Proteine an der Zellmembran der Wirtszelle verankert.

Ein Chloramphenicol Resistenzgen ermöglicht die Selektion und der ColE1 Replikationsursprung die Vervielfältigung des Plasmids in *E. coli*. Der 2 μ Replikationsursprung und die Information für die Uracil-Synthese erlauben die Propagation und Selektion in *Saccharomyces cerevisiae* cdc25H. Die Expression der durch die cDNA kodierten, myristylierten Proteine steht unter der Kontrolle des Gal1 Promotors und kann durch Zugabe von Galaktose spezifisch induziert werden. In den mit *XhoI* und *EcoRI* gespaltenen, dephosphorylierten Vektor pMyrXR wurde eine H2LCL cDNA-Bank einkloniert. pMyr ohne Insert, mit der für MafB bzw. der für Lamin C kodierenden cDNA kamen in Kontrollreaktionen des CytoTrapTM Two-Hybrid Systems zur Anwendung. Der Vektor ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt.

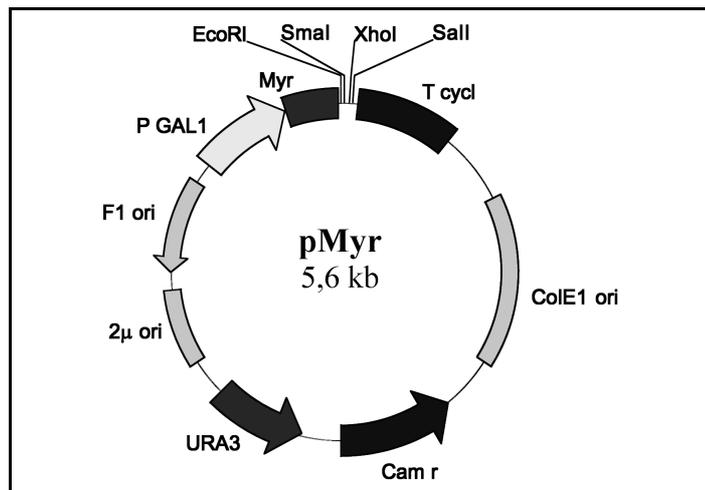


Abbildung 6: Genkarte des CytoTrap™ Two-Hybrid Vektors pMyr

Bezeichnungen: P_{GAL1}: Gal1 Promotor zur Expression in Hefe; Myr: Myristylierungssignal, T_{cycl}: Transkriptionsterminations- und Polyadenylierungssignal in Hefe; f1 ori: Replikationsursprung bei Transfektion mit Helferphagen; 2μ ori: Replikationsursprung in Hefe; ColE1 ori: Replikationsursprung in *E. coli*; Cam^r: Chloramphenikolresistenzgen; URA3: Gen für die Uracil-Synthese.

pSos (STRATAGENE, La Jolla, USA)

Dieser CytoTrap™ Two-Hybrid System Vektor wurde zur Expression des hSos-hVDAC1 Fusionsproteins in *Saccharomyces cerevisiae* cdc25H verwendet.

Ein Ampicillin Resistenzgen ermöglicht die Selektion in *E. coli*, der ColE1 Replikationsursprung die Vervielfältigung des Plasmids. Der 2μ Replikationsursprung und die Information für die Leucin-Synthese erlauben die Propagation und Selektion in *Saccharomyces cerevisiae* cdc25H. Die konstitutive Expression des hSos-Fusionsproteins wird durch den ADH1-Promotor ermöglicht. Der Vektor ist schematisch in Abbildung 7 dargestellt.

pSos ohne Insert bzw. mit der für das Protein MafB kodierenden cDNA kamen in Kontrollreaktionen des CytoTrap™ Two-Hybrid Systems zur Anwendung.

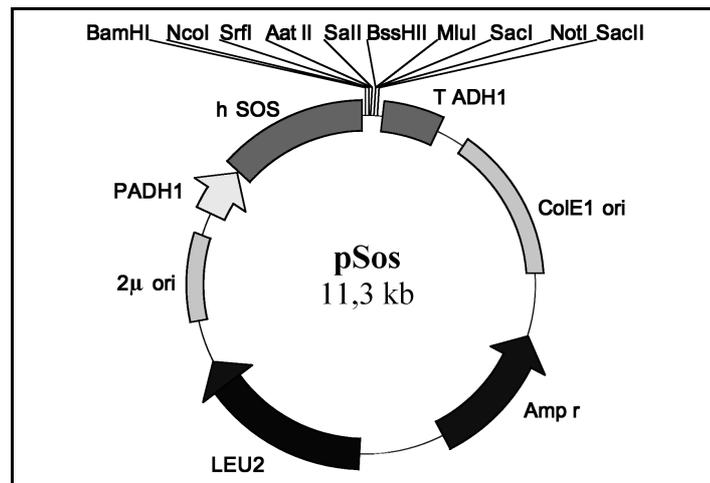


Abbildung 7: Genkarte des CytoTrap™ Two-Hybrid Vektors pSos

Bezeichnungen: P_{ADH1}: ADH1 Promotor zur Expression in Hefe; hSos: Gen für humanes hSos, T_{ADH1}: Transkriptionsterminations- und Polyadenylierungssignal in Hefe; 2μ ori: Replikationsursprung in Hefe; ColE1 ori: Replikationsursprung in *E. coli*; Amp^r: Ampicillinresistenzgen; Leu3: Gen für die Leucin-Synthese.

2.7 Oligodesoxyribonukleotide

2.7.1 Oligonukleotid-Primer für Nukleotidsequenzanalysen

Po312-F	5'-TACAGAGAAATGGAATACCGAC-3'
Po462-R	5'-TTAGGTGAGAAGGATGAATCGAA-3'
Po575-F	5'-CTGCAAAATCCCGAGTGACC-3'
Po752-R	5'-CGCGTGTTACTGGTTTCCTGCTGTC-3'
pMyr-F	5'-ACTACTAGCAGCTGTAATAC-3'
pMyr-R	5'-CGTGAATGTAAGCGTGACAT-3'
pSos-F	5'-CCAAGACCAGGTACCATG-3'
pSosR	5'-CGCAGGGTTTTCCAGT-3'
pGEX-F	5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'
pGEX-R	5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'
EGFPN1-F	5'-GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTC-3'
EGFPN1-R	5'-CCGTCCAGCTCGACCAGGATG-3'
EGFPC3-F	5'-CATGGTCCTGTCTGGAGTTCGTG-3'
EGFPC3-R	5'-CCTCTACAAATGTGGTATGGCTGA-3'

T7-F	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
PBP74-F	5'-GCGTGGATCCATGATAAGTGCCAGCCGAGCTGCA-3'
PBP74-F1	5'-ATGCTGTGATCACAGTCC-3'
PBP74-F2	5'-TGGCATGACTAGGATGCG-3'
PBP74-R	5'-TCGAGTCGACTTACTGTTTTTCCTCCTTTTGATC-3'

2.7.2 Oligonukleotid-Primer für Polymerase-Kettenreaktionen und Nukleotidsequenzanalysen

Po-F	5'-GTATAGGATCCTTATGGCTGTGCCACCCACGTA-3' (<i>BamHI</i>)
Po-R	5'-CGGCCCCGTCGACTTATGCTTGAAATTCAG-3' (<i>Sall</i>)
TcGEX-F	5'-GCGTGGATCCATGGAAGACTACCAGGCTGCG-3' (<i>BamHI</i>)
TcGEX-R	5'-AGCTTGTCGACTCAAATAGACAGTCCGAAGGCAC-3' (<i>Sall</i>)
PBP74-F	5'-GCGTGGATCCATGATAAGTGCCAGCCGAGCTGCA-3' (<i>BamHI</i>)
PBP74-448-F	5'-GCGTGGATCCATGATTGAAACTCTAGGAGGTGTC-3' (<i>BamHI</i>)
PBP74-R	5'-TCGAGTCGACTTACTGTTTTTCCTCCTTTTGATC-3' (<i>Sall</i>)
FLAG-PO-F	5'-ACTAGTGGATCCTTATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGCTGTGCCACCCACGTAT-3' (<i>BamHI</i>)
PoFLAG-R	5'-CTCGAGGTCGACTTACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCTGCTTGAATTCCAGTCCTAG-3' (<i>Sall</i>)
PoN1/C3-F	5'-TCAGATCTCGAGATGGCTGTGCCACCCACG-3' (<i>XhoI</i>)
PoN1/C3-R	5'-CGTCGACTGCAGTGCTTGAAATTCAGTCC-3' (<i>PstI</i>)
EGFP-Po-F	5'-GCTGGAGCTCACCATGGTGAGCAAGGGGCGAGGAG-3' (<i>SacI</i>)
EGFP-Po-R	5'-AGTCGCGGCCGCTTATGCTTGAAATTCAGTCC-3' (<i>NotI</i>)
Po-EGFP-F	5'-GCTGGAGCTCACCATGGCTGTGCCACCCACGTAT-3' (<i>SacI</i>)
Po-EGFP-R	5'-ATTATGATCTAGAGTCGCGGCCGCTTTACTTG-3' (<i>NotI</i>)
PoGEX-F	5'-GCGTGGATCCATGGCTGTGCCACCCACGTAT-3' (<i>BamHI</i>)

2.8 Enzyme, Nukleinsäuren und Antikörper

AuroProbe™ EM GAM IgG G30 (Gold-markierter Ziege anti-Maus Antikörper), AMERSHAM LIFE SCIENCE, Buckinghamshire, GB

DNA-Standard *ladder*-Mix, FERMENTAS, Vilnius, Litauen

DNaseI, ROCHE, Mannheim

FITC-konjugierter Ziege anti-Kaninchen Antikörper, SIGMA, Taufkirchen

FITC-konjugierter Ziege anti-Maus Antikörper, SIGMA, Taufkirchen

HRP-konjugiertes Kaninchen anti-Maus IgG, DAKOPATTS, Hamburg

HRP-konjugiertes Schwein anti-Kaninchen IgG, DAKOPATTS, Hamburg

Kaninchen anti-Prohibitin Antikörper, LAB VISION CORPORATION, Fremont, USA

LMW-Marker, PHARMACIA LKB, Freiburg

Monoklonaler Maus anti-FLAG[®] M2 Antikörper, SIGMA, Taufkirchen

Monoklonaler Maus anti- γ -Adaptin Antikörper (Klon 100/3), SIGMA, Taufkirchen

Monoklonaler Maus anti-GOLGI 58K Protein Antikörper (Clone 38K-9), SIGMA, Taufkirchen

Monoklonaler Maus anti-mitochondriales HSP70 Antikörper (IgG3), AFFINITY BIOREAGENTS, INC, Golden, USA

Monoklonale Maus anti-hVDAC1 Antikörper (Nr. 1: IgG_{2a}, Nr. 4: IgG_{2b}, Nr. 6: IgG_{2b}, Nr. 7: IgG_{2b}), CALBIOCHEM-NOVABIOCHEM GMBH, Bad Soden/Ts

Restriktionsendonucleasen, GIBCO BRL, Eggenstein

Restriktionsendonukleasen, ROCHE, Mannheim

RNasin[®] RNase-Inhibitor ,PROMEGA, Madison, USA

RNA-Standard *Ladder-1*, ROCHE, Mannheim

Streptavidin-konjugierte alkalische Phosphatase, SERVA, Heidelberg

Taq-Polymerase, PHARMACIA LKB, Freiburg

TRITC-konjugierter Ziege anti-Kaninchen Antikörper, SIGMA, Taufkirchen

TRITC-konjugierter Ziege anti-Maus Antikörper, SIGMA, Taufkirchen

Ultrapure dNTP Set 2'-Desoxynukleosid 5-Triphosphat, PHARMACIA LKB, Freiburg

Vent-Polymerase, NEW ENGLAND BIOLABS, Bad Schwalbach

Der polyklonale Antikörper gegen das humane Tctex1 (R5205) wurde freundlicher Weise von Stephen King, Department of Biochemistry, University of Connecticut Health Center, USA zur Verfügung gestellt.

2.9 Chemikalien, Feinmaterialien und Kits

Alle in der nachfolgenden Liste nicht aufgeführten Chemikalien wurden in Analysenqualität von den Firmen MERCK, Darmstadt oder SIGMA, Taufkirchen bezogen.

ABI Prism™ Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, PE APPLIED BIOSYSTEMS, Weiterstadt

Acrylamid, BIOMOL, Ilvesheim

Ag/AgCl-Elektroden Modell 6.0733.100, METROHM, Herisau, CH

Agarose, BIOMOL, Ilvesheim

Agarose NA für Gelelektrophoresen, PHARMACIA LKB, Freiburg

Ampicillin Na-Salz, ROCHE, Mannheim

Autoread™ Sequencing Kit, PHARMACIA LKB, Freiburg

β-Mercaptoethanol. FLUKA, Buchs, CH

Bacto-Agar, DIFCO LABORATORIES, Detroit, USA

Bacto-Peptone, DIFCO LABORATORIES, Detroit, USA

Bacto-Tryptone, DIFCO LABORATORIES, Detroit, USA

Biotin *in vitro* Translation Kit, ROCHE, Mannheim

Cell-scraper 23 cm, NALGE-NUNC, Naperville, USA

Cellophanfolie und Trocknungsrahmen für SDS-PAG, NOVEX, San Diego, USA

Centriflex™ Gel Filtration Cartridges, EDGE BIO SYSTEMS, Geithersburg, USA

Coomassie Brilliant Blue R 250, SERVA, Heidelberg

CytoTrap™ XR Library Construction Kit, STRATGENE, La Jolla, USA

Deckgläser 24 x 36 mm und rund 18 mm, MENZEL-GLÄSER, Braunschweig

Elektroporationsküvetten 0,5 mm, BIORAD, München

Ethidiumbromid, SERVA, Heidelberg

Ethylendiamin-Tetraacetat (EDTA), SERVA, Heidelberg

Genta-Sleecol®, ALBRECHT, Aulendorf

Gewebekulturröhrchen, GREINER, Nürnberg

Gewebekulturschalen 250 ml, GREINER, Nürnberg

GFX Micro Plasmid Präp Kit, PHARMACIA LKB, Freiburg

Glutathione-Sepharose[®]4B, PHARMACIA LKB, Freiburg

Filterpapier 3mm, WHATMAN, Maidstone, GB

Fixogum, MARABU, Tamm

Fuchs-Rosenthal Zählkammer, SCHÜTT, Göttingen

Fujichromfilm ProVia 1600, FUJI, Tokio, Y

Glycerol, GIBCO BRL, Eggenstein

Glycin, SERVA, Heidelberg

Hefe-Extrakt, DIFCO LABORATORIES, Detroit, USA

HEPES, SERVA, Heidelberg

IntenSE[™] M Silver Enhancement Kit, AMERSHAM LIFE SCIENCE, Buckinghamshire, GB

IPTG, BIOMOL, Ilvesheim

Kapillarglas GC 150T-10, CLARK ELECTROMEDICAL INSTRUMENTS, Reading, GB

Kapillarglas GB1507F-8P, SCIENCE PRODUCTS GMBH, Frankfurt

Kernfarbstoff H 33342, HOECHST, Frankfurt

Kohleband 8 mm doppelt klebend, PLANO, Marburg

Kohlegarn C 5421, EMITECH LTD, Ashford, GB

L- α -Diphytanoyl-Phosphatidylcholin, AVANTI BIOCHEMICALS, Alabaster, USA

Lithiumacetat, SERVA, Heidelberg

Long Ranger[™], PE APPLIED BIOSYSTEMS, Weiterstadt

mCAP[™] mRNA Capping Kit, STRATGENE, La Jolla, USA

Messenger mRNA Isolation Kit, STRATGENE, La Jolla, USA

N',N-Methylenbisacrylamid, GERBU TRADING, Gaiberg

N, N, N', N', Tetramethylethyldiamin (TEMED), SERVA, Heidelberg

Natriumdodecylsulfat, BIOMOL, Ilvesheim

Nitrogen Base, DIFCO LABORATORIES, Detroit, USA

Objektträger 76 x 26 mm, MENZEL-GLÄSER, Braunschweig

OPC-Säule, PE APPLIED BIOSYSTEMS, Weiterstadt
Petrischalen steril (Durchmesser 82 mm und 140 mm), GREINER, Nürnberg
Pipettenspitzen 10 µl- 1000 µl, EPPENDORF, Hamburg
Plasmid Purification Kit, QIAGEN, Hilden
Polaroidfilm 667, POLAROID CORPORATION, Cambridge, USA
Polyethylenglycol 3500 (PEG), SERVA, Heidelberg
Polygluconatfaden Maxon, BRAUN-DEXON GMBH, Spangenberg
PP-Impfösen, DIFCO LABORATORIES, Detroit, USA
PVDF-Membran Immobilon™ P 45, MILLIPORE, Bradford, GB
QIAquickPCR Purification Kit, QIAGEN, Hilden
Reaktionsgefäße 1,5 und 2,0 ml, EPPENDORF, Hamburg
Rinderserum-albumin, BIOMOL, Ilvesheim
Rollfilm APX 100/200, AGFA-GAVAERT, Leverkusen
Super-Fect™ Transfection Kit, QIAGEN, Hilden
Sterilfilter MiniSart N 0,2 µm, SARTORIUS, Göttingen
Sterilfiltrationsgerät Sartolab V-500, SARTORIUS, Göttingen
Tween 20, BIORAD, München
12 well cluster, COSTAR, Cambridge, USA
Ziegennormalserum, AMERSHAM LIFE SCIENCE, Buckinghamshire, GB

2.10 Geräte

ABIPrism™ 377 DNA Sequencer, PE APPLIED BIOSYSTEMS, Weiterstadt
Autoklav 23, MELAG, Berlin
Autoklav Typ kSG 114, SCHÜTT LABORTECHNIK, Göttingen
automatische Pipettierhilfe Pipettus akku, HIRSCHMANN LABORGERÄTE, Ebermannstadt
Binokular Stemi CV 8, ZEISS, Göttingen
Blotkammer Fast Blot B33, BIOMETRA, Göttingen
Brutschrank, HERAEUS, Osterode

Brutschränke begasbar, FORMA SCIENTIFIC, Marietta, USA

DNA-Sequenziergerät (A.L.F.), PHARMACIA LKB, Freiburg

DNA Synthesizer 392, PE APPLIED BIOSYSTEMS, Weiterstadt

Elektrophoresekammer DNA Cell, BIORAD, München

Flachbettschreiber PM 8252, PHILLIPS, Eindhoven

Fluoreszenzmikroskop Axioskop mit 35 mm Filmkassette, ZEISS, Göttingen

Gene Pulser 2 mit Puls Controller plus, BIORAD, München

GeneQuant RNA/DNA-Calculator, PHARMACIA LKB, Freiburg

Gleichspannungsquelle für Versuche mit künstlichen Lipidmembranen, WERKSTÄTTEN MPI FÜR EXP. MEDIZIN, Göttingen

Heizbad, SCHÜTT LABORTECHNIK, Göttingen

HeraSafe Sterilbank Klasse 2, HERAEUS, Osterode

I/U-Verstärker für Versuche mit künstlichen Lipidmembranen, WERKSTÄTTEN MPI FÜR EXP. MEDIZIN, Göttingen

Indirektes Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135, ZEISS, Göttingen

Kaltlichtlampe KL 1500, SCHOTT, Wiesbaden

Kohlebedampfungsgerät K 450, EMITECH LTD, Ashford, GB

Konfokales Lasermikroskop MRC 1024, BIORAD, München

Kühlzentrifuge (J2-2) mit Rotor JA 10 und JA 20, BECKMANN INSTRUMENTS, Palo Alto, USA

Kühlzentrifuge Omnifuge 2 ORS, HERAEUS, Osterode

Labofuge, HERAEUS, Osterode

Meßkammer für Versuche mit künstlichen Lipidmembranen, WERKSTÄTTEN MPI FÜR EXP. MEDIZIN, Göttingen

Microinjector 5342, EPPENDORF, Hamburg

Micromanipulator 5170, EPPENDORF, Hamburg

Mikrowellenherd Modell 810, PHILLIPS, Eindhoven, NL

Minishaker MS 1, IKA WERKE, Staufen

Oozyten Voltage clamp Verstärker OC 725A, WARNER, New Haven, USA

PCR-System GeneAmp 9600 und 2400, PE APPLIED BIOSYSTEMS, Weiterstadt

pH-Meter PHM 82, RETTBERG, Göttingen

Pipettenzieher DMZ-Universal Puller, ZEITZ, Augsburg

Rasterelektronenmikroskop JSM-5400, JEOL, Y

Sofortbildkamera MP-4 mit Stativ 4401, POLAROID CORPORATION, Cambridge, USA

Spannungsgerät 2301 Macrodrive, LKB, Gräflingen

Speicheroszilloskop 54600A, HEWLETT PACKARD, Hannover

Sterilbank Biohazard Gelaire BSB 4, FLOW LABORATORIES GmbH, Meckenheim

Thermomixer 5436, EPPENDORF, Hamburg

Tiefkühlschrank (-80°C), HERAEUS, Osterode

Tischzentrifuge 5415 C, EPPENDORF, Hamburg

Ultraschallgerät Labsonic U, BRAUN, Melsungen

Ultrazentrifuge TL-100, BECKMANN INSTRUMENTS, Palo Alto, USA

UV-Licht Typ N 72, INTAS, Göttingen

Vakuumbzentrifuge speed-vac SC 110, SCHÜTT LABORTECHNIK

Video Graphic Printer UP-850, JEOL, Y

3 Methoden

3.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.1.1 Synthese von Oligonukleotiden

Synthetisch hergestellte Oligonukleotide wurden als Primer bei PCR-Amplifikationen und bei der DNA-Sequenzierung eingesetzt. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden nach der β -Cyanoethyl-Phosphoramidit-Methode (Beaucage und Caruthers, 1981) durch ein vollautomatisches DNA-Synthesegerät hergestellt. An die als Trägermaterial fungierende Glasmatrix-Säule wurden 0,2 μ mol des ersten Nucleosids über die 3'-Hydroxygruppe kovalent gebunden. Nach Abspaltung der Dimethoxytrityl-Schutzgruppe durch Trichloressigsäure folgte der nächste Synthesezyklus. Nach dem letzten Kopplungsschritt wurde auf die Abspaltung der Dimethoxytrityl-Schutzgruppe verzichtet („*Trityl-on*“ Modus) und das Syntheseprodukt durch Zugabe von Ammoniumhydroxid von der Glasmatrix-Säule freigesetzt. Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte durch Inkubation für 15 h bei 55 °C. Die Trityl-Gruppen tragenden Oligonukleotide wurden über eine *reversed phase* OPC-Säule aufgrund ihrer größeren Hydrophobizität durch Zugabe von 2 %iger (v/v) Trifluoressigsäure und einem Waschschrift in Wasser aufgereinigt. Die vollständigen Syntheseprodukte wurden anschließend mit 20 % (v/v) Acetonitril eluiert, unter Vakuum getrocknet und in bidest. Wasser aufgenommen.

3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Anhand der Absorbtion bei 260 nm wurde die Konzentration von DNA-, RNA- und Oligonukleotidlösungen ermittelt (Sambrook *et al.*, 1989).

Die optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm der verdünnten Proben wurden in einer Quarzküvette gegen den verwendeten Puffer als Leerwert im Photometer gemessen. Die Konzentrationen wurden nach folgenden Formeln errechnet:

Doppelstränge DNA: $OD_{260} \times 50 = \text{Konzentration in } \mu\text{g/ml}$

Oligonukleotide: $OD_{260} \times 33 = \text{Konzentration in } \mu\text{g/ml}$

RNA: $OD_{260} \times 40 = \text{Konzentration in } \mu\text{g/ml}$

Aus dem Verhältnis der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm konnte die Reinheit der gemessenen Lösungen bestimmt werden. Der OD_{260}/OD_{280} -Quotient für reine DNA beträgt 1,8, für reine RNA 2,0.

3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Methode der PCR (Saiki *et al.*, 1988) beruht auf der Amplifikation eines DNA-Bereiches durch eine thermostabile Polymerase.

Zur Amplifizierung eines DNA-Fragmentes wurden ca. 10 ng Matrizen-DNA, jeweils 20 pmol Oligonukleotide und dNTP-Mix in einer Endkonzentration von 0,2 mM eingesetzt. In analytischen Ansätzen kam eine Einheit Taq-Polymerase, in präparativen eine Einheit Vent-Polymerase zum Einsatz. Die Reaktion wurde im Inkubationspuffer des entsprechenden Enzyms in einem Gesamtvolumen von 50 µl im Thermocycler (Gene Amp PCR System 2400 oder 9600) durchgeführt. Das zur Anwendung kommende PCR-Programm startete mit einem Denaturierungsschritt von 5 min bei 95 °C. Die darauf folgenden 25 Verlängerungszyklen bestanden aus 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Hybridisierung und 30 s Elongation bei 72 °C, wobei die Hybridisierungstemperatur für die eingesetzten Oligonukleotide mittels der nachfolgenden Formel getrennt berechnet und anschließend gemittelt wurden:

$T_{\text{annealing}}: 69,3 \text{ °C} + 0,41 \times (\%G/C) - 650/\text{Oligonukleotidlänge}$.

Den Abschluß des Programms bildete ein Elongationsschritt von 5 min bei 72 °C.

3.1.4 Reinigung von PCR-Produkten

DNA-Fragmente wurden nach der Polymerase-Kettenreaktion durch das QIAquick PCR Purification Kit von Nukleotiden, Primern, Salzen und der Polymerase gereinigt. Ein PCR-Ansatz wurde mit 5 Volumen Puffer PB versetzt und auf eine QIAquick spin column aufgetragen. Die hohe Salzkonzentration und ein pH-Wert unter 7,5 führten zur Anbindung der DNA-Fragmente an die Säulenmatrix. Nach einem Zentrifugationsschritt von 1 min bei 10.000 x g wurden verbliebene Verunreinigungen durch Zugabe von 750 µl Puffer PE und erneuter Zentrifugation ausgewaschen. Die aufgereinigten DNA-Fragmente wurden anschließend mit 50 µl bidest. Wasser eluiert.

3.1.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die sequenzspezifische Hydrolyse von DNA wurde mittels Endonukleasen unter Berücksichtigung der Herstellerangaben über Puffer- und Temperaturbedingungen

durchgeführt. In der Regel wurden die Ansätze mit 3 Einheiten Enzym pro μg DNA für 2 h bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle der vollständigen Hydrolyse wurden Proben der gespaltenen und der ungespaltenen DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

3.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente aus PCR, Restriktionsspaltungen, Ligationen und Plasmidpräparationen wurden durch die Agarose-Gelelektrophorese nach Sambrook *et al.* (1989) aufgetrennt. Für analytische Zwecke kamen Gele der Größe 100 x 65 x 7 mm zur Anwendung, präparative Gele waren 140 x 100 x 7 mm groß. Je nach Länge der zu analysierenden DNA-Fragmente enthielten die Gele 0,8 –1,2 % (w/v) Agarose in 1 x TBE-Puffer. Die Proben wurden mit 0,5 Volumen Probenpuffer versetzt, auf ein Gel aufgetragen und in 1 x TBE-Puffer bei konstanter Spannung von 5 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Gele wurden anschließend in einer Lösung aus 0,5 μg Ethidiumbromid / ml bidest. Wasser 5 Minuten inkubiert, in bidest. Wasser entfärbt und unter UV-Licht (254 nm) zur Dokumentation mit einer Polaroid-Kamera fotografiert.

3.1.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung der DNA-Fragmente nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung wurden unter UV-Licht die entsprechenden Banden ausgeschnitten, mit 1 Volumenteil TE pH 8,0 versetzt und mechanisch zerkleinert. Der Ansatz wurde mit einem Volumenteil Phenol pH 8,0 vereinigt und intensiv geschüttelt. Gelstrukturen wurden anschließend durch mehrfach wiederholte Inkubation bei -70 °C für 30 min und Inkubation bei 45 °C für 15 min aufgebrochen. Nach Zentrifugation für 5 min bei 10.000 x g wurde der Überstand abgenommen und mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) extrahiert. Die im Überstand enthaltene DNA wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 3 Volumen Ethanol bei -20 °C präzipitiert, zentrifugiert und mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in TE pH 7,4 gelöst und photometrisch quantifiziert.

3.1.8 Ligation

Linearisierte Vektor-DNA und DNA Fragmente wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:5 durch 2 Einheiten T4-DNA-Ligase pro pmol DNA-Enden in Ligase-Puffer kovalent verknüpft. Die Ligationsansätze beinhalteten 300 bis 800 ng DNA in einem Gesamtvolumen von 10 μl und wurden 16 Stunden bei 14 °C inkubiert. Zur Elektroporation eingesetzte

Transformationsansätze wurden durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 3 Volumen Ethanol präzipitiert, mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und abschließend in bidest. Wasser aufgenommen.

3.1.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

PCR-Fragmente und Plasmide wurden nach Restriktionsspaltung mit den passenden Enzymen, Aufreinigung und Ligation zur Transformation von *E. coli* eingesetzt. Durch Anzucht der transformierten Zellen wurde Plasmid-DNA angereichert, die nach der Aufreinigung auf korrekte Sequenz überprüft, zur Subklonierung in andere Vektoren oder zur *in vitro*-Transkription eingesetzt wurde.

3.1.10 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*

Die verwendeten *E. coli* Stämme mit und ohne Plasmide wurden bei -70 °C als Glycerin-Suspension aufbewahrt. Hierzu wurde ein Aliquot der ausgewachsenen LB-Flüssigkultur mit 15 % (v/v) sterilem Glycerin versetzt und bei -70 °C eingefroren. Zur Reaktivierung der Zellen wurde die Suspension auf Eis aufgetaut, auf LB-Platten ausgestrichen und einzelne Kolonien zum Animpfen einer neuen LB-Flüssigkultur verwendet.

3.1.11 Transformation von *E. coli*

3.1.11.1 Chemische Transformation nach Inoue *et al.* (1990)

Glycerin-Dauerkulturen der entsprechenden *Escherichia coli*-Stämme wurden auf LB-Vollmediumplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Als Vorkultur wurden 10 ml SOB-Medium mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurden 250 ml SOB-Medium mit der Vorkultur inokuliert und bei 18 °C und 220 rpm inkubiert, bis der Ansatz eine optische Dichte von 0,6 bei einer Wellenlänge von 600 nm erreicht hatte. Die Kultur wurde 10 min auf Eis abgekühlt und 10 min bei 2.500 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 80 ml Transformationspuffer resuspendiert, 10 min auf Eis verwahrt und erneut wie oben zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden nun in 20 ml Transformationspuffer resuspendiert, DMSO mit einer Endkonzentration von 7 % (v/v) zugeführt und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation

von 10 min auf Eis wurde die Zellsuspension in 2 ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation der vorbehandelten Zellen mit der entsprechenden Plasmid-DNA wurde ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, mit 50 bis 500 ng der entsprechenden DNA versetzt und für 30 min im Eisbad inkubiert. Einem Hitzeschock von 30 s bei 42 °C folgte die Inkubation für 2 min auf Eis. Die Ansätze wurden mit 0,8 ml SOC-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. 5 μl bis 200 μl der Ansätze wurden auf Selektivagar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur weiteren Analyse der transformierten Zellen wurden Flüssigkulturen mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und angezüchtet.

3.1.11.2 Elektroporation kompetenter Zellen

Durch das Elektroporationsverfahren werden *E. coli* Zellen kurzfristig in ein elektrisches Spannungsfeld gebracht, wodurch eine vorübergehende Permeabilisierung der Membran die Aufnahme von Plasmid-DNA ermöglicht (Weaver, 1995).

Glycerin-Dauerkulturen der entsprechenden *E. coli*-Stämme wurden auf LB-Vollmediumplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Als Vorkultur wurden 10 ml 2YT-Medium mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurden 500 ml 2YT-Medium mit der Vorkultur inokuliert und bei 37 °C und 220 rpm inkubiert, bis der Ansatz eine optische Dichte von 0,6 bei einer Wellenlänge von 600 nm erreicht hatte. Die Kultur wurde 10 min auf Eis abgekühlt und 10 min bei $2.500 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zur Entsalzung mehrmals mit 4 °C kaltem bidest. Wasser gewaschen und schließlich in 1 ml 10 % (v/v) Glycerin gelöst. 50 μl Aliquots wurden direkt in Transformationsversuche eingesetzt, wenn eine hohe Transformationsrate gefordert war. Andernfalls wurden die Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurden 50 μl der Zellsuspension mit 1-4 μl salzfreier DNA-Lösung in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette vereinigt und 1 min auf Eis inkubiert. Die Küvette wurde in die Elektroporationskammer des *Gene Pulser* Gerätes gestellt, der mit folgender Einstellung programmiert wurde: elektrische Kapazität von 25 μF , Spannung von 2,5 kV mit einem Widerstand von 200 Ω . Die Dauer des angelegten Pulses betrug zwischen 4,5 und 5 ms. Die Zellsuspension wurde umgehend in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit 950 μl vorgewärmten SOC-Medium für eine Stunde bei 37 °C und 220 rpm inkubiert.

Verdünnungsreihen der Ansätze wurden anschließend auf Selektivagar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Mit einzelnen Kolonien konnten nun Selektivmedien zur weiteren Analyse und Vermehrung der transformierten Zellen inokuliert werden.

3.1.12 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde aus *E-coli* durch alkalische SDS-Lyse nach Birnboim und Doly (1979) isoliert und gereinigt. Alkalische Pufferbedingungen führen dabei zum Zellaufschluß und zur Denaturierung von Proteinen und chromosomaler DNA. Durch Inkubation des Zellaufschlusses mit RNase A wird zudem bakterielle RNA eliminiert.

Die Plasmid-DNA kann über eine Glas-Faser-Matrix nach Neutralisation und Zugabe chaotroper Salze gereinigt werden. Verunreinigende Komponenten werden ausgewaschen und die Plasmid-DNA durch einen Niedrigsalz-Puffer eluiert.

3.1.12.1 Plasmid-Isolierung analytisch

Das *GFX Micro Plasmid Prep Kit* wurde für analytische Plasmidisolierungen mit einer Ausbeute von ca. 20 µg mit den vom Hersteller gelieferten Lösungen nach Protokoll angewendet. 1,5 ml einer Übernachtskultur wurden in der Tischzentrifuge bei 14.000 rpm und RT für 1 min zentrifugiert und das Pellet in 150 µl Lösung I resuspendiert. Durch Zugabe von 150 µl Lösung II wurden die Zellen lysiert. Die Zugabe von 300 µl Lösung III führte zur Neutralisation des Ansatzes und zur SDS-Fällung. Proteine, Membranbestandteile und chromosomale DNA wurden in der Tischzentrifuge bei 14.000 rpm und RT für 5 min pelletiert und der DNA-enhaltende Überstand auf eine GFX-Säule überführt. Nach einem Waschschrift mit 500 µl GFX-Waschpuffer wurde die reine Plasmid-DNA mit 100 µl TE pH 8,0 eluiert.

3.1.12.2 Plasmid-Isolierung präparativ

Zur Plasmid-Isolierung im präparativen Maßstab mit einer Ausbeute von ca. 100 µg DNA kam das *Qiagen Plasmid Kit* zur Anwendung. 25 - 50 ml einer Übernachtskultur wurden in diesem Versuch mit 3500 rpm für 10 min in der Labofuge abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 4 ml P1-Puffer resuspendiert, durch Zugabe von 4 ml P2-Puffer lysiert und zur Neutralisierung mit 4 ml P3-Puffer versetzt. Ausgefällene Proteine, Membranbestandteile und chromosomale DNA wurden bei 15.000 rpm und 4 °C für 30 min in der Kühlzentrifuge

(Beckmann-Rotor JA20) pelletiert und der Überstand auf eine zuvor mit QBT-Puffer equilibrierte *Qiagen-tip 100* Säule überführt. Nach zwei Waschschritten mit jeweils 10 ml QC-Puffer wurde die reine Plasmid-DNA mit 5ml QF-Puffer von der Säule eluiert. Der Ansatz wurde mit 3,5 ml Isopropanol versetzt und die gefällte DNA in der Kühlzentrifuge *Omnifuge 2 ORS* mit 6.000 rpm bei 4 °C für 30 min sedimentiert. Das Pellet wurde in 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, unter Vakuum eingetrocknet und in 100 µl TE pH 7,4 oder bidest. Wasser gelöst. Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt und die Qualität durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

3.1.13 DNA-Sequenzanalyse

Die Ermittlung der Nukleotidsequenz von DNA erfolgte durch kontrollierten Kettenabbruch bei der enzymatischen DNA-Replikation mittels eingebauten Didesoxyanaloga (Sanger *et al.*, 1977). Einzelsträngige DNA hybridisiert bei dieser Reaktion mit einem die Kettenverlängerung einleitenden Primer, an den durch die T7-DNA Polymerase die einzelnen Desoxyribonukleotidphosphate komplementär zum Matrizenstrang kovalent gebunden werden. Die DNA-Synthese wird durch den zufälligen Einbau des jeweiligen 2',3'-Didesoxyanalogons abgebrochen, woraus Populationen von DNA-Molekülen unterschiedlicher Länge resultieren. Die DNA-Fragmente der Ansätze werden der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt und können anschließend aufgrund der Fluoresceinmarkierung von einem Laser des DNA-Sequenziergerätes erfaßt werden. Dem detektierten Bandenmuster läßt sich nun die fortlaufende Nukleotidsequenz zuordnen.

3.1.13.1 Sequenzierung von DNA mit dem A.L.F.-Sequenziergerät

Klonierte DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des AutoReadTM Sequencing Kits unter Verwendung fluoresceinmarkierter dATPs nach Zimmermann *et al.* (1990) modifiziert analysiert. 10 µg DNA wurden durch Zugabe von 8 µl 2M NaOH in einem Gesamtvolumen von 40 µl für 10 min denaturiert, mit 7 µl 3 M Na-Acetat neutralisiert und die DNA in Ethanol gefällt. Das Präzipitat wurde in 10 µl bidest. Wasser gelöst, mit 40 pmol Primer und 2 µl Annealing-Puffer versetzt und für 5 min auf 65 °C erhitzt. Nach einer Inkubation für 10 min bei 37 °C wurde der Ansatz für 10 min bei RT abgekühlt. Dem Ansatz wurden 2 µl Labeling-Mix mit den fluoresceinzmarkierten dATPs und 2 µl T7-DNA Polymerase zugeführt. Nach Inkubation für 2 min bei 37 °C wurden 1 µl Extension-Puffer sowie 3 µl DMSO zugeführt, gemischt und jeweils 4,5 µl mit je 2,5 µl des Didesoxy-Mixes für A, C, G

oder T für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die enzymatische Kettenverlängerung wurde durch Zugabe von 5 µl Stop-Mix beendet und die Proben bis zur Analyse bei –20 °C verwahrt.

Die elektrophoretische Auftrennung und Analyse der DNA-Fragmente erfolgte im A.L.F.-Sequenziergerät. Hierfür wurden Gele der Dimension 350 x 300 x 1,5 mm bestehend aus 6 % (v/v) *Long Ranger*TM und 7 M Harnstoff in TBE (ALF) verwendet. Die Sequenzieransätze wurden 2 min bei 92 °C denaturiert und elektrophoretisch in einem vorbereiteten Gel für 8 h bei 40 °C mit 2000 V in TBE (ALF) aufgetrennt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte unter Anwendung der A.L.F.-Manager-Software, Version 2.5.

3.1.13.2 Sequenzierung von DNA mit dem ABI PrismTM 377-Sequenziergerät

Bei dieser Sequenziermethode erfolgt der Einbau der Didesoxyribonukleotide, die über einen Linker mit unterschiedlichen Fluoresceinfarbstoffen gekoppelt sind, durch die Polymerase-Kettenreaktion (*cycle sequencing*). Die verwendeten Big-Dye-Terminatoren enthalten einen Fluoresceinfarbstoff als Energiedonor gekoppelt an ein Rhodaminderivat als Energieakzeptor (Lee *et al.*, 1997). Der effektive Energietransfer dieser Komponenten und eine optimale Absorption der freigesetzten Energie durch den vom Sequenziergerät verwendeten Argon-Ionenlaser führen zu einem äußerst sensitiven Nachweis der markierten DNA-Moleküle. In den einzelnen PCR-Zyklen findet durch Zugabe der dNTPs und eines Primers zur Matrizen-DNA eine lineare Amplifikation dieser durch die thermostabile Amplitaq-DNA-Polymerase statt, wobei der Einbau der fluoresceinmarkierten 2',3'-Didesoxyanaloga nach statistischer Wahrscheinlichkeit erfolgt. Die aufgereinigten DNA-Fragmente werden elektrophoretisch aufgetrennt, vom Laser des Sequenziergerätes detektiert und mittels geeigneter Software die Nukleotidsequenz bestimmt. Durch die Verwendung der PCR-Technologie, der geringen Exonukleaseaktivität der eingesetzten Polymerase und der sensitiven Detektion fluoresceinmarkierter DNA-Moleküle verringert sich die benötigte DNA-Menge. Die Länge der vom System analysierbaren Sequenzabschnitte ist beim *cycle sequencing* deutlich größer als bei der zuvor beschriebenen Sequenziermethode.

Zur Sequenzreaktion wurden 200 ng DNA, 3,2 pmol Primer und 4 µl des *ABI Prism*TM *BigDye*TM *Terminator RR Mix* in einem Gesamtvolumen von 10 µl gemischt. Die Reaktion wurde im Gene Amp PCR System 9600 mit 25 Zyklen und folgendem Temperatur- und Zeitverlauf durchgeführt: Denaturierung für 10 s bei 96 °C, Hybridisierung der Primer für 5 s bei 50 °C und Elongation für 4 min bei 60 °C. Die Proben wurden über CentriflexTM Gelfiltrations Säulen gereinigt. Die anschließende Analyse fand mit dem *ABI Prism*TM 377

DNA-Sequenziergerät statt. Die lyophilisierten DNA-Fragmente wurden mit 4 µl Blue Dextran Probenpuffer versetzt, 2 min bei 95 °C denaturiert und 10 h bei konstanter Spannung von 2400 V bei 51 °C in 1 x TBE elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei kam ein Gel, bestehend aus 5 % (v/v) *LongRanger*TM, 6 M Harnstoff, 1 x TBE und der Dimension 250 x 580 x 0,2 mm zur Anwendung.

3.1.14 *In vitro*-Transkription

Spezifische mRNA wurde durch die *in vitro*-Transkription von cDNA-Fragmenten synthetisiert, die in den Vektor pSGEM stromabwärts des T7-Promotors kloniert waren. Nach Linearisierung der Plasmide am 3'-Ende mittels *NheI* wurden die Ansätze mit einem Volumen Phenol/Chloroform (pH 8,0) versetzt und 5 Minuten bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die wässrigen Phasen wurden nochmals mit Chloroform extrahiert und anschließend ethanolpräzipitiert. Die Transkription der cDNA-Fragmente erfolgte unter Anwendung eines *mCAP*TM *mRNA Capping Kits* nach Angaben des Herstellers modifiziert statt. Ein 70 µl Transkriptionsansatz enthielt 5 µg DNA, 0,8 µl 750 mM DTT, 6 µl je 10 mM rNTP, 6 µl 10 mM CAPTM-Analog, 40 U RNasin und 60 U T7-RNA Polymerase. Die Reaktion fand für 2 h bei 37 °C statt. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mittels *RNase*-freier *DNaseA* hydrolytisch gespalten und die resultierende mRNA mit einem Volumen Phenol pH 4,3 extrahiert. Nach Zentrifugation bei 10.000 x g und 4 °C wurden die wässrigen Phasen erneut mit Chloroform extrahiert. Die mRNA wurden mit 1/10 Volumen 10 M Ammoniumacetat und 3 Volumen Ethanol versetzt und 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 10.000 x g und 4 °C wurden die Ansätze mit 80 % (v/v) Ethanol gewaschen und abschließend in der Vakuumzentrifuge kurz eingetrocknet. Die Konzentration der gereinigten mRNA wurde nach Lösung in DEPC-H₂O photometrisch gemessen. Die Proben wurden aliquotiert und bei -70 °C aufbewahrt.

3.1.15 Denaturierende Gelelektrophorese von RNA

mRNA-Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen analysiert. Sämtliche Gelapparaturen wurden vor Gebrauch eine Stunde in 3 % (v/v) H₂O₂ inkubiert und nachfolgend mehrmals mit DEPC-Wasser gespült. Die Gele enthielten 1,5 % (w/v) Agarose und 1/12 Volumen Formaldehyd (37 %ig) in 1 x MOPS-Puffer (Dimension: 100 x 65 x ca. 7 mm). Ein Probenvolumen wurde mit drei Volumen Loading-Puffer versetzt und 5 Minuten bei 60 °C inkubiert. Dem Ansatz wurde auf Eis ein

Volumenteil Probenpuffer zugeführt. Die Elektrophorese fand bei konstanter Spannung von 80 V in 1 x MOPS-Puffer statt. Das Gel wurden anschließend in einer Lösung aus 0,5 µg Ethidiumbromid/ml DEPC-Wasser 15 Minuten inkubiert, in DEPC-Wasser 60 Minuten entfärbt und unter UV-Licht (254 nm) zur Dokumentation mit einer Polaroid-Kamera fotografiert.

3.1.16 *In vitro*-Translation

Die Funktionalität der synthetisierten mRNA wurde in einem zellfreien Kaninchen Retikulozyten-Lysat überprüft. Zum Einsatz kam ein Biotin *in vitro*-Translation Kit, das durch die Verwendung biotinylierter Lysinmoleküle ein Umschreiben von mRNA in biotinmarkierte Proteine ermöglicht. Die Translationsprodukte können anschließend mittels SDS-PAGE und Westernblot neben immunologischen Nachweismethoden auch durch eine enzymatische Farbreaktion visualisiert werden.

Die Bestandteile des Kits wurden auf Eis aufgetaut. 1 µg mRNA wurde zur Aufhebung lokaler Sekundärstrukturen für 10 min auf 65 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt. 35 µl des Lysates, 40 U RNasin und 1 µg mRNA wurden mit DEPC-Wasser auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und 1 h bei 30 °C inkubiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt.

3.2 Methoden für das Two-Hybrid System

Das in dieser Arbeit eingesetzte CytoTrapTM Two-Hybrid System beruht auf der Interaktion eines spezifischen hSos-Fusionsproteins mit einem von einer cDNA-Bank kodierten Protein an der Plasmamembran des temperatursensitiven Hefestammes *S. cerevisiae* cdc25H. Durch eine Punktmutation im cdc25 Gen der Hefezelle vermag diese nicht mehr bei 37 °C zu wachsen (Petitjean *et al.*, 1990), da der Ras-Signalweg nicht aktiviert werden kann. Ein Köderprotein, hier z.B. das hVDAC1, wird als Fusionsprotein mit dem humanem Sos-Gen, welches dem cdc25 Gen der Hefe homolog ist, in die Hefezellen transformiert. Das funktionstüchtige hSos hebt die native Temperatursensitivität der mutierten Wirtszelle auf, wenn eine Interaktion des Köderproteins mit einem von der transformierten cDNA-Bank kodierten und durch ein Myristylierungssignal an der Plasmamembran verankerten Protein stattfindet. Durch die räumliche Nähe des hSos zum RAS-Protein der Wirtszelle wird dabei der Ras-Signalweg aktiviert, der das Wirtswachstum bei 37 °C ermöglicht. Durch das selektive Wachstum bei 37 °C und die Verwendung von Selektionsmedien, die durch die

transformierten Plasmide komplementiert werden, führt die Interaktion des hSos-Köderproteins mit cDNA-Zielproteinen zum spezifischen Wachstum dieser Hefekolonien (Aronheim *et al.*, 1997). Aus dem Hefeklon kann anschließend das entsprechende pMyr-Plasmid isoliert und die einklonierte cDNA analysiert und identifiziert werden.

3.2.1 mRNA Isolierung aus H2LCL-Zellen

Die Aufreinigung von mRNA aus der H2LCL-Zelllinie erfolgte mit Hilfe des *Messenger RNA Isolation Kits* und den mitgelieferten Puffern. H2LCL-Zellen wurden für diese Anwendung permeabilisiert und polyadenylierte Poly(A)-RNA mittels Affinitätschromatographie an Oligo(dT)Säulen aus dem Zellysat isoliert. Die Arbeiten fanden unter RNase-freien Bedingungen statt.

Je Ansatz wurden 5×10^7 H2LCL-Zellen in 5 ml Denaturierungslösung homogenisiert und mit 10 ml Elutionspuffer versetzt. Proteine und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei $12.000 \times g$ und RT für 10 min pelletiert und der mRNA-enhaltende Überstand mit 5 ml Oligo(dT)Cellulose-Lösung (0,4 g/ml) für 15 min bei RT gemischt. Die mit der Oligo(dT)Cellulose hybridisierte, polyadenylierte RNA sedimentierte in einem Zentrifugationsschritt bei $700 \times g$ und RT für 5 min. Der Ansatz wurde dreimal mit je 5 ml Hochsalz-Puffer und einmal mit 5 ml Niedrigsalz-Puffer gewaschen. Das erhaltene Sediment wurde in 5 ml Niedrigsalz-Puffer gelöst und in eine Säule gefüllt. Nach dem Auslaufen des Puffers wurde die mRNA durch Zugabe von $3 \times 400 \mu\text{l}$ Elutionspuffer (auf 68°C vorgewärmt) von der Säulenmatrix eluiert. Zur Anreicherung polyadenylierter mRNA wurde die Oligo(dT)Cellulose erneut mit $2 \times 1 \text{ ml}$ Hochsalz-Puffer reequilibriert. Die vereinigten RNA-Lösungen wurden mit 1/10 Volumen 5 M NaCl versetzt, auf 68°C erwärmt und auf die Säule gegeben. Verbliebene Verunreinigungen wurden durch dreimalige Zugabe von je 3 ml Niedrigsalz-Puffer ausgewaschen und gereinigte mRNA wie oben von der Oligo(dT)Cellulose eluiert. Die mRNA wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaAc, 0,005 % (w/v) Glycogen und 2,5 Volumen 100 % Ethanol präzipitiert, unter Vakuum eingetrocknet und in Elutionspuffer resuspendiert. Nach Bestimmung der mRNA-Konzentration wurde diese umgehend zur cDNA-Synthese eingesetzt.

3.2.2 cDNA-Synthese

Zur Umschreibung der mRNA in cDNA kam das *CytoTrapTM XR Library Construction Kit* zur Anwendung. Einem $50 \mu\text{l}$ -Ansatz wurden $5 \mu\text{l}$ 10 x First-strand Puffer zugeführt. $5 \mu\text{g}$

mRNA dienten als Matrize zur Synthese des ersten cDNA Stranges ((-)-Strang) durch 75 U der aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus stammenden Reversen Transkriptase (MMLV-RT). 2,8 µg Oligo(dT)-Primer, die mit einer durch GAGA-Sequenz geschützten *XhoI*-Schnittstelle versehen waren, initiierten diese Reaktion. Der für 1 h bei 37 °C stattfindende 5-Methyl-dCTP- Einbau aus den 3 µl Nukleotid-Mix in den cDNA-Strang schützte diesen im weiteren Versuchsverlauf vor ungewollten Restriktionsspaltungen durch Endonukleasen.

Der Ansatz wurde zur Synthese des zweiten cDNA-Stranges ((+)-Strang) mit 20 µl Second-strand Puffer, 6 µl dNTP-Mix und 116 µl bidest. Wasser versetzt. Die durch 3 U RNase H partiell hydrolysierten mRNA-Fragmente dienten der dem Ansatz zugeführten 99 U DNA-Polymerase I als Primer. Die Reaktion fand für 2,5 h bei 16 °C statt. Überhängende Enden der Primer wurden anschließend mit 23 µl dNTP-Mix durch 2 µl *Pfu*-DNA-Polymerase bei 72 °C für 30 min aufgefüllt. Nach Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation wurde der Ansatz in 9 µl *EcoRI*-Adapterlösung resuspendiert. Die Adaptormoleküle mit einer *EcoRI*-Schnittstelle wurden Zugabe von 1 µl 10 x Ligase Puffer, 1 µl 10 mM ATP und 4 U T4 DNA-Ligase bei 8 °C über Nacht an die stumpfen Enden der cDNA ligiert. Nach Hitzeinaktivierung der Ligase wurden die *EcoRI*-Enden durch Zugabe von 1 µl 10x Ligase-Puffer, 2 µl 10 mM ATP, 6 µl bidest. Wasser und 10 U T4-Polynukleotid Kinase phosphoryliert. Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und die T4 DNA-Ligase anschließend für 30 min bei 72 °C inaktiviert.

Die hemimethylierten cDNA-Fragmente wurden einer *XhoI*-Restriktionsspaltung unterzogen und mit Phenol-Chloroform extrahiert. Nach einer Ethanol-fällung wurde die pelletierte cDNA in DEPC-Wasser gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.3 Synthese einer pMyr-cDNA Bank

Die doppelsträngige, hemimethylierte cDNA wurde nun in den Vektor pMyrXR ligiert. Dabei wurde ein molares Verhältnis von Vektor-DNA zu cDNA von 1 zu 2 berücksichtigt. Als Pilot-Versuch wurde 1 µl des Ligationsansatzes in 100 µl kompetente Zellen chemisch transformiert. Da hemimethylierte cDNA in einem $McrA^+ McrB^+$ *E. coli* Stamm vom *mcrA* und *mcrB* Restriktionssystem gespalten wird, wurde der $McrA^- McrB^-$ *E. coli* Stamm *XL10-Gold*[®] *Kan* zur Transformation eingesetzt. Nach dem Hitzeschock und der Inkubation für 1 h bei 37 °C und 220 rpm in 900 µl NZY⁺-Medium wurden 1 µl und 10 µl der Ansätze auf LB-Chloramphenicol Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Kolonien pro

Platte wurden ausgezählt und aus den durch die nachfolgenden Formeln erhaltenen Werten das arithmetische Mittel errechnet:

Zahl der Kolonien pro Platte / Volumen der ausplattierten Zellen x 1000 μ l = absolute cfu
(cfu = Kolonien formende Einheiten).

Über die errechneten cfu der Pilot-Transformation und der eingesetzten Menge des Ligationsansatzes wurde nun die Anzahl der benötigten Transformationsansätze errechnet, die zu mindestens 1×10^6 Primärkolonien führte. Ab einer Primärkolonienzahl dieser Größenordnung wird davon ausgegangen, daß die gesamte mRNA-Population einer Zelle mindestens einmal durch die cDNA-Bank repräsentiert wird.

Die einzelnen Transformationsansätze wurden in NZY⁺-Medium für eine Stunde bei 37 °C und 220 rpm inkubiert und anschließend vereinigt. Dieser Ansatz bildete die primäre cDNA-Bank, die bis zur Amplifikation bei 4 °C gelagert wurde. Zur Qualitätsüberprüfung wurden 1 μ l und 10 μ l der cDNA-Bank auf Selektionsagar-Platten ausgestrichen und die absolute Zahl der primären Transformanden errechnet. Zudem wurde ein Aliquot der Bank aufgeköcht, abzentrifugiert und die im Überstand enthaltene cDNA mit den Primern Myr-F und Myr-R mittels PCR amplifiziert. Durch elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel konnte nun die Insertgröße der cDNA-Bank analysiert werden.

Zur Amplifikation der Plasmidbank wurde der Pool der Transformationsansätze auf sechzig 150 mm Selektionsagar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Kolonien wurden in 1 l LB-Chloranphenicol-Medium abgeschwemmt und 4 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und die Plasmide isoliert. Diese Plasmidpräparation stellte die einmal amplifizierte cDNA-Bank dar, die im CytoTrapTM Two-Hybrid System nach hVDAC1-Interaktionspartnern durchmustert wurde.

3.2.4 Kultivierung der Hefezellen

Zur Überprüfung des Phänotypes der *S. cerevisiae* cdc25H-Zellen wurden diese mit einer sterilen Impföse auf YPAD- und auf SD/Glu(UL⁻)-Platten ausgestrichen. Parallel ausplattierte Ansätze wurden 4 Tage bei 25 °C und 37 °C inkubiert. Erfolgte das Zellwachstum nur auf den bei 25 °C inkubierten YPAD-Platten, keinesfalls hingegen auf den Selektionsplatten, so war der Phänotyp bestätigt. Die cdc25H-Hefezellen wurden erneut auf YPAD-Platten ausgestrichen, für 4 Tage bei 25°C inkubiert, mit Parafilm versiegelt und bei 4 °C gelagert. Wöchentlich wurden die Kolonien frisch ausgestrichen. Einzelne Kolonien dieser

Platten wurden für die jeweiligen Versuche entnommen und zur Herstellung kompetenter Hefezellen eingesetzt.

Eine mit einer einzelnen *cdc25H*-Kolonie angeimpfte YPAD-Kultur wurde bis zu einer OD_{600} von 0,8-1,0 bei 25 °C angezüchtet, mit 15 % (v/v) sterilem Glycerin versetzt, aliquotiert und als Dauerkultur bei -80 °C verwahrt.

3.2.5 Präparation kompetenter Hefezellen

Zur Herstellung kompetenter *S. cerevisiae cdc25H*-Zellen kam die Lithiumacetat-Methode zur Anwendung. Hierfür wurden 150 ml YPAD-Medium mit einer *cdc25H* Hefekolonie inokuliert und bei 25 °C und 250 rpm bis zu einer OD_{600} von 1,5 angezüchtet. Hatte die Kultur eine OD_{600} von 0,7 erreicht, wurden 75 µl zur Überprüfung des Phänotyps auf einer YPAD-Platte ausgestrichen und parallel zum fortlaufenden Versuch für ≥ 4 Tage bei 37 °C inkubiert. Sollten in dieser Zeit mehr als 30 Kolonien auf der Platte gewachsen sein, wurde der Ansatz verworfen und mit einer erneut isolierten *cdc25H*-Kolonie wiederholt. Im fortlaufenden Versuch wurde 1 L YPAD-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,2 - 0,3 mit der Vorkultur versetzt und für 3 h bei 25 °C und 250 rpm inkubiert. Die Kultur wurde für 5 min mit 1000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 ml sterilem bidest. Wasser gelöst. Die Zellen wurden erneut wie oben abzentrifugiert und mit 100 ml LiSORB-Puffer gewaschen, bevor sie in 8 ml LiSORB-Puffer vorsichtig resuspendiert wurden.

3.2.6 Transformation kompetenter Zellen

Die Kotransformation von je 1 µg der pSos- und pMyr-Plasmidkonstrukte in kompetente *S. cerevisiae cdc25H*-Zellen fand nach Angaben des CytoTrapTM System Herstellers modifiziert statt. Hierbei wurden die beiden Plasmide mit 7 µg denaturierter, nach Sambrook *et al.* (1989) präparierter Heringssperma-DNA vermischt und zu 100 µl kompetenten Zellen gegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig mit 600 µl PEG/LiAc-Puffer gemischt und 30 min bei 25 °C langsam geschüttelt. Nach Zugabe von DMSO mit einer Endkonzentration von 10 % (v/v) wurden die Zellen für 20 min einem Hitzeschock bei 42 °C unterzogen, 5 min auf Eis abgekühlt und 5 min bei 1000 x g zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 200 µl TE pH 7,5 resuspendiert und auf SD/Glu(UL⁻)-Platten ausgestrichen.

Zum Durchmustern der cDNA-Bank im Two-Hybrid System wurden 500 µg der pMyr-cDNA-Plasmide mit 1 mg pSos-hVDAC1 zu 8 ml kompetenten Zellen gegeben und mit

20 mg Heringssperma DNA gemischt. 60 ml PEG/LiOAc-Puffer kamen zum Einsatz und im letzten Schritt der Transformation wurden die pelletierten Zellen in 10 ml TE pH 7,5 gelöst.

3.2.7 Durchmusterung der H2LCL cDNA-Bank im Cyto-Trap™ Two-Hybrid System

Zum Interaktionstest von hVDAC1 mit Proteinen einer Expressions-Bank wurden die pMyr- und die pSos-Plasmide in kompetente *cdc25H* Hefezellen kotransformiert. In Tabelle 1 ist die Kombination der einzelnen Plasmid-Kombinationen und Kontrollen dargestellt.

Tabelle 1: Plasmidkombinationen zur simultanen Transformation von *S.cerevisiae cdc25H*

pSos Insert:	pMyr Insert:	Ansatz:
hVDAC1	H2LCL-cDNA	Screening der Bank
hVDAC1	-	negativ-Kontrolle
hVDAC1	Lamin C	negativ-Kontrolle
-	-	negativ-Kontrolle
-	cDNA	negativ-Kontrolle
MafB	MafB	positiv-Kontrolle

Die transformierten Zellen wurden auf SD/Glu(UL⁻)-Platten ausgestrichen und für 2 Tage bei 25°C inkubiert. Mittels eines Samtstempels wurden Replika der Platten angefertigt und diese auf SD/Gal(UL⁻)-Platten übertragen. Die Platten wurden 10 Tage bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit gewachsene Kolonien wurden in TE pH 7,5 isoliert, parallel auf SD/Glu(UL⁻)- und SD/Gal(UL⁻)-Platten übertragen und bei 25 °C und 37 °C vier Tage lang inkubiert. Kolonien, die auf SD/Gal(UL⁻)-Platten bei 37 °C, nicht aber auf SD/Glu(UL⁻)-Platten bei 37 °C wuchsen, stellten im ersten Zyklus des Two-Hybrid Systems positiv interagierende Klone dar. Eine Übersicht der Wachstumsbedingungen von Hefeklonen mit interagierenden Proteinen ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Nachweis der spezifischen Interaktion der durch pMyr und pSos kodierten Proteine mit dem CytoTrap™ Two-Hybrid System

Wachstum auf:	Glu(UL ⁻)	Glu(UL ⁻)	Gal(UL ⁻)	Gal(UL ⁻)
	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
Keine Interaktion	+	-	+	-
Revertant	+	+	+	+
Interaktion	+	-	+	+

Interaktionen zwischen hSos-Fusionsproteinen und myristylierten Proteinen sind durch Wachstum der Temperatursensitiven Wirtszellen auf SD/Gal(UL⁻)-Selektionsplatten bei 37 °C spezifisch, wenn unter Berücksichtigung der Kontrolltransformation keine Zellteilung auf SD/Glu(UL⁻)-Selektionsplatten bei 37 °C stattfindet.

Sie wurden in YPAD-Medium angezüchtet und die Plasmid-DNA isoliert. Diese wurde in *E. coli* transformiert, in Selektionsmedium für das pMyr-Plasmid angereichert und isoliert. Die aufgereinigten pMyr-Plasmide wurden in einem zweiten Zyklus des CytoTrap™ Systems mit pSos-hVDAC1 in kompetente *cdc25H* Zellen kotransformiert und auf SD/Glu(UL⁻)-Platten ausgestrichen. Nach Inkubation für 4 Tage bei 25 °C wurden die Kolonien auf SD/Glu(UL⁻)- und SD/Gal(UL⁻)-Platten übertragen und bei 37 °C inkubiert. Kolonien, die auch in diesem Zyklus auf SD/Gal(UL⁻)-Platten bei 37 °C, nicht aber auf SD/Glu(UL⁻)-Platten bei 37 °C wuchsen, stellten im CytoTrap™ Two-Hybrid System positiv interagierende Klone dar. Die nach dem ersten Zyklus des CytoTrap™ Systems aus *E. coli* bereits isolierten pMyr-Plasmide wurden durch die DNA-Sequenzierung analysiert. Mit den ermittelten DNA-Sequenzen wurden Sequenz-Datenbanken durchmustert und homologe humane Gene bzw. Proteine identifiziert.

Anhand der ermittelten Primärstrukturen konnte durch die Synthese der entsprechenden Primer der vollständige Leserahmen amplifiziert und kloniert werden. Die Spezifität der in diesem System identifizierten Interaktionen wurde anschließend proteinchemisch überprüft.

3.2.8 Präparation von Plasmid-DNA aus Hefezellen

5 ml SD/Glu(UL⁻)-Selektionsmedium wurden mit den die jeweiligen Plasmide-tragenden Hefekolonien inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 bei 25 °C und 250 rpm angezüchtet. Die Zellen wurden bei 4000 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und in 0,3 ml Lysis-Puffer resuspendiert. Die Ansätze wurden mit 50 µl säuregewaschenen Glasperlen (0,5 mm) und

300 µl Phenol : Chloroform (1:1) versetzt und 1 min intensiv gemischt. Nach Zentrifugation bei 14.000 x g bei RT für 5 min wurde die im Überstand enthaltene DNA mit Ethanol präzipitiert, zweimal in 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und nach Eintrocknung unter Vakuum in 20 µl bidest. Wasser gelöst. Die Plasmide wurden zur Amplifikation und nachfolgender Analyse in kompetente *E. coli* Zellen transformiert.

3.3 Allgemeine proteinchemische Methoden

3.3.1 Azeton-Fällung

Zur Isolierung von Proteinen aus Proben mit geringem Salzgehalt wurden diese mit dem sechsfachen Volumen an kaltem Azeton versetzt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Die Proteine wurden für 20 min bei 10.000 x g und 4 °C sedimentiert und unter N₂ eingetrocknet.

3.3.2 Trichloressigsäure-Fällung

Proteinproben mit hohem Salzgehalt wurden mit einem Volumen 20 %iger TCA (w/v) versetzt und eine Stunde bei 4 °C gekühlt. Die Proteine wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 6.000 x g und 4 °C sedimentiert und das Pellet mit Diethylether gründlich gemischt. Die Suspension wurde wie oben zentrifugiert und der Überstand bis kurz oberhalb der Phasengrenze entnommen und verworfen. Der Ansatz wurde zweimal mit Methanol gewaschen und unter N₂ eingetrocknet.

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Gefällte Proteine oder Zellaufschlüsse wurden aufgrund ihres Molekulargewichtes unter denaturierenden Bedingungen durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Die Gele setzten sich aus einem 4,5 x 8,5 x 1 mm großen Trenngel mit 10 % oder 12 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid in Trenngelpuffer und einem Sammelgel aus 5 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid in Sammelgelpuffer zusammen. Die zu analysierenden Proben wurden 5 min in 1 x Protein-Probenpuffer zur Denaturierung aufgeköcht, in die Taschen des Sammelgels aufgetragen und bei konstanter Stromstärke von 20 mA in Laemmli-Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Kurz nach dem Auslaufen der Lauffront wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen oder mit Coomassie Färbelösung für 30 min gefärbt und anschließend zum

Visualisieren der Proteinbanden mit Entfärber entfärbt. Gefärbte Gele wurden zur Dokumentation mit bidest. Wasser gespült, 30 min in Trocknungslösung equilibriert und zwischen zwei angefeuchteten Cellophanfolien eingespannt in einem Rahmen getrocknet.

3.3.4 Proteintransfer auf PVDF-Membranen

Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen wurden durch das semi-dry Verfahren unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems (Hirano, 1989) auf PVDF-Membranen transferiert. Hierfür wurde das Trenngel 20 min in Transferpuffer C equilibriert. Zwei PVDF-Membranen in der Größe des Trenngels wurden in Methanol befeuchtet, mit bidest. Wasser gespült und für 10 min in Transferpuffer B verwahrt. Auf die angefeuchteten Graphit-Platten der Blotkammer wurden von der Anode zur Kathode Filter, Membranen und das Gel in folgender Reihenfolge übereinander gelegt: ein in Transferpuffer A equilibrierter Whatman-Filter, ein in Transferpuffer B equilibrierter Whatman-Filter, die beiden wie oben präparierten PVDF-Membranen, das Polyacrylamidgel und zwei in Transferpuffer C equilibrierte Whatman-Filter. Der Proteintransfer erfolgte für 20 min bei $2,5 \text{ mA/cm}^2$. Die PVDF-Membranen wurden anschließend 2 min in Ponceau S-Lösung und in bidest. Wasser zur Überprüfung der Transfereffizienz inkubiert (Salinovic und Montelaro, 1986). Sichtbare Proteinbanden wurden durch Nadelstiche markiert und die Membranen direkt zur immunologischen oder enzymatischen Analyse der Proteine überführt.

3.3.5 Immunologische Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen

Die mit Proteinen beladenen PVDF-Membranen wurde zunächst 1 h in Absättigungslösung und 2 h bei RT in der Erstantikörperlösung inkubiert. Anschließend wurden die Membranen eine Stunde in Zweitantikörperlösung geschwenkt. Auf die Inkubationen in Absättigungs-, Erstantikörper- und Zweitantikörperlösung folgten jeweils 4 Waschschrte à 5 min in TBS-Puffer. Die spezifischen Primärantikörper wurden nach Angaben der Hersteller verdünnt. Die eingesetzten Zweitantikörper waren Peroxidase-konjugierte anti-Mausimmunglobulin Antikörper vom Kaninchen oder Peroxidase-konjugierte anti-Kaninchenimmunglobuline vom Schwein und wurden 1:500 in TBS-Puffer verdünnt. Die Visualisierung der markierten Proteinbanden erfolgte durch Zugabe der Entwicklungslösung. Diese setzte sich aus 8 ml TBS-Puffer, 2 ml 0,3 % (w/v) 4-Chlor-1-naphthol in Methanol und 10 μl H_2O_2 zusammen. Nach 10 min wurde die Farbreaktion durch Spülen mit bidest. Wasser gestoppt, die Membran lichtgeschützt getrocknet und zur Dokumentation fotografiert.

3.3.6 Enzymatische Detektion biotinylierter Proteine auf PVDF-Membranen

Die mittels *in vitro*-Translation synthetisierten biotinylierten Proteine wurden nach der SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde in Puffer-2 für 1 h bei RT abgesättigt, 3 x 5 min in Puffer-1 gewaschen und für 30 min mit 1:5000 in TBS verdünnter Streptavidin-konjugierter alkalischer Phosphatase inkubiert. Streptavidin wurde aufgrund seiner hohen Affinität zu Biotin an die markierten Proteine gebunden. Unspezifisch assoziiertes Konjugat wurde in drei Waschschritten à 5 min mit Puffer-1 entfernt und die Membran 2 min bei RT in Puffer-3 equilibriert. Die Visualisierung der spezifischen Proteinbanden fand durch Zugabe von frisch angesetzter Substratlösung statt. Die enzymatische Farbreaktion wurde durch einen Waschschrift in Puffer-4 gestoppt, die Membran lichtgeschützt getrocknet und zur Dokumentation fotografiert.

3.3.7 Methoden zur Expression und Isolierung rekombinanter Proteine

3.3.7.1 Präparation von *E. coli* BL21 (DE3) pLys [pGEX-Tctex1 oder pGEX- Δ PBP74]-Gesamtzellextrakten

Aus *E. coli* BL21 (DE3) pLys-Zellen wurden elektrokompetente Zellen hergestellt. Die cDNA, die für den vollständigen Leserahmen oder deletierte Abschnitte von Tctex1 bzw. Δ PBP74 kodieren, wurden aus der H2LCL-cDNA mittels PCR mit spezifischen Primern amplifiziert und in den Vektor pGEX-KG inkloniert. Diese Plasmide wurden durch die Elektroporation in kompetente *E. coli* BL21 (DE3) pLys transformiert. Die Plasmide einzelner Kolonien wurden isoliert und durch die PCR mit spezifischen Primern auf erfolgreiche Transformation analysiert.

Kolonien mit pGEX-Tctex1 bzw. pGEX-PBP74 wurden in 40 ml 2YT-Medium über Nacht bei 37 °C und 220 rpm angezüchtet. 360 ml 2YT-Medium wurden mit der Vorkultur angeimpft und 1 h bei 37 °C mit 250 rpm inkubiert. Die Zugabe von 2 mM IPTG induzierte anschließend eine vierstündige Expressionsphase der entsprechenden Proteine bei 30 °C und 250 rpm. Zur Zellernte wurde der Ansatz auf Eis gekühlt und mit 2.500 x g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 20 ml PBS gelöst. Zur Zellyse wurde der auf Eis gekühlte Ansatz im Ultraschallgerät mit 4 x 15 Impulsen à 0,5 s und 250 Watt beschallt. Die aufgeschlossenen Zellen wurden nach Zugabe von Triton X-100 in einer Endkonzentration von 1 % (v/v) für 15 min auf Eis gerührt und mit 20.000 x g bei 4 °C für 30 min zentrifugiert.

Das im Überstand gelöste, überexprimierte GST-Fusionsprotein konnte anschließend aufgrund seiner Affinität zu Glutathion chromatographisch aufgereinigt werden.

3.3.7.2 Isolierung von rekombinantem Tctex1 und Δ PBP74

Eine Kunststoffsäule wurde mit 1 ml einer 50 %igen (w/v) Glutathione-Sepharose[®] 4B-Suspension gefüllt. Die Matrix wurde mit PBS (GST) equilibriert und der geklärte Überstand des präparativen Expressionsansatzes auf die Säule gegeben. Der aufgefangene Durchbruch wurde zur Bindung weiterer GST-Fusionsproteine erneut auf die Säule gegeben. Verunreinigungen und unspezifisch gebundene Proteine wurden durch drei Waschschriffe mit 5 ml PBS (GST) aus der Matrix entfernt. Die Elution der über die Glutathion S-Transferase an Glutathion-Sepharose gebundenen Fusionsproteine erfolgte in Vorversuchen durch Zugabe von 10 mM reduziertem Glutathion. Das rekombinante Protein ohne die Glutathion S-Transferase wurde durch die Protease Thrombin abgespalten. Dieses Enzym erkennt eine spezifische, zwischen der Glutathion S-Transferase und dem Fusionsprotein eingebaute Schnittstelle. Die Glutathion S-Transferase verblieb in diesem Ansatz an der Säulenmatrix, während das C-terminal angehängte Protein durch Zugabe von 25 U Thrombin in 1 ml PBS eluiert und bei -20 °C verwahrt wurde. Aliquots der aufgereinigten Proteine wurden zur weiteren Analyse mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch spezifische Antikörper nachgewiesen.

3.3.7.3 Überlagerungsassay

Die Verifizierung der durch das Two-Hybrid System ermittelten Interaktionspartner des hVDAC1 wurde nach Wolf und Sahyoun (1996) und Mochly-Rosen *et al.* (1991) modifiziert durchgeführt. hVDAC1 wurde neben einem der rekombinanten Proteine nach SDS-PAGE auf einer PVDF-Membran immobilisiert und deren Positionen durch Ponceau S-Färbung markiert. Die Membran wurde in Blockierungspuffer für 2 h bei RT schwenkend inkubiert. Nach fünf Waschschriffen à 5 min in TBS, 0,5 % (v/v) Tween 20 folgte die Inkubation mit einem der aufgereinigten, rekombinanten Proteine (0,02 mg/ml in TBS) über Nacht bei 4 °C. Ein paralleler Ansatz wurde als Negativkontrolle in diesem Schritt mit dem identischen Puffer aber ohne das rekombinante Protein inkubiert. Nach vier Waschschriffen in TBS à 5 min wurden interagierende Proteinbanden durch anti-Tctex1 bzw. anti-mtHSP70 Erstantikörper und HRP-konjugierten Zweitantikörper immunologisch durch die Farbentwicklung mit Chlornaphthol/H₂O₂ visualisiert.

3.3.8 Versuche mit künstlichen Lipid-Doppelmembranen

Zur Charakterisierung der elektrophysiologischen Eigenschaften des hVDAC1 unter Einfluß der im CytoTrapTM Two-Hybrid System ermittelten Interaktionspartner, wurden Versuche mit künstlichen Lipidmembranen (Benz *et al.*, 1978 und 1979) durchgeführt. Mit dieser Methode wurden die Einzelleitfähigkeit und die Spannungsabhängigkeit des Kanalproteins unter Anwesenheit eines der rekombinanten Proteine untersucht. Der hierfür verwendete Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 8 dargestellt.

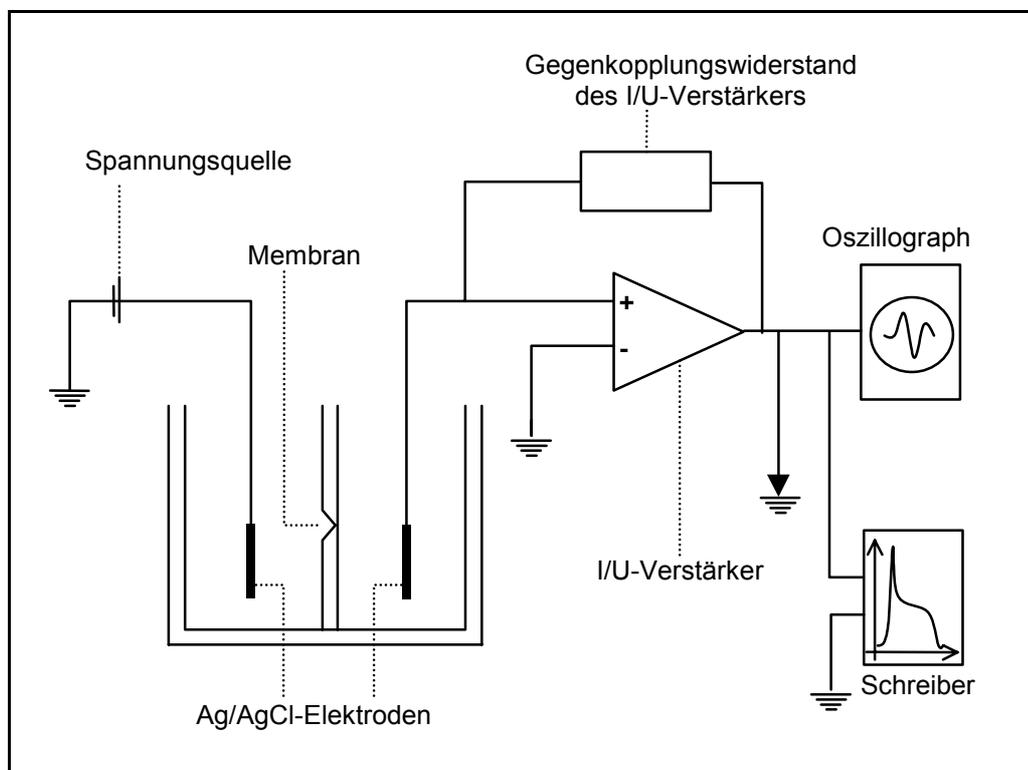


Abbildung 8: Aufbau der Meßapparatur für Versuche mit künstlichen Lipid-Doppelmembranen
Die Funktionsweise ist nachfolgend im Text beschrieben.

Um das in der Trennwand zwischen den beiden Kammern der Teflonküvette liegende Loch mit einem Durchmesser von 1 mm wurden zu Versuchsbeginn 5 µl Benetzlösung aufgetragen. Die Küvette wurde nach Verdunstung des Lösungsmittels in die abgeschirmte Meßeinheit gestellt und mit 8 ml Ringerlösung je Kammer befüllt. In die Lösung wurden die Ag/AgCl-Elektroden getaucht, die mit einer Gleichspannungsquelle und dem I/U-Verstärker verbunden wurden. Bei einer über die Elektroden angelegten Spannung von 10 mV wurde die künstliche Lipid-Doppelmembran gezogen, indem 4 µl Membranlösung auf einem Spatel über das zuvor

benetzte Loch der Trennwand geführt wurden. Die Ausbildung der Doppelmembran konnte optisch durch Schwarzfärbung der Membran im Auflicht und durch Unterbrechung des Stromflusses am Speicheroszilloskop überprüft werden. 50 ng hVDAC1 wurden bei stabiler Membran in jede Kammer pipettiert. Die Insertion der einzelnen hVDAC1-Moleküle waren nach Verstärkung durch den I/U-Verstärker am Oszilloskop sichtbar und wurden von einem Flachbettschreiber aufgezeichnet. Die Leitfähigkeit (G) eines einzelnen in die Membran inserierten hVDAC1-Moleküls konnte über folgende Formel berechnet werden:

$$G = (U_S / U_Z \times R_G) \times (A / A_V)$$

G = Leitfähigkeit in Siemens (S), U_S = Schreiberspannung (0,5 V), U_Z = angelegte Spannung (0,01 V), R_G = Verstärkungsgrad (10^9 V/A), A = Größe des Schreiberausschlages pro Insertion (cm), A_V = Schreibervollausschlag (25 cm)

Spannungsabhängigkeitsmessungen wurden nach Insertion von mindestens 100 hVDAC1-Molekülen und konstantem Stromfluß durch sukzessives Erhöhen der Spannung in 10 mV-Schritten von -80 bis +80 mV durchgeführt. Nach Erstellung einer Eichkurve für hVDAC1 wurde der Einfluß der im Two-Hybrid System ermittelten Interaktionspartner des hVDAC1 auf die Einzelleitfähigkeit und die Spannungsabhängigkeit untersucht. Für die Einzelleitfähigkeitsmessung wurde das rekombinante Protein im Überschuß mit hVDAC1 für 20 min bei RT präinkubiert. Nachfolgend wurden die Einzelleitfähigkeiten der inserierten Moleküle und die Spannungsabhängigkeit unter Anwesenheit des Interaktionspartners untersucht.

3.4 Zellbiologische Techniken

3.4.1 Kultivierung von H2LCL-Zellen

Die EBV-transformierte, lymphoblastoide Zelllinie H2LCL wurde in der abteilungseigenen Zellzucht in 10 l Kulturen in RPMI 1640-Medium bei 37 °C angezogen. Bei einer Zelldichte von 10^6 /ml wurden die Zellen nach Verdünnung subkultiviert oder zur Zellernte in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 800 x g bei 4 °C für 3 min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden anschließend in vorgekühltem PBS gewaschen und direkt zur mRNA-Isolierung eingesetzt (3.2.1).

3.4.2 Kultivierung von HeLa-Zellen

Adhärenz wachsende HeLa-Zellen (Gey, 1952) wurden in 250 ml Gewebekulturflaschen mit 10 ml *Dulbeccos' Modified Eagle Medium* (DMEM) inklusive Penicillin/Streptomycin (je 50 µg/ml) und 10 % (v/v) dekomplementiertes fötales Kälberserum bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ kultiviert. Nachdem die Kulturen zu ca. 80 % konfluent gewachsen waren, wurden sie mit einem Zellschaber mechanisch vom Gefäßboden abgelöst, 1:5 mit frischem Medium verdünnt und in neuen Gewebekulturflaschen subkultiviert.

3.4.3 Bestimmung der Zellzahl

Der Trypan-Blau-Exklusionstest nach Hoskins *et al.* (1956) wurde zur Bestimmung der Zellzahl angewendet.

200 µl Zellsuspension wurden mit dem gleichen Volumen frisch filtrierter Trypan-Blau-Lösung gemischt und ein Aliquot unter dem Lichtmikroskop in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer untersucht. Die Zellzahl pro ml ließ sich aus der durchschnittlichen Zellzahl pro Zählkammerquadrat $\times 10^4$ errechnen. Dabei wurden nur vitale, ungefärbte Zellen berücksichtigt. Die Dimension des Zählkammerquadrates betrug 1 x 1 x 0,1 mm.

3.4.4 Transiente Transfektion von HeLa-Zellen

Zum Einbringen von Plasmiden in HeLa-Zellen wurde das *SuperFectTM Transfection Reagent* verwendet. Die Plasmide werden durch das Reagenz, das aus einem aktiven Dendrimer besteht, aggregiert und der entstandene SuperFect-DNA-Komplex trägt an seiner Oberfläche positive Ladungen. Diese ermöglichen die Bindung des Komplexes an negativ geladene Oberflächenproteine eukaryontischer Zellen und bewirken die Aufnahme in die Zelle. Die Plasmide werden darüber hinaus in der Zelle durch das Reagenz vor lysosomalen Nukleasen geschützt. Dadurch wird der Transport intakter und stabiler Plasmid-DNA in den Zellkern gewährleistet.

24 Stunden vor der Transfektion wurden die Vertiefungen eines Gewebekulturgefäßes (*12 well cluster*) mit sterilen Deckgläschen versehen. In die Vertiefungen wurden nun 1×10^5 HeLa-Zellen eingebracht und bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ inkubiert, bis die Kultur zu 40 % bis 80 % konfluent war. 2 µg der jeweiligen Plasmid-DNA wurde in 75 µl DMEM (ohne Antibiotika und fötalem Kälberserum) gelöst. Der Ansatz wurde mit 7,5 µl *SuperFectTM Transfection Reagent* gemischt und 10 min bei RT zur Komplexbildung inkubiert. In dieser

Zeit wurden die auf den Deckgläschen gewachsenen Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Der Transfektionsansatz wurde mit 400 µl DMEM vorsichtig gemischt und zu den Zellen gegeben. Der Transfektionsansatz wurde nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ von den Zellen abpipettiert. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und in DMEM bis zur Kernfärbung und mikroskopischen Auswertung für 12 bis 72 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.4.5 Indirekte Immunfluoreszenz

Zum Nachweis spezifischer endogener Proteine wurden HeLa-Zellen zu ca. 50 % konfluent auf Deckgläschen angezchtet. Die mehrmals mit PBS gewaschenen Präparate wurden an der Luft getrocknet und 10 min in 80 % (v/v) Azeton in PBS inkubiert. Das Deckgläschen wurde erneut an der Luft getrocknet und mehrmals mit PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation von 30 min in PBS mit 10 % (v/v) NGS (Normal Goat Serum) zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Das Präparat wurde 1 h mit einem spezifischen Erstantikörper in Blockierungslösung inkubiert, viermal mit PBS gewaschen und im Fall einer Doppelmarkierung mit einem weiteren Primärantikörper, der aber aus einem anderen Organismus stammt, wie oben inkubiert und gewaschen. Anschließend wurde das Präparat nacheinander mit dem entsprechenden FITC- bzw. TRITC-konjugierten Sekundärantikörper (Anti-Mausimmunglobulin- bzw. Anti-Kaninchenimmunglobulin-Antikörper aus der Ziege, 1:100 in PBS) für 45 min lichtgeschützt inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurde die Kernfärbung durchgeführt und das Präparat unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Anstelle der Azetonfixierung wurden Zellen auch in 4 % (w/v) Paraformaldehyd/PBS für 10 min fixiert. Zur Permeabilisierung wurden die Deckgläschen in 0,3 % (v/v) Triton X-100/PBS 5 min inkubiert. Nach vier Waschschrten in PBS wurden die Präparate wie oben abgesättigt und mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert.

3.4.6 Kernfärbung

Zur Visualisierung des Zellkerns wurde die Kernfärbung nach Preisler (1978) mit dem Hoechst-Farbstoff H 33342 durchgeführt. Dieser interkaliert in die DNA vitaler Zellen und kann im Fluoreszenzmikroskop angeregt werden. Durch die Emission von blauem Licht mit einer Wellenlänge von 420 nm kann die Lage der Zellkerne in den Präparaten dargestellt werden.

HeLa-Zellen wurden dafür direkt vor der mikroskopischen Auswertung zweimal mit PBS gewaschen und mit 1 ml Hoechst-Farbstoff H 33342 (0,1 µg/ml in PBS) 5 min bei RT inkubiert. Nach fünf Waschschritten mit PBS wurden die Deckgläschen mit der Seite der adhären gewachsenen Zellen auf einen Objektträger überführt, mittels *Fixogum* fixiert und im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

3.4.7 Fluoreszenzmikroskopie

Die durch transiente Transfektion in HeLa-Zellen exprimierten EGFP-Fusionsproteine und durch indirekte Immunfluoreszenz doppeltmarkierten endogenen HeLa-Proteine wurden in der Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Zur Anwendung kamen dabei das indirekte Fluoreszenzmikroskop und das Fluoreszenz-Axioskop. EGFP-Fusionsproteine und FITC-markierte Proteine wurden durch Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 450-490 nm grün leuchtend markiert. TRITC-markierte Proteine wurden in den Präparaten durch Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 560 nm rot-fluoreszierend visualisiert. Die Exzitation des blau leuchtenden Kernfarbstoffes H 33342 erfolgte bei einer Wellenlänge von 365 nm. Die spezifischen, nach entsprechender Anregung emittierten Strahlungen wurden mikroskopisch beobachtet und mittels der auf dem Mikroskop installierten Kamera mit einem Fuji Provia 1600 Diafilm dokumentiert.

3.4.8 Expression in *Xenopus* Oozyten

Weibchen des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* wurden Teile des Ovars operativ entnommen. Oozyten wurden vereinzelt, nach Entwicklungsstufen selektiert, zur Expression heterologer Proteine mit spezifischer mRNA injiziert und bei 18 °C in modifizierter Barth'scher Lösung inkubiert (Dascal, 1987).

3.4.8.1 Operative Entnahme

Xenopus-Weibchen wurde zur Betäubung 45 min in 0,1 %iger (w/v) 3-Aminobenzoessäure-Ethylester (Tricain[®]) gelegt. Das Tier wurde auf einem feuchten Tuch gebettet. Die Eröffnung des Abdomens erfolgte mittels Skalpell durch einen ventralen 1 cm langen Schnitt durch die Haut und das Muskelgewebe von medial nach lateral in Kopfrichtung. Das benötigte Ovarsäckchen wurde mit stumpfen Pinzetten hervor gehoben und ein Teil mit einer Schere abgeschnitten. Luftblasen wurden aus dem Bauchraum ausgestrichen und mit einem monofilen, absorbierbaren Polygluconat-Faden zunächst die Muskeldecke und anschließend

die Haut genächt. Die Ovarsäckchen wurden in Ca^{2+} -freier modifizierter Barth'scher-Lösung aufbewahrt. Der Frosch wurde über Nacht in 500 ml Genta Sleecol[®] Desinfektionslösung gelegt und zurück in das Aquarium gesetzt.

3.4.8.2 Präparation der Oozyten

Das Ovarsäckchen wurde mittels zweier Pinzetten aufgerissen und zur enzymatischen Entfernung des die Oozyten umgebende Follikelepithels 2 h in Collagenase-Lösung (2 mg/ml in Ca^{2+} -freier modifizierter Barth'scher Lösung) bei RT schwenkend inkubiert. Die nun größtenteils defollikulierten Oozyten wurden mehrmals in modifizierter Barth'scher Lösung gewaschen. Oozyten der Entwicklungsstufen V und VI wurden isoliert. Reste des Follikelepithels konnten unter dem binokularen Mikroskop mittels zweier Pinzetten abpräpariert werden. Die Oozyten wurden bis zur Mikroinjektion der mRNA in modifizierter Barth'scher Lösung bei 18 °C gelagert.

3.4.8.3 Mikroinjektion

Defollikulierte *Xenopus*-Oozyten wurden auf einen mit einem Netz versehenen Objektträger mit modifizierter Barth'scher Lösung überführt. Filamentfreie Glas-Mikropipetten wurden vom programmierbaren Pipettenzieher zu Kapillaren ausgezogen, die Spitzen auf einen Durchmesser von 20 µm abgebrochen und die jeweilige mRNA-Lösung (0,5 µg/µl) mittels einer Microloader-Spitze einpipettiert. Mit der in einen Mikromanipulator eingespannten Mikropipette konnten nun über den an einen Kompressor angeschlossenen Mikroinjektor ca. 50 ng mRNA je Oocyte injiziert werden. Kontroll-Oozyten wurden mit DEPC-Wasser injiziert. Die Oozyten wurden bis zur weiteren Analyse in täglich ersetzter modifizierter Barth'scher Lösung bei 18 °C im Wasserbad inkubiert.

3.4.8.4 Proteinchemische Charakterisierung heterolog exprimierter Proteine

Je 10 mRNA-injizierte Oozyten der einzelnen Ansätze wurden nach 2 bis 10 Inkubationstagen in Solubilisierungspuffer mechanisch aufgeschlossen und eine Stunde bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Nach einer Ultrazentrifugation bei 100.000 x g und 4 °C für 60 min wurden die Proteine des Pellets und des Überstandes mittels Azetonfällung gereinigt (Thinnes *et al.*, 1989). Die heterolog exprimierten Proteine wurden nach SDS-PAGE und Westernblot durch die entsprechenden Antikörper immunologisch nachgewiesen.

3.4.8.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die heterologe Expression der hVDAC1-EGFP Fusionsproteine in *Xenopus* Oozyten wurde fluoreszenzmikroskopisch verfolgt. Hierfür wurden Oozyten 1 bis 10 Tage nach der mRNA-Injektion in die eingeschliffene Mulde eines Objektträgers überführt und mit einem Deckgläßchen versehen, welches zum Schutz der Oozyten mit Abstandhaltern aus Laborfett versehen war. Die Objekte wurden im indirekten Fluoreszenzmikroskop Axioskop oder im inversen Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 mit Licht einer Wellenlänge von 450-490 nm angeregt, was zur Visualisierung der exprimierten EGFP-Fusionsproteine führte. Die Expression der jeweiligen Proteine wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen verfolgt.

Nach der Ermittlung der Expressionsrate wurden Oozyten der einzelnen Ansätze im konfokalen Mikroskop mit monochromatischem Licht einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Die daraus resultierenden Fluoreszenzmuster wurde durch einen Laser mit einem 522 nm-Filter erfaßt und elektronisch dokumentiert.

3.4.8.6 Raster-Elektronenmikroskopie

Zur detaillierteren Lokalisierung des heterolog exprimierten hVDAC-1 an der Zellmembran von *Xenopus* Oozyten wurden diese im Raster-Elektronenmikroskop (REM) untersucht. Nach immunologischer Detektion der Proteine wurden die Oozyten fixiert und Goldmarkierungen mittels Silberfärbung verstärkt (Steinacker *et al.*, 2000).

mRNA injizierte und nicht injizierte, enzymatisch defollikulierte Oozyten wurden mehrmals mit Waschpuffer gespült und in Blockierungspuffer 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden sie in 50 µl mit 1:10 in Inkubationspuffer verdünntem anti-FLAG[®] M2-Antikörper für 90 min bei RT überführt. Nach fünfmaligem Waschen in Waschpuffer wurden die Oozyten mit 1:12 in Inkubationspuffer verdünntem 30 nm Gold-konjugierten anti-Mausimmunglobulin-Antikörper aus der Ziege 90 min bei 4 °C inkubiert. Die Oozyten wurden fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und 15 min in hypertoner Lösung inkubiert. Die abgehobene Vitellinschicht wurde manuell mittels zweier Pinzetten entfernt und die Oozyten 30 min in 2 % (v/v) Glutaraldehyd fixiert. Es schlossen sich je drei Waschgänge mit PBS (Xeno) und bidest. Wasser an. Da bei der REM mit zunehmender Vergrößerung auch eine Steigerung der auf das Präparat strahlenden und schädigenden Energie einher geht, wurde eine Silberverstärkung der Goldmarkierung durchgeführt. Die Verstärkungsreaktion mit den Bestandteilen des *IntenSETM Silver Enhancement Kits* fand für 30 min bei RT statt. Die

Oozyten wurden dreimal mit bidest. Wasser gewaschen und 2 h bei RT in Fixierlösung inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten erfolgte die Dehydrierung über eine aufsteigende Alkoholreihe. Dabei wurden die Oozyten jeweils 30 min in 30 %, 40 % und 50 % und anschließend jeweils 20 min in 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % und 99 % Ethanol inkubiert. Abschließend wurden die Präparate zweimal mit 100 % Ethanol für 30 min versetzt. Je eine Oozyte wurde mit beidseitig klebendem Kohleband auf einem Aluminiumträger befestigt, mit Kohlenstoff zur Verbesserung der Darstellung bedampft und im REM untersucht.

3.4.8.7 2-Elektroden Voltage clamp

Die Charakterisierung der elektrophysiologischen Eigenschaften von Wasser- und mRNA-injizierten *Xenopus* Oozyten erlaubt die 2-Elektroden Voltage clamp Methode. Hierbei werden Gesamtzellströme über die Plasmamembran gemessen.

Ein negativ gekoppelter „*feed-back*“-Kreislauf stellt die Hauptkomponente der Voltage clamp Anordnung dar. Er ermöglicht die Einstellung des Membranpotentials auf einen definierten Wert. Neben einem speziellen Oozyten-Voltage clamp-Verstärker wurden für das Messbad eine Referenz- und eine Erdungselektrode sowie für die Oozyte die intrazellulären Strom- und Spannungselektroden benötigt. Die Erdungs- und Referenzelektroden bestanden aus chloriertem Silberdraht. Die Referenzelektrode war an den Vorverstärker der Stromelektrode, die Erdungselektrode an den Vorverstärker der Spannungselektrode angeschlossen. Die stromeinspeisende und die spannungsmessende Elektroden wurden zur Einführung in die Oozyte mit ausgezogenen und an einem Heizdraht nachgearbeiteten, filamenthaltigen Glaskapillaren versehen und mit 3 M KCl gefüllt. Der Meßplatz wurde freundlicher Weise von Frau Dr. Burckhardt am Physiologischen Institut der Universität Göttingen zur Verfügung gestellt. Eine Übersicht des 2-Elektroden Voltage clamp Aufbaus ist in Abbildung 9 dargestellt.

In die spülbare Badkammer wurde eine Oozyte plziert und mit Hilfe von Mikromanipulatoren zuerst die Spannungs-, dann die Stromelektrode eingestochen. Bei den Messungen wurde das aktuelle Membranpotential von der Spannungselektrode erfaßt, während die einspeisende Elektrode über den Voltage clamp Verstärker soviel Strom in die Oozyte injizierte, wie zum Erhalten des zuvor gewählten Sollpotentials benötigt wurde. In dieser Anordnung sind Änderungen der injizierten Strommenge direkt proportional zu Änderungen des Membranpotentials der Oozyte und daher umgekehrt proportional zu dem

über die Plasmamembran fließenden Strom. Die Richtung des Stromes wird konventionell als Bewegung positiv geladener Ionen bezeichnet. Ein Nettoeinstrom kann sich also sowohl auf den Einstrom positiv geladener Teilchen, als auch auf den Ausstrom negativer Ladungen beziehen.

Zur weiteren Messung wurden Oozyten, deren Ruhepotential konstant und niedriger als -30 mV war, auf ein Sollpotential von -60 mV geklemmt. Die verwendeten Badlösungen ohne und mit Modulatoren wurden mit regulierbarer Flußgeschwindigkeit per Gravitation der Badkammer zugeführt. Ein Austausch der Badflüssigkeit erfolgte nach Spülen mit dem 10-fachen Badvolumen der Kammer.

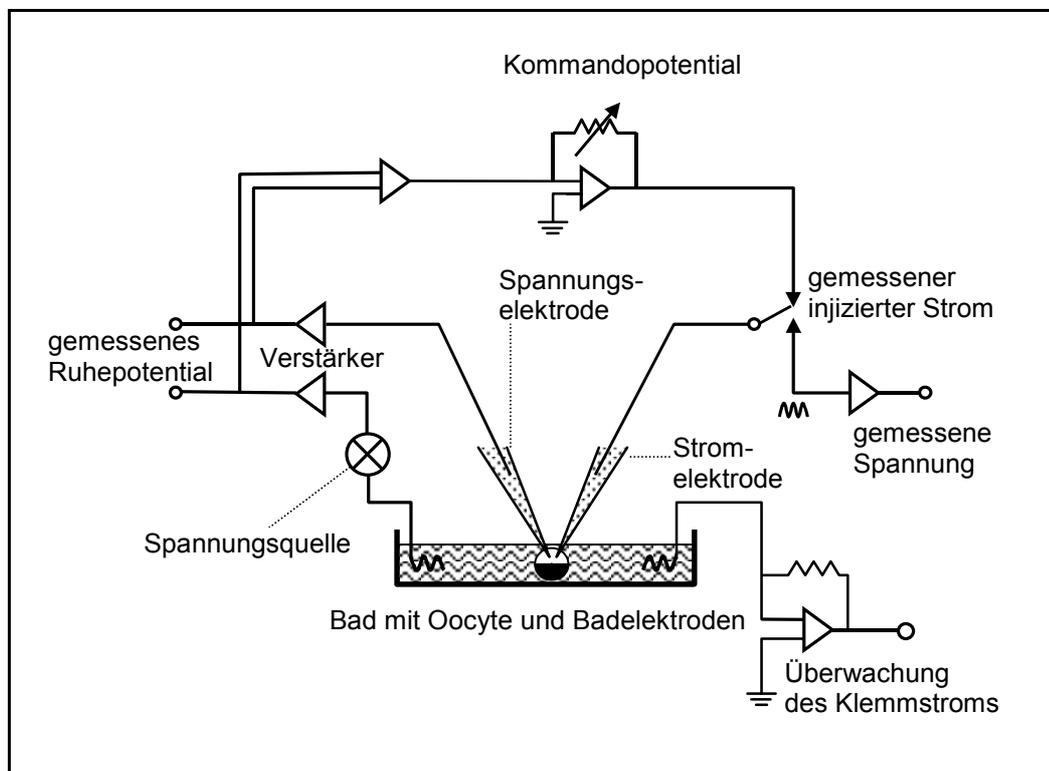


Abbildung 9: Schematische Darstellung des 2-Elektroden Voltage clamp Aufbaus

Strom-Spannungs-Kennlinien wurden ermittelt, indem bei Spannungsstufen von -80 bis +20 mV der resultierende Haltestrom gemessen und aufgezeichnet wurde. Eine Auftragung des gemessenen Stromes gegen die angelegte Spannung ermöglicht Aussagen über die Spannungsabhängigkeit als auch über das Umkehrpotential des Gesamtzellstromes. In der Auswertung wurden die Standardabweichungen mit folgender Formel berechnet:

$$\sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n^2}}$$

4 Ergebnisse

4.1 Heterologe Expression von hVDAC1 in *Xenopus laevis* Oozyten

Die für hVDAC1 kodierende cDNA wurde am 5'- bzw. 3'-Ende mit der Nukleinsäuresequenz des *Enhanced Green Fluorescent Proteins* (EGFP) und in einem zweiten Ansatz mit einem für das FLAG-Epitop kodierenden Nukleinsäureabschnitt fusioniert, in mRNA transkribiert und diese zur heterologen Expression der Fusionsproteine in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert. Die Oozyten wurden anschließend biochemisch, fluoreszenz- bzw. elektronenmikroskopisch und elektrophysiologisch analysiert (Schwarzer *et al.*, 2000).

4.1.1 Konstruktion der hVDAC1-Plasmide

Ausgangsplasmid zur Synthese modifizierter hVDAC1-Konstrukte war der Vektor *pBluescript*-hVDAC1, der die vollständige, für den Leserahmen des hVDAC1 kodierende Nukleinsäuresequenz beinhaltet. Abbildung 10 zeigt eine schematische Darstellung der durch die modifizierten cDNA-Fragmente kodierten Proteine.

Der für hVDAC1 kodierende Sequenzabschnitt wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer PoN1/C3-F und PoN1/C3-R amplifiziert und nach Restriktionsspaltung in die Schnittstellen *XhoI* und *PstI* der Vektoren pEGFPN1 und EGFP3C3 eingebracht.

Aus dem Plasmid pEGFPN1/hVDAC1 wurde der für das Fusionsprotein kodierende Leserahmen in einer PCR mit den Primern Po-EGFP-F und Po-EGFP-R unter Einführung der Restriktionsschnittstellen *SacI* und *NotI* amplifiziert und in die entsprechenden Schnittstellen des *in vitro*-Transkription Vektors pSGEM eingefügt. Das resultierende cDNA-Insert kodierte für hVDAC1, welches C-terminal mit dem EGFP fusioniert als pSGEM-hVDAC1/EGFP bezeichnet wurde.

Das Plasmid pEGFP3C3/hVDAC1 diente in einer PCR mit den Primern EGFP-Po-F und EGFP-Po-R als Matrize zur Amplifizierung des cDNA-Fragmentes, das für das N-terminal an hVDAC1 fusionierte EGFP kodierte. Unter Benutzung der eingebrachten *SacI*- und *NotI*-Schnittstellen wurde das Konstrukt in den Vektor pSGEM ligiert und das resultierende Plasmid als pSGEM-EGFP/hVDAC1 bezeichnet.

Der Leserahmen des hVDAC1 ohne Markierung wurde unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Sal*I direkt in den Vektor pSGEM subkloniert. Dieses Plasmid wurde pSGEM-hVDAC1 genannt.

Der für das *Enhanced Green Fluorescent Protein* kodierende Leserahmen wurde aus pEGFPN1 mittels PCR und den Primern EGFP-Po-F und Po-EGFP-R angereichert und in die Schnittstellen *Sac*I und *Not*I des Vektors pSGEM eingebracht. Dieses Konstrukt wurde als pSGEM-EGFP bezeichnet.

In einer PCR mit den Primern Po-F und Po-FLAG-R wurde ein aus 24 Nukleotiden bestehendes, für das FLAG-Epitop kodierendes Fragment an das 3'-Ende der hVDAC1-cDNA gehängt. Das PCR-Produkt wurde in die Schnittstellen BamHI und SalI des Vektors pSGEM ligiert und das entstandene Plasmid pSGEM-hVDAC1/FLAG genannt.

Mit den Primern FLAG-Po-F und Po-R wurde mittels PCR das FLAG-Fragment an das 5'-Ende der hVDAC1-cDNA fusioniert. Aus dem in den Vektor pSGEM eingebrachten Konstrukt resultierte das Plasmid pSGEM-FLAG/hVDAC1.

Die Leserahmen der einzelnen cDNA-Fragmente in den entsprechenden Vektoren wurden in DNA-Sequenzanalysen unter Verwendung der unter 2.7 aufgeführten, sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primer bestätigt.

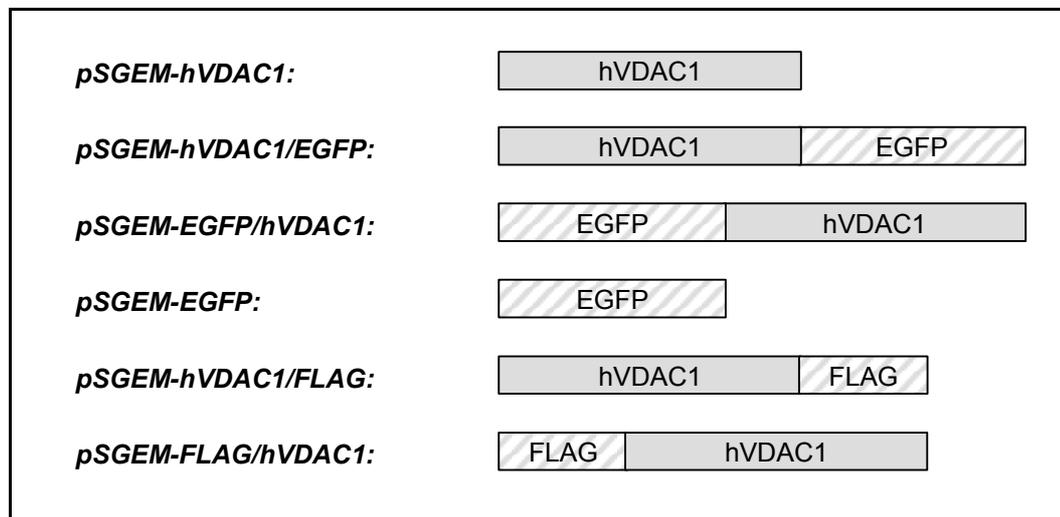


Abbildung 10: hVDAC1-Konstrukte zur Untersuchung der Lokalisierung in *Xenopus laevis* Oozyten

Die schematische Darstellung vermittelt eine Übersicht der durch die konstruierten Plasmide kodierten Expressionsprodukte. hVDAC1 cDNA wurde N- bzw. C-terminal mit dem Leserahmen des EGFP und in einem weiteren Ansatz mit der für das FLAG-Epitop kodierenden Nukleinsäuresequenz fusioniert.

4.1.2 *In vitro*-Transkription und Translation

Die Plasmide mit den hVDAC1-Konstrukten wurden am 3'-Ende der *multi cloning site* stromabwärts des T7-Promotors durch das Restriktionsenzym *NheI* hydrolysiert. Die linearisierten Plasmide wurden aufgereinigt und in der *in vitro*-Transkription durch die T7 RNA-Polymerase in mRNA umgeschrieben. Eine Ausbeute von 30-80 µg mRNA wurde in den 70 µl-Ansätzen photometrisch ermittelt. Zur qualitativen Analyse wurden Aliquots der Ansätze in einem Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen visualisiert (Abbildung 11). Die erwartete Größe der einzelnen mRNA-Banden konnte durch den Vergleich mit einem RNA-Längenstandard bestätigt werden.

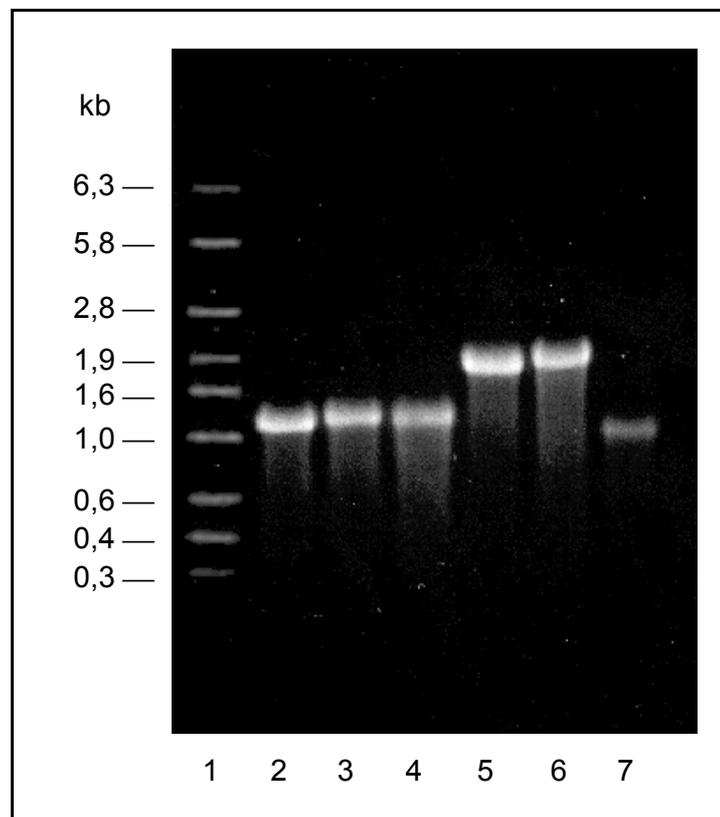


Abbildung 11: *In vitro*-Transkriptionsprodukte der hVDAC1-Plasmide

Das Ethidiumbromid-gefärbte, Formaldehyd-haltige Agarosegel (1,5 %) zeigt die für die zur *in vitro*-Translation und Expression in *Xenopus* Oozyten eingesetzten mRNA-Fragmente. Spur 1: 2 µg RNA-Marker, Spur 2: 1 µg hVDAC1, Spur 3: 1 µg hVDAC1/FLAG, Spur 4: 1,5 µg FLAG/hVDAC1, Spur 5: 1 µg hVDAC1/EGFP, Spur 6: 1 µg EGFP/hVDAC1, Spur 7: 0,5 µg EGFP

Zur Überprüfung der Funktionalität der einzelnen mRNA-Präparationen wurden diese in die *in vitro*-Translation eingesetzt. In diesem zellfreien Expressionssystem wurden die unterschiedlichen mRNA-Fragmente in Proteine umgeschrieben, die durch den Einbau von

Biotin-konjugierten Lysinen markiert waren. Die Translationsprodukte wurden einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen und auf eine PVDF-Membran transferiert, auf der Biotin-markierte Proteine enzymatisch durch Streptavidin-konjugierte Alkalische Phosphatase und einer Substratlösung aus NBT und X-Phosphat nachgewiesen wurden. Abbildung 12 zeigt exemplarisch einen entwickelten Westernblot mit aus den eingesetzten mRNA-Fragmenten resultierenden Translationsprodukten. Die jeweiligen mRNA-Ansätze wurden effizient translatiert (Schwarzer *et al.*, 2000). Die im Vergleich zum LMW-Marker ermittelten Molekulargewichte der Proteine stimmten mit den erwarteten Größen unter Berücksichtigung der durch die Biotin-, EGFP- und Flag-Markierung hervorgerufene Verschiebung des Molekulargewichtes überein (Babel *et al.*, 1991, Winkelbach *et al.*, 1994).

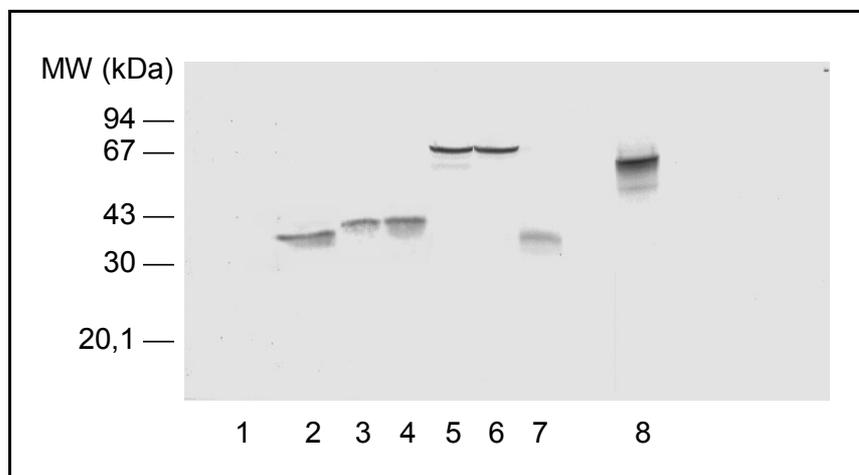


Abbildung 12: *in vitro*-Translationsprodukte der hVDAC1-Konstrukte

Die Abbildung zeigt die enzymatische Darstellung biotinylierter Translationsprodukte im Westernblot. Spur 1: LMW-Marker, Spur 2: hVDAC1, Spur 3: hVDAC1/FLAG, Spur 4: FLAG/hVDAC1, Spur 5: EGFP/hVDAC1, Spur 6: hVDAC1/EGFP, Spur 7: EGFP, Spur 8: γ -Globulin

4.1.3 Plasmalemmale Lokalisierung der heterolog exprimierten Proteine

Zur heterologen Expression der einzelnen hVDAC1-Konstrukte in *Xenopus* Oozyten wurden diese defollikuliert und mit 50 ng der entsprechenden mRNA injiziert. Nach einer Inkubation von 2 bis 10 Tagen wurden die Oozyten mikroskopisch analysiert.

4.1.3.1 Lichtmikroskopische Daten

Die Expression der hVDAC1-EGFP-Fusionsproteine in *Xenopus* Oozyten wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioskop unter UV-Licht verfolgt. Bereits einen Tag nach Injektion der mRNA konnte intrazelluläre eine schwache Fluoreszenz beobachtet werden. Ab dem

zweiten Inkubationstag wurden vereinzelte Fluoreszenzsignale an der Oberfläche von Oozyten detektiert, die mit hVDAC1-EGFP-mRNA injiziert wurden. Die Zahl der Markierungen an der Zelloberfläche dieser Oozyten nahm bis zum fünften Inkubationstag zu und blieb an den folgenden Tagen konstant. Oozyten, die mit EGFP-hVDAC1-mRNA injiziert wurden, zeigten zu keinem Zeitpunkt des Experimentes Markierungen an der Oberfläche, sondern intrazellulär fluoreszierende Signale (Daten nicht gezeigt). Dieses Expressionsmuster war mit dem der EGFP-mRNA-injizierten Kontrolloozyten identisch. In Abbildung 13 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Oozyten am siebten Inkubationstag dargestellt, die mit hVDAC1/EGFP-mRNA und EGFP-mRNA injiziert wurden (Schwarzer *et al.*, 2000).

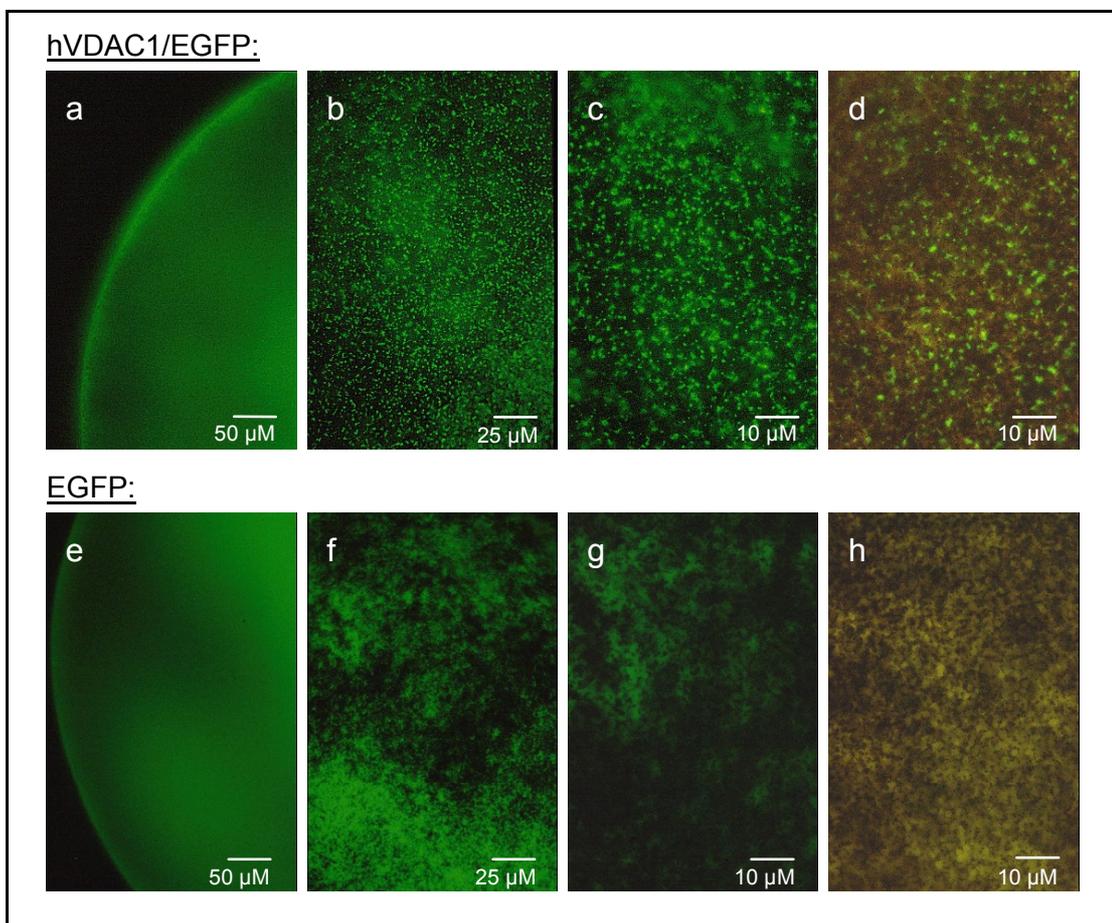


Abbildung 13: Lichtmikroskopische Darstellung des hVDAC1/EGFP-Fusionsproteins und des EGFPs in *Xenopus laevis* Oozyten

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen die plasmalemmale Expression von hVDAC1/EGFP (a-d) und die intrazelluläre Verteilung des EGFPs (e-h) in enzymatisch defollikulierten Oozyten 7 Tage nach Injektion der entsprechenden mRNA-Fragmente. a und e: Fokussierung auf die Äquatorialebene 200-fach vergrößert, b und f: Fokussierung auf die Oozytenoberfläche 400-fach vergrößert, c und g: Fokussierung auf die Oozytenoberfläche 1000-fach vergrößert, d und h: Fokussierung auf die Oozytenoberfläche 1000-fach vergrößert mit Durchlicht

4.1.3.2 Konfokal-lasermikroskopische Daten

Mit dem Lichtmikroskop wurden Oozyten der einzelnen Ansätze sondiert, die ein repräsentatives Expressionsmuster der EGFP-Fusionsproteine zeigten. Um Aufnahmen mit einer höheren Auflösung zu erhalten, wurden diese Oozyten mit dem konfokalen Lasermikroskop betrachtet. Die daraus resultierten Aufnahmen in der Aufsicht und der Äquatorialebene der Oozyten sind in Abbildung 14 dargestellt. Eine deutliche Markierung an der Zellmembran wurde für Oozyten registriert, die mit hVDAC1/EGFP-mRNA injiziert waren (Schwarzer *et al.*, 2000). Mit EGFP-mRNA injizierte Kontrolloozyten zeigten keine scharfen Signale an der Zelloberfläche, sondern eine diffuse intrazelluläre Fluoreszenz, die durch schwach pigmentierte Regionen der Plasmamembran strahlte. Mit EGFP/hVDAC1-mRNA injizierte Oozyten zeigten ein mit den Kontrolloozyten identisches Expressionsmuster (Daten nicht gezeigt).

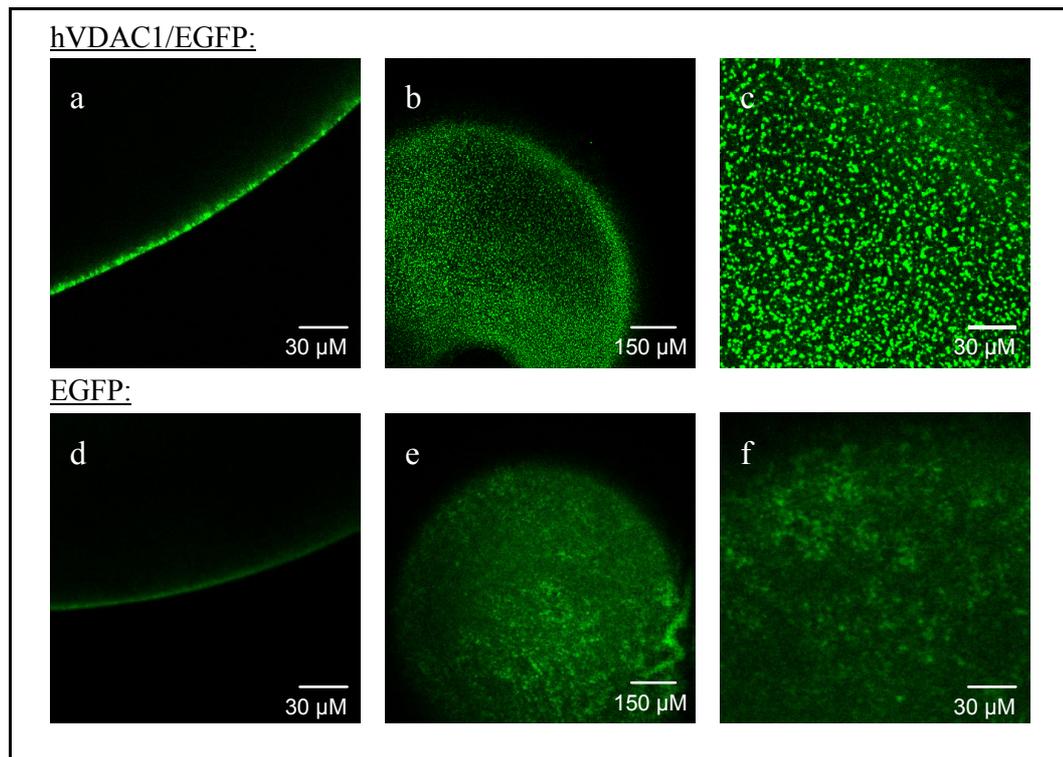


Abbildung 14: Konfokale Visualisierung des hVDAC1/EGFP-Fusionsproteins und des EGFPs in *Xenopus laevis* Oozyten

Die mit Hilfe des konfokalen Mikroskops erstellten Aufnahmen zeigen die plasmalemmale Expression von hVDAC1/EGFP (a-c) und die intrazelluläre Verteilung des EGFPs (d-f) in enzymatisch defollikulierten Oozyten 7 Tage nach Injektion der entsprechenden mRNA-Fragmente. a und d: Fokussierung auf die Äquatorialebene 400-fach vergrößert, b und e: Fokussierung auf die Oozytenoberfläche 75-fach vergrößert, c und f: Fokussierung auf die Oozytenoberfläche 400-fach vergrößert

4.1.3.3 Rasterelektronenmikroskopische Daten

Um einerseits die heterologe Expression von hVDAC1 in *Xenopus* Oozyten mit einer anderen Markierungsmethode zu bestätigen und andererseits nähere Auskunft über die Position der Markierung an der Zelloberfläche zu erhalten, wurde hVDAC1 N- oder C-terminal mit dem FLAG-Epitop versehen. Die Expression dieser Konstrukte wurde immunologisch mittels monoklonaler anti-FLAG[®] Primär- und Gold-konjugierter Sekundärantikörper detektiert und nach der Silberverstärkung durch das Raster-Elektronenmikroskop dargestellt.

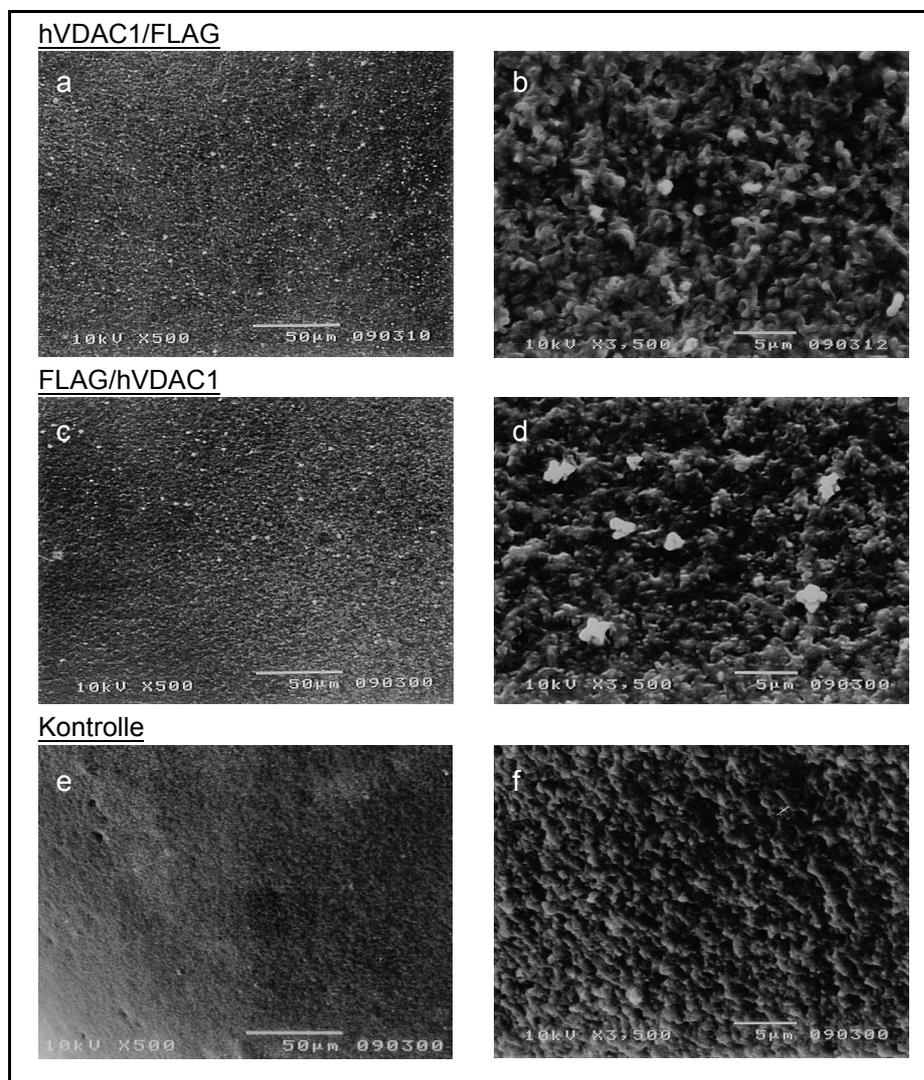


Abbildung 15: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Expression des durch das FLAG-Epitop modifizierten hVDAC1 in *Xenopus laevis* Oozyten

Die mit Hilfe des REM erstellten Aufnahmen zeigen die Oberfläche von enzymatisch defollikulierten Oozyten 7 Tage nach Injektion von hVDAC1/FLAG-mRNA (a und b), FLAG/hVDAC1-mRNA (c und d) und DEPC-Wasser (e und f). Die Oozyten wurden nach Inkubation mit anti-FLAG[®] Antikörper und Gold-konjugierten Sekundärantikörper, Glutaraldehyd-Fixierung und Silberverstärkung analysiert.

Aus den REM-Aufnahmen geht hervor, daß sowohl C-terminal "geflagtes" hVDAC1 (Abbildung 15 a und b) als auch hVDAC1 mit dem N-terminalen FLAG-Epitop (Abbildung 15 c und d) an der Plasmamembran nachgewiesen werden konnte (Schwarzer *et al.*, 2000). Die in Abbildung 15 e und f dargestellten Wasser-injizierte Kontrolloozyten zeigten hingegen nach identischer immunologischer Prozedur keine entsprechenden Markierungen an der Oberfläche. Der immunologische Nachweis beider hVDAC1-Konstrukte zeigt, daß sich deren durch das Epitop markierte Termini auf der extrazellulären Seite der Zellmembran befanden.

4.1.4 Biochemische Analyse heterolog exprimierter hVDAC1-Konstrukte

Neben den optischen Auswertungen unter Zuhilfenahme der unterschiedlichen Mikroskopietechniken wurden die heterolog exprimierten hVDAC1-Konstrukte in den *Xenopus* Oozyten proteinchemisch analysiert. Hierfür wurden pro Ansatz 10 mRNA-injizierte Oozyten nach sieben Inkubationstagen vereinigt und solubilisiert. Da im Gesamtzellaufschluß von *Xenopus* Oozyten mehrere Proteine im für hVDAC1 charakteristischen Molekulargewicht liegen, wurden gelöste von unlöslichen Proteinen in einer Ultrazentrifugation getrennt. Je 1/10 der resultierenden Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und immunologisch mit spezifischen Antikörpern untersucht.

Abbildung 16 zeigt ein SDS-Gel (Spuren 2 bis 5) und den zugehörigen Westernblot (Spuren 6 bis 10) der solubilisierten Oozyten, die mit Wasser (Spuren 2 und 7), hVDAC1-mRNA (Spuren 3 und 8) oder hVDAC1/EGFP-mRNA (Spuren 5 und 10) injiziert wurden. Durch monoklonale anti-hVDAC1 Antikörper wurde in mit Wasser injizierten Kontrolloozyten eine ca. 30 kDa große Proteinbande angefärbt (Spur 7). Hierbei handelt es sich um endogenes VDAC der *Xenopus* Oozyte (Steinacker *et al.*, 2000). In hVDAC1-mRNA injizierten Oozyten wurde neben der endogenen VDAC-Bande eine zusätzliche, 31 kDa große Proteinbande durch die anti-hVDAC1 Antikörper detektiert (Spur 8). Diese Bande repräsentiert das heterolog exprimierte hVDAC1 (Schwarzer, 1996). Das in den Spuren 4 und 9 aufgetrennte, aus humanen B-Lymphozyten isolierte Kontroll-hVDAC1 weist eine Bande mit einem Molekulargewicht von 31 kDa auf. Endogenes und heterolog exprimiertes VDAC lag unter den angewendeten Bedingungen der Solubilisierung nach der Ultrazentrifugation in gelöster Form im Überstand vor. Heterolog exprimiertes hVDAC1/EGFP dagegen war nach der Ultrazentrifugation Bestandteil der unlöslichen Proteinfraction im Zentrifugationspellet. Die ca. 60 kDa große Proteinbande dieses Konstruktes aus der in den Spuren 5 und 10 dargestellten Pellet-Fraktion solubilisierter Oozyten wurde durch anti-hVDAC1 Antikörper in

Spur 10 angefärbt. Für die EGFP-hVDAC1 Fusionsproteine wurde mit Hilfe eines Proteinsequenz-Analyseprogrammes (L'Atelier BioInformatique de Marseille (A.B.I.M.), F) ein isoelektrischer Punkt (pI) von 6,28 errechnet, für hVDAC1 postuliert das Programm dagegen einen pI von 9,36. Experimentell wurde von Kayser *et al.*, 1989 und Jakob *et al.*, 1995 für hVDAC1 ein pI zwischen 7,2 und 8,1 ermittelt. Der Unterschied im isoelektrischen Punkt verdeutlicht Differenzen in der Löslichkeit dieser heterolog exprimierten Proteine in Abhängigkeit vom pH Wert des Solubilisierungspuffers.

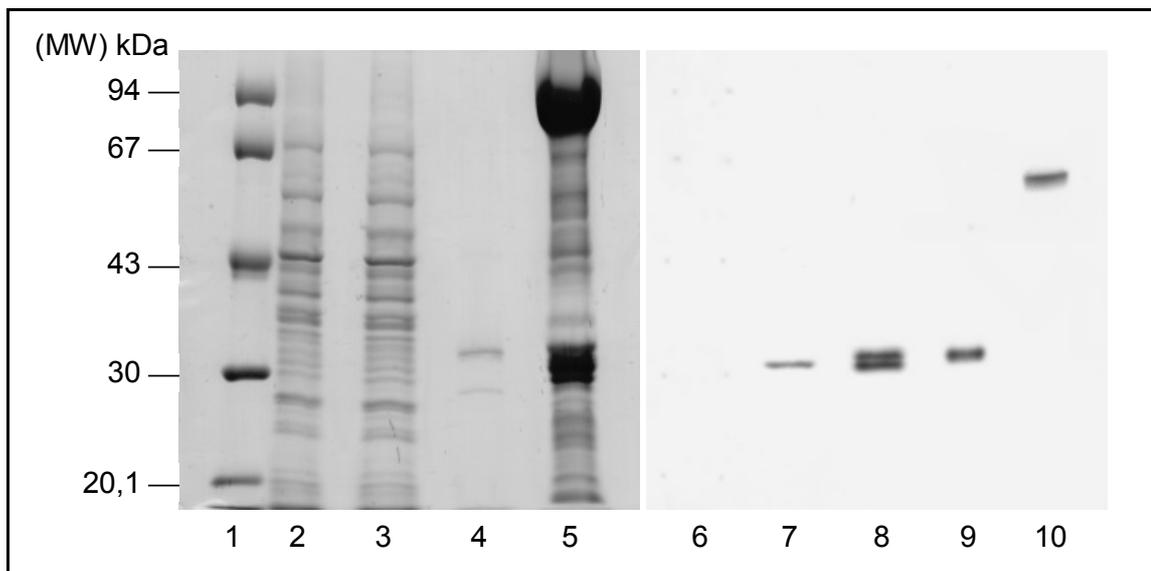


Abbildung 16: Proteinchemische Analyse des in *Xenopus* Oozyten heterolog exprimierten hVDAC1 und hVDAC1/EGFP-Fusionsproteins

Mit spezifischer mRNA injizierte *Xenopus* Oozyten wurden 7 Tage inkubiert und solubilisiert. Dargestellt ist ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel der aufgetrennten Proteine (Spuren 1 bis 5) und der entsprechende Westernblot nach der Immunreaktion mit dem anti-hVDAC1 Antikörper. Spuren 1 und 6: LMW-Marker, Spuren 2 und 7: solubilisierte Kontrolloozyten, Spuren 3 und 8: solubilisierte hVDAC1-Oozyten, Spuren 4 und 9: aus H2LCL-Zellen isoliertes hVDAC1, Spuren 5 und 10: unlösliche Proteinfractionen der hVDAC1/EGFP-Oozyten

Die mit FLAG-hVDAC1-mRNA injizierten *Xenopus* Oozyten wurden solubilisiert und im SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 17, Spuren 1 bis 5). Im zugehörigen Westernblot wurden die Proteine der Ansätze mit dem monoklonalen anti-FLAG[®] Antikörper inkubiert (Spuren 6 bis 10). Die in Spur 7 identifizierten Proteinbande repräsentiert das heterolog exprimierte hVDAC1/Flag, in Spur 8 ist das FLAG/hVDAC1-Konstrukt dargestellt. Beide Proteine zeigten ein Molekulargewicht von 34 kDa. Proteine aus Wasser-injizierten Kontrolloozyten zeigten keine Reaktion mit dem monoklonalen anti-FLAG[®] Antikörper (Spur 9).

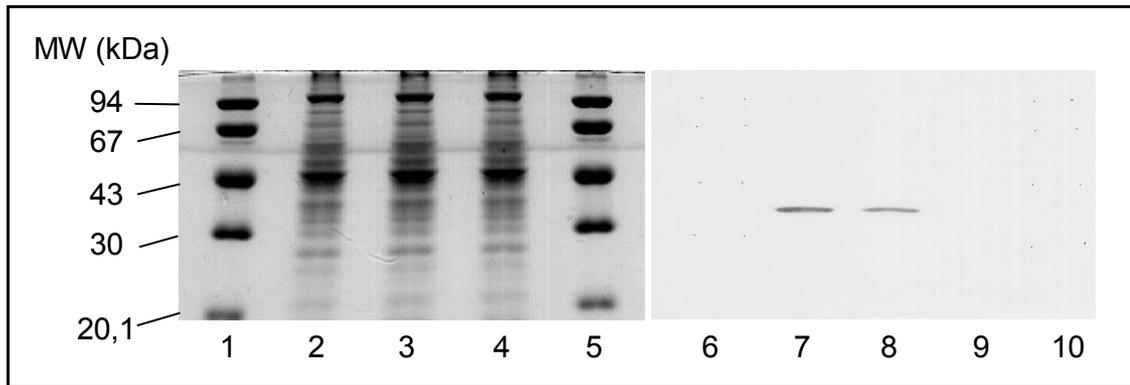


Abbildung 17: Proteinchemische Analyse des in *Xenopus* Oozyten heterolog exprimierten, FLAG-markierten hVDAC1

Mit spezifischer mRNA injizierte *Xenopus* Oozyten wurden 7 Tage inkubiert und solubilisiert. Dargestellt ist ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel der aufgetrennten Proteine (Spuren 1 bis 5) und der entsprechende Westernblot nach der Immunreaktion mit dem anti-FLAG[®] Antikörper. Spuren 1, 5, 6 und 10: LMW-Marker, Spuren 2 und 7: solubilisierte hVDAC1/FLAG-Oozyten, Spuren 3 und 8: solubilisierte FLAG/hVDAC1-Oozyten, Spuren 4 und 9: solubilisierte Kontrolloozyten

Die immunologisch detektierten Proteinbanden in Abbildung 16 und Abbildung 17 belegen zum einen die heterologe Expression der unterschiedlichen hVDAC1-Konstrukte in *Xenopus* Oozyten. Dabei stammt die aufgetragene Proteinmenge pro Spur aus der solubilisierten Proteinfraction einer Oozyte (bzw. für hVDAC1-EGFP aus der unlöslichen Proteinfraction). Zum anderen erlaubt das ermittelte Molekulargewicht der identifizierten heterolog exprimierten Proteine die qualitative Bestätigung vollständiger Translationsprodukte der jeweils injizierten mRNA.

4.1.5 Elektrophysiologische Messungen an *Xenopus* Oozyten

Mit hVDAC1-mRNA bzw. DEPC-Wasser injizierte, defollikulierte Oozyten wurden nach fünf Inkubationstagen mit der 2-Elektroden Voltage clamp Methode untersucht. Das Membranpotential der in modifizierter Barth'scher Lösung gemessenen Oozyten betrug 5 min nach dem Einstechen beider Elektroden -38 ± 10 mV ($n_{\text{hVDAC1}} = 32$) und -38 ± 9 mV ($n_{\text{Kontrolle}} = 32$).

4.1.5.1 Strom-Spannungsmessungen in modifizierter Barth'scher Lösung

hVDAC1-exprimierende und Wasser-injizierte Kontrolloozyten wurden auf -60 mV geklemmt und der bei unterschiedlichen angelegten Spannungen resultierende Strom gemessen. Dabei wurde die Spannung zwischen -80 mV und $+20$ mV in 10 mV-Schritten für jeweils 5 s variiert. Die sich einstellenden, vom Schreiber aufgezeichneten Stromantworten der Oozyten lagen bei negativen Klemmpotentialen bei maximal -80 nA und nach

Depolarisierung bei maximal +120 nA. Nach Abschluß der Messungen wurde jede hVDAC1-Oozyte proteinchemisch analysiert und nur dann in der Auswertung berücksichtigt, wenn das heterolog exprimierte Protein immunologisch im Westernblot identifiziert werden konnte. Anhand der Schreiberaufzeichnungen wurden Strom-Spannungs-Kennlinien erstellt. Aus Abbildung 18 geht hervor, daß sich die gemessenen Ströme der hVDAC1-exprimierenden Oozyten von Kontrollloozyten bei angelegten Spannungen zwischen -80 mV und +20 mV nicht unterscheiden. Das Umkehrpotential von -37 ± 8 mV dieser Oozyten war nicht signifikant unterschiedlich zu dem zuvor gemessenen Ruhepotential von -38 ± 10 mV. Das in *Xenopus* Oozyten heterolog exprimierte hVDAC1 zeigte unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluß auf die gemessenen Gesamtströme über die Plasmamembran und repräsentiert somit einen elektrisch stillen Kanal.

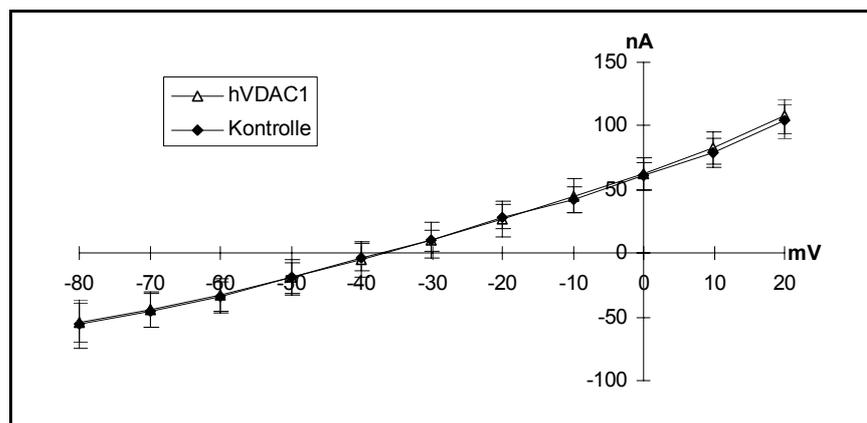


Abbildung 18: Strom-Spannungsbeziehung von hVDAC1-exprimierenden- und Kontrollloozyten

Die Messungen wurden in modifizierter Barth'scher Lösung 5 min nach Einstechen der Elektroden durchgeführt ($V_{\text{clamp}} = -60$ mV, $n_{\text{hVDAC1}} = 32$, $n_{\text{Kontrolle}} = 32$)

4.1.5.2 Strom-Spannungsmessungen mit applizierten Modulatoren

Die Applikation von bis zu 100 $\mu\text{g/ml}$ anti-hVDAC1 Antikörpern (Nr. 1, 4 und 7) in die isotone Badlösung hatte keinen Einfluß auf die bei Spannungen zwischen -80 und +20 mV gemessenen Ströme von *Xenopus* Oozyten, die mit hVDAC1-mRNA injiziert und vor den Messungen 30 Minuten mit den entsprechend konzentrierten Antikörpern präinkubiert wurden. Die ermittelte Strom-Spannungsbeziehung in modifizierter Barth'scher Lösung ohne und mit anti-hVDAC1 Antikörper ist beispielhaft für Ak Nr. 7 in Abbildung 19 a dargestellt. Ein Einfluß dieser Antikörper auf die Gesamtzellströme von Wasser-injizierten Kontrollloozyten konnte in der isotonen Badlösung ebenfalls nicht ermittelt werden (Daten

nicht gezeigt). Messungen mit 5 bis 100 μM Gadolinium, einem dreiwertigen Kation, welches die Spannungsabhängigkeit von hVDAC1 in Versuchen mit künstlichen Lipid-Doppelmembranen erniedrigt und hVDAC1-spezifisches Schwellen von HeLa-Zellen und B-Lymphozyten hervorruft (Thinnes *et al.*, 2000a), führten zu keinen signifikanten Änderungen der aufgezeichneten Stromantworten in hVDAC1-exprimierenden Oozyten (Abbildung 19 b). Identische Strom-Spannungs-Beziehungen wurden in Wasser-injizierten Kontrollloozyten in Gegenwart von 5 μM Gadolinium gemessen (Daten nicht gezeigt).

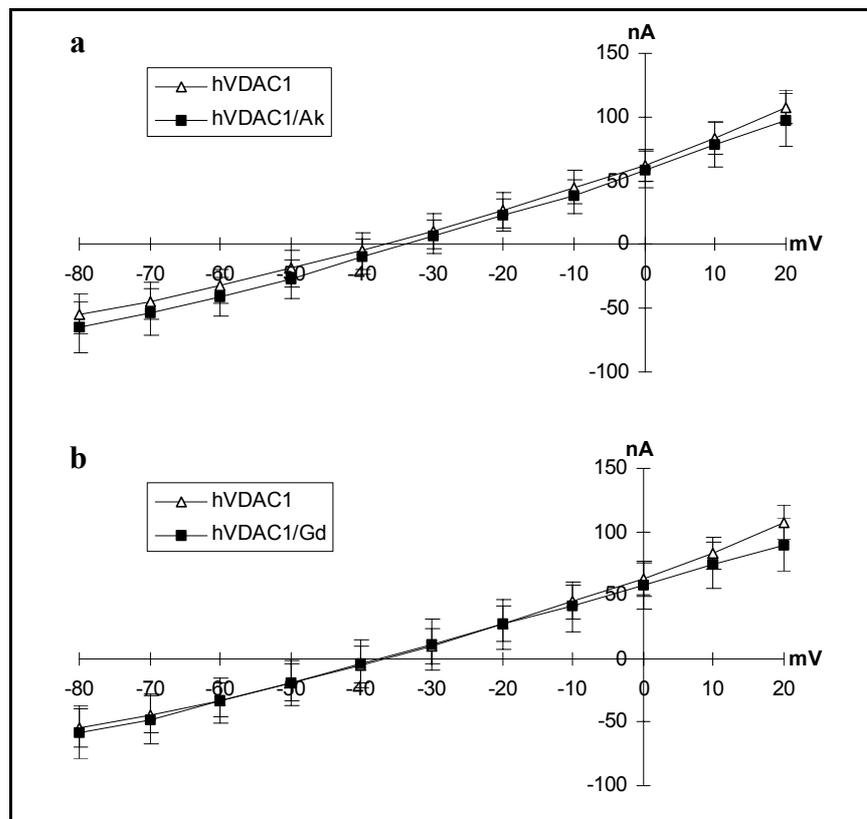


Abbildung 19: Einfluß von anti-hVDAC1 Antikörper und Gadolinium auf die Strom-Spannungsbeziehung von hVDAC1-exprimierenden Oozyten

Die Messungen wurden in modifizierter Barth'scher Lösung 5 min nach Einstechen der Elektroden durchgeführt ($V_{\text{clamp}} = -60 \text{ mV}$, $n_{\text{hVDAC1}} = 32$). **a:** nach Präinkubation mit und in Gegenwart von 10 $\mu\text{g/ml}$ anti-hVDAC1 Antikörper Nr. 7 ($n = 18$) **b:** in Gegenwart von 5 μM Gadolinium ($n = 21$)

Zusammenfassend läßt sich an dieser Stelle feststellen, daß in *Xenopus laevis* Oozyten hVDAC1 in der Plasmamembran exprimiert wurde, daß aber in Voltage clamp Messungen dadurch weder spannungsabhängige noch durch hVDAC1-Modulatoren beeinflussbare Veränderungen der Gesamtzellströme initiiert werden konnten. Das heterolog exprimierte hVDAC1 zeigte in der Zellmembran von *Xenopus laevis* Oozyten keine erfassbare zusätzliche Kanalaktivität und nahm dementsprechend einen geschlossenen Zustand ein.

4.2 Nachweis von hVDAC1-Interaktionspartnern im Two-Hybrid System

Zum Auffinden von Interaktionspartnern des hVDAC1 kam das Cyto-TrapTM Two-Hybrid System zum Einsatz. In diesem System wurde eine cDNA Bank, die aus isolierter mRNA von H2LCL-Zellen hergestellt wurde, in *Saccharomyces cerevisiae* cdc25H eingebracht und mit dem Fusionsprotein hSos-hVDAC1 als Köder durchsucht.

4.2.1 Konstruktion der H2LCL-cDNA Bank im Vektor pMyr

Aus 1×10^8 H2LCL-Zellen wurde die polyadenylierte RNA mit dem Messenger RNA Isolation Kit aufgereinigt. Von den isolierten 11 μg mRNA wurden 5 μg zur Synthese der cDNA im CytoTrapTM XR Library Construction Kit eingesetzt. Mit den für einen gerichteten Einbau an den 5'- und 3'-Enden der cDNA vorgesehenen *EcoRI*- und *XhoI*-Schnittstellen wurden die cDNA-Fragmente in den Two-Hybrid Vektor pMyr ligiert. Diese Plasmide wurden in kompetente XL10-Gold-Zellen transformiert und führten zu 1×10^6 unabhängigen Klonen, die den vollständigen mRNA-Pool einer H2LCL-Zelle repräsentierten. Zur Amplifikation der cDNA-Bank wurden diese Primärklone auf Selektionsagar-Platten vermehrt, die Zellen abgeschwemmt und ein Titer von 1×10^9 cfu/ml ermittelt. Anschließend konnten aus den angezüchteten Zellen 4 mg vektorielle DNA (pMyr-cDNA) isoliert werden, die die einmal amplifizierte Plasmid-Bank darstellten.

4.2.2 Konstruktion des pSos-Vektors mit hVDAC1

Zur Durchmusterung der H2LCL-cDNA Bank mit hVDAC1 als Köderprotein im Two-Hybrid System wurde die für hVDAC1 kodierende Nukleinsäuresequenz *in frame* in den Vektor pSos kloniert. Der Leserahmen dieses für das Fusionsprotein hSos-hVDAC1 kodierende Konstruktes wurde mittels DNA-Sequenzierung unter Benutzung der Primer Sos-F, Sos-R, Po312-F, Po-462-R und Po752-R bestätigt.

4.2.3 Überprüfung der hVDAC1-Wirkung auf das temperatursensitive Zellwachstum

Die Grundvoraussetzung für die Ermittlung von Interaktionspartnern im CytoTrapTM Two-Hybrid System war, daß hVDAC1 als Köderprotein kein Wachstum der temperatursensitiven cdc25H Hefezellen bei 37 °C induzierte. Um dies zu testen, wurden cdc25H Zellen mit pSos-hVDAC1 und pMyr ohne Insert oder mit pMyr-Lamin C simultan transformiert. Die Ansätze

wurden auf SD/Glu(UL⁻)-Selektionsagar-Platten ausgestrichen, bei 25 °C inkubiert und auf SD/Glu(UL⁻)- und SD/Gal(UL⁻)-Selektionsagar-Platten repliziert. Die Inkubation dieser Platten bei 37 °C führte zu keinem Wachstum der transformierten Hefekolonien. Aufgrund dieses Befundes kann eine direkte Interaktion des hVDAC1 mit dem Protein Ras in der Zelle ausgeschlossen werden. Die in diesem Experiment mit pSos-hVDAC1 und pMyr oder pMyr-Lamin C transformierten Hefezellen sind bei den Kontrollen in Abbildung 21 d, f und h auf Seite 68 dargestellt.

4.2.4 Interaktions-Assay

Eine Übersicht über die grundlegenden Schritte des CytoTrapTM Two-Hybrid Systems zeigt Abbildung 20 auf Seite 65.

Die Two-Hybrid Vektoren pSos-hVDAC1 und pMyr-cDNA wurden simultan in *Saccharomyces cerevisiae* cdc25H transformiert. Von 2 x 10⁶ Hefeklonen, die zwei Tage bei 25 °C auf SD/Glu(UL⁻)-Selektionsagar-Platten gewachsen waren, wurden Replika auf SD/Gal(UL⁻)-Selektionsagar-Platten mit Hilfe von Samtstempeln erstellt. 431 Hefeklone, die auf diesen Platten bei 37 °C wuchsen, wurden auf je zwei SD/Gal(UL⁻)- und SD/Glu(UL⁻)-Selektionsagar-Platten überführt und jeweils bei 25 °C und 37°C inkubiert. Das temperaturabhängige Wachstum der Hefekolonien auf den unterschiedlichen Selektionsnährböden wurde mit dem Wachstumsschema aus Tabelle 2 (Seite 37) verglichen und "Interaktionsklone" identifiziert. 64 Hefekolonien, die bei 37 °C auf SD/Gal(UL⁻)- nicht aber bei 37 °C auf SD/Glu(UL⁻)-Selektionsagar-Platten wuchsen, stellten in dieser ersten Runde des CytoTrapTM Two-Hybrid Systems positive Interaktionsklone dar. Die Kolonien wurden amplifiziert, deren Plasmide isoliert und in *E. coli* transformiert. Unter Verwendung von Selektionsmedium mit Chloramphenicol wurden die *E. coli*-Zellen angereichert und anschließend die pMyr-cDNA Plasmide isoliert.

In einer zweiten Runde des CytoTrapTM Two-Hybrid Systems wurden die pMyr-cDNA Plasmide der 64 Hefekolonien jeweils mit pSos-hVDAC1 simultan in *S. cerevisiae* cdc25H transformiert, auf SD/Glu(UL⁻)-Selektionsagar-Platten ausgestrichen und vier Tage bei 25 °C inkubiert. Jeweils vier Kolonien pro Ansatz wurden nun auf SD/Glu(UL⁻)- und SD/Gal(UL⁻)-Selektionsagar-Platten übertragen und bei 37 °C sechs Tage lang inkubiert. Kolonien, die bei 37 °C sowohl auf SD/Glu(UL⁻)- als auch auf SD/Gal(UL⁻)-Selektionsagar-Platten wuchsen, stellten falsch-positive Klone im Sinne des Systems dar. Hefekolonien aus 13 Transformationsansätzen zeigten ein Galaktose-induziertes Wachstum und repräsentierten

Hefezellen, in denen hVDAC1 mit einem exprimierten Protein der cDNA-Bank interagiert und über das Protein hSos und den RAS-Signalweg Zellwachstum bei 37 °C ermöglicht hat. Diese Hefekolonien wurden von 1 - 13 durchlaufend nummeriert.

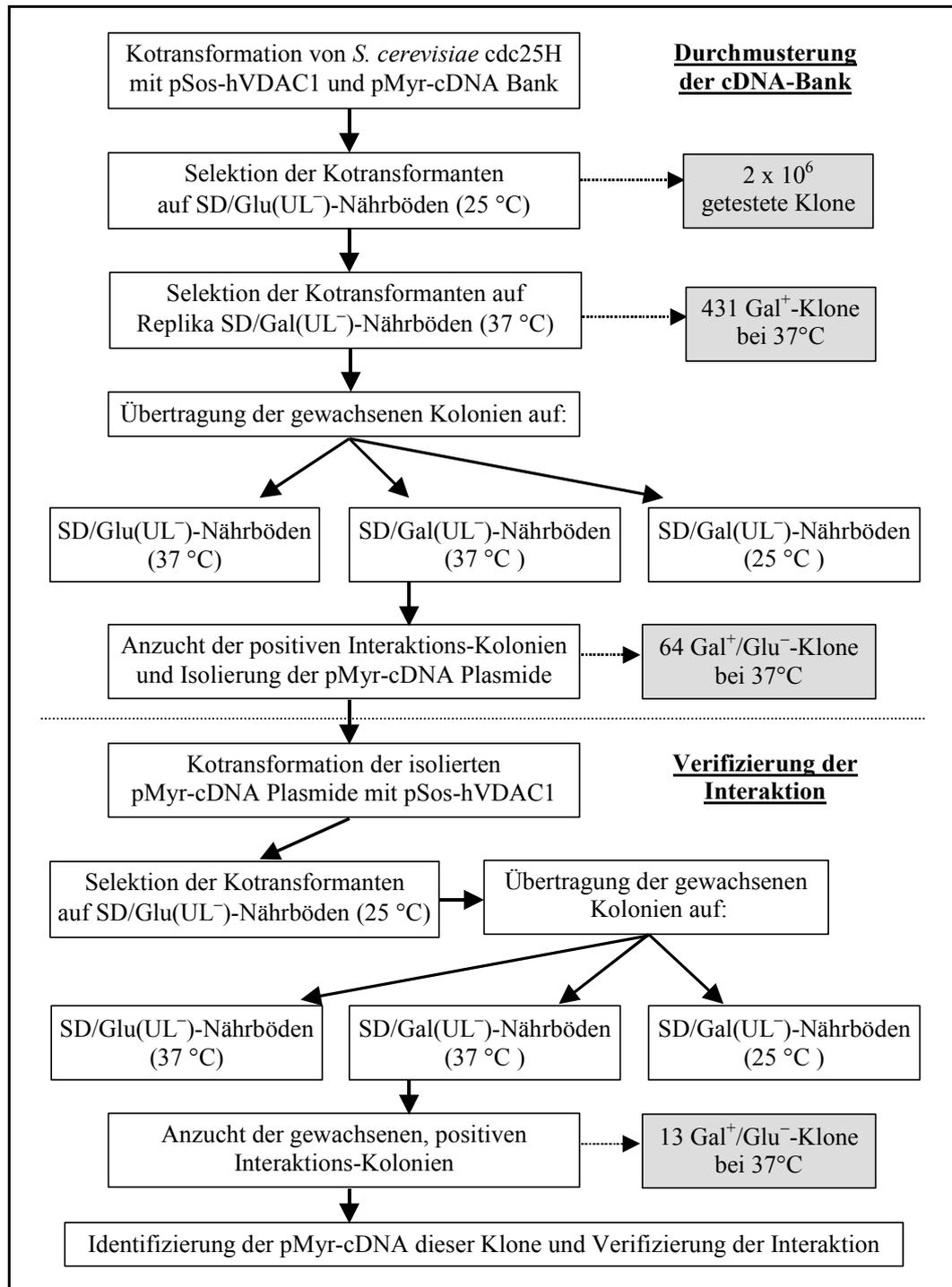


Abbildung 20: Schematische Darstellung der wichtigsten Schritte der Durchmusterung einer H2LCL cDNA-Bank mit hVDAC1 als Köderprotein im CytoTrap™ Two-Hybrid System

Die Anzahl der analysierten und die der identifizierten positiven Hefeklone der einzelnen Abschnitte des Experimentes ist grau hinterlegt

4.2.5 Identifizierung der mit hVDAC1 interagierenden Proteine

Mittels DNA-Sequenzanalyse unter Verwendung der Primer Myr-F bzw. Myr-R wurden die Nukleinsäuresequenzen der pMyr-Plasmide aus den 13 im CytoTrap™ Two-Hybrid System positiven Hefekolonien ermittelt. Die Klone 1, 4, 5, 10 und 13, die Klone 6, 7 und 12 und die Klone 2 und 11 kodierten jeweils für ein identisches Protein. Die Klone 3, 8 und 9 kodierten für unterschiedliche Proteine. Mit Hilfe der erhaltenen DNA-Sequenzdaten der Interaktionspartner wurden nun Datenbankvergleiche (*Sequence search Basic Blast*, NCBI) angestellt und homologe humane Proteine identifiziert. Durch die ermittelten Leserahmen wurde bestätigt, daß die cDNA-Fragmente im Leserahmen mit dem Start-Codon des Vektors pMyr kloniert waren und eine effiziente Expression dieser Proteine gewährleistet war. Die sechs mit hVDAC1 interagierenden Proteine und die Abschnitte dieser Bindungspartner, für die die isolierten cDNA-Fragmente kodieren, sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3: Mit hVDAC1 im CytoTrap™ Two-Hybrid System interagierende Proteine

Bindungspartner	GenBank Accession no.	Größe des Proteins	Homologer Sequenzabschnitt	Gefundene Klone
Tctel1	D50663	113 AS	AS 1 – AS 113	1,4,5,10,13
PBP74/ GRP75	L11066	679 AS	AS 448 – AS 679	2,11
Pyridoxal Kinase	NM_003681	316 AS	AS 245 – AS 316	6,7,12
Sec63	AJ011779	760 AS	AS 676 – AS 760	9
HSP90	M16660	724 AS	AS 1 – AS 229	3
26 S Proteasom Untereinheit s5a	U51007	377 AS	AS 299 – AS 377	8

Die Interaktionen wurden durch das temperaturspezifische Wachstum auf SD/Gal(UL⁻)-Selektionsplatten nachgewiesen

Die Nukleinsäuresequenz der Klone 1, 4, 5, 10 und 13 kodiert für die leichte Dyneinkette Tctel1 (Watanabe *et al.*, 1996). Da für dieses Protein in der Literatur von anderen Arbeitsgruppen einheitlich die Bezeichnung Tctex1 Verwendung findet, wird in der fortlaufenden Arbeit ebenfalls dieser Name für das Proteine benutzt. In der für Tctex1 kodierenden cDNA wurden für den 5'-untranslatierten Bereich zusätzlich 4 Nukleotide

ermittelt. Die unter der *Accession no.* D50663 veröffentlichte Sequenz wird somit am 5'-Ende um die Basen ACGC ergänzt.

Die Nukleinsäuresequenzen der Klone 2 und 11 kodieren für das Peptid-binding Protein 74 (PBP74), das von Domanico *et al.* (1993) als Mitglied der HSP70 Familie identifiziert wurde. Die unter der *Accession no.* L11066 veröffentlichte Sequenz kodiert für ein 679 AS großes Protein, dessen 232 C-terminalen AS mit dem durch die pMyr-cDNA kodierte Aminosäuresequenz identisch sind.

Die cDNA der Klone 6, 7 und 12 kodieren für 72 C-terminale AS der durch Hanna *et al.* (1997) identifizierten Pyridoxal Kinase.

Das durch die pMyr-cDNA in Klon 9 kodierte Protein ließ durch den Datenbankvergleich einem Abschnitt des ER-Proteins Sec63 zuordnen. Die 85 AS entsprachen dem C-Terminus des von Skowronek *et al.* (1999) beschriebenen Proteins.

Die 229 AS, die durch die pMyr-cDNA in Klon 3 kodieren, erwiesen sich als homolog zum N-Terminus des HSP90 (Rebbe *et al.*, 1987).

Die cDNA aus Klon 8 kodiert für einen aus 79 AS bestehenden Proteinabschnitt der s5a-Untereinheit des 26 S Proteasoms (Ferrell *et al.*, 1996).

4.2.6 Bestätigung der Bindungsspezifität der interagierenden Proteine

Zur einwandfreien Bestätigung der Interaktion im CytoTrapTM Two-Hybrid System wurden die für die identifizierten Proteine kodierenden pMyr-Plasmide einerseits mit pSos-hVDAC1 und andererseits mit pSos simultan in *S. cerevisiae* cdc25H transformiert. Zur weiteren Überprüfung wurden cdc25H-Hefezellen zudem mit Kontrollplasmiden kotransformiert. Dabei kamen die Plasmidkombinationen pSos-hVDAC1 mit pMyr, pSos-hVDAC1 mit pMyr-Lamin C, pSos-MafB mit pMyr-MafB und pSos mit pMyr zum Einsatz (Abbildung 21 a und b). Die Transformationsansätze wurden auf SD/Glu(UL⁻)-Selektionsagar-Platten ausgestrichen und bei 25 °C inkubiert. Pro Transformationsansatz wurden vier, für die Kontrollansätze acht Kolonien auf SD/Glu(UL⁻)-Selektionsagar-Platten (Abbildung 21 e und f) und SD/Gal(UL⁻)-Selektionsagar-Platten (Abbildung 21 g und h) übertragen und bei 37 °C inkubiert. Daneben wurden Kolonien nach dem gleichen Verteilungsmuster auf SD/Glu(UL⁻)-Selektionsagar-Platten bei 25 °C inkubiert (Abbildung 21 c und d). Die Selektionsagar-Platten zeigen ein durch Galaktose induziertes Wachstum bei 37 °C der cdc25H-Hefezellen, die mit pSos-hVDAC1 und dem jeweiligen der sechs pMyr-cDNA Plasmide simultan transformiert wurden.

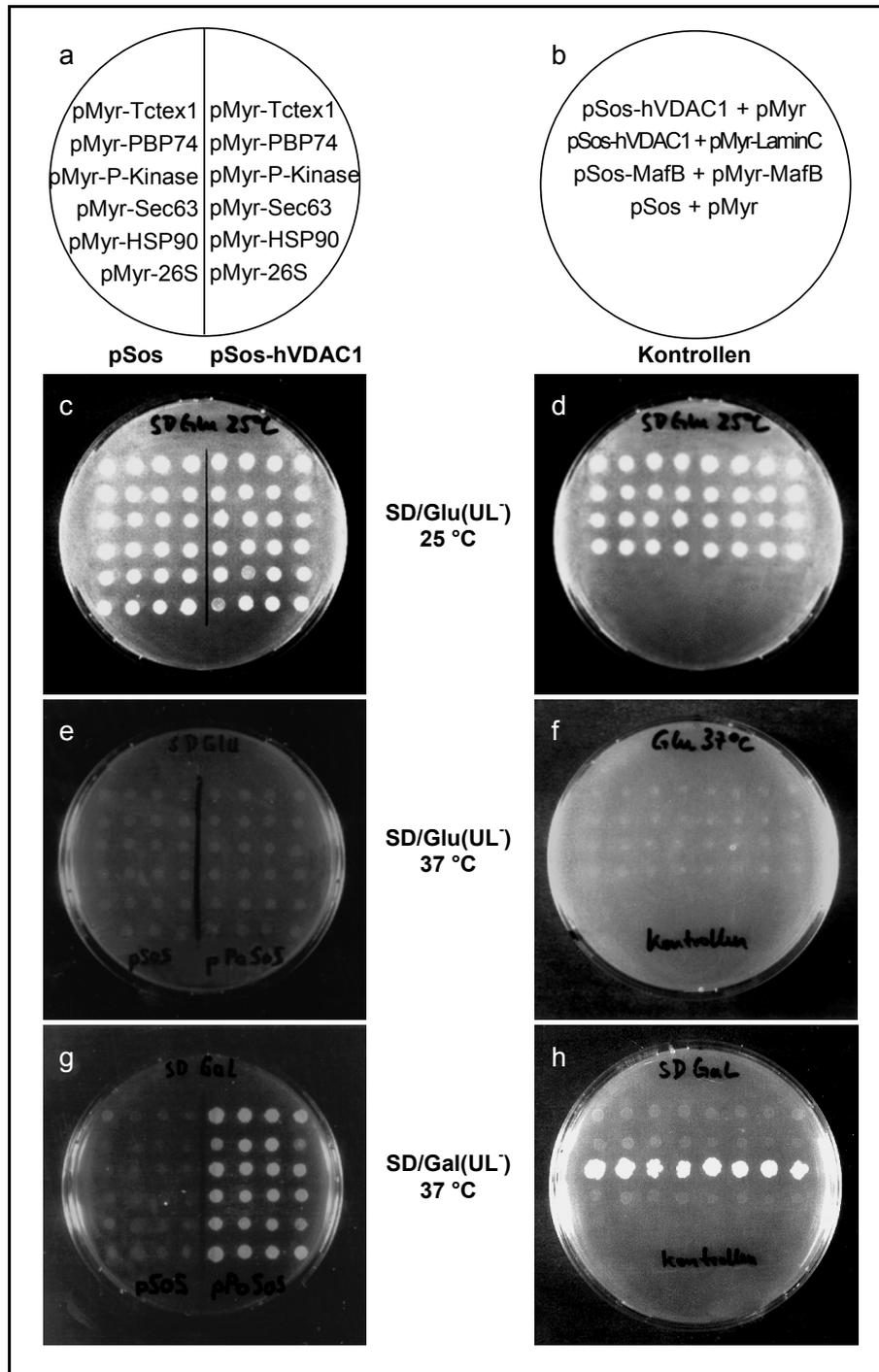


Abbildung 21: Interaktionsspezifisches Wachstum von *S. cerevisiae* cdc25H nach simultaner Transformation mit spezifischen pSos- und pMyr-Plasmiden

Die zur Kotransformation von *S. cerevisiae* cdc25H eingesetzten Plasmidkombinationen des Interaktionsassays sind schematisch in **a** dargestellt. Pro Reihe wurde ein spezifisches pMyr-cDNA Plasmid jeweils in die ersten vier Hefeklonen mit pSos und die letzten vier mit pSos-hVDAC1 kotransformiert. Die Verteilung dieser Hefezellen gilt für **c**, **e** und **g**. Die Verteilung der zur Transformation eingesetzten Plasmidkombinationen des Kontrollexperimentes (**d**, **f** und **h**) ist schematisch in **b** dargestellt. Pro Reihe wurden auf diesen Platten jeweils acht, mit den gleichen Plasmiden kotransformierte Hefeklonen angeordnet. **c** und **d**: Wachstum der Zellen bei 25 °C auf SD/Glu(UL)-Platten. **e** und **f**: temperatursensitives Wachstum bei 37 °C auf SD/Glu(UL)-Platten. **g** und **h**: temperatursensitives, Galaktose-induziertes Wachstum bei 37 °C auf SD/Gal(UL)-Platten

Diese Zellen wuchsen dagegen nicht auf Glukose-Nährböden bei 37 °C. *S. cerevisiae* cdc25H-Zellen, die mit pSos statt pSos-hVDAC1 und dem jeweiligen pMyr-cDNA Plasmid transformiert wurden, zeigten zudem kein Wachstum auf Glukose- und Galaktose-haltigen Nährböden. Dadurch konnte eine eigenständige Aktivierung des Ras-Signalweges durch die Interaktionspartner ausgeschlossen werden.

Die Transformation mit den Kontrollplasmiden des CytoTrap™ Two-Hybrid Systems führte zu den erwarteten Ergebnissen. Die Plasmidkombinationen pSos-hVDAC1+pMyr, pSos-hVDAC1+pMyr-Lamin C und pSos+pMyr ließen den transformierten Hefezellen kein Wachstum bei 37 °C auf SD/Glu(UL⁻)- und SD/Gal(UL⁻)-Selektionsagar-Platten zu. hVDAC1 komplementierte in dem Versuch also nicht allein den temperaturabhängigen Wachstumsdefekt des Hefestammes. *Saccharomyces cerevisiae* cdc25H, die hingegen mit pSos-MafB und pMyr-MafB als Positiv-Kontrolle simultan transformiert wurde, zeigte durch die stattfindende Interaktion die Aktivierung des RAS-Signalweges und somit ein Galaktose-induziertes Wachstum bei 37 °C. Die Spezifität des durch Galaktose induzierten Wachstums dieser Transformanten wird durch die ausgebliebene Zellteilung auf SD/Glu(UL⁻)-Selektionsagar-Platten bei 37 °C bestätigt (Abbildung 21).

4.2.7 Proteinchemische Verifizierung der ermittelten Protein/Protein-Interaktionen

Die *in vivo* durch das CytoTrap™ Two-Hybrid System nachgewiesenen Interaktionen zwischen hVDAC1 und einer Auswahl der Bindungspartner wurde mit Hilfe proteinchemischer Methoden bestätigt. Hierfür wurden die Proteine Tctex1 und PBP74 ausgewählt, da zum einen spezifische Antikörper gegen diese Proteine zugänglich waren. Zum anderen werden beide Interaktionspartner im Zusammenhang mit dem Transport von Proteinen diskutiert und mit Mitochondrien und der Plasmamembran in Verbindung gebracht. Da der Transport von hVDAC1 in der Zelle bisher noch nicht aufgeklärt ist, waren diese beiden Interaktionspartner von besonderem Interesse.

Zunächst wurden die Interaktionspartner in *E. coli* heterolog exprimiert, aufgereinigt und anschließend zu *in vitro*-Bindungsstudien mit aus H2LCL-Zellen isoliertem hVDAC1 eingesetzt.

4.2.7.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem Tctex1

Der für Tctex1 kodierende Leserahmen wurde aus der H2LCL-cDNA mittels PCR unter Verwendung der Primer TcGex-F und TcGex-R amplifiziert und in den Vektor pGEX-KG

kloniert. *E. coli* BL21 (DE3)pLys wurden mit diesem Plasmid transformiert und das resultierende Fusionsprotein GST-Tctex1 überexprimiert. Die Aufreinigung des rekombinanten Tctex1 erfolgte unter Gebrauch von Glutathion-Sepharose®4B. rTctex1 wurde über die N-terminal fusionierte Glutathion S-Transferase an der Säulenmatrix immobilisiert. Das vollständige Fusionsprotein konnte einerseits durch reduziertes Glutathion von der Säule eluiert werden. Die Verwendung von Thrombin erlaubte andererseits durch eine eingebaute Thrombinschnittstelle zwischen der Glutathion S-Transferase und Tctex1 die proteolytische Isolierung des reinen rTctex1. Die einzelnen Fraktionen der Aufreinigung wurden aufgefangen, im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 22, links) und auf eine PVDF-Membran transferiert. Das rekombinante Tctex1 konnte anschließend auf dieser immunologisch in den einzelnen Fraktionen identifiziert werden (Abbildung 22, rechts). In den Fraktionen Zellaufschluß (Spur 13), Solubilisat (Spur 14), Zellpellet (Spur 15), Durchbruch (Spur 16) und Glutathion-Eluat (Spur 18) markierte der polyklonale Kaninchen anti-Tctex1 Antikörper eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 40 kDa. Die zusätzlich angefärbten Proteine in den Spuren 13, 14 und 15 waren in den aufgereinigten Fraktionen nicht mehr enthalten und resultierten aus Kreuzreaktionen der Antikörper oder aus Abbaufragmenten des Expressionsproduktes. Diese 40 kDa Bande beinhaltet das rGST-Tctex1-Fusionsprotein. Das durch Thrombin von dem Fusionsprotein abgespaltene Tctex1 wurde in Spur 19 registriert und zeigte das für dieses Protein erwartete Molekulargewicht von ca. 14 kDa. Diese Fraktion wurde zu Protein-Bindungsstudien mit hVDAC1 eingesetzt.

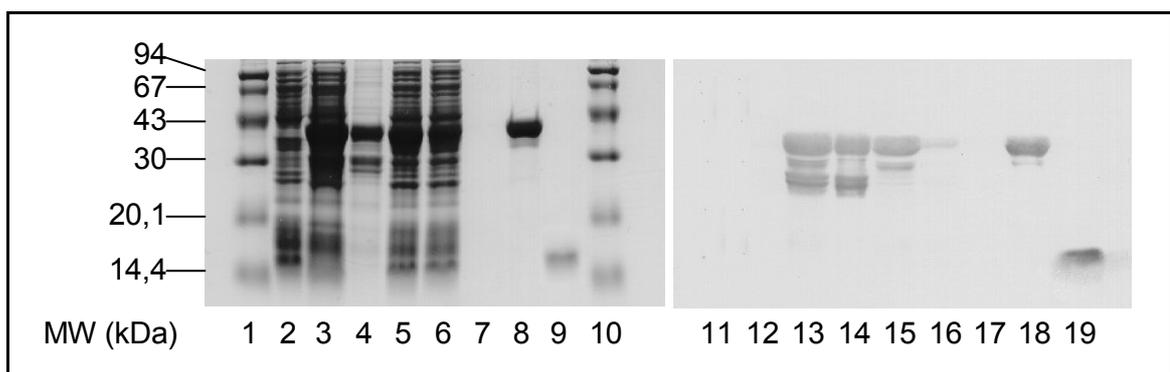


Abbildung 22: Aufreinigung von rekombinantem Tctex1 an Glutathion-Sepharose®4B

Dargestellt ist ein Coomassie gefärbtes 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel (Spuren 1 bis 10) und der entsprechende Westernblot nach Immunreaktion mit anti-Tctex1-Antiserum (Spuren 11-19). Spuren 1, 10 und 11: LMW-Marker, Spuren 2 und 12: Gesamtzellaufschluß vor Induktion, Spuren 3 und 13: Gesamtzellaufschluß nach Induktion, Spuren 4 und 14: Solubilisat, 5 und 15: Zellpellet, 6 und 16: Säulendurchbruch, 7 und 17: Waschfraktion, 8 und 18: Glutathion-Eluat, 9 und 19: Thrombin-Eluat

4.2.7.2 *In vitro*-Assoziation von hVDAC1 und Tctex1 im Überlagerungsassay

Zur proteinchemischen Verifizierung der *in vivo*-Interaktion von hVDAC1 mit Tctex1 aus dem Two-Hybrid System kam der Überlagerungstest zur Anwendung. Hierfür wurden die beiden Proteine parallel nebeneinander mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 23 a) und anschließend auf der PVDF-Membran immobilisiert. Eine Membranhälfte wurde in rTctex1-Lösung, die andere in TBS/PBS-Puffer ohne rTctex1 inkubiert. Anschließend wurden gebundene rTctex1-Moleküle immunologisch durch den anti-Tctex1 Antikörper detektiert. Die nach Inkubation in einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper aufgetretene Farbreaktion mit Chlornaphthol/H₂O₂ zeigt Abbildung 23 b.

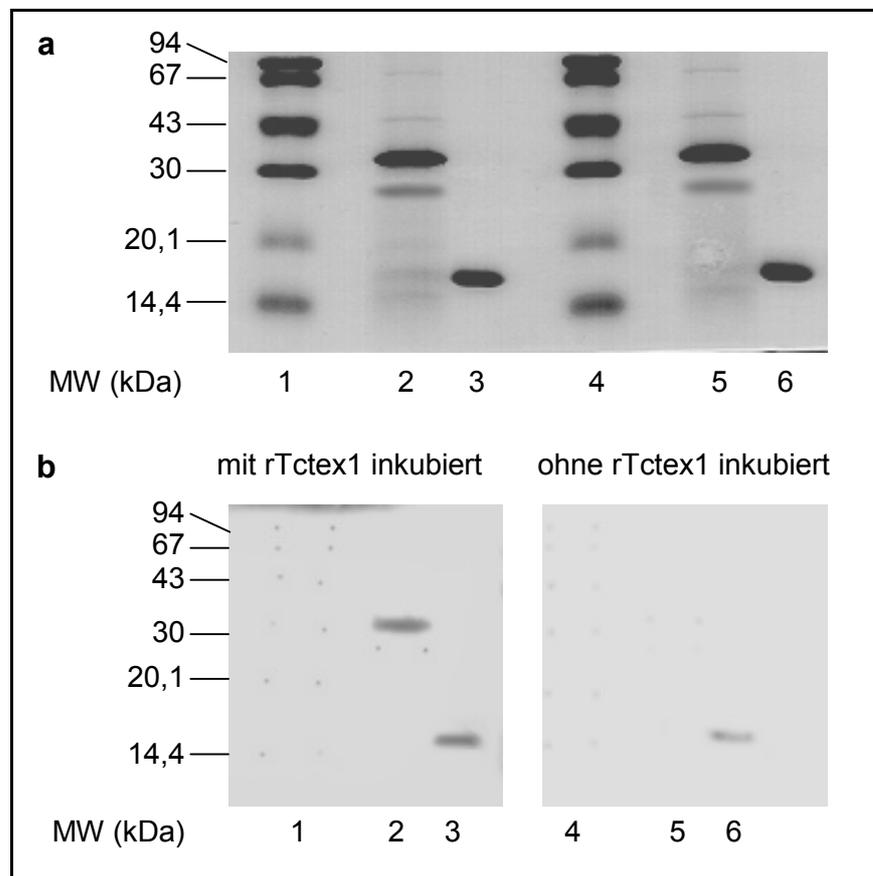


Abbildung 23: Nachweis der Protein/Protein Interaktion von hVDAC1 mit rTctex1 im Überlagerungsassay

Das Coomassie gefärbte 12 %ige SDS-Polyacrylamidgel ist in **a** dargestellt. Spuren 1 und 4: LMW-Marker, Spuren 2 und 5: aus H2LCL-Zellen aufgereinigtes hVDAC1, Spuren 3 und 6: rekombinantes Tctex1. Abbildung **b** zeigt den entsprechenden Westernblot nach Immunreaktion mit dem anti-Tctex1 Antikörper. Die in den Spuren aufgetragenen Proben entsprechen der Verteilung in **a**. Die linke Membran wurde mit, die rechte ohne rTctex1 inkubiert.

Die linke Membran in Abbildung 23 b wurde mit rTctex1-Lösung inkubiert. Auf dieser wurde in Spur 2 eine Proteinbande in Höhe des für hVDAC1 charakteristischen Molekulargewichtes durch den anti-Tctex1 Antikörper detektiert. Eine weitere Proteinbande dieser Spur mit einem niedrigeren Molekulargewicht trat mit Tctex nicht in Wechselwirkung. Diese Proteinbande interagiert mit einem gegen den N-Terminus von hVDAC1 gerichteten Antikörper und wurde durch Proteinsequenzierung als ein Abbaufragment des hVDAC1 identifiziert (Kiafard, persönliche Mitteilung). Da Tctex1 mit dem vollständigen, nicht aber mit diesem C-terminal verkürzten hVDAC1 interagiert, ist der C-terminale Abschnitt des hVDAC1 bei der Interaktion von Bedeutung. Das in Spur 3 zur Kontrolle aufgetragene Tctex1 wurde ebenfalls immunologisch erkannt. Zudem fand mit keiner der Marker-Banden eine unspezifische Farbreaktion statt. Daß die Anfärbung der hVDAC1-Proteinbande in Spur 2 durch die Interaktion mit rTctex1 und nicht durch eine unspezifische Kreuzreaktion der verwendeten Antikörper hervorgerufen wurde, bestätigt die Farbreaktion der rechten Membran in Abbildung 23 b. Diese Membran wurde an Stelle von rTctex1 mit TBS/PBS-Puffer inkubiert und zeigt in Spur 5 keine Farbreaktion im Bereich des für hVDAC1 charakteristischen Molekulargewichtes. Das in Spur 6 zur Kontrolle des immunologischen Nachweises aufgetragene rTctex1 wurde hingegen vom anti-Tctex1 Antikörper erkannt. Die Interaktion zwischen hVDAC1 und Tctex1 im CytoTrap™ Two-Hybrid System wurde durch diesen *in vitro*-Bindungstest proteinchemisch bestätigt.

4.2.7.3 Expression und Aufreinigung von rekombinantem Δ PBP74

Der durch das Two-Hybrid System ermittelte, zu einer Interaktion mit hVDAC1 führende Sequenzabschnitt von PBP74 wurde in einer PCR mit den Primern PBP74-448-F und PBP74-R amplifiziert und in den Expressionsvektor pGEX-KG kloniert (pGEX- Δ PBP74). In einem parallelen Ansatz wurde unter Verwendung der Primer PBP74-F und PBP74-R in einer PCR der vollständige Leserahmen des PBP74 amplifiziert und in pGEX-KG eingebracht (pGEX-PBP74). Nach Überprüfung der Nukleinsäuresequenzen mittels DNA-Sequenzanalyse unter Verwendung spezifischer Primer wurden *E. coli* BL21 (DE3)pLys-Zellen mit dem jeweiligen Plasmid zur heterologen Expression der resultierenden Fusionsproteine GST-PBP74 und GST- Δ PBP74 überexprimiert. Bei der anschließenden Aufreinigung der GST-Fusionsproteine an immobilisierter Glutathion-Sepharose® 4B ließ sich das vollständige PBP74 nicht isolieren, da das Protein unlöslich in *inclusion bodies* vorlag. Im weiteren Experiment wurde daher mit dem rekombinanten Δ PBP74 gearbeitet, welches über

Glutathion-Sepharose[®]4B aufgereinigt werden konnte. Die solubilisierten Proteine des Zellaufschlusses wurden über die Säule gegeben und das gebundene GST-Fusionsprotein mit reduziertem Glutathion eluiert. Reines Δ PBP74 wurde vom dem an Glutathion-Sepharose[®]4B gebundenen GST-Fusionsprotein durch Thrombin abgespalten. Die gesammelten Fraktionen der Aufreinigung wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 24, Spuren 1-10) und auf die PVDF-Membran übertragen. Die Identität der Expressionsprodukte wurde anschließend mit dem monoklonalen anti-mtHSP70 Antikörper überprüft (Abbildung 24, Spuren 11-20).

In den Fraktionen Zellaufschluß (Spur 13), Solubilisat (Spur 14), Zellpellet (Spur 15) und Durchbruch (Spur 16) markierte der monoklonale Maus anti-mtHSP70 Antikörper eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 52 kDa neben weiteren, kleineren *E. coli* Proteinen. In dem aufgereinigten Glutathion-Eluat (Spur 18) wurde nur noch die 52 kDa Bande detektiert. Diese Bande beinhaltet das rGST- Δ PBP74-Fusionsprotein. Das durch Thrombin von dem Fusionsprotein abgespaltene r Δ PBP74 wurde in Spur 19 registriert und zeigte das erwartete Molekulargewicht von ca. 26 kDa. Diese Fraktion wurde zu Proteinbindungstests mit hVDAC1 eingesetzt.

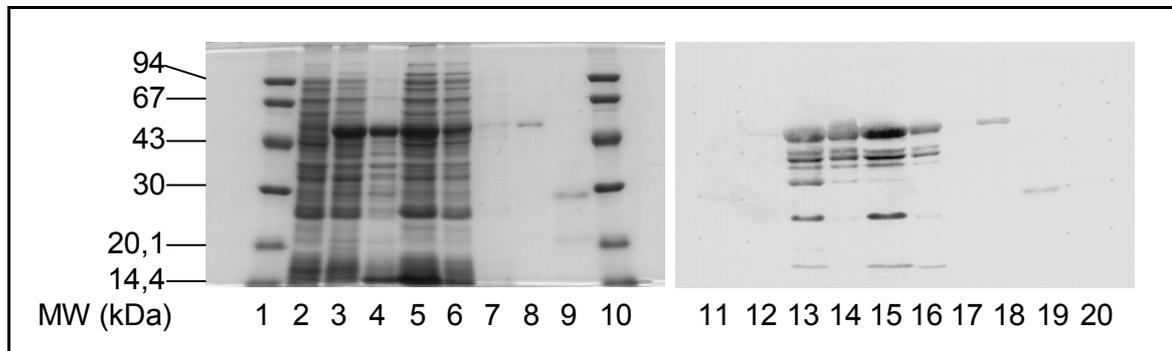


Abbildung 24: Aufreinigung von rekombinantem PBP74 an Glutathion-Sepharose[®]4B

Dargestellt ist ein Coomassie gefärbtes, 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel (Spuren 1 bis 10) und der entsprechende Westernblot nach Immunreaktion mit dem anti-mtHSP70 Antikörper (Spuren 11-19). Spuren 1, 10 und 11: LMW-Marker, Spuren 2 und 12: Gesamtzellaufschluß vor Induktion, Spuren 3 und 13: Gesamtzellaufschluß nach Induktion, Spuren 4 und 14: Solubilisat, 5 und 15: Zellpellet, 6 und 16: Säulendurchbruch, 7 und 17: Waschfraktion, 8 und 18: Glutathion-Eluat, 9 und 19: Thrombin-Eluat

4.2.7.4 *In vitro*-Assoziation von hVDAC1 und Δ PBP74 im Überlagerungsassay

Die im Two-Hybrid System ermittelte Interaktion zwischen hVDAC1 und Δ PBP74 wurde proteinchemisch mit Hilfe des Überlagerungstests *in vitro* überprüft. Beide Proteine wurden zweimal nebeneinander mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 25 a) und auf der PVDF-Membran immobilisiert. Eine Membranhälfte wurde in r Δ PBP74-Lösung, die andere in Puffer

ohne r Δ PBP74 inkubiert. Anschließend wurden gebundene r Δ PBP74-Moleküle immunologisch durch den anti-mtHSP70 Antikörper detektiert. Abbildung 25 b zeigt die nach Inkubation mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper aufgetretene Farbreaktion mit Chlornaphthol/H₂O₂.

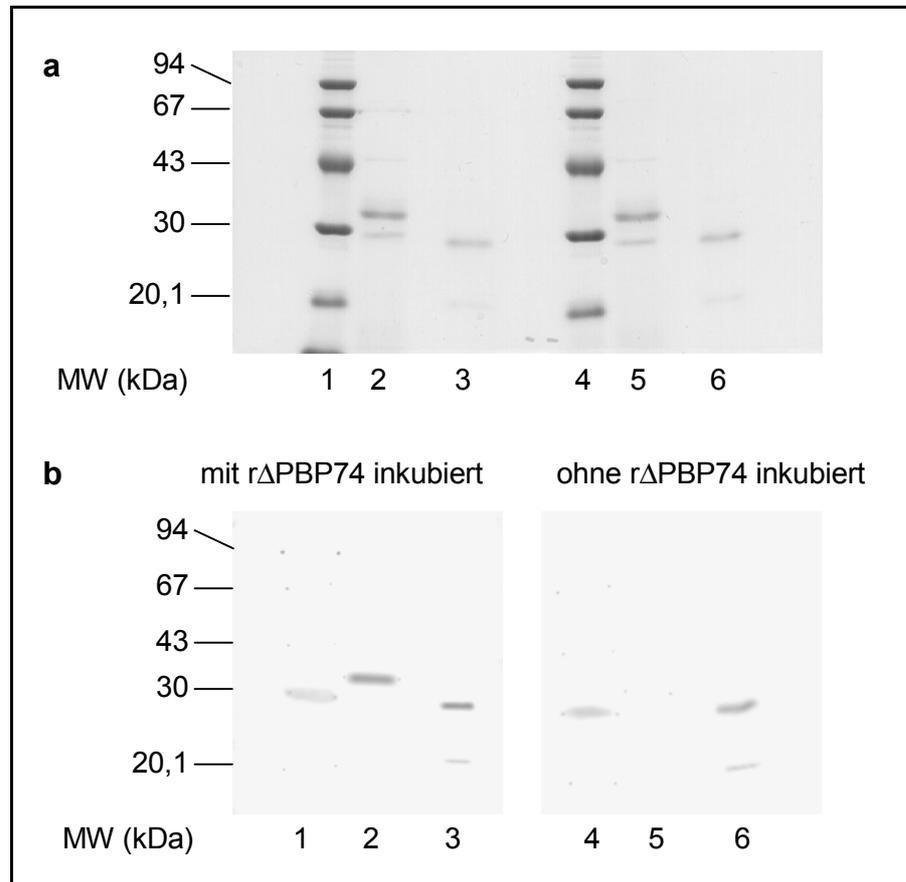


Abbildung 25: Nachweis der Protein/Protein Interaktion von hVDAC1 mit r Δ PBP74 im Überlagerungsassay

Das Coomassie gefärbte, 12 %ige SDS-Polyacrylamidgel ist in **a** dargestellt. Spuren 1 und 4: LMW-Marker, Spuren 2 und 5: aus H2LCL-Zellen aufgereinigtes hVDAC1, Spuren 3 und 6: rekombinantes Δ PBP74. Abbildung **b** zeigt den entsprechenden Westernblot nach Immunreaktion mit dem anti-mtHSP70 Antikörper. Die in den Spuren aufgetragenen Proben entsprechen der Verteilung in **a**. Die linke Membran wurde mit, die rechte ohne r Δ PBP74 inkubiert.

Das in Spur 2 der Abbildung 25 b immobilisierte hVDAC1 wurde durch den anti-mtHSP70 Antikörper markiert. Die so nachgewiesene Bindung von r Δ PBP74 an hVDAC1 ist spezifisch, da in Spur 5 des Kontrollansatzes keine Farbreaktion erfolgte. Da auch für r Δ PBP74 keine Anbindung an das hVDAC1-Abbaufragment in Spur 2 erfolgte, ist der C-Terminale Abschnitt des hVDAC1 an der Proteininteraktion beteiligt. Die Markierung der 30 kDa Bande des Molekulargewicht-Markers in Spur 1 wurde durch eine Kreuzreaktion der verwendeten Antikörper und nicht durch die Bindung von r Δ PBP74 hervorgerufen. Dies

belegt die Anfärbung der 30 kDa Bande des Molekulargewicht-Markers in Spur 4 des Kontrollansatzes, der nicht mit r Δ PBP74 inkubiert wurde aber trotzdem eine Farbreaktion aufweist.

4.2.8 Lokalisierungsstudien der interagierenden Proteine in HeLa-Zellen

Die Verteilung von hVDAC1, Tctex1 und PBP74 in HeLa-Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei wurden hVDAC1, Tctex1 und PBP74 immunologisch durch spezifische Erstantikörper und fluoreszierende Zweitantikörper angefärbt. Neben der immunologischen Visualisierung des endogenen HeLa-hVDAC1 wurden auch hVDAC1 N- bzw. C-terminal als EGFP-Fusionsprotein transient in HeLa-Zellen exprimiert und die Lokalisierung der Expressionsprodukte Fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

4.2.8.1 Kolokalisierung von hVDAC1 mit Tctex1

Die im CytoTrapTM Two-Hybrid System ermittelte und proteinchemisch bestätigte Interaktion von hVDAC1 mit Tctex1 eröffnete die Frage nach der zellulären Verteilung beider Proteine *in vivo*. Zur Klärung dieser Frage wurden HeLa-Zellen auf Deckgläschen angezüchtet, mit Azeton oder Formaldehyd fixiert und unspezifische Bindungsstellen mit Ziegennormalserum abgesättigt. Die Präparate wurden nacheinander mit spezifischen Primärantikörpern und anschließend mit FITC- bzw. TRITC-markierten Sekundärantikörpern inkubiert. Nach der Kernfärbung wurden die Deckgläschen auf Objektträger überführt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Aus den Doppelmarkierungen in Abbildung 26 a bis d geht eindeutig hervor, daß sich die durch anti-hVDAC1 und anti-Tctex1 Antikörper identifizierten Regionen überschneiden. Beide Proteine befinden sich intrazellulär zwischen der Kern- und Zellmembran. Der Bereich um den Zellkern weist dabei eine intensive Markierung auf. In der Peripherie der Zellen wurden fädige Strukturen durch die Antikörper markiert. Die Region des durch den Hoechstfarbstoff identifizierten Zellkerns wurde durch die Antikörper ausgespart. Eine eigenständige Markierung der Zellmembran konnte in den analysierten Präparaten nicht dargestellt werden, da die zytoplasmatischen Markierungen bis an die Plasmamembran reichten.

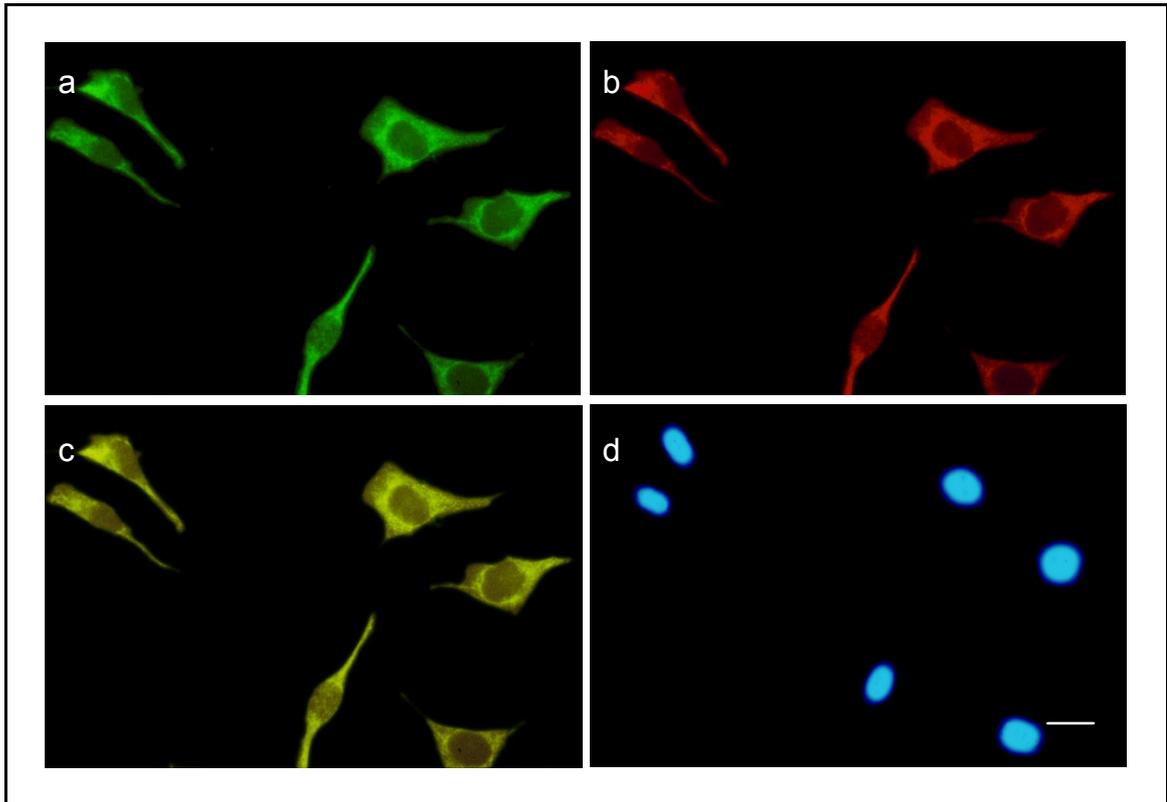


Abbildung 26: Kolokalisierung von hVDAC1 und Tctex1 in HeLa-Zellen

Lichtmikroskopische Darstellung der Immunfluoreszenz einer doppelmarkierten HeLa-Zelle nach Formaldehyd-Fixierung und Kernfärbung. **a:** anti-hVDAC1 Primär- und FITC-konjugierter Sekundärantikörper, **b:** anti-Tctex1 Primär- und TRITC-konjugierter Sekundärantikörper, **c:** Doppelbelichtung der FITC- und TRITC-Fluoreszenz, **d:** Fluoreszenz des Kernfarbstoffes. Kalibrierungsbalken = 10 μm

Parallel zur immunologischen Detektion von endogenem hVDAC1 wurden hVDAC1-EGFP und EGFP-hVDAC1 Fusionsproteine in HeLa-Zellen exprimiert. Die transient mit den entsprechenden Plasmiden transfizierten HeLa-Zellen wurden nach 48 stündiger Inkubation fixiert, endogenes Tctex1 immunologisch markiert und vor der mikroskopischen Betrachtung einer Kernfärbung unterzogen.

Die Doppelmarkierung von EGFP/hVDAC1 und Tctex1 ist beispielhaft in Abbildung 27 a bis d dargestellt und zeigt ein überlappendes Verteilungsmuster beider Proteine. Die zytoplasmatischen Signale des EGFP-hVDAC1 und Tctex1 lagen in Regionen um den Zellkern. Im Vergleich zu der oben dargestellten immunologischen Detektion untransfizierter HeLa-Zellen waren die Fluoreszenzsignale beider Proteine in der Peripherie transformierter Zellen schwächer ausgeprägt. Für das hVDAC1-EGFP Fusionsprotein und Tctex1 wurde ein entsprechendes Expressionsmuster identifiziert (Daten nicht gezeigt).

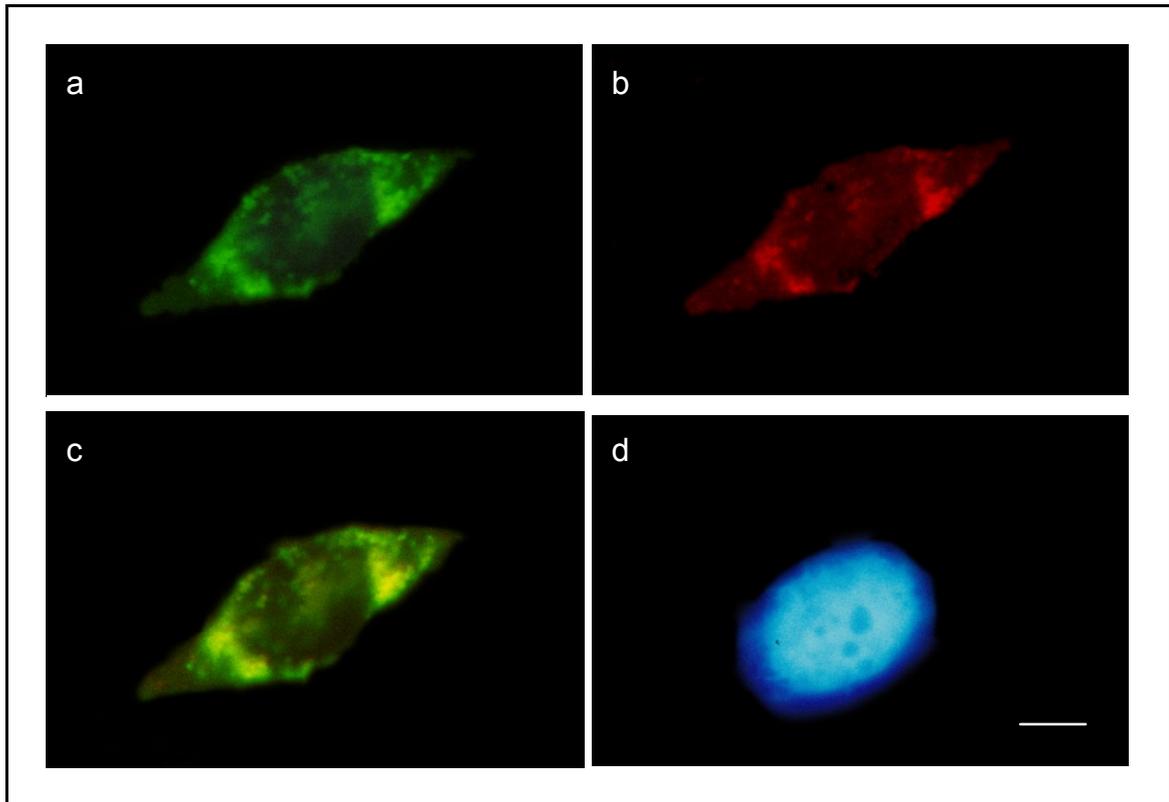


Abbildung 27: Kolokalisierung von EGFP-hVDAC1 Fusionsproteinen und Tctex1 in HeLa-Zellen

Lichtmikroskopische Darstellung der Fluoreszenz von Azeton-fixierten HeLa-Zellen 48 h nach Transfektion mit EGFP/hVDAC1 **a**: Fluoreszenz des EGFP/hVDAC1 Fusionsproteins, **b**: anti-Tctex1 Primär- und TRITC-konjugierter Sekundärantikörper, **c**: Doppelbelichtung der EGFP/hVDAC1- und TRITC-Fluoreszenz, **d**: Fluoreszenz des Kernfarbstoffes. Kalibrierungsbalken = 5 μ m

4.2.8.2 Kolokalisierung von hVDAC1 mit PBP74

Analog zu den Lokalisierungsstudien von hVDAC1 mit Tctex1 wurde das Expressionsmuster mit PBP74 untersucht. In diesem Experiment wurde hVDAC1 immunologisch durch polyklonale Kaninchen anti-hVDAC1 Antikörper und als N- bzw. C-terminales EGFP-Fusionsprotein in HeLa-Zellen detektiert. PBP74-Moleküle wurden durch monoklonale anti-mtHSP70 Antikörper identifiziert. Die immunologische Doppelmarkierung in Abbildung 28 a bis d zeigt ein nahezu identisches Verteilungsmuster von hVDAC1 und PBP74 im Zytoplasma. Die durch die Kernfärbung charakterisierte Region des Zellkerns zeigte keine immunologische Markierung. Der Bereich der Plasmamembran ließ sich in den untersuchten Zellen aufgrund der starken zytoplasmatischen Markierung nicht klar von dieser abgrenzen.

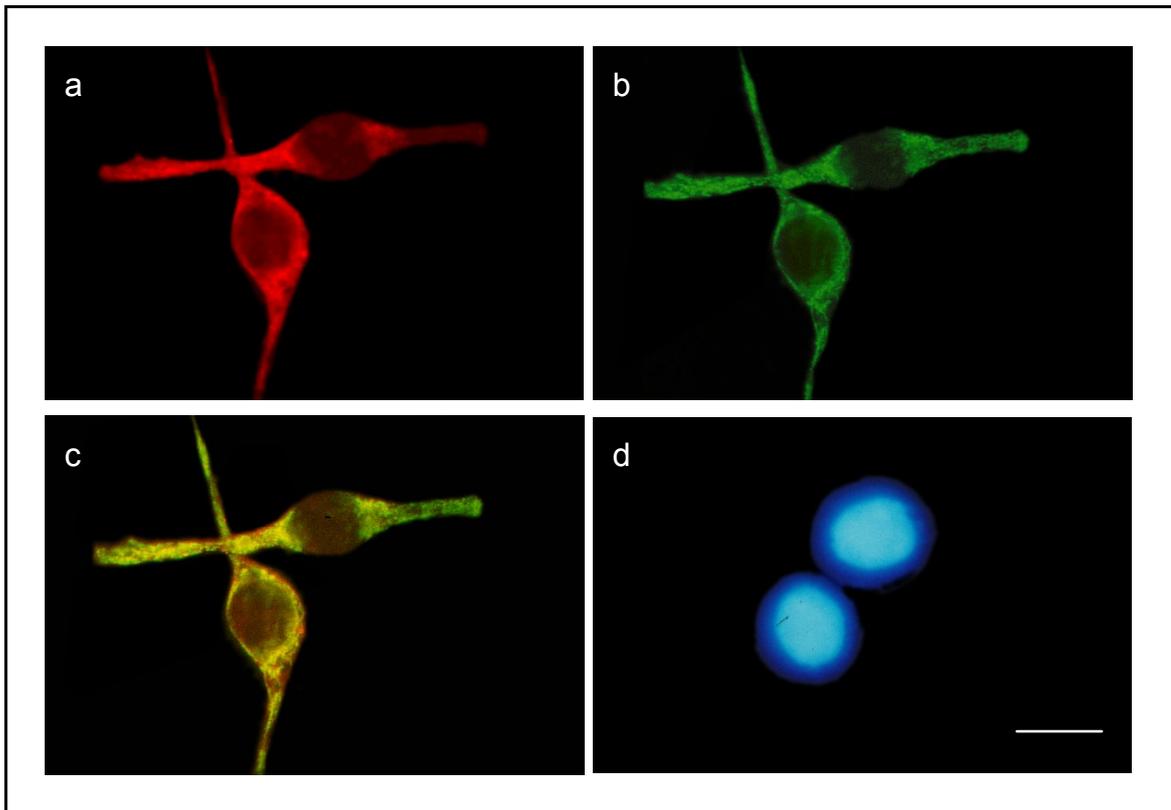


Abbildung 28: Kolokalisierung von hVDAC1 und PBP74 in HeLa-Zellen

Lichtmikroskopische Darstellung der Immunfluoreszenz einer doppelmarkierten HeLa-Zelle nach Formaldehyd-Fixierung und Kernfärbung. **a:** anti-hVDAC1 Primär- und TRITC-konjugierter Sekundärantikörper, **b:** anti-mtHSP70 Primär- und FITC-konjugierter Sekundärantikörper, **c:** Doppelbelichtung der FITC- und TRITC-Fluoreszenz, **d:** Fluoreszenz des Kernfarbstoffes. Kalibrierungsbalken = 10 µm

Untersuchungen des EGFP/hVDAC1 Fusionsproteins und des immunologisch identifizierten, TRITC-markierten PBP74 zeigen ebenfalls eine Kolokalisierung beider Proteine. In diesen Zellen wurden Regionen im Zytoplasma um den Zellkern hervorgehoben, in der Zellperipherie war die Intensität der Markierungen dagegen schwächer ausgeprägt (Abbildung 29 a bis d). Die Verteilung des hVDAC1/EGFP Fusionsproteins ließ sich von dem N-terminalen EGFP/hVDAC1 Fusionsprotein nicht unterscheiden und zeigte ebenfalls eine Kolokalisierung mit PBP74 (Daten nicht gezeigt).

Aus diesen Experimenten geht deutlich hervor, daß hVDAC1 und PBP74 in HeLa-Zellen kolokalisiert sind.

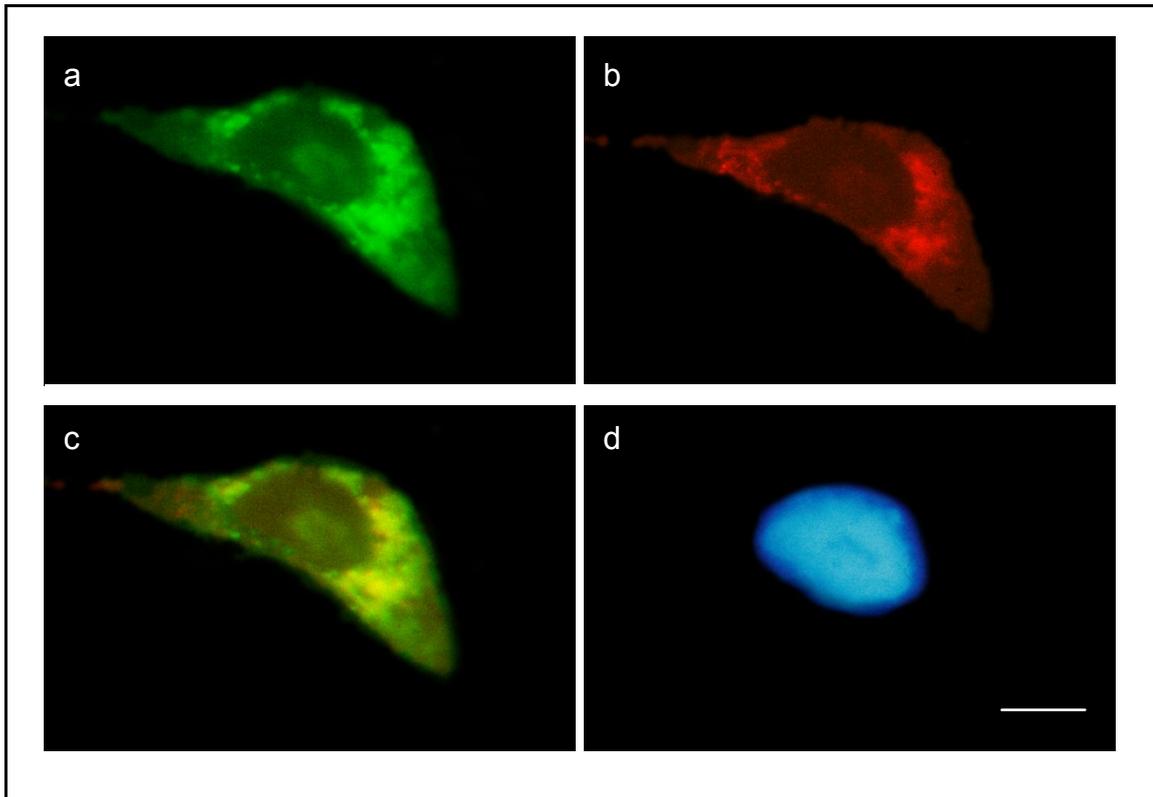


Abbildung 29: Kolokalisierung von EGFP-hVDAC1 Fusionsproteinen und PBP74 in HeLa-Zellen

Lichtmikroskopische Darstellung der Fluoreszenz von Azeton-fixierten HeLa-Zellen 48 h nach Transfektion mit EGFP/hVDAC1 und immunologischer Detektion von PBP74. **a:** Fluoreszenz des EGFP/hVDAC1 Fusionsproteins, **b:** anti-mtHSP70 Primär- und TRITC-konjugierter Sekundärantikörper, **c:** Doppelbelichtung der EGFP/hVDAC1- und TRITC-Fluoreszenz, **d:** Fluoreszenz des Kernfarbstoffes. Kalibrierungsbalken = 5 μ m

4.2.8.3 Lokalisierung von hVDAC1 in HeLa-Zellen

Um die Verteilung von hVDAC1 in HeLa-Zellen näher zu charakterisieren, wurden Doppelmarkierungen mit Antikörpern gegen spezifische Markerproteine ausgewählter Zellkompartimente durchgeführt. Hierfür wurden HeLa-Zellen auf Deckgläschen angezchtet, mit Azeton oder Formaldehyd fixiert und unspezifische Bindungsstellen mit Ziegennormalserum abgesättigt. Die Präparate wurden nacheinander mit anti-hVDAC1- und spezifischen anti-"Zellkompartiment"-Antikörpern inkubiert. Die gebundenen Immunglobuline wurden anschließend durch FITC- bzw. TRITC-konjugierte Sekundärantikörper markiert. Nach der Kernfärbung wurden die Deckgläschen auf Objektträger überführt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. In diesen Experimenten identifizierten die Antikörper gegen die trans-Golgi-Markerproteine 58K und γ -Adaptin

intrazelluläre Bereiche, in denen auch hVDAC1-Moleküle immunologisch detektiert wurden (Abbildung 30 a bis h).

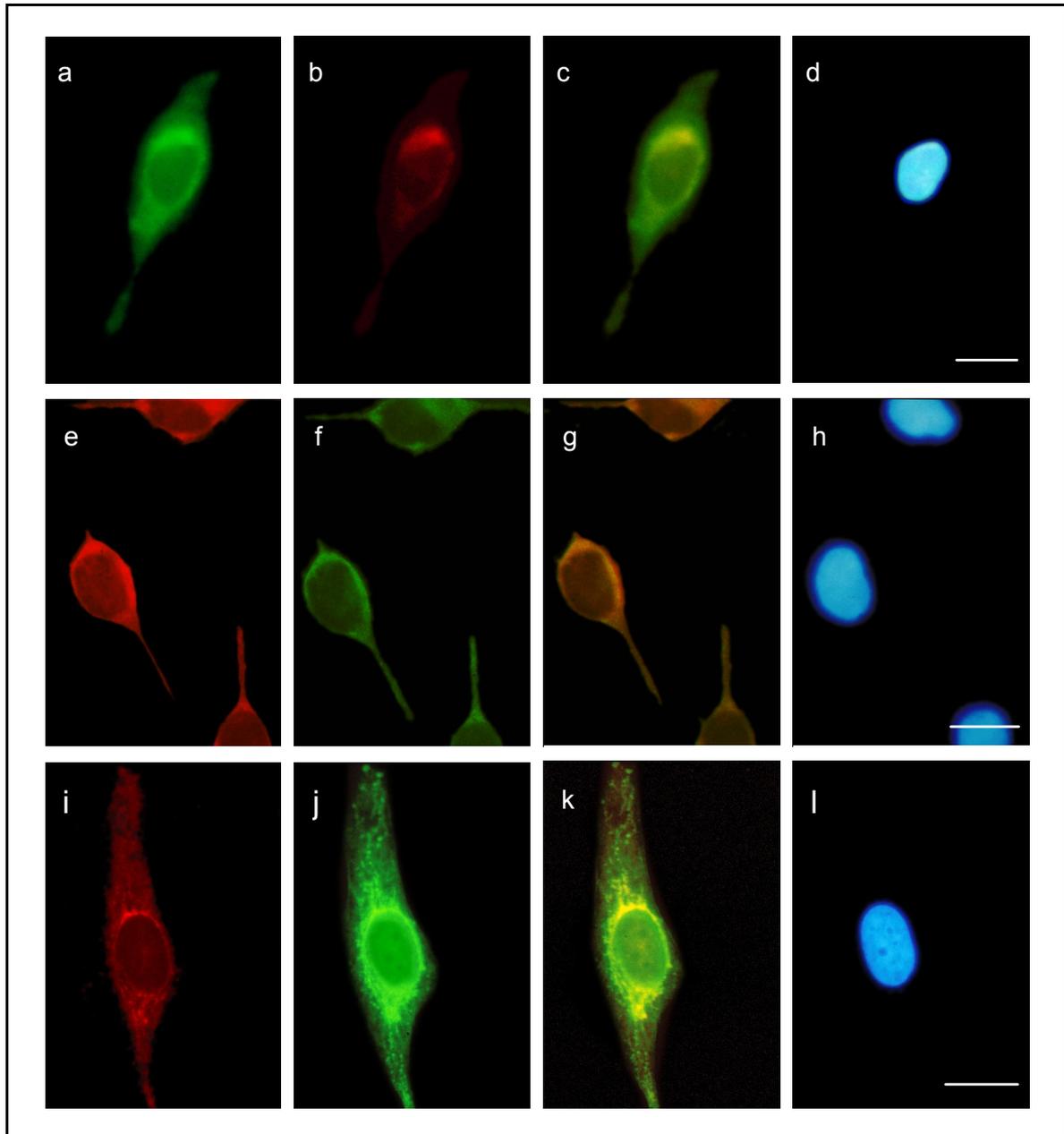


Abbildung 30: Kolokalisierung von hVDAC1 mit Markerproteinen des Golgiapparates und von Mitochondrien in HeLa-Zellen

Lichtmikroskopische Darstellung der Immunfluoreszenz von doppelmarkierten HeLa-Zelle nach Fixierung und Kernfärbung. **a:** anti-hVDAC1 Primär- und FITC-konjugierter Sekundärantikörper, **b:** anti-58K Primär- und TRITC-konjugierter Sekundärantikörper, **c:** Doppelbelichtung der FITC- und TRITC-Fluoreszenz, **d:** Fluoreszenz des Kernfarbstoffes (Formaldehyd-fixiert), **e:** anti-hVDAC1 Primär- und TRITC-konjugierter Sekundärantikörper, **f:** anti- γ Adaptin Primär- und FITC-konjugierter Sekundärantikörper, **g:** Doppelbelichtung der FITC- und TRITC-Fluoreszenz, **h:** Fluoreszenz des Kernfarbstoffes (Azeton-fixiert), **i:** anti-hVDAC1 Sekundär- und TRITC-konjugierter Sekundärantikörper, **j:** anti-Prohibitin Primär- und FITC-konjugierter Sekundärantikörper, **k:** Doppelbelichtung der FITC- und TRITC-Fluoreszenz, **l:** Fluoreszenz des Kernfarbstoffes (Formaldehyd-fixiert). Kalibrierungsbalken = 10 μ m

hVDAC1 und das 58K Protein zeigten dabei ein überlappendes Verteilungsmuster in einer begrenzten Region um den Zellkern (Abbildung 30 a bis d). γ -Adaptin konnte zusammen mit hVDAC1 in einem weitläufigeren Bereich des Zytoplasmas kolokalisiert werden (Abbildung 30 e bis h).

Die Kolokalisierung von hVDAC1 mit Prohibitin in Mitochondrien zeigt Abbildung 30 i bis l. hVDAC1 und das mitochondriale Protein Prohibitin wurden dabei deutlich in der Region um den Zellkern herum gemeinsam dargestellt. Fädige, für Mitochondrien charakteristische Strukturen in der Zellperipherie erschienen in diesem Ansatz durch den anti-Prohibitin Antikörper mit höherer Intensität als durch den anti-hVDAC1 Antikörper.

Der durch die Hoechst-Färbung lokalisierte Kernbereich wurde in den Zellen durch die verwendeten Antikörper nicht oder nur sehr schwach markiert.

Zur Kontrolle der Verteilung der überexprimierten N- und C-terminalen hVDAC1/EGFP Fusionsproteine wurden parallel HeLa-Zellen transient mit dem für das EGFP ohne hVDAC1 kodierende Plasmid transfiziert, nach 48 Stunden fixiert und vor der mikroskopischen Betrachtung einer Kernfärbung unterzogen.

Die durch die EGFP-Fusionsproteine hervorgerufenen Fluoreszenz zeigte sowohl für das N-terminale (Abbildung 31 a) als auch für das C-terminale Konstrukt zytoplasmatische Markierungen zwischen der Kern- und der Plasmamembran mit einer deutlichen Anhäufung in Regionen um den Zellkern (Abbildung 31 c). Die Fusionsproteine waren auch in diesen Präparaten nicht in den mittels Hoechst-Färbung markierten Zellkernen lokalisiert (vergleiche Abbildung 31 b und d). Vereinzelt waren in HeLa-Zellen nach Transfektion mit hVDAC1-EGFP Plasmiden neben einer schwachen intrazellulären Markierung Signale an der Zellmembran sichtbar. Die plasmalemmale Lokalisierung des hVDAC1/EGFP Fusionsproteins ist beispielhaft in Abbildung 31 e dargestellt.

Die Spezifität der Lokalisierung der hVDAC1/EGFP Fusionsproteine wurde durch die Expression des EGFPs ohne hVDAC1 überprüft. In zur Kontrolle mit EGFP ohne hVDAC1 transfizierten HeLa-Zellen war das grün fluoreszierende Expressionsprodukt stets gleichmäßig intrazellulär verteilt und auch im Kernbereich zu finden (Abbildung 31 g und h). Zusammenfassend konnte hVDAC1 immunologisch oder als EGFP-Fusionsprotein in HeLa-Zellen in Mitochondrien, in Teilbereichen des retikuloendothelialen Systems und an der Plasmamembran lokalisiert werden.

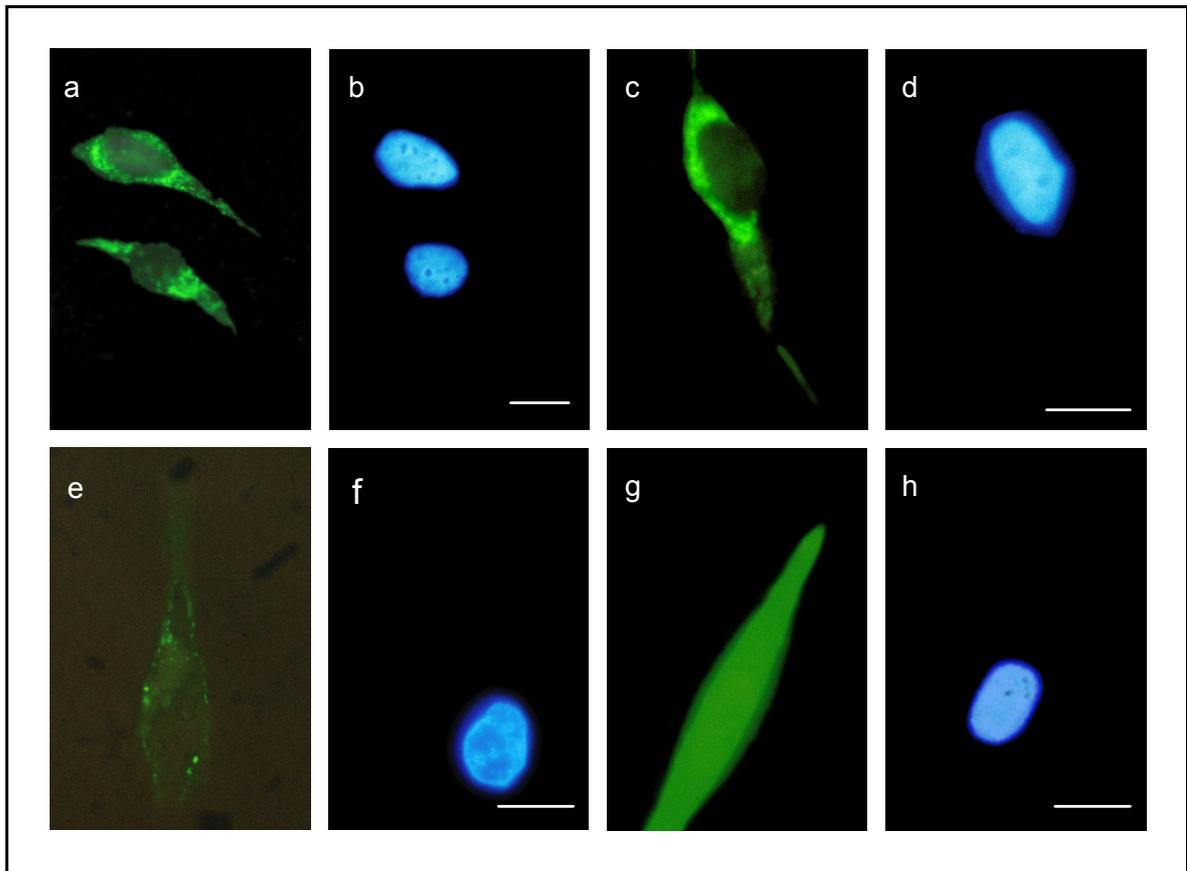


Abbildung 31: Lokalisierung der hVDAC1-EGFP Fusionsproteine transfizierter HeLa-Zellen

Lichtmikroskopische Darstellung der Fluoreszenz von Azeton-fixierten HeLa-Zellen 48 h nach Transfektion mit EGFP-Plasmiden. **a:** Fluoreszenz des EGFP/hVDAC1 Fusionsproteins, **b:** Fluoreszenz des Kernfarbstoffes, **c** und **e:** Fluoreszenz des hVDAC1/EGFP Fusionsproteins, **d:** Fluoreszenz des Kernfarbstoffes, **f:** Fluoreszenz des Kernfarbstoffes, **g:** Fluoreszenz des EGFPs, **h:** Fluoreszenz des Kernfarbstoffes. Kalibrierungsbalken = 10 μ m

4.2.9 Funktionelle Auswirkung der Interaktionspartner auf hVDAC1

Die Kanaleigenschaften von hVDAC1 wurden in der Vergangenheit in Versuchen mit künstlichen Lipiddoppelmembranen charakterisiert. Die Messungen wurden meist in 1 M KCl durchgeführt, da die Pore unter diesen Hochsalz-Bedingungen sehr stabil ist. Die Spannungsabhängigkeit und eine Einzelleitfähigkeit im nS-Bereich des Kanals sind unter diesen Bedingungen deutlich meßbar. Es war nun interessant festzustellen, ob die im CytoTrap™ Two-Hybrid System für hVDAC1 ermittelten Interaktionspartner einen Einfluß auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des Kanals ausüben würden. Um Interaktionen unter physiologischen Bedingungen zu detektieren, wurde hVDAC1 vor und nach Zugabe von rTctex1 oder r Δ PBP74 jedoch nicht in 1 M KCl, sondern in Ringerlösung vermessen.

4.2.9.1 Einzelkanalgröße und Spannungsabhängigkeit von hVDAC1

Aus H2LCL-Zellen isoliertes hVDAC1 stammte für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente aus Abteilungsbeständen. In Experimenten mit je 50 ng hVDAC1 pro Kammer wurde zunächst das elektrophysiologische Verhalten des Kanals in Ringerlösung bestimmt. Die daraus resultierende Einzelkanalleitfähigkeit und die Spannungsabhängigkeit wurden als Referenz für Messungen mit den zugesetzten Interaktionspartner eingesetzt.

Die Insertion von hVDAC1-Molekülen in Ringerlösung bei 10 mV angelegter Spannung wurde durch den für diese Kanäle charakteristischen stufenförmigen Anstieg des Stromflusses beobachtet. Dabei beruht jeder diskrete Sprung auf die Insertion eines Moleküls. Die Insertionsereignisse zu Beginn der durchgeführten Messungen wurden ausgewertet und die errechnete Leitfähigkeit der einzelnen Poren dargestellt. Abbildung 32 zeigt das auf diesen Messungen basierende Histogramm, das gesteigerte Häufigkeit der Leitfähigkeit bei 160, 280 und 400 pS verdeutlicht. Der voll geöffnete Zustand von hVDAC1 wird durch das Leitfähigkeitsmaximum bei 400 pS repräsentiert.

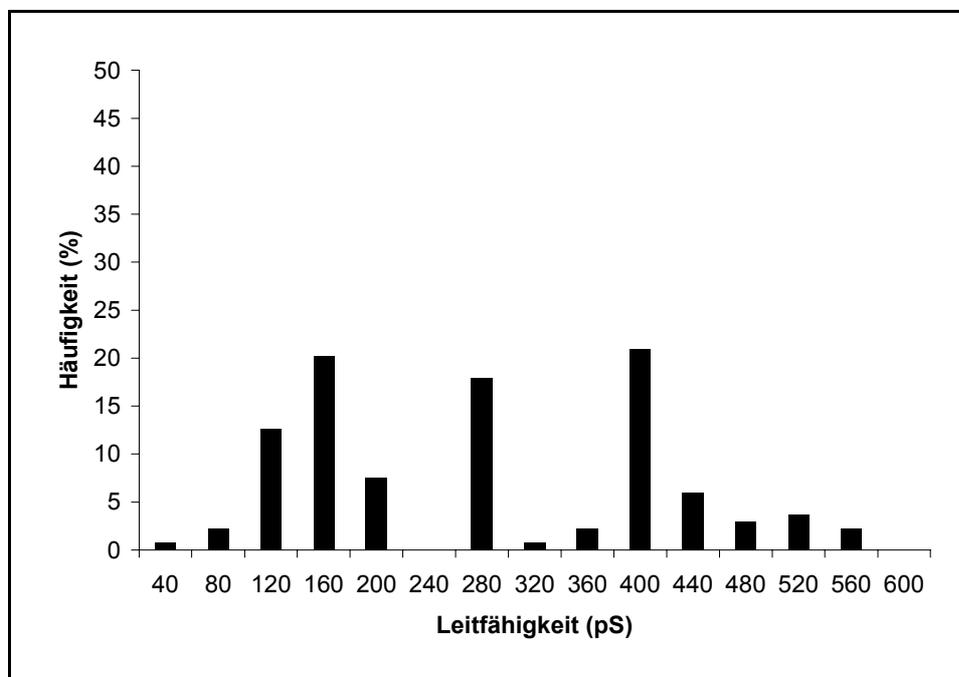


Abbildung 32: Einzelkanalleitfähigkeit von hVDAC1

Je Kammer wurden 50 ng hVDAC1 zugesetzt und zur Insertion eine Spannung von 10 mV angelegt (Elektrolytsg.: Ringerlsg., Membranlsg.: L- α -Diphytanoyl-phosphatidylcholin, 134 Insertionsereignisse)

Nachdem ein stabiles Leitfähigkeitsniveau durch die Insertion vieler Poren registriert werden konnte, wurde die Spannungsabhängigkeit von hVDAC1 bestimmt. Dies erfolgte durch sukzessives Anlegen steigender Spannungen in 10 mV Schritten von -80 mV bis +80 mV an die Kammer. Für die angelegten Spannungen wurden die Quotienten aus der am Ende des untersuchten Zeitraumes gemessenen Leitfähigkeit (G) und der konstanten, unbeeinflussten Leitfähigkeit (G_0) bei +10 mV bestimmt. Diese Normierung ermöglicht den Vergleich unterschiedlicher Messungen miteinander. Die auf der Spannungsabhängigkeit basierende Änderung der relativen Leitfähigkeit ist in Abbildung 33 dargestellt. Die relative Leitfähigkeit bei +10 mV repräsentierte dabei den voll geöffneten Zustand des Kanals. Mit zunehmender positiver oder negativer Spannung nahm die relative Leitfähigkeit glockenförmig ab und betrug bei +80 mV noch 45 %, bei -80 mV nur noch 45 % der Leitfähigkeit G_0 .

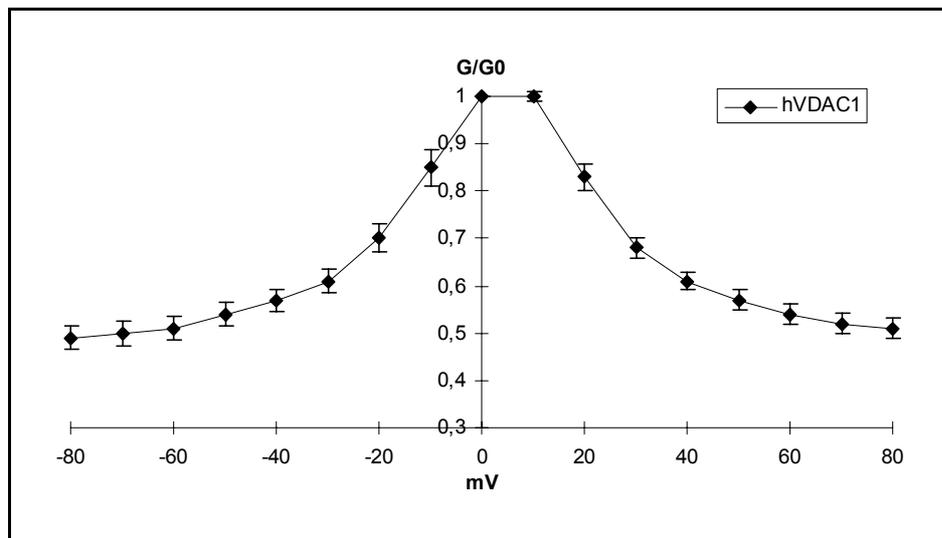


Abbildung 33: Spannungsabhängige Änderung der relativen Leitfähigkeit von hVDAC1

Je Kammer wurden 50 ng hVDAC1 zugesetzt und nach Erreichen einer konstanten Leitfähigkeit die Spannungsabhängigkeit im Bereich von -80 bis +80 mV bestimmt (Elektrolytlösung: Ringerlösung, Membranlösung: L- α -Diphytanoyl-phosphatidylcholin, $n_{\text{hVDAC1}} = 21$)

4.2.9.2 Einfluß von rTctex1 auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von hVDAC1

Nach der Charakterisierung des elektrophysiologischen Verhaltens von hVDAC1 wurde zunächst überprüft, ob die Zugabe des Proteins rTctex1 einen Einfluß auf die Einzelkanalleitfähigkeit von hVDAC1 hat. Aus den nach Präinkubation der beiden Proteine registrierten Insertionsereignissen wurde die Einzelkanalleitfähigkeit berechnet. Aus Abbildung 34 ist ersichtlich, daß eine gesteigerte Häufigkeit der Leitfähigkeit von 120, 280 und 400 pS für hVDAC1 unter dem Einfluß von rTctex1 gemessen wurden. Insertionen mit

dem vollständig geöffneten Zustand von hVDAC1 traten im Vergleich mit der Messung ohne rTctex1 seltener auf (vergleiche Abbildung 32). Im Gegensatz dazu wurden unter dem Einfluß von rTctex1 häufiger Insertionsereignisse aufgezeichnet, die mit Einzelleitfähigkeit von 80 bis 280 pS einen weniger geöffneten Zustand von hVDAC1 repräsentieren.

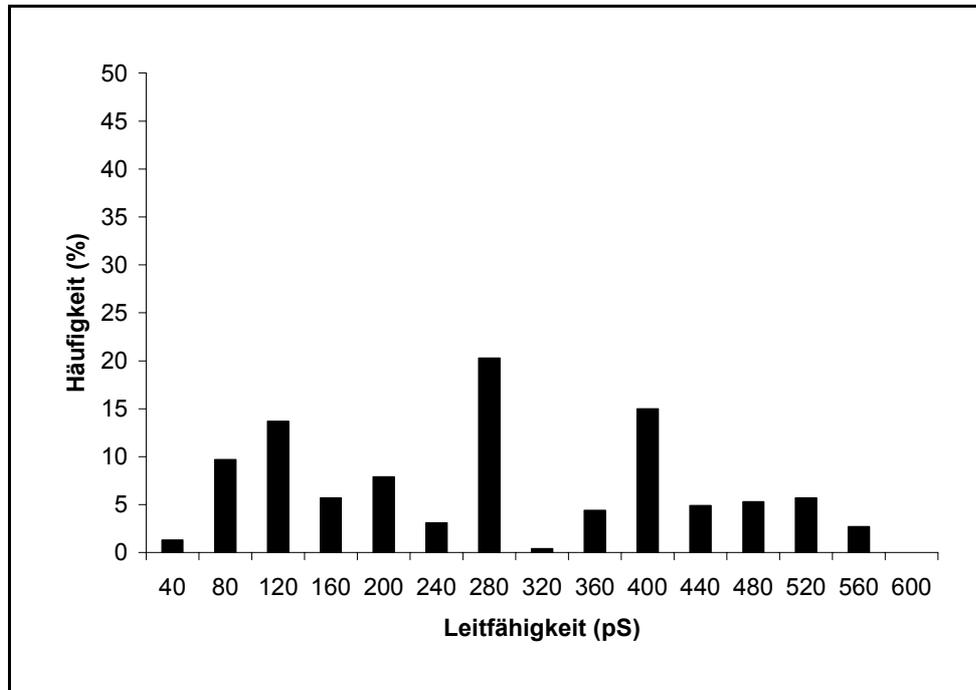


Abbildung 34: Einfluß von rTctex1 auf die Einzelkanalleitfähigkeit von hVDAC1

Je Kammer wurden 50 ng hVDAC1 mit 1 µg des Thrombin-eluierten, rekombinanten Tctex1 zugesetzt und zur Insertion eine Spannung von 10 mV angelegt (Elektrolytlösung: Ringerlösung, Membranlösung: L- α -Diphytanoyl-phosphatidylcholin, 227 Insertionsereignisse).

Die Wirkung von rTctex1 auf die Spannungsabhängigkeit von hVDAC1 wurde nach Erreichen eines stabilen Leitfähigkeitsniveaus durchgeführt. Abbildung 35 zeigt die gemessenen Ströme bei angelegten Spannungen zwischen -80 und +80 mV für hVDAC1 mit und ohne rTctex1. Die relative Leitfähigkeit bei +10 mV stellt den voll geöffneten Zustand der Pore dar. Mit zunehmender positiver oder negativer Spannung geht eine stärkere Abnahme der Stromstärke unter Anwesenheit von rTctex1 im Vergleich zu hVDAC1 ohne rTctex1 hervor. Diese Auftragung verdeutlicht, daß rTctex1 die Spannungsabhängigkeit von hVDAC1 verstärkt. Die relative Leitfähigkeit von hVDAC1 wurde bei Spannungen unterhalb -30 mV und oberhalb +40 mV durch rTctex1 um bis zu 8 % erniedrigt.

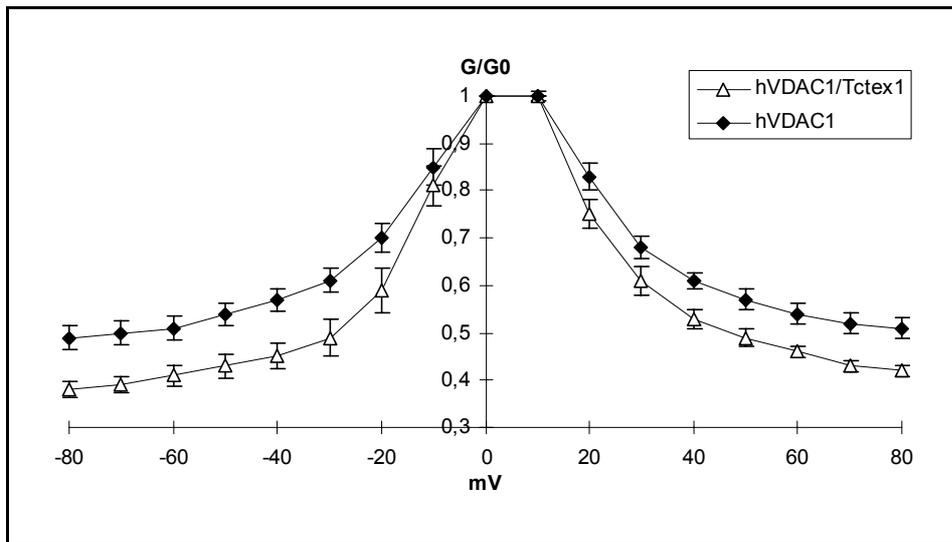


Abbildung 35: Erhöhung der spannungsabhängigen Änderung der relativen Leitfähigkeit von hVDAC1 durch rTctex1

Je Kammer wurden 50 ng hVDAC1 mit 1 μ g rTctex1 zugesetzt und nach Erreichen einer konstanten Leitfähigkeit die Spannungsabhängigkeit im Bereich von -80 bis +80 mV bestimmt (Elektrolytlösung: Ringerlösung, Membranlösung: L- α -Diphytanoyl-phosphatidylcholin, $n_{\text{hVDAC1}} = 21$, $n_{\text{hVDAC1/Tctex1}} = 11$).

Für rTctex1 allein konnten in Kontrollexperimenten keine Änderungen in der Leitfähigkeit der Lipiddoppelschicht und auch keine spannungsabhängige Kanalaktivität gemessen (Daten nicht gezeigt) und somit die Spezifität der Interaktion mit hVDAC1 bestätigt werden.

Zusammenfassend begünstigt rTctex1 niedrigere Einzelkanalleitfähigkeiten von hVDAC1 und verstärkt dessen Spannungsabhängigkeit.

4.2.9.3 Einfluß von r Δ PBP74 auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von hVDAC1

Analog zu der elektrophysiologischen Charakterisierung von hVDAC1 in Gegenwart des rTctex1 wurde nun die Wirkung von r Δ PBP74 untersucht.

Die Einzelkanalleitfähigkeiten von hVDAC1 wurden durch die Präinkubation mit r Δ PBP74 beeinflusst. Das aus den gemessenen Strömen einzelner Insertionen erstellte Histogramm in Abbildung 36 zeigt eine gesteigerte Häufigkeit der Leitfähigkeit bei 120, 280 und 400 pS. Im Vergleich zur Kontrollmessung in Abbildung 32 wird in Gegenwart von r Δ PBP74 einerseits das Einnehmen dieser drei Kanalzustände von hVDAC1 stabilisiert. Andererseits inserierten deutlich häufiger Moleküle mit einem größeren Porendurchmesser.

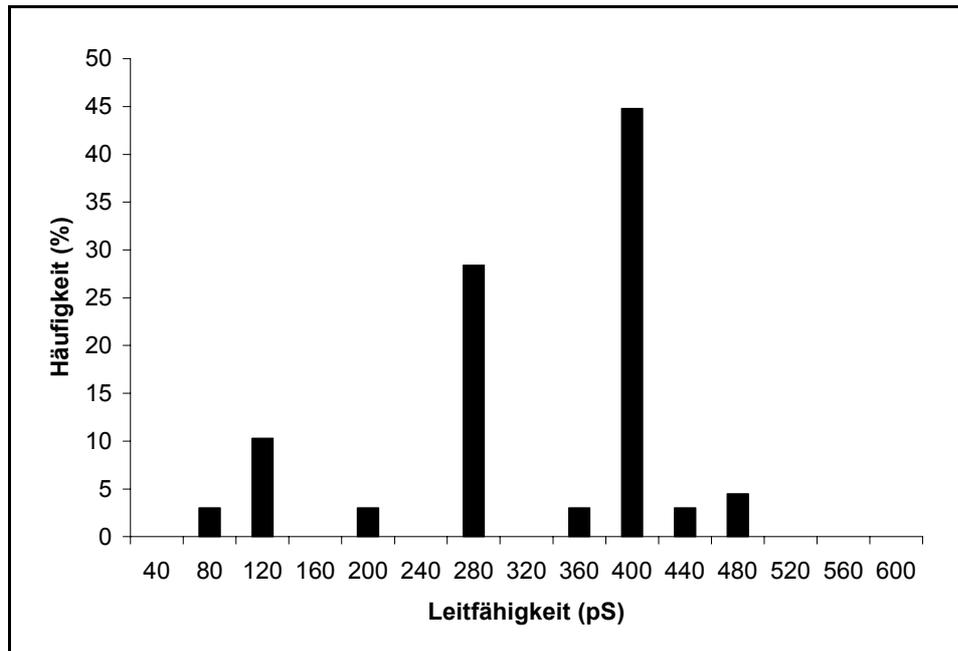


Abbildung 36: Einfluß von r Δ PBP74 auf die Einzelkanalleitfähigkeit von hVDAC1

Je Kammer wurden 50 ng hVDAC1 mit 1 μ g des Thrombin-eluierten, rekombinanten Δ PBP74 zugesetzt und zur Insertion eine Spannung von 10 mV angelegt (Elektrolytlösung: Ringerlösung, Membranlösung: L- α -Diphytanoyl-phosphatidylcholin, 134 Insertionsereignisse).

Nach Abschluß der Insertionen stellte sich in den Messungen ein stabiles Leitfähigkeitsniveau ein, und der Einfluß von r Δ PBP74 auf die Spannungsabhängigkeit von hVDAC1 wurde untersucht. Die in diesem Experiment erbrachten Daten zeigen eindeutig, daß r Δ PBP74 die Spannungsabhängigkeit von hVDAC1 stark verringert. Abbildung 37 präsentiert die aus den ermittelten Strömen errechnete relative Leitfähigkeit bei angelegten Spannungen zwischen -80 bis +80 mV. Die relative Leitfähigkeit bei +10 mV stellt den vollständig geöffneten Zustand von hVDAC1 dar. Die spannungsabhängige Abnahme der relativen Leitfähigkeit von hVDAC1 betrug nach Interaktion mit r Δ PBP74 bei -80 mV 89 % und bei +80 mV 85 %. Im Vergleich mit der hVDAC1-Referenzmessung ist klar ersichtlich, daß r Δ PBP74 Zustände mit einem weiter geöffneten Porendurchmesser des Kanals stabilisiert. Für r Δ PBP74 ohne hVDAC1 konnte in Kontrollexperimenten keine Änderung in der Leitfähigkeit der Lipiddoppelschicht und auch keine spannungsabhängige Kanalaktivität gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Die Änderung des elektrophysiologischen Verhaltens von hVDAC1 in Gegenwart von r Δ PBP74 basiert somit spezifisch auf der Interaktion beider Proteine.

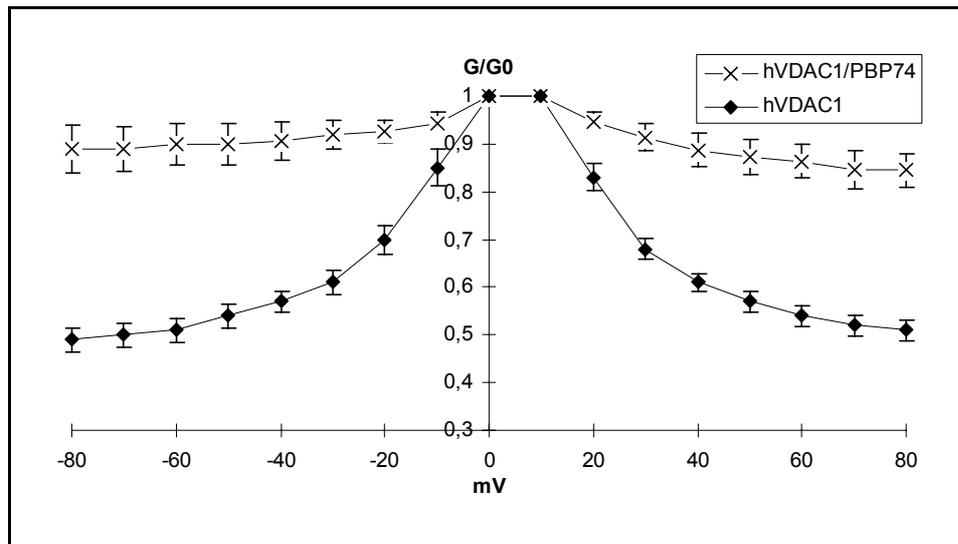


Abbildung 37: Erniedrigung der spannungsabhängigen Änderung der relativen Leitfähigkeit von hVDAC1 durch r Δ PBP74

Je Kammer wurden 50 ng hVDAC1 mit 1 μ g des Thrombin-eluierten, rekombinanten Δ PBP74 zugesetzt und nach Erreichen einer konstanten Leitfähigkeit die Spannungsabhängigkeit im Bereich von -80 bis +80 mV bestimmt (Elektrolytlösung: Ringerlösung (Membranlösung: L- α -Diphytanoylphosphatidylcholin, $n_{\text{hVDAC1}} = 21$, $n_{\text{hVDAC1/PBP74}} = 14$).

5 Diskussion

5.1 VDAC im Kontext der Mitochondrien und der Plasmamembran

Die Expression von VDAC (Voltage-dependent Anion-selective Channel, eukaryontisches Porin) in der äußeren Mitochondrienmembran wurde erstmals von Colombini (1979) für *Paramecium aurelia* beschrieben. Seither konnte das Protein als Kanal der äußeren Mitochondrienmembran in *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Dictyostelium discoideum*, *Caenorhabditis elegans* und bei diversen Vertebraten in unterschiedlichen Geweben identifiziert werden. Dabei treten große Unterschiede in der Primärstruktur der Proteine auf (43 % Homologie von hVDAC1 zu *N. crassa* (Kleene *et al.*, 1987) und 30 % zur Hefe (Colombini *et al.*, 1996)). Das elektrophysiologische Erscheinungsbild nach Insertion von aufgereinigtem VDAC in künstliche Lipid-Doppelmembranen ist dagegen stark konserviert. Der vollständig geöffnete Zustand des Kanals wird in 1 M KCl bei einer angelegten Spannung um 0 mV durch eine Leitfähigkeit von 4,2 nS repräsentiert. Diesem Zustand wird ein Porendurchmesser von 2,5 bis 3 nm zugeordnet (Colombini *et al.*, 1996). Bei angelegten Spannungen ab +/- 30 mV schließt sich dagegen der Kanal unter Ausbildung verschiedener Zustände geringerer Leitfähigkeit, die durch Verringerung der Porengröße auf bis zu 60 % charakterisiert wurden (Benz *et al.*, 1992). Die Selektivität des geöffneten Zustandes für Anionen über Kationen beträgt 2:1, für den geschlossenen Zustand wird dagegen der Wechsel von einer Anionen- zu einer starken Kationen-Selektivität beschrieben (Benz *et al.*, 1992; Colombini, 1989; Zhang und Colombini, 1990).

Weitere Eigenschaften von VDAC sind die reversible Bindung von ATP (Flörke *et al.*, 1994) und die Fähigkeit, als Kanal für mitochondriales ATP permeabel zu sein (Rostovtseva und Colombini, 1997). Der Metabolit kann im Zytoplasma an die mit VDAC-assoziierte Hexokinase und Glycerinkinase binden (Adams *et al.*, 1991; McCabe, 1994; Kottke *et al.*, 1988). Im Intermembranraum der Mitochondrienmembran bindet VDAC einerseits an die mitochondriale Kreatinkinase (Brdiczka *et al.*, 1994), andererseits ist es hier Bestandteil der mitochondrialen Permeability-Transition-Pore (PTP), bestehend aus VDAC, dem Adenin-Nukleotid-Translokator und Cyclophylin-D (Cromton, 1999). Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie, für die eine Schlüsselfunktion bei der Regulierung des programmierten Zelltodes (Apoptose) beschrieben ist, interagieren direkt mit VDAC oder wirken regulativ auf die PTP (Vander Heiden *et al.*, 2000; Shimizu *et al.*, 2000a und 2000b). Ein regulativer Einfluß auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von VDAC konnte zudem für

Dextransulfat (Mangan und Colombini, 1987), das König'sche Polyanion (Benz *et al.*, 1988 und 1990; Colombini *et al.*, 1987) und ein lösliches Protein aus dem mitochondrialen Intermembranraum (Holden und Colombini, 1993) gezeigt werden. VDAC besitzt außerdem eine Sensitivität gegenüber dem Anionenkanal-Inhibitor DIDS (Thinnes *et al.*, 1990 und 1994). Ein eigenständiges und vollständiges Schließen einzelner VDAC-Moleküle nach Insertion in künstliche Lipid-Doppelmembranen konnte schließlich von Bãthori *et al.* (1998) beobachtet werden. Ursprüngliche Vorstellungen von VDAC als einem starren Molekularsieb wurden durch die oben aufgeführten Studien verworfen.

Die Regulation von VDAC erlangte besondere Bedeutung, als 1989 durch Thinnes *et al.* eine extramitochondriale Lokalisierung des Proteins in der Plasmamembran von humanen B-Lymphozyten nachgewiesen wurde. Dieser nach seiner Veröffentlichung vorerst angezweifelte, mittels immunologischer Methoden erhobene Befund wurde in den letzten Jahren durch weitere Arbeiten belegt. VDAC konnte zusammen mit dem GABA_A-Rezeptor in Astrozyten vom Rind aufgereinigt (Bureau *et al.*, 1992) und mit dem CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) durch Puchelle *et al.* (1993) an der Oberfläche von humanen respiratorischen Epithelzellen kolokalisiert werden. Biochemische Experimente bestätigten die plasmalemmale Lokalisierung von VDAC (Jakob *et al.*, 1995; Eben-Brunnen *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde in jüngeren Studien die Expression von VDAC in Synaptosomen des elektrischen Organs von *Torpedo marmorata* und *T. ocellata* (Shafir *et al.*, 1998), in Caveolae von T-Lymphozyten-abgeleiteten CEM-Zellen (Bãthori *et al.*, 1999), in der postsynaptischen Membran (*Postsynaptic Density Fraction*) von Nervenzellen der Ratte (Moon *et al.*, 1999) und in der Zellmembran von *Xenopus laevis* Oozyten (Steinacker *et al.*, 2000) beschrieben. Weitere extramitochondriale Daten stellen die Lokalisierung von VDAC im sarkoplasmatischen Retikulum (Jürgens *et al.*, 1995; Shoshan-Barmatz *et al.*, 1996) und in Endosomen dar (Reymann *et al.*, 1998).

Da mitochondriales und plasmalemmales VDAC in der Primärstruktur (Stadtmüller *et al.*, 1999) und dem biophysikalischen Verhalten (Benz *et al.*, 1992) identisch sind, wäre unter Beachtung der für das isolierte Molekül beschriebenen Eigenschaften dessen Lokalisierung in der Zellmembran ohne regulierbare Eigenschaften für die Zelle letal. In diesem Kompartiment der Zelle ist eine strikte Regulation im Sinne einer Verschließung des Kanalproteins somit unerlässlich. Diese Forderung findet in den Arbeiten von Janisch *et al.* (1993) und Dermietzel *et al.* (1994) weitere Unterstützung und Bestätigung. Den Autoren gelang in Patch clamp Experimenten an Endothelzellen bzw. Astrozyten die spezifische Blockierung eines großen

Anionen-Kanals durch anti-VDAC Antikörper. Diese inhibierbaren Ströme konnten an ausgerissenen Membranstücken erst nach einigen Minuten, jedoch nicht an der intakten Membran im *cell attached* Modus gemessen werden. Buettner *et al.* (2000) konnten entsprechende Kanäle vermehrt an ausgerissenen Membranen von PC12 Zellen der Ratte messen, die zuvor mit VDAC-Konstrukten der Maus transfiziert wurden. Unter physiologischen Bedingungen vor dem Ausreißen der Membran konnten die Autoren dieser Studien also keine auf VDAC basierenden Ströme messen, was auf einen verschlossenen Zustand des Kanals hinweist. Das elektrophysiologische Erscheinungsbild von VDAC *in vivo* und *in vitro* weist dementsprechend deutliche Differenzen auf. Die durch diese Studien aufgebrachte Frage nach den für die Modulation des plasmalemalen VDAC verantwortlichen Regulatoren konnte bisher nicht beantwortet werden.

Inhalt der vorliegenden Arbeit ist die heterologe Expression von hVDAC1 in *Xenopus laevis* Oozyten und dessen Charakterisierung in einem physiologischen Kontext. Einen weiteren Schwerpunkt bildet die Identifizierung von mit hVDAC1 interagierenden Proteinen mit Hilfe des CytoTrapTM Two-Hybrid Systems und deren Einfluß auf die Funktionalität des Kanals.

5.2 Heterologe Expression in *Xenopus laevis* Oozyten

An Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* wurden in frühen Studien zelluläre Prozesse und die Morphologie unter entwicklungsbiologischen Gesichtspunkten wie Reifung, Wachstums und Fertilisation erforscht (Rugh, 1951; Holmes, 1952; Balinsky, 1981). In den 60er und 70er Jahren folgte die Untersuchung von Mechanismen, die an der Regulation der Zellteilung (Masui und Clarke, 1979; Morrill *et al.*, 1981) und der Genexpression (Gurdon, 1974; Lane, 1981; Soreq, 1985) in *Xenopus* Oozyten beteiligt sind. Des weiteren wurde der Einfluß von Neurotransmittern auf Oozyten charakterisiert (Kusano *et al.*, 1977).

Bahnbrechend war die Entdeckung von Gurdon *et al.* (1971), das Oozyten zur Synthese fremder Proteine nach Injektion von mRNA befähigt sind. Seither wurden *Xenopus* Oozyten intensiv zur heterologen Expression und Charakterisierung von Ionenkanälen, Rezeptoren und Modulatoren eingesetzt. Eine ausführliche Auflistung dieser Arbeiten geben Dascal (1987) und Weber (1999).

Studien zur plasmalemalen Lokalisation von VDAC erfolgten in der Vergangenheit unter Verwendung von anti-VDAC Antikörpern mittels immunologischer Techniken und durch Zellfraktionierung (Thinnes und Reymann, 1997; Eben-Brunnen *et al.*, 1998). Die in dieser Arbeit angestrebte heterologe Expression von hVDAC1 in *Xenopus laevis* Oozyten hatte unter

anderem zum Ziel, durch die Benutzung von EGFP Fusionsproteinen und FLAG-Epitop-markiertem hVDAC1 unabhängig von den bisher eingesetzten anti-hVDAC1 Antikörpern Aussagen zur Lokalisation des Kanals zu treffen. Aufgrund der Größe und Morphologie der Oozyte war anzunehmen, daß sich eine gegebenenfalls induzierbare plasmalemmale Expression von hVDAC1 in diesem Zellkompartiment deutlich von intrazellulären Markierungen abgrenzbar darstellen läßt. Darüber hinaus war es interessant zu prüfen, ob das heterolog exprimierte Protein einen Einfluß auf das elektrophysiologische Verhalten der Oozyte *in vivo* ausübt.

5.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Befunde zur Expression von hVDAC1 in der Zellmembran von *Xenopus* Oozyten

Diese Arbeit liefert erstmals Erkenntnisse über heterolog exprimiertes hVDAC1 in der Zellmembran von *Xenopus* Oozyten (Schwarzer *et al.*, 2000). Dabei umgeht die Expression des hVDAC1-EGFP Fusionsproteins in Lokalisierungsstudien elegant die bei immunologischen Techniken nicht vollständig auszuschließenden Kreuzreaktionen eines Antikörpers mit anderen Proteinen.

Heterolog exprimiertes hVDAC1-EGFP Fusionsprotein konnte bereits zwei Tage nach Injektion der für das Protein kodierenden mRNA an der Oberfläche von *Xenopus* Oozyten identifiziert werden. Im zeitlichen Verlauf nahmen die Fluoreszenzsignale bis zum fünften Inkubationstag deutlich zu (Abbildung 13 a bis d). Mit Hilfe des konfokalen Mikroskops ließen sich die in Clustern auftretenden Markierungen eindeutig der Zelloberfläche zuordnen (Abbildung 14 a bis c). Es muß sich hierbei jeweils um eine Anhäufung des Expressionsproduktes handeln, da sich die detektierten Markierungen in ihrer Größe unterscheiden. Von VDAC in künstlichen Lipid-Doppelmembranen ist bekannt, daß bereits inserierte Kanäle die Einlagerung weiterer Moleküle katalysieren (Xu und Colombini, 1996). Sollte VDAC auch *in vivo* diese Eigenschaft haben, ließen sich damit die Anhäufungen des Proteins erklären. Im Gegensatz zur Expression eines GABA_A-Rezeptor-EGFP Fusionsproteins in *Xenopus* Oozyten, welches nur am animalen Pol detektiert wurde (Bueno *et al.*, 1998), ließ sich das hVDAC1-EGFP Fusionsprotein ubiquitär verbreitet am animalen und vegetativen Pol der Oozyte darstellen. Bei der Fokussierung auf die Oberfläche der Oozyte wurden neben den deutlichen, plasmalemmlen Markierungen auch diffuse, intrazelluläre Fluoreszenzsignale als Hintergrundleuchten registriert.

Das Fluoreszenzmuster des N-terminalen EGFP-hVDAC1 Fusionsproteins entsprach in seiner Verteilung den Signalen der EGFP-Kontrolloozyten. Scharf abgrenzbare Markierungen an der Zellmembran konnten in keiner Oozyte ermittelt werden. Statt dessen wurde ein einheitliches, intrazelluläres grünes Leuchten beobachtet (Abbildung 13 e bis h und Abbildung 14 d bis f). Die Betrachtung der hVDAC1-EGFP- und EGFP-exprimierenden Oozyten im Fluoreszenzmikroskop unter Durchlicht verdeutlichte eindeutig die Differenz zwischen der intrazellulären und der plasmalemmlalen Lokalisierung des EGFP und des hVDAC1-EGFP Fusionsproteins (Abbildung 13 d und h).

Der Unterschied in der Expression der N- und C-terminalen EGFP-hVDAC1 Fusionsproteine identifiziert den N-Terminus des Kanalproteins als Träger von Informationen zum *Trafficking* innerhalb der Zelle. Durch die Anbindung des EGFP an den N-Terminus von hVDAC1 wurde die Insertion des Fusionsproteins in die Zellmembran verhindert.

Die Insertion des hVDAC1-EGFP Fusionsproteins in die Zellmembran kann nicht allein durch das EGFP hervorgerufen werden und ist auch nicht die Folge einer unphysiologischen Überexpression. Ein spezifischer Einbau des Proteins in die Zellmembran wird durch die fehlende plasmalemmlale Lokalisierung des ebenfalls überexprimierten, aber N-terminalen EGFP-hVDAC1 Fusionsproteins bestätigt. Die nach Fusion des *Green-Fluorescent-Proteins* an den GABA_A-Rezeptor (Bueno *et al.*, 1998) und an die α Z1-Untereinheit des Glycin-Rezeptors (David-Watine *et al.*, 1999) in *Xenopus* Oozyten exprimierten Fusionsproteine zeigten im Vergleich zu exprimierten Wildtyp-Proteinen keine Unterschiede in der zellulären Verteilung. Der Transport dieser beiden Proteine mit terminal fusioniertem GFP zur Plasmamembran und deren funktionelle, elektrophysiologische Identität mit den Wildtyp-Proteinen in diesem Kompartiment bestätigen die Spezifität der in dieser Arbeit dargestellten Expression von hVDAC1-EGFP in der Plasmamembran von *Xenopus* Oozyten.

5.2.2 Elektronenmikroskopische Befunde zur Expression von hVDAC1 in der Zellmembran von *Xenopus* Oozyten

Neben den EGFP-hVDAC1 DNA-Konstrukten wurden Plasmide konstruiert, die für hVDAC1 mit einem am N-Terminus und in einem zweiten Ansatz am C-Terminus aus acht Aminosäuren bestehenden FLAG-Epitop kodieren (Abbildung 10). Das sogenannte "Tagging" von Proteinen mit definierten Epitopen ermöglicht verlässliche immunologische Nachweise unter Verwendung spezifischer Antikörper. Wagner *et al.* (2000) beschreiben den spezifischen Nachweis eines mit dem Flag-Epitop markierten Na⁺/H⁺-Austauschers NHE-1 an

der Plasmamembran von *Xenopus* Oozyten. Yang und Verkman (1997) zeigen, daß die Anbindung des Flag-Epitops an den N- oder C-Terminus von fünf verschiedenen Aquaporinen deren Funktionalität an der Plasmamembran nicht wesentlich einschränkt. Das Anbinden des Flag-Epitops ermöglicht daher einen spezifischen Nachweis des zu analysierenden Proteins, ohne dessen Funktionalität aufzuheben. Die für FLAG-markiertes hVDAC1 kodierenden Transkripte wurden in *Xenopus* Oozyten injiziert. Die Expressionsprodukte konnten anschließend immunologisch durch monoklonale anti-FLAG M2 Primär- und Gold-konjugierte Sekundärantikörper markiert, durch eine Silberfärbung verstärkt und im Rasterelektronenmikroskop visualisiert werden (Schwarzer *et al.*, 2000). In den kohlebedampften Präparaten wurde sowohl das N- als auch das C-terminal durch das FLAG-Epitop markierte hVDAC1 an der Zelloberfläche nachgewiesen (Abbildung 15). Die Zugänglichkeit des Epitops für die verwendeten Antikörper verdeutlicht weiterhin die extrazelluläre Lage der "geflaggtten" N- und C-Termini der entsprechenden hVDAC1-Konstrukte. In einem Strukturmodell für VDAC in der Plasmamembran wird ein extrazellulärer N-Terminus postuliert (Thinnes und Reymann, 1997). Die Anordnung basiert neben computerunterstützten Strukturmodellen und peptidspezifischen Antikörperreaktionen an der äußeren Mitochondrienmembran (DePinto *et al.*, 1991) auf Studien, in denen VDAC-Moleküle durch indirekte Immunfärbungen mittels monoklonaler anti-hVDAC1 Antikörper markiert wurden. Da diese verwendeten Antikörper nur die ersten 12 Aminosäuren des N-Termins von hVDAC als Epitop erkennen und die Studien an Zellen mit intakten Membranen durchgeführt wurden (König *et al.*, 1991; Cole *et al.*, 1992), wird ein extrazellulärer N-Terminus von VDAC1 angenommen. Die hier dargestellte immunologische Markierung des FLAG-hVDAC1 an der Zelloberfläche von *Xenopus* Oozyten bestätigt also die extrazelluläre Lage des N-terminalen Proteinabschnittes in dem postulierten Strukturmodell.

Für den C-Terminus des hVDAC1 wird eine intramembranale Lage angenommen. In dem oben erwähnten Strukturmodell bildet der C-terminale Sequenzabschnitt eine intrazelluläre Schleife, die in die Membran inseriert und dort endet. Diese Anordnung kann durch die immunologische Markierung des heterolog exprimierten hVFAC1-FLAG an der Oozytenoberfläche bestätigt werden. Der äußerst hydrophile Charakter der acht polaren, basischen oder sauren Aminosäuren des FLAG-Epitopes (Hopp *et al.*, 1988) verhindert deren intramembranale Lage und führt somit zu einer Verlängerung des von intra- nach extrazellulär angeordneten C-Terminus über die Zellmembran hinaus.

Im Gegensatz zu der N-terminalen Fusion des EGFP an hVDAC1 hatte die Modifikation des Proteins mit dem FLAG-Epitop an dieser Position keinen inhibierenden Effekt auf den Transport bzw. den Einbau des heterolog exprimierten Proteins in die Zellmembran. Die unterschiedliche Auswirkung auf den intrazellulären Transport durch die Fusion an den N-Terminus von hVDAC1 kann auf dem deutlichen Größenunterschied zwischen dem FLAG-Epitop (8 AS) und dem EGFP (239 AS) basieren. Das *Trafficking* von hVDAC1 in der Zelle wird mit den bisher ermittelten Erkenntnissen im Abschnitt 5.5 diskutiert.

5.2.3 Biochemische Bestätigung der heterolog exprimierten Proteine

Rekombinante Plasmide, die für hVDAC1, für N- und C-terminale hVDAC1-EGFP Fusionsproteine als auch für FLAG-markiertes hVDAC1 kodieren, wurden synthetisiert und als Ausgangsplasmid zur *in vitro*-Transkription eingesetzt. Die spezifischen mRNA-Produkte erwiesen sich in Biotin *in vitro*-Translationsreaktionen als funktionstüchtig (Abbildung 12). Die nach Injektion dieser Transkripte in *Xenopus laevis* Oozyten heterolog exprimierten Proteine konnten nach Solubilisierung der Eizellen und SDS-PAGE im Westernblot immunologisch identifiziert werden (Abbildung 16 und Abbildung 17). Dabei wurden hVDAC1 und die FLAG-markierten hVDAC1 Konstrukte in der für VDAC charakteristischen löslichen Fraktion der Präparation nachgewiesen. Die Expressionsprodukte entsprachen daher in ihren proteinchemischen Eigenschaften denen des aus H2LCL- oder Muskelzellen isolierten hVDAC1 (Schwarzer *et al.*, 2000; Thinnes *et al.*, 1989; Jürgens *et al.*, 1991). Das hVDAC1-EGFP Fusionsprotein wurde dagegen in der unlöslichen Proteinfraction der Präparation identifiziert. Die Unlöslichkeit des Fusionsproteins in dem verwendeten Solubilisierungspuffer läßt sich durch die deutliche Differenz im isoelektrischen Punkt erklären. Für das hVDAC1 errechnete ein Proteinsequenz-Analyseprogramm einen pI von 9,3, wohingegen für das EGFP Fusionsprotein der unlöslichen Fraktion ein pI um 6,2 bestimmt wurde. Die unterschiedlichen Ladungen der Proteine begünstigten oder erschwerten deren Löslichkeit in dem verwendeten Puffersystem und erklären die Isolierung in verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung. Die Abweichung des errechneten isoelektrischen Punktes von hVDAC1 und des von Kayser *et al.* (1989) experimentell ermittelten pI basiert auf posttranslationalen Modifikation wie beispielsweise der N-terminalen Acetylierung und der Anlagerungen von Ionen an das Protein, die durch das Computer Programm nicht berücksichtigt werden.

5.2.4 Voltage clamp Messungen an *Xenopus* Oozyten

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse zur Kanaleigenschaft von VDAC-Molekülen wurden *in vitro* durch Versuche mit isoliertem Protein in künstlichen Lipid-Doppelmembranen erhoben (Colombini *et al.*, 1996). In Patch clamp Experimenten an ausgerissenen oder an permeabilisierten Membranen konnten Maxi-Chloridkanäle identifiziert werden, die durch anti-VDAC Antikörper inhibierbar waren (Janisch *et al.*, 1993; Dermietzel *et al.*, 1994). Buettner *et al.* (2000) gelang mit Hilfe der gleichen Methode eine deutlich vermehrte Darstellung dieser Maxi-Chloridkanäle in PC12 Zellen der Ratte, die mit VDAC1-Konstrukten der Maus transfiziert wurden. Da aber sowohl in den Versuchen in der künstlichen Lipid-Doppelmembran als auch in den Patch clamp Studien die Kanäle nicht mehr in einem physiologischen Kontext standen, ist das Erscheinungsbild von VDAC *in vivo* ungeklärt.

Das im Rahmen dieser Arbeit heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimierte hVDAC1 führte in Voltage clamp Messungen zu keinerlei Veränderungen der Gesamtzellströme über die Zellmembran. Im Vergleich mit Wasser-injizierten Kontrolloozyten wurde keine signifikante spannungsabhängige Veränderung der Stromantwort durch angelegte Potentiale von -80 mV bis +20 mV festgestellt (Abbildung 18). Die Applikation von bis zu 100 µg/ml anti-hVDAC1 Antikörpern war sowohl in Kontrolloozyten als auch in hVDAC1-exprimierenden Oozyten ohne Wirkung auf das elektrophysiologische Verhalten der untersuchten Oozyten (Abbildung 19 a). Durch Zugabe von 5 µM bis 100 µM Gadolinium in die Badlösung wurde versucht, den Öffnungszustand des heterolog exprimierten hVDAC1 zu modulieren. Für Gadolinium, einem dreiwertigen Lanthanid und Inhibitor von *stretch*-aktivierten Kanälen (Yang und Sachs, 1989), konnte in Streulichtversuchen und Videountersuchungen gezeigt werden, daß es das Schwellen von B-Lymphozyten und HeLa-Zellen initiiert. Dieser Schwellungseffekt konnte durch die Präinkubation der Zellen mit anti-hVDAC1 Antikörpern inhibiert werden (Thinnes *et al.*, 2000a). Die in dieser Arbeit untersuchten, mit Wasser oder hVDAC1-mRNA injizierten Oozyten reagierten auf die Zugabe von Gadolinium in die Badlösung mit unbeeinflussten und identischen Stromantworten (Abbildung 19 b). Gründe hierfür lassen sich möglicherweise in der Präparation der verwendeten Oozyten finden. Diese wurden enzymatisch durch Collagenase defollikuliert. Ackerman *et al.* (1994) beschreiben das Ausbleiben von hypoton stimulierten Strömen in Oozyten ab dem vierten Tag nach Entfernung des Follikelepithels. Steinacker (1998) konnte auf VDAC basierende, hypoton initiierte Ströme an manuell frisch

defollikulierten *Xenopus* Oozyten messen, nicht aber an mit Collagenase behandelten Eizellen. Diese Befunde verdeutlichen einen inhibierenden Einfluß der Defollikulierung in zeitlicher Abhängigkeit auf Ströme, die an der Volumenregulation der Oozyte beteiligt sind. Da Gadolinium aber in HeLa-Zellen und B-Lymphozyten die Volumenregulation moduliert, läßt sich das Ausbleiben solch einer Wirkung in den untersuchten Oozyten fünf Tage nach der Collagenase-Behandlung erklären.

Es ist anzumerken, daß in der 2-Elektroden Voltage clamp Anordnung die Aktivierung bzw. Inaktivierung von Kanälen innerhalb der ersten Millisekunden nach Anlegen der Spannung nicht erfaßt werden können (Dascal, 1987; Stühmer und Parekh, 1995). Sollte hVDAC1 in *Xenopus* Oozyten einer derartigen Kinetik unterliegen, wären die resultierenden Ströme nicht meßbar. Darüber hinaus könnte heterolog exprimiertes hVDAC1 mit dem in *Xenopus* Oozyten nachgewiesenen endogenen VDAC (Steinacker, 2000) um den Transport zur Plasmamembran konkurrieren. Die Anzahl aller VDAC-Moleküle in der Membran und somit das elektrophysiologische Verhalten dieser Oozyte wäre unter Berücksichtigung der biophysikalischen Konvergenz innerhalb der VDAC-Kanäle unterschiedlicher Vertebraten mit dem Erscheinungsbild einer Kontrolloozyte identisch.

Die in dieser Arbeit erzielten Befunde favorisieren für VDAC1 jedoch zusammen mit Erkenntnissen über VDAC-getragene Maxi-Chloridkanäle einen durch Modulatoren verschlossenen Kanal in der Zellmembran. Diese Hypothese wird durch die im folgenden Abschnitt diskutierten Daten unterstützt.

5.3 VDAC im Kontext von Anionen-Kanälen an der Plasmamembran

Eine direkte Beteiligung von VDAC an großen Anionen-Kanälen in der Plasmamembran von Endothelzellen und Astrozyten konnte durch Janisch *et al.* (1993), Dermietzel *et al.* (1994) und Guibert *et al.* (1998) gezeigt werden. Die in diesen Arbeiten beschriebenen Ströme lassen sich den sogenannten Maxi-Chloridkanälen zuordnen. Es handelt sich dabei um ein elektrophysiologisches Erscheinungsbild, nach dessen molekularer Identität seit der Entdeckung durch Baltz und Magleby (1983) gesucht wurde. Die kürzlich veröffentlichte Studie von Buettner *et al.* (2000) liefert aber einen deutlichen Hinweis, daß VDAC die Basis eines Maxi-Chloridkanals darstellt. An mit VDAC transfizierten PC12 Zellen konnten die Autoren in 18 % der vermessenen Patches Maxi-Chloridkanäle identifizieren. Identische Kanäle konnten dagegen in untransfizierten Kontrollzellen nur in 4 % der Patches identifiziert werden.

Maxi-Chloridkanäle sind durch eine hohe Leitfähigkeit von bis zu 450 pS mit Zuständen niedrigerer Leitfähigkeit für den einzelnen Kanal, einem spannungsabhängigen Öffnen mit maximaler Leitfähigkeit um 0 mV, einer Anionen- über Kationenselektivität (Blatz und Magleby, 1983) und einer ubiquitären Verteilung charakterisiert. Derartige Ströme konnten an Muskelzellen der Ratte (Blatz und Magleby, 1983), an humanen B-Lymphozyten (Schlichter *et al.*, 1990), an corticalen Astrozyten der Ratte (Jalonen, 1993), an corticalen Zellen des renalen Sammelrohrs (Schwiebert *et al.*, 1994) und an Neuroblastomzellen (Falke und Misler, 1989) gemessen werden. Die in diesen Studien beschriebenen Ströme wurden durch Patch clamp Messungen an *excised patches* ermittelt. Die Kanäle erschienen fast ausschließlich erst einige Zeit nach dem Ausreißen der Membran (Cahalan und Lewis; 1988, Schlichter *et al.*, 1990; Bosma, 1989; Pahapill und Schlichter, 1992). Da in diesen *excised patches* ein physiologisches intrazelluläres Milieu nicht mehr vorhanden ist (Gray *et al.*, 1984; Woll und Neumcke, 1987; Jalonen, 1993), lassen sich die nun auftretenden Ströme durch das Abdiffundieren eines unter physiologischen Bedingungen intrazellulär assoziierten Regulators interpretieren.

Diese Annahme wird durch Morris und Frizzell (1993) unterstützt, die in undifferenzierten humanen Colonzellen einen Ca^{2+} -abhängigen Chloridkanal mit niedriger Leitfähigkeit im *cell attached* Modus messen konnten, der nach Ausreißen des Patches oder Permeabilisierung der Membran verschwand. Statt dessen wurden in dem Patch Ströme detektiert, die sich den Ca^{2+} -unabhängigen Maxi-Chloridkanälen zuordnen lassen. Nach dem Auftauchen dieser Kanäle konnten die zuvor gemessenen Ca^{2+} -abhängigen Chloridkanäle nicht mehr registriert werden. Ein ähnliches Phänomen wird von Dascal (1987) beschrieben. Der Autor diskutiert eine von Young *et al.* (1984) veröffentlichte Studie, in der Fraktionen der Plasmamembran von *Xenopus* Oozyten in der künstlichen Lipid-Doppelmembran untersucht wurden. In dieser wurde ein Ca^{2+} -abhängiger Kanal mit einer hohen Einzelkanalleitfähigkeit von 380 pS, einer Anionenselektivität und einem spannungsabhängigen Schließen des Kanals bei hohen angelegten Potentialen identifiziert. Ein Kanal mit identischen Eigenschaften konnte in *Xenopus* Oozyten *in vivo* nicht dargestellt werden.

Aus den Ergebnissen von Morris und Frizzell (1993) und Young *et al.* (1984) geht hervor, daß das elektrophysiologische Erscheinungsbild von Maxi-Chloridkanälen im physiologischen Kontext durch modulierende Komponenten beeinflusst wird und eine Isolierung der Kanäle, einhergehend mit Variationen des physiologischen Milieus, zu einer drastischen Veränderung der gemessenen Stromantworten führt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die elektrophysiologischen Untersuchungen mittels Voltage clamp Messungen an der intakten Membran von *Xenopus* Oozyten durchgeführt. Ein Abdiffundieren solch eines modulierenden, intrazellulären Proteins oder Faktors ist in der verwendeten Meßanordnung ausgeschlossen. Da im Gegensatz zu den Patch clamp Aufzeichnungen an VDAC-transfizierten Zellen von Buettner *et al.* (2000) aber durch Voltage clamp Messungen an *Xenopus* Oozyten keine Ströme durch heterolog exprimiertes hVDAC1 initiiert wurden, demonstrieren die erhobenen Daten einen geschlossenen bzw. verschlossenen Zustand sowohl des endogenen VDACs, als auch des heterolog exprimierten hVDAC1 im Kontext eines intrazellulär physiologischen Milieus, wie es für den zuvor diskutierten Maxi-Chloridkanal postuliert wird.

In eukaryontischen Zellen werden Chloridkanäle in der Zellmembran im Zusammenhang mit der Volumenregulation, dem Membranpotential, der pH-Regulierung, dem vektoriellen Transport von Chlorid-Ionen, der Exozytose, dem Membrantransport von Aminosäuren und organischen Osmolyten, der Zellproliferation und der indirekten Aktivierung von Proteinkinasen diskutiert (Nilius *et al.*, 1997). Das elektrophysiologische Erscheinungsbild der experimentell charakterisierten volumen- und schwellungsaktivierten Chloridströme und volumenregulierten Anionenströme wird als VSOAC (*Volume-Sensitive Organic Osmolyte Anion Channel*) zusammengefaßt (Strange und Jackson, 1995). Die molekulare Identität dieses volumensensitiven Kanals konnte bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Er ist im wesentlichen durch eine auswärts-rektifizierende Strom-Spannungsbeziehung, einer Inaktivierung durch Depolarisation und seiner Inhibierbarkeit durch Anionen-Transportblocker charakterisiert. Drei unterschiedliche, durch osmotisches Schwellen aktivierbare und in ihrem elektrophysiologischen Erscheinungsbild bekannte Anionenkanäle werden von Strange *et al.* (1996) als Kandidaten für den VSOAC diskutiert.

Der zu den spannungsabhängigen ClC-Chloridkanälen gehörende, ubiquitär verbreitete ClC2 (Thiemann *et al.*, 1992) ist ein schwellungsaktivierter Kanal mit breiter Anionen-Permeabilität und besitzt eine Leitfähigkeit von 3 bis 5 pS (Pusch und Jentsch, 1994). Aufgrund seiner einwärts-rektifizierenden Strom-Spannungskurve und einer spannungsabhängigen Aktivierung bei niedrigen Potentialen unterscheidet sich dieser Kanal jedoch vom VSOAC (Nilius *et al.*, 1997).

Eine auswärts-rektifizierende Strom-Spannungskurve zeigt hingegen der ORCC (*Outwardly Rectifying Chloride Channel*). Dieser auf molekularer Basis bisher noch unbekannt Kanal

wurde in vielen Säugerzellen (Strange and Jackson, 1995) und auch in *Xenopus* Oozyten (Ackerman *et al.*, 1994) elektrophysiologisch dargestellt. Mit Einzelkanalleitfähigkeiten von 40 bis 78 pS bei positiven und 10 bis 20 pS bei negativen angelegten Potentialen läßt sich der ORCC den Midi-Chloridkanälen zuordnen (Nilius *et al.*, 1997). Der schwellungsaktivierte Kanal wird durch Depolarisierung über 60 mV inaktiviert und läßt sich durch Anionen-Transportblocker inhibieren (Strange *et al.*, 1996). Die letztgenannten Autoren diskutieren weitere Übereinstimmungen des ORCC mit dem VSOAC.

Der bereits in seinen Eigenschaften beschriebene Maxi-Chloridkanal zeigt ebenfalls die für den VSOAC geforderte Inhibierbarkeit durch Anionen-Transportblocker und eine volumensensitive Aktivierung (Strange *et al.*, 1996). Interessant sind Befunde, in denen Bestandteile des Zytoskeletts der Zelle eine Regulation des Maxi-Chloridkanals ausüben (Schwiebert *et al.*, 1994; Stanton *et al.*, 1994). Die Depolymerisierung von F-Aktin durch unterschiedliche Cytochalasine oder ein schwellungsinduziertes Zerreißen des Aktinzytoskeletts führte beispielsweise in Zellen des renalen Sammelrohrs zu einer Aktivierung dieses Kanals. Der lineare Verlauf der Strom-Spannungs-Kennlinie für den Maxi-Chloridkanal unterscheidet sich allerdings von dem des VSOACs. Bei dem Vergleich der Strom-Spannungsbeziehungen beider Kanäle ist jedoch zu beachten, daß die für den Maxi-Chloridkanal ermittelte Kennlinie auf Messungen an *excised patches* beruht. Wie bereits diskutiert, repräsentieren die in diesem Modus aufgezeichneten Daten das Erscheinungsbild des Kanals unter unphysiologischen Bedingungen.

Da für die beiden zuletzt genannten Kanäle, also dem ORCC und dem Maxi-Chloridkanal, in Bezug auf VDAC deutliche Übereinstimmungen existieren, läßt sich dessen Beteiligung an der zellulären Volumenregulation postulieren, die in Abschnitt 5.6 weiter ausgeführt wird.

Neben den von Strange *et al.* (1996) diskutierten Kandidaten für den VSOAC finden sich in der Literatur weitere Arbeiten über diesen schwellungsaktivierten Kanal. Ursprünglich vorgeschlagene Kandidaten, wie das P-Glykoprotein (Valverde *et al.*, 1992) oder der pICln (Paulmichl *et al.*, 1992) werden mittlerweile nicht mehr als Basis, sondern als Regulatoren des Kanals diskutiert (Valverde, 1999). Duan *et al.* (1997) beschreiben die für den VSOAC geforderten Eigenschaften der Spannungsabhängigkeit, der pharmakologischen Inhibierbarkeit und der Ionenselektivität für das Kanalprotein ClC-3. Durch heterolog exprimierte ClC-3 Kanäle hervorgerufene Ströme unterscheiden sich hingegen in ihren Eigenschaften von denen der endogenen schwellungsaktivierten Kanäle (Valverde, 1999). Es ist nicht auszuschließen, daß unterschiedliche Kanäle für volumensensitive Chloridströme

verantwortlich sind. Darüber hinaus können die schwellungsinduzierten Ströme in Zellen unterschiedlicher Gewebe beispielsweise durch spezifische Modulatoren verschieden ausgeprägt sein.

5.4 Nachweis von hVDAC1-bindenden Proteinen mit Hilfe des Two-Hybrid Systems

Durch die unterschiedliche Lokalisierung von VDAC in Mitochondrien, in der Plasmamembran, im sarkoplasmatischen Retikulum und in Endosomen sind besondere Anforderungen an eine Regulation des Kanals gestellt. Das Lumen des jeweiligen Kompartimentes setzt sich aus unterschiedlichen Ionen und organischen Bestandteilen zusammen und wird durch Membranen von dem umgebenden Zytoplasma bzw. dem extrazellulären Raum abgegrenzt. Das in diesen Membranen exprimierte VDAC bedarf zur Aufrechterhaltung des Kompartiment-spezifischen Milieus einer Regulierung, da aufgrund seines *in vitro* gezeigten Porendurchmessers die Existenz eines Gradienten über die jeweilige Membran nicht denkbar wäre. Durch Arbeiten von Holden und Colombini (1993), Heiden *et al.* (1996), Xu *et al.* (1999) und Shimuzu *et al.* (2000a) wurde gezeigt, daß Proteinkomponenten die elektrophysiologischen Eigenschaften von hVDAC1 modulieren. Darüber hinaus ist der Mechanismus der Proteinsortierung zu den unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle bisher ungeklärt. Zum Auffinden weiterer Interaktionspartner von hVDAC1, um auf diese Weise Informationen über die biologischen Eigenschaften des Proteins zu gewinnen, wurde in dieser Arbeit das CytoTrapTM Two-Hybrid System eingesetzt.

In der Vergangenheit wurden für viele Proteine Interaktionspartner durch das etablierte, auf Fields und Song (1989) basierende Two-Hybrid System entdeckt. Ein Köderprotein mit DNA-bindender Domäne interagiert in diesem Assay mit einem Zielprotein mit Transkriptions-aktivierender Domäne im Kern einer Hefezelle und löst die Transkription eines Reportergens aus. Für das Auffinden von Proteinen, die eigenständig Transkriptions-aktivierend wirken, posttranslationale Modifizierungen oder das Zytoplasma bzw. die Plasmamembran als Umfeld zur Ausbildung von Tertiärstrukturen benötigen, hat dieses System Nachteile. Da hVDAC1 nicht im Zellkern, sondern in den Membranen von Mitochondrien, Endosomen, dem sarkoplasmatischen Retikulum und der Zellmembran exprimiert wird, kam alternativ das auf Studien von Aronheim *et al.* (1997) basierende CytoTrapTM Two-Hybrid System zum Einsatz. In diesem Assay führt die Interaktion eines hSos-Köder-Fusionsproteins mit einem durch ein Myristylierungssignal an der

Plasmamembran verankerten Zielprotein über die Aktivierung des Ras-Signalweges zu einem temperaturabhängigen Wachstum der Wirtszelle. Das System bedient sich des temperatursensitiven *Saccharomyces cerevisiae* cdc25H Stammes, der durch eine Mutation im cdc25 Gen bei 25 °C, nicht aber bei 37 °C wachsen kann. Das an das Köderprotein fusionierte hSos komplementiert das defekte cdc25H Gen der Hefe und ermöglicht der Zelle durch Aktivierung des Ras-Signalwegs ein Wachstum bei 37 °C, wenn sich das Köderprotein durch die Interaktion mit dem Zielprotein an der Plasmamembran befindet.

In dieser Arbeit wurde hVDAC1 als Köderprotein zur Suche nach Interaktionspartnern eingesetzt. Da die ersten und auch weitere Befunde zur extramitochondrialen Lokalisierung von hVDAC1 aus H2LCL-Zellen stammen (Thinnes *et al.*, 1989; Reymann *et al.*, 1995), wurde die lymphoblastoide B-Zelllinie zur Synthese einer cDNA-Bank verwendet und diese zur Suche nach Interaktionspartnern eingesetzt.

Das hSos-hVDAC1 Köderprotein konnte den Ras-Signalweg von sich aus in diesem System nicht aktivieren und initiierte daher kein Wachstum der Wirtszelle bei 37 °C (s. 4.2.3). Dieser Befund ist interessant, da natives hVDAC1 wie auch das Ras Protein in bzw. an der Plasmamembran lokalisiert sind. Einzig die räumliche Nähe des hSos ist für die Aktivierung des Ras-Signalweges ausschlaggebend. Die Vermutung, daß das hSos-hVDAC1 Köderprotein an der Plasmamembran der Wirtszelle autonom den Ras-Signalweg aktiviert, findet in dem hVDAC1-Kontrollexperiment keine Bestätigung. Ein Zusammenhang zwischen plasmalemalen hVDAC1 und Ras *in vivo* kann daher ausgeschlossen werden.

Durch das CytoTrapTM Two-Hybrid System konnten die folgenden mit hVDAC1 interagierenden Proteine identifiziert werden: eine leichte Kette des zytoplasmatischen Dyneins (Tctex1), das Peptid-Binding-Protein 74 (PBP74/GRP75/Mortalin/mtHSP70), eine Pyridoxal Kinase, das ER-Protein Sec63, das Hitzeschock-Protein HSP90 und eine 26 S Proteasom Untereinheit (s5a).

Für eine Verifizierung der Interaktion mit hVDAC1 wurden Tctex1 und PBP74 ausgewählt. Für die leichte Kette des zytoplasmatischen Dyneins waren Antikörper zur weiteren Analyse erhältlich. Dynein wird im für VDAC interessanten Zusammenhang mit dem Transport von Proteinen und Vesikeln an Mikrotubuli diskutiert und es lag die vollständige, für den Leserahmen von Tctex1 kodierende cDNA vor. Das PBP74 war interessant, da es wie VDAC in Mitochondrien, in endozytotischen Vesikeln und an der Plasmamembran lokalisiert ist und spezifische Antikörper kommerziell erhältlich waren. Eine Bestätigung der Interaktion von hVDAC1 mit den anderen vier Proteinen konnte bisher noch nicht durchgeführt werden, da

keine Antikörper gegen diese Proteine zur spezifischen Analyse der Interaktion erhältlich waren und die Präparation von Antiseren in Kaninchen im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war. Es ist jedoch festzustellen, daß die Interaktion von hVDAC1 mit Sec63 unter Berücksichtigung der Lokalisierung beider Proteine im ER bzw. SR ebenfalls sehr interessant ist, da Sec63 zusammen mit dem Protein BIP einen Komplex bildet, der bei der Translokation von Proteinen in dieses Kompartiment verantwortlich ist (Skowronek *et al.*, 1999). Für die Pyridoxal Kinase sei an dieser Stelle angemerkt, daß VDAC in Mitochondrien mit der Hexokinase, der Glycerinkinase (Adams *et al.*, 1991) und der Kreatinkinase (Brdiczka *et al.*, 1994) assoziiert vorliegen kann. Im Zusammenhang mit diesen Kinasen wird die Bereitstellung von mitochondrialem ATP durch VDAC bei Phosphorylierungsreaktionen angenommen. Diese Assoziation läßt sich auch für die Pyridoxalkinase vermuten. HSP90 ist ein zytosolisches Hitzeschock-Protein, das an der Faltung von Signaltransduktions-Proteinen beteiligt ist (Caplan, 1999). Loo *et al.* (1998) diskutieren eine Assoziation von HSP90 mit dem *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR). Eine Unterbindung dieser Interaktion verhindert die Bildung des reifen CFTR und beschleunigt zugleich den Abbau des Proteins im 26 S Proteasom. Für VDAC wäre in diesem Zusammenhang eine ähnliche Interaktion vorstellbar. Der von Loo *et al.* (1998) diskutierte Zusammenhang zwischen einer HSP90-abhängigen Proteinfaltung und dem 26 S Proteasom stellt eine Verbindung zu einem weiteren, mit VDAC im Two-Hybrid System interagierenden Protein dar. Die s5a Untereinheit ist ein Teil des 26 S Proteasomes. Sie bindet polyubiquitinierte Proteine und sondiert diese für den proteolytischen Abbau (Ferrell *et al.*, 1996). Beispielhaft für die Proteindegradierung sei an dieser Stelle erneut eine Studie zum CFTR angeführt (Ward *et al.*, 1995). Interessant ist in Bezug auf VDAC außerdem der ATP-abhängige Übergang des 20 S Proteosom-Komplexes mit Proteaseaktivität in den 26 S Proteosom-Komplex mit Substratspezifität (Eytan *et al.*, 1989). Es wäre denkbar, daß mitochondriales ATP durch VDAC, das für dieses Nukletid permeabel ist (Rostovtseva und Colombini, 1997), die Konformationsänderung des Komplexes in räumlicher Nähe begünstigt.

5.4.1 Charakterisierung von Tctex1

Zytoplasmatisches Dynein ist ein multimerer Proteinkomplex, der aus zwei schweren Ketten (>500 kDa), drei Intermediärketten (74 kDa), vier leichten Intermediärketten (50-60 kDa) und unterschiedlichen leichten Ketten (8-22 kDa) besteht (Lane und Allan, 1998; King *et al.*, 1996). Unter Hydrolyse von ATP ist dieser Proteinkomplex an dem Transport von Organellen

und Vesikeln und an der Positionierung des Golgiapparates, des Kerns und der mitotischen Spindeln beteiligt. Eine indirekte Bindung über Dynactin an den Dyneinkomplex ermöglicht den Transport dieser Strukturen an Mikrotubuli in Richtung der Minus-Enden (Lane und Allan, 1998). Eine der leichten Ketten dieses molekularen Motors ist das mit hVDAC1 im Two-Hybrid System interagierende Tctel1, welches nach dem homologen Protein der Maus synonym auch als Tctex1 bezeichnet wird (Watanabe *et al.*, 1996; King *et al.*, 1996). Diese leichte Kette kosedimentiert mit Mikrotubuli, läßt sich von dieser Zytoskelett-Struktur mit anderen Dynein-Proteinen durch ATP eluieren und kann mit einer 74 kDa Intermediärkette immunpräzipitiert werden (King *et al.*, 1996). Tai *et al.* (1998) konnten eine Kollokalisierung von Tctex1 mit dem Golgiapparat darstellen. In Photorezeptorzellen ist Tctex1 darüber hinaus direkt am intrazellulären post-Golgitransport des transmembranalen Proteins Rhodopsin beteiligt (Tai *et al.*, 1999). In dem elektrischen Organ von *Torpedo californica* ist Tctex1 Bestandteil der post-synaptischen Membran und kopräzipitiert mit dem Acetylcholin-Rezeptor (Mou *et al.*, 1998). Eine Assoziation der leichten Dyneinkette ist darüber hinaus mit einem Regulator der Neurotransmitter-Freisetzung (Doc2), der Tyrosinkinase Fyn, den $\beta\gamma$ -Untereinheiten eines heteromeren G-Proteins und mit einem Komplex beschrieben, der aus der GTPase Fip-1 und dem adenoviralen Inhibitor der TNF α -induzierten Apoptose Ad E3-14.7K besteht (Nagano *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 1998; Takesono *et al.*, 1999; Lukashok *et al.*, 2000). Neben der Beteiligung am zytoplasmatischen Dynein ist Tctex1 Bestandteil des inneren Dyneinarms II in Spermien der Maus und des Flagellums von *Chlamydomonas* (Harrison *et al.*, 1998).

Die im Two-Hybrid System ermittelte Interaktion von hVDAC1 und Tctex1 wurde *in vitro* durch einen Überlagerungstest bestätigt. In diesem lagerte sich rekombinantes Tctex1 spezifisch an das vollständige hVDAC1 an (s. Abbildung 23). Ein C-terminal verkürztes hVDAC1-Abbaufragment wurde dagegen nicht durch das rekombinante Tctex1 gebunden. Dieser Befund weist dem an der Interaktion beteiligten Abschnitt des hVDAC1 ein Molekulargewicht um 4000 Da zu.

Eine weitere Charakterisierung der Interaktion beider Proteine erfolgte durch Kollokalisierungsstudien in HeLa-Zellen. Eine überlappende Verteilung beider Proteine wurde intrazellulär von der Plasma- bis an die Kernmembran mit einer deutlichen Anhäufung um den Kern dargestellt (s. Abbildung 26 und Abbildung 27). Diese Befunde bestätigen die von Campbell *et al.* (1998) immunologisch ermittelte Verteilung von Tctex1 in Cos-7 Zellen.

Für eine Interaktion mit hVDAC1 an der Zellmembran ist die in der Literatur beschriebene Assoziation von Tctex1 mit plasmalemalen Proteinen interessant. Die leichte Dyneinkette bindet wie bereits erwähnt an Rhodopsin (Tai *et al.*, 1999) und ist mit dem Acetylcholin-Rezeptor assoziiert (Mou *et al.*, 1998). Bauch *et al.* (1998) beschreiben die Interaktion von Tctex1 mit dem N-Terminus von CD5, einem transmembranalen Regulatorprotein von Antigenrezeptoren auf B- und T-Zellen. Hamm-Alvarez und Sheetz (1998) diskutieren die modulierende Wirkung des Microtubuli-abhängigen Vesikeltransports auf die Aktivität von Kanal- und Transportproteinen in Leber- und Nierenzellen.

Tatsächlich konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Modulation der Kanaleigenschaften von hVDAC1 durch Tctex1 ermittelt werden. In der künstlichen Lipid-Doppelmembran wurden nach Präinkubation der Proteine bei der Insertion des Komplexes im Vergleich mit inserierten nativen hVDAC1-Molekülen häufiger niedrigere Einzelleitfähigkeiten gemessen (Abbildung 34). Die für hVDAC1 charakteristische Spannungsabhängigkeit wurde in Gegenwart von Tctex1 darüber hinaus deutlich erhöht (Abbildung 35). Tctex1 bewirkt somit eine partielle Verschließung des Kanalproteins und ist ein interessanter Kandidat für die Regulation der Pore. Diese Modulation des Kanals entspricht der im Zusammenhang mit Maxi-Chloridkanälen und der plasmalemalen Expression von hVDAC1 gestellten Forderung nach einer Verschließung des Kanals. Bei der Beurteilung des Wirkungsgrades der Verschließung von hVDAC1 durch Tctex1 ist zu berücksichtigen, daß die hier diskutierten Befunde *in vitro* an isolierten Molekülen erhoben wurden. Es ist nicht auszuschließen, daß der Porendurchmesser von hVDAC1 durch die Interaktion mit der leichten Dyneinkette im physiologischen Kontext stärker moduliert wird. Zur Prüfung dieser Hypothese sind *in vivo* Experimente unerlässlich, in denen nach hVDAC-getragenen Strömen unter dem Einfluß von Dynein gesucht wird. Die Verteilung von Dynein läßt sich beispielsweise durch Cholchicin modulieren, welches die Ausbildung von Mikrotubuli inhibiert.

5.4.2 Charakterisierung von PBP74

Im Two-Hybrid System interagierte hVDAC1 mit der C-terminalen Domäne eines Proteins, das unter den Namen *Peptid-binding Protein 74* (PBP74), *Glucose-regulated Protein* (GRP75), *mitochondrial Heatshock Protein 70* (mtHSP70) und *Mortalin* bekannt ist. Die verschiedenen Namen dieses Proteins beschreiben dessen in unterschiedlichen experimentellen Ansätzen identifizierte Funktionen. Es ist an der Prozessierung von Antigenen in B-Zellen beteiligt (Domanico *et al.*, 1993), seine Expression läßt sich durch

Glukose-Mangel induzieren (Massa *et al.*, 1995), es moduliert in Mitochondrien den Import von Proteinen (Bhattacharyya *et al.*, 1995; Voisine *et al.*, 1999) und ist beim zellulären Alterungsprozeß von Bedeutung (Wadhwa *et al.*, 1993). Strukturanalysen ordnen es der HSP70 Familie zu. Proteine dieser Familie binden synthetisierte, ungefaltete Polypeptide und sind bei der Faltung und dem membranalen Proteintransport von Bedeutung (Hartl *et al.*, 1992; Kiang und Tsokos, 1998).

Die Interaktion von hVDAC1 fand im CytoTrapTM System mit einem 232 Aminosäuren langen C-terminalen Fragment dieses Peptid-binding Proteins 74 statt, daß den für HSP70-Proteine charakteristischen konservierten C-Terminus und auch die Peptid-bindende Domäne enthielt. Um zu prüfen, ob die für den vollständigen Leserahmen des Proteins kodierende cDNA in H2LCL-Zellen existiert, wurde die durch Reverse Transkriptase aus H2LCL-mRNA umgeschriebene cDNA in einer PCR-Reaktion mit den Primern PBP74-F und PBP74-R eingesetzt. Das amplifizierte Fragment war mit der für das PBP74 kodierenden cDNA identisch. Zur Bestätigung der ermittelten Interaktion wurde das Protein rekombinant als Glutathion Transferase-S Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert. Das Expressionsprodukt lag in *E. coli* in sogenannten *inclusion bodies* vor und ließ sich nicht mittels immobilisierter Glutathion-Sepharose[®]4B isolieren. Zur Verifizierung der Protein-Protein Bindung wurde daher das im Two-Hybrid System ermittelte, für den C-terminalen Bereich des PBP74 kodierende cDNA-Fragment mittels PCR aus der H2LCL-cDNA amplifiziert, in den Expressionsvektor pGEX-KG kloniert und zur Transformation von *E. coli* eingesetzt. Das in diesem Ansatz exprimierte rekombinante Δ PBP74 ließ sich aus dem bakteriellen Gesamtsolubilisat aufreinigen und wurde für den Überlagerungsassay eingesetzt. Δ PBP74 lagerte sich in diesem Experiment spezifisch an hVDAC1 an (Abbildung 25), wodurch die im Two-Hybrid System ermittelte Interaktion bestätigt werden konnte. Da das rekombinante Δ PBP74 nicht mit dem am C-terminal verkürzten Abbaufragment von hVDAC1 interagiert, muß dieser Proteinabschnitt an der Proteinbindung beteiligt sein.

Ein Zusammenhang beider Proteine *in vivo* konnte darüber hinaus durch die Kolokalisierung des PBP74 mit hVDAC1 in HeLa-Zellen ermittelt werden (Abbildung 28 und Abbildung 29).

In Mitochondrien fungiert das PBP74 in der Matrix an der inneren Mitochondrienmembran als Hitzeschock Protein beim Proteinimport (Voisine *et al.*, 1999). Eine direkte Interaktion von hVDAC1 mit dem PBP74 in Mitochondrien ist aufgrund der räumlichen Verteilung beider Proteine fragwürdig. Die innere mitochondriale Membran verhindert einen direkten

Kontakt des PBP74 in der Matrix mit hVDAC1 in der äußeren Membran (Colombini *et al.*, 1996). Einzig Szabo *et al.* (1993) diskutieren einen prozentual geringen Anteil von VDAC in der inneren Membran. Hier ist jedoch anzumerken, daß VDAC mit dem Adenin-Nukleotid-Transporter (ANT) der inneren Mitochondrienmembran einen Komplex bildet und daher bei der Isolierung der inneren Membran eine Verunreinigung durch an den ANT-assoziiertes VDAC nicht auszuschließen ist. Da das PBP74 wie hVDAC1 im Zellkern kodiert ist und nach seiner Synthese im Zytoplasma zu den Mitochondrien transportiert wird, könnte eine Interaktion beider Proteine in der äußeren Membran beim Import des Hitzeschock Proteins an der äußeren Mitochondrienmembran stattfinden.

In Studien von Domanico *et al.* (1993) und VanBuskirk *et al.* (1991) wurde das PBP74 in zytoplasmatischen Vesikeln, im ER, im Golgiapparat, an der Plasmamembran und in endozytotischen Vesikeln bzw. in Endosomen identifiziert. hVDAC1 konnte ebenfalls in der Plasmamembran (Thinnes und Reymann, 1997), in endozytotischen Vesikeln (Reymann *et al.*, 1998), im SR (Shoshan-Barmatz *et al.*, 1996) und dem Golgiapparat (diese Arbeit) lokalisiert werden. Die identische Verteilung beider Proteine in diesen unterschiedlichen Kompartimenten läßt einen direkten Zusammenhang von hVDAC1 und dem PBP74 vermuten. In Interaktionen des PBP74 mit anderen extrazellulären Proteinen wird das Hitzeschock Protein im Zusammenhang mit dem intrazellulären *Trafficking* des Fibroblasten Wachstumsfaktor-1 (FGF-1) und der Faltung und Translokation des Interleukin-1 Rezeptors I diskutiert (Mizukoshi *et al.*, 1999; Sacht *et al.*, 1998). Diese Funktionen des PBP74 sind für hVDAC1 in Bezug auf dessen Synthese und Transport in der Zelle von besonderem Interesse. Erstaunlicher Weise führte die Interaktion des r Δ PBP74 mit hVDAC1 zu einer drastischen Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften des Kanalproteins in der künstlichen Lipid-Doppelmembran. Bei der Insertion der präinkubierten Proteine in die Membran wurden deutlich vermehrt Einzelkanalleitfähigkeiten von 400 pS gemessen, die den vollständig geöffneten Zustand von hVDAC1 repräsentieren. Insertionen, die den geschlossenen Kanal darstellen, wurden hingegen im Vergleich zum nativen hVDAC1 seltener registriert (Abbildung 36). Das spannungsabhängige Schließen von hVDAC1 wurde in Gegenwart des rekombinanten Δ PBP74 stark inhibiert (Abbildung 37). Die Bindung von r Δ PBP74 stabilisiert dementsprechend einen weit geöffneten Porendurchmesser des Kanalproteins. Inwiefern die Bindung des PBP74 an hVDAC1 dessen elektrophysiologisches Erscheinungsbild *in vivo* moduliert, bleibt ungeklärt. Interessant ist die verstärkt registrierte Einzelkanalleitfähigkeit von 400 pS für hVDAC1 im Zusammenhang mit den bereits diskutierten Maxi-

Chloridkanälen. Die in Patch clamp Versuchen von Dermietzel *et al.* (1994) ermittelte Leitfähigkeit für den einzelnen Kanal entspricht in der Größenordnung der Leitfähigkeit des vollständig geöffneten hVDAC1-r Δ PBP74-Komplexes. Dementsprechend würde eine Assoziation des PBP74 an VDAC in Patch clamp Messungen nicht durch das Ausreißen des Membranfragmentes unterbunden werden. Weitere Studien zur Charakterisierung der hier ermittelten Interaktion von hVDAC1 mit dem PBP74 in einem physiologischen Kontext sind von besonderem Interesse.

5.5 Stand der Translokation und Lokalisierung von VDAC1

VDAC1 wird an freien Ribosomen im Zytoplasma synthetisiert. Der Einbau des Proteins in die äußere Mitochondrienmembran ist ATP-abhängig (Kleene *et al.*, 1987) und unterliegt einer Autokatalyse (Xu und Colombini, 1996). Sequenzabschnitte im C-terminalen Bereich von *Neurospora*-VDAC enthalten nach Court *et al.* (1996) Informationen für eine Rezeptor-abhängige Insertion in diese Membran. Zudem wurde für das Protein Tom20 eine Beteiligung bei der Insertion von VDAC in die äußere Mitochondrienmembran gezeigt (Schleiff *et al.*, 1999). Es ist nicht geklärt, welcher Mechanismus für einen Transport zu extramitochondrialen Kompartimenten verantwortlich ist. Sequenzunterschiede in der 5'-untranslatierten Region (UTR) des VDAC Genes in *Drosophila melanogaster* werden von Bathori *et al.* (1999) als alternative *Splicing*-Produkte im Zusammenhang mit der Sortierung innerhalb der Zelle diskutiert. Eine klassische, für eine Polypeptidkette kodierende Leadersequenz, die einen Kompartiment-spezifischen Transport initiiert, konnte für das humane VDAC1 bisher nicht ermittelt werden. Einzig Buettner *et al.* (2000) diskutieren ein alternatives Splicing-Produkt vom VDAC1 der Maus, das am 5'-Ende für eine plasmalemmale Signalsequenz kodiert. In Zellen, die mit diesem pl-VDAC1 transfiziert wurden, konnten die Autoren eine Ansammlung des Expressionsproduktes im ER und dem Golgiapparat darstellen. Eine deutliche Anhäufung des exprimierten Proteins an der Plasmamembran zeigen die in dieser Studie dargestellten Immunfluoreszenz-Aufnahmen aber nicht. Wie auch bei der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Expression des hVDAC1 in HeLa-Zellen, reichen die intrazellulären Markierungen bis an die Plasmamembran und lassen die Darstellung von deutlich abgegrenzten Fluoreszenzsignalen nicht zu. Die Transfektion von PC12-Zellen der Ratte mit dem Wildtyp-VDAC1 der Maus führte zu einer vermehrten Expression in Mitochondrien. Durch Patch clamp Messungen an ausgerissenen Membranfragmenten untransfizierter PC12 Zellen der Ratte konnten die Autoren in 4 % der Patches Maxi-Chloridkanäle registrieren. In

Zellen, die mit dem pl-VDAC1 der Maus transfiziert wurden, ließen sich identische Kanäle dagegen in 18 % der untersuchten Patches identifizieren. Interessanter Weise zeigten aber auch 17 % der elektrophysiologischen Aufzeichnungen an Zellen, die mit dem Wildtyp-VDAC1 ohne Signalpeptid transfiziert wurden, entsprechende Maxi-Chloridkanäle. Es ist daher nicht eindeutig geklärt, ob diese aus 13 Aminosäuren bestehende Signalsequenz für den spezifischen Transport des VDAC1 zur Plasmamembran verantwortlich ist. Ein Kontrollversuch durch ein definitiv nicht plasmalemmales Protein mit diesem Signalpeptid wurde von den Autoren nicht gezeigt. Die Expression des hVDAC1-EGFP Fusionsproteins und des FLAG-markierten hVDAC1 ohne Signalpeptid konnte zudem in *Xenopus laevis* Oozyten eindeutig an der Plasmamembran dargestellt werden (s. 4.1.3.1, 4.1.3.2 und 4.1.3.3). Soltys und Gupta (2000) postulieren für mitochondriale Proteine einen alternativen Transportmechanismus zu extramitochondrialen Kompartimenten in der Zelle. Die Autoren diskutieren einen Transport unter dem Gesichtspunkt der Endosymbionten-Theorie der Mitochondrien und der Fähigkeit gramnegativer Bakterien, Proteine durch Vesikelabschnürung zu exportieren. Danach würden die Protein-beladenen Vesikel entlang von Zytoskelettelementen spezifisch durch das Zytoplasma zu ihrem Zielort transportiert. Diese Hypothese findet durch Befunde der vorgestellten Arbeit Unterstützung. Das mit hVDAC1 interagierende Tctex1 ist Bestandteil eines Motorkomplexes, der am Transport von Vesikeln und Organellen an Mikrotubuli verantwortlich ist. Darüber hinaus läßt sich in der Literatur ein weiterer Hinweis für eine Verbindung von mitochondrialen Proteinen mit Tctex1 bei Caggese *et al.* (1999) finden. Die Autoren haben mitochondriale Proteine proteinchemisch isoliert und gegen jedes dieser Proteine Antiseren hergestellt. Mit einem dieser Antiseren konnte anschließend in einer cDNA-Expressionsbank der Fliege Tctex1 identifiziert werden. Da Tctex1 selbst nicht in Mitochondrien lokalisiert ist, muß es bei der Aufreinigung an einem mitochondrialen Protein assoziiert gewesen sein. Daß hVDAC1 mit großer Wahrscheinlichkeit dieser Assoziationspartner von Tctex1 ist, zeigt die in dieser Arbeit ermittelten Interaktionen beider Proteine im Two-Hybrid System, im Überlagerungsassay und in den Versuchen an der künstlichen Lipid-Doppelmembran.

Eine Assoziation von VDAC1 mit Mikrotubuli stellt darüber hinaus eine Arbeit von Lindén und Karlsson (1996) dar, in der die Bindung von VDAC1 der Ratte an MAP2 (*Microtubule-Associated Protein 2*) mittels Affinitäts-Chromatographie beschrieben wird.

Die Frage, ob durch die Interaktion mit Tctex1 oder MAP2 VDAC1 als "Brückenprotein" für den Transport von Mitochondrien fungiert, oder als vesikuläres Protein entlang der

Mikrotubuli transportiert wird, läßt sich nicht eindeutig beantworten. Die für Tctex1 durch Tai *et al.* (1999) beschriebenen Eigenschaften sprechen für einen Transport von VDAC1 in Vesikeln. Laut dieser Studie ist Tctex1 direkt für den Transport von Rhodopsin in Vesikeln verantwortlich. Für das im Zusammenhang mit der Neurotransmitterfreisetzung stehende Protein Doc2 wird durch die Interaktion mit Tctex1 eine Beteiligung der leichten Dyneinkette beim vesikulären Transport von Endosomen beschrieben (Nagano *et al.*, 1998). Der elektronenmikroskopische Nachweis von hVDAC1 in endozytotischen Vesikeln (Reymann *et al.*, 1998) ist unter diesem Gesichtspunkt ein weiterer Hinweis auf einen vesikulären Transport des hVDAC1. Die Annahme wird durch eine Studie unterstützt, nach der die Positionierung dieser Membranstrukturen unter der Kontrolle des Dyneinkomplexes und der Mikrotubuli steht (Aniento *et al.*, 1993). Tai *et al.* (1998) konnten Tctex1 im Golgiapparat lokalisieren. Die in der vorgelegten Arbeit ermittelte Kollokalisierung von hVDAC1 mit Markerproteinen des Trans-Golgiapparates favorisiert daher eine Interaktion von hVDAC1 mit Dynein unabhängig von Mitochondrien. Die bisher gesammelten Erkenntnisse zur intrazellulären Verteilung des humanen VDAC1 werden darüber hinaus durch die Lokalisierung des Kanalproteins im Golgiapparat ergänzt (Abbildung 30 a bis h). Eine direkte Assoziation der leichten Dyneinkette läßt sich auch an der Zellmembran finden, da in *T. californica* Tctex1 mit dem Acetylcholin-Rezeptor in der post-synaptischen Membran assoziiert ist (Mou *et al.*, 1998). In dieser Studie wird zudem durch die Interaktion der Tyrosinkinase Fyn mit der leichten Dyneinkette eine zelluläre Verteilung des Dyneinkomplexes in Abhängigkeit seines Phosphorylierungsgrades diskutiert.

Die Transfektion von HeLa-Zellen mit Plasmiden, die für N- oder C-terminale EGFP-hVDAC1 Fusionsproteine kodieren, führte zu einer Ansammlung der Expressionsprodukte in zentralen Regionen des Zytoplasmas (Abbildung 27, 29 und 31 c). Im Vergleich mit dem immunologisch detektierten endogenen hVDAC1 untransfizierter Zellen in den Abbildungen 26 und 28 ließen sich weniger Fusionsproteine in der Zellperipherie darstellen. Diese Verteilung erlangt unter Berücksichtigung einer aktuellen Studie von Desagher und Martinou (2000) besondere Bedeutung, in der eine vermehrte Anordnung der Mitochondrien um den Kern apoptotischer Zellen beschrieben wird. Die Autoren zeigen, daß die Überexpression des proapoptischen Proteins Bax die Verteilung der Mitochondrien in transfizierten Zellen drastisch verändert. Diese ordnen sich in Regionen um den Kern an und lassen sich in der Zellperipherie nicht mehr nachweisen. Sollte die Überexpression der hVDAC1 Fusionsproteine in HeLa-Zellen analog zur Bax-Überexpression für eine Veränderung in der

mitochondrialen Verteilung verantwortlich sein, wäre neben den bestehenden und bereits erwähnten Erkenntnissen zur Beteiligung des mitochondrialen VDACs an der Apoptose ein weiterer Zusammenhang dargestellt. Die Autoren diskutieren, daß ein defekter Kinesin-abhängiger Transport Ursache dieses Phänomens sein kann. Kinesin ist für den Transport von Strukturen in Richtung der Plus-Enden von Mikrotubuli in die Zellperipherie verantwortlich. Die morphologische Veränderung der Zelle in Form einer Anordnung der Mitochondrien um den Kern kann demzufolge auf einem Dynein-abhängigen Transport der Mitochondrien entlang der Mikrotubuli basieren. Der Dynein-Motorkomplex ist für einen Transport membranöser Komponenten in Richtung der Minus-Enden von Mikrotubuli verantwortlich, der von der Zellperipherie zum zentral gelegenen Mikrotubuli-Organisationszentrum führt. Diese Hypothese beinhaltet also einen Dynein-abhängigen Transport von Mitochondrien in Verbindung mit hVDAC1 und findet durch die in dieser Arbeit identifizierten Korrelation in der Verteilung von Tctex1 mit den EGFP-hVDAC1 Fusionsproteinen Bestätigung.

Ob VDAC letztendlich in Vesikeln transportiert wird, am Transport der Mitochondrien durch Tctex1 bzw. Mikrotubuli-assoziierten Proteinen oder aber an beiden Mechanismen beteiligt ist, kann erst durch weitere Experimente aufgeklärt werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen sind hierfür unerlässlich. Die Transfektion von Zellen mit EGFP-markiertem hVDAC1 und die Verfolgung der Expression des Fusionsproteins *in vivo* in zeitlicher Abhängigkeit unter Verwendung einer Fluoreszenz-Videokamera und die Applikation von Zytoskelett-Inhibitoren kann darüber hinaus zu weiteren Erkenntnissen über den Transport des extramitochondrialen Kanalproteins oder aber der Mitochondrien führen.

Für das mit hVDAC1 interagierende PBP74 ist eine Beteiligung an der zellulären Proteinsortierung ebenfalls vorstellbar. Wie bereits erwähnt, fungieren Hitzeschock Proteine als Chaperone bei der Faltung von Proteinen und deren Translokation durch Membranen. Eine derartige Interaktion von hVDAC1 mit dem PBP74 ist in der mitochondrialen Matrix aber äußerst unwahrscheinlich, da die Lokalisierung beider Proteine durch die innere Mitochondrienmembran abgrenzt wird. Analog zu der von VanBuskirk *et al.* (1991) beschriebenen Prozessierung von Antigenen in B-Zellen könnte das PBP74 aber an der Modulation von hVDAC1 in endozytotischen Vesikeln und an der Plasmamembran beteiligt sein.

In der Sequenz von hVDAC1 sind voraussichtlich Informationen für einen zielgerichteten Transport des Proteins in der Zelle enthalten. Dies wird durch die heterologe Expression der EGFP- und FLAG-markierten Fusionsproteine in *Xenopus* Oozyten bestätigt. Eine

umfangreiche Modifizierung am N-Terminus, wie sie durch die Anbindung des EGFPs erfolgte, ließ keine Lokalisierung des Fusionsproteins an der Plasmamembran zu. Die Fusion des EGFPs an den C-Terminus von hVDAC1 verhinderte dessen Insertion in die Zellmembran hingegen nicht. Darüber hinaus hatte die Anbindung des kleinen, aus acht Aminosäuren bestehenden FLAG-Epitops an den N-Terminus keinen inhibitorischen Einfluß auf dessen plasmalemaler Expression. Ob die N-terminale EGFP-Fusionierung an hVDAC1 tatsächlich Sequenzinformationen zum Transport innerhalb der Zelle beeinflußt oder aber den Insertionsprozeß in die Zellmembran mechanisch verhindert, kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht entschieden werden. Das *Xenopus*-Expressionssystem bietet sich jedoch für weitere Studien an, in denen sich beispielsweise der Einfluß deletierter Proteinabschnitte auf den Transport des heterolog exprimierten hVDAC1-EGFP Fusionsproteins verdeutlichen läßt.

5.6 Stand der Diskussion zur Funktion von VDAC1

Der Nachweis in verschiedenen Zellkompartimenten und die ubiquitäre Expression von VDAC1 in unterschiedlichen Zelltypen postulieren eine multifunktionelle Bedeutung des Kanalproteins in Abhängigkeit spezifischer Regulatoren und der Zusammensetzung des angrenzenden Milieus.

In der äußeren Mitochondrienmembran ist VDAC1 zum einen am Metabolitaustausch beispielsweise von ATP und ADP beteiligt (Benz, 1994; Rostovtseva und Colombini, 1997). Jüngere Studien zeigen zum anderen, daß es als Bestandteil der mitochondrialen Permeability Transition Pore (PTP) an dem Cytochrome C-Efflux aus den Mitochondrien im Verlauf der Apoptose involviert ist und direkt mit Apoptose-regulierenden Proteinen der Bcl-2-Familie interagiert (Cromton, 1999; Shimizu *et al.*, 2000a und 200b).

Im sarkoplasmatischen Retikulum wird die Funktion von VDAC bei dem Transport von Ionen und ATP diskutiert (Shoshan-Barmatz *et al.*, 1996).

In Endosomen wird für VDAC1 als Chloridkanal eine Funktion bei der Ansäuerung des Vesikelmilieus postuliert, die wiederum grundlegend für die Prozessierung und den weiteren Transport der Bestandteile dieses Kompartimentes der Zelle ist (Reymann *et al.*, 1998).

Die bisherigen Erkenntnisse über VDAC1 in der Zellmembran favorisieren ein Modell, in dem das Protein die molekulare Basis eines Maxi-Chloridkanals repräsentiert, der *in vivo* unter der Kontrolle regulativer Modulatoren Midi- oder Mini-Chloridkanäle darstellen kann

(Thinnes und Reymann, 1997). Durch die Patch clamp Experimente an ausgerissenen Membranfragmenten in den Arbeiten von Janisch *et al.* (1993), Dermitzel *et al.* (1994), Guibert *et al.* (1998) und Buettner *et al.* (2000) wurde ein direkter Zusammenhang zwischen VDAC1 und Maxi-Chloridkanälen gezeigt. Der Übergang von Ca^{2+} -abhängigen Chloridkanälen niedriger Leitfähigkeit unter physiologischen Bedingungen zu entsprechenden Maxi-Chloridkanälen nach Ausreißen der Membran in Patch clamp Messungen (Morris und Frizzell, 1993) stellt eine Verbindung dieser Mini-Chloridkanäle zu VDAC dar. Thinnes *et al.* (1990) diskutieren die Beteiligung von VDAC1 am ORCC (**O**utwardly **R**ectifying **C**hloride **C**hannel). Dieser Kanal steht in gesunden exokrinen Zellen unter Kontrolle des CFTR (Egan *et al.*, 1992; Gabriel *et al.*, 1993) und läßt sich aufgrund einer mittleren Leitfähigkeit den Midi-Chloridkanälen zuordnen. Die Hypothese eines Kanalkomplexes unter Beteiligung von VDAC, wird durch die folgenden Befunde bestärkt: 1. VDAC1 und CFTR konnten an der Oberfläche respiratorischer Endothelzellen kolokalisiert werden (Puchelle, 1993). 2. VDAC1 bindet ATP und die Stilbendisulfonat-Gruppe von DIDS (Flörke *et al.*, 1994, Thinnes *et al.*, 1994). Der ORCC kann durch beide Substanzen moduliert werden (Becq *et al.*, 1992; Bridges *et al.*, 1989). 3. Der ORCC und VDAC1 werden durch zytosolische Faktoren moduliert (Kunzelmann *et al.*, 1991; Heiden *et al.*, 1996; Heiden 1995; Befunde dieser Arbeit). 4. Der ORCC wird unverändert in CF-Zellen exprimiert und auch VDAC1 ist ohne Veränderung der Primärstruktur in diesen Zellen zu finden (Guggino, 1993; Kayser *et al.*, 1989; Hein, 1992).

Maxi-, Midi- und auch Mini-Chloridkanäle werden im Kontext der Volumenregulation diskutiert (Nilius *et al.*, 1997). Neben der Assoziation des VDAC1 mit dem ORCC ist die für Maxi-Chloridkanäle von Schwiebert *et al.* (1994) gezeigte Regulation der Kanalaktivität und des Zellvolumens durch das auf Aktin basierende Zytoskelett interessant, da sich die elektrophysiologischen Eigenschaften von isoliertem VDAC *in vitro* ebenfalls durch Aktin (Xu *et al.*, 1998) und durch das Aktin-assoziierte Protein Gelsolin (Kusano *et al.*, 2000) beeinflussen lassen. Eine direkte Beteiligung von hVDAC1 an der Volumenregulation konnte an B-Lymphozyten und HeLa-Zellen gezeigt werden. In isotoner Ringerlösung induziert Gadolinium das Schwellen von B-Lymphozyten eines Cystischen Fibrose Patienten als auch gesunder B-Lymphozyten und HeLa-Zellen. Diese Volumenzunahme läßt sich durch die Präinkubation der drei Zelllinien spezifisch mit anti-hVDAC1 Antikörpern inhibieren (Thinnes *et al.*, 2000a). Darüber hinaus konnte bei HeLa-Zellen nach hypotoner Stimulation die sich normalerweise anschließende Volumenabnahme auf den Ausgangszustand

(*Regulatory Volume Decrease*, RVD) durch die Präinkubation der Zellen mit hVDAC1-Antikörpern blockiert werden (Thinnes *et al.*, 2000b). Diese Befunde verdeutlichen eine Kanalfunktion des hVDAC1 in der Plasmamembran im Rahmen der zellulären Volumenreaktion.

Volumen-regulierte Anionenkanäle sind neben der zellulären Osmoregulation unter anderem auch an dem vektoriellen Chloridtransport in polarisierten Endothelzellen, an der Zellproliferation und der Apoptose beteiligt (Nilius *et al.*, 1997). Mitochondriales hVDAC1 erlangte in jüngster Zeit im Zusammenhang mit der Apoptose besondere Aufmerksamkeit, da es als Bestandteil der *Permeability Transition Pore* am Efflux von Cytochrom C aus den Organellen mitwirkt und durch pro- und anti-apoptischen Proteine der Bcl-2 Familie reguliert wird (Shimizu *et al.*, 1999). Für das in der Zellmembran lokalisierte hVDAC1 gibt es interessante Hinweise, daß es am Phänomen des programmierten Zelltodes ebenfalls von Bedeutung ist. Bortner und Cidlowski (1996) zeigen, daß ein Fehlen von Mechanismen der Volumenregulation in lymphoiden Zellen zu apoptotischen Merkmalen führt. Nach Maeno *et al.* (2000) ist die Volumenabnahme einer der initialen Schritte der Apoptose und die Blockierung dieser apoptotischen Volumenabnahme (*Apoptotic Volume Decrease*, AVD) durch Inhibierung von Kalium- und Chloridkanälen verhindert die Ausbildung biochemischer und morphologischer Phänomene des programmierten Zelltodes. VDAC1 bildet mit dem pro-apoptischen Protein Bax der Bcl-2 Familie *in vitro* eine Pore mit einer im Vergleich zum nativen VDAC1 bis zu zehnfach höheren Leitfähigkeit. Die Bindung des anti-apoptischen Proteins Bcl-X_L der Bcl-2 Familie und auch dessen BH4-Domäne verschließen hingegen VDAC1 in Versuchen an künstlichen Lipid-Doppelmembranen (Shimizu *et al.*, 2000b). De Jong *et al.* (1994) konnten das Protein Bcl-2 in Mitochondrien und auch in der Zellmembran lokalisieren. Die Überexpression von Bcl-2 führte in PW-Zellen zu einer Aktivierung der plasmalemalen Na⁺/K⁺/ATPase Pumpe (Gilbert und Knox, 1997). Erste Hinweise für eine mögliche Interaktion von Proteinen der Bcl-2 Familie mit hVDAC1 in der Plasmamembran liefern Befunde, wonach ein Peptid der BH4-Domäne des anti-apoptischen Proteins Bcl-X_L die RVD von HeLa-Zellen nach hypotoner Stimulation inhibiert (Thinnes *et al.* 2000c). Dieser Effekt des BH4-Peptides entspricht der Wirkung von anti-hVDAC1 Antikörpern und dem Anionenkanal-Inhibitor DIDS. Durch die BH4-spezifische Blockierung der Volumenabnahme wäre hVDAC1 in der Plasmamembran direkt durch die Regulation des Zellvolumens an einem weiteren, grundlegenden Schritt der Apoptose beteiligt. Diese

Hypothese wird durch eine Studie von Szabo *et al.* (1998) unterstützt, in der bei der CD95-induzierten Apoptose auf eine Beteiligung des ORCCs, der wie bereits beschrieben mit der Volumenregulation und hVDAC1 in Verbindung steht, verwiesen wird.

Für die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Interaktionspartner des hVDAC1 werden ebenfalls Verbindungen mit der Apoptose diskutiert. Der Dynein-Motorkomplex, in den Tctex1 involviert ist, interagiert mit dem pro-apoptotischen Bcl-2 Protein Bim (Puthalakath *et al.*, 1999). Dick *et al.* (1996) zeigen, daß eine Veränderung des Dyneinkomplexes durch eine Mutation in einer leichten Kette (DDLC1) in *Drosophila*-Zellen die Apoptose zur Folge hat. Der oben erwähnte Zusammenhang des ORCCs mit der CD95-induzierten Apoptose beruht nach Szabo *et al.* (1998) auf der Aktivierung einer Tyrosin Kinase. Atkinson *et al.* (1996) identifizieren in der CD95-abhängigen Signalkaskade eine Assoziation des CD95-Rezeptors mit der Tyrosin Kinase Fyn. Diese interagiert direkt mit der leichten Dyneinkette Tctex1 (Campbell *et al.*, 1998; Mou *et al.*, 1998). Durch die Interaktion des Tctex1 mit hVDAC1, welches als Bestandteil des ORCCs diskutiert wird, läßt sich ein komplexer Zusammenhang zwischen CD95, Fyn, Tctex1, hVDAC1, der auf dem ORCC basierenden Volumenregulation und der Apoptose herstellen.

Ob der Dyneinkomplex letztlich als Transporter von Modulatoren der Apoptose fungiert oder direkt an der Regulation des programmierten Zelltodes beteiligt ist, bleibt vorerst ungeklärt. Da Tctex1 *in vitro* den Porenzustand von hVDAC1 aber verringert, ist ein regulativer Einfluß des Dyneinkomplexes während der Apoptose im Kontext der Volumenreaktion nicht auszuschließen.

Einen Zusammenhang des mit hVDAC1 interagierenden PBP74 und der Apoptose beschreiben Sadekova *et al.* (1997). In HT29 und MCF-1-Zellen konnte nach ionisierender Bestrahlung, einem Auslöser der Apoptose, eine verstärkte Expression des PBP74 beobachtet werden. Eine gezielte Inhibierung der Expression des PBP74 in HT29-Zellen mittels *antisense*-Oligonukleotiden führte zu einer erhöhten Empfindlichkeit bestrahlter Zellen. Die Zelllinie SW48 verfügt über keinen Anpassungsmechanismus an durch γ -Strahlen ausgelöste Apoptose und zeigt keine verstärkte Expression des PBP74 nach Bestrahlung. Das PBP74 stabilisiert zelltypspezifisch die Vitalität bestrahlter Zellen und ist demnach an Kontrollmechanismen der Apoptose beteiligt. Zur Aufklärung dieser Mechanismen bietet die

hier identifizierte Interaktion des hVDAC1 mit dem C-terminalen Abschnitt des PBP74 eine interessante Perspektive.

Die Interaktion des PBP74 mit dem Wachstumsfaktor FGF-1 und seine Bedeutung bei der Immortalisierung von Zellen sprechen daneben für eine Funktion im Rahmen der Zellproliferation. Da für den Zellzyklus unter anderem die mittels volumenregulierter Kanäle modulierte Chloridkonzentration von Bedeutung ist (Nilius, 1997), läßt sich hierbei eine Beteiligung des hVDAC1 in Form des VSOACs vermuten. Die in dieser Arbeit identifizierte drastische Veränderung der Kanaleigenschaften des hVDAC1 durch einen Proteinabschnitt des PBP74 *in vitro* ist unter diesem Gesichtspunkt ein Hinweis zur Beteiligung beider Proteine an der Regulation des zellulären Volumens.

5.7 Ausblick

Eine mögliche Beteiligung des plasmalemalen hVDAC1 an der Apoptose bedarf der weiterführenden Charakterisierung. Gezielte plasmalemmale Lokalisierungsstudien von hVDAC1 mit unterschiedlichen pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie können weitere Hinweise auf einen funktionellen Zusammenhang liefern. Eine nachfolgende Charakterisierung möglicher Interaktionen sollte zwingend unter physiologischen Bedingungen stattfinden, da sich die *in vitro* ermittelten Eigenschaften des hVDAC1 von seinem elektrophysiologischen Erscheinungsbild *in vivo* deutlich unterscheiden.

Zur Charakterisierung der Kanalfunktion von hVDAC1 in der Plasmamembran sind daher ebenfalls weitere Experimente von Bedeutung, die eine Aktivierung des Kanals unter physiologischen Bedingungen zum Ziel haben. Tctex1 und Bestandteile des Aktinzytoskeletts modulieren die elektrophysiologischen Eigenschaften von VDAC1 *in vitro*. Das Zerreißen des Aktinzytoskeletts führt zur Aktivierung von Maxi-Chloridkanälen in der Zellmembran. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für den ORCC neben der Beteiligung von VDAC1 eine Assoziation der leichten Dyneinkette Tctex1 diskutiert. Daher könnten Voltage clamp Messungen oder Patch clamp Versuche im *cell attached* Modus, in denen eine Inhibierung von mit VDAC1 assoziierten Zytoskelettelementen und Motorkomplexen untersucht werden, von Bedeutung sein und zu einer Modulation des Kanalzustandes führen.

Die Identifizierung weiterer mit hVDAC1 in Wechselwirkung stehenden Proteinen könnte mit einem modifizierten CytoTrapTM Two Hybrid System erfolgen. Als Köderprotein der in dieser Arbeit ermittelten Interaktionspartner fungierte ein N-terminales hSos-hVDAC1 Fusionsprotein. Ob der an einer Interaktion mit anderen Proteinen beteiligte N-Terminus des

nativ gefalteten hVDAC1 strukturell dem hSos-hVDAC1 Fusionsprotein entspricht, ist fragwürdig. Proteininteraktionen des N-terminalen Abschnittes von hVDAC1 mit anderen Proteinen *in vivo* werden durch das hSos mit großer Wahrscheinlichkeit unterbunden. Es wäre interessant zu testen, ob sich ein C-terminal an hVDAC1 fusioniertes hSos als Köderprotein im CytoTrapTM System zur Identifizierung von Wechselwirkungen des N-Terminus mit anderen Proteinen eignet und so weitere Hinweise zum biologischen Kontext des Kanalproteins liefern kann.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung von hVDAC1 unter physiologischen Bedingungen im Kontext seiner Lokalisierung und Funktionalität. Hierfür wurde das Kanalprotein heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und analysiert. Mit hVDAC1 in Wechselwirkung stehende Proteine sollten darüber hinaus durch ein Two-Hybrid System identifiziert werden, um auf diesem Weg weitere Erkenntnisse über das Protein in seinem biologischen Umfeld zu gewinnen.

Plasmide, die für das Wildtyp-hVDAC1 und N- bzw. C-terminal durch Anbindung des *Enhanced Green Fluorescent Proteins* oder des FLAG-Epitops modifizierte hVDAC1 kodieren, dienten zur Synthese spezifischer mRNA. Diese erwiesen sich in einem *in vitro*-Transaktionssystem als funktionstüchtig, wurden in *Xenopus* Oozyten injiziert und von diesen erfolgreich translatiert.

Heterolog exprimiertes hVDAC1-EGFP konnte in fluoreszenzmikroskopischen Analysen eindeutig an der Plasmamembran der *Xenopus* Oozyten oberhalb einer diffusen intrazellulären Verteilung dargestellt werden. Das EGFP-hVDAC1 ließ sich dagegen wie das zur Kontrolle exprimierte EGFP nur intrazellulär lokalisieren. Dieses Ergebnis verdeutlicht die Bedeutung des N-Terminus von hVDAC1 für dessen plasmalemmale Lokalisierung.

Mit dem FLAG-Epitop markiertes, heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimiertes hVDAC1 konnte mittels Raster-Elektronenmikroskopie nach Immungoldfärbung und Silberverstärkung ebenfalls an der Plasmamembran detektiert werden. Dabei hatte die Anbindung des aus acht Aminosäuren bestehenden FLAG-Epitopes an den N- oder den C-Terminus von hVDAC1 keinen inhibitorischen Einfluß auf dessen Einbau in die Zellmembran.

Diese Befunde bestätigen die in der Vergangenheit angezweifelte, durch anti-hVDAC1 Antikörper ermittelte Lokalisierung des VDAC1 in der Plasmamembran eukaryontischer Zellen.

In *Xenopus* Oozyten konnte mit Hilfe der 2-Elektroden Voltage clamp Methode eine durch heterolog exprimiertes hVDAC1 bedingte Veränderung des Gesamtzellstromes über die Zellmembran nicht detektiert werden. Dieser Befund bestätigt das für eine plasmalemmale Lokalisierung geforderte Einnehmen eines geschlossenen Kanalzustandes unter physiologischen Bedingungen. Die Applikation von hVDAC1-Modulatoren initiierte unter isotonen Bedingungen keine Aktivitätsveränderung des Kanals.

Zum Auffinden von mit hVDAC1 interagierenden Proteinen wurde eine H2LCL cDNA-Bank synthetisiert und im CytoTrapTM Two-Hybrid System mit hVDAC1 als Köderprotein durchsucht. Da die Grundlage dieses Interaktionsassays auf einer Ansteuerung des Ras-

Signalweges der Wirtszelle basiert, das hVDAC1-Köderprotein aber zu keiner eigenständigen Aktivierung des Systems führte, kann eine Funktion des hVDAC1 im Zusammenhang mit der Ansteuerung der Ras-Signalkaskade ausgeschlossen werden.

Von 2×10^6 mit pSos-hVDAC1 und pMyr-cDNA transformierten Hefeklonen wurden 13 Kolonien identifiziert, deren pMyr-cDNA Plasmide für Proteine kodierten, die spezifisch mit hVDAC1 interagierten. DNA-Sequenzanalysen ergaben, daß die pMyr Plasmide dieser Hefeklone für sechs unterschiedliche Proteine kodieren. Als Interaktionspartner von hVDAC1 wurden durch Sequenzdatenbank-Vergleiche die leichte Dyneinkette Tctex1, das zur HSP70-Familie gehörende Peptid-binding Protein 74 (PBP74), die Pyridoxal Kinase, das ER-Protein Sec63, das Chaperon HSP90 und die s5a-Untereinheit des 26 S Proteasom identifiziert.

Die *in vivo* ermittelten Interaktionen von hVDAC1 mit Tctex1 und PBP74 ließen sich proteinchemisch und elektrophysiologisch bestätigen. Hierfür wurden Tctex1 und der im Two-Hybrid System für die Bindung mit hVDAC1 verantwortliche C-terminale Bereich von PBP74 rekombinant in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Mit Hilfe des Überlagerungstests konnte die Anbindung sowohl von rTctex1 als auch von r Δ PBP74 an den C-terminen Abschnitt von hVDAC1 *in vitro* durch spezifische Antikörper gezeigt werden. hVDAC1 ließ sich darüber hinaus mit Tctex1 und Δ PBP74 in HeLa-Zellen kolokalisieren.

In Messungen an künstlichen Lipid-Doppelmembranen führte die Präinkubation von hVDAC1 mit rTctex1 zu einem partiellen Verschließen des Kanals. In Gegenwart des rekombinanten Δ PBP74 nahm hVDAC1 deutlich vermehrt seinen vollständig geöffneten Kanalzustand ein und zeigte eine verminderte Spannungsabhängigkeit.

Durch die Interaktion von hVDAC1 mit Tctex1 und PBP74 wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals Hinweise auf einen vesikulären Transport des Proteins in der Zelle erhoben. Zusammen mit in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen bekräftigen die vorgestellten Ergebnisse darüber hinaus für hVDAC1 eine Kanalfunktion in der Plasmamembran. Als Bestandteil des *Outwardly rectifying chloride channels* oder eines Maxi-Chloridkanals wird für hVDAC1 eine Beteiligung an der zellulären Volumenregulation und somit eine Funktion bei grundlegenden zellulären Mechanismen wie der Osmoregulation, der Proliferation und der Apoptose postuliert.

Künftig bleibt zu klären, welchen Regulationsmechanismen hVDAC1 als Anionenkanal in der Plasmamembran unterliegt. Eine gezielte Modulation von Zytoskelettelementen in elektrophysiologischen Experimenten bietet hierfür und auch zur weiteren Erforschung des zellulären hVDAC1-Transports in Lokalisierungsstudien erfolgsversprechende Perspektiven.

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
A.L.F.	Automated laser fluorescent
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bidest.	bidestillata
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIDS	4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-Disulfonsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EGTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung, Gramm
G	Leitfähigkeit
GABA	γ -Aminobuttersäure
Gal	Galaktose
Glu	Glukose
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
H2LCL	lymphoblastoide B-Zelllinie mit den Genen des H2 Locus
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-Piperazin-N'-[2'-Ethansulfonsäure]
HRP	Horseradish Peroxidase
hVDAC1	human voltage-dependent anion-selective channel 1
I	Stromstärke
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
k	Kilo
l	Liter
L	Leucin
LB	Luria Bertani
LMW	Low molecular weight Proteinmarker
m	Meter; milli
M	molar
μ	micro

min	Minute
MOPS	3-(N-mopholino) propansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
n	nano
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
Ω	Ohm
OD	Optische Dichte
OPC	Oligonucleotic purification cartridge
ORCC	Outwardly rectifying chloride channel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
p	pico
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der $H^{(+)}$ -Ionenkonzentration
PBS	Phosphate buffered saline
pI	isoelektrischer Punkt
PEG	Polyethylenglycol
PTP	Permeability transition pore
PVDF	Polyvinylidendifluorid
r	rekombinant
REM	Raster-Elektronenmikroskop
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RVD	Regulatory volume decrease
s	Sekunde
S	Siemens
SD	Synthetic drop-out
SDS	Sodiumdodecylsulfate
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisocyanat
U	Spannung, Unit, Uracil
UV	ultraviolett
V	Volt
V_{clamp}	Klemmspannung
VSOAC	Volume-sensitive organic osmolyte-anion channel
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Phosphat	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
YPAD	Yeast-extract/Peptone/Adenine hemisulfate/Dextose
YT	Yeast-extract/Tryptone

8 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Genkarte des Vektors pBluescript SK (+)	9
Abbildung 2: Genkarte des Transkriptions Vektors pSGEM	9
Abbildung 3: Genkarte des Expressionsvektors pEGFP-N1	10
Abbildung 4: Genkarte des Expressionsvektors pEGFP-C3	11
Abbildung 5: Genkarte des Expressionsvektors pGEX-KG	12
Abbildung 6: Genkarte des CytoTrap TM Two-Hybrid Vektors pMyr	13
Abbildung 7: Genkarte des CytoTrap TM Two-Hybrid Vektors pSos.....	14
Abbildung 8: Aufbau der Meßapparatur für Versuche mit künstlichen Lipid- Doppelmembranen	42
Abbildung 9: Schematische Darstellung des 2-Elektroden Voltage clamp Aufbaus	50
Abbildung 10: hVDAC1-Konstrukte zur Untersuchung der Lokalisierung in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	52
Abbildung 11: <i>In vitro</i> -Transkriptionsprodukte der hVDAC1-Plasmide	53
Abbildung 12: <i>in vitro</i> -Translationsprodukte der hVDAC1-Konstrukte.....	54
Abbildung 13: Lichtmikroskopische Darstellung des hVDAC1/EGFP-Fusionsproteins und des EGFPs in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	55
Abbildung 14: Konfokale Visualisierung des hVDAC1/EGFP-Fusionsproteins und des EGFPs in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	56
Abbildung 15: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Expression des durch das FLAG-Epitop modifizierten hVDAC1 in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	57
Abbildung 16: Proteinchemische Analyse des in <i>Xenopus</i> Oozyten heterolog exprimierten hVDAC1 und hVDAC1/EGFP-Fusionsproteins.....	59

Abbildung 17: Proteinchemische Analyse des in <i>Xenopus</i> Oozyten heterolog exprimierten, FLAG-markierten hVDAC1	60
Abbildung 18: Strom-Spannungsbeziehung von hVDAC1-exprimierenden- und Kontrolloozyten.....	61
Abbildung 19: Einfluß von anti-hVDAC1 Antikörper und Gadolinium auf die Strom-Spannungsbeziehung von hVDAC1-exprimierenden Oozyten.....	62
Abbildung 20: Schematische Darstellung der wichtigsten Schritte der Durchmusterung einer H2LCL cDNA-Bank mit hVDAC1 als Köderprotein im CytoTrap™ Two-Hybrid System.....	65
Abbildung 21: Interaktionsspezifisches Wachstum von <i>S. cerevisiae</i> cdc25H nach simultaner Transformation mit spezifischen pSos- und pMyr-Plasmiden.....	68
Abbildung 22: Aufreinigung von rekombinantem Tctex1 an Glutathion-Sepharose® 4B	70
Abbildung 23: Nachweis der Protein/Protein Interaktion von hVDAC1 mit rTctex1 im Überlagerungsassay.....	71
Abbildung 24: Aufreinigung von rekombinantem PBP74 an Glutathion-Sepharose® 4B	73
Abbildung 25: Nachweis der Protein/Protein Interaktion von hVDAC1 mit rΔPBP74 im Überlagerungsassay.....	74
Abbildung 26: Kolokalisierung von hVDAC1 und Tctex1 in HeLa-Zellen.....	76
Abbildung 27: Kolokalisierung von EGFP-hVDAC1 Fusionsproteinen und Tctex1 in HeLa-Zellen.....	77
Abbildung 28: Kolokalisierung von hVDAC1 und PBP74 in HeLa-Zellen	78
Abbildung 29: Kolokalisierung von EGFP-hVDAC1 Fusionsproteinen und PBP74 in HeLa-Zellen.....	79
Abbildung 30: Kolokalisierung von hVDAC1 mit Markerproteinen des Golgiapparates und von Mitochondrien in HeLa-Zellen.....	80

Abbildung 31: Lokalisierung der hVDAC1-EGFP Fusionsproteine transfizierter HeLa-Zellen	82
Abbildung 32: Einzelkanalleitfähigkeit von hVDAC1	83
Abbildung 33: Spannungsabhängige Änderung der relativen Leitfähigkeit von hVDAC1	84
Abbildung 34: Einfluß von rTctex1 auf die Einzelkanalleitfähigkeit von hVDAC1	85
Abbildung 35: Erhöhung der spannungsabhängigen Änderung der relativen Leitfähigkeit von hVDAC1 durch rTctex1	86
Abbildung 36: Einfluß von rΔPBP74 auf die Einzelkanalleitfähigkeit von hVDAC1	87
Abbildung 37: Erniedrigung der spannungsabhängigen Änderung der relativen Leitfähigkeit von hVDAC1 durch rΔPBP74.....	88
Tabelle 1: Plasmidkombinationen zur simultanen Transformation von <i>S.cerevisiae</i> cdc25H	36
Tabelle 2: Nachweis der spezifischen Interaktion der durch pMyr und pSos kodierten Proteine mit dem CytoTrap TM Two-Hybrid System	37
Tabelle 3: Mit hVDAC1 im CytoTrap TM Two-Hybrid System interagierende Proteine.....	66

9 Literaturverzeichnis

ACKERMAN M.J., WICKMAN K.D., CLAPHAM D.E. (1994) Hypotonicity activates a native chloride current in *Xenopus*-oocytes. *J. Gen. Physiol.* 103, 153-179.

ADAMS V., GRIFFIN L., TOWBIN J., GELB B., WORLEY K., MCCABE E.R.B. (1991) Porin interaction with hexokinase and glycerol kinase - metabolic microcompartmentation at the outer mitochondrial-membrane. *Biochem. Med. Metab. B.* 45, 271-291.

ANIENITO F., EMANS N., GRIFFITHS G., GRUENBERG J. (1993) Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J. Cell. Biol.* 123, 1373-1387 Part 1.

ARONHEIM A., ZANDI E., HENNEMANN H., ELLEDGE S.J., KARIN M. (1997) Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3094-3102.

ATKINSON E.A., OSTERGAARD H., KANE K., PINKOSKI M.J., CAPUTO A., OLSZOWY M.W., BLEACKLEY R.C.A. (1996) Physical interaction between the cell death protein Fas and the tyrosine kinase p59(FynT). *J. Biol. Chem.* 271, 5968-5971.

BABEL D., WALTER G., GÖTZ H., THINNES F.P., JÜRGENS L., KONIG U., HILSCHMANN N. (1991) Studies on human porin 6. Production and characterization of 8 monoclonal mouse antibodies against the human VDAC Porin 31HL and their application for histotopological studies in human skeletal-muscle. *Biol. Chem. H.-S.* 372, 1027-1034.

BALINSKY B.I. (1981) *An introduction to embryology.* W.B. Saunders, Philadelphia.

BÀTHORI G., SZABO I., SCHMEHL I., TOMBOLA F., DE PINTO V., ZORATTI M. (1998) Novel aspects of the electrophysiology of mitochondrial porin. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 243, 258-263.

BÀTHORI G., PAROLINI I., TOMBOLA F., SZABO I., MESSINA A., OLIVA M., DE PINTO V., LISANTI M., SARGIACOMO M., ZORATTI M. (1999) Porin is present in the plasma membrane where it is concentrated in caveolae and caveolae-related domains. *J. Biol. Chem.* 274, 29607-29612.

- BAUCH A., CAMPBELL K.S., RETH M.** (1998) Interaction of the CD5 cytoplasmic domain with the Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II delta. *Eur. J. Immunol.* 28, 2167-2177.
- BEAUCAGE S.L., CARUTHERS M.H.** (1981) Desoxynucleosid phosphoramidites - a new class of key intermediates for desoxynucleotide synthesis. *Tetrahedron. Lett.* 22, 1859-1862.
- BECQ F., FANJUL M., MAHIEU I., BERGER Z., GOLA M., HOLLANDE E.** (1992) Anion channels in a human pancreatic-cancer cell-line (Capan-1) of ductal origin. *Pflug. Arch. Eur. J. Phy.* 420, 46-53.
- BENZ R., JANKO K., BOOS W., LÄUGER P.** (1978) Formation of large, ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta* 511, 305-319.
- BENZ R., JANKO K., LÄUGER P.** (1979) Ionic selectivity of pores formed by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta* 511, 238-247.
- BENZ R., BAUER K.** (1988) Permeation of hydrophilic molecules through the outer-membrane of gram-negative bacteria - review on bacterial porins. *Eur. J. Biochem.* 176, 1-19.
- BENZ R., WOJTCZAK L., BOSCH W., BRDICZKA D.** (1988) Inhibition of adenine-nucleotide transport through the mitochondrial porin by a synthetic polyanion. *FEBS Lett.* 231, 75-80.
- BENZ R., KOTTKE M., BRDICZKA D.** (1990) The cationically selective state of the mitochondrial outer-membrane pore - a study with intact mitochondria and reconstituted mitochondrial porin. *Biochim. Biophys. Acta* 1022, 311-318.
- BENZ R., MAIER E., THINNES F.P., GÖTZ H., HILSCHMANN N.** (1992) Studies on human porin 7. The channel properties of the human lymphocyte-B membrane-derived Proin-31HL are similar to those of mitochondrial porins. *Biol. Chem. H.-S.* 373, 295-303.
- BENZ R.** (1994) Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes - review on mitochondrial porins. *BBA-Rev. Biomembranes* 1197, 167-196.
- BHATTACHARYYA T., KARNEZIS A.N., MURPHY S.P., HOANG T., FREEMAN B.C., PHILLIPS B., MORIMOTO R.I.** (1995) Cloning and subcellular-localization of human mitochondrial HSP70. *J. Biol. Chem.* 270, 1705-1710.

- BIRNBOIM H.C., DOLY J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523.
- BLACHLYDYSON E., BALDINI A., LITT M., MCCABE E.R.B., FORTE M.** (1994) Human genes encoding the voltage-dependent anion channel (VDAC) of the outer mitochondrial-membrane - mapping and identification of 2 new isoforms. *Genomics* 20, 62-67.
- BLATZ A.L., MAGLEBY K.L.** (1983) Single voltage-dependent chloride-selective channels of large conductance in cultured rat muscle. *Biophys. J.* 43, 237-241.
- BORTNER C.D., CIDLOWSKI J.A.** (1996) Absence of volume regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes. *Am. J. Physiol-Cell P.H.* 40, C950-C961.
- BOSMA M.M.** (1989) Anion channels with multiple conductance levels in a mouse lymphocyte-B cell-line. *J. Physiol.* 410, 67-90.
- BRDICZKA D., KALDIS P., WALLIMANN T.** (1994) In-vitro complex-formation between the octamer of mitochondrial creatine-kinase and porin. *J. Biol. Chem.* 269, 27640-27644.
- BRIDGES R.J., WORRELL R.T., FRIZZELL R.A., BENOS D.J.** (1989) Stilbene disulfonate blockade of colonic secretory Cl⁻ channels in planar lipid bilayers. *Am. J. Physiol.* 256, C902-C912 Part 1.
- BUENO O.F., ROBINSON L.C., ALVAREZ-HERNANDEZ X., LEIDENHEIMER N.J.** (1998) Functional characterization and visualization of a GABA(A) receptor-GFP chimera expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol. Brain. Res.* 59, 165-177.
- BUCHANAN S.K.** (1999) Beta-Barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 9, 455-461.
- BUETTNER R., PAPOUTSOGLOU G., SCEMES E., SPRAY D.C., DERMIETZEL R.** (2000) Evidence for secretory pathway localization of a voltage-dependent anion channel isoform. *P. NATL. ACAD. SCI. USA* 97, 3201-3206.

- BUREAU M.H., KHRESTCHATISKY M., HEEREN M.A., ZAMBROWICZ E.B., KIM H., GRISAR T.M., COLOMBINI M., TOBIN A.J., OLSEN R.W.** (1992) Isolation and cloning of a voltage-dependent anion channel-like Mr 36,000 polypeptide from mammalian brain. *J. Biol. Chem.* 267, 8679-8684.
- CAGGESE C., RAGONE G., PERRINI B., MOSCHETTI R., DE PINTO V., CAIZZI R., BARSANTI P.** (1999) Identification of nuclear genes encoding mitochondrial proteins: isolation of a collection of *D-melanogaster* cDNAs homologous to sequences in the Human Gene Index database. *Mol. Gen. Genet.* 261, 64-70.
- CAHALAN M.D., LEWIS R.S.** (1988) Role of potassium and chloride channels in volume regulation by T lymphocytes. In: *Cell physiology of blood.* Gunn R. Parker J. (Hrsg.), 281-301, Rockefeller Univ. Press, New York.
- CAMPBELL K.S., COOPER S., DESSING M., YATES S., BUDER A.** (1998) Interaction of p59(Fyn) kinase with the dynein light chain, Tctex-1, and colocalization during cytokinesis. *J. Immunol.* 161, 1728-1737.
- CAPLAN A.J.** (1999) HSP90's secrets unfold: new insights from structural and functional studies. *Trends Cell Biol.* 9, 262-268.
- COLE T., AWNI L.A., NYAKATURA E., GÖTZ H., WALTER G., THINNES F.P., HILSCHMANN N.** (1992) Studies on human porin 8. Expression of Porin 31HL channels in the plasmalemma of the acute-lymphoblastic-leukemia cell-line KM3 as revealed by light-microscopy and electron-microscopy. *Biol. Chem. H.-S.* 373, 891-896.
- COLOMBINI M.** (1979) Candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial-membrane. *Nature* 279, 643-645.
- COLOMBINI M.** (1980) Pore-size and properties of channels from mitochondria isolated from *Neurospora-crassa*. *J. Membrane Biol.* 53, 79-84.
- COLOMBINI M., YEUNG C.L., TUNG J., KONIG T.** (1987) The mitochondrial outer-membrane channel, VDAC, is regulated by a synthetic polyanion. *Biochim. Biophys. ACTA* 905, 279-286.
- COLOMBINI M.** (1989) Voltage gating in the mitochondrial channel, VDAC. *J. Membrane Biol.* 111, 103-111.

- COLOMBINI M., BLACHLY-DYSON E., FORTE M.** (1996) VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane. In: Ion Channels Vol. 4 (Narahashi, T. ed.), 169-202, Plenum Publishing Corp., New York.
- COURT D.A., KLEENE R., NEUPERT W., LILL R.** (1996) Role of the N- and C-termini of porin in import into the outer membrane of *Neurospora* mitochondria. *Febs Lett.* 390, 73-77.
- COWAN S.W., SCHIRMER T., RUMMEL G., STEIERT M., GHOSH R., PAUPTIT R.A., JANSONIUS J.N., ROSENBUSCH J.P.** (1992) Crystal-structures explain functional-properties of 2 *Escherichia-coli* porins. *Nature* 358, 727-733.
- CROMPTON M.** (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 341, 233-249.
- DASCAL N.** (1987) The use of *Xenopus* oocytes for study ion channels. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22, 317-387.
- DAVID-WATINE B., SHORTE S.L., FUCILE S., DE SAINT JAN D., KORN H., BREGESTOVSKI P.** (1999) Functional integrity of green fluorescent protein conjugated glycine receptor channels. *Neuropharmacology* 38, 785-792.
- DEJONG D., PRINS F.A., MASON D.Y., REED J.C., VANOMMEN G.B., KLUIN P.M.** (1994) Subcellular-localization of the Bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid-cells. *Cancer Res.* 54, 256-260.
- DEPINTO V., PREZIOSO G., THINNES F., LINK T.A., PALMIERI F.** (1991) Peptide-specific antibodies and proteases as probes of the transmembrane topology of the bovine heart mitochondrial porin. *Biochemistry* 30, 10191-10200.
- DERMIETZEL R., HWANG T.K., BUETTNER R., HOFER A., DOTZLER E., KREMER M., DEUTZMANN R., THINNES F.P., FISHMAN G.I., SPRAY D.C., SIEMEN D.** (1994) Cloning and in-situ localization of a brain-derived porin that constitutes a large-conductance anion channel in astrocytic plasma-membranes. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 499-503.
- DESAGHER S., MARTINO J.C.** (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 10, 369-377.

- DICK T., RAY K., SALZ H.K., CHIA W.** (1996) Cytoplasmic dynein (DDLC1) mutations cause morphogenetic defects and apoptotic cell death in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1966-1977.
- DOMANICO S.Z., DENAGEL D.C., DAHLSEID J.N., GREEN J.M., PIERCE S.K.** (1993) Cloning of the gene encoding peptide-binding protein-74 shows that it is a new member of the heat-shock protein-70 family. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3598-3610.
- DUAN D., WINTER C., COWLEY S., HUME J.R., HOROWITZ B.** (1997) Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature* 390, 417-421.
- EGAN M., FLOTTE T., AFIONE S., SOLOW R., ZEITLIN P.L., CARTER B.J., GUGGINO W.B.** (1992) Defective regulation of outwardly rectifying Cl⁻ channels by protein kinase-a corrected by insertion of CFTR. *Nature* 358, 581-584.
- EBEN-BRUNNEN J., REYMANN S., AWNI L.A., COLE T., HELLMANN T., HELLMANN K.P., PAETZOLD G., KLEINEKE J., THINNES F.P., GÖTZ H., HILSCHMANN N** (1998) Lentil lectin enriched microsomes from the plasma membrane of the human B-lymphocyte cell line H2LCL carry a heavy load of type-1 porin. *Biol. Chem.* 379, 1419-1426.
- EYTAN E., GANOTH D., ARMON T., HERSHKO A.** (1989) ATP-Dependent incorporation of 20S protease into the 26S complex that degrades proteins conjugated to ubiquitin - (protein breakdown multicatalytic proteinase complex). *P. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7751-7755.
- FALKE L.C., MISLER S.** (1989) activity of ion channels during volume regulation by clonal N1E115 neuro-blastoma cells. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3919-3923.
- FERRELL K., DEVERAUX Q., VAN NOCKER S., RECHSTEINER M.** (1996) Molecular cloning and expression of a multiubiquitin chain binding subunit of the human 26S protease. *Febs Lett.* 381, 143-148.
- FIELDS S., SONG O.K.** (1989) A novel genetic system to detect protein protein interactions. *Nature* 340, 245-246.

- FLÖRKE H., THINNES F.P., WINKELBACH H., STADTMÜLLER U., PAETZOLD G., MORYS-WORTMANN C., HESSE D., STERNBACH H., ZIMMERMANN B., KAUFMANN-KOLLE P., HEIDEN. M., KARABINOS A., REYMANN S., LALK V.E, HILSCHMANN N.** (1994) Channel active mammalian porin, purified from crude membrane-fractions of human B-lymphocytes and bovine skeletal-muscle, reversibly binds adenosine-triphosphate (ATP). *Biol. Chem. H.-S.* 375, 513-520.
- GABRIEL S.E., CLARKE L.L., BOUCHER R.C., STUTTS M.J.** (1993) CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature* 363, 263-266.
- GEY G.O., COFFMAN W.D., KUBICEK M.T.** (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 12, 264-265.
- GRAY P.T.A., BEVAN S., RITCHIE J.M.** (1984) High conductance anion-selective channels in rat cultured schwann-cells. *P. Roy. Soc. Lond. B. Bio.* 221, 395-409.
- GUAN K.L., DIXON J.E.** (1991) Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal. Biochem.* 192, 262-267.
- GUGGINO W.B.** (1993) Outwardly rectifying chloride channels and CF - a divorce and remarriage. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25, 27-35.
- GUIBERT B., DERMETZEL R., SIEMEN D.** (1998) Large conductance channel in plasma membranes of astrocytic cells is functionally related to mitochondrial VDAC-channels. *Int. J. Biochem. Cell B.* 30, 379-391.
- GURDON J.B., LANE C.D., WOODLAND H.R., MARBAIX G.** (1971) Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and it's translation in living cells. *Nature* 233, 177-182.
- GURDON J.B.** (1974) The control of gene expression in animal development. University Press, Oxford.

- HAMM-ALVAREZ S.F., SHEETZ M.P.** (1998) Microtubule-dependent vesicle transport: Modulation of channel and transporter activity in liver and kidney. *Physiol. Rev.* 78, 1109-1129.
- HANAHAH D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- HANNA M.C., TURNER A.J., KIRKNESS E.F.** (1997) Human pyridoxal kinase. cDNA cloning, expression, and modulation by ligands of the benzodiazepine receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 10756-10760.
- HARRISON A., OLDS-CLARKE P., KING S.M.** (1998) Identification of the t complex-encoded cytoplasmic dynein light chain Tctex1 in inner arm II supports the involvement of flagellar dyneins in meiotic drive. *J. Cell Biol.* 140, 1137-1147.
- HARTL F.U., MARTIN J., NEUPERT W.** (1992) Protein folding in the cell - the role of molecular chaperones HSP70 and HSP60. *Annu. Rev. Bioph. Biom.* 21, 293-322.
- HEIDEN M.** (1995) Untersuchungen zur Regulation der elektrophysiologischen Eigenschaften des humanen Porins. Doktorarbeit, Georg-August Universität Göttingen, Cuvillier Verlag, Göttingen.
- HEIDEN M., KROLL K., THINNES F.P., HILSCHMANN N.** (1996) Proteins of cytosol and amniotic fluid increase the voltage dependence of human type-1 porin. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28, 171-180.
- HEIN A.** (1992) Primärstrukturanalyse des plasmalemmständigen Porins aus EBV-transformierten B-Zellen eines Patienten mit Cystischer Fibrose, Diplomarbeit, Georg-August Universität Göttingen.
- HIRANO H.** (1989) Microsequence analysis of winged bean seed proteins electroblotted from two-dimensional gel. *J. Prot. Chem.* 8, 115-130.
- HOLDEN M.J., COLOMBINI M.** (1993) The outer mitochondrial-membrane channel, VDAC, is modulated by a protein localized in the intermembrane space. *Biochim. Biophys. ACTA* 1144, 396-402.
- HOLMES S.J.** (1952) *The biology of the frog.* Macmillan Press, New York.

- HOPP T.P., PRICKETT K.S., PRICE V., LIBBY R.T., MARCH C.J., CERETTI P., URDAL D.L. COLON P.J** (1988) A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Biotechnology* 6, 1205-1210.
- HOSKINS J.M., MEYNELL G.G., SANDERS F.K.** (1956) A comparison of methods for estimating the viable count of a suspension of tumor cells. *Exp. Cell Res.* 11-297-305.
- INOUE H., NOJIMA H., OKAYAMA H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-38.
- JAKOB C., GÖTZ H., HELLMANN T., HELLMANN K.P., REYMANN S., FLÖRKE H., THINNES F.P., HILSCHMANN N.** (1995) Studies on human porin 13. The type-1 VDAC Porin 31HL biotinylated at the plasmalemma of trypan blue excluding human B-lymphocytes. *Febs Lett.* 368, 5-9.
- JALONEN T.** (1993) Single-channel characteristics of the large-conductance anion channel in rat cortical astrocytes in primary culture. *Glia* 9, 227-237.
- JANISCH U., SKOFITSCH G., THINNES F.P., GRRAIER W.F., GROSCHNER K.** (1993) Evidence for the involvement of plasma membrane porin in agonist-induced activation of vasculat endothelial cells. *Naunyan-Schmiedebergs's Arch. Pharmacol.* 347 (Suppl.), R73.
- JÜRGENS L., ILSEMANN P., KRATZIN H.D., HESSE D., ECKART K., THINNES F.P., HILSCHMANN N.** (1991) Studies on human porin 4. The primary structures of Porin-31HM purified from human skeletal-muscle membranes and of Porin-31HL derived from human lymphocyte-B membranes are identical. *Biol. Chem. H.-S.* 372, 455-463.
- JÜRGENS L., KLEINEKE J., BRDICZKA D., THINNES F.P., HILSCHMANN N.** (1995) Localization of type-1 porin channel (VDAC) in the sarcoplasmatic reticulum. *Biol. Chem. H.-S.* 376, 685-689.
- JUNANKAR P.R., DULHUNTY A.F., CURTIS S.M., PACE S.M., THINNES F.P.** (1995) Porin-type1 proteins in sarcoplasmic reticulum and plasmalemma of striated muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell M.* 16, 595-610.

- KAYSER H., KRATZIN H.D., THINNES F.P., GÖTZ H., SCHMIDT W.E., ECKART K., HILSCHMANN N.** (1989) To the knowledge of human porins 2. Characterization and primary structure of a 31-kDa porin from human B-lymphocytes (Porin 31 HL) *Biol. Chem. H.-S.* 370, 1265-1278.
- KIANG J.G., TSOKOS G.C.** (1998) Heat shock protein 70 kDa: Molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol. Therapeut.* 80, 183-201.
- KING S.M., DILLMAN J.F., BENASHKI S.E., LYE R.J., PATELKING R.S., PFISTER K.K.** (1996) The mouse t-complex-encoded protein Tctex-1 is a light chain of brain cytoplasmic dynein. *J. Biol. Chem.* 271, 32281-32287.
- KLEENE R., PFANNER N., PFALLER R., LINK T.A., SEBALD W., NEUPERT W., TROPSCHUG M.** (1987) Mitochondrial porin of *Neurospora-crassa* - cDNA cloning, invitro expression and import into mitochondria. *EMBO J.* 6, 2627-2633.
- KOTTKE M., ADAM V., RIESINGER I., BREMM G., BOSCH W., BRDICZKA D., SANDRI G., PANFILI E.** (1988) Mitochondrial boundary membrane contact sites in brain - points of hexokinase and creatine-kinase location, and control of CA^{2+} transport. *Biochim. Biophys. Acta* 935, 87-102.
- KUNZELMANN K., TILMANN M., HANSEN C.P., GREGER R.** (1991) Inhibition of epithelial chloride channels by cytosol. *Pflug. Arch. Eur. J. Phy.* 418, 479-490.
- KUSANO K., MILEDI R., STINNAKRE J.** (1977) Acetylcholine receptors in oocyte membrane. *Nature* 270, 739-741.
- KUSANO H., SHIMIZU S., KOYA R.C., FUJITA H., KAMADA S., KUZUMAKI N., TSUJIMOTO Y.** (2000) Human gelsolin prevents apoptosis by inhibiting apoptotic mitochondrial changes via closing VDAC. *Oncogene* 19, 4807-4814.
- LAEMMLI U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LANE C.D.** (1981) The fate of foreign proteins introduced into *Xenopus* oocytes. *Cell* 24, 281-282.

- LANE J., ALLAN V.** (1998) Microtubule-based membrane movement. *BBA-Rev. Biomembranes* 1376, 27-55.
- LEE L.G., SPURGEON S.L., HEINER C.R., BENSON S.C., ROSENBLUM B.B., MENCHEN S.M., GRAHAM R.J., CONSTANTINESCU A., UPADHYA K.G., CASSEL J.M.** (1997) New energy transfer dyes for DNA sequencing. *Nucl. Acids Res.* 25, 2816-2822.
- LINDÉN M., GELLERFORS P., NELSON B.D.** (1982) Purification of a protein having pore forming activity from the rat-liver mitochondrial outer-membrane. *Biochem. J.* 208, 77-82.
- LINDÉN M., KARLSSON G.** (1996) Identification of porin as a binding site for MAP2. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 218, 833-836.
- LOO M.A., JENSEN T.J., CUI L.Y., HOU Y.X., CHANG X.B., RIORDAN J.R.** (1998) Perturbation of HSP90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *Embo J.* 17, 6879-6887.
- LUDWIG O., DEPINTO V., PALMIERI F., BENZ R.** (1986) Pore formation by the mitochondrial porin of rat-brain in lipid bilayer-membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 860, 268-276.
- LUKASHOK S.A., TARASSISHIN L., LI Y.G., HORWITZ M.S.** (2000) An adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis complexes with dynein and a small GTPase. *J. Virol.* 74, 4705-4709.
- MAENO E., ISHIZAKI Y., KANASEKI T., HAZAMA A., OKADA Y.** (2000) Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9487-9492.
- MANGAN P.S., COLOMBINI M.** (1987) Ultrasteep voltage dependence in a membrane channel. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4896-4900.
- MANSUI Y., CLARKE H.G.** (1979) Oocyte maturation. *Int. Rev. Cytol.* 57, 185-282.
- MASSA S.M., LONGO F.M., ZUO J., WANG S., CHEN J., SHARP F.R.** (1995) cloning of rat GRP75, an HSP70-family member, and its expression in normal and ischemic brain. *J. Neurosci. Res.* 40, 807-819.

- MCCABE E.R.B.** (1994) Microcompartmentation of energy-metabolism at the outer mitochondrial-membrane - role in diabetes-mellitus and other diseases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 317-325.
- MIZUKOSHI E., SUZUKI M., LOUPATOV A, URUNO T, HAYASHI H., MISONO T., KAUL S.C., WADHWA R., IMAMURA T.** (1999) Fibroblast growth factor-1 interacts with the glucose-regulated protein GRP75/mortalin. *Biochem J.* 343, 461-466 Part 2.
- MOCHLY-ROSEN D., KHANER H., LOPPEZ J.** (1991) Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3997-4000.
- MOON J.I., JUNG .Y.W., KO B.H., DE PINTO V., JIN I., MOON I.S.** (1999) Presence of a voltage-dependent anion channel 1 in the rat postsynaptic density fraction. *Neuroreport* 10, 443-447.
- MORRILL G.A., ZIEGLER D., KOSTELLOW A.B.** (1981) The role of Ca^{2+} and cyclic nucleotids in progesterone initiation of the meiotic division in amphibian oocytes. *Life Sci.* 29, 1821-1835.
- MORRIS A.P., FRIZZELL R.A.** (1993) Ca^{2+} -dependent Cl⁻ channels in undifferentiated human colonic cells (HT-29) II. Regulation and rundown. *Am. J. Physiol.* 264, C977-C985 Part 1.
- MOU T., KRAAS J.R., FUNG E.T., SWOPE S.L.** (1998) Identification of a dynein molecular motor component in Torpedo electroplax; binding and phosphorylation of Tctex-1 by Fyn. *Febs Lett.* 435, 275-281.
- NAGANO F., ORITA S., SASAKI T., NAITO A., SAKAGUCHI G., MAEDA M., WATANABE T., KOMINAMI E., UCHIYAMA Y., TAKAI Y.** (1998) Interaction of Doc2 with Tctex-1, a light chain of cytoplasmic dynein - Implication in dynein-dependent vesicle transport. *J. Biol. Chem.* 273, 30065-30068.
- NIKAIDO H.** (1993) Transport across the bacterial outer-membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25, 581-589.
- NIKAIDO H.** (1994) Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 3905-3908.

- NILIUS B., EGGERMONT J., VOETS T., BUYSE G., MANOLOPOULOS V., DROOGMANS G.** (1997) Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. *Prog. Biophys. Mol. Bio.* 68, 69-119.
- PAHAPILL P.A., SCHLICHTER L.C.** (1992) Cl⁻ channels in intact human lymphocytes-T. *J. Membrane Biol.* 125, 171-183.
- PAULMICHL M., LI Y., WICKMAN K., ACKERMAN M., PERALTA E., CLAPHAM D.** (1992) New mammalian chloride channel identified by expression cloning. *Nature* 356, 238-241.
- PETITJEAN A., HILGER F., TATCHELL K.** (1990) Comparison of thermosensitive alleles of the *cdc25* gene involved in the camp metabolism of *saccharomyces-cerevisiae*. *Genetics* 124, 797-806.
- PREISLER H.D.** (1978) Alteration of binding of the supervital dye Hoechst 33342 to human leukemia cells by adriamycin. *Cancer Treat. Rep.* 62, 1393-1396.
- PUCHELLE E., JACQUOT J., FUCHEY C., BURLET H., KLOSSEK J.M., GILAIN L., TRIGLIA J.M., THINNES F.P., HILSCHMANN N.** (1993) Studies on human porin 9. Immunolocalization of porin and CFTR channels in human surface respiratory epithelium. *Biol. Chem. H.-S.* 374, 297-304.
- PUSCH M., JENTSCH T.J.** (1994) Molecular physiology of voltage-gated chloride channels. *Physiol. Rev.* 74, 813-827.
- PUTHALAKATH H., HUANG D.C.S., O'REILLY L.A., KING S.M., STRASSER A.** (1999) The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol. Cell.* 3, 287-296.
- REBBE N.F., WARE J., BERTINA R.M., MODRICH P., STAFFORD D.W.** (1987) Nucleotide sequence of a cDNA for a member of the human 90-kDa heat-shock protein family. *Gene* 53, 235-245.

- REYMANN S., FLÖRKE H., HEIDEN M., JAKOB C., STADTMULLER U., STEINACKER P., LALK V.E., PARDOWITZ I., THINNES F.P.** (1995) Further evidence for multitopological localization of mammalian porin (VDAC) in the plasmalemma forming part of a chloride channel complex affected in cystic-fibrosis and encephalomyopathy. *Biochem. Mol. Med.* 54, 75-87.
- REYMANN S, HAASE W, KRICK W, BURCKHARDT G, THINNES FP** (1998) Endosomes: another extra-mitochondrial location of type-1 porin voltage-dependent anion-selective channels (VDAC) *Pflug. Arch. Eur. J. Phy.* 436, 478-480.
- ROSTOVTSEVA T., COLOMBINI M.** (1997) VDAC channels mediate and gate the flow of ATP: Implications for the regulation of mitochondrial function. *Biophys. J.* 72, 1954-1962.
- RUGH R.** (1951) *The frog: It's reproduction and development.* The Blakiston Company, Philadelphia.
- SACHT G., BRIGELIUS-FLOHE R., KIESS M., SZTAJER H., FLOHE L.** (1999) ATP-sensitive association of mortalin with the IL-1 receptor type I. *Biofactors* 9, 49-60.
- SADEKOVA S., LEHNERT S., CHOW T.Y.K.** (1997) Induction of PBP74/mortalin/GRP75, a member of the HSP70 family, by low doses of ionizing radiation: a possible role in induced radioresistance. *Int. J. Radiat. Biol.* 72, 653-660.
- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B., ERLICH H.A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science* 239, 487-491.
- SALINOVIC O., MONTELARO R.C.** (1986) Reversible staining and peptid mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecyl polyacrylamid gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 156, 341-347.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T.** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SANGER F., NICKLER S., COULSON A.R.** (1977) DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.

- SCHEIN S.J., COLOMBINI M., FINKELSTEIN A.** (1976) Reconstitution in planar bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from *Paramecium* mitochondria. *J. Membrane Biol.* 30, 99-120.
- SCHLEIFF E., SILVIUS J.R., SHORE G.C.** (1999) Direct membrane insertion of voltage-dependent anion-selective channel protein catalyzed by mitochondrial Tom20. *J. Cell. Biol.* 145, 973-978.
- SCHLICHTER L.C., GRYGORCZYK R., PAHAPILL P.A., GRYGORCZYK C.** (1990) A large, multiple-conductance chloride channel in normal human lymphocytes-T. *Pflug. Arch. Eur. J. Phy.* 416, 413-421.
- SCHWARZER C.** (1996) Versuche zur *in vitro*-Transkription von humanem Typ-1 Porin und seiner Expression in *Xenopus* Oozyten. Diplomarbeit, Georg-August Universität Göttingen.
- SCHWARZER C., BECKER S., AWNI L.A., COLE T., MERKER R., BARNIKOL-WATANABE S., THINNES F.P. HILSCHMANN N.** (2000) Human voltage-dependent anion-selective channel expressed in the plasmalemma of *Xenopus laevis* oocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 1075-1084.
- SCHWIEBERT E.M., MILLS J.W., STANTON B.A.** (1994) Actin-based cytoskeleton regulates a chloride channel and cell-volume in a renal cortical collecting duct cell-line. *J. Biol. Chem.* 269, 7081-7089.
- SHAFIR I., FENG W., SHOSHAN-BARMATAZ V.** (1998) Voltage-dependent anion channel proteins in synaptosomes of the *Torpedo* electric organ: Immunolocalization, purification, and characterization. *J. Bioenerg. Biomembr.* 30, 499-510.
- SHIMIZU S., NARITA M., TSUJIMOTO Y.** (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483-487.
- SHIMIZU S., IDE T., YANAGIDA T., TSUJIMOTO Y.** (2000a) Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 275, 12321-12325.

- SHIMIZU S., KONISHI A., KODAMA T., TSUJIMOTO Y.** (2000b) BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9347-9347.
- SHOSHAN-BARMATZ V., HADAD N., FENG W., SHAFIR I., ORR I., VARSANYI M., HEILMEYER L.M.G.** (1996) VDAC/porin is present in sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. *Febs Lett.* 386, 205-210.
- SKOWRONEK M.H., ROTTER M., HAAS I.G.** (1999) Molecular characterization of a novel mammalian DnaJ-like Sec63p homolog. *J. Biol. Chem.* 380, 1133-1138.
- SOLTYS B.J., GUPTA R.S.** (2000) Mitochondrial proteins at unexpected cellular locations: Export of proteins from mitochondria from an evolutionary perspective. *Int. Rev. Cytol.* 194, 133-196.
- SOREQ H.** (1985) The biosynthesis of biologically-active proteins in meta RNA-microinjected *Xenopus* oocytes. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 18, 199-238.
- SORGATO M.C., MORAN O.** (1993) Channels in mitochondrial-membranes - knowns, unknowns, and prospects for the future. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28, 127-171.
- STANTON B.A., SCHWIEBERT E.M., MILLS J.** (1994) the actin cytoskeleton, a heterotrimeric G-protein, phospholipase-C (PLC) and protein-kinase-C (PKC) mediate the regulatory volume decrease (RVD) in a cortical collecting duct cell-line (TCCT-28A). *J. Am. Soc. Nephrol* 5, 300-300.
- STADTMÜLLER U., EBEN-BRUNNEN J., SCHMID A., HESSE D., KLEBERT S., KRATZIN H.D., HESSE J., ZIMMERMANN B., REYMANN S., THINNES F.P., BENZ R., GÖTZ H., HILSCHMANN N.** (1999) Studies on human porin, Part XX - Mitochondria-derived and extra-mitochondrial human type-1 porin are identical as revealed by amino acid sequencing and electrophysiological characterisation. *Biol. Chem.* 380, 1461-1466.
- STEINACKER P.** (1998) Studien zur Funktionsbestimmung von plasmamembranal exprimiertem VDAC (Voltage-Dependent Anion-Selective Channel). Doktorarbeit, Georg-August Universität Göttingen, Cuvillier Verlag, Göttingen.

- STEINACKER P., AWNI L.A., BECKER S., COLE T., REYMANN S., HESSE D., MORYS-WORTMANN C., SCHWARZER C., THINNES F.P., HILSCHMANN N.** (2000) The plasmamembrane of *Xenopus laevis* oocytes contains voltage-dependent anion-selective porin channels. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 225-234.
- STRANGE K., JACKSON P.S.** (1995) Swelling-activated organic osmolyte efflux - a new role for anion channels. *Kidney. Int.* 48, 994-1003.
- STRANGE K., EMMA F., JACKSON P.S.** (1996) Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am. J. Physiol.-Cell P.H.* 39, C711-C730.
- STÜHMER W., PAREKH A.B.** (1995) Electrophysiological recordings from *Xenopus* oocytes. In: *Single Channel Recording* 2nd ed. (Sakmann B. and Neher E. eds.), 341-356, Plenum Press, New York.
- STUDIER F.W., MOFFAT B.A.** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.
- SZABO I., DEPINTO V., ZORATTI M.** (1993) The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules 2. The electrophysiological properties of VDAC are compatible with those of the mitochondrial megachannel. *Febs Lett.* 330, 206-210.
- SZABO I., LEPPLE-WIENHUES A., KABA K.N., ZORATTI M., GULBINS E., LANG F.** (1998) Tyrosine kinase-dependent activation of a chloride channel in CD95-induced apoptosis in T lymphocytes. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6169-6174.
- TAI A.W., CHUANG J.Z., SUNG C.H.** (1998) Localization of Tctex-1, a cytoplasmic dynein light chain, to the golgi apparatus and evidence for dynein complex heterogeneity. *J. Biol. Chem.* 273, 19639-19649.
- TAI A.W., CHUANG J.Z., BODE C., WOLFRUM U., SUNG C.H.** (1999) Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1. *Cell* 97, 877-887.
- TAKESONO A., CISMOWSKI M.J., RIBAS C., BERNARD M., CHUNG P., HAZARD S., DUZIC E., LANIER S.M.** (1999) Receptor-independent activators of heterotrimeric G-protein signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 274, 33202-33205.

THIEMANN A., GRUNDER S., PUSCH M., JENTSCH T.J.A. (1992) Chloride channel widely expressed in epithelial and nonepithelial cells. *Nature* 356, 57-60.

THINNES F.P., GÖTZ H., KAYSER H., BENZ R., SCHMIDT W.E., KRATZIN H.D., HILSCHMANN N. (1989) To the knowledge of human porins 1. Purification of a porin from human B-lymphocytes (Porin 31 HL) and the topochemical proof of its expression on the plasmalemma of the parentage cell-line. *Biol. Chem. H.-S.* 370, 1253-1264.

THINNES F.P., SCHMID A., BENZ R., HILSCHMANN N. (1990) Studies on human porin 3. Does the voltage-dependent anion channel Porin 31HL form part of the chloride channel complex, which is observed in different cells and thought to be affected in cystic-fibrosis. *Biol. Chem. H.-S.* 371, 1047-1050.

THINNES F.P., FLÖRKE H., WINKELBACH H., STADTMÜLLER U., HEIDEN M., KARABINOS A., HESSE D., KRATZIN H., FLEER E., HILSCHMANN N. (1994) Channel active mammalian porin, purified from crude membrane fractions of human B-lymphocytes or bovine skeletal muscle, reversibly binds the stilbene-disulfonate group of the chloride channel blocker DIDS. Studies on human porin, part X. *Biol. Chem. H.-S.* 375, 315-322.

THINNES F.P., REYMANN S. (1997) New findings concerning vertebrate porin. *Naturwissenschaften* 84, 480-498.

THINNES F.P., HELLMANN K.P., HELLMANN T., MERKER R., SCHWARZER C., WALTER G., GÖTZ H., HILSCHMANN N. (2000a) Studies on human porin XXI: Gadolinium opens up cell membrane standing porin channels making way for the osmolytes chloride or taurine - A putative approach to activate the alternate chloride channel in cystic fibrosis. *Mol. Genet. Metab.* 69, 240-251.

THINNES F.P., HELLMANN K.P., HELLMANN T., BROCKHAUS-PRUCHNIEWICZ U., MERKER R., SCHWARZER C., WALTER G., GÖTZ H., HILSCHMANN N. (2000b) Studies on human porin XXII: Cell membrane integrated human porin channels are involved in regulatory volume decrease (RVD) of HeLa cells. *Mol. Genet. Metab.* 69, 331-337.

- THINNES F.P., HELLMANN K.P., SCHWARZER C., MERKER R., HILSCHMANN N.** (2000c) Cell outside applied BH4 domain peptides of anti-apoptotic Bcl-X_L block regulatory volume decrease (RVD) of HeLa cells in a way corresponding to anti-human type-1 porin/VDAC antibodies. (in Vorbereitung).
- VALVERDE M.A., DIAZ M., SEPULVEDA F.V., GILL D.R., HYDE S.C., HIGGINS C.F.** (1992) Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature* 355, 830-833.
- VALVERDE M.A.** (1999) CIC channels: leaving the dark ages on the verge of a new millennium. *Curr. Opin. Cell Biol* 11, 509-516.
- VANBUSKIRK A.M., DENAGEL D.C., GUAGLIARDI L.E., BRODSKY F.M., PIERCE S.K.** (1991) Cellular and subcellular-distribution of PBP72/74, a peptide-binding protein that plays a role in antigen processing. *J. Immunol.* 146, 500-506.
- VANDER HEIDEN M.G., CHANDEL N.S., LI X.X., SCHUMACKER P.T., COLOMBINI M., THOMPSON C.B.** (2000) Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4666-4671.
- VOISINE C., CRAIG E.A., ZUFALL N., VON AHSEN O., PFANNER N., VOOS W.** (1999) The protein import motor of mitochondria: Unfolding and trapping of preproteins ave distinct and separable functions of matrix HSP70. *Cell* 97, 565-574.
- WADHWA R., KAUL S.C., SUGIMOTO Y., MITSUI Y.** (1993) induction of cellular senescence by transfection of cytosolic mortalin cDNA NIH-3T3-cells. *J. Biol Chem.* 268, 22239-22242.
- WAGNER C.A., FRIEDRICH B., SETIAWAN I., LANG F., BROER S.** (2000) The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell. Physiol. Biochem.* 10, 1-12.
- WARD C.L., OMURA S., KOPITO R.R.** (1995) Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* 83, 121-127.
- WATANABE T.K., FUJIWARA T., SHIMIZU F., OKUNO S., SUZUKI M., TAKAHASHI E., NAKAMURA Y., HIRAI Y.** (1996) Cloning, expression, and mapping of TCTEL1, a putative human homologue of murine Tcte1 to 6q. *Cytogenet. Cell Genet.* 73, 153-156.

- WEAVER J.C.** (1995) Electroporation in cells and tissues - a biophysical phenomenon due to electromagnetic-fields. *Radio. Sci.* 30, (1) 205-221.
- WEBER W.M.** (1999) Ion currents of *Xenopus Laevis* oocytes: state of the art. *BBA-Biomembranes* 1421, 213-233.
- WEISS M.S., ABELE U., WECKESSER J., WELTE W., SCHILTZ E., SCHULZ G.E.** (1991) Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. *Science* 254, 1627-1630.
- WERNET P.** (1976) Human Ia-type alloantigens: Methods of detecting, aspects of chemistry and biology, markers for disease states. *Transplantat. Rev.* 30, 271-298.
- WINKELBACH H., WALTER G., MORYS-WORTMANN C., PAETZOLD G., HESSE D., ZIMMERMANN B., FLÖRKE H., REYMANN S., STADTMULLER U., THINNES F.P., HILSCHMANN N.** (1994) Studies on human porin 7. 8 monoclonal mouse anti-Porin 31HL antibodies discriminate type-1 and type-2 mammalian porin channels VDACs in western blotting and enzyme-linked immunosorbent assays. *Biochem. Med. Metab. B.* 52, 120-127.
- WOLF M., SAHYOUN N.** (1996) Protein kinase C and phosphatidylserine bind to M_r 110,00/115,00 polypeptides enriched in cytoskeletal and postsynaptic density preparations. *J. Biol. Chem.* 261, 13327-13332.
- WOLL K.H., NEUMCKE B.** (1987) Conductance properties and voltage dependence of an anion channel in amphibian skeletal-muscle. *Pflug. Arch. Eur. J. Phy.* 410, 641-647.
- XU X.F., COLOMBINI M.** (1996) Self-catalyzed insertion of proteins into phospholipid membranes. *J. Biol. Chem.* 271, 23675-23682.
- XU X., FORBES J.G., COLOMBINI M** (1999) Actin modulates the gating of *Neurospora crassa* VDAC. *Biophys. J.* 76, A143-A143 Part 2.
- YANG X.C., SACHS F.** (1989) Block of stretch-activated ion channels in *Xenopus* oocytes by gadolinium and calcium-ions. *Science* 243, 1068-1071.
- YANG B.X., VERKMAN A.S.** (1997) Water and glycerol permeabilities of aquaporins 1-5 and MIP determined quantitatively by expression of epitope-tagged constructs in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 272, 16140-16146.

YOUNG G.P., YOUNG J.D., DESHPANDE A.K., GOLDSTEIN M., KOIDE S.S., COHN Z.A. (1984) A Ca^{2+} -activated channel from *Xenopus laevis* oocyte membranes reconstituted into planar bilayers. P. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5155-5159.

YU W.H., WOLFGANG W., FORTE M. (1995) Subcellular-localization of human voltage-dependent anion channel isoforms. J. Biol. Chem. 270, 13998-14006.

YU W.H., FORTE M. (1996) Is there VDAC in cell compartments other than the mitochondria? J. Bioenerg. Biomembr. 28, 93-100.

ZHANG D.W., COLOMBINI M. (1990) Group-IIIa-metal hydroxides indirectly neutralize the voltage sensor of the voltage-dependent mitochondrial channel, VDAC, by interacting with a dynamic binding-site. Biochim. Biophys. ACTA 1025, 127-134.

ZIMMERMANN J., VOSS H., SCHWAGER C., ERFLE H., STUCKY K., KRISTENSEN T., ANSORGE W. (1990) A simplified protocol for plasmid DNA sequencing. Nucl. Acids Res. 18, 1067-1067.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Hilschmann bedanke ich mich herzlich für die Überlassung des Themas und die stets gewährte Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Bartolomaeus danke ich für die Betreuung der Arbeit seitens der Universität Bielefeld und sein persönliches Interesse.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Dr. Thinnes für die thematische Betreuung, seine Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen Anregungen verpflichtet.

Frau Barnikol-Watanabe danke ich für die fachliche Unterstützung bei molekularbiologischen Arbeitsmethoden und den persönlichen, geduldigen Einsatz bei der Bewältigung methodischer Probleme. An dieser Stelle geht mein Dank auch an Frau Kroll, Frau Dr. Reinhold und Frau Dr. Steinacker, die im Laboralltag innovative Ratschläge gaben und freundschaftlich bei der Suche nach alternativen Methoden halfen.

Die fachliche Unterstützung und die Bereitstellung von Geräten durch Mitarbeiter des Max-Planck-Instituts hat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Mein Dank gilt Frau Prätör für die Hilfe bei den DNA-Sequenzanalysen und den Oligonukleotidsynthesen, Frau Hellmann und Herrn Hellmann für die Unterstützung bei der Aufzucht der Zellen, Frau Schäpermeier und Frau Kügler für die Bereitstellung der *Xenopus* Oozyten und Herrn Cole und Herrn Awni für die Zusammenarbeit bei konfokalen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Merker für die Hilfestellung bei EDV-Angelegenheiten und der grafischen Darstellung der Daten und bei den Mitarbeitern der "Gemeinsamen Dienste" für die Unterstützung bei technischen Problemen bedanken.

Bei Experimenten, die nicht am Max-Planck-Institut durchgeführt werden konnten, wurde ich durch Kollegen anderer Institute unterstützt. Mein besonderer Dank gilt hier Frau Dr. Burckhardt vom Physiologischen Institut der Universität Göttingen für ihre Hilfe bei den Voltage clamp Messungen und ihre Diskussionsbereitschaft. Herrn Prof. Dr. Herrmann und Frau Becker vom Anthropologischen Institut der Universität Göttingen danke ich für den Zugang zum Raster-Elektronenmikroskop und den Hilfestellungen bei den Aufnahmen. Herrn King vom Department of Biochemistry der University of Connecticut, USA danke ich für die Bereitstellung des anti-Tctex1 Antiserums.

Zu guter Letzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie, die mich durch Höhen und Tiefen des Doktorandenlebens geduldig begleitet und durch ihr stetiges Verständnis und ihre liebevolle Unterstützung bei der Arbeit motiviert hat.

Lebenslauf

Name	Christian Schwarzer
Geburtstag und -ort	21.04.1969 in Gehrden als Sohn von Georg Schwarzer und Franziska Schwarzer, geb. Crämer
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet mit Giulia Schwarzer (geb. Chillemi), ein Kind
Schulbildung	
1975-1979	Grundschule in Alfeld/Leine
1979-1985	Realschule in Alfeld/Leine
1985-1988	Gymnasium in Alfeld/Leine
	Abschluß: 19.05.1988, Allgemeine Hochschulreife
Zivildienst	
1988-1990	Hannover/Mühlenberg
Universitätsstudium	
Okt. 1990	Immatrikulation an der Georg-August-Universität zu Göttingen im Fach Biologie
Okt. 1992	Vordiplom in den Fächern Zoologie, Botanik, Anorganische Chemie und Physikalische Chemie
Feb. 1995	Mündliche Diplomprüfung in den Fächern Zoologie, Immunologie und Organischer Chemie
März 1995-Sep. 1996	Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel "Studien zur <i>in vitro</i> -Transkription von humanem Typ-1 Porin und seiner Expression in <i>Xenopus</i> Oozyten" in der Abteilung Immunchemie am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen
Dez. 1996	Diplom
Jan. 1997-Okt. 2000	Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation mit dem Titel "Expression von humanem Typ-1 Porin in <i>Xenopus</i> Oozyten und Studien zu seiner Funktionalität" in der Abteilung Immunchemie am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen
Apr. 1999	Immatrikulation an der Universität in Bielefeld im Fach Biologie