

Struktur–Funktions Analyse
des
pro-apoptotischen Proteins Bax

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Gerd Heimlich

aus Mönchengladbach

Köln, 2003

Berichterstatter: **Prof. Dr. Martin Krönke**
Prof. Dr. Reinhard Krämer

Tag der mündlichen Prüfung: 04.06.2003

Für meine Eltern

„Habe nun, ach! Philosophie,
Juristerei und Medizin,
Und leider auch Theologie!
Durchaus studiert, mit heißem Bemühn.
Da steh ich nun, ich armer Tor!
Und bin so klug als wie zuvor...“

(Johann Wolfgang Goethe: Faust
Der Tragödie erster Teil)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungen	4
Einleitung.....	5
Material und Methoden	21
Überexpression und Reinigung der verschiedenen mBax(Δ TM) Mutanten	22
Expression und Reinigung von mBax	24
Analyse der Membranlyse durch Bax	28
Rattenleber-Mitochondrien-Isolation	29
Freisetzung von Cytochrom c aus isolierten Mitochondrien	30
Insertion von Bax in die Mitochondrienmembran	30
Analyse der mitochondrialen Permeabilitätstransition	30
Messung des mitochondrialen Membranpotentials.....	31
Isolation von Hexokinase-Porin-ANT-Komplexen	32
Rekonstitution von Komplexen in Phospholipidvesikeln	33
Ergebnisse	34
Expression, Reinigung und Analyse von Bax Proteinen.....	34
Analyse von mBax(Δ TM) und mBax mit verschiedenen Antikörpern.....	41
Cytochrom c Freisetzung durch Bax.....	43
Insertion von Bax Proteinen in die mitochondrialen Membranen	51
Einfluss von Bax auf das mitochondriale Membranpotential	54
Einfluss von Bax auf die mitochondriale Permeabilitätstransition	56
Freisetzung von Cytochrom c aus Porin-ANT-Komplexen.....	58
Diskussion	63
Struktur–Funktions-Analyse von Bax	63
Bedeutung der Cytochrom c Mobilität für die Freisetzung.....	66
Mechanismen der Cytochrom c Freisetzung.....	67
Bedeutung der Bindung der Hexokinase an Porin-ANT-Komplexe.....	69
Bax und seine Rolle bei der Apoptose	70
Literatur.....	73
Anhang	86
Zusammenfassung.....	89
Abstract.....	90
Danksagung.....	92
Erklärung.....	94
Lebenslauf.....	95

Abkürzungen

Es sind nur Abkürzungen aufgeführt, die nicht im Verzeichnis der “standard abbreviations and symbols” erwähnt werden (siehe Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003).

ADP	Adenosindiphosphat
ANT	Adenine nucleotide translocator
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BA	Bonkretic acid (Bonkrekat)
BH	Bcl-2-Homologie-Domäne
C-	Carboxy-
CAPS	3-[Cyclohexylamino]-1-propansulfonsäure
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
CsA	Cyclosporin A
ECL	Enhanced chemilumineszens
His ₆	Histidin Hexapeptid
HRP	Horseradish Peroxidase
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
Mab	Mouse antibody
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionization
MPT	Mitochondriale Permeabilitätstransition
N-	Amino-
OD	Optische Dichte
PTP	Permeabilitätstransitions-pore
PVDF	Poly(vinyl)difluorid
TM	Transmembrandomäne
TNFR	Tumor-Necrosis-Factor-Receptor
u	units
Upm	Umdrehungen pro Minute
VDAC	Voltage dependent anion channel
ZMMK	Zentrum für Molekulare Medizin der Universität zu Köln

Einleitung

Zelltod

Der Tod von Zellen ist ein Phänomen von enormer Bedeutung in einem mehrzelligen Organismus während seiner gesamten Lebensspanne. Die Fähigkeit, einzelne nicht mehr benötigte Zellen aus einem Gewebeverband zu entfernen, ist für die Funktion eines mehrzelligen Organismus essentiell. Man unterscheidet grundsätzlich aufgrund der Morphologie zwei Arten des Zelltods, Nekrose und Apoptose (Kerr, J.F. *et al.* 1972).

Nekrose ist gekennzeichnet durch ein massives Schwellen der Zelle, die Zerstörung von Zellorganellen und das Zerreißen der Zellmembran (Kerr, J.F. *et al.* 1972; Wyllie, A.H. *et al.* 1980) (Abbildung 1). Diese morphologischen Veränderungen sind die Folge eines Verlustes der positiven Energiebilanz der Zelle (Barros, L.F. *et al.* 2001). Dieser Verlust führt zu einem Stillstand aller energieabhängigen Reaktionen in der Zelle, wie zum Beispiel der ATP getriebenen Ionenpumpen. Das regulierte Ionengleichgewicht gerät dadurch außer Kontrolle, was zu einer Diffusion von Wasser in die Zelle und damit zu einem massiven Schwellen derselben führt. Das Zytoskelett wird degradiert und schließlich platzt die Zelle. Dadurch werden die zellulären Inhaltsstoffe in das umgebende Gewebe freigesetzt. Dieser Zelltod ist im allgemeinen mit einer Entzündungsreaktion verbunden und wird daher als pathologische Form des Zelltods betrachtet (Barros, L.F. *et al.* 2001).

Im Gegensatz dazu ist Apoptose gekennzeichnet durch ein Schrumpfen der Zelle, die Degradation von Proteinen, die Kondensation des Chromatin und die Fragmentierung der DNA (Kerr, J.F. *et al.* 1972) (Abbildung 1). Ausstülpungen der Plasmamembran, sogenannte „apoptotic bodies“ entstehen, welche zusammen mit den anderen Zellresten von umgebenden Zellen und Makrophagen phagozytiert werden. Diese für Apoptose typischen morphologischen Veränderungen unterliegen einem verzweigten, konservierten endogenem Zelltodprogramm (Wyllie, A.H. *et al.* 1980). Der programmierte Zelltod ist eine physiologische Form des Zelltods, der nicht mehr benötigte Zellen ohne Schaden für das umgebende Gewebe entfernt.

Apoptose ist während der embryonalen Entwicklung von Bedeutung und wird vom Immunsystem zum Entfernen von auto-aggressiven Immunzellen bzw. von infizierten Zellen genutzt. Die zentrale Rolle von Apoptose für den Organismus bzw. die Notwendigkeit einer strikten Kontrolle der involvierten biochemischen Prozesse wird durch eine Vielzahl von Krankheiten, die im Zusammenhang mit dem programmierten Zelltod stehen, offensichtlich.

So kann eine verringerte Zelltod-Frequenz zum Auftreten von Krebs, Autoimmunkrankheiten oder Entwicklungsstörungen beitragen. Umgekehrt findet man eine erhöhte Apoptoserate bei neurodegenerativen Krankheiten oder HIV.

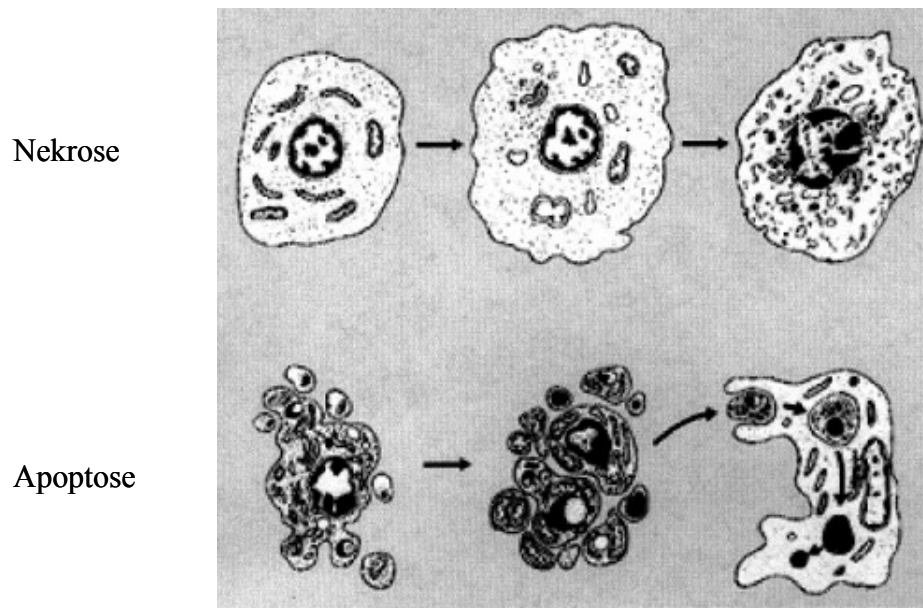


Abb. 1: Morphologie von Nekrose und Apoptose.

Nekrose ist gekennzeichnet durch ein massives Schwellen der Zelle, Zerstörung von Zellorganellen und Zerreißen der Zellmembran. Dadurch werden die zellulären Inhaltsstoffe in das umgebende Gewebe freigesetzt. Während der Apoptose aktivieren Zellen ein intrazelluläres Programm, welches dazu führt, dass die Zellen in kontrollierter Weise aus dem Organismus entfernt werden. Im Gegensatz zu nekrotischen Zellen schrumpfen apoptotische Zellen und formen sogenannte „apoptotic bodies“, welche von umliegenden Zellen phagozytiert werden, bevor der Inhalt der Zelle in das umliegende Gewebe eindringen kann (Kerr, J.F. *et al.* 1972; Wyllie, A.H. *et al.* 1980) (entnommen aus Kramer, P.H.; 2000).

Regulation von Apoptose

Eine Familie von Cystein-Proteasen, die Caspasen, spielt in den apoptotischen Signalwegen eine wichtige Rolle. Bei allen Caspasen handelt es sich um Cystein-haltige Aspartat-spezifische Endoproteasen, die in der Evolution stark konserviert sind und große Sequenzhomologie zueinander aufweisen (Alnemri, E.S. *et al.* 1996). Im Menschen sind über ein Dutzend Caspasen identifiziert worden, die unterschiedliche Funktionen bei der Apoptose ausüben (Rano, T.A. *et al.* 1997; Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. 1998). Caspasen liegen in nicht apoptotischen Zellen als inaktive Proenzyme vor, die durch Spaltung an einem spezifischen Aspartatrest aktiviert werden (Alnemri, E.S. 1997). Die Produkte der proteolytischen Spaltung dimerisieren und formen die aktive Caspase. Prozessierte Caspasen können als Initiator-Caspasen weitere Familienmitglieder proteolytisch aktivieren oder als

Effektor-Caspasen in der Zelle Zielstrukturen, die zu der apoptotischen Morphologie führen, spalten.

Die biochemischen Prozesse, welche die gezielte Zerstörung einer Zelle regulieren und schließlich zu den für Apoptose typischen morphologischen Veränderungen führen, sind von größter Komplexität. Eine Vielzahl von Stimuli, wie die Aktivierung der Rezeptoren der „Tumor-Necrosis-Factor-Receptor“-Familie (TNFR-Familie), UV-Strahlung, Staurosporin oder Entzug von Wachstumsfaktoren, kann Apoptose initiieren. Grundsätzlich kann man zwischen einem extrinsischen und einem mitochondrialen Signalweg unterscheiden (Cory, S. and Adams, J.M. 2002) (Abbildung 2).

Extrinsisch kann Apoptose durch Aktivierung von Rezeptoren der TNFR-Familie, wie CD95R, durch Bindung ihrer Liganden, wie CD95L, induziert werden. Durch die Bindung des Liganden aggregiert der Rezeptor und formt einen Signalkomplex DISC (death-inducing-signaling-complex) (Kischkel, F.C. *et al.* 1995). Dieser rekrutiert auf der zytosolischen Seite der Membran diverse Adaptormoleküle und das Zymogen Procaspase-8. Bei der hohen Konzentration der Procaspase-8 im DISC reicht deren autokatalytische Aktivität aus, um sich selbst proteolytisch zu spalten und damit zu aktivieren (Muzio, M. *et al.* 1998). Prozessierte Caspase-8 aktiviert als Initiator-Caspase im Folgenden Effektor-Caspasen, wie Caspase-3, -6 und -7.

Im Mittelpunkt des mitochondrialen Apoptosesignalwegs stehen die Mitochondrien. Diese enthalten in ihrem Intermembranraum pro-apoptische Faktoren wie Cytochrom c, AIF und Smac/DIABLO. Bei Aktivierung dieses Signalwegs, wie zum Beispiel durch UV-Strahlung, Staurosporin oder Entzug von Wachstumsfaktoren, werden die pro-apoptischen Faktoren aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytosol freigesetzt (Jürgensmeier, J.M. *et al.* 1998; Reed, J.C. *et al.* 1998; Lorenzo, H.K. *et al.* 1999; Susin, S.A. *et al.* 1999; Verhagen, A.M. *et al.* 2000). Im Zytosol partizipieren diese Faktoren an der Initiation und Propagation der Caspase-Kaskade (Du, C. *et al.* 2000). Am besten charakterisiert ist dabei die Funktion des Cytochrom c. Nach seiner Freisetzung in das Zytosol assoziiert Cytochrom c in Gegenwart von ATP mit Apaf-1 (apoptosis-protease-activating-factor-1) und rekrutiert Procaspase-9, um das Apoptosom zu formen. In diesem Multiproteinkomplex wird Procaspase-9 prozessiert und kann anschließend Effektor-Caspasen wie Caspase-3, -6 and -7 aktivieren (Green, D.R. and Reed, J.C. 1998; Reed, J.C. *et al.* 1998; Verhagen, A.M. *et al.* 2000). Die Freisetzung dieser pro-apoptischen Faktoren aus den Mitochondrien wird durch die Proteine der Bcl-2 Familie reguliert (Adams, J.M. and Cory, S. 1998). Das pro-apoptische Protein Bax ist maßgeblich für die Freisetzung von pro-apoptischen Faktoren

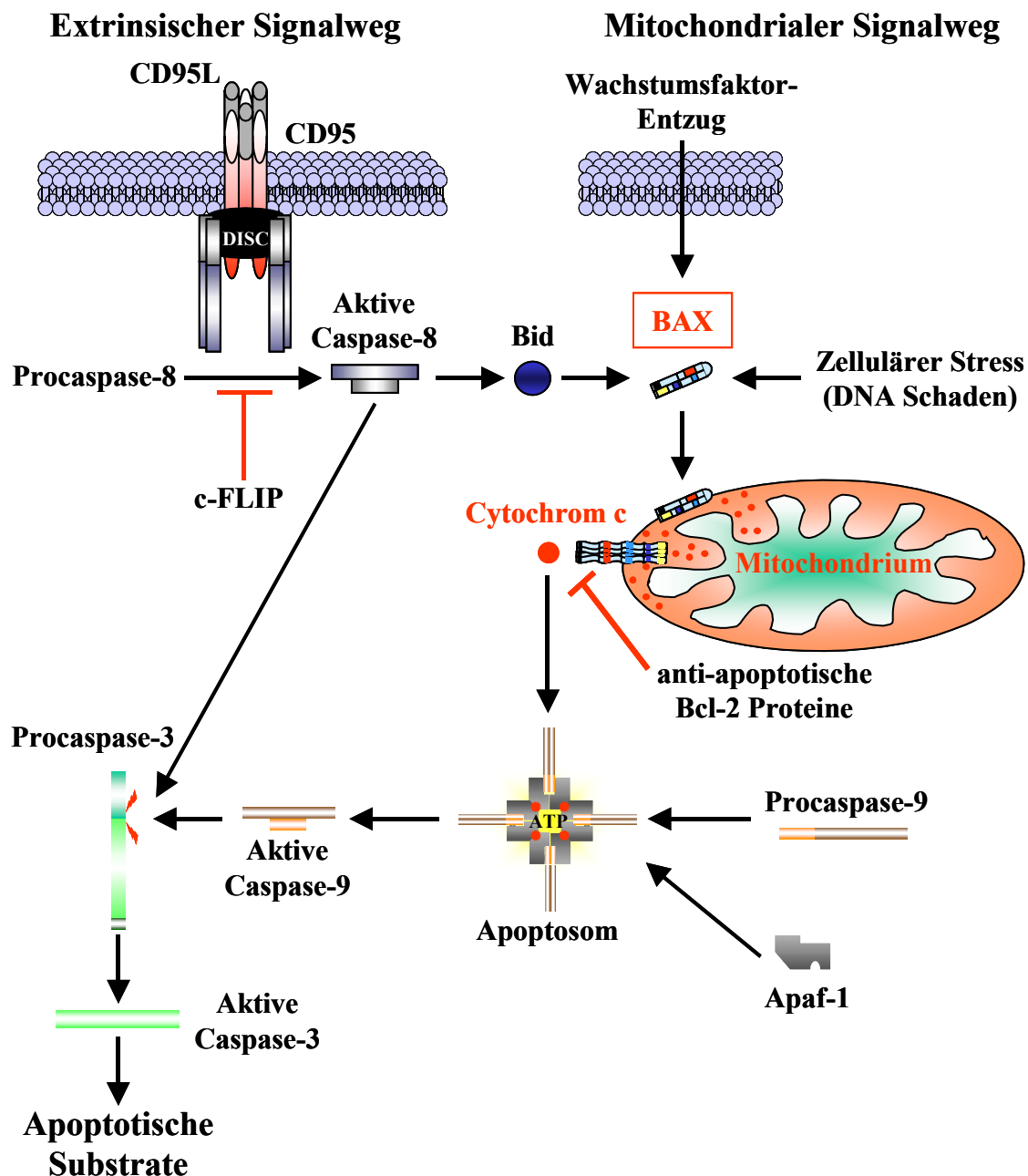


Abb. 2: Apoptotische Signalwege in Säugerzellen.

Der extrinsische Signalweg wird durch Mitglieder der TNFR-Familie, wie CD95R, initiiert. Die Bindung des CD95-Liganden an den CD95-Rezeptor führt zur Rezeptor-Trimerisierung und Bildung des DISC. Der DISC rekrutiert Procaspase-8, was in Prozessierung und damit Aktivierung derselben resultiert. Der mitochondriale Signalweg kann durch Wachstumsfaktor-Entzug oder UV-Strahlung initiiert werden. Der extrinsische und der mitochondriale Signalweg werden durch Bid, welches durch Caspase-8 proteolytisch aktiviert wird, verbunden. Aktivierung von Bid resultiert in Translokation zu den Mitochondrien, wo es durch Aktivierung des pro-apoptotischen Proteins Bax Cytochrom c freisetzt. Die pro- und anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie kompetieren an der Oberfläche der Mitochondrien miteinander und regulieren die Freisetzung von Cytochrom c. Wenn die pro-apoptotischen Proteine überwiegen, werden verschiedene pro-apoptotische Faktoren aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytosol freigesetzt. Cytochrom c assoziiert mit Apaf-1 und mit Procaspase-9 und bildet das Apoptosom. Procaspase-3 wird durch aktive Caspase-8 oder durch aktive Caspase-9 aktiviert. Prozessierte Caspase-3 spaltet verschiedene Substrate proteolytisch, die für die morphologischen Veränderungen verantwortlich sind.

verantwortlich (Kluck, R.M. *et al.* 1997; Eskes, R. *et al.* 1998; Jürgensmeier, J.M. *et al.* 1998).

Eine Verbindung der beiden Signalwege kann durch das pro-apoptotische Protein Bid, welches ebenfalls zur Bcl-2 Familie gehört, vermittelt werden. Aktivierte Caspase-8 spaltet Bid, wodurch dessen pro-apoptotische Aktivität stark erhöht wird. Das resultierende Bid-Fragment (tBid) transloziert an die Mitochondrien, wo es durch Aktivierung von Bax die Freisetzung von Cytochrom c bewirkt (Eskes, R. *et al.* 2000; Hengartner, M.O. 2000).

Die Proteine der Bcl-2 Familie

Wichtige Regulatoren der Apoptose sind die Proteine der Bcl-2 Familie. Bcl-2 wurde als ein bei folliculären Lymphomen involviertes Gen identifiziert (Tsujimoto, Y. *et al.* 1985). Dieses Protein ist in der Lage, Apoptose zu inhibieren (Vaux, D.L. *et al.* 1988). Die bis dato identifizierten Proteine der Bcl-2 Familie werden nach ihren strukturellen und funktionellen Eigenschaften in drei Gruppen klassifiziert (Adams, J.M. and Cory, S. 1998; Gross, A. *et al.* 1999) (Abbildung 3).

Die anti-apoptotischen Proteine, wie Bcl-2 und Bcl-X_L, verhindern den Tod von Zellen. Sie alle sind durch vier konservierte Domänen, den Bcl-2-Homologie-Domänen (BH1-BH4), charakterisiert. Die BH4-Domäne ist für die anti-apoptotische Funktion der Proteine notwendig (Yin, X.M. *et al.* 1994; Hirotsu, M. *et al.* 1999).

Die pro-apoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie können in zwei Untergruppen unterteilt werden. Zum einen besitzen Mitglieder, wie Bax, Bak und Bok, die drei konservierten Domänen BH1-BH3 (Adams, J.M. and Cory, S. 1998; Antonsson, B. and Martinou, J.C. 2000). Die zweite Untergruppe bilden die sogenannten „BH3-domain-only“ Proteine, welche nur die Bcl-2-Homologie-Domäne 3 (BH3) besitzen. Zu dieser heterogeneren Gruppe gehören Bid, Bim, Bik und Bad (Adams, J.M. and Cory, S. 1998).

Eine weitere Eigenschaft der meisten Proteine der Bcl-2 Familie ist eine C-terminale Domäne aus 20 hydrophoben Aminosäuren. Diese Transmembrandomäne (TM) ist verantwortlich für das „Targeting“ der Proteine an zelluläre Membranen, wie der äußeren Mitochondrienmembran und dem endoplasmatischen Retikulum (Krajewski, S. *et al.* 1993; Foyouzi-Youssefi, R. *et al.* 2000; Hacki, J. *et al.* 2000). Der größte Teil der membranständigen Proteine ist dabei zum Zytosol hin orientiert (Reed, J.C. *et al.* 1998).

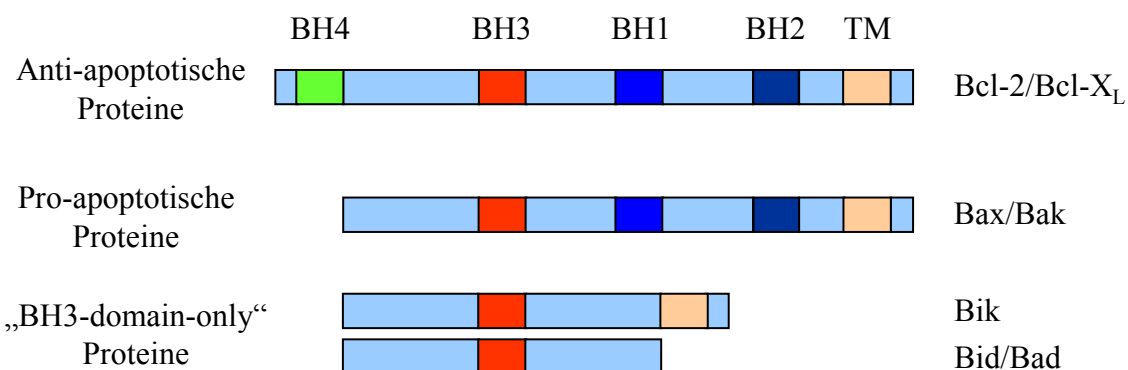


Abb. 3: Die Proteine der Bcl-2 Familie.

Die Mitglieder der Bcl-2 Familienproteine werden nach ihren strukturellen und funktionellen Charakteristika unterschieden. Die Mitglieder der ersten Gruppe wie Bcl-2 und Bcl-X_L, sind anti-apoptotisch. Sie besitzen die konservierten Homologie-Domänen BH1-4 und eine C-terminale hydrophobe Transmembrandomäne. Im Gegensatz dazu besitzen die pro-apoptotischen Vertreter, wie Bax und Bak, eine ähnliche Struktur aber keine BH4 Domäne. Einige pro-apoptotische Mitglieder, die sogenannten „BH3-domain-only“ Proteine, wie Bik, Bid und Bad, bilden eine Untergruppe, die nur über eine BH3-Domäne und mitunter auch über eine Transmembrandomäne verfügt (nach Hengartner, M.O., 2000).

Die Proteine der Bcl-2 Familie können miteinander interagieren und Homo- und Heterodimere als auch Oligomere formen. Basierend auf der pro- und anti-apoptotischen Funktion wurde ein Modell kreiert, bei dem die Dimerisierung der anti- und pro-apoptotischen Vertreter deren apoptotische Aktivität kontrolliert (Oltvai, Z.N. *et al.* 1993). Dimerisierung wird durch die Insertion der BH3-Domäne eines Proteins in eine hydrophobe Tasche, die von den BH1-, BH2- und BH3-Domänen eines weiteren Proteins geformt wird, erreicht (Sattler, M. *et al.* 1997). Die BH3-Domäne der pro-apoptotischen Proteine scheint sowohl für ihre spezifische Funktion als auch die Dimerisierung notwendig zu sein (Zha, J. *et al.* 1997). Eine pro-apoptotischen Aktivität von Bax ohne Dimerisierung durch die BH3-Domäne ist jedoch ebenfalls beobachtet worden (Wang, K. *et al.* 1998).

Das pro-apoptotische Protein Bax

Die biologische Bedeutung von Bax für den mitochondrialen Apoptosesignalweg ist mittels „knock-out“-Experimenten aufgezeigt worden (Wei, M.C. *et al.* 2001). Mäuse, denen entweder Bax oder Bak fehlt, zeigen geringe oder keine Abnormalitäten, wohingegen Tiere denen beide Proteine fehlen (*bax*^{-/-}*bak*^{-/-}) viele überzählige Zellen in verschiedenen Geweben akkumulieren und progressive Lymphadenopathie entwickeln (Lindsten, T. *et al.* 2000).

Die Anzahl der Bax bzw. Bak Allele ist dabei nicht für die Apoptose limitierend. So sind Tiere, die nur eine Kopie des Bax- bzw. Bak-Gens ($bax^{+/-}bak^{-/-}$ oder $bax^{-/-}bak^{+/-}$) aufweisen, phänotypisch normal (Lindsten, T. *et al.* 2000).

In embryonischen Maus-Fibroblasten (MEFs), die entweder Bax negativ ($bax^{-/-}$) oder Bak negativ ($bak^{-/-}$) sind, kann Apoptose induziert werden. Im Gegensatz dazu sind MEFs, die sowohl Bax als auch Bak negativ ($bax^{-/-}bak^{-/-}$) sind, vollständig resistent gegen Apoptose-Induktion durch tBid als auch durch verschiedene andere Stimuli, wie Staurosporin oder UV-Strahlung (Wei, M.C. *et al.* 2001). In Bax und Bak negativen ($bax^{-/-}bak^{-/-}$) Zellen im Vergleich zu unveränderten MEFs ist keine Freisetzung von Cytochrom c nach Induktion von Apoptose mehr zu beobachten. Weiterhin ist mit Bid negativen ($bid^{-/-}$) Mäusen gezeigt worden, dass Bid „upstream“ von Bax und Bak fungiert (Yin, X.M. *et al.* 1999). Bid ist aber nicht der alleinige Aktivator von Bax bzw. Bak, da Apoptose in Bid negativen ($bid^{-/-}$) MEFs durch Stimuli wie Staurosporin und UV-Strahlung weiterhin induziert werden kann (Wei, M.C. *et al.* 2001).

Bax ist als erstes pro-apoptotisches Protein durch Co-Immunpräzipitation mit Bcl-2 identifiziert worden (Oltvai, Z.N. *et al.* 1993). Nach einem apoptotischen Stimulus wird Bax aktiviert und kann Cytochrom c und andere pro-apoptotische Faktoren aus dem Intermembranraum von Mitochondrien freisetzen (Kluck, R.M. *et al.* 1997; Jürgensmeier, J.M. *et al.* 1998; Reed, J.C. *et al.* 1998). Diese pro-apoptotische Aktivität von Bax kann durch Überexpression von Bcl-2 oder Bcl-X_L inhibiert werden (Oltvai, Z.N. *et al.* 1993). Bcl-2 inhibiert dabei die Bax-Aktivierung und Oligomerisierung (Mikhailov, V. *et al.* 2001). Mit Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) wurde eine direkte Interaktion von Bax mit Bcl-2 an den Mitochondrien gezeigt (Mahajan, N.P. *et al.* 1998). Im Gegensatz dazu konnte mit Immunpräzipitation und „Cross-linking“ in Bcl-2 exprimierenden Zellen, wo die Oligomerisierung von Bax inhibiert wurde, keine direkte Interaktion von Bax mit Bcl-2 nachgewiesen werden (Mikhailov, V. *et al.* 2001). Damit ist der molekulare Mechanismus der Inhibition von Bax durch Bcl-2 weiterhin unklar und könnte vom Zelltyp und dem jeweiligen Apoptose-Stimulus abhängen (Antonsson, B. 2001). Bax liegt in der Zelle hauptsächlich als Monomer im Zytosol vor (Hsu, Y.T. *et al.* 1997; Wolter, K.G. *et al.* 1997), oder ist lose mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert (Roucou, X. and Martinou, J.C. 2001). Um pro-apoptotisch wirken zu können, muss Bax oligomerisieren (Antonsson, B. *et al.* 2000). Nach Translokation an die Mitochondrien ändert Bax seine Konformation, wobei der N- und der C-Terminus exponiert werden, oligomerisiert und inseriert in die Mitochondrienmembranen (Wolter, K.G. *et al.* 1997; Nechushtan, A. *et al.* 1999; Murphy,

K.M. *et al.* 2000). Es wurde gezeigt, dass aktiviertes Bid (tBid) an Bax bindet und eine allosterische Aktivierung stimuliert, die in einer Oligomerisierung von Bax resultiert und zur Bildung von Poren für die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien führt (Desagher, S. *et al.* 1999; Eskes, R. *et al.* 2000; Wei, M.C. *et al.* 2000).

Die Oligomerisierung von Bax kann artifiziell durch Detergenzien wie Triton X-100 oder Tween 20 induziert werden (Hsu, Y.T. and Youle, R.J. 1997; Hsu, Y.T. and Youle, R.J. 1998). Rekombinant exprimiertes und zytosolisches Bax formen in der Anwesenheit von Oktylglykosid Tetramere mit einem Molekulargewicht von 80 kDa (Antonsson, B. *et al.* 2000). Diese Tetramere können dimerisieren und Oktamere von 160 kDa bilden. Die Konformationsänderung und die resultierende Oligomerisierung in der Anwesenheit von Detergens scheinen stattzufinden, wenn die Detergens-Konzentration die kritische Mizellenkonzentration übersteigt (Suzuki, M. *et al.* 2000). Nach seiner Aktivierung kann Bax als Oligomer in der äußeren mitochondrialen Membran detektiert werden (Antonsson, B. *et al.* 2001).

Struktur und Funktion von Bax

Die Sequenz von Bax besteht aus 192 Aminosäuren. Es besitzt die drei Homologie-Domänen BH1-3 und eine hydrophobe Transmembrandomäne (TM) am C-Terminus (Oltvai, Z.N. *et al.* 1993). Die dreidimensionale Struktur von monomerem, humanen Bax in Lösung wurde durch 2-dimensionale nukleare magnetische Resonanz Spektroskopie (2D-NMR) ermittelt (Suzuki, M. *et al.* 2000). Danach besteht das Protein aus neun α -Helices (Abbildung 4). Die generelle Organisation des Proteins ist der des Bcl-X_L ähnlich (Muchmore, S.W. *et al.* 1996). Bax besitzt acht amphipathische α -Helices, die um eine zentrale hydrophobe α -Helix (α -Helix 5) angeordnet sind (Suzuki, M. *et al.* 2000). Die zwölf N-terminalen Aminosäuren von Bax und die Aminosäure-Schleife zwischen α -Helix 1 und 2 sind flexibel und nehmen in Lösung keine geordnete Tertiärstruktur an (Suzuki, M. *et al.* 2000).

Die α -Helix 1 befindet sich an der Oberfläche des Proteins. Nach der Induktion von Apoptose und Membraninsertion wird α -Helix 1 durch eine konformationelle Änderung von Bax exponiert und damit für die Bindung von spezifischen Antikörpern erreichbar (Desagher, S. *et al.* 1999).

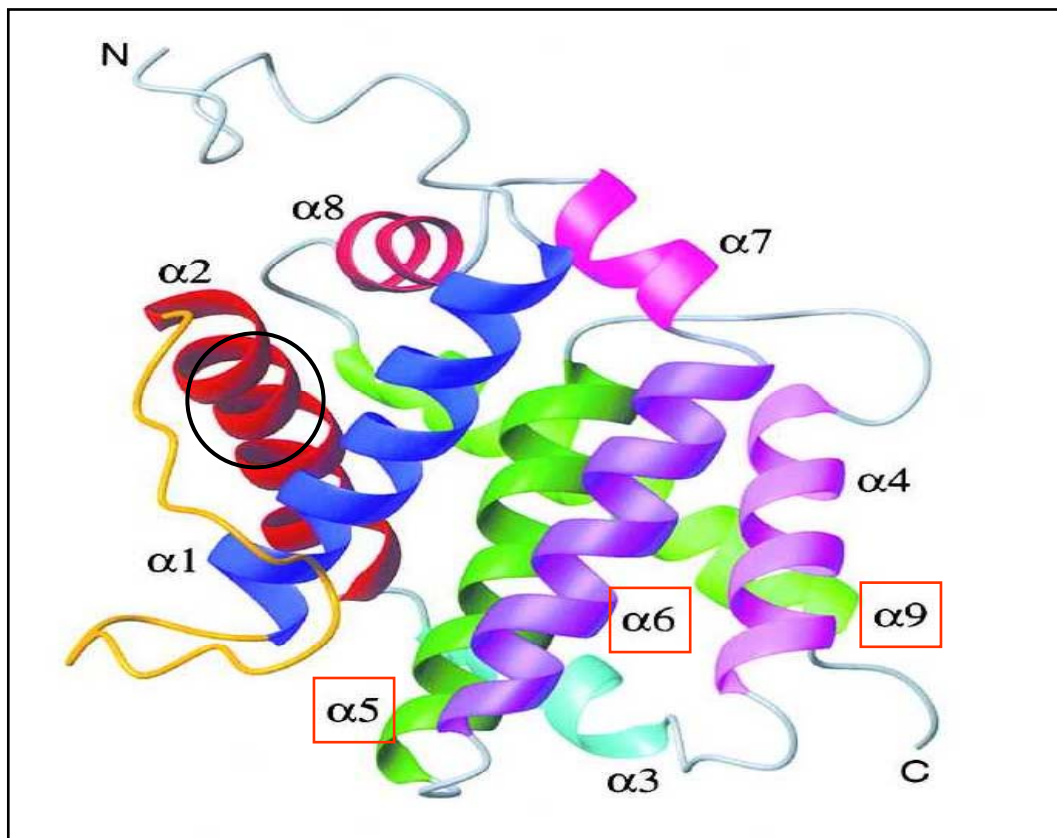


Abb. 4: 3D-Struktur von monomerem humanem Bax Protein in Lösung.

Die gezeigte 3D-Struktur von Bax wurde mittels 2D-NMR Strukturanalyse gewonnen (entnommen aus: Suzuki, M. *et al.*, 2000). Dargestellt sind α -Helix 2 (rot), die die BH3-Domäne enthält, die zentralen α -Helices 5/6 (dunkelgrün bzw. lila) und im Hintergrund die α -Helix 9 (hellgrün), die die Transmembrandomäne enthält.

Die amphipathische α -Helix 2, welche die BH3-Domäne von Bax enthält, ist bei der Homo- und Heterodimerisierung involviert und ist für Induktion von Apoptose durch Bax essentiell (Hunter, J.J. and Parslow, T.G. 1996; Zha, H. *et al.* 1996; Simonen, M. *et al.* 1997; Adams, J.M. and Cory, S. 1998; Kelekar, A. and Thompson, C.B. 1998; Suzuki, M. *et al.* 2000). In Hefen verhindert die Deletion des konservierten Tetrapeptids IGDE im Zentrum der BH3-Domäne von Bax die Dimerisierung und den letalen Effekt von Bax. In Fibroblasten und Epithelzellen induziert die Expression von Bax(Δ IGDE) im Gegensatz zu Bax keine Apoptose und eine Assoziation mit endogenem Bax kann nicht detektiert werden (Zha, H. *et al.* 1996).

Daraus wurde geschlossen, dass der durch die BH3-Domäne vermittelte pro-apoptotische Effekt von Bax von dem konservierten IGDE-Motiv im Zentrum der BH3-Domäne abhängt. Bei einer weitreichenden Mutagenese der BH3-Domäne ist gezeigt worden, dass ein zur Hetero- und Dimerisierung unfähiges mutiertes Bax Protein dennoch pro-apoptotisch wirken kann (Wang, K. *et al.* 1998). Die Bindung und damit Inaktivierung der anti-apoptotischen

Mitglieder der Bcl-2 Familie über die BH3-Domäne ist damit neben der Bax-induzierten Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren aus Mitochondrien ein möglicher Mechanismus für den pro-apoptotischen Effekt von Bax.

Die BH1-Domäne von Bax umfasst die Aminosäuren zwischen den α -Helices 4/5 und einen Teil der α -Helix 5. Die α -Helices 7 und 8 bilden die konservierte BH2-Domäne (Suzuki, M. *et al.* 2000). Die Domänen BH1-3 spielen bei der Oligomerisierung von Bax eine zentrale Rolle.

Sowohl Bax als auch andere Mitglieder der Bcl-2 Familie könnten durch Aggregation bzw. Oligomerisierung Poren formen, welche die Translokation von Cytochrom c erlauben. Dieser Hypothese liegt die ähnliche Struktur der Proteine der Bcl-2 Familie mit bakteriellen porenformenden Toxinen zugrunde (Muchmore, S.W. *et al.* 1996; Schendel, S.L. *et al.* 1998). Im Gegensatz zu Bcl-2 kann ein Protein, dem die α -Helices 5/6 von Bcl-2 deletiert wurden, in artifiziellen Membranen keine Ionenkanäle bilden (Schendel, S.L. *et al.* 1997). Es wurde außerdem gezeigt, dass die zentralen α -Helices 5/6 selbst in der Abwesenheit der Transmembrandomäne für die Membraninsertion wichtig sind (Aritomi, M. *et al.* 1997; Matsuyama, S. *et al.* 1998). Die Expression von Bax mit einer Deletion der α -Helices 5/6 in 293T-Zellen reduziert den pro-apoptotischen Effekt nur marginal (Matsuyama, S. *et al.* 1998). Daraus wurde geschlossen, dass diese Helices für die Funktion von Bax in Säugerzellen nicht absolut notwendig sind. Im Gegensatz dazu ist der zytotoxische Effekt in Hefen bei Deletion dieser zwei Helices völlig unterbunden (Matsuyama, S. *et al.* 1998). In Hefen sind die beiden Helices also für die Funktion von Bax notwendig. Bei Experimenten mit mutiertem Bax wurde gezeigt, dass bei Substitution von geladenen Aminosäureresten in den α -Helices 5/6 durch neutrale Aminosäurereste die Insertion von Bax in die mitochondrialen Membranen erhöht wird (Nouraini, S. *et al.* 2000). Dadurch ist die Toxizität in Hefen und Säugerzellen stark erhöht worden. Ob jedoch die Membraninsertion via α -Helices 5/6 mit der Freisetzung von Cytochrom c korreliert, ist bislang nicht untersucht.

Die C-terminale hydrophobe Region des Bax Proteins ist die Transmembrandomäne, die teilweise durch α -Helix 9 gebildet wird. Diese Helix ist in einer hydrophoben Tasche, die vom Rest des Proteins gebildet wird, inseriert. Durch die Konformationsänderung des Proteins wird α -Helix 9 aus der Tasche entlassen und könnte die Affinität von Bax für zelluläre Membranen erhöhen (Nechushtan, A. *et al.* 1999; Suzuki, M. *et al.* 2000). Die hydrophobe Tasche wird dadurch für Interaktionen über die BH3-Domäne mit Bax oder anderen Proteinen der Bcl-2 Familie zugänglich.

Mitochondrien

Das zentrale Organell des intrinsischen Apoptosesignalwegs, das Mitochondrium, besitzt zwei Membranen, eine äußere und eine innere. Die innere Membran kann in zwei funktional verschiedene Bereiche unterteilt werden. Es gibt zum einen die periphere innere Mitochondrienmembran, welche sich in relativer Nähe zur äußeren Membran befindet und Kontakte, sogenannte „contact sites“, mit dieser ausbildet (Brdiczka, D. 1991). Zum anderen gibt es die Cristae, welche den Teil der inneren Membran darstellen, der alle fünf Proteinkomplexe der oxidativen Phosphorylierung enthält. Die Cristae ragen in den Matrixraum hinein. Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Analysen wurde gezeigt, dass ungefähr 80 % des Volumens des Intermembranraums von der Cristae-Membran umschlossen wird (Mannella, C.A. *et al.* 1994; Perkins, G. *et al.* 1997). Die verbleibenden 20 % des Volumens des Intermembranraums befinden sich zwischen der äußeren und der peripheren inneren Mitochondrienmembran (Bernardi, P. and Azzone, G.F. 1981; Bernardi, P. *et al.* 1999). Diese beiden Subkompartimente des Intermembranraums stehen über kleine Tubuli in Kontakt miteinander. Basierend auf diesem Modell wurde vermutet, dass es verschiedene Cytochrom c Fraktionen in den unterschiedlichen Subkompartimenten gibt.

Die Kontakte zwischen der peripheren inneren und der äußeren Mitochondrienmembran, „contact sites“, die für den Transport von Metaboliten verantwortlich sind, werden durch Interaktion von Porin und dem ANT gebildet (Brdiczka, D. 1991; Vyssokikh, M.Y. *et al.* 2001). In diesem Komplex besitzt Porin eine höhere Bindungsaffinität für zytosolische Hexokinase (Wicker, U. *et al.* 1993). Diese katalysiert die Bildung von Glucose-6-Phosphat aus Glucose und ATP. Durch Bindung an Porin-ANT-Komplexe hat die Hexokinase einen direkten Zugang zu ATP, welches durch diesen Komplex transloziert.

Bei der Isolation von Porin-ANT-Komplexen aus den Mitochondrien von Rattenhirn bleibt die Hexokinase mit diesem Komplex assoziiert (Beutner, G. *et al.* 1996). Kürzlich ist gezeigt worden, dass Bax und Hexokinase um dieselbe Bindungsstelle an Mitochondrien von Hepatozyten konkurrieren und dies die Freisetzung von Cytochrom c durch Bax beeinflusst (Pastorino, J.G. *et al.* 2002). Die Aktivität der Hexokinase, welche die Bindung derselben an die Porin-ANT-Komplexe beeinflusst, könnte einen Einfluss auf die Bax-induzierte Freisetzung von Cytochrom c haben.

Die fünf Proteinkomplexe der mitochondrialen Atmungskette sind für die Generierung von ATP verantwortlich. Die Komplexe I-IV transportieren Elektronen und sind für die Aufrechterhaltung des Potentials über die innere Membran verantwortlich. Komplex V nutzt

den Protonengradienten über die Membran zur Synthese von ATP. Bei Cytochrom c handelt es sich um ein stark positiv geladenes Protein, das mit Komplex III und IV der mitochondrialen Atmungskette und Cardiolipin durch elektrostatische Wechselwirkungen assoziiert. Während der oxidativen Phosphorylierung transportiert Cytochrom c Elektronen von Komplex III zu Komplex IV.

Mechanismen der Bax-induzierten Cytochrom c Freisetzung

Verschiedene Mechanismen für die Bax-induzierte Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien wurden postuliert (Green, D.R. and Reed, J.C. 1998; Martinou, J.C. 1999; Lim, M.L. *et al.* 2002). Die Freisetzung von pro-apoptischen Faktoren könnte durch eine intakte äußere Mitochondrienmembran geschehen oder eine indirekte Folge eines Zerreißen der äußeren Membran sein. Im ersten Fall würde Bax die Freisetzung von Cytochrom c vermitteln, ohne die äußere Mitochondrienmembran dauerhaft zu zerstören. Im zweiten Fall wäre die Freisetzung aller Proteine des Intermembranraums eine Folge der Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembran durch den Einfluss von Bax. Ein Zerreißen der äußeren mitochondrialen Membran kann als Folge eines Anschwellens des Matrixraums durch hinein diffundierendes Wasser verursacht werden. Die innere Mitochondrienmembran würde sich daraufhin entfalten und wegen der größeren Oberfläche zum Reißen der äußeren Membran führen.

Während einer mitochondrialen Permeabilitätstransition wird ein Kanal generiert, die sogenannten Permeabilitätstransitions-pore (PTP), an dem beide Mitochondrienmembranen beteiligt sind (Haworth, R.A. and Hunter, D.R. 1979; Hunter, D.R. and Haworth, R.A. 1979; Hunter, D.R. and Haworth, R.A. 1979). Die PTP ist im geöffneten Zustand für Moleküle bis zu 1,5 kDa frei permeabel (Crompton, M. *et al.* 1987). Somit ist eine ungehinderte Diffusion von Wasser in den Matrixraum mit erhöhter Osmolarität im Vergleich zum Zytosol möglich. An der PTP sind primär ein mitochondriales Porin in der äußeren Membran auch „voltage dependent anion channel“ (VDAC) genannt und der „adenine nucleotide translocator“ (ANT) in der inneren Membran beteiligt (Hunter, D.R. and Haworth, R.A. 1979; Hunter, D.R. and Haworth, R.A. 1979). Der Benzodiazepinrezeptor und Cyclophilin D sind auch als Bestandteile der PTP postuliert worden (Halestrap, A.P. and Davidson, A.M. 1990; McEnery, M.W. 1992; McEnery, M.W. *et al.* 1992). Zytosolische Hexokinase und mitochondriale Creatinkinase üben eine Funktion bei der Regulation der Pore aus, indem sie durch

Interaktion mit dem VDAC bzw. ANT Komplexe bilden können, die ein Öffnen der Pore verhindern. Die mitochondriale Permeabilitätstransition (MPT) kann durch spezielle Stimuli, wie zum Beispiel eine erhöhte Calciumkonzentration, ausgelöst werden. Ein Öffnen der Pore kann durch Magnesiumionen oder Cyclosporin A (CsA), das die Bindung des Cyclophilin D verhindert, inhibiert werden (Haworth, R.A. and Hunter, D.R. 1979; Crompton, M. *et al.* 1988; Bernardi, P. 1992). Es wurde gezeigt, dass Bax sowohl mit dem VDAC als auch mit dem ANT interagieren kann (Marzo, I. *et al.* 1998; Shimizu, S. *et al.* 1998). Grundsätzlich könnte Bax somit durch Interaktion mit einem an der PTP beteiligten Proteine eine mitochondriale Permeabilitätstransition induzieren. Dies würde zum Bersten der äußeren Mitochondrienmembran durch das Schwellen der Matrix und somit zu einer unspezifischen Freisetzung von Cytochrom c und anderen Proteinen aus dem Intermembranraum führen (Abbildung 5 A).

In die mitochondriale Membran inseriertes Bax Protein könnte nach einer alternativen Hypothese durch Interaktion mit membranständigen Proteinen eine Hyperpolarisation über die innere Membran der Mitochondrien induzieren. Im Falle einer Interaktion von Bax mit dem (VDAC) in der äußeren Membran wurde bereits der Verschluss dieses normalerweise für Metabolite bis 5 kDa permeablen Kanals postuliert (Vander Heiden, M.G. *et al.* 1999). Im geschlossenen Zustand kann der VDAC zwar noch von Wasser aber nicht mehr von Metaboliten, insbesondere ATP oder ADP, passiert werden. Durch den verhinderten Austausch mit dem Zytosol erhöht sich das Verhältnis von ATP/ADP, zugunsten des ATP in der mitochondrialen Matrix. Weitere direkte Folgen des Verschlusses wären ein Anstieg des Membranpotentials über die innere Mitochondrienmembran (Hyperpolarisation) und eine Alkalisierung des Matrixraums. Die veränderte Energielage der Mitochondrien würde ebenfalls zur Diffusion von Wasser in den Matrixraum und damit zu einem Bersten der äußeren Mitochondrienmembran führen, wodurch pro-apoptotische Faktoren neben anderen Proteinen unspezifisch freigesetzt werden könnten (Abbildung 5 B).

Ein möglicher Mechanismus, der die äußere Mitochondrienmembran intakt hält, könnte eine Interaktion von Bax mit dem VDAC sein, wodurch der Durchmesser der vorhandenen Pore soweit vergrößert wird, dass sie für Cytochrom c permeabel wird (Shimizu, S. *et al.* 1999) (Abbildung 5 C).

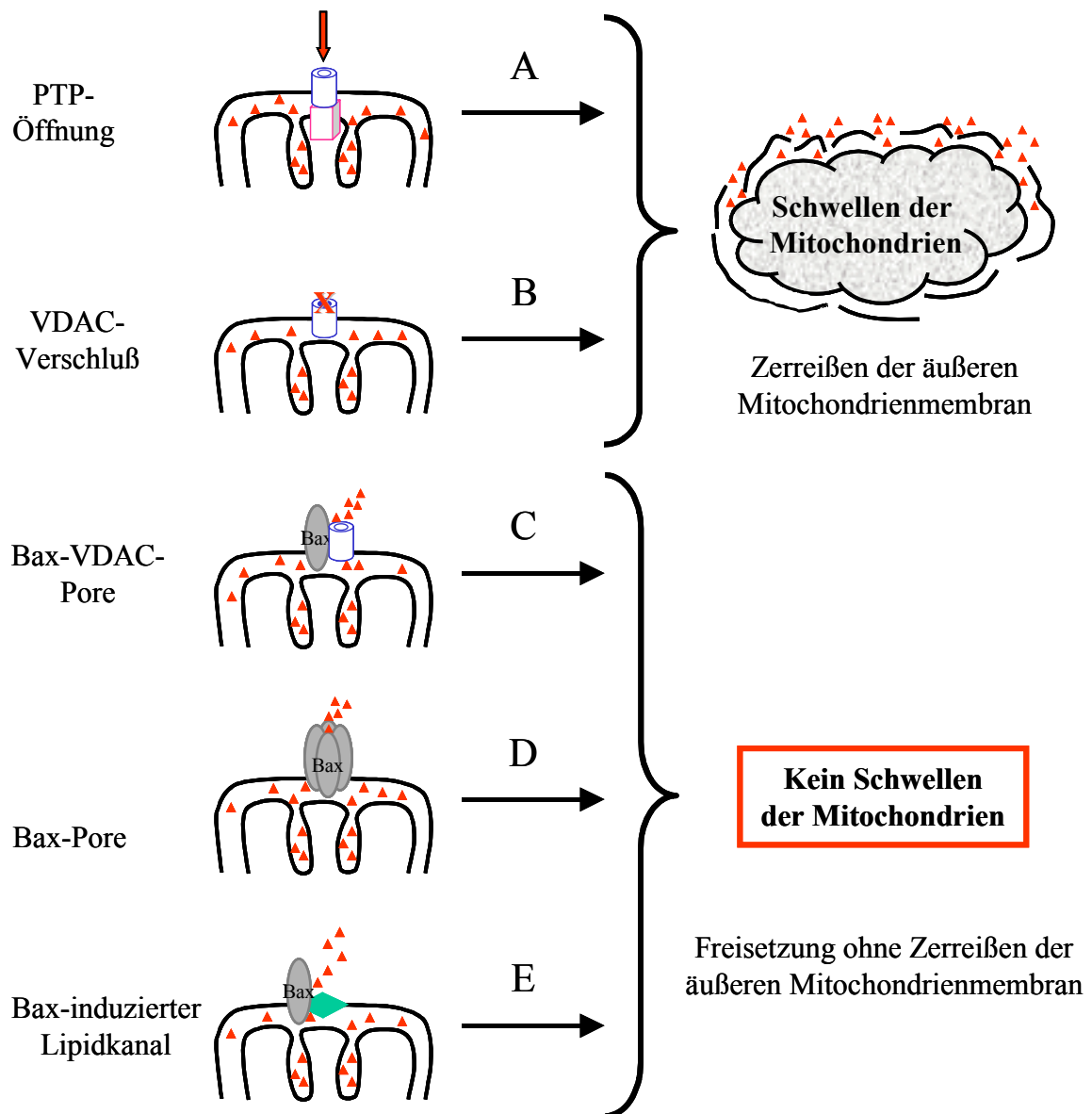


Abb. 5: Mechanismen der Bax-induzierten Cytochrom c Freisetzung.

Übersicht über verschiedene postulierte Mechanismen für die Bax-induzierte Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien (in Anlehnung an: Lim M.L. *et al.*, 2002). Die Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren könnte durch eine intakte äußere Mitochondrienmembran geschehen (C-E) oder eine indirekte Folge eines Zerreißen der äußeren Membran sein (A, B).

Kristallographische Analysen zeigten, dass Bcl-X_L eine sehr große Ähnlichkeit in seiner dreidimensionalen Struktur zu porenformenden Domänen von bakteriellen Toxinen aufweist (Muchmore, S.W. *et al.* 1996). Es ist bekannt, dass die Proteine der Bcl-2 Familie Ionenkanäle bilden können (Antonsson, B. *et al.* 1997; Schlesinger, P.H. *et al.* 1997; Schendel, S.L. *et al.* 1998). Die Notwendigkeit einer Oligomerisierung von Bax für die pro-apoptotische Funktion wurde ebenfalls gezeigt (Gross, A. *et al.* 1998). Die Vermutung liegt daher nahe, dass Bax allein durch Oligomerisierung eine Pore für Cytochrom c in der äußeren Mitochondrienmembran bilden könnte (Saito, M. *et al.* 2000) (Abbildung 5D).

Ein weiterer Mechanismus der Cytochrom c Freisetzung ohne Zerstörung der äußeren Membran wäre ein Bax-induzierter Lipidkanal in der Membran. Dieses Model basiert auf Experimenten, in denen gezeigt wurde, dass Bax und tBid in der Lage sind, die Stabilität von Phospholipid-Doppelschichten und Liposomen zu verringern (Basanez, G. *et al.* 1999; Kudla, G. *et al.* 2000). Dieser Destabilisierung liegt eine Verringerung der linearen Spannung (linear tension) der Membran zugrunde. Außerdem wurde gezeigt, dass Bax in hoher Konzentration ($> 5 \mu\text{M}$) in der Lage ist, isolierte Erythrozyten zu lysieren und dadurch Hämoglobin freizusetzen (Antonsson, B. *et al.* 1997; Shimizu, S. *et al.* 2001). Bax könnte die notwendige Aktivierungsenergie für die Bildung eines neuen Kanals in einer Lipidstruktur soweit heruntersetzen, dass sich dieser in zellulären Membranen formen könnte (Basanez, G. *et al.* 1999) (Abbildung 5 E).

Eine weitere Bax-induzierte Pore der sogenannte „mitochondrial apoptosis-induced channel“ (MAC) wurde kürzlich für Säugerzellen beschrieben (Pavlov, E.V. *et al.* 2001). Dabei handelt es sich um einen „high conductance channel“ der unabhängig von VDAC seine Funktion ausübt und durch Bcl-2 inhibiert wird. Inwiefern der MAC einem der obigen Mechanismen zugeordnet werden kann, oder eine neue alternative Hypothese darstellt, ist noch unklar.

Zielsetzung der Arbeit

Die Freisetzung von Cytochrom c und anderen pro-apoptotischen Faktoren aus dem Intermembranraum von Mitochondrien ist von zentraler Bedeutung für den intrinsischen oder mitochondrialen Apoptosesignalweg. Die Regulation der Freisetzung obliegt unter anderem den Proteinen der Bcl-2 Familie. Dennoch ist der genaue Mechanismus der Freisetzung der pro-apoptotischen Faktoren, der Einfluss der Verteilung von Cytochrom c in den Mitochondrien und der resultierende Effekt auf die Physiologie dieses Zellorganells in weiten Teilen ungeklärt oder überaus kontrovers.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine Struktur-Funktions Analyse des pro-apoptotischen Proteins Bax im Bezug auf die Bax-induzierte Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien. Für die Freisetzung von Cytochrom c essentielle Domänen des Proteins sollten identifiziert werden. Mit rekombinanten Deletionsproteinen sollte der Einfluss der Transmembrandomäne, der BH3-Domäne und der zentralen α -Helices 5/6 auf die Freisetzung von Cytochrom c aus isolierten Mitochondrien *in vitro* charakterisiert werden. Ein konserviertes Tetrapeptid (IGDE) im Zentrum der BH3-Domäne und die zentralen α -Helices

5/6 sollten entweder allein oder in Kombination deletiert werden, um den individuellen Einfluss bzw. Synergien für die Funktionalität von Bax zu identifizieren. Weiterhin sollte mit Hilfe einer Membranpotentialmessung und der Analyse des Einflusses von Bax auf zelluläre Membranen und die mitochondriale Transitionpore der zugrunde liegende Mechanismus der Freisetzung näher charakterisiert werden. Schließlich sollte die Bax-induzierte Freisetzung eines speziellen, in den Hexokinase-Porin-ANT-Komplexen organisierten, Cytochrom c Pools untersucht werden.

Material und Methoden

Chemikalien und Reagenzien

Wenn nicht anders ausgewiesen, wurden alle Chemikalien und Reagenzien bei Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) erworben.

Klonierung verschiedener ORFs für Maus Bax α

Alle klonierten ORFs für das Bax Protein besitzen die Sequenz des Maus Bax α (NCBI Datenbank, NID Nummer g388191). Zur Konstruktion der Deletionsproteine von Bax wurden Sequenzbereiche gezielt deletiert. Als „Template“ standen drei Plasmide zur Verfügung, die bereits verschiedene Bax-Sequenzen enthielten (vgl. Tabelle 1). Diese Plasmide wurden zur Konstruktion von Expressionsvektoren für Bax bzw. verschiedene Deletionsproteine verwendet. Die Bax-Sequenzen wurden über PCR mit Hilfe von Primern, die Restriktionsschnittstellen an das 5'- und 3'-Ende anhängen, amplifiziert. Dazu wurde eine Pfu-DNA-Polymerase (Promega) verwendet. Die codierende DNA-Sequenz für die mBax Proteine, denen die 20 C-terminalen hydrophoben Aminosäuren der Transmembrandomäne deletiert worden waren, wurde mit Hilfe der Primer 1 und 2 mittels PCR amplifiziert. Die Primer 3 und 4 in Kombination mit den Primern 1 und 2 dienten zur Deletion der α -Helices 5/6. Die codierende DNA-Sequenz für mBax wurde mit Hilfe der Primer 5 und 6 amplifiziert (vgl. Tabelle 2).

Alle verwendeten Primer wurden bei MWG-Biotech AG synthetisiert. Alle Ausgangsplasmide und alle resultierenden Expressionsvektoren wurden im Servicelabor des ZMMK der Universität zu Köln auf ihre korrekte DNA-Sequenz überprüft.

Tabelle 1: Vorhandene „Template“-Plasmide zur Klonierung der ORFs von Bax

Plasmidname	Plasmid	Bax-Insert	Literatur
pGEX-4T1-Bax	pGEX-4T1 (Pharmacia)	mBax(Δ TM)	(Xie, Z. <i>et al.</i> 1998)
pcDNA3-HABax	pcDNA3 (Invitrogen)	mBax(WT)	(Zha, H. <i>et al.</i> 1996)
pcDNA3-HABax(Δ IGDE)	pcDNA3 (Invitrogen)	mBax(Δ IGDE)	(Zha, H. <i>et al.</i> 1996)

(Alle drei Plasmide wurden freundlicherweise von Dr. John Reed, The Burnham Institute in La Jolla, U. S. A. zur Verfügung gestellt.)

Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide zur Klonierung der ORFs von Bax

#	Primername	Sequenz (5' – 3')
1	5'mBax(EcoR1)	5' CCC CCC CCG AAT TCA TGG ACG GGT CCG GGG AGC 3'
2	3'mBax(Xho1) -TM	5' CCC CCC CCC TCG AGT CAC TGC CAT GTG GGG GTC 3'
3	mBax(-h5/6) frw	5' GAT GGC AAT TTC GAC CAG GGT GGC TGG GAA GGC 3'
4	mBax(-h5/6) rev	5' GCC ACC CTG GTC GAA GTT GCC ATC AGC AAA CAT 3'
5	5'mBax(Bgl2)	5' CCC CCC CCA GAT CTA TGG ACG GGT CCG GGG AGC 3'
6	3'mBax(Hind3)	5' CCC CCC CCA AGC TTT CAG CCC ATC TTC TTC CAG ATG 3'

(Namen: frw – vorwärts, rev – rückwärts)

Die codierende DNA-Sequenz für die verschiedenen Bax Proteine, denen die 20 C-terminalen hydrophoben Aminosäuren der Transmembrandomäne (TM) deletiert worden waren, wurde mit Hilfe einer flankierenden 5'-terminalen *EcoRI* und einer 3'-terminalen *XhoI* Restriktionsschnittstelle in den prokaryotischen Expressionsvektor pGEX-4T1 (Amersham Pharmacia Biotech) kloniert. Durch diese Klonierungsstrategie wird ein GST-Expressionstag an den N-Terminus des Proteins gehängt, was eine Reinigung mittels Affinitätschromatographie ermöglicht.

Die codierende DNA-Sequenz für unmodifiziertes Bax wurde mit Hilfe einer flankierenden 5'-terminalen *BglII* und einer 3'-terminalen *HindIII* Restriktionsschnittstelle in den prokaryotischen Expressionsvektor pBAD/HisB (Invitrogen) kloniert. Durch diese Klonierungsstrategie wird ein His₆-Expressionstag am N-Terminus des Proteins zur Reinigung mittels Affinitätschromatographie eingeführt.

Überexpression und Reinigung der verschiedenen mBax(Δ TM) Mutanten

Überexpression:

Alle rekombinanten Bax Proteine, denen die 20 C-terminalen Aminosäuren der Transmembranregion fehlen, mBax(Δ TM), wurden mit kleinen Modifikationen in Anlehnung an Xie *et al.* (1998) isoliert (Xie, Z. *et al.* 1998):

Die Expressionsvektoren wurden in den *E. coli* Stamm XL-1 Blue transformiert. Eine einzelne Kolonie der retransformierten Bakterien wurde über Nacht bei 37°C in 1 l TB Medium (Terrific Broth) mit 1,5 % Glycerol in der Gegenwart von 0,5 mg/ml Carbenicillin unter Schütteln kultiviert. Die Expression der Proteine wurde durch Zugabe von 10 μ M IPTG (Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid) für 24 Stunden bei 25°C induziert. Die Bakterien

wurden durch Zentrifugation (3.000 xg, 10 min., 4°C) geerntet. Das mit PBS gewaschene Pellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Reinigung:

Die Bakterien wurden im Resuspensions-Puffer durch Zugabe von 0,5 mg/ml Lysozym und Behandlung mit Ultraschall (50 Minuten, Puls ein: 15 Sekunden, Amplitude 15 %) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (27.500 xg, 10 min., 4°C) wurde der Überstand über Nacht mit äquibrierter Glutathion-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) inkubiert. Die rekombinanten Proteine binden dabei über das GST-Expressionstag an die Glutathion-Sepharose. Die Glutathion-Sepharose mit gebundenem Protein wurde in eine Säule gepackt und intensiv mit GST-Waschpuffer gewaschen. Die Proteine wurden durch Behandlung mit 300 u Thrombin (Amersham Pharmacia Biotech) in GST-Elutionspuffer über Nacht (4°C) proteolytisch von dem Säulenmaterial eluiert. Die eluierten mBax(Δ TM) Proteine wurden über Nacht bei 4°C gegen Dialysepuffer dialysiert. Die Proteine wurden anschließend auf eine Anionenaustauscher Säule (Resource Q, Amersham Pharmacia Biotech) aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 0 bis 500 mM NaCl in Dialysepuffer eluiert.

Fractionen, die mBax(Δ TM) Proteine enthielten, wurden mit Hilfe einer Amicon Zelle (Millipore) bei 4°C unter Druck (N₂) bis zu einer Endkonzentration von 0,35 mg/ml in Lagerpuffer (P1) konzentriert. Alle gewonnenen mBax(Δ TM) Proteine wurden aliquotiert bei -70°C gelagert.

Tabelle 3: Medien und Puffer für die Reinigung von mBax(Δ TM) Proteinen

TB Medium	1,2 % Bacto-Tryptone, 2,4 % Hefeextrakt, 1,5 % Glycerol
Resuspensions-Puffer	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 % Tween 20, 0,1 % 2-Mercaptoethanol, Complete Protease Inhibitor Set (Roche) (pH 8,0)
GST-Waschpuffer	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, 0,1 % 2-Mercaptoethanol (pH 8,0)
GST-Elutionspuffer	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2,5 mM CaCl ₂ , 0,1 % Tween 20, 0,1 % 2-Mercaptoethanol (pH 8,0)
Dialysepuffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1 % 2-Mercaptoethanol (pH 8,0)
Lagerpuffer (P1)	10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl (pH 7,5)

Expression und Reinigung von mBax

Fermentation und Überexpression:

Rekombinantes Bax Protein wurde mit kleinen Modifikationen in Anlehnung an Montessuit *et al.* (1999) isoliert (Montessuit, S. *et al.* 1999):

Der Expressionsvektor wurde in den *E. coli* Stamm LMG 194 (Invitrogen), der speziell für die Expression toxischer Proteine geeignet ist, transformiert. Eine einzelne Kolonie der transformierten Bakterien wurde in RM Medium mit 0,4 % Glucose in der Gegenwart von 100 µg/ml Ampicillin über Nacht kultiviert. Diese Vorkultur wurde zum Animpfen eines mit 10 l RM Medium befüllten Fermenters verwendet. Die Kultur wurde bei 37°C und einem Sauerstoffgehalt von 30 % unter Rühren bis zu einer OD₆₀₀ von 3 fermentiert. Dann wurde die Expression des Fusionsproteins durch Zugabe von L-Arabinose (1 g/l) induziert. Die Kultur wurde für weitere 4 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (5.850 xg, 10 min., 4°C) geerntet. Das mit PBS gewaschene Pellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert. Die Ausbeute betrug 60-70 g Bakterien (Nassgewicht).

Reinigung:

35 g Bakterien wurden in 100 ml Lysepuffer resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 50 µg/ml Lysozym und Behandlung mit Ultraschall (50 Minuten, Puls ein: 15 Sekunden, Amplitude 15 %) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (35.000 xg, 30 Minuten, 4°C) wurde der Überstand für 16 Stunden auf eine mit His₆-Waschpuffer äquilibrierte 5 ml Nickel-NTA Säule (Amersham Pharmacia Biotech) geladen. Danach wurde die proteinbeladene Säule mit 15 Säulenvolumen His₆-Waschpuffer gewaschen. Das Protein wurde in einer Ein-Schritt-Elution mit 20 ml His₆-Elutionspuffer eluiert und in Fraktionen gesammelt.

Die mBax haltigen Fraktionen wurden vereinigt und 1:4 mit His₆-FPLC-Puffer verdünnt. Diese Lösung wurde auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte Anionenaustauscher Säule (Resource Q; Amersham Pharmacia Biotech) aufgetragen. Das mBax Protein wurde mit einem linearen Gradienten von 0 bis 500 mM NaCl in His₆-FPLC-Puffer eluiert.

Die Fraktionen mit mBax wurden in der Gegenwart von Lagerpuffer (P2) mittels Ultrafiltration (VIVA-Spin6 Konzentrator, 5 kDa Ausschlussgrenze, VIVA Science) bis zu einer maximalen Endkonzentration von 0,2 mg/ml aufkonzentriert. Zentrifugiert wurde für mehrere Stunden bei 2.560 xg (4°C). Das gewonnene Protein wurde aliquotiert bei –70°C gelagert.

Tabelle 4: Medien und Puffer für die Reinigung von mBax

RM Medium	2 % Casamino Acids, 1 x M9 Salzlösung, 1 mM MgCl ₂ , 0,4 % Glucose (pH 7,4)
10 x M9 Salzlösung	422 mM Na ₂ HPO ₄ , 220 mM KH ₂ PO ₄ , 85 mM NaCl, 187 mM NH ₄ Cl (pH 7,4)
Lysepuffer	100 mM HEPES-NaOH, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 % Triton X-100, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 0,1 % 2-Mercaptoethanol, Complete Protease Inhibitor Set (EDTA-free) (Roche), 30 µg/ml DNaseI, 50 µg/ml RNaseA, 50 µg/ml Lysozym (pH 8,0)
His ₆ -Waschpuffer	50 mM HEPES-NaOH, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 20 mM Imidazol, 2 % Oktylglykosid (Alexis), 0,1 mM PMSF, 0,1 mM Benzamidin, 0,1 % 2-Mercaptoethanol (pH 8,0)
His ₆ -Elutionspuffer	50 mM HEPES-NaOH, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 200 mM Imidazol, 2 % Oktylglykosid, 0,1 mM PMSF, 0,1 mM Benzamidin, 0,1 % 2-Mercaptoethanol (pH 8,0)
His ₆ -FPLC-Puffer	50 mM HEPES-NaOH, 2 % Oktylglykosid, 0,1 mM PMSF, 0,1 mM Benzamidin, 0,1 % 2-Mercaptoethanol (pH 8,0)
Lagerpuffer (P2)	20 mM Na ₂ HPO ₄ , 5 % Glycerin, 0,5 % Oktylglykosid (pH 7,5)

Proteinbestimmung

Proteingehalte wurden mit Hilfe eines modifizierten Bradford-Tests (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad) analysiert (Bradford, M.M. 1976). Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe von BSA verwendet. Absorptionen wurden bei 570 nm mit einem ELISA-Plate-Reader (Dy nex Technologies) gemessen.

Trennung von Proteinen über SDS-PAGE

Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Schägger, H. and von Jagow, G. 1987). Die Proteine wurden in 1x Ladepuffer mit 5 % 2-Mercaptoethanol für 5 Minuten bei 100°C inkubiert. Die Proben wurden auf 14 % Gelen (Mini Protean 3, Bio-Rad) gepuffert mit Tris/Glycin oder High-Tris/Glycin geladen und nach dem Einlaufen in das Trenngel (120 V) bei konstanter Spannung von 180 V aufgetrennt.

Tabelle 5: Reagenzien für die SDS-PAGE

5 x Ladepuffer	60 mM Tris-HCl, 14,4 mM SDS, 25 % Glycerol, 0,1 % Bromphenol Blau (pH 6,8)
Tris/Glycin Gel	375 mM Tris-HCl, 14 % Acrylamid/Bis, 0,1 % SDS (pH 8,8)
High-Tris/Glycin Gel	750 mM Tris-HCl, 14 % Acrylamid/Bis, 0,1 % SDS (pH 8,8)
Sammelgel	125 mM Tris-HCl, 4 % Acrylamid/Bis, 0,1 % SDS (pH 6,8)
10 x Laufpuffer	3 % Tris-Base, 14,4 % Glycin, 1 % SDS
10 x High-Tris-Puffer	6 % Tris-Base, 14,4 % Glycin, 1 % SDS

Coomassie Brilliant Blue Färbung

Mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennte Proteine mit einer Lösung von 0,2 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva) in 50 % Methanol und 10 % Essigsäure für 60 Minuten gefärbt. Das Entfärben der Gelmatrix erfolgte mit einer Lösung von 50 % Methanol und 10 % Essigsäure. Gele mit gefärbten Proteinen wurden nach Inkubation in 10 % Glycerol und 20 % Ethanol über Nacht (4°C) getrocknet.

Silberfärbung

Mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden mit Silber gefärbt (Neuhoff, V. *et al.* 1990). Nach der Elektrophorese wurden die Gele 30 Minuten mit Fixierer und anschließend 30 Minuten mit der Oxidationslösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 Minuten mit Wasser folgte eine 20 minütige Inkubation in Silberlösung mit Formaldehyd. Die Gele wurden anschließend bis zum Erscheinen der Proteinbanden in Entwicklerlösung mit Formaldehyd inkubiert. Die Entwicklung wurde bei ausreichender Farbtintensität mit der EDTA-Lösung beendet.

Tabelle 6: Lösungen für die Silberfärbung

Fixierer	50 % Ethanol, 10 % Essigsäure
Oxidationslösung	30 % Ethanol, 0,83 M Natriumacetat, 0,125 % Glutaraldehyd, 8 mM Natriumthiosulfat
Silberlösung	0,1 % Silbernitrat
Entwicklerlösung	0,24 M Natriumcarbonat
EDTA-Lösung	39 mM EDTA

Western Blot Analyse

Ein spezifischer Nachweis von Proteinen erfolgte immunchemisch mittels Western Blot. Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran (Protran 0,2 µm; Schleicher und Schüll) transferiert. Die Western Blot Membran wurde für 20-60 Minuten mit Blockpuffer (siehe Tabelle 7) bei Raumtemperatur geblockt. Es folgte eine Inkubation mit den entsprechenden Erstantikörpern (siehe Tabelle 8) in Blockpuffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Die Membran wurde mit Waschpuffer von ungebundenem Erstantikörper gewaschen. HRP-konjugierte Anti-Kaninchen bzw. Anti-Maus IgGs (Bio-Rad) wurden als Zweitantikörper verwendet. Die Western Blot Membran wurde 60 Minuten mit den Zweitantikörpern in Blockpuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen der Membran wurde eine Chemilumineszenz-Reaktion zur Visualisierung der gebundenen Antikörper verwendet. Diese wurde mit einem ECL-Kit (Amersham Pharmacia Biotech) gemäß den Herstellerangaben detektiert.

Tabelle 7: Reagenzien für den Western Blot

Transferpuffer	25 mM Tris-HCl, 20 % Methanol, 0,05 % SDS (pH 8,3)
Blockpuffer	10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 % Magermilch, 2 % BSA, 0,1 % Tween-20 (pH 7,4-7,6)
10 x Waschpuffer	1,2 M NaCl, 0,1 M NaH ₂ PO ₄ , 0,3 M K ₂ HPO ₄ (pH 7,6)

Tabelle 8: Antikörper für den Western Blot

Name	Isotyp	Immunogen	Hersteller	Verdünnung	Katalog Nr.
Anti Bax (6A7)	Monoklonal/Maus (6A7)	AS 12-24	BD Pharmingen	1:2500	66241A
Rat-Anti Bax	Monoklonal/Ratte	AS 1-172	BD Pharmingen	1:2500	13401A
Rabbit-Anti Bax	Polyklonal/Kaninchen	AS 31-64	BD Pharmingen	1:2500	554106
Cytochrom c	Monoklonal/Maus	AS 1-80, 66-104	BD Pharmingen	1:2000	556433
Anti Cyt c Oxid.	Monoklonal/Maus	Subunit IV	Molecular Probes	1:2000	A-6431
Anti His	Monoklonal/Maus	His ₅ Motiv	Qiagen	1:2000	34660

Proteinanalyse mit MALDI

Nach SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Blue Färbung erfolgte die MALDI-Analyse von Proteinen wie anderswo beschrieben (Bernardo, K. *et al.* 2002). Die gefärbten Proteinbanden wurden aus der Gelmatrix ausgeschnitten. Das Protein wurde mit Trypsin (Promega) bei 37 °C für 16 Stunden verdaut. Alle Massenspektren wurden mit Hilfe eines Bruker REFLEX 4 Massenspektrometers (Bruker) aufgezeichnet.

Proteinsequenzierung über Edman-Abbau

Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz wurden die Proteine nach SDS-PAGE einem Edman-Abbau unterzogen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 5 Minuten in CAPS-Transferpuffer (10 mM CAPS, 10 % Methanol (pH 11)) inkubiert, um die Menge von Tris und Glycin zu reduzieren. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran (Hybond™-PVDF Membran; Amersham Life Science) transferiert. Die Membran wurde für 5 Minuten mit Wasser gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit 0,1 % Coomassie Blue R-250 in 50 % Methanol für 5 Minuten auf der Membran gefärbt. Die Membran wurde anschließend mit einer Lösung von 50 % Methanol und 10 % Essigsäure für 5-10 Minuten entfärbt. Nach abschließendem Waschen mit Wasser wurde die Membran an der Luft getrocknet und bei -20°C gelagert.

Die Sequenzierung der gefärbten Proteine über Edman-Abbau wurde im Servicelabor des ZMMK der Universität zu Köln vorgenommen.

Analyse der Membranlyse durch Bax

Um zu untersuchen, ob Bax unspezifisch Membranen lysieren kann, wurde die *in vitro* Freisetzung von Hämoglobin aus isolierten humanen Erythrozyten durch Bax analysiert. Dazu wurden 0,5 ml heparinisiertes Blut mit 40 ml eiskaltem PBS (pH 7,4) verdünnt. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 5.000 xg (4°C) wurden die pelletierten Erythrozyten (100 µg Gesamtprotein) in 100 µl Sucrose/PIPES Puffer (250 mM Sucrose, 20 mM PIPES-NaOH (pH 7,2)) resuspendiert und mit den verschiedenen Bax Proteinen für 60 Minuten bei 30°C im Thermoschüttler (1.300 Upm) inkubiert. Nach Zentrifugation bei 5.000 xg für 5 Minuten

(4°C) wurde die freigesetzte Menge an Hämoglobin im Überstand spektroskopisch bestimmt. Dazu wurde die Absorption bei 405 nm mit Hilfe eines ELISA-Plate-Readers (Dynex Technologies) ermittelt. Die Gesamtmenge an Hämoglobin wurde durch vollständiges Lysieren von Erythrozyten mit dem Detergens Triton X-100 freigesetzt. Die durch Bax freigesetzte Menge an Hämoglobin wurde im Verhältnis zur Gesamtmenge angegeben.

Rattenleber-Mitochondrien-Isolation

Eine weibliche Wistar Ratte (220-260 g) wurde nach kurzzeitigem Betäuben mit CO₂ durch Dekapitation getötet. Die Leber wurde entnommen, fein geschnitten und in eisgekühltem Isolationsmedium (MIB) mehrfach gewaschen. Die Gewebestücke wurden in einem Teflon-in-Glas Homogenisator mit 700 Upm homogenisiert (5-10 Stöße). Das resultierende Homogenisat wurde für 10 Minuten bei 600 xg (4°C) zentrifugiert, um Zellreste zu pelletieren. Mitochondrien aus dem resultierenden Überstand wurden für 10 Minuten bei 12.000 xg (4°C) pelletiert, anschließend in Zentrifugationsmedium (MCB) resuspendiert und auf einen diskontinuierlichen Gradienten von 1,2 M Sucrosepuffer und 1,6 M Sucrosepuffer geladen. Der Gradient wurde 30-60 Minuten bei 47.800 xg (4°C) zentrifugiert. Die Mitochondrien wurden aus der Interphase entnommen, in MCB resuspendiert und erneut durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 18.000 xg (4°C) pelletiert und abschließend dreimal mit Mitochondrienlagerpuffer (MSB) gewaschen. Die Lebermitochondrien in MSB können auf Eis gelagert bis zu 4 Stunden verwendet werden. Die bei einer Präparation erzielte Gesamtproteinmenge in Mitochondrien beträgt 50-60 mg/ml.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Puffer für die Mitochondrienisolation und -analyse

Isolationsmedium (MIB)	210 mM Mannitol, 70 mM Sucrose, 1 mM EGTA, 5 mM HEPES-NaOH, 0,05 % BSA (pH 7,4)
Zentrifugationsmedium (MCB)	300 mM Mannitol, 10 mM KH ₂ PO ₄ , 0,1 % BSA (pH 7,2)
1,2 M Sucrosepuffer	1,2 M Sucrose, 10 mM KH ₂ PO ₄ , 0,1 % BSA (pH 7,5)
1,6 M Sucrosepuffer	1,6 M Sucrose, 10 mM KH ₂ PO ₄ , 0,1 % BSA (pH 7,5)
Mitochondrienlagerpuffer (MSB)	400 mM Mannitol, 10 mM KH ₂ PO ₄ , 50 mM Tris-HCl, 0,5 % BSA (pH 7,2)
Swelling-Puffer (CFS)	220 mM Mannitol, 68 mM Sucrose, 2 mM NaCl, 5 mM KH ₂ PO ₄ , 10 mM HEPES-NaOH (pH 7,4)
KCl-Medium	150 mM KCl, 10 mM HEPES-NaOH, 1 mM GSH, 0,1 mM EGTA (pH 7,4)

Freisetzung von Cytochrom c aus isolierten Mitochondrien

Die *in vitro* Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum wurde an isolierten Rattenlebermitochondrien untersucht. Dazu wurden 5 µl Bax Protein oder entsprechende Kontrollen vorgelegt. Mitochondrien (300 µg Gesamtprotein) resuspendiert in 45 µl MSB mit 5 mM Succinat, 5 µM Rotenon und 4 mM MgCl₂ wurden zu jeder Probe zugesetzt. Nach Inkubation für 30 Minuten bei 30°C im Thermoschüttler (750 Upm) wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation bei 510 xg pelletiert. Der resultierende Überstand wurde erneut zentrifugiert und immunchemisch mittels Western Blot oder mit Hilfe eines Cytochrom c ELISA (R&D Systems) auf die Anwesenheit von Cytochrom c untersucht.

Insertion von Bax in die Mitochondrienmembran

Die Insertion von rekombinantem Bax Protein in mitochondriale Membranen wurde *in vitro* mit Hilfe von isolierten Rattenlebermitochondrien analysiert. Mitochondrien (1200 µg Gesamtprotein) wurden mit 1,7 µM der verschiedenen rekombinanten Bax Proteine in 300 µl MSB mit 5 mM Succinat, 5 µM Rotenon und 4 mM MgCl₂ resuspendiert. Nach Inkubation für 60 Minuten bei 30°C im Thermoschüttler (850 Upm) wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation bei 510 xg pelletiert. Das Mitochondrienpellet wurde viermal mit MSB gewaschen, um nicht gebundenes bzw. nicht inseriertes Bax Protein zu entfernen. Gebundenes Bax Protein wurde durch 20 minütige Behandlung der Mitochondrien auf Eis mit 0,1 M Na₂CO₃ in MSB (pH 12) von der Membran abgelöst. Nach Zentrifugation für 1 Stunde bei 100.000 xg wurde der Überstand mit abgelöstem Bax Protein entfernt. Das Membranpellet mit dem inserierten Bax Protein wurde in 1 x Ladepuffer für die SDS-PAGE Analyse aufgenommen. Überstand- und Pelletfraktion wurden im Western Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen Bax (Rabbit-Anti Bax) auf die Anwesenheit von Bax Protein analysiert.

Analyse der mitochondrialen Permeabilitätstransition

Das Schwellen von isolierten Rattenlebermitochondrien wird durch Öffnen der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (PTP) verursacht und kann spektroskopisch

verfolgt werden (Bernardi, P. 1999). Ein Anschwellen der Mitochondrien führt zu einer erhöhten Streuung des eingestrahlt Lichts, wodurch das detektierte Signal abnimmt. Die isolierten Mitochondrien (1200 µg Gesamtprotein) wurden dazu in 1,2 ml CFS mit 5 mM Succinat bzw. 5 µM Rotenon resuspendiert. Die Mitochondrien wurden mit einer Endkonzentration von 150 µM CaCl₂ (Positivkontrolle) in Ab- oder Anwesenheit von 4 mM MgCl₂ behandelt. Die Anwesenheit von Mg²⁺-Ionen inhibiert das Öffnen der Permeabilitätstransitions-pore. Eine Endkonzentration von 500 nM mBax(ΔTM), 340 nM mBax(ΔIGDE;ΔTM) bzw. 50 nM mBax wurde eingestellt oder das entsprechende Volumen Lagerpuffer zugegeben. Die Absorption wurde in einem Doppelstrahlspektrometer (Lambda 40; Perkin Elmer) mit temperierten Küvetten unter Rühren (30°C, 200 Upm) bei einer Messwellenlänge von 540 nm über 6 Minuten verfolgt.

Messung des mitochondrialen Membranpotentials

Das Membranpotential über die innere Mitochondrienmembran von isolierten Mitochondrien kann mit Hilfe von Safranin, einem kationischen membranpermeablen Farbstoff, analysiert werden (Akerman, K.E. 1979). Safranin akkumuliert in Abhängigkeit vom Membranpotential in der mitochondrialen Matrix bzw. aggregiert an der inneren Membranoberfläche. Diffusionspotentiale von K⁺- bzw. H⁺-Ionen über die innere Membran von isolierten Mitochondrien induzieren eine Veränderung der spektralen Eigenschaften des Safranin. Das Ausmaß der spektralen Veränderungen korreliert linear mit dem Membranpotential. Eine Potentialabnahme resultiert daher in einer Absorptionsabnahme bei 555 nm. Isolierte Rattenlebermitochondrien (600 µg Gesamtprotein) wurden in 2 ml KCl-Medium mit 10 mM K₂HPO₄, 5 mM L-Glutamat, 4 mM L-Malat, 2 mM MgCl₂ und 10 µg/ml Safranin resuspendiert. Die Absorption wurde in einem Doppelstrahlspektrometer (Lambda 40; Perkin Elmer) mit temperierten Küvetten unter Rühren (30°C, 220 Upm) bei einer Messwellenlänge von 555 nm über 8 Minuten verfolgt. Bax Protein oder ein entsprechendes Volumen des Lagerpuffers wurden nach einer Minute zu der Mitochondriensuspension zugesetzt. Entkopplung der Mitochondrien in der Probenküvette wurde durch Zugabe von 50 µM Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP) nach 6 Minuten induziert. Die Depolarisierung resultierte in einer starken Signalabnahme.

Isolation von Hexokinase-Porin-ANT-Komplexen

Hexokinase-Porin-ANT-Komplexe wurden in Anlehnung an Beutner *et al.* (1996) wie folgt isoliert (Beutner, G. *et al.* 1996):

Drei männliche Ratten (220 -260 g) wurden durch Genickbruch getötet. Die Großhirne wurden zügig entnommen und direkt in flüssigem Stickstoff bis zur Verwendung schockgefroren. Nach Auftauen in GT-Medium wurde das Gehirngewebe auf Eis grob geschnitten und in GT-Medium gewaschen. Das Gewebematerial wurde in GT-Medium (10 ml/g Gewebemasse) mit einem Teflon-in-Glas Homogenisator bei 200 Upm homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 12.000 xg für 10 Minuten (4°C) wurde das resultierende Membranpellet erneut in GT-Medium wie zuvor homogenisiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 Minuten bei 12.000 xg (4°C) wurde das Membranpellet in GT-Medium mit 1 % Triton X-100 (Roche) resuspendiert, um Proteine aus der Membran zu solubilisieren. Die Suspension wurde lichtgeschützt für 45 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Rühren inkubiert. Der Membranextrakt wurde 45 Minuten bei 45.000 xg (4°C) zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde mit 30 g DEAE-Cellulose (DE 52, Whatman) in 1x Äquilibrierpuffer für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die solubilisierten Proteine an das Säulenmaterial zu binden. Eine Säule wurde gepackt, gewaschen und die gebundenen Proteine wurden durch einen linearen Gradienten von 50-500 mM KCl in FPLC-Puffer eluiert. Fraktionen wurden auf den Gehalt an Cytochrom c durch Differenzspektroskopie in Anlehnung an Appaix *et al.* (2000) analysiert (Appaix, F. *et al.* 2000). Verwendet wurde die α Absorptionsbande des Cytochrom c Spektrums bei 550 nm nach Reduktion mit Natriumdithionit. Die vorhandene Hexokinase-Aktivität wurde mit einem gekoppelten optischen enzymatischen Test bei 366 nm mit Glucose und ATP als Substrat analysiert (Hoppe-Seyler, F. *et al.* 1953). Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (Roche) und NADP wurden für die Indikatorreaktion verwendet.

Tabelle 10: Zusammensetzung der Puffer für die Komplexisolierung

GT-Medium	10 mM HEPES-NaOH, 10 mM Glucose, 20 mM Monothioglycerol (pH 7,4)
5 x Äquilibrierpuffer	25 mM Na ₂ HPO ₄ , 25 mM K ₂ HPO ₄ (pH 8,0)
1 x Äquilibrierpuffer	10 mM Na ₂ HPO ₄ , 6,6 mM K ₂ HPO ₄ , 100 mM Glucose, 1 mM Dithioerythrit (pH 8,0)
FPLC-Puffer A	10 mM Na ₂ HPO ₄ , 6,6 mM K ₂ HPO ₄ , 100 mM Glucose, 50 mM KCl, 1 mM Dithioerythrit (pH 8,0)
FPLC-Puffer B	10 mM Na ₂ HPO ₄ , 6,6 mM K ₂ HPO ₄ , 100 mM Glucose, 500 mM KCl, 1 mM Dithioerythrit (pH 8,0)
Dialysepuffer	125 mM Sucrose, 10 mM HEPES-NaOH (pH 7,4)

Rekonstitution von Komplexen in Phospholipidvesikeln

Die isolierten Komplexe von Hexokinase-Porin-ANT mit dem gebundenen endogenen Cytochrom c sollten in Liposomen rekonstituiert werden. Dazu wurden Liposomen mit 98 % Phosphatidylcholin und 2 % Cholesterin verwendet. Die Lipide wurden in Dialysepuffer mit 0,3 % Oktylglykosid bei Raumtemperatur resuspendiert. Die Fraktionen der Komplexisolierung mit der größten Hexokinase-Aktivität (1.500-2.500 mU) wurden mit der Lipidresuspension vereint. Nach Dialyse über Nacht (4°C) wurden Vesikel mit 10 mM KCl und 20 mM Malat durch Beschallen mit Ultraschall (3 x 10 Sekunden mit jeweils 1 Minute Pause) beladen. Nach einer Größenausschlusschromatographie über Sephadex G 75 (Amersham Pharmacia Biotech) in Dialysepuffer wurden die Vesikel auf die Durchlässigkeit für Malat untersucht. Dazu wurde nach Zentrifugation für 45 Minuten bei 400.000 xg (4°C) freigesetztes Malat im Überstand mit einem gekoppelten enzymatischen Test analysiert (Bergmeyer, H.U. *et al.* 1970). Der Gesamtgehalt an Cytochrom c in den pelletierten Vesikeln wurde nach Lysieren mit Triton X-100 wie zuvor spektroskopisch bestimmt.

Nach Behandlung der Vesikel in Dialysepuffer mit mBax(Δ TM) Protein für 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde 45 Minuten bei 400.000 xg (4°C) zentrifugiert. Der Gehalt an freigesetztem Cytochrom c bzw. Malat im Überstand wurde erneut spektroskopisch ermittelt. Das Vesikelpellet wurde mit Triton X-100 vollständig lysiert. Der Gehalt an Cytochrom c wurde in dieser Pelletfraktion ebenfalls spektroskopisch ermittelt.

Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Struktur-Funktions Analyse des pro-apoptotischen Proteins Bax durchgeführt. Dabei sollten für die Freisetzung von Cytochrom c essentielle Domänen des Proteins identifiziert werden. Der Mechanismus der Bax-induzierten Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum von Mitochondrien sollte ebenfalls analysiert werden. Durch Rekonstitution von isolierten Komplexen aus den Mitochondrienmembranen in Liposomen sollte ein speziell organisierter Pool von Cytochrom c und die Freisetzung von diesem durch Bax charakterisiert werden.

Expression, Reinigung und Analyse von Bax Proteinen

Bei der Charakterisierung essentieller Domänen für die Bax-induzierte Freisetzung von Cytochrom c sollten die C-terminale hydrophobe Transmembrandomäne (TM), die BH3-Domäne und die zentralen α -Helices 5/6 von Bax untersucht werden. Der Einfluss der Transmembrandomäne sollte dabei durch einen Vergleich der Proteine mBax und mBax(Δ TM) charakterisiert werden. Es wurde bereits gezeigt, dass Cytochrom c durch mBax(Δ TM) freigesetzt werden kann (Jürgensmeier, J.M. *et al.* 1998; Montessuit, S. *et al.* 1999). Im Vergleich zu Bax(Δ TM) war Bax bei der Freisetzung von Carboxyfluorescein aus Liposomen jedoch reaktiver (Jürgensmeier, J.M. *et al.* 1998; Montessuit, S. *et al.* 1999). Ein detaillierter Vergleich und das Ausmaß der durch die beiden Proteine induzierten Freisetzung von Cytochrom c unter denselben Bedingungen wurde bislang nicht durchgeführt. Die für die Interaktion der Proteine der Bcl-2 Familie untereinander wichtige BH3-Domäne sollte durch Deletion eines konservierten Tetrapeptids (IGDE) beeinflusst werden. Die Deletion der zentralen α -Helices 5/6 sollte eine mögliche Funktion dieser Domäne untersuchen.

Die Proteine mBax, mBax(Δ TM), mBax(Δ IGDE; Δ TM), mBax(Δ h5/6; Δ TM) und mBax(Δ IGDE; Δ h5/6; Δ TM) wurden rekombinant hergestellt. Die genaue Lokalisation der Deletionen in der Aminosäuresequenz ist für alle fünf Proteine schematisch dargestellt (Abbildung 6). Die nach der Expression resultierende Aminosäuresequenz jedes Proteins ist im Anhang zu finden.

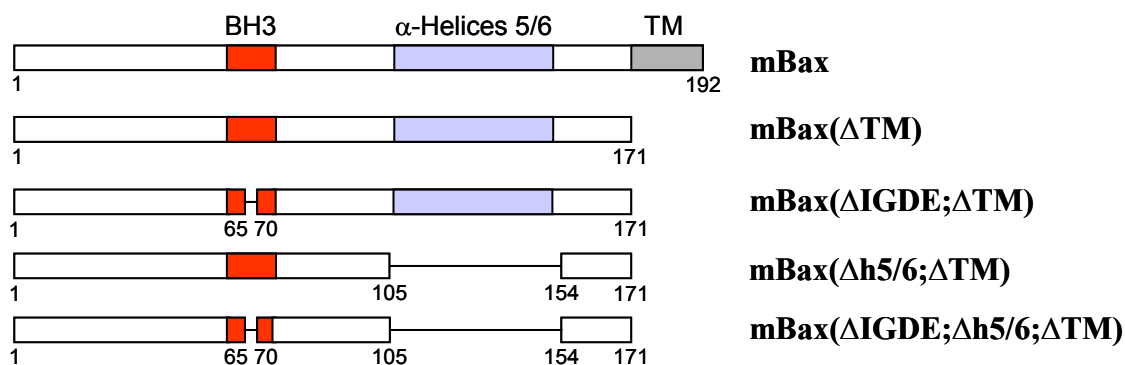


Abb. 6: Schematische Darstellung der rekombinanten Bax Proteine.

Die Deletionen in der BH3-Domäne, der α -Helices 5/6 und der Transmembrandomäne sind schematisch für alle verwendeten rekombinanten Bax Proteine dargestellt.

mBax Protein

Die Expression und Reinigung von rekombinantem Maus Bax Protein (mBax) wurde in Anlehnung an Montessuit *et al.* (1999) mit kleinen Modifikationen durchgeführt (Montessuit, S. *et al.* 1999). Die Expression von mBax in dem *E. coli* Stamm XL-1 Blue unter Kontrolle eines lacZ Promotors ist wegen der Toxizität des mBax Proteins für die Bakterien nicht möglich. Es wurde deshalb der Expressionsvektor pBAD/HisB (Invitrogen) verwendet. Dieser ermöglicht aufgrund des araBAD-Promotors eine streng regulierbare Expression des gewünschten Proteins in geringer Konzentration, die mit L-Arabinose induziert werden kann. Die Expression erfolgte in dem *E. coli* Stamm LMG 194, der speziell für die Expression toxischer Proteine geeignet ist. Die Bakterien wurden nach dem sogenannten „Batch-Verfahren“ in einem Fermenter kultiviert. Durch Zugabe von L-Arabinose wurde die Expression von mBax für vier Stunden bei 30°C induziert. Längere Expressionszeiten führten für die Bakterien aufgrund des toxischen Proteins zu zunehmendem Stress und damit zu einer vermehrten Degradation des exprimierten mBax.

Das rekombinante mBax wurde mit Hilfe einer Affinitätschromatographie aus einem Lysat der Bakterien gereinigt. Dazu wurde ein His₆-Expressionstag verwendet. Damit bei der späteren Charakterisierung des Einflusses der C-terminalen Transmembrandomäne (TM) die Interaktion mit der Mitochondrienmembran unbeeinflusst war, wurde das mBax mit einem N-terminalen His₆-Expressionstag exprimiert. Um das exprimierte mBax Protein in der löslichen Fraktion des Bakterienlysats zu erhalten, wurde zur Solubilisierung das synthetische nichtionische Detergens Triton X-100 verwendet. Das mBax Protein neigt wegen der

vorhandenen hydrophoben Transmembrandomäne (TM) am C-Terminus zur Präzipitation. Um das mBax Protein während des gesamten Reinigungsprozesses dennoch in Lösung zu halten, wurde das nichtionische Detergens Oktylglykosid bei allen Schritten verwendet. Das gereinigte Protein wurde in einem Puffer konzentriert, der neben 5 % Glycerin auch 0,5 % Oktylglykosid enthielt, um das mBax gelöst lagern zu können. Maximal konnte eine Proteinkonzentration von 0,1–0,2 mg/ml erreicht werden, ohne mBax zu präzipitieren.

Das isolierte mBax Protein wurde gelelektrophoretisch mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Silber gefärbt (Spur 2, Abbildung 7). Das mBax Protein zeigte während der SDS-PAGE ein minimal von der erwarteten Größe abweichendes Laufverhalten. Detektiert wurde ein Protein von 29 kDa statt eines 25,6 kDa Proteins. Bei dieser Proteinbande handelte es sich um Bax, wie die spätere Analyse mittels Western Blot zeigte (vgl. auch Abbildung 10 B).

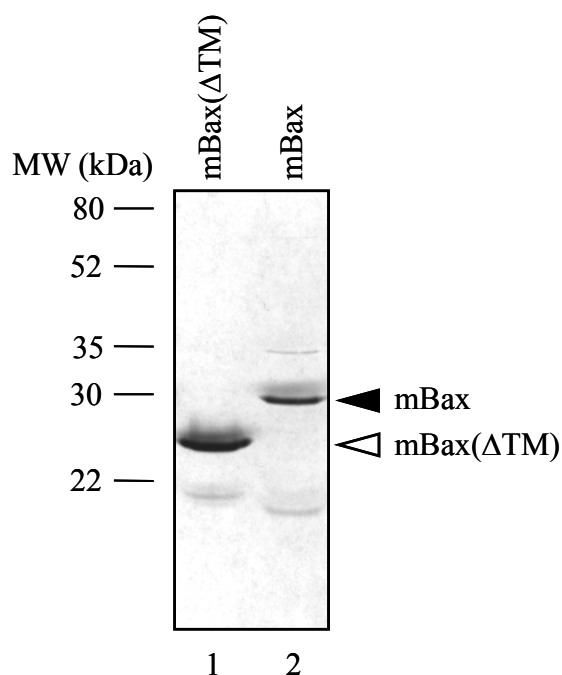


Abb. 7: Analytische Gelelektrophorese von rekombinantem Bax Protein.

1 µg rekombinantes mBax(ΔTM) (1) und mBax (2) wurden nach SDS-PAGE (14 %) mit Silber gefärbt.

Zum direkten Vergleich wurde außerdem das Protein mBax(ΔTM) (siehe auch folgende Reinigung) in gleicher Menge mittels SDS-PAGE aufgetrennt und ebenfalls mit Silber gefärbt (Spur 1, Abbildung 7). Dieses Protein lief ebenfalls bei einem höheren Molekulargewicht und zeigte eine Bande bei 24 kDa. Außerdem wurde ein Protein von ungefähr 20 kDa detektiert.

Bei beiden Proteinbanden handelte es sich um Bax, wie die spätere Analyse mittels Western Blot zeigte (vgl. auch Abbildung 10 B).

Bax Proteine ohne Transmembrandomäne

Die Expression und Reinigung aller rekombinanten murinen Bax Proteine, denen die 20 C-terminalen hydrophoben Aminosäuren der Transmembrandomäne (TM) fehlten, wurde in Anlehnung an Xie *et al.* (1998) durchgeführt (Xie, Z. *et al.* 1998). Für die verschiedenen mBax(Δ TM) Proteine wurde der Expressionsvektor pGEX-4T1 (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. Dieser ermöglicht aufgrund des lacZ-Promotors eine mit IPTG induzierbare Expression des gewünschten Proteins. Die Expression erfolgte in *E. coli* XL-1 Blue nach Transformation des Expressionsvektors. Zur Reinigung mittels Affinitätschromatographie wurden diese Proteine mit einem N-terminalen GST-Expressionstag exprimiert. Das Protein mBax(Δ TM) wurde mit einem zusätzlichen His₆-Expressionstag am C-Terminus für die spezifische Detektion mit einem entsprechenden Antikörper exprimiert. Der Verlauf der Reinigung von mBax(Δ TM) Proteinen ist exemplarisch am Beispiel des Proteins mBax(Δ IGDE; Δ TM) dargestellt (Abbildung 8).

Zur Solubilisierung des exprimierten membranständigen Proteins wurde das synthetische nichtionische Detergens Tween 20 verwendet. Die Proteinbanden der löslichen Fraktion des Bakterienlysats wurden durch Färbung mit „Coomassie-Blue“ detektiert (Spur 1, Abbildung 8 A). In der entsprechenden Spur im immunchemischen Nachweis mittels Western Blot (Abbildung 8 B) wurde mit einem monoklonalen Antikörper (6A7) gegen Bax eine Bande detektiert, deren Molekulargewicht dem mBax(Δ IGDE; Δ TM) Protein mit dem N-terminalen GST-Expressionstag entsprach (Spur 1, Abbildung 8 B). Die Expression des Proteins wurde dadurch bestätigt. Nach Inkubation der löslichen Fraktion des Bakterienlysats mit Glutathion-Sepharose war ein spezifischer Nachweis von Bax Protein mittels Western Blot in dieser Fraktion nicht mehr möglich (Spur 2, Abbildung 8 B). Das deutete auf eine vollständige Bindung des überexprimierten mBax(Δ IGDE; Δ TM) Proteins an das Säulenmaterial über das GST-Expressionstag hin. Das Säulenmaterial wurde gewaschen, um nicht spezifisch gebundene Proteine zu entfernen. In der entsprechenden Fraktion waren Proteine weder durch Färbung mit „Coomassie-Blue“ noch durch Western Blot detektierbar (Spur 3, Abbildung 8). Das mBax(Δ IGDE; Δ TM) Protein wurde anschließend mit Thrombin proteolytisch vom Expressionstag abgespalten und dadurch vom Säulenmaterial eluiert. Es wurde ein Protein

von 22 kDa nach Färbung mit „Coomassie-Blue“ detektiert (Spur 4, Abbildung 8 A). Das 22 kDa Protein wurde im Western Blot durch einen spezifischen Antikörper (6A7) als Bax nachgewiesen (Spur 4, Abbildung 8 B). Das resultierende Protein zeigte ein minimal abweichendes Laufverhalten während der SDS-PAGE im Vergleich zum erwarteten Molekulargewicht von 19,4 kDa.

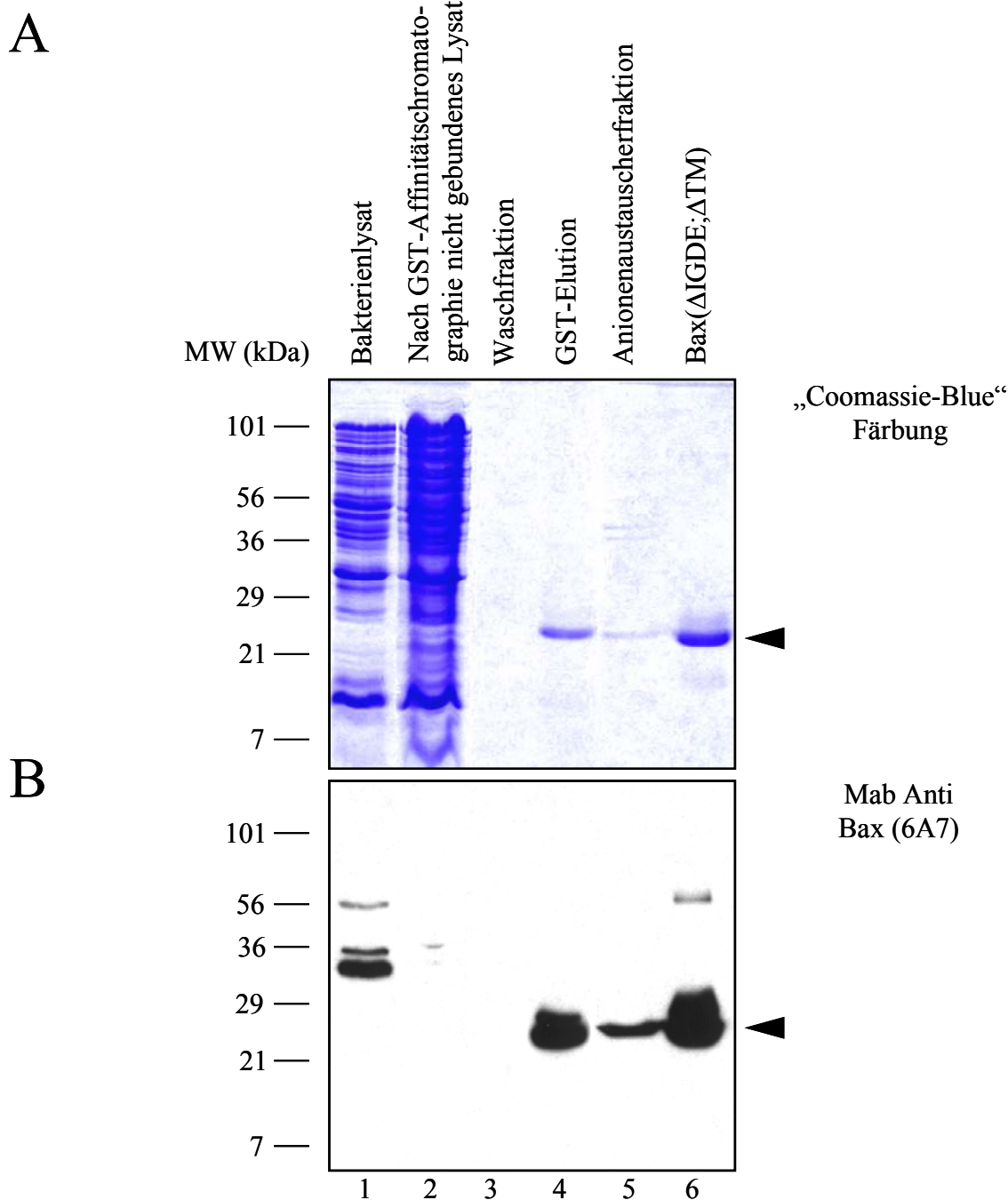


Abb. 8: Reinigung von rekombinantem Bax(Δ IGDE; Δ TM) Protein.

Die Proteine in den Fraktionen der angegebenen Reinigungsschritte wurden nach SDS-PAGE (14 %) mit „Coomassie-Blue“ gefärbt (A) bzw. nach SDS-PAGE (14 %) mittels Western Blot (B) analysiert. Die spezifische Detektion von Bax erfolgte durch einen monoklonalen Erstantikörper (6A7), der die Aminosäuren 12-24 von Bax erkennt, gefolgt von einem HRP gekoppelten Zweitantikörper und ECL.

Die Konzentration des mBax(Δ IGDE; Δ TM) Proteins war nach der Anionenaustauschchromatographie um ca. 50 % verringert (Spur 5, Abbildung 8). In der letzten Spur der Färbung mit „Coomassie-Blue“ bzw. des Western Blots wurde das im Lagerpuffer konzentrierte mBax(Δ IGDE; Δ TM) Protein aufgetragen. Das Hauptprodukt bestand aus einem 22 kDa Protein. Dieses im Laufverhalten während der SDS-PAGE abweichende Protein wurde im Western Blot durch einen spezifischen Antikörper (6A7) als Bax nachgewiesen (Spur 6, Abbildung 8 B). Außerdem konnte im Western Blot ein Bax Protein detektiert werden, dessen Molekulargewicht mit dem von dimerisiertem Bax übereinstimmte (Spur 6, Abbildung 8 B). Dieses SDS-resistente Bax-Dimer war nur in Spuren vorhanden, da es bei der „Coomassie-Blue“ Färbung nicht detektiert werden konnte (Spur 6, Abbildung 8A).

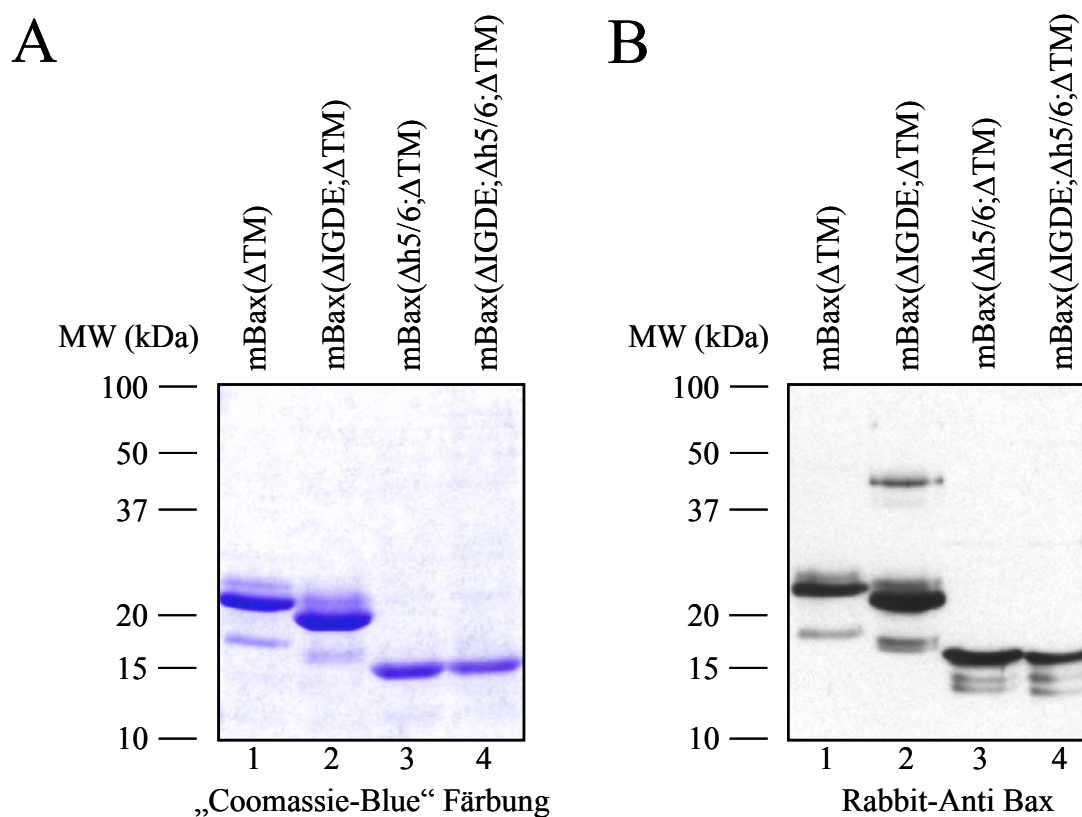


Abb. 9: Analytische Gelelektrophorese von rekombinanten Bax Proteinen ohne Transmembrandomäne.

Alle gereinigten rekombinanten Bax-Deletionsproteine wurden mit SDS-PAGE (14 %) aufgetrennt und anschließend mit „Coomassie-Blue“ gefärbt (A) oder mittels Western Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen Bax (Rabbit-Anti Bax) detektiert (B).

Alle gereinigten Proteine, denen die 20 hydrophoben Aminosäuren am C-Terminus fehlten, mBax(Δ TM) Proteine, wurden in gleicher Menge mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit „Coomassie-Blue“ gefärbt (Abbildung 9 A). Alle Proteine zeigten ein minimal abweichendes Laufverhalten während der SDS-PAGE, da um 2 kDa vergrößerte Molekulargewichte im Vergleich zu den theoretischen Molekulargewichten der entsprechenden mBax(Δ TM) Proteine gefunden wurden. Bei allen Proteinbanden handelte es sich um Bax, wie eine Analyse mittels Western Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen Bax (Rabbit-Anti Bax) zeigte (Abbildung 9 B). Bei den Proteinpräparationen wurden geringe Mengen zweier Degradationsprodukte sichtbar, deren Molekulargewichte um ungefähr 3 kDa kleiner waren, als das des erwarteten rekombinanten Bax Proteins (Abbildung 9). Bei mBax(Δ IGDE; Δ TM) wurde das in Spuren vorhandene dimerisierte Bax wiederum detektiert (Spur 2, Abbildung 9B). Grundsätzlich konnte bei allen mBax(Δ TM) Proteinen jeweils eine Proteinkonzentration größer als 0,2 mg/ml erreicht werden, ohne mBax zu präzipitieren.

Die Proteine mBax(Δ TM) und mBax(Δ IGDE; Δ TM) wurden massenspektroskopisch (MALDI-MS) analysiert. Die gefundenen Peptide sind im Anhang aufgelistet. Es handelte sich bei beiden Proteinen eindeutig um Bax. Für mBax(Δ IGDE; Δ TM) konnte das Tetrapeptid IGDE wie erwartet nicht nachgewiesen werden.

Die isolierten rekombinanten Proteine wurden im Folgenden zur Charakterisierung der für die Freisetzung von Cytochrom c wichtigen Domänen von Bax verwendet. Da die Anwesenheit der C-terminalen hydrophoben Transmembrandomäne auf der einen Seite die Toxizität von Bax für Bakterien stark erhöht und auf der anderen Seite die Löslichkeit des Proteins stark verringert, wurden alle Deletionsmutanten ohne die Transmembrandomäne exprimiert. Es war außerdem nötig, für mBax einen Lagerpuffer zu verwenden, der neben Glycerin auch geringe Mengen des Detergens Oktylglykosid enthielt. Die Anwesenheit von geringen Mengen Detergens konnte für die Experimente toleriert werden, stellte aber für die isolierten Mitochondrien eine negative Bedingung dar. Dies sprach zusätzlich für die Deletion der Transmembrandomäne bei der Erzeugung der rekombinanten Deletionsproteine, welche somit in Puffer ohne Detergens gelöst werden konnten.

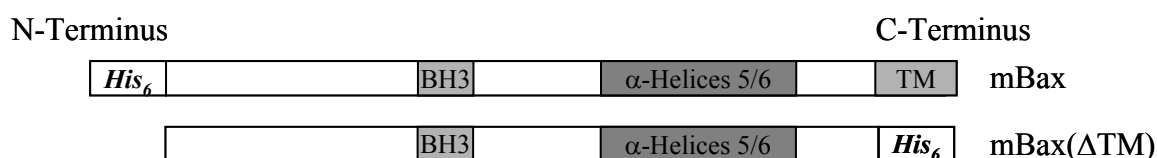
Die während der Reinigung anwesenden Detergenzien Triton X-100, Tween 20 und Oktylglykosid ermöglichen in der verwendeten Konzentration eine Konformationsänderung des Bax Proteins, welche für eine Oligomerisierung der Proteine notwendig ist (Hsu, Y.T. and Youle, R.J. 1997; Hsu, Y.T. and Youle, R.J. 1998; Antonsson, B. *et al.* 2000).

Analyse von mBax(Δ TM) und mBax mit verschiedenen Antikörpern

Da die gereinigten Proteine in ihrem Laufverhalten geringfügig von den erwarteten Molekulargewichten abwichen, sollte eine Analyse deren Identität als Bax bestätigen. Repräsentativ wurde dies für mBax(Δ TM) und mBax mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt.

Die mit SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mBax und mBax(Δ TM) (vgl. auch Abbildung 7) wurden immunchemisch im Western Blot mit verschiedenen Primärantikörpern analysiert. Die spezifische Detektion von Bax Protein erfolgte durch zwei monoklonale Erstantikörper, die Aminosäuren 12-24 (6A7) bzw. die Aminosäuren 1-172 (Rat-Anti Bax) erkennen. Weiterhin wurde das His₆-Expressionstag am C- bzw. N-Terminus mit einem monoklonalen Anti-His-Antikörper spezifisch nachgewiesen (Abbildung 10 A).

A



B

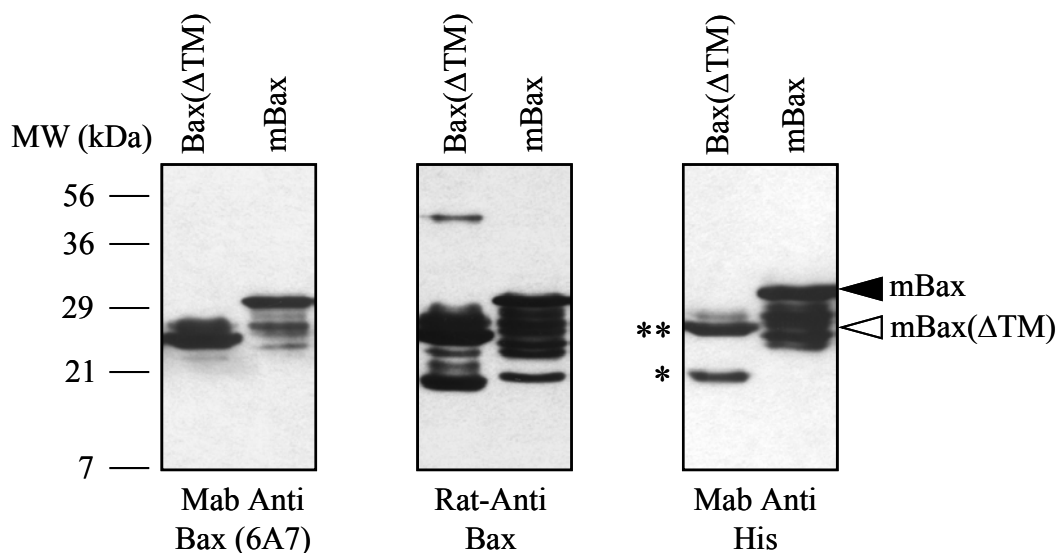


Abb. 10: Immunchemische Analyse von mBax(Δ TM) und mBax.

A: Schematische Darstellung der rekombinanten Proteine mBax(Δ TM) und mBax

B: 1 μ g rekombinantes mBax(Δ TM) Protein und mBax Protein wurden nach SDS-PAGE (14 %) mittels Western Blot analysiert. Die spezifische Detektion von Bax erfolgte entweder durch einen monoklonalen Erstantikörper gegen Aminosäuren 12-24 (6A7) oder gegen Aminosäuren 1-172 (Rat-Anti Bax). Die mit einem His₆-Expressionstag versehenen Proteine wurden mit einem Anti-His-Antikörper, gefolgt von einem HRP gekoppelten Zweitantikörper und ECL nachgewiesen.

Bei dem immunchemischen Nachweis von Bax Protein mit dem Antikörper 6A7 wurde eine 24 kDa Proteinbande für mBax(Δ TM) und eine 29 kDa Proteinbande für mBax detektiert (Abbildung 10 B). Diese als Bax identifizierten Proteine korrelierten in ihrem Molekulargewicht mit den mittels Silberfärbung nachgewiesenen Proteinen nach der Reinigung (vgl. auch Abbildung 7).

Bei dem immunchemischen Nachweis von Bax Protein mit dem monoklonalen Antikörper Rat-Anti Bax wurden dieselben Bax Proteine wie mit dem Antikörper 6A7 detektiert. Zusätzlich wurde ein Degradationsprodukt von Bax mit einem Molekulargewicht von ungefähr 20 kDa bei mBax(Δ TM) nachgewiesen (Abbildung 10 B). Dieses Degradationsprodukt von Bax entsprach dem bei der Silberfärbung detektierten Protein (vgl. auch Abbildung 7). Ein in Spuren vorhandenes SDS-resistentes Bax-Dimer von mBax(Δ TM) konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Dieser Antikörper detektierte außerdem geringe Mengen von Degradationsprodukten bei mBax (Abbildung 10 B).

Bei dem immunchemischen Nachweis des His₆-Expressionstag mit einem monoklonalen Anti-His-Antikörper wurden die zwei oben beschriebenen Bax Banden bei 24 kDa für mBax(Δ TM) bzw. 29 kDa für mBax detektiert. Im Falle des mBax wurden weitere Degradationsprodukte sichtbar. Von besonderem Interesse war, dass mit diesem Antikörper das zuvor nachgewiesene 20 kDa Degradationsprodukt von mBax(Δ TM) ebenfalls detektiert werden konnte (Abbildung 10 B). Da das Epitop für diesen Antikörper, das His₆-Expressionstag, im Falle des mBax(Δ TM) am C-Terminus lokalisiert ist (Abbildung 10 A), ließ sich daraus schließen, dass das 20 kDa Protein durch Degradation am N-Terminus entstanden sein musste. Dieses Ergebnis korrelierte mit dem Nachweis, bei dem der Antikörper 6A7, der ein Epitop am N-Terminus (Aminosäuren 12-24) erkennt, dieses Degradationsprodukt bei mBax(Δ TM) nicht detektierte.

Die Anwesenheit geringer Mengen von N-terminal degradiertem Bax aufgrund der Reinigung sollte die Funktion bezüglich der Freisetzung von Cytochrom c nicht beeinflussen. Eine Erhöhung des pro-apoptotischen Effekts von Bax durch Proteolyse am N-Terminus wurde bereits beschrieben (Gao, G. and Dou, Q.P. 2000; Wood, D.E. and Newcomb, E.W. 2000).

Analyse des Degradationsprodukts von mBax(Δ TM)

Bei dem Abspalten des N-Terminus handelte es sich wahrscheinlich um einen unspezifischen Proteinabbau während der Isolation. Dennoch war es von Interesse, die Spaltstelle genau zu

Zur Analyse der Freisetzung von Cytochrom c wurden die Proteine mBax und mBax(Δ TM), beide gelöst in Lagerpuffer (P2), verwendet. Dieser Puffer wurde neben dem Puffer, der zur Resuspension der Mitochondrien (MSB) verwendet worden war, als Negativkontrolle verwendet. Zur Ermittlung der Gesamtmenge an Cytochrom c in Mitochondrien wurde eine entsprechende Menge Mitochondrien mit dem Detergens Triton X-100 vollständig lysiert und der resultierende Cytochrom c Gehalt im Western Blot analysiert und mittels ELISA quantifiziert. Im Vergleich zu den Kontrollen setzten die Proteine mBax(Δ TM) und mBax in einer Konzentration von 200 nM deutlich Cytochrom c aus den Mitochondrien frei (Abbildung 12 A und B). Das geringe Hintergrundsignal bei den Negativkontrollen kann durch einige wenige, während des Experiments zerstörte, Mitochondrien erklärt werden. Im direkten Vergleich setzten beide Proteine eine vergleichbare Menge an Cytochrom c frei (Abbildung 12 A und B). Im Vergleich zur Gesamtmenge an Cytochrom c in den isolierten Mitochondrien wurden durch beide Proteine nur ungefähr 20 % des Gesamtgehalts an Cytochrom c freigesetzt (Abbildung 12 A und B). Die Freisetzung von Cytochrom c durch Bax war somit nicht quantitativ.

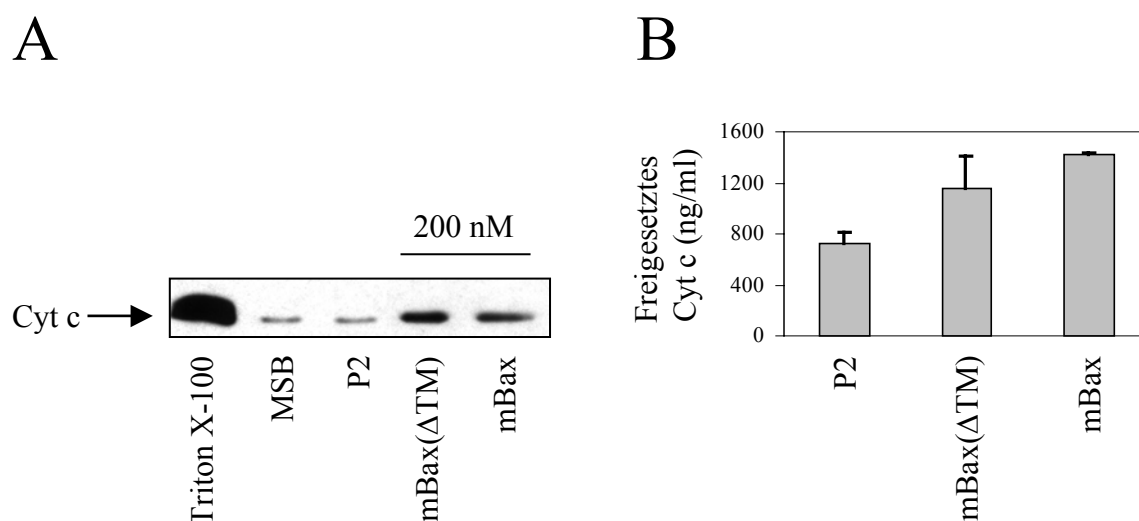


Abb. 12: Vergleich der Cytochrom c Freisetzung durch mBax und mBax(Δ TM)

Isolierte Rattenlebermitochondrien wurden für 30 Minuten bei 30°C mit 200 nM mBax(Δ TM) und mBax im selben Lagerpuffer inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Mitochondrien mit MSB oder Lagerpuffern (P2) behandelt. Zur Freisetzung der gesamten Menge an Cytochrom c wurden die Mitochondrien mit Triton X-100 lysiert. Die Mitochondrien wurden durch Zentrifugation pelletiert.

A: Die resultierenden Überstände wurden im Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper auf ihren Gehalt an Cytochrom c analysiert.

B: Die Überstände wurden außerdem mittels ELISA analysiert (n=2). Die entsprechende Gesamtmenge an Cytochrom c betrug 13.100 ng/ml.

(Allgemein ist anzumerken, dass Analyse mittels Western Blot eine punktuelle Darstellung ist, wohingegen die mehrfache Analyse mittels ELISA eine statistisch signifikante Probenanalyse ermöglicht.)

Die Abhängigkeit der Freisetzung von Cytochrom c aus isolierten Mitochondrien der Rattenleber von der Bax-Konzentration sollte untersucht werden. Dazu wurden isolierte Mitochondrien mit steigender Konzentration an rekombinantem mBax(Δ TM) bzw. mBax im selben Lagerpuffer (P2) inkubiert. Bei der Analyse der resultierenden Überstände auf ihren Gehalt an freigesetztem Cytochrom c mittels Western Blot wurde bei beiden Proteinen eine zunehmende Menge Cytochrom c mit zunehmender Proteinmenge detektiert (Abbildung 13 A).

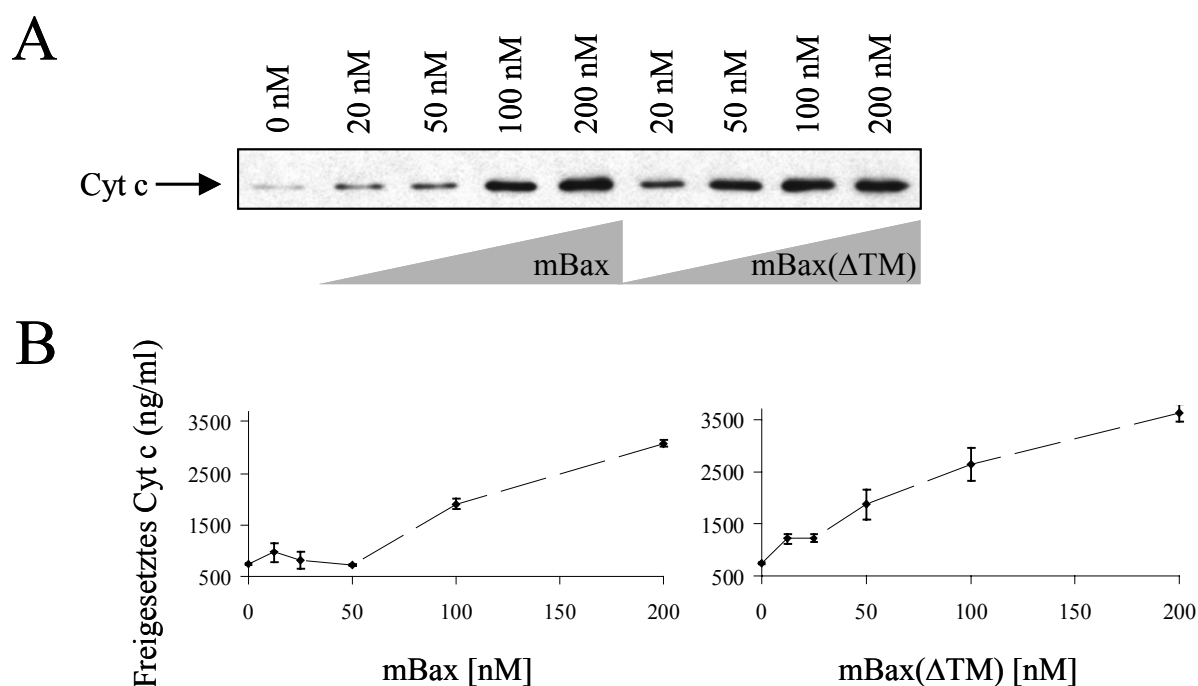


Abb. 13: Abhängigkeit der Cytochrom c Freisetzung von der Bax-Konzentration.

Isolierte Mitochondrien wurden für 30 Minuten bei 30°C mit steigender Konzentration von mBax und mBax(Δ TM) im selben Lagerpuffer behandelt. Als Negativkontrolle (0 nM) wurden die Mitochondrien mit Lagerpuffer (P2) behandelt. Zur Freisetzung der gesamten Menge an Cytochrom c wurden die Mitochondrien mit Triton X-100 lysiert.

A: Die resultierenden Überstände wurden im Western Blot analysiert.

B: Die Überstände wurden ebenfalls mittels ELISA analysiert (n=2). Die entsprechende Gesamtmenge an Cytochrom c betrug 11.020 ng/ml.

Die freigesetzte Menge an Cytochrom c in den resultierenden Überständen der Mitochondrien wurde auch mittels ELISA quantifiziert. Im Konzentrationsbereich von 0-200 nM setzten mBax und mBax(Δ TM) eine zunehmende Menge an Cytochrom c frei (Abbildung 13 B). Die Analyse der Bax-induzierten Freisetzung zeigte bei beiden verwendeten Proteinen einen linearen Zusammenhang zwischen der eingesetzten Bax-Menge und der freigesetzten Menge an Cytochrom c (Abbildung 13 B). Bei der durch mBax und mBax(Δ TM) induzierten

Freisetzung von Cytochrom c aus isolierten Rattenlebermitochondrien handelte es sich um eine dosisabhängige Freisetzung. Bei Verwendung der beiden Proteine im gleichen Lagerpuffer (P2) wurde für die Proteine mBax und mBax(Δ TM) die gleiche Reaktivität im Bezug auf die Freisetzung von Cytochrom c gefunden.

Es wurde bei der Untersuchung der Dosisabhängigkeit gezeigt, dass die Transmembrandomäne (TM) für die Freisetzung von Cytochrom c nicht essentiell ist. Daher wurden in dieser Arbeit weitere Domänen von Bax deletiert und deren Einfluss auf die Freisetzung von Cytochrom c analysiert. Außerdem wurde zur Expression die Transmembrandomäne aller weiteren Bax Proteine deletiert, um die Löslichkeit der rekombinanten Proteine zu erhöhen (vgl. auch Abbildung 6). Diese rekombinanten Deletionsproteine von Bax wurden in Lagerpuffer (P1) ohne anwesendes Detergens gelöst, um für Mitochondrien verträglichere Bedingungen zu ermöglichen.

Einfluss der BH3-Domäne und der α -Helices 5/6 auf die Cytochrom c Freisetzung

Im letzten Abschnitt wurde gezeigt, dass die Transmembrandomäne von Bax für die Freisetzung von Cytochrom c nicht notwendig ist. Als nächstes stellte sich die Frage, ob die für die Interaktion der Bcl-2 Proteine notwendige BH3-Domäne oder die zwei zentralen α -Helices 5/6 eine Rolle bei der Freisetzung von Cytochrom spielen. Die Freisetzung von Cytochrom c aus isolierten Mitochondrien wurde *in vitro* mit rekombinanten Deletionsproteinen von Bax untersucht. Es wurde zum einen ein konserviertes Tetrapeptid (IGDE) in der BH3-Domäne deletiert, mBax(Δ IGDE; Δ TM). Dieses Tetrapeptid ist für die Dimerisierung mit anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie und den pro-apoptotischen Effekt von Bax von zentraler Bedeutung (Zha, H. *et al.* 1996). Die zwei zentralen hydrophoben Helices weisen Homologie zu den porenformenden Domänen von bakteriellen Toxinen auf und könnten für eine Insertion in die Membran verantwortlich sein. Zur Untersuchung dieser potentiell porenformenden Domäne wurden die beiden zentralen hydrophoben α -Helices 5/6 vollständig deletiert, mBax(Δ h5/6; Δ TM). Ein weiteres Deletionsprotein, dem beide zu charakterisierenden Domänen fehlten wurde ebenfalls rekombinant erzeugt, mBax(Δ IGDE; Δ h5/6; Δ TM).

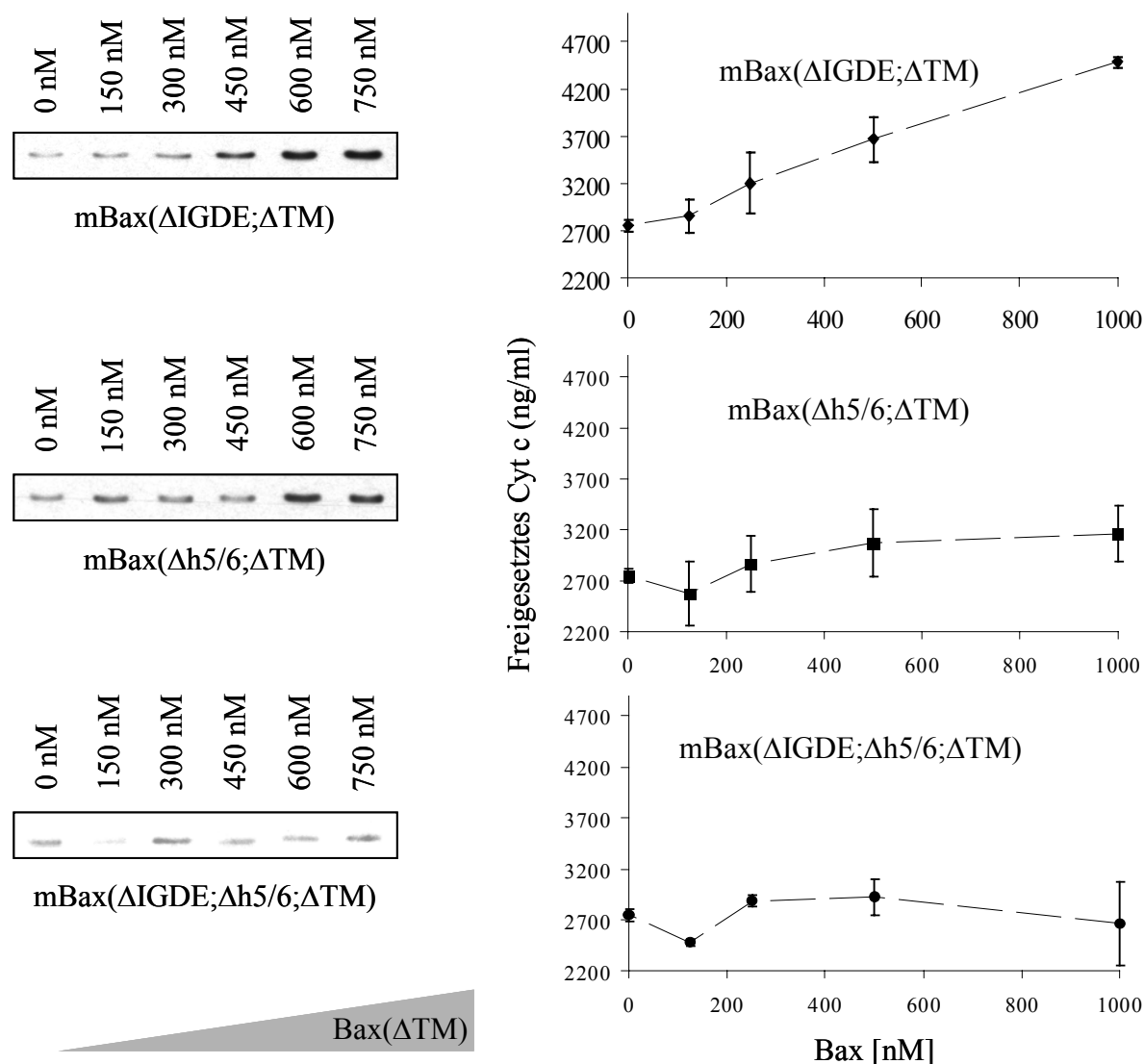


Abb. 14: Abhängigkeit der Cytochrom c Freisetzung von der Bax-Konzentration.

Isolierte Rattenlebermitochondrien wurden für 30 Minuten bei 30°C mit steigender Konzentration der verschiedenen Bax(Δ TM) Proteine inkubiert. Als Negativkontrolle (0 nM) wurden die Mitochondrien mit Lagerpuffer (P1) behandelt. Die Mitochondrien wurden durch Zentrifugation pelletiert.

A: Die resultierenden Überstände wurden im Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen Cytochrom c analysiert.

B: Die resultierenden Überstände wurden mit einem ELISA für Cytochrom c analysiert (n=3). Die entsprechende Gesamtmenge an Cytochrom c betrug 12.050 ng/ml.

Die spezifische Freisetzung von Cytochrom c aus isolierten Mitochondrien in Abhängigkeit von der eingesetzten Bax-Konzentration wurde untersucht. Für die Deletionsproteine wurde ein Konzentrationsbereich von 0–1000 nM gewählt. Durch Bax freigesetztes Cytochrom c wurde mittels Western Blot und ELISA untersucht.

Bei der quantitativen Analyse der Überstände mittels ELISA war bei dem mBax(Δ IGDE; Δ TM) Protein ein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Menge

an mBax Protein und der freigesetzten Menge an Cytochrom c zu beobachten (Abbildung 14). Durch mBax(Δ h5/6; Δ TM) Protein war nur eine wenig erhöhte Cytochrom c Freisetzung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei sehr hohen Bax Protein Konzentrationen zu beobachten (Abbildung 14). Im analysierten Konzentrationsbereich wurde durch mBax(Δ IGDE; Δ h5/6; Δ TM) Protein kein Cytochrom c freigesetzt. Bei der nicht quantitativen aber sensitiveren Analyse mittels Western Blot wurden diese Ergebnisse bezüglich der Bax-Konzentration und der freigesetzten Menge an Cytochrom c bestätigt (Abbildung 14).

Es wurde gezeigt, dass Bax trotz einer Deletion des IGDE-Motivs in der BH3-Domäne Cytochrom c aus isolierten Mitochondrien *in vitro* freisetzt. Das bedeutet, dass die BH3-Domäne für die Freisetzung von Cytochrom c durch Bax allein nicht ausreichend ist. Im Gegensatz dazu zeigen Proteine mit einer Deletion der beiden zentralen α -Helices 5/6 eine stark verringerte Freisetzung von Cytochrom c. Die Deletion des IGDE-Motivs und der α -Helices 5/6 verhindert die Freisetzung von Cytochrom c. Die Anwesenheit der zwei zentralen α -Helices 5/6 ist folglich für die Freisetzung von Cytochrom c durch Bax von zentraler Bedeutung.

Die Interaktion der Proteine der Bcl-2 Familie miteinander sowie deren Fähigkeit, Homodimere bzw. Oligomere über die Domänen BH1-3 zu bilden, ist von zentraler Bedeutung für ihre Funktion bei der Regulation des mitochondrialen Apoptosesignalwegs. Daher wurde die Freisetzung von Cytochrom c aus isolierten Rattenlebermitochondrien durch äquimolare Mischungen zweier Bax-Deletionsproteine untersucht. Nach Inkubation der isolierten Mitochondrien mit den Proteinen bzw. den Proteinmischungen wurden die Überstände mittels Western Blot und ELISA auf ihren Gehalt an freigesetztem Cytochrom c analysiert.

Bei der eingesetzten Konzentration von 1 μ M setzten die Proteine mBax(Δ TM) und mBax(Δ IGDE; Δ TM) im Vergleich zur Kontrolle wie erwartet deutlich Cytochrom c frei. Im Gegensatz dazu zeigten die Proteine mBax(Δ h5/6; Δ TM) und mBax(Δ IGDE; Δ h5/6; Δ TM) eine stark verringerte Freisetzung von Cytochrom c (Abbildung 15). Die Cytochrom c Freisetzung durch 1 μ M Gesamt-Bax-Protein in einer äquimolaren Mischung der Proteine mBax(Δ IGDE; Δ TM) und mBax(Δ h5/6; Δ TM), was die absolute Konzentration jedes der beiden Proteine auf 0,5 μ M reduzierte, war im Vergleich zu der durch 1 μ M mBax(Δ IGDE; Δ TM) induzierten Freisetzung geringfügig verstärkt. Das deutete darauf hin, dass durch die Mischung dieser beiden Proteine, das Bax Protein mit den deletierten α -Helices 5/6 an der Cytochrom c Freisetzung partizipierte. Bei der Kombination von

mBax(Δ IGDE; Δ TM) mit mBax(Δ IGDE; Δ h5/6; Δ TM) wurde eine freigesetzte Cytochrom c Menge im Western Blot detektiert, die der Menge an Cytochrom c bei halbiertes Konzentration an mBax(Δ IGDE; Δ TM) entsprechen könnte. Das deutete darauf hin, dass bei dieser Mischung nur mBax(Δ IGDE; Δ TM) für die Freisetzung von Cytochrom c verantwortlich war. Bei der Mischung zweier Proteine, die jeweils eine Deletion des α -Helix 5/6 Motivs aufwies, ließ sich keine veränderte Freisetzung an Cytochrom c nachweisen (Abbildung 15).

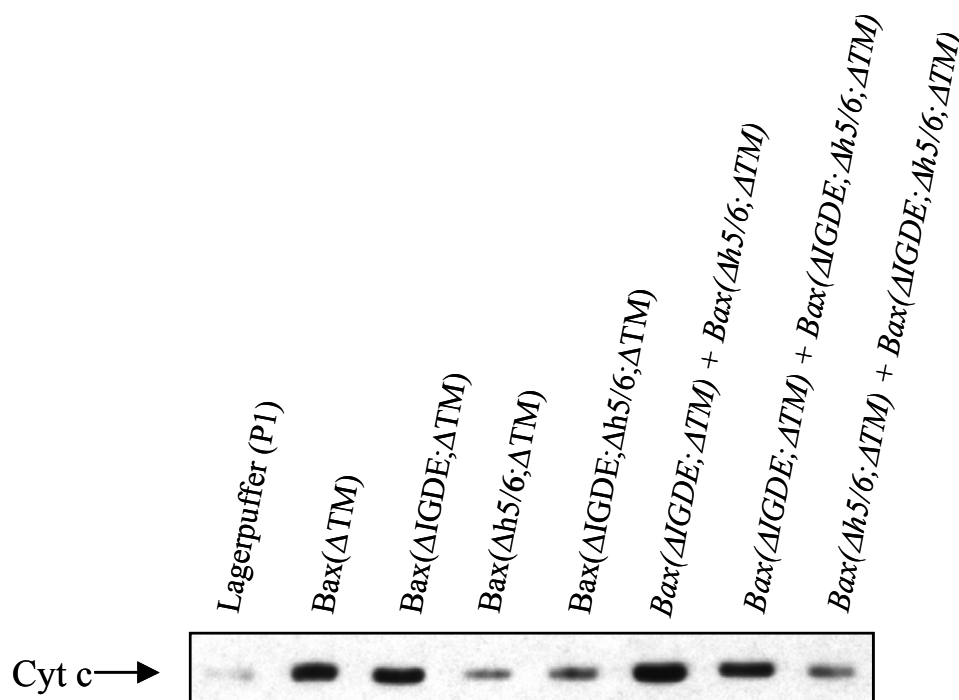


Abb. 15: Bax induzierte Freisetzung von Cytochrom c aus isolierten Mitochondrien.

Isolierte Rattenlebermitochondrien wurden für 30 Minuten bei 30°C in der Anwesenheit von 1,0 μ M der verschiedenen Bax(Δ TM) Proteine inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Mitochondrien mit Lagerpuffer (P1) behandelt. Nach Pelletierung der Mitochondrien wurden die resultierenden Überstände im Western Blot immunchemisch mit einem monoklonalen Antikörper gegen Cytochrom c analysiert.

Bei Analyse der Überstände mittels ELISA konnten diese Resultate bestätigt werden. Die dosisabhängige Freisetzung von Cytochrom c durch mBax(Δ IGDE; Δ TM) wurde erneut gezeigt. Die beiden Proteine mit den deletierten α -Helices 5/6 zeigten wiederum keine signifikante Freisetzung von Cytochrom c. Bei der quantitativen Analyse zeigte sich, dass die freigesetzte Menge an Cytochrom c bei der Mischung von mBax(Δ IGDE; Δ TM) mit mBax(Δ h5/6; Δ TM) im Vergleich zum unverdünnten mBax(Δ IGDE; Δ TM) Protein erhöht war.

Die Kombination von 0,5 μM mBax($\Delta\text{IGDE};\Delta\text{TM}$) mit 0,5 μM mBax($\Delta\text{IGDE};\Delta\text{h5/6};\Delta\text{TM}$) setzte dieselbe Menge an Cytochrom c frei wie 0,5 μM mBax($\Delta\text{IGDE};\Delta\text{TM}$) allein. Eine Mischung zweier Proteine mit deletiertem α -Helix 5/6 Motiv setzte dagegen nur eine minimale Menge Cytochrom c frei (Abbildung 16).

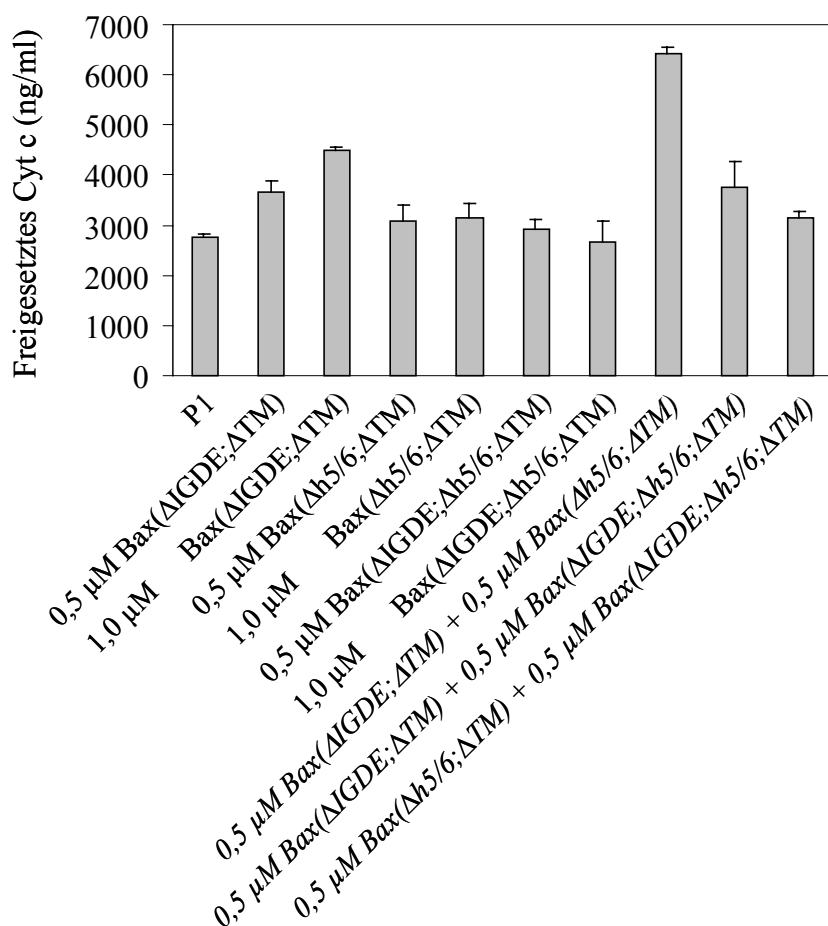


Abb. 16: Bax induzierte Freisetzung von Cytochrom c aus isolierten Mitochondrien.

Isolierte Rattenlebermitochondrien wurden für 30 Minuten bei 30°C in der Anwesenheit von 1,0 μM der verschiedenen Bax(ΔTM) Proteine inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Mitochondrien mit Lagerpuffer (P1) behandelt. Nach Pelletierung der Mitochondrien wurden die resultierenden Überstände immunchemisch mit einem ELISA für Cytochrom c analysiert.

In diesem Abschnitt wurde gezeigt, dass die Anwesenheit des IGDE-Motivs in der BH3-Domäne für die Cytochrom c Freisetzung durch Bax nicht ausreichend ist. Es wurde dadurch gezeigt, dass die BH3-Domäne allein die Bax-induzierte Freisetzung von Cytochrom c nicht vermitteln kann. Die Detektion von Spuren eines SDS-resistenten Bax-Dimers nach der Reinigung deutet eine mögliche Bax Di- bzw. Oligomerisierung unabhängig von einer

funktionalen BH3-Domäne an. Das gänzliche Fehlen des α -Helix 5/6 Motivs bei zwei Proteinen einer Mischung verhindert die Cytochrom c Freisetzung nahezu vollständig. In einer äquimolaren Mischung kann das Fehlen des α -Helix 5/6 Motivs in einem Protein zu einem bestimmten Grad kompensiert werden, solange eine Interaktion über eine intakte BH3-Domäne möglich ist. Eine verhinderte Interaktion über eine inaktive BH3-Domäne (Δ IGDE) bei gleichzeitiger Abwesenheit des α -Helix 5/6 Motivs verhindert eine Freisetzung von Cytochrom c durch Bax in einer Mischung. Die beiden zentralen hydrophoben Helices sind demnach für die Freisetzung von Cytochrom c notwendig.

Insertion von Bax Proteinen in die mitochondrialen Membranen

Es ist bekannt, dass die zentralen α -Helices 5/6 von Bax Sequenzhomologie zu verschiedenen bakteriellen Toxinen aufweisen. Diese Pathogenitätsfaktoren agieren über eine Insertion in die Membran der eukaryontischen Zielzelle (Schein, S.J. *et al.* 1978). Da im letzten Abschnitt gezeigt wurde, dass die zwei zentralen hydrophoben α -Helices 5/6 von Bax für die Cytochrom c Freisetzung aus Mitochondrien bedeutend sind, sollte der zugrunde liegende Mechanismus untersucht werden. Daher wurde eine mögliche Insertion in die mitochondrialen Membranen analysiert.

Dazu wurden isolierte Rattenlebermitochondrien mit rekombinanten Bax Proteinen inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die pelletierten Mitochondrien gewaschen, um lose anheftendes Bax zu entfernen. Anschließend wurden mit der äußeren Membran interagierende Proteine durch Behandlung mit alkalischer Lösung entfernt. Nach Ultrazentrifugation wurde das resultierende Membranpellet der Mitochondrien in SDS-PAGE-Ladepuffer resuspendiert und mittels Western Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen Bax (Rabbit-Anti Bax) auf die Anwesenheit von inseriertem Bax Protein analysiert. Um sicherzustellen, dass vergleichbare Mengen an Mitochondrien verwendet worden waren, wurde die Untereinheit IV der Cytochrom c Oxidase, ein Protein der inneren Membran, als Kontrolle ebenfalls im Western Blot detektiert (Abbildung 17 A).

Bei der Analyse der Membranfraktion der unbehandelten Mitochondrien ließ sich im Western Blot kein Bax detektieren. Die Anwesenheit von endogenem, in die Membranen inseriertem Bax konnte daher ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu konnten mBax(Δ TM) und mBax(Δ IGDE; Δ TM) bei Analyse der Membranfraktion mittels Western Blot in den mitochondrialen Membranen inseriert gefunden werden (Abbildung 17 A). Offensichtlich

wird die Insertion von Bax in die mitochondrialen Membranen also nicht durch die Transmembrandomäne vermittelt. Bei der Analyse der Membranfraktion der Mitochondrien wurden die beiden Bax Proteine, denen das α -Helix 5/6 Motiv fehlte, nicht detektiert (Abbildung 17 A). Grundsätzlich können beide Bax Proteine aber mit dem verwendeten Antikörper detektiert werden (vgl. auch Abbildung 9 B). Die Deletion der hydrophoben α -Helices 5/6 verhinderte also eine Insertion von Bax in die mitochondrialen Membranen. Im Falle der Mischung von mBax(Δ IGDE; Δ TM) mit mBax(Δ h5/6; Δ TM) wurde nur das mBax(Δ IGDE; Δ TM) Protein in die Membranen inseriert detektiert (Abbildung 17 A).

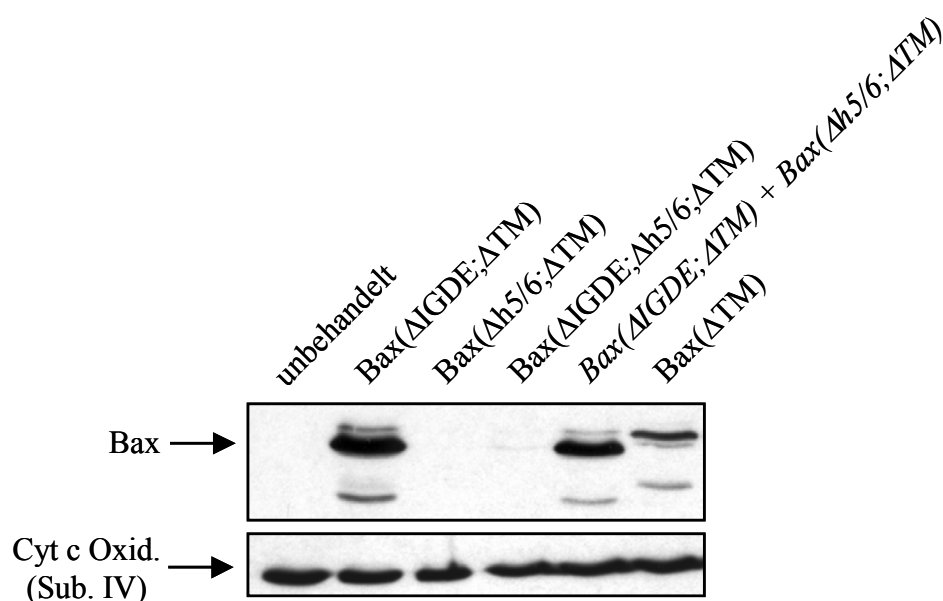


Abb. 17: Analyse der Membraninsertion von Bax.

Isolierte Rattenlebermitochondrien wurden für 30 Minuten bei 30°C in der Anwesenheit von 1,7 μ M der verschiedenen Bax(Δ TM) Proteine inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Mitochondrien mit MSB behandelt. Die Mitochondrien wurden durch Zentrifugation pelletiert. Das Mitochondrienpellet wurde gewaschen, und anheftende Proteine wurden durch Behandlung mit 0,1 M Na_2CO_3 in MSB entfernt. Nach Ultrazentrifugation bei 100.000 $\times g$ wurde das Membranpellet mit den inserierten Proteinen in SDS-PAGE-Ladepuffer resuspendiert. Die Anwesenheit von inseriertem Bax wurde im Western Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen Bax (Rabbit-Anti Bax) analysiert. Als Kontrolle für integrale mitochondriale Membranproteine wurde im selben Western Blot die Untereinheit IV der Cytochrom c Oxidase immunchemisch detektiert.

Da die Insertion in die mitochondrialen Membranen notwendig ist, um Cytochrom c freizusetzen, sollte analysiert werden, ob Bax Proteine in einer Konzentration, die ausreichend für eine signifikante Freisetzung von Cytochrom c ist, auch durch Insertion in andere zelluläre Membranen Poren bilden und dadurch Proteine freisetzen können. Dazu wurden humane Erythrozyten mit 1 μ M der rekombinanten Bax Proteine inkubiert und die Freisetzung von

Hämoglobin spektroskopisch analysiert. Zur Bestimmung der Gesamtmenge an Hämoglobin wurde eine entsprechende Menge Erythrozyten mit Triton X-100 vollständig lysiert. Die freigesetzte Menge an Hämoglobin jeder Probe wurde im Verhältnis zur Gesamtmenge des Hämoglobins angegeben. Unabhängig von der verwendeten Probe wurden etwa 2-4 % des Gesamtgehaltes an Hämoglobin freigesetzt. Dabei konnte keine erhöhte Freisetzung durch Bax Proteine im Vergleich zu den entsprechenden Negativkontrollen festgestellt werden (Abbildung 18). In der gegebenen Konzentration von 1 μM Bax Protein, welche ausreichend für eine signifikante Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien ist (vgl. auch Abb. 14, 15 und 16), wurde keine Freisetzung von Hämoglobin beobachtet.

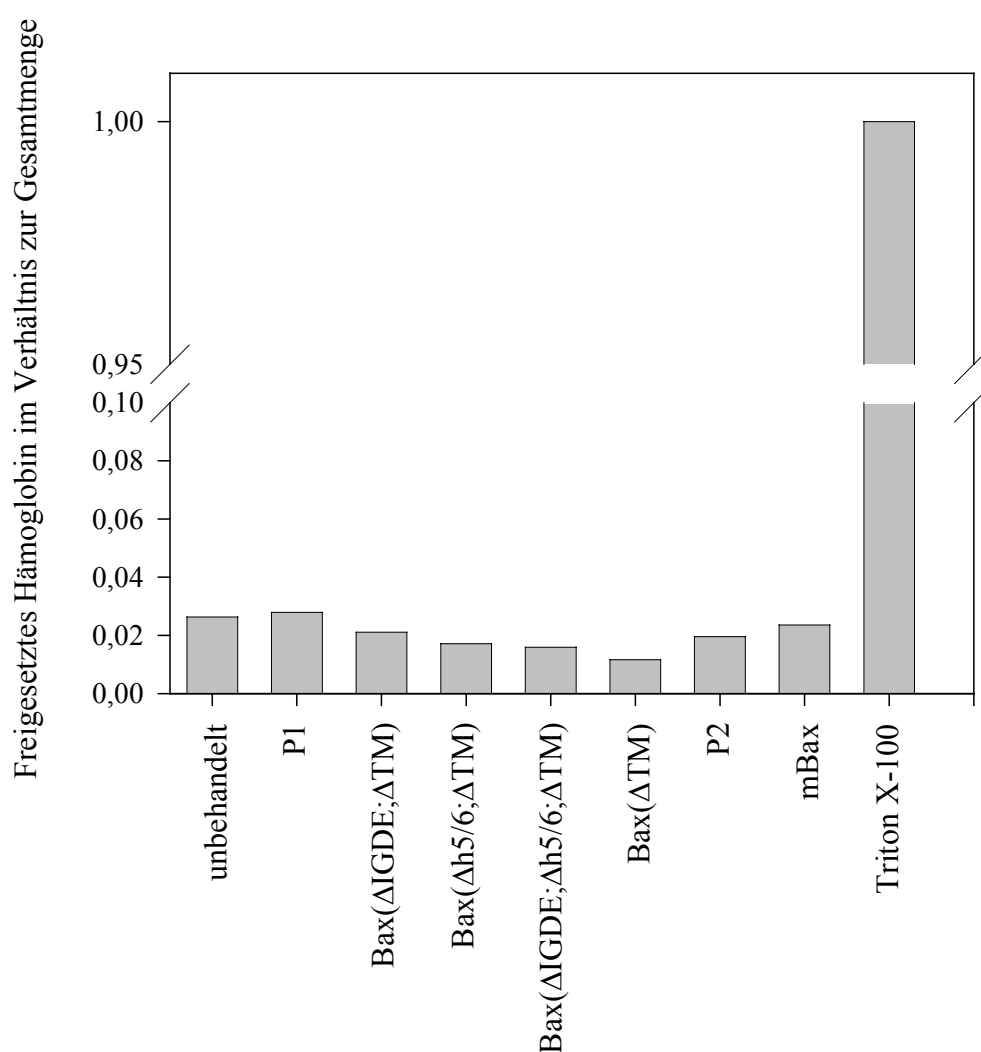


Abb. 18: Einfluss von Bax auf zelluläre Membranen.

Erythrozyten wurden aus menschlichem Blut isoliert und 1 h bei 30°C mit 1 μM der verschiedenen Bax Proteine inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Erythrozyten mit Lagerpuffer für mBax(ΔTM) Proteine (P1) bzw. für mBax Protein (P2) behandelt. Als Positivkontrolle wurden sie mit 1 % Triton X-100 vollständig lysiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und spektroskopisch bei 405 nm auf den Gehalt an freigesetztem Hämoglobin untersucht. Die aus den Erythrozyten freigesetzte Menge Hämoglobin ist im Verhältnis zu den mit Triton X-100 vollständig lysierten Erythrozyten (= 1,00) angegeben.

Einfluss von Bax auf das mitochondriale Membranpotential

Das Potential über die innere Mitochondrienmembran spiegelt den bioenergetischen Zustand von Mitochondrien wieder. Das Membranpotential ist für die Funktion der oxidativen Phosphorylierung und den Import von Proteinen und Metaboliten in die Mitochondrien absolut notwendig. Wie zuvor gezeigt wurde, ist die Insertion von Bax in die Membranen der Mitochondrien essentiell für die Freisetzung von Cytochrom c. Die inserierten Proteine könnten dadurch das Potential über die innere Membran beeinflussen. Neben anderen wurden auch Mechanismen für die Freisetzung von Cytochrom c postuliert, die mit einer Veränderung des Potentials (De- bzw. Hyperpolarisation) korrelieren (Lim, M.L. *et al.* 2002). Um den Mechanismus der Bax-induzierten Cytochrom c Freisetzung charakterisieren zu können, wurde deshalb das Potential über die innere Mitochondrienmembran analysiert.

Dazu wurden isolierte Mitochondrien aus der Rattenleber mit dem Farbstoff Safranin, der eine zeitabhängige Verfolgung des Potential ermöglicht, beladen. Safranin akkumuliert in Abhängigkeit vom Membranpotential in den Mitochondrien, wobei seine spektralen Eigenschaften durch Diffusionspotentiale über die innere Membran verändert werden können. Das Ausmaß dieser Veränderungen korreliert linear mit dem Membranpotential. Nach Resuspension der Mitochondrien wurde eine Absorptionskinetik spektroskopisch bei 555 nm gemessen. Nach einer Vorlaufzeit von einer Minute wurde Bax Protein oder das entsprechende Volumen Puffer zugegeben. Als Positivkontrolle wurde nach weiteren fünf Minuten der Entkoppler Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP), der das Potential über die innere Mitochondrienmembran aufhebt, zur Messküvette zugegeben. Diese Depolarisierung zeigte sich in einer abrupten Absorptionsabnahme. Bei jeder Messung wurde ein vorhandenes Membranpotential durch Verwendung von CCCP nachgewiesen (Abbildung 19 und 20).

Weder durch den Puffer noch durch die jeweiligen Bax Proteine mBax(Δ TM), mBax(Δ IGDE; Δ TM), mBax(Δ h5/6; Δ TM) oder mBax(Δ IGDE; Δ h5/6; Δ TM) wurde das Potential über die innere Mitochondrienmembran beeinflusst. Es wurde damit weder eine Depolarisierung noch eine Hyperpolarisierung detektiert. Im Gegensatz dazu wurde durch Zugabe von CCCP die innere Mitochondrienmembran wie erwartet depolarisiert (Abbildung 19).

Bei Zugabe des Lagerpuffers (P2) war das Signal ebenfalls stabil. Durch Zugabe von mBax wurde eine geringe, aber stetige Abnahme der Absorption, und damit eine geringe anhaltende Depolarisierung nachgewiesen. Das mBax Protein war demnach in der Lage, das

Membranpotential minimal zu verringern. Da eine weitere Depolarisierung mit CCCP detektiert wurde, ist das Potential durch mBax nicht quantitativ beeinflusst worden (Abbildung 20).

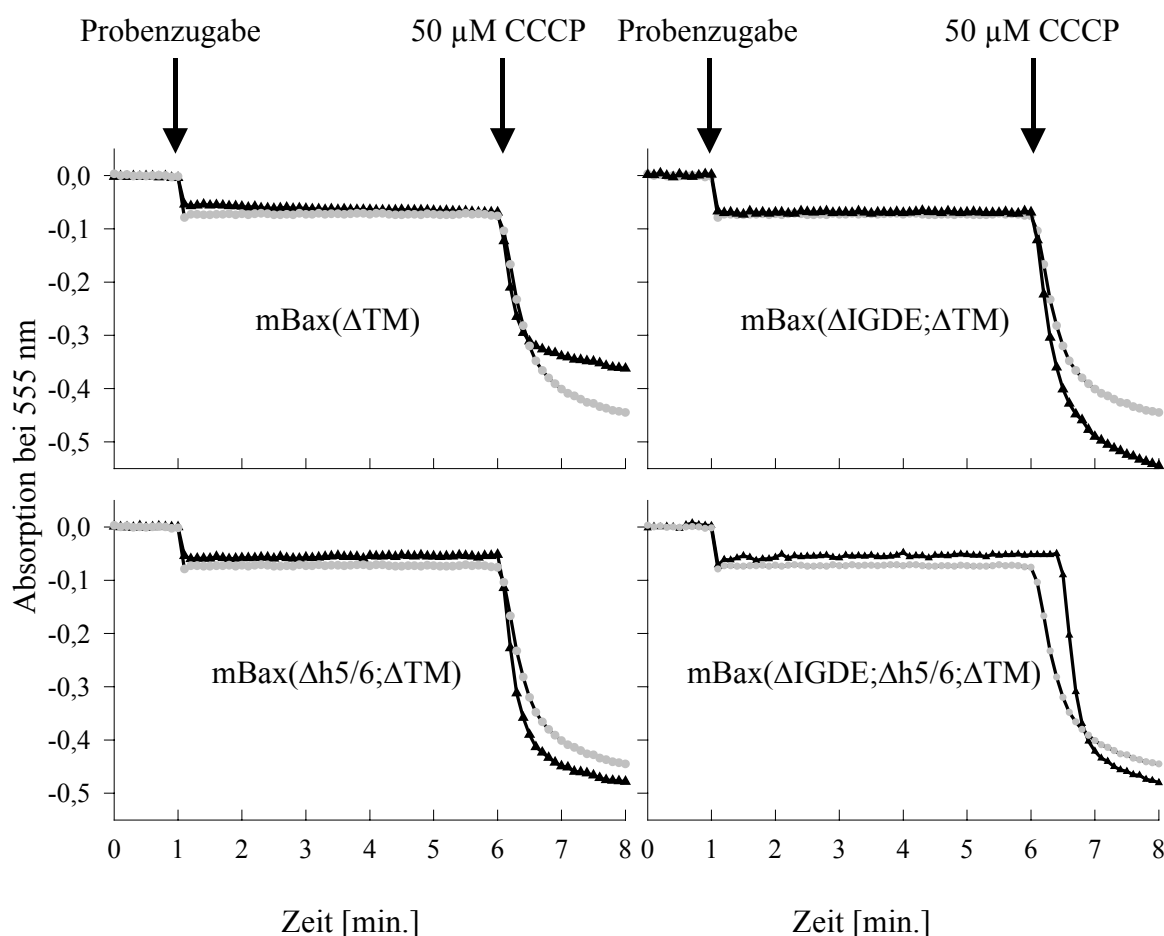


Abb. 19: Einfluss von mBax(Δ TM) Proteinen auf das mitochondriale Membranpotential.

Isolierte Rattenlebermitochondrien wurden in KCl-Medium mit 10 μ g/ml Safranin resuspendiert. Die Absorption wurde bei 30°C im Doppelstrahlspektrometer bei 555 nm über die Zeit beobachtet. Zum angegebenen Zeitpunkt wurde eine Endkonzentration von 500 nM der Bax(Δ TM) Proteine (schwarz) eingestellt, oder das entsprechende Volumen Lagerpuffer (P1) (grau) zugesetzt. Als Positivkontrolle wurde nach 6 Minuten der Entkoppler CCCP bis zu einer Endkonzentration von 50 μ M zugesetzt. Die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials resultiert in Diffusionspotentialen, welche die spektralen Eigenschaften des Safranin beeinflussen. Diese Veränderung resultiert in einer Abnahme der Absorption.

Eine Hyperpolarisation wurde nicht beobachtet. Stattdessen verursachte mBax sogar eine minimale Depolarisierung. In dem in dieser Arbeit verwendeten Modellsystem und unter den verwendeten experimentellen Bedingungen ist die Freisetzung von Cytochrom c nicht das Resultat eines Schwellens der mitochondrialen Matrix aufgrund einer Bax-induzierten Hyperpolarisation.

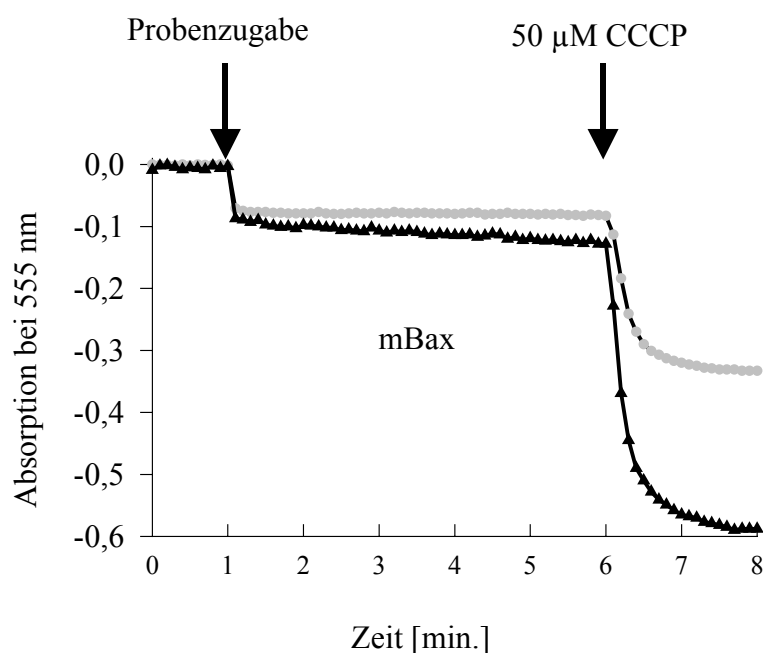


Abb. 20: Einfluss von mBax auf das mitochondriale Membranpotential.

Isolierte Rattenlebermitochondrien wurden in KCl-Medium mit 10 µg/ml Safranin resuspendiert. Die Absorption wurde bei 30°C im Doppelstrahlspektrometer bei 555 nm über die Zeit beobachtet. Zum angegebenen Zeitpunkt wurde eine Endkonzentration von 115 nM mBax Protein (schwarz) eingestellt, oder das entsprechende Volumen Lagerpuffer (P2) (grau) zugesetzt. Als Positivkontrolle wurde nach 6 Minuten der Entkoppler CCCP bis zu einer Endkonzentration von 50 µM zugesetzt. Die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials resultiert in Diffusionspotentialen, welche die spektralen Eigenschaften des Safranin beeinflussen. Diese Veränderung resultiert in einer Abnahme der Absorption.

Einfluss von Bax auf die mitochondriale Permeabilitätstransition

In die mitochondrialen Membranen inseriertes Bax Protein könnte mit den vorhandenen Proteinen (z.B. VDAC oder ANT) interagieren und die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (PTP) induzieren. Als Folge dieser mitochondrialen Permeabilitätstransition (MPT) diffundiert Wasser in den Matrixraum mit höherer Osmolarität, was zum Schwellen der Mitochondrien führt. Dieser Prozess würde die innere Membran entfalten und wegen der größeren Oberfläche letztendlich zum Zerreißen der äußeren Membran führen.

Es sollte untersucht werden, ob isolierte Mitochondrien unter dem Einfluss von rekombinantem Bax Protein schwellen, was eine direkte Folge einer involvierten MPT wäre. Das Schwellen von isolierten Mitochondrien in Suspension wurde kinetisch im Doppelstrahlspektrometer verfolgt. Als Positivkontrolle wurde das Öffnen der PTP bzw. das

Schwellen der Mitochondrien nach einer Minute durch Zugabe von 150 μM CaCl_2 induziert. Wie erwartet war eine schnelle und rapide Signalabnahme die Folge, die das Schwellen der isolierten Mitochondrien aufgrund der MPT anzeigte. Eine Induktion des Öffnens der PTP wurde in einer Suspension in der Anwesenheit von MgCl_2 , welches ein Inhibitor der PTP ist (Bernardi, P. *et al.* 1999), vollständig inhibiert (Abbildung 21 A). Die isolierten Rattenlebermitochondrien besaßen also grundsätzlich die Fähigkeit eine mitochondriale Permeabilitätstransition zu vollziehen.

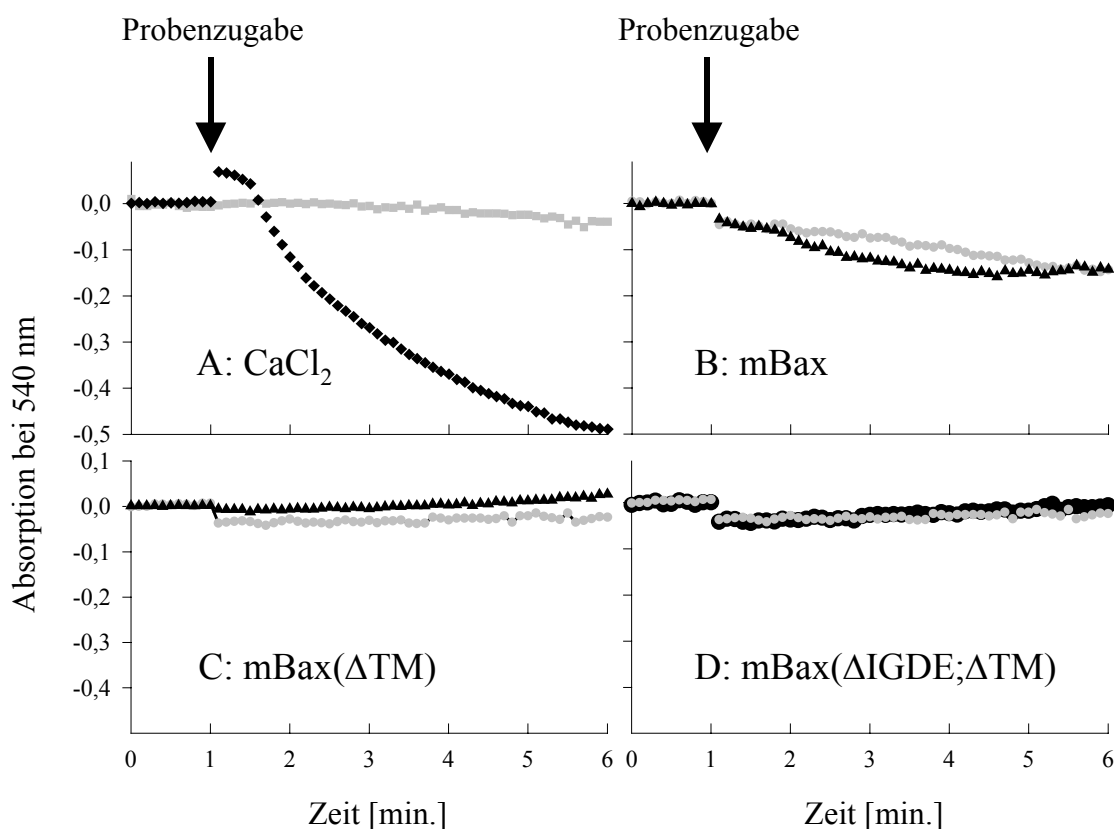


Abb. 21: Einfluss von Bax auf die mitochondriale Permeabilitätstransition.

Die Lichtstreuung als Maß für das Schwellen von isolierten Rattenlebermitochondrien wurde bei 30°C im Doppelstrahlspektrometer bei 540 nm kontinuierlich gemessen. Das Schwellen von Mitochondrien resultiert in einer Abnahme der Absorption.

A: Als Positivkontrolle wurde CaCl_2 (schwarz) in einer Endkonzentration von 150 μM zugesetzt. Als Negativkontrolle wurden die Mitochondrien vor dem Experiment in Reaktionspuffer mit 4 mM MgCl_2 (grau) resuspendiert, wodurch die mitochondriale Permeabilitätstransition blockiert wird.

B: Eine Endkonzentration von 50 nM mBax (schwarz) wurde eingestellt oder das entsprechende Volumen Lagerpuffer (P2) (grau) zugesetzt.

C: Eine Endkonzentration von 500 nM Bax(ΔTM) (schwarz) wurde eingestellt oder das entsprechende Volumen an Lagerpuffer (P1) (grau) zugesetzt.

D: Eine Endkonzentration von 340 nM Bax($\Delta\text{IGDE};\Delta\text{TM}$) (schwarz) wurde eingestellt oder das entsprechende Volumen Lagerpuffer (P1) (grau) zugesetzt.

Nach einer Vorlaufzeit von einer Minute wurde mBax zu der Suspension der Mitochondrien gegeben, worauf eine geringe Signalabnahme zu verzeichnen war. Durch Zugabe des entsprechenden Volumens Lagerpuffer wurde im Kontrollexperiment dieselbe Abnahme registriert (Abbildung 21 B). Das deutete darauf hin, dass sich der verwendete Puffer und nicht das Protein selbst negativ auf die Mitochondrien bzw. die MPT ausgewirkt hatte. Es könnte sich dabei um ein minimales Schwellen aller Mitochondrien oder ein transientes intensives Schwellen einer Subpopulation der Mitochondrien gehandelt haben.

Bei Zugabe der Proteine mBax(Δ TM) bzw. mBax(Δ IGDE; Δ TM), die beide in der Lage waren Cytochrom c freizusetzen, war im Vergleich zur Kontrolle kein Schwellen der Mitochondrien über die Zeit zu beobachten (Abbildung 21 C und D).

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass alle verwendeten Bax Proteine in einer Konzentration, bei denen sie signifikante Mengen von Cytochrom c freisetzen, die mitochondriale Permeabilitätstransition nicht induzieren. Dieses Ergebnis korreliert mit der vorherigen Messung eines stabilen mitochondrialen Membranpotentials, da eine Öffnung der PTP unweigerlich zu einer abrupten Depolarisierung aufgrund der resultierenden Permeabilität über die innere Membran führen würde. Außerdem bestätigt das Ausbleiben des mitochondrialen Schwellens, dass keine Diffusion von Wasser in den Matrixraum aufgrund einer Hyperpolarisation stattgefunden hat. Die Freisetzung von pro-apoptischen Faktoren aus dem Intermembranraum ist in diesem Modellsystem nicht das Ergebnis einer unspezifischen Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembran aufgrund einer Hyperpolarisation oder einer Öffnung der PTP.

Freisetzung von Cytochrom c aus Porin-ANT-Komplexen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Bax Cytochrom c aus isolierten Mitochondrien freisetzen kann. Einige funktional notwendige Domänen des pro-apoptischen Bcl-2 Proteins Bax wurden charakterisiert und mögliche Mechanismen untersucht. Ein genereller Einfluss der Verteilung des Cytochrom c in den Mitochondrien wurde nicht berücksichtigt. Daher sollte ein spezifischer endogener Pool von Cytochrom c, der in Hexokinase-Porin-ANT-Komplexen organisiert ist, und bei deren Reinigung mit isoliert werden kann, untersucht werden.

Dazu wurden isolierte Hexokinase-Porin-ANT-Komplexe mitsamt des endogenen Cytochrom c in Liposomen rekonstituiert und die Freisetzung dieses speziellen Cytochrom c Pools durch Inkubation mit rekombinantem mBax(Δ TM) Protein *in vitro* analysiert. Eine potentielle

Regulation der Freisetzung von Cytochrom c aus den Komplexen wurde durch Zugabe der Substrate bzw. des Produkts der von der Hexokinase katalysierten Reaktion untersucht. Hexokinase-Porin-ANT-Komplexe wurden aus einem Triton X-100 Extrakt von Rattenhirn durch Anionenaustauschchromatographie isoliert. Die gebundene Hexokinase vermittelt dabei eine Affinität zur verwendeten Cellulose, einem Glucosepolymer (Beutner, G. *et al.* 1996). Die an die DEAE-Cellulose gebundenen Proteine wurden mit einem KCl-Gradienten eluiert und auf ihren Gehalt an Hexokinase und Cytochrom c analysiert. Endogenes Cytochrom c konnte spektroskopisch in den Fraktionen mit Hexokinase-Aktivität, welche die gereinigten Komplexe widerspiegelt, nachgewiesen werden (Abbildung 22). Die isolierten Hexokinase-Porin-ANT-Komplexe wurden in Phospholipidvesikeln rekonstituiert und diese mit Malat beladen. Nach einer Größenausschlusschromatographie über Sephadex G 75 konnten, nach Lyse der Vesikel, Cytochrom c und Hexokinase weiterhin zusammen nachgewiesen werden. Die zuvor in den Vesikeln eingeschlossene Menge Malat war nach der Größenausschlusschromatographie über Sephadex G 75 quantitativ nachweisbar. Dies bewies das Vorhandensein von abgeschlossenen Vesikeln mit endogenen Cytochrom c haltigen Hexokinase-Porin-ANT-Komplexen in der Phospholipid-Doppelschicht.

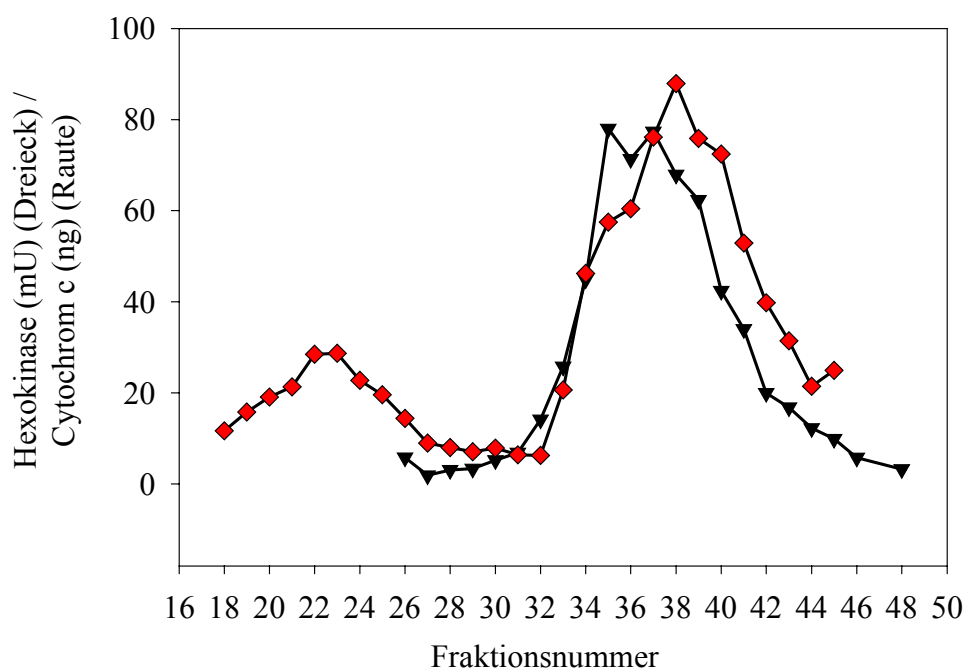


Abb. 22: Co-Elution von Hexokinase-Porin-ANT-Komplexen und Cytochrom c bei Reinigung über DEAE Cellulose.

Die Membranfraktion von Rattengehirngewebe wurde isoliert. Nach Extraktion integraler Proteine mit Triton X-100 wurde der resultierende Membranextrakt mit äquilibrierter DEAE-Cellulose inkubiert. Gebundene Proteine wurden mit einem linearen KCl-Gradienten von 50-500 mM eluiert. Die Elutionsfraktionen der Chromatographie über DEAE-Cellulose wurden durch Differenzspektroskopie auf den Gehalt an Cytochrom c (Raute) bzw. mit einem gekoppelten optischen enzymatischen Test auf die Aktivität an Hexokinase (Dreieck) analysiert.

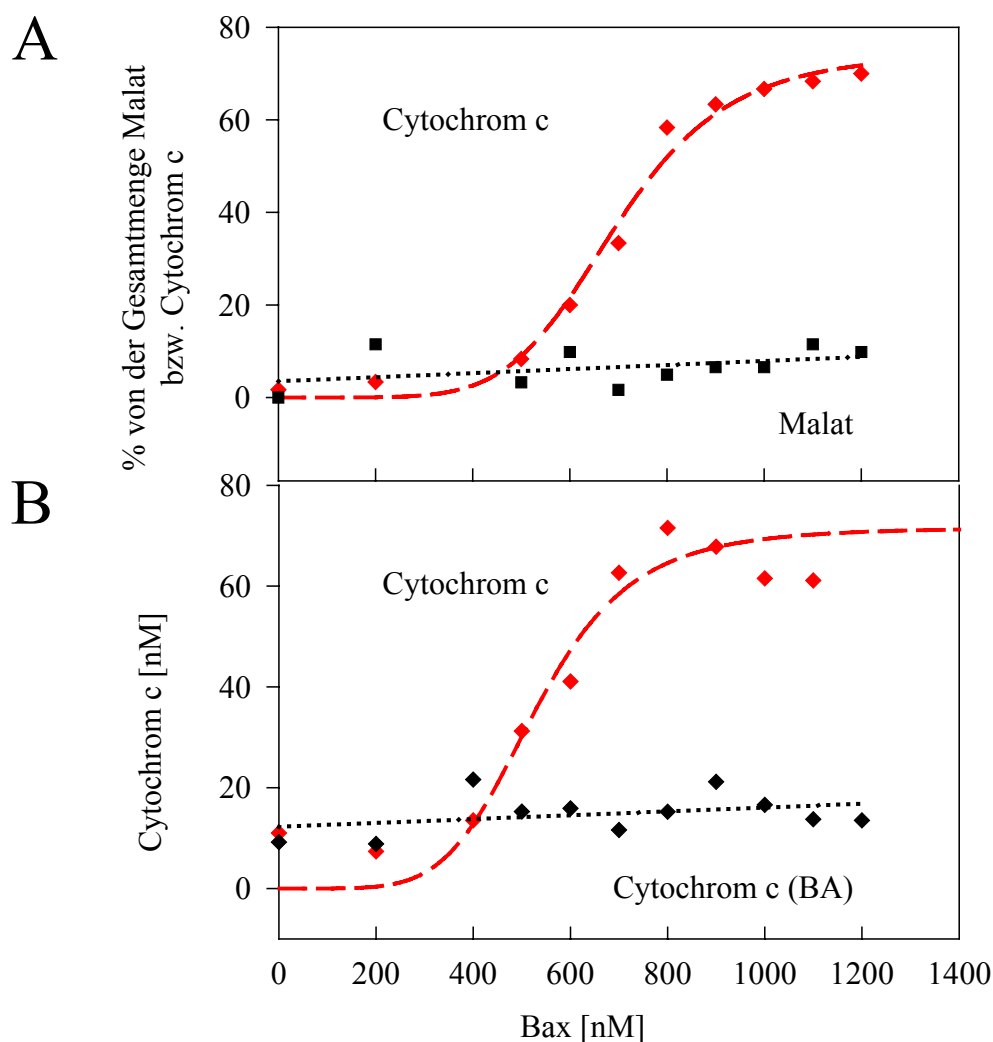


Abb. 23: Freisetzung von endogenem Cytochrom c aus Hexokinase-Porin-ANT-Komplexen durch Bax.

A: Isolierte Hexokinase-Porin-ANT-Komplexe wurden in Phospholipidvesikeln rekonstituiert. Die Vesikel wurden mit Malat und KCl beladen und bei Raumtemperatur für 10 Minuten mit steigender mBax(Δ TM)-Konzentration behandelt. Die Freisetzung von endogenem Cytochrom c wurde nach Zentrifugation für 45 Minuten bei 400.000 g spektroskopisch bestimmt. Die Permeabilität für Malat wurde mit einem gekoppelten optischen enzymatischen Test analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

B: Rekonstituierte Hexokinase-Porin-ANT-Komplexe wurden vor der Behandlung mit mBax(Δ TM) mit 250 μ M Bonkreat vorinkubiert. Das Experiment wurde wie unter A beschrieben durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten.

Es sollte nun analysiert werden, ob mBax(Δ TM) diese spezielle endogene in Hexokinase-Porin-ANT-Komplexen organisierte Fraktion von Cytochrom c freisetzen kann. Die Proteoliposomen mit den rekonstituierten Komplexen wurden deshalb mit mBax(Δ TM) in einem Konzentrationsbereich von 0-1200 nM behandelt. Nach Zentrifugation wurden die resultierenden Überstände abgenommen und spektroskopisch auf ihren Gehalt an

freigesetztem Cytochrom c analysiert. Bis zu 80 % des vorhandenen endogenen Cytochrom c wurde dosisabhängig durch Bax freigesetzt. Die Freisetzung oblag dabei einem sigmoiden Verlauf (Abbildung 23 A). Im Gegensatz zu Cytochrom c wurde das in den Vesikeln eingeschlossene Malat nicht durch Bax freigesetzt (Abbildung 23 A). Die Vesikel waren also abgeschlossen und für Malat impermeabel. Durch Bonkrekat wird der ANT in einer Konfiguration fixiert, die keine Interaktion mit Porin erlaubt. Dadurch werden die Komplexe zerstört. Nach Dissoziation der Komplexe mit Bonkrekat (BA) konnte mBax(Δ TM) kein endogenes Cytochrom c mehr freisetzen (Abbildung 23 B). Das Cytochrom c wurde somit aus einer speziellen Organisation in den Porin-ANT-Komplexen freigesetzt.

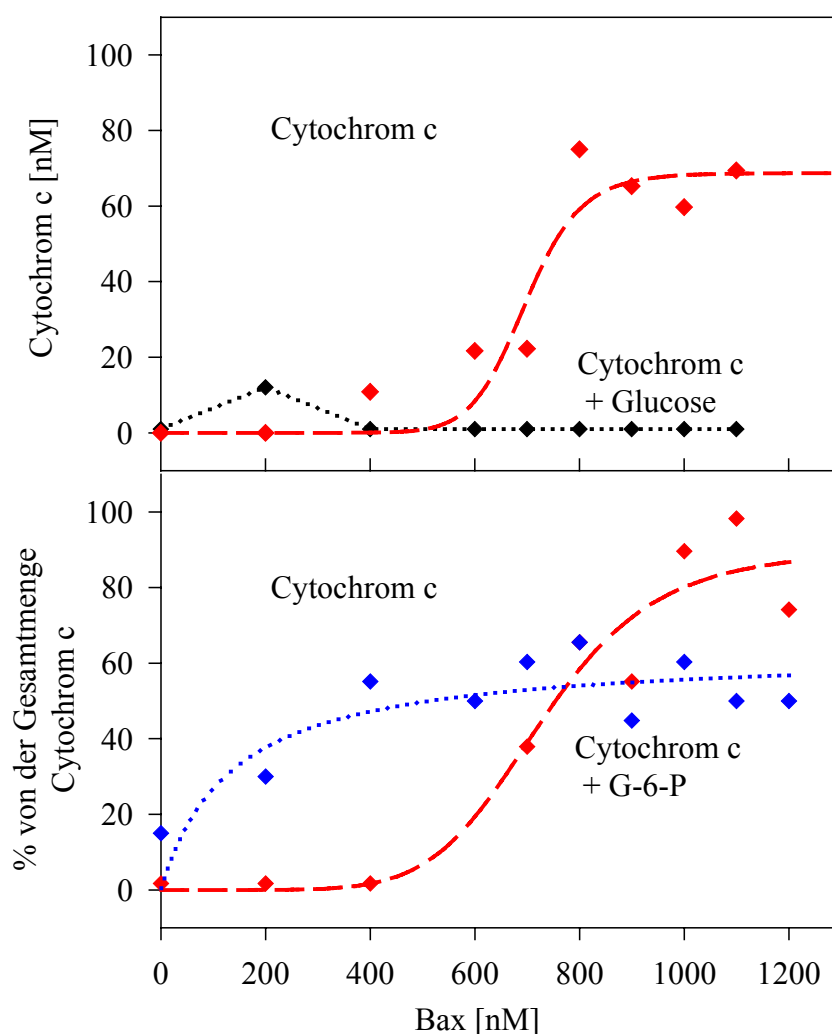


Abb. 24: Einfluss der Hexokinase-Aktivität auf die Bax-induzierte Freisetzung von endogenem Cytochrom c.

A: Das Experiment wurde wie zuvor (Abb. 23) aber in Anwesenheit von 2 mM ATP und 4 mM Glucose durchgeführt.

B: Das Experiment wurde wie zuvor (Abb. 23) aber in Anwesenheit von 5 mM Glucose-6-Phosphat durchgeführt.

Gezeigt sind in beiden Fällen die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente.

Durch eine aktive Hexokinase produziertes ADP stabilisiert Porin-ANT-Komplexe und erhöht die Bindung des Enzyms an die mitochondriale Oberfläche (Bucheler, K. *et al.* 1991). Es wurde gezeigt, dass Bax und Hexokinase die gleiche Bindungsstelle an Mitochondrien aufweisen (Pastorino, J.G. *et al.* 2002). Daher sollte analysiert werden, ob die Substrate bzw. das Produkt der von der Hexokinase katalysierten Reaktion einen Einfluss auf die mBax(Δ TM)-induzierte Freisetzung des endogenen Cytochrom c haben. Das Experiment wurde wie oben beschrieben, jedoch in der Anwesenheit von Hexokinase-Substraten (ATP und Glucose) oder dem Produkt der enzymkatalysierten Reaktion (Glucose-6-Phosphat), durchgeführt. In der Anwesenheit von ATP und Glucose wurde das endogene Cytochrom c durch mBax(Δ TM) nicht aus den Hexokinase-Porin-ANT-Komplexen freigesetzt (Abbildung 24 A). Im Gegensatz dazu wurde in der Anwesenheit von Glucose-6-Phosphat das endogene Cytochrom c bereits bei geringeren Konzentrationen von mBax(Δ TM) aus den Komplexen freigesetzt. Dieser Zusammenhang spiegelte sich in einem Wechsel von einem sigmoiden in einen hyperbolischen Kurvenverlauf wieder (Abbildung 24 B).

In diesem Abschnitt wurde gezeigt, dass Hexokinase-Porin-ANT-Komplexe isoliert werden können, die eine signifikante endogene Menge an Cytochrom c enthalten. Dieser spezielle Pool wird *in vitro* aus in Liposomen rekonstituierten Komplexen durch mBax(Δ TM) dosisabhängig freigesetzt, wenn die Komplexe assoziiert sind. Die Aktivität und damit die Bindung der Hexokinase an die rekonstituierten Porin-ANT-Komplexe beeinflusst direkt die Bax-induzierte Freisetzung des endogenen Cytochrom c Pools.

Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Bax induzierte Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum von isolierten Mitochondrien analysiert. Dabei wurden drei Domänen des Proteins im Hinblick auf ihre Notwendigkeit für die Funktionalität von Bax charakterisiert. Weiterhin wurde durch Untersuchung der Physiologie von Mitochondrien der Mechanismus der Bax-induzierten Freisetzung von Cytochrom c untersucht. Außerdem wurde mit Hilfe eines rekonstituierten Proteinkomplexes die Bax-induzierte Freisetzung eines in Hexokinase-Porin-ANT-Komplexen organisierten Pools von Cytochrom c analysiert.

Struktur-Funktions-Analyse von Bax

Die meisten Mitglieder der Bcl-2 Familie besitzen eine hydrophobe C-terminale Region, die bei der Interaktion der Proteine mit zellulären Membranen von Bedeutung ist (Kroemer, G. 1997). Die Freisetzung von Cytochrom c aus isolierten Mitochondrien kann jedoch auch durch Bax ohne Transmembrandomäne (TM) induziert werden (Eskes, R. *et al.* 1998; Jürgensmeier, J.M. *et al.* 1998). Bei einem Vergleich der durch die Proteine mBax und mBax(Δ TM) induzierten Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien im Rahmen dieser Arbeit konnte kein Unterschied im Bezug auf die Aktivität festgestellt werden. Die Transmembrandomäne (TM) ist somit für die Freisetzung von Cytochrom c *in vitro* nicht essentiell. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten experimentellen System wird die Interaktion von Bax mit der mitochondrialen Membran durch die hohe Konzentration von aktiviertem Bax verstärkt. Es wurde nur die Cytochrom c Freisetzung untersucht, und nicht das „Targeting“ des Bax Proteins an die Oberfläche der Mitochondrien, bei dem die Transmembrandomäne von Bedeutung sein könnte (Goping, I.S. *et al.* 1998; Montessuit, S. *et al.* 1999). Expression von Bax(Δ TM) in Fibroblasten und Epithelzellen führt zur Induktion von Apoptose, wobei postuliert worden ist, dass dieser pro-apoptotische Effekt durch die Anwesenheit von endogenem Bax vermittelt worden sei (Zha, H. *et al.* 1996). Bei Transfektion von HL-60 Zellen mit Bax bzw. Bax(Δ TM) wurde kein Unterschied bezüglich der Sensitivität nach Induktion von Apoptose festgestellt (Tremblais, K. *et al.* 1999). Außerdem ist bei Verwendung von isolierten Mitochondrien die Bindung von Bax(Δ TM) im Vergleich zu Bax nur marginal verringert gewesen (Tremblais, K. *et al.* 1999). In Einklang mit den beschriebenen Ergebnissen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine vergleichbare

Cytochrom c Freisetzung durch mBax bzw. mBax(Δ TM) induziert. Außerdem kann aufgrund der Abwesenheit von endogenem Bax in isolierten Mitochondrien diese Freisetzung von Cytochrom c durch mBax(Δ TM) nicht durch Interaktion mit endogenem Bax vermittelt worden sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass das mBax(Δ TM) Protein in mitochondriale Membranen inserieren kann. Die Transmembrandomäne ist damit nicht die Domäne des Bax Proteins, welche die Insertion in die mitochondrialen Membranen vermittelt.

Die Transmembrandomäne kann für eine Regulation von Bax bzw. dessen pro-apoptotischer Wirkung von Bedeutung sein. Die 20 hydrophoben C-terminalen Aminosäuren von Bax, die die Transmembrandomäne bilden sind zu einem großen Teil in α -Helix 9 organisiert. Diese Helix ist bei monomerem Bax in einer hydrophoben Tasche eingebettet, aus der sie nach der konformationellen Änderung von Bax freigesetzt wird (Suzuki, M. *et al.* 2000). Die α -Helix 9 könnte die hydrophobe Tasche von Bax, die für die Interaktion der Proteine der Bcl-2 Familie untereinander wichtig ist, blockieren. Die Freisetzung aus dieser Tasche während der konformationellen Änderung könnte durch andere Proteine oder Faktoren induziert und dadurch die Wirkung von Bax reguliert werden.

Die amphipathische α -Helix 2, welche die BH3-Domäne von Bax enthält, ist in die Homo- und Heterodimerisierung involviert und ist für die Apoptose-induzierende Wirkung von Bax essentiell (Hunter, J.J. and Parslow, T.G. 1996; Zha, H. *et al.* 1996; Simonen, M. *et al.* 1997; Adams, J.M. and Cory, S. 1998; Kelekar, A. and Thompson, C.B. 1998; Suzuki, M. *et al.* 2000). In Hefen verhindert die Deletion des konservierten Tetrapeptids IGDE im Zentrum der BH3-Domäne von Bax die Fähigkeit zu dimerisieren und verhindert den letalen Effekt von Bax. In Fibroblasten und Epithelzellen induziert die Expression von Bax(Δ IGDE) im Gegensatz zu Bax keine Apoptose und eine Assoziation mit endogenem Bax kann nicht detektiert werden (Zha, H. *et al.* 1996). Daraus wurde geschlossen, dass das IGDE-Motiv für die Funktion der für die pro-apoptotische Wirkung von Bax essentiellen BH3-Domäne notwendig ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein rekombinantes Deletionsprotein von Bax mit einem fehlenden IGDE-Motiv in der BH3-Domäne immer noch in der Lage ist, in die mitochondrialen Membranen zu inserieren und Cytochrom c freizusetzen. Das bedeutet, dass eine funktionale BH3-Domäne für die eigentliche Freisetzung von Cytochrom c nicht ausreichend ist. Die Anwesenheit reinigungsbedingter Spuren von dimerisiertem mBax(Δ IGDE; Δ TM) kann allein die deutliche Aktivität dieses Deletionsproteins nicht erklären. Umgekehrt sind die Bax-Dimere ein Hinweis auf eine

mögliche Oligomerisierung unabhängig von einer funktionalen BH3-Domäne. Bax, welches aufgrund der Deletion der α -Helices 5/6 nicht in die Membranen inserieren kann, partizipiert jedoch an der Freisetzung von Cytochrom c, wenn eine Interaktion über eine intakte BH3-Domäne mit einem weiteren funktionalen Bax Protein möglich ist. Daraus lässt sich schließen, dass die fehlende pro-apoptotische Wirkung von Bax(Δ IGDE) in Hefen bzw. Säugerzellen nicht in einer verhinderten Cytochrom c Freisetzung, sondern in einer verminderten Interaktion über die BH3-Domäne begründet liegen müsste. Es könnte sich dabei um eine verhinderte Dimerisierung mit anti-apoptotischen Proteinen handeln, da das IGDE-Motiv für die Dimerisierung von Bax wichtig ist (Zha, H. *et al.* 1996). Bei einer weitreichenden Mutagenese der BH3-Domäne ist ebenfalls gezeigt worden, dass ein zur Hetero- und Dimerisierung unfähiges mutiertes Bax Protein dennoch pro-apoptotisch wirken kann (Wang, K. *et al.* 1998). Das bedeutet, dass die sogenannte „Killing-Funktion“ von Bax zum einen indirekt durch Heterodimerisierung über die BH3-Domäne mit den anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie, und damit Inaktivierung derselben, vermittelt wird. Zum anderen kann Bax unabhängig von einer Hetero- und Dimerisierung Cytochrom c freisetzen und dadurch pro-apoptotisch wirken. Die BH3-Domäne von Bax könnte somit „upstream“ der Freisetzung von Cytochrom c bei der Regulation der Interaktion von Bax mit anderen Proteinen der Bcl-2 Familie von Bedeutung sein.

Die Mitglieder der Bcl-2 Familie könnten durch Aggregation bzw. Oligomerisierung Poren bilden, die die Translokation von Cytochrom c erlauben. Dieser Hypothese liegt die ähnliche Struktur der Proteine der Bcl-2 Familie mit bakteriellen porenformenden Toxinen, wie den Colicinen, zugrunde (Muchmore, S.W. *et al.* 1996; Schendel, S.L. *et al.* 1998). Bcl-2, dem die α -Helices 5/6 deletiert worden sind, kann in artifiziellen Membranen keine Ionenkanäle bilden (Schendel, S.L. *et al.* 1997). Daher ist postuliert worden, dass die zentralen α -Helices 5/6 für die Membraninsertion wichtig sind (Aritomi, M. *et al.* 1997; Matsuyama, S. *et al.* 1998). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Bax ohne die zentralen α -Helices 5/6 nicht in der Lage ist, in mitochondriale Membranen zu inserieren. Die verhinderte Insertion korreliert mit einer stark verringerten Freisetzung von Cytochrom c durch Bax. In Einklang mit diesen Ergebnissen zeigt eine Mutagenese-Analyse, die zur Neutralisation von geladenen Aminosäureresten in den α -Helices 5/6 führt, was die Insertion von Bax in mitochondriale Membranen erleichtert, eine erhöhte Toxizität in Hefen und Säugerzellen (Nouraini, S. *et al.* 2000).

Expression von Bax mit einer Deletion der α -Helices 5/6 in 293T-Zellen reduziert den pro-apoptotischen Effekt nur marginal (Matsuyama, S. *et al.* 1998). Es ist daraus geschlossen worden, dass diese Helices für die pro-apoptotische Funktion von Bax in Säugerzellen nicht essentiell sind. Im Hinblick auf die aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Interaktion der Bax Proteine miteinander, liegt es nahe, eine Interaktion über die BH3-Domäne mit endogenem Bax der Säugerzellen für die nur marginal reduzierte Funktionalität des Bax Proteins mit den deletierten α -Helices 5/6 verantwortlich zu machen. Wie man aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse vermuten würde, wurde der zytotoxische Effekt in Hefen, die keine Proteine der Bcl-2 Familie besitzen, bei Deletion der α -Helices 5/6 unterbunden (Matsuyama, S. *et al.* 1998).

Bedeutung der Cytochrom c Mobilität für die Freisetzung

In vitro korreliert das Ausmaß der Freisetzung von Cytochrom c aus isolierten Mitochondrien durch Stimulation der PTP mit Ca^{2+} -Ionen mit einer erhöhten Ionenstärke (Gogvadze, V. *et al.* 2001). Dies ist mit einer verstärkten Mobilität des positiv geladenen Cytochrom c, welches elektrostatisch mit Cardiolipin in den Mitochondrienmembranen interagiert, begründet worden (Cortese, J.D. *et al.* 1998). Schlüsselenzyme der apoptotischen Signalkaskade und Nukleasen konnten unter physiologischer, hoher Ionenstärke nicht aktiviert werden (Bortner, C.D. *et al.* 1997; Hughes, F.M., Jr. *et al.* 1997; Dallaporta, B. *et al.* 1998). Eine intrazelluläre hohe Ionenstärke kann somit Apoptose inhibieren. Daher werden Kalium-Transporter in der Zellmembran aktiviert, um die Kaliumkonzentration in der Zelle zu verringern. Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigte Freisetzung von Cytochrom c gelang in Puffern, die eine dem Zytosol vergleichbare Osmolarität, aber eine deutlich reduzierte Ionenstärke aufwiesen. Die entsprechende Osmolarität wurde durch Verwendung von Mannitol und Sucrose anstelle von KCl in den Puffern erreicht. Diese Bedingungen spiegeln damit unter Umständen die physiologischen Bedingungen während der Apoptose genauer wieder. In dieser Arbeit war die Freisetzung von Cytochrom c durch mBax bzw. mBax(Δ TM) auf ungefähr 20 % des Gesamtgehalts limitiert. Diese Tatsache könnte mit einer eingeschränkten Mobilität des Cytochrom c in den auf Sucrose und Mannitol basierenden Puffern mit geringer Ionenstärke erklärt werden.

Mechanismen der Cytochrom c Freisetzung

Für die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien durch Bax sind verschiedene Mechanismen postuliert worden (vgl. auch Abbildung 5). Die Freisetzung könnte indirekt durch das Reißen der äußeren Membran oder durch eine Pore in einer sonst intakten äußeren Membran geschehen.

Eine mögliche Hypothese für die Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren aus dem Intermembranraum von Mitochondrien ist die Modulation der PTP durch Bax (Kroemer, G. *et al.* 1998; Crompton, M. 1999). Gegen diesen Mechanismus sprechen jedoch zahlreiche publizierte Experimente. *In vivo* konnte aus den Mitochondrien von Neuronen nach Entzug von Wachstumsfaktoren Cytochrom c freigesetzt werden. Die Mitochondrien in diesen Zellen wirken im Gegensatz zu nicht apoptotischen Zellen eher kleiner und sind nicht angeschwollen. In der Anwesenheit von Caspase-Inhibitoren konnten die Mitochondrien der Neurone ihre ursprüngliche Größe und ihren normalen Gehalt an Cytochrom c wieder erlangen (Martinou, I. *et al.* 1999). Bei der Inkubation von isolierten Mitochondrien mit rekombinantem Bax konnte eine Freisetzung von Cytochrom c ohne ein Schwellen der Mitochondrien beobachtet werden (Jürgensmeier, J.M. *et al.* 1998; Finucane, D.M. *et al.* 1999). Bei der Analyse von Mitochondrien im Rahmen dieser Arbeit bei Behandlung mit rekombinantem Bax Protein in einer Konzentration, die ausreichend für eine Freisetzung von Cytochrom c war, konnte ebenfalls kein Schwellen beobachtet werden. Es ist postuliert worden, dass rekombinantes Bax in geringer Konzentration (125 nM) Cytochrom c ohne ein Schwellen der Mitochondrien freisetzt, aber bei höherer Konzentration (250-1000 nM) eine Öffnung der PTP induziert (Pastorino, J.G. *et al.* 1999). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Konzentration von Bax befand sich im Konzentrationsbereich, der PTP-abhängig hätte sein sollen, induzierte jedoch keine PTP. Weiterhin waren bei den für die Cytochrom c Freisetzung verwendeten Puffern Mg^{2+} -Ionen, einem PTP-Inhibitor, anwesend. Die Freisetzung von Cytochrom c durch Bax wurde dadurch jedoch nicht beeinflusst, was eine Modulation der PTP durch Bax ausschließt. Dieses Ergebnis ist in Einklang mit Experimenten, bei denen die Aktivität von Bax, Cytochrom c freizusetzen, durch Mg^{2+} -Ionen sogar erhöht worden ist (Eskes, R. *et al.* 1998).

Die Notwendigkeit einer MPT für die Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren aus Mitochondrien erscheint besonders *in vivo* immer unwahrscheinlicher (Lim, M.L. *et al.* 2002). Die Rolle der PTP bei der *in vitro* Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren ist weniger klar, aber in dieser Arbeit und anderen Publikationen konnte eine PTP-unabhängige

Freisetzung beobachtet werden (Eskes, R. *et al.* 1998; Jürgensmeier, J.M. *et al.* 1998; Doran, E. and Halestrap, A.P. 2000; Robertson, J.D. *et al.* 2000).

Eine weitere Hypothese für die Freisetzung von pro-apoptischen Faktoren durch ein Reißen der äußeren Membran basiert auf einer Hyperpolarisation als Folge des Verschlusses des VDAC (Vander Heiden, M.G. *et al.* 1999). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde durch Analyse des mitochondrialen Membranpotentials eine Hyperpolarisation als eine mögliche Ursache für ein Schwellen der Mitochondrien ausgeschlossen. In dem in dieser Arbeit verwendeten Modellsystem können somit alle Mechanismen, die zu einem Reißen der äußeren Membran führen, ausgeschlossen werden.

Eine Hypothese für die Freisetzung von Cytochrom c durch eine ansonsten intakte äußere Membran ist eine Bax-induzierte Lipidpore. Diesem Mechanismus liegt der destabilisierende Einfluss von Bax bzw. Bid auf Membranen zugrunde (Basanez, G. *et al.* 1999; Kudla, G. *et al.* 2000). Da Bax in jeder Membran eine Lipidpore induzieren sollte, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Freisetzung von Hämoglobin durch Bax untersucht. In einer Konzentration, die ausreichend für die Freisetzung von Cytochrom c ist, konnte keine Freisetzung von Hämoglobin durch Bax beobachtet werden. Das bedeutet, dass Bax mit den Membranen von Mitochondrien bzw. Erythrozyten unterschiedlich interagiert. Eine Bax-induzierte Lipidpore ist daher unwahrscheinlich.

Eine Freisetzung von Hämoglobin aus Erythrozyten durch Bax ist bereits gezeigt worden (Antonsson, B. *et al.* 1997; Shimizu, S. *et al.* 2001). Die in diesen Publikationen verwendete Konzentration von Bax ist im Vergleich zu der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentration (1000 nM) zehnfach höher gewesen, und ist somit nicht direkt vergleichbar. Die Bax induzierte Hämolyse ist als Hinweis gesehen worden, dass Bax Poren in Membranen vergleichbar dem Hämolysin formen kann. Im Gegensatz zu Hämolysin, welches allein Poren formen kann, ist für die Bax-induzierte Permeabilität jedoch eine Interaktion mit VDAC auf der Oberfläche der Erythrozyten notwendig (Shimizu, S. *et al.* 2001). Der VDAC scheint bezüglich der Bindung von Bax an Mitochondrien eine Rolle zu spielen (Pastorino, J.G. *et al.* 2002; Tsujimoto, Y. and Shimizu, S. 2002; Vyssokikh, M.Y. *et al.* 2002). Die zu Bax homologen bakteriellen Toxine scheinen ebenfalls über Porine mit ihren Zielzellen zu interagieren (Dover, L.G. *et al.* 2000). Ob jedoch Bax den VDAC direkt moduliert und eine VDAC-Bax-Pore, durch die Cytochrom c freigesetzt wird, entsteht, bleibt fraglich. Der VDAC könnte für Bax nach der Aktivierung im Zytosol eine Bindestelle darstellen, welche unter Umständen in Zusammenhang mit dem mitochondrialen „Targeting“ von Bax steht. Bei der möglichen Interaktion von Bax mit dem VDAC könnte die Transmembrandomäne einen

regulatorischen Effekt ausüben. Eine Regulation und Interaktion des VDAC durch die anti-apoptotischen Vertretern der Bcl-2 Familie wurde bereits postuliert (Tsujiimoto, Y. and Shimizu, S. 2000). Die pro- und anti-apoptotischen Vertreter der Bcl-2 Familie könnten am VDAC aufeinander treffen und durch Hetero- und Homo-Dimerisierung über die BH3-Domäne das Schicksal der Zelle regulieren. Ist aktiviertes Bax einmal an die äußere mitochondriale Membran gebunden, könnte das Protein dann nach Oligomerisierung und Insertion über die α -Helices 5/6 eine eigenständige Bax-Pore ausbilden, durch die Cytochrom c freigesetzt wird.

Bedeutung der Bindung der Hexokinase an Porin-ANT-Komplexe

Bekannt ist eine Verteilung von Cytochrom c in den verschiedenen Subkompartimenten des Intermembranraums (Bernardi, P. *et al.* 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bei Isolation von Hexokinase-Porin-ANT-Komplexen eine signifikante Menge an endogenem Cytochrom c mitgereinigt werden konnte. Dieser spezielle Pool von Cytochrom c war fest an die Komplexe gebunden oder in diesen eingeschlossen, da er während der Reinigung selbst in der Anwesenheit von 200 mM KCl nicht abgelöst wurde. Diese Organisation von Cytochrom c in Hexokinase-Porin-ANT-Komplexen könnte auch in intakten Mitochondrien vorhanden sein. Die Existenz dieses in Porin-ANT-Komplexen organisierten Cytochrom c Pools, könnte in Zusammenhang mit der in dieser Arbeit gefundenen limitierten Freisetzung durch Bax stehen. Die Verteilung von Cytochrom c in Mitochondrien könnte von genereller Bedeutung im Zusammenhang mit der durch die Proteine der Bcl-2 Familie regulierten Cytochrom c Freisetzung sein.

Die gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass Bax und Hexokinase mit hoher Affinität an die gleiche spezifische Porinstruktur in den Porin-ANT-Komplexen binden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Experimenten an isolierten Mitochondrien bei denen Bax Cytochrom c nur in Abwesenheit von Hexokinase freisetzen kann (Pastorino, J.G. *et al.* 2002). Die Abhängigkeit der Bindung von Bax von der Aktivität der Hexokinase deutet auf eine Kopplung von Metabolismus und Bax induzierter Cytochrom c Freisetzung. Dies ist ein Hinweis auf eine Regulation der apoptotischen Signalwege durch den metabolischen Zustand in Zellen. Ein schützender Effekt durch Glucose, der in Zusammenhang mit der Glykolyse steht, ist bei Hypoxie-induzierter Apoptose bereits beobachtet worden (Moley, K.H. and Mueckler, M.M. 2000). Außerdem verringert eine erhöhte Hexokinase-Aktivität bei durch oxidativen

Stress induzierter Apoptose die Zelltodrate, wobei dieser Effekt von der Phosphorylierung von Glucose abhängig ist (Bryson, J.M. *et al.* 2002). Diese Tatsache korreliert mit dem in dieser Arbeit gefundenen Ergebnis, wonach eine substratgesättigte Hexokinase die Bax-induzierte Freisetzung von endogenem Cytochrom c aus Porin-ANT-Komplexen verhindert.

Bax und seine Rolle bei der Apoptose

Wenn auch die fundamentale Bedeutung von Bax charakterisiert worden ist, so sind bezüglich seiner Wirkungsweise bzw. des Mechanismus der Bax-induzierten Freisetzung von proapoptotischen Faktoren viele Dinge weiterhin ungeklärt. Zum Beispiel wird die Bedeutung des „Targeting“ des Bax Proteins an mitochondriale Membranen nicht genau verstanden. Die selektive oder verstärkte Interaktion von Bax mit mitochondrialen Membranen im Vergleich zu anderen zellulären Membranen muss einen oder mehrere Gründe haben. Die biochemische Beschaffenheit der Membran, wie die Lipidzusammensetzung oder die Anwesenheit bestimmter Proteine bzw. Zielstrukturen, könnte für das spezifische „Targeting“ verantwortlich sein. Die Wichtigkeit von Cardiolipin für den Effekt von Bax oder die Interaktion von Bax mit dem VDAC sind bereits postuliert worden (Kuwana, T. *et al.* 2002; Tsujimoto, Y. and Shimizu, S. 2002). Eine gemeinsame Bindungsstelle von Bax bzw. Hexokinase an VDAC und eine damit verbundene mögliche metabolische Regulation von Apoptose könnte ebenfalls eine Rolle spielen (Pastorino, J.G. *et al.* 2002; Vyssokikh, M.Y. *et al.* 2002). Interessanterweise können Staurosporin-resistente Jurkat-T-Zellen selektiert werden, aus deren Mitochondrien nach Isolation bei Zugabe von rekombinantem Bax oder Bid kein Cytochrom c freigesetzt werden kann (Wang, G.Q. *et al.* 2001). In den Mitochondrien dieser Staurosporin-resistenten Zellen konnten andere mitochondriale Veränderungen wie eine PTP, Verlust von Cardiolipin oder Generierung von reaktiven Sauerstoffmolekülen nicht nachgewiesen werden (Wang, G.Q. *et al.* 2001). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Mitochondrien in diesen Zellen eine biochemische Modifikation, die sie für Bax unangreifbar macht, vollzogen haben. Diese Veränderung ihrer Mitochondrienstruktur könnte die Zellen resistent gegen Chemotherapeutika machen, die zur Aktivierung von Bax und in nicht resistenten Zellen somit zu Apoptose führen. Das genaue Verständnis der Interaktion von Bax mit der Oberfläche von Mitochondrien ist damit überaus bedeutsam.

Die dreidimensionale Struktur von Bax weist eine große Ähnlichkeit zu den porenformenden Colicinen A und E1 und zu der Domäne von Diphtherie-Toxin, welche für die Translokation durch Membranen verantwortlich ist, auf (Choe, S. *et al.* 1992; Parker, M.W. *et al.* 1992; Elkins, P. *et al.* 1997). Bei der Struktur-Funktions Analyse von Bax sind bezüglich der Wirkungsweise Ähnlichkeiten zu den homologen bakteriellen Toxinen gefunden worden. So wird die Insertion von Bax in mitochondriale Membranen über die α -Helices 5/6 vermittelt und ist für die Funktion von zentraler Bedeutung. Nach dem Durchtritt durch die äußere Membran greifen die porenformenden Colicine sensitive *E. coli* Zellen durch Bildung von Ionenkanälen in deren innerer Membran an (Schein, S.J. *et al.* 1978). In Analogie kann ein Deletionsprotein von Bcl-2, dem die α -Helices 5/6 deletiert wurden, in Lipid-Doppelschichten keine Ionenkanäle bilden (Schendel, S.L. *et al.* 1997). Bei elektrophysiologischen Messungen an in Liposomen oder planaren Lipid-Doppelschichten rekonstituierten Bax-ANT Kanälen konnte Bax Protein mit einer Deletion der α -Helices 5/6 die Funktion des Kanals nicht modulieren (Marzo, I. *et al.* 1998; Brenner, C. *et al.* 2000). Wenn auch die Bedeutung der Bildung von Ionenkanälen für die Freisetzung von Cytochrom c bzw. die apoptotischen Effekte der Proteine der Bcl-2 Familie grundsätzlich noch ungeklärt sind, so ist die Analogie zu den bakteriellen Toxinen doch markant. Ähnlich dem Bax Protein werden Colicine durch Detergenzien in eine Konformation, welche für die Insertion in Membranen notwendig ist, überführt (Merrill, A.R. and Cramer, W.A. 1990; Dover, L.G. *et al.* 2000). Weiterhin wurde gezeigt, dass Colicin N an trimerisierte bakterielle Porine, die zu mitochondrialem VDAC homolog sind, binden muss, um die äußere Membran der Bakterien zu passieren (Dover, L.G. *et al.* 2000). Wie bereits oben diskutiert scheint der VDAC für die Bindung von Bax an Mitochondrien ebenfalls wichtig zu sein. Analog zu bakteriellen Toxinen, die nach Interaktion mit Porin und Passieren der äußeren Membran Ionenkanäle bilden, könnte Bax nach Interaktion mit VDAC und Oligomerisierung Poren für die Translokation von Cytochrom c bilden.

Colicine werden von *E. coli* produziert, um konkurrierende Bakterien zu zerstören. Im evolutionären Rahmen betrachtet könnten sich die Proteine der Bcl-2 Familie nach der Endosymbiose von Bakterien hin zu Mitochondrien vielleicht aus bereits vorhandenen Abwehrmechanismen entwickelt haben (Ameisen, J.C. 2002). Es wird postuliert, dass α -proteobakterielle Endosymbionten sezernierte und membranständige Proteasen benutzt haben könnten, um ihren Wirt zu töten, wenn dieser z. B. Nahrungsmangel ausgesetzt ist. Dadurch wären die Endosymbionten in der Lage gewesen den Wirt zu verlassen und einen neuen Wirt aufzusuchen. Diese „Waffe“ hätte im Laufe der Evolution durch den Wirt selber unter

Einbezug strikter Kontrollmechanismen zur Entwicklung des programmierten Zelltods verwendet werden können (Frade, J.M. and Michaelidis, T.M. 1997; Ameisen, J.C. 2002; Koonin, E.V. and Aravind, L. 2002).

Literatur

Adams, J.M. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." Science **281**(5381): 1322-6.

Akerman, K.E. (1979). "Qualitative measurements of the mitochondrial membrane potential in situ in Ehrlich ascites tumour cells using the safranin method." Biochim Biophys Acta **546**(2): 341-7.

Alnemri, E.S. (1997). "Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases." J Cell Biochem **64**(1): 33-42.

Alnemri, E.S., D.J. Livingston, D.W. Nicholson, G. Salvesen, N.A. Thornberry, W.W. Wong and J. Yuan (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." Cell **87**(2): 171.

Ameisen, J.C. (2002). "On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years." Cell Death Differ **9**(4): 367-93.

Antonsson, B. (2001). "Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion." Cell Tissue Res **306**(3): 347-61.

Antonsson, B., F. Conti, A. Ciavatta, S. Montessuit, S. Lewis, I. Martinou, L. Bernasconi, A. Bernard, J.J. Mermoud, G. Mazzei, K. Maundrell, F. Gambale, R. Sadoul and J.C. Martinou (1997). "Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2." Science **277**(5324): 370-2.

Antonsson, B. and J.C. Martinou (2000). "The Bcl-2 protein family." Exp Cell Res **256**(1): 50-7.

Antonsson, B., S. Montessuit, S. Lauper, R. Eskes and J.C. Martinou (2000). "Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria." Biochem J **345 Pt 2**: 271-8.

Antonsson, B., S. Montessuit, B. Sanchez and J.C. Martinou (2001). "Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells." J Biol Chem **276**(15): 11615-23.

Appaix, F., M. Minatchy, C. Riva-Lavieille, J. Olivares, B. Antonsson and V.A. Saks (2000). "Rapid spectrophotometric method for quantitation of cytochrome c release from isolated mitochondria or permeabilized cells revisited." Biochim Biophys Acta **1457**(3): 175-81.

Aritomi, M., N. Kunishima, N. Inohara, Y. Ishibashi, S. Ohta and K. Morikawa (1997). "Crystal structure of rat Bcl-xL. Implications for the function of the Bcl-2 protein family." J Biol Chem **272**(44): 27886-92.

Barros, L.F., T. Hermosilla and J. Castro (2001). "Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **130**(3): 401-9.

Basanez, G., A. Nechushtan, O. Drozhinin, A. Chanturiya, E. Choe, S. Tutt, K.A. Wood, Y. Hsu, J. Zimmerberg and R.J. Youle (1999). "Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5492-7.

Bergmeyer, H.U., J. Bergmeyer and M. Grassl (1970). Methods of enzymatic analysis. Weinheim; Deerfield Beach; Fla., Verlag Chemie.

Bernardi, P. (1992). "Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization." J Biol Chem **267**(13): 8834-9.

Bernardi, P. (1999). "Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition." Physiol Rev **79**(4): 1127-55.

Bernardi, P. and G.F. Azzone (1981). "Cytochrome c as an electron shuttle between the outer and inner mitochondrial membranes." J Biol Chem **256**(14): 7187-92.

Bernardi, P., L. Scorrano, R. Colonna, V. Petronilli and F. Di Lisa (1999). "Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues." Eur J Biochem **264**(3): 687-701.

Bernardo, K., N. Pakulat, M. Macht, O. Krut, H. Seifert, S. Flier, F. Hüniger and M. Krönke (2002). "Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry." Proteomics **2**(6): 747-53.

Beutner, G., A. Ruck, B. Riede, W. Welte and D. Brdiczka (1996). "Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore." FEBS Lett **396**(2-3): 189-95.

Bortner, C.D., F.M. Hughes, Jr. and J.A. Cidlowski (1997). "A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis." J Biol Chem **272**(51): 32436-42.

Bradford, M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.

Brdiczka, D. (1991). "Contact sites between mitochondrial envelope membranes. Structure and function in energy- and protein-transfer." Biochim Biophys Acta **1071**(3): 291-312.

Brenner, C., H. Cadiou, H.L. Vieira, N. Zamzami, I. Marzo, Z. Xie, B. Leber, D. Andrews, H. Duclohier, J.C. Reed and G. Kroemer (2000). "Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator." Oncogene **19**(3): 329-36.

Bryson, J.M., P.E. Coy, K. Gottlob, N. Hay and R.B. Robey (2002). "Increased hexokinase activity, of either ectopic or endogenous origin, protects renal epithelial cells against acute oxidant-induced cell death." J Biol Chem **277**(13): 11392-400.

Bucheler, K., V. Adams and D. Brdiczka (1991). "Localization of the ATP/ADP translocator in the inner membrane and regulation of contact sites between mitochondrial envelope membranes by ADP. A study on freeze-fractured isolated liver mitochondria." Biochim Biophys Acta **1056**(3): 233-42.

Choe, S., M.J. Bennett, G. Fujii, P.M. Curmi, K.A. Kantardjieff, R.J. Collier and D. Eisenberg (1992). "The crystal structure of diphtheria toxin." Nature **357**(6375): 216-22.

Cortese, J.D., A.L. Voglino and C.R. Hackenbrock (1998). "Multiple conformations of physiological membrane-bound cytochrome c." Biochemistry **37**(18): 6402-9.

Cory, S. and J.M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." Nat Rev Cancer **2**(9): 647-56.

Crompton, M. (1999). "The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death." Biochem J **341** (Pt 2): 233-49.

Crompton, M., A. Costi and L. Hayat (1987). "Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria." Biochem J **245**(3): 915-8.

Crompton, M., H. Ellinger and A. Costi (1988). "Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress." Biochem J **255**(1): 357-60.

Dallaporta, B., T. Hirsch, S.A. Susin, N. Zamzami, N. Larochette, C. Brenner, I. Marzo and G. Kroemer (1998). "Potassium leakage during the apoptotic degradation phase." J Immunol **160**(11): 5605-15.

Desagher, S., A. Osen-Sand, A. Nichols, R. Eskes, S. Montessuit, S. Lauper, K. Maundrell, B. Antonsson and J.C. Martinou (1999). "Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis." J Cell Biol **144**(5): 891-901.

Doran, E. and A.P. Halestrap (2000). "Cytochrome c release from isolated rat liver mitochondria can occur independently of outer-membrane rupture: possible role of contact sites." Biochem J **348 Pt 2**: 343-50.

Dover, L.G., L.J. Evans, S.L. Fridd, G. Bainbridge, E.M. Raggett and J.H. Lakey (2000). "Colicin pore-forming domains bind to Escherichia coli trimeric porins." Biochemistry **39**(29): 8632-7.

Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li and X. Wang (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." Cell **102**(1): 33-42.

Elkins, P., A. Bunker, W.A. Cramer and C.V. Stauffacher (1997). "A mechanism for toxin insertion into membranes is suggested by the crystal structure of the channel-forming domain of colicin E1." Structure **5**(3): 443-58.

Eskes, R., B. Antonsson, A. Osen-Sand, S. Montessuit, C. Richter, R. Sadoul, G. Mazzei, A. Nichols and J.C. Martinou (1998). "Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions." J Cell Biol **143**(1): 217-24.

Eskes, R., S. Desagher, B. Antonsson and J.C. Martinou (2000). "Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane." Mol Cell Biol **20**(3): 929-35.

Finucane, D.M., E. Bossy-Wetzel, N.J. Waterhouse, T.G. Cotter and D.R. Green (1999). "Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL." J Biol Chem **274**(4): 2225-33.

Foyouzi-Youssefi, R., S. Arnaudeau, C. Borner, W.L. Kelley, J. Tschopp, D.P. Lew, N. Demarex and K.H. Krause (2000). "Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 5723-8.

Frade, J.M. and T.M. Michaelidis (1997). "Origin of eukaryotic programmed cell death: a consequence of aerobic metabolism?" Bioessays **19**(9): 827-32.

Gao, G. and Q.P. Dou (2000). "N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death." J Cell Biochem **80**(1): 53-72.

Gogvadze, V., J.D. Robertson, B. Zhivotovsky and S. Orrenius (2001). "Cytochrome c release occurs via Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent mechanisms that are regulated by Bax." J Biol Chem **276**(22): 19066-71.

Goping, I.S., A. Gross, J.N. Lavoie, M. Nguyen, R. Jemmerson, K. Roth, S.J. Korsmeyer and G.C. Shore (1998). "Regulated targeting of BAX to mitochondria." J Cell Biol **143**(1): 207-15.

Green, D.R. and J.C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." Science **281**(5381): 1309-12.

Gross, A., J. Jockel, M.C. Wei and S.J. Korsmeyer (1998). "Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis." Embo J **17**(14): 3878-85.

Gross, A., J.M. McDonnell and S.J. Korsmeyer (1999). "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." Genes Dev **13**(15): 1899-911.

Hacki, J., L. Egger, L. Monney, S. Conus, T. Rosse, I. Fellay and C. Borner (2000). "Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2." Oncogene **19**(19): 2286-95.

Halestrap, A.P. and A.M. Davidson (1990). "Inhibition of Ca²⁺-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase." Biochem J **268**(1): 153-60.

Haworth, R.A. and D.R. Hunter (1979). "The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site." Arch Biochem Biophys **195**(2): 460-7.

Hengartner, M.O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." Nature **407**(6805): 770-6.

Hirotsani, M., Y. Zhang, N. Fujita, M. Naito and T. Tsuruo (1999). "NH₂-terminal BH4 domain of Bcl-2 is functional for heterodimerization with Bax and inhibition of apoptosis." J Biol Chem **274**(29): 20415-20.

Hoppe-Seyler, F., H. Thierfelder and K. Lang (1953). Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, für Ärzte, Biologen und Chemiker. Berlin,, Springer-Verlag.

Hsu, Y.T., K.G. Wolter and R.J. Youle (1997). "Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 3668-72.

Hsu, Y.T. and R.J. Youle (1997). "Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family." J Biol Chem **272**(21): 13829-34.

Hsu, Y.T. and R.J. Youle (1998). "Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations." J Biol Chem **273**(17): 10777-83.

Hughes, F.M., Jr., C.D. Bortner, G.D. Purdy and J.A. Cidlowski (1997). "Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes." J Biol Chem **272**(48): 30567-76.

Hunter, D.R. and R.A. Haworth (1979). "The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms." Arch Biochem Biophys **195**(2): 453-9.

Hunter, D.R. and R.A. Haworth (1979). "The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca²⁺ release." Arch Biochem Biophys **195**(2): 468-77.

Hunter, J.J. and T.G. Parslow (1996). "A peptide sequence from Bax that converts Bcl-2 into an activator of apoptosis." J Biol Chem **271**(15): 8521-4.

Jürgensmeier, J.M., Z. Xie, Q. Deveraux, L. Ellerby, D. Bredesen and J.C. Reed (1998). "Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 4997-5002.

Kelekar, A. and C.B. Thompson (1998). "Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis." Trends Cell Biol **8**(8): 324-30.

Kerr, J.F., A.H. Wyllie and A.R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-57.

Kischkel, F.C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P.H. Kramer and M.E. Peter (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." Embo J **14**(22): 5579-88.

Kluck, R.M., E. Bossy-Wetzel, D.R. Green and D.D. Newmeyer (1997). "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." Science **275**(5303): 1132-6.

Koonin, E.V. and L. Aravind (2002). "Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection." Cell Death Differ **9**(4): 394-404.

Krajewski, S., S. Tanaka, S. Takayama, M.J. Schibler, W. Fenton and J.C. Reed (1993). "Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes." Cancer Res **53**(19): 4701-14.

Kramer, P.H. (2000). "Apoptose" Deutsches Ärzteblatt **97**(25): A-1752-1759

Kroemer, G. (1997). "The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis." Nat Med **3**(6): 614-20.

Kroemer, G., B. Dallaporta and M. Resche-Rigon (1998). "The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis." Annu Rev Physiol **60**: 619-42.

Kudla, G., S. Montessuit, R. Eskes, C. Berrier, J.C. Martinou, A. Ghazi and B. Antonsson (2000). "The destabilization of lipid membranes induced by the C-terminal fragment of caspase 8-cleaved bid is inhibited by the N-terminal fragment." J Biol Chem **275**(30): 22713-8.

Kuwana, T., M.R. Mackey, G. Perkins, M.H. Ellisman, M. Latterich, R. Schneider, D.R. Green and D.D. Newmeyer (2002). "Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane." Cell **111**(3): 331-42.

Lim, M.L., M.G. Lum, T.M. Hansen, X. Roucou and P. Nagley (2002). "On the release of cytochrome c from mitochondria during cell death signaling." J Biomed Sci **9**(6 Pt 1): 488-506.

Lindsten, T., A.J. Ross, A. King, W.X. Zong, J.C. Rathmell, H.A. Shiels, E. Ulrich, K.G. Waymire, P. Mahar, K. Frauwirth, Y. Chen, M. Wei, V.M. Eng, D.M. Adelman, M.C. Simon, A. Ma, J.A. Golden, G. Evan, S.J. Korsmeyer, G.R. MacGregor and C.B. Thompson (2000). "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues." Mol Cell **6**(6): 1389-99.

Lorenzo, H.K., S.A. Susin, J. Penninger and G. Kroemer (1999). "Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death." Cell Death Differ **6**(6): 516-24.

Mahajan, N.P., K. Linder, G. Berry, G.W. Gordon, R. Heim and B. Herman (1998). "Bcl-2 and Bax interactions in mitochondria probed with green fluorescent protein and fluorescence resonance energy transfer." Nat Biotechnol **16**(6): 547-52.

Mannella, C.A., M. Marko, P. Penczek, D. Barnard and J. Frank (1994). "The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope." Microsc Res Tech **27**(4): 278-83.

Martinou, I., S. Desagher, R. Eskes, B. Antonsson, E. Andre, S. Fakan and J.C. Martinou (1999). "The release of cytochrome c from mitochondria during apoptosis of NGF-deprived sympathetic neurons is a reversible event." J Cell Biol **144**(5): 883-9.

Martinou, J.C. (1999). "Apoptosis. Key to the mitochondrial gate." Nature **399**(6735): 411-2.

Marzo, I., C. Brenner, N. Zamzami, J.M. Jürgensmeier, S.A. Susin, H.L. Vieira, M.C. Prevost, Z. Xie, S. Matsuyama, J.C. Reed and G. Kroemer (1998). "Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis." Science **281**(5385): 2027-31.

Matsuyama, S., S.L. Schendel, Z. Xie and J.C. Reed (1998). "Cytoprotection by Bcl-2 requires the pore-forming alpha5 and alpha6 helices." J Biol Chem **273**(47): 30995-1001.

McEnery, M.W. (1992). "The mitochondrial benzodiazepine receptor: evidence for association with the voltage-dependent anion channel (VDAC)." J Bioenerg Biomembr **24**(1): 63-9.

McEnery, M.W., A.M. Snowman, R.R. Trifiletti and S.H. Snyder (1992). "Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(8): 3170-4.

Merrill, A.R. and W.A. Cramer (1990). "Identification of a voltage-responsive segment of the potential-gated colicin E1 ion channel." Biochemistry **29**(37): 8529-34.

Mikhailov, V., M. Mikhailova, D.J. Pulkrabek, Z. Dong, M.A. Venkatachalam and P. Saikumar (2001). "Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane." J Biol Chem **276**(21): 18361-74.

Moley, K.H. and M.M. Mueckler (2000). "Glucose transport and apoptosis." Apoptosis **5**(2): 99-105.

Montessuit, S., G. Mazzei, E. Magnenat and B. Antonsson (1999). "Expression and purification of full-length human Bax alpha." Protein Expr Purif **15**(2): 202-6.

Muchmore, S.W., M. Sattler, H. Liang, R.P. Meadows, J.E. Harlan, H.S. Yoon, D. Nettessheim, B.S. Chang, C.B. Thompson, S.L. Wong, S.L. Ng and S.W. Fesik (1996). "X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death." Nature **381**(6580): 335-41.

Murphy, K.M., V. Ranganathan, M.L. Farnsworth, M. Kavallaris and R.B. Lock (2000). "Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells." Cell Death Differ **7**(1): 102-11.

Muzio, M., B.R. Stockwell, H.R. Stennicke, G.S. Salvesen and V.M. Dixit (1998). "An induced proximity model for caspase-8 activation." J Biol Chem **273**(5): 2926-30.

Nechushtan, A., C.L. Smith, Y.T. Hsu and R.J. Youle (1999). "Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death." Embo J **18**(9): 2330-41.

Neuhoff, V., R. Stamm, I. Pardowitz, N. Arold, W. Ehrhardt and D. Taube (1990). "Essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with coomassie brilliant blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution." Electrophoresis **11**(2): 101-17.

Nouraini, S., E. Six, S. Matsuyama, S. Krajewski and J.C. Reed (2000). "The putative pore-forming domain of Bax regulates mitochondrial localization and interaction with Bcl-X(L)." Mol Cell Biol **20**(5): 1604-15.

Oltvai, Z.N., C.L. Milliman and S.J. Korsmeyer (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." Cell **74**(4): 609-19.

Parker, M.W., J.P. Postma, F. Pattus, A.D. Tucker and D. Tsernoglou (1992). "Refined structure of the pore-forming domain of colicin A at 2.4 Å resolution." J Mol Biol **224**(3): 639-57.

Pastorino, J.G., N. Shulga and J.B. Hoek (2002). "Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis." J Biol Chem **277**(9): 7610-8.

Pastorino, J.G., M. Tafani, R.J. Rothman, A. Marcinkeviciute, J.B. Hoek, J.L. Farber and A. Marcineviciute (1999). "Functional consequences of the sustained or transient activation by Bax of the mitochondrial permeability transition pore." J Biol Chem **274**(44): 31734-9.

Pavlov, E.V., M. Priault, D. Pietkiewicz, E.H. Cheng, B. Antonsson, S. Manon, S.J. Korsmeyer, C.A. Mannella and K.W. Kinnally (2001). "A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast." J Cell Biol **155**(5): 725-31.

Perkins, G., C. Renken, M.E. Martone, S.J. Young, M. Ellisman and T. Frey (1997). "Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts." J Struct Biol **119**(3): 260-72.

Rano, T.A., T. Timkey, E.P. Peterson, J. Rotonda, D.W. Nicholson, J.W. Becker, K.T. Chapman and N.A. Thornberry (1997). "A combinatorial approach for determining protease specificities: application to interleukin-1beta converting enzyme (ICE)." Chem Biol **4**(2): 149-55.

Reed, J.C., J.M. Jürgensmeier and S. Matsuyama (1998). "Bcl-2 family proteins and mitochondria." Biochim Biophys Acta **1366**(1-2): 127-37.

Robertson, J.D., V. Gogvadze, B. Zhivotovsky and S. Orrenius (2000). "Distinct pathways for stimulation of cytochrome c release by etoposide." J Biol Chem **275**(42): 32438-43.

Roucou, X. and J.C. Martinou (2001). "Conformational change of Bax: a question of life or death." Cell Death Differ **8**(9): 875-7.

Saito, M., S.J. Korsmeyer and P.H. Schlesinger (2000). "BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes." Nat Cell Biol **2**(8): 553-5.

Sattler, M., H. Liang, D. Nettlesheim, R.P. Meadows, J.E. Harlan, M. Eberstadt, H.S. Yoon, S.B. Shuker, B.S. Chang, A.J. Minn, C.B. Thompson and S.W. Fesik (1997). "Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis." Science **275**(5302): 983-6.

Schägger, H. and G. von Jagow (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal Biochem **166**(2): 368-79.

Schein, S.J., B.L. Kagan and A. Finkelstein (1978). "Colicin K acts by forming voltage-dependent channels in phospholipid bilayer membranes." Nature **276**(5684): 159-63.

Schendel, S.L., M. Montal and J.C. Reed (1998). "Bcl-2 family proteins as ion-channels." Cell Death Differ **5**(5): 372-80.

Schendel, S.L., Z. Xie, M.O. Montal, S. Matsuyama, M. Montal and J.C. Reed (1997). "Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5113-8.

Schlesinger, P.H., A. Gross, X.M. Yin, K. Yamamoto, M. Saito, G. Waksman and S.J. Korsmeyer (1997). "Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11357-62.

Shimizu, S., Y. Eguchi, W. Kamiike, Y. Funahashi, A. Mignon, V. Lacronique, H. Matsuda and Y. Tsujimoto (1998). "Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(4): 1455-9.

Shimizu, S., Y. Matsuoka, Y. Shinohara, Y. Yoneda and Y. Tsujimoto (2001). "Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells." J Cell Biol **152**(2): 237-50.

Shimizu, S., M. Narita and Y. Tsujimoto (1999). "Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC." Nature **399**(6735): 483-7.

Simonen, M., H. Keller and J. Heim (1997). "The BH3 domain of Bax is sufficient for interaction of Bax with itself and with other family members and it is required for induction of apoptosis." Eur J Biochem **249**(1): 85-91.

Susin, S.A., H.K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B.E. Snow, G.M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D.R. Goodlett, R. Aebersold, D.P. Siderovski, J.M. Penninger and G. Kroemer (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." Nature **397**(6718): 441-6.

Suzuki, M., R.J. Youle and N. Tjandra (2000). "Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization." Cell **103**(4): 645-54.

Thornberry, N.A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." Science **281**(5381): 1312-6.

Tremblais, K., L. Oliver, P. Juin, T.M. Le Cabellec, K. Meflah and F.M. Vallette (1999). "The C-terminus of bax is not a membrane addressing/anchoring signal." Biochem Biophys Res Commun **260**(3): 582-91.

Tsujimoto, Y., J. Cossman, E. Jaffe and C.M. Croce (1985). "Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma." Science **228**(4706): 1440-3.

Tsujimoto, Y. and S. Shimizu (2000). "VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins." Cell Death Differ **7**(12): 1174-81.

Tsujimoto, Y. and S. Shimizu (2002). "The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis." Biochimie **84**(2-3): 187-93.

Vander Heiden, M.G., N.S. Chandel, P.T. Schumacker and C.B. Thompson (1999). "Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange." Mol Cell **3**(2): 159-67.

Vaux, D.L., S. Cory and J.M. Adams (1988). "Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells." Nature **335**(6189): 440-2.

Verhagen, A.M., P.G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L.M. Connolly, G.E. Reid, R.L. Moritz, R.J. Simpson and D.L. Vaux (2000). "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." Cell **102**(1): 43-53.

Vyssokikh, M.Y., A. Katz, A. Rueck, C. Wuensch, A. Dorner, D.B. Zorov and D. Brdiczka (2001). "Adenine nucleotide translocator isoforms 1 and 2 are differently distributed in the mitochondrial inner membrane and have distinct affinities to cyclophilin D." Biochem J **358**(Pt 2): 349-58.

Vyssokikh, M.Y., L. Zorova, D. Zorov, G. Heimlich, J.J. Jürgensmeier and D. Brdiczka (2002). "Bax releases cytochrome c preferentially from a complex between porin and adenine nucleotide translocator. Hexokinase activity suppresses this effect." Mol Biol Rep **29**(1-2): 93-6.

Wang, G.Q., B.R. Gastman, E. Wieckowski, L.A. Goldstein, A. Rabinovitz, X.M. Yin and H. Rabinowich (2001). "Apoptosis-resistant mitochondria in T cells selected for resistance to Fas signaling." J Biol Chem **276**(5): 3610-9.

Wang, K., A. Gross, G. Waksman and S.J. Korsmeyer (1998). "Mutagenesis of the BH3 domain of BAX identifies residues critical for dimerization and killing." Mol Cell Biol **18**(10): 6083-9.

Wei, M.C., T. Lindsten, V.K. Mootha, S. Weiler, A. Gross, M. Ashiya, C.B. Thompson and S.J. Korsmeyer (2000). "tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c." Genes Dev **14**(16): 2060-71.

Wei, M.C., W.X. Zong, E.H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A.J. Ross, K.A. Roth, G.R. MacGregor, C.B. Thompson and S.J. Korsmeyer (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." Science **292**(5517): 727-30.

Wicker, U., K. Bucheler, F.N. Gellerich, M. Wagner, M. Kapschke and D. Brdiczka (1993). "Effect of macromolecules on the structure of the mitochondrial inter-membrane space and the regulation of hexokinase." Biochim Biophys Acta **1142**(3): 228-39.

Wolter, K.G., Y.T. Hsu, C.L. Smith, A. Nechushtan, X.G. Xi and R.J. Youle (1997). "Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis." J Cell Biol **139**(5): 1281-92.

Wood, D.E. and E.W. Newcomb (2000). "Cleavage of Bax enhances its cell death function." Exp Cell Res **256**(2): 375-82.

Wyllie, A.H., J.F. Kerr and A.R. Currie (1980). "Cell death: the significance of apoptosis." Int Rev Cytol **68**: 251-306.

Xie, Z., S. Schendel, S. Matsuyama and J.C. Reed (1998). "Acidic pH promotes dimerization of Bcl-2 family proteins." Biochemistry **37**(18): 6410-8.

Yin, X.M., Z.N. Oltvai and S.J. Korsmeyer (1994). "BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax." Nature **369**(6478): 321-3.

Yin, X.M., K. Wang, A. Gross, Y. Zhao, S. Zinkel, B. Klocke, K.A. Roth and S.J. Korsmeyer (1999). "Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis." Nature **400**(6747): 886-91.

Zha, H., C. Aime-Sempe, T. Sato and J.C. Reed (1996). "Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2." J Biol Chem **271**(13): 7440-4.

Zha, H., H.A. Fisk, M.P. Yaffe, N. Mahajan, B. Herman and J.C. Reed (1996). "Structure-function comparisons of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells." Mol Cell Biol **16**(11): 6494-508.

Zha, J., H. Harada, K. Osipov, J. Jockel, G. Waksman and S.J. Korsmeyer (1997). "BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity." J Biol Chem **272**(39): 24101-4.

Anhang

Sequenzen aller Bax Proteine nach Expression und Reinigung:

a) mBax 25,56 kDa

MGGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPSSRSMDGSGEQLGSGGPTSSE
QIMKTGAFLQGFQDRAGRMAGETPELTLEQPPQDASTKKLSECLRRIGDELDSNME
LQRMIADVDTDSPREVFFRVAADMFAADGNFNWGRVVALFYFASKLVLKALCTKV
PELIRTIMGWTLDFLRERLLVWIQDQGGWEGLLSYFGTPTWQTVTIFVAGVLTASL
TIWKKMG

b) mBax(Δ TM) 20,63 kDa

GSPEFMDGSGEQLGSGGPTSSEQIMKTGAFLQGFQDRAGRMAGETPELTLEQPPQD
ASTKKLSECLRRIGDELDSNMELQRMIADVDTDSPREVFFRVAADMFAADGNFNWGR
VVALFYFASKLVLKALCTKVPELIRTIMGWTLDFLRERLLVWIQDQGGWEGLLS
YFGTPTWQHSHHHHH

c) mBax(Δ IGDE; Δ TM) 19,39 kDa

GSPEFMDGSGEQLGSGGPTSSEQIMKTGAFLQGFQDRAGRMAGETPELTLEQPPQD
ASTKKLSECLRRRLDSNMELQRMIADVDTDSPREVFFRVAADMFAADGNFNWGRVVA
LFYFASKLVLKALCTKVPELIRTIMGWTLDFLRERLLVWIQDQGGWEGLLSYFG
TPTWQ

d) mBax(Δ h5/6; Δ TM) 14,11 kDa

GSPEFMDGSGEQLGSGGPTSSEQIMKTGAFLQGFQDRAGRMAGETPELTLEQPPQD
ASTKKLSECLRRIGDELDSNMELQRMIADVDTDSPREVFFRVAADMFAADGNFDQGG
WEGLLSYFGTPTWQ

e) mBax(Δ IGDE; Δ h5/6; Δ TM) 13,70 kDa

GSPEFMDGSGEQLGSGGPTSSEQIMKTGAFLQGFQDRAGRMAGETPELTLEQPPQD
ASTKKLSECLRRRLDSNMELQRMIADVDTDSPREVFFRVAADMFAADGNFDQGGWEG
LSYFGTPTWQ

GSPEF : N-terminaler Rest des GST-Expressionstag
HHHHHH : His₆-Expressionstag
IGDE : konserviertes Tetrapeptid im Zentrum der BH3-Domäne
fett : α -Helices 5/6
unterstrichen: Transmembrandomäne (TM)

N-terminaler Edman-Abbau:

Analyse von (*):

GSPEFMDGSGEQLGSGGPTSSEQIMKTGAFLLQGFIQDRAGRMAGETPELTLEQPPQD
ASTKKLSECLRRIGDELDSNMELQRMADVDTDSPREVFVRVAADMFAADGNFNFN**WGR**
VVALFYFASKLVLKALCTKVPELIRTIMGWTLDFLRERLLVWIQDQGGWEGLLS
YFGTPTWQHSHHHHH

a) GSPE(-)(A?)

b) GSPE(-)AV(-)DG

Analyse von (**):

GSPEFMDGSGEQLGSGGPTSSEQIMKTGAFLLQGF**IQDRAGR**MAGETPELTLEQPPQD
ASTKKLSECLRRIGDELDSNMELQRMADVDTDSPREVFVRVAADMFAADGNFNFN**WGR**
VVALFYFASKLVLKALCTKVPELIRTIMGWTLDFLRERLLVWIQDQGGWEGLLS
YFGTPTWQHSHHHHH

a) Hauptsequenz: TGAFLLQGF

b) Nebensequenz: MA(GRQ)E(TA)PELT

MALDI-TOF/MS Analyse von mBax(Δ TM):

GSPEFMDGSGEQLGSGGPTSSEQIMKTGAFLLQGFIQDRAGRMAGETPELTLEQPPQD
ASTKKLSECLRRIGDELDSNMELQRMIAADVDTDSPREVFFRVAADMFADGNFNWGR
VVALFYFASKLVLKALCTKVPELIRTIMGWTLDFLRERLLVWIQDQGGWEGLLS
YFGTPTWQH HHHHHH

a) Tryptische-Peptide nach MALDI-TOF/MS:

1465,69 m/z (Da) TGAFLQGGFIQDR
1352,58 m/z (Da) TIMGWTLDFLR
1518,70 m/z (Da) IGDELDSNMELQR

b) V8(Glu-C)-Peptide nach LC-MS:

1598,82 m/z (Da) QIMKTGAFLLQ
1808,97 m/z (Da) RLLVWIQDQGGWE

MALDI-TOF/MS Analyse von mBax(Δ IGDE; Δ TM):

GSPEFMDGSGEQLGSGGPTSSEQIMKTGAFLLQGFIQDRAGRMAGETPELTLEQPPQD
ASTKKLSECLRRRLDSNMELQRMIAADVDTDSPREVFFRVAADMFADGNFNWGRVVA
LFYFASKLVLKALCTKVPELIRTIMGWTLDFLRERLLVWIQDQGGWEGLLSYFG
TPTWQ

a) Tryptische-Peptide nach MALDI-TOF/MS:

904,49 m/z (Da) KLSECLR
1143,61 m/z (Da) VVALFYFASK
1218,56 m/z (Da) MIADVDTDSPR
1298,75 m/z (Da) ALCTKVPELIR
1352,58 m/z (Da) TIMGWTLDFLR
1464,69 m/z (Da) TGAFLQGGFIQDR
1669,72 m/z (Da) VAADMFADGNFNWGR
1896,86 m/z (Da) MIADVDTDSPREVFFR
2141,92 m/z (Da) MAGETPELTLEQPPQDASTK

b) V8(Glu-C)-Peptide nach LC-MS:

1598,82 m/z (Da) QIMKTGAFLLQGFIQD
1808,97 m/z (Da) RLLVWIQDQGGWE

Zusammenfassung

Das pro-apoptotische Protein Bax spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation des mitochondrialen Apoptosesignalwegs. Es ist unter anderem maßgeblich an der Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren wie Cytochrom c, AIF und Smac/DIABLO aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytosol beteiligt. Es wurde für die Bax-induzierte Freisetzung von Cytochrom c gezeigt, dass die konformationelle Änderung und Oligomerisierung von Bax, notwendig sind. Der zugrunde liegende Mechanismus der Freisetzung ist jedoch unbekannt. Insbesondere konnten die Domänen von Bax, welche für die Freisetzung von Cytochrom c verantwortlich sind, bislang noch nicht identifiziert werden. Das Ziel dieser Arbeit war es, durch *in vitro* Studien an isolierten Mitochondrien und rekombinanten Bax Proteinen die für die Freisetzung von Cytochrom c essentiellen Domänen des Proteins zu identifizieren und deren Funktion zu charakterisieren. Der Einfluss der hydrophoben C-terminalen Transmembrandomäne (TM), der BH3-Domäne und der zentralen hydrophoben Helices 5/6 von Bax auf die Freisetzung von Cytochrom c standen dabei im Vordergrund der Untersuchungen. Die Experimentalbefunde zeigen, dass die Transmembrandomäne für die Freisetzung von Cytochrom c durch Bax nicht notwendig ist. Durch eine Kombination verschiedener interner Deletionsmutanten von Bax konnte außerdem gezeigt werden, dass die BH3-Domäne allein für die Freisetzung von Cytochrom c nicht ausreichend ist. Vielmehr ist die Insertion des Bax Proteins in die Mitochondrienmembranen über die Helices 5/6 für die Freisetzung von Cytochrom c essentiell. Durch Analyse des mitochondrialen Membranpotentials und der mitochondrialen Permeabilitätstransition konnte gezeigt werden, dass Bax ohne eine Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembran Cytochrom c spezifisch freisetzt. Dafür spricht auch, dass Bax nur ungefähr 20 % des gesamten Cytochrom c Gehalts aus den isolierten Mitochondrien freizusetzen vermag. Schließlich wurde die Fragestellung untersucht, ob die Kompartimentierung von Cytochrom c in den Mitochondrien von Bedeutung ist. Durch Isolation und Rekonstitution von Hexokinase-Porin-ANT-Komplexen konnte gezeigt werden, dass Bax das endogene Cytochrom c aus assoziierten Komplexen in Abhängigkeit von der Substrat- bzw. Produktsättigung der Hexokinase spezifisch freisetzen kann. Diese Beobachtung könnte erklären, warum eine erhöhte Hexokinase-Aktivität die Apoptoserate von Zellen verringern kann. So könnte bei Tumorzellen, bei denen eine verstärkte Glykolyse vorliegt, der mitochondriale Apoptosesignalweg blockiert sein.

Abstract

The removal of unwanted cells by apoptosis is of great importance for tissue homeostasis of many organisms. Major key players of the intrinsic apoptotic pathway are the mitochondria. These organelles contain a variety of pro-apoptotic factors like cytochrome c, Smac/DIABLO or AIF in their intermembrane space. Once released into the cytosol, these factors participate in the activation of various targets and processes, eventually leading to typical morphological changes, which are characteristic for apoptosis. The release of the pro-apoptotic factors is tightly regulated by the Bcl-2 family proteins. One member of the Bcl-2 family, the pro-apoptotic protein Bax, induces the release of cytochrome c and other pro-apoptotic factors. Although a conformational change, oligomerization and insertion into the mitochondrial membranes of Bax have been found to be prerequisites for the induction of cytochrome c release, the essential domains for this process are still elusive. Furthermore, the necessity of a rupture of the outer mitochondrial membrane with regard to the cytochrome c release remains controversial.

In the present thesis, a structure function analysis of the pro-apoptotic Bax protein was performed to characterize important protein domains involved in the *in vitro* translocation of cytochrome c.

The data obtained show that the transmembrane domain (TM) is not required for the Bax-induced release of cytochrome c. Furthermore, Bax(-TM) was found associated with the mitochondrial membranes indicating that the insertion process is mediated by a distinct Bax domain. The integrity of the BH3 domain of Bax was destroyed by deleting a conserved four amino acid motif, IGDE. The corresponding Bax(-IGDE) mutant induced the release of cytochrome c and it was found associated with mitochondrial membranes. Therefore, it was concluded that a functional BH3 domain of Bax is not absolutely required for the induction of cytochrome c release from mitochondria. The deletion of helices -5 and -6 of Bax resulted in a significantly decreased cytochrome c releasing activity indicating that the insertion of Bax into mitochondrial membranes by this domain is essential for the Bax-mediated translocation of cytochrome c.

The rupture of the outer mitochondrial membrane is the result of massive mitochondrial matrix swelling caused by either hyperpolarization, or by opening of the permeability transition pore (PTP). Important experiments were therefore the measurement of the mitochondrial membrane potential and the swelling of mitochondria. They were performed to monitor possible effects of Bax and its mutants, which might have led to nonspecific cytochrome c re-

lease. None of the Bax mutants produced any of the above effects, indicating that the cytochrome c release observed is a specific function of Bax action.

Finally, the importance of the fine distribution of the cytochrome c inside distinct mitochondrial compartments was investigated. By isolating and reconstituting hexokinase-porin-ANT-complexes it was shown that Bax can induce the release of endogenous cytochrome c specifically organized in this complex. This release occurred only from associated complexes and was dependent on the saturation of hexokinase with its substrates or products. This observation suggests that the mitochondrial apoptotic pathway is blocked in those tumor cells that show an enhanced rate of glycolysis.

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Martin Krönke für das Referat meiner Arbeit und der Aufnahme in seinem Institut bedanken. Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer für die Übernahme des Co-Referats und Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner für den Prüfungsvorsitz.

Der Projektleiterin Dr. Juliane Jürgensmeier möchte ich für die interessante Fragestellung, die Einführung in die Welt der Apoptose und die kritische, konstruktive Durchsicht des Manuskripts danken.

Allen jetzigen und ehemaligen Kollegen und Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene gilt mein besonderer Dank, da ohne sie diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich weiß die ständige Hilfsbereitschaft, Geduld, die Gespräche dienstlicher und privater Natur und den Kuchen und Sekt überaus zu schätzen. Hervorheben möchte ich Marion Peters, Fatma Sak, Herrn Cinkel, Herrn Röhrig und Günther Arnold für die permanente Bereitschaft die bürokratischen und organisatorischen Hindernisse des Alltags zu beheben. Bei Kathrin Busch möchte ich mich für die sorgfältige Durchführung von so mancher Mito-Präparation bzw. Western Blot bedanken. Mein besonderer Dank gilt Oleg Krut für das Lösen meiner vielen Computerfragen. Katussevani Bernardo und Marcus Klein danke ich für die Unterstützung bei der Protein-Analytik bzw. der Proteinexpression. Bei Hamid Kashkar möchte ich mich für die lustige „Bench-Nachbarschaft“ bedanken. Sein taktisch analytischer Sachverstand kam mir außerdem bei so manchem Problem zu Gute. Eine besondere Ehre ist es dem Instituts-Fußball Team anzugehören. Ich werde dieses sportlich kollegiale Zusammensein in Zukunft extrem vermissen.

Dem Institut für Biochemie von Prof. Dr. Krämer möchte ich für die freundliche Aufnahme und die Einführung in die Kunst der bakteriellen Fermentation herzlichst danken. Besonders Hendrik Rönsch und Andreas Wolf haben mir dabei mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Susanne Morbach möchte ich an dieser Stelle außerdem für die Übernahme des Prüfungsbeisitzes danken.

Ein ganz großes Dankeschön möchte ich Prof. Dr. Dieter Brdiczka von der Universität Konstanz aussprechen. Ich danke ihm dafür, dass ich die Gelegenheit hatte das SIP

„Bioenergetics“ im Sommer 2001 besuchen zu dürfen. Es war ein sehr interessantes Meeting, das viel Gelegenheit zu ausführlichen Diskussionen gab. Außerdem habe ich die lustige und produktive Forschungszeit in seinem Labor im März 2002 zusammen mit Mike Vyssokikh überaus genossen.

Bei meinen Kooperationspartnern Karin Öllinger, Katarina Kågedal und Lotta Johansson von der Universität Linköping, Schweden, möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit bedanken. Außerdem habe ich Euch auch für meine PostDoc Stelle am NIEHS in North Carolina zu danken.

Natürlich möchte ich mich auch bei allen meinen Freunden, Verwandten und Bekannten bedanken, mit denen ich so manche Stunden in all den Jahren verbracht habe. Ihr wart immer der notwendige Gegenpol zu der vielen mitunter stressigen Forschung.

Mein besonderer Dank gilt meiner Schwester und vor allem meinen Eltern, die immer für mich da waren. Ihr habt mich allzeit unterstützt und beraten. Euch habe ich es zu verdanken, dass ich heute diese Zeilen hier schreiben darf. Ohne Euch wäre dies niemals möglich gewesen. DANKE!

Britta danke ich dafür, dass sie in den Monaten, wo sich in meinem Leben soviel verändert hat, an meiner Seite war. Sie war immer für mich da, hat mir zugehört und mich aufgemuntert. Nichts war ihr je zuviel und sie hätte mich im wahrsten Sinne des Wortes an das Ende dieser Welt begleitet.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Martin Krönke betreut worden.

"Localisation of cytochrome c in a complex of porin and adenine nucleotide translocator: Bax targeted cytochrome c release depends on the functional state of the complex"

M. Vyssokikh, L. Zorova, D. Zorov, G. Heimlich, J. M. Jürgensmeier, D. Brdiczka
Molecular Biology Reports **29**: 93-96 (2002)

Lebenslauf

Gerd Heimlich
Sülzburgstr. 158
D-50937 Köln

Tel. (privat): 0221/9438772
Tel. (dienstl.): 0221/478-7283
Mobil: 0179/7341567
E-mail: gerd.heimlich@uni-koeln.de

Persönliche Angaben

Familienstand: ledig; keine Kinder
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum: 13.07.1973
Geburtsort: Mönchengladbach; NRW

Schulische Laufbahn

08.1980 - 06.1984 Städt. Grundschule Dülken (NRW)
08.1984 - 06.1993 Städt. Gymnasium Dülken (NRW)

Wehrdienstzeit

07.1993 - 06.1994 Wehrdienst in Goslar und Ahlhorn (Luftwaffe)

Hochschullaufbahn

10.1994 - 09.1999 Chemiestudium an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf
10.1996 Vordiplom
10.1996 - 03.1997 Zweitstudium Biologie an der Heinrich-Heine-Universität
08.1997 - 08.1998 DAAD gefördertes integriertes Auslandsstudium in den U.S.A.;
Forschung (bioorganische Chemie) bei Prof. Dr. H. H. Thorp;
Department of Chemistry der University of North Carolina at
Chapel Hill
01.1999 - 04.1999 Diplomprüfungen (Wahlpflichtfach: Biochemie)
04.1999 - 09.1999 Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Heinrich-Heine-

- Universität in Düsseldorf bei Prof. Dr. H. Weiss;
„Einsatz der Strep-tag/Strep Tactin Affinitätschromatographie zur
Isolierung des Komplex I aus Neurospora“
- 11.1999 - heute Dissertation am Institut für Med. Mikrobiologie, Immunologie und
Hygiene der Universität zu Köln bei Prof. Dr. M. Krönke mit dem
Ziel der Promotion an der Math. Nat. Fakultät;
„Struktur–Funktions Analyse des pro-apoptotischen Proteins Bax“

Sprachkenntnisse

- Englisch Verhandlungssicher in Wort und Schrift
Latein Großes Latinum
Japanisch Ausbaufähige Grundkenntnisse

Ehrenamtliche Tätigkeiten

- 06.1995 - 05.1997 Fachschaftsrat der Fachschaft Chemie
07.1996 - 07.1997 Fakultätsrat der Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf

Mitgliedschaften

- 01.2000 – 12.2002 Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI)
01.1999 - heute Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh)

Unterschrift

Köln, 16.03.2003