

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und
Pharmazie der Ludwig Maximilians Universität München

**Strukturelle Untersuchungen der Konformationsänderungen
im proapoptotischen Protein Bax und der räumlichen
Anordnung des membranständigen Baxoligomers**

Stephanie Wiebke Bleicken
aus Buchholz in der Nordheide

2008

Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 der Promotionsordnung vom 29 Januar 1998 von Prof. Oesterhelt betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München am 12.05.08

Stephanie Bleicken

Dissertation eingereicht am 15.05.08

1. Gutachter Prof. Oesterhelt
2. Gutachter Prof. Steinhoff

Mündliche Prüfung am 17.09.08

Für Jan

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung:	6
Kapitel 1: Einleitung	9
Apoptose, Autophagie, Nekrose – Zelltod in Metazoen	9
Apoptotische Signalkaskaden	11
Die Initiation der Mitochondrien-vermittelten (intrinsischen) Apoptose	13
Stresserkennung im Cytosol und Signalweitergabe zum Mitochondrium mittels der Bcl-2 Proteine	14
Lageveränderung von proapoptotischen Faktoren aus dem Mitochondrium ins Cytosol	16
Die Struktur der Bcl-2 Proteine	19
Das proapoptotische Protein Bax	20
Das proapoptotische Protein Bak	22
Ziele	23
Ergebnisse und Diskussion	24
Kapitel 2: Proteinexpression und Reinigung von Bax	24
Ziel	24
Expression und Reinigung des Bax Wildtypproteins	24
Expression und Reinigung von Expression Baxmutanten	27
Qualitäts- und Reinheitskontrolle von Bax WT und der Mutanten	27
Vorstellung der untersuchten Konformationen von Bax	28
Herstellung von oligomeren Bax in Detergenz	29
Herstellung von membranständigem Bax	29
Bedeutung von Disulfidbrücken für die Oligomerisierung von Bax	31
Kapitel 3: In silico Analyse von Bax	33
Primärstrukturanalyse von Baxproteinen aus Säuge- und Wirbeltieren	33
Darstellung der konservierten Aminosäuren auf der Proteinoberfläche mit Hilfe der NMR-Struktur	
Daten des Proteins	34
Isoformen von Bax und ihre funktionellen Besonderheiten	34
Strukturelle Unterschiede in der Tertiärstruktur der Bcl-2 Proteine	36
Kapitel 4: Untersuchungen der Sekundär- und Tertiärstruktur von Bax	38
Ergebnisse	38
Sekundärstrukturanalyse	38
Circular-Dichroismus-Spektroskopie	38
Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FTIR)	39
Untersuchungen der Tertiärstruktur von beiden Konformationen von Bax	40
Tryptophanfluoreszenz	40
Proteaseverdau	41
Elektronenspinresonanzspektroskopie	44
Die Konformationsänderungen von Bax durch die Zugabe von c_8 Bid braucht Lipide	48
Diskussion	50
Konformations-bedingte Veränderungen von α_2 und α_5	50
Konformations-bedingte Veränderungen von α_9	51
Konformations-bedingte Veränderungen im Bereich vor α_2	51
Konformations-bedingte Veränderungen in der C-terminalen Proteinhälfte	52
Kapitel 5: Untersuchungen zur Stabilität von Bax	54
Ergebnisse:	54
Thermische Stabilität von Bax	54
Thermische Stabilität des monomeren Bax	55
Darstellung des hitzeinduzierten „Megaoligomers“ von Bax	56
Thermische Stabilität des oligomeren Bax	57
Stabilität von Bax gegenüber chaotropen Substanzen	58
Diskussion	59
Das Megaoligomer	59
Stabilität von Bax gegen Temperaturerhöhung und chaotrope Substanzen	59
Kapitel 6: Kontaktbereiche zwischen den Monomeren des Baxoligomers	62
Ergebnisse	62
Biotinbindeexperimente	62
Kovalente Vernetzung der Monomere im Baxoligomer	65

Puls-ESR-Messungen zur Ermittlung der Abstände zwischen den in Cysteinen in Bax	69
Monomer	69
Oligomer in Detergenz und Lipid	70
Diskussion	72
Interaktionsflächen zwischen den Monomeren	72
Die zusätzliche Distanz im Oligomer bei niedriger Detergenzkonzentration	73
Kapitel 7: Untersuchungen zur Anzahl der Monomere im Baxoligomer	75
Ergebnisse	75
Laufverhalten von Bax in nativen Gelen	75
Proteinvernetzungsexperimente	76
Diskussion	77
Kapitel 8: Größe und Form des Baxoligomers	79
Ergebnisse	79
Größenausschlusschromatographie	79
Kristallographische Arbeiten an Bax	80
Dynamische Lichtstreuung (DLS)	80
Elektronen- und Rasterkraftmikroskopie	81
Analytische Ultrazentrifugation	88
Diskussion	89
Größenbestimmung des monomeren Bax	89
Größenbestimmung des oligomeren Bax in Detergenz	89
Größenbestimmung des oligomeren Bax in Liposomen	90
Kapitel 9: Modell des oligomeren Baxkomplexes	93
Bewertung der bestehenden Modelle von Bax und die Membranständigkeit von $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 9$	94
Die Struktur des Baxdimers in der membranständigen Konformation	96
Die Struktur des Baxoligomers in der membranständigen Konformation	100
Porenbildung oder Proteininhibierung	101
Der innere Porendurchmesser des oligomeren Bax	101
Der Einbau von Bax in den Liposomen	103
Kapitel 10: Material und Methoden	105
Materialien	105
Methoden	109
Anhänge:	119
Anhang 1: Die Initiation der Apoptose über den Rezeptor-vermittelten Signalweg (extrinsischer Signalweg) und die Funktion der Caspasen	119
Anhang 2: Bax abhängige Mitochondrienfragmentierung	120
Anhang 3: Apoptose Regulation am Endoplasmatischen Retikulum (ER)	123
Anhang 4: Strukturuntersuchungen an Bax in An- und Abwesenheit von DTT	126
Anhang 5: Theoretischer Hintergrund der ESR-Spektroskopie und Darstellung der Puls-ESR zwei Puls-ESEEM und DEER-Daten	127
Anhang 6: Vergleich vom Bax WT Protein zu den Cysteinmutanten	132
Anhang 7: Lokale Biotinbindung an Bax	134
Anhang 8: Vergleich vom Bax (WT)-Protein zu den Mutanten der Proteinvernetzungsexperimente	136
Anhang 9: Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy; AFM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM);	137
Anhang 10: Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen	139
Referenzen	142

Zusammenfassung:

In mehrzelligen Organismen müssen Veränderungen in der Zellzahl - durch Zellteilung oder Zelltod - strikt reguliert werden, da Störungen zu lebensgefährlichen Krankheiten wie Krebs, neurodegenerativen oder Autoimmunerkrankungen führen können. Eine Schlüsselrolle in der Kontrolle des Zelltods übernehmen die Bcl-2 Proteine, die sich in drei Untergruppen unterschiedlicher Funktion unterteilen lassen: (1) antiapoptotische Bcl-2 Proteine, (2) proapoptotische *BH3-only* Bcl-2 Proteine und (3) proapoptotische *multidomain* Bcl-2 Proteine. Während das funktionelle Spektrum der Bcl-2 Proteine ständig erweitert wird, ist das Wissen über ihre strukturellen Eigenschaften immer noch begrenzt.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Struktur des proapoptotischen *multidomain* Bcl-2 Proteins Bax, das die Mitochondrien-vermittelte Apoptose einleiten kann. Bax kann vom *BH3-only* Bcl-2 Protein tBid und anderen Faktoren aktiviert oder von den antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen inaktiviert werden. Wenn Bax aktiviert wurde (a) entlässt es Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Cytosol, und es beeinflusst sowohl (b) die Mitochondrienmorphologie als auch (c) die Ca^{2+} -Homöostase der Zelle. Die Aktivität des Proteins ist mit seiner räumlichen Struktur verknüpft. *In vivo* sind zwei Konformationen bekannt: (1) Eine inaktive, lösliche und monomere Konformation, die im Cytosol von gesunden Säugerzellen vorkommt und (2) eine aktive, membranständige und oligomere Konformation, die in die äußere Mitochondrienmembran von apoptotischen Zellen eingebaut ist. Die Letztgenannte bewirkt die Entstehung einer Pore, durch die das Cytochrom c ins Cytosol strömen kann.

Die Struktur des monomeren Bax wurde mittels NMR in der Gruppe von Dr. Tjandra (PDB:1F16⁽¹⁾) gelöst. Das Protein ist ein globuläres 21 kDa Protein aus neun α -Helices ($\alpha 1$ - $\alpha 9$), wobei $\alpha 5$ den Kern des Proteins bildet. Gemeinsame Motive der Bcl-2 Proteine sind die Bcl-2 Homologie (BH) Domänen. Vier dieser Domänen sind bekannt, wobei drei (BH1-3) in Bax vorkommen. Außer dieser Domänen gibt es auf Ebene der Primärstruktur kaum Homologien zwischen den Bcl-2 Proteinen und es wurden keine Homologien zu anderen Proteinen gefunden. Im Gegensatz dazu ist die Tertiärstruktur innerhalb der Bcl-2 Proteine hoch konserviert und ähnelt derjenigen einiger bakterieller Toxine (z.B. der C-terminalen Domäne der Colicine). Die Untergruppe der *multidomain* Bcl-2 Proteine (zu denen Bax gehört) kommt ausschließlich in Wirbeltieren vor. Die anderen Bcl-2 Untergruppen wurden dagegen auch in vielen Invertebratenspezies nachgewiesen. *In silico* Sequenzanalysen zeigen eine hohe Konservierung der Aminosäuresequenz von Bax. In $\alpha 2$ und der C-terminalen Proteinhälfte (umfasst alle drei BH Domänen) sind sogar 94% bzw. 90% der Aminosäuren konserviert.

Die Struktur der aktiven, oligomeren Baxkonformation ist weitgehend unbekannt. Die Arbeiten von Annis *et al.*⁽²⁾ und Garcia Saez *et al.*⁽³⁾ zeigten drei membranständige Helices ($\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 9$), die Lage der anderen Helices ist unbekannt.

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit ist: Die Bestimmung der strukturellen Veränderungen in Bax während des Übergangs von der inaktiven in die aktive Konformation und insbesondere die strukturelle Untersuchung des oligomeren, aktiven und membranständigen Bax.

Beide Proteinkonformationen wurden mit vielen, verschiedenen biochemischen und biophysikalischen Methoden analysiert (z.B. mit Elektronenspinresonanzmessungen, Elektronen- sowie Rasterkraftmikroskopie und Massenspektrometrie an chemisch modifizierten Baxproteinen).

Folgende Informationen wurden dabei gewonnen:

- (A) Die Einnahme der aktiven Baxkonformation beeinflusst nicht die Sekundärstruktur des Proteins.
- (B) Membraneinbau und Oligomerisierung führen zu deutlichen Veränderungen in der Tertiärstruktur von Bax:
 - Die lokale Umgebung der Tryptophane (insgesamt sechs, alle in der C-terminalen Proteinhälfte) wird hydrophober.
 - Im Oligomer ist der N-Terminus vor $\alpha 2$ zugänglich für Proteasen, im Monomer ist es $\alpha 9$.
 - Eine Untersuchung der lokalen Umgebungen der nativen Cysteine von Bax zeigt Oligomerisations-induzierte Veränderungen.
 - Die Baxaktivierung bewirkte eine Immobilisierung des Spinlabels an C126 (am Ende von $\alpha 5$), sowie eine Abnahme seiner Zugänglichkeit für paramagnetische Quencher und der Polarität seiner Umgebung.
 - Die Umgebung des Spinlabels an C62 (in der BH3 Domäne in $\alpha 2$) verändert sich durch die Baxaktivierung. Die Zugänglichkeit des Labels für paramagnetische Quencher sinkt nahezu auf null ab, es wird leicht immobilisiert und die Polarität der Umgebung sinkt leicht ab.
 - Eine Untersuchung der Zugänglichkeit einiger Aminosäuren in Bax für NHS-Biotin zeigt, dass M1 und K21 (in $\alpha 1$) in beiden Konformationen gut zugänglich sind, während sich die Zugänglichkeit von K57, K58 und K64 (alle in $\alpha 2$) durch die Oligomerisierung verschlechtert, wogegen sich die von K119, K123 (in $\alpha 5$) und K128 (Loop zwischen $\alpha 5$ und $\alpha 6$) verbessert.
- (C) Chemische und thermische Stabilitätsanalysen zeigen die oligomere Baxkonformation stabiler als die monomere, wobei beide sehr stabil waren.
- (D) Zwei BH3 Domänen ($\alpha 2$) bilden eine Kontaktfläche zwischen den Monomeren des Baxoligomers aus.
- (E) Distanzmessungen zeigen:
 - Die Spinlabel an C126 und C62 liegen in der monomeren Konformation

3,15 nm voneinander entfernt. Die Oligomerisierung verändert die Distanz nur wenig.

- Zwei Spinlabel an C62 liegen im Oligomer 2,4 nm oder mehr als 5 nm von einander entfernt.
 - Zwei Spinlabel an C126 liegen im Oligomer 3 nm, 4 nm oder mehr als 5 nm von einander entfernt.
- (F) Die Tertiärstruktur der Baxoligomere in Liposomen oder Detergenz zeigt keine deutlichen Unterschiede.
- (G) Eine Untersuchung der Quartärstruktur der Oligomere in Detergenz oder Liposomen zeigt die Oligomere in Detergenz verkleinert. Sie bestanden aus einer geraden Anzahl von Monomeren, wobei das größte, identifizierte Oligomer ein Dodekamer war.
- (H) In Detergenz bilden sich porenartige Partikel von etwa 4 nm Höhe, ca. 8 - 10 nm äußerem und 2 -3 nm Porendurchmesser. Nach Detergenzentzug zerfallen sie in Dimere oder bilden Aggregate.
- (I) Der Einbau von Bax in Liposomen führt zu Löchern im Lipidfilm, die einen Durchmesser von 5 bis zu 20 nm haben.

Mittels dieser Ergebnisse und der bereits vorhandenen Daten zu Bax konnte ein neues, detailreicheres Modell des Baxoligomers erstellt werden. Die wichtigsten Aussagen dieses Modells sind: Bax baut während der Konformationsänderung die Helices $\alpha 9$, $\alpha 5$ und $\alpha 6$ in die Membran ein, wogegen sich die anderen Helices auf die Oberfläche der Lipidschicht legen. Zwei $\alpha 2$ Helices kommen während der Oligomerisierung dicht zusammen und bilden eine Interaktionsfläche zwischen den Monomeren aus. Das Oligomer besteht aus einer geraden Anzahl von Monomeren. Die gebildete Pore ist in Lipid groß genug um Cytochrom c passieren zu lassen und könnte aus einem Baxdodekamer bestehen.

Kapitel 1: Einleitung

Apoptose, Autophagie, Nekrose – Zelltod in Metazoen

„Life is pleasant, death is peaceful. It's the transition that's troublesome“ (Isaac Asimov)

Das Überleben der mehrzelligen Eukaryoten (Metazoen) hängt von der Fähigkeit - jeder Zelle und des ganzen Organismus - ab, auf veränderte Lebensbedingungen einzugehen. Schlüsselqualifikationen sind dabei die Kontrolle der Zellzahl durch Zellteilung und Zelltod sowie die Fähigkeit in Hungersituationen hauszuhalten und überflüssiges wieder zu verwerten. Die Regulation dieser Mechanismen erfolgt durch ein komplexes Proteinnetzwerk. In der Erkennung von Stresssignalen (innerhalb der Zelle) und in der Entscheidung, ob und wie eine Zelle stirbt nimmt die Familie der Bcl-2 Proteine eine wichtige Position ein. Stören Fehlregulationen das Gleichgewicht von Zellteilung und Zelltod kann es zu schweren Krankheiten, wie Krebs, Autoimmunerkrankungen (z.B. Multiple Sklerose) oder neurodegenerativen Erkrankungen (Morbus Alzheimer und Parkinson) kommen ⁽⁴⁾. Auch Viren (z.B. HIV) können das Gleichgewicht stören.

Die strukturelle Untersuchung des proapoptotischen Bcl-2 Proteins Bax ist Kernpunkt dieser Arbeit. Die Deletion von Bax und seines Homologen Bak führt in der Maus zum pränatalen Tod oder ernsten organischen Schäden ⁽⁵⁾. Folglich sind Bax und Bak essentielle Proteine in Mäusen aber auch in anderen Säugern.

Der Zelltod kann durch mehrere voneinander abweichende Mechanismen ausgelöst und durchgeführt werden. Dabei können unterschiedliche Signalwege eingeschlagen und verschiedene morphologische Veränderungen der Zelle und des umgebenden Gewebes sichtbar werden. Die wichtigsten Arten des Zelltods sind im Folgenden aufgeführt:

(I) Schädliche Umwelteinflüsse wie Verbrennungen oder mechanische Traumata lösen **Nekrosen** aus, die sich phänotypisch durch Anschwellen und Platzen von Zellen zeigen (siehe Abbildung 1; links). Dabei diffundieren Zellbestandteile ins umgebende Gewebe und lösen eine Entzündungsreaktion aus, die in schweren Fällen das Überleben des Organismus gefährden kann ⁽⁶⁾. Sind die im Folgenden beschriebenen Apoptose und Autophagie Mechanismen intakt, minimiert dies Schädigungen des Organismus durch Nekrosen.

(II) Mittels **Autophagie** werden in Hungersituationen nicht essentielle Proteine und Organelle abgebaut. Die Autophagie kann aber auch zum Tod der Zelle führen. Das Wissen um diesen Zelltod ist neuer und weniger gut verstanden, als die anderen beiden Mechanismen. Die sterbende Zelle baut sich selbst mittels Autophagosomen ab und die Abbaufragmente werden vom umgebenden Gewebe aufgenommen, sodass es zu keiner Entzündung kommt. Die Autophagie wurde in Tieren, Pflanzen

und Pilzen nachgewiesen.

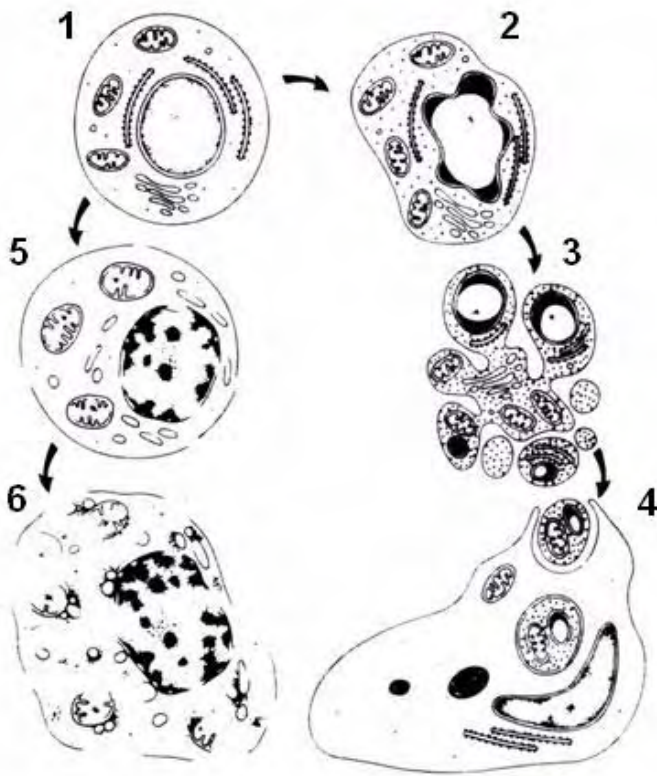


Abbildung 1: Strukturelle Veränderungen einer Zelle während Apoptose (rechts) und Nekrose (links).

Apoptose: Die vormals gesunde Zelle (1) beginnt zu schrumpfen, dabei kondensieren Cytoplasma und Chromatin (2). Im weiteren Verlauf beginnt die Fragmentierung von DNA, Proteinen, Kern, Mitochondrien, ... und der Abbau der gesamten Zelle in apoptotische Vesikel (*apoptotic bodies*), wobei die Integrität der Zellmembran erhalten bleibt (3). Die Vesikel können danach rückstandsfrei von Makrophagen oder Nachbarzellen aufgenommen werden, so dass es zu keiner Entzündungsreaktion kommt (4). **Nekrose:** Bei Beginn einer Nekrose schwellen die Mitochondrien, sowie die gesamte Zelle an (5). Dabei kommt es zu einer ungeordneten Kondensation des Chromatins, die Zellmembranen wird durchlässig und die Zellbestandteile diffundieren ins umgebende Gewebe (6), in Folge dessen es zu einer Entzündungsreaktion kommen kann [nach⁽⁷⁾].

(III) Die am besten beschriebene Todesart ist die **Apoptose**, auch programmierter Zelltod⁽⁸⁾ genannt. Sie kommt in tierischen Zellen vor und bewirkt den Abbau der Zelle in „*apoptotic bodies*“, die von Nachbarzellen oder Makrophagen aufgenommen werden, sodass es zu keiner Entzündungsreaktion im Körper kommt. Phänotypisch erkennt man die Apoptose am (a) Schrumpfen der Zelle, (b) der Kondensation des Chromatins, (c) der Caspaseaktivierung, (d) der Fragmentierung von DNA, Organellen und Cytoskelett sowie (e) der rückstandsfreien Zerlegung der Zelle in die „*apoptotic bodies*“ (siehe Abbildung 1; rechts). Sie ist lebensnotwendig für die Entwicklung, Zelldifferenzierung und Gewebehomöostase mehrzelliger Organismen und für die Entfernung überflüssiger, infizierter oder beschädigter Zellen.

Die Aufklärung der molekularen Vorgänge während der Apoptose begann 1976 mit den Arbeiten von Sulston & Horvitz⁽⁹⁾ am Nematoden *C. elegans*. 131 der 1090 somatischen Zellen des Wurms sterben während seiner Entwicklung durch Apoptose ab. Die *C. elegans* Forschung identifizierte viele essentiellen Gene und Proteine für die Initiation und Exekution der Apoptose, von denen viele später auch im Menschen identifizierten wurden. Eine Übersicht der heute bekannten Signalwege bietet Abbildung 2.

Apoptotische Signalkaskaden

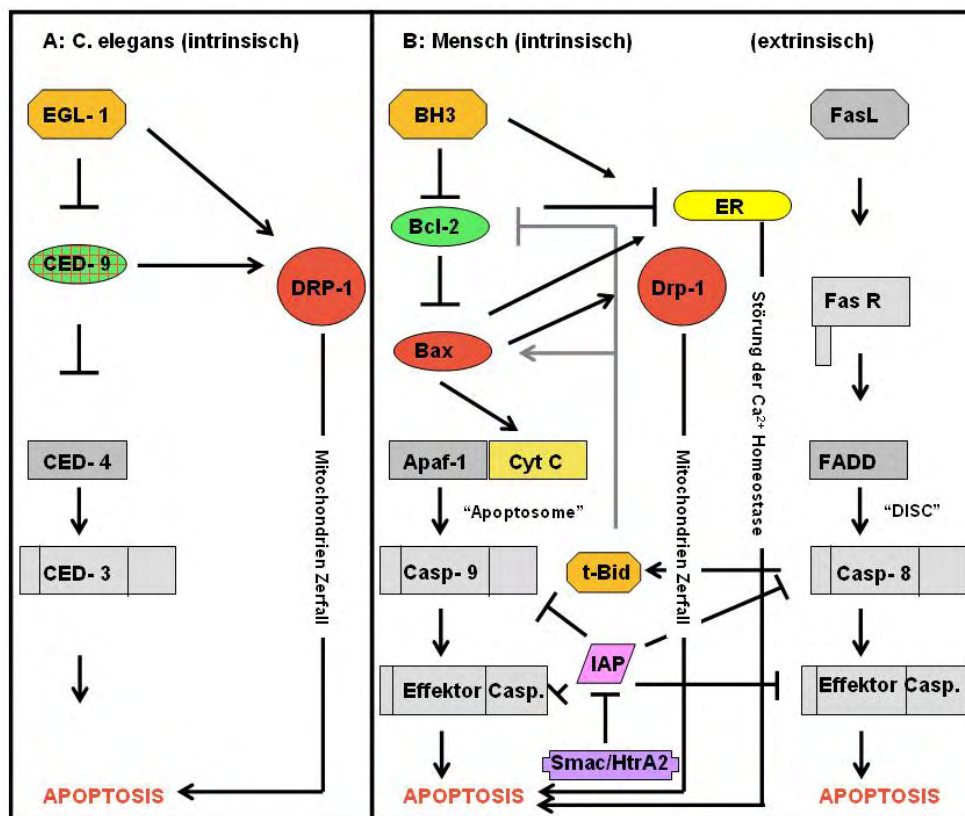


Abbildung 2: Signalwege in die Apoptose in A: *C. elegans* und B: Mensch

Der intrinsische Signalweg beginnt mit der Erkennung von Stresssituationen mit Hilfe der BH3-only Proteine (gelbe Oktaeder), sie aktivieren letztlich im Menschen Bax oder Bak (rote Ovale) und in *C. elegans* CED9 (eine Bcl-2 Homolog mit pro- und antiapoptotischen Eigenschaften; rot-grünes Oval). Danach führen drei Signalwege in die Apoptose: Der erste aktiviert Apoptosome und Caspasen, wozu im Menschen Cytochrom c aus dem Mitochondrium entlassen werden muss. Der Zweite verläuft über die Aktivierung von Drp1 und die Mitochondrienfragmentierung. Der Dritte greift in die Ca^{2+} -Homöostase am ER ein. Den extrinsischen Signalweg gibt es nur in Wirbeltieren in ihm aktivieren die T-Zellen mit Hilfe eines Liganden (z.B. Fas Ligand, als grauer Oktaeder gezeigt) sogenannte Todesrezeptoren (z.B. den Fas Rezeptor) auf der Oberfläche von den Zellen, die sterben sollen. Durch diese Aktivierung wird der DISC-Komplex gebildet und die Caspasen aktiviert. Caspase 8 schneidet und aktiviert dabei das BH3-only Protein Bid, wodurch parallel der intrinsische Signalweg eingeleitet wird. Die Caspasen werden normalerweise von Inhibitoren (IAP) blockiert. Diese Blockierung stoppt die Apoptose, was langfristig aber nicht immer zum Überleben der Zelle führt, da andere Todesmechanismen greifen können. Bax setzt neben Cytochrom c auch Smac/HtrA2 aus dem Mitochondrium frei. Dieses Protein kann die IAP's inhibieren, sodass die Caspasen aktiv werden können.

Im Mensch wurden zwei voneinander unabhängige Signalwege in die Apoptose identifiziert:

(a) der extrinsische und (b) der intrinsische Signalweg. Einen Überblick über die wichtigsten Komponenten beider Signalwege gibt Abbildung 2.

Während des extrinsischen Signalweges, der vom Vorhandensein einer adaptiven Immunabwehr abhängt (also nur in Wirbeltieren vorkommt), erteilen die T-Zellen des Immunsystems einen Todesbefehl an die Zielzelle (siehe Anhang 1). Der intrinsische oder mitochondrienabhängige Signalweg ist eine Art Zellselbstmord, der früh in der Evolution der Tiere entwickelt wurde und auf den im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird. Beiden Signalwege bewirken die Caspaseaktivierung und den Zellabbau. Da Bax an der Initiation und nicht der Exekution der Apoptose beteiligt ist, werden die Caspasen hier nur kurz in Anhang 1 angesprochen.

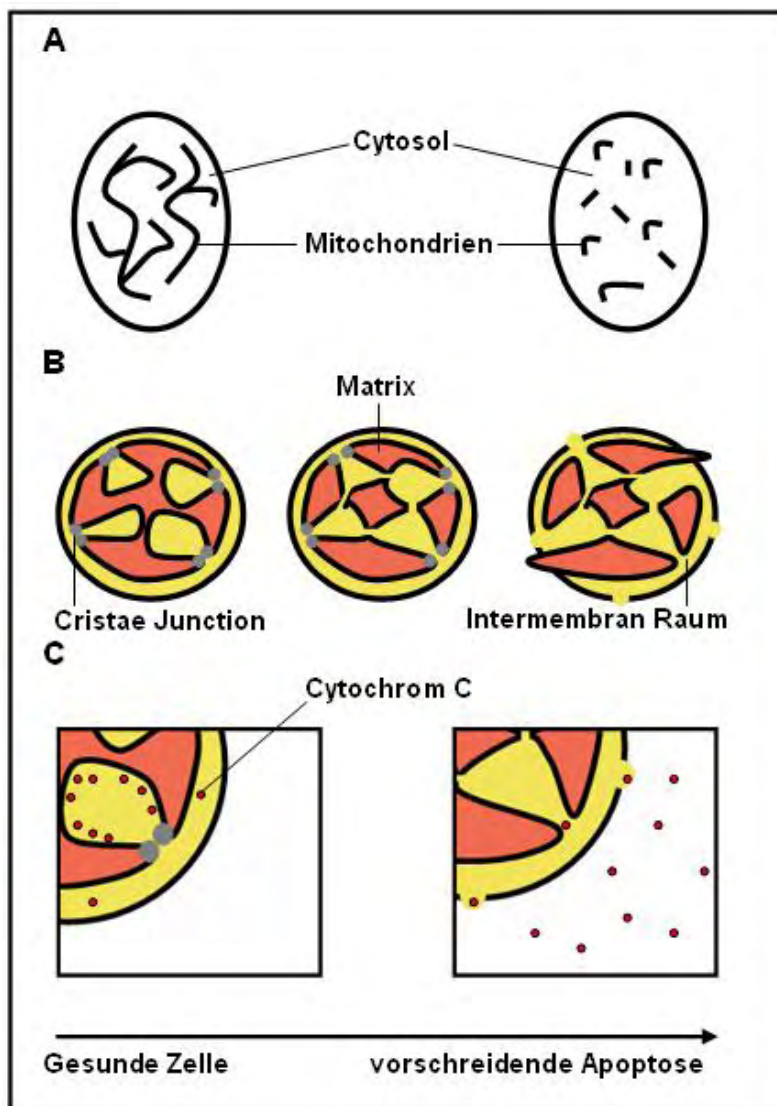


Abbildung 3 : Morphologische Veränderungen der Mitochondrien durch die Apoptose

A: Schematische Darstellung der Zelle: Das tubuläre Mitochondriennetzwerk zerfällt während der Apoptose. **B:** Schematische Darstellung eines Mitochondrienquerschnitts. Während der Apoptose werden die *Cristae Junctions* durchlässig, die Cristae bilden ein Netzwerk aus, die Mitochondrien schwellen an und die äußere Membran wird durchlässig. **C:** Während der Apoptose wird das Cytochrom c aus den Cristae und den Mitochondrien ins Cytoplasma entlassen

Einschub 1: Funktion und Morphologie der Mitochondrien

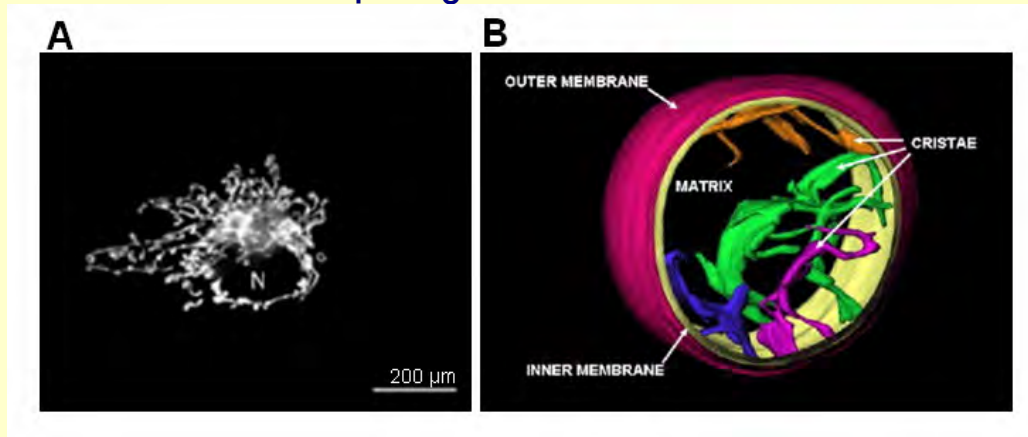


Abbildung 4: Modell eines Mitochondriums

A: Fluoreszenzmarkiertes Mitochondriennetzwerk aus COS 7 Zellen ⁽¹⁰⁾; B: Querschnitt eines Mitochondriums, nach Elektronentomographie ⁽¹¹⁾

Mitochondrien sind Zellorganellen mit vielen Funktionen. Sie sind entscheidend für Energiegewinnung, Teile des Stoffwechsels und die Kontrolle der Ca^{2+} -Homöostase, außerdem sind sie Informationsknotenpunkte in der Apoptose. Gesunde Säugerzellen brauchen funktionelle Mitochondrien um zu überleben und um entzündungsfrei zu sterben.

Die Funktionalität der Mitochondrien spiegelt sich in ihrer komplexen und dynamischen Struktur wieder. In den meisten Zellen liegen sie als tubuläre, vom Cytoskelett geformte Netzwerke vor, die sich ständig teilen und wieder miteinander verschmelzen ⁽¹¹⁾. Diese Vorgänge sind für die Erhaltung der mitochondrialen DNA unerlässlich.

Die mitochondrialen Tuben verfügen über fünf abgetrennte Bereiche (siehe Abbildung 4B): die Matrix, die innere und die äußere Membran und den Intermembranraum, der sich in den kleine äußeren

Intermembranraum (über den das Cytochrom c ins Cytosol entlassen werden kann) und die Cristae (mit den Atmungskettenkomplexe und 85% des Cytochrom c ^(12,13)) unterteilen lässt. Beide hängen über schmale (mit den *Cristae Junctions* verschlossenen ^(11,14)) Verbindungen zusammen ⁽¹¹⁾ (siehe Abbildung 3).

Die Komplexität der Morphologie erhöht sich durch Veränderungen der Cristae, während der Fusions- und Teilungsvorgänge ⁽¹¹⁾. Isolierte Mitochondrien (ohne Stabilisierung des Cytoskeletts) bilden ovale Gebilde, wie sie oft in Lehrbüchern abgebildet sind. Für kurze Übertragungswege liegen Teile des Mitochondriennetzwerks nah am Kern, der Plasmamembran und dem ER. Das ER kommt an einigen Stellen bis auf 5 nm an die äußere Mitochondrienmembran heran, sodass Verbindungen zwischen den Organellen aufgebaut werden können ⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

Die Initiation der Mitochondrien-vermittelten (intrinsischen) Apoptose

Die intrinsische Apoptose ist an morphologische Veränderungen der Mitochondrien gekoppelt. In Einschub 1 ist eine Einführung in die Funktion und Morphologie der Mitochondrien in gesunden Zellen gegeben. Während der Apoptose verändert sich die Mitochondrienmorphologie von einem komplexen Netzwerk aus Tuben zu kleineren einzelnen Mitochondrien ⁽¹⁸⁾. Die Morphologie der Cristae wandelt sich von getrennten Membraneinstülpungen zum Netzwerk, das in späten Apoptosephasen über die teilweise löchrige äußere Membran hinausreichen kann ^(13,19) (siehe Abbildung 3).

Stresserkennung im Cytosol und Signalweitergabe zum Mitochondrium mittels der Bcl-2 Proteine

Die Bcl-2 Proteine werden als Torhüter der Mitochondrien-abhängigen Apoptose bezeichnet. Die Konzentrationen und Aktivitäten der Mitglieder ihrer drei Untergruppen entscheiden, ob und wann die Apoptose eingeleitet wird⁽²⁰⁾. Die drei Gruppen können miteinander interagieren und durch ihre Funktion und Domänenstruktur (d.h. bezüglich vier Bcl-2 Homologie (BH) Domänen)⁽²¹⁾ unterschieden werden (siehe Tabelle 1: und Abbildung 5).

Funktion	Klassifizierung	Bekannte Proteine	Domänenstruktur	
Antiapoptotisch		Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, A1, Bcl-w, ...	BH1-B4	
Proapoptotisch	<i>multidomain</i>	Bax, Bak, Bok	BH1-BH3	
	<i>BH3-only</i>	Baxaktivator	Bim, Bid	BH3
		Baxderepressor	Bad, Bik, Puma, Bnip3, Noxa, Bmf, Hrk, ...	BH3

Tabelle 1: Klassifizierung der Bcl-2 Proteine

Die Mitochondrien-vermittelte Apoptose beginnt im Cytosol mit der Erkennung und Verarbeitung von Stresssignalen mittels der proapoptotischen BH3-only Proteine (z.B. t-Bid, Bad, Bim). Sie wirken als Stresssensoren der Zelle und besitzen nur die BH3 Domäne. Nach ihrer Aktivierung können sie die proapoptotischen multidomain Bcl-2 Proteine direkt einschalten (Baxaktivatoren) oder dessen Aktivierung durch Inhibierung der antiapoptotischen Bcl-2 Proteine erleichtern (Baxderepressoren)⁽²²⁻²⁵⁾. Die verschiedenen BH3-only Proteine werden durch verschiedene Stresssignale aktiviert und liegen bis dahin in einer inaktiven Form vor (siehe Abbildung 6).

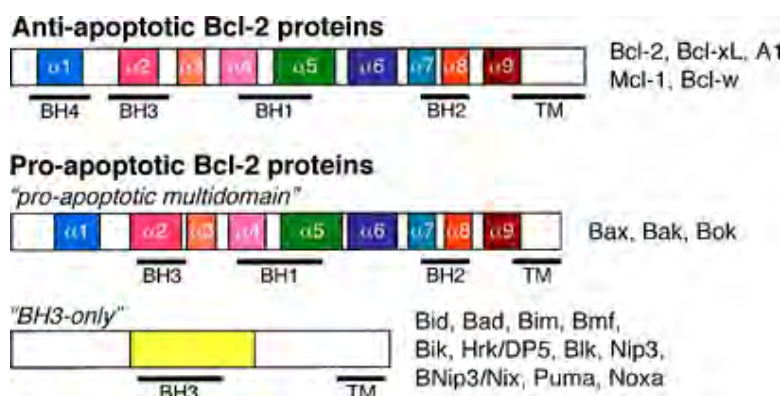


Abbildung 5: Domänen Struktur der Bcl-2 Proteine (aus⁽²²⁾)

Die proapoptotisch *multidomain* Bcl-2 Proteine (Bax, Bak, Bok) besitzen drei BH Domänen (BH 1, 2 und 3). Sie können von den BH3-only Proteinen aktiviert werden, dies kann aber auch ihnen unabhängig geschehen⁽²⁵⁾. Bax kann zunächst reversibel an die äußere

Mitochondrienmembran binden, um dann durch einen unbekanntem Stimulus irreversibel in die Membran einzubauen⁽²⁶⁾. Dabei nimmt Bax eine oligomere Konformation ein⁽²⁶⁻²⁹⁾ (siehe Abbildung 7, und Anhang 2) und reichert sich mit Drp1 (*dynamamin like Protein 1*) und Mfn1 (*mitofusin 1*) in bestimmten Membranbereichen an, an denen sich das Mitochondrium später teilen wird⁽³⁰⁾ (siehe Abbildung 7). Alternativ kann Bax auch in die Membran des ER's einbauen⁽³¹⁻³⁶⁾ (siehe Anhang 3). Das Bax Homolog Bak liegt immer in der äußeren Mitochondrienmembran vor und muss dort aktiviert werden⁽³⁶⁻³⁸⁾.

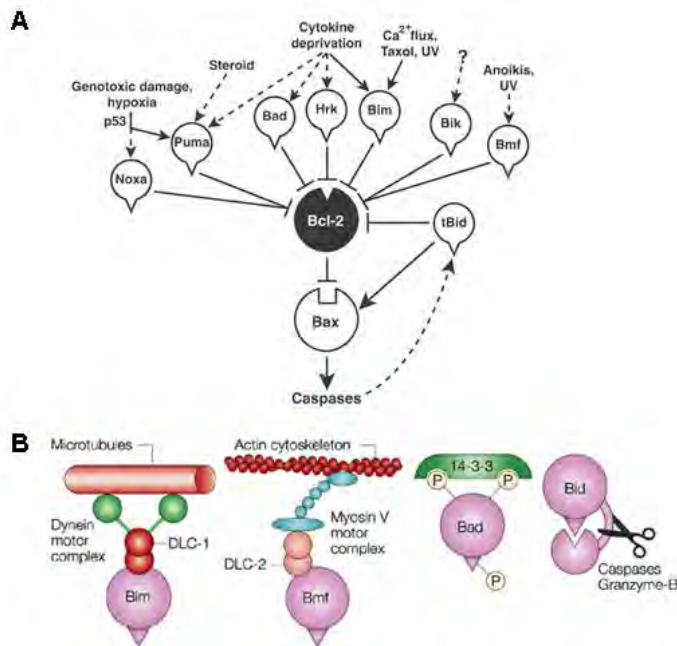


Abbildung 6: Aktivierung der BH3-only Proteine

A: Stressfaktoren und die dadurch aktivierte BH3-only Proteine; B: Posttranslationale Regulationen von BH3-only Proteinen die zu ihrer Inaktivierung führen [Abbildung aus^(39,40)]

Die proapoptotischen *multidomain* Bcl-2 Proteine leiten die Apoptose auf verschiedene Art und Weise ein. Vom aktiven Bax ausgehend sind drei Signalwege in den apoptotischen Zelltod bekannt (siehe Abbildung 2): Es bewirkt (a) das Entlassen von Cytochrom c und anderen proapoptotischen Proteinen (z.B. Smac /DIABLO und HtrA 2) aus den Mitochondrien ins Cytoplasma, (b) die Drp1 abhängige Fragmentierung der Mitochondrien und (c) die Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase am Endoplasmatischen Retikulum. Alle drei Mechanismen sind miteinander verknüpft, so ist Drp1 auch für das Entlassen des Cytochrom c's notwendig⁽⁴¹⁾ und ER und Mitochondrien kommen räumlich nah genug zusammen, um zu Wechselwirkungen zuzulassen^(15,42). Auf Signalweg (a) wird im nächsten Abschnitt eingegangen, während (b) und (c) in den Anhängen 2 und 3 behandelt werden.

Die Deletion der Gene von Bax und Bak schützt Zellen vor vielen proapoptotischen Reizen⁽³⁸⁾. Auf den Organismus hat das aber weitreichend negative Auswirkungen^(5,38,43). Neben den BH3-only Proteinen kann Bax auch von einer Reihe anderer Proteine gebunden und reguliert werden: p53^(44,45), Bif1^(46,47) und ASC⁽⁴⁸⁾ aktivieren Bax, wogegen Humanin⁽⁴⁹⁾,

Ku70⁽⁵⁰⁾, Clusterin⁽⁵¹⁾ und 14-3-3⁽⁵²⁾ es inhibieren. Die Transkription von Bax wird durch p53 und c-myc reguliert^(53,54).

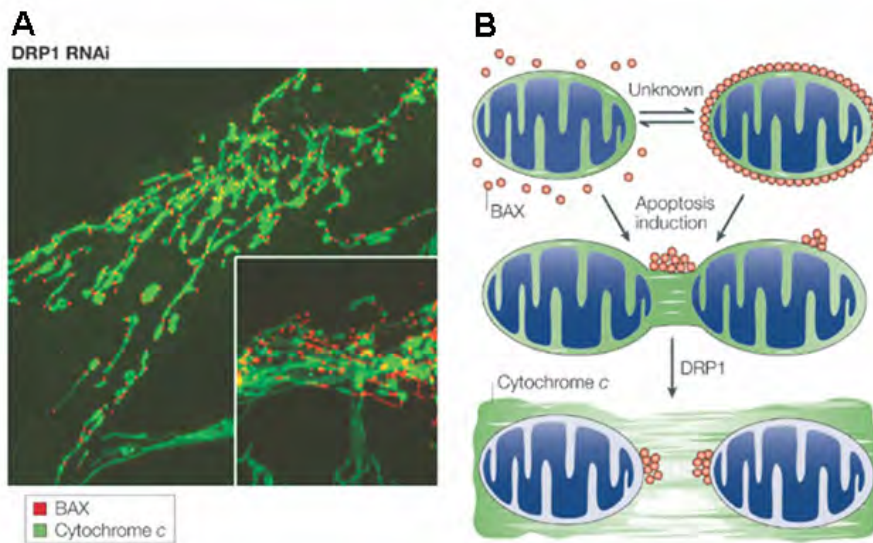


Abbildung 7: Lokalisation von Bax in der Zelle [aus⁽³⁰⁾]

A: Lage von Bax (rot) und Cytochrom c (grün) in Zellen nach proapoptotischem Stimulus und Zugabe von RNAi gegen Drp 1. Ohne Drp 1 wird fast kein Cytochrom c freigesetzt und die Mitochondrien fragmentieren kaum, aber Bax lokalisiert trotzdem nach einem proapoptotischen Reiz in Spots auf der Mitochondrienoberfläche. **B:** Darstellung des Standorts von Bax in gesunden und apoptotische Zellen. Das in gesunden Zellen cytoplasmatische Bax wird durch einen unbekannt, proapoptotischen Reiz an die äußere Mitochondrienmembran gerufen. Es baut in sie ein und sammelt sich an bestimmten Oberflächenspots an. Drp 1 und Mfn 1 werden dort ebenfalls gefunden. Mit Drp 1 beginnt in diesen Spots die Teilung des Mitochondriums. Drp 1 und Bax bewirken zusammen gemeinsam auch die Cytochrom c Freisetzung.

Die antiapoptotischen Bcl-2 Proteine (z.B. Bcl-2, Bcl-xL, und Mcl-1) besitzen alle vier BH Domänen. Sie können Bax und Bak inhibieren und durch die proapoptotischen BH3-only Proteine inhibiert werden. Bcl-xL interagiert zusätzlich mit Beclin 1, einem zentralen Regulator der Autophagie^(55,56). Es ist also auch an der Entscheidung, wie eine Zelle stirbt beteiligt.

Lageveränderung von proapoptotischen Faktoren aus dem Mitochondrium ins Cytosol

Nach der Aktivierung, dem Membraneinbau und der Oligomerisierung von Bax wird die äußere Mitochondrienmembran^(24,27-29,57-59) durchlässig für Cytochrom c und es wird fast vollständig ins Cytosol entlassen^(60,61). In gesunden Zellen liegt nur ein kleiner Teil (ca. 15%) des mitochondrialen Cytochrom c im äußeren Intermembranraum vor^(12,13), während der Rest in den Cristae liegt. Um diesen Anteil ins Cytosol zu entlassen, müssen zunächst die *Cristae Junctions* unter Mitwirkung des BH3-only Proteins t-Bid geöffnet werden^(13,16,62,63). Wie Bax die äußere Mitochondrienmembran durchlässig für proapoptotische Proteine macht ist nicht voll verstanden. Es wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen:

- (1) Bax bildet Oligomere die Poren (Baxpore) in der Membran ausbilden ^(59,64).
- (2) Bax ist Teil der PTP (*permeability transition pore*) ⁽⁶⁵⁾.
- (3) Bax schließt den VDAC (*voltage dependent anion channel*) ⁽⁶⁶⁾.
- (4) Bax verändert die Lipide in seiner Umgebung, sodass „Lipidporen“ entstehen ^(18,67).

Die Hypothesen zu den Poren in der äußeren Mitochondrienmembran werden im Folgenden und in Abbildung 8 und Abbildung 10 B näher skizziert.

Die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran

Die Baxpore:

Die aktive, oligomere Bax- bzw. Bakkonformation bildet Poren, die einen Durchgang für das Cytochrom c in der äußeren Mitochondrienmembran schaffen und es so ins Cytosol freisetzen. Diese Bax induzierte Membranpore behindert nicht die Funktionalität der Mitochondrien. Ob die Porenbildung weitere Proteine benötigt ist nicht bekannt, aber Cardiolipin scheint für ihre Ausbildung notwendig zu sein ⁽⁵⁹⁾. Abbildung 8 zeigt ein Modell der Baxpore. Ihre Struktur wird später gesondert behandelt, da sie ein zentraler Punkt dieser Arbeit ist.

Die PTP und das Schließen von VDAC:

Die PTP besteht im Wesentlichen aus den Proteinen: VDAC, ANT (*adenin nucleotid translocator*) und Cyclophilin D ^(68,69). Abbildung 8 zeigt ein Modell der PTP. Sie wird durch Ca^{2+} aktiviert ⁽⁷⁰⁾, vermutlich durch die Bcl-2 Proteine reguliert ^(66,71-74) und ermöglicht einen Ionenfluss über beide Mitochondrienmembranen. Dabei ist unklar, wie die Mitochondrien nach Aktivierung der PTP ihre Funktionalität aufrechterhalten können, da ihre Öffnung zu einem Ionenstrom in die Matrix führt, diese dadurch anschwillt und der entstehende Druck Löcher in die äußere Mitochondrienmembran reißt. Es wurde postuliert, dass die PTP in der Apoptose nur sehr kurz öffnet und die Mitochondrien dadurch intakt bleiben. Möglich ist auch, dass die PTP erst in späteren Apoptosestadien aktiviert wird. So wurde für die Apoptose von HeLa Zellen gezeigt, dass die Mitochondrien erst 5 bis 10 min nach dem Entlassen des Cytochrom c anschwellen und somit die PTP nicht für das Entlassen des Cytochrom c verantwortlich sein kann ⁽⁷⁵⁾.

Das Schließen von VDAC stoppt den ATP/ADP und Ionenaustausch zwischen Mitochondrium und Cytosol, was ebenfalls ein Anschwellen der Matrix bewirkt. Das Anschwellen der Matrix ist charakteristisch für Nekrosen, in deren Entstehung die PTP eine wichtige Rolle einnimmt ^(22,76-79).

Die Lipidpore:

Diese Hypothese geht davon aus, dass Bax mit mehreren hydrophoben Helices in die Membran einbaut und die umgebenden Lipide destabilisiert, worauf das Cytochrom c die entstehenden Durchgänge ins Cytosol passieren kann (siehe Abbildung 10 B).

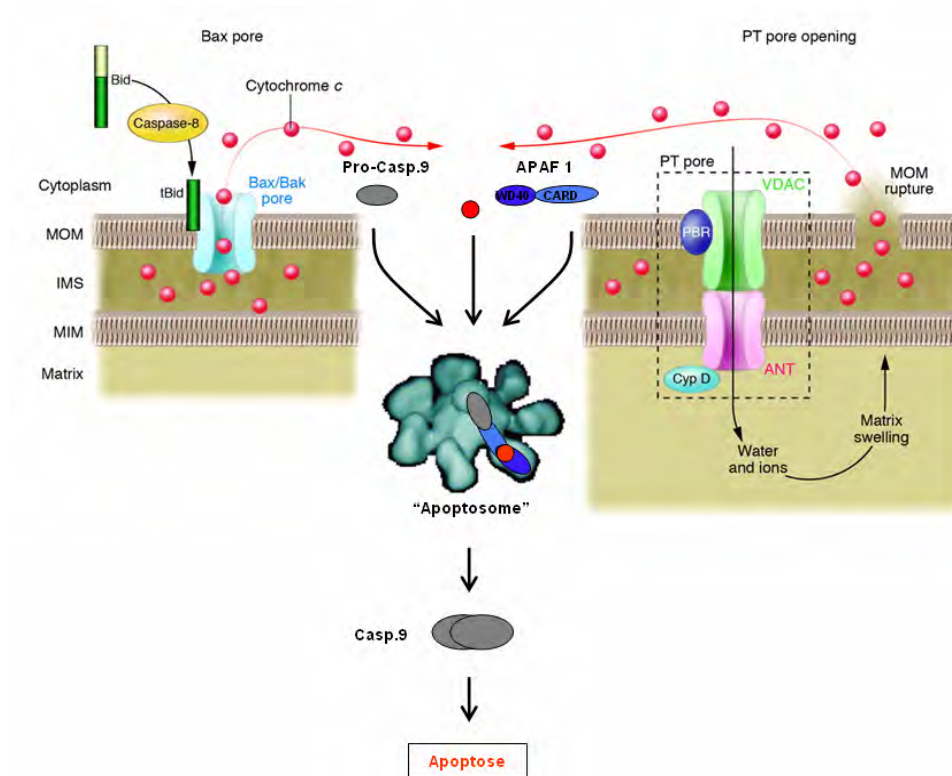


Abbildung 8: Initiierung der Apoptose durch Freisetzung von Cytochrom c Abwandlung einer Abbildung von Bouchier-Hayes et al. ⁽²⁰⁾

Wenn Bax (z.B. durch Aktivierung mittels t-Bid) in die äußere Mitochondrienmembran eingebaut vorliegt, bildet es Poren, durch die Proteine wie Cytochrom c in das Cytosol gelangen. Im Cytosol kann das Cytochrom c mit APAF 1, und Procaspase 9 einen Komplex (genannt Apoptosome) bilden, der zur Aktivierung der Procaspase 9 und damit der Initiierung der Apoptose führt. Auch die Aktivierung der Permeability Transition Pore führt zum Entlassen des Cytochrom c aus dem Mitochondrium. Diese Pore ist hier mit folgenden Komponenten gezeigt: dem VDAC, dem ANT, dem PBR (*peripheral benzodiazepine receptor*) und Cyclophilin D. Sie ermöglicht einen Wasser- und Ionenfluss über beide Mitochondrienmembranen, der zum Anschwellen der Matrix und zum Platzen der äußere Mitochondrienmembran führt.

Wie auch immer das Cytochrom c ins Cytosol gelangt, bewirkt die Apoptose letztendlich immer einen Zusammenbruch der ATP Produktion ⁽²⁰⁾, da die Effektorcaspasen Teile der Elektronentransportkette zerlegen ^(80,81). Würde dies bereits früh während der Apoptose passieren, wäre der ATP Verlust fatal, da der Zellabbau Energie benötigt und die Zelle ohne diese Energie an Nekrose stürbe. Sobald das Cytochrom c im Cytosol angekommen ist, bildet es mit APAF 1 (*apoptotic protease activating factor 1*), deoxyATP und Procaspase 9 einen Komplex, der als Apoptosome bezeichnet wird. Seine Bildung bewirkt eine Konformationsänderung der Procaspase, die sie aktiviert. Die reife Caspase spaltet nun die Effektorcaspasen und die Apoptose wird eingeleitet ⁽⁸²⁾ (siehe Abbildung 8).

Die Struktur der Bcl-2 Proteine

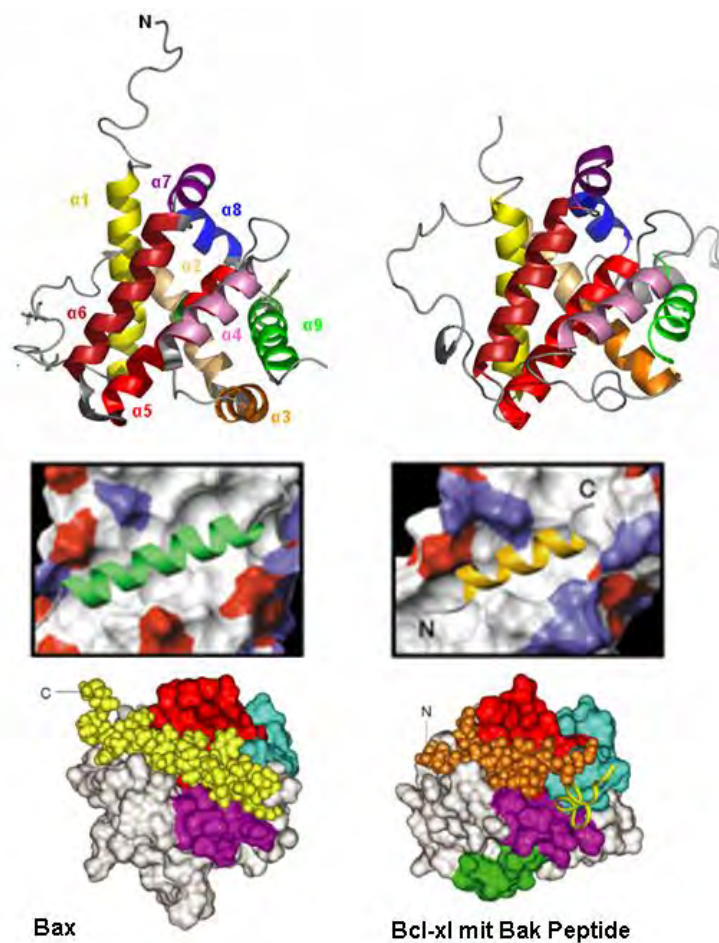


Abbildung 9: Struktur- und Oberflächendarstellung der Bcl-2 Proteine Bax (in Volllänge) und Bcl-xL ohne $\alpha 9$ aber mit gebundenem Bak Peptid.

Oben: Strukturdarstellung von Bax (links) und Bcl-xL mit Bak Peptid (rechts); $\alpha 1$ - gelb, $\alpha 2$ - beige, $\alpha 3$ - orange ($\alpha 2$ und $\alpha 3$ sind in Bcl-xL zu einer Helix verschmolzen); $\alpha 4$ - rosa, $\alpha 5$ - rot, $\alpha 6$ - dunkelrot, $\alpha 7$ - lila; $\alpha 8$ - blau, $\alpha 9$ - grün bzw. Bak Peptid - lemon; Mitte: Darstellung der Interaktion der Oberfläche der hydrophoben Furche mit der C-terminalen Helix (grün) bzw. dem Bak Peptid (gelb). Unten: Oberflächendarstellung mit farblich hervorgehobenen BH Domänen, sowie C-terminaler Helix von Bax (gelb) und Bak Peptid (orange); BH1: rot; BH2: türkis; BH3: lila; BH4: grün (aus⁽⁴⁰⁾) Die Orientierung des C-Terminus von Bax und des Bak Peptids in der hydrophoben Furche sind komplementär zueinander.

In der Literatur sind verschiedene Röntgen- und NMR-Strukturen von löslichen Bcl-2 Proteinen beschrieben. Dabei wurden jedoch meist verkürzte Proteine, denen die C-terminale Helix fehlt gezeigt^(1,37,83-87). Die Aminosäuresequenz der Bcl-2 Proteine ist nur mäßig konserviert, ihre Faltung jedoch stark. Sie haben eine Masse von 20-30 kDa und bestehen meist aus neun α -Helices (fortan $\alpha 1$ - $\alpha 9$ genannt; gezeigt in Abbildung 9). Die N-terminale $\alpha 1$ bildet in antiapoptotischen Proteinen die BH4 Domäne. Sie kommt in den proapoptotischen Bcl-2 Proteinen nicht vor. Zwischen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ ist eine große flexible Loopregion, in der viele Bcl-2 Proteine durch Proteasen geschnitten werden können⁽⁸⁸⁾. Ihr schließt sich die $\alpha 2$ als BH3 Domäne an. Der Bereich um $\alpha 4$ und $\alpha 5$ bildet die BH1 Domäne. BH2 setzt sich aus Teilen der beiden kurzen Helices vor der C-terminalen Helix zusammen.

Dem Kern des Proteins bildet die hydrophobe $\alpha 5$, die von den anderen amphipatischen Helices abgeschirmt wird ^(1,37,89).

Aminosäuren aus BH1, BH2 und BH3 bilden - wie in Abbildung 9 gezeigt - eine hydrophobe Furche auf der Proteinoberfläche. Diese Furche ist für die Interaktionen innerhalb der Bcl-2 Proteine wichtig. Sie kann entweder die C-terminale Helix, Bereiche der proapoptotischen BH3-*only* Proteine oder Inhibitoren binden ^(1,83,90). Der Inhibitor ABT-737 bindet z.B. die hydrophobe Furche von Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w und stört die Interaktion mit dem proapoptotischen Bax. Damit verstärkt er die Wirkung von Chemotherapien auf solide Tumore ⁽⁹¹⁾ und zeigt, dass die Bcl-2 Proteine erfolgsversprechende Ziele in der Krebstherapie sind.

Das proapoptotische Protein Bax

Wie schon erwähnt, sind zwei verschiedene Konformationen von Bax bekannt. In gesunden Zellen liegt es als inaktives, monomeres Protein im Cytosol vor und seine Aktivierung zur membranständigen, oligomeren Form ist ein mehrstufiger, nicht vollständig verstandener Prozess, der letztlich zum Tod der Zelle führt. Die Struktur des inaktiven, löslichen Bax wurde durch NMR gelöst und ist in Abbildung 9 gezeigt ⁽¹⁾. Bax ist ein kompakt gefaltetes, globuläres Protein aus neun alpha Helices. $\alpha 5$ bildet den hydrophoben Kern des Proteins, der nach außen durch die anderen meist amphipatischen Helices abgeschirmt wird. Die hydrophobe $\alpha 9$ liegt in einer hydrophoben Furche auf der Proteinoberfläche, die von Aminosäuren aus BH1 - 3 gebildet wird (siehe Abbildung 9).

Die Struktur der membranständigen Konformation ist nicht bekannt. Es gibt allerdings eine Reihe von Publikationen, die sich mit Membraneinbau einzelner Helices beschäftigen oder die Lage einzelner Aminosäuren bezüglich der Membran überprüfen ^(2,3,58,92-94). Daher wurden verschiedene Modelle für die oligomere, membranständige Konformation von Bax, ihren Insertionsmechanismus und die Art der Porenbildung entwickelt. Sie werden im Folgenden kurz vorgestellt (siehe auch Abbildung 10) und beziehen sich auf die Annahme, dass die zuvor beschriebene Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran durch die Baxpore geschieht, oder (Modell B) der Baxeinbau die Ausbildung einer Lipidpore bewirkt.

Das Modell A von Annis *et al.* ⁽²⁾ geht davon aus, dass Bax mit $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 9$ in die äußere Mitochondrienmembran einbaut, zu den anderen Helices gibt es keine Aussagen. Es wird davon ausgegangen, dass das Protein oligomerisiert und proapoptotischen Proteine wie Cytochrom c über die Membran schleust.

Das Modell B von Garcia Saez *et al.* ⁽³⁾ postuliert, dass sich Bax, wenn es an der Membran angekommen ist, entfaltet und auf die Oberfläche legt, worauf $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\alpha 6$

und $\alpha 9$ in die Membran insertieren und die Lipidumgebung gestört wird. Hierbei entsteht eine Pore in der Membran. Ein ähnlicher Insertionsmechanismus wird auch für die Colicine angenommen, die eine ähnliche Faltung wie Bax haben. Eine Oligomerisierung von Bax wird in dieses Modell nicht einbezogen.

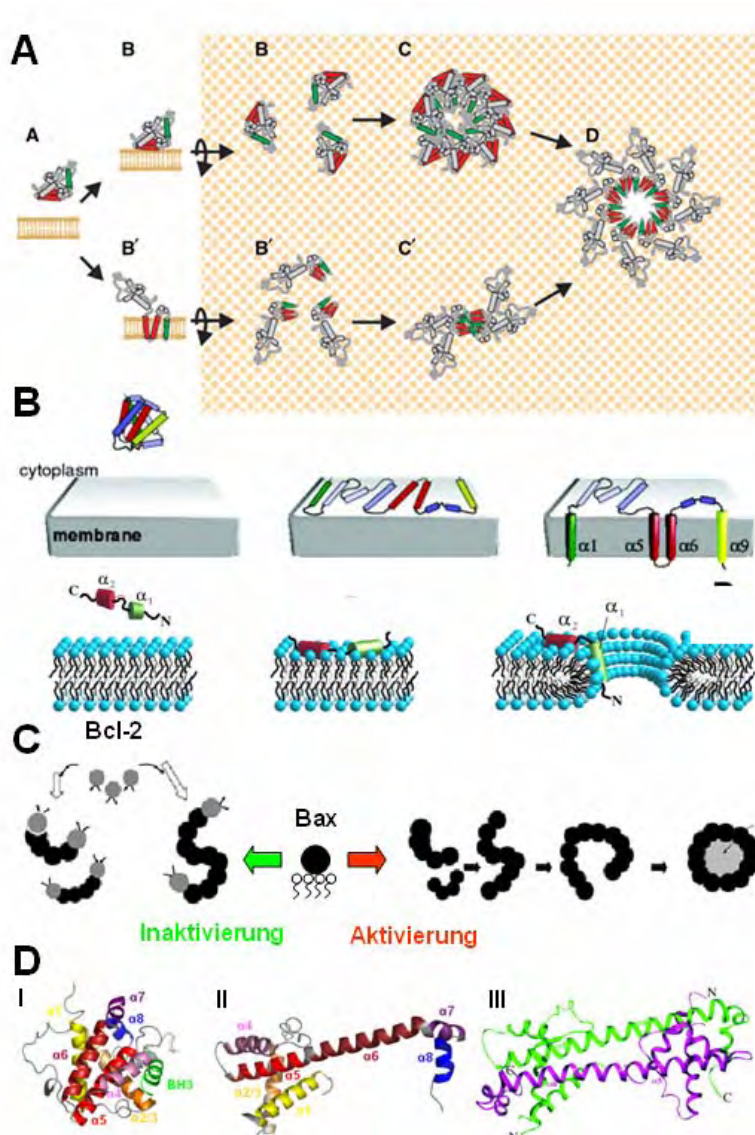


Abbildung 10: Modelle zur membranständigen Baxkonformation und dem Membraneinbau

A: Das Modell des membranständigen Bax nach Annis *et al.* ⁽²⁾. Die Lipide sind in beige gezeichnet, $\alpha 9$ grün, $\alpha 5$ und $\alpha 6$ rot und der Rest von Bax grau dargestellt. **B:** Das Modell des membranständigen Bax nach Garcia Saez *et al.* ⁽³⁾. Lipide sind türkis gezeichnet, $\alpha 1$ - grün, $\alpha 5$ und $\alpha 6$ - rot und $\alpha 9$ - gelb, alle weiteren Helices sind blau gezeichnet. **C:** Modell zur Bildung der Baxpore nach Reed ⁽⁶⁴⁾. Baxmonomere sind als schwarze Kugeln dargestellt, Bcl-2 Monomere als graue. **D:** Modell der Bcl-xL Dimerisierung nach O'Neill *et al.* ⁽⁹⁵⁾. I: Bcl-xL Monomer ohne $\alpha 9$ aber mit Fragment eines BH3-only Proteins; II: Kristallstruktur eines Bcl-xL Monomers in der Dimer Konformation; III: Kristallstruktur des gesamten Dimers. Farbcode von I und II wie in Abbildung 9, in III ist ein Monomer in lila das andere in grün dargestellt. Näheres findet sich im Text.

Modell C von Reed ⁽⁶⁴⁾ macht keine Aussagen welche Teile von Bax in die Membran einbauen. Es geht davon aus, dass das membranständige Bax mittels Kettenelongation oligomerisiert. Wenn sich die Kette zum Ring schliesst, werden die

Lipide innerhalb des Ringes destabilisiert und eine Pore entsteht. Dieses Modell bietet auch eine Erklärung für die Inaktivierung von Bax durch antiapoptotische Bcl-2 Proteine an ^(96,97). Nach Modell C inhibiert die Bindung eines antiapoptotischen Bcl-2 Proteins Kettenelongation und Ringschluss des Baxoligomers, wodurch auch die Porenentstehung verhindert wird.

Modell D zeigt die Kristallstruktur des antiapoptotischen Bcl-xL Monomers und eines Bcl-xL Dimers (nach O'Neill *et al.* ⁽⁹⁵⁾). Im Dimer sind $\alpha 5$ und $\alpha 6$ zu einer Helix fusioniert, während sie im Monomer V-förmig angeordnet sind. Die Monomere legen sich zu einer hantelförmigen Dimerstruktur zusammen, in deren Zentrum zwei $\alpha 5/\alpha 6$ Helices liegen. Baxoligomere könnten ähnlich aufgebaut sein.

Eine aktuelle Studie zeigte, dass BH1 und BH3, also $\alpha 2$, $\alpha 4$ und $\alpha 5$. für die Membran Insertion, die Oligomerisierung und die proapoptotische Wirkung essentiell sind ⁽⁹⁸⁾. Andere Arbeiten zeigen, dass der Bereich vor $\alpha 1$ (Aminosäure 1-19; ART „apoptosis regulating targeting“) für die Inaktivierung von Bax wichtig ist ^(26,99,100). In Abbildung 11 wird die Sekundärstruktur von Bax mit Einblendung aller funktionsrelevanten Bereiche gezeigt.

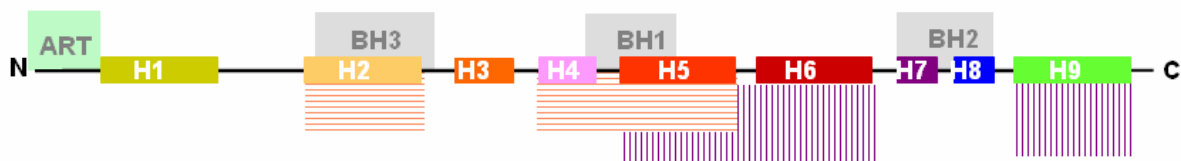


Abbildung 11: Sekundärstruktur von Bax mit Darstellung der Bcl-2 Homologie Domänen und anderer funktionell relevanter Bereiche.

Farbcode: Helices: $\alpha 1$ - gelb; $\alpha 2$ - hellorange; $\alpha 3$ - orange, $\alpha 4$ - pink; $\alpha 5$ - rot; $\alpha 6$ - dunkelrot; $\alpha 7$ - lila; $\alpha 8$ - blau; $\alpha 9$ - grün; BH Domänen – grau; ART-Sequenz - hellgrün; Potenzielle, transmembrane Helices - lila gestreift; Essentielle Helices für die Aktivierung von Bax - rot gestreift,

Das proapoptotische Protein Bak

In dieser Arbeit wurde mit Bax und nicht mit Bak experimentiert. Da beide aber die gleiche Funktion in Säugerzellen haben und es Strukturdaten von Bak gibt, die beim Verständnis der Konformationsänderungen von Bax helfen könnten, wird auch Bak hier vorgestellt. Bak liegt immer in der äußeren Mitochondrienmembran vor und kann daher nicht wie Bax im Cytosol aktiviert werden. Die Aktivierung und die Inhibierung des Proteins erfolgt also in der Membran. Die Kristallstruktur eines Bakdimers (C- und N-terminal verkürzt) lieferte ein Modell zur Bakinhibierung.

Die Struktur zeigt zwei Monomere die mittels eines Zn^{2+} Ions an $\alpha 6$ verbunden sind (siehe Abbildung 12 C; Zn^{2+} kann nur Bak nicht Bax inhibieren). Durch die Dimerisierung wird der Membraneinbau von $\alpha 5$ und $\alpha 6$ verhindert. Betrachtet man Unterschiede zwischen der löslichen Baxstruktur und der Struktur des Bakdimers haben beide Proteine eine sehr ähnliche Faltung, wobei die BH3 Domäne in beiden unterschiedlich angeordnet ist (siehe

Abbildung 12A, B und Kapitel 3). Dieser Unterschied könnte die inaktive Bak Konformation stabilisieren, und tatsächlich zeigt unsere Arbeit die besondere Bedeutung der BH3 Domäne in der Aktivierung von Bax.

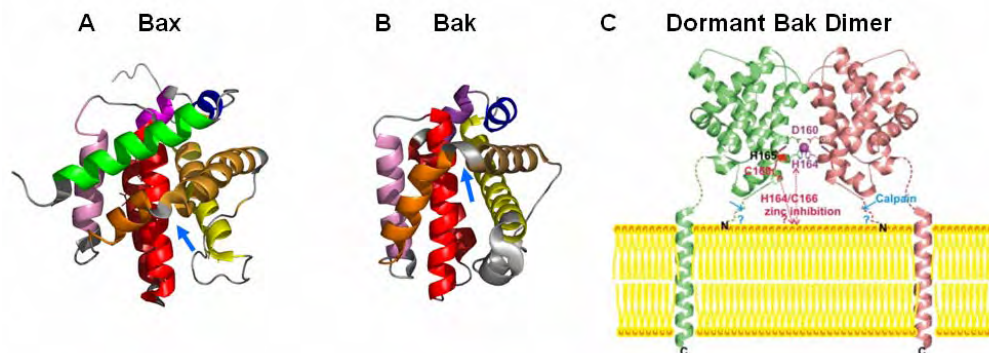


Abbildung 12: Modell eines inaktiven Bakdimers

A: NMR-Modell von Bax. B: Kristallstruktur von cBak (N und C-terminale verkürzt). C: Modell des inaktivierten Bakdimers mit komplexierten Zn^{2+} (N- und C-Terminus wurden ins Modell eingefügt) Farbcodem wie in Abbildung 9, die blauen Pfeile zeigen den deutlichen strukturellen Unterschied beider Moleküle in der BH3 Domäne

Ziele

Es werden immer wieder neue Funktionen der Bcl-2 Proteinfamilie beschrieben, während das Wissen über ihre strukturellen Eigenschaften und damit der Grundlage ihrer Funktionen begrenzt ist. So können viele Fragen zur Funktion der Bcl-2 Proteine nicht geklärt werden. Um mehr Informationen zur aktiven Konformation von Bax zu gewinnen wurden in dieser Arbeit beide Baxkonformationen untersucht und verglichen und versucht ein vollständigeres Modell des oligomeren Baxkomplexes zu entwickeln. Außerdem wurde untersucht ob es Unterschiede in Konformation und Aufbau des oligomeren Bax in Detergenz und Lipidbilayern gibt.

Ergebnisse und Diskussion

Kapitel 2: Proteinexpression und Reinigung von Bax

Ziel: Herstellung und Reinigung des monomeren Baxproteins sowie seine Aktivierung in Detergenz und Lipid.

Expression und Reinigung des Bax Wildtypproteins

Untersuchung der Proteinexpression von Volllänge Bax sowie einer C-terminal verkürzten Mutante

Da Bax Poren in Membranen ausbilden kann⁽¹⁰¹⁾, wirkt seine Überexpression toxisch auf eukaryotischen Zellen (z.B.^(102,103)). Um ausreichende Mengen für biochemische Studien zu produzieren wurde eine heterologe Expression in *E. coli* angestrebt. Die Plasmide mit der Bax-DNA (pTM23_{-His}Bax und pTM23_{-His}BaxΔα9) wurden von Dr. Martinou zur Verfügung gestellt. Das Baxprotein ohne α9 (mit N-terminalen Histidintag) konnte in vielen *E. coli* Stämmen exprimiert werden, wogegen das Volllängekonstrukt toxisch auf fast alle getesteten *E. coli* Stämme wirkte (siehe Tabelle 1). Die einzige Ausnahme bildete C43, ein BL21 Derivat, das speziell für toxische Proteine entwickelt wurde und mindestens zwei nicht identifizierte Mutationen trägt⁽¹⁰⁴⁾. Die Proteinreinigung erforderte zwei Schritte: Nickel Affinitäts- und Anionenaustauschchromatographie. Das C-terminal verkürzte Baxprotein konnte erfolgreich exprimiert, gereinigt und identifiziert werden, wogegen nur geringe Mengen des vollständigen Proteins gereinigt wurden (siehe Abbildung 13). Sie reichten nicht aus das Protein eindeutig mittels MALDI-MS oder N-terminaler Sequenzierung zu identifizieren oder es für weitere Experimente zu nutzen.

Bakterienstamm	His ₆ Bax Δ α9	His ₆ Bax
BL 21 (gold)	+	-
Rosetta	+	-
BL21 (RIL)	+	-
C43	+	+
C41	nicht durchgeführt	-

Tabelle 1: Expression von Bax in verschiedenen Bakterienstämmen

Konstruktion eines polycistronischen Operons in pET23 zur Steigerung der Expressionsrate von Bax

Um die Expressionsrate von Bax zu verbessern wurde versucht, ein polycistronisches Operon aus den Genen von Bax und der F1F0- ATPase Untereinheit β (Gen: *uncF*) zu klonieren. Die Überexpression von der Untereinheit β wirkt toxisch auf *E. coli* Zellen- sie

konnte aber in C43 erfolgreich durchgeführt werden, wobei die Zellen intrazelluläre Membranen ausbildeten⁽¹⁰⁵⁾. Nach der gemeinsamen Expression sollte Bax hauptsächlich in den inneren Membranen vorliegen, sodass es weniger toxisch wirkt. Nach der Klonierung trug aber keines der isolierten Plasmide das gewünschte Operon (das *uncF* Gen war immer revers eingesetzt). Da die Expression von β die Lipidzusammensetzung der C43 Zellen verändert (die Cardiolipinkonzentration erhöht sich von 2 - 4 % auf 14%⁽¹⁰⁵⁾) und da Cardiolipin entscheidend für die Insertion von Bax in die Membran ist⁽⁵⁹⁾, könnte die Kombination aus Bax und β zu einem so starken Einbau von Bax in die Membran geführt haben, dass die Zellen daran zugrunde gingen, weshalb nicht die gesuchten Plasmide isoliert werden konnten.

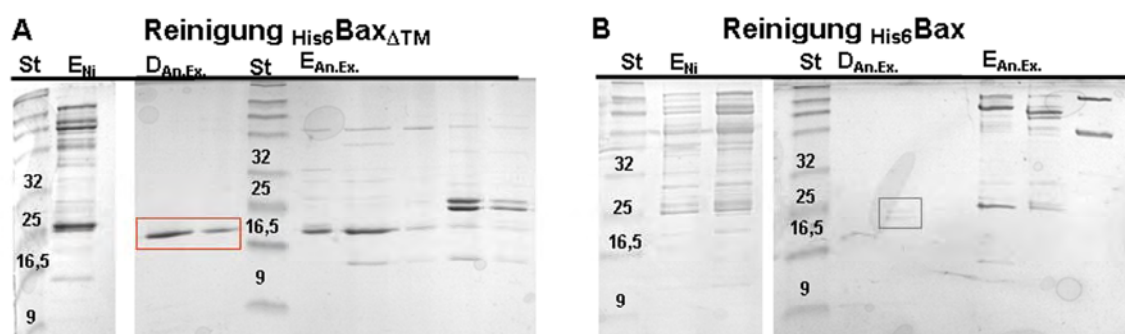


Abbildung 13: 17% SDS-Gele mit aufgetragenen Fraktionen der Bax und Bax Δ TM Reinigung
A: Fraktionen nach der Nickelaffinitäts- und der Anionenaustauschchromatographie an His₆ Bax Δ TM; **B:** Fraktionen nach der Ni-Affinitäts- und der Anionenaustauschchromatographie an His₆ Bax; **Legende:** D_{An.Ex.}: Durchlaufaktionen der Austauschchromatographie; E_{An.Ex.}: Elutionsfraktionen der Austauschchromatographie; E_{Ni}: Elutionsfraktion nach Nickelaffinitätschromatographie; roter Kasten: Banden in denen Bax durch N-terminales Sequenzieren (AHHHHHMDGS) identifiziert; grauer Kasten: Banden deren Größe auf Bax hinweist, wo es aber nicht nachgewiesen werden konnte.

Expression von Bax und Reinigung mit Hilfe eines Bax-Inteinfusionsproteins

Die Struktur des cytosolischen Bax wurde mittels NMR gelöst⁽¹⁾. Dazu wurde ein Vektor zur Expression eines Bax-Inteinfusionsproteins kloniert: pTYB1-Bax (wurde uns von Dr. Tjandra zur Verfügung gestellt). Im Fusionsprotein ist Bax mit dem C-Terminus an ein Intein aus *S.cerevisiae* gekoppelt, an das wiederum eine Chitinbindestelle fusioniert wurde. $\alpha 9$ ist so mitten im Fusionsprotein und kann nicht in die Membran einbauen. Dieses Konstrukt ermöglichte laut Suzuki *et al.*⁽¹⁾ eine Expression von Bax mit Proteinausbeuten von 0,25 mg Bax pro Liter *E. coli* Zellkultur (ähnliche Ausbeuten wurden auch in dieser Arbeit erreicht).

Das Baxprotein wurde in BL21/ RIPL Zellen exprimiert und durch Affinitätschromatographie an Chitinbeads und Anionenaustauschchromatographie gereinigt (siehe Abbildung 14). Nach dem ersten Reinigungsschritt war das Protein zu etwa 90% rein (gezeigt in Abbildung 14C), begann aber bei Konzentrationen über 1 mg/ml auszufallen. Die Anionenaustauschchromatographie erhöhte den Reinheitsgrad auf nahezu 100% (siehe Abbildung 14A), das

Protein neigte jedoch weiterhin zum Ausfallen. Dieser Effekt konnte erst durch Entsalzen und Bindung des Proteins an die Anionenaustauschsäule behoben werden, wobei Moleküle wie DTT und DNA entfernt werden konnten (Laufprofile siehe Abbildung 14). Das Eluat scheint nach der Reinigung Spuren einer Protease zu enthalten. Diese konnte nicht nachgewiesen werden, verkürzte aber einige Baxmutanten schon während der Reinigung. Nach 24 Stunden Lagerung bei 25-27°C verloren ca. 20% des Baxproteins (WT) die sechzehn C-terminalen Aminosäuren. Nach sieben Tagen bei 4°C waren aber noch 95% des Proteins unverdaut. Dagegen wurden bei der Baxmutante C62A, C126A, S118C schon während der Reinigung über 80% des Proteins, um sechzehn C-terminale Aminosäuren verkürzt.

Es ist auch denkbar, dass Bax sich selbst prozessierte. Eine Proteasefunktion von Bax ist jedoch bisher unbekannt.

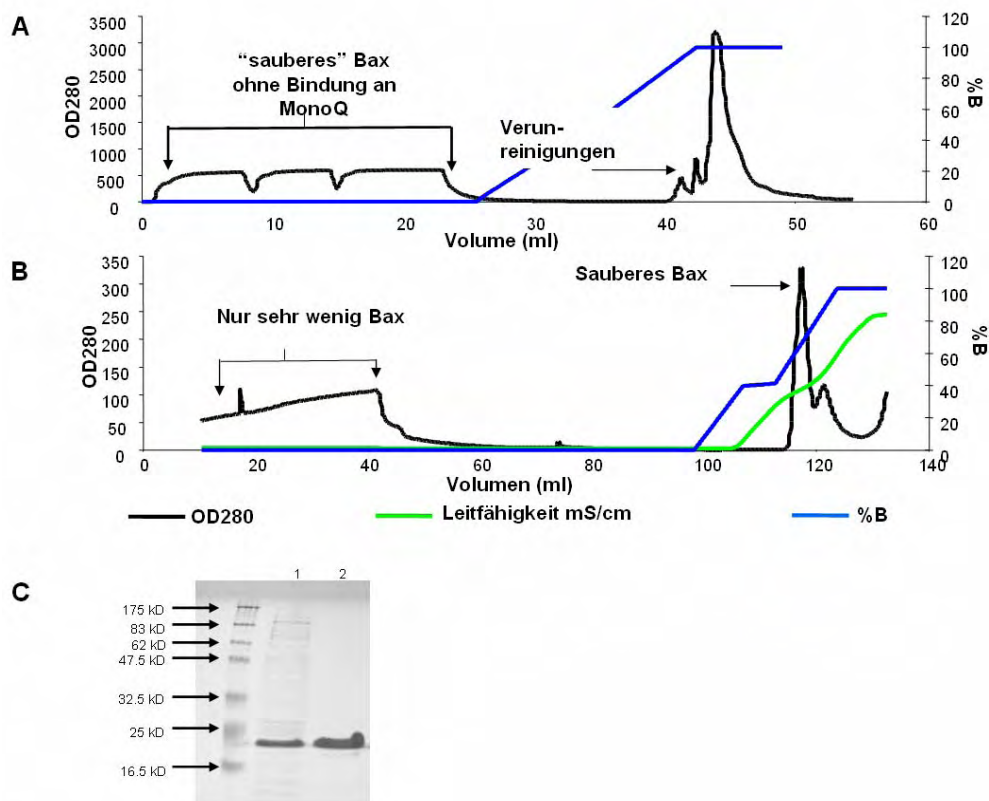


Abbildung 14: Reinigung von Bax mittels Affinitäts- und Anionenaustauschchromatographie
A: Chromatogramm eines anionenaustauschchromatographie Laufes in Anwesenheit von Salz (Puffer A: 20 mM NaCl; 20 mM KCl; 3 mM MgCl₂; 20 mM HEPES, 2 mM DTT; pH 7; Puffer B: 1 M NaCl; 20 mM KCl; 3 mM MgCl₂; 20 mM HEPES, 2 mM DTT; pH 7) **B:** Chromatogramm eines anionenaustauschchromatographie Laufes in Abwesenheit von zusätzlichem Salz (Puffer A: 20 mM Tris, 2 mM DTT; pH 8,1; Puffer B: 1 M NaCl; 20 mM Tris, pH 8,1) **C:** 17% SDS-Gel von Bax. Spur 1: Bax nach Chitinsäule; Spur 2: Bax nach Anionenaustauschchromatographie

Zellwachstum durch Fermentation zur Erhöhung der Proteinmenge

Aufgrund der geringen Proteinausbeute von Bax wurden für einige Versuche Zellen im Fermentor angezogen. Dort konnten die Lebensbedingungen der *E. coli* Zellen verbessert werden, sodass höhere Zelldichten erreicht wurden (Ernte: etwa 20 - 30 g Zellen pro Liter

Fermenterkultur). Vergleicht man die Zellen in Farbe, Stabilität und Zusammensetzung mit Kulturen aus den Schüttelkolbenexpressionen sind deutliche Unterschiede vorhanden (siehe Abbildung 15). Zellen aus der Fermentation sind heller und rötlicher als Schüttelkulturzellen (siehe Abbildung 15), wobei diese Varianzen auf die unterschiedlichen Nährmedien zurückgehen könnten. Außerdem waren die fermentierten Zellen weniger stabil im Aufschluss mit der *French press* und zeigten unter gleichen Aufschlussbedingungen nahezu kein Zellpellet, aber ein kleines, weißes Einschlusskörper Pellet, das in den Schüttelkolbenkulturen nicht vorkam (siehe Abbildung 15). Nach der Reinigung konnten jedoch keine Unterschiede in der Proteinqualität der Proben aus den verschiedenen Kulturbedingungen festgestellt werden.

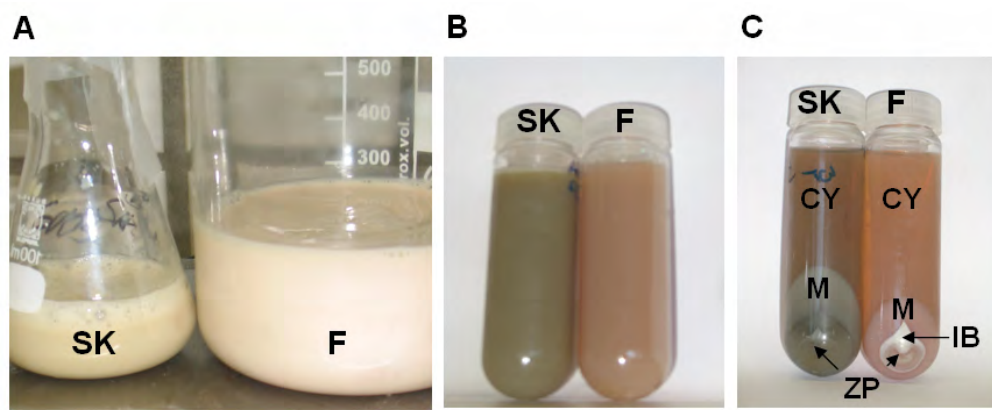


Abbildung 15: Vergleich von Zellemlusionen aus Schüttelkolben und Fermentationsexperimenten
A: Zellen nach aufschwemmen in Puffer, **B:** Zellen nach Zellaufschluss durch *French press*, **C:** Zellen nach Zentrifugation bei 25000 rpm. SK: Zellen aus Schüttelkolbenexpression; F: Zellen aus Fermentation; CY: Cytosol; M: Membranen; IB: *Inclusion bodies*; ZP: Zellpellet

Expression und Reinigung von Expression Baxmutanten

Die in dieser Arbeit verwendeten Baxmutanten wurden auf die gleiche Weise exprimiert und gereinigt wie das WT Protein.

Qualitäts- und Reinheitskontrolle von Bax WT und der Mutanten

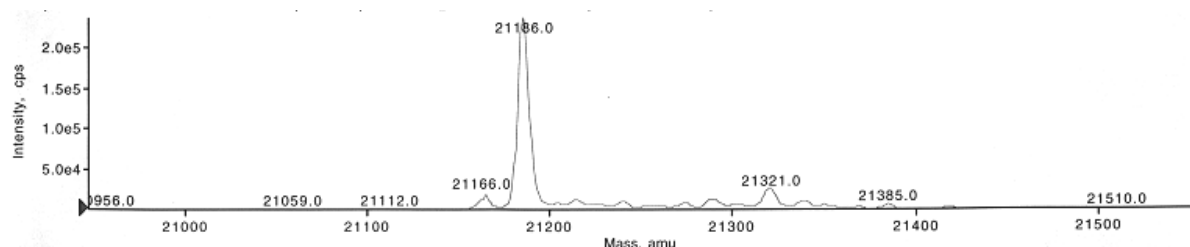


Abbildung 16: Dekonvolvierte Masse von Bax nach massenspektrometrischen Messungen (erwartet 21184, gefunden 21186)

Die Analyse des Proteins mittels SDS-Gelen, Reverse Phase Chromatographie und Massenspektroskopie zeigten einen hohen Reinheitsgrad des Proteins und eine ungewöhnliche hohe Hydrophobizität. Die ermittelte Masse von Bax ist in Abbildung 16

gezeigt. Die publizierte NMR-Struktur von Bax offenbarte einen Sekundärstrukturanteil des Proteins von 65%. Die Qualität der Proteinfaltung wurde durch CD-Spektroskopie überprüft, wobei ein Sekundärstrukturanteil von 60% im Monomer 64% im Oligomer berechnet wurde (siehe Kapitel 4). Das Protein scheint also korrekt gefaltet zu sein.

Vorstellung der untersuchten Konformationen von Bax

In den späteren Kapiteln dieser Arbeit werden verschiedene Baxproben (siehe Abbildung 17) untersucht:

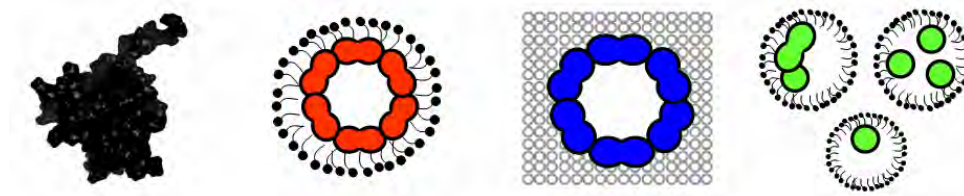


Abbildung 17: Darstellung der untersuchten Baxproben

Bax wurde in der Farbe dargestellt die auch in der weiteren Arbeit verwendet wird: Monomer: schwarz; Oligomer in Detergenz [OG, DM, DDM]: rot; Oligomer in Liposomen: blau; Bax in CHAPS: grün.

- (1) Das monomere Bax als inaktive Konformation (in schwarz gezeigt).
- (2) Das durch Detergenzugabe (0,5% DM, 0,5% DDM oder 2% OG) oligomerisierte Bax (in rot gezeigt; laut Literatur besitzt es viele Eigenschaften des aktiven Bax in Membranen: Es kann oligomerisieren, in Liposomen inserieren und macht sie durchlässig für Cytochrom c und Fluorophore ^(1,27,59,96,106)).
- (3) Das in Liposomen inserierte Bax als native, aktive und oligomere Konformation (in blau gezeigt).
- (4) Bax nach Zugabe des Detergenz CHAPS (in grün gezeigt; in der Literatur wird angenommen, dass die Zugabe von CHAPS zu Bax die Konformation des Proteins nicht beeinflusst ^(27,28,96,106)).

Lipidbilayer besitzen andere Eigenschaften als Detergenzmizellen. Sie bestehen aus drei Zonen: zwei hydrophilen, die von einer hydrophoben getrennt werden. Da Detergenzmizellen nur eine hydrophile und eine hydrophobe Zone haben, schirmen sie hydrophobe Proteinbereiche anders ab als Lipidbilayer ⁽¹⁰⁷⁾. Daher könnten die Eigenschaften und die Struktur von Bax in beiden Substanzen unterschiedlich sein. Viele Experimente dieser Arbeit sind daher in vergleichend beiden Substanzen durchgeführt worden. Die Strukturen einiger verwendeter Lipide und Detergenzien sind in Abbildung 18 gezeigt, wobei die hydrophilen und hydrophoben Bereiche der meisten Substanzen hervorgehoben sind.

Der Vergleich mit Bax in CHAPS sollte zeigen, ob dieses Detergenz die Baxkonformation tatsächlich nicht beeinflusst.

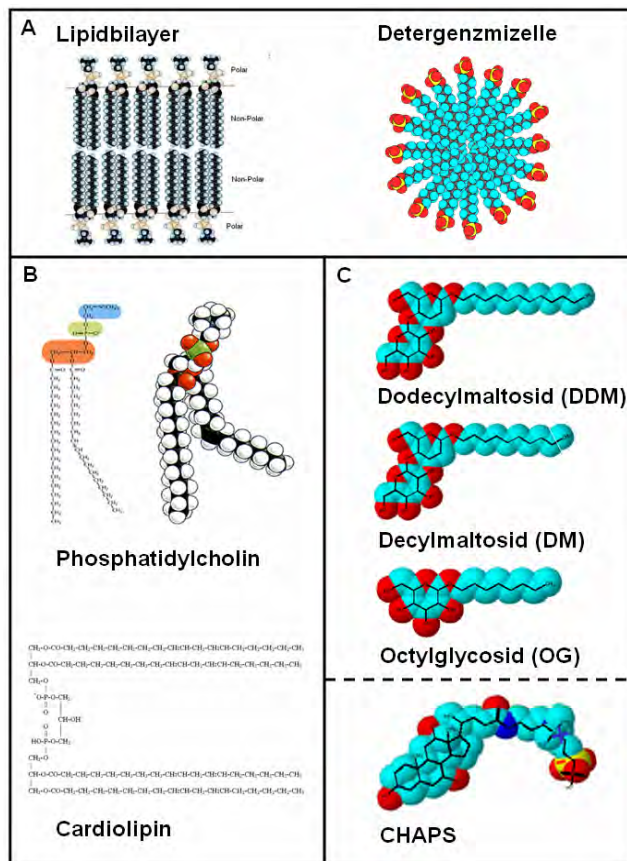


Abbildung 18: Darstellung der Struktur der verwendeten Detergenzien und einiger Lipide
A: Darstellung einer Lipiddoppelschicht und einer Detergenzmizelle; B: Darstellung einiger in der Arbeit verwendeten Lipide; C: Darstellung der Strukturen der verwendeten Detergenzien. Bei den Detergenzien sind hydrophobe Bereiche in blau und hydrophile in rot angezeigt.

Herstellung von oligomeren Bax in Detergenz

Um die Oligomerisierung von Bax zu induzieren wurde das Protein mit Detergenz inkubiert und die Oligomerisierung mit Größenausschlusschromatographie überprüft (siehe Kapitel 8). In der Literatur wurde zur Aktivierung meist das Detergenz OG (Octylglycoside) verwendet^(1,27,59). Einige Experimente dieser Arbeit zeigten jedoch, dass in DM (Decylmaltoside) oder DDM (Dodecylmaltoside) vorinkubiertes Bax, das native Protein in Membranen genauso gut oder noch besser widerspiegelt (siehe Kapitel 4, 7 und 8), worauf vorwiegend DDM als aktivierendes Detergenz verwendet wurde.

Herstellung von membranständigem Bax

Um Bax erfolgreich in Liposomen einzubauen musste es zuvor aktiviert werden⁽⁵⁹⁾. Dies konnte durch Detergenzzugabe oder c_8 Bid (Bid nach Aktivierung durch Caspase 8) geschehen (siehe Kapitel 4: ESR-Spektroskopie). Das BH3-*only* Protein c_8 Bid wurde nur selten verwendet, da es nachträglich nicht aus der Probe entfernt werden konnte und so einige Untersuchungen verfälschen konnte. Bei der Reinigung der Liposomen nach Insertion von Bax (mittels Dichtegradientenzentrifugation) wurden zwei Fraktionen isoliert (siehe

Abbildung 19A; verwendet wurden Lipidmischungen: 80% Phosphatidylcholin und 20% Cardiolipin oder in Lipidmixturen aus *E. coli*). Die Pellet Fraktion und die schwimmende Fraktion enthielten beide Lipid und Bax, was mittels SDS-Gelelektrophorese und Elektronenmikroskopie gezeigt wurde (siehe Abbildung 19B-D). In Rinderherzlipiden gab es eine dritte Fraktion, die auf dem Gradienten schwamm. Sie enthielt vermutlich Liposomen angereichert mit Cholesterin und Sphingolipiden (kamen nur in dieser Lipidmischung vor), die zum aufschwimmen neigen. Diese Fraktion zeigt, dass nicht alle Liposomen gleiche Lipidmischungen enthielten.

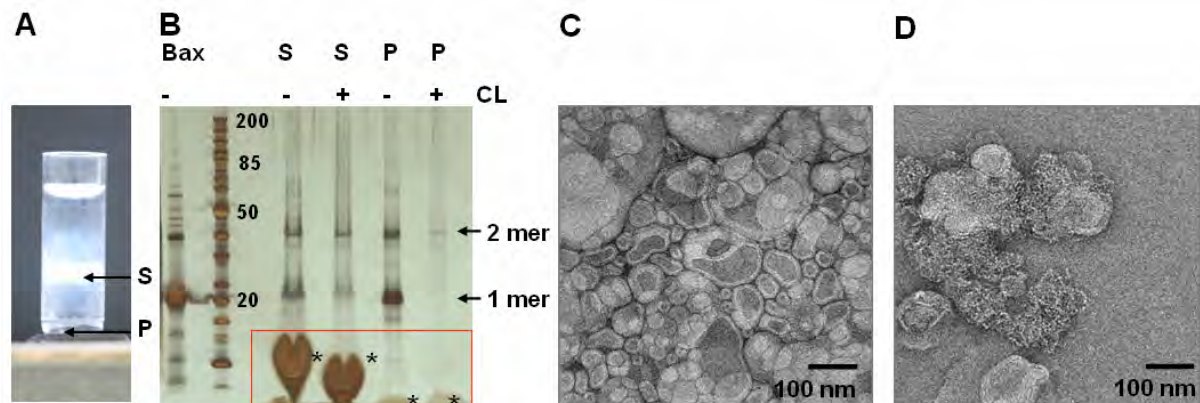


Abbildung 19: Baxeinbau in Liposomen und deren Reinigung

A: Aufspaltung der Lipidfraktionen nach Ultrazentrifugation im Nycodenzgradienten; **B:** 4-12% Gradientengel der Lipidfraktionen vor und nach Proteilvernetzung; **C:** Elektronenmikroskopische Aufnahme der Fraktion S; **D:** Elektronenmikroskopische Aufnahme der Fraktion P; **S:** schwimmende Lipidbande; **P:** Pellet Fraktion; **Rote Box:** Banden die Bax unabhängig durch die Liposomen entstehen

Das Lipid / Protein-Verhältnis ist in der löslichen Fraktion viel größer als in der Pellet Fraktion. Abschätzungen der Liposomendichte auf den Elektronenmikroskopienetzen zeigten, dass ca. 90% des Lipids in der schwimmenden Fraktion vorlag. Die Liposomen im Pellet erschienen im Elektronenmikroskop teilweise nicht mehr intakt zu sein (siehe Abbildung 19D). Ob ihre unregelmäßig Form aus Protein/Lipidaggregaten oder Liposomen, die durch starken Baxeinbau instabil wurden, resultierte, konnte nicht ermittelt werden.

Zur Optimierung der Rekonstitution von Bax in Liposomen wurde die Inkubationszeit und die Inkubationstemperatur untersucht (siehe Abbildung 20). Dabei zeigte sich, dass Bax schnell und auch bei niedrigen Temperaturen in Liposomen einbaut. Bei Temperaturzunahme sowie bei längeren Inkubationszeiten sind zwei Phänomene zu beobachten:

1. Bax liegt N-terminal verkürzt (auf Bax 39-192) vor (siehe auch Abschnitt Expression von Bax und Reinigung mit Hilfe eines Bax-Inteinfusionsproteins).
2. Die Pelletfraktion wird mit zunehmender Zeit und Temperatur größer. Der längere oder verstärkte Baxeinbau in die Liposomen macht diese also vermutlich instabil, wodurch sie im Gradient pelletieren.

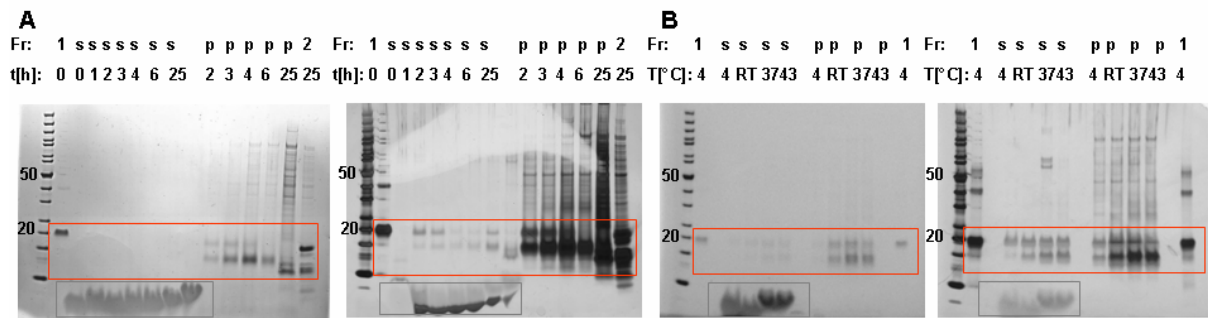


Abbildung 20: Analyse der löslichen und pelletieren Zentrifugationsfraktionen nach verschiedenen Inkubationszeiten und Inkubationstemperaturen.

A: Bax in den Fraktionen P und S nach verschiedenen Inkubationszeiten (links: Coomassie Färbung der Gele, rechts: Silberfärbung der Gele); **B:** Bax in den Fraktionen P und S nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen (links: Coomassie Färbung der Gele, rechts: Silberfärbung der Gele); Rote Box: Baxbanden; graue Box: Liposomen Banden

Bedeutung von Disulfidbrücken für die Oligomerisierung von Bax

Einige Experimente dieser Arbeit mussten in Abwesenheit von reduzierenden Reagenzien durchgeführt werden. Da Bax zwei Cysteine besitzt musste dabei sichergestellt werden, dass keine Disulfidbrücken ausgebildet werden, die die Struktur von Bax verändern. Bax liegt im Cytosol oder in der äußeren Mitochondrienmembran vor und sollte daher in der Zelle keine Disulfidbrücken ausbilden. In Stresssituationen sowie während der Apoptose werden in Zellen jedoch verstärkt Radikale (ROS; *reactive oxygen species*) gebildet, die das Redoxsystem der Zelle stark beanspruchen und den Schutz gegen Oxidation verringern. In Folge dessen wäre es denkbar, dass Cysteinbrücken zwischen den Baxmonomeren gebildet werden.

D'Alessio *et al.* beschäftigte sich mit der Fragestellung, ob der oxidative Stress die Aktivierung von Bax beeinflusst⁽¹⁰⁸⁾. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von H₂O₂ zu Säugerzellextrakten, die Dimerisierung von Bax verstärkt, während nach zusätzlicher Zugabe von Antioxidanzien dieser Effekt ausblieb⁽¹⁰⁸⁾. Allerdings wurde nicht gezeigt, ob es sich um einen direkten Effekt durch Disulfidbrücken in Bax oder einen indirekten Effekt (z.B. über die Aktivierung von BH3-*only* Proteinen) handelte. Eine nähere Analyse des Redoxzustand von Bax erschien daher notwendig.

Untersuchung der Cystein Zugänglichkeit mittels Cystein Labeling

Für Elektronenspinresonanz Messungen (in Kapitel 4 und 6 gezeigt) wurde ein Spinlabel an die Cysteine des Proteins gebunden. Diese Reaktion musste ohne Antioxidanzien durchgeführt werden, da sonst das freie Elektron im Label reduziert würde, wobei das Label nur an reduzierte Cysteine gebunden werden kann. Die Experimente zeigten eine Labelingeffizienz von nahezu 100% (gezeigt in Abbildung 21), Bax muss also reduziert vorgelegen haben.

Zur Analyse von Strukturänderungen in Abwesenheit des Antioxidanz wurden auch Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturanalysen durchgeführt (siehe Anhang 3). Direkte Aussagen über den Redoxzustand von Bax in Säugerzellen sind mit Hilfe dieses Experimentes nicht möglich, es legt jedoch nahe, dass eine Disulfidbrückenbildung in der Zelle in irgendeiner Form katalysiert werden müsste.

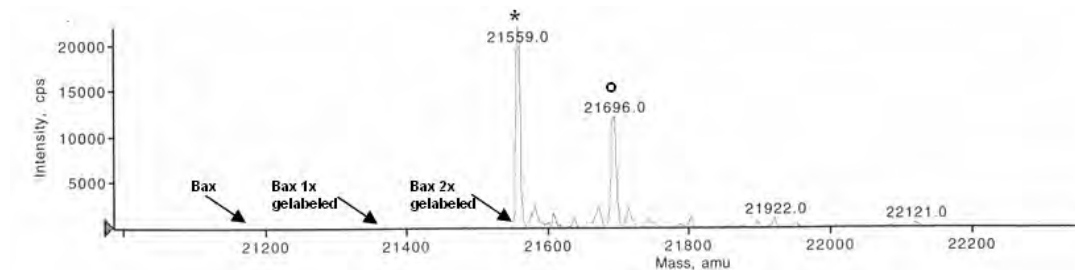


Abbildung 21: Spinlabelingeffizienz an Bax

*Deconvolierte Masse vom gelabelten Bax: 21559 Da (abzüglich zweimal 185 Da vom MTSSL ergibt 21189 Da); Masse von Bax vor dem Labeling: 21188 Da (theoretische Masse von Bax: 21184 Da). Das Protein wurde also zu nahezu 100% gelabelt. ° In der Reinigung von Bax wird immer ein Anteil eines um 137 Da schweren Bax identifiziert, woher diese zusätzliche Masse stammt, ist unklar.

Zusammenfassung:

Bax wurde sowohl in der monomeren, inaktiven als auch in der oligomeren, aktiven Konformation hergestellt. Das Protein hatte die erwartete Masse und Sekundärstruktur und es wurden keine Disulfidbrücken ausgebildet.

Kapitel 3: *In silico* Analyse von Bax

Ziel: Die Identifizierung und Analyse funktionell relevanter Bereiche von Bax anhand Aminosäuresequenzen aus verschiedenen Organismen und der NMR-Struktur des Proteins

Primärstrukturanalyse von Baxproteinen aus Säuge- und Wirbeltieren

Die DNA- und somit die Aminosäuresequenzen von Bax aus verschiedenen Organismen sind durch Genomprojekte zugänglich geworden, wodurch konservierte Regionen im Protein untersucht werden können. Sie sind für eine Analyse der Proteinstruktur interessant, da Mutationen meist in funktionell weniger wichtigen Bereichen etabliert werden und konservierte Bereiche daher oft gleichzeitig funktionell relevante Bereiche sind.

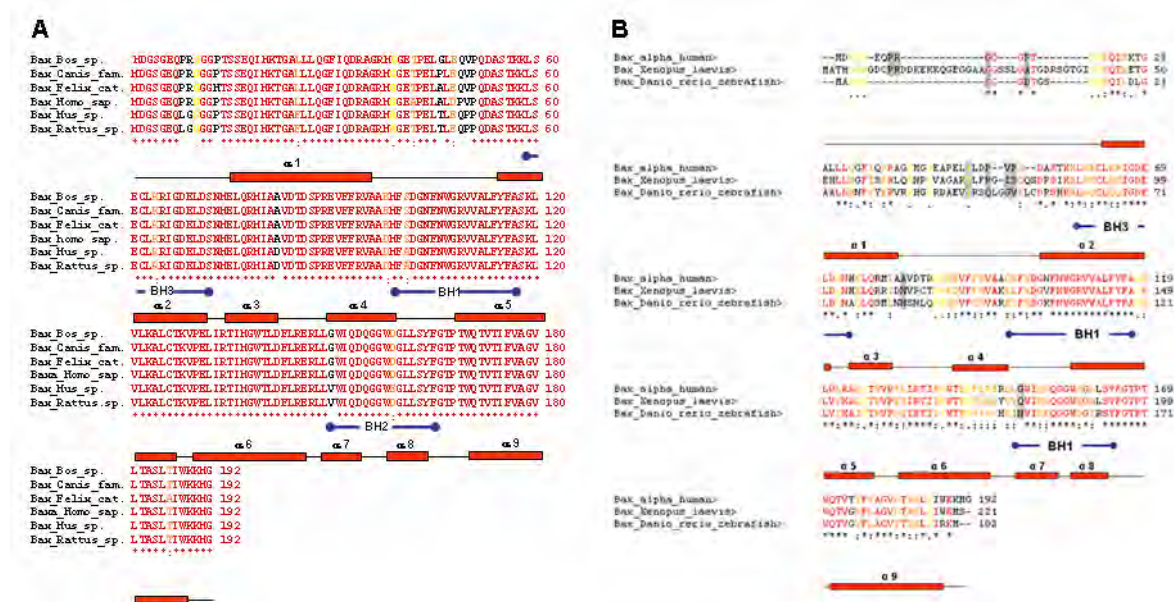


Abbildung 22: Clustal W Alignment von Bax alpha aus verschiedenen Spezies

A: aus Säugetieren; B: aus Vertebraten. Aminosäuren die in allen Organismen unverändert vorkommen sind rot mit Stern gekennzeichnet, hochkonservierte orange mit Doppelpunkt, konservierte gelb mit Punkt und nicht konservierte schwarz dargestellt. Aminosäuren, die in Säugern nicht konserviert sind wurden in B grau hinterlegt. Unter den Sequenzen sind die Bcl-2 Homologie Domänen in blau und Sekundärstrukturelemente in rot eingblendet.

Im Menschen wurden verschiedene, aus differenziellem Spleißing hervorgegangene Isoformen von Bax identifiziert. Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurde Bax alpha verwendet, da es die am meisten exprimierte und am besten untersuchte Isoform ist. Viele Genomprojekte identifizierten Baxsequenzen oder -teilstrecken, aber nur in vier Organismen wurden sie als Bax alpha annotiert. Bei den anderen Sequenzen treten oft Insertionen oder N-terminale Verlängerungen auf, die darauf hinweisen, dass die Sequenz kein korrektes Bax alpha codiert (Beispiel Schimpanse: nur zwei Aminosäureaustausche innerhalb der Baxsequenz ausgetauscht, aber eine N-terminale Verlängerung von 70 Aminosäuren; die die Sequenzhomologie beider Gene von 99% auf 74% senkt). Um

derartige Fehlerquellen zu umgehen und trotzdem die Anzahl von Sequenzen zu erhöhen, wurden gezielt nur vollständige und N-terminal nicht über 30 Basen verlängerte Sequenzen ausgewählt.

Abbildung 22A zeigt den Sequenzvergleich von Baxproteinen aus verschiedenen Säugetierspezies. Das Protein ist stark konserviert. Von 192 Aminosäuren sind 173 (90%) identisch und acht weitere hoch konserviert (zum Vergleich: Bei Cytochrom c-Sequenzen aus Mensch, Maus, Rind und Kaninchen sind nur 46% der Aminosäuren identische und 18% hochkonserviert). Die meisten Aminosäureaustausche in Bax sind am N-Terminus oder in der Loop Region zwischen $\alpha 1$ und $\alpha 2$, den flexibelsten Regionen im Protein (laut NMR-Daten ⁽¹⁾), bei denen beiden eine regulative Funktion vermutet wird ⁽⁸⁸⁾. Die hohe Konservierung ermöglicht keine Identifikation von potenziell funktionellen Bereichen, daher wurde der Sequenzvergleich auf Wirbeltierspezies aufgeweitet. Wieder wird eine hohe Sequenzkonservierung gefunden: 85 Aminosäuren sind identisch (44%), 43 (22%) hochkonserviert und 19 (10%) konservierte (siehe Abbildung 22B). Nun sind besonders hoch konservierte Bereiche sichtbar, auf die im nächsten Abschnitt eingegangen wird. Insgesamt ist die C-terminale Proteinhälfte (Aminosäure 98-192; insgesamt 90% der Aminosäuren konserviert, davon 58% identisch) stärker konserviert als die N-terminale (Aminosäure 1-97; 62% konservierte Aminosäuren davon 34% identisch). Die Sequenzkonservierung in der C-terminalen Hälfte ist damit fast so hoch, wie in den BH Domänen (68% identisch, und 92% konservierte).

Darstellung der konservierten Aminosäuren auf der Proteinoberfläche mit Hilfe der NMR-Struktur Daten des Proteins

Die konservierten Aminosäuren aus dem in Abbildung 22B gezeigten Alignment von Bax aus Wirbeltieren werden in Abbildung 23 in die NMR-Struktur des Proteins (1F16 ⁽¹⁾) eingeblendet (siehe Abbildung 23B, D, F). Besonders hoch konservierte Bereiche sind: (1) Der Proteinkern (siehe Abbildung 23F), (2) $\alpha 9$ (siehe Abbildung 23B oben und mitte) sowie (3) die sie bindende hydrophobe Furche und deren Umgebung (Teile von $\alpha 2$, $\alpha 5$ und $\alpha 8$; siehe Abbildung 23D oben und mitte). Alle konservierten Bereiche sind gleichzeitig hydrophobe Bereiche (siehe Abbildung 23C, E), in Bezug auf die Oberflächenbereiche ist dies ungewöhnlich für ein lösliches Protein.

Isoformen von Bax und ihre funktionellen Besonderheiten

Isoformen können, wenn es Daten zu ihrer Aktivität gibt Informationen zu funktionell relevante Proteinbereichen liefern. Während Bax alpha gut untersucht wurde, gibt es über die meisten anderen Isoformen nur wenige Informationen (zusammen gestellt in Tabelle 2).

Näher untersucht wurden nur Bax psi, eine N-terminal verkürzte Isoform, und Bax Δ TM, eine künstlich erzeugte und biochemisch untersuchte C-terminal verkürzte Baxvariante.

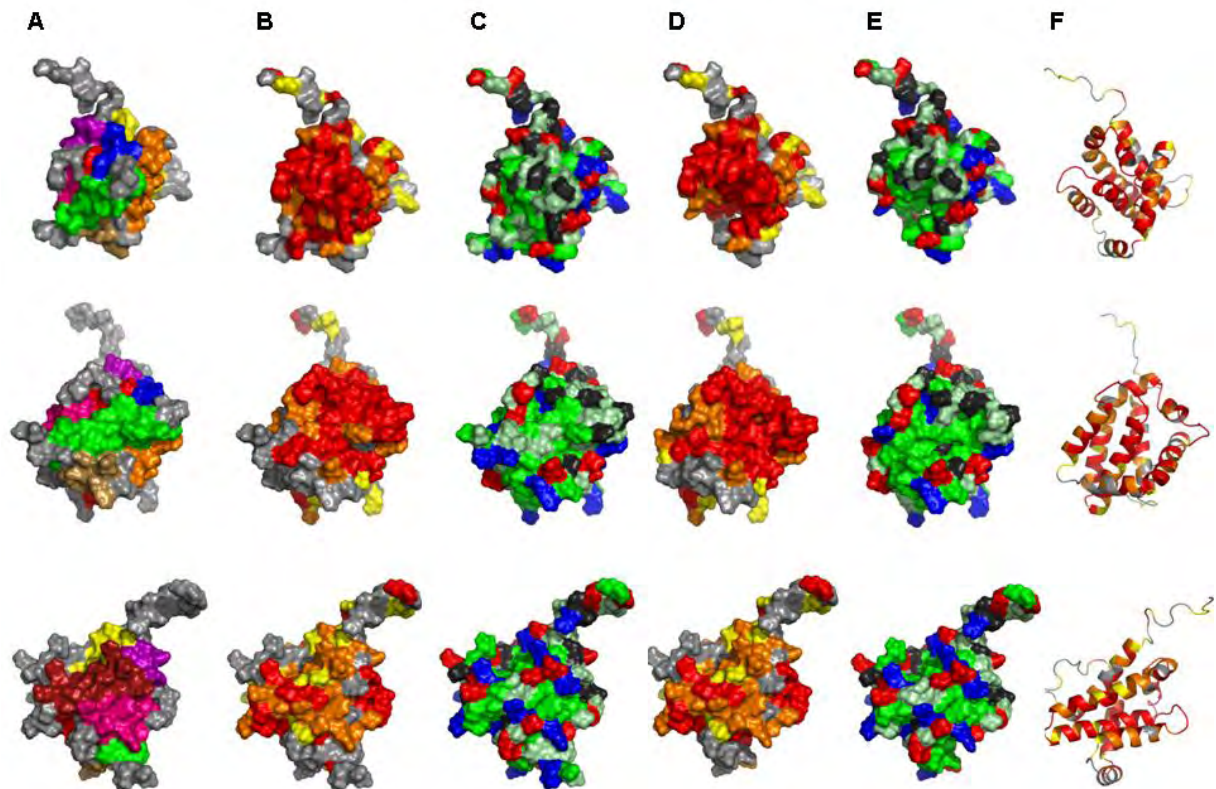


Abbildung 23: Band- und Oberflächendarstellungen von Bax (PDB: 1F16) aus drei verschiedenen Perspektiven

A - C: Darstellung des Volllänge; D - F Darstellung von Bax ohne α 9; A: Oberflächendarstellung mit eingblendeter Sekundärstruktur. Farbcode: α 1 - gelb, α 2 - orange, α 3 - sand; α 4 - rosa, α 5 - rot, α 6 - dunkelrot, α 7 - lila; α 8 - blau, α 9 - grün; B und D: Darstellung der in Wirbeltieren konservierten Aminosäuren. In D (besonders in der mittleren Darstellung) ist durch das Fehlen von α 9 die hoch konservierte hydrophobe Furche sichtbar. Unveränderte Aminosäuren sind rot dargestellt, hochkonservierte orange, konservative gelb und die anderen grau; C und E Darstellung der Hydrophobizität der Aminosäuren auf der Baxoberfläche. In E ist durch das Fehlen von α 9 die Hydrophobizität der Furche sichtbar (besonders in der mittleren Darstellung). Dunkelgrün: sehr hydrophobe Aminosäuren (I,L,V,A,C,M,F), hellgrün: leicht hydrophobe Aminosäuren (G,W,S,T), rot: saure Aminosäuren (E,D), blau: basische Aminosäuren (K,R,H) und die restlichen Aminosäuren (Y,Q,P,N) sind schwarz eingblendet. F: Banddarstellung von Bax ohne α 9 mit farblicher Darstellung des Konservierungsgrades der Aminosäuren in Wirbeltieren. Farbcode wie in B und D.

Bax psi ist eine N-terminal um 19 Aminosäuren verkürzte Isoform, die in Hirntumorgewebe (glioblastoma multiform) entdeckt wurde⁽¹⁰⁰⁾. Statistisch gesehen überleben Patienten, die Bax psi im Tumorgewebe exprimieren, länger als Patienten, die nur Bax alpha exprimieren. Bax psi wirkt stärker toxisch auf Zellen als Bax alpha, es ist nicht cytosolisch, sondern nur membranständig^(26,99). Die 19 N-terminalen Aminosäuren werden als ART (*apoptosis regulating targeting*) Sequenz bezeichnet. Sie ist nicht essentiell für die Membraninsertion oder Oligomerisierung von Bax, aber vermutlich an der Aktivierung und Stabilisierung der inaktiven, cytosolischen Konformation beteiligt, da Bax psi wurde nicht in dieser

Konformation gefunden wurde. Verkürzt man Bax um 37 N-terminale Aminosäuren, sodass $\alpha 1$ komplett fehlt oder wird $\alpha 1$ mutiert (z.B. Bax L26G), erniedrigt dies die Insertionsrate von Bax in die Membran⁽⁹²⁾. Bax Δ 1-37 kann also vermutlich keine der beiden Baxkonformationen einnehmen.

Isoform	Exon Zusammensetzung	Protein Struktur	Herkunft	Funktionelle Besonderheiten
Bax alpha ⁽⁹⁷⁾	1-2-3-4-5-6	192 As; BH1, BH2, BH3, $\alpha 9$ vorhanden	Alle untersuchten Gewebe	
Bax beta ⁽⁹⁷⁾	1-2-3-4-5-intron5-6	218 As; BH1, BH2, BH3; $\alpha 9$ fehlt	In vielen humanen Geweben nachgewiesen ⁽¹⁰⁹⁾	Keine Publikationen vorhanden
Bax tau/ gamma ⁽⁹⁷⁾	1-*3-4-5-6	41 As; $\alpha 9$ fehlt	Nicht beschrieben.	Keine Publikationen vorhanden
Bax delta ^(110,111)	1-2-4-5-6	143 As; BH1, BH2, $\alpha 9$ vorhanden	Aus cDNA Bibliothek	In Tumor Zelllinien nach p53 Überexpression gefunden, proapoptotisch.
Bax sigma ⁽¹¹²⁾	1-2-3-4-5-Teil von 6	180As; Δ 159-171As, BH1, Teil von BH2, BH3; $\alpha 9$ vorhanden	Viele menschliche Gewebe	Proapoptotisch, interagiert mit Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL aber nicht mit Bad oder Bik in Y2H
Bax psi ⁽¹⁰⁰⁾	Teil von 1-2-3-4-5-6 Translation beginnt an zweitem ATG	173 As; Δ 1-19 As; BH1, BH2, BH3; $\alpha 9$ vorhanden	Entdeckt in Tumorgewebe m-RNA in vielen anderen Geweben nachgewiesen	Stärker proapoptotisch als Bax alpha, nur membran-insertiert
Bax omega ⁽¹⁰⁹⁾	1-2-3-4-5*	221 As; BH1, BH2, BH3, $\alpha 9$ fehlt	In vielen Geweben nachgewiesen	Interagiert mit Bcl-2 und Bax alpha. Je nach Zelllinie pro oder antiapoptotische Wirkung beschrieben
Bax epsilon ⁽¹¹³⁾	1-2-3-4-*intron4-5	164 As (1-123 identisch zu Bax alpha); BH1, BH3; $\alpha 9$ fehlt	Aus Mausgewebe	GST- Bax epsilon kann Bax alpha, Bax epsilon und Bcl-2 binden schwächere proapoptotische Wirkung als alpha.
Bax zeta	4-5-6	As 79-192; ; BH1, BH2, $\alpha 9$ vorhanden	Aus Ovarien carcinomas	Nur Datenbankeintrag
Bax ΔTM ⁽²⁷⁾	-	As 1-171; BH1, BH2, BH3, $\alpha 9$ fehlt	Künstlich	Kann Oligomerisieren und in die Membran einbauen.

Tabelle 2: Zusammenfassung der publizierten Daten zu den Isoformen von Bax. Das Gen von Bax liegt im Menschen auf Chromosom 19 ⁽¹¹⁰⁾. Bax alpha setzt sich aus sechs Exons zusammen ⁽⁹⁷⁾. Exon 1: As 1-11; Exon 2: As 12-29; Exon 3: As 30-78; Exon 4: As 79-123 (BH1); Exon 5: 124-158 (BH2); Exon 6: As 159-192; *Leserasterverschiebung;

Bax Δ TM fehlt $\alpha 9$. Die Funktion dieser Helix ist umstritten, wobei ihre Hydrophobizität auf eine Funktion als Membrananker hinweist ⁽⁵⁸⁾. Ohne ihre Bindung an die hydrophobe Furche ist diese frei zugänglich ⁽¹⁾. Bax Δ TM kann oligomerisieren und in die Membranen eingebaut werden, ist aber weniger toxisch als das Volllängeprotein ^(27,114,115).

Strukturelle Unterschiede in der Tertiärstruktur der Bcl-2 Proteine

In den letzten Jahren sind eine Reihe von NMR- und Kristallstrukturen von Bcl-2 Proteinen publiziert worden. Dabei zeigte sich die Tertiärstruktur erstaunlich stark konserviert, egal ob pro- (Bax und Bak) oder antiapoptotische (Bcl-2 und Bcl-w) Familienmitglieder betrachtet wurden (siehe Abbildung 24). Die deutlichsten Strukturunterschiede finden sich im Bereich von $\alpha 9$ und der hydrophoben Furche (vor allem an der BH3 Domäne).

Vergleicht man die Bindung von $\alpha 9$ in Bax und Bcl-w (keine der anderen Bcl-2 Strukturen zeigt $\alpha 9$) an die hydrophobe Furche, mit der Bindung von Peptiden (aus BH3 Domänen) an die hydrophobe Furche von Bcl-xL zeigen sich klare Unterschiede (siehe Abbildung 24, oben und mitte). Da die Interaktion mit BH3-Peptiden Bcl-2 Proteine regulieren kann, kommt $\alpha 9$ und der hydrophoben Furche wohl eine besondere funktionelle Bedeutung zu. Der Vergleich vom aktiven Bax mit dem inaktiven Bak zeigt auch deutliche Unterschiede in der hydrophoben Furche. $\alpha 2$ (BH3 Domäne) und $\alpha 3$ sind im inaktiven Bak verschoben und verkleinern damit die hydrophobe Furche, sodass eine Bindung von $\alpha 9$ unwahrscheinlich erscheint. Diese Verschiebung könnte also direkt die Aktivität beeinflussen.

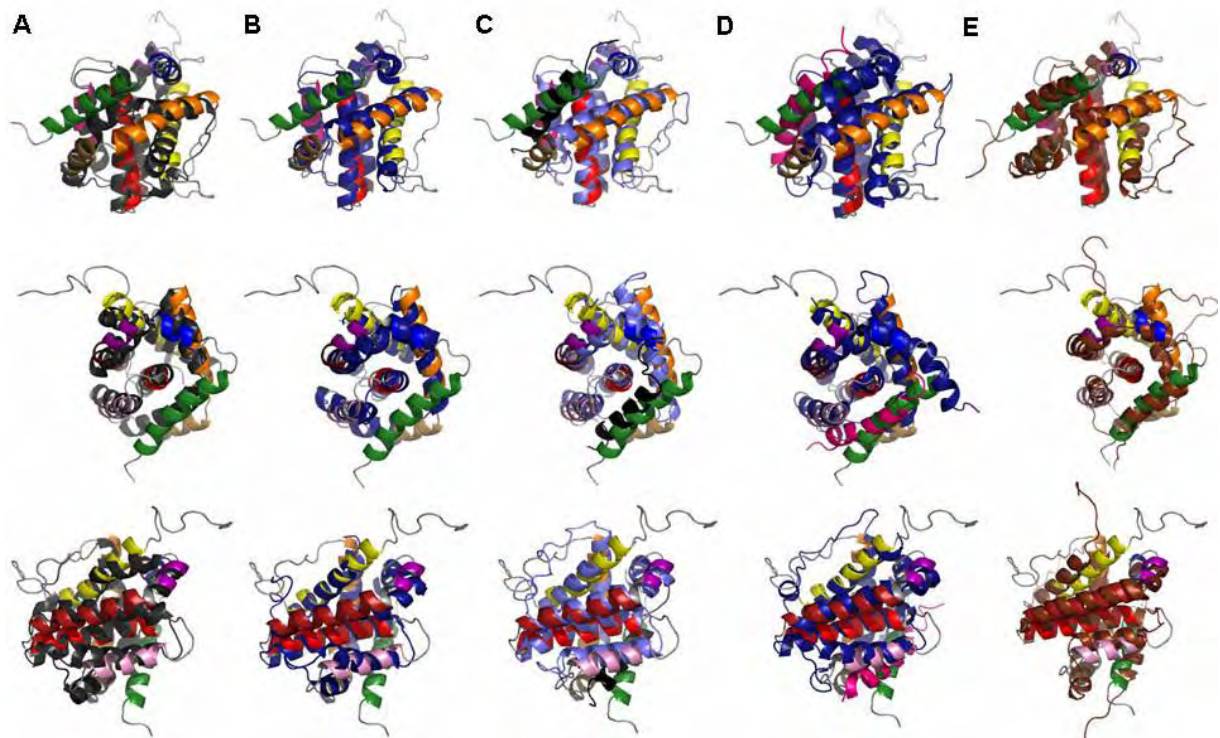


Abbildung 24: Vergleich der Tertiärstrukturen verschiedener Bcl-2 Proteine

Drei verschiedenen Ansichten (oben, mitte und unten) der Strukturdarstellung von Bax und A: inaktiven Bak ohne $\alpha 9$; B: Bcl-xL ohne $\alpha 9$; C: Bcl-xL ohne $\alpha 9$ mit den BH3 Peptid von Beclin 1; D: Bcl-xL ohne $\alpha 9$ mit den BH3 Peptid von Bad; E: Bcl-w. Farbcode: Bax ($\alpha 1$ - gelb, $\alpha 2$ - orange, $\alpha 3$ - sand; $\alpha 4$ - rosa, $\alpha 5$ - rot, $\alpha 6$ - dunkelrot, $\alpha 7$ - lila; $\alpha 8$ - blau, $\alpha 9$ - grün); Bak (dunkelgrau) Bcl-xL (blau); Beclin 1 (schwarz); Bad (pink); Bcl-w (braun)

Zusammenfassung:

Die Aminosäuresequenz von Bax, besonders in der C-terminalen Proteinhälfte, ist extrem hoch konserviert. Funktionell interessant scheint ein hoch konservierter und gleichzeitig hydrophober Bereich auf der Proteinoberfläche aus $\alpha 9$, der sie bindenden hydrophoben Furche und ihrer Umgebung (Teile von $\alpha 2$, $\alpha 5$ und $\alpha 8$) zu sein. Der N-Terminus vor $\alpha 1$ scheint dagegen wichtig zur Einnahme der monomeren, cytosolischen Konformation zu sein, wie die Untersuchungen an Bax psi zeigten.

Kapitel 4: Untersuchungen der Sekundär- und Tertiärstruktur von Bax

Ziel:

Die Sekundär- und Tertiärstrukturanalyse von Bax hatte zum Ziel, die Ergebnisse mit den publizierten Daten von Bax zu vergleichen, Unterschiede zwischen beiden Baxkonformationen zu identifizieren und Informationen zur strukturellen Charakterisierung des aktiven, oligomeren Bax zu sammeln.

Ergebnisse

Sekundärstrukturanalyse

Circular-Dichroismus-Spektroskopie

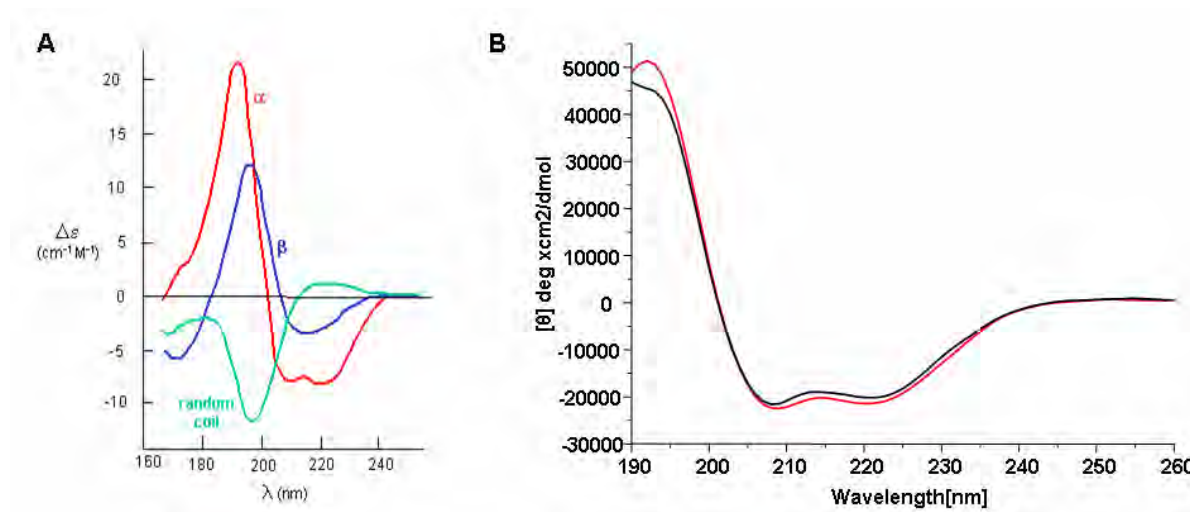


Abbildung 25: CD-Spektroskopie an Bax

A: Modell Spektren einer α -Helix, eines β -Faltblatts und einer random coiled Sekundärstruktur; B: CD-Spektren des monomeren (Schwarz; 60% α -Helix) und des oligomeren Bax (rot; (64% α -Helix).

α -Helices, β -Faltblätter und unstrukturierte Regionen von Proteinen haben charakteristische, optische Eigenschaften, die zu bestimmten Linienformen von CD-Spektren führen (siehe Abbildung 25A⁽¹¹⁶⁾). Sie ermöglichen es aus dem CD-Spektrum eines Protein die Sekundärstrukturanteile zu berechnen⁽¹¹⁷⁾. Manche Proteine verändern während Konformationsänderungen ihre Sekundärstruktur, bei Bax scheint das nicht der Fall zu sein. Das monomere Bax hatte die typische Linienform eines α -helikalen Proteins mit 60% α -Helices (siehe Abbildung 25B und Tabelle 3; Maximum bei 194 nm, Minima bei 208 nm und 222 nm). Die Daten passen zu den NMR-Untersuchungen (65% Anteil α -Helices;⁽¹⁾) und bereits publizierten CD-Spektren von Bax (66% Helix;⁽¹¹⁸⁾). Das oligomere Bax hatte eine sehr ähnliche Linienform und 64% α -Helices (Daten für DDM in Abbildung 25B; DM und OG

Daten fast identisch). Die Abweichung von 4% ist vernachlässigbar, da sie innerhalb der Messgenauigkeit der CD-Spektroskopie und der UV/Vis-Spektroskopie zur Proteinkonzentrationsmessung liegt. In Liposomen eingebautes Bax wurde nicht vermessen, da dort die Konzentration von Bax nicht genau ermittelt werden konnte. In CHAPS konnten keine vollständigen Spektren aufgenommen werden, da unterhalb von 215 nm starkes Hintergrundrauschen die Messung störte.

Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FTIR)

Für die Sekundärstrukturanalyse von Proteinen mittels FTIR wird die Energieaufnahme der Bindungen im Peptidrückrad genutzt. Die Wasserstoffbrückenbindungen in Helices und Faltblättern beeinflussen die Absorptionsmaxima der Amid I und Amid II Bande (im wesentlichen C=O Streckschwingung; Absorption bei ca. 1600-1700 cm^{-1} bzw. N-H Biege/C-N Streckschwingung; Absorption bei ca. 1480-1575 cm^{-1}), sodass die Lage ihrer Maxima Aussagen zu Sekundärstrukturanteilen zulässt (siehe Tabelle 3 ⁽¹¹⁹⁾). Allerdings absorbieren einige Aminosäureseitenketten und H₂O im selben Wellenzahlenbereich wie die Amid I Bande und erschweren die Datenauswertung ⁽¹²⁰⁾.

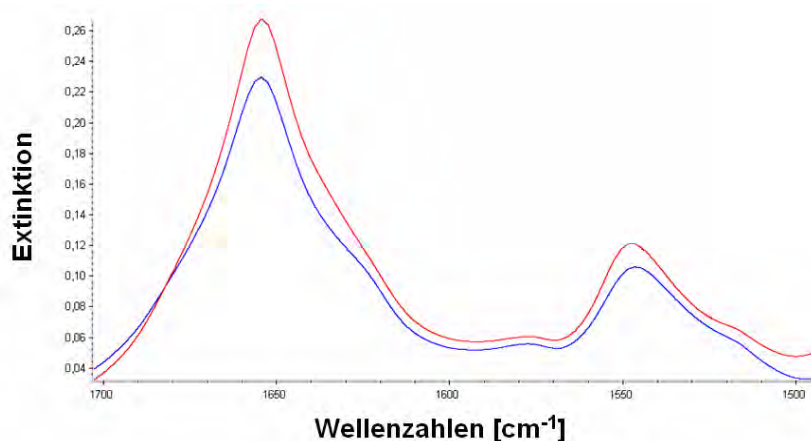


Abbildung 26: FTIR-Spektren von monomeren und oligomeren Bax im Bereich von 1500 bis 1700 cm^{-1} . Die das monomere Bax ist hier abweichend von sonst verwendeten Farbcode als blaue Kurve gezeigt, die rote Kurve zeigt das oligomere Bax in DDM. Aus den Spektren wurde mit Hilfe des Programms OMNIC von Thermo die Sekundärstrukturanteile berechnet.

In Abbildung 26 sind die FTIR-Spektren beider Baxkonformationen gezeigt. Es zeigen sich keine deutlichen Unterschiede. Das Amid I Maximum beider Proben liegt bei 1654 cm^{-1} im Bereich eines vorwiegend α -helikalen Proteins (siehe Tabelle 3). Für das Monomer wurde der Anteil an α -Helices mit 60% berechnet, im Oligomer war er mit 71% höher (siehe Tabelle 3), allerdings berechnete das Programm für das Oligomer einen β -Faltblatt Anteil von -4%, der zeigt, dass die Datenberechnung nicht zufriedenstellend erfolgte. Das Spektrum des monomeren Bax zeigt im Unterschied zu dem des Oligomers eine leichte Schulter bei etwa 1625 cm^{-1} . In diesem Bereich absorbieren intermolekulare β -Faltblätter ⁽¹¹⁹⁾, und die Seitenketten von Lysin, Asparagin oder Tyrosin ⁽¹²⁰⁾. Zusammengenommen zeigen die CD-,

und FTIR-Daten, das Bax gefaltet vorliegt und die Oligomerisierung keine deutlichen Änderungen in der Sekundärstruktur hervorbringt.

Sekundärstruktur	Maxima Amid I [cm-1]	Monomer [%]	Oligomer [%]
α -Helix	1650-1658	60,6 (CD: 60)	71,4 (CD: 64)
β -Faltblatt	1632-1638, 1695-1675, 1615-1625 (intermolekulare)	3,7 (CD: 8)	- 4 (CD: 7)
Turns	1650-1690	13,6 (CD: 14)	13,9 (CD: 15)
Bends		6,9	5,6
Rest/ radom coil	1652-1660	13,3 (CD: 21)	12,4(CD:21)

Tabelle 3: Ermittelte Sekundärstrukturanteile von monomerem und oligomerem Bax mit Hilfe von FTIR- und CD-Spektroskopie

Untersuchungen der Tertiärstruktur von beiden Konformationen von Bax

Tryptophanfluoreszenz

Je polarer die Umgebung eines Tryptophans ist, desto größerer ist die Wellenlänge des emittierten Lichtes (in Bereich zwischen 308 und 350 nm). Nach dem Strukturmodell des monomeren Bax sind alle Tryptophane dem Lösungsmittel zugewandt. Das Licht sollte also im längerwelligen Bereich emittiert werden, was das gemessene Spektrum bestätigte (siehe Abbildung 27C; Maximum bei 336 nm). Um sicher zu stellen, dass die Detergenzzugabe keine Veränderungen der Umgebungspolarität auslöst, wurde acetyliertes Tryptophan in An- und Abwesenheit der Detergenzien vermessen. Die Detergenzzugabe verursachte nur sehr geringe Veränderungen der Fluoreszenz (siehe Abbildung 27D), sodass alle Verschiebungen des Emissionsmaximums auf Konformationsänderungen im Protein beruhen müssen.

Die Zugabe von DM, DDM oder OG zu Bax und der Einbau in Liposomen verursachte eine Blauverschiebung des Emissionsmaximums von bis zu 8 nm. Die Emissionsmaxima in DM, DDM und Liposomen waren mit 327 - 328 nm nahezu gleich, die Umgebung der Tryptophane scheint also in diesen Substanzen sehr ähnlich zu sein. Das Emissionsmaximum in OG lag bei 331 nm, und das in CHAPS bei 334 nm (siehe Abbildung 27C). Auch die Emissionsintensitäten variierten zwischen den Proben (siehe Abbildung 27E). In Anwesenheit von Detergenz waren sie erhöht: drei- bis vierfach in DM und DDM und zweifach in OG. Die Probe in Liposomen konnte nicht in diesen Vergleich einbezogen werden, da dort die Proteinkonzentrationen nicht genau bestimmt werden konnten.

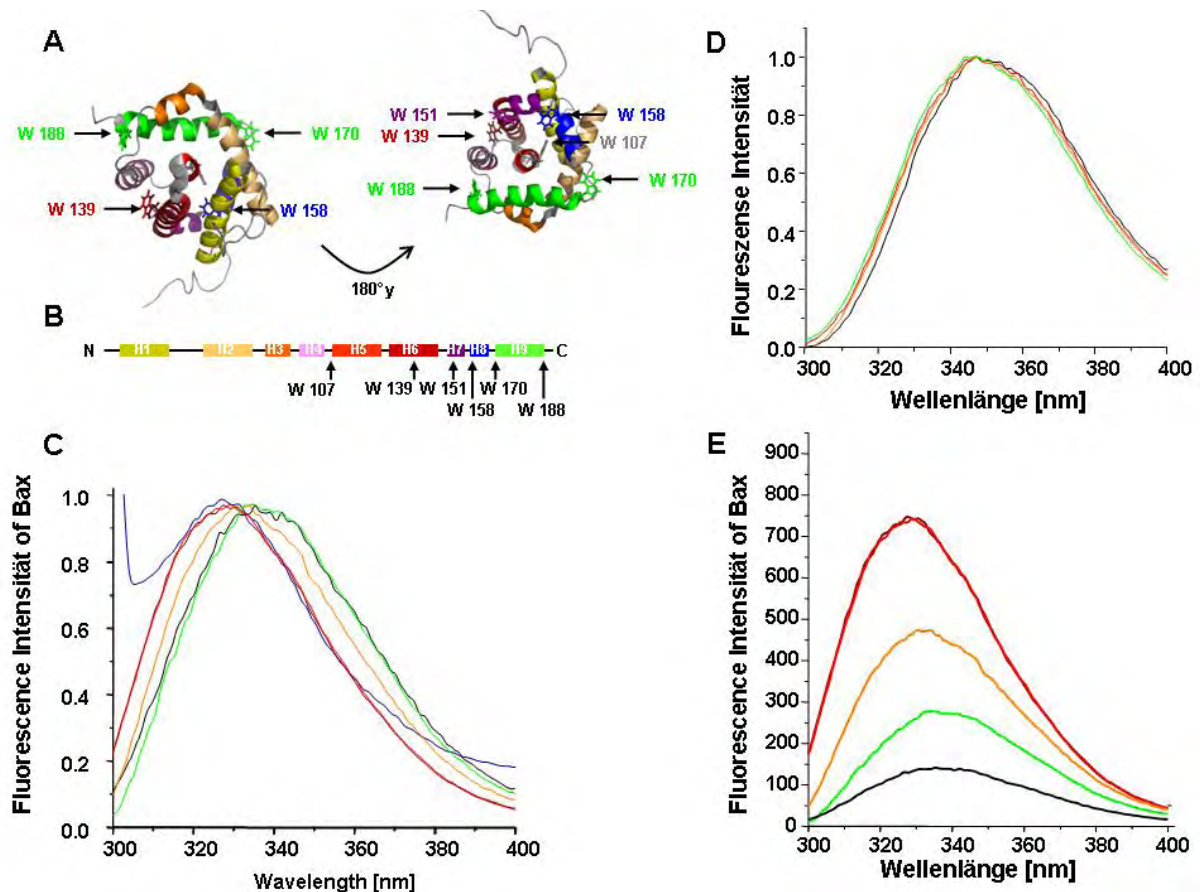


Abbildung 27: Tryptophan Fluoreszenz von Bax

A, B: In die Tertiärstruktur (A) sowie Primär- und Sekundärstruktur (B) von Bax eingeblendete Tryptophane; C: Normierte Tryptophan Fluoreszenz Spektren von monomeren und oligomeren Bax. Farbcode: Probe ohne Detergenz - schwarz; in 0.5% DM - rot, in 0.5% DDM - dunkelrot, in 2% OG - orange, in Liposomen - blau (80% Phosphatidylcholin und 20% Cardiolipin oder Lipidextrakten aus Rinderherzen) und in 2% CHAPS - grün. D: Normierte Tryptophan Fluoreszenz Spektren von acetylierten Tryptophan in Puffer mit und ohne Detergenz. E: Nicht normierte Tryptophan Fluoreszenz aus C.

Proteaseverdau

Goping *et al.* verglich die Proteasezugänglichkeiten von Bax in Säugerzellextrakten vor und nach der Apoptoseinitiation der Zellen⁽²⁶⁾. Es zeigte sich, dass der N-Terminus von Bax während der Aktivierung des Proteins zugänglicher wurde.

Identifizierte Fragmentanfänge (aus N-terminalen Sequenzieren)	Baxmonomer nach Subtilisin-verdau	Baxoligomer nach Subtilisin - verdau
Aminosäure 1	> 90%	< 40%
Aminosäure 39	< 10%	> 50%
Aminosäure 47		
Aminosäure 29,33	-	< 10%

Tabelle 4: Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierung von Bax nach Subtilisinverdau

In Goping *et al.* wurden die Schnittstellen nicht näher untersucht, sodass weitere Schnittstellen unentdeckt geblieben sein könnten (z.B. in der C-terminalen Proteinhälfte). Daher wurde der proteolytische Abbau mit dem rekombinant hergestellten Bax (Monomer

und Oligomer) wiederholt. Die Abbaumuster glichen denen aus den Säugerezellen. Das rekombinante Protein schien also dieselbe Struktur wie das native Bax der Zellen gehabt zu haben. Das Experiment zeigte auch, dass die Oligomerisierung den C-Terminus von Bax stabiler gegen die Protease macht, wogegen der N-Terminus zugänglicher wurde. Zum Verdau wurden Proteinase K und Subtilisin verwendet, die identifizierten Schnittstellen waren bei beiden nahezu identisch, wobei Proteinase K effektiver arbeitete (gezeigt in Tabelle 5). Die Datenanalyse erfolgte mittels einer Kombination aus SDS-Gelelektrophorese, N-terminaler Sequenzierung und Massenspektroskopie (LC-MS).

Monomeres Bax hat einen stabilen N-Terminus aber eine flexible $\alpha 9$

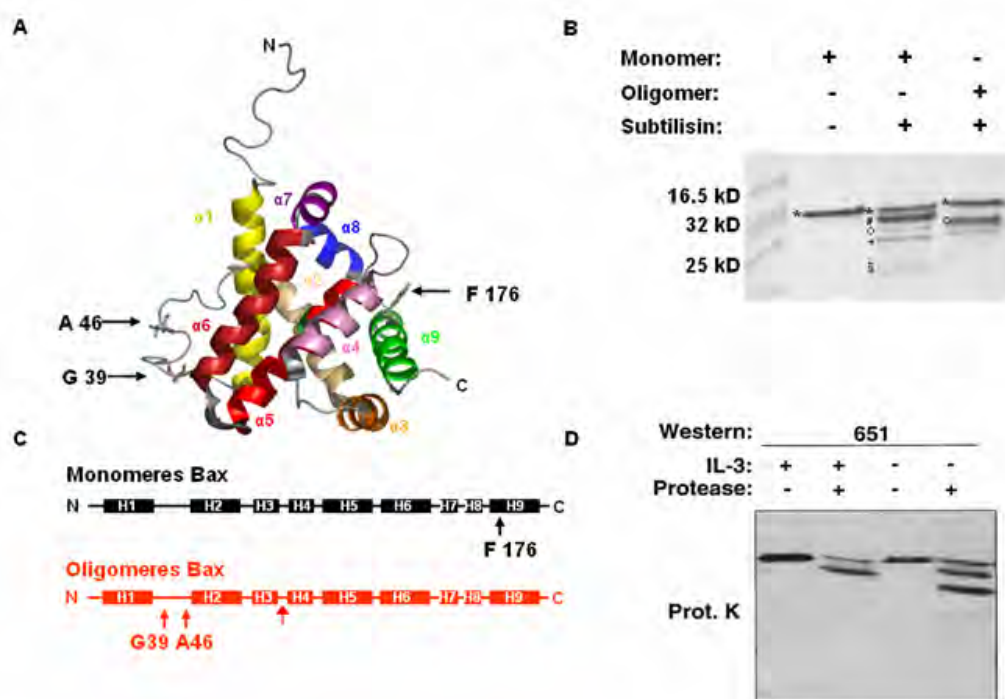


Abbildung 28: Analyse des Proteaseverbaus von monomerem und oligomerem Bax
(A) Bandstruktur des monomeren Bax und den identifizierten Subtilisin Schnittstellen. Die Helices wurden Farbcodiert: $\alpha 1$ - gelb; $\alpha 2$ - beige; $\alpha 3$ - orange; $\alpha 4$ - pink; $\alpha 5$ - hellrot; $\alpha 6$ - dunkelrot; $\alpha 7$ - lila; $\alpha 8$ - blau; $\alpha 9$ - grün; **(B)** Fragmente von Bax nach dem Subtilisinabbau und Trennung auf einem 17% SDS-Gelelektrophorese; * Aminosäure 1 - 192 and 1 - 191; # Aminosäure 1 - 176, 1 - 174, 1 - 173; ° Aminosäure 39 - 192, 47 - 192, 39 - 191, 47 - 191; + Aminosäure 82 - 192, 83 - 192; § Aminosäure 1 - 39 und 1 - 46; **(C)** Darstellung der Schnittstellen in monomeren and oligomeren Bax bezogen auf die Sekundärstruktur; **(D)**: Ausschnitt aus einer Abbildung aus Goping *et al.* ⁽²⁶⁾ die einen Westernblot von Bax aus Säugerezellextrakt nach Proteinase K-Verdau zeigt.

Nach dem Proteaseverdau des monomeren Bax zeigten SDS-Gele mehrere prominente Banden (siehe Abbildung 28 für Subtilisin; in Kapitel 6 ist der Proteinase K-Verdau gezeigt). N-terminale Sequenzierung und Massenspektrometrie der Fragmente ergaben, dass der N-Terminus fast vollständig stabil gegenüber der Proteolyse ist (gezeigt in Tabelle 4, Tabelle 5 und Abbildung 28), während $\alpha 9$ abgebaut wird. Das Hauptfragment der Verdau war Bax Aminosäure 1-176 mit den Nebenprodukten Aminosäure 1 - 171, 1 - 172 und 1 - 174

(Abbildung 28B), außerdem gab es Spuren des N-terminal verkürzten Bax 40 - 192 und des N- und C-terminal tranchierten Bax 40 - 176 (siehe Abbildung 28 und Tabelle 5). Im Subtilisinverdau wurde zusätzlich Volllänge Bax und Bax ohne das C-terminale Glyzin (Bax 1 - 191) gefunden.

Identifizierte Fragmente (LC-MS)	Subtilisin (1:200)		Proteinase K (1:300)	
	Monomer	Oligomer	Monomer	Oligomer
1-192	< 30%	< 40%	< 10%	< 10%
1-38	identifiziert	Identifiziert	identifiziert	identifiziert
1-46				
5-38	-		-	
5-46	-		-	
1-176	> 50%	-	> 60%	-
1-174	< 20%	-	< 20%	-
1-172		-		-
1-171		-		-
39-192	< 10%	> 50%	< 10%	> 80%
47-192	-		-	
39-176	spuren	-	-	-

Tabelle 5: Vergleich des Proteaseverdaus durch Proteinase K und Subtilisin

Die Oligomerisierung von Bax bewirkt strukturelle Veränderungen im N und C-Terminus des Proteins

Das Baxoligomer kann N-terminal verkürzt werden. Die Hauptabbauprodukte (in OG, DM und DDM) sind Bax 39 - 192 und Bax 46 - 192, dazu kommen die Nebenprodukte Bax 82 - 192 und Bax 83 - 192 und ein Teil unverdauten Proteins (siehe Tabelle 4, 5, Abbildung 28).

Die Abbaubanden in CHAPS setzen sich aus einer Mischung aus N- oder C-terminal verkürzten Fragmenten zusammen. Die oligomere Konformation wird also in CHAPS nicht vollständig eingenommen (siehe Abbildung 29).

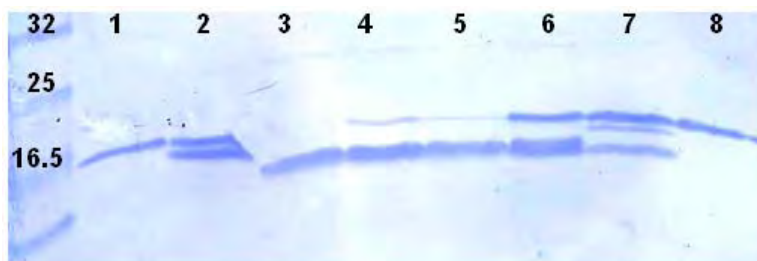


Abbildung 29: Blot eines SDS-Gels nach Subtilisinverdau für die N-terminale Sequenzierung

1: Baxmonomer ohne Verdau, 2: Baxmonomer nach Verdau, 3: Baxoligomer in 0,5% DM nach Verdau, 4: Baxoligomer in 0,5% DDM nach Verdau, 5: Baxoligomer in 2% OG nach Verdau, 6: Baxoligomer in 0,6% C8E4 nach Verdau, 7: Baxoligomer in 2% CHAPS nach Verdau, 8: Baxoligomer in 0,6% C8E4 ohne Verdau

Die Proteolyse in Lipid konnte nicht bei den gleichen Konzentrationsverhältnissen, wie beim

Monomer und in Detergenz durchgeführt werden, da eine genaue Konzentrationsbestimmung des Proteins nicht möglich war. Die N-terminale Sequenzierung zeigte aber, dass in Liposomen eingebautes Bax, zu dem Proteinase K gegeben wurde, bis Aminosäure 39 abgebaut wurde.

Elektronenspinresonanzspektroskopie

Die ESR-Spektroskopie ist eine Methode, mit deren Hilfe Aussagen über die lokale Umgebung von ungepaarten Elektronen gemacht werden können (siehe Einführung in Anhang 5). Ungepaarte Elektronen kommen in Proteinen nur in Metallkomplexen vor, oder sie können selektiv mittels des *site directed spin labelings* eingeführt werden. Dazu wird die Proteinsequenz durch gezielte Mutagenese verändert, sodass das Proteine mit einem Cystein (für Puls-ESR auch zwei Cysteinen; siehe Kapitel 6) entstehen, an das ein MTS (Methanethiosulfonate)-Spinlabel kovalent gebunden wird (siehe Anhang 5). Mit der ESR-Methode kann nun die lokale Umgebung des Cysteins untersucht werden. Die Experimente fanden in Kooperation mit in der Gruppe von Prof. Steinhoff (Universität Osnabrück) statt, wobei die Messungen mit Dr. Bordignon und Dr. Padmavathi durchgeführt wurden.

Bax besitzt zwei native, hochkonservierte und im Monomer gut zugängliche ⁽¹⁾ Cysteine (C62 und C126; siehe Abbildung 30A). Durch Mutagenese wurden Baxproteine mit nur einem Cystein hergestellt und nach dem vorhandenen Cystein benannt: Bax C126 (mit der Mutation C62A) und Bax C62 (mit der Mutation C126A). Sie wurden kloniert, exprimiert, gereinigt und konnten effektiv MTSSL binden. Beide Mutanten zeigten eine hohe Proteasestabilität und biophysikalische Eigenschaften vergleichbar dem WT Protein (siehe Anhang 6).

Die Proteine wurde in verschiedenen Umgebungen vermessen, als:

- (1) monomeres Bax
- (2) oligomeres Bax in DDM
- (3) Bax rekonstituiert in Liposomen
- (4) Bax in CHAPS.

Eine Cystein-freies Baxprotein (C126A, C62A), sowie daraus entstandene Proteine mit zusätzlichem Cystein (z.B. Bax C126A, C62A, S118C) wurden kloniert aber während der Reinigung des Proteins stark von Proteasen verkürzt, sodass sie nicht untersucht wurden. Näheres zu diesen Mutanten findet sich in Anhang 6.

Messungen an Bax C126 (C62A)

C126 liegt im Monomer gut zugänglich am Ende von $\alpha 5$ (siehe Abbildung 31A). Nach der Membraninsertion liegt es laut dem Modell von Annis *et al.* ⁽²⁾ im Bereich der polaren Kopfgruppen der Liposomen (siehe Abbildung 31B).

Raumtemperaturmessungen im X-Band Frequenzbereich (9,7 GHz) zeigten das Spinlabel im

Monomer extrem mobil (siehe Abbildung 30A). Das MTSSL war demnach dem Lösungsmittel zugewandt und nicht von Aminosäuren seiner Umgebung sterisch eingeschränkt. Das Messergebnis passt somit gut zu den NMR-Daten ⁽¹⁾.

Die Oligomerisierung des Proteins schränkte die Beweglichkeit des Spinlabels sowohl in Detergenz als auch in Lipid stark ein (siehe Abbildung 30A). Das Label verlor seine exponierte Lage und wurde in seiner Beweglichkeit eingeschränkt. Es ist demnach mehr ins Proteininnere oder zur Interaktionsfläche mit dem Lipid bzw. Detergenz verschoben. Die Spektren waren in Lipid und DDM nahezu identisch, was zeigt, dass die Umgebung des Spinlabels in beiden Substanzen sehr ähnlich ist. Die Kurve in CHAPS unterscheidet sich von den anderen Kurven und könnte eine Mischung aus monomeren und oligomeren Protein zeigen (siehe Abbildung 30A). Nach der Oligomerisierung in DDM zeigten die Spektren die Freisetzung eines kleinen Anteils des Spinlabels (siehe Abbildung 30A, rote Kurve). Es könnte durch einen Anteil entfalteten Proteins entstehen, oder das MTSSL wurde während der Konformationsänderung aus Vertiefungen der Proteinoberfläche befreit, wo es nicht kovalent gebunden lag. In Liposomen kann freies Label nicht detektiert werden, da es während der Gradienten Zentrifugation entfernt wird.

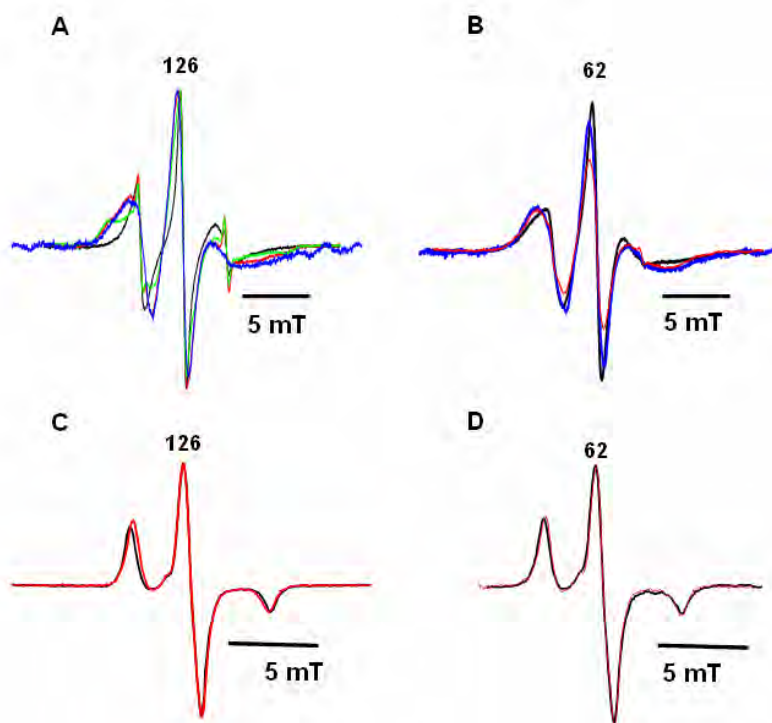


Abbildung 30: Spinnormierte X-Band Spektren von Bax C126 (C126A) und Bax C62 (C62A)
A und B: Spektren bei Raumtemperatur; C und D: Spektren bei 160°C; Schwarz: Monomeres Bax, rot: Oligomeres Bax in 0,5% DDM; grün: Bax in CHAPS; blau: Bax in Lipid

Die Zugänglichkeit vom Spinlabel an C126 für paramagnetischen Quencher ist in Abbildung 31C dargestellt. Im monomeren Bax ist die Zugänglichkeit für beide Substanzen hoch, es liegt also an der Oberfläche des Proteins (siehe Abbildung 31C). Nach der Rekonstitution in

Liposomen oder der Mischung mit Detergenz nimmt die Zugänglichkeit für beide Substanzen besonders aber für Nickel-EDDA stark ab. Im Oligomer ist C126 also nicht mehr frei zugänglich, sondern im Bereich des Lipidbilayers. Die Zugänglichkeit in Detergenz ist etwas besser als in Liposomen, was sowohl durch eine schlechtere Abschirmung, als auch den Anteil freien Spinlabels erklärt werden könnte.

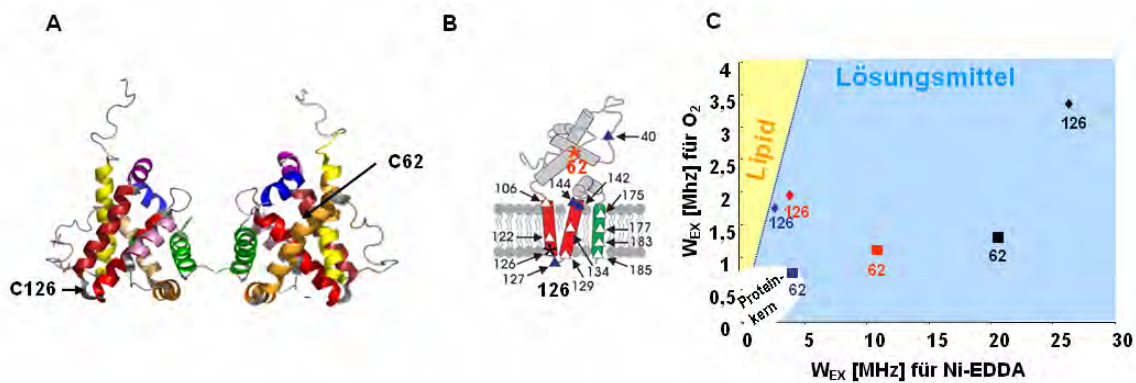


Abbildung 31: ESR-Messungen an Bax C126 und Bax C62

A: Position der beiden Aminosäuren im monomeren Bax und **B:** im Modell des aktives Bax nach ⁽²⁾ (die Dreiecke zeigen die Position von Aminosäuren in ⁽²⁾ untersucht wurden); **C:** Darstellung der Zugänglichkeitsdaten liegen, Spinlabel an der Proteinoberfläche haben eine hohe Zugänglichkeit für Nickel-EDDA und Sauerstoff (blauer Bereich), in Lipidbilayer ist die Sauerstoffzugänglichkeit hoch und die Zugänglichkeit für Nickel-EDDA niedrig (gelber Bereich), wenn das Label im Proteininneren verborgen liegt, ist die Zugänglichkeit für beide Substanzen nahezu null (weißer Bereich).

Zur Polaritätsbestimmung wurde die Hyperfeinkopplungskonstante A_{zz} aus X-Band Messungen bei 160°K bestimmt (siehe Abbildung 30C, D). In Proteinen werden abhängig von der Umgebung des Spinlabels A_{zz} Werte von 3,2 - 3,8 mT gemessen. Je größer A_{zz} ist, desto höher ist die Polarität der Umgebung des Spinlabels. Monomeres Bax C126 zeigt einen Wert von 3,72 mT, also eine polare Umgebung. Nach dem Einbau in Liposomen sank A_{zz} auf 3,46 mT, in Detergenz wurden 3,57 mT gemessen. Die Umgebung von C126 wird demnach beim Einbau in Liposomen bzw. Detergenzmizellen wesentlich unpolarer (siehe Abbildung 32). Dies legt nahe, dass das Label wie von Annis *et al.* vorgeschlagen in Höhe der Kopfgruppen des Lipidbilayers liegt. Die Unterschiede im A_{zz} zwischen Detergenz und Lipid könnten auf das freie Spinlabel oder die unterschiedliche Abschirmung in beiden Substanzen zurückgehen. Die ermittelten Daten beider Mutanten sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Messungen an Bax C62 (C126A)

C62 liegt in $\alpha 2$ in der BH3 Domäne von Bax (As 59 - 73; siehe Abbildung 31A) in einer Vertiefung an der Proteinoberfläche des Monomers (siehe Abbildung 31A). Gemäß dem Model von Annis *et al.* liegt C62 nach der Membraninsertion des Proteins außerhalb der Membran (siehe Abbildung 31B), nähere Angaben zu seiner Lage werden aber nicht gemacht.

Probe	Linewith [Gauss]	Π O ₂ [W _{Ex}]	Π Nickel-EDDA [W _{Ex}]	Azz [mT]
Bax C126 Monomer	2.2	6.44 [3.2]	60.7 [30.4]	3.72
Bax C126 DDM	3.5	4.02 [2.0]	7.2 [3.6]	3.57
Bax C126 Lipid	4.5	3.61 [1.8]	4.7 [2.4]	3.46
Bax C62 Monomer	3.5	2.71 [1.4]	43.28 [21.6]	3.64
Bax C62 DDM	5.5	2.40 [1.2]	21.02 [10.5]	3.59
Bax C62 Lipid	5.5	1.59 [0.8]	7.4 [3.7]	3.56

Tabelle 6: Tabellarische Zusammenfassung der *continuous wave* ESR-Messergebnisse an Bax C62 und Bax C126

Die Mobilitätsmessungen am Monomer zeigten eine deutlich eingeschränkere Beweglichkeit des Labels im Vergleich zu C126 (siehe Abbildung 30B). Die Zugabe von Detergenz oder der Einbau in Liposomen schränkt die Beweglichkeit des Labels weiter ein, wobei der Unterschied viel weniger ausgeprägt ist, als bei C126. Gab man Detergenz zu, zeigten die Spektren wieder Hinweise auf freies Spinlabel. Für Abbildung 30B wurde es jedoch entfernt, um die Spektren in Detergenz und Lipid besser vergleichen zu können. Sie sind sehr ähnlich aber nicht identisch.

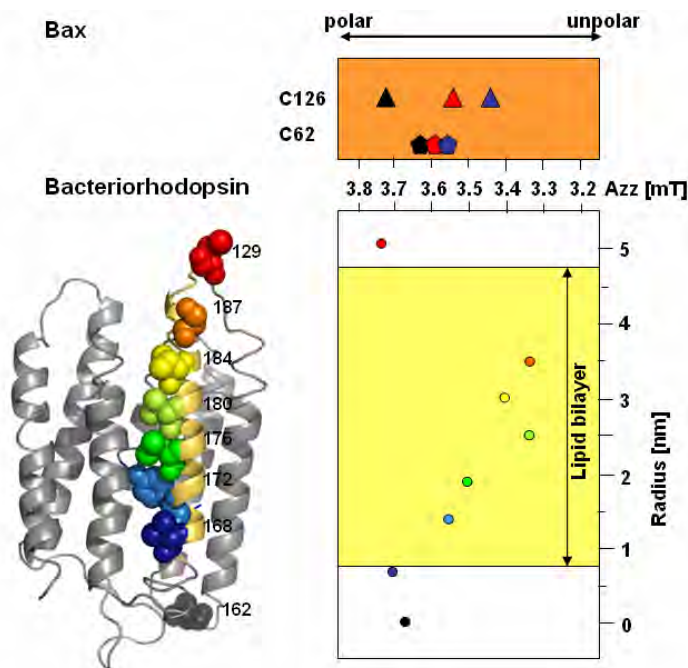


Abbildung 32: Polaritätsanalyse der Baxmutanten in Vergleich zu Bakteriorhodopsin

Die an Bax ermittelten Werte sind in der orangen Box dargestellt. Die Werte von C126 sind als Dreiecke, die von C62 als Fünfecke gezeigt. Das monomere Protein ist schwarz gezeigt, das Oligomer in DDM rot und das Oligomer in Liposomen blau. Als Vergleich sind in der gelben Box die Werte von Labels an verschiedenen Positionen des Bakteriorhodopsin dargestellt, bei diesen ist der A_{zz} Wert noch in Beziehung zur Position in der Membran gesetzt (Daten aus ⁽¹²¹⁾).

Zugänglichkeitsmessungen mit Nickel-EDDA und Sauerstoff zeigten das Label im Monomer gut zugänglich für beide Substanzen. Der Einbau in Liposomen oder die Zugabe von DDM verschlechtert die Zugänglichkeit deutlich. In Liposomen war das Label sogar fast

unzugänglich (siehe Abbildung 31C). Die Unterschiede zwischen den Oligomeren in Liposomen oder Detergenz könnte an dem Anteil freien Spinlabels oder der unterschiedlichen Abschirmung in beiden Substanzen begründet sein. In Lipid ist die Abschirmung so stark, dass C62 am Rande einer Interaktionsfläche zwischen den Monomeren des Oligomers liegen könnte.

Die Polaritätsanalyse zeigte nur geringe Veränderungen. A_{zz} sank von 3,64 mT im Monomer auf 3,56 mT in Lipid und 3,59 mT in Detergenz. Ein Eintauchen dieser Bereiche in die Membran (siehe Abbildung 32) oder in einem hydrophoben Proteinkern ist damit unwahrscheinlich. C62 könnte aber auf der Oberfläche der Membran liegen.

Die Konformationsänderungen von Bax durch die Zugabe von c_8 Bid braucht Lipide

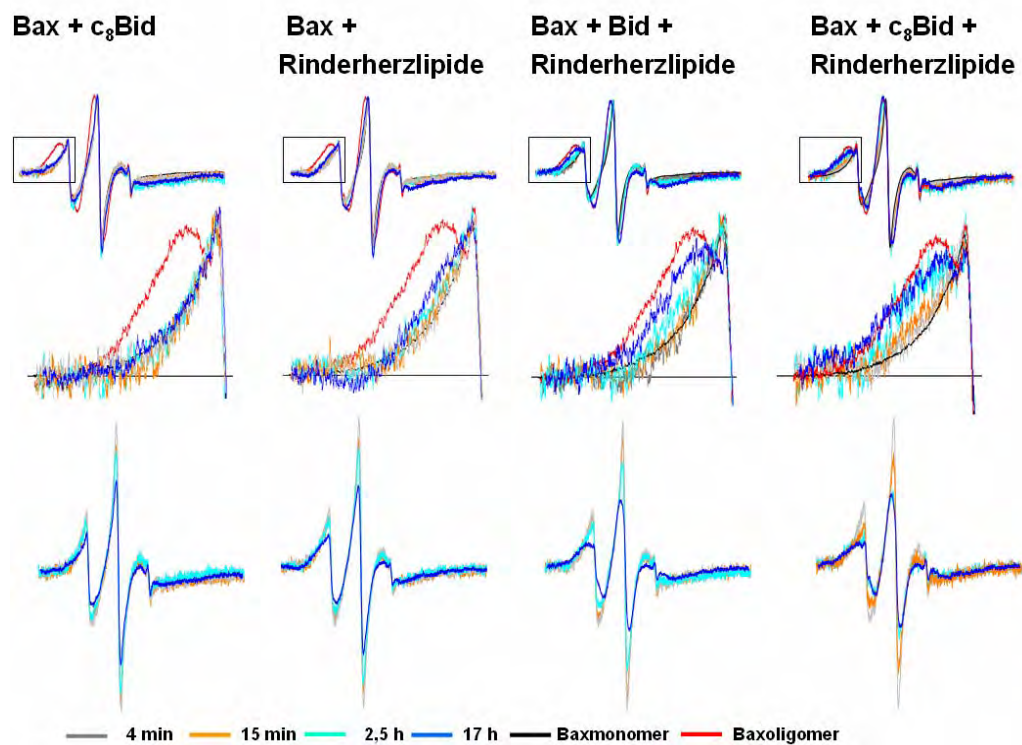


Abbildung 33 Raumtemperatur ESR-Spektren von Lösungen mit MTSSL gelabelten Bax (C126 und C62), Rinderherzlipiden, Bid und c_8 Bid nach unterschiedlichen Inkubationszeiten und im Vergleich zum monomeren und oligomeren Bax. Die untere Hälfte der Abbildung zeigt die Veränderungen der Spektren mit der Zeit, die obere einen Vergleich des monomeren und oligomeren Proteins mit den Spektren nach verschiedenen Messzeiten.

In Säugerzellen aktiviert die Zugabe von tBid (von Caspase 8 geschnittenem Bid) Bax. Das Volllänge Bid aktiviert Bax deutlich langsamer⁽²²⁻²⁵⁾. Eine Mischung von c_8 Bid (rekombinant hergestelltes Bid Caspase 8 verdaut), dem in dieser Arbeit hergestelltem Bax und Liposomen (mit Rinderherz und *E. coli* Liposomen getestet) aktivierte Bax ebenfalls (siehe Abbildung 33), was zeigte, dass das rekombinant hergestellte Bax somit funktional ist. c_8 Bid

aktivierte dieses Bax ebenfalls effektiver es Volllänge Bid tat. Die Mischung aus c₈Bid und Bax in wässriger Lösung hatte keine Konformationsänderungen in Bax zur Folge und die Zugabe von Liposomen zum monomeren Bax aktivierte nur einen kleinen Anteil der Baxmoleküle. Die Baxaktivierung braucht demnach die Gegenwart von Liposomen und c₈Bid (siehe Abbildung 33).

Einflüsse des pH Wertes auf die Baxkonformation

Catron *et al.* ⁽¹²²⁾ zeigte, dass der Einbau von Bax in Mitochondrien effektiver bei pH 6 oder pH 8,2 verläuft, als bei pH 7. Es blieb dabei unklar, ob der pH Wert die Konformationsänderungen des Proteins direkt beeinflusst oder zusätzliche Faktoren, wie Bid oder Lipide notwendig sind.

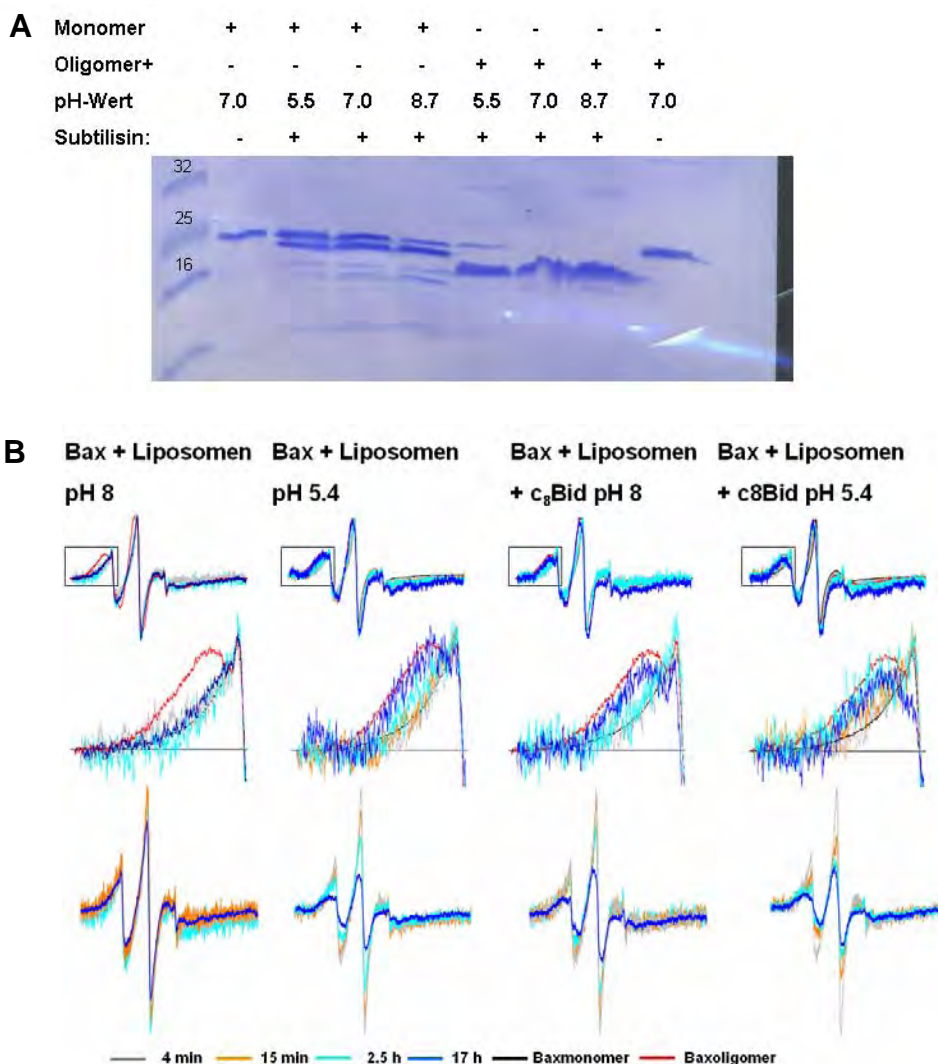


Abbildung 34: Einfluss des pH Wertes auf die Baxkonformation

A: SDS-Gel eines Subtilisinverdau beider Baxkonformationen bei verschiedenen pH Werten massenspektrometrische Untersuchungen und N-terminale Sequenzierung zeigten keine deutlichen Unterschiede zwischen den Proben. **B:** Raumtemperatur ESR-Spektren von Bax (C126 und C62 mit MTSSL) in Gegenwart von *E. coli* Liposomen und c₈Bid bei unterschiedlichen pH Werten und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten. Die untere Hälfte der Abbildung zeigt die Veränderungen in den Spektren mit der Zeit, die obere einen Vergleich des monomeren und oligomeren Proteins mit den Spektren der verschiedenen Messzeiten.

Proteolyseexperimenten zeigten in wässriger Lösung keine Änderungen im Abbauverhalten von Bax bei unterschiedlichen pH Werten (zwischen pH 5,5 und 8,7) (siehe Abbildung 34A). Es muss also neben den pH Werten einen zweiten Faktor geben der die Baxkonformation in den Experimenten von Catron *et al.* beeinflusst hat. ESR-Experimente zeigten, dass wiederum die Membranen eine Rolle spielen. In Anwesenheit von Liposomen und c_8 Bid laufen die Konformationsänderungen bei pH 5,4 viel schneller ab als bei pH 8 (siehe Abbildung 34B). Bei pH 5,4 reichte die Anwesenheit von Liposomen (ohne c_8 Bid) sogar aus, um Bax zu aktivieren. Die pH Wert Verschiebung erleichtert die Baxaktivierung also nur in Anwesenheit von Lipidbilayern.

Diskussion

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Konformationsänderung in Bax die Tertiär- aber nicht die Sekundärstruktur des Proteins beeinflusst. Das rekombinante Protein ist funktional und zeigte in Protealyseexperimenten gleiche Schnittmuster wie das native Protein in Säugerzellen. Die Aktivierung von Bax wird vom pH Wert sowie c_8 Bid beeinflusst und die aktive Konformation wird nur in Anwesenheit von Lipiden oder Detergenzien eingenommen. DDM und DM können die native Lipidumgebung des aktiven Bax so gut ersetzen, dass kaum Unterschiede in der Tertiärstruktur von Baxoligomeren in diesen Detergenzien oder Liposomen gefunden wurden, während CHAPS Zugabe zu Bax keine normale Oligomerisierung bewirkt.

Was passiert mit den Baxmonomeren während der Konformationsänderung? Insgesamt konnten wir Veränderungen in nahezu allen Teilen des Proteins beobachten.

Konformations-bedingte Veränderungen von $\alpha 2$ und $\alpha 5$

Die ESR-Messungen zeigten deutliche Veränderungen im Bereich von $\alpha 2$ und $\alpha 5$. Wie von Annis *et al.* vorgeschlagen scheint $\alpha 5$ in die Membran einzubauen und C126 in Bereich der Lipidkopfgruppen zu liegen. Der starke Mobilitätsverlust von C126 nach der Oligomerisierung könnte zusätzlich darauf hindeuten, dass $\alpha 5$ im Oligomer mit andern Helices in der Membran interagiert (z.B. $\alpha 9$ aus demselben Monomer oder $\alpha 5$, $\alpha 6$ oder $\alpha 9$ aus einen anderen), eine Möglichkeit die in Kapitel 6 weiter untersucht wird.

Die bisherigen Modelle des Oligomers machten keine Voraussagen zu $\alpha 2$ (der BH3 Domäne). Aber es wurde schon in Kapitel 3 im Vergleich der Bcl-2 Strukturen gezeigt, dass ihr eine Funktion in der Aktivität des Proteins zukommen mag. Unsere Daten zeigen, dass die Oligomerisierung ihre Umgebung verändert. $\alpha 2$ baut aber nicht in die Membran ein, sondern scheint eher an einer Interaktion zwischen den Monomeren teilzunehmen.

Die funktionelle Bedeutung der BH3 Domäne ist nicht neu. Zha *et al.* ⁽¹²³⁾ entdeckte sie und

postulierte eine Funktion in der Oligomerisierung des Proteins^(123,124). Seine Studien beschränkten sich aber auf Peptide, die bereits ohne Detergenzzugabe aktiv waren und die aufgrund ihrer Länge nicht mehr als die Sekundärstruktur von Bax eingenommen haben können, da ihnen viele Aminosäuren zur Ausbildung der Tertiärstruktur fehlen. Nichtsdestotrotz zeigte Zha *et al.*⁽¹²³⁾, dass Peptid 59 – 101 (Teil $\alpha 2$ bis Loop nach $\alpha 4$) mit Bax und Bcl-2 Dimere bilden kann, während das Peptid Bax 69 - 119 (Ende $\alpha 2$ bis mitte $\alpha 5$) dies nicht vermag. Niemand zeigte jedoch bisher, dass die BH3 Domäne im vollständigen Protein an der Oligomerisierung mitwirkt. Dies wird in Kapitel 6 dieser Arbeit gezeigt.

Konformations-bedingte Veränderungen von $\alpha 9$

Da die BH3 Domäne im monomeren Protein an der Bindung von $\alpha 9$ beteiligt ist, stellt sich die Frage, was mit dieser Helix während der Oligomerisierung passiert, zumal postuliert wurde, dass $\alpha 9$ während der Aktivierung von Bax in die Membran einbaut (z.B.^(2,3,58)).

Die Subtilisin- und Proteinase K-Verdauexperimente, die eine geschnittene $\alpha 9$ im Monomer zeigten, legten nahe, dass $\alpha 9$ nicht wie von den NMR-Daten erwartet, stabil an den Proteinkernen gebunden ist, sondern zumindest temporär flexibel vorliegt. Die Oligomerisierung veränderte die Zugänglichkeit von $\alpha 9$ soweit, dass sie im Oligomer unzugänglich ist. Die Verkürzung des C-Terminus fand auch im monomeren, inaktiven Bax der Säugerzellextrakte Goping *et al.* statt. Ihr Westerblot zum Proteinase K-Verdau zeigte für gesunde Säugerzellen ein vergleichbares Abbaumuster, wie wir es im monomeren Bax gefunden haben (siehe Abbildung 28C, D). Es ist auch in den nicht apoptotischen Säugerzellen C-terminal verkürzt, da es sonst nicht verkürzt wäre und gleichzeitig einen Antikörper am N-Terminus binden könnte.

Die temporäre Freisetzung von $\alpha 9$ aus der hydrophoben Furche scheint wichtig für die Bax-aktivierung zu sein. Mutationen oder Modifikation von $\alpha 9$ regulieren die Aktivität des Proteins. Eine Phosphorylierung an S184 oder eine S184E bzw. S184K Mutation inhibieren die Aktivierung sowie den Membraneinbau von Bax^(58,125) und sie stören die Interaktion mit der hydrophoben Furche^(1,58). Wenn $\alpha 9$ nicht an die Proteinoberfläche gebunden ist, könnte sie also das Protein in der Membran verankern und die hydrophobe Furche würde zugänglich für die Oligomerisierung werden.

Das NMR-Modell von Bax zeigt nur wenige Bindestellen zwischen Furche und $\alpha 9$ (hydrophobe Wechselwirkungen und eine potentielle Wasserstoffbrückenbindung zwischen S184 und D98⁽¹⁾). Temporäre Flexibilität in diesem Bereich erscheint also möglich.

Konformations-bedingte Veränderungen im Bereich vor $\alpha 2$

Goping *et al.* zeigte nach Apoptoseinitiation eine Mischung aus N- und C-Terminal

verkürztem Bax. In unseren Experimenten wurde Bax nach der Oligomerisierung nur noch N-terminal verkürzt. Die Unterschiede lassen sich dadurch erklären, dass nach einem apoptotischen Stimulus nicht immer alle Zellen sofort den Zelltod einleiten, sondern das Lysat aus Goping *et al.* vermutlich aus einer Mischung apoptotischer und nicht apoptotischer Zellen bestand (und damit einer Mischung aus aktiven und inaktiven Bax; siehe Abbildung 28). Die Daten von Goping *et al.* und uns zeigen beide, dass die Konformationsänderung in Bax nicht nur den C- sondern auch den N-Terminus (vor $\alpha 2$) des Proteins beeinflusst.

In der NMR-Struktur sind die ersten 12 Aminosäuren von Bax flexibel⁽¹⁾. Trotzdem schneiden Proteasen das Protein hier nicht im Monomer, wogegen im Oligomer eine Schnittstelle nach S4 identifiziert wurde (siehe Tabelle 5). Der N-Terminus vor $\alpha 1$ ist also im Monomer unzugänglich und wird erst nach der Oligomerisierung bis zu $\alpha 2$ zugänglich. Bei einigen Molekülen des Oligomers konnte sogar im Loop zwischen $\alpha 3$ und $\alpha 4$ geschnitten werden (siehe Abbildung 28C).

Die Bedeutung des Proteinbereiches vor $\alpha 1$ in der Baxaktivierung zeigt sich in Bax psi (siehe Kapitel 3; Isoform der 19 N-terminale Aminosäuren fehlen, die sogenannte ART-Sequenz). Bax psi liegt nur in der membranständigen Konformation vor und wirkt stärker toxisch auf Zellen als Bax alpha^(26,100,126,127). Einige Aminosäuren am Ende der ART-Sequenz kommen laut der Baxstruktur (PDB:1F16⁽¹⁾) im Monomer nah genug an Aminosäuren von $\alpha 7$ und $\alpha 8$, um zu interagieren. Diese Wechselwirkungen könnten die inaktive Baxkonformation und die Bindung von $\alpha 9$ an das Protein stabilisieren. Ohne sie könnte $\alpha 9$ an Flexibilität gewinnen, leichter die Furche verlassen und in die Membran einbauen, womit die erhöhte Toxizität und permanente Membraninsertion von Bax psi erklärt wäre.

Die Loop Region zwischen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ ist im Monomer laut NMR-Daten bis auf eine Interaktion die zwischen E 43 bis A 45 mit I 133 und M 137 in $\alpha 6$ ⁽¹⁾ flexibel. Der Einbau von $\alpha 6$ in die Membran^(2,93), würde die Interaktion mit der Loop Region unterbrechen, der Loop könnte näher an die Oberfläche rücken und zugänglich werden. Die Umlagerung von $\alpha 1$ könnte verdeckte Proteinregionen zugänglich machen und so die Aktivierung fördern.

Konformations-bedingte Veränderungen in der C-terminalen Proteinhälfte

Die Tryptophanfluoreszenzmessungen runden die Ergebnisse zu den Konformationsänderungen in Bax ab. Bax enthält sechs Tryptophane, die alle in der C-terminalen, hoch konservierten Proteinhälfte liegen (siehe Abbildung 27). Fünf von ihnen sind in allen Sequenzen der Alignments aus Kapitel 3 konserviert, das sechste (W188) ist nur im Zebrafisch ausgetauscht. Drei Tryptophane flankieren $\alpha 5$ (W107) und $\alpha 9$ (W170 und W188) und ein viertes liegt mitten in $\alpha 6$ (gezeigt in Abbildung 27A, B), also im Bereich der Helices, die in die äußere Mitochondrienmembran einbauen^(2,3). Tryptophane kommen in

membranständigen Proteinen oft am Übergang zwischen der Lipidphase und der wässrigen Phase vor⁽¹²⁸⁾, was die These des Membraneinbaus von $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 9$ stützt.

All dies lässt Oligomerisierungs-bedingte Änderungen der Tryptophanfluoreszenz erwarten und diese wurden auch experimentell (mit Verschiebungen bis zu 8 nm) bestätigt. Die Veränderungen in der Lage und Intensität der Emissionsmaxima waren in DM, DDM und in Liposomen am größten, gefolgt von OG und am niedrigsten im CHAPS (siehe Abbildung 27C, E). Diese Reihenfolge spiegelt die abnehmende Größe der hydrophoben Bereiche der Detergenzien wieder (siehe in Abbildung 18, Kapitel 2). Der Unterschied zwischen DDM und DM zu OG könnte erklärt werden, wenn mindestens ein Tryptophan im Oligomer Kontakt zu den Detergenzien hätte, da größere hydrophobe Bereiche die Abschirmung hydrophober Proteinbereiche verbessern können (DM und DDM haben größere hydrophobe Bereiche als OG). Die Beschaffenheit des CHAPS mit dem kleinsten hydrophoben Bereich scheint nicht auszureichen, um Bax voll zu aktivieren, wie die Verdau und ESR-Experimente zeigten.

Da Sauerstoff quenchend auf die Fluoreszenz wirkt^(116,129), und seine Konzentration in Puffern und in Lipidschichten höher als im Proteinkern ist⁽¹³⁰⁻¹³²⁾, spricht die erhöhte Emissionsintensität nach der Oligomerisierung für die Verschiebung von mindestens einem Tryptophan in den Proteinkern bzw. einen Interaktionsbereich zwischen den Monomeren des Oligomers. Dies wäre z.B. dann der Fall, wenn die membranständigen Helices der Monomere des Oligomers interagieren würden.

Zusammenfassung:

Die Oligomerisierung und Membraninsertion von Bax führt zu Veränderungen in der Tertiär- aber nicht in der Sekundärstruktur des Proteins. Die Aktivierung von Bax durch c_8 Bid zeigt, dass Protein funktional. Außerdem konnten kaum Unterschiede zwischen dem in Detergenz oligomerisiertem und dem in Liposomen eingebautem Bax gefunden werden. Bax in CHAPS verhielt sich wie eine Mischung aus monomeren und oligomeren Bax. Die C-terminale Proteinhälfte bekommt durch die Oligomerisierung eine hydrophobere Umgebung. $\alpha 9$ ist im Monomer Protease exponiert, wird aber mit der Oligomerisierung unzugänglich. Der N-Terminus ist hingegen im monomeren Bax stabil gegen Proteasen, kann aber im Oligomer geschnitten werden. Die Umgebung von C126 am Ende von $\alpha 5$ verändert sich stark durch die Oligomerisierung. Im Monomer ist das Label beweglich, Puffer exponiert und hat eine hydrophile Umgebung. Durch die Oligomerisierung wird die Umgebung hydrophober und das Label in seiner Bewegung eingeschränkt. Die Umgebung von C62 verändert sich durch die Konformationsänderung weniger. Da die Zugänglichkeit für paramagnetische Quencher aber auf nahezu null absank, könnte das Label im Oligomer im Bereich einer Interaktionsfläche zwischen den Monomeren liegen.

Kapitel 5: Untersuchungen zur Stabilität von Bax

Ziel:

Untersuchung der Einflüsse von Wärme und chaotropen Substanzen auf die Stabilität beider Baxkonformationen.

Ergebnisse:

Thermische Stabilität von Bax

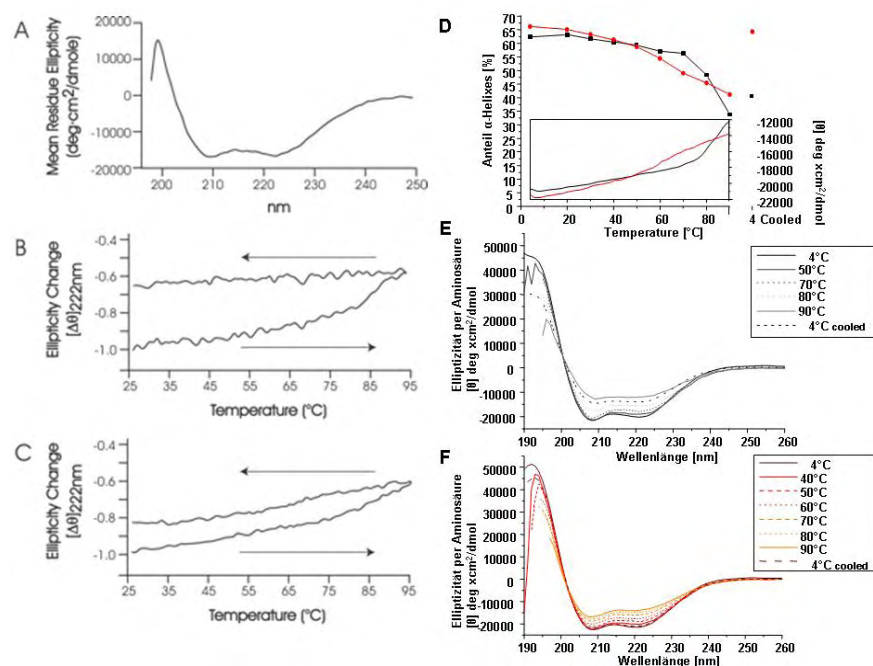


Abbildung 35: CD-Schmelzkurven von Bax

Abbildung A - C zeigt die Daten aus Yethon *et al.* ⁽¹¹⁸⁾, während D - F die Daten dieser Arbeit zeigt. (A) CD-Spektrum des monomeren Bax ⁽¹¹⁸⁾; (B) CD-Schmelzkurve des monomeren Bax ⁽¹¹⁸⁾; (C) CD-Schmelzkurve von Bax in Lipid ⁽¹¹⁸⁾ (DOPC:DOPE:DOPS:PI:CL; 43:27:9:9:12); (D) Schmelzkurven von monomeren und oligomeren Bax (DDM); die oberen Kurven zeigen die Abnahme des α helikalen Anteils und die Auswirkung des Kühlens auf 4°C; die untere Box zeigt die Schmelzkurven; monomeres Bax ist schwarz gezeit; oligomeres Bax rot; E: CD-Spektren des monomeren Bax bei verschiedenen Temperaturen; (F) CD-Spektren des oligomeren Bax (DDM) bei verschiedenen Temperaturen.

Da Bax eine hohe Stabilität gegenüber Proteasen zeigte, wurde auch die thermische Stabilität seiner beiden Konformationen mittels Schmelzkurven untersucht. Durch Yethon *et al.* wurden bereits Schmelzkurven des monomeren Bax und Bax in Anwesenheit von Lipid [DOPC (43%): DOPE (27%): DOPS (9%): PI (9%):CL (12%)] veröffentlicht ⁽¹¹⁸⁾ (siehe Abbildung 35A-C). Die Messungen zeigten ein sehr stabiles Protein, wobei die Stabilität in Lipid höher war als im monomeren Protein. Die Wiederholung des Experiments mit dem von uns rekombinant hergestelltem Bax zeigte, dass das Schmelzverhalten in Detergenz und Lipid vergleichbar ist.

Thermische Stabilität des monomeren Bax

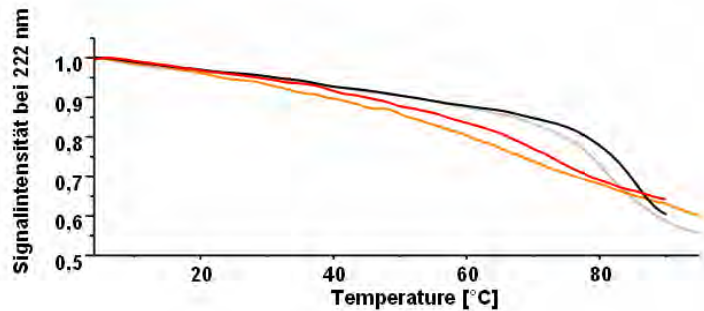


Abbildung 36: Schmelzkurven von monomeren und oligomeren Bax bei verschiedenen Salzkonzentrationen.

Monomeres Bax in Puffer MA (ohne Salz) - schwarz; Oligomeres Bax in Puffer MA mit 0,5% DDM (ohne Salz) - rot; Monomeres Bax im Puffer MA mit 100 mM NaCl und 1 mM CaCl₂ - grau; Oligomeres Bax im Puffer MA mit 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ und 0,5% DDM - orange.

Die Sekundärstruktur des monomeren Bax veränderte sich erst bei mehr als 75°C. Der Beginn einer sigmoidalen Schmelzkurve wurde sichtbar, die Entfaltung des Proteins ist aber auch bei 90°C nicht abgeschlossen (siehe Abbildung 35D, E). Das CD-Spektrum von Bax zeigt noch bei 90°C die Linienform eines α -helikalen Proteins (siehe Abbildung 35E; berechnet 35% α -Helices). Die Abkühlung des Proteins auf 4°C führte zu keiner vollständigen Rückfaltung, der α -helikale Anteil erholte sich nur auf etwa 40%, passend zu den Daten von Yethon *et al.* ⁽¹¹⁸⁾ (siehe Abbildung 35). Die Zugabe von Detergenz (bei 90°C oder nach dem Abkühlen) bewirkte nur eine partielle Rückfaltung (auf etwa 50% Anteil α -Helices).

Identifizierte Fragmente von Bax (LC-MS)	Vorinkubation der Probe bei 4°C		Vorinkubation der Probe bei 90°C	
	Monomer	Oligomer	Monomer	Oligomer
1 - 192	< 30%	< 40%		
1 - 38	Spuren			
1 - 46				
1 - 176		> 50%		
1 - 174	< 20%			
1 - 172				
1 - 171				
39 - 192	< 10%	> 50%	> 80%	> 80%
47 - 192	-			
39 - 176	Spuren			
82- 192, 82- 191, 83- 191, 83- 192, 85- 192, 85- 191			< 10%	< 10%
53- 192, 58- 192			< 10%	< 10%

Tabelle 7: Darstellung der LC - MS Messergebnisse von Proteinase K verdauten Baxproben mit und ohne Vorinkubation bei 90°C

Die An- oder Abwesenheit von Salz verändert das Schmelzverhalten des Proteins nur wenig, nach Zugabe von 100 mM NaCl und 1 mM CaCl₂ sank die Schmelztemperatur um etwa 3°C (siehe Abbildung 36).

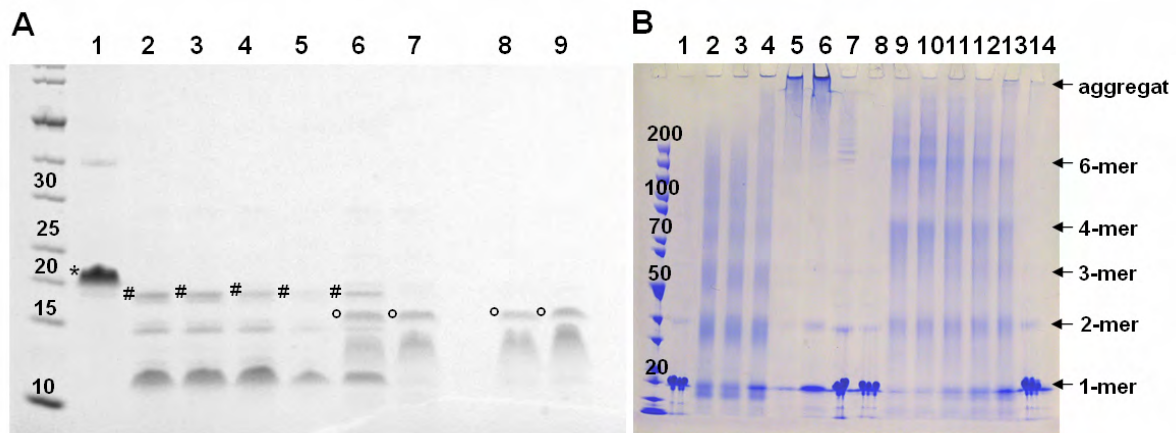


Abbildung 37: Veränderungen in Bax nach Erwärmung

A: Subtilinabbau von Bax nach Erwärmen auf verschiedene Temperaturen; 1: monomeres Bax ohne Verdau; 2: monomeres Bax bei 4°C nach Verdau; 3: monomeres Bax nach Erwärmung auf 50°C und Verdau; 4: monomeres Bax nach Erwärmung auf 60°C und Verdau; 5: monomeres Bax nach Erwärmung auf 70°C und Verdau; 6: monomeres Bax nach Erwärmung auf 80°C und Verdau; 7: monomeres Bax nach Erwärmung auf 90°C und Verdau; 8: oligomeres Bax bei 4°C nach Verdau; 9: oligomeres Bax nach Erwärmung auf 90°C und Verdau; **B:** Vernetzung von Bax nach Erwärmen auf verschiedene Temperaturen; 1: Baxmonomer 4°C; 2: vernetztes Baxmonomer 4°C; 3: vernetztes Baxmonomer 50°C; 4: vernetztes Baxmonomer 70°C; 5: vernetztes Baxmonomer 80°C; 6: vernetztes Baxmonomer 90°C; 7: Baxmonomer 90°C; 8: Baxoligomer 4°C; 9: vernetztes Baxoligomer 4°C; 10: vernetztes Baxoligomer 50°C; 11: vernetztes Baxoligomer 70°C; 12: vernetztes Baxoligomer 80°C; 13: vernetztes Baxoligomer 90°C; 14: vernetztes Baxoligomer 90°C.

Um die instabilsten Teile des monomeren Proteins zu identifizieren wurde die Erwärmung mit einem Protease Abbau kombiniert. Nach Erwärmen auf 40 bis 90°C wurde das Protein auf 4°C abgekühlt, verdaut und die Fragmente analysiert (siehe Abbildung 37A und Tabelle 7). Bis 70°C zeigten sich keine deutlichen Veränderungen im Abbaumuster. Bei 80°C erschien zusätzlich das N-terminal verkürzte Fragment Bax 46 - 192, das sonst nur im oligomeren Bax entsteht. Bei 90°C ist nahezu nur noch dieses Fragment vorhanden (siehe Abbildung 37).

Die Erwärmung bewirkt also eine irreversible Konformationsänderung des monomeren Proteins. Bei über 70°C verlässt der Loop zwischen α_1 und α_2 seine verdeckte Position und wird zugänglich für die Protease, während die C-terminale α_9 unzugänglich wird. Bei einigen Molekülen wird zusätzlich der Loop zwischen α_3 und α_4 zugänglich. Im erhitzten Monomer sind also dieselben Proteinbereiche für die Protease zugänglich wie im Oligomer.

Darstellung des hitzeinduzierten „Megaoligomers“ von Bax

Die Analysen der erwärmten Monomere zeigten, dass keine normalen Oligomere gebildet wurden sondern größere Komplexe, die fortan „Megaoligomere“ genannt werden (gezeigt in

Abbildung 37). Sie unterscheiden sich von aggregiertem Bax, da sie nicht durch Zentrifugation abgetrennt werden können und alle Monomere in ihnen zugänglich sind und an derselben Stelle von Proteasen abgebaut werden können. Die Megaoligomere wurden mit Größenausschlusschromatographie, Proteinvernetzungs experimenten und Rasterkraftmikroskopie (siehe Abbildung 37B und Abbildung 38) untersucht.

Bei Verwendung einer Superdex 200 Säule kam das Megaoligomer im Ausschlussvolumen, es ist also deutlich größer als das normale Oligomer (siehe Abbildung 38E). Rasterkraftmikroskopieaufnahmen zeigten Partikel mit 6 nm bis 20 nm Höhe und 20 – 40 nm Durchmesser (siehe Abbildung 38). Die Verteilung der Partikelhöhen zeigte keine Normalverteilung, sondern eine breit gefächerte Verteilung, die sich möglicherweise in mehrere Peaks aufteilen lässt. Bedenkt man die Monomerhöhe von 3 nm könnten im Megaoligomer mehrere Monomere übereinander gestapelt vorliegen. Die Megaoligomer Konformation ist aber nicht so interessant für weitere Untersuchungen, da sie wohl in Organismen nicht funktionell relevant ist.

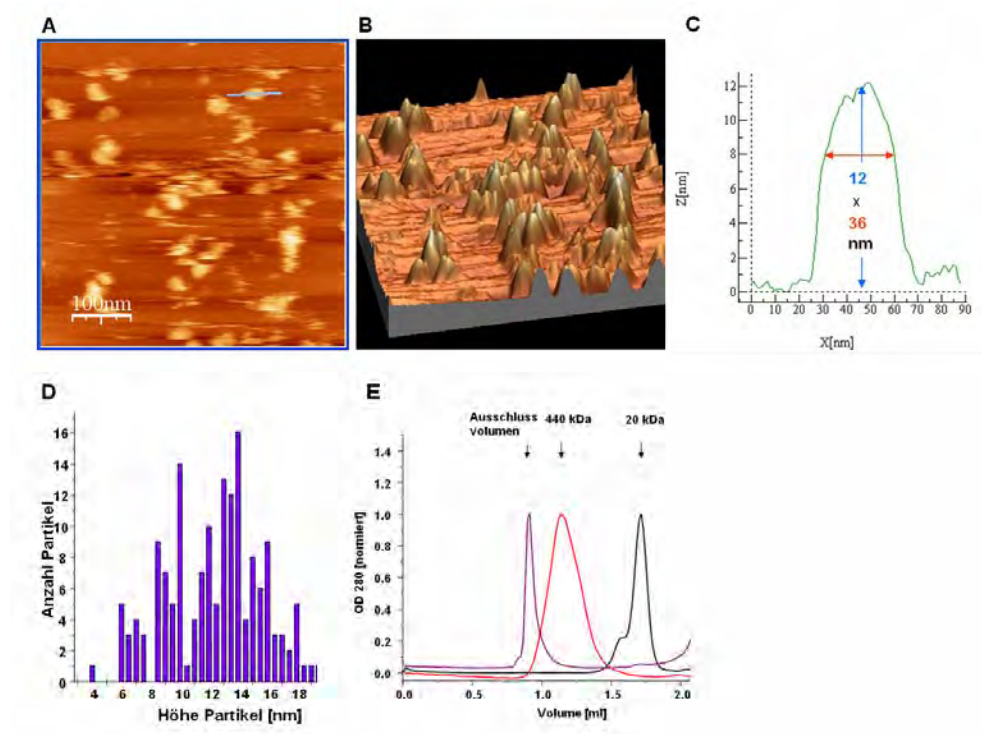


Abbildung 38: AFM-Untersuchungen der Hitze induzierten Baxkonformation „Megaoligomer“
A: AFM-Aufnahme des Megaoligomers; **B:** 3D Darstellung von A; **C:** Profil Megaoligomers (in A hervorgehoben); **D:** Verteilung der Partikel Höhe des Megaoligomers; **E:** Größenausschluss Chromatographie von Baxmonomeren (schwarz), Oligomeren (in DDM, rot) und Megaoligomeren (lila).

Thermische Stabilität des oligomeren Bax

Das oligomere Bax in Detergenz ist noch stabiler gegenüber Wärmezugabe als das Monomer. Die Absorption bei 222 nm nimmt zwischen 40°C und 90°C kontinuierlich ab (siehe Abbildung 35D, F; der Anteil α -Helices sinkt auf etwa 40%), es ist aber kein

sigmoidaler Kurvenverlauf erkennbar und nach abkühlen der Probe ist der α -helicale Anteil wieder 60% (Abbildung 35D, F). Die Anwesenheit von Salz im Puffer hatte dabei wiederum nur einen leichten Einfluss auf das Schmelzverhalten (siehe Abbildung 36). Der Kurvenverlauf in Detergenz ähnelt dem in Lipiden (Abbildung 35C), die Regeneration erscheint aber noch besser zu funktionieren.

Auch im Proteaseverdau (siehe Abbildung 37A), der Größenausschlusschromatographie (Daten nicht gezeigt) oder dem Proteinvernetzungsverhalten (siehe Abbildung 37B) zeigten sich keine Veränderungen nach und vor der Erwärmung auf 90°C.

Stabilität von Bax gegenüber chaotropen Substanzen

Auch der Einfluss chaotroper Substanzen auf Faltung und Stabilität von Bax wurde mittels Tryptophan Fluoreszenz getestet. Chaotrope Substanzen, wie Harnstoff oder Guanidinium Hydrochlorid, interagieren mit Proteinen und lösen dabei alle nicht kovalenten Bindungen auf. Die genauen Vorgänge dabei sind aber nicht vollständig verstanden.

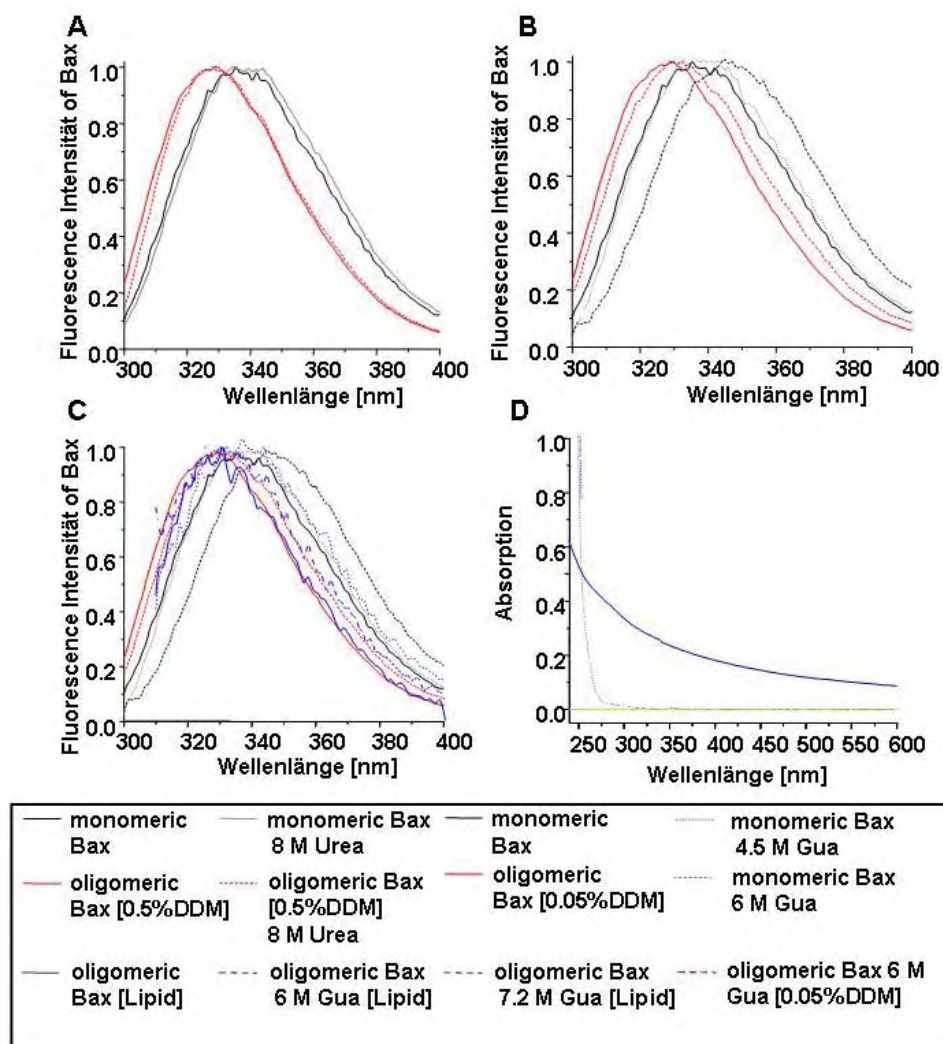


Abbildung 39: Stabilität von Bax gegenüber Chaotropen Substanzen (A) Stabilität gegenüber Harnstoff (B) Stabilität gegenüber Guanidinium Hydrochlorid

Bax ist stabil gegenüber einer Entfaltung mit Harnstoff. Weder monomeres noch oligomeres Bax ließ sich durch ihn entfalten (bis 8 M getestet; siehe Abbildung 39A). In Guanidinium Hydrochlorid war die Entfaltung des Monomers möglich, sie begann bei Konzentrationen über 4 M. Bei 6 M war das Emissionsmaximum auf 346 nm verschoben, sodass das Protein vollständig entfaltet vorlag (siehe Abbildung 39B; das Absorptionsmaximum von Ac-Tryptophan lag bei 348 nm). Das Baxoligomer in Detergenz zeigte bei 6 M Guanidinium Hydrochlorid nur eine kleine Verschiebung des Emissionsmaximums und ist somit auch bei dieser hohen Konzentration nahezu intakt (siehe Abbildung 39B). Messungen in Lipid waren schwierig, da Liposomen Licht streuen und sich bei Zugabe der konzentrierten Guanidinium Hydrochlorid Lösung auflösten (siehe Abbildung 39D). Trotzdem zeigte Bax in Lipid eine hohe Stabilität und es wurde erst bei über 7 M Guanidinium Hydrochlorid entfaltet (gezeigt in Abbildung 39C für Bax in Rinderherzlipiden). In 7,2 M Guanidinium Hydrochlorid ist das oligomere Protein immer noch nicht vollständig entfaltet, aber eine deutliche Verschiebung des Fluoreszenzmaximums wurde sichtbar.

Diskussion

Das Megaoligomer

Das Megaoligomer bildet sich nach Temperaturerhöhungen über 70°C. Bei dieser Temperatur erhöht sich die Flexibilität der Baxmonomere, die Sekundärstruktur ändert sich, und das Protein verliert seine kompakte Struktur. Dabei können bis dahin unzugängliche Bereiche frei werden. Sie könnten Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Lösungsmittel ausbilden und da diese Brücken nicht einfach gelöst werden können, ist die Einnahme der monomeren Konformation nicht mehr möglich. Wenn hydrophobe Bereiche frei werden, die im Kern liegen oder Detergenz oder Lipide als Abschirmung gegen das hydrophile Lösungsmittel brauchen, könnten die Bildung des Megaoligomers die einzige Möglichkeit sein eine Abschirmung gegen das hydrophile Lösungsmittel zu erhalten.

Das Megaoligomer unterscheidet sich von anderen Proteinaggregaten durch seine relativ kleine, konstante Größe und dadurch, dass es nicht durch Zentrifugation von der Lösung getrennt werden kann. Außerdem ist bei ihm der Loop zwischen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ in allen Monomeren zugänglich, was zeigt, dass alle Monomere von außen erreicht werden können. Es muss also einen klaren Aufbau haben und ist kein ungeordneter Proteinklumpen.

Stabilität von Bax gegen Temperaturerhöhung und chaotrope Substanzen

Die hohe Stabilität von Bax ist unerwartet. Eine so hohe thermische Stabilität findet sich meist nur in den Proteinen thermophiler Organismen und eine so starke Resistenz gegen

chaotrope Substanzen ist hauptsächlich bei toxischen Protein „Missfaltungen“ wie PrP^{Sc} bekannt. Bedenkt man allerdings, dass Krankheiten wie Krebs und Aggressoren wie Viren Störungen im Gleichgewicht von Zellteilung und Apoptose hervorrufen müssen, um wirksam zu werden und dass Bax ein ideales Ziel zur Störung dieser Gleichgewichte darstellt, könnte die Stabilität eine natürliche Barriere zu Erhaltung des Lebens des Organismus ausbilden. Bei Proteinen mit mehreren Konformationen liegen diese in Gleichgewichten miteinander vor, die durch bestimmte Stimuli verschoben werden können. Das Poren-bildende Bax muss in gesunden Zellen in seiner inaktiven Konformation arretiert werden, da eine spontane Aktivierung zum ungeplanten Zelltod führen könnte. Die Baxaktivierung darf auch nicht gestoppt werden, da dies eine Krebsentstehung erleichtern könnte. Die Funktion von Bax mag also die hohe Stabilität notwendig machen.

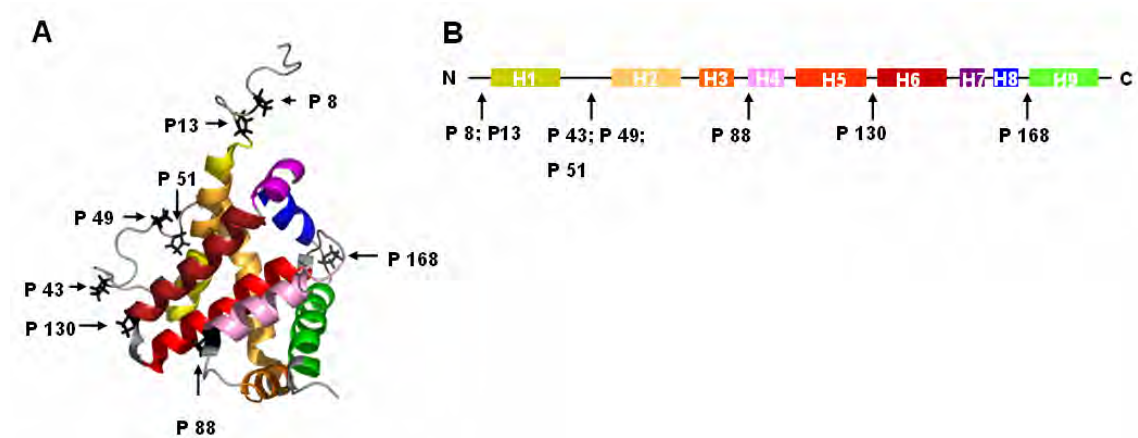


Abbildung 40: Proline in Bax

A: Proline schwarz im NMR-Strukturmodell hervorgehoben; Farbcode: α 1 - gelb; α 2 - beige; α 3 - orange; α 4 - pink; α 5 - hellrot; α 6 - dunkelrot; α 7 - lila; α 8 - blau; α 9 - grün; B: Proline Positionen im Sekundärstrukturmodell

Alle genutzten denaturierenden Bedingungen wirken letztendlich am denaturierten Protein⁽¹³³⁾. Die hohe Stabilität reflektiert somit eine geringe Flexibilität des Moleküls, da Bewegungen, chaotropen Substanzen oder Proteasen Angriffsflächen im Protein eröffnen würden. Ein Vergleich des Enzyms „Adenylat Kinase“ aus einem mesophilen und einem thermophilen Organismus ergab, dass die katalytische Konformationsänderungen im thermophilen Enzym bei 20°C langsamer verläuft als im mesophilen⁽¹³⁴⁾. Die Beweglichkeit dieses Moleküls ist also eingeschränkt. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen beider Enzyme fällt eine Anreicherung des Prolins im thermophilen auf. Prolin bewirkt, dass das Rückgrat eines Proteins rigider wird. Bax besitzt acht Proline an Positionen, die teilweise hoch konserviert sind und zur Konformationsänderung beitragen: P 168 vor α 9, P 130 zwischen α 5 und α 6 und P 88 in α 4. Die anderen fünf Proline liegen vor α 2 und sind in ihrer Position weniger konserviert, allerdings wurden in allen untersuchten Spezies mehrere Proline in diesem Bereich gefunden (siehe Abbildung 40). Bei Bax könnten die Proline die Flexibilität des Proteinrückgrats erniedrigen, Konformationsänderungen verlangsamen, und

unerwünschte Aktivierungen verhindern.

Das Baxoligomer kann kaum entfaltet werden. Ein Grund für sein ungewöhnliches Schmelzverhalten und die vollständige Regeneration beim Abkühlen könnte ein starker hydrophober Kern sein, der das Oligomer auch bei zunehmender Wärme zusammen hält. Er könnte auch die Rückfaltung erleichtern, da die Monomere zusammenblieben und sich bei der Rückfaltung unterstützen könnten. Eine wichtige Rolle in diesem Prozess spielt vermutlich das Detergenz. Es kann während des gesamten Prozesses hydrophobe Bereiche abschirmen und so den Zusammenschluss zum Megaoligomer unnötig machen. Die verbesserte Rückfaltung des Oligomers in Detergenz gegenüber dem Lipid, lässt sich eventuell durch die größere Flexibilität des, im Vergleich zum Lipid, kleinen Detergenz erklären.

Interessanterweise zeigte Pagliari *et al.* ⁽¹³⁵⁾, dass Bax und Bak bei Temperaturen ab 43°C Mitochondrien durchgängig für Cytochrom c macht, ohne einen weiteren Stimuli zu benötigen. Das verwendete rekombinant hergestellte Konstrukt von Bax hatte keine $\alpha 9$ aber einen N-terminalen Histidintag und oligomerisierte schon bei 43°C. Aus den Daten ist dabei aber nicht ersichtlich, ob normale Oligomere oder Megaoligomere gebildet wurden. Die Ergebnisse passen nicht mit unseren überein, was daran liegen könnte das die verwendeten Baxkonstrukte sehr unterschiedlich sind. Ohne $\alpha 9$, mit zugänglicher hydrophober Furche und zusätzlichem Histidintag mag das Protein anders reagieren, da alle drei Bereiche während der Oligomerisierung von Bax funktional wichtige Veränderungen durchlaufen (z.B. ^(58,106,123,136,137) und Kapitel 4).

Zusammenfassung:

Die Experimente zeigen eine hohe Stabilität von Bax gegen Hitze, chaotrope Substanzen und Proteasen, die in der oligomeren Konformation (in Liposomen oder Detergenz) noch höher ist als in der monomeren. Ohne lipophile Substanzen kann die aktive, oligomere Konformation nicht eingenommen werden. Erhöht man in Abwesenheit von lipophilen Substanzen durch Wärmezugabe die Mobilität des Proteinrückgrads, verliert Bax bei über 70°C irreversible die monomere Konformation und bildet das Megaoligomer. Dabei wird der Loop zwischen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ zugänglich und kann abgebaut werden, wogegen der C-Terminus unzugänglich wird. Die Experimente zeigten, dass Bax ein sehr starres Protein ist. Jede Bewegung des Proteins müsste einen Zugang zum Kern eröffnen und damit die Möglichkeit zum Abbau oder zur Entfaltung geben. Die Stabilität könnte unerwünschte Aktivierungen von Bax verhindern und die Inaktivierung des aktiven Bax erschweren.

Kapitel 6: Kontaktbereiche zwischen den Monomeren des Baxoligomers

Ziel:

Identifikation der Kontaktbereiche zwischen den Monomeren im Baxoligomer und die Untersuchung der Abstände zwischen den Cysteinen in beiden Proteinkonformationen.

Ergebnisse

Biotinbindeexperimente

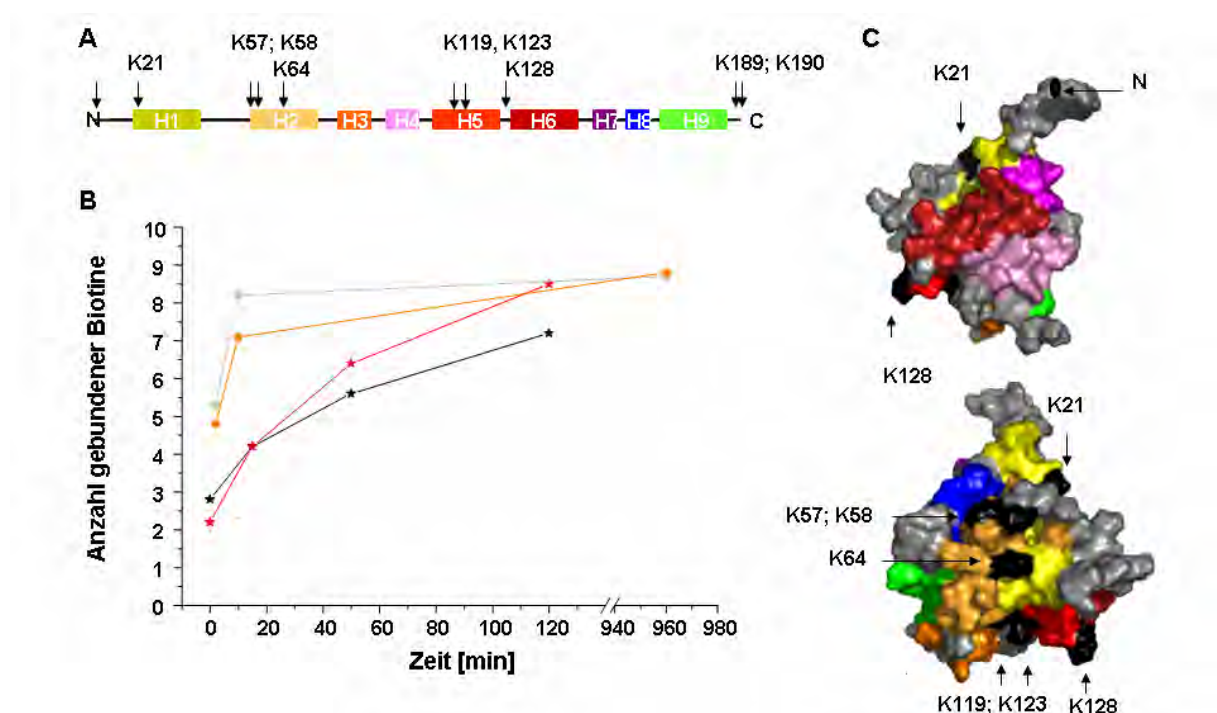


Abbildung 41: Biotinbindung an Bax

A: Lysine in Bax. Die schwarzen Pfeile zeigen alle potenziellen Biotinbindestellen in der Sekundärstruktur von Bax an. **B:** Gemittelte Anzahl von an ein Baxmonomer gebundenen Biotinmolekülen, nach bestimmten Zeitpunkten, in der jeweiligen Konformation; Baxmonomer auf Eis - schwarz; Baxoligomer auf Eis - rot; Baxmonomer bei Raumtemperatur - grau; Baxoligomer bei Raumtemperatur - orange. **C:** Einblendung der Biotinbindestellen (schwarz) im NMR-Modell des Monomers. Farbcode: $\alpha 1$ - gelb, $\alpha 2$ - beige, $\alpha 3$ - orange, $\alpha 4$ - pink, $\alpha 5$ - rot, $\alpha 6$ - dunkelrot, $\alpha 7$ - lila, $\alpha 8$ - blau, $\alpha 9$ - grün

Die ESR-Experimente aus Kapitel 4 wiesen darauf hin, dass C62 in einer Interaktionsfläche zwischen den Baxmonomeren im Oligomer liegt. Um diese Vermutung zu erhärten oder zu widerlegen, wurde die Bindung von NHS-Biotin an Bax untersucht. Mittels seiner reaktiven Gruppe kann NHS-Biotin selektiv an Lysine und den N-Terminus von Proteinen binden. Bax hat neun Lysine und besitzt somit zehn Bindestellen für Biotin (siehe Abbildung 39). Drei der Lysine (K57, K58 und K64) liegen in $\alpha 2$ in der direkten Umgebung von C62. Ihr

Biotinbindeverhalten in beiden Proteinkonformationen sollte Aufschluss über das Vorhandensein einer Interaktion in diesem Bereich geben. Drei weitere Lysine befinden sich in der Nähe von C126 (K119 und K123 in $\alpha 5$, sowie K128 in dem Loop zwischen $\alpha 5$ und $\alpha 6$). Sie können die Schlussfolgerungen, die aus den ESR-Messungen an C126 gezogen wurden, erhärten oder widerlegen und gleichzeitig die Untersuchungen auf die Umgebung von C126 ausweiten. Die verbleibenden drei Lysine K21 (in $\alpha 1$), K189 und K190 (nach $\alpha 9$) liegen nah am N- bzw. C-Terminus von Bax und könnten mit dem Biotinbindeverhalten des N-Terminus weitere Informationen liefern.

Ermittlung der Anzahl der an Bax gebundenen Biotine

Vergleicht man die beiden Baxkonformationen in Bezug auf die Anzahl gebundener Biotine, zeigen sich kaum Unterschiede (siehe Abbildung 39B). Bei Raumtemperatur waren bereits nach 10 min etwa 80% aller Bindestellen in beiden Konformationen besetzt und nach 16 h Inkubation waren kaum mehr Biotine gebunden (siehe Abbildung 39B). Demnach wurden innerhalb von 10 min nahezu alle erreichbaren Bindestellen in Bax besetzt und zwei von zehn waren pro Konformation schwer zugänglich. Das Oligomer hatte aus unbekannter Ursache teilweise elf Biotine gebunden (wobei die Massenanalyse Aminosäureaustausche ausschloss). Um die Reaktion zu verlangsamen wurden die Experimente im Eisbad durchgeführt und die Inkubation über zwei Stunden verfolgt (siehe Abbildung 39B).

Lokale Biotinbindung an Bax

Um die Zugänglichkeit der einzelnen Lysine für das Biotin zu ermitteln wurde das Protein mit Trypsin verdaut und durch Masseanalyse untersucht. Die Peptide mit K189 und K190 konnten dabei nicht detektiert werden.

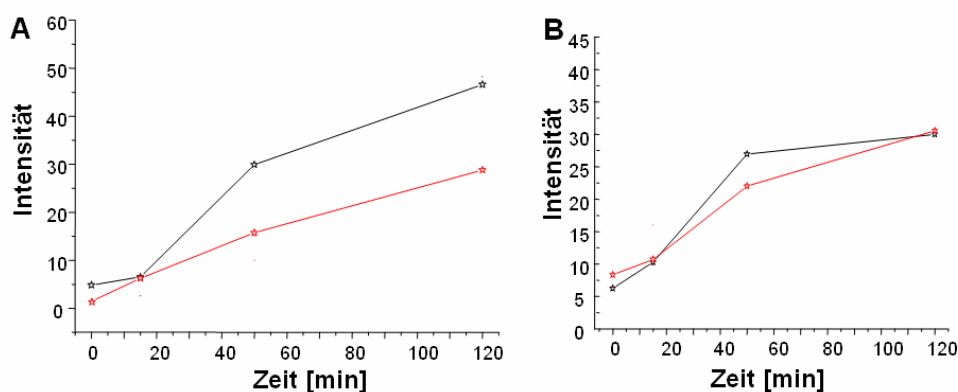


Abbildung 42: Biotinbindung an N-Terminus und K21

A: Biotinbindung an den N-Terminus (Zunahme des Peptids 1 - 9 mit einem gebundenen Biotin); B: Biotinbindung an K21 (Zunahme des Peptids 10 - 34 mit einem gebundenen Biotin). Die Peakintensität des untersuchten Peptids wurde zu der Peakintensität des Peptids 135 - 145 (ohne Biotinbindemöglichkeit) aus derselben Probe ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind das Monomer in schwarz und das Oligomer in rot.

N-Terminus und K21: Die Peptide mit dem N-Terminus und K21 (in α_1) sind im monomeren Bax laut NMR-Modell gut zugänglich (siehe Abbildung 39). Das Oligomermodell von Annis *et al.* ⁽²⁾ gibt keine Informationen zu diesen beiden Resten. Die Messdaten bestätigten die gute Zugänglichkeit beider Reste im Monomer (siehe Abbildung 42) und zeigten beide auch im Oligomer gut zugänglich. Der N-Terminus konnte dabei im Monomer etwas effektiver als im Oligomer gelabelt werden, während K21 in beiden Konformationen etwa gleich stark Biotin band (siehe Abbildung 42), somit blieben beide Reste an der Proteinoberfläche.

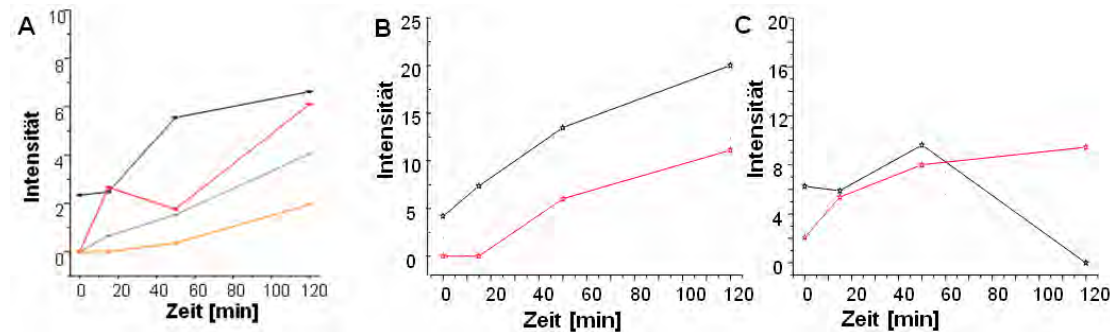


Abbildung 43: Biotinbindung an K57, K58 und K64

A: Biotinbindung an K57, K58 und K64 (Zunahme des Peptids 38 - 65 mit zwei bzw. drei gebundenen Biotinen); **B:** Biotinbindung an K58 und K64 (Zunahme des Peptids 58 - 65 mit zwei gebundenen Biotinen); **C:** Biotinbindung an K58 und K64 (Zunahme des Peptids 58 - 65 mit einem gebundenen Biotin). Die Peakintensität des untersuchten Peptids wurde wie in Abbildung 42 errechnet und auch dieselbe Legende verwendet. In A sind die Peptide mit zwei Biotinen aus der monomeren Probe in Schwarz gezeigt und die der oligomeren Probe in rot. Die Peptide mit drei Biotinen sind in der monomeren Probe grau und in der oligomeren Probe orange dargestellt.

K57, K58 und K64: K57, K58 und K64 liegen im Monomer gut zugänglich in der hoch konservierten BH3 Domäne (α_2) auf der Proteinoberfläche (siehe Abbildung 39). Im Oligomer ist ihre Lage ungeklärt. Die gute Zugänglichkeit der Lysine im Monomer bestätigte sich experimentell, wogegen sie im Oligomer deutlich niedriger war (siehe Abbildung 43). Dies zeigte sich deutlich am Peptid 38 – 65, dass mit zwei oder drei gebundenen Biotinen nachgewiesen werden konnte. In der Monomerprobe war die Intensität der Peptide mit mehreren Biotinen deutlich höher als im Oligomer (siehe Abbildung 43A). Zusätzlich konnte die Biotinbindung an K58 und K64 mit dem Peptid 58 – 64 verfolgt werden. Im Monomer hatte das Peptid mit zwei gebundenen Biotinen eine deutlich höhere Intensitätszunahme als im Oligomer (siehe Abbildung 43B). Das Peptid mit einem Biotin lag dagegen im Oligomer nach 120 min noch mit hoher Intensität vor, wogegen sie im Monomer bei 50 min ihr Maximum erreicht hatte und bei 120 min wieder bei null lag. Das Monomer hatte also nach 120 min mehrere Biotin an K57, K58 und K64 gebunden, während es im Oligomer meist genau eines war (siehe Abbildung 43C). Demnach senkt die Oligomerisierung von Bax die Zugänglichkeit von α_2 für Biotin ab.

K119, K123 und K128: K128 befindet sich im Monomer im Loop zwischen α_5 und α_6 . Im Gegensatz zu K119 und K123, die in α_5 im Proteinkern liegen, ist dieser Rest im Monomer

gut zugänglich (siehe Abbildung 39). Nach der Oligomerisierung und dem Membraneinbau des Proteins liegt K128 nach dem Modell von Annis *et al.* ⁽²⁾ am Rande des Lipidbilayers und K119 und K123 befinden sich im Lipid.

Die Biotinbindung an K128 konnte mit dem Peptid 124 - 134 untersucht werden. In der monomeren Konformation nimmt die Intensität des Peptids mit einem Biotin über den gesamten Zeitraum zu, während sie im Oligomer nur bis zur Probe bei 50 min zunimmt, dann aber wieder absinkt (siehe Abbildung 44C). K128 bindet das Biotin im Oligomer demnach schneller als im Monomer. Dass dieses Peptid im Monomer über den gesamten Zeitraum vorhanden ist und an Intensität zunimmt, zeigt auch dass die Schnittstelle nach K123 die ganze Zeit für Trypsin zugänglich ist. K123 ist also im Monomer weitgehend unzugänglich, wogegen es im Oligomer besser Biotin binden konnte.

In beiden Konformationen wurden nur wenige Peptide 120 - 134 mit zwei gebundenen Biotinen nachgewiesen (siehe Abbildung 44B). Also scheint K123 nie deutlich besser als K119 zugänglich zu sein. Wenn Biotin an alle drei Biotine gebunden ist, entstehen Peptide, die zu groß für die Identifikation mittels MALDI-MS sind. Die Biotinbindung an K119 wurde mit dem Peptid 110 - 119 (ohne Biotin, siehe Abbildung 44A) verfolgt. Im Oligomer verschwand es nach 50 min vollständig, wogegen es im Monomer nachweisbar blieb. K119 und K123 verlassen also während der Oligomerisierung den Proteinkern und ihre Zugänglichkeit für Biotin verbessert sich. Die vorhandene Intensität des Peptids 124 – 134 (mit einem Biotin; siehe Abbildung 44) nach 120 min im Oligomer zeigt aber auch, dass der Zugang nach wie vor beschränkt ist, zumal zu diesem Zeitpunkt etwa 80% der Biotinbindestellen im Oligomer besetzt sind (siehe Abbildung 41).

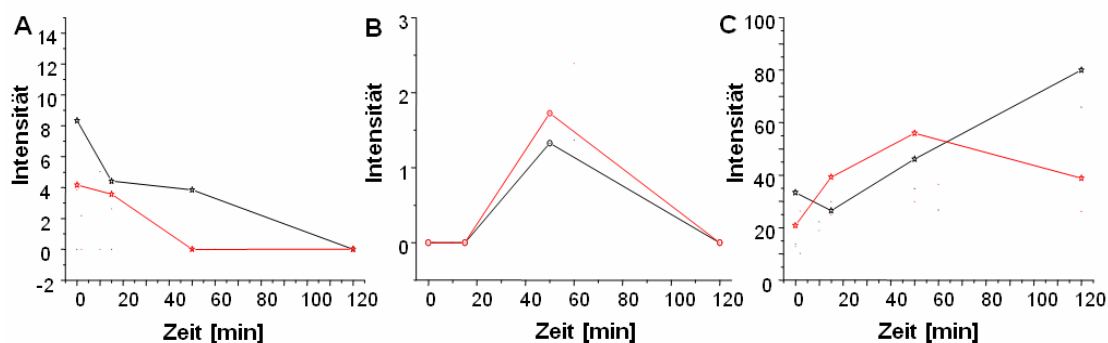


Abbildung 44: Biotinbindung an K119, K123 und K128

A: Biotinbindung an K119 (Abnahme des Peptids 110 - 119 ohne Biotin; die Intensität dieses Peptids ist auch nach Trypsinverdau ohne vorherige Biotinbindung schlecht); **B:** Biotinbindung an K123 und K128 (anhand des Peptids 120 - 134 mit zwei gebundenen Biotinen); **C:** Biotinbindung an von K128 (Anhand des Peptids 124 - 134 mit einem Biotin). Die Peakintensität der untersuchten Peptide wurden wie in Abbildung 42 errechnet und auch dieselbe Legende verwendet.

Kovalente Vernetzung der Monomere im Baxoligomer

Um die Interaktionsflächen zwischen den Monomeren des Baxoligomers direkt zu

untersuchen wurden die Moleküle mit Rutheniumtrisbipyridyldication oder Glutaraldehyd kovalent verknüpft und versucht mittels Massenspektrometrie die Vernetzungsstellen zu identifizieren.

Experimente mit Rutheniumtrisbipyridyldication

Das Rutheniumtrisbipyridyldication kann laut Fancy *et al.* ⁽¹³⁸⁾ mit Hilfe von Licht und in Anwesenheit von Ammoniumpersulfat mit Tyrosin reagieren und es in ein Radikal umwandeln. Das Radikal kann dann eine kovalente Bindung zu einem benachbarten Tyrosin, Lysin oder Cystein ausbilden ⁽¹³⁸⁾ (siehe Abbildung 45B, C). Bax besitzt zwei Tyrosine, zwei Cysteine, neun Lysine und einen N-Terminus. Wenn ein Tyrosin die Vernetzung startet ergeben sich demnach 25 potenzielle Vernetzungsstellen. Drei Lysine und ein Cystein liegen dabei in der BH3 Domäne.

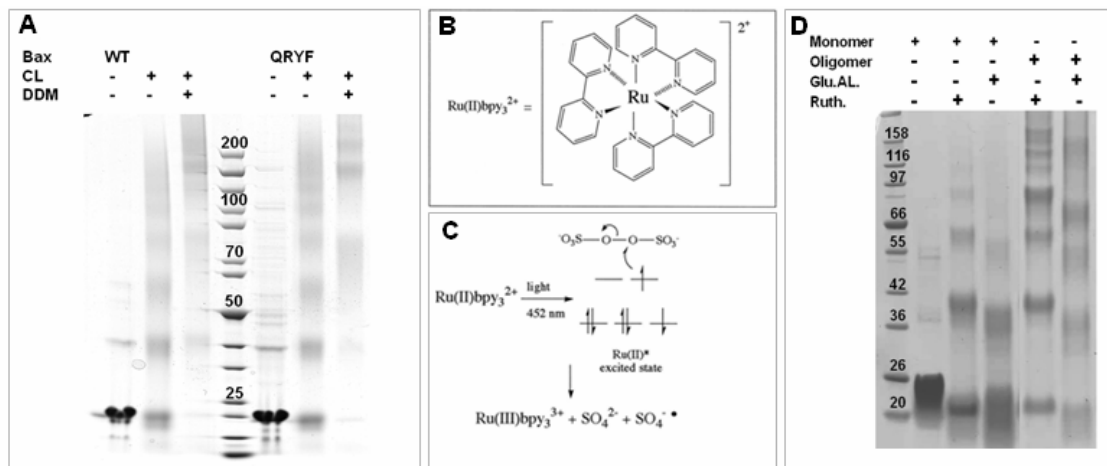


Abbildung 45: Quervernetzungsexperimente an Bax

A: SDS-Gradientengel von monomerem und oligomerem Baxprotein (WT und Bax QRYF: Q171R, Y162F) vor und nach dem Vernetzen mit Rutheniumtrisbipyridyldication; **B:** Struktur des Rutheniumtrisbipyridyldication ⁽¹³⁸⁾; **C:** Aktivierungsreaktion des Rutheniumtrisbipyridyldication ⁽¹³⁸⁾. **D:** 4-12% SDS-Gradientengel von monomerem und oligomerem Bax (WT) vor und nach dem Vernetzen mit Glutaraldehyd im Vergleich zum Vernetzen mit Rutheniumtrisbipyridyldication (diese Proben waren in Puffer mit 20 mM HEPES und 100 mM NaCl, pH7, 5;

Bax (WT)

Die Monomere des Baxoligomers konnten erfolgreich verbunden werden (Abbildung 45A). Die Proben wurden auf einem SDS-Gel separiert, dann mit Trypsin verdaut und schließlich versucht möglichst viele Peptide massenspektrometrisch nachzuweisen. Verbundene Peptide konnten nicht identifiziert werden, da die Vernetzung das Flugverhalten der Peptide im Massenspektrometer verändert, sodass ihnen keine korrekten Massen zugeordnet werden konnten. Daher wurde nach Peptiden gesucht, die spezifisch nach der kovalenten Verknüpfung verloren gingen. Zwei Proben wurden untersucht und verglichen:

- (1) Bax
- (2) quervernetzte Baxoligomere in DDM (siehe Abbildung 46A).

Im nicht vernetzten Bax konnten 73% der 192 Aminosäuren identifiziert werden, im vernetzten Oligomer 67% (siehe Abbildung 46B, C). Einige Peptide konnten aufgrund ihrer Größe nicht massenspektrometrisch erfasst werden. Die Peptide 35 - 37, 90 - 94, 120 - 123, 191 - 192 waren zu klein um erfasst zu werden; die Peptide 58 - 64, 58 - 65, 59 - 64 und 59 - 65 waren so klein, dass sie nur mittels Esi-Q-TOF identifiziert wurden und das Peptid 148 - 189 war zu groß, um erfasst zu werden. Es kann auch mit anderen massenspektrometrisch etablierten Proteasen kaum verkleinert werden.

Nach der Vernetzung gingen im Wesentlichen zwei Peptide verloren: 59 - 64 in der BH3 Domäne ($\alpha 2$) und 124 - 128 in $\alpha 5$ (siehe Abbildung 46). Betrachtet man die BH3 Domäne zeigt sich, dass das Peptid 38 - 57 in beiden Proben identifiziert wurde und somit K57 nicht an der Vernetzung teilnahm. Von den Peptiden 38 - 58 und 65 - 78 wurden im vernetzten Oligomer nur sehr geringe Mengen identifiziert und die Peptide 58 - 64, 58 - 65, 59 - 64, 59 - 65 mit K58, C62 oder K64 wurden im verbundenen Protein überhaupt nicht identifiziert. K58, C62 oder K64 scheinen also an der Vernetzung teilzunehmen. Als zweiter Interaktionsbereich bot sich entweder $\alpha 5$ oder der Bereich zwischen $\alpha 7$ und $\alpha 9$ an, der im Versuch nicht erfasst wurde.

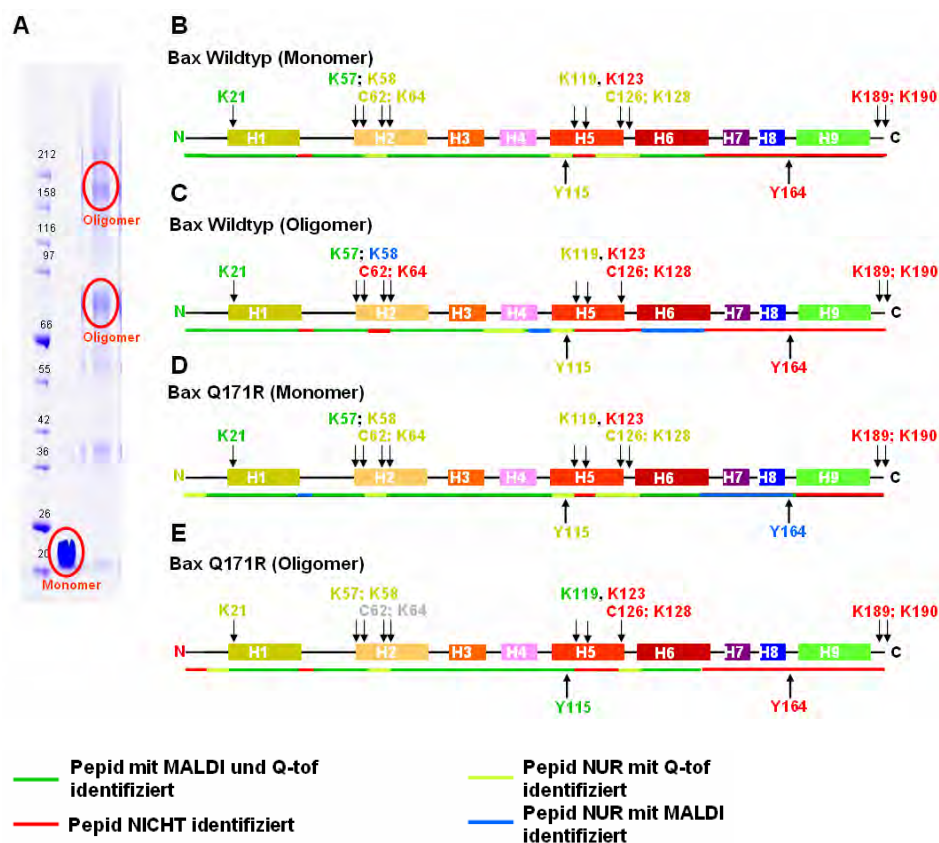


Abbildung 46: Massenspektroskopische Analyse von Bax

A: SDS-Gel der verwendeten Baxproben (WT; für das Oligomer wurde immer die Tetramer- oder Oktamerbande verwendet); **B- E:** Darstellung der Sekundärstruktur von Bax und Einblendung der potenziell zur Interaktion fähigen Aminosäuren und der tatsächlich identifizierten Peptide von dem nicht vernetzten Bax (WT); (B); dem vernetzten Baxoligomer (WT); (C); dem nicht vernetzten Bax Q171R (D) und dem vernetzten Bax Q171R Oligomer (E).

Da laut Fancy et al. ⁽¹³⁸⁾ immer ein Tyrosin an der Vernetzung teilnimmt, müsste der Interaktionspartner der BH3 Domäne (hat kein Tyrosin) Y115 oder Y164 sein. Das Peptid mit Y115 (110 – 119, α 5) wurde in beiden Proben eindeutig identifiziert und ist damit wohl nicht beteiligt. Y164 (α 8) liegt im nicht identifizierten großen C-terminalen Peptid und konnte nicht untersucht werden. Um es erfassen zu können, wurden zwei Baxmutanten mit einer zusätzlichen Schnittstelle im C-terminalen Peptid kloniert: Bax Q171R und Bax L161R, von denen nur Bax Q171R erfolgreich exprimieren werden konnte.

Bax Q171R und Bax QRYF (Q171R und Y164F)

In biophysikalischen Analysen zeigte Bax Q171R keine deutlichen Unterschiede zum Wildtypprotein (siehe Anhang 8). Y164 konnte in MALDI Spektren des nicht vernetzten Bax Q171R, aber nicht im verknüpften Protein identifiziert werden (siehe Abbildung 46D, E). Y115 wurde wiederum in beiden Proben nachgewiesen (siehe Abbildung 46D, E). Die Daten ließen eine Beteiligung von Y164 an der Vernetzung wahrscheinlich erscheinen und wurden deshalb mit der Baxmutante QRYF (Q171R und Y164F) überprüft. Ohne Y164 und mit nur noch einem Tyrosin im Protein sollte Bax nicht zu Oligomeren, sondern höchstens zu Dimeren, verbunden werden. Die Experimente zeigten jedoch eine vergleichbare Vernetzung wie beim Wildtypprotein (siehe Abbildung 45A). Y164 kann also nicht essentiell für die kovalente Bindung sein und somit ist Tyrosin nicht die einzige Aminosäure, die vom Rutheniumreagenz aktiviert wird. Es muss also andere als den von Fancy *et al.* vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus geben.

Die Ergebnisse der Experimente an Bax Q171R bestätigen die Annahme, dass K58 bis K64 an einer Interaktion teilnehmen. Es wurden zwar Peptide mit K57 und K58 in beiden Proben nachgewiesen (38 - 57 und 38 - 58) aber die Signale der Peptide mit 58 - 64 und 58 - 65 gingen im vernetzten Oligomer fast vollständig verloren. Zusätzlich ging in Bax Q171R Protein das Peptid: 120 - 123 (in α 5) nach der Vernetzung verloren (im Wildtypprotein konnte dieses Peptid nie identifiziert werden). Die Annahme das α 5 an einer Interaktionsfläche zwischen den Monomeren beteiligt ist, wird dadurch gestärkt.

Experimente mit Glutaraldehyde

Die Ergebnisse des letzten Abschnitts wiesen darauf hin, dass keine Tyrosine am Vernetzen teilnehmen vielleicht aber Lysine, da die für die Vernetzung interessanten Peptide 124 - 128 und 58 - 65 beide Lysine (und Cysteine) tragen. Die Quervernetzung des Oligomers konnte auch mit Glutaraldehyd durchgeführt werden, das hauptsächlich Lysine verbindet (siehe Abbildung 45D).

Puls-ESR-Messungen zur Ermittlung der Abstände zwischen den in Cysteinen in Bax

Es blieb unklar, ob die an der Vernetzung teilnehmenden Aminosäuren aus der BH3 Domäne mit einer zweiten BH3 Domänen oder einem anderen Teil des Proteins (z.B. $\alpha 5$) interagieren. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die Abstände zwischen C126 und C62 mittels Puls-ESR-Messungen ermittelt. Eine Einführung in diese Methode findet sich in Anhang 5. Die Proben wurden vor der Messung in Hinblick auf die Proteinkonzentration, die Labeleffizienz und die Anzahl freier Elektronen überprüft. Es zeigte sich, dass nahezu 100% der Baxmoleküle das Label trugen, aber etwa 40% der freien Elektronen während der Probenvorbereitung verloren gingen.

Die Experimente wurden in Kooperation mit der Gruppe von Prof. Steinhoff (Universität Osnabrück) durchgeführt und Dr. Bordignon vermaß die Proben. Die ermittelten Rohdaten sind in Anhang 6 gezeigt.

Monomer

Gemäß der NMR-Daten beträgt der Abstand der C β -Atome beider Cysteine im monomeren Bax 2,55 nm⁽¹⁾. Die Puls-ESR-Experimente zeigten einem Abstand von 3,15 nm zwischen den freien Elektronen des Spinlabels an (siehe Abbildung 47A). Da sich der Abstand zwischen dem C β -Atom des Cysteins und dem freien Elektron zu der ursprünglichen Distanz summiert passt die ermittelte Distanz gut zu den NMR-Daten.

In den Bax C126 Monomeren wurden keine Spin-Spininteraktionen gemessen. Bax C62 enthielt einen kleinen Anteil von Dimeren (5-10%), die eine Distanz von 2,4 nm zueinander hatten. Dieselbe Distanz wurde im Bax C62 Oligomer gefunden. Die monomere Probe enthielt also einige Dimere, die über ihre BH3 Domänen verbunden waren.

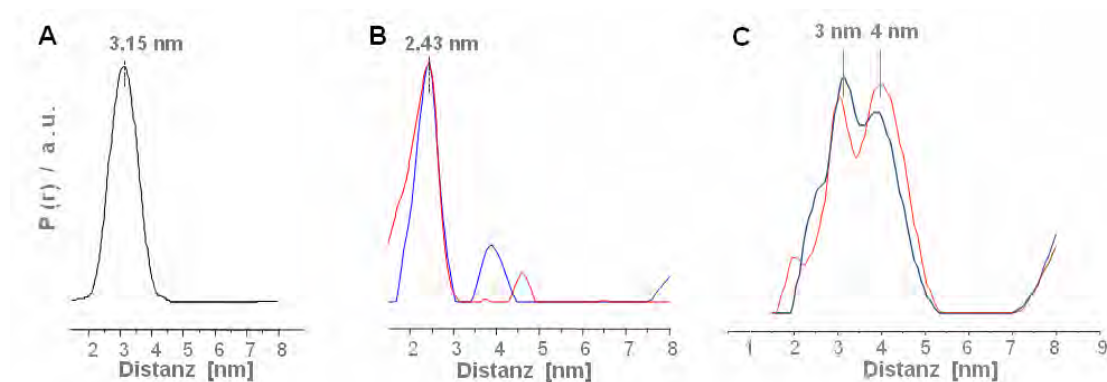


Abbildung 47: ESR-Messungen zu den Distanzen zwischen Cysteinen in Bax

A: Abstand der zwei Spinlabel an C62 und C126 im monomeren Baxprotein. **B:** Distanzmessungen an Bax C62 in 0,5% DDM (rot) und in Rinderherzlipiden (blau). Die kleinen Signale bei 4 - 5 nm sind wahrscheinlich keine Distanzen sondern stammen aus dem Probenhintergrund. **C:** Distanzmessungen an Bax C126 in 1% DDM (rot) und in E. coli Lipiden (blau).

Oligomer in Detergenz und Lipid

Nach der Oligomerisierung in DDM oder dem Einbau von Bax in Liposomen wurden die Abstände zwischen den Cysteinen neu vermessen. In Lipid relaxierte das Signal des freien Elektrons allerdings so schnell, dass die Distanzen im Protein mit beiden Cysteinen nicht ermittelt werden konnten. Alle in Oligomeren ermittelten Distanzen sind in Abbildung 49C gezeigt.

Abstände im Oligomer von Bax C62

C62 liegt in der BH3 Domäne (bestehend aus $\alpha 2$: ASTKKLSECLKRGDELD). Im Bax C62 (C126A) Oligomer wurde sowohl in Detergenz als auch in Liposomen eine scharfe 2,4 nm Distanz gemessen (siehe Abbildung 47B). Die Distanz ist also in beiden Substanzen nahezu identisch und das Protein hatte demnach in beiden denselben oder einen sehr ähnlichen Oligomeraufbau. Die Messung zeigt auch, dass zwei BH3 Domänen im Oligomer zu einer Interaktionsfläche zusammen kommen. Eine zweite Distanz konnte nicht ermittelt werden, das nächste C62 lag also mehr als 5 nm entfernt.

Abstände im Oligomer von Bax C126

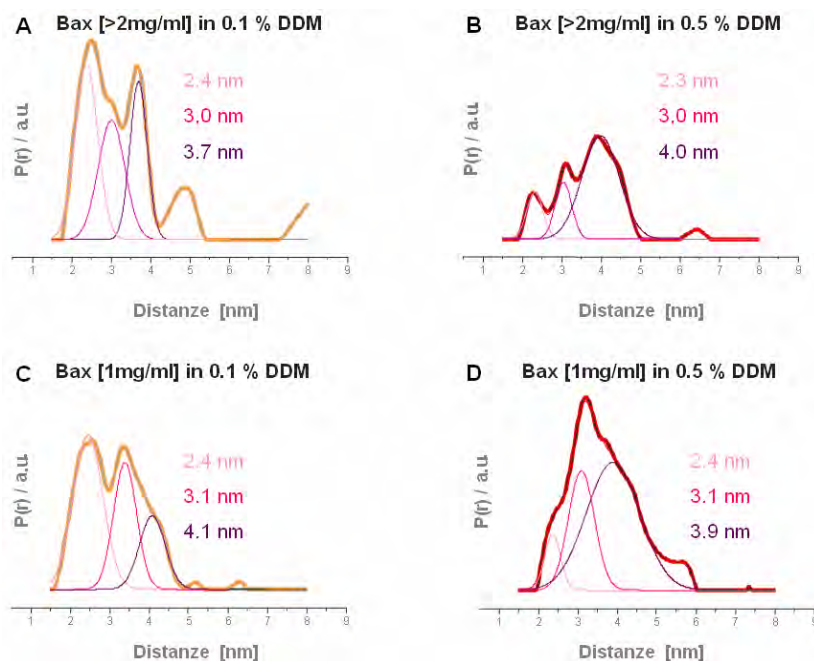


Abbildung 48: Vergleich der Distanzverteilung von Bax C126 bei verschiedenen Protein Detergenz Quotienten

A: Hohe Proteinkonzentration in 0,1% DDM; B: Hohe Proteinkonzentration in 0,5%DDM; C: Niedrige Proteinkonzentration in 0,1% DDM; D: Niedrige Proteinkonzentration in 0,5%DDM. Je nach 30-60 min Inkubation in Detergenz.

C126 liegt im Übergang zwischen $\alpha 5$ und dem Loop vor $\alpha 6$. Diese Position erlaubt im Monomer eine hohe Beweglichkeit des Labels, die nach der Oligomerisierung in Detergenz oder Lipid stark eingeschränkt ist (gezeigt in Kapitel 4). In den Baxoligomeren (in Detergenz

und Liposomen) wurden jeweils zwei Distanzen von 3 und 4 nm identifiziert, die in Liposomen und Detergenz weitgehend übereinstimmten (siehe Abbildung 47C). Die Messungen zeigte, dass Bax mindestens als Tetramer vorlag und jedes freie Elektron am Label an C126 mindestens zwei andere freie Elektronen in benachbarten Monomeren wahrnehmen kann. Zwei $\alpha 5$ kommen im Oligomer also nicht nah zueinander, es ist aber möglich, dass $\alpha 5$ mit anderen Regionen (z.B. der auch membranständigen $\alpha 9$) in den benachbarten Monomeren interagiert. Um diese zu finden bräuchte es weitere Untersuchungen an neuen Baxmutanten.

Nach Variationen des Protein/Detergenzquotienten tauchte eine zusätzliche 2,4 nm Distanz auf (siehe Abbildung 48). Je größer der Quotient wurde, desto größer wurde der Anteil dieser Distanz (siehe Abbildung 48). Die 2,4 nm Distanz in Bax C126 entspricht der Oligomerdistanz in Bax C62. Da die Proben aber komplett separat gereinigt wurden, ist die Ähnlichkeit zufällig und kann nicht aus einer Mischung beider Proben entstanden sein.

Abstände in Oligomer von Bax (WT; C62 und C126)

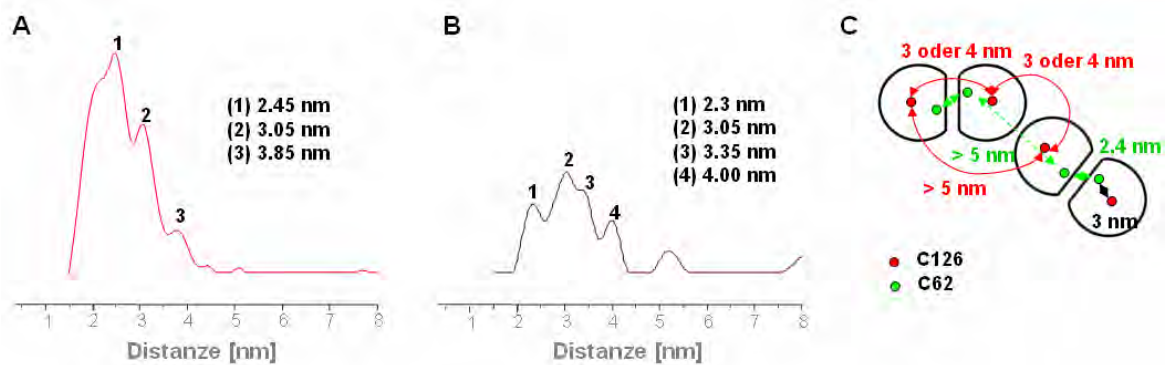


Abbildung 49: Distanzmessungen am Baxprotein mit beiden Cysteinen und Darstellung der gemessenen Abstände

A: Bax (WT) in 0,5% DDM mit MTSSL. B: Bax (WT) in 0,5% DDM, Mischung aus 25% Bax mit MTSSL und 75% Bax mit Label ohne freies Elektron; C: Teilansicht des Baxoligomers mit den ermittelten Distanzen. Die schwarzen Kreise stellen Baxmonomere dar.

Das Oligomer von Bax (WT) zeigte eine breite Distanzverteilung in der alle bisher gefundenen Distanzen verborgen liegen (2,4 nm etwa 3 nm und etwa 4 nm; siehe Abbildung 49A), wobei der 2,4 nm Peak die stärkste Signalintensität zeigte. Es erschien keine weitere Distanz, also konnte dem Abstand zwischen C62 und C126 innerhalb eines Monomers im Oligomer keine Distanz zugeordnet werden. Um diese Distanz zu finden und von den anderen Spininteraktionen zu unterscheiden, sollte die Signalintensität dieser Distanz, durch eine Verdünnung aller anderen Distanzen, erhöht werden. Dazu wurden zwei verschiedene Label an Bax gebunden: Ein Aliquot mit dem MTS-Spinlabel und ein weiteres mit einem Label ohne freies Elektron. Beide wurden gemischt, sodass nur 25% der Monomere freie Elektronen trugen. Danach wurden Detergenz zugegeben und die Abstände im Oligomer ermittelt. Dabei gab es Probleme, da ein Teil des Proteins nach Bindung an das Label ohne

das freie Elektron ausfiel und auch Teile der gemischten Probe aggregierten. Damit war das tatsächliche Mischverhältnis unklar. Nach der Messung lag das intensivste Peakmaximum bei 3,05 nm und es erschien eine neue, fast genauso intensive Distanz bei 3,35 nm (siehe Abbildung 49B). Welche der beiden die gesuchte Distanz ist, blieb dabei unklar. Aber das Experiment zeigte, dass die Oligomerisierung den Abstand zwischen C62 und C126 nur wenig veränderte. Theoretisch sollte in der Distanzverteilung auch die Distanz zwischen C62 und C126 aus verschiedenen Monomeren vorhanden sein. Sie konnte jedoch nicht zugeordnet werden.

Diskussion

Interaktionsflächen zwischen den Monomeren

Die Ergebnisse der ESR-, Biotinbindungs- und Verknüpfungsexperimente zeigten, dass C62 und seine Umgebung durch die Oligomerisierung schlechter zugänglich wurden und zwei BH3 Domänen im Oligomer dicht zusammenkommen und eine Interaktionsfläche ausbilden. BH3 ($\alpha 2$) ist eine amphipatische Helix deren eine Seite hydrophob ist und daher in der membranständigen Form dem Lipid zugewandt sein könnte, während die andere Seite viele Ladungen trägt (siehe Abbildung 50). Kommen zwei BH3 Domänen dicht zusammen sollten sie, gemäß der in Abbildung 50 gezeigten Struktur, Salzbrücken miteinander ausbilden können und zusammenkommen.

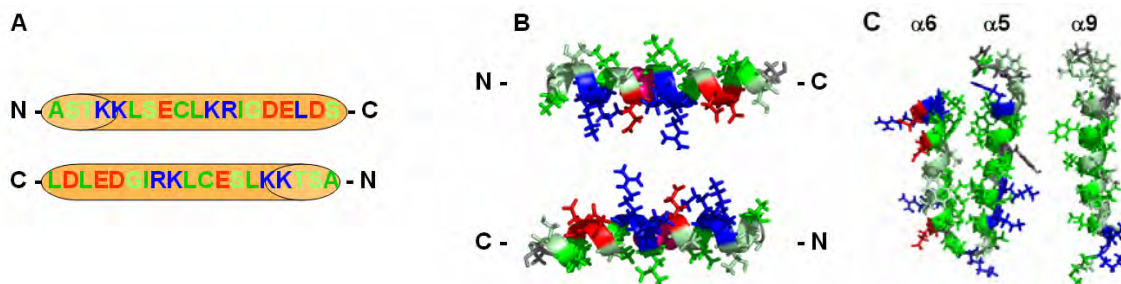


Abbildung 50: Interaktionen zwischen zwei $\alpha 2$ Helices im Baxoligomer und Darstellung von $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 9$

A: Die Sekundärstruktur von zwei $\alpha 2$ Helices (als Zylinder dargestellt) aus benachbarten Monomeren des Oligomers mit eingblendeter Aminosäuresequenz. **B:** Inhalt wie A aber als Banddarstellung mit eingblendeten Aminosäureseitenketten. **C:** Darstellung der membranständigen Helices ($\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 9$) von Bax. Basische Aminosäuren [H, K, R] sind in blau, saure [E, D] in rot, hydrophobe [I, L, A, V, C, M, F] in grün und leicht hydrophobe [S, T, G, W] in hellgrün dargestellt. Die Restlichen sind in grau gezeigt.

Die zweite Interaktionsfläche zwischen den Monomeren muss auf der gegenüberliegenden Seite des Monomers liegen (siehe Abbildung 49C). Sie konnte nicht eindeutig identifiziert werden, aber die Vernetzungsexperimente dieses Kapitels und von Kapitel 7 deuten auf eine Interaktion innerhalb der Membran hin, an der $\alpha 5$ beteiligt sein könnte. Die ESR-Daten zeigten, dass im Oligomer nicht zwei $\alpha 5$ nah zusammen kommen, sondern $\alpha 5$

möglicherweise mit $\alpha 6$ oder $\alpha 9$ (beide auch membranständig) eines andern Monomers interagiert. Die Biotinbindeexperimente zeigten $\alpha 5$ im Oligomer zugänglicher als im Monomer aber immer noch schlecht zugänglich, sie könnte also an einer Interaktion teilnehmen. Alle untersuchten Reste liegen auf einer Seite der Helix, schaut man sich $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 9$ genauer an (siehe Abbildung 50C), könnten $\alpha 5$ und $\alpha 6$ mit ihren einander abgewandten Seiten zusammenpassen und eine Interaktionsfläche ausbilden. Dies erscheint von der Sequenz her wahrscheinlicher als eine Interaktion zwischen $\alpha 5$ und $\alpha 9$.

Die zusätzliche Distanz im Oligomer bei niedriger Detergenzkonzentration

Es stellte sich die Frage, warum eine zusätzliche 2,4 nm Distanz in Bax C126 identifiziert wurde, wenn ein großer Protein/Detergenzquotient vorlag. Die Proteinkonzentration in den ESR-Messungen war mit 2 - 5 mg/ml (100-250 μ M Baxmoleküle) höher als in allen anderen Experimenten dieser Arbeit (mit Ausnahme der Kristallisation). Zur Bildung einer DDM Mizelle sind 110 - 140 DDM Moleküle notwendig⁽¹³⁹⁾ und 0,1% DDM entsprechen 2 mM DDM Molekülen. Bei hoher Bax und niedriger Detergenzkonzentration kamen also nur 10 - 20 DDM Moleküle auf ein Baxmonomer, zu wenige um eine Mizelle pro Monomer zu bilden, sondern es gab nur eine Mizelle für fünf bis zehn Baxmonomere. Nur in den Proben mit mindestens 0,5% DDM und niedrigerer Baxkonzentration (siehe Abbildung 48D), gab es ausreichend Detergenz, um alle Monomere mit Mizellen zu umschließen. Experimentell zeigten diese Proben nur einen kleinen Anteil der 2,4 nm Distanz und auch bei dem in Liposomen insertiertem Bax kam sie kaum vor (siehe Abbildung 48 und 47). Wir nehmen daher an, dass in den Proben mit dem hohen Protein/Detergenzquotienten nicht alle hydrophoben Bereiche aller Baxmoleküle befriedigend abgeschirmt wurden und daher nicht alle Moleküle die Oligomerkonformation einnehmen konnten. Da die Raumtemperatur X-Band Spektren gleichzeitig keine deutlichen Unterschiede zwischen den Proben aus Abbildung 48 zeigten, hat das vorhandene Detergenz aber eine Konformationsänderung eingeleitet. Dabei kamen hydrophobe Bereiche an die Proteinoberfläche, die gegen die hydrophile Umgebung im Puffer abgeschirmt werden müssen. Ohne genug Detergenz für die Abschirmung legen sie sich vermutlich mit ihren hydrophoben Bereichen zusammen. Da $\alpha 5$ (mit C126) zu den hydrophoben Bereichen gehört, könnten sich die $\alpha 5$ aus mehreren Monomere zusammengedrängt haben, wobei die 2,4 nm Distanz entstand. Passend dazu zeigten die AFM-Messungen in Kapitel 8 nach Verdünnung des Detergenz Partikel in Dimergröße. Vielleicht haben diese Dimer gleichzeitig die kurze Distanz und sind dem von O'Neill *et al.*⁽⁹⁵⁾ (siehe Abbildung 10; Kapitel 1) vorgestellten Dimeren ähnlich, sie hätten jedenfalls eine Distanz von etwa 2 nm und eine Größe, die zu den Partikeln in den AFM-Bildern passt.

Zusammenfassung:

Bax bildet mindestens Tetramere aus. Die Konformation des Oligomers und die Abstände zwischen den Cysteinen sind in Detergenz und Liposomen nahezu identisch. Jedes Monomer im Oligomer liegt zwischen zwei anderen Monomeren und muss daher an zwei Stellen Kontakt zu ihnen aufnehmen. Einen Interaktionsbereich bilden die BH3 Domänen benachbarter Monomere aus. Der Zweite konnte nicht näher identifiziert werden, aber $\alpha 5$ könnte beteiligt gewesen sein. Der Abstand zwischen C62 und C126 innerhalb des Monomers veränderte sich durch die Oligomerisierung nur wenig. Im Bax C62 Oligomer hat das freie Elektron 2,4 nm Abstand zum nächsten freien Elektron, alle weiteren Elektronen lagen mehr als 5 nm entfernt. Im Bax C126 Oligomer kann das freie Elektron zwei andere Elektronen im Abstand von etwa 3 nm bzw. 4 nm wahrnehmen.

Kapitel 7: Untersuchungen zur Anzahl der Monomere im Baxoligomer

Ziel:

Bestimmung der Anzahl der Monomere im Baxoligomer in Detergenz und Lipid

Ergebnisse

Laufverhalten von Bax in nativen Gelen

Eine Möglichkeit zur Abschätzung der Größe von Membranproteinkomplexen ist die Blue-Nativ-Gelelektrophorese^(140,141). Vor und während der Trennung werden die Proteine dabei nicht denaturiert, sondern sie wandern gefaltet im elektrischen Feld. Das Coomassie Blue in den Puffern lagert sich an die hydrophoben Proteinbereiche an⁽¹¹⁶⁾ und schirmt sie gegen die wässrige Umgebung ab. Bax wurde parallel als Monomer und als Oligomer, vorinkubiert in DM, DDM und OG sowie in CHAPS, untersucht (gezeigt in Abbildung 51).

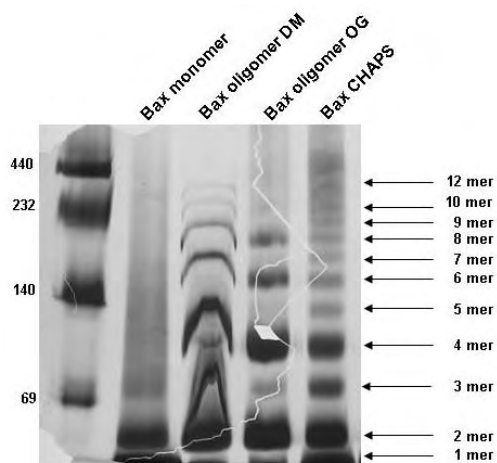


Abbildung 51: Blue Nativ Gel Elektrophorese von Bax

Das monomere Bax zeigte zwei Banden, die Monomere bzw. Dimere repräsentieren.

Baxproben vorinkubiert in DM oder OG zeigten eine Vielzahl von leiterartig angeordneten Banden im Gel. Die meisten Oligomere haben dabei eine gerade Anzahl von Monomeren. Untersucht man die Gesamtgröße des Proteinkomplexes sind die intensivsten Banden Dimer- und Tetramerbanden und das Größte sichtbare Oligomer ein Dodekamer.

Das Laufverhalten von Bax in CHAPS unterscheidet sich von dem in anderen Detergenzien (siehe Abbildung 51). Im Gel liegen verschieden große Oligomere vor, die insgesamt kleiner waren, als in den DM oder OG Proben. Dabei tauchten zusätzliche Banden zwischen den in DM und OG sichtbaren auf.

Proteinvernetzungsexperimente

Die kovalente Verbindung von Baxmonomeren wurde in verschiedenen Publikationen zur Unterscheidung der aktiven und der inaktiven Baxkonformation genutzt (z.B. ⁽¹⁴²⁾). In dieser Arbeit wurde als Vernetzungsreagenz Rutheniumtrisbipyridyldication ⁽¹³⁸⁾ verwendet, dass in Kapitel 6 vorgestellt wurde. Die Experimente werden hier noch einmal aufgegriffen, um die Anzahl der Monomere im Oligomer abzuschätzen. Unter optimalen Bedingungen sollten Oligomere möglichst komplett vernetzt werden. Es gibt deutliche Unterschiede im Vernetzungsverhalten des monomeren und oligomeren Bax und zwischen den beiden membranständigen Proben in Detergenz bzw. Liposomen (siehe Abbildung 52).

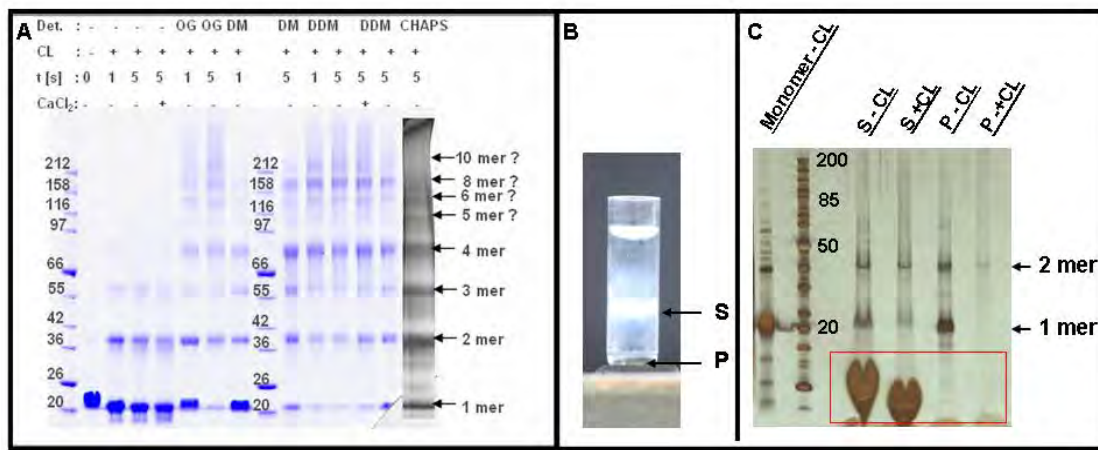


Abbildung 52: Kovalente Verbindung von Bax in verschiedenen Umgebungen

A: 4-12% SDS-Gradientengel von monomerem und oligomerem Bax nach dem Vernetzen; **B:** Lipidfraktionen nach Dichtegradienten Zentrifugation (S: schwimmende Bande; P: Pellet); **C:** 4-12% SDS-Gradientengel von den beiden Lipid Fraktionen vor und nach dem Vernetzen; Rote Box: Banden die Bax unabhängig durch die Liposomen entstehen. (Lipid Zusammensetzung: 80% Phosphatidylcholin, 20% Cardiolipin)

Ohne Detergenzzugabe wandert Bax nach der Reaktion hauptsächlich als Monomer im elektrischen Feld. Dazu kommen Dimere und kleinere Anteile von Trimeren und Tetrameren (siehe Abbildung 52A).

Nach Vorinkubation des Proteins in OG, DM oder DDM erschienen deutlich größere Oligomere (siehe Abbildung 52A). Die intensivste Bande zeigte ein Tetramer, die Höchste ein Dekamer. Wie bereits in den nativen Gelen erschienen hauptsächlich Oligomere mit einer geraden Anzahl von Monomeren. Eine der zwei Interaktionsflächen zwischen den Monomeren schien also effektiver vernetzt worden zu sein als die andere.

Oligomere mit ungerader Anzahl an Monomeren waren hauptsächlich in den Proben mit CHAPS und im Monomer vorhanden (siehe Abbildung 52A). Eine Interaktionsfläche zwischen den Monomeren wurde dort also nicht wie in den anderen Detergenzien ausgebildet. Der Vergleich von Bax in CHAPS mit den anderen Proben zeigt, dass es dem Monomer ähnlicher ist als dem Oligomer. Nach der Silberfärbung erscheinen aber in der CHAPS Probe mehr und größere Oligomerbanden als in der Monomerprobe.

In Liposomen inseriertes Bax wurde mittels Gradientenzentrifugation gereinigt, zwei Bax und Liposomen enthaltende Fraktionen getrennt und ein Teil der Fraktionen wurde kovalent verknüpft (siehe Abbildung 52B). Nach der Verknüfungsreaktion wurden Dimere aber keine größeren Oligomere gefunden (siehe Abbildung 52C). Vergleicht man die Proben vor und nach der Verbindung, scheint nach der Reaktion viel weniger Protein im Gel aufgetrennt worden zu sein, obwohl die Proben gleiche Proteinmengen enthielten (siehe Abbildung 52C).

Diskussion

In den Monomerproben der verschiedenen Experimente waren immer auch einige Dimere vorhanden (siehe auch Kapitel 6 und 8). In den nativen Gelen war das Dimer allerdings stärker präsent als in allen anderen Messungen, diese starke Dimerbildung könnte durch Anlagerung des Detergenz-ähnlichen Coomassies entstanden sein. Nach dem kovalenten Vernetzen sind in der Monomerprobe auch Tri- und Tetramere sichtbar geworden, sie könnten bei Kollisionen der Monomere in der konzentrierten Probe entstanden sein.

Baxoligomere erschienen im nativen Gel nicht als eine sondern leiterartig angeordnete Oligomerbanden. Dieses Ergebnis ließ zwei Schlüsse zu: (1) Entweder zerfallen die Baxoligomere im Gel aufgrund ihrer veränderten Umgebung in kleinere Komplexe oder (2) Bax liegt ohnehin in einer sehr inhomogenen Größenverteilung vor. Da sich in den Puls-ESR-Messungen zeigte, dass Baxoligomere bei Detergenzmangel zerfallen, erscheint die erste Möglichkeit plausibler, zumal die Oligomere in den Experimenten aus Kapitel 8 nicht derart inhomogen erscheinen. In den SDS-Gelen nach der kovalenten Verknüpfung waren auch leiterartig angeordnete Oligomere sichtbar. Hier entstanden sie aber, weil das Reagenz nicht immer alle Monomere eines Oligomers verknüpfte sondern lediglich Teile des Oligomers miteinander verbunden wurden.

Es fällt auf, dass sowohl in den nativen als auch den SDS-Gelen nach der Vernetzung die Oligomere vorwiegend eine gerade Anzahl von Monomeren hatten. Eine Interaktionsfläche zwischen den Monomeren scheint also wesentlich stabiler entgegen dem Zerfall zu sein als die andere, was auch die Ergebnissen der Puls-ESR-Messungen aus Kapitel 6, sowie die AFM-Messungen aus Kapitel 8 bestätigten. Eine der beiden Interaktionsbereiche ist auch besser zugänglich für das Rutheniumreagenz.

In Kapitel 6 wurde eine Interaktion zwischen zwei BH3 Domänen nachgewiesen. Diese Interaktion findet vermutlich über Salzbrücken und unter Beteiligung von Lysin statt (siehe Kapitel 6 und 9). Sie bietet sich daher als ideales Ziel für eine schnelle Verknüpfung mittels Vernetzungsreagenzien an. Im nativen Gel würden die Salzbrücken die Ladungen auch gegen die hydrophobe Umgebung abschirmen, sodass auch dort eine hohe Stabilität vorliegen sollte. Als zweite Interaktionsfläche wird in Kapitel 6 eine Interaktion innerhalb der Membran, unter Beteiligung von $\alpha 5$, vorgeschlagen. In der Umgebung des Coomassie sollte

diese weniger stabil sein. Nach einem Zerfall des Oligomers an dieser Stelle würde sich das Coomassie anlagern und die hydrophoben Bereiche gegen ein erneutes Zusammenkommen abschirmen. Für eine kovalente Verknüpfung ist dieser Bereich auch weniger geeignet, da das Rutheniumreagenz hydrophil und der zu verknüpfende Bereich hydrophob ist. Die Ergebnisse der Verknüpfung von membranständigem Bax in Liposomen verstärken diese Annahmen. Dort wurden Dimere anstatt größere Oligomere gefunden, obwohl die Puls-ESR-Daten (aus Kapitel 6) größere Oligomere in Liposomen identifizierten. Wenn also größere Oligomere vorhanden waren, konnten diese entweder nicht ins Gel einwandern oder ein Interaktionsbereich zwischen den Monomeren war in Liposomen unzugänglich für das Rutheniumreagenz. Beides ist aufgrund der Daten denkbar. Für die erste Annahme spricht, dass nach dem Vernetzen weniger Protein in das Gel eingewandert ist als vor der Vernetzung. Die zweite Annahme wäre erklärt, wenn ein Interaktionsbereich in Liposomen tatsächlich innerhalb der Lipidschicht liegt und damit unzugänglich für das Rutheniumreagenz wäre. In Detergenzmizellen wäre eine Abschirmung dieses Bereichs aufgrund der kleineren lipophilen Molekülanteile schlechter, wodurch die Verknüpfung in diesen Proben erleichtert wäre.

In den CHAPS Proben gab es viel mehr Oligomere mit einer ungeraden Anzahl von Monomeren als in der anderen Detergenzien. Scheinbar kann also in CHAPS eine Interaktionsfläche nicht normal ausgebildet werden, was mit der Struktur der Moleküle zusammen hängen könnte, die sich stark von den anderen Detergenzien unterscheidet (siehe Kapitel 2 und 4). Ob Oligomere tatsächlich so in CHAPS vorlagen oder die Oligomerisierung durch den Einfluss des Coomassies verstärkt wurde, ist unklar. Der Vergleich der Probe mit dem Monomer zeigt jedoch deutlich, dass CHAPS Veränderungen in Bax hervorruft und so eine Mischung aus Monomeren und Oligomeren vorliegt. Die in Kapitel 8 gezeigten Größenausschlusschromatographiemessungen bestätigen dies. Aktivieren kann CHAPS Bax jedoch nicht. Antonsson *et al.* zeigte, dass in CHAPS vorinkubiertes Bax Carboxyfluorescein gefüllte Liposomen, im Gegensatz zu in OG vorinkubiertem Bax, nicht durchlässig macht ⁽²⁷⁾.

Zusammenfassung:

Das Baxoligomer ist aus einer geraden Anzahl von Monomeren aufgebaut. Der am stärksten vertretene Oligomerzustand ist ein Tetramer, das größte, identifizierte ein Dodekamer. In CHAPS liegt Bax hauptsächlich Monomer vor, es wurden aber auch einige Oligomere gebildet. In Liposomen konnten nach dem Vernetzen nur Dimere gefunden werden, obwohl die Puls-ESR-Experimente größere Oligomere in Lipid identifizierten. Einer der zwei Interaktionsbereiche zwischen den Monomeren (möglicherweise $\alpha 5$) scheint in Lipid unzugänglich für das Vernetzungsreagenz zu sein.

Kapitel 8: Größe und Form des Baxoligomers

Ziel:

Ermittlung der absoluten Größe und Form des Baxoligomers in Detergenz und Lipid

Ergebnisse

Größenausschlusschromatographie

In Größenausschlusschromatographieexperimenten eluierte das monomere Bax bei einem Volumen von 1,78 ml, vergleichbar zu einem 20 kDa Markerprotein. Der Elutionspeak wies eine Schulter auf, die vermutlich Baxdimere enthielt (siehe Abbildung 53).

Wenn Bax mit DM oder DDM vorinkubiert wurde, eluierte es in einem schmalen Peak bei etwa 1,2 ml und das Elutionsvolumen war vergleichbar dem des 440 kDa Markerproteins Ferritin. Die Peakform ließ auf eine homogene Probenzusammensetzung schließen (siehe Abbildung 53). Nach der Vorinkubation in OG eluierte das Protein bei etwa 1,3 ml und der Peak war breiter (siehe Abbildung 53). Dies ließ auf ein kleineres und nicht so homogenes Oligomer schließen, wobei OG Moleküle und Mizellen kleiner als DM oder DDM Moleküle und Mizellen sind, was eine Peakverschiebung bewirken könnte (siehe Kapitel 2).

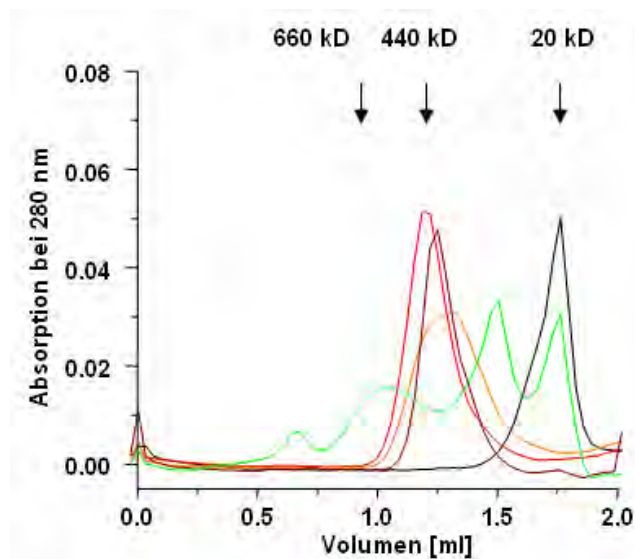


Abbildung 53: Größenausschlusschromatographie von monomerem und oligomerem Bax
Baxmonomer ohne Detergenz - schwarz; Baxoligomer: in 0,5% DM - rot, in 0,5% DDM - dunkelrot, in 2% OG - orange und Bax in 2% CHAPS - grün.

Der Elutionszeitpunkt eines Moleküls ist von seinem hydrodynamischen Radius und seiner Form abhängig. Da beides beim Baxoligomer unbekannt ist, konnte die Größe des Oligomers nicht bestimmt werden. Um eine bessere Vorstellung von der Größe der Mizelle zu erhalten, wurde das Membranprotein VDAC in 0,5% DDM (Protein von T. Meins erhalten)

untersucht. Das Protein hat eine Größe von 33 kDa und sollte als Monomer oder Dimer in der Mizelle vorliegen. Sein Peakmaximum lag bei 1,49 ml. Da Bax unter gleichen Bedingungen bei 1,2 ml eluierte, muss es deutlich größer sein als VDAC und sollte mindestens als Tetramer vorliegen.

Bax, vorinkubiert in CHAPS, zeigte eine andere Größenverteilung als die anderen Proben. Es wurden vier Peaks identifiziert. Ein Teil des Proteins lag als Monomer vor, zwei weitere Anteile eluierten im kleinen oder im großen Oligomer Bereich und der letzte Anteil eluierte im Ausschlussvolumen, was auf Proteinaggregate hinweist (siehe Abbildung 53). Die beiden in der Mitte genannten Anteile könnten Baxmonomere und Baxoligomere in der CHAPS Mizelle repräsentieren. Wie schon in Kapitel 4 und 7 beschrieben lag Bax in CHAPS als Mischung aus Monomeren und verschieden großen Oligomeren vor.

Die Größenausschlusschromatographie wurde bereits von anderen wissenschaftlichen Gruppen zur Bestimmung der Größe von rekombinant hergestelltem Baxoligomeren oder Baxoligomeren aus den Mitochondrien apoptotischer Zellen verwendet^(27,28). Unsere Daten stimmen mit den Literaturdaten überein, wobei die unterschiedlichen Baxkonstrukte Vergleiche schwierig machen. In dieser Arbeit wurde Volllänge Bax ohne jeglichen Tag verwendet, wogegen Antonsson *et al.*^(27,28) Konstrukte mit N - terminalem Histidintag nutzte, denen teilweise $\alpha 9$ fehlte.

Kristallographische Arbeiten an Bax

Die Struktur des Baxoligomers sollte mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht werden. Dazu wurden beide Konformationen mittels der „*hanging drop*“- oder der „*sitting drop*“-Methode unter verschiedenen Bedingungen kristallisiert. Bax bildete aber nur wenige Kristalle. Diese erschienen erst nach Monaten der Inkubation und erwiesen sich bei näheren Untersuchungen als Salzkristalle oder schlecht streuende Proteinkristalle. Lichtstreuungsexperimente an Bax zeigten hohe Polydispersitätsindizes (0,7 für das Monomer und 0,9 für das Oligomer), die darauf hindeuten, dass Bax nicht für die Kristallisation geeignet ist.

Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die Lichtstreuungsexperimente zeigten in der Monomerprobe Partikel mit Durchmessern von 4 - 5 nm und größere die Dimere repräsentieren könnten (siehe Abbildung 54 B). Das Oligomer mit Mizelle war größer, die meisten Partikel hatten einen Durchmesser von 7 - 10 nm, aber die Größe war inhomogen (siehe Abbildung 54B).

Bei dieser Methode liefern große Partikel übermäßig intensives Streulicht und gehen damit überproportional in das Messergebnis ein. Solche Partikel fanden sich in beiden Baxproben, ihr Volumenanteil lag aber unter 0,5% (siehe Abbildung 54A).

Liposomen wurden vor und nach dem Einbau von Bax in Hinblick auf ihre Größe untersucht. Nach dem Einbau des Proteins nahm die Größe der Liposomen um 10 - 20 nm zu, was auf einen erfolgreichen Einbau von Bax hinweist (siehe Abbildung 54C).

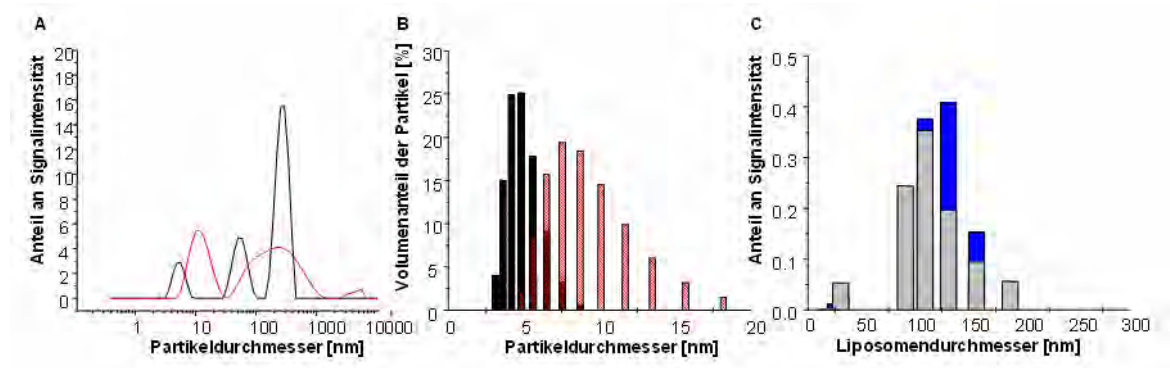


Abbildung 54: Daten der Dynamischen Lichtstreuung

A: Signalintensitäten verschiedener Partikel in Proben von monomeren Bax (schwarz) und oligomeren Bax (in DDM; rot); **B:** Volumenanteil verschiedener Partikel in Proben von monomeren Bax (schwarz) und oligomeren Bax (in DDM; rot); **C:** Signalintensität verschiedener Partikel in Liposomen mit (blau) und ohne (grau) Bax

Elektronen- und Rasterkraftmikroskopie

Elektronen- und Rasterkraftmikroskopie (EM und AFM) geben die Möglichkeit kleine Moleküle wie Proteine oder auch Strukturen wie Liposomen abzubilden. Eine Einführung in beide Methoden findet sich in Anhang 9.

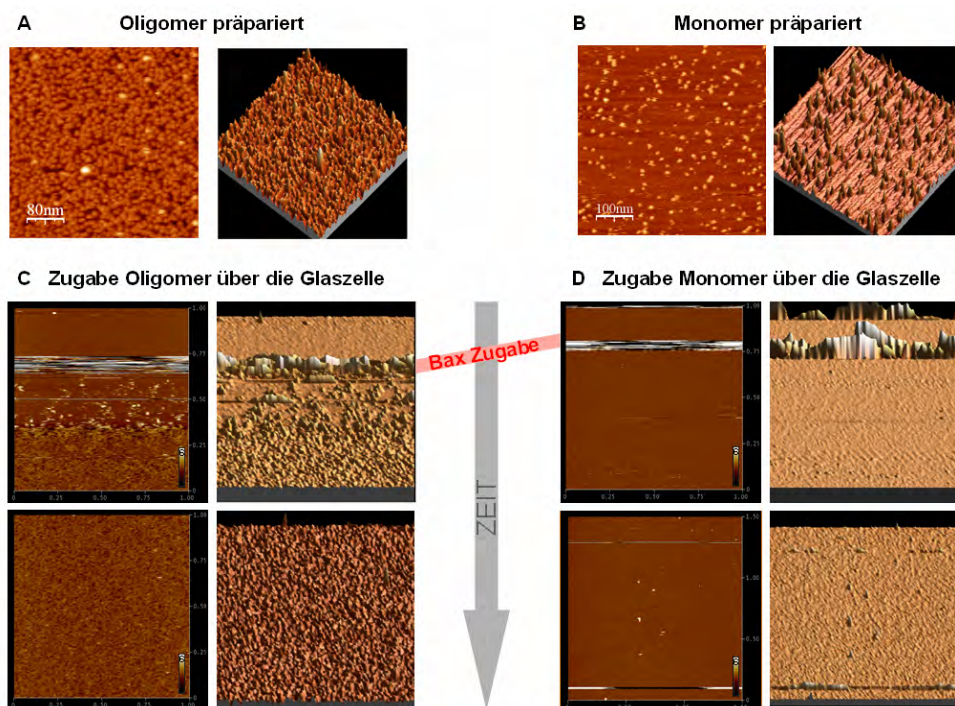


Abbildung 55: Affinitäten von monomeren und oligomeren Bax an Glimmeroberflächen

A und B: Darstellung von frisch gespaltenem Glimmer der unter identischen Bedingungen und bei gleicher Proteinkonzentration mit (B) monomeren bzw. (A) oligomeren Bax belegt wurde. **C und D:** Abbildung der Glimmeroberfläche vor und nach Zugabe gleicher Konzentrationen von monomeren (D) bzw. oligomeren (C) Bax mittels der Glaszelle

Affinität von Bax zur Glimmeroberfläche

Eine Voraussetzung für die Darstellung von Proteinen im AFM ist ihre Immobilisierung auf Oberflächen. Die Affinität von Proteinen zur Oberfläche (in diesem Fall Glimmer) kann zwischen zwei Proteinen oder zwei Konformationen aber durchaus differieren, deshalb getestet wurde, ob beide Baxkonformationen unterschiedlich an Glimmer binden. Hierzu wurden zunächst identische Mengen des monomeren bzw. oligomeren Proteins auf die Glimmeroberfläche gegeben. Bei Zugabe gleicher Proteinmengen band das Monomer viel schlechter an den Glimmer als das Oligomer (siehe Abbildung 55A, B).

Mit einem anderen Experiment wurde die Belegung des Glimmers direkt verfolgt. Dazu wurde zunächst der leere Glimmer abgebildet und das Protein dann (während des Abbildens) über die Glaszelle zugegeben (siehe Abbildung 55C, D). Auch dieses Experiment zeigte nur wenige an die Oberfläche gebundene Monomere, wogegen das Oligomer schnell einen dichten Proteinteppich ausbildete (gezeigt in Abbildung 55C, D).

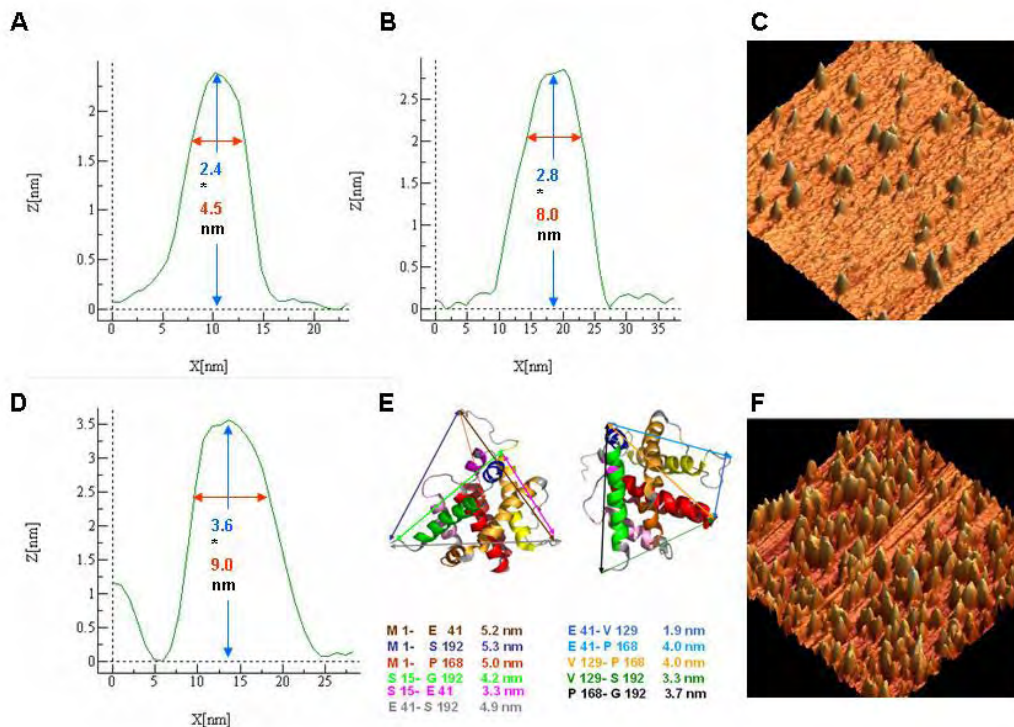


Abbildung 56: AFM-Untersuchungen an Bax

A und B: Profile von Baxmonomeren; C: AFM-Aufnahme von Baxmonomeren auf Glimmer (3D Darstellung; 300X300 nm); D: Profil von einem Baxoligomer; E: Durchmesser des Baxmonomers laut NMR; F: AFM-Aufnahme von Baxoligomeren (3D Darstellung; 300X300 nm). Bei der Auswertung der Partikel wurde der Durchmesser etwa am unteren Rand des oberen Drittels des Partikels gemessen, wie in A, B und D gezeigt

AFM-Untersuchungen am Baxmonomer und Baxoligomer in Detergenz

AFM-Aufnahmen des monomeren und oligomeren Bax sind in Abbildung 56 wiedergegeben. Vergleicht man die Höhe- und den Durchmesser beider Konformationen wurden nur geringe

Größenunterschiede sichtbar. Das Monomer wurde mit durchschnittlich 3 nm Höhe und 7 nm Breite abgebildet, beim Oligomer war die Höhe durchschnittlich 3,4 nm und der Durchmesser 9 nm (siehe Abbildung 57).

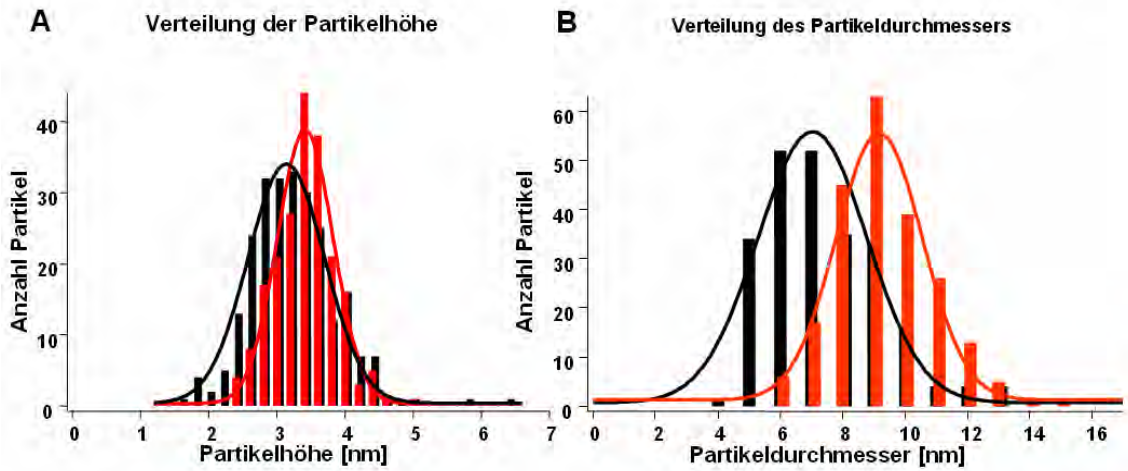


Abbildung 57: Verteilung der Höhen (A) und Querschnitte (B) der monomeren und oligomeren (DDM) Baxpartikel. Das Monomer ist schwarz dargestellt und das Oligomer in DDM rot

Das Oligomer war im Durchschnitt also nur 0,4 nm höher und 2 nm breiter als das Monomer (siehe Abbildung 57).

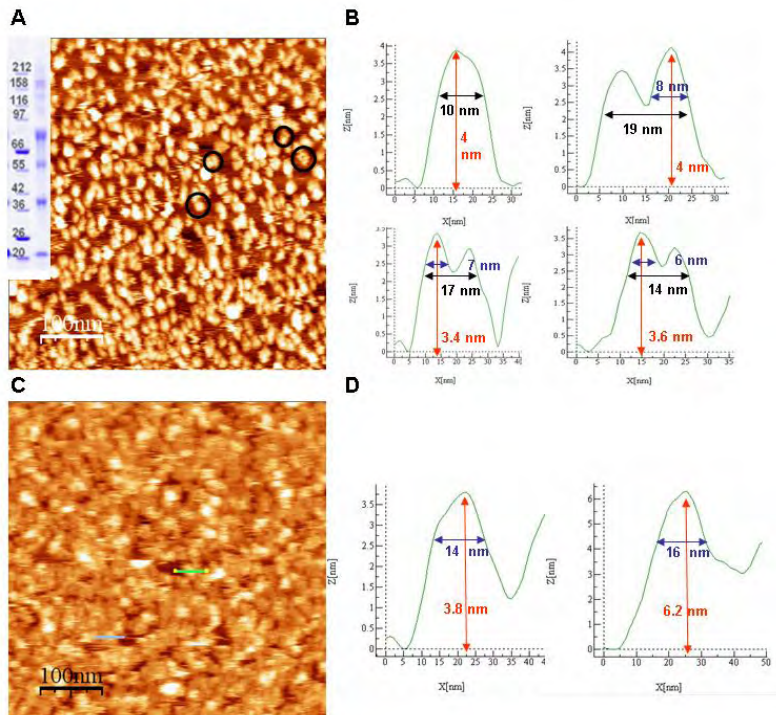


Abbildung 58: AFM-Abbildung von vernetzten Baxoligomeren

A: AFM-Aufnahme von in Lösung mit dem Ruthenium Reagenz vernetzten Baxoligomeren (2D Darstellung; 500X500 nm). Die Probe wurde zur Kontrolle der Oligomergöße auf ein SDS-Gel aufgetragen und als Inset eingeblendet. **B:** Profile von in A gekennzeichneten Proteinen; **C:** AFM-Aufnahme von auf der Oberfläche mit 2% Glutaraldehyd vernetzten Baxoligomeren (2D Darstellung; 500X500 nm); **D:** Profile von in C gekennzeichneten Proteinen. Die meisten Partikel hatten eine Höhe von 3 - 4 nm; die höheren könnten übereinander liegende Partikel repräsentieren.

Die Oligomerprobe wurde zwar bei hoher Detergenzkonzentration an den Glimmer absorbiert, dieser wurde dann aber vor dem Abbilden mit Detergenz freiem Puffer gewaschen und möglichst viel Detergenz entfernt, um vom Detergenz ausgelöste Interaktionen zwischen Probe und Spitze zu eliminieren, da diese die Messungen stören. Nachdem die Puls-ESR-Messungen gezeigt hatten, dass Bax bei niedrigen Detergenzkonzentrationen keine normalen Oligomere ausbildet (siehe Kapitel 6), war unklar, ob die Oligomere beim Waschen auf den Glimmer zerfielen. Daher wurden die Oligomere in Lösung oder, nach der Absorption, auf der Oberfläche kovalent verknüpft und abgebildet (siehe Abbildung 58). Dabei konnten aber nicht alle Monomere eines Oligomers verbunden werden, sondern es lagen Mischungen verschieden großer Oligomere auf der Oberfläche, wie das SDS-Gel der in Lösung vernetzten Probe in Abbildung 58A illustriert. Die abgebildeten Oligomerpartikel waren mit 3 - 4 nm ähnlich hoch wie die zuvor gezeigten Dimere aus Abbildung 56F, aber wesentlich breiter. Einige von ihnen zeigten auch eine porenartige Struktur in ihrer Mitte (siehe Abbildung 58).

TEM-Aufnahmen des Baxoligomers in Detergenz

Eine andere Möglichkeit zur Größenbestimmung der Baxoligomere ist die Untersuchung im Transmissionselektronenmikroskop (TEM). Für die Elektronenmikroskopie wurde die Methode der Negativkontrastierung und die Dekorierung mit kovalent gebundenen Goldpartikeln, sowie eine Kombination aus beidem verwendet. Beide Methoden werden im Anhang 9 näher erklärt.

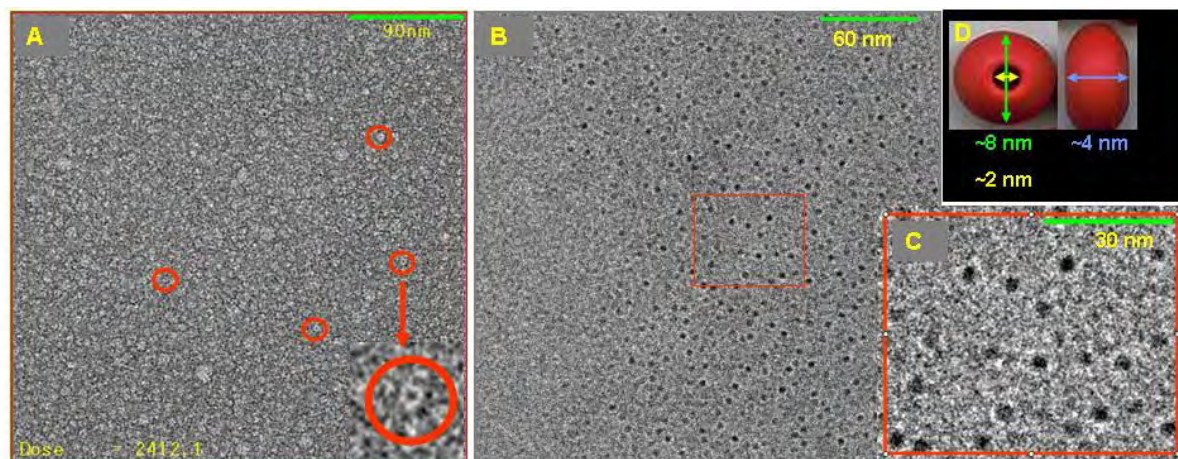


Abbildung 59: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Baxoligomers

A: EM Aufnahme Baxoligomer (0,5%DM) mit 2 % Uranyl Acetat gefärbt (Aufnahme G.Pfeiffer); **B:** EM Aufnahme Baxoligomer (0,5%DDM) goldgelabelt (1,4 nm Goldpartikel) und mit 2% Ammonium Molybdat gefärbt; **C:** Vergrößerter Ausschnitt aus B –dunkle Partikel sind vermutlich Cluster aus kovalent an gebundenem Gold, in ihnen sind dunkle Punkte sichtbar, die die einzelnen Goldpartikel repräsentieren könnten. **D:** Modell der Baxpartikel aus Größenabschätzungen von AFM-und TEM-Messungen (Höhe ca. 4 nm, äußerer Durchmesser ca. 8 nm und innerer Durchmesser ca. 2 nm)

Nach der Negativkontrastierung der auf Kohle absorbierten Baxoligomere wurden in den TEM-Messungen einige Partikel sichtbar (siehe Abbildung 59A, die Partikel waren leider nicht sehr einheitlich; da die Negativkontrastierung keine schonende Methode zur Proteinabbildung ist, könnten die Partikel natives und denaturiertes Bax zeigen; siehe auch Anhang 9). Viele Partikel hatten einen äußeren Durchmesser von 7 - 8 nm und teilweise war ein Loch in ihrer Mitte sichtbar (Porendurchmesser etwa 2 - 3 nm; siehe Abbildung 59A, D), sie könnten Baxoligomere zeigen.

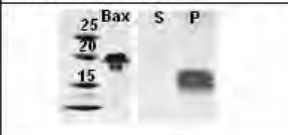







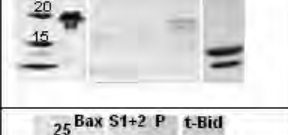



Probe	Foto SDS- Gel	Foto Gradient	
100 nm Liposomen mit Baxoligomer (0.2%DDM)			1 Bande Pelett
400 nm Liposomen mit Baxoligomer (0.2%DDM)			1 Bande Pelett
100 nm Liposomen mit Baxmonomer			2 Banden
400 nm Liposomen mit Baxmonomer			2 Banden
100 nm Liposomen mit Baxmonomer und t-Bid			2 Banden kleines Pelett
400 nm Liposomen mit Baxmonomer und t-Bid			2 Banden kleines Pelett

Tabelle 8: Einbaueffizienz verschiedener Baxproben in Liposomen.

P: Pellet; S: schwimmende Bande. Die Proben wurden parallel angesetzt und untersucht. Nach der Dichtegradientenzentrifugation von der zweiten Probe (400 nm Liposomen mit Baxoligomeren) kippte der Zentrifugenbecher um, weswegen diese Probe nicht mit den anderen auf ein SDS-Gel geladen werden konnte, sondern wiederholt werden musste und ein anderes Gel gezeigt ist.

Um die Baxoligomere weiter im TEM zu untersuchen wurde das Protein spezifisch mit Gold dekoriert. Dazu wurden Nanogoldpartikel von 1,4 nm Durchmesser mit verschiedenen reaktiven Gruppen verwendet. Monoaminonanogold (bindet an Cysteine) konnte erfolgreich kovalent an Bax gebunden werden (NHS - Nanogold bewirkte die Aggregation von Bax). Nach Goldbindung an und Oligomerisierung von Bax sollte das Oligomer mit den Goldpartikeln im TEM sichtbar werden. Da einiges über die Lage der Cysteine bekannt ist, sollte eine klarere Beschreibungen des Baxoligomer möglich werden. Das gelabelte Protein wurde mit Detergenz oligomerisiert, von freien Goldpartikeln und Aggregaten getrennt, auf

Kohlefilm aufgebracht und mit schwach kontrastierenden Schwermetallen gefärbt. Danach erschienen im TEM schwarze Cluster mit ca. 5 nm Durchmesser, die in Proben mit freiem Nanogold nicht vorlagen. In den dunklen Bereichen sind einzelne dunkle Punkte in der Größenordnung der Nanogoldpartikel sichtbar (siehe Abbildung 59C). Da die Cluster zu groß für zwei Nanogoldpartikel sind, zeigen sie wohl Baxoligomere auf dem Kohlefilm. Da das Protein selbst aber nicht sichtbar ist, konnten keine weiteren Aussagen zum Oligomer gemacht werden.

Untersuchungen zu Bax in Lipid

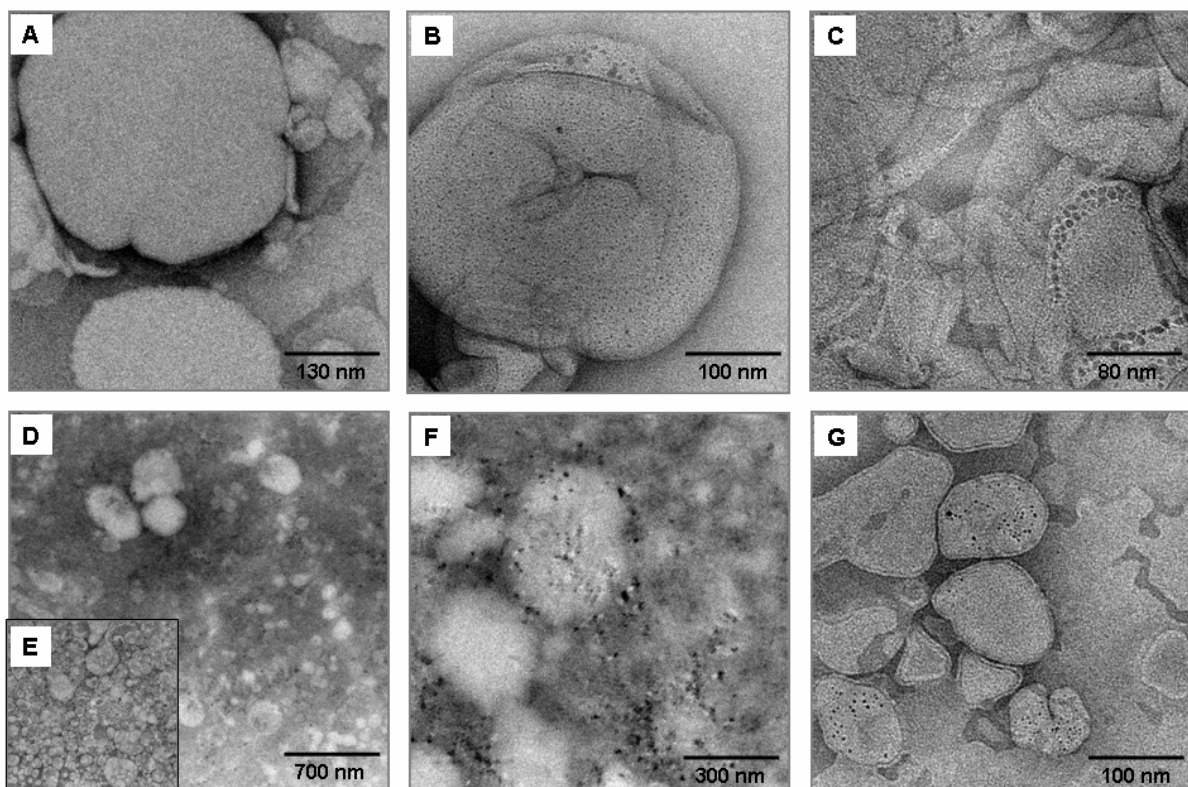


Abbildung 60: EM Aufnahmen von Liposomen

A: Liposomen ohne Bax (mit 0,1% DDM inkubiert und mit 2% Uranyl Acetat gefärbt); B und C: Liposomen nach Baxeinbau (mit 2% Uranyl Acetat gefärbt); D und F : Liposomen nach Baxeinbau und Goldbindung aber ohne Entfernung des freien Nanogold und ohne Färbung; E: Liposomen aus der gleichen Probe wie D und F bei etwa gleicher Liposomenkonzentration mit 1% Ammonium Molydat gefärbt und ohne Nanogoldpartikel, G: Liposomen nach Baxeinbau, Goldlabeling, Entfernung des freien Nanogolds und mit 1% Ammonium Molybdät Färbung.

Die Veränderungen von Liposomen durch den Einbau von Bax wurden im TEM und im AFM untersucht. Zunächst wurde der Einbau von Bax in die Liposomen unter verschiedenen Bedingungen getestet. Die Proben wurden mittels Gradientenzentrifugation gereinigt und die Fraktionen auf SDS-Gelen untersucht (siehe Tabelle 8). Bax, das mit c_8 Bid oder Detergenz aktiviert worden war, wurde im Gegensatz zum Monomer, effizient in die Liposomen inseriert (siehe Tabelle 8 und die ESR-Messungen in Kapitel 4). Pelletfraktionen traten nur dann auf, wenn Bax in die Liposomen einbaute. Pellett und Bande enthielten Lipid und Bax.

In der Pellefrac­tion ist das Bax/Lipid Ver­hältnis und der Grad der Verunrei­nigungen aber höher als in der schwim­menden Bande. Inter­essanterweise wurde in Proben, in denen Bax mit c_8 Bid aktiviert wurde, nur Bax aber kein c_8 Bid in den SDS-Gelen der Fraktionen gefun­den. Im TEM zeigten die Liposomen mit Bax nach der stark kontrastierenden Uranyl Acetat Färbung dunkle, „porenartige“ Bereiche mit Durchmessern von 5 - 20 nm, die in Bax-freien Liposomen nicht vorkamen. Sie könnten mit Schwermetallionen gefüllte Poren repräsentieren (siehe Abbildung 60 A - C). Färbte man Liposomen mit insertiertem Bax der gleichen Probe mit dem schwächer kontrastierenden Ammonium Molybdat, waren keine Poren sichtbar.

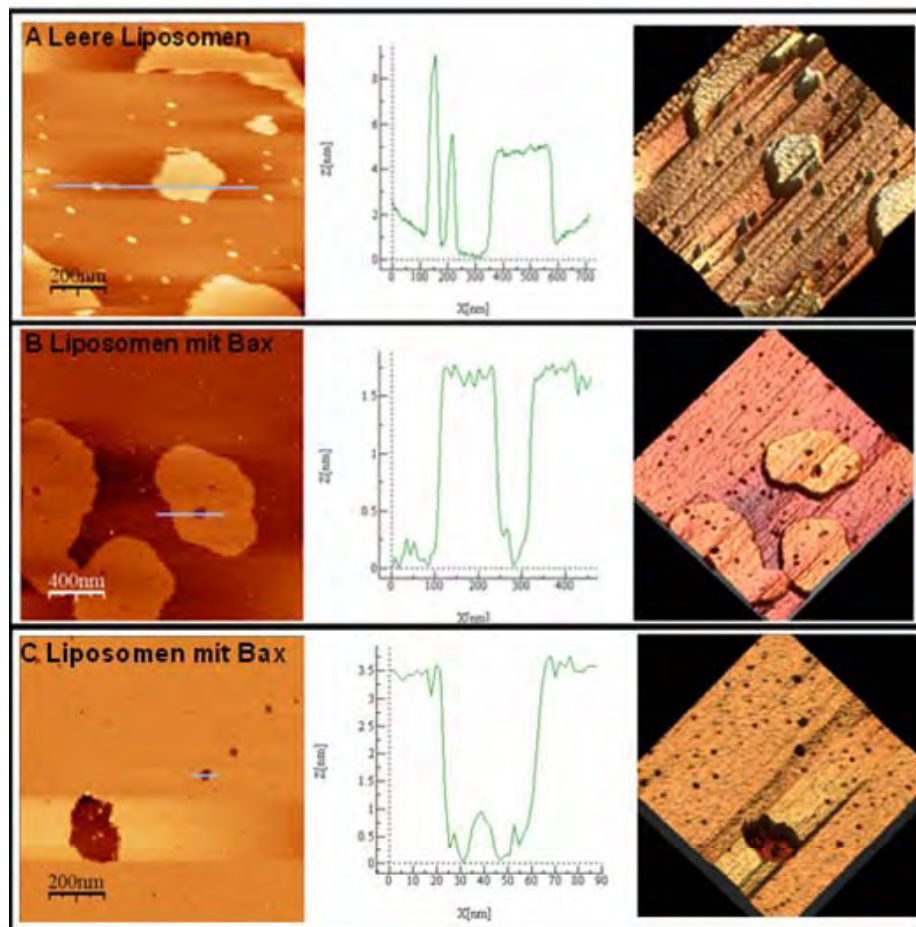


Abbildung 61: AFM an Liposomen

A: Proteinfreier Lipidbilayer (Liposomen aus Rinderherzlipiden); B: Lipidschicht im eingebauten Bax und der Höhe eines Lipidmonolayers (Liposomen aus Rinderherzlipiden); C: Lipidbilayer mit Bax (Liposomen aus 80% Phosphatidylcholin; 20% Cardiolipin)

Wenn man die Liposomen mit Bax mit Gold labelte, auf die kohlebedampften Träger­netze absorbierte und mit Ammonium Molybdat anfärbte oder ungefärbt im TEM untersuchte, erschienen wieder schwarze Bereiche im Lipid (siehe Abbildung 60G). Dies zeigt, dass Bax in die Lipiddoppelschichten insertiert ist. Die Poren hatten einen Durchmesser von 5 - 15 nm. Die AFM-Abbildungen von Lipidfilmen gestalteten sich schwierig, da die Liposomen schlecht am Glimmer haften und die Spitze des Cantilevers, die fragilen Lipidfilme leicht verschob

oder durchbrach. Nach der Insertion von Bax haftete das Lipid besser am Glimmer und es wurden Löcher (5 - 50 nm) im Lipid gefunden. Sie könnten Baxporen repräsentieren, denn ohne Proteineinbau wurden keine Löcher beobachtet. An den Rändern der Löcher wurden aber keine Poren „Umrandungen“ gefunden, sondern höchstens einzelne Partikel und es lagen oft Partikel am Boden der Löcher (siehe Abbildung 61B, D). Ob die Poren in ihrer tatsächlichen Größe dargestellt sind, oder durch die mechanische Einwirkung der Spitze vergrößert wurden, ist unklar. Da sich aber keine deutlichen Erhebungen finden, liegt nahe, dass das Protein nicht deutlich höher als die Lipidschicht (also etwa 4 nm) ist.

In allen Lipidproben (mit oder ohne Bax) wurden neben den großen Lipidbereichen auch kleinere „Partikel“ abgebildet. In Proben mit Bax fanden sich mehr von ihnen. Sie hatten etwa die Größe von Baxoligomeren (siehe in Abbildung 61A, B), waren aber auch in Proben ohne Bax vorhanden (siehe Abbildung 61A). Sie könnten Baxoligomere, kleine Lipidbereiche oder Verunreinigungen zeigen.

Analytische Ultrazentrifugation

Um die Größe der Baxoligomere in Detergenz (0,5% DDM) zu bestimmen wurde ihr Sedimentationsverhalten in der Ultrazentrifuge beobachtet. Es wurden zwei Partikelgrößen bei etwa 5,4 S und 7,8 S gefunden. Bei höheren Proteinkonzentrationen nahm der Anteil der 7,8 S Fraktion zu.

Je nach Form und Einfluss des Detergenz können sehr unterschiedliche Molekulargewichte aus den Sedimentationskoeffizienten gewonnen werden. Zu 5,4 S und 7,8 S könnten Größen von 80 kDa (Tetramer) und 160 kDa (Oktamer) passen. Die Massenkalkulation beruht auf vielen Unbekannten, deren Variation verändert das den Partikeln zugeordnete Molekulargewicht, aber die 7,8 S Partikel haben immer etwa die doppelte Masse, wie die 5,4 S Partikel.

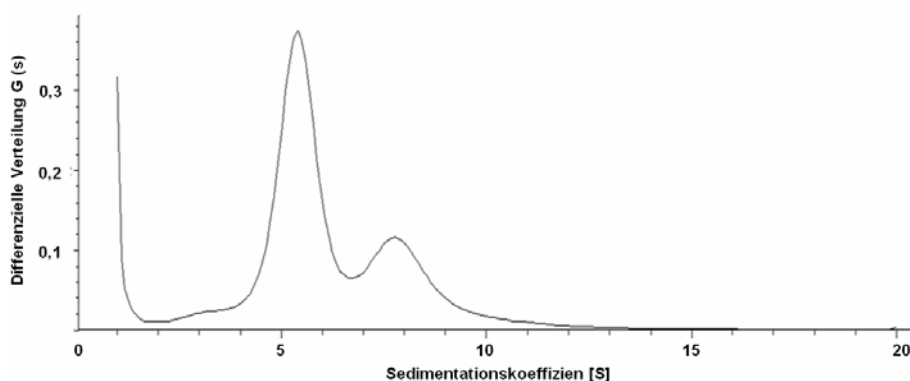


Abbildung 62: Analytischen Ultrazentrifugation von Baxoligomeren in 0.5% DDM

Diskussion

Größenbestimmung des monomeren Bax

Die Partikelgröße des monomeren Bax kann aus dem Koordinatenfile der NMR-Struktur ⁽¹⁾ (www.rcsb.org/pdb/home/home.do;1F16) ermittelt werden. Je nach Orientierung im Raum hat das Baxmonomer Durchmesser zwischen 3 und 5 nm (siehe Abbildung 56E).

Diese Partikelgröße passt gut zu den DLS Daten. Im AFM wurde das Monomer mit durchschnittlich 3 nm Höhe und 7 nm Breite abgebildet (siehe Abbildung 57). Allerdings geben AFM-Spitzen Erhebungen immer breiter wieder als sie tatsächlich sind, wogegen Löcher verkleinert dargestellt werden (siehe auch Anhang 9). Die tatsächliche Breite ist also im Bereich von 3 - 5 nm, passend zu den NMR- Daten. Der 5 nm Monomerdurchmesser im NMR-Modell entsteht durch den flexiblen N-Terminus von Bax ohne ihn sinkt der Durchmesser auf 3 - 4 nm. Da flexible Proteinregionen im AFM oft nicht korrekt abgebildet werden können wird von Molerkülen mit 3 nm Höhe und 4 nm Breite ausgegangen (ihr Volumen ist 25 nm³; siehe Einschub 2).

In den Größenausschlusschromatographieexperimenten eluierte das Monomer wie ein 21 kDa Protein. Zusätzlich zeigte der Peak eine Schulter, die Bax enthielt, das vermutlich als Dimer vorlag. Ein Dimeranteil war auch in den DLS-Messungen und den Puls-ESR-Experimenten vorhanden (siehe Kapitel 6).

Einschub 2: Volumenberechnung der Baxpartikel

Formeln:

$$V_{\text{Kugel}} = 4/3 * \Pi * r^3$$

$$V_{\text{Ellipsoid}} = 4/3 * \Pi * r^1 * r^2 * r^3$$

Baxmonomer _(NMR)	$r_1 = 1,7 \text{ nm}; r_2 = 2 \text{ nm}; r_3 = 2,5 \text{ nm}$	$V = 35 \text{ nm}^3$
Baxmonomer _(NMR ohne As 1 - 15)	$r_1 = 1,7 \text{ nm}; r_2 = 2 \text{ nm}; r_3 = 2 \text{ nm}$	$V = 28 \text{ nm}^3$
Baxmonomer _(AFM)	$r = 1,5 \text{ nm}; r_2 = 2 \text{ nm}; r_3 = 2 \text{ nm}$	$V = 25 \text{ nm}^3$
Baxoligomer _(Diskus; AFM)	$r_1 = 1,7 \text{ nm}; r_2 = 3,0 \text{ nm}; r_3 = 3,0 \text{ nm}$	$V = 64 \text{ nm}^3$
Baxoligomer _(Kugel DLS)	$r_1 = 3,5\text{-}5 \text{ nm}; r_2 = 3,5\text{-}5 \text{ nm}; r_3 = 3,5\text{-}5 \text{ nm}$	$V = 160\text{-}520 \text{ nm}^3$
Baxoligomer _(Kugel TEM)	$r_1 = 4 \text{ nm}; r_2 = 4 \text{ nm}; r_3 = 4 \text{ nm}$	$V = 268 \text{ nm}^3$

Größenbestimmung des oligomeren Bax in Detergenz

Die Größe der Baxoligomere in DDM variierte zwischen den verschiedenen Messmethoden. In den Experimenten mittels DLS und im TEM hatten sie einen Durchmesser von 7 - 10 nm und ein Volumen von 160 - 520 nm³ (siehe Einschub 2; bei globulärem Protein ohne Pore – die Pore oder eine andere Proteinform würden Grössenabschätzungen schwierig machen). Die Partikelvolumina aus den Größenausschlusschromatographie (das Oligomer eluiert wie das 440 kDa Protein Ferritin, eine Hohlkugel mit 12 nm Durchmesser) und den Ultra-

zentrifugationsmessungen (Tetrameren entsprechen etwa $4 \times 35 \text{ nm}^3 = 140 \text{ nm}^3$; Oktameren $\sim 8 \times 35 \text{ nm}^3 = 280 \text{ nm}^3$) passen auch zu diesem Größenbereich.

Dagegen stellten sich die Baxoligomere in den AFM-Messungen viel kleiner dar. Sie waren mit einer mittleren Höhe von 3,4 nm und einem mittleren Durchmesser von 9 nm, nur 0,4 nm höher und 2 nm breiter als das Monomer (siehe Abbildung 57). Ihre tatsächliche Höhe wäre also 3,4 nm und ihre Breite 6 nm. Sie wären diskusförmig und hätten ein Volumen von 64 nm^3 , was besser zu einem Dimer oder Trimer aber nicht zu einem Oligomer passen würde.

Der Entzug des Detergenz beim Waschen könnte, wie schon in den Puls-ESR-Messungen (siehe Kapitel 6) zum Zerfall der Oligomere geführt haben, was dadurch bestätigt wird, dass nach der kovalenten Verknüpfung größere Oligomere auf dem Glimmer erschienen. Sie waren (nach beiden Verknüpfungsmethoden) durchschnittlich 3 – 4 nm hoch (die wenigen höheren Partikel könnten auch von einer zweiten Schicht Oligomere stammen) und wesentlich breiter als vor der kovalenten Verbindung (siehe Abbildung 58). Einige Partikel zeigten sogar eine porenartige Struktur in ihrer Mitte (siehe Abbildung 58A, B). Es war jedoch nicht sinnvoll die Größe dieser Partikel als Größe des Baxoligomers zu übernehmen, da ein SDS-Gel der verknüpften Probe zeigte (siehe Abbildung 58), dass die meisten Oligomere nicht vollständig verbunden wurden. Die AFM-Messungen zeigen jedoch klar diskus- und nicht kugelförmige Baxoligomere. So eine Form könnte zu der beobachteten breiten Durchmesserstreuung im DLS und der uneinheitliche Partikelform im TEM führen und damit die gemessene, breite Größverteilung erklären.

Bringt man die Daten zusammen erscheinen die Oligomere in Detergenz (laut AFM-Messungen in Detergenz und Lipid) 4 nm hoch und 8 -10 nm breit (TEM und DLS Messungen) und besitzen eine 2 - 3 nm Pore. Da der Durchmesser einer Lipiddoppelschicht etwa 4 nm beträgt und die Möglichkeit besteht die Breite den Membranproteinen anzupassen⁽¹²⁸⁾, sollten solche Baxoligomere in Mitochondrienmembranen einbauen können. Cytochrom c Moleküle habe einen Durchmesser von etwa 2,5 -4 nm (Größe aus NMR-Struktur ermittelt; PDB: 1J3S). Eine 2-3 nm Pore könnte also ausreichen, es die Mitochondrienmembran passieren zu lassen (siehe auch Kapitel 1 zur Baxfunktion).

Größenbestimmung des oligomeren Bax in Liposomen

Die Messungen an Liposomen ergaben, dass Liposomen im TEM und im AFM verschiedenartig abgebildet werden. Im AFM konnten nur geplatzte Liposomen untersucht werden, bei denen der Bilayer direkt auf der Oberfläche lag. Mehrschichtige Lipidlagen konnten nicht abgebildet werden, da die Spitze sie ständig durchbrach und damit eine Abbildung verhinderte. So wurden im AFM immer nur die Innenseite der Liposomen abgebildet (siehe Abbildung 63). In den TEM-Aufnahmen waren dagegen beide Seiten

sichtbar, da die Liposomen an die Oberfläche absorbiert wurden und dann geplatzt und intakte Liposomen kontrastiert wurden (siehe Abbildung 63).

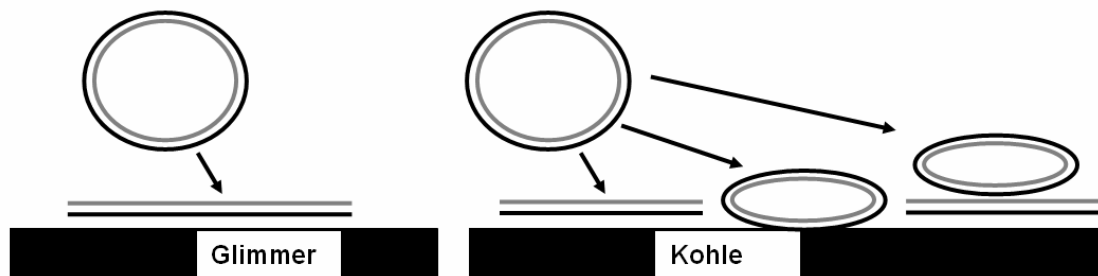


Abbildung 63: Beobachtetes Bindeverhalten der Liposomen auf Glimmer und Kohle
 Der äußere Lipidlayer des Bilayers ist schwarz, der innere grau. Es ist unklar, ob die Liposomen auf Glimmer anders absorbierten als auf Kohle, abgebildet wurden im AFM nur geplatze Liposomen.

Die Baxoligomere zeigten Poren von 5 bis 20 nm. Die Oligomere in Liposomen sind also deutlich größer als in Detergenz (auch wenn die größten Poren durch die AFM-Spitze aufgeweitet sein könnten), obwohl die Puls-ESR-Daten in beiden Proteinumgebungen nahezu gleiche Ergebnisse zeigten.

Wie schon in Kapitel 2 angesprochen, unterscheidet sich die Abschirmung hydrophober Bereiche in Detergenz und Lipiddoppelschichten deutlich voneinander. Dies kann dazu führen, dass Proteinkomplexe in Detergenzmizellen nicht so ausgebildet werden können, wie sie in Lipiddoppelschichten vorkommen. Klare *et al.*⁽¹⁰⁷⁾ zeigte, dass der heterotetramere Komplex der beiden *Naotomonas pharaonis* Proteine NpSRII (Sensorrhodopsin II) und NpHtrII₁₅₇ (halobakterieller Signaltransducer von Rhodopsin II verkürzt ab Aminosäure 157) in Lipiddoppelschichten ausgebildet werden kann, wogegen die Moleküle in Detergenzmizellen nur als Heterodimer vorliegen (siehe Abbildung 64). Es ist demnach denkbar, dass auch der oligomere Zustand von Bax sich in beiden Substanzen unterscheidet und Bax in Detergenzmizellen seine volle Größe nicht erreicht kann, weil in Detergenz die kleineren Oligomere stabiler sein könnten als die größeren.

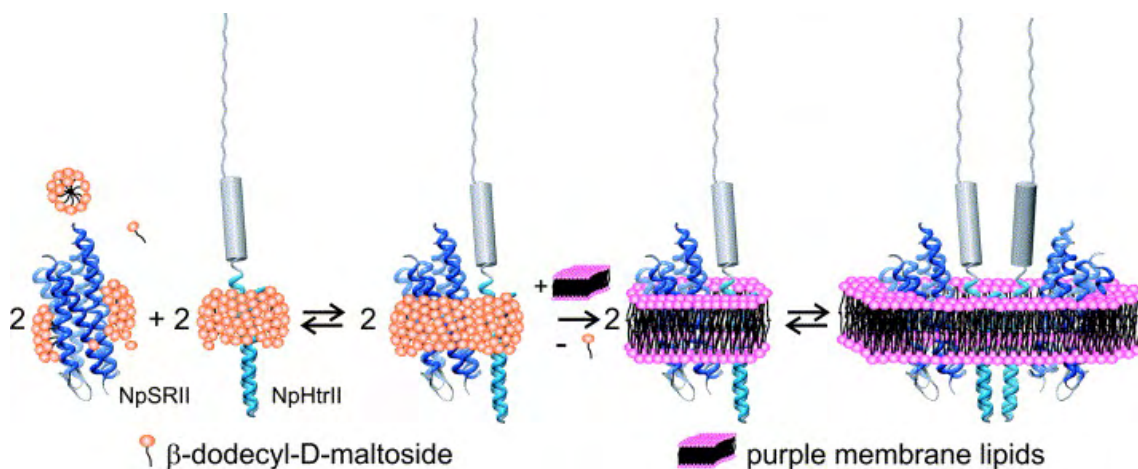


Abbildung 64: Darstellung von den *Naotomonas pharaonis* Proteinen NpSRII und NpHtrII₁₅₇ in DDM und Lipidbilayern aus Klare *et al.*⁽¹⁰⁷⁾

In lebenden Zellen wurde gezeigt, dass Bax während der Apoptose nicht überall an der Mitochondrienoberfläche verteilt ist, sondern sich an bestimmten Bereichen sammelt⁽³⁰⁾ (siehe auch Kapitel 1). Interessanterweise häuften sich auch in einigen, aber nicht in allen Liposomen die „Poren“ an (siehe Abbildung 60C). Da das Lipid Cardiolipin für den Bax Einbau essentiell ist⁽⁵⁹⁾, könnten die Poren - reichen Bereiche gleichzeitig Cardiolipin - reiche Bereiche sein. Manche Lipide verteilen sich nicht gleichmäßig in Lipidbilayern, sondern können sich sammeln und so z.B. Lipid rafts bilden⁽¹⁴³⁾. Die äußere Mitochondrienmembran enthält nur wenig Cardiolipin, das meiste liegt in der inneren Membran und kommt in den Kontaktbereichen zwischen beiden Membranen vor, über die es auch in die äußere Membran gelangt⁽¹⁴⁴⁾. Die Kontaktbereiche könnten also durch die hohe Cardiolipin Konzentration zu Bax - reichen Bereichen werden, die in Säugermitochondrien gefunden wurden. Über die Kontaktbereiche als auch von Bax ist außerdem bekannt, dass sie an der Koordination von Mitochondrienteilung und Fusion beteiligt sind⁽⁴¹⁾ (siehe Anhang 2).

Zusammenfassung:

Die Messergebnisse zeigten ein Monomer mit einem Durchmesser von 3 - 5 nm, das dem aus NMR-Daten vorgegebenen entsprach. Nach der Oligomerisierung in DDM bildeten sich größere, porenartige Partikel von etwa 4 nm Höhe, 8 - 10 nm äußerem Durchmesser und 2 - 3 nm Porendurchmesser. Der Einbau von Bax in Liposomen war nur in Anwesenheit von Detergenz oder c_8 Bid möglich. Nach dem Einbau wurden Löcher im Lipidfilm detektiert. Laut Abschätzungen aus TEM-Aufnahmen hatten die Löcher einen inneren Durchmesser von 5 - 20 nm. Im AFM wurden ähnliche Löcher und zusätzliche, größere Löcher gefunden. Letztere könnten aber durch die Spitze des Cantilevers aufgeweitet worden sein. Die Inkubation in CHAPS bewirkte eine Mischung aus monomerem und oligomerem Bax.

Kapitel 9: Modell des oligomeren Baxkomplexes

Nach Abschluss der Messungen zeigten sich deutliche Unterschiede in der Tertiärstruktur der löslichen und der membranständigen Baxkonformation. Die membranständigen Oligomere in Liposomen oder Detergenz zeigten dagegen, mit Ausnahme ihrer absoluten Größe, nahezu gleiche Ergebnisse, sodass das Protein wohl in beiden Substanzen in der gleichen Konformation vorliegt. Dies und die Analyse des Gesamtaufbaus des Oligomers lassen nicht die Rekonstruktion einer Proteinstruktur zu, ermöglichen aber die Bewertung der vorhandenen Modelle von Bax und die Erstellung eines neuen, detailreicheren Modells. Es ist in Abbildung 65 gezeigt und mit seiner Hilfe können die Ergebnisse der am membranständigen Bax durchgeführten Experimente erklärt werden.

Seitenansicht

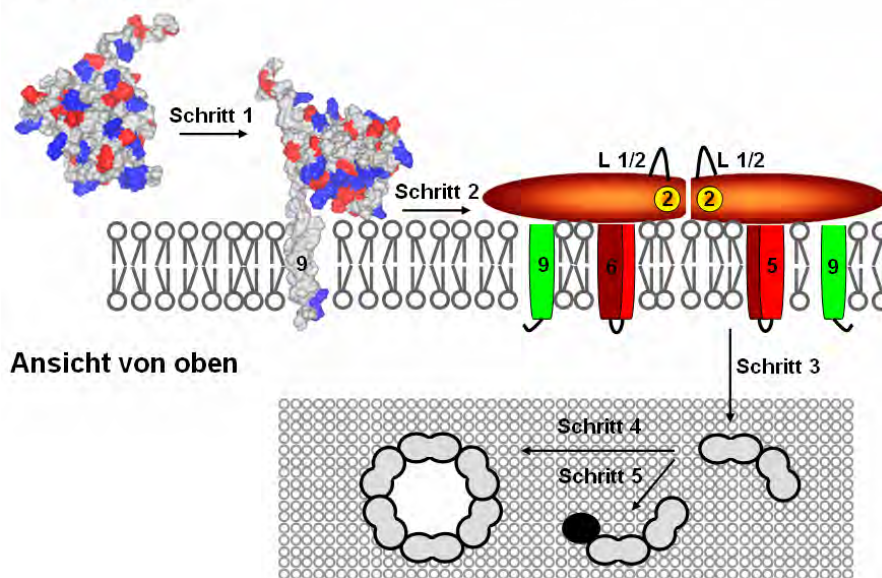


Abbildung 65: Neues Modell zum Membraneinbau, der Oligomerisierung und der Inhibierung von Bax in der äußeren Mitochondrienmembran. Es werden dabei bereits publizierte Daten und Ideen, sowie neue, in dieser Arbeit gewonnene Erkenntnisse einbezogen. Das Modell erklärt die Konformationsänderung von Bax in vier Schritten und zeigt in einem fünften Schritt die Inhibierung von Bax in der Membran: (Schritt 1) Einbau des Baxmonomers in die Membran mittels Insertion von $\alpha 9$. (Schritt 2) Konformationsänderung des Proteins mit Membraninsertion von $\alpha 5$ und $\alpha 6$ und Dimerbildung. (Schritt 3) Kettenverlängerung durch Dimer-Dimer Interaktionen, (Schritt 4) Ringschluss und Porenbildung. (Schritt 5) Bindung von antiapoptischen Bcl-2 Proteinen, die den Ringschluss verhindern und Bax inhibieren. Bis Schritt 2 ist Bax als Oberflächenansicht der NMR-Strukturdarstellung⁽¹⁾ mit eingeblendeten Ladungen (sauer - rot, basisch - blau) gezeigt. Nach Schritt 2 ist ein Modell des Baxdimers in der membranständigen Konformation gezeigt. Dabei sind $\alpha 5$ (rot) $\alpha 6$ (dunkelrot) und $\alpha 9$ (grün) in die Membran eingebaut, während die anderen Helices flach auf der Oberfläche liegen (als rot - orange Diskus gezeigt). Die $\alpha 2$ Helices aus beiden Monomeren liegen darin in einer intermonomeren Interaktionsfläche zusammen (gelb - orange dargestellt). Der Loop zwischen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ (L1/2; schwarz) liegt an der Moleküloberfläche. Nach Schritt 3 ändert sich die Ansicht und die Darstellung: In der Aufsicht sind die Baxdimere als graue Doppelkugeln gezeigt und antiapoptische Bcl-2 Proteine als schwarze Kugeln. Die Lipidköpfe sind als kleine graue Kreise eingeblendet.

Auf die Einzelheiten die zur Erstellung dieses Modells führten, wird in den folgenden Abschnitten näher eingegangen. Die wichtigsten Aussagen des neuen Modells von Bax sind:

Bax baut während der Konformationsänderung die Helices α_9 , α_5 und α_6 in die Membran ein, wogegen die anderen Helices auf der Oberfläche der Lipidschicht zu liegen kommen. Zwei α_2 Helices kommen während der Oligomerisierung dicht zusammen und bilden eine Interaktionsfläche zwischen den Monomeren aus. Das Oligomers besteht aus einer geraden Anzahl von Monomeren. Die vom Oligomer gebildete Pore ist in Lipid groß genug, um Cytochrom c passieren zu lassen und könnte aus einem Baxdodekamer mit 36 Helices in der Membran bestehen.

Bewertung der bestehenden Modelle von Bax und die Membranständigkeit von α_5 , α_6 und α_9

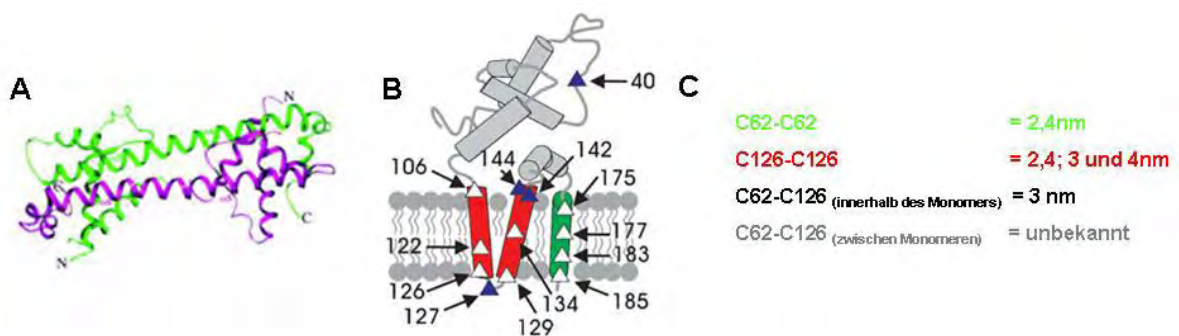


Abbildung 66: Modelle von Bax aus der Literatur und gemessene Distanzen innerhalb des Oligomers
A: Modell des Bcl-xL Dimers von O`Neill et al. ⁽⁹⁵⁾; B: Modell des membranständigen Bax nach Annis et al. ⁽²⁾ (die Dreiecke zeigen die Position von Aminosäuren die in Annis et al. untersucht wurden); C: Distanzen im Baxoligomer (aus Puls-EPR-Messungen ermittelt).

Die publizierten Modelle von Annis et al. ⁽²⁾, Garcia Saez et al. ⁽³⁾ und O`Neill et al. ⁽⁹⁵⁾ wurden mit den in dieser Arbeit ermittelten Daten verglichen (siehe Kapitel 1 und Abbildung 66). Unsere Daten zeigen, dass die Baxoligomere nicht wie das in Abbildung 66A dargestellte Bcl-xL Dimer von O`Neill et al. ⁽⁹⁵⁾ aufgebaut sind. Im Bcl-xL Dimer sind α_5 und α_6 zu einer langen Helix verbunden, während sie im löslichen Protein klappmesserartig angeordnet sind (gezeigt mittels NMR von Muchmore et al. ⁽⁸⁹⁾). Im Dimer interagieren die langen $\alpha_5/6$ Helices aus zwei Monomeren miteinander. Wenn Bax ähnlich aufgebaut wäre, müsste es im Oligomer eine kurze Distanz zwischen zwei C126 geben. Die ESR-Messungen aus Kapitel 6 zeigten im Oligomer jedoch Distanzen von 3 und 4 nm, die deutlich zu groß für diese Konformation sind. Eine zusätzliche Distanz von 2,4 nm, die zu der von O`Neill et al. ⁽⁹⁵⁾ vorgeschlagenen Konformation passen könnte, kommt hauptsächlich bei niedrigen Detergenzkonzentrationen vor, wenn das Oligomer nicht vollständig mit einer Mizelle umschlossen werden kann, und in Dimere zerfällt. In Lipidbilayern wurde die 2,4 nm Distanz dagegen kaum gefunden (siehe auch Kapitel 6). Zur Übersicht sind alle durch ESR ermittelten Distanzen in Abbildung 66C gezeigt.

Einschub 3: Hydrophobizitätsanalyse der Helices von Bax

Die *in silico* Analyse der Aminosäuresequenz des Proteins erlaubt Voraussagen zur Wahrscheinlichkeit des Membraneinbaus einzelner Helices. $\alpha 5$ und $\alpha 6$ werden dabei sehr unterschiedlich bewertet. TMHMM⁽¹⁴⁵⁾ bewertet z.B. nur $\alpha 9$ eindeutig als transmembrane Helix (siehe Abbildung 67). Nutzt man dagegen andere Berechnungen (z.B. aus⁽¹⁴⁶⁾), können $\alpha 9$ und $\alpha 5$ und, mit Einschränkung der letzten beiden C-terminalen Reste, auch $\alpha 6$ in die Membran insertieren.

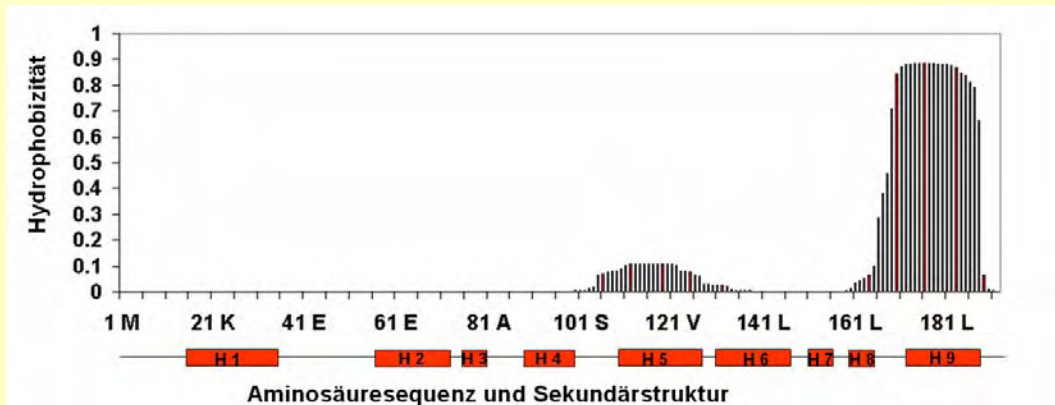


Abbildung 67: Berechnungen des Programms TMHMM zur Wahrscheinlichkeit transmembraner Bereiche in Bax. Je höher die Hydrophobizität (zwischen 0 und 1) bewertet wird, desto wahrscheinlicher kann eine Helix in die Lipidbilayer einbauen.

Strukturuntersuchungen an Membranproteinen haben gezeigt, dass viele transmembrane Helices nicht perfekt hydrophob sind, sondern hydrophile Bereiche aufweisen. Diese können mit hydrophilen Bereichen anderer Helices in der Membran interagieren und die Proteinstabilität erhöhen⁽¹²⁸⁾.

Die Modelle von Annis *et al.*⁽²⁾ (gezeigt in Abbildung 66B) und Garcia Saez *et al.*⁽³⁾ (siehe Kapitel 1), in denen $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 9$ membranständig sind, erlauben eine schlüssigere Interpretation der in dieser Arbeit ermittelten Daten, da:

- die Proteolyseexperimente aus Kapitel 4 den vorgeschlagenen Membraneinbau von $\alpha 9$ stützen,
- die ESR-Daten an Bax C126 aus Kapitel 4 den Einbau von $\alpha 5$ in den Lipidbilayer bestätigen und
- die Modelle die hydrophobere Umgebung der Tryptophane aus Bax (siehe Kapitel 4) nach der Oligomerisierung erklären würden (vier Tryptophane liegen in den transmembranen Helices).

Der Einbau von $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 9$ in den Lipidbilayer wird also von unseren Experimenten bestätigt und in unser Modell des membranständigen Bax aufgenommen. Alle drei Helices sind gemäß den Analysen aus Kapitel 3 innerhalb der Vertebraten hoch konserviert und

hydrophob (siehe Einschub 3). Ob, wie von Garcia Saez *et al.* ⁽³⁾ vorgeschlagen, auch $\alpha 1$ in die Membran einbaut, ist nicht klar. Da aber K21 in $\alpha 1$ in beiden Baxkonformationen Biotin gut binden kann, erscheint ein Membraneinbau unwahrscheinlich. Außerdem gibt es eine Calpainschnittstelle am Ende von $\alpha 1$ und der Schnitt verstärkt die proapoptotische Funktion von Bax ⁽¹²⁷⁾. $\alpha 1$ scheint also entbehrlich für die membranständige Konformation von Bax zu sein. Zur Lage und Faltung der anderen fünf Helices von Bax (in der membranständigen Konformation, die von Annis *et al.* ⁽²⁾ und Garcia Saez *et al.* ⁽³⁾ nicht näher untersucht wurden) und zum Aufbau des Oligomers, liefert diese Arbeit neue Erkenntnisse. In den folgenden Abschnitten wird auf unsere Erkenntnisse eingegangen und das Modell schrittweise entwickelt.

Die Struktur des Baxdimers in der membranständigen Konformation (Schritt 1 und 2 im oben vorgestellten Modell)

Schritt 1: „Der Membraneinbau von $\alpha 9$ “. Der Membraneinbau von $\alpha 9$ wurde schon in verschiedenen Publikationen vorgeschlagen (z.B. ^(2,3,58)). Die Fähigkeit dieser Helix, die hydrophobe Furche zu verlassen, wurde zusätzlich mit Proteolyseexperimenten nachgewiesen (siehe Kapitel 4). Wenn die Furche zugänglich für die wässrige Umgebung wird, könnte dies weitere Konformationsänderung des Proteins auslösen, um die hydrophoben Proteinbereiche abzuschirmen. Der Membraneinbau von $\alpha 9$ wird als erster Schritt in das Modell aufgenommen.

Schritt 2: „Der Einbau von $\alpha 5$ und $\alpha 6$ in die Membran und die Baxdimerisierung“. Ohne $\alpha 9$ ändert sich die Umgebung der hydrophoben Furche und damit die Abschirmung von hydrophoben Bereichen aus den Helices $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\alpha 8$ gegenüber der wässrigen Umgebung (siehe Abbildung 68). Der Membraneinbau von $\alpha 5$ und $\alpha 6$ und die Dimerisierung über zwei $\alpha 2$ verringerte die Zugänglichkeit der hydrophoben Bereiche deutlich, wobei der Einbau von $\alpha 5$ und $\alpha 6$ aber auch hydrophobe Teile von $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$ und $\alpha 8$ zugänglich machen würde. Diese könnten sich nun auf den Lipidbilayer legen, und durch partielles Eintauchen hydrophobe Bereiche abschirmen.

Die Experimente in nativen Gelen und an vernetzten Proteinen (siehe Kapitel 7) zeigten, dass das Baxdimer die Basis Einheit des Oligomers ist. Daher wurde zunächst ein Modell des Baxdimers entwickelt (siehe Abbildung 69 und 68). Die Oligomerisierung und der Membraneinbau des Proteins führen, wie die Puls-ESR-Messungen zeigen, nur zu kleinen Änderungen im Abstand zwischen den beiden Cysteinen (C62 und C126) in Bax. Die Distanz betrug in beiden Konformationen etwa 3 nm (siehe Kapitel 6). Um $\alpha 5$ und $\alpha 6$ in die Membran einzubauen, muss sich trotzdem die Lage von $\alpha 2$ (mit C62) relativ zu $\alpha 5$ (mit C126) verändern, da sonst beim Eintauchen des Moleküls in die Membran Ladungen aus $\alpha 2$, $\alpha 3$

und $\alpha 4$ (insgesamt 15 geladene Aminosäuren, siehe Abbildung 69C) Kontakt zu den hydrophoben Lipidanteilen des Bilayers hätten (siehe Abbildung 69).

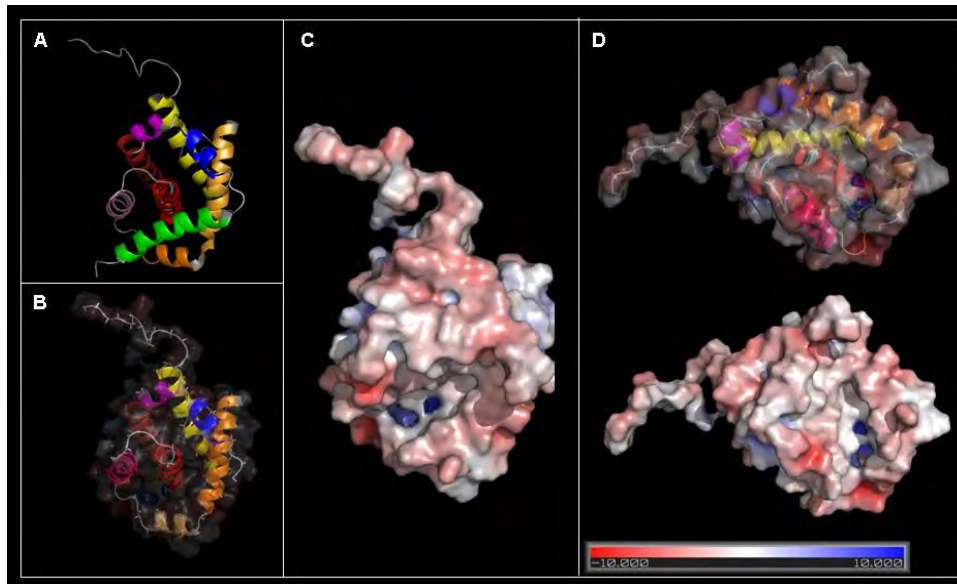


Abbildung 68: Veränderungen in der Umgebung von $\alpha 5$ und $\alpha 2$ durch die Membraninsertion von $\alpha 9$. Die Darstellung greift auf Daten der NMR-Struktur von Bax⁽¹⁾ zurück. A: Banddarstellung von Bax mit $\alpha 9$ (grün). B: Ansicht wie in A aber ohne $\alpha 9$ und mit Einblendung der Oberfläche. C: wie B aber nur Oberflächendarstellung. Farbcode der Helices: $\alpha 1$ - gelb; $\alpha 2$ - beige; $\alpha 3$ - orange; $\alpha 4$ - pink; $\alpha 5$ - hellrot; $\alpha 6$ - dunkelrot; $\alpha 7$ - lila; $\alpha 8$ - blau; $\alpha 9$ - grün. Der Oberflächenfarbcode reicht von -10 (sehr sauer, rot) bis +10 (sehr basisch, blau; siehe Balken in D). D zeigt Bax unter denselben Parametern wie B und C, nur die Perspektive wurde verändert.

Der Vergleich der Kristallstruktur des inaktivem Bakdimers (Bak ist ein Funktionshomolog von Bax) von Moldoveanu *et al.*⁽³⁷⁾ mit der löslichen Baxstruktur von Suzuki *et al.*⁽¹⁾ zeigt einige Unterschiede zwischen beiden Proteinen (siehe Kapitel 3). Besonders der Bereich um $\alpha 2$ und $\alpha 3$ (hydrophobe Furche) ist in beiden nicht deckungsgleich. Da das Bakdimer in der inaktiven Form gezeigt ist, wurde von Moldoveanu *et al.* spekuliert, dass Lageveränderungen von $\alpha 2$ und $\alpha 3$ die Aktivität von Bak regulieren könnten⁽³⁷⁾. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass $\alpha 2$ wichtig für die Konformationsänderungen in Bax ist, da die Monomere im Oligomer mittels $\alpha 2$ verbunden werden (wie die Puls-ESR-Daten an Bax C62 aus Kapitel 6 zeigten).

Das Modell von Annis *et al.*⁽²⁾ zeigt ein membranständiges Bax, dessen Tertiärstruktur sich stark von der des löslichen Bax aus Suzuki *et al.*⁽¹⁾ unterscheidet. Wesentlich ist dabei eine Veränderung des Winkels zwischen $\alpha 4$ und $\alpha 5$. Für unser Modell wurde dieser Winkel ausgehend von der Struktur des löslichen Proteins⁽¹⁾ so verändert, dass C62 etwa 3 nm von C126 entfernt liegt, $\alpha 5$ und $\alpha 6$ membranständig sind und $\alpha 2$ mit ihrer hydrophoben Seite in die Membran eintaucht. Das Ergebnis der Drehung ist in Abbildung 69B als Baxdimer gezeigt. Dabei wird aus Gründen der Übersichtlichkeit nur ein Teil des Proteins dargestellt ($\alpha 2$ bis $\alpha 6$; das linke Monomer zeigt zusätzlich den Loop zwischen $\alpha 1$ und $\alpha 2$). Die Anordnung der zwei Monomere zueinander wurde so gewählt, dass sie zu den Puls-ESR-

Distanzen passt.

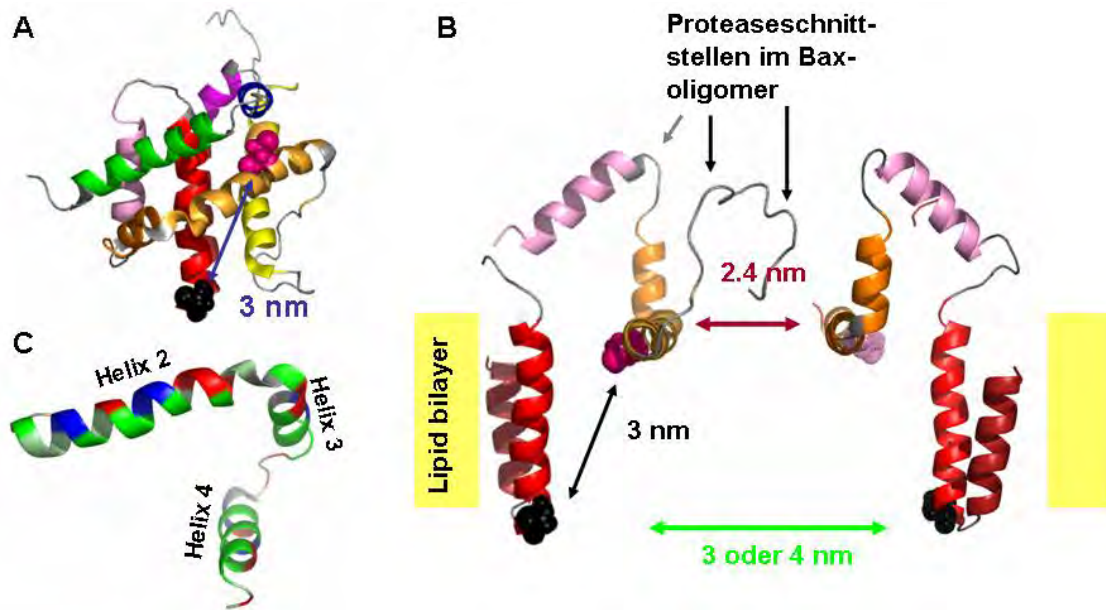


Abbildung 69: Entwicklung eines Modells des Baxdimers

A: Bandmodell des Baxmonomers nach ⁽¹⁾ mit hervorgehobenen Cysteinien C62 (pink) und C126 (schwarz) Die 3 nm Distanz wurde in ESR-Experimenten ermittelt und passt zu den Daten der löslichen Baxstruktur aus Suzuki *et al.* ⁽¹⁾; **B:** Bandmodell von $\alpha 2$ bis $\alpha 6$ nach Änderung des Winkels zwischen $\alpha 4$ und $\alpha 5$; **C:** Bandmodell von $\alpha 2$ bis $\alpha 4$. Basische Aminosäuren [H,K,R] sind in blau, saure [E,D] in rot, hydrophobe [I, L, A,V, C, M, F] in grün und leicht hydrophobe [S, T, G, W] in hellgrün dargestellt. Die restlichen sind grau gezeigt. Die eingezeichneten Distanzen stammen aus den ESR-Experimenten. Helix Farbcode von A und B siehe Abbildung 68

Die gezeigte Anordnung der membranständigen Konformation deckt sich mit vielen der in den vorigen Kapiteln vorgestellten Ergebnisse:

- (1) C62 und C126 haben einen Abstand von etwa 3 nm, wie er mit Puls-ESR ermittelt wurde. Allerdings wurde dieser Abstand zur Entwicklung des Modells genutzt.
- (2) Die gemessenen Abstände zwischen zwei C126 im Oligomer von 3 oder 4 nm können mit diesem Modell erklärt werden. Es gibt dabei zwei Distanzen, da bei den Messungen keine Dimere sondern Oligomere vorlagen und somit jedes Monomer zwei Nachbarn hat.
- (3) Die $\alpha 2$ Helices aus beiden Monomeren kommen dicht genug zusammen, um die 2,4 nm Distanz zu erklären. Die hydrophoben Bereiche können dabei der Membran zugewandt werden und die Ladungen kommen, wie bei einem Reißverschluss, außerhalb des Lipidbilayers zusammen, sodass die beiden Moleküle über Salzbrücken verbunden werden (siehe Kapitel 6).
- (4) Diese Salzbrücken könnten die stabilen Dimere, die in den Blue-Native-Gelexperimenten beobachtet wurden, erklären.
- (5) Die zwei $\alpha 2$ Helices bilden eine gemeinsame Interaktionsfläche, die für kleine

Moleküle nicht mehr zugänglich ist. Dies konnte durch die ineffiziente Biotinbindung an K57, K58 und K64 im Oligomeren Bax gezeigt werden.

(6) Beim Eintauchen von $\alpha 5$ und $\alpha 6$ in die Membran verlassen die beiden Helices den Proteinkern. Dies kann die verbesserte Zugänglichkeit für Biotin von K119 und K123 (in $\alpha 5$) nach der Oligomerisierung erklären.

(7) Das Modell zeigt den N-Terminus und K21 ($\alpha 1$) auf der Proteinoberfläche, passend zu der experimentell gefundenen, guten Biotinzugänglichkeit.

(9) Die im Baxoligomer ermittelten Proteolyse Schnittstellen liegen im Modell zugänglich an der Moleküloberfläche.

(10) Wenn $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 9$ membraninsertiert vorliegen, verändert sich die Umgebung der vier Tryptophane in ihnen. Sie wird hydrophober, womit sich die Blauverschiebung in der Fluoreszenz erklären lässt. Die erhöhte Fluoreszenzintensität nach der Oligomerisierung zeigt, dass die Tryptophane von Sauerstoff abgeschirmt werden. Ein Phänomen, das durch die Verlagerung der Tryptophane in den Oligomerkern erklärt werden kann.

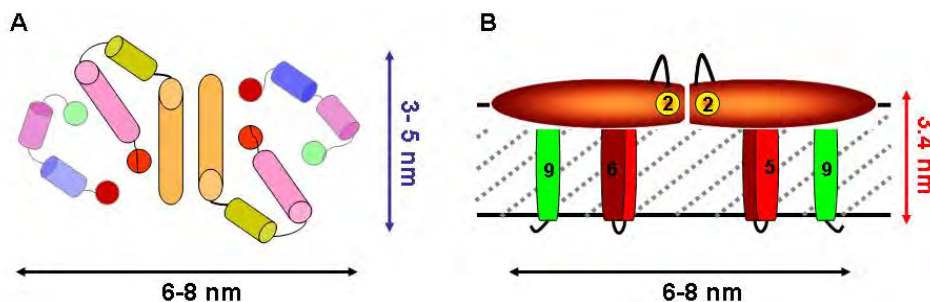


Abbildung 70: Modell des Baxdimers (ohne $\alpha 1$)

A: Aufsicht des Baxmodells. Helices sind als Zylinder dargestellt; B: Seitenansicht des Modells. Dabei sind die senkrecht auf $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 9$ liegenden Helices als rote Scheibe dargestellt, in der $\alpha 2$ speziell in gelb hervorgehoben wurde. Die Membran ist grau schraffiert dargestellt. Farbcode der Helices: $\alpha 2$ - orange; $\alpha 3$ - beige; $\alpha 4$ rosa; $\alpha 5$ - rot; $\alpha 6$ - dunkelrot; $\alpha 7$ - blau; $\alpha 8$ - lila; $\alpha 9$ - grün.

Ausgehend von der im AFM ermittelten Molekülhöhe und den von Suzuki *et al.* mittels NMR ⁽¹⁾ bestimmten Helixlängen, hätte das Dimer eine Größe von 3 - 4 nm Höhe, etwa 3 - 5 nm Breite und 6 - 8 nm Länge. Das in Abbildung 69B dargestellte Modell passt nicht zu dieser Molekülhöhe, es müsste dazu höher sein. Wenn $\alpha 3$ und $\alpha 4$ nicht wie in Abbildung 69B gezeigt, aus der Membran hervorragen, sondern sich alle nicht insertierten Helices auf die Oberfläche legen, hätte das Oligomer die experimentell bestimmte Höhe von 3 - 4 nm ($\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 9$ sind je etwa 3 nm lang, alle anderen Helices sind amphipatisch, es ist also energetisch günstig die hydrophobe Seite waagrecht auf die Lipidoberfläche zu legen - siehe Abbildung 69C).

Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass die in Abbildung 70 gezeigte Struktur des

membranständigen Bax stark der bekannten, membranständigen Struktur der C-terminalen Domäne des Colicin E1 ähnelt (in der *closed channel* Konformation; siehe Abbildung 71). Auch die NMR-Strukturen des löslichen Bax und seiner Homologen zeigen Ähnlichkeiten zu den löslichen Strukturen dieser bakteriellen Toxine ^(1,89). Colicine sind lösliche Proteine, die von einigen Bakterien ins Medium abgesondert werden, um die Membranen von Nahrungskonkurrenten zu durchstoßen, sie damit zu töten und so einen Selektionsvorteil gewinnen. Sie verursachen also, genau wie Bax, Poren in Lipidschichten. Von den Colicinen ist jedoch bisher nicht bekannt, dass sie in der Membran oligomerisieren.

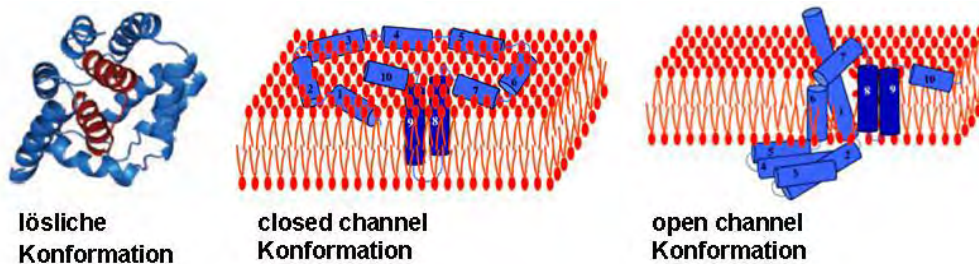


Abbildung 71: Colicin Konformationen entnommen aus Cascales *et al.* ⁽¹⁴⁷⁾

Die Struktur des Baxoligomers in der membranständigen Konformation (Schritt 3 im oben vorgestellten Modell)

Schritt 3: „Vergrößerung des Baxoligomers durch Kettenelongation. Die Spin-Spininteraktionen der Puls-ESR-Messungen an C126 (siehe Kapitel 6) zeigten Bax als mindestens tetrameres Protein. Die größten Oligomere, in nativen Gelen und nach Proteinvernetzungen waren Dodekamere (siehe Kapitel 7). Es wurden jedoch auch alle kleineren Oligomere mit einer geraden Anzahl von Monomeren identifiziert.

Vergleicht man die geschätzte Größe des Baxdimers (siehe Abbildung 69) mit den Größenabschätzungen des Oligomers in Detergenz aus Kapitel 8, spricht die Größe eher für Tetramere bis Oktamere als für Dodekamere, allerdings sind Größenabschätzungen schwierig, da die Messungen in Liposomen größere Oligomere als in Detergenz zeigen (siehe Kapitel 8).

Da die Daten keine eindeutige Bestimmung der Anzahl von Monomeren im Oligomer zuließen, wird eine Kette aus sechs Monomeren als Modell des Baxoligomers gezeigt (siehe Abbildung 72). Die Monomere sind dabei vereinfacht als Kugeln dargestellt. In der Mitte der Abbildung ist ein Dimer in der Darstellung aus Abbildung 70B eingblendet. Es soll die Blickrichtung des Betrachters (der quasi aus der Mitte des Lipidbilayers hervorschaut) verdeutlichen. Die Proteinvernetzungsexperimente aus Kapitel 6 und 7 geben Hinweise, dass $\alpha 5$ an einer zweiten Interaktionsfläche zwischen den Monomeren beteiligt ist. Da $\alpha 5$ membranständig ist, böten sich $\alpha 6$ oder $\alpha 9$ als Interaktionspartner an. Um dies nachzuweisen und ein detailreiches Modell zu erstellen bräuchte es aber weitere

Experimente an spingelabelten Baxmutanten.

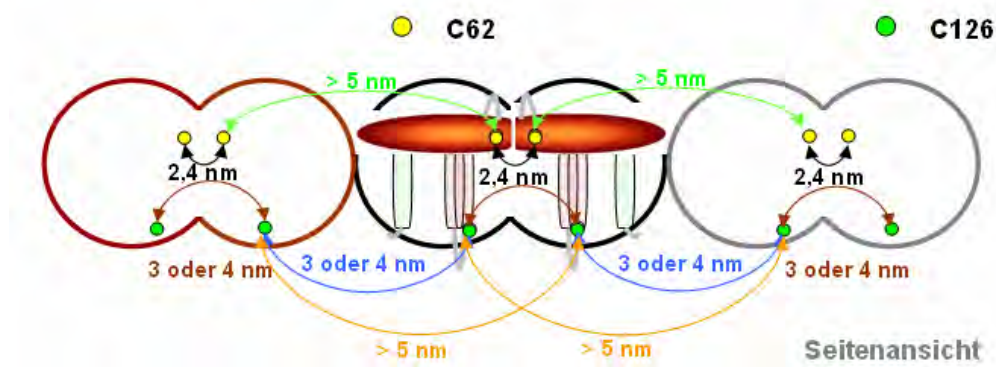


Abbildung 72: 2D Darstellung der Distanzen innerhalb des Baxoligomers ausgehend von dem Modell des dimeren Bax aus Abbildung 68B, das im mittleren Dimer auch eingebildet ist. Der Blickpunkt des Betrachters ist auf das Innere des Lipidbilayers gerichtet. C62 und C126 sind als gelbe bzw. grüne Punkte gezeigt. Die Distanzen zwischen ihnen sind mit verschiedenen farbigen Pfeilen gekennzeichnet.

Porenbildung oder Proteininhibierung

Schritt 4 und 5: „Ringschluss und Inhibierung von Bax“. Von Reed ⁽⁶⁴⁾ wurde aus den vorhandenen Literaturdaten von Bax ein Modell des Baxoligomers entwickelt, das nicht die Tertiärstruktur des Proteins, sondern die Oligomerbildung bzw. die Inhibierung von Bax in der Mitochondrienmembran beschreibt. Reed spekuliert, dass das aktive, membranständige Bax Ketten aus Monomeren bildet, die mittels Ringschluss (Schritt 4) geschlossen werden und eine Pore bilden. Kettenelongation und Ringschluss können aber durch die Bindung antiapoptotischer Bcl-2 Proteine blockiert werden (Schritt 5). Dies hat zur Folge, dass keine Pore entstehen kann und Bax inaktiv in der Membran vorliegt ⁽⁶⁴⁾ und die Referenzen darin). Bis zur Kettenelongation wurde die Entstehung der Baxpore in diesem Kapitel beschrieben. Zu den letzten beiden Schritten konnte mit den hier angewandten Methoden gezeigt werden, dass die Oligomere zumindest im Detergenz aus einer geraden Anzahl an Monomeren bestehen (siehe Kapitel 7). Reed gibt keine Informationen zur Anzahl der Monomere im Oligomer, er nimmt aber an, dass sie heterogen ist. Da die Anzahl der Monomere im Oligomer nicht genau bestimmt werden konnte, wurde versucht die notwendige Porengröße zum Entlassen des Cytochrom c festzulegen und vorherzusagen, wie viele Monomere notwendig sind, um diese Größe zu erreichen.

Der innere Porendurchmesser des oligomeren Bax

In früheren Studien wurde gezeigt, dass Bax in menschlichen Zellen Cytochrom c, ein Molekül von 12 kDa und 2,5-4 nm Durchmesser (Größe aus NMR-Struktur ermittelt; PDB: 1J3S), aus dem Mitochondrienintermembranraum ins Cytosol entlässt ⁽⁵⁹⁾. Zumindest aus

Hefemitochondrien entlässt Bax aber auch wesentlich größere Proteine, wie z.B. Cytochrom b_2 Tetramere mit 230 kDa⁽¹⁴⁸⁾. Das Baxoligomer muss also Poren mit einem inneren Durchmesser von ca. 3 - 4 nm bilden, um Cytochrom c ausströmen lassen zu können und wesentlich größere für Cytochrom b_2 . Experimentell wurden Poren von über 4 nm Durchmesser in den AFM- und TEM-Untersuchungen bestätigt. In Lipid wurden verschieden große Poren gefunden, die kleinsten von ihnen hatten einen inneren Durchmesser von 5 nm, die größten von etwa 20 nm. In Detergenz (DDM) waren die Poren mit etwa 2 - 3 nm innerem Durchmesser deutlich kleiner (siehe Kapitel 8).

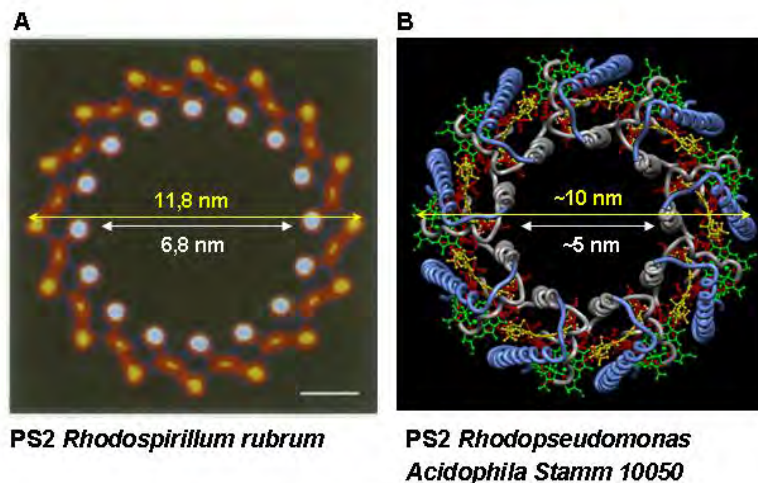


Abbildung 73: Strukturen von Photosystemen aus verschiedenen Organismen (mit PS abgekürzt)
 In A markieren weiße und gelbe Punkte jeweils eine Helix. Das PS II besteht aus 16 Untereinheiten und 32 Helices. In B sind die 18 Helices der neun Untereinheiten in weiß und blau gezeigt. Die weißen Pfeile in der Pore zeigen jeweils den inneren Porendurchmesser an, die gelben den äußeren. Dabei wurden nur die Sekundärstrukturelemente aber nicht überstehende Aminosäureseitenketten berücksichtigt.

Wie viele Monomere muss ein Oligomer aufweisen um eine Porengröße von 4 nm zu erreichen? Um diese Frage zu beantworten wurde das Photosystem II aus *Rhodospirillum rubrum* und *Rhodopseudomonas acidophila* (Stamm 10050) betrachtet. Beide bilden mit ihren Helices Proteinringe in Membranen aus, deren Strukturen bekannt sind. Die Struktur des Photosystems II aus *Rhodospirillum rubrum* wurde von Karrasch *et al.*⁽¹⁴⁹⁾ mittels EM (Auflösung von 8.5 Å) gelöst. Es besteht aus einem Ring von 16 Untereinheiten und 32 transmembranen Helices. Die äußeren bzw. inneren Durchmesser des Ringes sind dabei 11,8 nm bzw. 6,8 nm (siehe Abbildung 73A). Das Photosystem II aus *Rhodopseudomonas acidophila* (Stamm 10050) gelöst von Prince *et al.*⁽¹⁵⁰⁾ hat neun Untereinheiten und 18 transmembranen Helices (Ringdurchmesser außen ~10 nm bzw. innen ~5 nm; siehe Abbildung 73B). Je nach Anzahl der Untereinheiten und der Positionierung der Untereinheiten bzw. Helices zueinander entstehen also unterschiedlich große Ringe und Poren. Dabei können achtzehn Helices ausreichen eine 4 nm Pore aufzubauen und 32 Helices eine 7 nm Pore zu schaffen.

Betrachtet man das Modell von Bax, hätte ein Baxoktamer 24 transmembrane Helices und ein Baxdodekamer 36 Helices in der Membran. Zumindest das Dodekamer (in nativen Gelen identifiziert) sollte also ausreichen, um eine Pore für den Cytochrom c Transport auszubilden, daher wurde ein Dodekamer für das Modell von Bax in Abbildung 65 verwendet. Da die AFM- und TEM-Aufnahmen noch größere Poren in Liposomen zeigten, ist es gut möglich, dass unter diesen Bedingungen viel größere Oligomere gebildet wurden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit dem Befund, dass Bax *in vivo* auch größere Moleküle wie das Cytochrom b_2 Tetramer entlassen kann⁽¹⁴⁸⁾, sofern die Kettenelongation nicht durch noch unbekannte Faktoren beschränkt wird.

Der Einbau von Bax in den Liposomen

Gemäß dem in Abbildung 70 gezeigten Modell des Baxdimers liegen nahezu alle Ladungen von Bax auf einer Seite des Lipidbilayers. Da Ladungen Lipidschichten nur schwer passieren können, sollten die auf der Membran liegenden, ladungstragenden Helices also auf der äußeren, dem wässriger Lösungsmittel zugewandten Seite des Liposoms, angeordnet sein.

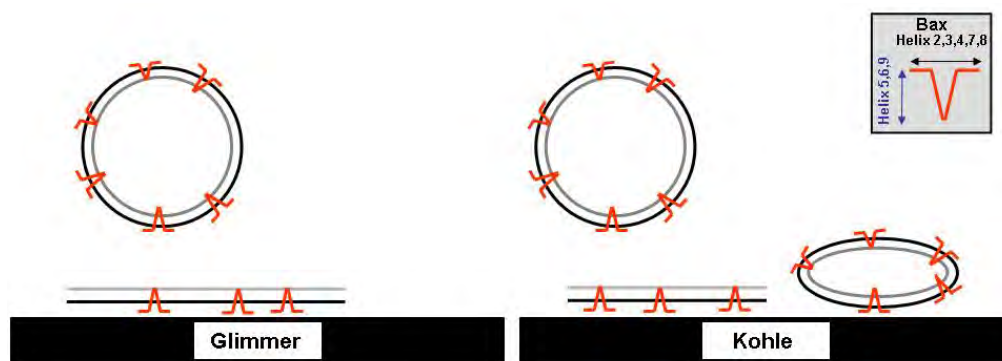


Abbildung 74: Bindung von Liposomen mit Bax an Glimmer und Kohle

Dabei sind die Lipidschichten des Liposoms schwarz (außen) und grau (innen)gezeigt. Bax ist in rot eingezeichnet, wobei $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 9$ in den Lipidbilayer durchstoßen, während alle anderen Helices auf der Liposomenaußenseite liegen.

Wie in Kapitel 8 erläutert, konnten im TEM intakte und geplatze Liposomen beobachtet werden, während im AFM nur die geplatzen Liposomen sichtbar waren. Abbildung 74 zeigt die entsprechenden Proteinlipidkonstellationen. Im TEM konnten demnach beide Membranseiten betrachtet werden, im AFM nur die Innenseite. Wenn nahezu alle Helices und Ladungen des Proteins auf der Außenseite des Liposoms lägen, wären sie im TEM aber nicht im AFM zugänglich. Im AFM wäre nur das entstandene Loch, der Loop zwischen $\alpha 5$ und $\alpha 6$ sowie der C-Terminus nach $\alpha 9$ sichtbar. Dies erklärt, warum die AFM-Aufnahmen aus Kapitel 8 Löcher im Lipidfilm, aber kaum Protein an deren Rändern zeigten: Loop und C-Terminus waren einfach zu klein, um detektiert zu werden.

Dass nahezu alle Ladungen auf einer Seite des Proteins liegen, erklärt auch die starke, uniforme Bindung der Detergenz induzierten Baxoligomere an den Glimmer. Die Seite mit

den Ladungen legt sich hierbei bevorzugt auf den ebenfalls geladenen Glimmer und liefert so eine Erklärung für die verbesserte Liposomenbindung nach dem Membraneinbau von Bax an den Glimmer. Tatsächlich wurden bei der hydrophoberen Kohle keine Veränderungen in der Liposomenbindung vor und nach Baxeinbau festgestellt.

Kapitel 10: Material und Methoden

Materialien

Instruments:

Agarose Gel Elektrophorese	Spannungsquelle von Carl Roth GmbH System
CD-Spektrometer	JASCO J-115 Spektropolarimeter mit JASCO PFD 350S Peltier Type FDCD zur Temperature Kontrolle JASCO 810 Spetropolarimeter
Elektronenmikroskop	Philipps CM 12
Elektronen Spin Resonanz Spektrometer	Magnetech spectrometer (continuous wave ESR) Bruker Eleksys 580 spectrometer mit Bruker Flexline split-ring resonator ER 4118X_MS3 (Puls-ESR)
Elektroporationzelle	Gene Pulser mit 0,2 mm Küvetten (Biorad)
Fluorescence Spektrometer	LS50B Spektrometer (Perkin Elmer) mit 105.251-QS (50 µl) Küvetten
French Pressure Cell Press	Aminco SLM Instruments
HPLC High Pressure Liquid Chromatography	ÄKTA Explorer and ÄKTA Basis (Amersham Biotech) mit selbstgepackter Ni-NTA Säule; Superdex S75 (16/60); Superdex 200 (16/60); Mono A; Source A. SMART Chromatographie System (Amersham Biotech) mit Superdex 75 HR 3.2/30; Superdex 200 HR 3.2/30, Superrose 6 HR 3.2/30
Massenspektrometer	MALDI- Massenspektrometer Reflex 3 (Bruker Daltonics) Q-TOF Ultimate Massenspektrometer (Waters) Electrospray Ionisations Massenspektrometrie (ESI-MS) mit micrOTOF LC (Bruker Daltonics) und vorgeschalteter Agilent 1100 HPLC mit einer Water Symetry C4 reverse phase Säule
Sequenz Analyser	Procise 492cLC (Applied Biosystems, GmbH)

Rasterkraft Mikroskop	Nanoscope Multimode III (Veeco)
Quecksilber Lampe	Leica 100W Xenon Lampe mit KG4 und GG395nm Filtern
SDS-Gelapparatur	Gelelectrophoris System SE215 Might Small (Hoefer/ Pharmacia Biotech) XCell SureLock™ Electrophoresis cell (Invitrogene) mit NuPAGE Fertiggradientengelelen Spannungquelle (Pharmacia)
UV-vis Spektrometer	UV-1700 von Shimadzu mit 105.251-QS (50 µl) Küvetten NanoDrop (NanoDrop Technologies)
Zentrifugen und Rotoren	Avanti J25 mit JA-25.50 Rotor Avanti J20 mit JLA-8.100 Rotor Sigma 4K15 mit Schwingrotor für Falcon Tubes von Greiner Eppendorf Zentrifuge mit FA45-30-11 Rotor für Eppendorfgefäße Beckman TL-100 Ultrazentrifuge mit TLA 100.3 und TLA 100.2 von Beckman

Chemikalien

Medien, Puffer und Stammlösungen

Medien wurden für 20 min autoklaviert (121°C; 2 bar) und bei Raumtemperatur gelagert. Antibiotika wurden nach einer Abkühlung unter 60°C beigefügt.

Wachstumsmedien

LB-Medium 1% (w/v) Bacto Tryptone
(Luria-Bertani medium), *E. coli*: 0.5% (w/v) Bacto Yeast Extract
1% (w/v) NaCl (171 mM) pH 7,0

für Platten wurden 15g/l Agar zugegeben

TB-Medium 1.2% (w/v) Bacto Tryptone
(Terrific broth medium), *E. coli*: 2.4% (w/v) Bacto Yeast Extract
0.4% (w/v) Glycerin pH 7,5

für Platten wurden 15 g/l Agar zugegeben

Puffer

Die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Puffer werden in Tabelle 9 aufgeführt:

Puffer	NI A	NI B	MA	MAN	MB	S 1	S2	C 1	C 2	C 3
Tris-HCl			20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
HEPES	20 mM	2 mM								
NaCl	500 mM	500 mM		20 mM	1 M	150 mM	150 mM	100 mM	500 mM	500 mM
CaCl ₂							mM			
KCL				20 mM						
MgCl ₂				3 mM						
Imidazol	10 mM	500 mM								
Na ₃ PO ₄	20 mM	20 mM								
DTT										30 mM
pH	7,5	7,5	8,0	7,5	8,0	7,5	7,5	8,0	8,0	8,0

Tabelle 9: Pufferzusammensetzungen

Stammlösungen

IPTG (1000- fache Lösung):	238 g/l isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (1 M)
Ampicillin (1000- fache Lösung)	100 g/l Ampicillin (0,25 M);
Chloramphenicol (1000- fache Lösung)	30 g/l Chloramphenicol;:

Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

Bakterienstämme:

Name	Genotyp	Herkunft
BL21(DE3) Gold	E. coli B F ⁻ , ompT, hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻), dcm ⁺ , Tet ^r , galλ(DE3) endA, Hte	Stratagene
DH5α	F ⁻ , endoA1, hsdR17(r _K ⁻ , r _K ⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, Δ (argF-lacZya) U169, Φ80dlacZΔM15	Gibco BRL
C41	BL21(DE3) mit mindestens einer unbekanntenen Mutation	Avidis
C43	C41 mit mindestens einer weiteren unbekanntenen Mutation	Avidis
BL21/RIPL	E. coli B F ⁻ , ompT, hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻), dcm ⁺ , Tet ^r , galλ(DE3) endA, Hte [argU ileY leuW Cam ^r][argU; ileY; LeuW; Strep ^R /Spec ^R]	Stratagene
Rosetta (DE3)	E. coli B F ⁻ , ompT, hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻), gal, dcm lacY1(DE3) pRARE6 Cam ^R ,	Novagene
BL21/RIL	E. coli B F ⁻ , ompT, hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻), dcm ⁺ , Tet ^r , galλ(DE3) endA, Hte [argU ileY leuW Cam ^r]	Stratagene

Tabelle 10: Bakterienstämme

Plasmide

Die innerhalb dieser Arbeit produzierten Plasmide sind mittels ortgerichteter Mutagenese kloniert worden.

Name	Herkunft
pET 23d-Bax Δ TM	Labor Dr. Antonsson
pET 23d-Bax	Labor Dr. Antonsson
pTyB1-Bax	Labor Dr Tjandra ⁽¹⁾
pTYB1-Bax C62A	Diese Arbeit
pTYB1-Bax C126A	Diese Arbeit
pTYB1-Bax C62A; C126A	Diese Arbeit
pTYB1-Bax C62A; C126A; A24C	Diese Arbeit
pTYB1-Bax C62A; C126A; S118C	Diese Arbeit
pTYB1-Bax C62A; C126A; V110C	Diese Arbeit
pTYB1-Bax C62A; C126A; I150C	Diese Arbeit
pTYB1-Bax C62A;C126A;T135C	Diese Arbeit
pTYB1-Bax C62A; C126A; I175C	Diese Arbeit
pTYB1-Bax C62A; C126A; A178C	Diese Arbeit
pTYB1-Bax P13L	Diese Arbeit
pTYB1-Bax S184A	Diese Arbeit
pTYB1-Bax S184K	Diese Arbeit
pTYB1-Bax Q171R	Diese Arbeit
pTYB1-Bax Q171R; Y164F	Diese Arbeit
pTYB1-Bax Q171R; Y164F; Y115F	Diese Arbeit
pTYB1-Bax Y115F	Diese Arbeit

Tabelle 11: Plasmid

Oligonukleotide

Oligonukleotide für Ortsspezifische Mutagenese wurden mit etwa 10-15 Basen vor und nach dem mutierten Codon konstruiert. Die Schmelztemperatur wurde vom Programm „Oligonucleotide Properties Calculator“ (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) auf 60-65°C kalkuliert. Die Primer wurden über Metabion bezogen und die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Name	Sequenz
Bcl-xL VL +	GCG CGC ATA TGT CTC AGA GCA ACC GGG AGC TGG
Bcl-X I-	GCG CTC TTC GGC GGG CTT TCC GAC TGA AGA GTG AGC CCA GC
Bax P13V +	GGG GAG CAG CCC AGA GGC GGG GGG GTC ACC AGC TCT GAG CAG ATC
Bax P13V -	GAT CTG CTC AGA GCT GGT GAC CCC CCC GCC TCT GGG CTG CTC CCC
Bax S184A +	GCG GGA GTG CTC ACC GCC GCG CTC ACC ATC TGG AAG AAG
Bax S184A -	CTT CTT CCA GAT GGT GAG CGC GGC GGT GAG CAC TCC CGC GTG GCG GGA GTG CTC ACC GCC AAG CTC ACC ATC TGG AAG AAG
Bax S184K +	CTT CTT CCA GAT GGT GAG CTT GGC GGT GAG CAC TCC CGC CAC
Bax S184K -	ATG GAC GGG TCC GGG GAG CAG CCC AGA GGC GGG GG
Bax Sequenz Base 1-36	TCA GCC CAT CTT CTT CCA GAT GGT GAG CGA GGC GGT GAG C
Bax Sequenz Ende	GGC CGG GTT GTC GCC CTT TTC TAC TTT GCC AGC
Bax Base 320 +	GCT GGC AAA GTA GAA AAG GGC GAC AAC CCG GCC
Bax Base 320 -	CTG AGC GAG GCT CTC AAG CGC ATC GGG
Bax C62A +	CCC GAT GCG CTT GAG AGC CTC GCT CAG
Bax C62A -	

Name	Sequenz
Bax C126A +	CTC AAG GCC CTG GCC ACC AAG GTG CCG GAA
Bax C126A -	TTC CGG CAC CTT GGT GGC CAG GGC CTT GAG
Bax I161r +	GGT TGG GAC GGC CGC CTC TCC TAC TTT
Bax I161r -	AAA GTA GGA GAG GCG GCC GTC CCA ACC
Bax Q171R +	ACG CCC ACG TGG CGG ACC GTG ACC AT
Bax Q171R -	ATG GTC ACG GTC CGC CAC GTG GGC GT
Bax Y164f +	GCC TCC TCT CCT TTT TTG GGA CGC CCA CGT
Bax Y164f -	ACG TGG GCG TCC CAA AAA AGG AGA GGA GGC
Bax Y115f +	CCG GGT TGT CGC CCT TTT CTT CTT TGC CAG CAA A
Bax Y115f -	TTT GCT GGC AAA GAA GAA AAG GGC GAC AAC CCG G
Bax A24C +	ATG AAG ACA GGG TGC CTT TTG CTT CAG GGT TT
Bax A24C -	AAA CCC TGA AGC AAA AGG CAC CCT GTC TTC AT
Bax S118C +	TAC TTT GCC TGC AAA CTG GTG CTC AAG GCC
Bax S118C -	GGC CTT GAG CAC CAG TTT GCA GGC AAA GTA
Bax T135C +	CGG AAC TGA TCA GAT GCA TCA TGG GCT GGA
Bax T135C -	TCC AGC CCA TGA TGC ATC TGA TCA GTT CCG
Bax I175C+	AGA CCG TGA CCT GCT TTG TGG CGG GAG T
Bax I175C-	ACT CCC GCC ACA AAG CAG GTC ACG GTC T
Bax A178C +	CGT GAC CAT CTT TGT GTG CGG AGT GCT CAC C
Bax A178C -	GGT GAG CAC TCC GCA CAC AAA GAT GGT CAC G
Bax V110C +	AAC TTC AAC TGG GGC CGG TGT GTC GCC CTT TTC
Bax V110C -	GAA AAG GGC GAC ACA CCG GCC CCA GTT GAA GTT
Bax I150C +	TCC GGG AGC GGT GCT TGG GCT GGA TCC AA
Bax I150C -	TTG GAT CCA GCC CAA GCA CCG CTC CCG GA

Tabelle 12: Oligonukleotide

Methoden

Lagerung und Anzucht von *E. coli* Zellen

Lagerung

E. coli Zellen wurden vor der Nutzung frisch transformiert oder kurzzeitig auf LB-Agarplatten bei 4°C gelagert. Eine Ausnahme bilden kompetente Zellen die im Abschnitt Transformation näher besprochen werden.

Anzucht

Die Bakterien wurden, soweit es nicht anders angegeben ist, aerob bei 37°C und 180-220 rpm kultiviert.

Molekularbiologische Methoden

Agarose Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten nach der ortsspezifischen Mutagenese erfolgte als analytische Auftrennung auf einem 0.8% igen Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromide, durch Ladungsauftrennung im elektrischen Feld. Die DNA-Proben wurden vor der Auftrennung mit Agarose Gellade Puffer (0.2% (w/v) Bromphenolblau, 30% Glycerin) versetzt und Proben bei einer Spannung von 5 V/cm aufgetrennt.

Biotinbindung an Bax

Für die Biotinbindung an Bax wurden Baxproben (30 µl) mit einer Konzentration von etwa 0,5 mg/ml

(23 µM) auf Eis verwendet. Sie wurde im Verhältnis 1:4 mit NHS-Biotin gemischt, inkubiert und die Reaktion mit einem dreifachen Lysinüberschuss (bezogen auf das Biotin) gestoppt. Die Biotinbinderate des Gesamtproteins wurde mit LC-MS (Hauservice) bestimmt. Um herauszufinden welche Lysine gelabelt sind, wurden die Proben zunächst auf ein SDS- Gradientengel aufgetragen. Die Baxbanden wurden später mit Trypsin verdaut und die Masse der Fragmente mittels MALDI-MS und ESI-MS bestimmt (Hauservice).

DNA-Konzentrationsbestimmung

DNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe analytischer Agarose Gelelektrophoreses bestimmt. Bis zu 5 µl der zu untersuchenden DNA-Proben wurden neben einer Marker DNA auf ein Gel geladen. Mit Hilfe der Auftrennung sowie der Herstellerangaben zu den DNA-Konzentrationen in den Markerbanden, konnten die Konzentration und der Reinheitsgrad der Probe bestimmt werden.

Außerdem konnte die Konzentration mittels des NanoDrop UV-Spektrometer bestimmt werden.

DNA-Ligation

Ligationen wurden mit 100-500 ng DNA bei einer Insert zu Vektor Rate von 3:1 bis 5:1 über Nacht bei 16°C durchgeführt. Das Probenvolumen war 10 µl (1 µl T4-ligase und dem von Hersteller angegebenen Mengen an Reaktionspuffer). Reinheit und Konzentration der DNA-Proben wurde mittels analytischer Gelelektrophorese bestimmt.

DNA-Restriktion

Zum vollständigen Verdau der DNA-Fragmente wurden Restriktionsenzyme von NEB verwendet und nach Herstellerangaben eingesetzt.

DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde der Haus interne Sequenzierservice auf einem ABI 3730 Sequenzierer genutzt. Die Proben wurden mit dem *BigDye 3.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Perkin Elmer Applied Biosystems) nach folgendem Schema vorbereitet und danach einer PCR unterzogen

Reaktion-Mix:

Vektor (100-500 ng DNA)	2 µl
Primer (1 pmol/ µl)	1 µl
Big Dye 3.1 Mix	4 µl
Big Dye Puffer	1 µl
Betain	2 µl

PCR:

98°C	2 min	
95°C	30 s	
60°C	30 s	70 Zyklen
65°C	3 min	
4°C		

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose Gelen

Zu isolierende DNA- Fragmente wurden im Agarosegel separiert, kurz im UV-Licht sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Mit Hilfe des „*Qiaquick Gel Extraktion Kits*“ wurde die DNA isoliert.

Isolierung von Plasmid DNA

Plasmid DNA wurde mit Hilfe des „*Qiaprep Spin Miniprep Kit*“ (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Der Vektor wurde dazu zuvor in DH5α transformiert und die Zellen über Nacht bei 37°C und 220 rpm in LB Medium (mit 100 mg/ml Ampicillin) kultiviert

Ortsspezifische Mutagenese

Die Ausgangsplasmide wurden uns aus den Laboren von Dr. J. C. Martinou (pTM23-HisBax; pTM23-HisBaxΔα9) und Dr. N. Tjandra (pTYB1-Bax) zur Verfügung gestellt. Die Mutanten wurden mit Hilfe von ortsspezifischer Mutagenese kloniert. Die Mutagenesemethode wurde mit Hilfe der Herstellerangaben des „*Quikchange™ Site-Directed Mutagenesis Kit*“ (Statagene) erarbeitet. Da der verwendete Vektor mit Insert sehr groß ist (über 8 kB), wurde statt der im Kit angegebenen Pfu- Polymerase die Phusion-Polymerase (Finnzymes) verwendet. Nach Ansetzen des Reaktionsmixes und PCR wurden die Proben mit 2 µl Dpn I (NEB) und 5 µl NEB 2 Reaktionspuffer versetzt und 2-3 h bei 37° C inkubiert, um die Template DNA abzubauen. Danach wurde die DNA mit Hilfe des PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt und in DH5α Zellen transformiert.

Reaktions- Mix

Vektor (50 ng/µl)	1 µl	
Primer + (1 pmol/ µl)	1 µl	
Primer - (1 pmol/ µl)	1 µl	
dNTP`s (10 mM)	1,5 µl	
DMSO (100%)	1,5 µl	
Millipore Wasser	33 µl	
Phusion GC Puffer (5x)	10 µl	
Phusion Polymerase	0,6 µl	

PCR

98°C	2 min	
98°C	20 s	
62°C	20 s	32 Zyklen
72°C	5 min	
72°C	7 min	
4°C		

Präparation und Transformation von elektro- oder chemisch- kompetenten *E. coli* Zellen

Für Fermentationen und schwierige Klonierungen wurden chemisch-kompetente Zellen gekauft und nach Herstellerangaben transformiert (DH5α und BL21/RIPL). Für alle anderen Anwendungen wurden elektro-kompetente Zellen selbst hergestellt und verwendet. *E. coli* Kulturen wurden in LB Medium, je nach Bakterien Stamm mit oder ohne Antibiotikum, über Nacht bei 37°C und 220 rpm angezogen. Ein Liter LB Medium wurde mit 10 ml dieser Vorkultur versetzt und bis zur mittleren logarithmischen Phase (OD600 = 0,6-0,8) angezogen. Die Zellsuspension wurde auf 4°C gekühlt und bei 4°C zentrifugiert (4000 g, 15 min). Das Zellpellet wurde in einer sterilen 10% Glycerin Lösung aufgenommen wiederholt zentrifugiert und in immer geringeren Flüssigkeitsmengen aufgenommen (1 l, 0,5 l und 0,2 l). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 800 µl 10% Glycerin aufgenommen und dann in 50 µl Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Für die Transformation wurde 1 µl Plasmid DNA mit einem auf Eis aufgetautem Aliquot der kompetenten Zellen gemischt, in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und in der Elektroporations Apparatur einem Spannungsfeld unterworfen (25 µF, 1,5 kV, 800 Ω). Danach wurden die Zellen in LB-Medium (2 ml, 30-60 min) regeneriert und auf LB Agar Platten oder in Flüssigkulturen mit Selektionsmarker über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert.

Proteinchemische Methoden

Blue Native Gradientengelelektrophorese

Native Gradienten Gele wurden nach der Methode von Schagger und Jagow ^(140,141) als 6-12% Gradientengele hergestellt. Die Proben für die selbstgegossenen Gele wurden auf ca. 1,5 mg/ml konzentriert und 50 µl Probe mit 45 µl ACA Puffer (750 mM ξ-aminocapronic acid, 50 mM Bis-Tris pH7, 0,5 mM EDTA-Na₂) und 5 µl Ladepuffer (750 mM ξ-aminocapronic acid, 5% Coomassie G) gemischt bevor sie auf das Gel (20 cm x 20 cm x 0,75 mm, BioRad-Apparatur) aufgetragen wurden. Die Gelzusammensetzung ist in Tabelle 13 gezeigt.

	Sammelgel	Trenngel	
	4 %	6%	12%
Acylamid (30/0.8)	2.66 ml	2.1 ml	4.2 ml
Gelpuffer (6x)	3.33 ml	1.75 ml	1.75 ml
Glyzerin	-	-	2.1 g
Ammoniumpersulfat (10%)	200 μ l	20 μ l	20 μ l
TEMED	20 μ l	5 μ l	5 μ l
Gesamtvolumen	20 ml	10.5 ml	10.5 ml

Tabelle 13: Gelzusammensetzung der nativen Gele

Für den Lauf wurden folgende Puffer verwendet: (1) Kathode Puffer (50 mM Tricine, 15 mM Bis Tris, pH7, Coomassie G 0,02%) (2) Anoden Puffer (50 mM Bis Tris, pH7). Der Lauf wurde bei 12-15 mA durchgeführt.

Gold Labeling von Bax

Für EM Aufnahmen wurde das Baxoligomer und das in Liposomen eingebaute Bax mit Nanogold (Nanoprobes) bestückt. Die Goldpartikel hatten einen Durchmesser von 1,4 nm und waren mit verschiedenen reaktiven Gruppen versehen. NHS- Gold kann kovalent an Lysine und den N-terminus binden und Monoamino-Gold bindet kovalent an Cysteine. Das von Nanoprobes gelieferte Gold wurde in Milli Q Wasser gelöst, mit der vorbereiteten Baxprobe (in 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,5) versetzt oder bei -20°C eingefroren. Das Mischverhältnis wurde so gewählt, das auf ein Baxmonomer drei Goldpartikel kamen. Gold und Protein wurden zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Probe mit gebundenem Gold und das freie Gold mittels einer Superdex 200 Säule im SMART System voneinander getrennt und die Labelingeffizienz nach Herstellerangaben berechnet.

Konzentration der Proteinproben

Proteine wurden mit Konzentratoren (Amicon (Millipore) oder Vivaspin (Sartorius) bei einem Ausschlussvolumen von 5 bzw. 10 kDa verdichtet.

Protein Quervernetzung

Jeweils 10 μ l Baxproben (0,8-1,2 mg/ml; Puffer MA) wurden mit 1 μ l Ammonium Peroxodisulfate (APS, 25 mM) und 2 μ l Ruthenium (II) Tris-Bipyridyldication (5 mM Aldrich) in der Dunkelheit gemischt und direkt 5 s mit einer Xenon Lampe belichtet. Dabei wurden Filter verwendet, um nur Licht zwischen 400 und 700 nm zur Probe zu geben (Filter: KG4; GG 395 nm; 100 W Leica; Distanz 37 cm). In einer Licht abhängigen Reaktion reagiert das Ruthenium (II) Tris-Bipyridyldication mit Tyrosinen, die dabei zu Radikalen werden. Laut der Literatur können die Tyrosineradikale mit anderen Tyrosinen, Lysin oder Cysteinen reagieren, wobei eine kovalente Bindung zwischen den beiden Aminosäuren ausgebildet wird⁽¹³⁸⁾. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 μ l SDS-Gel Proben Puffer gestoppt.

Protein Dialyse

Um Puffer auszuwechseln oder kleine Moleküle wie DTT oder das Nitroxid Spinlabel zu entfernen, wurde das Protein in Dialyseschläuche (Sigma-Aldrich) oder Dialysekammern (*Slide A Lyzer*, Pierce) gefüllt, und der Puffer ausgetauscht.

Protein Konzentrationsmessungen

Protein Konzentrationen wurden mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes [Extinktion (bei 280 nm) entspricht der Proteinkonzentration multipliziert mit der Schichtdicke der Lösung und dem molekularen Extinktionskoeffizienten] ermittelt. Mit Hilfe eines UV-Vis Spektrometers wurde die Extinktion bei 280 nm bestimmt und der molekulare Extinktionskoeffizient aus der Aminosäure Sequenz des Proteins errechnet (Addition: 5690 per Tryptophan plus 1280 per Tyrosine und 120 per Cystein; <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/ProteinCalc.html>). Er beträgt für Bax 35980 cm⁻¹ M⁻¹. Um Messfehler durch Aggregate oder DNA/RNA Verunreinigungen zu entdecken wurden immer UV Spektren zwischen 215 und 600 nm gemessen und überprüft.

Proteinverdauexperimente

Für die Verdauexperimente wurden die Endopeptidasen Subtilisin und Proteinase K verwendet. Monomeres und oligomeres Bax wurden in Eis abgekühlt und im Verhältnis 1:200 mit der Protease gemischt und eine Stunde im Eisbad inkubiert. Die Reaktion wurde mittels (1) Zugabe von Gel Ladepuffer und fünf minütigen Kochens bei 100°C oder (2) durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff mit nachfolgender Lagerung bei -80°C gestoppt. Die Proben wurden auf SDS- Gele geladen, gefärbt und ausgewertet oder nach dem Lauf auf eine PVDF-Membran geblottet, gefärbt und N-terminal sequenziert (Hauservice) oder die Probe wurde per LC-MS untersucht (Hauservice).

SDS-Polyacrylamide Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Verschiedene SDS-Gelelektrophorese Systeme wurden im Laufe dieser Arbeit genutzt. Gradienten Gele (Nu-PAGE) wurden als Fertigprodukte mit allen Puffern von Invitrogen bezogen und nach Herstellerangaben genutzt. Alle anderen SDS-Platten Gele wurden mit verschiedenen Acrylamid Konzentrationen selbst gegossen und in einem diskontinuierlichem Puffersystem bei denaturierenden Bedingungen genutzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit dem Lade-Puffer versetzt und ca. 5 min auf 99°C erhitzt. Der Lauf wurde in einem Spannungsfeld von 15-20 V/cm durchgeführt. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel in eine Coomassie Lösung für 1-3 h gefärbt (Wasser/ Methanol/ Essigsäure: 45/45/10; mit 0,1% Coomassie). Um die Banden sichtbar zu machen wurde das Gel danach in Entfärbelösung gelegt (Wasser/ Methanol/ Essigsäure: 45/45/10). Bei genügender Entfärbung wurden die Gele fotografiert. Sehr schwache Proteinbanden wurden nachträglich Silber gefärbt.

Puffer Komponenten	4 x Sammelgel-Puffer	4x Trenngel-Puffer	5x Proben-lade Puffer	10 x Laufpuffer
Tris-HCl	1,5 M; pH 8.8	0,5 M ; pH 6.8	0,5 M ; pH 6.8	0,5M
EDTA	0,5 mM	0,5 mM		
SDS	0,4% (w/v)	0,4% (w/v)	2,3% (w/v)	1%
Glyzerin			10%	
DDT			5%	
Bromphenol Blau			0,1%	
Glycine				1,9 M

Tabelle 14: Puffer für die SDS-PAGE

Gel- Komponenten	Sammelgel	10% Trenngel	13.5% Trenngel	17% Trenngel
30% Protogel (30% acrylamide, 0.8% N,N'-methylenebisacrylamide)	4,8 ml	20 ml	27 ml	34 ml
4 x Sammelgel- puffer	8 ml			
4x Trenngel- puffer		15 ml	15 ml	15 ml
Glycerol		ml	9 ml	2 ml
TEMED	15 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Ammoniumpersulfate	200 µl	400 µl	400 µl	400 µl
H ₂ O _{bidest}	16,6 ml	ml	9 ml	9 ml

Tabelle 15: Gelkomponenten der SDS-PAGE

Semi-Dry Blotting

Für immunologische Nachweise wie auch für die N-terminale Sequenzierung von Proteinen oder Proteinfragmenten wurden Proteinbanden mit Hilfe einer Semi-Dry-Blottingapparatur aus SDS-Gelelektrophoren auf PVDF-Membranen (Immobilon-P transfer membrane, Millipore) übertragen. Vor dem Blotting wurden Gel und Filterpapier (Whatmann 3 mm) 30 min in Blotpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% Methanol; die Membran kurz in 100% Methanol) äquilibriert. Danach wurden Gel und Membran zwischen drei Lagen Filterpapier auf die Kathode gelegt und die Proteinübertragung (20 V über 3 h) durchgeführt. Für die N-terminale Sequenzierung wurde der Blot mit Coomassie Puffer (Wasser/

Methanol/ Essigsäure: 45/45/10; mit 0,1% Coomassie) gefärbt, und bis zum deutlichen hervortreten der Banden entfärbt (40% Wasser/ 40% Methanol/ 20% Essigsäure).

Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde nach der Coomassie Färbung durchgeführt, dazu wurden die Gele zunächst drei mal 20 min in 50% Ethanol fixiert, danach 1 min in 200 mg Na₂S₂O₃ inkubiert und weiterhin zwei mal 1 min in Millipore Wasser gewaschen. Danach wurde das Gel für 20 min in die Silberfärbelösung gelegt (2% w/v AgNO₃; 0,0375% v/v Formaldehyd), kurz mit Wasser gewaschen und die gewünschte Färbung in der Entwicklerlösung (6% w/v NaCO₃; 0,025% v/v Formaldehyd) abgewartet. Anschließend wurde die Probe für eine Stunde in 10% Essigsäure fixiert (abgewandelte Methode nach Vorum⁽¹⁵¹⁾).

Expression und Aufreinigung von Bax in *E. coli*

Expression von Bax

Die Expression des Bax-Inteinusionsproteins und der Baxkonstrukte mit Histidintags wurde in verschiedenen Bakterienstämmen getestet. Die Expression von His₆-Bax wurde in C43 und die des Baxfusionsproteins in BL21/RIPL durchgeführt. Dazu wurden eine 3 l Zellkultur im Schüttelkolben (in TB Medium bei 37°C und ca. 180 rpm) angezogen, bis eine optische Dichte₆₀₀ von 1 erreicht wurde. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt, mit 1 mM IPTG induziert und weitere 4-6 h bei 20°C und 180 rpm inkubiert. Da das Expressionslevel von Bax niedrig war, wurde für die Zellen für einige Experimente im 10 l Maßstab fermentiert (Hauservice). Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 6000 rpm für 20 min vom Medium befreit und das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C oder bei längeren Lagerzeiten bei -80°C gelagert.

Zellaufschluss

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in Puffer C1 (für Aufreinigung mit Chitin Beads) oder Puffer NiA (Aufreinigung mit Nickel Beads) aufgeschwemmt, mittels French Press aufgeschlossen, etwa 30 min mit DNase I auf Eis inkubiert und 60 min bei 25000 rpm zentrifugiert, um das Cytosol von den Membranen und nicht aufgeschlossenen Zellen zu trennen.

Affinitätschromatographie:

Über Nickel Beads:

Für die Aufreinigung wurden 10 ml Nickelbeads (Quiagen) pro 3 Liter Zellkultur (Schüttelkolben) verwendet, in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und 5 min bei 500 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und in fünf Schritten für die Reinigung vorbereitet und äquilibriert. Jeder Schritt setzte sich aus aufschlemmen des Säulenmaterials in 40 ml Flüssigkeit, 10 min äquilibrieren in der Flüssigkeit und 5 min Zentrifugation bei 500 g zusammen. Nach dem fünften Schritt wurde auf die Zentrifugation verzichtet. Für die jeweiligen Schritte wurde 1. Milli Q Wasser; 2. Puffer NiA; 3. Puffer NiB, 4. und 5. Puffer NiA verwendet. Danach wurden Cytosol und Beads vermischt und eine Stunde im Drehrad inkubiert. Das Säulenmaterial mit dem Cytosol wurde in einen Säulenkorpus gefüllt und an die ÄKTA Basic angeschlossen und zunächst mit Puffer NiA gewaschen. Der Säulendurchlauf wurde dabei gesammelt und fraktioniert. Nach dem die Absorption bei 280 nm konstante Werte annahm wurde das Protein mit einem Linearen- oder einem Stufengradienten aus Puffer NiA und Puffer NiB eluiert.

Über Chitin Beads:

Pro Liter Zellkultur (Schüttelkolben) wurden etwa 3 ml Chitinbeads (NEB) verwendet, nach Herstellerangaben gewaschen in Puffer C2 aufgenommen und in einen leeren Säulenkorpus gefüllt. Das Cytosol wurde über die Chitinbeads gegeben, um das Baxfusionsprotein mittels seines Chitinbindedomäne an die Beads zu binden. Das durchfließende Cytosol wurde aufgefangen und der Prozess zweimal wiederholt. Darauf hin wurde die Säule mit etwa 20 Säulenvolumen Puffer C2 gewaschen, um alle ungebundenen Proteine zu entfernen, danach wurde die Säule mit drei Säulenvolumen Puffer C3 gewaschen, verschlossen und für 16 h bei 4°C inkubiert. Durch das DTT in

Puffer C3 kann das Intein im Fusionsprotein das Protein spalten. Danach können die 192 Aminosäuren von Bax ohne Tag von der Säule gewaschen werden. Durch Zugabe von 3 bis 10 Säulenvolumen Puffer C2 wird Bax eluiert, während der Rest des Fusionsproteins an die Säule gebunden bleibt. Nach dieser Affinitätschromatographie lag Bax zu etwa 90% rein vor (Abschätzung aus SDS-Gelen). Die Chitinbeads wurden nach Herstellerangaben regeneriert.

Anionen Austausch Chromatographie

Um den Reinheitsgrad von Bax zu erhöhen wurde an die Affinitäts-Chromatographie eine Anionen Austausch Chromatographie angeschlossen. Dazu wurde das Protein zunächst in einem Niedrigsalzpuffer dialysiert (His-Bax in Puffer MAN; Bax in Puffer MA). Die Chromatographie wurde mit einer MonoQ (GE Healthcare) oder einer SourceQ (GE Healthcare) Säule durchgeführt. Die Säule wurde an das ÄKTA Explorer System angeschlossen und zunächst mit fünf Säulenvolumen Puffer MA bzw. MAN, darauf mit zehn Säulenvolumen Puffer MB und schließlich mit 20 bis 30 Säulenvolumen Puffer MA bzw. MAN äquilibriert. Danach wurde die Fraktionierung des Säulenuats gestartet und das Protein auf die Säule gegeben. Nach Durchlauf des Proteins wurde erneut mit 25-35 Säulenvolumen Puffer (MAN oder MA) gespült um nicht gebundene Moleküle zu entfernen. Letztlich wurde ein linearer Gradient aus Puffer MA bzw. MAN mit Puffer MB über 8 Säulenvolumen durchgeführt.

Größenausschluss Chromatographie

Die Größenausschluss Chromatographie wurde zur Analyse des Oligomerisierungszustand und der Größe der Oligomere genutzt. Für analytische Zwecke wurden eine Superdex 75 HR 3.2/30 Säule (GE-Healthcare) oder eine Superdex 200 HR 3.2/30 Säule (GE-Healthcare) am SMART System genutzt und mit Puffer S1 mit oder ohne Detergenzien verwendet. Für präparative Zwecken wurde eine Superdex 200 (GE Healthcare) am ÄKTA-System genutzt.

Qualitative Analyse des Baxproteins

N-terminales Sequenzieren

Die N-terminale Sequenzierung wurde mittels der Edman- Degradation in einer Service Einrichtung des Hauses durchgeführt.

Bestimmung der Gesamtmasse

Die Gesamtmasse von Bax, der Punktmutanten und der Abbaufragmente wurde mittels Liquid Chromatographie Massen Spektroskopie (LC-MS) in einer Service Einrichtung des Hauses durchgeführt.

Massenbestimmung Trypsin verdauter Baxproteine

Die Massenbestimmung Trypsin verdauter Baxproteine wurde Mit Hilfe von MALDI-MS oder LC-MS in einer Service Einrichtung des Hauses durchgeführt.

Baxoligomerisierung in Detergenz und Lipid

Oligomerisierung in Detergenzien

Die Oligomerisierung in Detergenzien passiert automatisch durch die Zugabe des Detergenz. Sofern nicht anders beschrieben wurden das Baxmonomer und das Detergenz mindestens vier Stunden vor Versuchsbeginn bei 4°C vermischt und inkubiert. Sofern nicht anders beschrieben wurden Endkonzentrationen von 0.5% DM, 0.5% DDM, 2% OG, 0.6% C8E4 und 2% CHAPS verwendet.

Rekonstitution von Bax in Lipidvesikel

Lipidvesikel setzten sich, wenn nicht anders beschrieben, aus 80% Phosphatylcholin (Sigma) und 20 % Cardiolipin (Sigma) oder gekauften Lipidmischungen [*E. coli* polar Lipids (avanti polar lipids) oder

Bovine Heart Lipids (avanti polar lipids)] zusammen. Die Lipide lagen in Chloroform vor und wurden in Chloroform vermischt und im Vakuum getrocknet. Der Lipidfilm wurde durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen auf Trockeneis und vortexen in Puffer S1 oder S2 resuspendiert. Die Lipidkonzentration betrug nach dem Auflösen 20 mg/ml. Der Lipidmix wurde, je nach Versuch, durch 100 nm, 200 nm, 400 nm oder 1000 nm Membranen (Avestin) in einem MiniExtruder (Avestin) gepresst, bis die Lösung weniger trüb vorlag (mindestens 25 mal). Bax vorinkubiert in 0,1% DM wurde mit den Vesikeln und Biobeads (BioRAD) für 1-20 Stunden bei verschiedenen Temperaturen und 300 rpm vermischt. Dabei sollten die Biobeads das Detergenz binden und aus der Lösung entfernen. Die Liposomen wurden mittels eines Nycodenzgradienten gereinigt. Die Lipid-Baxmischung und eine 20%ige Nycodenzlösung in Puffer S1 wurden zu einer finalen Konzentration von 10% Nycodenz gemischt und danach mit einer 5% Nycodenz Lösung in Puffer S1 und Puffer S2 oder S1 in einem Ultrazentrifugen-Röhrchen überschichtet. Die Zentrifugation fand bei 200 000 g für 30 min und 10°C statt. Nach der Zentrifugation konnten zwei (im Falle der Rinderherzlipide drei) Fraktionen getrennt werden: 1. Ein Pellet und 2. eine schwimmende Lipidbande. Bei den Rinderherzlipiden kam eine Fettschicht auf dem Gradienten dazu. Zur weiteren Aufreinigung wurden beide Proben jeweils mit Puffer S1 oder S2 aufgefüllt und nochmals unter identischen Bedingungen zentrifugiert.

Spektroskopische und Mikroskopische Methoden

Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation wurde durch eine Service Einrichtung des Hauses durchgeführt.

Die Svedberg Gleichung: $M = RTs / D(1 - \rho v)$ und $s = v / \omega * r$

M: Masse; R: Gaskonstante; T: Temperatur; s: Sedimentationskoeffizient; D: Diffusionskoeffizient; v: partial spezifische Volumen; ρ : Dichte; r: Radius; ω : Winkelgeschwindigkeit; V: Sedimentationsgeschwindigkeit

Circular Dichroism Spektroskopie

Die gemessenen CD-Spektren und CD-Schmelzkurven wurden auf einen Jasco J715 Spektropolarimeter mit einem Jasco PFD 350S Peltier type FDCD Zubehör zur Temperatur Kontrolle oder einem Jasco 810 Spektropolarimeter gemessen. Die Proben wurden zur Messung in eine 0,1 mm Quartz Küvette gefüllt. Für Spektren wurde der Durchschnitt durch vier Spektren gebildet, bei Schmelzkurven wurde jedes Spektrum nur einmal aufgenommen. Voreinstellungen am Gerät: Data pitch 0,1 nm; Scan Geschwindigkeit 20 nm s⁻¹ und 1 nm Spaltbreite. Bax wurde wenn nicht anders angegeben in Puffer MA bei einer Konzentration von 0,08 bis 0,14 mg ml⁻¹ gemessen. Spektren wurden bei 4°C aufgenommen, Schmelzkurven zwischen 4°C und 90°C bzw. 95°C. Die sekundär Strukturanteile wurden mit Hilfe des Programms CDNN⁽¹¹⁷⁾ ermittelt.

Elektronen Mikroskopie

Für die Elektronen Mikroskopie wurden Kohle beschichtete Kupfernetze eine Minute im Plasmacleaner gereinigt, mit 5 μ l Probe für eine Minute inkubiert, dann wurde die Probe mit Filterpapier abgesaugt. Danach wurden 5 μ l 2% Uranylacetat oder 1% Ammonium Molybdat auf den Grit gegeben und nach 30 s mit dem Filterpapier abgesogen. Der Grit wurde im Anschluss am CM12 Elektronenmikroskop untersucht.

Elektronen Spin Resonanz Spektroskopie

Probenvorbereitung

Zur Probenvorbereitung wurde eine 20 μ M Lösung des gereinigten Proteins mit 200 μ M Spinlabel für 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurde das Protein gegen Puffer MA dialysiert (mindestens 1: 10000), um freies Spinlabel zu entfernen. Die Effizienz des Labelings wurde mittels LC-MS in einer Service Einrichtung des Hauses untersucht, sie war immer bei nahezu 100%.

Continuous wave EPR Experimente

Alle Messungen wurden von oder mit Dr. L Padmavati und Dr E. Bordignon in der Gruppe von Prof. Steinhoff durchgeführt. Continuous wave (cw) EPR Spektren wurden im X-Band Frequenzbereich (9,3–9,4 GHz) mit einem Magnetech Spektrometer durchgeführt. Die Proben wurden in ESR Glaskapillaren gefüllt (0,9 mm innerer Durchmesser, Probenvolumen 15 μ l). Die Spektren wurden bei

folgenden Bedingungen aufgenommen: 100 kHz Feld Modulation, Mikrowellen Leistung 2 mW, Modulationsamplitude 0,125 mT, Magnetfeldbereich 120 Gauss in 120 s. EPR Spektren für die Spin Abstandsmessungen und Bestimmungen von A_{zz} wurden bei 160 K mit einem selbstkonstruierten EPR Spektrometer mit einem AEG H103 Resonator gemessen. Das Magnetfeld wurde mit einem B-NM 12 B-Feldmeter (Bruker) gemessen. Der Durchflusskryostat Oxford ESR 900 ermöglichte eine konstante Proben temperatur. Die Mikrowellenquelle wurde auf 0,2 mW und die B-Feld Modulations Amplitude auf 0,25 mT eingestellt. Die Proben wurden in EPR Quartzkapillaren vermessen. Die Zugänglichkeit für paramagnetische Quencher wurde über die Methode der continuous wave power saturation⁽¹³⁰⁾ bestimmt. Dazu wurde ein ESR-Spektrometer mit Loop Gap Resonator verwendet. Die Mikrowellenleistung wurde dabei auf 0,1 bis 30-40 mW eingestellt. Die Probe wurde zur Messung in eine gasdurchlässige TPX Kapillare (Spintec) gefüllt. Als Referenzmessung wurde der Sauerstoff durch einen Stickstoffstrom um die Kapillare entfernt. Um die Sauerstoffzugänglichkeit zu messen wurde der Stickstoff mit einem Luftstrom (21% O₂) ersetzt. Die Zugänglichkeit für wässrige Lösungen wurde durch Zugabe von Nickel-EDDA (Nickel-EDDA; 12,5 oder 25 mM; die Ergebnisse sind für 25 mM dargestellt) zur selben Probe überprüft, wobei weiterhin ein Stickstoffstrom anlag. Vor den ESR-Experimenten wurde die Probe 20 min mit dem Stickstoffgas umflossen.

Anpassung und Auswertung der simulierten continuous wave EPR Spektren

Die Simulation von dipolar verbreiterten ESR-Pulverspektren zu den experimentell bei 160 K ermittelten wurde mit der von Steinhoff *et al.* entwickelten Methode durchgeführt⁽¹⁵²⁻¹⁵⁴⁾.

Puls-ESR-Experimente

Die DEER Daten wurden im X-Band Frequenzbereich (9,3–9,4 GHz) mit einem Bruker Eleksys 580 Spektrometer ausgestattet mit Bruker Flexline split-ring resonator ER 4118X_MS3 und Durchflusskryostat (ESR900; Oxford Instruments; Temperaturkontrollelement ITC 503S von Oxford Instruments) durchgeführt. Alle Messungen wurden als vier puls DEER Experiment: $\pi/2(v_{obs})-\tau_1-\pi(v_{obs})-t'-\pi(v_{pump})-(\tau_1+\tau_2-t')-\pi(v_{obs})-\tau_2$ -echo⁽¹⁵⁵⁾ gewonnen. Die Zeit t' war variable während τ_1 und τ_2 konstant blieben. Der Resonator wurde auf Q~100 überkoppelt. Die Pumpfrequenz (v_{pump}) ist entsprechend dem Mittelpunkt des Resonator dyps gewählt worden und stimmt mit dem Maximum des Nitroxid ESR-Spektrums überein. Die observer Frequenz (v_{obs}) ist 65 MHz höher und entspricht den Niedrigfeldmaximum des Spektrums. Alle Messungen wurden bei 50 K mit *observer* Puls Längen von 16 ns ($\pi/2$) und 32 ns (π) und 12 ns *pump* Puls Länge durchgeführt. Die Protonmodulation wurde durch Addition von elf verschiedenen τ_1 , beginnend mit $\tau_{1,0} = 200$ ns und Abstand von $\Delta\tau_1 = 8$ ns, heraus gemittelt. Einige Messungen fanden in Anwesenheit von D₂O und Glycerin oder deuteriertem Glycerin als Gefrierschutz und zur Verlangsamung der Spin Relaxation statt. Die Deuteriummodulation wurde durch Addition von acht verschiedenen τ_1 beginnend mit $\tau_{1,0} = 400$ ns und Abstand von $\Delta\tau_1 = 56$ ns gemittelt. Die gesamte Messdauer betrug 6 bis 14 Stunden pro Probe. Die Analyse der DEER Daten wurde mit der Software DeerAnalysis 2006.1 {Jeschke, 2006 #939} durchgeführt.

Raster Kraft Mikroskopie

Für die Raster Kraft Mikroskopie an Monomer, Oligomer und Megaoligomer wurde das Protein, soweit nicht anders beschrieben, direkt auf frisch gespalten Glimmer gegeben, 15 min inkubiert, danach gründlich mit Puffer MA gewaschen und gemessen. Für Proben mit Lipid wurde der frisch gespalte Glimmer zunächst 15 min mit 1 M MgCl₂ bedeckt dann mit 0.1 M Citratpuffer (100 mM NaCl; pH 6,2) oder Puffer C1 bedeckt, 30 min inkubiert, nochmals mit dem selben Puffer gewaschen und dann in den Puffertropfen das 10-50% Flüssigkeitsvolumen an Liposomen gegeben (10-20 mg/ml). Nach 60 min Inkubation wurde wiederum mit dem Puffer gewaschen und vermessen. Bei Zugabe des Proteins über die Glaszelle wurde zunächst die Glimmeroberfläche abgetastet, dann der Cantilever vorsichtig zurückgezogen (ohne den Oberflächenbereich zu verschieben). Danach wurden 5-10 μ l Protein zu den ca. 400 μ l Pufferreservoir in der Glaszelle gegeben und der Cantilever der Oberfläche wieder angenähert, um weiter abzubilden.

Tryptophan Fluoreszenz

Fluoreszenz Spektren wurden auf einem Perkin Elmer Spektrometer (LS50B) bei einer Spaltbreite von 5 nm gemessen. Bax hatte dabei eine Konzentration von 0,25 bis 1 μ M. Ac-Tryptophan hatte eine Konzentration von 4 μ M. Licht wurde bei 280 nm (Tyrosine und Tryptophane Absorption) oder 295 nm (nur Tryptophan Absorption) eingestrahlt und die Fluoreszenz zwischen 300 und 400 nm gemessen.

UV-Vis Spektroskopie

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration und gleichzeitigen Überprüfung der Abwesenheit von Proteinaggregaten, DNA oder RNA wurden Spektren zwischen 215 nm und 600 nm aufgenommen. Dazu wurde zwei Spektrometer genutzt (UV-1700 von Shimadzu mit 105.251-QS (50 µl) Küvetten oder ein NanoDrop Spektrometer). Des Weiteren wurden die Spektrometer zur Bestimmung der Zelldichte von Zellkulturen genutzt.

Kristallographische Methoden

Die Kristallisation wurde mit gereinigtem monomerem und oligomerem Bax durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde dabei auf 1- 10 mg/ml eingestellt, worauf im Falle des Baxoligomers die Detergenzkonzentration in der erwünschten Konzentration erfolgte. Für die Kristallisation wurden zahlreiche Detergenzien und Detergenzien Konzentrationen getestet. Als Methoden wurden die „hanging drop“ und die „sitting drop“ Methode verwendet. Die Kristallisation wurde bei 4°C oder bei 18°C durchgeführt. Um die Kristallbildung herbeizuführen wurden verschiedene kommerziell erhältliche Screens der Firma Hampton Research verwendet. Das Streuverhalten der gewachsenen Kristalle wurde von Iris Asen oder Martin Grinninger an den Beamlines der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble) oder der Swiss Light Source (SLS, Zurich) getestet.

Homologieuntersuchungen an Bax

Für die Untersuchungen wurde humanes Bax alpha verwendet. Viele Genomprojekte haben Bax-sequenzen oder -teilsequenzen identifiziert, aber nur in vier Organismen wurden sie als Bax alpha annotiert (Mensch (**Q07812**), Maus (**Q07813**), Ratte (**Q63690**) und Rind (**O022703**). Dazu wurden für Untersuchungen an Säugetieren, die Sequenzen von Katze (**Q8SQ43**) und Hund (**Q8HYUS**) verwendet, und aus dem Bereich der Vertebraten kamen noch Zebrafish (**Q919N4**) und Krallenfrosch (**Q98U13**) dazu, da sie keine großen Insertionen oder N-terminalen Verlängerungen aufwiesen. Untersucht man die anderen verfügbaren Baxsequenzen treten oft Insertionen oder N-terminale Verlängerungen auf, die durch die Verwendung anderer Isoformen, durch nicht entfernte Introns oder falsche Startcodon Annotation entstanden sein könnten. Betrachtet man z.B. die Baxaminosäuresequenz des Schimpansen, weist diese im Vergleich zur menschlichen Sequenz nur zwei Aminosäureaustausche, aber eine N-terminale Verlängerung von 70 Aminosäuren auf. Für den Sequenzvergleich wurde das Programm Clustal W verwendet.

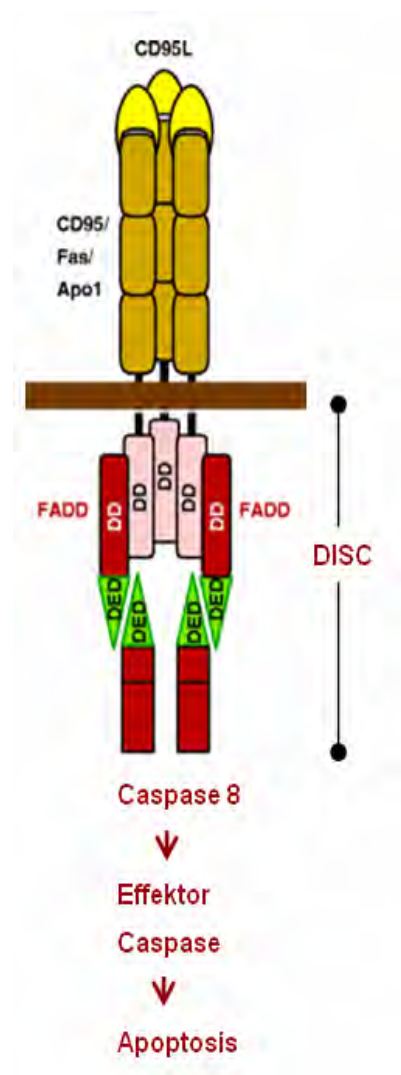
Verwendete Programme

Für Tabellenkalkulationen und Diagrammerstellung wurden die Programme: Excel und Origin 6.1 verwendet. PDB Dateien sind mittels Pymol, CCP4 und Coot bearbeitet und dargestellt worden. Die Berechnung der Sekundärstrukturanteile in der CD-Spektroskopie wurde mit CDNN durchgeführt, für die FTIR-Auswertung wurde OMNIC verwendet. Die Sequenzvergleiche wurden mit Clustal W ermittelt und die Abbildungen mittels Corel Graphics Suite 11 oder Power Point erstellt.

Anhänge:

Anhang 1: Die Initiation der Apoptose über den Rezeptor-vermittelten Signalweg (extrinsischer Signalweg) und die Funktion der Caspasen

Um gegen Angriffe auf die Gesundheit des Organismus gewappnet zu sein (durch Bakterien, Viren, Parasiten und Tumorzellen), wurde in Wirbeltieren die adaptive Immunabwehr entwickelt. Ein essentieller Teil dieses Systems sind die T-Zellen. Sie wandern im Körper umher und überprüfen den Gesundheitszustand der Zellen. Nach der Erkennung einer Infektion durch Viren oder Bakterien oder einer Transformation zur Krebszelle befiehlt die T-Zelle den programmierten Zelltod über die Rezeptor-vermittelte Apoptose^(156,157). Die wesentlichen Komponenten dieser Signalkaskade sind in Abbildung 75 dargestellt.



Aktiviert T-Zellen exponieren den so genannten Todesliganden (z.B. Fas Ligand, CD 95 Ligand) auf ihrer Oberfläche, der an bestimmte Rezeptoren (z.B. Fas-Rezeptor, CD 95 Rezeptor) auf der Zelloberfläche von erkrankten Zelle binden kann. Diese Interaktion führt zur Aktivierung und Trimerisierung des Rezeptors, woraufhin sich auf der cytosolischen Membranseite der „DISC“ (death inducing signaling complex) ausbildet. Dieser Komplex besteht aus dem Todesrezeptortrimer, dem cytosolisch gebundenen Adaptorprotein „FADD“ (Fas-associated death domain) und der Procaspase 8. Durch die Aktivierung verändert sich die DISC Konformation und Caspase 9 wird aktiv, dabei übernimmt FADD die Funktion Rezeptor und Caspase zu verbinden. Es wurden verschiedene DISC Komplexe identifiziert, die in Abbildung 75 gezeigte Domänenstruktur ist über alle bekannten DISC Komplexe konserviert⁽¹⁵⁶⁾. Die Initiatorcaspase 8 aktiviert nicht nur Effektorcaspasen, sondern auch das Bcl-2 Protein Bid, wodurch sie auch den Mitochondrien-vermittelten Signalweg einleitet

Abbildung 75: Rezeptor-vermittelte Apoptose durch Todesrezeptoren (CD 95, Fas, Apo1). DD: Death domain; DED: Death effector domain [nach⁽¹⁵⁶⁾]

Caspasen

Caspasen sind Cysteinproteasen, die als inaktive Vorläuferenzyme (Zymogene) in allen Zellen vorliegen. Sie werden spezifisch während der Apoptose durch Proteolyse aktiviert und ihre Regulation ist komplex. Nicht nur die Proteolyse, sondern auch eine Reihe von Inhibitoren (Inhibitor of Apoptotic Protein: IAP) tragen zur Regulation bei. Die IAP's können durch spezielle Proteine (z.B. Smac/DIABLO und HtrA2), die zuvor unter Mitwirkung von Bax vom Mitochondrium ins Cytosol entlassen wurden, inhibiert werden.

In *C. elegans* wurde zunächst nur eine Caspase beschrieben, im Menschen sind dagegen etwa ein Dutzend bekannt. Sie lassen sich in die beiden Untergruppen der Initiatorcaspasen und der Effektorcaspasen unterteilen. Die Initiatorcaspasen (z.B. Caspase 8 und 9) werden an Proteinkomplexen, wie den Apoptosomen oder den DISC Komplexen gebunden. Dort durchlaufen sie eine aktivierende Autoproteolyse, woraufhin sie mittels Proteolyse die Effektorcaspasen aktivieren können. Diese wirken, indem sie ein breites Spektrum von Proteinen verdauen. Die Caspaseinhibierung stellt die letzte Möglichkeit dar den Zelltod aufzuhalten.

Anhang 2: Bax abhängige Mitochondrienfragmentierung

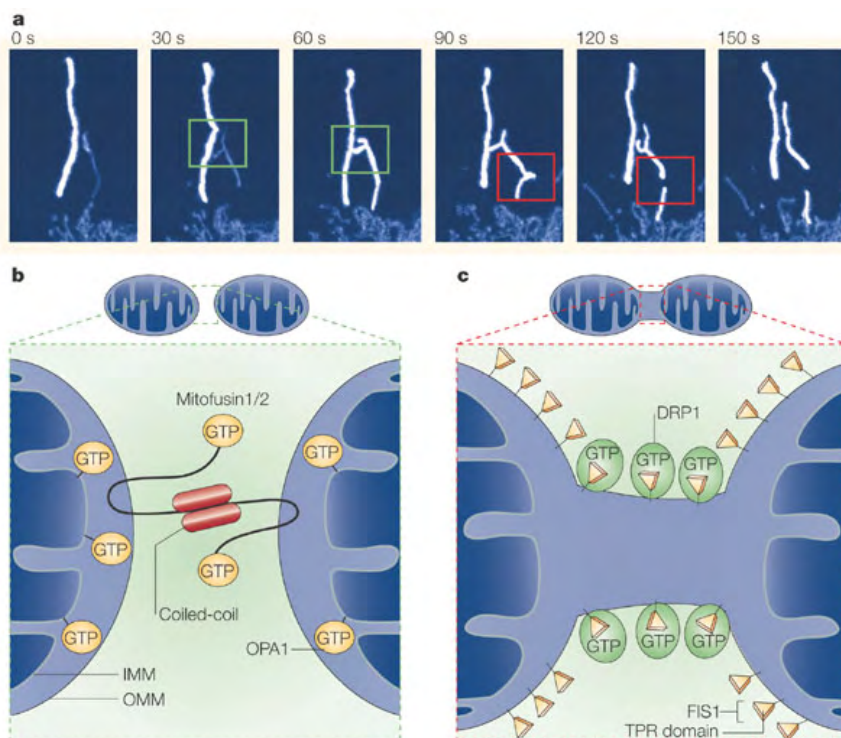


Abbildung 76: Verschmelzung und Teilungsvorgänge der Mitochondrien (Abbildung aus⁽³⁰⁾)

A: Konfokale Zeitraffer Bilder von mit photoaktiviertem GFP markierten Mitochondrien. Die grüne Box zeigt eine Mitochondrienverschmelzung und die Rote eine Mitochondrienteilung. **B und C** zeigen Schemata von Querschnitten durch fusionierende (**B**) und sich teilenden Mitochondrien (**C**), sowie einige dabei beteiligte Proteine. Es wurde postuliert, dass Mitofusindimere eine Verbindung zwischen den zur Fusionierung bestimmten mitochondrialen Tuben ausbilden. Während der Teilung interagiert Drp1 mit hFis1 bevor es zum finalen Teilungsschritt kommt.

Die morphologischen Veränderungen der Mitochondrien in der Apoptose sind für das Entlassen von proapoptotischen Faktoren ins Cytosol notwendig. Bax und Bak haben in gesunden und apoptotischen Zellen Einfluss auf die Morphologie und die Funktionalität der Mitochondrien. Sie beeinflussen vor allem das Gleichgewicht von Mitochondrienteilung und -verschmelzung. Verschmelzen die Mitochondrien nicht mehr miteinander verliert die Zelle ihre mitochondriale DNA und stirbt. Während der Initiation der Apoptose verändert sich die Konformation von Bax und Bak und damit ihr Einfluss auf die Mitochondrien. Um auf die Funktion von Bax und Bak an den Mitochondrien näher einzugehen, werden die Vorgänge während der mitochondrialen Teilung in Einschub 5 zusammengefasst.

Die Teilung der Mitochondrien, Chloroplasten, Vesikel und Bakterien erfolgt unter Mithilfe der Proteinfamilie der Dynamin GTPasen (siehe Einschub 1). Opa1 (Optic atrophy), Mfn1 und Mfn2 sind für die mitochondrialen Fusion wichtige Dynamin GTPasen und Drp1 ist in der Teilung eine relevante Dynamin GTPase⁽¹⁵⁸⁾ (siehe Abbildung 76). Einige dieser GTPasen werden auch mit Bax in Zusammenhang gebracht.

Einschub 4: Mitochondriale Teilung

Wie in Abbildung 76 gezeigt durchlaufen gesunde Mitochondrien in den meisten Zellen einen ständigen Kreislauf des sich Teilens und wieder mit einander Verschmelzens. Die Mechanismen und die Regulation dieser Vorgänge sind nur teilweise verstanden. Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien früher Eukaryoten teilen sich über verschieden kontraktile Ringsysteme an ihrer äußeren Membran⁽¹⁵⁹⁾. Die beteiligten Proteine leiten sich dabei evolutionär von den kontraktile Ringsystemen der Bakterien ab⁽¹⁶⁰⁾.

In Mitochondrien höherer Eukaryoten konnten die meisten Proteine zum Aufbau der

kontraktile Ringe nicht identifiziert werden.

In allen Teilungsmaschinen übernehmen GTPasen der Dynamin Familie die terminale Abschnürung der Mitochondrien. Einen Überblick dazu gibt Abbildung 77.

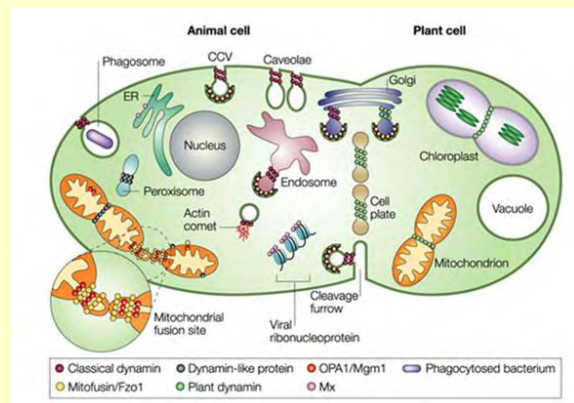


Abbildung 77: Dynamin Proteine und ihre Funktionen (aus⁽¹⁶¹⁾)

Mfn2 und Drp1 wurden zusammen mit dem aktivierten Bax an den Einschnürungsbereichen auf der Mitochondrienoberfläche gefunden (siehe Abbildung 8 Einleitung), an denen sich das Mitochondrium teilen wird oder geteilt hat⁽¹⁶²⁾. Es besteht also ein Zusammenhang zwischen Bax, den mitochondrialen Dynaminen und den Teilungs- und Fusionsmechanismus. Die Baxaktivierung braucht außerdem Bif1 (Endophilin B1), ein Protein das sowohl im Cytosol als auch am Mitochondrium identifiziert wurde und dem eine Interaktion mit Drp1 zugeschrieben wird^(30,47). Das Hefe Homolog von Drp1 kann Spiralen von ca. 100 nm

Durchmesser bilden, deren Größe zur Größe der mitochondrialen Einschnürungen vor dem terminalen Teilungsschritt passt ⁽¹⁶³⁾. Die Teilung der Mitochondrien wird vermutlich von Drp1 abgeschlossen.

Die Funktion von Drp 1 und bekannte Wechselwirkungen zu Bcl-2 Proteinen :

In *C. elegans* wird die mitochondriale Fragmentierung durch die Lageveränderung des cytosolischen Drp1 ans Mitochondrium ausgelöst. Der Komplex aus den Bcl-2 Proteinen CED 9 (ein Bcl-2 Protein mit pro- und antiapoptotischen Wirkungen) und Egl1 (ein BH3-only Protein), der während der Apoptose Initiation am Mitochondrium ausgebildet wird, rekrutiert dabei das (bis dahin cytosolische) Drp1, worauf die Mitochondrien zerfallen und die Zelle stirbt ⁽¹⁶⁴⁾. In Hefezellen und wahrscheinlich auch Säugerzellen findet die Drp1 Verankerung über hFis1, ein Protein der äußeren Mitochondrienmembran statt ⁽³⁰⁾. Drp1 ist wie Bax kein ausschließliches Membranprotein, sondern liegt zum größten Teil durch Phosphorylierung inaktiviert im Cytosol vor. Es wurde aber auch am ER und einigen an das Cytoskelett gebundenen Vesikeln identifiziert ⁽¹⁶⁵⁾. Durch Ca^{2+} Ionen wird Drp1 aktiviert ⁽¹⁶⁶⁾ und kann an hFis1 binden.

In gesunden Zellen gibt es einen Drp1 Kreislauf zwischen Cytosol und Mitochondrienmembran. In apoptotischen Zellen wird Drp1 sumoiliert und bleibt danach dauerhaft in der äußeren Mitochondrienmembran. Diese Verankerung ist unabhängig von hFis1 hängt aber von der Aktivierung von Bax bzw. Bak ab ⁽¹⁶⁷⁾. Die Deletion von Drp1 oder hFis1 führt zu einer erniedrigten Apoptoserate nach proapoptotischen Stimuli. Die Überexpression von Drp1 erhöht die Apoptosesensibilität oder führt zum Zelltod ⁽³⁰⁾.

Wechselwirkungen von Bax und Bak und den Mitofusinen, sowie dessen Funktion:

Bax und Bak sind in gesunden Zellen notwendig, um Mfn2 in bestimmten Loci auf der Oberfläche der äußeren Mitochondrienmembran zu halten. Verliert Mfn2 die fokussierte Lokalisation durch Unterdrückung der Bax/Bak oder der Mfn2 Expression, finden keine normalen Verschmelzungsreaktionen mehr statt und die Mitochondrien liegen fragmentiert vor ⁽¹⁵⁸⁾. Es ist noch nicht geklärt, ob die Konformationsänderungen von Bax und Bak zu einer veränderten Interaktion mit Mfn2 und zur verstärkten Mitochondrienteilung in der Apoptose führen oder es einen weiteren noch unbekanntem Mechanismus gibt. Die Erhöhung der mitochondrialen Teilungsrate oder die Blockierung der Fusion führt langfristig immer zu einem Verlust der mitochondrialen DNA und damit in jedem Fall in den Zelltod ⁽¹⁶⁸⁻¹⁷³⁾. Die Überexpression von Mfn1 oder 2 erniedrigt die Apoptoserate nach proapoptotischen Stimuli. Die Deletion von Mfn1 und 2 bewirkt eine Erhöhung der Apoptosesensibilität oder führt direkt zum Zelltod ⁽³⁰⁾.

Anhang 3: Apoptose Regulation am Endoplasmatischen Retikulum (ER)

Bcl-2 Proteine bauen auch in die ER Membran ein. Ihre Funktion dort ist aber nicht voll verstanden. Da mutiertes Bcl-2, das nur noch in ER Membranen einbauen kann, Bax immer noch inaktiviert^(174,175), scheint die ER Funktion nicht die Arretierung und Inaktivierung von Bcl-2 Proteinen zu bewirken. Das ER hat viele Funktionen. Im Zusammenhang mit den Bcl-2 Proteinen und der Apoptose stehen (a) die Faltung von sekretorischen Proteinen und (b) die Ca^{2+} Speicherfunktion.

Wechselwirkungen der Bcl-2 Proteine mit der Protein Faltung:

In Stresssituationen in der Zelle kann es zu missgefalteten Proteinen im ER kommen. Die Zelle reagiert darauf mit der „UPS“ (unfolded protein response) oder der „EOR“ (ER overload response). Diese führen zu einem Stoppsignal im Metabolismus, während dessen die ungefalteten Proteine aus dem ER abgebaut bzw. gefaltet werden oder die Apoptose mittels der BH3-only Proteine aktiviert werden kann⁽³³⁾. Mäuse ohne Bax und Bax Gene zeigen auch Störungen in der UPS⁽¹⁷⁶⁾.

Einschub 5: Ca^{2+} -Homöostase in der Zelle

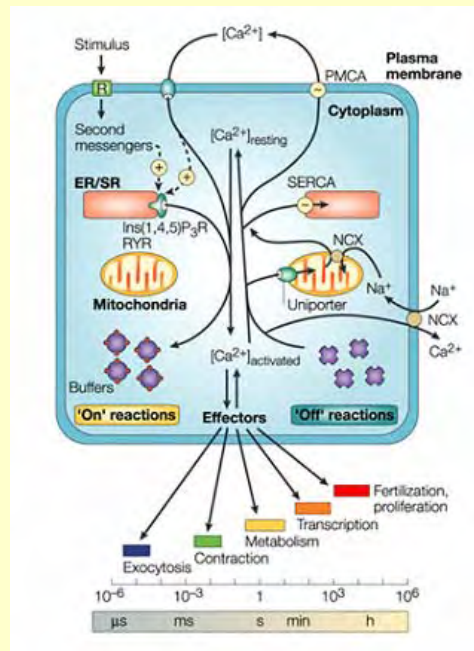


Abbildung 78: Ca^{2+} Flüsse und Signalwege der Zelle [aus⁽¹⁷⁷⁾]

Ca^{2+} ist ein „second messenger“. Erhöhte Konzentrationen im Cytoplasma oder in den

Mitochondrien können je nach Zellart und Situation Signalmolekülexozytose, Muskelkontraktion, verstärkten Metabolismus, veränderte Transkription und sowohl Zelltod als auch Zellteilung hervorrufen⁽¹⁷⁷⁾. Ein Überblick wird in Abbildung 76 gegeben. Das ER bildet wie die Mitochondrien ein tubuläres Netzwerk in der Zelle aus^(17,178). Teile von ihm liegen dabei nahe an den Mitochondrien, andere nahe am Kern oder der Plasmamembran. Dies macht einen schnellen Informationsfluss zwischen den Organellen möglich. Um die Zellen gesund zu erhalten ist eine exakte Regulation der Ca^{2+} Flüsse notwendig. Ca^{2+} wird durch zahlreiche Proteine gebunden und es reguliert ihre Aktivität, daher müssen freie Ca^{2+} schnell aus dem Cytoplasma entfernt werden. Hierzu pumpen ATPasen (SERCA; PMCA;), Antiporter (NCX) oder Uniporter die freie Ca^{2+} Ionen in ER, Mitochondrien oder die extrazelluläre Matrix (siehe Abbildung 76). Zusätzlich können die Ionen mit Hilfe von Ca^{2+} Bindeproteinen im Cytoplasma inaktiviert werden⁽¹⁷⁷⁾.

Wechselwirkungen der Bcl-2 Proteine mit der Ca^{2+} Ionen Homöostase:

Veränderungen in den Ca^{2+} Flüssen der Zelle können einen Apoptosemechanismus am ER aktivieren. Die Ca^{2+} Ionen Flüsse in gesunden Zellen sind in Einschub 5 kurz vorgestellt. ER und Mitochondrien haben beide eine Ca^{2+} Speicherfunktion. In gesunden Zellen ohne apoptotischen Stimulus verlässt etwas Ca^{2+} in Leckströmen das ER. An so genannten Mikrodomänen zwischen ER und Mitochondrien kann es direkt zum nahe liegenden Mitochondrium geleitet werden sonst fließt es ins Cytosol. Nach Ca^{2+} Aufnahme erhöht das Mitochondrium die ATP Produktion ^(15,17,68). Letztlich fließt das Ca^{2+} zum ER zurück ^(68,179,180). Erhöhen sich die Ca^{2+} Flüsse aus dem ER deutlich (z.B. durch einen proapoptotischen Reiz), kann das Mitochondrium zuviel Ca^{2+} aufnehmen und „überladen“ werden. Dies kann zur Öffnung der PTP führen und toxisch wirken ^(68,180-183). Auch eine verstärkte Annäherung von ER und Mitochondrium führt in Anwesenheit von proapoptotischen Reizen zu einer Ca^{2+} Überladung des Mitochondriums ⁽¹⁵⁾.

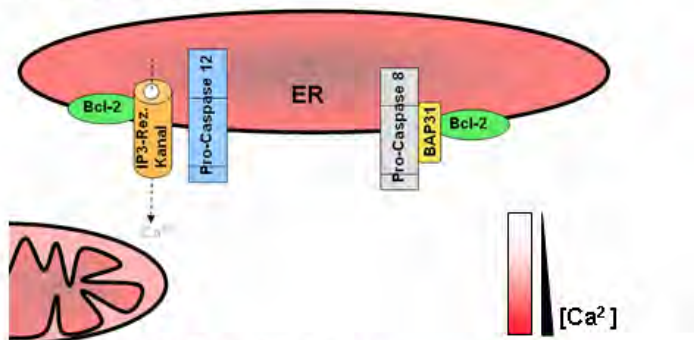
Zwei Rezeptoren regulieren die Ca^{2+} Flüsse aus dem ER: (1) das Membranpotenzial und Ca^{2+} abhängige Rhyandodium Rezeptor und (2) der Inositol Trisphosphat (IP_3) und Ca^{2+} abhängige IP_3 -Rezeptor ^(184,185). Der IP_3 -Rezeptor ist für die Ca^{2+} Konzentrations-änderungen in der Signaltransduktion und dem Zelltod wichtig ^(186,187). Er wird von IP_3 und geringen Ca^{2+} Konzentrationen im Cytosol aktiviert und liegt bei hoher Ca^{2+} Konzentration sowie der Anwesenheit von Calmodulin inhibiert vor. Es gibt also eine Ca^{2+} abhängige Autoregulation des Rezeptors. Er ist in Mikrodomänen nah am Mitochondrium angereicht, wodurch das Ca^{2+} direkt an die äußere Mitochondrienmembran weiter gegeben werden kann ^(17,188) und mit Hilfe vom VDAC und einem Uniporter in die Matrix transportiert wird ^(179,189).

Die Einflüsse der Bcl-2 Proteine auf die Ca^{2+} -Homöostase sind nicht voll verstanden stellen sich aber momentan wie folgt da:

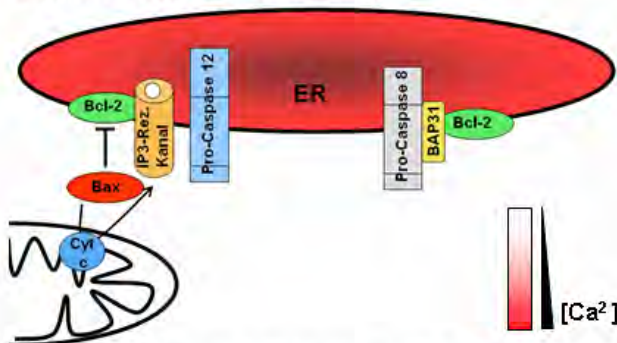
Bcl-2 Proteine können mit dem IP_3 Rezeptor interagieren und dadurch die Ca^{2+} Flüsse beeinflussen ^(190,191). Die antiapoptotischen Proteine Bcl-xL und Bcl-2 kommen in gesunden und apoptotischen Zellen in der ER Membran vor. Dort binden sie an den IP_3 -Rezeptor und erhöhen seine Sensibilität für Ca^{2+} und IP_3 ⁽¹⁹⁰⁾. Diese Sensibilisierung tritt besonders in Zellen ohne Bax und Bak auf ⁽¹⁹¹⁾. Die resultierenden Ca^{2+} Leckströme vom ER werden vom Mitochondrium aufgenommen. Dadurch ist die Ca^{2+} Konzentration im ER niedrig (gezeigt in Abbildung 79A) und es kommt zu einer ständigen Stimulierung der ATPase Produktion im Mitochondrium ⁽³⁵⁾. In gesunden Zellen verhindern die antiapoptotische Bcl-2 Proteine also eine hohe Ca^{2+} Konzentration im ER und die hohe Ca^{2+} Konzentration in den Mitochondrien bewirkt, dass viel Ca^{2+} dazu kommen muss, um den Schwellenwert zur Auslösung der Apoptose zu überschreiten. Kommt es nun zu einem proapoptotischen Reiz kann nur wenig Ca^{2+} aus dem ER freigesetzt werden, damit ist die Wahrscheinlichkeit die Apoptose

auszulösen niedrig (siehe Abbildung 79A).

A. Gesunde Zelle:



B: Zelle nach Bax Aktivierung:



C: Zelle nach zusätzlichem proapoptotischen Reiz:

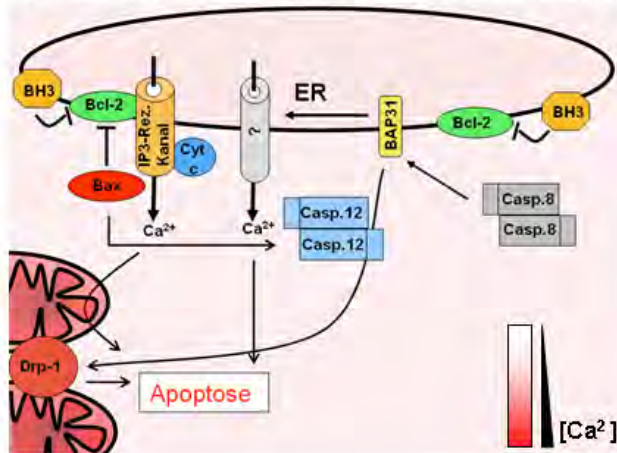


Abbildung 79: Einflüsse von pro- und antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen am ER im Verlauf der Apoptoseinitiation

A: Situation in der gesunden Zelle; **B:** Eine Zelle nach der Baxaktivierung ; **C:** Eine Zelle nach einem zusätzlichem proapoptotischen Reiz. Die Farbintensität der Farbe Rot in Cytosol und Organellen soll die Ca^{2+} Konzentration symbolisieren. Nähere Erklärungen im Text.

Die Aktivierung von Bax und Bak stört am ER die Interaktion von Bcl-2 und dem IP3 Rezeptor ⁽¹⁹⁰⁾ und am Mitochondrium bewirkt sie das Entlassen des Cytochrom c's. Die Sensitivität vom IP₃-Rezeptor für IP₃ und Ca²⁺ verändert sich und die Ca²⁺ Leckströme versiegen. Damit wird die Ca²⁺ Konzentration im ER erhöht und die Mitochondrien erhalten weniger Ca²⁺. Wodurch ihr Schwellenwert die Apoptose auszulösen absinkt (siehe Abbildung 79B). Kommt es nun zu einem zusätzlichem proapoptotischen Reiz wird viel Ca²⁺ aus dem ER entlassen und es kann zu einer Ca²⁺ Überladung der Mitochondrien kommen, an der die

Zelle stirbt. Ein solcher proapoptotischer Stimulus kann die Bindung des zuvor durch Bax ins Cytoplasma entlassenen Cytochrom c an den IP3-Rezeptor sein, da Cytochrom c die Ca^{2+} Autoregulation des Rezeptors unterdrückt ⁽¹⁹²⁾ (siehe Abbildung 79C).

Zusätzlich aktiviert Ca^{2+} die Protease Calpain, zu deren Substraten die proapoptotischen Proteine Bax, Bid und Procaspase 12 gehören ⁽¹⁹³⁾, wodurch die Apoptose forciert wird.

Das Ca^{2+} kann auch Drp1 aktivieren und die Mitochondrienfragmentierung auslösen (gezeigt in Abbildung 79).

Bcl-2 Proteine regulieren BAP 31

Bcl-xL und Bcl-2 binden am ER auch BAP 31 und blockieren seine Aktivierung ⁽¹⁹⁴⁾ (siehe Abbildung 79). BAP 31 ist ein Membranprotein des ER, dass durch eine Komplexbildung mit einer Isoform von Procaspase 8 (Procaspase 8L) an einer DISC unabhängigen Caspase-aktivierung beteiligt ist. Caspase 8 kann BAP 31 schneiden und damit seine proapoptotische Wirkung verstärken. Es folgt eine Ca^{2+} Abgabe vom ER ins Cytosol und zu den Mitochondrien, diese Fragmentierung und entlassen das Cytochrom c ⁽¹⁹⁵⁾.

Anhang 4: Strukturuntersuchungen an Bax in An- und Abwesenheit von DTT

CD-Spektren von monomeren und oligomeren Bax (WT) mit und ohne Vorinkubation in DTT wurden zum Vergleich der Sekundärstrukturen unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt (siehe Abbildung 80B). Zusätzlich wurden Spektren einer Cystein-freien Baxmutante gemessen, um zu überprüfen, ob die Cysteine wichtig für die Faltung oder die Konformationsänderung von Bax sind. Es zeigten sich jedoch keine deutlichen Unterschiede in den CD- Spektren (siehe Abbildung 80).

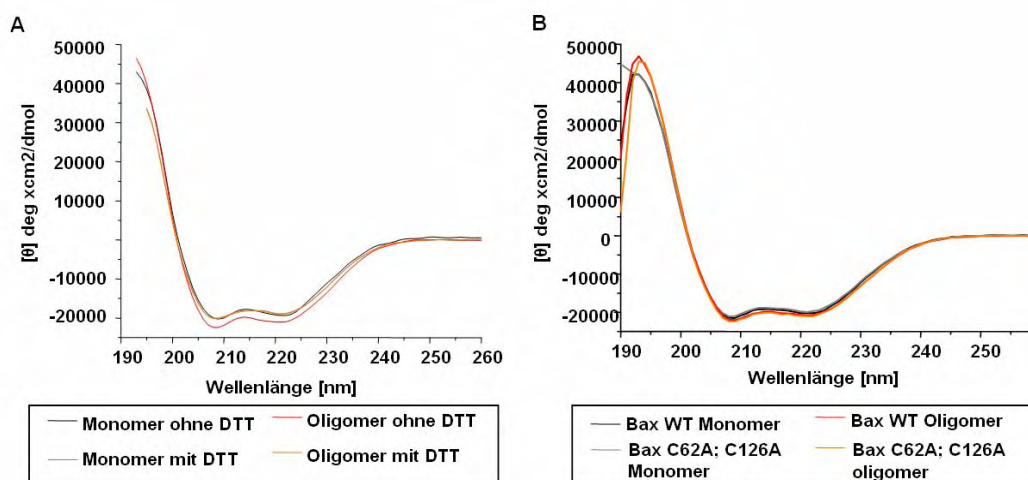


Abbildung 80: CD-Spektren von Bax zur Identifikation von Disulfidbrücken

A: Messung von Bax mit und ohne Vorinkubation in DTT; B: Messungen am WT Protein und einer Cystein-freien Mutante

Zur Analyse der Tertiär- und Quartärstruktur wurden ebenfalls Messungen durchgeführt. Subtilisinverdaus bei verschiedenen Temperaturen (siehe Abbildung 81B) sowie Experimente mittels Größenausschlusschromatographie und nativen Gelen (an Bax WT und der Cystein-freien Mutante; Daten nicht gezeigt) zeigten keine deutlichen Unterschiede. Schmelzkurven zum Vergleich der Stabilität von Bax in An- und Abwesenheit des Antioxidanz zeigten allerdings bei über 70°C leichte Unterschiede im Entfalten des monomeren Bax (siehe Abbildung 81A). Insgesamt zeigten die Experimente keine Hinweise zu Cysteinbrückenbildungen im Temperaturbereich unter 70°C.

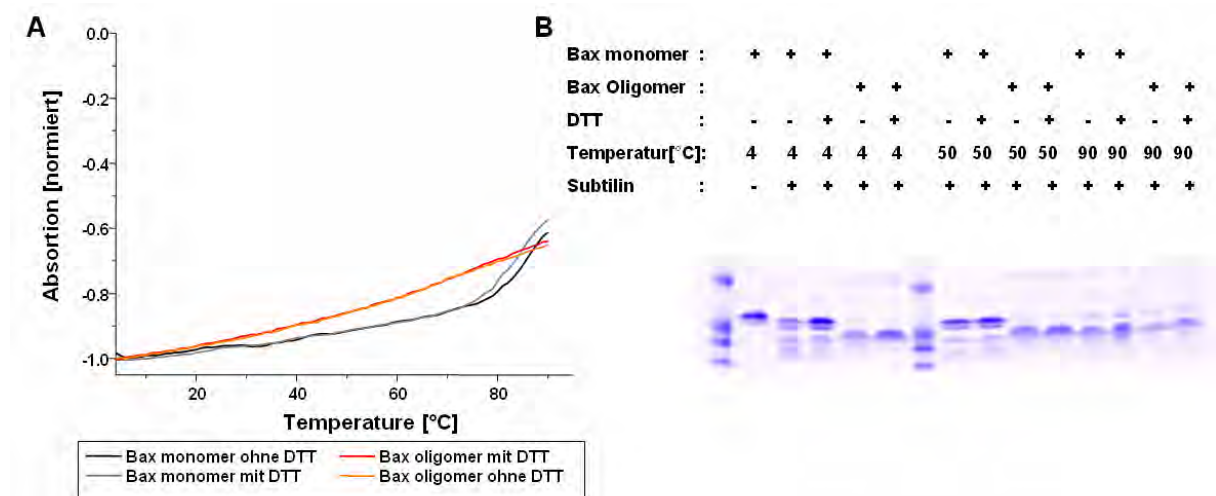


Abbildung 81: Vergleich der Proteineigenschaften von Bax in an und Abwesenheit von DTT
A: CD-Schmelzkurven von Bax aus Reinigungen mit und ohne DTT; B: Subtilisinverdaus von Bax bei verschiedenen Temperaturen mit und ohne DTT

Anhang 5: Theoretischer Hintergrund der ESR-Spektroskopie und Darstellung der Puls-ESR zwei Puls-ESEEM und DEER-Daten

In der an Bax durchgeführten Elektronen Spin Resonanz Spektroskopie wurde das Spinlabel MTS (Methanethiosulfonate) verwendet (siehe Abbildung 82A). Das freie Elektron befindet sich dort im 2 p Molekülorbital zwischen dem Sauerstoff und dem Stickstoff. Der Spin des freien Elektrons kann dabei von lokalen Dipolmomenten der Umgebung sowie dem Kernspin beeinflusst werden. Somit sind die ESR-Spektren verschieden, je nachdem ob das Label in ein wässriges Lösungsmittel oder in eine Lipidschicht reicht oder von Aminosäuren umgeben ist. Ein Elektron kann zwei mögliche Spinzustände einnehmen: $m_s = -1/2$ und $m_s = +1/2$. Wenn Elektronen Energie in ihrem Resonanzbereich zugeführt wird, können sie in den höher energetischen Zustand übergehen. Dieser Übergang kann im EPR Spektrometer detektiert werden (siehe Abbildung 82B). Die Interaktion mit dem Stickstoffkernspin bewirkt eine weitere Energieaufspaltung der möglichen Spinzustände (Hyperfeinkopplung), wie sie in Abbildung 82C oben gezeigt ist. Die ESR-Spektren des Spinlabels (frei oder an Proteine

gebunden) zeigen dementsprechend drei Peaks (siehe Abbildung 82D).

Continuous wave ESR

Raumtemperatur X-Band Spektren geben Informationen zur Dynamik des Spinlabels und des Proteinrückgrads an dessen Position wieder. Ein dem Lösungsmittel zugewandtes Spinlabel in einer Loop Position kann sich, ähnlich einem freien Spinlabel, uneingeschränkt bewegen. Wenn das Label im Inneren des Proteins vorliegt entstehen sterische Behinderungen, die die Beweglichkeit einschränken. Diese Unterschiede können im X-Band Frequenzbereich bei 9,7 GHz detektiert werden.

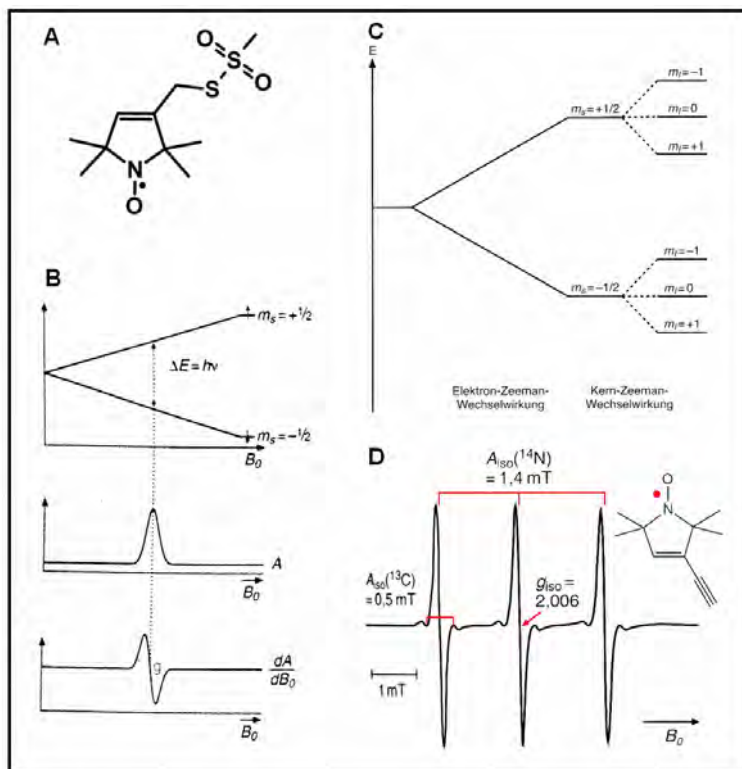


Abbildung 82: ESR-Spinlabel und Spektren

A: Freies Spinlabel [gezeigt: MTS Spinlabel]; **B:** Elektronensplittung ohne Hyperfeinsplittung (oben) und daraus gemessene Absorption (Mitte) und dessen erste Ableitung (unten, EPR Output); **C:** Elektronensplittung mit Hyperfeinsplittung; **D:** Raumtemperatur X-Band Spektrum des freien Spinlabels.

Beispiele für ein bewegliches und ein unbewegliches Label sind in Abbildung 83 A gezeigt. Je stärker die Mobilität des Spinlabels eingeschränkt wird, desto breiter ist der Abstand zwischen Minima und Maxima des Mittelpeaks im Spektrum (ΔH_0 ; Abbildung 83).

EPR Experimente können in verschiedenen Frequenz- und Temperaturbereichen aufgenommen werden. Dabei können auch die Tensorelemente g_{xx} , g_{yy} , g_{zz} und A_{xx} , A_{yy} , A_{zz} ermittelt werden, die in Raumtemperatur X-Band Messungen nicht aufgelöst werden können (siehe Abbildung 82D). Der g-Wert (auch Landé Faktor genannt; $g = 2,0023$) der bei freien Elektronen im Vakuum konstant ist, wird im Protein durch die Einflüsse der Umgebung des

Elektrons charakteristisch verschoben. Dasselbe gilt für die Hyperfeinkopplungskonstanten $[A_{xx}, A_{yy}, A_{zz}]$. Die Hyperfeinkopplungskonstante $[A_{zz}]$ gibt Aufschluss über die Polarität der direkten Umgebung des Spinlabels. Um A_{zz} ermitteln zu können, muss die Beweglichkeit des Spinlabels durch Einfrieren (auf 160 K) eingeschränkt werden. Ein X-Band Spektrum aus dem A_{zz} bestimmt werden kann, ist in Abbildung 82D dargestellt. Je kleiner A_{zz} desto unpolarer die Umgebung des freien Elektrons. Eine unpolare Umgebung spricht für die Insertion in die Membran oder eine Lage tief im Proteinkern.

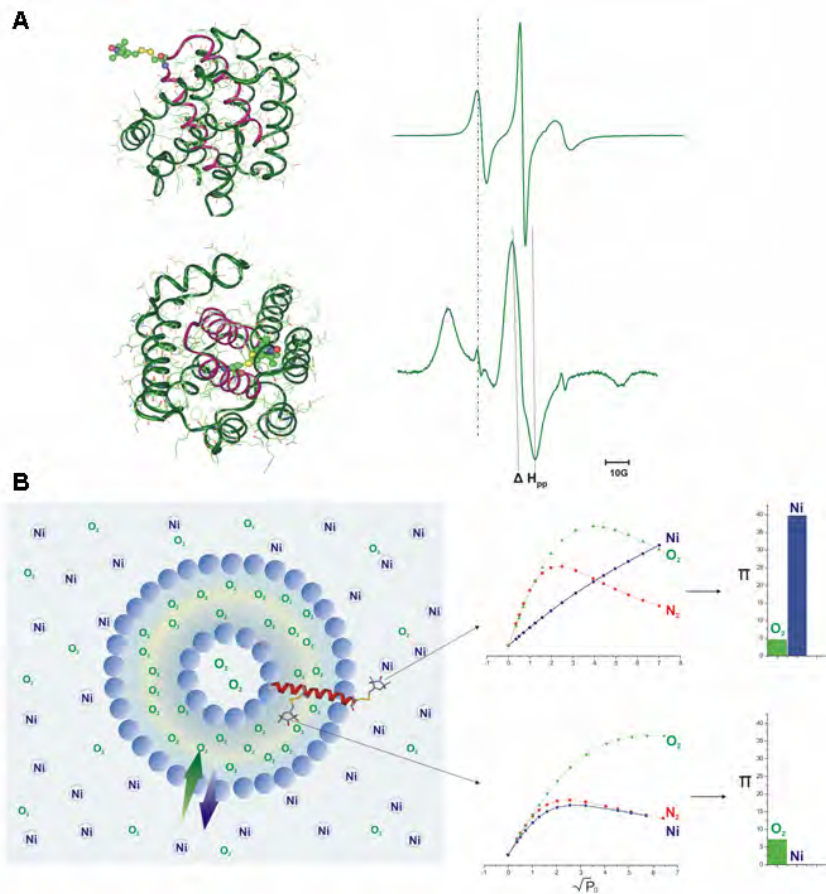


Abbildung 83: Elektronen Spin Resonanz Spektroskopie

A: Raumtemperatur X-Band ESR-Spektren bei exponiertem, sehr mobilem Spinlabel (oben) bzw. eines rigiden Spinlabels innerhalb des Proteins. B: Zugänglichkeitsmessungen in Lipid. Je nach Lage des Labels innerhalb des Proteins oder innerhalb der Lipidschicht verändert sich der Einfluss quencherender Reagenzien auf den Spin

Zusätzlich kann die Zugänglichkeit des Spinlabels für paramagnetische Quencher bestimmt werden. Kollisionen mit paramagnetischen Substanzen können den Spinübergang des Labels beeinflussen und quenchen (siehe Abbildung 83 B). Solche Substanzen sind Nickel-EDDA und Sauerstoff. Beide Quencher haben unterschiedliche Eigenschaften und können damit Informationen zur Position des Spinlabels geben, wie in Abbildung 83 B gezeigt ist. Nickel-EDDA ist hydrophil und kann daher nur Spinübergänge von Labels quenchen, die zum Puffer orientiert sind, in das Proteininnere oder die Lipidschicht diffundiert es nicht. Sauerstoff kann auch nicht in den Kern eines Proteins diffundieren, aber er kommt in der

wässrigen und in der Lipidphase vor. Misst man die Zugänglichkeit des Spinlabels für beide Substanzen gewinnt man Informationen zu seiner Umgebung.

Puls-ESR

Zwischen zwei paramagnetischen Zentren in einem Protein oder einem Proteinkomplex können die Abstände mit Hilfe von ESR-Methoden bestimmt werden. Je nach Größe des Abstands kann dies mittels *continuous wave* oder Puls-ESR geschehen. Abstände von 0,8 bis 2 nm können durch die Linienverbreiterung in 160 K *continuous wave* Spektren ermittelt werden, Abstände von 2-7 nm aus Puls-ESR-Techniken.

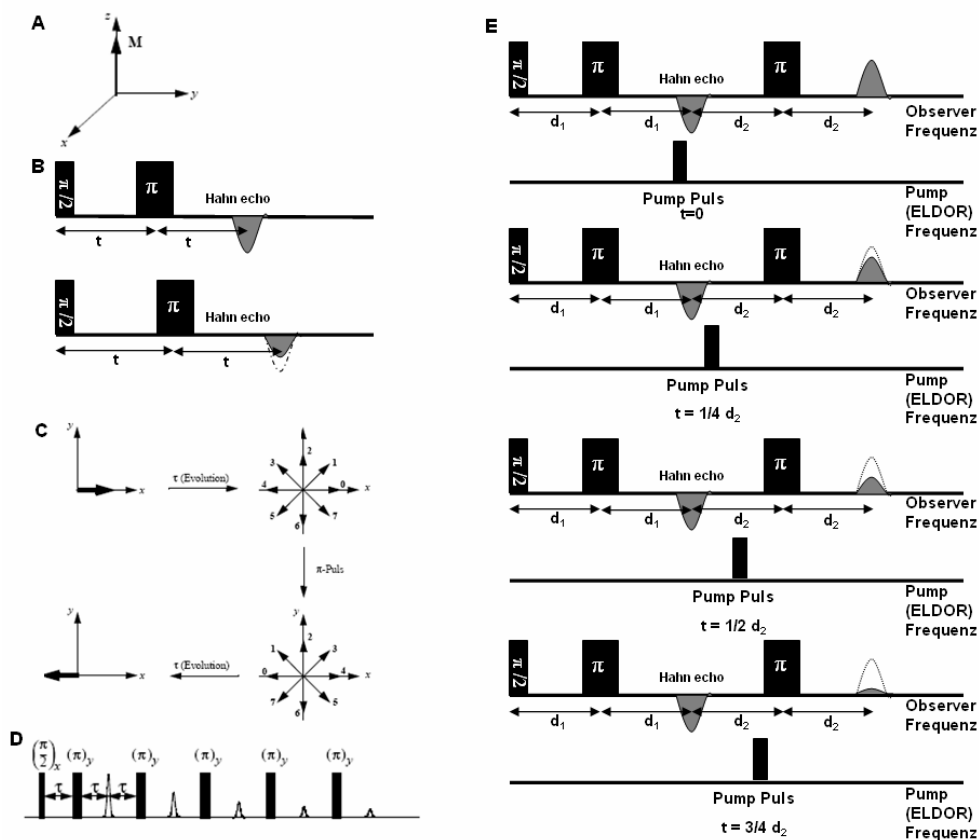


Abbildung 84: Sequenzen für Puls-ESR-Experimente (teilweise entnommen aus ^(196,197))

A: Vor der Anregung im Magnetfeld ist die Magnetisierung (M) der Spins im Magnetfeld in z Richtung ausgerichtet. **B:** Erzeugung eines Hahnechos nach zwei Pulsen, die die Magnetisierung der Spins in x Richtung klappten. Die Intensität des Echos ist von t abhängig. **C:** Zerfall und Fokussierung der Nettomagnetisierung der Spinpakete des Experiments aus **B**. **D:** Veränderungen der Intensität des Echos nach mehreren Pulsen durch Spin Relaxation. **E:** Pulssequenz des vier Puls DEER mit Veränderungen des zweiten Echos nach Pump Puls zu verschiedenen Zeitpunkten "

Bei der Puls-ESR wirkt ein kontinuierliches Magnetfeld aber kein kontinuierliches Mikrowellenfeld auf die Probe, sondern es werden Mikrowellen Pulse eingestrahlt. Die Probe wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in den vorgekühlten (50 K) Resonator gegeben. An diesen wird ein Magnetfeld B_0 in z -Richtung angelegt. Es bewirkt, dass die ungepaarten Elektronen sich parallel oder antiparallel zu diesem Feld anordnen ($m_s = -1/2$ und $m_s = +1/2$). Da die parallel angeordneten Elektronen einen niedrigeren Energiezustand haben,

liegen die meisten in diesem Zustand vor. Vor der Anregung durch die Mikrowellenpulse liegen die Spins in der Magnetisierung M parallel zu B_0 vor (siehe Abbildung 84A). Gibt man jetzt einen Mikrowellenpuls ($\pi/2$, siehe Abbildung 84A) mit einer Magnetfeldkomponente in x -Richtung auf die Probe, klappen die Elektronen in x Richtung um, was detektiert werden kann. Nach Ende des Mikrowellenpulses läuft die Phase der Elektronenspins auseinander (siehe Abbildung 84C). Gibt man nach einer Zeit t einen π Puls (siehe Abbildung 84B) klappen die Elektronen um 180° . Dadurch laufen nach einer weiteren Zeit t die Phasen der Spinpakete wieder zusammen und ein so genanntes Hahn Echo Signal entsteht. Die Pulssequenz die zur Entstehung des Echos führt ist in Abbildung 84B gezeigt. Man kann nun π Puls und Echo wiederholen, das Signal wird jedoch jedes Mal schwächer (siehe Abbildung 84D), weil ein Teil der Elektronen relaxiert (d.h. Energie an die Umgebung abgibt), den Phasenbezug zueinander verliert und so nicht mehr synchronisiert werden kann. Je mehr H_2O Moleküle in der Umgebung des ungepaarten Elektrons sind, desto schneller relaxiert das Echo.

Im zwei Puls ESEEM (*Electron Spin Echo Envelope Modulation*) Experiment (siehe Abbildung 84B) wird die Zeit t zwischen $\pi/2$ und π -Puls verändert. Je größer t wird desto mehr nimmt die Intensität des Echos aufgrund der Relaxation ab. Bei größerer Relaxationszeit der Proteinmutante kann auch d_2 im DEER (*Double Electron Electron Resonance*) Experiment entsprechend groß gewählt werden. Bei einer größeren Zeit d_2 wird das DEER Signal länger aufgenommen (Abbildung 10E) und größere Abstände können bestimmt werden. Zwei Puls ESEEM Spektren von Bax sind in Abbildung 85A gezeigt.

Um Aufschluss über die Distanzen zwischen zwei ungepaarten Elektronen zu bekommen wird im DEER Experiment die Echomodulierung untersucht, die durch die Wechselwirkungen der freien Elektronen im System entsteht. Aus dem DEER Signal (für Baxproben in Abbildung 85B gezeigt) kann die Distanz dann berechnet werden. Das Experiment ist in Abbildung 84E gezeigt. d_1 ist dabei festgelegt, während d_2 abhängig von t aus dem vorher durchgeführten zwei Puls ESEEM Experiment gewählt wird. Beim DEER Experiment werden Mikrowellenpulse mit unterschiedlichen Frequenzen eingestrahlt: *observer* Pulse (in der Frequenz eines Nebenmaximas des *continuous wave* Spektrums der Probe) und *pump* Pulse (in der Frequenz eines Hauptmaximas des *continuous wave* Spektrums der Probe). Beide regen somit verschiedene Spinpakete in der Probe an. Wenn die angeregten Spins beider Frequenzen nah genug zusammenkommen um miteinander Wechsel zu wirken, kommt es zu einer Modulation des Echos. Diese Modulation hat eine Frequenz aus der die Distanz zwischen den Spins abgeleitet werden kann. Bei zu großen Spindistanzen nimmt das Echosignal ab ohne dass es zu einer Signalmodulation kommt (die Modulation ist in Abbildung 85B sichtbar). Die roten und schwarzen Spektren zeigen modulierte Echoabnahmen, während die blauen Spektren das Signal ohne Spininteraktion zeigen.

Rohdaten der Puls-ESR-Messungen

Die Rohdaten der Puls-ESR-Messungen sind in Abbildung 85 gezeigt.

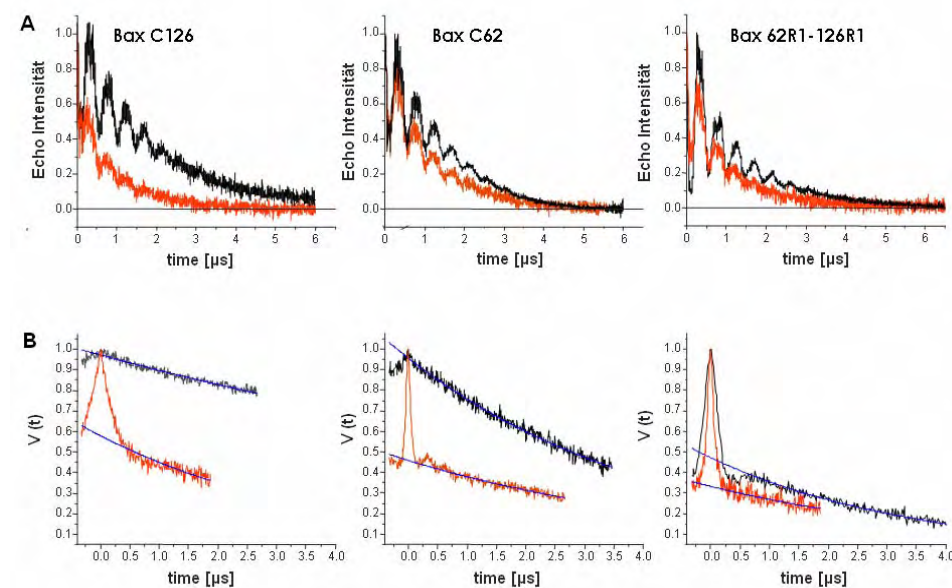


Abbildung 85: Zwei Puls ESEEM Signale und DEER Signale von Bax WT, Bax C62 und Bax C126
A: Zwei Puls ESEEM Signale. B. DEER Signale. Die Spektren des Monomers sind in schwarz gezeigt, die des Oligomers in Detergenz (DDM) in rot. Die blauen Spektren zeigen wie das Echo ohne Spininteraktion abnehmen würde.

Anhang 6: Vergleich vom Bax WT Protein zu den Cysteinmutanten

Für die EPR Spektroskopie wurden Baxmutanten mit nur einem Cystein, sowie eine Cystein-freie Mutante kloniert. Die Orte der Mutationen sind in Bezug auf die Sekundärstruktur in Abbildung 86 gezeigt und die ermittelten Proteineigenschaften werden Tabelle 16, Tabelle 17 und Abbildung 87 vorgestellt.



Abbildung 86: Sekundärstruktur von Box mit Positionen der Punktmutationen

Die Mutation von jeweils einem der beiden nativen Cysteine veränderte die Eigenschaften von Bax kaum. Das Protein blieb weitgehend Protease stabil, ließ sich weiterhin oligomerisieren, hatte eine vergleichbare Tryptophanfluoreszenz wie das WT Protein und auch die Schmelzkurven veränderten sich nur wenig (siehe Tabelle 17 und Abbildung 88 und Abbildung 87). Tauschte man beide Cysteine gegen Alanine aus wurde das Protein instabiler gegenüber der Proteaseverunreinigung. SDS-Gele und LC-MS Daten zeigen, dass nach nur einem Tag nach der Reinigung mittels des Anionenaustauschers, bereits etwa 20% des Proteins die 16 C-terminalen Aminosäuren verloren hat (siehe Abbildung 88).

Name	C62	C126	Neues Cystein	Kloniert	Gereinigt	As176-192	gelabelt
Bax WT	+	+	-	+	+	stabil	+
Bax C126	A	+	-	+	+	stabil	+
Bax C62	+	A	-	+	+	stabil	+
Bax CF	A	A	-	+	+	instabil	-
Bax C24	A	A	A24C	+	-		
Bax C110	A	A	V110C	+	+	instabil	
Bax C118	A	A	S118C	+	+	Instabil	n. zug.**
Bax C135	A	A	T135C	+	-		
Bax C150	A	A	L150C	+	-		
Bax C175	A	A	I175C	.*	-		
Bax C178	A	A	A178C	+	-		

Tabelle 16: Klonierte Cysteinmutanten von Bax (n. zug.- Cystein nicht zugänglich für MTSSL)**

Das Protein ohne Cystein wurde daraufhin zügig per CD-Spektroskopie, Tryptophan-floureszenz und Crosslink Experimenten untersucht und zeigte dabei vergleichbare Ergebnisse zum WT Protein (siehe Tabelle 17). Es oligomerisierte noch normal nachdem schon über 50% des Proteins verkürzt vorlagen (Parallel mittels LC-MS überprüft). Die geringere Proteasestabilität könnte durch eine erhöhte Backboneflexibilität erklärt werden.

Name	Max. Trp.	Floureszenz		CD-Spek.	Ant.α-Helix	Gelfiltr.	Elution	Vernetzungsverhalten	
	Mono.	Oligo. in DDM	in	Mono.	Oligo. in DDM	Mono.	Oligo. in DDM	Oligo. in DDM	In
Bax WT	336 nm	328 nm		60%	64%	1.71 ml	1.28 ml		+
Bax C62	334 nm	328 nm		60%	65%	1.72 ml	1.29 ml		+
Bax C126	334 nm	327 nm		60%	65%	1.71 ml	1.36 ml		+
Bax CF	338 nm	328 nm		58%	64%	1.71 ml*	1.29 ml*		+

Tabelle 17: Eigenschaften der gereinigten Cysteinmutanten *das für die Gelfiltration verwendete Bax CF war zu mindestens 50% C-terminal um 16 Aminosäuren verkürzt.

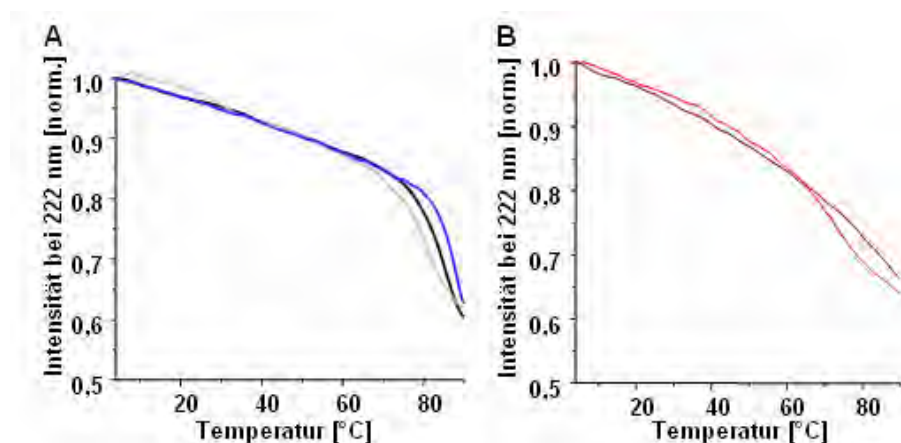


Abbildung 87: Schmelzkurven von Bax WT sowie Bax C126 und Bax C62.

A: Schmelzerhalten des Monomers; Schwarz: Bax WT; Grau: Bax C126; Lila: Bax C62; B. Schmelzerhalten des Oligomers [DDM]; Rot: Bax WT; Orange: Bax C126; Braun: Bax C62; Rot und Orange nahezu Deckungsgleich.

Die Einführung weiterer zusätzlicher Cysteine verringerte die die Proteasestabilität weiter, sodass kein Volllänge Protein nach der Reinigung für ESR-Messungen vorlag. Diese wurde

daher nicht durchgeführt. Außerdem hatte Bax C118 ein Cystein im Proteinkern, das nicht erfolgreich gelabelt werden konnte.

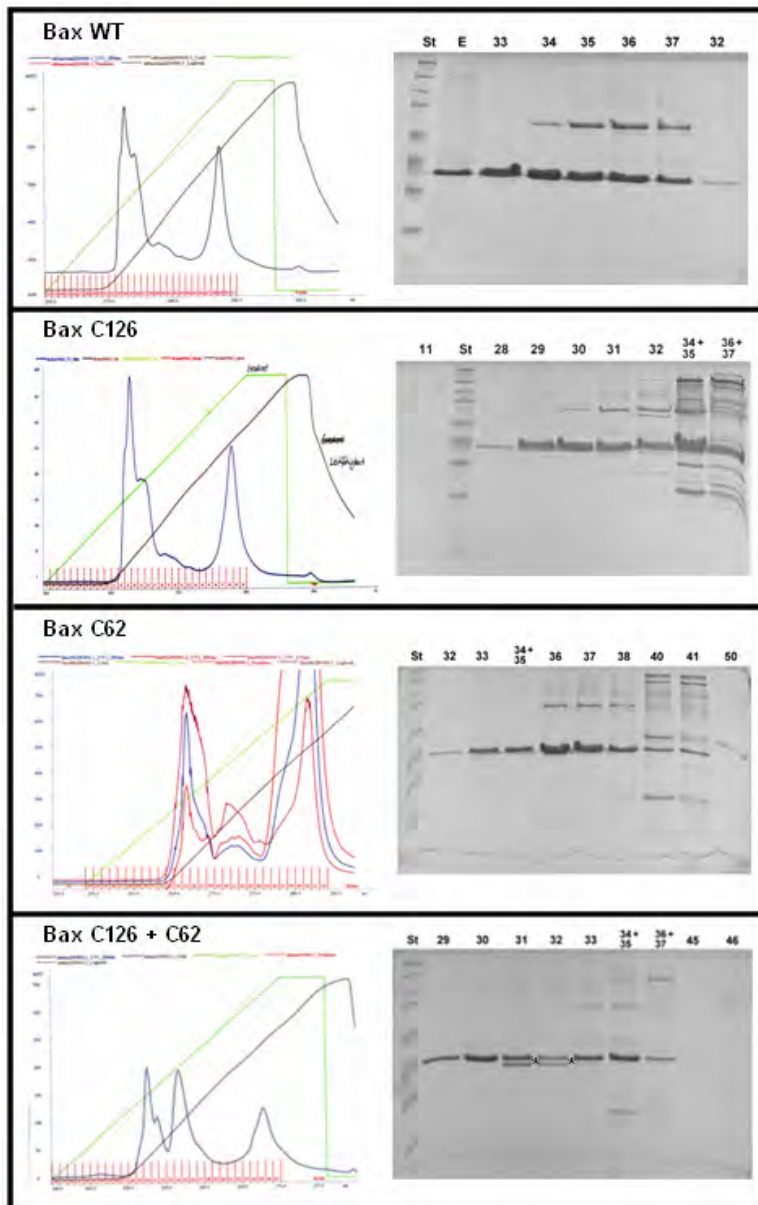


Abbildung 88: Dokumentation der Mutantenreinigung
 Links: Elutionsprofil des Anionenaustauschlaufes; Rechts: 17% SDS-Gel der Elutionsfraktionen;
 * Bax 1-176

Anhang 7: Lokale Biotinbindung an Bax

Darstellung der lokalen Biotinbindung an monomeren und oligomeren Bax aus drei Experimenten. Die Daten stimmen mit den Aussagen aus Kapitel 6 überein. Das Monomer ist immer in schwarz oder grau dargestellt, das Oligomer in rot oder orange. Die Messungen können anhand der Form der Messpunkte (Rechteck; gezeigt, Stern und Kreis) unterschieden werden.

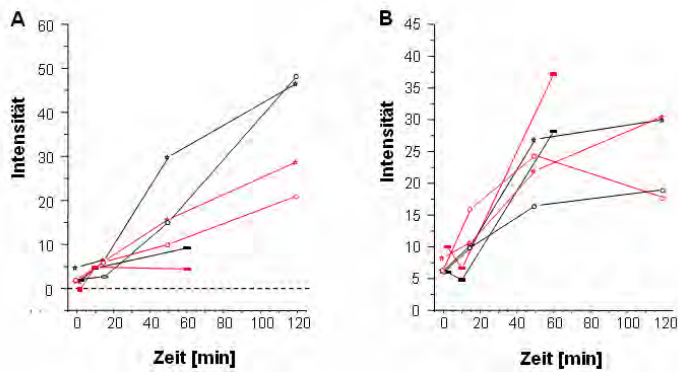


Abbildung 89: Biotinbindung an N-Terminus und K21

A: Biotinbindung an den N-Terminus (Zunahme Peptid 1-9 mit 1x Biotin); **B:** Biotinbindung an K21 (Zunahme Peptid 10-34 mit 1x Biotin). Die Peakintensität des untersuchten Peptids wurde durch 1/100 der Peakintensität des Peptids 135-145 (ohne Biotinbindemöglichkeit) aus derselben Probe dividiert. Dargestellt sind Monomer (schwarz) und Oligomer (rot) aus drei Messungen (Rechtecke, Sterne und Kreise).

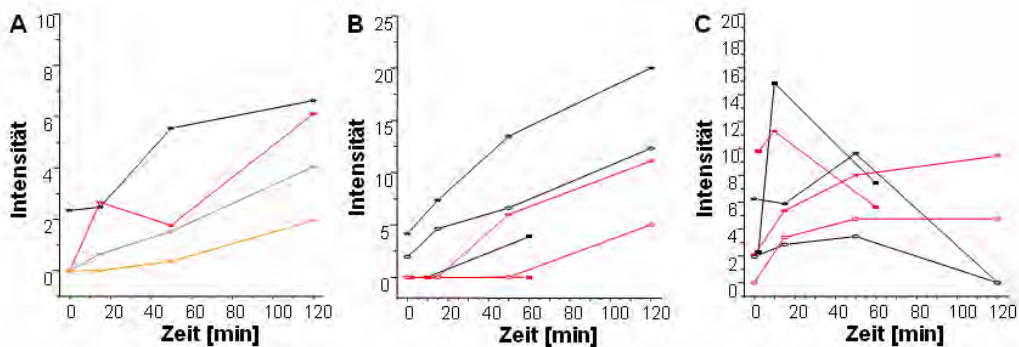


Abbildung 90: Biotinbindung an K57, K58 und K64

A: Biotinbindung an K57, K58 und K64 (Zunahme Peptid 38-65 mit 2 bzw. 3x Biotin); **B:** Biotinbindung an K58 und K64 (Zunahme Peptid 58-65 mit zwei Biotinen); **C:** Biotinbindung an K58 und K64 (Zunahme Peptid 58-65 mit einem Biotin). Die Peakintensität des untersuchten Peptids wurden wie in Abbildung 42 errechnet, und auch dieselbe Legende verwendet. In A sind die Peptide mit zwei Biotinen in Schwarz und rot und die drei Biotinen in grau und orange dargestellt.

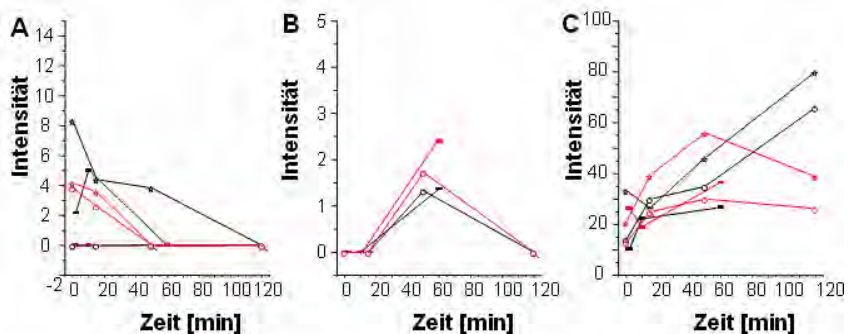


Abbildung 91: Biotinbindung an K119, K123 und K128

A: Biotinbindung an K119 (Abnahme Peptid 110-119 ohne Biotin); **B:** Biotinbindung an K123 und K128 (anhand Peptid 120-134 mit zwei Biotinen); **C:** Biotinbindung an K128 (Anhand Peptid 124-134 mit einem Biotin). Die Peakintensität des untersuchten Peptids wurden wie in Abbildung 42 errechnet, und auch dieselbe Legende verwendet.

Anhang 8: Vergleich vom Bax (WT)-Protein zu den Mutanten der Proteinvernetzungsexperimente

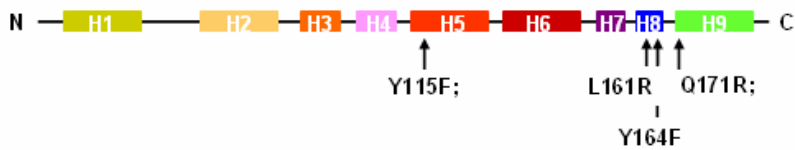


Abbildung 92: Sekundärstruktur von Bax mit den Positionen der Punktmutationen

Für die Untersuchung der Interaktionsbereiche der Monomere im Oligomer wurden verschiedene Mutanten kloniert, gereinigt und vernetzt. Der Ort der Mutation in Bezug auf die Sekundärstruktur von Bax wird in Abbildung 92 gezeigt und ihre Eigenschaften in Tabelle 18, Tabelle 19 und Abbildung 93 vorgestellt.

Name	Y115	Y164	Zusätzliche Mutation	Kloniert	Gereinigt	As176-192	Cross link
Bax WT	+	+	-	+	+	stabil	normal
Bax Q171R	+	+	Q171R	+	+	stabil	normal
Bax L161R	+	+	L161R	+	Kein Protein exprimiert	-	-
Bax QRYF	+	F	Q171R	+	+	stabil	normal

Tabelle 18: Klonierte Cross link Mutanten von Bax

Die Baxmutante L161R ließ sich klonieren, nach Induktion der Genexpression starben die Zellen jedoch ab, sodass kein Protein untersucht werden konnte. Proteine mit den Aminosäureaustauschen Q171R und Y164F konnten gereinigt werden, die Mutationen veränderten die Eigenschaften des Proteins kaum: Sie oligomerisierten normal und zeigten biophysikalische Eigenschaften vergleichbar zum WT (siehe Tabelle 19). Nur das Schmelzverhalten wich leicht von dem des WT Proteins ab (siehe Abbildung 93).

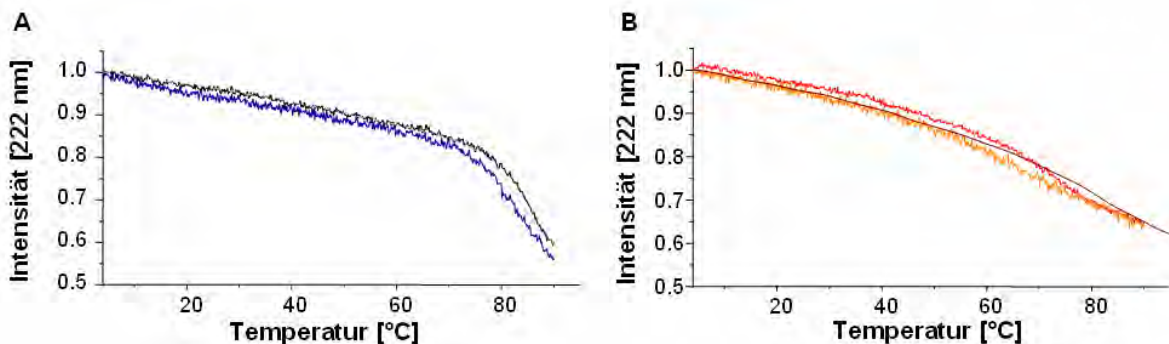


Abbildung 93: Schmelzkurven von Bax WT sowie Bax Q171R und Bax QRYT.

A: Schmelzerhalten des Monomers; Schwarz: Bax WT; blau: Bax Q171R; Grau: Bax QRYF; B: Schmelzerhalten des Oligomers [DDM]; Rot: Bax WT; Orange: Bax C126; Braun: Bax C62; Rot und Orange nahezu Deckungsgleich.

Name	Max. Trp.	Fluoreszenz	CD-Spek.	Ant.α-Helix	Gelfiltr.	Elution	Cross link Verhalten Oligomer In DDM
	Monomer	Oligo.mer in DDM	Monomer	Oligomer in DDM	Monomer	Oligomer in DDM	
Bax WT	336 nm	328 nm	60%	64%	1.71 ml	1.15 ml	+
Bax Q171R	335 nm	328 nm	60%	65%	1.71	1.20 ml	+
Bax QRYF	n.d.	n.d.	60%	65%	1.70	1.17	+

Tabelle 19: Eigenschaften der Mutanten (n.d. bedeutet Experiment nicht durchgeführt)

Anhang 9: Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy; AFM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM):

Mit der Rasterkraftmikroskopie (AFM) können Proteine in Lösung und damit in einer relativ nativen Umgebung untersucht werden. Allerdings muss die Probe zur Abbildung an einer Oberfläche haften. In dieser Arbeit wurde frisch gespaltener Glimmer verwendet (negativ geladene Oberfläche). Beim Abbilden im AFM wird die Probe von einem Cantilever mit feiner Spitze abgerastert. Der Hersteller gibt den Radius der Spitze mit unter 20 nm an. Die Auslenkung des Cantivers wird mit Hilfe eines Lasers und einem Quadrantendetektor gemessen (siehe Abbildung 94A). Die Messungen in dieser Arbeit wurden im „tapping mode“ durchgeführt. Hierbei wird der Cantilever zu Schwingungen angeregt. Beim Kontakt mit der Probe wird die Amplitude gedämpft. Während des Scannens wird über einen Feedbackloop die Tappingamplitude, durch nachregeln der Probenhalterhöhe (z-Piezo) konstant gehalten. Die Auslenkung in z-Richtung ergibt für jeden x-y Punkt die Probenhöhe und damit direkt die Topographie der Probe.

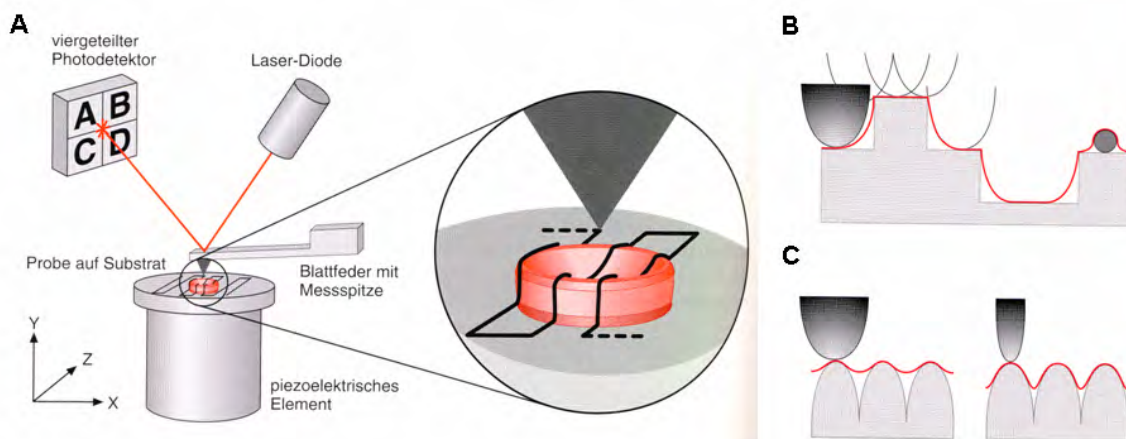


Abbildung 94: Rasterkraftmikroskopie

A: Vereinfachter Messaufbau; B und C : Überlagerungseffekte zwischen Spitze und Probe die zu Verfälschungen in der Oberflächen Topographie führen [nach⁽¹¹⁶⁾].

Die Abbildung eines Objekts ist stark von der Spitzenform und der Probenpräparation abhängig. Eine runde Spitze kann wie in Abbildung 94B gezeigt keine scharfen Kanten abbilden. Wenn die abzubildenden Objekte kleiner sind als die Spitze, wird nur die Höhe des

Objekts korrekt wieder gegeben, während in x-y Richtung die Form der Spitze widergespiegelt wird. Liegen die Objekte sehr dicht zusammen, stabilisieren sie sich gegenseitig, und die Auflösung in x-y Richtung wird verbessert. Die Höhengauflösung wird dabei aber ungenau, da die Spitze zwischen den Molekülen nicht genug Platz hat, um die Oberfläche zu erreichen (siehe Abbildung 94C).

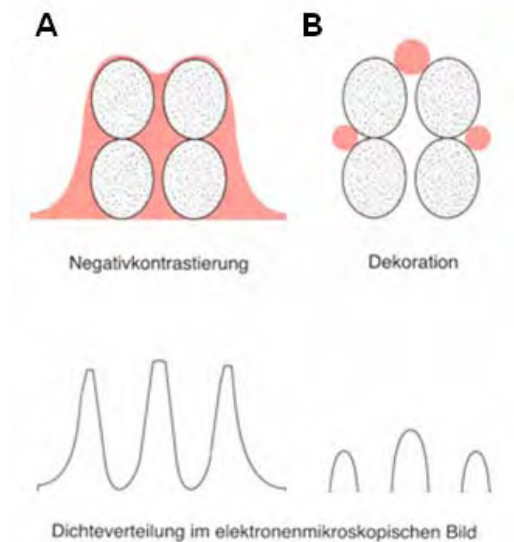


Abbildung 95: Verwendete Methoden zur Kontrastierung von Bax in der Transmissionselektronenmikroskopie [nach⁽¹¹⁶⁾]

Bax ist ein kleines Molekül, wodurch die Spitze leicht einen größeren Durchmesser als das Protein hat. Zunächst wurden daher eng bepackte Proben untersucht um einen Überblick über die Homogenität des Proteins zu gewinnen. Dann wurden verdünnte Proben mit einzeln liegenden Proteinen für Auswertung und Statistik verwendet.

Mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) können Objekte mittels Elektronen im Nanometerbereich abgebildet werden, dazu müssen die zu untersuchenden Objekte sehr dünn sein. Die Elektronenmikroskopie findet im Vakuum statt, daher müssen die Messobjekte stabilisiert oder kontrastiert werden, um nicht zu denaturieren oder Artefakte zu bilden. Im Falle von Bax wurde das Protein auf einen Kohlefilm aufgebracht und mit Negativkontrastierung oder Dekoration mit Goldpartikeln auf die Messung vorbereitet (siehe Abbildung 95).

Bei der Negativkontrastierung wird das Protein von einer Schwermetalllösung umhüllt und vorhandene Hohlräume damit gefüllt. Kommt die getrocknete Probe ins Vakuum bleibt nur die getrocknete Schwermetallhülle übrig. Das biologische Material wird bei der Prozedur meist denaturiert. Die Schwermetallhülle streut die Elektronen und ist relativ strahlungsresistent. Besonders dicht sind Hohlräumebereiche und die Umrandungen des ursprünglichen biologischen Objekts (siehe Abbildung 95A). Ein Problem dieser Methode sind Färbeartefakte, da der Film unterschiedlich abtrocknen und das Protein während der Präparation denaturieren kann. Außerdem kann es auch zu Reaktionen zwischen den

färbenden Ionen und Pufferbestandteilen kommen, die zu Artefakten auf der Oberfläche führen.

Bei der Dekorierung mit Goldpartikeln wurden diese zunächst kovalent an das native Protein gebunden. Die Probe wurde gereinigt und wie bei der Negativkontrastierung auf den Kohlefilm aufgebracht. Die Goldpartikel bleiben auf der Oberfläche liegen, auch wenn das Protein denaturiert. Zur Verbesserung der Darstellung wurde das Labeling teilweise mit einer gering kontrastierenden Schwermetallfärbung verbunden.

Anhang 10: Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

AFM	-	<i>atomic force microscopy</i>
ANT	-	<i>adenosin nucleotid translocator</i>
ATP	-	Adenosintriphosphat
Bak	-	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
Bax	-	<i>Bcl-2 associated x protein</i>
Bcl-2	-	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BH3	-	Bcl-2 Homologie Domäne
(t)Bid	-	<i>(truncated) BH3 interacting domain death agonist</i>
Ca ²⁺	-	Caliumionen
CHAPS	-	<i>Cholamidopropyltrimethylammoniopropanesulfonate</i>
CD	-	<i>Circular dichroismus</i>
<i>C. elegans</i>	-	<i>Caenorhabditis elegans</i>
DDM	-	<i>dodecyl maltoside</i>
DM	-	<i>decyl maltoside</i>
Drp	-	<i>dynamamin like protein</i>
<i>E. coli</i>	-	<i>Escherichia coli</i>
EDDA	-	<i>Ethylenediaminediaceticacid</i>
ER	-	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	-	<i>Electrospray ionization mass spectrometry</i>
FTIR	-	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
ESR	-	Elektronenspinresonanz
LC-MS	-	<i>Liquid chromatography mass spectrometry</i>
MALDI	-	<i>Matrix assisted laser desorption/ionization</i>
Mfn	-	<i>Mitofusion</i>
MTSSL	-	Methanethiosulfonatespinlabel
OG	-	<i>Octyl glucoside</i>
PTP	-	<i>permeability transition pore</i>
SDS-PAGE	-	Sodiumdodecylsulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TEM	-	Transmissionselektronenmikroskop
TM	-	Transmembrane (bezogen auf $\alpha 9$)
T-Zellen	-	Thymuslymphozyten
VDAC	-	<i>voltage dependent anion channel</i>
WT	-	Wildtyp

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name **Stephanie Wiebke Bleicken**
Geburtsdatum 17/03/ 1977 in Buchholz
Nationalität deutsch
Familienstand verheiratet

Promotion

Zeitraum Seit 01/11/2003
Titel der Arbeit Strukturelle Untersuchungen der Konformationsänderungen im proapoptotischen Protein Bax und der räumlichen Anordnung des membranständigen Baxoligomers

Ort MPI für Biochemie
Am Klopferspitz 18
82152 Martinsried

Studium

Zeitraum 01/10/1997 - 31/06/2003
Abschluss Diplombiologin
Thema / Zeitraum der Diplomarbeit Struktur- und Funktionsbeziehungen des Glukosetransporters EII^{Glc} aus Escherichia coli K-12")
01/09/2002 - 01/07/2003

Ort Universität Osnabrück

Schulbildung

Zeitraum 01/08/1993 - 30/07/1997
Abschluss Abitur
Ort Lohmühlen Gymnasium Hamburg

Zeitraum 01/08/1983 - 30/07/1993
Abschluss Realschulabschluss
Ort Grund- und Realschule Hanstedt

Danksagung

Es ist mir ein Anliegen, allen zu danken, die mir in den vergangenen Jahren halfen diese Arbeit fertigzustellen, besonders liegen mir dabei die am Herzen, denen ich am Herzen lag.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Oesterhelt, der mir die Gelegenheit gab, diese Arbeit in seiner Abteilung anzufangen und fertigzustellen, sowie Dr. Zeth, der das Projekt erdachte, begleitete und seine Finanzierung ermöglichte.

Ebenso möchte ich Prof. Steinhoff, Dr. Padmavathi und Dr. Bordignon für die angenehme und erfolgreiche Kooperation danken.

Um der Struktur des oligomeren Bax nachzuspüren brauchte es viele verschiedene Methoden. Um den Umgang mit ihnen zu lernen, hatte ich zu meinem Glück viel Hilfe. Ich danke herzlich Lissy, die mir CD- und Fluoreszenzspektrometer erklärte und ohne deren Masseanalysen Teile meiner Arbeit so nicht möglich gewesen wären, sowie Mirjam und Guckus, die mir halfen die Tücken des AFM zu verstehen und manche meiner Lücken im Verständnis der Physik zu füllen. Ich danke Günther, der mir den Umgang mit dem TEM erklärte und immer half wenn mein Wissen um den praktischen Umgang mit diesem Gerät an seine Grenzen stieß. Ebenso danke ich Reini für das N-terminale Sequenzieren, Siggie für die MALDI-Messungen, Julia für die Erklärungen rund ums ESR und Birgit B. für die Einführung in die Blue-Nativ-Gelelektrophorese.

Ich möchte mich auch bei meinen Kollegen in der Abteilung Oe bedanken mit denen es viel Spaß gemacht hat zusammen zu arbeiten und mit denen ich vielen gute, hilfreiche Diskussionen hatte. Besonders danke ich dem X-tal Laborteam: Iris, Kiki, Martin, Petra, Reinhard, Thomas und Ursel sowie meinen Praktikanten Anne und Heinrich für die gute und konstruktive Zusammenarbeit. Sehr dankbar bin ich auch Martin, Birgit, Reinhard und Iris für die vielen fachlichen Diskussionen, Hilfe, Tipps und konstruktiven Kritiken im praktischen und schriftlichen Teil der Arbeit.

Zum Ende dieser Arbeit gilt mein herzlichster Dank denen, die mich inspiriert, getragen, geschoben, gebremst, hinterfragt und vor allem geliebt haben: meinem Mann, meiner Familie, meinen Freunden.

Referenzen

1. Suzuki M, Youle R J & Tjandra N. (2000). Structure of Bax: Coregulation of Dimer Formation and Intracellular Localization. *Cell* **103**, 645-654.
2. Annis M G, Soucie E L, Dlugosz P J, Cruz-Aguado J A, Penn L Z, Leber B & Andrews D W. (2005). Bax forms multispansing monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *The EMBO journal* **24**, 2096-2103.
3. Garcia-Saez a J, Coraiola M, Serra M D, Mingarro I, Muller P & Salgado J. (2006). Peptides corresponding to helices 5 and 6 of Bax can independently form large lipid pores. *The FEBS journal* **273**, 971-981.
4. Thompson C B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462.
5. Lindsten T, Ross a J, King A, Zong W X, Rathmell J C, Shiels H A, Ulrich E, Waymire K G, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng V M, Adelman D M, Simon M C, Ma A, Golden J A, Evan G, Korsmeyer S J, Macgregor G R & Thompson C B. (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Molecular Cell* **6**, 1389-1399.
6. Eninger a L & Thompson C B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology* **16**, 663-669.
7. Kerr J F. (1995). Neglected opportunities in apoptosis research. *Trends in Cell Biology* **5**, 55-57.
8. Kerr J F, Wyllie a H & Currie a R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* **26**, 239-257.
9. Sulston J E & Horvitz H R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*. **56**, 110-156.
10. Frazier a E, Kiu C, Stojanovski D, Hoogenraad N J & Ryan M T. (2006). Mitochondrial morphology and distribution in mammalian cells. *Biological chemistry* **387**, 1551-1558.
11. Mannella C A. (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1763**, 542-548.
12. D'herde K, De Prest B, Mussche S, Schotte P, Beyaert R, Coster R V & Roels F. (2000). Ultrastructural localization of cytochrome c in apoptosis demonstrates mitochondrial heterogeneity. *Cell death and differentiation* **7**, 331-337.
13. Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes S A, Mannella C A & Korsmeyer S J. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Developmental cell*. **2**, 55-67.
14. Mannella C A. (2006). The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1762**, 140-147.
15. Csordas G, Renken C, Varnai P, Walter L, Weaver D, Buttle K F, Balla T, Mannella C A & Hajnoczky G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *The Journal of cell biology* **174**, 915-921.
16. Mannella C A, Pfeiffer D R, Bradshaw P C, Moraru, I, Slepchenko B, Loew L M, Hsieh C E, Buttle K & Marko M. (2001). Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life* **52**, 93-100.
17. Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay F S, Fogarty K E, Lifshitz L M, Tuft R A & Pozzan T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science*. **280**, 1763-1766.
18. Desagher S & Martinou J-C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology* **10**, 369-377.
19. Scorrano L & Korsmeyer S J. (2003). Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304**, 437-444.
20. Bouchier-Hayes L, Lartigue L & Newmeyer D D. (2005). Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. *The Journal of clinical investigation* **115**, 2640-2647.
21. Kuwana T & Newmeyer D D. (2003). Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* **15**, 691-699.
22. Chipuk J E, Bouchier-Hayes L & Green D R. (2006). Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell death and differentiation* **13**, 1396-402. .
23. Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk J E, Bonzon C, Sullivan B A, Green D R & Newmeyer D D. (2005). BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Molecular Cell* **17**, 525-535.
24. Letai A, Bassik M C, Walensky L D, Sorcinelli M D, Weiler S & Korsmeyer S J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**, 183-192.
25. Willis S N, Fletcher J I, Kaufmann T, Van Delft M F, Chen L, Czabotar P E, Ierino H, Lee E F, Fairlie W D, Bouillet P, Strasser A, Kluck R M, Adams J M & Huang D C S. (2007). Apoptosis Initiated When BH3 Ligands Engage Multiple Bcl-2 Homologs, Not Bax or Bak. *Science* **315**, 856-859.

26. Goping I S, Gross A, Lavoie J N, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, Korsmeyer S J & Shore G C. (1998). Regulated Targeting of BAX to Mitochondria. *The Journal of cell biology* **143**, 207-215.
27. Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R & Martinou J C. (2000). Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *The Biochemical journal* **345**, 271-278.
28. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B & Martinou J-C. (2001). Bax Is Present as a High Molecular Weight Oligomer/Complex in the Mitochondrial Membrane of Apoptotic Cells. *The Journal of biological chemistry* **276**, 11615-11623.
29. Nechushtan A, Smith C L, Lamensdorf I, Yoon S-H & Youle R J. (2001). Bax and Bak Coalesce into Novel Mitochondria-associated Clusters during Apoptosis. *The Journal of cell biology* **153**, 1265-1276.
30. Youle R J & Karbowski M. (2005). Mitochondrial fission in apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 657-663.
31. Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler M J, Fenton W & Reed J C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer research* **53**, 4701-4714.
32. Zong W X, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu Q C, Yuan J & Thompson C B. (2003). Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *The Journal of cell biology*. **162**, 59-69.
33. Breckenridge D G, Germain M, Mathai J P, Nguyen M & Shore G C. (2003). Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* **22**, 8608-8618.
34. Orrenius S, Zhivotovsky B & Nicotera P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**, 552-565.
35. Scorrano L, Oakes S A, Opferman J T, Cheng E H, Sorcinelli M D, Pozzan T & Korsmeyer S J. (2003). BAX and BAK Regulation of Endoplasmic Reticulum Ca²⁺: A Control Point for Apoptosis. *Science* **300**, 135-139.
36. Rizzuto R, Pinton P, Ferrari D, Chami M, Szabadkai G, Magalhaes P J, Di Virgilio F & Pozzan T. (2003). Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene*. **22**, 8619-8627.
37. Moldoveanu T, Liu Q, Tocilj A, Watson M, Shore G & Gehring K. (2006). The X-Ray Structure of a BAK Homodimer Reveals an Inhibitory Zinc Binding Site. *Molecular Cell* **24**, 677-688.
38. Wei M C, Zong W X, Cheng E H, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross a J, Roth K A, Macgregor G R, Thompson C B & Korsmeyer S J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. **292**, 727-730.
39. Cory S & Adams J M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews Cancer* **2**, 647-656.
40. Cory S, Huang D C & Adams J M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* **22**, 8590-8607.
41. Cassidy-Stone A, Chipuk J, Ingberman E, Song C, Yoo C, Kuwana T, Kurth M, Shaw J, Hinshaw J, Green D & Nunnari J. (2008). Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in bax/bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Developmental Cell* **14**, 193-204.
42. Mannella C A, Buttle K, Rath B K & Marko M. (1998). Electron microscopic tomography of rat-liver mitochondria and their interaction with the endoplasmic reticulum. *Biofactors* **8**, 225-8.
43. Lindsten T & Thompson C B. (2006). Cell death in the absence of Bax and Bak. *Cell death and differentiation* **13**, 1272-1276.
44. Chipuk J E, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin N M, Newmeyer D D, Schuler M & Green D R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**, 1010-1014.
45. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P & Moll U M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular Cell*. **11**, 577-590.
46. Cuddeback S M, Yamaguchi H, Komatsu K, Miyashita T, Yamada M, Wu C, Singh S & Wang H-G. (2001). Molecular Cloning and Characterization of Bif-1. A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax. *The Journal of biological chemistry* **276**, 20559-20565.
47. Takahashi Y, Karbowski M, Yamaguchi H, Kazi A, Wu J, Sebt S M, Youle R J & Wang H-G. (2005). Loss of Bif-1 Suppresses Bax/Bak Conformational Change and Mitochondrial Apoptosis. *Molecular and cellular biology* **25**, 9369-9382.
48. Ohtsuka T, Ryu H, Minamishima Y A, Macip S, Sagara J, Nakayama K I, Aaronson S A & Lee S W. (2004). ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. *Nat Cell Biol* **6**, 121-128.
49. Guo B, Zhai D, Cabezas E, Welsh K, Nouraini S, Satterthwait a C & Reed J C. (2003). Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature* **423**, 456-461.
50. Sawada M, Sun W, Hayes P, Leskov K, Boothman D A & Matsuyama S. (2003). Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria. *Nature cell biology* **5**, 320-329.

51. Zhang H, Kim J K, Edwards C A, Xu Z, Taichman R & Wang C-Y. (2005). Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nature cell biology* **7**, 909-915.
52. Nomura M, Shimizu S, Sugiyama T, Narita M, Ito T, Matsuda H & Tsujimoto Y. (2003). 14-3-3 Interacts Directly with and Negatively Regulates Pro-apoptotic Bax. *The Journal of biological chemistry* **278**, 2058-2065.
53. Mitchell K O, Ricci M S, Miyashita T, Dicker D T, Jin Z, Reed J C & El-Deiry W S. (2000). Bax Is a Transcriptional Target and Mediator of c-Myc-induced Apoptosis. *Cancer Res* **60**, 6318-6325.
54. Miyashita T & Reed J C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293-299.
55. Oberstein A, Jeffrey P D & Shi Y. (2007). Crystal Structure of the Bcl-XL-Beclin 1 Peptide Complex. *The Journal of biological chemistry* **282**, 13123-13132.
56. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang X H, Mizushima N, Packer M, Schneider M D & Levine B. (2005). Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy. *Cell* **122**, 927-939.
57. Eskes R, Desagher S, Antonsson B & Martinou J-C. (2000). Bid Induces the Oligomerization and Insertion of Bax into the Outer Mitochondrial Membrane. *Nature cell biology* **20**, 929-935.
58. Nechushtan A, Smith C L, Hsu Y T & Youle R J. (1999). Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *The EMBO journal* **18**, 2330-2341.
59. Kuwana T, Mackey M R, Perkins G, Ellisman M H, Latterich M, Schneiter R, Green D R & Newmeyer D D. (2002). Bid, Bax, and Lipids Cooperate to Form Supramolecular Openings in the Outer Mitochondrial Membrane. *Cell* **111**, 331-342.
60. Goldstein J C, Waterhouse N J, Juin P, Evan G I & Green D R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nature cell biology* **2**, 156-162.
61. Lum M G, Minamikawa T & Nagley P. (2002). Microscopic photosensitization: a new tool to investigate the role of mitochondria in cell death. *ScientificWorldJournal*. **2**, 1198-1208.
62. Cipolat S, Rudka T, Hartmann D, Costa V, Serneels L, Craessaerts K, Metzger K, Frezza C, Annaert W, D'adamio L, Derks C, Dejaegere T, Pellegrini L, D'hooge R, Scorrano L & De Strooper B. (2006). Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* **126**, 163-175.
63. Frezza C, Cipolat S, Martins De Brito O, Micaroni M, Beznoussenko G V, Rudka T, Bartoli D, Polishuck R S, Danial N N, De Strooper B & Scorrano L. (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* **126**, 177-189.
64. Reed J C. (2006). Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell death and differentiation* **13**, 1378-1386.
65. Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz R J, Matsuda H & Tsujimoto Y. (1998). Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 14681-14686.
66. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y & Tsujimoto Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483-487.
67. Basanez G, Nechushtan A, Drozhinin O, Chanturiya A, Choe E, Tutt S, Wood K A, Hsu Y, Zimmerberg J & Youle R J. (1999). Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 5492-5497.
68. Bernardi P. (1999). Mitochondrial Transport of Cations: Channels, Exchangers, and Permeability Transition. *Physiological reviews* **79**, 1127-1155.
69. Bernardi P, Krauskopf A, Basso E, Petronilli V, Blachly-Dyson E, Di Lisa F & Forte M A. (2006). The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *The FEBS journal* **273**, 2077-2099.
70. Ichas F & Mazat J P. (1998). From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochimica et biophysica acta* **1366**, 33-50.
71. Sugiyama T, Shimizu S, Matsuoka Y, Yoneda Y & Tsujimoto Y. (2002). Activation of mitochondrial voltage-dependent anion channel by pro-apoptotic BH3-only protein Bim. *Oncogene*. **21**, 4944-4956.
72. Zamzami N, El Hamel C, Maise C, Brenner C, Munoz-Pinedo C, Belzacq a S, Costantini P, Vieira H, Loeffler M, Molle G & Kroemer G. (2000). Bid acts on the permeability transition pore complex to induce apoptosis. *Oncogene*. **19**, 6342-6350.
73. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier J M, Susin S A, Vieira H L, Prevost M C, Xie Z, Matsuyama S, Reed J C & Kroemer G. (1998). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*. **281**, 2027-2031.
74. Green D R & Kroemer G. (2004). The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death. *Science* **305**, 626-629.
75. Gao W, Pu Y, Luo K Q & Chang D C. (2001). Temporal relationship between cytochrome c release and mitochondrial swelling during UV-induced apoptosis in living HeLa cells. *J Cell Sci* **114**, 2855-2862.

76. Baines C P, Kaiser R A, Purcell N H, Blair N S, Osinska H, Hambleton M A, Brunskill E W, Sayen M R, Gottlieb R A, Dorn G W, Robbins J & Molkentin J D. (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* **434**, 658-662.
77. Kokoszka J E, Waymire K G, Levy S E, Sligh J E, Cai J, Jones D P, Macgregor G R & Wallace D C. (2004). The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*. **427**, 461-465.
78. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T & Tsujimoto Y. (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*. **434**, 652-658.
79. Halestrap A. (2005). Biochemistry: a pore way to die. *Nature* **434**, 578-579.
80. Ricci J E, Gottlieb R A & Green D R. (2003). Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *The Journal of cell biology* **160**, 65-75. Epub 2003 Jan 6.
81. Ricci J E, Munoz-Pinedo C, Fitzgerald P, Bailly-Maitre B, Perkins G A, Yadava N, Scheffler I E, Ellisman M H & Green D R. (2004). Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* **117**, 773-786.
82. Wang X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & development* **15**, 2922-2933.
83. Sattler M, Liang H, Nettesheim D, Meadows R P, Harlan J E, Eberstadt M, Yoon H S, Shuker S B, Chang B S, Minn a J, Thompson C B & Fesik S W. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak Peptide Complex: Recognition Between Regulators of Apoptosis. *Science* **275**, 983-986.
84. Muchmore S W, Sattler M, Liang H, Meadows R P, Harlan J E, Yoon H S, Nettesheim D, Chang B S, Thompson C B, Wong S-L, Ng S-C & Fesik S W. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **381**, 335-341.
85. Petros a M, Medek A, Nettesheim D G, Kim D H, Yoon H S, Swift K, Matayoshi E D, Oltersdorf T & Fesik S W. (2001). Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *PNAS* **98**, 3012-3017.
86. Day C L, Chen L, Richardson S J, Harrison P J, Huang D C S & Hinds M G. (2005). Solution Structure of Prosurvival Mcl-1 and Characterization of Its Binding by Proapoptotic BH3-only Ligands. *The Journal of biological chemistry* **280**, 4738-4744.
87. Mcdonnell J M, Fushman D, Milliman C L, Korsmeyer S J & Cowburn D. (1999). Solution Structure of the Proapoptotic Molecule BID: A Structural Basis for Apoptotic Agonists and Antagonists. *Cell* **96**, 625-634.
88. Petros a M, Olejniczak E T & Fesik S W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1644**, 83-94.
89. Muchmore S W, Sattler M, Liang H, Meadows R P, Harlan J E, Yoon H S, Nettesheim D, Chang B S, Thompson C B, Wong S-L, Ng S-C & Fesik S W. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **381**, 335-341.
90. Denisov a Y, Chen G, Sprules T, Moldoveanu T, Beauparlant P & Gehring K. (2006). Structural Model of the BCL-w-BID Peptide Complex and Its Interactions with Phospholipid Micelles. *Biochemistry* **45**, 2250-2256.
91. Oltersdorf T, Elmore S W, Shoemaker a R, Armstrong R C, Augeri D J, Belli B A, Bruncko M, Deckwerth T L, Dinges J, Hajduk P J, Joseph M K, Kitada S, Korsmeyer S J, Kunzer a R, Letai A, Li C, Mitten M J, Nettesheim D G, Ng S, Nimmer P M, O'connor J M, Oleksijew A, Petros a M, Reed J C, Shen W, Tahir S K, Thompson C B, Tomaselli K J, Wang B, Wendt M D, Zhang H, Fesik S W & Rosenberg S H. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* **435**, 677-681.
92. Cartron P-F, Priault M, Oliver L, Meflah K, Manon S & Vallette F M. (2003). The N-terminal End of Bax Contains a Mitochondrial-targeting Signal. *The Journal of biological chemistry* **278**, 11633-11641.
93. Garcia-Saez a J, Coraiola M, Dalla Serra M, Mingarro I, Menestrina G & Salgado J. (2005). Peptides Derived from Apoptotic Bax and Bid Reproduce the Poration Activity of the Parent Full-Length Proteins. *Biophysical Journal* **88**, 3976-3990.
94. Garcia-Saez a J, Mingarro I, Perez-Paya E & Salgado J. (2004). Membrane-Insertion Fragments of Bcl-xL, Bax, and Bid. *Biochemistry* **43**, 10930-10943.
95. O'neill J W, Manion M K, Maguire B & Hockenbery D M. (2006). BCL-XL Dimerization by Three-dimensional Domain Swapping. *Journal of Molecular Biology* **356**, 367-381.
96. Hsu Y-T & Youle R J. (1997). Nonionic Detergents Induce Dimerization among Members of the Bcl-2 Family. *The Journal of biological chemistry* **272**, 13829-13834.
97. Oltval Z N, Milliman C L & Korsmeyer S J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-619.
98. George N M, Evans J J D & Luo X. (2007). A three-helix homo-oligomerization domain containing BH3 and BH1 is responsible for the apoptotic activity of Bax. *Genes Dev.* **21**, 1937-1948.
99. Ruffolo S C, Breckenridge D G, Nguyen M, Goping I S, Gross A, Korsmeyer S J, Li H, Yuan J & Shore G C. (2000). BID-dependent and BID-independent pathways for BAX insertion into mitochondria. *Cell death and differentiation*. **7**, 1101-1108.

100. Cartron P-F, Oliver L, Martin S, Moreau C, Lecabellec M-T, Jezequel P, Meflah K & Vallette F M. (2002). The expression of a new variant of the pro-apoptotic molecule Bax, Bax{psi}, is correlated with an increased survival of glioblastoma multiforme patients. *Human molecular genetics* **11**, 675-687.
101. Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod J-J, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R & Martinou J-C. (1997). Inhibition of Bax Channel-Forming Activity by Bcl-2. *Science* **277**, 370-372.
102. Jurgensmeier J M, Krajewski S, Armstrong R C, Wilson G M, Oltersdorf T, Fritz L C, Reed J C & O'Ttilie S. (1997). Bax- and Bak-induced cell death in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell* **8**, 325-339.
103. Bargou R C, Wagener C, Bommert K, Mapara M Y, Daniel P T, Arnold W, Dietel M, Guski H, Feller A, Royer H D & Dorken B. (1996). Overexpression of the Death-promoting Gene bax-alpha Which Is Downregulated in Breast Cancer Restores Sensitivity to Different Apoptotic Stimuli and Reduces Tumor Growth in SCID Mice. *J. Clin. Invest.* **97**, 2651-2659.
104. Miroux B & Walker J E. (1996). Over-production of Proteins in *Escherichia coli*: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels. *Journal of Molecular Biology* **260**, 289-298.
105. Arechaga I, Miroux B, Karrasch S, Huijbregts R, De Kruijff B, Runswick M J & Walker J E. (2000). Characterisation of new intracellular membranes in *Escherichia coli* accompanying large scale over-production of the b subunit of F1Fo ATP synthase. *FEBS Letters* **482**, 215-219.
106. Hsu Y-T & Youle R J. (1998). Bax in Murine Thymus Is a Soluble Monomeric Protein That Displays Differential Detergent-induced Conformations. *The Journal of biological chemistry* **273**, 10777-10783.
107. Klare J P, Bordignon E, Doebber M, Fitter J, Kriegsmann J, Chizhov I, Steinhoff H-J & Engelhard M. (2006). Effects of Solubilization on the Structure and Function of the Sensory Rhodopsin II/Transducer Complex. *Journal of Molecular Biology* **356**, 1207-1221.
108. D'alessio M, De Nicola M, Coppola S, Gualandi G, Pugliese L, Cerella C, Cristofanon S, Civitareale P, Ciriolo M R, Bergamaschi A, Magrini A & Ghibelli L. (2005). Oxidative Bax dimerization promotes its translocation to mitochondria independently of apoptosis. *The FASEB journal*, 04-3329fje.
109. Zhou M, Demo S D, McClure T N, Crea R & Bitler C M. (1998). A Novel Splice Variant of the Cell Death-promoting Protein BAX. *J. Biol. Chem.* **273**, 11930-11936.
110. Apte S S, Mattei M-G & Olsen B R. (1995). Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX[delta]. *Genomics* **26**, 592-594.
111. Maxwell S A, Acosta S A & Davis G E. (1999). Induction and alternative splicing of the Bax gene mediated by p53 in a transformed endothelial cell line. *Apoptosis* **4**, 109-114.
112. Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, Dever-Bertrand J & Bertrand R. (2000). Characterization of Bax-[greek small letter final sigma], a Cell Death-Inducing Isoform of Bax. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **270**, 868-879.
113. Shi B, Triebe D, Kajiji S, Iwata K K, Bruskin A & Mahajna J. (1999). Identification and Characterization of Bax[epsilon], a Novel Bax Variant Missing the BH2 and the Transmembrane Domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **254**, 779-785.
114. Wieckowski M R, Vyssokikh M, Dymkowska D, Antonsson B, Brdiczka D & Wojtczak L. (2001). Oligomeric C-terminal truncated Bax preferentially releases cytochrome c but not adenylate kinase from mitochondria, outer membrane vesicles and proteoliposomes. *FEBS Letters* **505**, 453-459.
115. Dejean L M, Martinez-Caballero S, Guo L, Hughes C, Teijido O, Ducret T, Ichas F, Korsmeyer S J, Antonsson B, Jonas E A & Kinnally K W. (2005). Oligomeric Bax Is a Component of the Putative Cytochrome c Release Channel MAC, Mitochondrial Apoptosis-induced Channel. *Molecular and cellular biology* **16**, 2424-2432.
116. Lottspeich F & Engels J. (2006). *Bioanalytik*, Elsevier.
117. Bohm G, Muhr R & Jaenicke R. (1992). Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng.* **5**, 191-195.
118. Yethon J A, Epand R F, Leber B, Epand R M & Andrews D W. (2003). Interaction with a Membrane Surface Triggers a Reversible Conformational Change in Bax Normally Associated with Induction of Apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **278**, 48935-48941.
119. Tatulian S A. (2003). Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy: A Method of Choice for Studying Membrane Proteins and Lipids. *Biochemistry* **42**, 11898-11907.
120. Barth A. (2000). Fine-structure enhancement -- assessment of a simple method to resolve overlapping bands in spectra. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **56**, 1223-1232.
121. Savitsky A. K M, Duche D., Möbius K., Steinhoff HJ. . (2004). Spontaneous Refolding of the pore forming Colicin A Toxin upon Membrane Association As Studied by X-Band and W-Band High Field EPR. *J Phys Chem B* **108**, 9541-9548.
122. Cartron, Oliver, Mayat, Meflah & Vallette. (2004). Impact of pH on Bax conformation, oligomerisation and mitochondrial integration. *FEBS Letters* **578**, 41-46.

123. Zha H, Aimé-Sempé C, Sato T & Reed J C. (1996). Proapoptotic Protein Bax Heterodimerizes with Bcl-2 and Homodimerizes with Bax via a Novel Domain (BH3) Distinct from BH1 and BH2. *The Journal of biological chemistry* **271**, 7440-7444.
124. Simonen M, Keller H & Heim J. (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. *European Journal of Biochemistry* **249**, 85-91.
125. Gardai S J, Hildeman D A, Frankel S K, Whitlock B B, Frasch S C, Borregaard N, Marrack P, Bratton D L & Henson P M. (2004). Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt Regulates Its Activity and Apoptosis in Neutrophils. *The Journal of biological chemistry* **279**, 21085-21095.
126. Cartron P-F, Moreau C, Oliver L, Mayat E, Meflah K & Vallette F M. (2002). Involvement of the N-terminus of Bax in its intracellular localization and function. *FEBS Letters* **512**, 95-100.
127. Cartron P-F, Oliver L, Juin P, Meflah K & Vallette F M. (2004). The p18 Truncated Form of Bax Behaves Like a Bcl-2 Homology Domain 3-only Protein. *The Journal of biological chemistry* **279**, 11503-11512.
128. Nyholm T K M, Ozdirekcan S & Killian J A. (2007). How Protein Transmembrane Segments Sense the Lipid Environment. *Biochemistry* **46**, 1457-1465.
129. Lakowicz J R & Weber G. (1973). Quenching of fluorescence by oxygen. Probe for structural fluctuations in macromolecules. *Biochemistry* **12**, 4161-4170.
130. Altenbach C, Greenhalgh D A, Khorana H G & Hubbell W L. (1994). A Collision Gradient Method to Determine the Immersion Depth of Nitroxides in Lipid Bilayers: Application to Spin-Labeled Mutants of Bacteriorhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 1667-1671.
131. Dzikovski B G, Livshits V A & Marsh D. (2003). Oxygen Permeation Profile in Lipid Membranes: Comparison with Transmembrane Polarity Profile. *Biophys. J.* **85**, 1005-1012.
132. Marsh D, Dzikovski B G & Livshits V A. (2006). Oxygen Profiles in Membranes. *Biophys. J.* **90**, L49-51.
133. Shortle D. (1996). The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability. *FASEB J.* **10**, 27-34.
134. Wolf-Watz M, Thai V, Henzler-Wildman K, Hadjipavlou G, Eisenmesser E Z & Kern D. (2004). Linkage between dynamics and catalysis in a thermophilic-mesophilic enzyme pair. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 945-949.
135. Pagliari L J, Kuwana T, Bonzon C, Newmeyer D D, Tu S, Beere H M & Green D R. (2005). The multidomain proapoptotic molecules Bax and Bak are directly activated by heat. *PNAS* **102**, 17975-17980.
136. Roucou X & Martinou J C. (2001). Conformational change of Bax: a question of life or death. *Cell death and differentiation* **8**, 875-877.
137. Zhou H, Hou Q, Hansen J L & Hsu Y T. (2007). Complete activation of Bax by a single site mutation. *Oncogene*.
138. Fancy D A & Kodadek T. (1999). Chemistry for the analysis of protein-protein interactions: Rapid and efficient cross-linking triggered by long wavelength light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 6020-6024.
139. Sanders C. S F. (2006). Solution NMR of membrane proteins: practice and challenges. *Magnetic Resonance in Chemistry* **44**, s24-s40.
140. Schagger H & Von Jagow G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* **199**, 223-231.
141. Schagger H., Cramer W. A. & Vonjagow G. (1994). Analysis of Molecular Masses and Oligomeric States of Protein Complexes by Blue Native Electrophoresis and Isolation of Membrane Protein Complexes by Two-Dimensional Native Electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **217**, 220-230.
142. Choi S-Y, Kim M-J, Kang C-M, Bae S, Cho C-K, Soh J-W, Kim J-H, Kang S, Chung H Y, Lee Y-S & Lee S-J. (2006). Activation of Bak and Bax through c-Abl-Protein Kinase C{delta}-p38 MAPK Signaling in Response to Ionizing Radiation in Human Non-small Cell Lung Cancer Cells. *The Journal of biological chemistry* **281**, 7049-7059.
143. Wolfgang H. Binder V B F M M. (2003). Domains and Rafts in Lipid Membranes. *Angewandte Chemie International Edition* **42**, 5802-5827.
144. Ardail D, Privat J-P, Egret-Charlier M, Levrat C, Lerme F & Louisot P. (1990). Mitochondrial Contact Sites. *The Journal of Biological Chemistry* **265**, 18797-18802.
145. Sonnhammer E L, Von Heijne G & Krogh A. (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **6**, 175-182.
146. White S H & Wimley W C. (1999). MEMBRANE PROTEIN FOLDING AND STABILITY: Physical Principles. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **28**, 319-365.
147. Cascales E Fau - Buchanan S K, Buchanan Sk Fau - Duche D, Duche D Fau - Kleanthous C, Kleanthous C Fau - Lloubes R, Lloubes R Fau - Postle K, Postle K Fau - Riley M, Riley M Fau - Slatin S, Slatin S Fau - Cavard D & Cavard D. (2007). Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**, 158-229.

148. Sanjuan Szklarz L K, Kozjak-Pavlovic V, Vogtle F N, Chacinska A, Milenkovic D, Vogel S, Durr M, Westermann B, Guiard B, Martinou J-C, Borner C, Pfanner N & Meisinger C. (2007). Preprotein Transport Machineries of Yeast Mitochondrial Outer Membrane Are not Required for Bax-induced Release of Intermembrane Space Proteins. *Journal of Molecular Biology* **368**, 44-54.
149. Karrasch S, Bullough P A & Ghosh R. (1995). The 8.5 Å projection map of the light-harvesting complex I from *Rhodospirillum rubrum* reveals a ring composed of 16 subunits. *Embo J* **14**, 631-638.
150. Prince S, Howard T, Myles D, Wilkinson C, Papiz M, Freer A, Cogdell R & Isaacs N. (2003). Detergent structure in crystals of the integral membrane light-harvesting complex LH2 from *Rhodospseudomonas acidophila* strain 10050. *Journal of molecular biology* **326**, 307-315.
151. Mortz E, Krogh T N, Vorum H & Gorg A. (2001). Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics* **1**, 1359-63.
152. Steinhoff H J, Radzwill, N., Thevis, W., Lenz, V., Brandenburg, D., Antson, A., Dodson, G., and Wollmer, A. (1997). Determination of interspin distances between spin labels attached to insulin: comparison of electron paramagnetic resonance data with the X-ray structure. *Biophys J* **73**, 3287-98.
153. Steinhoff H J, Savitsky, A., Wegener, C., Pfeiffer, M., Plato, M., and Möbius, K. (2000). High-field EPR studies of the structure and conformational changes of site-directed spin labeled bacteriorhodopsin *Biochim Biophys Acta* **1457**, 253-262.
154. Bruttlach H, Bordignon, E., Urban, L., Klare, J. P., Reyer, H.-J., Engelhard, M., and Steinhoff, H. J. (2006). High-Field EPR and Site-Directed Spin Labeling Reveal a Periodical Polarity Profile: The Sequence 88 to 94 of the Phototransducer NpHtrII in Complex with Sensory Rhodopsin, NpSRII *Applied Magnetic Resonance* **30**, 359-372.
155. Pannier M, Veit, S., Godt, A., Jeschke, G., and Spiess, H. W. . (2000). Dead-time free measurement of dipole-dipole interactions between electron spins. *Journal of Magnetic Resonance* **142**, 331-340.
156. Ashkenazi A & Dixit V M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308.
157. Schulze-Osthoff K. (1994). The Fas/APO-1 receptor and its deadly ligand. *Trends in Cell Biology* **4**, 421-426.
158. Karbowski M, Norris K L, Cleland M M, Jeong S-Y & Youle R J. (2006). Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* **443**, 658-662.
159. Osteryoung K W & Nunnari J. (2003). The division of endosymbiotic organelles. *Science*. **302**, 1698-1704.
160. Nishida K, Takahara M, Miyagishima S-Y, Kuroiwa H, Matsuzaki M & Kuroiwa T. (2003). Dynamic recruitment of dynamin for final mitochondrial severance in a primitive red alga. *PNAS* **100**, 2146-2151.
161. Praefcke G J & McMahon H T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nature reviews. Molecular cell biology*. **5**, 133-147.
162. Karbowski M, Lee Y J, Gaume B, Jeong S Y, Frank S, Nechushtan A, Santel A, Fuller M, Smith C L & Youle R J. (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *The Journal of cell biology* **159**, 931-8.
163. Ingerman E, Perkins E, Marino M, Mears J, Mccaffery J, Hinshaw J & Nunnari J. (2005). Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *The Journal of cell biology* **170**, 1021-1027.
164. Jagasia R, Grote P, Westermann B & Conradt B. (2005). DRP-1-mediated mitochondrial fragmentation during EGL-1-induced cell death in *C. elegans*. *Nature*. **433**, 754-760.
165. Pitts K R, Yoon Y, Krueger E W & Mcniven M A. (1999). The Dynamin-like Protein DLP1 Is Essential for Normal Distribution and Morphology of the Endoplasmic Reticulum and Mitochondria in Mammalian Cells. *Mol. Biol. Cell* **10**, 4403-4417.
166. Cereghetti G M & Scorrano L. (2006). The many shapes of mitochondrial death. *Oncogene* **25**, 4717-4724.
167. Wasiak S Z R, McBride Hm. (2007). Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J Cell Biol* **177**, 439-450.
168. Cipolat S, Martins De Brito O, Dal Zilio B & Scorrano L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 15927-32. .
169. Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner E S, Leitner W W, Robert E G, Catez F, Smith C L & Youle R J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Developmental cell* **1**, 515-525.
170. Chen H, Chomyn A & Chan D C. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *The Journal of biological chemistry* **280**, 26185-92. .
171. Chen H, Detmer S A, Ewald a J, Griffin E E, Fraser S E & Chan D C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of cell biology* **160**, 189-200. .
172. Griparic L, Van Der Wel N N, Orozco I J, Peters P J & Van Der Bliek a M. (2004). Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **279**, 18792-18798. .

173. Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P & Lenaers G. (2003). Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **278**, 7743-7746.
174. Thomenius M J, Wang N S, Reineks E Z, Wang Z & Distelhorst C W. (2003). Bcl-2 on the Endoplasmic Reticulum Regulates Bax Activity by Binding to BH3-only Proteins. *J. Biol. Chem.* **278**, 6243-6250.
175. Hacki J, Egger L, Monney L, Conus S, Rosse T, Fellay I & Borner C. (2000). Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene* **19**, 2286-2295.
176. Hetz C, Bernasconi P, Fisher J, Lee a-H, Bassik M C, Antonsson B, Brandt G S, Iwakoshi N N, Schinzel A, Glimcher L H & Korsmeyer S J. (2006). Proapoptotic BAX and BAK Modulate the Unfolded Protein Response by a Direct Interaction with IRE1{alpha}. *Science* **312**, 572-576.
177. Berridge M J, Bootman M D & Roderick H L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**, 517-529.
178. Collins T J, Berridge M J, Lipp P & Bootman M D. (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *The EMBO journal* **21**, 1616-1627.
179. Hajnoczky G, Csordas G, Das S, Garcia-Perez C, Saotome M, Sinha Roy S & Yi M. (2006). Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell Calcium* **40**, 553-660.
180. Demareux N & Distelhorst C. (2003). CELL BIOLOGY: Apoptosis--the Calcium Connection. *Science* **300**, 65-67.
181. Krieger C & Duchen M R. (2002). Mitochondria, Ca²⁺ and neurodegenerative disease. *Eur J Pharmacol* **447**, 177-188.
182. Szalai G, Krishnamurthy R & Hajnoczky G. (1999). Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals. *The EMBO journal* **18**, 6349-6361.
183. Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, Di Virgilio F, Pozzan T & Rizzuto R. (2001). The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *Embo J* **20**, 2690-701.
184. Berridge M J, Lipp P & Bootman M D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* **1**, 11-21.
185. Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P & Meldolesi J. (1994). Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiological reviews* **74**, 595-636.
186. Jayaraman T & Marks a R. (1997). T cells deficient in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor are resistant to apoptosis. *Molecular and cellular biology* **17**, 3005-3012.
187. Sugawara H, Kurosaki M, Takata M & Kurosaki T. (1997). Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *The EMBO journal* **16**, 3078-3088.
188. Csordas G, Thomas a P & Hajnoczky G. (1999). Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *The EMBO journal* **18**, 96-108.
189. Kirichok Y, Krapivinsky G & Clapham D E. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* **427**, 360-364.
190. White C, Li C, Yang J, Petrenko N B, Madesh M, Thompson C B & Foskett J K. (2005). The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-XL modulation of the InsP3R. *Nature cell biology.* **7**, 1021-1028.
191. Oakes S A, Scorrano L, Opferman J T, Bassik M C, Nishino M, Pozzan T & Korsmeyer S J. (2005). Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 105-110.
192. Boehning D, Patterson R L, Sedaghat L, Glebova N O, Kurosaki T & Snyder S H. (2003). Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* **5**, 1051-61.
193. Nakagawa T & Yuan J. (2000). Cross-talk between Two Cysteine Protease Families: Activation of Caspase-12 by Calpain in Apoptosis. *J. Cell Biol.* **150**, 887-894.
194. Breckenridge D G, Nguyen M, Kuppig S, Reth M & Shore G C. (2002). The procaspase-8 isoform, procaspase-8L, recruited to the BAP31 complex at the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 4331-4336.
195. Breckenridge Dg S M, Marcellus Rc, Shore Gc. (2003). Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol* **160**, 1115-1127
196. Hemminga M & Berliner L. (2007). *ESR Spektroskopie in Membrane Biophysics*, springer.
197. Jeschke G. (1998). Einführung in die ESR Spektroskopie - Vorlesungskript, pp. <http://www.mpip-mainz.mpg.de/~jeschke/vbook.pdf>.

