

**Affinitätsmarkierung von Anionenkanälen und regulatorischen
Proteinen im sarcoplasmatischen Reticulum**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Silke Flebbe
aus Frankfurt

Frankfurt am Main 2001
DF1

vom Fachbereich 14, Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. J. Engels

Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Fasold
Prof. Dr. B. Ludwig

Datum der Disputation: 27. April 2001

The outcome of any serious research
can only be to make two questions grow
where only one grew before.

Thorstein Veblen

Inhaltsverzeichnis**Abkürzungsverzeichnis**

1. EINLEITUNG	1
1.1 Aufbau des Skelettmuskels	1
1.2 Sarcoplasmatisches Reticulum (SR)	1
1.3 Erregungs-Kontraktions-Kopplung (EKK)	3
1.4 Proteine des sarcoplasmatischen Reticulums	3
1.5 Ionenkanäle	4
1.5.1 Ca ²⁺ -Release-Kanal	5
1.5.2 Kaliumkanäle	5
1.5.3 Anionenkanäle	5
1.5.3.1 BCl ('big chloride channel')	7
1.5.3.2 SCl ('small chloride channel')	7
1.5.3.3 VDAC ('voltage-dependent anion-selective channel')	9
1.6 G-Proteine im SR	12
2. ERGEBNISSE	14
2.1 Isolierung und Charakterisierung von Vesikeln des sarcoplasmatischen Reticulums	14
2.1.1 Isolierung von SR-Vesikeln	14
2.1.2 Reinheit der SR-Präparation	14
2.1.3 Bestimmung der Hydrolyseaktivität der Ca ²⁺ -ATPase	15
2.1.4 Transportaktivität der ATPase	16
2.1.5 Auftrennung der Vesikelpräparation in 'heavy' und 'light' SR	17
2.2 Detektion, Isolierung und Sequenzierung des VDAC	18
2.2.1 Detektion des VDAC in SR-Vesikeln	18
2.2.2 Isolierung des VDAC aus SR-Vesikeln	20
2.2.2.1 Affinitätschromatographie mittels immobilisiertem anti-VDAC Antikörper	21
2.2.2.2 Affinitätschromatographie mit 4-Acetamido-4'-isothiocyanatostilben-2,2'-disulfonat (SITS)	22
2.2.3 Aufreinigung des VDAC durch präparative SDS-PAGE	23
2.2.4 Spaltung des VDAC mit Bromcyan	24
2.2.5 Identifizierung der Bromcyan-Fragmente des VDAC	25
2.2.6 Sequenzvergleich von VDAC-Isoformen verschiedener Organismen	25
2.2.7 Rekonstitution des VDAC in künstliche Vesikel	27
2.2.7.1 Analyse der rekonstituierten Vesikel	27
2.3 Untersuchung des Oligomerisierungsgrades des VDAC	29
2.4 Anionentransportmessungen mit der Filterassay-Methode	31
2.4.1 Einfluß des VDAC auf den Sulfat-Efflux	33
2.4.1.1 Antikörperwirkung	34
2.4.1.2 Einfluß von DCCD auf den Sulfat-Efflux	34
2.4.1.3 Einfluß von Nicotinamidadenindinucleotiden und deren Derivaten auf den Sulfat-Efflux	36
2.5.1 Nachweis von G _α -UE in den SR-Vesikeln	37
2.5.2 Einfluß eines Antikörpers gegen die G _α -UE von G-Proteinen auf den Sulfat-Efflux	38

2.6 Einfluß von Suraminderivaten auf den SO_4^{2-} -Efflux	40
2.6.1 Synthese von SB 10 und dessen Einfluß auf den Sulfat-Efflux	41
2.6.2 Synthese und funktionelle Analyse von SB 22	42
2.6.2.1 Affinitätsmarkierung von SR-Proteinen mit SB 22	44
2.6.3 Synthese und funktionelle Charakterisierung von SB 9	47
2.6.3.1 Affinitätschromatographie mit immobilisiertem SB 9	47
2.7 Einfluß von Nucleotiden auf den SO_4^{2-} -Efflux	49
2.7.1 Synthese des 6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphats	51
2.7.1.1 Synthese des $[\gamma\text{-}/\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{-6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphats}$	51
2.7.2 Stufenweise Synthese des 6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphats	52
2.7.2.1 Stufenweise Synthese des $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{-6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphats}$	52
2.7.3 Einfluß von 6-DNP-S-GTP auf den SO_4^{2-} -Efflux	53
2.7.4 Detektion und Identifizierung von SR-Proteinen, die mit dem GTP-Analogon wechselwirken	55
2.7.5 Einfluß von $\text{GTP}\gamma\text{S}$ und $\text{GDP}\beta\text{S}$ auf den SO_4^{2-} -Efflux	58
2.8 Wirkung von Fettsäuren im SR	60
2.8.1 Einfluß von Fettsäuren auf den Sulfat-Efflux	60
2.8.2 Einfluß von PGE_2 auf den Sulfat-Efflux	62
2.9 Effekte von ATP-sensitiven Kaliumkanal-Effektoren auf den Sulfat-Efflux	63
3. DISKUSSION	66
3.1 Anionentransport im SR	66
3.2 Identifizierung und Charakterisierung des VDAC	68
3.2.1 Einfluß des VDAC auf den Sulfat-Efflux	71
3.3 Funktion von G-Proteinen im SR	74
3.3.1 Nachweis von G-Proteinen im SR des Skelettmuskels	74
3.3.2 Hinweise auf eine G-Protein-vermittelte Regulation von Anionenkanälen im SR	75
3.4 Einfluß von Nucleotiden auf den Sulfat-Efflux	77
3.5 Einfluß von Fettsäuren und ihren Metaboliten auf den Sulfat-Efflux	80
4. ZUSAMMENFASSUNG	82
5. MATERIAL UND METHODEN	84
5.1 Allgemeine Standardarbeitsmethoden	84
5.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Biuret	84
5.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Popov	84
5.1.3 Chloroform-Methanol-Fällung nach Wessel und Flügge	85
5.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	85
5.1.5 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen	87
5.1.6 Nachweis von Proteinen mit Amidoschwarz	87
5.1.7 Autoradiographie	88
5.1.8 Flüssigkeitsszintillationszählung	88

5.2 Präparation und Charakterisierung von SR-Vesikeln	88
5.2.1 Isolierung von SR-Vesikeln aus Kaninchenmuskulatur	88
5.2.2 Auftrennung der SR-Vesikel in HSR- und LSR-Vesikel	90
5.2.3 Hydrolyseaktivität der Calcium-ATPase	91
5.2.4 Transportaktivität der Ca ²⁺ -ATPase	92
5.3 Aufreinigung des VDAC aus SR-Vesikeln	94
5.3.1 Detektion des VDAC	94
5.3.2 Isolierung des VDAC	95
5.3.2.1 Affinitätschromatographie mit 4-Acetamido-4'-isothiocyanatostilben-2.2'-disulfonat (SITS)	95
5.3.3 Präparative SDS-PAGE	96
5.3.4 Elektroelution von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen	96
5.3.5 Bromcyan-Spaltung des VDAC	96
5.3.6 Rekonstitution des VDAC in künstliche Asolektinvesikel	97
5.3.6.1 Herstellung der Liposomen	97
5.3.6.2 Vorbereitung und Regenerierung der Beads	97
5.3.6.3 Rekonstitution	98
5.3.7 Quervernetzungs-Experimente mit DEB und DADS	98
5.4 Synthese des 6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphats (6-DNP-S-GTP)	98
5.4.1 Synthese des 6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-monophosphats (6-DNP-S-GMP)	98
5.4.2 Synthese des 6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphats	99
5.4.2.1 Synthese des [γ -/ β - ³² P]-6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphats	100
5.4.3.1 Synthese des [β - ³² P]-6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphats	101
5.5 Synthese von Suraminderivaten	101
5.5.1 Synthese von SB 9	102
5.5.2 Synthese von SB 10	102
5.5.3 Synthese von SB 22	102
5.6 Markierung und Detektion von SR-Proteinen mit Anionentransport-Inhibitoren	103
5.6.1 Markierung von SR-Proteinen mit 6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphat	103
5.6.2 Markierung von SR-Proteinen mit radioaktiv markiertem SB 22	104
5.6.2.1 Jodierung von SB 22	104
5.6.3 Affinitätschromatographie mit SB 9	104
5.7 Immunodetektion von G _{α} -Untereinheiten im SR	105
5.8 Sulfat-Transportmessung mit der Filterassay-Methode	105
6. LITERATUR	106
8. DANKSAGUNGEN	116

Abkürzungsverzeichnis

A23187	Calciumionophor Calcimycin	mCi	Millicurie
ADP	Adenosin-5'-diphosphat	min	Minuten
AMP-PNP	Adenosin-5'-(β,γ -imido)-triphosphat	mM	Millimolar
APS	Ammoniumperoxodisulfat	M	Molar
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	MW	Molekulargewicht
Ci	Curie	NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
cpm	Impulse pro Minute	NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
Da	Dalton	nm	Nanometer
CAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
DEB	Diepoxybutan	PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
DADS	4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-disulfonsäure	PLB	<i>planar lipid bilayer</i>
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid	PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
DIDS	4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-disulfonsäure	PVDF	Polyvinylidendifluorid
DMF	Dimethylformamid	rpm	Umdrehungen pro Minute
DNFB	2,4-Dinitro-1-fluor-benzol	RT	Raumtemperatur
DTT	Dithiothreitol	RyR	Ryanodin-Rezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	S	Siemens
g	Erdbeschleunigung	SDS	Natriumdodecylsulfat
GDP	Guanosin-5'-diphosphat	SITS	4-Acetamido-4'-isothiocyanatostilben-2,2'-disulfonsäure
GP-53	Glycoprotein mit 53 kDa	6-DNP-S-GTP	6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat	SR	Sarcoplasmatisches Reticulum
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	TEA	Triethanolamin
h	Stunde	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
		TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan
		UE	Untereinheit
		UV	Ultraviolett
		VDAC	<i>voltage-dependent anion-selective channel</i>

Einbuchstabencode für Aminosäuren

A	Alanin	I	Isoleucin	R	Arginin
C	Cystein	K	Lysin	S	Serin
D	Asparaginsäure	L	Leucin	T	Threonin
E	Glutaminsäure	M	Methionin	V	Valin
F	Phenylalanin	N	Asparagin	W	Tryptophan
G	Glycin	P	Prolin	Y	Tyrosin
H	Histidin	Q	Glutamin		

1. Einleitung

1.1 Aufbau des Skelettmuskels

Quergestreifte Muskelfasern bestehen aus einer vielkernigen Zelle mit einem Durchmesser von 5-100 μM , die mehrere Zentimeter lang sein kann, und enthalten zahlreiche Myofibrillen in denen die Aktin- und Myosinfilamente organisiert sind. Sarcomere bilden die funktionellen Einheiten in den Myofibrillen. Sie sind in einer Muskelfaser so angeordnet, daß sie der Faser ein im Lichtmikroskop sichtbares, quergestreiftes Aussehen verleihen. Das Sarcomer ist in mehrere Banden, Scheiben und Zonen aufgeteilt, die sich je nach Kontraktionszustand der Zelle mehr oder weniger weit überlappen. Die an der M-Scheibe lokalisierten Myosinfilamente verbinden sich während der Kontraktion über Querbrücken mit den an der Z-Scheibe befestigten Aktinfilamenten. Das aktive Gleiten (*'sliding filaments'*) der dünnen Aktinfilamente zwischen die dicken Myosinfilamente führt zu einer Verkürzung der Myofibrille. Bei der Erschlaffung oder Dehnung des Muskels wird das Ausmaß der Überlappung durch Lösen der Bindungen wieder reduziert.

1.2 Sarcoplasmatisches Reticulum (SR)

Muskelzellen verfügen über ein spezielles Membransystem, das der Speicherung von Calcium-ionen dient und deren schnelle Freisetzung in das Cytoplasma sowie den Rücktransport in das SR-Lumen während des Erregungs-Kontraktions-Zyklus gewährleistet. Die Bezeichnung sarcoplasmatisches Reticulum leitet sich aufgrund seiner morphologischen Verwandtschaft zu dem endoplasmatischen Reticulum (ER) und seines Vorkommens in den Sarcomeren ab.

Das SR ist wie ein hohler Kragen um jede Myofibrille von einer Z-Scheibe zur anderen gewickelt und befindet sich neben dem System der transversalen Tubuli (T-Tubuli), die Ausstülpungen des Sarcolemmas darstellen und somit ein anatomisches Bindeglied zwischen der Oberflächenmembran und den tief in der Muskelfaser befindlichen Myofibrillen bilden.

Die longitudinalen Tubuli sind jeweils auf der Höhe der Z-Scheiben lokalisiert und umspannen die Myofibrillen netzartig über die gesamte Sarcomerlänge. Sie erweitern sich an den Enden jedes Sarcomers zu Ausstülpungen, die man terminale Cisternen nennt. Die terminalen Cisternen zweier aneinandergrenzender Sarcomere stehen im Bereich der I-Bande über einen schmalen Spalt in engem Kontakt mit einem T-Tubulus und bilden eine Triade. In elektronenmikroskopischen Studien zeigt sich, daß dieser Spalt von *'feet structures'* durch-

spannt wird, bei denen es sich um tetramere Komplexe des Ca^{2+} -Release-Kanals mit assoziierten Proteinen handelt (Chu et al. 1986, Chu et al. 1987, Ahern et al. 1994). Der Kanal wird aufgrund seiner hohen Affinität zu dem Alkaloid Ryanodin auch als Ryanodin-Rezeptor (RyR) bezeichnet.

SR-Vesikel lassen sich durch differentielle Zentrifugation (Hasselbach und Makinose 1961 und 1963, Portzehl 1957) funktionsfähig isolieren. Durch anschließende Saccharosedichte-gradienten-Zentrifugation erhält man zwei unterschiedliche Vesikel-Populationen. Die 'light' Vesikel (LSR) stammen aus dem longitudinalen Bereich des SR und enthalten zu 90% Ca^{2+} -ATPase und nur geringe Mengen RyR (Meissner 1975). Die 'heavy' Vesikel bestehen aus den terminalen Cisternen und enthalten außer der Ca^{2+} -ATPase (55-65%) zahlreiche Ryanodin-Rezeptoren (Louis 1980, Campbell et al. 1980).

Die Vesikel haben einen Durchmesser von 50-200 nm (Eich 1987) und ein Volumen von 3-7 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Protein (Herbette et al. 1981).

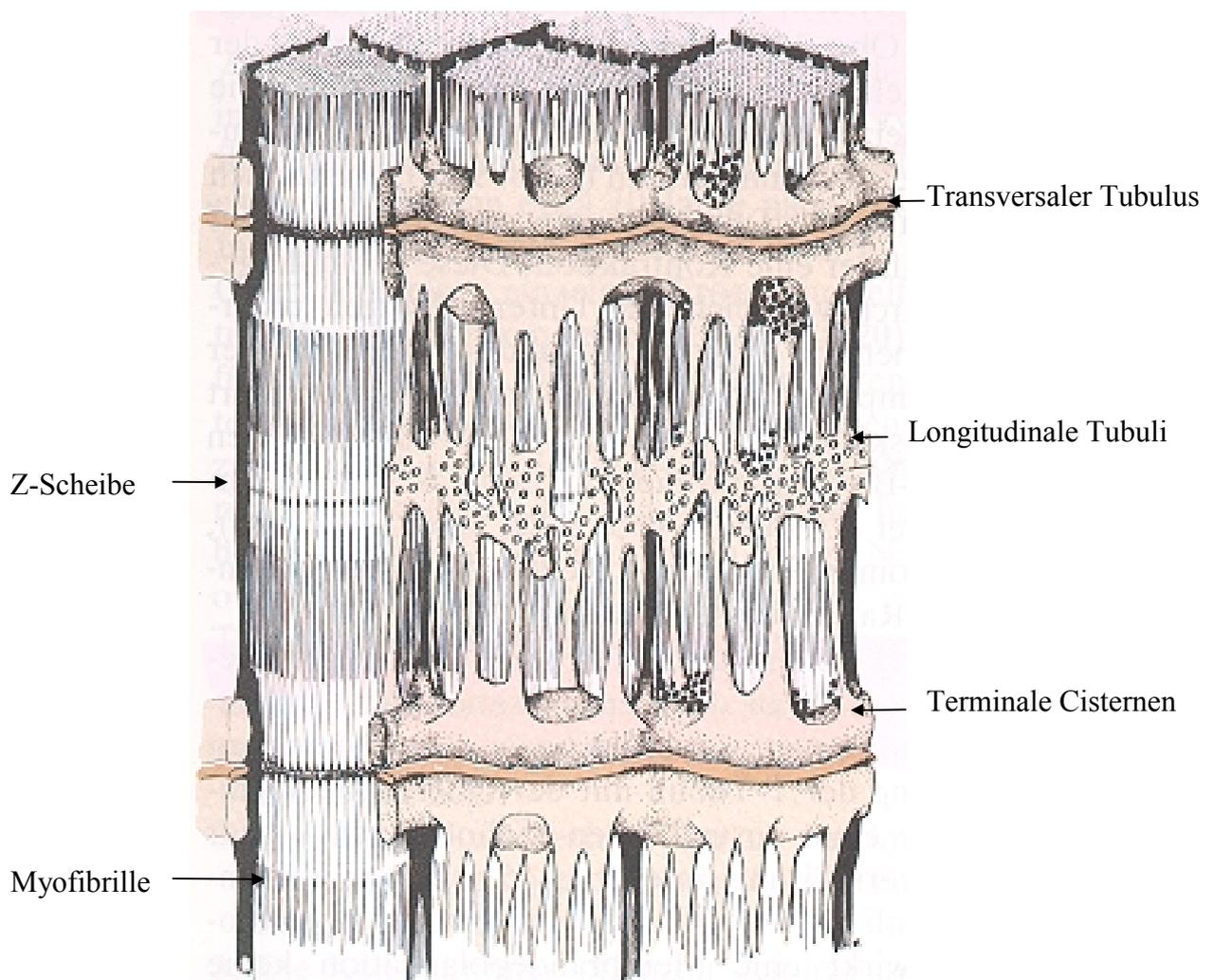


Abb. 1-1 Schematische Darstellung des sarcoplasmatischen Reticulums eines quergestreiften Muskels (Eckert 1986)

1.3 Erregungs-Kontraktions-Kopplung (EKK)

Die Depolarisation des Sarcolemmas führt in den transversalen Tubuli zur Aktivierung von integralen spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen, den Dihydropyridin-Rezeptoren (DHPR oder L-Typ Ca^{2+} -Kanäle), die häufig mit dem Ryanodin-Rezeptor des sarcoplasmatischen Reticulums assoziiert sind. Der DHPR ändert seine Konformation und aktiviert über eine cytoplasmatische Schleife den RyR (Lu et al. 1994), der über seine Fußstrukturen mit den T-Tubuli in Kontakt steht. Das mechanische Signal zur Öffnung des Kanals wird direkt über diese Strukturen vermittelt. Die Ca^{2+} -Konzentration im Cytoplasma wird sehr schnell von unter 10^{-7} auf 10^{-5} molar erhöht.

Die Ca^{2+} -Bindung an Troponin C führt zu einer Konformationsänderung im Actin-Troponin-Tropomyosin-Komplex und beeinflusst die Aktin-Myosinwechselwirkung (Gordon et al. 2000, Payne und Rudnick 1989), wodurch der Kontraktionszyklus eingeleitet wird.

Der RyR bleibt aktiv, solange die Depolarisation der Membran andauert. Die Ca^{2+} -ATPase beginnt dann sofort mit dem aktiven Rücktransport von Ca^{2+} in das SR-Lumen und führt somit zur Relaxation des Muskels.

Das Membranpotential des sarcoplasmatischen Reticulums bleibt sowohl während der schnellen Calcium-Freisetzung durch den RyR als auch bei dem aktiven Rücktransport durch die Ca^{2+} -ATPase konstant bei etwa 0 mV (Fink und Veigel 1996). In vitro Untersuchungen an rekonstituierten Vesikeln zeigen allerdings, daß durch den Ca^{2+} -Release und die Ca^{2+} -Aufnahme große Potentialdifferenzen entstehen. Die Ca^{2+} -ATPase bewirkt Membranpotentiale von bis zu -60 mV, die eine weitere Ca^{2+} -Aufnahme behindern würden (Martonosi 1984, Zimniak und Racker 1978, Morimoto und Kasai 1986, Hartung et al. 1987, Kometani und Kasai 1978, Yu et al. 1993). Unter physiologischen Bedingungen muß demnach ein Ladungsausgleich durch die Wanderung von Kationen entgegen oder Anionen mit den Ca^{2+} -Ionen erfolgen (Yu et al. 1994, Chu et al. 1983a und 1983b, Meissner und McKinley 1976).

1.4 Proteine des sarcoplasmatischen Reticulums

Die Hauptkomponente bildet die Mg^{2+} -abhängige Ca^{2+} -ATPase (110 kDa). Sie besteht aus 1001 Aminosäuren und transportiert pro hydrolysiertem ATP 2 Mol Ca^{2+} vom Cytoplasma in das Lumen des SR (MacLennan et al. 1985). Sie gehört zu den ionentransportierenden ATPasen vom P-Typ (Inesi und Kirtley 1992), zu denen ebenfalls die Na^+/K^+ -ATPase, die H^+/K^+ -ATPase sowie die K^+ -ATPase aus E. Coli zählen. Ihnen gemeinsam ist ein Wechsel

zwischen der E1- und E2-Form, die Hemmung durch Vanadat sowie die Phosphorylierung eines Aspartatrests im aktiven Zentrum.

Calsequestrin (63 kDa), Calreticulin (46 kDa), Calmodulin (16.7 kDa), Glycoprotein 53 (GP-53, 53 kDa) und das '*histidine-rich Ca²⁺-binding protein*' (HCP, 170 kDa) binden Ca²⁺ und halten die luminaire freie Ca²⁺-Konzentration gering, so daß die Speicherkapazität des SR erhöht wird (Leberer et al. 1990, Campbell und Mac Lennan 1983, Michalak et al. 1980, Tuana und Mac Lennan 1988).

Calsequestrin ist zudem für die Aktivität bzw. Ca²⁺-Sensitivität des RyR notwendig (Kawasaki et al. 1994). GP-53 (Campbell und Mac Lennan 1981) zeigt Homologien zu einem 160 kDa Glycoprotein, dem Sarcalumenin, das durch die Casein Kinase II phosphoryliert wird und modulierend auf den RyR einwirkt (Shoshan-Barmatz et al. 1996b). Für HCP werden ähnliche Eigenschaften diskutiert (Damiani et al. 1995).

1.5 Ionenkanäle

Ionenkanäle bilden hochselektive, hydrophile Poren durch die Membran. Im Gegensatz zu Carrier-Proteinen lassen sie sich nicht energetisch koppeln und erlauben lediglich einen passiven Transport entlang des elektrochemischen Gradienten. Dafür ist die Transportaktivität etwa um das 1000fache beschleunigt. Die Regulation der Durchtrittspore wird als '*gating*' bezeichnet und erfolgt durch Spannungsänderungen ('*voltage-dependent*'), durch mechanische Reize (Dehnungsreize) oder durch die Bindung von Signalmolekülen (Ligandenkontrolliert). Als physiologische Liganden können Neurotransmitter, intrazelluläre Botenstoffe wie Ionen und Nucleotide sowie bestimmte Signalproteine (G-Proteine) agieren. Zusätzlich können Phosphorylierungen bzw. Dephosphorylierungen eine Rolle spielen. Eine Modifikation der Kanaleigenschaften durch Ionenkanal-Inhibitoren und -Aktivatoren erfolgt entweder durch direkte Blockade der Pore ('*open channel block*') oder durch Modulation des '*gating*'-Mechanismus.

Neben Ca²⁺ ist die SR-Membran für K⁺, Na⁺, H⁺, Mg²⁺, HPO₄²⁻ und Cl⁻ permeabel (Young et al. 1981, Morimoto und Kasai 1986, Tanifuji 1987, Hals 1989, Thinnes 1992, Hudson et al. 1995, Dulhunty et al. 1996, Colombini et al. 1996). Aber auch organische Anionen und Polyanionen wie Nucleotide und andere Metabolite können die Membran überwinden (Shoshan-Barmatz et al. 1996a, Salama und Scarpa 1985, Kasai und Ide 1996).

1.5.1 Ca²⁺-Release-Kanal

Der Ca²⁺-Release-Kanal (RyR) des Skelettmuskels besteht aus einem Homotetramer mit Untereinheiten von je 595 kDa. Mit einer Größe von fast 2.4 MDa kann man ihn in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als *'feet structure'* erkennen (Saito et al. 1988). Durch ihn erfolgt die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem SR-Lumen (Meissner 1994). Ryanodin bindet mit hoher Affinität und Spezifität (Franzini-Armstrong und Protasi 1997, Zucchi und Ronca-Testoni 1997) und aktiviert den Kanal in niedrigen Konzentrationen (10-50 nM), in höheren Konzentrationen (10-300 µM) dagegen führt es zur Hemmung (Valdivia und Coronado 1989, Hasselbach und Migala 1992). Der RyR weist verschiedene Bindungsstellen für Nucleotide und regulatorische Proteine wie Sarcalumenin und Calmodulin auf. Der Kanal wird durch Ca²⁺, Coffein und ATP aktiviert und durch Mg²⁺, Procain sowie Rutheniumrot gehemmt (Nagasaki und Kasai 1983, Yamamoto und Kasai 1982).

Ca²⁺-freies Calmodulin führt nach Bindung an eine der wahrscheinlich 24 Calmodulin-Bindungsstellen zur Aktivierung, Ca²⁺-Calmodulin dagegen zur Hemmung des Kanals.

Suramin, ein polysulfonierter Naphthylharnstoff, stellt durch Wechselwirkung mit einer Calmodulin-Bindedomäne einen starken und direkten Aktivator des RyR dar (Chen und Mac Lennan 1994, Klinger et al. 1999, Sitsapesan 1999).

1.5.2 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle befinden sich vorwiegend in der Membran des longitudinalen SR und werden durch Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen konzentrationsabhängig gehemmt (Soler et al. 1994, Ide et al. 1991). Der Transport einwertiger Kationen ist weniger effektiv als der von Anionen (Kometani und Kasai 1978), weshalb Kaliumkanäle wahrscheinlich nicht zum Ladungsausgleich während des Ca²⁺-Fluxes beitragen. Zudem ist ihre Offenwahrscheinlichkeit P₀ bei 0 mV und negativen Potentialen sehr gering (Miller 1978, Coronado et al. 1980).

1.5.3 Anionenkanäle

Chloridkanäle sind in verschiedenen Zelltypen in unterschiedliche physiologische Funktionen involviert. Sie spielen eine essentielle Rolle bei der Osmoregulation, inhibitorischen Neurotransmission, pH-Balance, Salz- und Flüssigkeitssekretion und der Regulation des Zellvolumens (Hille 1992, Guggino 1994, Al-Awqati 1995). Im Skelettmuskel stabilisiert der

spannungsabhängige Cl⁻-Kanal das Membranpotential des Sarcolemmas (Blatz und Magleby 1983 und 1985).

Im SR ist die physiologische Rolle von Cl⁻ noch nicht vollständig geklärt. Man geht davon aus, daß Chloridionen an dem Ladungsausgleich während der EKK beteiligt sind und den Ca²⁺-Release regulieren (Allard und Rougier 1994, Berman 1999).

Durch Isotopen-Flux-Experimente konnte gezeigt werden, daß SR-Vesikel aus Herz- und Skelettmuskulatur für Chlorid durchlässig sind (Meissner und McKinley 1976 und 1982). Die Permeabilität von Cl⁻ ist 50mal höher als die von K⁺ (Kometani und Kasai 1978), weshalb es eine größere Rolle bei der Ladungsbalance während der Ca²⁺-Freisetzung spielen könnte. Neben der hohen Permeabilität für Cl⁻ und einige andere anorganische Anionen ist die SR-Membran auch für Nucleotide, Oxalat und andere Dicarboxylationen durchlässig.

Die unterschiedlichen Anforderungen verschiedener physiologischer Prozesse erklären die Diversität von Cl⁻-Kanälen in SR-Membranen des gleichen Gewebes, deren physiologische Rolle sich von ihren biophysikalischen Eigenschaften ableitet. Eine hohe Leitfähigkeit hat z.B. den Vorteil, daß große Mengen von Anionen für die Ladungskompensation und Zerstörung des Membranpotentials, das während des Ca²⁺-Fluxes entsteht, transportiert werden können.

Die elektrischen Eigenschaften der SR-Membran wurden hauptsächlich durch Verwendung der 'planar lipid bilayer'-Technik (PLB-Technik) untersucht. Diese Methode ergab, daß die SR-Membran mindestens drei verschiedene Anionenkanäle enthält, die sich hinsichtlich ihrer Leitfähigkeit, Kinetik, Spannungsabhängigkeit und Pharmakologie unterscheiden:

den BCl ('big chloride channel'), den SCl ('small chloride channel') und den VDAC ('voltage-dependent anion-selective channel'). Zudem ist ein 100 kDa Protein aus dem longitudinalen SR bekannt, das in PLB-Experimenten Chloridkanäle ausbildet (Ide et al. 1991). In der Literatur werden noch weitere Kanäle beschrieben, die sich in ihrer Leitfähigkeit, Selektivität und Sensitivität zu Hemmstoffen unterscheiden. Da sie in PLB-Experimenten nur selten auftreten, konnten sie jedoch noch nicht näher charakterisiert werden. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, daß es sich hierbei um Verunreinigungen durch Sarcolemma und T-Tubuli-Membranen handelt (Mitchell et al. 1983).

1.5.3.1 BCl (*'big chloride channel'*)

Der BCl ähnelt in Bezug auf Ionenselektivität, Leitfähigkeit sowie seiner Sensivität zu Sulfat und DIDS dem von Tanifuji et al. (1987) beschriebenen Kanal. Die Leitfähigkeit für Cl⁻ beträgt 210-250 pS (Kourie 1997b). Der Kanal ist in Lipid-Doppelmembranen meist geöffnet (Offenwahrscheinlichkeit P_o liegt nahe bei 1) und reagiert nicht auf Änderungen der Spannung (Kourie 1996a) und der cytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration (Ahern und Laver 1998). Der Kanal ist selektiv für Chlorid und wird durch 30-70 mM Sulfat von der cytoplasmatischen Seite gehemmt.

Cl⁻-Kanal-Inhibitoren stellen wichtige Hilfsmittel bei der Untersuchung des Ionentransports dar. Die Stilbendisulfonat-Derivate SITS und DIDS hemmen die Anionenpermeabilität skelettaler SR-Vesikel in millimolaren Konzentrationen (Kasai und Taguchi 1981). DIDS-Konzentrationen in mikromolaren Bereichen zeigen partielle Effekte auf einzelne Cl⁻-Kanalaktivitäten und nur eine um 10-25% reduzierte Permeabilität (Rousseau 1989).

8 µM DIDS bewirken im BCl keinen Effekt, 80 µM senken die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals, dagegen führen 120 µM DIDS zu einer absoluten Hemmung des Kanals.

ATP hemmt den Kanal von der luminalen Seite, jedoch nicht von der cytoplasmatischen Seite. Der BCl könnte deshalb ähnlich dem VDAC einen Transportweg für Polyanionen darstellen (Kourie 1997a). Nucleotide werden für Phosphorylierungs-abhängige Funktionen im SR-Lumen benötigt (Shoshan-Barmatz et al. 1996a). Die kinetischen Eigenschaften sowie die fehlende Spannungsabhängigkeit der Aktivität unterscheiden ihn allerdings vom VDAC.

1.5.3.2 SCl (*'small chloride channel'*)

Der *'small chloride channel'* unterscheidet sich in seinen Transporteigenschaften von den bekannten Anionenkanälen des SR, der T-Tubuli und des Sarcolemmas (Kourie et al. 1996a), ähnelt allerdings einem Cl⁻-Kanal des SR im Herzmuskel (Rousseau 1989). Die Leitfähigkeit des SCl liegt für Cl⁻ und SO₄²⁻ bei 65-95 pS (Kourie 1996a), was auf eine geringere Anionenspezifität hinweist. Er zeigt spannungsabhängige Aktivierungs- und Inaktivierungs-Kinetiken bei negativen Potentialen, die Aktivität muß jedoch durch einen Prä-Puls zu positiven Potentialen induziert werden.

Die Funktion des Kanals ist abhängig von der cytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration, weshalb er auch als Ca²⁺-induzierter Cl⁻-Kanal beschrieben wird. 1 µM Ca²⁺ sind zur Stimulation erforderlich (Kourie 1996b).

DIDS hemmt den Kanal reversibel und in mikromolaren Konzentrationen (8 μM DIDS). Inositolpolyphosphate reduzieren die Cl^- -Permeabilität des Kanals durch Bindung an eine Polyanionen-Bindungsstelle auf der cytoplasmatischen Seite (Kourie 1997a).

Ähnlich wirken Adenosinphosphate und deren Derivate wie AMP-PNP. Die ATP-induzierte Hemmung von der cytoplasmatischen Seite ist konzentrations- und spannungsunabhängig. Die Effektivität der Hemmung nimmt mit steigender Ladung zu ($\text{ATP}^{4-} > \text{ADP}^{3-} > \text{AMP}^{2-}$) (Kourie 1998). Sie erfolgt über einen 'open channel block' (Kourie 1997a, Ahern und Laver 1998). In vivo ist deshalb bei niedrigen physiologischen ATP-Konzentrationen die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals sehr gering (Terzic et al. 1995), was die Rolle des SCl als Ladungs-Kompensator vor allem in Gegenwart des fast ständig geöffneten BCl in Frage stellt. Jedoch geben die biophysikalischen Parameter der Ionenkanal-Aktivität aus PLB-Experimenten keine quantitative Aussage über die regulatorischen Mechanismen in vivo. Die ATP-Sensitivität des Kanals könnte unter physiologischen Bedingungen durch den $\text{pH}_{\text{cyt.}}$ -Wert, das ATP/ADP-Verhältnis, Lactat oder metabolischen Streß modifiziert werden. Zudem arbeiten Ionenkanäle wesentlich effizienter als Pumpen und Carrier, weshalb auch wenige, für kurze Zeit geöffnete Kanäle einen ausreichenden Transportausgleich für die Ca^{2+} -ATPase schaffen können (Kourie 1999).

In PLB-Experimenten wurde der Einfluß des pH-Wertes auf die Funktion des SCl getestet (Kourie 1999). Niedrige cytoplasmatische pH-Werte ($\text{pH}_{\text{cyt.}}$ -Werte) verändern die Leitfähigkeit und die Kinetik des Kanals und führen zu einem verminderten Ionenstrom. Ca^{2+} -Release-Kanäle werden ebenfalls durch niedrige $\text{pH}_{\text{cyt.}}$ -Werte moduliert (Ma und Zhao 1994, Rousseau und Pinkos 1990), so daß eine funktionelle Kopplung des SCl mit dem RyR diskutiert wird (Kourie 1999). Die beiden Kanäle könnten bei ungünstigen physiologischen Bedingungen (Hypoxie, Erschöpfung) den Ca^{2+} -Einstrom in das Myoplasma verhindern.

BCl und SCl konnten in PLB-Experimenten gleichermaßen in den terminalen Cisternen und im longitudinalen SR nachgewiesen werden. Da die Rekonstitution meist gleichzeitig erfolgt, wird eine Co-Lokalisation beider Kanäle postuliert (Kourie et al. 1996a).

1.5.3.3 VDAC (*'voltage-dependent anion-selective channel'*)

Der VDAC wurde zuerst in der äußeren Mitochondrienmembran detektiert (Colombini 1979). Lange Zeit ging man davon aus, daß er nur dort lokalisiert ist. Seit einiger Zeit gibt es sehr viele Hinweise für eine extramitochondriale Expression des VDAC. Der Kanal wurde in der Plasmamembran verschiedener Zellen (Bureau et al. 1992, Cole et al. 1992, Puchelle et al. 1993, Lisanti et al. 1994, Jakob et al. 1995, Reymann et al. 1995), in der Kernmembran (König et al. 1991, Junankar et al. 1993) und im SR (Junankar et al. 1995, Shoshan-Barmatz et al. 1996a) nachgewiesen. Porin 31HL aus der Membran humaner B-Lymphozyten ist ebenfalls mit dem mitochondrialen VDAC identisch (Benz et al. 1992, Kayser et al. 1989, Thinner et al. 1989).

Man geht davon aus, daß der VDAC in Mitochondrien den Hauptweg für die Diffusion von Ionen und Metaboliten durch die äußere Membran darstellt und den Transport von Adeninnucleotiden reguliert (Hodge und Colombini 1997, Rostovtseva und Colombini 1997). Der VDAC scheint in der Mitochondrienmembran noch zusätzliche Funktionen auszuüben, da er mit verschiedenen cytosolischen und mitochondrialen Proteinen wie Hexokinase (Fiek et al. 1982, Linden et al. 1982), MAP2, einem Protein des Cytoskeletts (Linden und Karlsson 1996), und Cytochrom c (Mannella et al. 1987, Stanley 1994) in Wechselwirkung tritt.

Der 31 kDa mitochondriale VDAC bildet nach der Rekonstitution in Lipid-Doppelmembranen einen *'large-conductance'* Ionenkanal mit einer Cl⁻ Leitfähigkeit von 4-4.5 nS aus (Schein et al. 1976, Colombini 1979).

Bei niedrigen Membranpotentialen (< 20 mV) ist der Kanal schwach Anionen-selektiv. Bei höheren Membranpotentialen (> 30-40 mV) wechselt er zu teilweise geschlossenen Kationen-selektiven Stadien (Benz et al. 1990, 1988).

Sequenz- und Strukturanalysen suggerieren eine porinähnliche Faßstruktur, das sogenannte *'β-barrel'*. Es konnten jedoch bis jetzt keine Sequenzhomologien zu den bakteriellen Porinen gefunden werden, obwohl die Eigenschaften in Einzelkanal-Messungen sehr ähnlich sind (Forte et al. 1987). Eine allgemeine strukturelle Eigenschaft bakterieller Porine, deren Struktur durch Röntgenkristallographie aufgeklärt wurde, ist ein intraluminales Segment, das mit Resten des *'β-barrels'* wechselwirkt, die Selektivität der Pore mitbestimmt und zu deren Stabilisierung beiträgt (Cowan et al. 1992, Weiss und Schulz 1992). In mitochondrialem VDAC konnte dieses Segment nicht detektiert werden. Der VDAC bildet auch keine dichtgepackten symmetrischen trimeren Komplexe wie die bakteriellen Porine (Mannella 1998).

Jeder Kanal besteht wahrscheinlich aus einer Polypeptidkette (Mannella 1987, Thomas et al. 1991, Peng et al. 1992a), jedoch gibt es auch Hinweise auf eine Dimerisierung (Linden und Gellerfors 1983, Krause et al. 1986). Das ' *β -barrel*' wird aus 12-16 antiparallelen β -Faltblättern gebildet (De Pinto et al. 1991, Rauch und Moran 1994, Dolder et al. 1999), mit einem α -helikalen N-Terminus, dessen Funktion zur Zeit noch nicht geklärt ist (Mannella 1998, Blachly-Dyson et al. 1990). Der Porendurchmesser beträgt im geöffneten Zustand 2-3 nm (Colombini 1980, Mannella 1981, Sorgato und Moran 1993, Benz 1994).

Es werden verschiedene Mechanismen diskutiert, die das '*gating*' des Kanals bewirken.

Mannella und Guo (1992) nehmen an, daß sich die N-terminale α -Helix in oder über das Innere der Pore bewegt, was zum partiellen Verschuß des Kanals führt. Punktmutationen in der N-terminalen Domäne deuten jedoch daraufhin, daß der α -helikale Bereich im offenen Zustand einen Spannungssensor und einen integralen Teil des Lumens darstellt (Blachly-Dyson et al. 1990, Thomas et al. 1993, Popp et al. 1996, Koppel et al. 1997). Ein Zwei-Stufen-Mechanismus (Mannella 1998), bei dem sich die N-terminale Domäne im elektro-physiologischen offenen Zustand in einem Spalt in der Lumenwand befindet, scheint im Moment das akzeptabelste Modell darzustellen. Durch '*gating*'-Stimuli wird sie aus der Furche verdrängt. Dies führt zur Destabilisierung des ' *β -barrels*' und zu einem partiellen Verschuß des Kanals. Antikörper gegen die N-terminale Domäne des VDAC zeigen allerdings keinen Einfluß auf die Kanaleigenschaften, wodurch eine mögliche Beteiligung am '*gating*'-Mechanismus zweifelhaft ist (Benz et al. 1992).

Bis jetzt ist noch unklar, ob der VDAC in situ auch durch Membranpotentiale in einen fast geschlossenen Zustand wechselt, wie es in PLB-Experimenten induziert wurde (Hodge und Colombini 1997, Zizi et al. 1998), da die Mitochondrienmembran (wie auch die SR-Membran) nicht signifikant elektrogen ist. Wahrscheinlicher aber ist, daß der VDAC in vivo mit endogenen Liganden wechselwirkt. β -NADH senkt die Spannungsabhängigkeit des VDAC und könnte somit die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran regulieren (Zizi et al. 1994, Holden und Colombini 1993). Außerdem vermindert es die Permeabilität der Membran für Adeninnucleotide um den Faktor 6 (Lee et al. 1994). α -NADH und β -NAD⁺ bewirken diese Effekte nicht.

Synthetische Polyanionen modulieren ebenfalls die Spannungsabhängigkeit des Kanals (Colombini et al. 1987, Heiden et al. 1996) und schränken die Diffusion von Adeninnucleotiden ein (Benz et al. 1990, Liu und Colombini 1992). Eine vollständige Hemmung

konnte nur durch Königs Polyanion erzielt werden (Colombini et al. 1987 und 1996, Colombini 1989).

Zn^{2+} reduziert die Spannungsabhängigkeit des Kanals, wohingegen Bariumionen keinen Effekt zeigen (Hellmann et al. 1999).

Der Cl^- -Kanal-Inhibitor DIDS hemmt den VDAC in PLB-Experimenten, indem er dessen Spannungsabhängigkeit vermindert. Diese Studie gab erste Hinweise darauf, daß der VDAC Teil eines Cl^- -Kanal-Komplexes darstellt (Thinnes et al. 1990). Man geht davon aus, daß eukaryotisches Porin die Kanalkomponente des ORDIC- (*'outwardly-rectifying depolarisation-induced chloride channel'*) Komplexes bildet (Thinnes und Reymann 1997). Jedoch konnte auch eine Komplexbildung mit dem Benzodiazepin-Rezeptor und dem Adeninnucleotid-Translokator sowie diversen Kinasen beobachtet werden (McEnery et al. 1991, Kinally et al. 1993, Brdiczka 1991).

Neben der Bindung des Stilben-Derivats (Thinnes et al. 1994) konnte auch die von ATP über eine Nucleotid-Bindungsstelle (GYGFG) nachgewiesen werden (Flörke et al. 1994).

Der VDAC wird in vivo durch die Wechselwirkung mit einem oder mehreren Modulatoren reguliert, die sich im Intermembran-Spalt der Mitochondrien befinden (Benz 1994 und Colombini et al. 1996). Strukturelle und funktionelle Änderungen durch niedrigen pH-Wert und Membranpotentiale imitieren in vitro die Effektor-induzierten Konformationsänderungen. Ein mitochondriales Modulator-Protein wurde von Liu und Colombini postuliert (1994), das den Wechsel zu Stadien mit niedrigerer Leitfähigkeit (*'lower-conducting substates'*) erleichtert.

Vor kurzem wurde das Vorkommen des VDAC im SR von verschiedenen Arbeitsgruppen demonstriert (Lewis et al. 1994, Shoshan-Barmatz et al. 1996a, Junankar et al. 1995). Jürgens et al. (1995) konnten den Kanal allerdings nur in den transversalen Tubuli und nicht im longitudinalen SR nachweisen.

Die Funktion des VDAC in SR-Membranen ist noch nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich minimiert er Potentialänderungen, die während der Calcium-Freisetzung und -Aufnahme entstehen. Zudem erlaubt er den Austausch von ATP/ADP und anorganischem Phosphat zwischen dem SR-Lumen und dem Cytoplasma. ATP wird z.B. für die Phosphorylierung luminaler Proteine (Sarcalumenin, Calsequestrin und HCP) benötigt (Shoshan-Barmatz et al. 1996b).

Der Kanal wird, wie der mitochondriale VDAC, spannungsabhängig durch DIDS und DCCD gehemmt und dadurch der ATP-Transport in native SR-Vesikel reduziert (Shoshan-Barmatz 1996a).

1.6 G-Proteine im SR

Heterotrimere G-Proteine koppeln membranständige, heptahelicale Rezeptoren an ihre zellulären Effektorsysteme wie Ionenkanäle oder Enzyme. Nach der Stimulation durchlaufen die G-Proteine einen Aktivierungs- und Deaktivierungs-Zyklus. Der Agonist-Rezeptor-Komplex tritt in Wechselwirkung mit der G_{α} -Untereinheit und führt zum Austausch von GDP durch GTP. Die G_{α} -Untereinheit dissoziiert von dem β/γ -Dimer ab, und beide modulieren über 'second messenger' die Aktivität von Effektorproteinen. Durch Hydrolyse des gebundenen GTP kommt es zur Reassoziierung des trimeren Komplexes und somit zur Deaktivierung.

Seit einiger Zeit wird allerdings auch eine direkte Wechselwirkung von G-Proteinen mit Calcium-, Kalium- und Chloridkanälen diskutiert (Dolphin 1990, Somasundaram und Tregear 1993, Sun et al. 1993, Ismailov et al. 1996).

G_{α} -Untereinheiten werden in vier Gruppen unterteilt: α_s , $\alpha_{i_o/t}$, α_q , $\alpha_{12/13}$, die sich jeweils in ihren biochemischen und strukturellen Eigenschaften ähneln. Die β - und γ -Untereinheiten bilden stabile Dimere, die erst durch Denaturierung getrennt werden können. Bis jetzt wurden 5 β - und 12 γ -Untereinheiten beschrieben (Freissmuth et al. 1999).

In den T-Tubuli und in den Vesikeln des sarcoplasmatischen Reticulums konnten sowohl heterotrimere als auch 'kleine' G-Proteine nachgewiesen werden (Doucet und Tuana 1991, Scherer et al. 1987).

Einige G_{α} -Untereinheiten können durch Pertussistoxin und Cholera toxin spezifisch ADP-ribosyliert werden. Weitere Nachweismethoden bieten die Photoaffinitätsmarkierung durch [32 P]-GTP, die Immunodetektion sowie die Wirkung verschiedener GTP-Derivate. Im LSR konnten die $G_{s\alpha}$ -Untereinheit und mehrere kleine G-Proteine detektiert werden (Kutchai et al. 1993). $G_{i\alpha}$, $G_{s\alpha}$ und $G_{q\alpha}$ sind in HSR- und LSR-Vesikeln lokalisiert (Carrasco et al. 1994). Die T-Tubuli enthalten den größten Anteil GTP-bindender Proteine.

Man geht davon aus, daß G-Proteine in die Erregungs-Kontraktions-Kopplung involviert sind, da $GTP\gamma S$ den Ca^{2+} -Release stimuliert (Carney-Anderson und Donaldson 1994, Villaz et al.

1989) und eine Co-Lokalisation mit spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen (DHPR) nachgewiesen werden konnte (Toutant et al. 1990). Welche regulatorischen Funktionen G-Proteine in den Vesikeln des HSR und besonders des LSR einnehmen, konnte bis jetzt noch nicht geklärt werden.

Suramin, ein bekannter P2-Purinoceptor-Antagonist, und dessen Derivate hemmen G-Proteine in mikromolaren Konzentrationen, indem sie die spontane Freisetzung von GDP durch die G_{α} -Untereinheit verhindern. Außerdem zerstören sie die ternäre Komplexbildung zwischen Agonist-Rezeptor-G-Protein.

Eine Wirkung von Fettsäuren auf G-Proteine ist ebenfalls bekannt. Arachidonsäure vermindert die GTPase-Aktivität von G-Proteinen in der Apikalmembran der Lunge (Mukhopadhyay et al. 1997). Auch andere ungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure und Ölsäure zeigen diesen Effekt.

Zielsetzung dieser Arbeit:

Ziel der Arbeit war die Aufreinigung und eindeutige Identifizierung des VDAC aus den Vesikeln des sarcoplasmatischen Reticulums. Weiterhin sollte dessen Funktion im SR untersucht werden. Durch Affinitätschromatographie und -markierung mit speziell synthetisierten Anionenkanal-Inhibitoren sollten potentielle Kanalproteine detektiert und isoliert werden. Besondere Beachtung fand hierbei eine mögliche Regulation von Anionenkanälen durch direkte Wechselwirkung mit G-Proteinen.

2. Ergebnisse

2.1 Isolierung und Charakterisierung von Vesikeln des sarcoplasmatischen Reticulums

2.1.1 Isolierung von SR-Vesikeln

Die Präparation nativer Vesikel des sarcoplasmatischen Reticulums (SR) aus der Skelettmuskulatur von Kaninchen erfolgte durch differentielle Zentrifugation nach einer von de Meis und Hasselbach modifizierten Methode (De Meis und Hasselbach 1971).

Das Muskelfleisch der Hinterläufe eines frisch geschlachteten Kaninchens wurde zerkleinert, in einem EDTA- und Kaliumchlorid-haltigen Phosphatpuffer aufgenommen und homogenisiert. Durch eine Zentrifugation bei niedriger g-Zahl wurden Sehnen, Fett und Myofibrillen sedimentiert. Durch erneute Zentrifugation des Überstandes mit höherer g-Zahl konnten die Mitochondrien entfernt werden. Bei dem dritten Zentrifugationsschritt trennten sich die SR-Vesikel von den löslichen Muskelproteinen Aktin, Tropomyosin und Troponin, die im Überstand verblieben. Das Sediment wurde dann in einen KCl-haltigen Triethanolamin-Puffer aufgenommen, homogenisiert und erneut zentrifugiert, um weitere Muskelproteine zu entfernen. Die SR-Vesikel wurden in einem Saccharose-, Mg^{2+} -ATP- und Kaliumchlorid-haltigen Puffer stabilisiert und durch vier Ultrazentrifugationsschritte weiter aufgereinigt.

Das die SR-Vesikel enthaltende Sediment wurde in einem KCl-haltigen Triethanolamin-Puffer homogenisiert, portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80^{\circ}C$ gelagert.

Das den Puffern zugesetzte β -Mercaptoethanol (1 mM) sollte die Proteine und Lipide des SR während der Präparation vor der Oxidation durch Sauerstoff schützen. Der letzte Puffer enthielt kein Reduktionsmittel, um eventuell störende Einflüsse bei den folgenden Experimenten auszuschließen. Auch der Protease-Inhibitor Leupeptin (0.5 $\mu g/ml$) wurde im letzten Schritt nicht zugesetzt.

Die Proteinkonzentration der isolierten Vesikel wurde nach einer modifizierten Biuret-Methode (Gornall et al. 1949) ermittelt und lag präparationsabhängig zwischen 15 und 23 mg/ml bei einer Gesamtausbeute von 200-430 mg je 500 g Muskelfleisch.

2.1.2 Reinheit der SR-Präparation

Durch Probenentnahme der jeweiligen Sedimente und Überstände während der Aufreinigung konnte der Verlauf der Präparation mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert und die Reinheit der SR-Präparation überprüft werden. Die nach dem letzten

Aufreinigungsschritt entnommene Probe zeigt das charakteristische Proteinmuster nativer SR-Vesikel. Die Ca^{2+} -ATPase erscheint als Hauptbande mit einem Molekulargewicht von 110 kDa (Mac Lennan et al. 1985), die Dimerform bei 220 kDa ist dagegen nur schwach zu erkennen. Weitere prominente Banden bilden der Ryanodin-Rezeptor (RyR) und das 53 kDa Glycoprotein (GP-53). Gelegentlich kann eine Verunreinigung der Präparation durch Phosphorylase b (97 kDa) auftreten, die dann direkt unterhalb der Ca^{2+} -ATPase erscheint.

Präparationen mit dem in Abb. 2-1 gezeigten Bandenmuster wurden weiteren Kontrollexperimenten unterzogen, um die Intaktheit der Vesikelmembranen zu überprüfen.

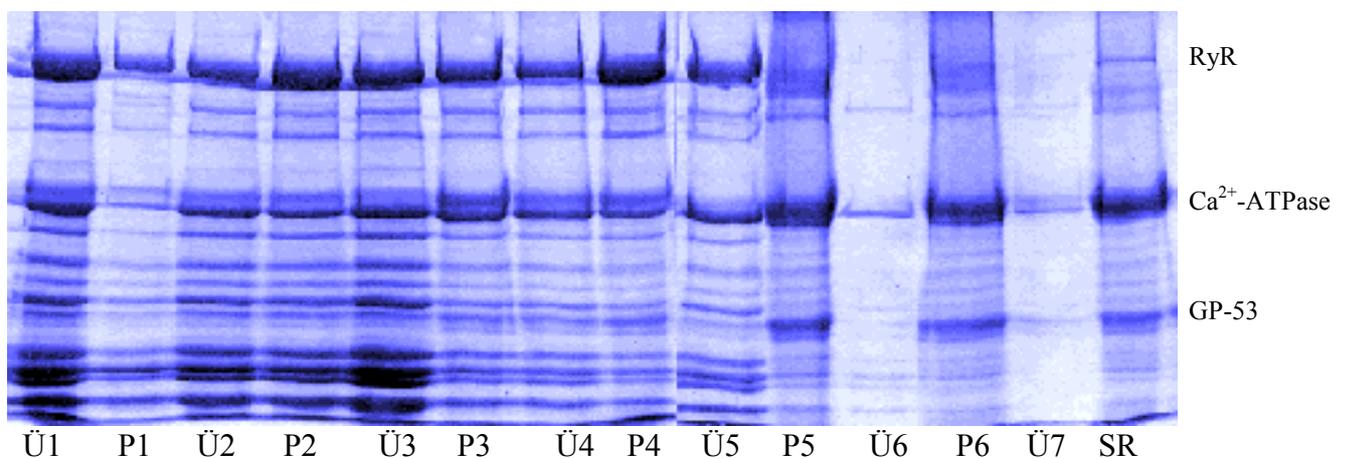


Abb. 2-1 SDS-PAGE (7.5% Polyacrylamid, Coomassie Blau-Färbung) der Präparationsschritte

Ü: Überstand, P: Pellet, SR: aufgereinigte SR-Vesikel

2.1.3 Bestimmung der Hydrolyseaktivität der Ca^{2+} -ATPase

Calciumionen werden unter ATP-Verbrauch in das Lumen der SR-Vesikel transportiert. Die Phosphorylierung des Transporterproteins und die nachfolgende Abspaltung von anorganischem Phosphat führen zu Konformationsänderungen innerhalb des Moleküls, die den Transport ermöglichen. Das bei der ATP-Hydrolyse freigesetzte anorganische Phosphat ist der Menge des transportierten Calciums proportional und wurde mit der Methode von Fiske und SubbaRow (Fiske und SubbaRow 1925) bestimmt. Die zunehmende Besetzung luminaler Ca^{2+} -Bindungsstellen der Ca^{2+} -ATPase hemmt den Transport. Die Hydrolyseaktivität beträgt bei intakten Vesikeln und einer freien Calciumkonzentration von 50 μM und 1 mM ATP durchschnittlich 0.3 μMol Phosphat pro mg und Minute.

Durch Zugabe des Calciumionophors Calcimycin (A 23187) wird die Calcium-Anreicherung in den Vesikeln verhindert und somit die luminaler Hemmung ausgeschaltet. Dies führt zu einer 2-3

fach verstärkten Hydrolyseaktivität der Ca^{2+} -ATPase im Vergleich zu intakten Vesikeln. Bei undichten Vesikeln ist dagegen durch ihre ohnehin gesteigerte Hydrolyseaktivität keine weitere Zunahme zu erkennen.

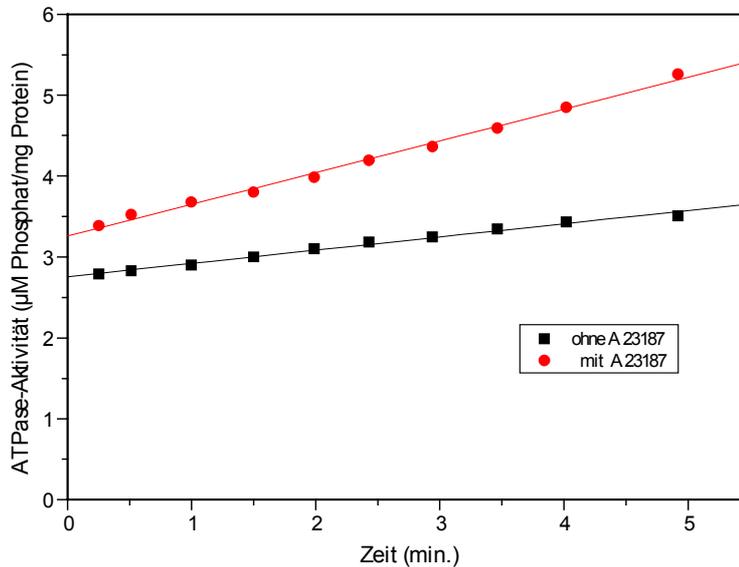


Abb. 2-2 Hydrolyseaktivität der Calcium-ATPase in An- und Abwesenheit des Calciumionophors A 23187

2.1.4 Transportaktivität der ATPase

Die Intaktheit der SR-Vesikel sowie ihre Speicherkapazität konnte durch die Aufnahme von $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Ionen getestet werden. Die maximale Calciumaufnahme liegt bei 100-200 nMol/mg Protein und läßt sich durch Zugabe von Oxalat (5mM), das Calcium präzipitiert, um das 50-100 fache steigern (Hasselbach und Makinose 1963).

Der Transport wurde mit der Filter-Assay-Methode nach Martonosi und Feretos (1964) gemessen. In intakten Vesikeln lag die Calciumtransportrate bei 0.7-0.9 $\mu\text{Mol/mg Protein pro Minute}$ und einer maximalen Calciumakkumulation von 5-10 $\mu\text{Mol/mg Protein}$. Bei undichten Vesikeln strömt das Calcium bereits nach ca. 15 Minuten wieder aus.

2.1.5 Auftrennung der Vesikelpräparation in 'heavy' und 'light' SR

Die Vesikelpräparation konnte mittels diskontinuierlicher Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation weiter aufgetrennt werden. Es bildeten sich dabei zwei Fraktionen, das 'heavy' SR (HSR) und das 'light' SR (LSR). Die 'light'-Vesikel setzen sich aus dem longitudinalen Bereich des SR zusammen (Meissner 1975) und enthalten zu ca. 90% die Ca^{2+} -ATPase. Die 'heavy'-Vesikel bestehen vorwiegend aus den terminalen Cisternen des SR (Mitchell et al. 1983) und enthalten nur 55-65% Ca^{2+} -ATPase. Der Anteil an Calcium-Release-Kanälen (RyR) ist in dieser Population am höchsten. In einigen Präparationen trat noch eine dritte Vesikel-Population auf, die als 'intermediate' bezeichnet wird (Meissner 1975). Sie setzt sich aus den Bereichen des longitudinalen SR und der terminalen Cisternen zusammen.

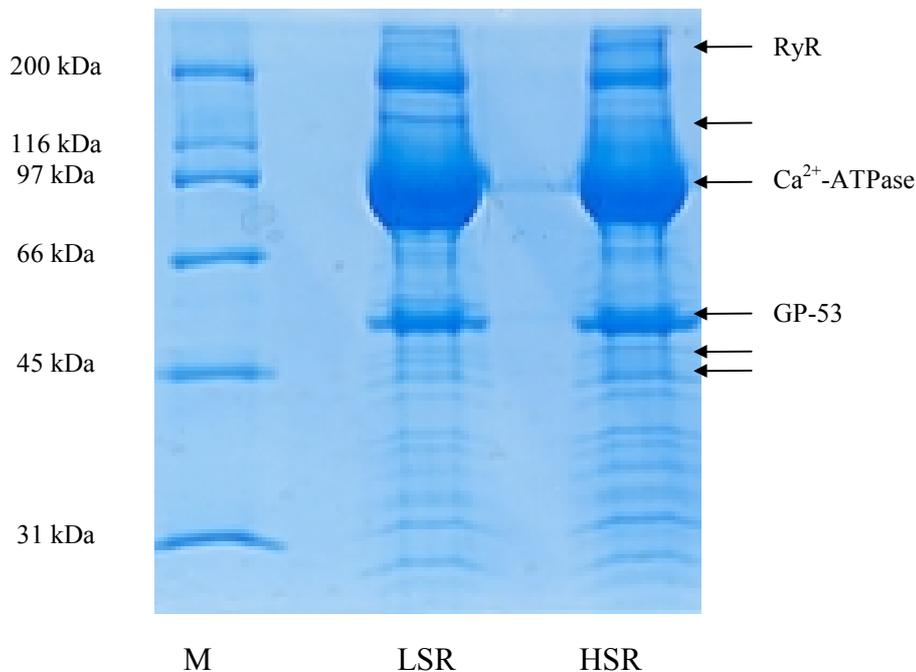


Abb. 2-3 SDS-PAGE (10% Polyacrylamid, Coomassie Blau-Färbung) der HSR- und LSR-Fraktionen

Das Proteinmuster der beiden SR-Populationen ist weitgehend identisch. Der Calcium-Release-Kanal (RyR) ist in den HSR-Vesikeln jedoch stärker vertreten. Auch in anderen Bereichen treten Intensitätsverschiebungen einzelner Banden auf, die durch Pfeile gekennzeichnet sind.

2.2 Detektion, Isolierung und Sequenzierung des VDAC

Der VDAC (*'voltage-dependent anion-selective channel'*) wurde zuerst in der äußeren Mitochondrienmembran detektiert, wo er den Transport verschiedener Metabolite, wie Succinat, Phosphat, Citrat und Adeninnucleotide, reguliert (Hodge und Colombini 1997, Benz et al. 1988, Rostovtseva und Colombini 1997). Neuere Studien gaben jedoch Hinweise auf die Expression des Kanals in anderen Zellkompartimenten (Thinnes et al. 1989, Bureau et al. 1992, Cole et al. 1992, Puchelle et al. 1993, Lisanti et al. 1994, Jakob et al. 1995, Reymann et al. 1995). Kurz vor dem Beginn dieser Arbeit konnte der VDAC auch in der Membran des sarcoplasmatischen Reticulums nachgewiesen werden (Junankar et al. 1995, Shoshan-Barmatz et al. 1996a). Andere Untersuchungen deuteten jedoch darauf hin, daß der Kanal nur in den transversalen Tubuli (T-Tubuli) lokalisiert ist (Jürgens et al. 1995). Deshalb sollte das Vorkommen des VDAC in den in unserem Arbeitskreis isolierten Vesikeln des sarcoplasmatischen Reticulums überprüft werden.

2.2.1 Detektion des VDAC in SR-Vesikeln

Die Vesikel des SR sowie die durch Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation gewonnenen HSR- und LSR-Vesikel wurden mittels 12% iger SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde ohne vorheriges Absättigen mit Magermilchpulver eine Stunde mit einem monoklonalen Antikörper gegen den VDAC 1 aus humanen B-Lymphozyten (Porin 31HL) inkubiert (Verd. 1:150000) (Winkelbach et al. 1994, Babel et al. 1991). Das Epitop des Antikörpers ist im N-terminalen, α -helikalen Bereich des VDAC lokalisiert. Dieser Teil ragt im mitochondrialen VDAC in das Cytosol (Thinnes et al. 1989). Nach dem Entfernen überschüssiger Antikörper wurde die Membran mit einem zweiten Antikörper, der gegen den F_c-Teil des ersten Antikörpers gerichtet und mit Peroxidase gekoppelt ist (Verd. 1:15000), inkubiert. Die Membran wurde erneut gewaschen, und die Lokalisation des VDAC-Antikörpers durch verstärkte Chemilumineszenz auf Röntgenfilmen detektiert.

Der monoklonale Antikörper reagierte mit einem Protein bei 35 kDa. In manchen SR-Präparationen trat zusätzlich eine Markierung bei 28 kDa auf. Ob es sich dabei um eine andere VDAC-Isoform oder lediglich um ein proteolytisches Fragment des VDAC handelt, ist noch unklar, da die Bande aufgrund geringer Proteinmengen nicht sequenziert werden konnte. Der VDAC ist jedoch gegenüber dem Verdau durch Proteasen sehr resistent (De Pinto et al. 1991, Shoshan-Barmatz et al. 1996a). Zudem wurden während der Aufreinigung zwei verschiedene Protease-Inhibitoren eingesetzt. Die Vermutung liegt demnach nahe, daß es sich bei der 28 kDa

Bande um eine weitere Isoform des VDAC handelt, die jedoch wesentlich schwächer in den SR-Präparationen vertreten ist.

Die LSR-Fraktion zeigte im Gegensatz zu der HSR-Fraktion nur eine schwache Antikörpermarkierung. Dies läßt darauf schließen, daß der VDAC vorwiegend in den terminalen Cisternen lokalisiert ist. Da der VDAC jedoch in beiden SR-Fraktionen nachgewiesen werden konnte, wurde bei den folgenden Aufreinigungsschritten auf eine Auftrennung der SR-Vesikel in HSR und LSR verzichtet.

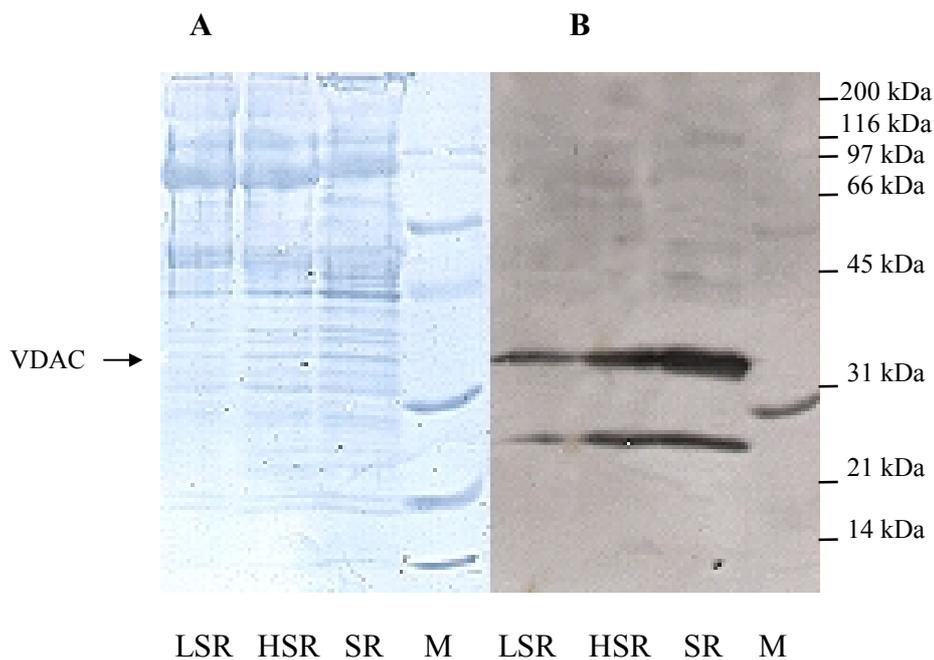


Abb. 2-4 Detektion des VDAC in den Fraktionen des SR, HSR und LSR

A: PVDF-Membran nach Amidoschwarz-Färbung

B: Chemiluminogramm von A nach Inkubation mit einem monoklonalen anti-VDAC Antikörper

M: Molekulargewichtsstandard

2.2.2 Isolierung des VDAC aus SR-Vesikeln

Nach der Detektion des VDAC in den Vesikeln des sarcoplasmatischen Reticulums sollte das Protein aufgereinigt und isoliert werden, um durch Sequenzanalyse eine weitere Charakterisierung vornehmen zu können. Zudem sollten Anionentransportmessungen an dem Kanal nach der Rekonstitution in künstliche Vesikel durchgeführt werden.

Die Aufreinigung erfolgte leicht modifiziert nach einer Methode von Shoshan-Barmatz et al. (1996a). Die SR-Vesikel wurden mit dem nicht-ionischen Detergenz Nonidet P-40 solubilisiert, und die verbleibenden Membranbestandteile durch Ultrazentrifugation abgetrennt. Die Membranproteine wurden dann auf eine Spermin-Agarose-Säule aufgetragen. Der größte Teil der SR-Proteine wurde an der Säulenmatrix adsorbiert. Der VDAC jedoch befand sich im Durchlauf (100-150 µg/ml). Die Elution der restlichen Proteine erfolgte mit 300 mM NaCl.

Die einzelnen Fraktionen wurden mittels 12% iger SDS-PAGE analysiert. Das Auftreten des VDAC in den einzelnen Fraktionen wurde durch Immunodetektion überprüft.

Die VDAC-enhaltenden Fraktionen sollten durch Verwendung des Kationenaustauschers Carboxymethyl-Cellulose (CM-Cellulose) weiter aufgereinigt werden. Zur Elution des Proteins wurden verschiedene Stufen- und lineare Gradienten getestet. Unabhängig von den verwendeten Gradienten erfolgte die Elution des VDAC immer diffus über mehrere Fraktionen hinweg. Die einzelnen Proben mußten deshalb stark aufkonzentriert werden, was wiederum zu hohen Verlusten führte. Mit dieser Methode konnte nur ca. 0.5 µg aufgereinigter VDAC pro mg SR-Vesikel erhalten werden.

Auch durch die Verwendung anderer Säulenmaterialien (Hi Trap Heparin-Säule, DEAE-Sephadex, CM-Sephadex) ließ sich keine verbesserte Ausbeute erzielen.

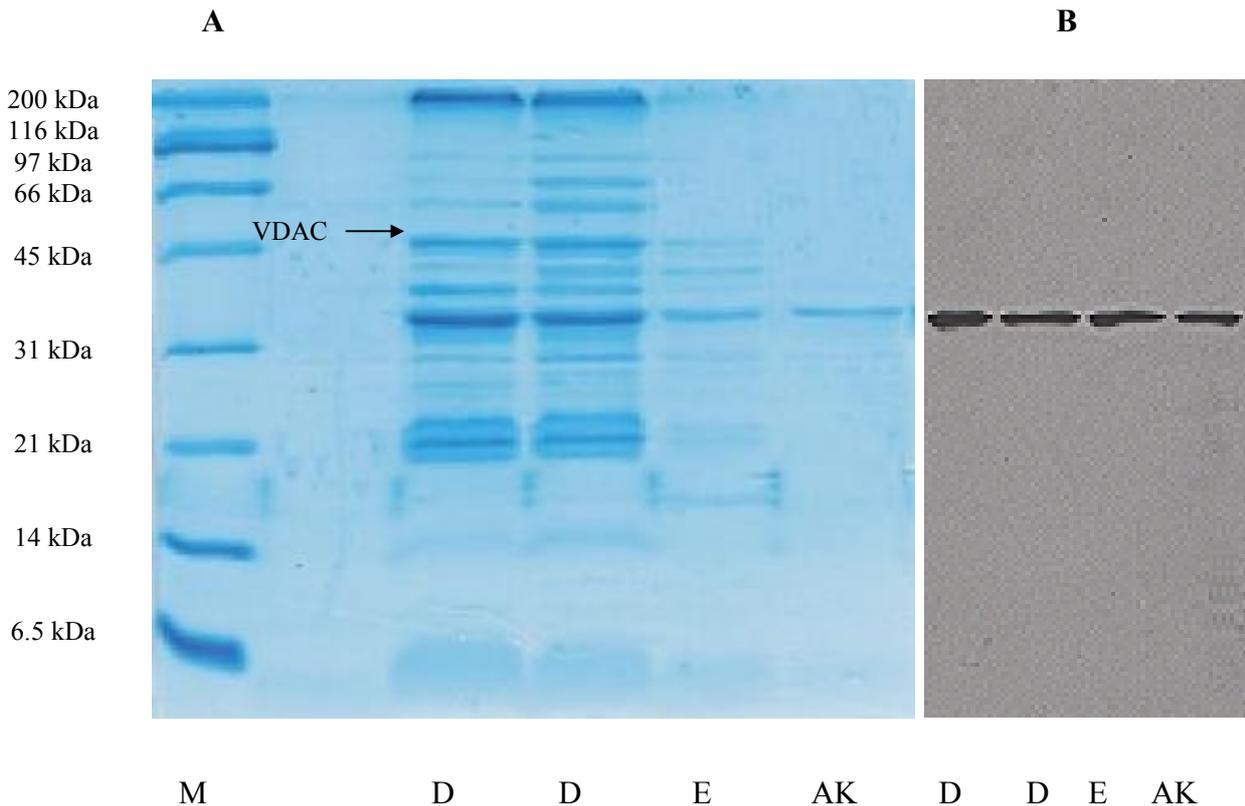


Abb. 2-5 Aufreinigung des VDAC aus den Vesikeln des sarcoplasmatischen Reticulums

A: SDS-PAGE (15% Polyacrylamid; Coomassie Blau-Färbung)

B: Entwickelter Röntgenfilm nach dem Elektrotransfer von A auf eine PVDF-Membran und Detektion mit einem monoklonalen VDAC-Antikörper.

D: Durchlauf der Spermin-Agarose-Säule

E: Eluat der CM-Cellulose-Säule nach Methanol-Chloroform-Fällung

AK: Affinitätschromatographie mit einem anti-VDAC Antikörper (s. 2.2.2.1).

2.2.2.1 Affinitätschromatographie mittels immobilisiertem anti-VDAC Antikörper

Durch Affinitätschromatographie sollte eine spezifische Anreicherung des nativen VDAC erzielt werden. Als Ligand diente ein monoklonaler anti-VDAC Antikörper, der kovalent an Bromcyan-aktivierte Sepharose 4B gebunden wurde. Der Durchlauf der Spermin-Agarose-Säule wurde mittels Vakuumkonzentration eingeengt und mit dem Säulenmaterial inkubiert. Nach dem Spülen der Säule konnte mit einem pH-Shift auf pH 4 der VDAC eluiert werden. Eine Erhöhung der Ionenstärke auf 1 M NaCl führte nicht zur Elution des VDAC. Der Nachweis erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben.

2.2.2.2 Affinitätschromatographie mit 4-Acetamido-4'-isothiocyanatostilben-2.2'-disulfonat (SITS)

Das Stilbenderivat 4.4'-Diisothiocyanatostilben-2.2'-disulfonat (DIDS) gilt bislang als eines der stärksten Inhibitoren der Anionentransportsysteme des SR mit einer halbmaximalen Hemmkonzentration (I_{50}) von 4 μM und einer Restaktivität von 5-10% der Kontrolle (Schuster 2001). Der VDAC bindet die Stilbendisulfonatgruppe dieses Chloridkanal-Inhibitors (Thinnes et al. 1994). Durch Affinitätschromatographie mit dem N-acetylierten DIDS-Analogon 4-Acet-amido-4'-isothiocyanatostilben-2.2'-disulfonat (SITS) sollte eine effektivere Aufreinigung des VDAC erzielt werden. DIDS hemmt jedoch nicht nur Anionenkanäle im SR, sondern auch die Ca^{2+} -Akkumulation durch die Ca^{2+} -ATPase in rekonstituierten Vesikeln (Hemling 1994, Schuster 1995), vermutlich indem es eine intramolekulare Quervernetzung zweier Lysinreste im Nucleotidbindungsbereich bewirkt (Campbell und Mac Lennan 1980, Kasai und Taguchi 1981, Kasai 1981, Dupont 1977). Lange Zeit ging man davon aus, daß die Ca^{2+} -ATPase selbst als Vermittler des Anionentransports im SR fungiert, da mit der Ca^{2+} -Akkumulation auch eine stöchiometrische Anreicherung von Anionen in das SR-Lumen einherging (Hasselbach und Makinose 1963). Jedoch wiesen rekonstituierte Vesikel, die aufgereinigte Ca^{2+} -ATPase enthielten, keine Permeabilität für SO_4^{2-} auf (Schuster 2001). Eine direkte Vermittlung des Anionentransports durch die Ca^{2+} -ATPase ist demnach auszuschließen. Auch die Wirkung von DIDS scheint auf beide Systeme unterschiedlich zu erfolgen.

Bei der Affinitätschromatographie mit SITS-Sepharose wurde in einem Vorversuch vorwiegend die Ca^{2+} -ATPase an der Säule adsorbiert. Da die Ca^{2+} -ATPase den Hauptproteinanteil des SR ausmacht, können dadurch die Bindungsstellen sehr schnell abgesättigt werden und somit für die in wesentlich geringeren Konzentrationen auftretenden Anionenkanäle nicht mehr zugänglich sein. Um die Ca^{2+} -ATPase zu eliminieren, wurde das SR nach der Solubilisierung über eine Spermin-Agarose-Säule aufgetrennt und mit dem Durchlauf weitergearbeitet.

SITS wurde über die Thiocyanatgruppe an EAH-Sepharose 4B gekuppelt und der Durchlauf der Spermin-Agarose-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0-300 mM NaCl. Die Analyse der Fraktionen ergab, daß der VDAC nicht an dem Säulenmaterial redardiert wurde und deshalb nur im Durchlauf detektiert werden konnte. Auch Änderungen der Puffersysteme und die Reduktion der Detergenz-Konzentration führten nicht zur Bindung des VDAC an die Säule.

Die Aufreinigung mittels SITS-Affinitätschromatographie eignete sich nicht zur Isolierung des VDAC aus den Membranen des sarcoplasmatischen Reticulums, obwohl sie von verschiedenen

Arbeitsgruppen bei der Isolation des VDAC aus den Membranen humaner B-Lymphozyten und des mitochondrialen VDAC beschrieben wurde (Jürgens et al. 1991, Thinnes et al. 1994). Die Möglichkeit, daß der Kanal vollständig von den Detergenz-Micellen verdeckt wird und deshalb keine Bindung mit dem Säulenmaterial eingehen kann, ist sehr unwahrscheinlich. Dieses Problem trat zwar Detergenz-abhängig bei der Aufreinigung des mitochondrialen VDAC auf (Palmieri und De Pinto 1989, De Pinto et al. 1989), jedoch nicht mit dem Detergenz Nonidet P-40. Die Anreicherung des solubilisierten VDAC aus den Vesikeln des SR über Affinitätschromatographie mit dem VDAC-Antikörper als Liganden sowie die Adsorption an CM-Cellulose sprechen zudem gegen diese Annahme.

Das Eluat enthielt geringe Mengen Ca^{2+} -ATPase und eine Bande bei ca. 50-55 kDa, bei der es sich um das Glycoprotein GP-53 handeln könnte. Da die einzelnen Proteine im Eluat nur sehr schwach sichtbar waren, gelang es nicht, andere Proteine auffindig zu machen, die eine Affinität zu SITS aufweisen und eventuell am Anionentransport des SR beteiligt sind. Außerdem ist nicht auszuschließen, daß diese Proteine bereits im ersten Aufreinigungsschritt eliminiert wurden. Es müssen deshalb effiziente Anionenkanal-Inhibitoren gefunden werden, die nicht oder nur in geringem Maße mit der Ca^{2+} -ATPase wechselwirken, um eine gezielte Aufreinigung von Anionenkanälen zu ermöglichen.

2.2.3 Aufreinigung des VDAC durch präparative SDS-PAGE

Da die durch säulenchromatographische Auftrennung erzielten Proteinmengen für eine Sequenzierung zu gering waren, wurde eine Anreicherung des VDAC über präparative Gele gewählt.

Der Durchlauf der Spermin-Agarose-Säule wurde durch Vakuumkonzentration und Methanol-Chloroform-Fällung eingengt und mittels präparativer SDS-PAGE aufgetrennt. Die VDAC-Banden wurden ausgeschnitten und durch Elektroelution zurückgewonnen. Um den Proteinverlust bei der Rückgewinnung aus den Gelstücken möglichst gering zu halten, wurde bei der Färbe- und Entfärbelösung auf Essigsäure verzichtet (Baumgärtner 1998).

Vor dem Start der Elektroelution wurden die Gelstücke in Rückelutionspuffer äquilibriert (Hunkapiller et al. 1983). Bei einer angelegten Spannung von 300 V konnte das Protein in 5 Stunden zurückgewonnen werden.

2.2.4 Spaltung des VDAC mit Bromcyan

Ein Sequenzierungsversuch ergab, daß der VDAC N-terminal blockiert ist, was auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde. Wahrscheinlich handelt es sich um eine Acetylierung (Jürgens et al. 1991, Thinnes und Reymann 1997).

Nach der Sequenzanalyse bekannter VDAC-Isoformen aus Mensch, Maus und Ratte sollten nach der Spaltung mit Bromcyan (BrCN) zwei bis vier unterschiedliche Fragmente entstehen. Die Spaltung findet hochspezifisch auf der C-terminalen Seite von Methionin statt, wobei der nucleophile Angriff durch den Schwefel der Thioethergruppe des Methionins am C-Atom des polarisierten Bromcyans erfolgt.

Nach der Elektroelution wurde die Proteinlösung mittels Chloroform-Methanol gefällt. Danach wurde das Protein in 70% iger Ameisensäure gelöst und Bromcyan (15 mg/ml) zugegeben. Die Spaltungsdauer betrug 17 Stunden. Nach Abschluß der Reaktion wurden unter Zugabe von Wasser flüchtige Bestandteile wie Bromcyan und seine Reaktionsprodukte durch Vakuumkonzentration eliminiert. Zur Auftrennung der Proteinfragmente wurde eine 18% ige SDS-PAGE verwendet. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteinfragmente auf eine PVDF-Membran elektrotransferiert und mit Coomassie Blau angefärbt. Durch die Bromcyanspaltung entstanden zwei Fragmente mit einem Molekulargewicht von 14 kDa und 21 kDa. Eine weitere Proteinbande trat bei 35 kDa auf. Hierbei handelt es sich um ungespaltenen VDAC.

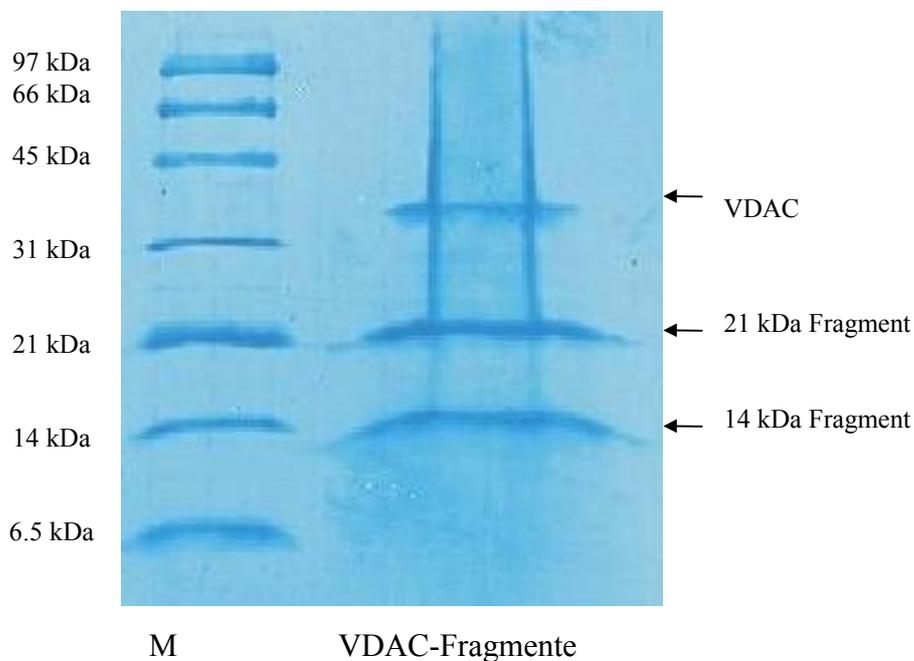


Abb. 2-6 Identifizierung der VDAC-Fragmente nach Spaltung mit Bromcyan
PVDF-Membran nach Elektrotransfer (Coomassie Blau-Färbung), M: Marker

2.2.5 Identifizierung der Bromcyan-Fragmente des VDAC

Die beiden Banden wurden ausgeschnitten und einer Partialsequenz-Analyse unterzogen. Die Proteinsequenzierungen wurden von Dr. K.-H. Mann, MPI für Biochemie, Abt. Proteinchemie in Martinsried durchgeführt. Die erhaltenen Partialsequenzen stimmten mit der fast zeitgleich erschienenen Sequenz des VDAC 1 aus dem Cornea-Endothel von *Oryctolagus cuniculus* (Kaninchen) überein (EMBL AF209725). Das sich aus der cDNA ergebende Molekulargewicht dieser Isoform beträgt 30.7 kDa. Abweichungen zu dem apparenten Molekulargewicht des VDAC aus den Vesikeln des SR können durch posttranslationale Modifikationen wie Glycosylierungen hervorgerufen werden.

Das 21 kDa-Fragment ist identisch mit dem N-Terminus des VDAC 1. Da sich die Isoformen 1 und 2 hauptsächlich in diesem Bereich unterscheiden, handelt es sich demnach sehr wahrscheinlich um die Isoform 1 des VDAC. Die Detektion der Aminosäuren war sehr schwach, was dadurch begründet sein könnte, daß nur eine partielle Abspaltung der blockierten Methionine stattgefunden hat und deshalb wenige Peptid-Fragmente einer Sequenzierung zugänglich waren. Es konnten 10 Aminosäuren mit folgender Sequenz detektiert werden.

Partialsequenz des 21 kDa- Fragmentes:

AVPPTYADLG

Bei der unteren Bande ließen sich dagegen 35 Aminosäuren ermitteln.

Partialsequenz des 14 kDa-Fragmentes:

NFETAKSRVTQSNFAVGKYKTDEFQLHTNVNDGTEF

2.2.6 Sequenzvergleich von VDAC-Isoformen verschiedener Organismen

21 kDa-Fragment

²AVPPTYADL G

Rabbit VDAC 1	¹ MAVPPTYADL	GKSARDVFTK	GYGFGLIKLD
Human VDAC 1	¹ MAVPPTYADL	GKSARDVFTK	GYGFGLIKLD
Rat VDAC 1	¹ MAVPPTYADL	GKSARDVFTK	GYGFGLIKLD
Human VDAC 2	¹ M ATHGQTCARP	MCIPPSYADL	GKVARDIFNK GFGFGLVKLD

Rabbit VDAC 1	³¹ LKTKSENGLE	FTSSGSANTE	TTKVTGSLET	KYRWTEYGLT
Human VDAC 1	³¹ LKTKSENGLE	FTSSGSANTE	TTKVTGSLET	KYRWTEYGLT
Rat VDAC 1	³¹ LKTKSENGLE	FTSSGSANTE	TTKVTGSLET	KYRWTEYGLT
Human VDAC 2	⁴² VKTKSCSGVE	FSTSGSSNTD	TGKVTGTLET	KYKWCEYGLT

Rabbit VDAC 1	⁷¹ FTEKWNTDNT	LGTEITVEDQ	LARGLKLTFD	SSFSPNTGKK
Human VDAC 1	⁷¹ FTEKWNTDNT	LGSEITVEDQ	LARGLKLTFD	SSFSPNTGKK
Rat VDAC 1	⁷¹ FTEKWNTDNT	LGSEITVEDQ	LARGLKLTFD	SSFSPNTGKK
Human VDAC 2	⁸² FTEKWNTDNT	LGTEIAIEDQ	ICQGLKLTFD	TTFSPNTGKK

Rabbit VDAC 1	¹¹¹ NAIKTGYKR	EHINLGCDVD	FDIAGPSIRG	ALVLGYEGWL
Human VDAC 1	¹¹¹ NAIKTGYKR	EHINLGCDMD	FDIAGPSIRG	ALVLGYEGFD
Rat VDAC 1	¹¹¹ NAIKTGYKR	EHINLGCDMD	FDIAGPSIRG	ALVLGYEGFD
Human VDAC 2	¹²² SGKIKSSYKR	ECINLGCDVD	FDFAGPAIHG	SAVFGYE

14 kDa-Fragment¹⁵⁶NFETAKS RVTQSNFAVG

Rabbit VDAC 1			¹⁵¹ AG	YQMNFETAKS	RVTQSNFAVG
Human VDAC 1	¹⁵¹ IAGPSIRGAL	VLGYEGWLAG		YQMNFETAKS	RVTQSNFAVG
Rat VDAC 1	¹⁵¹ IAGPSIRGAL	VLGYEGWLAG		YQMNFETSKS	RVTQSNFAVG
Human VDAC 2		¹⁵⁹ GWLAG		YQMTFDSAKS	KLTRNNFAVG

14 kDa-Fragment¹⁷³YKTDEFQLHT NVNDGTEF

Rabbit VDAC 1	¹⁷³ YKTDEFQLHT	NVNDGTEFGG	SIYQKVNKKL	ETAVNLAWTA
Human VDAC 1	¹⁹¹ YKTDEFQLHT	NVNDGTEFGG	SIYQKVNKKL	ETAVNLAWTA
Rat VDAC 1	¹⁹¹ YKTDEFQLHT	NVNDGTEFGG	SIYQKVNKKL	ETAVNLAWTA
Human VDAC 2	¹⁸⁴ YRTGDFQLHT	NVNDGTEFGG	SIYQKVCEDL	DTSVNLAWTS

Rabbit VDAC 1	²¹³ GNSNTRFGIA	AKYQIDPDAC	FSAKVNNSL	IGLGYTQTLK
Human VDAC 1	²³¹ GNSNTRFGIA	AKYQVDPDAC	FSAKVNNSL	IGLGYTQTLK
Rat VDAC 1	²³¹ GNSNTRFGIA	AKYQVDPDAC	FSAKVNNSL	IGLGYTQTLK
Human VDAC 2	²²⁴ GTNCTRFGIA	AKYQLDPTAS	ISAKVNNSL	IGVGYTQTLR

Rabbit VDAC 1	²⁵³ PGIKLTLSAL	LDGKNVNAGG	HKLGLGLEFQ	A
Human VDAC 1	²⁷¹ PGIKLTLSAL	LDGKNVNAGG	HKLGLGLEFQ	A
Rat VDAC 1	²⁷¹ PGIKLTLSAL	LDGKNVNAGG	HKLGLGLEFQ	A
Human VDAC 2	²⁶⁴ PGVKLTLSAL	VDGKSINAGG	HKVGLALELE	A

Abb. 2-7 Sequenzvergleich von VDAC-Proteinen verschiedener Organismen

Rabbit VDAC 1 (Oryctolagus Cuniculus, Cornea-Endothel) (Rae subm 2000; Medline-Zugriffsnummer AF209725), Human VDAC 1 (Homo sapiens, Mitochondrion) (Jürgens et al. 1991; Swiss-Prot Datenbank-Zugriffsnummer P21796), Rat VDAC 1 (Rattus Norvegicus, Mitochondrion) (Anflous et al. subm. 1998, Medline-Zugriffsnummer AF048828), Human VDAC 2 (Homo sapiens, Mitochondrion) (Blachly-Dyson et al. 1993, Medline-Zugriffsnummer 93131931).

2.2.7 Rekonstitution des VDAC in künstliche Vesikel

Um die Eigenschaften eines Kanals zu untersuchen, ist es von Vorteil, wenn dieser isoliert vorliegt. Die Rekonstitution aufgereinigter Proteine in künstliche Vesikel ermöglicht die Beobachtung einzelner Kanäle, ähnlich den Messungen an planaren Lipidmembranen. Da die Funktion des VDAC in den Vesikeln des sarcoplasmatischen Reticulums noch nicht eindeutig geklärt ist, war es von großem Interesse, das Protein in künstliche Asolektinvesikel zu rekonstituieren und diese Vesikel in Anionentransport-Experimenten einzusetzen. Die so erhaltenen Ergebnisse sollten dann mit denen an SR-Vesikeln verglichen werden. Als Anleitung diente leicht modifiziert die Rekonstitution der Ca^{2+} -ATPase in künstliche Asolektinvesikel (Schuster 1995).

Als Ausgangsmaterial für die Vesikel-Herstellung diente Asolektin, ein aus Sojabohnen gewonnenes Lipidgemisch. Es enthält die drei Hauptkomponenten der SR-Membran wie Lecithin (74%), Phosphatidylethanolamin (14%) und Phosphatidylinositol (8%) zu etwa gleichen Teilen (Lee et al 1994). Dadurch sollte sichergestellt werden, daß die Lipidkomposition der Vesikel während der Rekonstitution weitgehend beibehalten wird.

Aus den freien Asolektinlipiden entstanden durch Beschallung Liposomen, die durch mehrmaliges Pressen durch eine Polycarbonatmembran (400 nm) eine einheitliche Größe erhielten.

Der VDAC wurde wie unter 2.2.2 aufgereinigt und zunächst der Durchlauf der Spermin-Agarose-Säule für die Rekonstitution eingesetzt. Dessen Proteingehalt wurde anhand des Elutionsprofils abgeschätzt und lag bei ca. 150 µg/ml. Um eine gute Rekonstitution zu erzielen, sollte das Lipid-Protein-Verhältnis 20:1 bis 30:1 betragen.

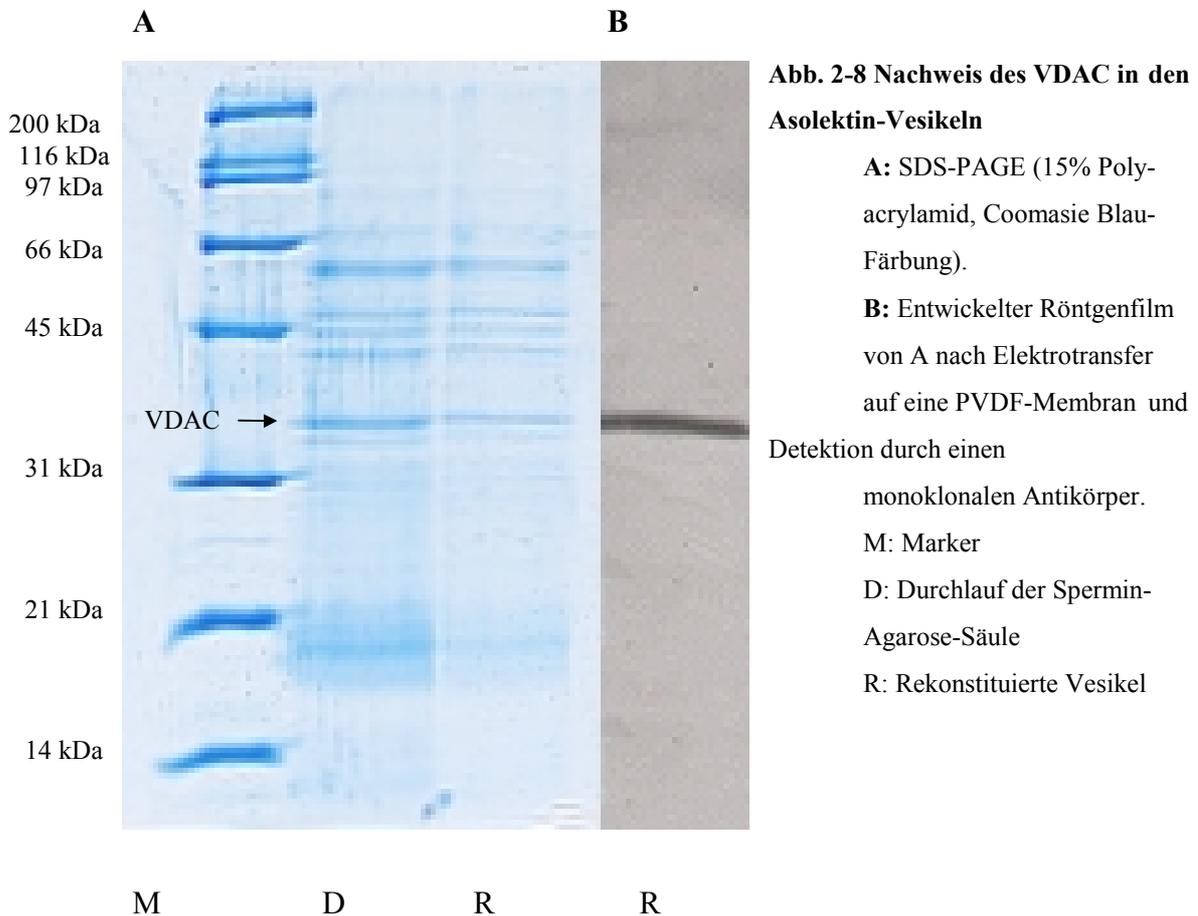
Nach Inkubation des Ansatzes mit einer entsprechenden Menge Vesikelsuspension begann die Detergenzentfernung durch Zugabe von Biobeads nach einer von Hemling (Hemling 1994) entwickelten Methode. Die Bestimmung des Proteingehalts nach Entfernung der Biobeads erfolgte nach Popov (1975). Die Ausbeute lag bei 200-240 µg pro ml. Nur etwa 1/5 der eingesetzten Proteine wurde in die Asolektinvesikel rekonstituiert.

Die Vesikel wurden portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.7.1 Analyse der rekonstituierten Vesikel

Um zu überprüfen, ob tatsächlich der VDAC in die künstlichen Asolektinvesikel eingebaut wurde, erfolgte eine Auftrennung der rekonstituierten Vesikel mittels SDS-PAGE und

nachfolgend eine Detektion des VDAC durch monoklonale Antikörper wie unter 2.2.1 beschrieben. Der VDAC konnte in den rekonstituierten Vesikeln bei 35 kDa nachgewiesen werden.



Im Anschluß daran wurden die Vesikel in Anionentransport-Experimenten (siehe 2.4) eingesetzt. Es konnte jedoch kein Sulfat-Efflux gemessen werden. Die Radioaktivität in den Vesikeln war für alle Zeitwerte etwa gleich und zudem sehr niedrig. Dies könnte einerseits daran liegen, daß die Vesikelmembran undicht ist, und deshalb kein Sulfat in den Vesikeln akkumulieren konnte. Hemling (1994) konnte jedoch zeigen, daß dies nicht der Fall ist. Es könnte allerdings auch sein, daß der VDAC nicht an dem Transport von Sulfat durch die Vesikelmembran beteiligt ist. Es ist zudem bekannt, daß sich die Transporteigenschaften des Kanals in künstlichen Phospholipid-Membranen von denen im Mitochondrium unterscheiden. Dies ist auch auf das Fehlen möglicher Regulationsfaktoren zurückzuführen (Bathori et al. 1993). Die fehlende Transportaktivität des VDAC könnte somit auch auf die artifizielle Umgebung zurückzuführen sein. Die Rekonstitutionsexperimente wurden aufgrund der sehr komplexen Bedingungen nach mehrmaligen Versuchen eingestellt, so daß die Frage, ob der VDAC den von uns gemessenen Sulfat-Efflux direkt beeinflusst, nicht geklärt werden konnte.

2.3 Untersuchung des Oligomerisierungsgrades des VDAC

Die Frage, ob der VDAC als Monomer oder als Dimer vorliegt, konnte bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt werden. Mittlerweile geht man davon aus, daß der Kanal durch ein VDAC-Monomer gebildet wird (De Pinto et al. 1991, Thomas et al. 1991, Peng et al. 1992a), Quervernetzungsexperimente und die Affinitätsaufreinigung des VDAC mit MAP2 geben jedoch Hinweise auf eine Dimerbildung (Linden und Karlsson 1996, Krause et al. 1986).

Es ist bekannt, daß der mitochondriale VDAC unter anderem mit Hexokinase, Glycerol-Kinase (Adams et al. 1991, Mc Cabe 1994) und einem Modulatorprotein (Holden und Colombini 1993, Heiden et al. 1996) wechselwirkt. Außerdem wird vermutet, daß er in der Plasmamembran den Kanal-bildenden Teil des ORDIC-Komplexes (*'outwardly-rectifying depolarisation-induced chloride channel'*) darstellt, der bei der Krankheit Mukoviszidose fehlreguliert ist (Thinnes und Reymann 1997, Thinnes et al. 1990, 1991). Für den VDAC des sarcoplasmatischen Reticulums wird eine Co-Lokalisation mit der Ca^{2+} -ATPase postuliert (Shafir et al. 1998).

Eine Untersuchung des Oligomerisierungsgrades des VDAC in den SR-Vesikeln sowie eine mögliche Assoziation des Kanals mit anderen Proteinen war deshalb besonders im Hinblick auf seine mögliche Funktion im SR von großem Interesse.

Eine Methode zur Untersuchung von inter- und intramolekularen Proteinwechselwirkungen stellt die Quervernetzung durch bifunktionelle Quervernetzungsreagenzien dar. Als Quervernetzungsreagenzien wurden 1.2:3.4 Diepoxybutan (DEB) und 4.4'-Diaminostilben-2.2'-disulfonsäure (DADS) verwendet. Die Quervernetzung des VDAC sollte durch Immunodetektion nachgewiesen werden.

Diepoxybutan wurde in Enkonzentrationen von 1-100 mM eingesetzt. Der VDAC konnte durch einen monoklonalen VDAC-Antikörper in den Ansätzen von 1 mM bis 80 mM DEB bei 35 kDa nachgewiesen werden. Bei 100 mM DEB war der Quervernetzungsgrad aller SR-Proteine sehr hoch und es konnte keine VDAC-Bande detektiert werden. Es ist möglich, daß das Epitop durch das in sehr hohen Konzentrationen vorliegende Quervernetzungsreagenz verdeckt wird und somit nicht mehr für den Antikörper zugänglich ist.

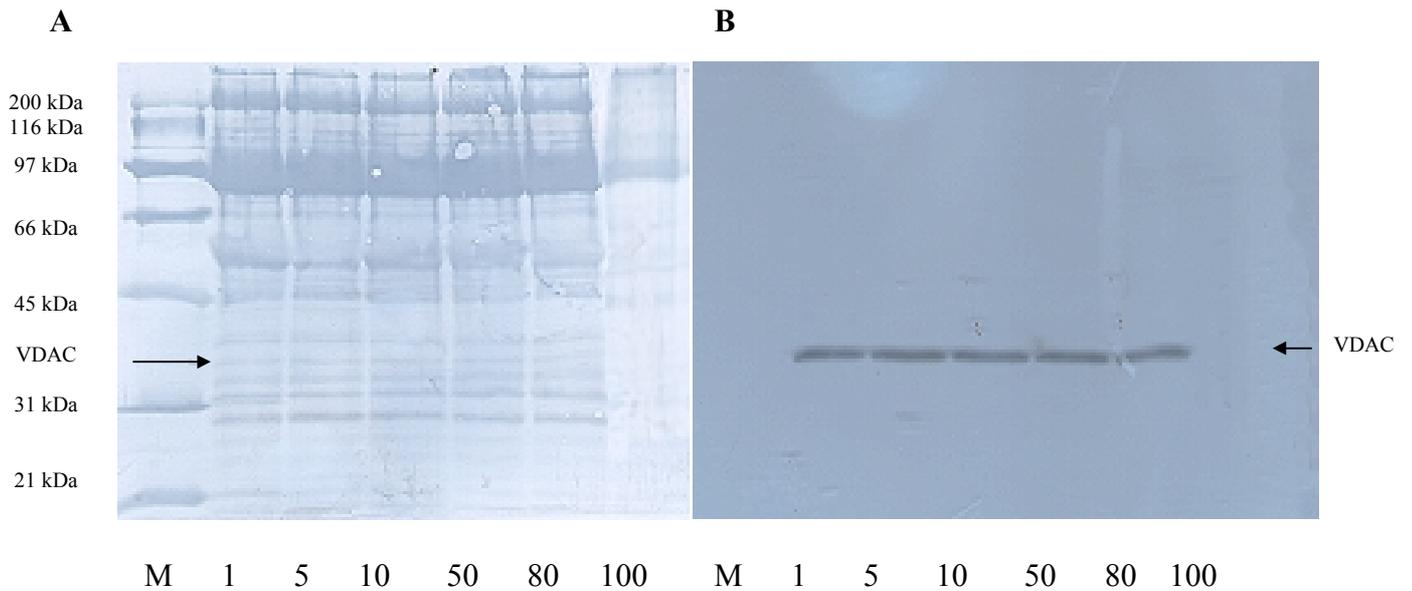


Abb. 2-9 Versuche zur Quervernetzung des VDAC mit Diepoxybutan (1-100 mM DEB)

A: PVDF-Membran (Amidoschwarz-Färbung)

B: Chemiluminogramm von A nach Inkubation mit einem VDAC-Antikörper. M: Marker

Durch die Verwendung des Quervernetzungsreagenzes 4.'4'-Diaminostilben-2.2'-disulfonsäure (DADS), das nach Diazotierung mit Tyrosinen und Histidinen reagiert, sollte eine andere Spezifität der Quervernetzung erzielt werden. DADS wurde vor dem Gebrauch in das Diazoniumion überführt und dann in Endkonzentrationen von 0.5-10 mM eingesetzt. Die Proben wurden mittels 10% iger SDS-PAGE aufgetrennt, elektrotransferiert und die Membranen mit dem VDAC-Antikörper inkubiert.

Besonders die Ca^{2+} -ATPase wurde durch DADS quervernetzt und einige Proteine im niedermolekularen Bereich. Der VDAC konnte jedoch in allen Ansätzen bei 35 kDa detektiert werden. Auch mit diesem Versuch konnte weder eine Dimer- bzw. Oligomer-Bildung des VDAC noch eine Assoziation mit anderen SR-Proteinen nachgewiesen werden.

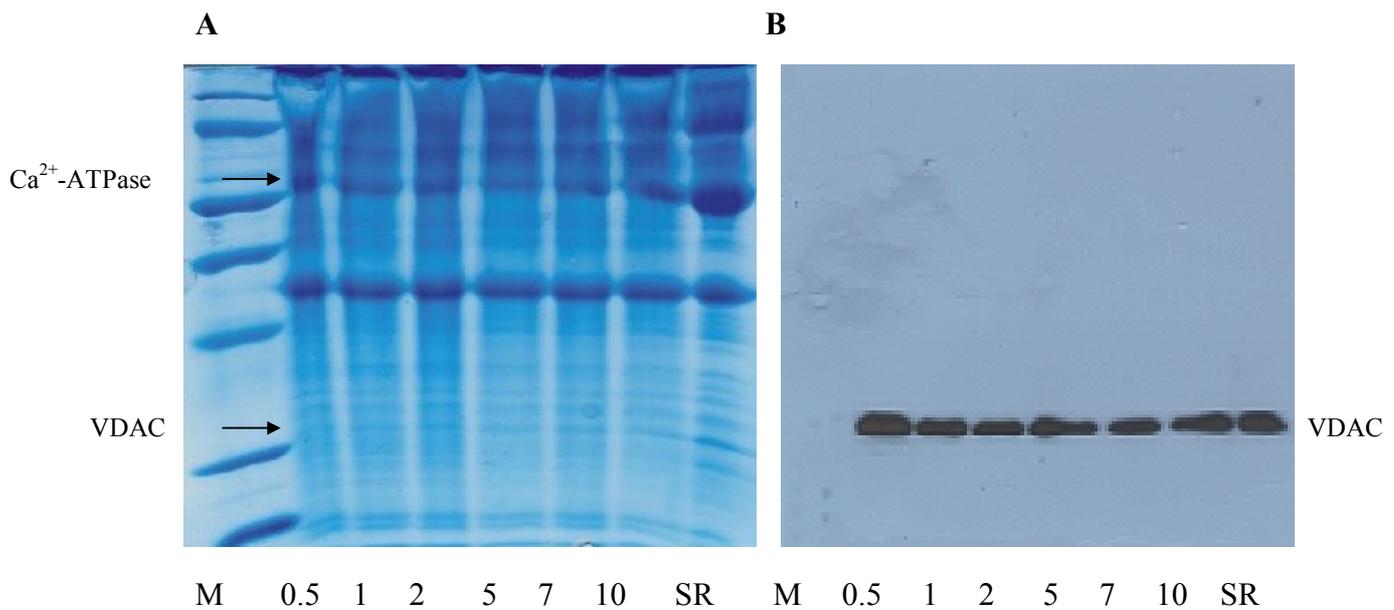


Abb. 2-10 Quervernetzungsversuche mit dem Cross-Linker DADS (Inkubationszeit: 5 min.)

A: SDS-PAGE (10% Polyacrylamid, Coomassie Blau-Färbung)

B: Entwickelter Röntgenfilm von A nach Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran und Inkubation mit einem monoklonalen Antikörper gegen den VDAC

2.4 Anionentransportmessungen mit der Filterassay-Methode

Das Ziel der Flux-Experimente bestand darin, Inhibitoren und Aktivatoren des Sulfattransports zu ermitteln, die spezifisch mit Anionenkanälen reagieren. Diese Substanzen sollten dann als Grundlage für Derivate dienen, die durch kovalente Bindung zur Affinitätschromatischen Aufreinigung verwendet werden oder durch radioaktive Markierung zur Affinitätsmarkierung von Kanalproteinen eingesetzt werden können. Zudem sollte untersucht werden, welche Rolle der VDAC in den Sulfat-Efflux-Experimenten spielt.

Es bieten sich verschiedene Methoden an, den Anionentransport in SR-Vesikeln zu untersuchen. Die neuesten Ergebnisse wurden durch Verwendung der planaren Lipiddoppelmembran-Technik (PLB-Technik) erzielt. Sie ermöglicht die Messung an einem einzelnen Kanal, der in einen künstlichen Membranverband rekonstituiert wird. Neben der guten zeitlichen Auflösung, die je nach Apparatur im Bereich von Millisekunden liegt, und der seitenspezifischen Wirkstoffzugabe bietet diese Technik jedoch auch Nachteile. Die artifizielle Umgebung kann leicht zur Bildung von Artefakten führen, zudem muß ein Ionengradient oder eine Spannung angelegt werden, um den Anionentransport messen zu können.

Mit der Filterassay-Methode können dagegen Anionentransporte an nativen SR-Vesikeln unter Aufrechterhaltung der Membranzusammensetzung vorgenommen werden. Die Interaktionen der einzelnen SR-Proteine, aber auch Kinasierungssysteme und die Mediatoren der Signaltransduktion bleiben dabei erhalten. Die zeitliche Auflösung des Filterassays liegt im Minutenbereich. Da die SR-Membran für Chlorid-Ionen sehr permeabel ist, werden die Messungen mit dem nicht-physiologischen 'Tracer-Ion' $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ vorgenommen, das wesentlich langsamer transportiert wird. Dadurch werden Rückschlüsse auf den Transport unter physiologischen Bedingungen erschwert. Eine weitere Schwierigkeit stellt die Heterogenität der Vesikel dar. Einerseits erlaubt sie das Zusammenspiel unterschiedlicher SR-Komponenten, erschwert andererseits aber die Zuordnung verschiedener Effekte auf einzelne Kanalproteine und die kinetische Analyse des Transportgeschehens.

Durchführung des Filterassays:

Die Anionentransportmessungen wurden nach einer Methode von Kasai und Taguchi (1981), die von Schuster (2001) modifiziert wurde, durchgeführt.

SR-Vesikel wurden mit radioaktivem Sulfat ($^{35}\text{SO}_4^{2-}$) (ca. 20 nM) bis zur Gleichgewichtseinstellung vorinkubiert und durch Verdünnung der Lösung in den Meßpuffer, der kein radioaktives Sulfat enthielt, die Messung gestartet. Die im Test eingesetzten Substanzen wurden ebenfalls in diesem Puffer vorgelegt. Zwischen 0.5 und 6 Minuten wurden Aliquots entnommen und überschüssiges $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ über einen Membranfilter abgesaugt. Die SR-Vesikel dagegen blieben an dem Filter haften. Die Bestimmung der Radioaktivität innerhalb der Vesikel erfolgte nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit im Szintillationszähler.

Der Befüllungsvorgang dauert im Vergleich zum Sulfat-Ausstrom, der nach wenigen Minuten beendet ist, relativ lange. Schuster (2001) konnte zeigen, daß die Gleichgewichtseinstellung bei 20°C nach einer Stunde erreicht ist.

Änderungen des pH-Wertes beeinflussen die Kanaleigenschaften sehr stark, da besonders im Porenbereich Ladungen eine große Rolle spielen. Die Wirkung von Inhibitoren und Aktivatoren wird dadurch jedoch nicht beeinflusst. Das pH-Optimum des Sulfat-Efflux liegt bei 6.5, weshalb die Experimente bei diesem pH-Wert durchgeführt wurden (Schuster 2001).

Auswertung der kinetischen Parameter des Filterassays:

Die Sulfat-Efflux-Kurven zeigen einen exponentiellen Kurvenverlauf erster Ordnung, der durch folgende Gleichung beschrieben wird:

$$y = A * e^{-B * X} + C \qquad \text{cpm}_t = (\text{cpm}_0 - \text{cpm}_\infty) e^{-k * t} + \text{cpm}_\infty$$

Durch Einsetzen der entsprechenden Meßparameter läßt sich die Radioaktivität innerhalb der Vesikel zu jedem beliebigen Zeitpunkt (t) bestimmen. Die Parameter cpm_0 und cpm_∞ sind von der spezifischen Aktivität der Sulfatlösung, der Vesikelpräparation, der Inkubationszeit und den eingesetzten Inhibitoren bzw. Aktivatoren abhängig. Deshalb wurde zur Auswertung der Sulfat-Efflux-Messungen der Proportionalitätsfaktor k (Geschwindigkeitskonstante/Minute) bestimmt. Zu jeder Meßreihe wurde eine Kontrollmessung durchgeführt, deren ermittelter k-Wert gleich 1 gesetzt wurde. Die k-Werte der restlichen Kurven wurden mit diesem k-Wert in Beziehung gesetzt. Die daraus resultierenden $k_{\text{rel.}}$ -Werte erlauben den Vergleich verschiedener Meßreihen und damit die Einstufung unterschiedlicher Wirkstoffgruppen.

Liegt der $k_{\text{rel.}}$ -Wert über dem Wert der Kontrollkurve (>1), aktiviert die eingesetzte Substanz den Sulfat-Efflux. Bei niedrigeren $k_{\text{rel.}}$ -Werten (<1) kommt es zu einer Hemmung des Fluxes.

Man muß dabei jedoch beachten, daß sich aktivierende und hemmende Effekte in diesem komplexen System überlagern können und deshalb in einigen Fällen möglicherweise nur schwache Effekte auftreten.

2.4.1 Einfluß des VDAC auf den Sulfat-Efflux

Der VDAC 1 konnte durch Immunodetektion und Partialsequenzanalyse in den Vesikeln des SR nachgewiesen werden (siehe 2.2.1 und 2.2.5). Shoshan-Barmatz et al. (1996a) gehen davon aus, daß der Kanal den Transport von ATP in die SR-Vesikel vermittelt. ATP wird dort zur Phosphorylierung verschiedener Proteine wie Sarcalumenin und Calsequestrin benötigt, die an der Regulation des Ca^{2+} -Release beteiligt sind. Neben dieser Funktion ist allerdings auch eine Beteiligung des VDAC in den Sulfat-Efflux-Experimenten in Betracht zu ziehen, die durch die folgenden Messungen analysiert werden sollte.

2.4.1.1 Antikörperwirkung

Durch den Einsatz eines monoklonalen Antikörpers gegen den VDAC (AK-VDAC) sollte dessen direkte Beteiligung am Sulfattransport näher untersucht werden. Der Antikörper richtet sich

gegen den N-terminalen Bereich des VDAC, der in Form einer α -Helix aus der Membran in das Cytosol herausragt (Thinnes und Reymann 1997). Einige Arbeitsgruppen gehen davon aus, daß sich dieser Bereich in einem Spalt im Inneren der Pore befindet, durch 'gating'-Stimuli seine Position verändert und bei dem Verschließen des Kanals eine Rolle spielt (Mannella 1998, Song et al. 1998). Allerdings beeinflussen monoklonale Antikörper gegen den N-terminalen Bereich des Porin 31HL aus B-Lymphozyten nicht dessen Kanaleigenschaften in PLB-Experimenten (Benz et al. 1992). Porin-Antikörper hemmen dagegen Chloridkanäle in Astrocyten und Endothelzellen in Patch-clamp-Studien (Thinnes und Reymann 1997).

Der verwendete Antikörper zeigte in einem Konzentrationsbereich von 8-800 ng/ml keinen Einfluß auf den Sulfat-Efflux im Vesikelsystem.

Da die Orientierung des VDAC in den Vesikeln des sarcoplasmatischen Reticulums nicht bekannt ist, sollte der Antikörper mit Hilfe der Liposofast-Technik in das Lumen eingebracht und somit eine Wirkung von beiden Seiten erzielt werden. Die SR-Vesikel wurden mit 100 ng/ml AK-VDAC versetzt und durch eine Polycarbonatmembran der Porenweite 400 nm gepreßt. Dadurch erhielten die Vesikel einerseits eine einheitliche Größe und wurden dabei gleichzeitig mit dem Antikörper beladen. Der Vorgang wurde mehrmals wiederholt. Die SR-Vesikel der Kontrollmessungen wurden ebenfalls dieser Behandlung unterzogen.

Auch in diesem Experiment war keine Beeinflussung des Sulfat-Efflux zu beobachten. Die Meßkurven sowie die ermittelten k-Werte ergaben keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollkurven. Da bis jetzt unklar ist, welche Rolle der α -helikale Bereich des VDAC in Bezug auf das 'gating' des Kanals spielt, gibt dieses Experiment keinen Aufschluß über eine mögliche Beteiligung des VDAC am Sulfattransport im SR.

2.4.1.2 Einfluß von DCCD auf den Sulfat-Efflux

Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) ist ein hydrophobes Reagenz, das spezifisch mit Carboxylgruppen reagiert. Im SR vermindert DCCD die Bindung von Ryanodin an den Ca^{2+} -Release-Kanal und setzt somit die Ca^{2+} -Freisetzung herab. Man geht deshalb davon aus, daß ein oder mehrere Carboxylrest(e) im RyR entweder an der Bindung von Ca^{2+} und/oder an Konformationsänderungen beteiligt sind, die durch die Ca^{2+} -Bindung induziert werden. Wahrscheinlich wird dieser Rest für die Öffnung des Kanals oder für die Ryanodinbindung benötigt (Feng et al. 1996).

[^{14}C]-DCCD markiert den VDAC aus SR- und mitochondrialen Membranen in relativ geringen Konzentrationen (2 nmol/mg Protein). Außerdem inhibiert DCCD den VDAC in PLB-

Experimenten spannungs- und konzentrationsabhängig, indem es dessen Offenwahrscheinlichkeit vermindert. Hydrophile Carboxyl-Reagenzien wie EDAC [1-ethyl-3-(3-dimethylamino) propyl-Carbodiimid] zeigen diesen Effekt nicht. Die durch DCCD modifizierte Carboxylgruppe könnte demnach in die Spannungssensitivität und/oder die Ionenselektivität des Kanals involviert sein (Shafir et al. 1998).

Da in den Sulfat-Efflux-Experimenten die Spannung 0 mV beträgt, ist eine Beeinflussung des VDAC durch den Wirkstoff eher unwahrscheinlich.

DCCD wurde dennoch in Konzentrationen von 1-100 μM in den Sulfat-Efflux-Experimenten eingesetzt. Ab 50 μM DCCD trat eine leichte Aktivierung des Transports auf. Bei 100 μM DCCD war die Transportrate um fast 50% erhöht. Das hydrophile EDAC zeigte dagegen keinen Einfluß auf den Sulfattransport.

Die stimulierende Wirkung von DCCD auf den Anionen-Efflux fügt sich nahtlos in die Ergebnisse von Schuster ein, der eine gegensätzliche Wirkung von RyR-Effektoren im Anionentransport-System beobachten konnte und liefert einen weiteren Hinweis auf eine funktionelle Kopplung von RyR und Anionenkanälen.

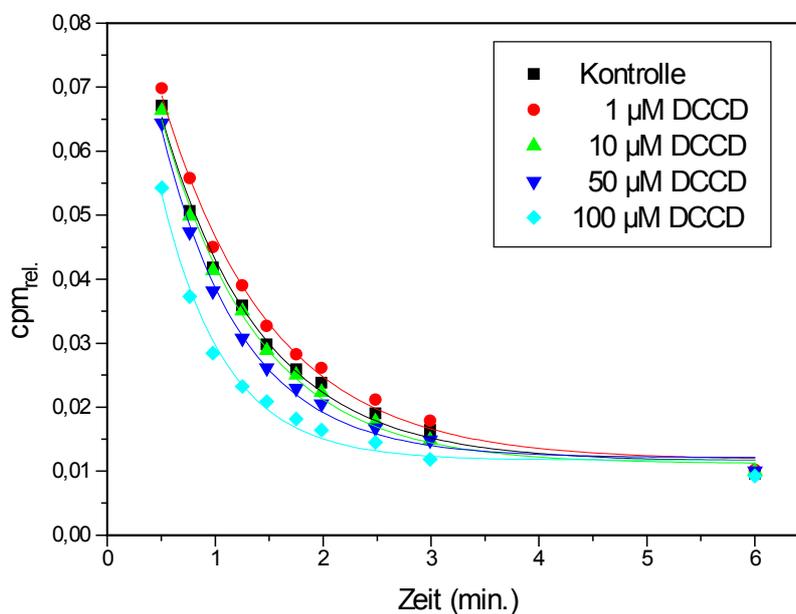


Abb. 2-11 Einfluß von DCCD auf den Sulfat-Efflux

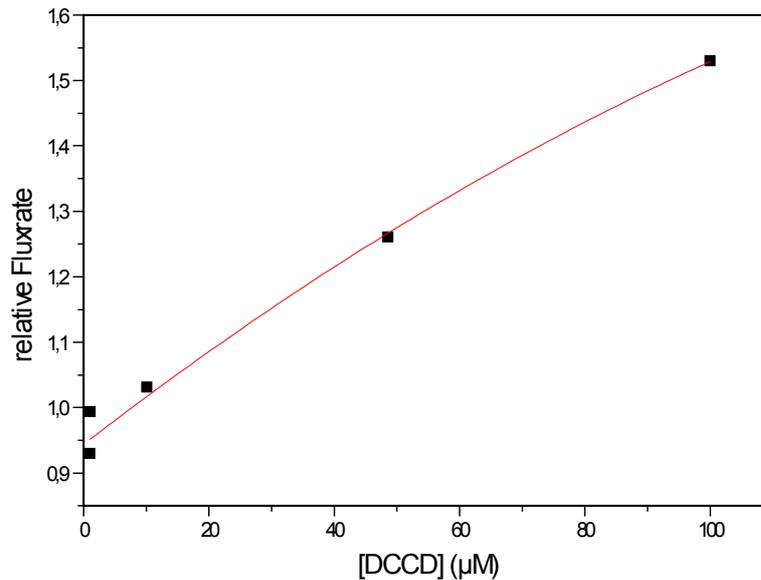


Abb. 2-12 Konzentrationsabhängige Aktivierung des Sulfat-Efflux durch DCCD

2.4.1.3 Einfluß von Nicotinamidadenindinucleotiden und deren Derivaten auf den Sulfat-Efflux

NADH erhöht im mikromolaren Bereich die Spannungsabhängigkeit des mitochondrialen VDAC und führt zum Verschluß des Kanals (Hodge und Colombini 1997). NADH und NADP^+ reduzieren die Permeabilität der Mitochondrienmembran für ATP (Lee et al. 1996).

α - und β -NADH, NADPH, NAD^+ , NADP^+ , ADP-Ribose sowie Nicotinamidribosemonophosphat beeinflussten in einem Konzentrationsbereich von 0.1 bis 1 mM den Sulfat-Efflux jedoch nicht.

Die aus Einzelkanal-Messungen bekannten Effektoren des VDAC entfalten demnach im Vesikelsystem aufgrund der unterschiedlichen Versuchsbedingungen und dem nicht vorhandenen Membranpotential eine andere bzw. keine Wirkung. Rückschlüsse auf eine mögliche Vermittlung des Sulfat-Efflux durch den VDAC können deshalb durch diese Experimente nicht gezogen werden.

2.5 Einfluß von G-Proteinen auf den Anionentransport im SR

Sowohl in den Vesikeln des sarcoplasmatischen Reticulums als auch in den transversalen Tubuli konnten von einigen Arbeitsgruppen G-Proteine mittels Immunodetektion, ADP-Ribosylierung und Photoaffinitätsmarkierung mit [³²P]-GTP nachgewiesen werden (Carney-Anderson und Donaldson 1994, Villaz et al. 1989). Man geht davon aus, daß sie in den Erregungs-Kontraktionszyklus involviert sind und den Ca²⁺-Release stimulieren. Diese Vermutung wird durch deren Co-Lokalisation mit dem DHPR verstärkt (Toutant et al. 1990). Welche regulatorische Funktion die GTP-bindenden Proteine in den Membranen des sarcoplasmatischen Reticulums ausüben, wird zur Zeit noch diskutiert. Eine Beteiligung am Ca²⁺-Release ist dabei ebenso in Betracht zu ziehen wie eine direkte Beeinflussung weiterer Kanäle des sarcoplasmatischen Reticulums.

Die Regulation von Ionenkanälen in der Plasmamembran verschiedener Zellen durch direkte Wechselwirkung mit G-Proteinen wurde schon von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben (Dolphin 1990, Gambling et al. 1998). In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob auch Kanäle intrazellulärer Membranen durch G-Proteine reguliert werden können.

2.5.1 Nachweis von G_α-UE in den SR-Vesikeln

Mittels eines monoklonalen Antikörpers, der sich gegen eine konservierte Region der G_α-Untereinheit (G_α-UE) von G-Proteinen richtet, sollte deren Vorkommen in den Vesikeln des SR untersucht werden. Es wurde ein Antikörper gewählt, der mehrere Klassen erkennt, da in der Literatur sowohl stimulierende als auch inhibitorische G_α-Untereinheiten im SR beschrieben wurden. Der hier verwendete Antikörper richtet sich gegen eine konservierte Region der GTP-Bindungsdomäne und ist für folgende G_α-Untereinheiten spezifisch: G_{iα}, G_{oα}, G_{sα}, G_{tα} und G_{zα} (Mumby und Gilman 1991, Goldsmith et al. 1987).

SR-Vesikel sowie LSR- und HSR-Vesikel wurden mittels 10% iger SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit dem monoklonalen Antikörper, wie unter 2.1.1 beschrieben, inkubiert.

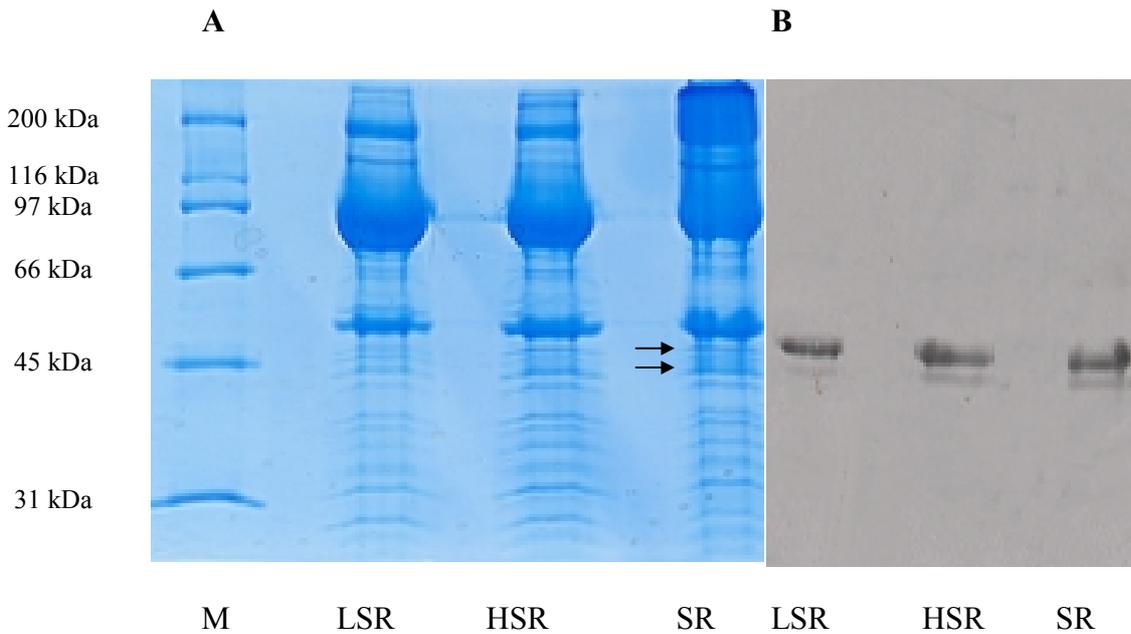


Abb. 2-13 Detektion der G_{α} -UE von G-Proteinen in den Vesikeln des sarcoplasmatischen Reticulums

A: SDS-PAGE (10% Polyacrylamid, Coomassie Blau-Färbung)

B: Chemiluminogramm von A nach Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran und Immunodetektion mit einem monoklonalen Antikörper gegen die G_{α} -UE von G-Proteinen.

Es konnten zwei Proteine detektiert werden, die mit dem Antikörper wechselwirken. Eine sehr deutliche Markierung trat bei 48 kDa in allen untersuchten Vesikeln auf. Eine weitere, aber wesentlich schwächere Markierung bei 45 kDa. Um welche G_{α} -Untereinheiten es sich handelt, ließ sich nicht klären. Kutchai et al. (1993) konnten jedoch durch ADP-Ribosylierung und Immunodetektion in LSR- und Sarcolemma-Fractionen ein Protein bei 45 kDa als $G_{s\alpha}$ -Untereinheit identifizieren.

2.5.2 Einfluß eines Antikörpers gegen die G_{α} -UE von G-Proteinen auf den Sulfat-Efflux

Um die Funktion von G-Proteinen in den SR-Vesikeln näher zu betrachten, sollte der Einfluß dieses Antikörpers auf den Sulfat-Efflux im Vesikelsystem untersucht werden.

Der Transport wurde durch die Zugabe von 0.2 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper leicht gehemmt. 1.5 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper führten zu einer maximalen Hemmung des Sulfat-Efflux von 17%. Bei dieser Antikörperkonzentration sind unspezifische Wechselwirkungen jedoch nicht auszuschließen.

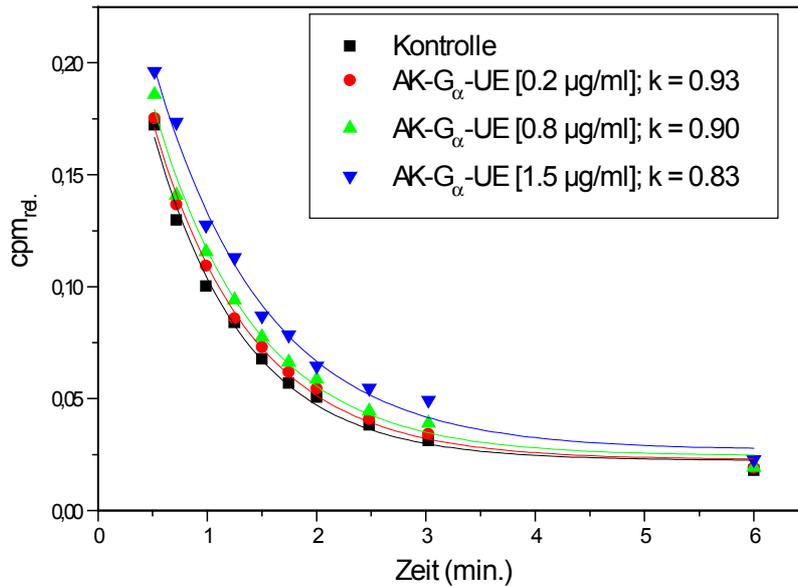


Abb. 2-14 Einfluß eines Antikörpers gegen die G_α-UE von G-Proteinen auf den Sulfat-Efflux

Als Negativ-Kontrolle wurde deshalb der Einfluß unspezifischer Antikörper auf den Sulfat-Efflux untersucht. Die Kurven lagen in allen eingesetzten Antikörper-Konzentrationen im Bereich der Kontrollkurve, das gleiche galt für die k-Werte.

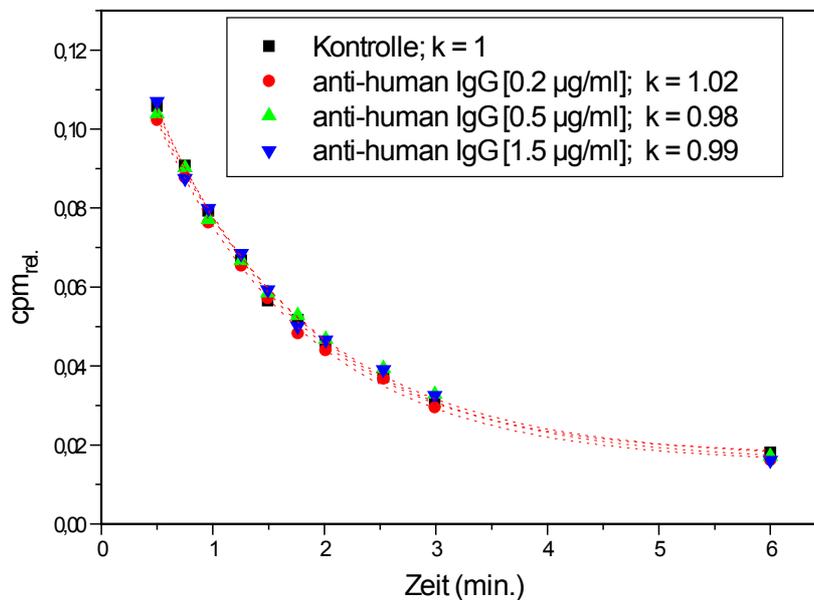


Abb. 2.15 Kontrollkurven mit anti-human IgG

Dieses Experiment gibt somit einen ersten Hinweis auf eine mögliche Wechselwirkung von G-Proteinen mit Anionenkanälen im SR.

2.6 Einfluß von Suraminderivaten auf den SO_4^{2-} -Efflux

Suramin ist ein symmetrisches, polysulfoniertes Naphthylamin-Derivat, das in der Trypanosomen-Therapie eingesetzt wurde. Mittlerweile dient es auch als effektives Anti-Krebs-Mittel. Zudem zeigt es antagonistische Wirkungen zu ATP bei verschiedenen Ionenkanälen und inhibiert DNA-Polymerasen sowie Rezeptoren von Wachstumsfaktoren (Freissmuth et al. 1999).

Die Wirkung von Suramin auf den Ca^{2+} -Flux im SR ist gut untersucht. Suramin aktiviert den Ryanodin-Rezeptor konzentrationsabhängig und hemmt die Ca^{2+} -ATPase und somit die Ca^{2+} -Akkumulation (Emmick et al. 1994).

Eine Wirkung von Suramin auf die G_α -Untereinheiten von G-Proteinen ist ebenfalls bekannt. Es vermindert die spontane GDP-Freisetzung und zerstört außerdem die ternäre Komplex-bildung zwischen Agonist-Rezeptor-G-Protein (Freissmuth et al. 1999, Hohenegger et al. 1998).

Diese Beobachtung und die beschriebene Wechselwirkung mit den G_α -Untereinheiten von G-Proteinen lieferten weitere Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung der Anionenkanäle im SR durch G-Proteine.

Um diese Fragestellung näher zu untersuchen, sollten einerseits auf synthetische Erfahrungen der Arbeitsgruppe Nickel (Nickel et al. 1986) zurückgegriffen und andererseits eigene Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe genutzt werden, die sich mit der Synthese von Ionenkanalinhibitoren auf der Basis von Pyridoxalphosphat beschäftigen. Von der Gruppe Nickel wurden Suraminderivate vielfältiger Art synthetisiert, die in der pharmakologischen Terminologie ausgedrückt als spezifische Antagonisten von P2-Purinoceptoren wirkten, aber nicht zwischen den P2X- und den P2Y-Subtypen zu unterscheiden vermochten (Hoyle et al. 1990).

In unserer Arbeitsgruppe wurden erstmals Pyridoxalphosphatderivate synthetisiert, die im mikromolaren Konzentrationsbereich selektiv auf P2X-Purinoceptoren einwirken (Lambrecht et al. 1992).

In biochemischer Terminologie gesprochen sind P2X-Rezeptoren Kationenkanäle (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), während P2Y-Rezeptoren eine Familie von G-Protein-gekoppelten Ionenkanälen darstellen. Gemeinsam ist ihnen die Lokalisation in der Plasmamembran verschiedener Zelltypen.

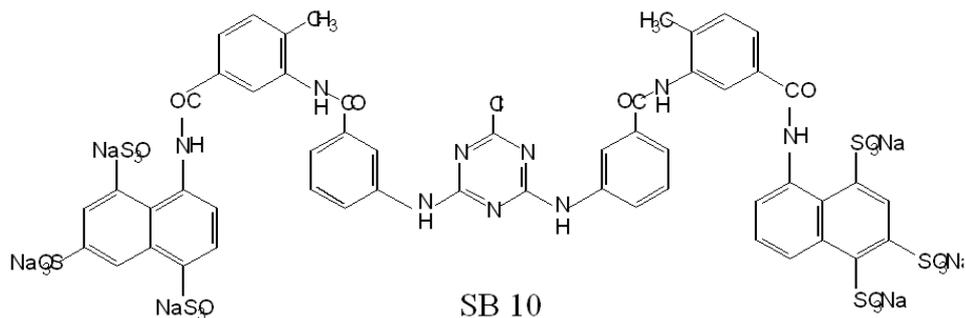
In dieser Arbeit sollten der gleichzeitige Einfluß von Derivaten der beiden Substanzklassen auf den Ionentransport durch die intrazelluläre Membran des sarcoplasmatischen Reticulums untersucht werden. Der hemmende Einfluß verschiedener Pyridoxalphosphatderivate auf den aktiven Ca^{2+} -Transport und den Sulfattransport konnten schon von Heider (1992), Brojatsch (1987) und Volz (1987) gezeigt werden. Schuster (2001) konnte mit Suramin selbst den bisher

stärksten, nicht kovalent reagierenden Hemmstoff des Sulfattransports durch die SR-Membran identifizieren.

Durch gezielte Veränderung des Suraminmoleküls und Verknüpfung der Synthese mit der von Pyridoxalphosphatderivaten sollten nun neue Inhibitoren synthetisiert werden, die zum einen kovalent mit den Zielproteinen reagieren können, zum anderen durch radioaktive Markierung die Identifizierung der Zielproteine erleichtern würden.

Angriffspunkt sollte die Abwandlung der Harnstoffbrücke im Suraminmolekül sein, die bisher nur selten das Ziel chemischer Modifikationen war. Es wurden zwei Strategien entwickelt: Die Harnstoffbrücke sollte zum einen durch Trichlortriazin, zum anderen durch Nitroisophthalsäure ersetzt werden, um so eine dritte Valenz für die chemische Derivatisierung einzuführen. Der chemischen Komplexität wegen wurden die Derivate mit SB X abgekürzt.

2.6.1 Synthese von SB 10 und dessen Einfluß auf den Sulfat-Efflux



Die Synthese dieser Substanz wurde in unserem Arbeitskreis von G. Spatz-Kümbel entwickelt. Dazu wurde stufenweise bei verschiedenen Temperaturen und pH 7 Trichlortriazin mit dem ‘Suraminhalbmolekül’ umgesetzt, so daß zwei Chloratome durch das ‘Suraminhalbmolekül’ ersetzt werden. Die nucleophile Substitution des dritten Chloratoms ist nur unter wesentlich stringenteren synthetischen Bedingungen durchführbar. Jedoch sollte es möglich sein, wegen der lokalen Überkonzentration bei Immobilisierung durch Bindung an das Zielprotein eine Reaktion mit einer sich präsentierenden Aminosäureseitenkette zu erreichen.

Doch zunächst wurde die Wirkung von SB 10 auf den Sulfat-Efflux aus den Vesikeln des sarcoplasmatischen Reticulums untersucht.

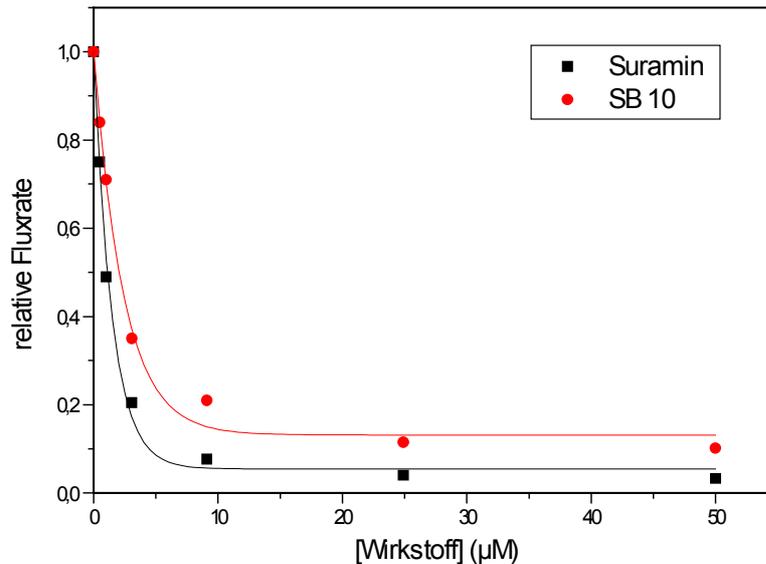


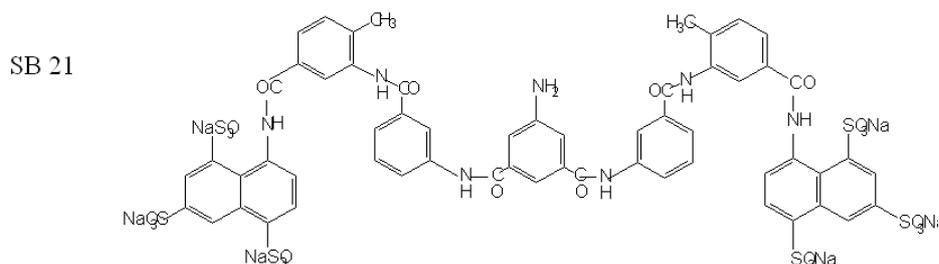
Abb. 2-16 Einfluß von Suramin und SB 10 auf den Sulfattransport

Die Effluxkurve von Suramin ($I_{50} = 0.9-1.16 \mu\text{M}$, 98% maximale Hemmung) wurde von Schuster mit freundlicher Genehmigung zur Verfügung gestellt. SB 10 hemmt den $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ -Transport halbmaximal bei $3 \mu\text{M}$ und 90% maximaler Hemmung.

In Abb. 2-16 ist die Hemmung des Sulfattransportes im Vergleich zu der durch Suramin hervorgerufenen Inhibition dargestellt. Wie leicht ersichtlich, ist mit SB 10 ein weiterer, sehr starker Hemmstoff gefunden worden. Die folgende Analyse zeigte jedoch, daß SB 10 nicht irreversibel mit einem Zielprotein reagiert. Auswaschen des Hemmstoffes durch Zentrifugation erbrachte bei erneuter Transportmessung den Kontrollmessungen vergleichbare k-Werte.

2.6.2 Synthese und funktionelle Analyse von SB 22

Eine weitere Synthese hatte zum Ziel, zwei 'Suraminhalbmoleküle' durch die Reaktion mit 5-Nitroisophthalsäuredichlorid zu verbrücken. Sowohl dieses Produkt (SB 20) als auch das durch katalytische Reduktion erhaltene Amin (SB 21) sind starke Hemmstoffe des Sulfattransportes bei halbmaximaler Hemmung um $1.5 \mu\text{M}$ und 80% iger maximaler Inhibition.



Die freie, aromatische Aminogruppe des SB 21 wurde in salzsaurer Lösung durch Reaktion mit Natriumnitrit in die Diazoniumverbindung überführt und diese dann bei pH 8 mit Pyridoxalphosphat gekuppelt. Die farbige Azoverbindung (SB 22) konnte sowohl mit der Chloramin-T-Methode als auch mit J₂-KJ-Lösung jodiert werden. Beide, die jodierte wie die unjodierte Substanz wurden zunächst wieder zu Transportmessungen eingesetzt. Abb. 2-17 zeigt, daß beide Substanzen an die Hemmwirkung des parentalen Suramins heranreichen.

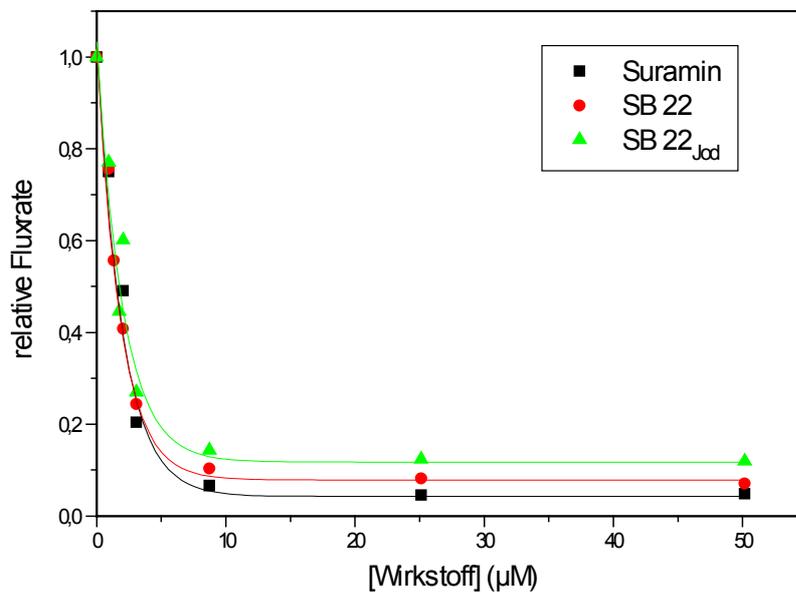
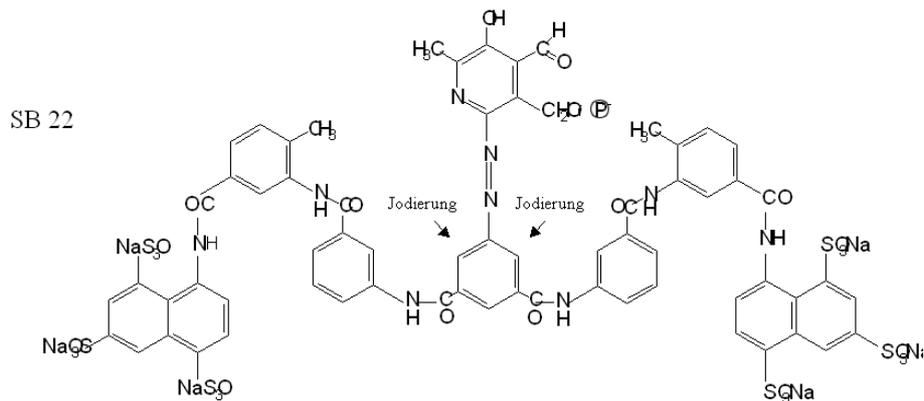


Abb. 2-17 Einfluß von SB 22 und SB22_{Jod} auf den Sulfat-Efflux

SB 22 reicht mit einer I₅₀ von 0.8 μM und einer Restaktivität von 7% der Kontrolle an die für Suramin ermittelten Werte heran. Die Wirkung des jodierten SB 22 (SB22_{Jod}) ist mit einer halbmaximalen Hemmkonzentration von 1 μM und einer maximalen Hemmung von 88% etwas schwächer. Eine Ungenauigkeit liegt allerdings in der schwierigen Ermittlung des Molekulargewichtes begründet.

2.6.2.1 Affinitätsmarkierung von SR-Proteinen mit SB 22



Das Suraminanalogon SB 22 erwies sich als effizienter Inhibitor des Sulfat-Effluxes, der zur Affinitätsmarkierung eingesetzt werden konnte.

SB 22 reagiert kovalent mit den Lysinseitenketten von Proteinen und ermöglicht somit die Detektion von Bindungspartnern. Die radioaktive Markierung des Suramin-Analogons erfolgte mit dem Radioisotop ^{125}I durch Zusatz von Chloramin-T. Überschüssiges Jodid wurde mittels Gelfiltration abgetrennt.

Die spezifische Aktivität der Substanz lag bei 0.004 mCi/mmol.

SR-Vesikel wurden mit SB 22 in Konzentrationen von 0.5 μM bis 100 μM unter Sulfat-Efflux-Bedingungen inkubiert. Die bei der Reaktion mit Lysin entstandene Schiff'sche Base sollte durch Zugabe von Natriumborhydrid (NaBH_4) reduziert und somit stabilisiert werden. Es wurden jeweils Ansätze mit und ohne Reduktionsmittel getestet. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die getrockneten Gele in einer photosensitiven Kassette 2-4 Tage exponiert. Die Auswertung erfolgte im Phosphorimager. Als Negativ-Kontrolle diente jodiertes SB 22 ohne Zusatz von SR-Vesikeln.

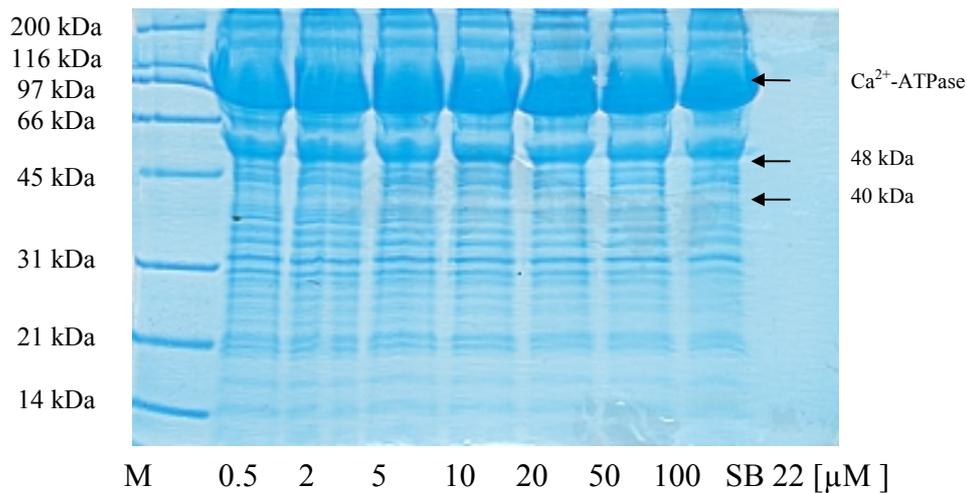
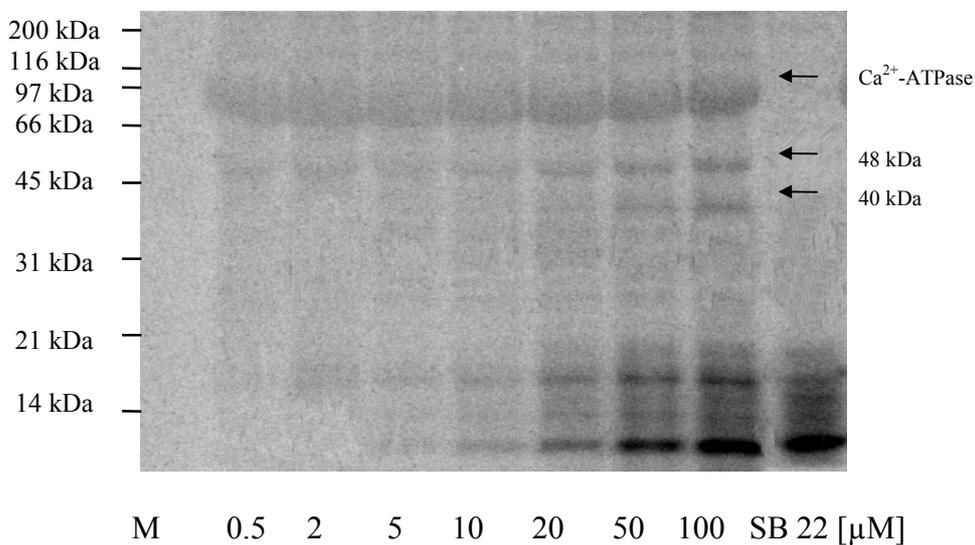
A**B**

Abb. 2-18 Markierung von SR-Proteinen mit SB 22 (0.5-100 μM , Reduktion mit NaBH_4 , pH 6.5)

A: SDS-PAGE (12% Polyacrylamid, Coomassie Blau-Färbung)

B: Autoradiogramm von A nach 3 Tagen Exposition in einer Phosphorimager-Kassette

M: Marker

Alle Reaktionsansätze wiesen eine radioaktive Markierung der Ca^{2+} -ATPase auf. In den Proben von 20-100 μM SB 22 konnten weitere Proteine mit einem Molekulargewicht von 48 kDa und 40 kDa detektiert werden.

Bei 48 kDa konnte mittels Immunodetektion auch eine G_{α} -Untereinheit nachgewiesen werden. Es liegt also sehr nahe, daß es sich in beiden Fällen um identische Proteine handelt.

Das jodierte Suramin-Analogon wies unterhalb von ca. 20 kDa ebenfalls eine starke Markierung auf, deren Herkunft nicht geklärt werden konnte. Auch Änderungen der Jodierungsbedingungen ergaben ähnliche Resultate. Es war deshalb nicht möglich, in dem Molekulargewichtsbereich <20 kDa eine radioaktive Markierung, die nicht von SB 22 selbst stammte, auszumachen.

Eine Erhöhung des pH-Wertes auf 7.4 ergab keine veränderte Markierung. Das Gleiche galt für den Zusatz von Natriumborhydrid. Auch eine längere Exposition in den photosensitiven Kassetten führte zu keinem deutlicheren Ergebnis.

Suramin zeigt im SR verschiedene Effekte. Es hemmt den aktiven Rücktransport von Ca^{2+} in das SR durch die Ca^{2+} -ATPase (Emmick et al. 1994) und wirkt agonistisch auf den RyR, wodurch der Ca^{2+} -Release gefördert wird. Es wurde vermutet, daß Suramin mit der ATP-Bindungsstelle des RyR wechselwirkt, dies konnte jedoch nicht bestätigt werden (Klinger et al. 1999). Eine Wechselwirkung zwischen Ryanodin-Rezeptor und dem Suramin-Analogon SB 22 scheint ebenfalls nicht vorzuliegen, da in diesem Molekulargewichtsbereich keine Affinitätsmarkierung detektiert werden konnte, wie Abb. 2-19 zeigt.

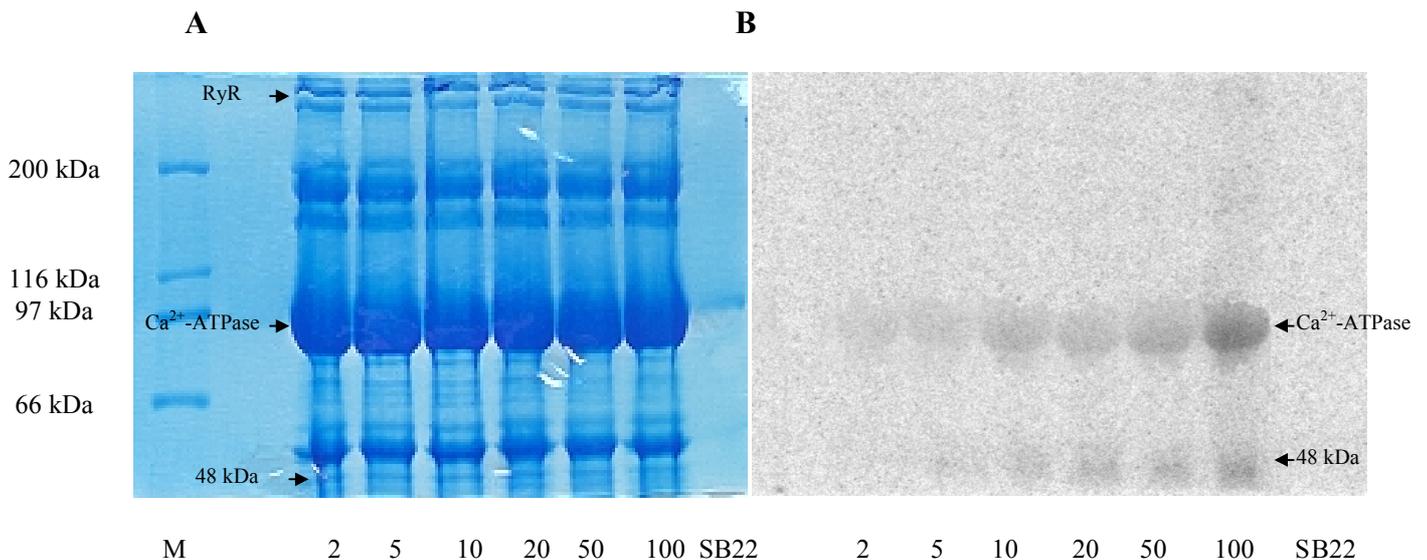


Abb.2-19 Markierung von SR-Proteinen mit SB 22 (2-100 μM , Reduktion mit NaBH_4 , pH 6.5)

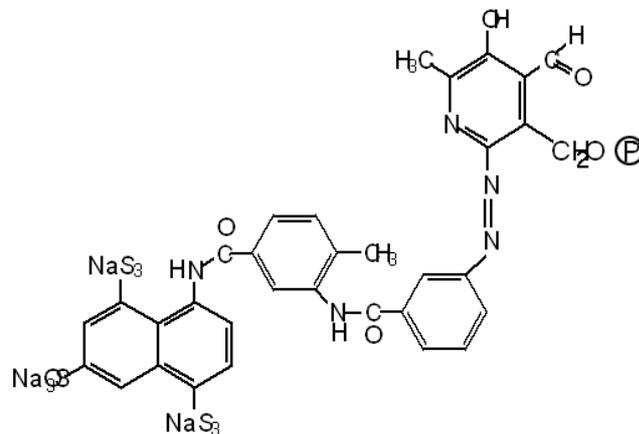
A: SDS-PAGE (7.5% Polyacrylamid, Coomassie Blau-Färbung)

B: Autoradiogramm von A nach 2 Tagen Exposition in einer Phosphorimager-Kassette

2.6.3 Synthese und funktionelle Charakterisierung von SB 9

Mit dem Suraminderivat SB 9 wurde im Arbeitskreis zum ersten mal ein Hemmstoff synthetisiert, der in einer Studie am Ratten vas deferens (Lambrecht et al. 2000) eine 10fach höhere Spezifität für P2Y₁- über P2X₁-Rezeptoren aufwies, also eine höhere Spezifität für G-Protein-gekoppelte Ionenkanäle. Wie bei SB 22 wurde die Suramin- mit der Pyridoxal-phosphatchemie verbunden und ein Molekül synthetisiert, daß durch Diazotierung eines ‘Suraminhalbmoleküls’ und nachfolgender Azokupplung mit Pyridoxalphosphat bei pH 8 entstand. Es wurde in unserem Arbeitskreis im Sulfat-Efflux eingesetzt und zeigte eine halbmaximale Hemmkonzentration von 28.6 µM bei einer Restaktivität von 20% der Kontrolle (Schuster 2001).

SB 9



2.6.3.1 Affinitätschromatographie mit immobilisiertem SB 9

Da SB 9 eine gewisse Spezifität für G-Protein-gekoppelte Ionenkanäle aufweist, sollte durch Immobilisierung von SB 9 eine neue Säulenmatrix für die Affinitätschromatographie hergestellt werden. Dazu bot sich wegen der endständigen Aldehydgruppe von SB 9 eine Kupplung mit Aminohexylsepharose an. Die entstandene Schiff'sche Base konnte mit Natriumborhydrid stabilisiert werden. Die Bindung des tiefroten SB 9 an die Säulenmatrix wurde mit dem Auge verfolgt.

Nach dem Äquilibrieren der Säule mit 10 mM TRIS-HCl pH 7.2 / 0.4% Nonidet P-40 wurde solubilisiertes SR aufgetragen, um festzustellen, welche Proteine mit SB 9 wechselwirken. Die Elution erfolgte mit einem kontinuierlichen Gradienten von 0-300 mM NaCl. Die Proben wurden nach der Fällung mit Methanol-Chloroform mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

Es zeigte sich, daß der VDAC nicht an die Säulenmatrix adsorbiert wurde und in allen Fraktionen des Durchlaufs (D) nachgewiesen werden konnte. Eluiert wurden vorwiegend die Ca^{2+} -ATPase, ein Protein bei etwa 66 kDa sowie bei 38 kDa. Es traten jedoch auch noch andere Proteine auf. Die SB 9-Sepharose-Säule weist demnach unerwünschte Wechselwirkungen auf und ist deshalb zur spezifischen Aufreinigung eines Anionenkanals aus dem SR ungeeignet.

Da das Elutionsprofil dem des VDAC über die Spermin-Agarose-Säule gleicht, wurde sie teilweise zur Anreicherung des VDAC eingesetzt.

Es sollte aber weiterhin auch geprüft werden, ob die beiden im SR detektierten G_{α} -Untereinheiten an der SB 9-Säule adsorbiert werden. Dazu wurden die Proben des Durchlaufs und des Eluats nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran mit einem monoklonalen Antikörper gegen die G_{α} -Untereinheiten inkubiert. Im Durchlauf trat keine Antikörper-Markierung auf. In den Fraktionen von ca. 80 mM (E1) bis 100 mM (E2) NaCl konnte eine Bande bei 48 kDa nachgewiesen werden. Offensichtlich geht eine G_{α} -Untereinheit eine Wechselwirkung mit dem Suraminderivat SB 9 ein. Die zweite G_{α} -Untereinheit bei 45 kDa konnte in den untersuchten Fraktionen nicht detektiert werden. Möglicherweise liegt sie nach der Chromatographie sehr stark verdünnt vor und kann somit nicht mehr nachgewiesen werden. Aus der Literatur ist zudem bekannt, daß verschiedene Suraminderivate mit unterschiedlichen G_{α} -Untereinheiten wechselwirken (Hohenegger et al. 1998, Chahdi et al. 1998, Freissmuth et al. 1997). Eine Adsorption beider Untereinheiten an die SB 9-Säule ist deshalb nicht zwingend.

Dies ist ein weiterer Beweis dafür, daß G_{α} -Untereinheiten in der SR-Membran vorhanden sind, die solubilisiert und affinitätschromatographisch angereichert werden können. Die Tatsache, daß der VDAC nicht an der SB 9-Sepharosematrix retardiert wird und SB 9 den Sulfat-Efflux hemmt, gibt einen starken Hinweis darauf, daß der Sulfat-Transporter ein Protein ist, das mit G-Proteinen wechselwirken kann, und daß der VDAC nicht der geeignete Kandidat zu sein scheint.

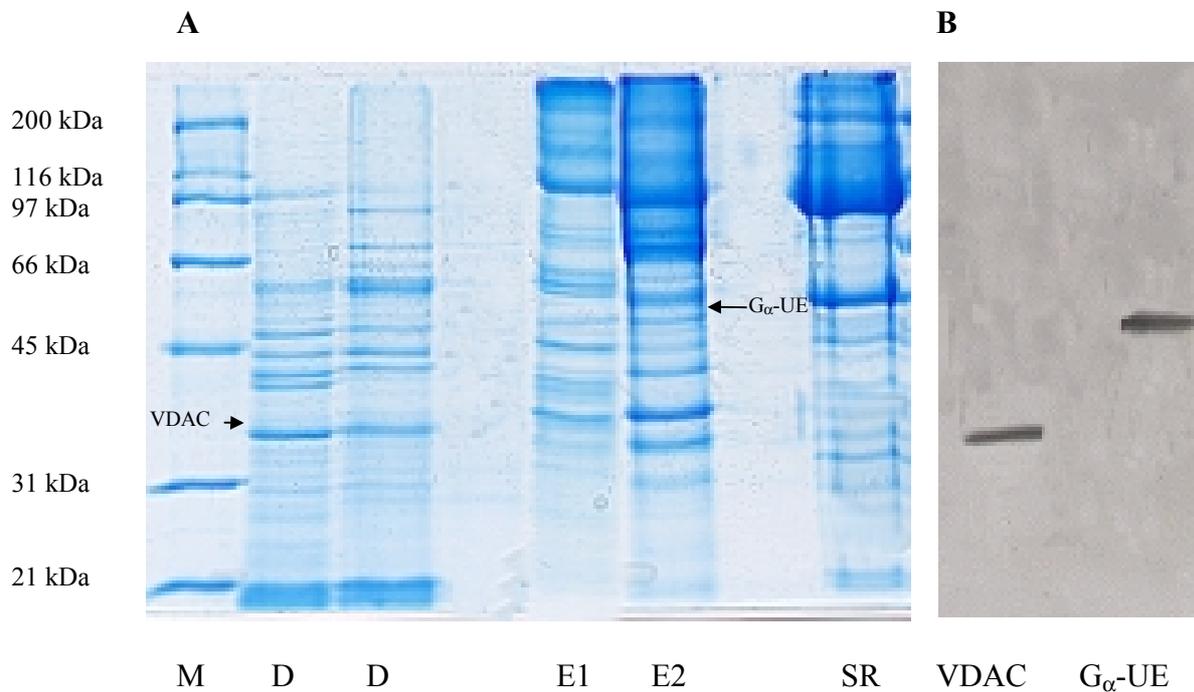


Abb. 2-20 Elutionsprofil der SB9-Sepharose-Säule nach Beladung mit solubilisiertem SR (2mg/ml)

Es werden nur Fraktionen gezeigt, die den VDAC bzw. die G_α-Untereinheit (G_α-UE) enthalten.

A: SDS-PAGE (12% Polyacrylamid; Coomassie Blau-Färbung)

B: Chemiluminogramm von D und E2 nach Transfer auf eine PVDF-Membran und Inkubation mit einem anti-VDAC (VDAC)- bzw. anti-G_α-UE (G_α-UE) Antikörper

M: Marker, D: Durchlauf, E1: Eluat bei 80 mM NaCl, E2: Eluat bei 100 mM NaCl.

2.7 Einfluß von Nucleotiden auf den SO₄²⁻-Efflux

Nucleotide reflektieren das bioenergetische Stadium und thermogene Mechanismen der Muskelfaser und spielen eine wichtige Rolle bei der Muskelkontraktion und -relaxation. Aus PLB-Experimenten ist bekannt, daß ATP den SCl von beiden Seiten der Membran hemmt, der BCl jedoch nur von der luminalen Seite beeinflusst wird. Andere Nucleotide sowie AMP-PNP (5'-Adenylylimidodiphosphat) zeigen ähnliche Effekte. Aus letzterem kann man schließen, daß für die Blockierung des Kanals keine Phosphorylierung notwendig ist (Kourie 1997b).

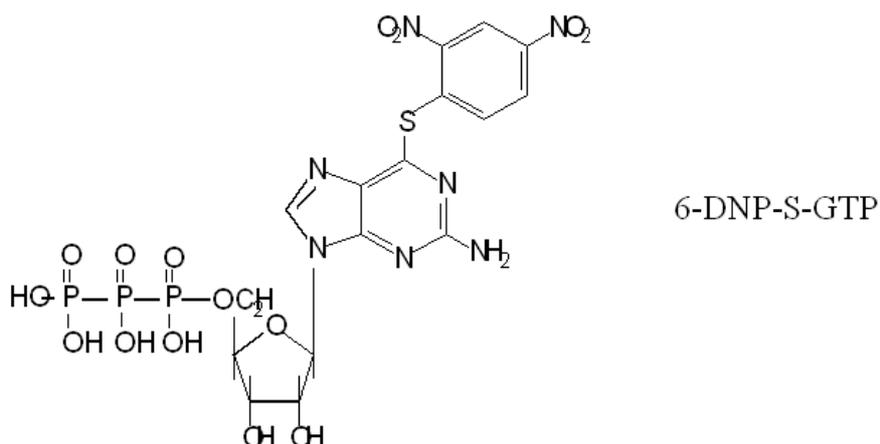
Ahern und Laver kamen zu dem Ergebnis, daß cytoplasmatisches ATP den SCl nur dann hemmt, wenn Cl⁻-Ionen vom Cytoplasma in das SR-Lumen wandern (Ahern und Laver 1998). Daraus

folgern sie, daß der SCl in vivo keine Chloridionen vom Cytoplasma in das SR-Lumen transportiert und somit auch nicht zum Ladungsausgleich während der elektrogenen Ca^{2+} -Aufnahme beitragen kann.

Auch in den Sulfat-Efflux-Experimenten entfalten Nucleotide eine inhibitorische Wirkung, wobei ATP, gefolgt von GTP, ähnlich den Messungen an planaren Lipiddoppelmembranen die effektivste Hemmung aufweist (Schuster 2001, Kourie 1996a). Durch die Zugabe von Magnesiumchlorid kann die Hemmwirkung der Nucleotide verstärkt werden. Magnesiumionen dienen bei zahlreichen katalytischen Prozessen als Cofaktoren und werden auch für die Aktivität der Ca^{2+} -ATPase benötigt. In unserem Arbeitskreis konnte gezeigt werden, daß Magnesiumionen den Sulfattransport im Vesikelsystem stimulieren. In Einzelkanal-Messungen beeinflussen sie den Cl-Transport jedoch nicht (Kourie 1997b).

Allerdings werden sowohl ATP als auch GTP im SR sehr schnell metabolisiert (Schuster 2001). Deshalb ist unklar, ob die Nucleotidtriphosphate selbst oder deren Metabolite an der Regulation von Anionenkanälen beteiligt sind. Auch AMP-PNP wird unter bestimmten Bedingungen im SR abgebaut, was durch neuere Studien am Institut gezeigt werden konnte (Bäumert, pers. Mitteilung 2000).

Ausgehend von den zuvor beschriebenen Hinweisen auf eine G-Protein-vermittelte Regulation von Anionentransportern in der Membran des sarcoplasmatischen Reticulums sollte nun der inhibitorische Einfluß von Guaninnucleotiden auf den Sulfat-Efflux näher charakterisiert werden. Dazu wurde ein GTP-Analogon (6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphat, 6-DNP-S-GTP) synthetisiert, das einerseits mit den Cysteinseitenketten von Proteinen einen stabilen Thioether ausbilden und andererseits mit ^{32}P Phosphat radioaktiv markiert werden kann. Mittels anschließender Affinitätsmarkierung sollten SR-Proteine identifiziert werden, die mit dem GTP-Analogon wechselwirken und eventuell an der Steuerung von Transportprozessen durch die intrazelluläre Membran beteiligt sind.



2.7.1 Synthese des 6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphats

Die Ausgangssubstanz 2-Amino-6-mercapto-purin-ribosid (6-Thio-Guanosin) wurde in Triethylphosphat gelöst und durch Zugabe von Phosphoroxidchlorid in das Monophosphat überführt. Nach der Zugabe von Bariumacetat entstand durch Hydrolyse das Bariumsalz, das mit Ethanol gefällt wurde. Die Extraktion des 6-Thio-Guanosinmonophosphats (6-Thio-GMP) aus dem entstandenen Niederschlag erfolgte mit Wasser. Die Ausbeute lag nach dem Lyophilisieren bei 90%.

Vor der Reaktion mit 2,4-Dinitro-1-fluor-benzol (DNFB) wurde das Bariumsalz des 6-Thio-GMP in die freie Säure überführt und erneut lyophilisiert. Nach dem Lösen in Wasser wurde der pH-Wert auf 8.3-8.5 eingestellt und DNFB in zweifachem Überschuß zugesetzt. Die Reaktion lief über Nacht. Nach der Zentrifugation wurde der entstandene Thioether mit Ethanol gewaschen und in Wasser aufgenommen.

Um die Reaktivität des Thioethers zu überprüfen, wurden Modellreaktionen mit Cystein, N-Acetylcystein und Cysteamin durchgeführt. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte in der Papierhochspannungselektrophorese pH 6.5 und Dünnschichtchromatographie zeigten, daß der Thioether fast vollständig umgesetzt wurde. Als Vergleich wurde Dinitrothiophenol eingesetzt, das ebenfalls bei der Reaktion entsteht.

Der als Natriumsalz vorliegende Thioether wurde in die freie Säure überführt, und der Phosphatrest durch die Zugabe von 1.1-Carbonyldiimidazol aktiviert. Überschüssiges 1.1-Carbonyldiimidazol wurde mit Methanol abgefangen. Um das bei der Reaktion störende Wasser zu entfernen, wurde die Diphosphorsäure am Rotationsverdampfer mit Dimethylformamid getrocknet. Zu der in Dimethylformamid gelösten Diphosphorsäure wurde der Thioether zugesetzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz am Rotationsverdampfer eingeeengt und in 0.01 M Lithiumchlorid aufgenommen. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte durch Anionenaustauscher-Chromatographie. Es entstanden drei Produkte, die mittels Papierhochspannungselektrophorese pH 3.5 analysiert wurden. Die Auswertung ergab, daß neben dem Triphosphat auch noch Spuren von Monophosphat und Diphosphat vorhanden sind. Die das Triphosphat enthaltenden Fraktionen wurden eingeeengt, mit Ethanol gefällt und lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 75% des Eduktes.

2.7.1.1 Synthese des [γ -/ β - ^{32}P]-6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphats

Die radioaktive Synthese des GTP-Analogons wurde mit [^{32}P]-Diphosphorsäure (spezifische Aktivität 2.4 Ci/mmol) durchgeführt, wobei ^{32}P entweder in γ - oder in β -Stellung eingebaut wird.

Die Synthese erfolgte analog zu 2.7.1 mit einem Zehntel-Ansatz. Die Ausbeute lag bei 75%. Die spezifische Aktivität betrug 4 mCi/mmol.

2.7.2 Stufenweise Synthese des 6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphats

Die stufenweise Synthese des GTP-Analogons hat den Vorteil, daß bei der radioaktiven Synthese ^{32}P Phosphat ausschließlich in β -Stellung eingebracht werden kann. Damit wird bei der nachfolgenden Affinitätsmarkierung einerseits die Detektion von phosphorylierten Proteinen verhindert, andererseits können auch nach einer Hydrolyse des $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-6-DNP-S-GTP}$ noch Proteinmarkierungen erzielt werden.

Die Phosphorsäure wurde in Wasser gelöst, mit Pyridin und tri-n-Butylamin versetzt, im Rotationsverdampfer eingengt und zweimal mit Dimethylformamid getrocknet. Das 6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-monophosphat wurde in DMF gelöst, mit 1.1-Carbonyldiimidazol aktiviert und die Phosphorsäure zugegeben. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz eingengt und in 0.1 M Triethanolamin/ CO_2 pH 7.5 aufgenommen. Die Auftrennung der Produkte erfolgte durch Anionenaustauscher-Chromatographie mit einem Gradienten von 0.1-0.8 M Triethanolamin/ CO_2 pH 7.5. Das entstandene Diphosphat wurde bis zur Trockenheit eingengt und im Exsikkator aufbewahrt.

Der zweite Phosphorylierungsschritt erfolgte wie zuvor beschrieben. Der Reaktionsansatz wurde nach dem Einrotieren in 0.01 M Lithiumchlorid pH 3 aufgenommen und mit einem Gradienten von 0.01-0.6 M Lithiumchlorid pH 3 eluiert. Die beiden Produkte wurden getrennt eingengt, mit Ethanol gefällt und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet. Bei der nachfolgenden Dünnschichtchromatographie zeigte sich, daß das Triphosphat erwartungsgemäß später eluierte als das Edukt. Die Ausbeute lag bei 35%.

2.7.2.1 Stufenweise Synthese des $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{-6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphats}$

Die Synthese wurde mit einem Zehntel-Ansatz der unter 2.7.2 beschriebenen Vorschrift durchgeführt. Im ersten Phosphorylierungsschritt wurde jedoch $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-Orthophosphorsäure}$ mit einer Aktivität von 10 mCi/ml eingesetzt. Beide Guaninnucleotid-Analoga konnten mittels Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden (Abb. 2-21). Die Ausbeute des ausschließlich in β -Stellung markierten GTP-Analogons betrug 15%, die spezifische Aktivität 0.4 mCi/mmol.

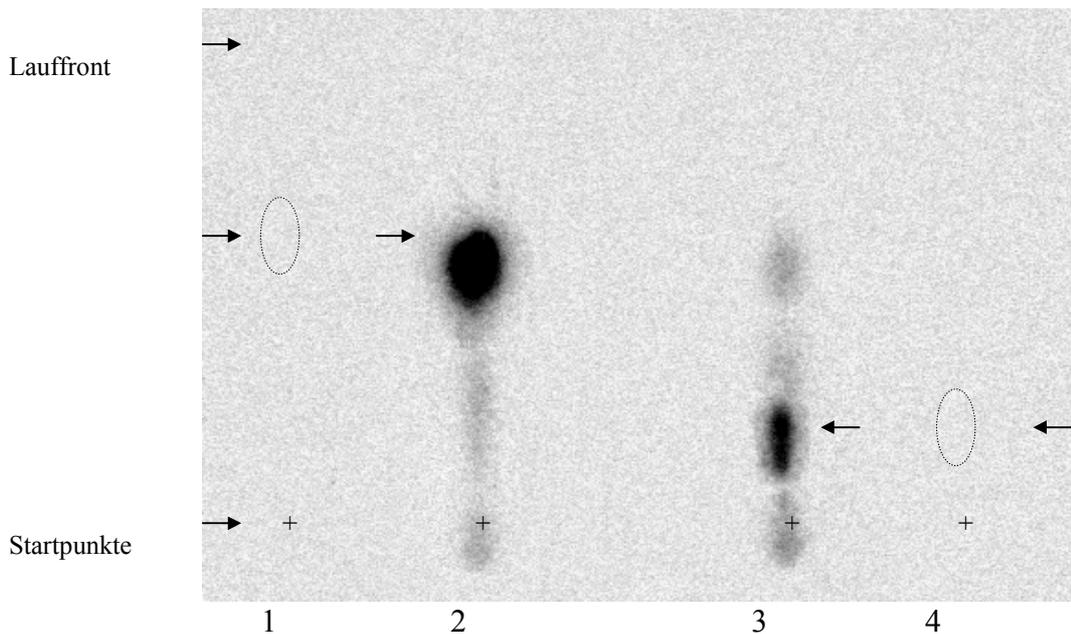


Abb. 2-21 Nachweis der GDP-/GTP-Analoga mittels Dünnschichtchromatographie

Autoradiographie der DC (Elutionsmittel 1 N LiCl, 2 M Ameisensäure) nach 0.5 h Exposition in einer Phosphorimager-Kassette

- 1: 6-DNP-S-GDP nach UV-Detektion (254 nm)
- 2: [β - 32 P]-6-DNP-S-GDP
- 3: [β - 32 P]-6-DNP-S-GTP
- 4: 6-DNP-S-GTP nach UV-Detektion (254 nm)

2.7.3 Einfluß von 6-DNP-S-GTP auf den SO_4^{2-} -Efflux

Zunächst sollte die Wirkung des GTP-Analogons auf den Sulfat-Efflux in den Vesikeln des sarcoplasmatischen Reticulums untersucht werden.

Für 6-DNP-S-GTP ergab sich eine halbmaximale Hemmkonzentration von 115 μM und eine Restaktivität von 44% der Kontrolle. Durch Zugabe von Magnesiumionen konnte der Effekt verstärkt werden ($I_{50} = 80 \mu\text{M}$ bei 32% Restaktivität der Kontrolle). 6-DNP-S-GTP zeigte somit ähnliche Affinitäten wie GTP, allerdings war die maximale Hemmung um ca. 30% erhöht. Es übertraf auch die maximale Hemmung von ATP. Vermutlich führt das GTP-Analogon durch die kovalente Bindung zu einer irreversiblen Modifikation der Zielproteine. Da der Sulfat-Efflux jedoch nicht vollständig zum Erliegen kommt, muß der Rest-Flux durch Kanalproteine vermittelt werden, die nicht der Regulation durch Nucleotide unterliegen.

Durch Vorinkubation der SR-Vesikel mit 6-DNP-S-GTP sollte überprüft werden, ob sich dadurch eine stärkere Wirkung erzielen läßt. Shoshan-Barmatz et al. (1996a) konnten zudem den Eintransport von ATP in die SR-Vesikel nachweisen. Eintransport-Studien im Vesikelsystem zufolge wird GTP sogar effizienter über die SR-Membran transportiert als ATP (Schuster 2001). Dort kann es als Substrat für die im Lumen vorliegende Casein-Kinase II dienen, die sowohl ATP als auch GTP zur Phosphorylierung verwenden kann (Hadad et al. 1999), und regulatorische Funktionen ausüben.

Die Fluxraten der vorinkubierten Vesikel lagen etwas niedriger als diejenigen ohne Vorinkubation, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant. Das GTP-Analogon wird somit entweder nicht in die Vesikel transportiert oder entfaltet seine Wirkung vorwiegend von der cytoplasmatischen Seite der Membran.

Da das GTP-Analogon als Lithiumsalz vorlag, wurde auch der Einfluß von Lithiumionen auf den Sulfat-Efflux untersucht. LiCl wurde in Konzentrationen von 0.1-5 mM eingesetzt. Erst ab 5 mM zeigte sich eine um ca. 5% gesteigerte Fluxrate. Der Einfluß von Lithiumionen ist deshalb im Gegensatz zu dem von Magnesiumionen vernachlässigbar.

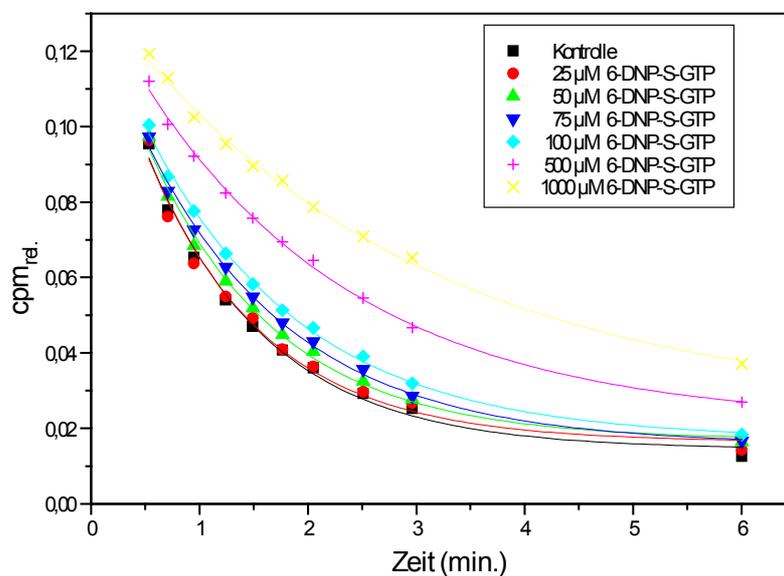


Abb. 2-22 Sulfat-Efflux-Kurven unter Zusatz von 6-DNP-S-GTP (- MgCl₂)

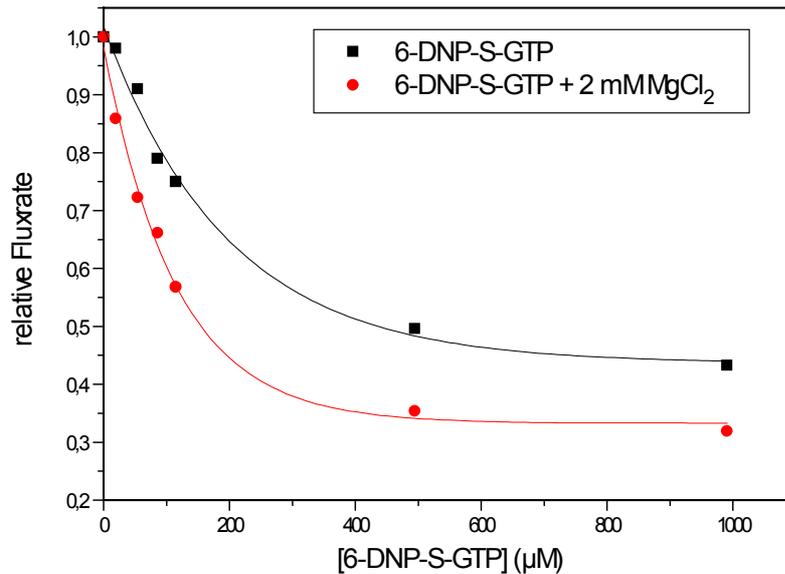


Abb. 2-23 Konzentrationsabhängige Hemmung des SO_4^{2-} -Efflux durch 6-DNP-S-GTP (\pm MgCl_2)

6-DNP-S-GTP verringert die Fluxrate um maximal 56% bei einer halbmaximalen Hemmkonzentration von 115 μM . Die Zugabe von 2 mM MgCl_2 erhöht die maximale Hemmung auf 68% bei einer I_{50} von 80 μM 6-DNP-S-GTP.

2.7.4 Detektion und Identifizierung von SR-Proteinen, die mit dem GTP-Analogen wechselwirken

Da das GTP-Analogen den Sulfat-Efflux sehr effektiv hemmt, sollten durch Affinitätsmarkierung mit [^{32}P]-6-DNP-S-GTP SR-Proteine detektiert werden, die entweder regulierend auf den Anionentransport im SR einwirken oder selbst als Kanalprotein in Frage kommen. 6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphat reagiert kovalent mit den Seitenketten von Cysteinen. Dabei bildet sich eine stabile Thioetherbindung zwischen dem Purinring des GTP-Analogons und der Sulfhydrylgruppe eines Cysteinrestes aus. Bei dieser Reaktion wird 1-Thio-2,4-dinitrobenzol freigesetzt.

SR-Vesikel wurden mit den beiden [^{32}P]-markierten GTP-Analoga (siehe 2.7.1.1 und 2.7.2.1) in Konzentrationen von 0.1-2 mM inkubiert. Die Versuche wurden bei pH 6.5 durchgeführt, um sie den Bedingungen der Sulfat-Efflux-Experimente anzugleichen. Danach wurden die Ansätze mit Probenpuffer β -Mercaptoethanol versetzt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Auswertung der getrockneten Gele erfolgte nach 2-5 Tagen Exposition in photosensitiven Kassetten im Phosphorimager.

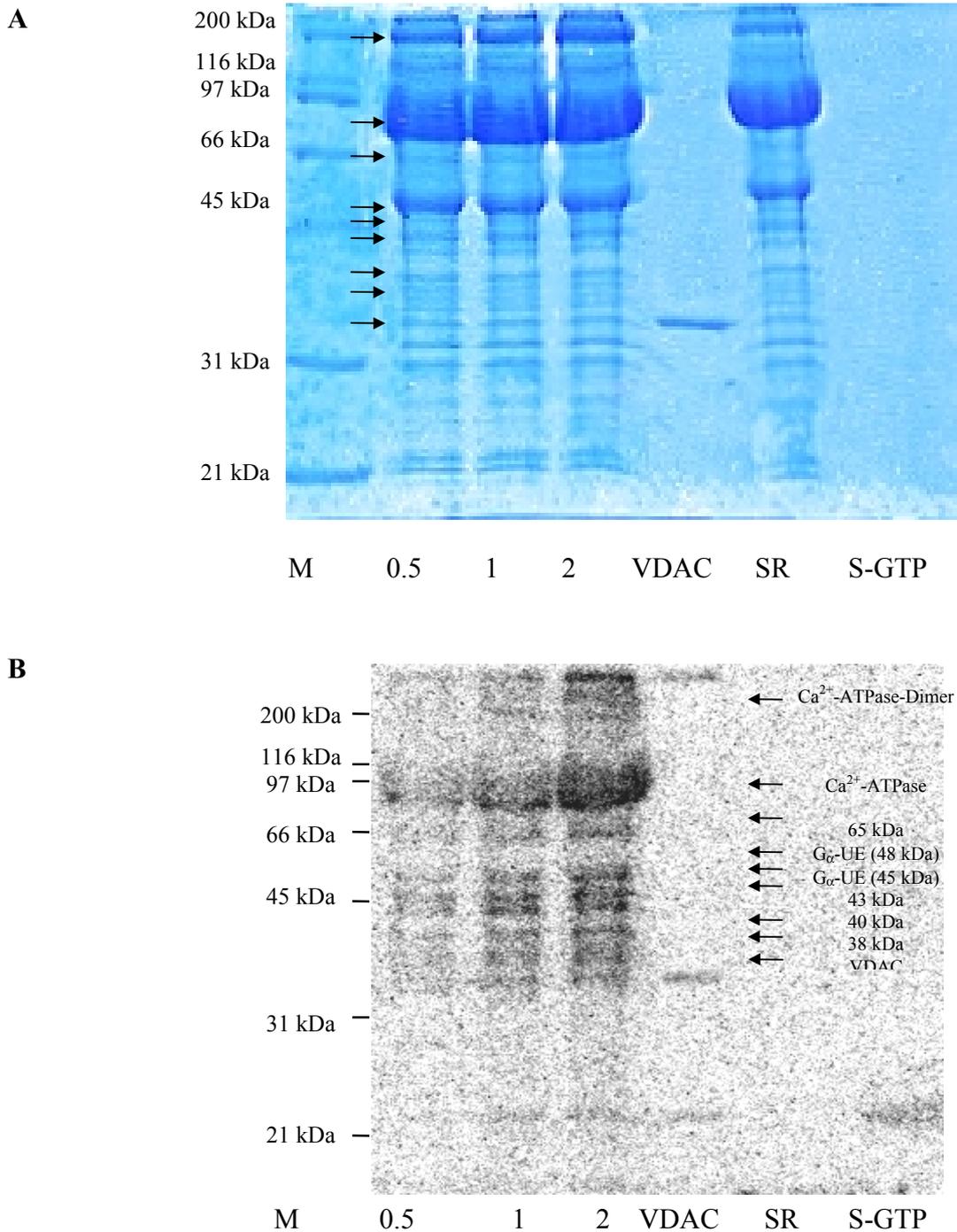


Abb. 2-24 Radioaktive Markierung von SR-Proteinen mit [β -³²P]-6-DNP-S-GTP (+ β -Mercaptoethanol)

A: SDS-PAGE (12% Polyacrylamid; Coomassie Blau-Färbung)

B: Autoradiogramm von A nach 48 h Exposition in einer Phosphorimager-Kassette

M: Marker, SR: SR-Vesikel, VDAC: VDAC inkubiert mit 1 mM [β -³²P]-6-DNP-S-GTP,

S-GTP: 2 mM [β -³²P]-6-DNP-S-GTP

Das $[\gamma\text{-}/\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{-6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphat}$ reagierte vorwiegend mit der Ca^{2+} -ATPase. Weitere Proteine traten in einem Bereich von 31-35 kDa sowie 45-60 kDa auf. Die Autoradiogramme dieser Gele konnten aufgrund der insgesamt sehr schwachen Markierung nicht zur Auswertung herangezogen werden. Dies läßt darauf schließen, daß das GTP-Analogon sehr schnell im SR hydrolysiert wurde, wodurch die radioaktive Markierung in γ -Stellung nicht mehr detektiert werden konnte. In den folgenden Experimenten wurde deshalb das ausschließlich in β -Stellung radioaktiv markierte GTP-Analogon verwendet.

Ab einer Konzentration von 0.5 mM $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{-6-DNP-S-GTP}$ konnten 8 SR-Proteine detektiert werden, die eine Wechselwirkung mit dem Analogon eingehen.

Markiert wurde die Ca^{2+} -ATPase (110 kDa), die eine Nucleotidbindungsstelle besitzt sowie ihre Dimerform (220 kDa). Auch die beiden G_{α} -Untereinheiten (45 kDa und 48 kDa) von G-Proteinen traten mit dem GTP-Analogon in Wechselwirkung. Der VDAC reagierte sowohl in den nativen SR-Vesikeln als auch nach affinitätschromatischer Aufreinigung mit 6-DNP-S-GTP. Eine Wechselwirkung könnte über die Nucleotidbindungsstelle im VDAC erfolgen (Flörke et al. 1994). Die Isoform 1 des VDAC enthält zudem 2 Cysteine, die eine kovalente Bindung mit dem Thioether eingehen können.

Weitere Banden traten bei 65 kDa, 43 kDa, 40 kDa, 38 kDa und 23 kDa auf. Letztere entspricht der Laufweite des GTP-Analogons, da sie auch in den Reaktionsansätzen ohne SR-Vesikel sichtbar ist. Die Identifizierung der restlichen vier Proteine ist das Ziel zukünftiger Untersuchungen.

Der Zusatz von Magnesiumchlorid beeinflusste die Markierung nicht, obwohl in den Sulfat-Efflux-Experimenten Magnesiumionen den hemmenden Effekt des 6-DNP-S-GTP verstärken.

Durch Zusatz von äquimolaren Mengen GTP in den Reaktionsansätzen war die Markierung der Proteine insgesamt etwas schwächer, konnte jedoch nicht vollständig aufgehoben werden.

Einem Teil der Proben wurde kein β -Mercaptoethanol zugesetzt, um eine Spaltung des bei der Markierungsreaktion entstehenden Thioethers zu verhindern. Diese Proben wiesen nach der SDS-PAGE jedoch eine diffuse Auftrennung der Proteine auf, die eine Zuordnung einzelner Markierungen erschwerte. Auffällig war allerdings die wesentlich stärkere Markierung der Ca^{2+} -ATPase in den Reaktionsansätzen ohne β -Mercaptoethanol.

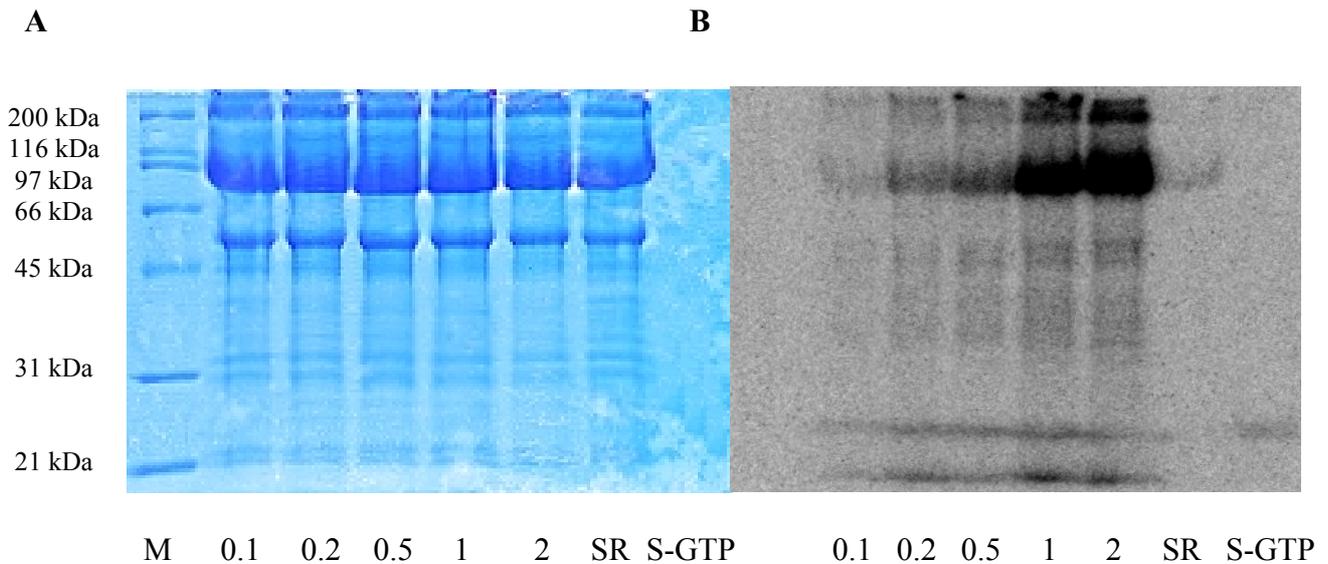


Abb 2-25 Radioaktive Markierung von SR-Proteinen mit $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{-6-DNP-S-GTP}$ (- β -Mercaptoethanol)

A: SDS-PAGE (12% Polyacrylamid; Coomassie Blau-Färbung)

B: Autoradiogramm von A nach 48 h Exposition in einer Phosphorimager-Kassette

M: Marker, SR: SR-Vesikel, S-GTP: 2 mM $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{-6-DNP-S-GTP}$

2.7.5 Einfluß von $\text{GTP}\gamma\text{S}$ und $\text{GDP}\beta\text{S}$ auf den SO_4^{2-} -Efflux

G-Proteine sind sehr wahrscheinlich an der Erregungs-Kontraktions-Kopplung im Skelettmuskel beteiligt, indem sie die Ca^{2+} -Freisetzung regulieren. Diese Annahme wird durch die unterschiedliche Wirkung der beiden Guaninnucleotid-Analoga $\text{GTP}\gamma\text{S}$ und $\text{GDP}\beta\text{S}$ untermauert. Das Hydrolyse-beständige $\text{GTP}\gamma\text{S}$ stimuliert an isolierten Muskelfasern die Freisetzung von Ca^{2+} . $\text{GTP}\gamma\text{S}$ hält die G_α -Untereinheit in ihrer aktiven Form und verhindert deren Zusammenlagerung mit dem $\beta\text{-}/\gamma$ -Dimer, wodurch es zu einer anhaltenden Aktivierung kommt. $\text{GDP}\beta\text{S}$ dagegen hemmt den Ausstrom von Ca^{2+} (Carney-Anderson und Donaldson 1994). Allerdings geht man davon aus, daß diese modulatorische Funktion nicht essentiell ist.

Um eine mögliche G-Protein-vermittelte Regulation von Anionenkanälen in der Membran des sarcoplasmatischen Reticulums zu untersuchen, wurde der Einfluß von $\text{GTP}\gamma\text{S}$ und $\text{GDP}\beta\text{S}$ auf den Sulfat-Efflux getestet.

Alle Meßreihen (auch die Kontrollmessungen) wurden unter Zusatz von 2 mM Magnesiumchlorid durchgeführt.

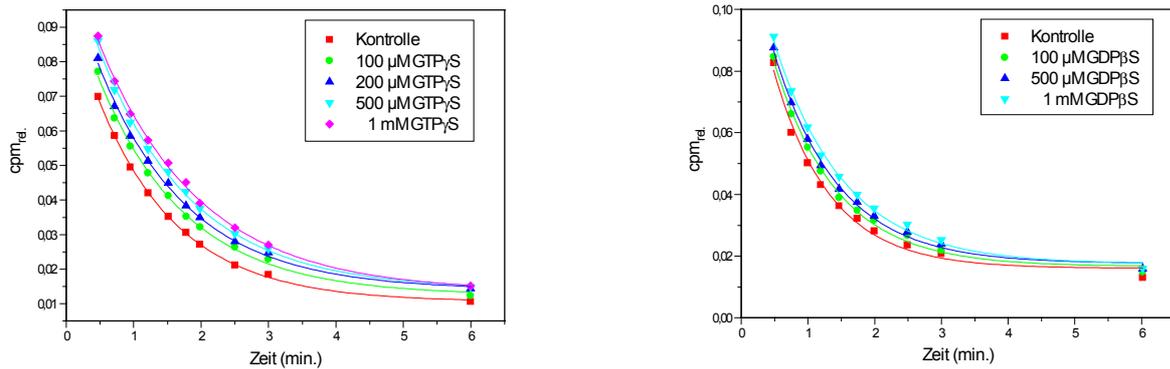


Abb. 2-26 Sulfat-Efflux-Kurven mit GTP γ S und GDP β S unter Zusatz von 2 mM MgCl $_2$

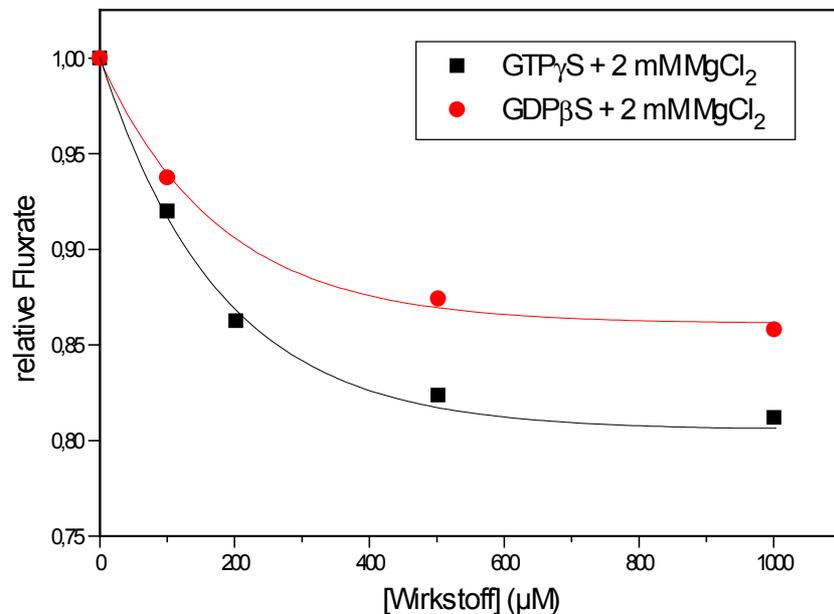


Abb. 2-27 Konzentrationsabhängige Hemmung des Sulfat-Efflux durch GTP γ S und GDP β S

Der Sulfat-Efflux wurde durch die Zugabe von GTP γ S und GDP β S reduziert. Die halbmaximale Hemmkonzentration ergab für GTP γ S 130 μ M bei einer maximalen Hemmung von 20 %.

Die inhibitorische Wirkung von GDP β S war etwas schwächer (I_{50} = 170 μ M, 15% maximale Hemmung). Dies stimmt mit der Beobachtung von Kourie (1997b) überein, daß die inhibitorische Wirkung von Nucleotiden auf den SCl in PLB-Experimenten mit steigender Ladung zunimmt. Adenosin-5-tetraphosphat zeigte im Vesikel-System dagegen keine Effekte auf den Sulfat-Efflux.

Dieses Resultat deutet daraufhin, daß die beiden Guaninnucleotid-Analoga vorwiegend direkt die Leitfähigkeit eines Kanalproteins reduzieren. Eine ausschließlich G-Protein-vermittelte Regulation von Anionenkanälen müßte zu unterschiedlichen Effekten führen.

2.8 Wirkung von Fettsäuren im SR

Auf der Suche nach physiologischen Wirkstoffen, die den Anionentransport im SR beeinflussen könnten, erweckte die Arachidonsäure (5,8,11,14-Eicosatetransäure) unser Interesse. Arachidonsäure wird durch die im Cytosol lokalisierte Phospholipase A₂ aus Membranphospholipiden freigesetzt und entfaltet vielfältige Funktionen.

Im SR des Herzmuskels moduliert sie die Struktur der Ryanodinbindungstasche und verhindert somit die Bindung von Ryanodin an den Ca²⁺-Release-Kanal (RyR) (Uehara et al. 1996). In isolierten SR-Vesikeln induziert Arachidonsäure zudem die Ca²⁺-Freisetzung durch den RyR und aufgrund der nur teilweisen Hemmung durch Rutheniumrot, einem starken Inhibitor des RyR, wahrscheinlich auch durch andere Kanäle (Dettbarn und Palade 1993).

Eine Wirkung auf die Ca²⁺-ATPase wird ebenfalls angenommen. Besonders Autooxidationsprodukte der Arachidonsäure hemmen die Ca²⁺-Akkumulation im SR-Lumen (Kim und La Bella 1988, Cardoso und De Meis 1993).

Auch eine Wirkung auf Anionenkanäle ist bekannt. In Patch-clamp Studien an L6 Myoblasten inhibiert Arachidonsäure einen Chloridkanal (*'large-conductance chloride channel'*) in Konzentrationen von 1-50 µmol/l (Zachar und Hurnak 1994). Chloridkanäle in der humanen Plazenta werden ebenfalls durch mikromolare Konzentrationen cis-ungesättigter Fettsäuren blockiert (Riquelme und Parra 1999).

Besonders interessant erschien uns jedoch die von Mukhopadhyay et al. 1(997) beschriebene Modulation von G-Proteinen in der Apikalmembran der Lunge durch ungesättigte Fettsäuren, die sich in einer verminderten GTPase-Aktivität äußert.

2.8.1 Einfluß von Fettsäuren auf den Sulfat-Efflux

Da die Arachidonsäure mit unterschiedlichen Ionenkanälen sowie G-Proteinen wechselwirkt, sollte deren Einfluß auf den Sulfattransport im SR untersucht werden. Um die Oxidation der Fettsäuren während der Messungen zu verhindern, wurden die verwendeten Puffer entgast und mit Argon gespült. Die Kontrollmessungen wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

Arachidonsäure verminderte den SO_4^{2-} -Efflux halbmaximal bei 42 μM mit einer maximalen Hemmung von 90%. Die gesättigte Arachidinsäure (n-Eicosansäure) zeigte im Bereich von 25-500 μM keinen Einfluß auf den Sulfatausstrom. Linolsäure (cis-9,cis-12-Octadecadiensäure) inhibierte den Sulfattransport mit einer I_{50} von 50 μM und einer maximalen Hemmung von 72%. Die einfach ungesättigte Ölsäure (cis-9-Octadecensäure) dagegen wirkte etwas schwächer (I_{50} = 55 μM , 68% maximale Hemmung). Als trans-Fettsäure wurde Linolensäure (trans-9,trans-12-Octadecadiensäure) eingesetzt, die den Sulfattransport ebenfalls hemmt (I_{50} = 75 μM , 65% maximale Hemmung), allerdings etwas geringer als die cis-ungesättigten Fettsäuren.

Trotz der zahlreichen Untersuchungen ist die Wirkungsweise der Fettsäuren auf die Regulation von Kanalproteinen nicht bekannt. Eine Beeinflussung der Kanaleigenschaften durch Micellenbildung scheint ausgeschlossen, da die kritische Micellenkonzentration für Arachidonsäure bei 73 μM liegt (Glick et al. 1996) und somit oberhalb der halbmaximalen Hemmkonzentration.

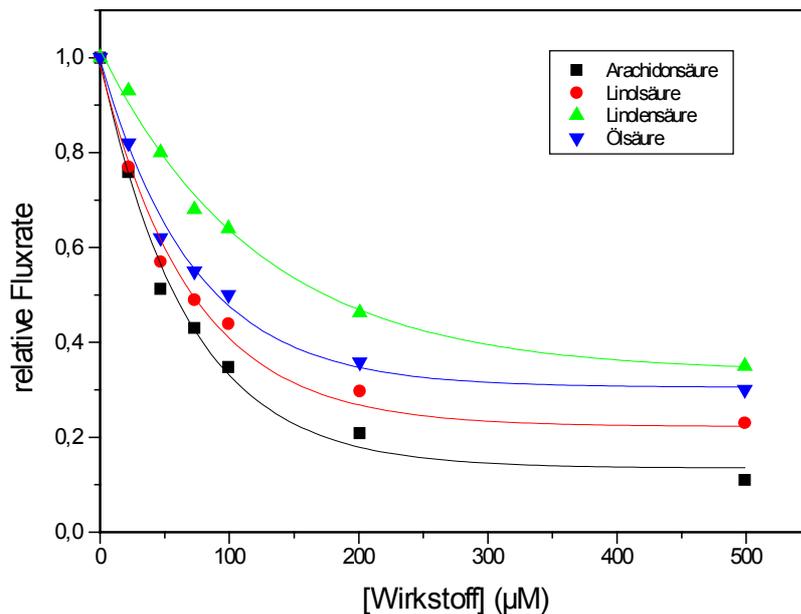


Abb.2-28 Einfluß verschiedener Fettsäuren auf den SO_4^{2-} -Efflux

Die Hemmwirkung der cis-ungesättigten Fettsäuren steigt mit zunehmender Anzahl der Doppelbindungen an. Trans-Linolensäure zeigt die geringste Wirkung. Die gesättigte Arachidinsäure beeinflusst den Sulfat-Efflux nicht.

2.8.2 Einfluß von PGE₂ auf den Sulfat-Efflux

Die Prostaglandine stellen Cyclooxygenase-Metabolite der Arachidonsäure und anderer mehrfach ungesättigter Fettsäuren dar. Zu dieser Gruppe gehören auch die Prostacycline und Thromboxane. Mit diesem Experiment sollte die Frage geklärt werden, ob auch Metabolite der Arachidonsäure den Sulfattransport im SR beeinflussen.

Aus der Literatur ist bekannt, daß Prostaglandin E₂ (PGE₂) die Anionensekretion in kultivierten Ratten- und Mausepithelien stimuliert (Wong et al. 1999, Fong und Chan 1998). Die weiteren Cyclooxygenase-Metabolite zeigen dagegen keine Wirkung. Ähnliche Effekte sind auch für die Chloridsekretion in anderen Epithelzellen bekannt (Deachapunya und Grady 1998, Bunce und Spraggs 1988, Bourke et al. 1995).

PGE₂ wird durch die Prostaglandin-Synthase, die eine Cyclooxygenase- und eine Hydroperoxidase-Komponente enthält, direkt aus Arachidonsäure gebildet.

Da PGE₂ stark oxidations- und lichtempfindlich ist, wurde es nach dem Lösen in Ethanol mit Argon überschichtet und im Dunkeln aufbewahrt.

Die Wirkungsweise von PGE₂ war abhängig von der eingesetzten Konzentration. In geringen Konzentrationsbereichen (1-50 nm) schwankten die $k_{rel.}$ -Werte um den Kontrollwert (Kurven nicht gezeigt). Von 0.1 -10 μ M PGE₂ wurde eine leichte Steigerung der Transportrate erreicht. Der Sulfat-Efflux wurde bei 0.1 μ M PGE₂ maximal um 17% stimuliert.

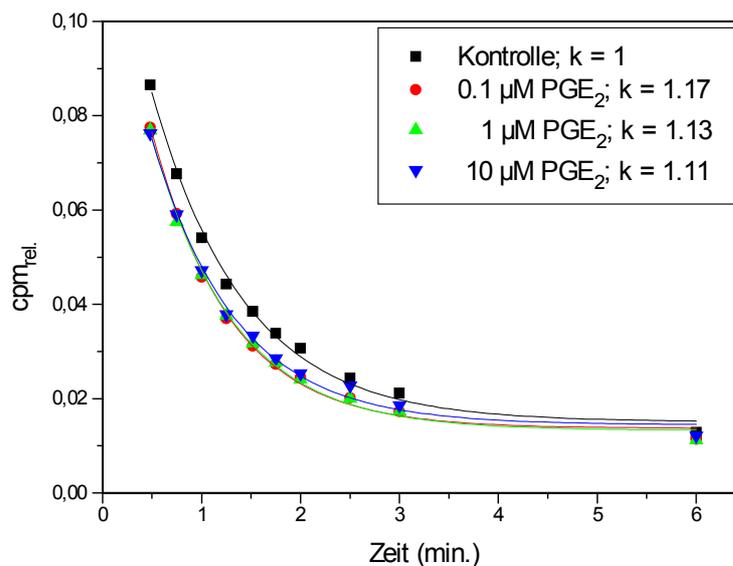


Abb. 2-29 Aktivierung des Sulfat-Efflux durch geringe PGE₂-Konzentrationen

Ab einer Konzentration von 20 μM PGE_2 wurde der Sulfattransport gehemmt. Die halbmaximale Inhibitorkonzentration lag bei 35 μM mit einer Restaktivität von 66% der Kontrolle.

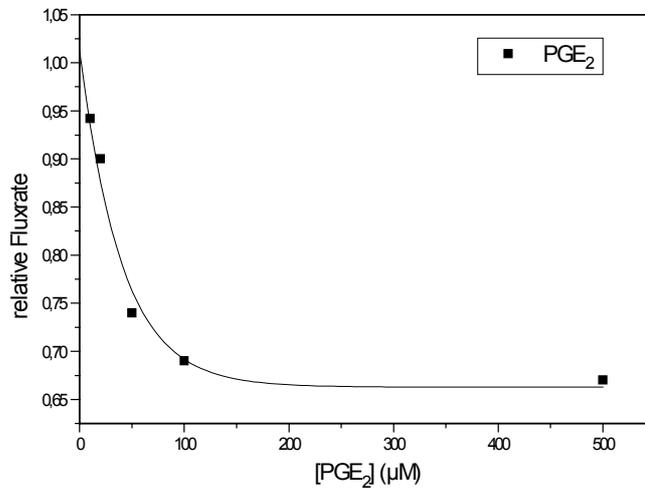


Abb. 2-30 Konzentrationsabhängige Hemmung des Sulfat-Efflux durch PGE_2 (20 μM - 500 μM)

2.9 Effekte von ATP-sensitiven Kaliumkanal-Effektoren auf den Sulfat-Efflux

Die modulatorischen Effekte von ATP-sensitiven K^+ -Kanal-Öffnern und -Inhibitoren auf die Leitfähigkeit und die kinetischen Eigenschaften von ATP-aktivierten Cl^- -Kanälen wurden in verschiedenen Studien untersucht (Sheppard und Welsh 1992, Ballatori et al. 1995, Holevinsky et al. 1994, Hongre et al. 1994, Tominaga et al. 1995), wobei sowohl K^+ -Kanal-Öffner als auch -Inhibitoren hemmende Effekte zeigen.

Kourie untersuchte erstmals in PLB-Experimenten deren Wirkung auf ATP-sensitive Chloridkanäle (SCl) im SR des Skelettmuskels (Kourie 1998). Der K^+ -Kanal-Inhibitor Glyburid, ein Sulfonylharnstoff, induziert eine reversible Abnahme des Ionenstroms und der kinetischen Parameter sowie eine Erhöhung der geschlossenen Zustände des Kanals. Die Hemmung wird deshalb als '*flicker-block*' beschrieben und erfolgt durch direkte Wechselwirkung mit dem '*gating*'-Mechanismus des SCl. Die halbmaximale Inhibitorkonzentration liegt bei 30 μM und ist mit denen für cAMP-aktivierte Cl^- -Kanäle (Sheppard und Welsh 1992) sowie ATP-sensitive K^+ -Kanäle im glatten Muskel vergleichbar (Standen et al. 1989). Glyburid wirkt von der cytoplasmatischen Seite wesentlich stärker, als von der luminalen Seite.

Minoxidil gehört zu der Pyrimidin-Klasse der ATP-sensitiven K^+ -Kanal-Öffner (Edwards und Weston 1993). In Einzelkanal-Messungen am SCl modifiziert es die Kinetik des Kanals im geöffneten Zustand und führt dann zur Hemmung (Kourie 1998).

Der ATP-sensitive K^+ -Kanal-Öffner Diazoxid erhöht die Offenwahrscheinlichkeit des SCl und den durchschnittlichen Ca^{2+} -Gegenstrom, der durch den ATP-sensitiven Cl^- -Kanal im SR fließt. Die Diazoxid-induzierte Muskelrelaxation könnte über diesen Ca^{2+} -Gegenstrom vermittelt werden. Diazoxid zeigt dagegen keinen Einfluß auf ATP-sensitive K^+ -Kanäle im Skelettmuskel (Weik und Neumcke 1989, 1990).

Der Einfluß von K^+ -Kanal-Öffnern und -Inhibitoren auf den Sulfat-Efflux in SR-Vesikeln wurde im Filterassay untersucht. Die daraus resultierenden Ergebnisse sollten mit denen aus den Einzelkanal-Messungen in Beziehung gesetzt werden.

Glyburid wurde in DMF gelöst und in Konzentrationen von 10-100 μM eingesetzt. Der Sulfat-Efflux wurde halbmaximal bei 14 μM gehemmt, die Restaktivität betrug 70% der Kontrolle.

Minoxidil zeigte ähnliche Effekte. Jedoch lag die I_{50} bei 21 μM , die Restaktivität bei 74% der Kontrolle. Die inhibitorische Wirkung der beiden Substanzen im Vesikelsystem entspricht demnach der in den Einzelkanal-Messungen.

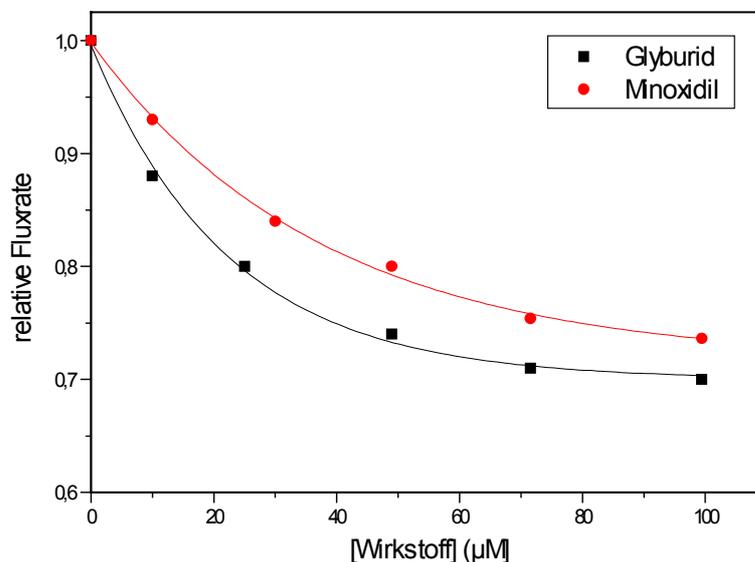


Abb. 2-31 Hemmung des Sulfat-Efflux durch den K^+ -Kanal-Aktivator Minoxidil und den K^+ -Kanal-Inhibitor Glyburid

Die Wirkung von Diazoxid trat erst bei 250 μM ein und führte zu einer leichten Hemmung. Eine Aktivierung des Sulfat-Transports konnte somit im Gegensatz zu den PLB-Experimenten an rekonstituiertem SCl nicht gezeigt werden.

Aufgrund der minimalen Effekte, die durch die K^+ -Kanal-Effektoren im Vesikelsystem hervorgerufen werden, erscheint eine Beteiligung des SCl an dem Sulfattransport im SR sehr unwahrscheinlich. Eindeutige Hinweise lieferten diese Messungen jedoch aufgrund der unterschiedlichen Versuchsbedingungen nicht und wurden deshalb nicht weiter verfolgt.

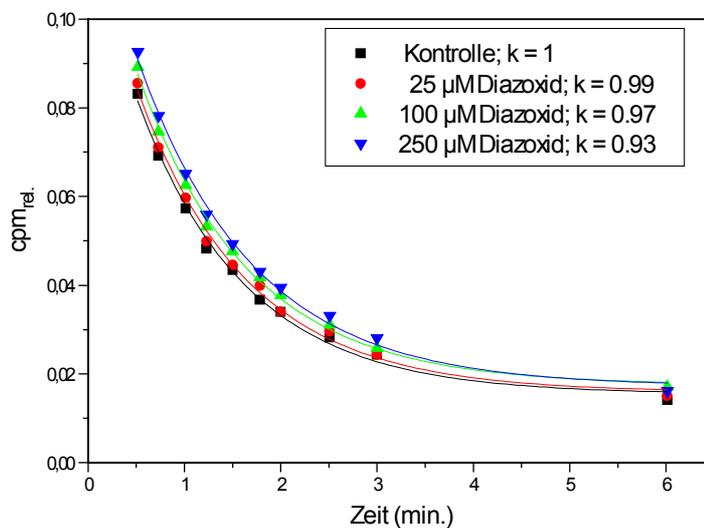


Abb. 2-32 Sulfat-Effluxkurven mit dem K^+ -Kanal-Aktivator Diazoxid

3. Diskussion

In dieser Arbeit sollte das Vorkommen des ‘*voltage-dependent anion-selective channel*’ (VDAC) in den Vesikeln des sarcoplasmatischen Reticulums (SR) nachgewiesen, eine Charakterisierung des Kanals vorgenommen sowie dessen Beteiligung am Transport von Sulfat untersucht werden. Da eine Sequenzierung und funktionelle Expression der in der SR-Membran beschriebenen Anionenkanäle bisher erfolglos war, sollten mittels Affinitätschromatographie und Affinitätsmarkierung Anionenkanäle detektiert und identifiziert werden. Dazu war die Ermittlung und Synthese spezifischer Anionenkanal-Inhibitoren notwendig. Einer möglichen G-Protein-vermittelten Regulation dieser Kanäle sollte dabei besondere Beachtung geschenkt werden.

3.1 Anionentransport im SR

Das sarcoplasmatische Reticulum des Skelettmuskels ist auf die Aufnahme, Speicherung und Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen spezialisiert. Die Hauptkomponenten dieses Systems bilden der Ryanodin-Rezeptor (RyR) und die Ca^{2+} -ATPase. Zudem existiert ein K^+ -Kanal mit hoher Leitfähigkeit (Coronado et al. 1980, Miller und Racker 1976) sowie verschiedene Anionenkanäle, deren Funktion bis jetzt noch nicht geklärt ist. Eine mögliche Rolle könnten kompensatorische Wirkungen darstellen, um den Aufbau eines Membranpotentials während der Ca^{2+} -Aufnahme bzw. des Ca^{2+} -Release zu verhindern und die Elektroneutralität im SR-Lumen zu gewährleisten. Cl^- -Ionen erhöhen zudem die Permeabilität der SR-Membran für Ca^{2+} und scheinen für eine optimale Ca^{2+} -Regulation notwendig zu sein (Sukhareva et al. 1994, Ikemoto et al. 1994, Patel et al. 1996). Als weitere physiologische Funktion wird auch der Transport anderer Metabolite wie Nucleotiden diskutiert. Die Cl^- -Konzentrationen im SR-Lumen und im Myoplasma sind sowohl im Ruhezustand als auch während der Muskelkontraktion gleich, weshalb eine regulatorische Funktion neben der kurzzeitigen Ladungskompensation fraglich ist.

Die Anzahl der Anionenkanäle im SR ist im Vergleich zu der Gesamtproteinmenge sehr gering, wodurch eine nähere Charakterisierung weiter erschwert wird. Rekonstitutionsexperimente an planaren Lipiddoppelmembranen (PLB) ergeben eine Fusionsrate von 1 bis maximal 4 Kanälen pro SR-Vesikel (Kourie 1997b, Rousseau et al. 1988).

In den vergangenen Jahren wurden eine Reihe unterschiedlicher Anionenkanäle in der SR-Membran beschrieben, die sich in ihrer Leitfähigkeit, Spannungsabhängigkeit und Regulation durch verschiedene Liganden unterscheiden. Diese unterschiedlichen Eigenschaften sind zumindest teilweise auf methodische Abweichungen bei der Präparation und der angewendeten Meßtechnik zurückzuführen. Letztendlich ist davon auszugehen, daß sich mindestens drei Anionenkanäle im SR befinden. Der *'big chloride channel'* (BCl), der *'small chloride channel'* (SCl) und der *'voltage-dependent anion-selective channel'* (VDAC).

Davon spielt der BCl in den Sulfat-Efflux-Experimenten wahrscheinlich die größte Rolle (Schuster 2001). Der Kanal weist in PLB-Experimenten eine hohe Leitfähigkeit für Cl⁻ und Offenwahrscheinlichkeit (P₀) auf. In einem Bereich von -40 mV ist er weitgehend spannungsunabhängig und somit bei einem Potential von 0 mV, wie es unter physiologischen Bedingungen und in Vesikel-Flux-Experimenten angenommen wird, geöffnet (Stienen 2000, Coonan und Lamb 1998). Zudem reagiert er in Einzelkanal-Messungen nicht auf Änderungen der Ca²⁺-Konzentration sowie einer Erniedrigung des pH-Wertes (Kourie et al. 1996a). Dagegen wird er von der cytoplasmatischen Seite durch Sulfat und von der luminalen Seite durch ATP gehemmt.

Der SCl ist abhängig von der cytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration und wird deshalb auch als Ca²⁺-aktivierter Cl⁻-Kanal beschrieben. Während der Muskelkontraktion ist die Ca²⁺-Konzentration im Myoplasma ausreichend, um den Kanal zu aktivieren (Kourie 1996b). Er tritt in PLB-Experimenten etwas seltener auf als der BCl, wodurch sein Nachweis und seine Charakterisierung erschwert werden. Zudem benötigt er für seine Aktivität einen Prä-Puls zu Potentialen von +40 mV bis +80 mV, wonach er für mehrere Sekunden in den aktiven Zustand wechselt (Kourie et al. 1996a). Der Kanal zeichnet sich zwar durch eine hohe Anionen-selektivität aus, weist jedoch ähnliche Leitfähigkeiten für SO₄²⁻- und Cl⁻-Ionen auf (Kourie et al. 1996b). Da die Transportgeschwindigkeit für SO₄²⁻ in den Vesikel-Experimenten im Vergleich zu Cl⁻ verlangsamt ist (Kometani und Kasai 1978), ist eine Beteiligung des SCl am Sulfat-Efflux nicht anzunehmen.

Der aus dem Mitochondrium bekannte VDAC konnte in den Membranen des SR mittels Immunodetektion und Markierung durch Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) nachgewiesen werden (Shoshan-Barmatz et al. 1996a, Shafir et al. 1998). Im Mitochondrium stellt er den

Haupttransportweg für verschiedene Metabolite, besonders ATP dar. Außerdem ist er an der Regulation der ATP-Konzentration im Mitochondrium beteiligt (Rostovtseva und Bezrukov 1998, Rostovtseva und Colombini 1997). Shoshan-Barmatz et al. (1996a) konnten indirekt einen Eintransport von ATP in das SR-Lumen nachweisen, weshalb der Kanal dort eine ähnliche Funktion ausüben könnte. Der VDAC liegt in niedrigen Potentialbereichen geöffnet vor und geht ab -20 mV in einen 'geschlossenen' Kationen-selektiven Zustand über. Er weist eine sehr hohe Leitfähigkeit auf, ist aber weitgehend Anionen-unselektiv. Die Anionenkanal-Inhibitoren DIDS und DCCD vermindern die Kanalaktivität in PLB-Experimenten. Durch die Zugabe von DIDS verliert der Kanal seine Spannungsabhängigkeit und wechselt auch bei niedrigen Membranpotentialen in den 'geschlossenen' Zustand (Thinnes et al. 1990). DCCD moduliert den Kanal jedoch nur bei hohen Spannungen in seinem Kationen-selektiven Zustand (Shafir et al. 1998). Die Wirkung der beiden Substanzen führt zu einer Reduktion des ATP-Transports in native SR-Vesikel (Shoshan-Barmatz et al. 1996a).

3.2 Identifizierung und Charakterisierung des VDAC

In den vergangenen Jahren häuften sich die Hinweise auf eine extramitochondriale Expression des VDAC. Das Vorkommen des VDAC in den Vesikeln des sarcoplasmatischen Reticulums wurde jedoch zu Beginn dieser Arbeit noch diskutiert. Deshalb sollte der Kanal mittels Immunodetektion in den Vesikeln des 'light' SR (LSR) und des 'heavy' SR (HSR) nachgewiesen werden. Der verwendete monoklonale Antikörper detektierte in allen Fraktionen ein Protein mit einem Molekulargewicht von 35 kDa. Bei der in einigen Präparationen zusätzlich auftretenden Markierung (28 kDa) handelt es sich entweder um eine weitere Isoform oder um ein Spaltprodukt des VDAC. Da der Kanal gegenüber dem Verdau durch Proteasen sehr resistent ist (De Pinto et al. 1991, Shoshan-Barmatz et al. 1996a) und zudem während der Aufreinigung verschiedene Protease-Inhibitoren eingesetzt wurden, ist die erste Annahme wahrscheinlicher. Eine nähere Identifizierung dieses Proteins war allerdings aufgrund des seltenen Auftretens und der geringen Mengen nicht möglich.

Da der VDAC in den Fraktionen des LSR in geringerer Anzahl vorliegt als in den Fraktionen des HSR, erscheint die von Shafir et al. (1998) postulierte Co-Lokalisation und Wechselwirkung des Kanals mit der Ca^{2+} -ATPase fragwürdig.

Die Aufreinigung des VDAC aus den Vesikeln des SR gestaltete sich entgegen den aus der Literatur bekannten Angaben problematisch, da der solubilisierte Kanal nur wenig Affinität zu den verwendeten Säulenmaterialien aufwies. Eine Adsorption erfolgte lediglich an Carboxymethyl-Cellulose und an eine mit dem VDAC-Antikörper bestückte Affinitätssäule. Das Protein eluierte von der CM-Cellulose-Matrix kontinuierlich in einem sehr großen Volumen, was zu hohen Verlusten bei der nachfolgenden Anreicherung führte. Durch Affinitätschromatographie mit dem monoklonalen Antikörper konnte der VDAC mit einem pH-Shift gezielt eluiert werden. Die Kapazität der Säule war allerdings für eine native Aufreinigung in größerem Maßstab zu gering.

Der verwendete Antikörper erkennt spezifisch die Isoform 1 des VDAC (Reymann et al. 1999, Jakob et al. 1995). Eine exakte Identifizierung des Proteins sollte dennoch mittels Sequenzanalyse erbracht werden. Eine Sequenzierung des über präparative Gele angereicherten Kanals ließ sich aufgrund einer N-terminalen Blockierung nicht vornehmen. Wahrscheinlich handelt es sich dabei, wie bei dem mitochondrialen VDAC, um eine Acetylierung (Thinnes und Reymann 1997).

Es wurde die Spaltung mit Bromcyan gewählt, da die bekannten VDAC-Isoformen aus Mensch, Maus und Ratte nur 2-4 Methionine aufweisen und somit nur wenige und dadurch gut detektierbare Peptidfragmente nach der Spaltung auftreten sollten. Es entstanden zwei Fragmente mit einem Molekulargewicht von 21 kDa und 14 kDa, deren Partialsequenzen exakt mit der erst kürzlich erschienenen Sequenz des VDAC 1 aus dem Cornea-Endothel von *Oryctolagus cuniculus* (Kaninchen) übereinstimmen. Diese Isoform enthält ebenfalls nur einen Methioninrest innerhalb der Sequenz und ein der ermittelten cDNA zugrunde liegendes Molekulargewicht von 31 kDa (Rae 2000). Abweichungen zu dem apparenten Molekulargewicht des VDAC aus den SR-Vesikeln können auf verschiedene posttranslationale Modifikationen wie Glycosylierungen zurückgeführt werden. Auch der humane, mitochondriale VDAC (HVDAC 1) weist ein apparentes Molekulargewicht von 35 kDa auf (Dolder et al. 1999).

Bis jetzt konnten zwei humane cDNA-Klone sequenziert werden (Blachly-Dyson et al. 1993), die vier Isoformen des VDAC codieren (HVDAC 1-4). HVDAC 1 und HVDAC 2 weisen 75% Sequenzhomologie auf und unterscheiden sich vorwiegend im N-terminalen Bereich durch eine Verlängerung der Isoform 2. Man geht davon aus, daß diese Region an der Zielsteuerung der verschiedenen Isoformen zu unterschiedlichen Zellkompartimenten beteiligt ist. HVDAC 3 und HVDAC 4 stellen Subtypen der Isoform 1 dar (Blachly-Dyson et al. 1994).

Aus dem Cornea-Endothel von *Oryctolagus cuniculus* liegen drei Isoformen vor, die starke Sequenzhomologien zu den aus anderen Säugetieren bekannten Formen aufweisen. Die Isoformen 1 aus Kaninchen und aus humanem VDAC stimmen bis auf zwei Aminosäuren überein, wobei humaner VDAC ein zusätzliches Methionin enthält. Eine Spaltung mit Bromcyan würde somit drei Fragmente ergeben.

Die erhaltenen Partialsequenzen weisen neben dem immunologischen Nachweis daraufhin, daß die Isoform 1 des VDAC in den Vesikeln des sarcoplasmatischen Reticulums aus dem Skelettmuskel von Kaninchen vorliegt und starke Sequenzhomologien zu dem VDAC aus dem Cornea-Endothel des gleichen Organismus aufweist.

Aufgrund seines vielfältigen Auftretens in unterschiedlichen Geweben und Kompartimenten wird die Beteiligung des VDAC als Poren-bildende Komponente verschiedener Cl⁻-Kanal-Komplexe, besonders des ORDIC (*'outwardly-rectifying depolarisation-induced chloride channel'*), diskutiert. Dafür sprechen die Hemmung von Cl⁻-Kanälen in Endothelzellen durch anti-VDAC Antikörper, die Veränderung der Kanaleigenschaften des rekonstituierten VDAC in PLB-Experimenten durch den Anionentransport-Inhibitor DIDS sowie die reversible Bindung des Stilbenderivats (Thinnes und Reymann 1997).

Der VDAC bildet außerdem einen Komplex mit dem mitochondrialen Benzodiazepin-Rezeptor und dem Adenin-Nucleotid-Translokator (McEnery et al. 1991, Kinally et al. 1993) sowie mit diversen Kinasen (Brdiczka 1991). Eine Wechselwirkung des mitochondrialen VDAC mit verschiedenen cytosolischen und mitochondrialen Proteinen ist bekannt. Dazu gehören die Hexokinase, Cytochrom c und MAP2, ein Protein des Cytoskeletts. Im SR konnte in elektronenmikroskopischen Studien eine Co-Lokalisation mit der Ca²⁺-ATPase beobachtet werden (Shafir et al. 1998). Auch eine Regulation durch assoziierte Modulatoren wird angenommen.

Zur Zeit wird diskutiert, ob der mitochondriale VDAC ausschließlich als Monomer oder auch als Dimer vorliegt. Die affinitätschromatographische Aufreinigung mit MAP2 sowie Quervernetzungsexperimente weisen auf eine Dimerbildung hin (Linden und Karlsson 1996, De Pinto et al. 1989, Roos et al. 1982). Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Membrankristallen deuten jedoch vermehrt auf eine Monomerform hin (Mannella et al. 1987, Thomas et al. 1991, Peng et al. 1992b).

Durch Verwendung der Quervernetzungsreagenzien Diepoxybutan und 4.4'-Diaminostilben-2.2'-disulfonsäure sollte eine intra- und/oder intermolekulare Komplexbildung des VDAC in

den Vesikeln des sarcoplasmatischen Reticulums untersucht werden. Die Experimente geben allerdings in den untersuchten Konzentrationsbereichen keine Hinweise auf eine mögliche Oligomerisierung des Kanals. Der VDAC scheint im SR demnach als Monomer vorzuliegen und im Gegensatz zu dem mitochondrialen VDAC keine Komplexe mit anderen Proteinen auszubilden.

3.2.1 Einfluß des VDAC auf den Sulfat-Efflux

Nach der Detektion des VDAC in den Vesikeln des SR sollte dessen Rekonstitution in künstliche Asolektin-Vesikel Aufschluß über eine mögliche Beteiligung am Sulfattransport geben. Der Kanal konnte mittels Immunodetektion in den rekonstituierten Vesikeln nachgewiesen werden, zeigte aber in den Vesikel-Flux-Experimenten keine Transporteigenschaften. Hierzu bieten sich mehrere Erklärungen an. Einerseits kann nicht sichergestellt werden, ob der Kanal funktionell rekonstituiert wurde. Bathori et al. (1993) konnten zeigen, daß mitochondrialer VDAC nach der Rekonstitution in künstliche Vesikel andere Transporteigenschaften und Inhibitorsensitivitäten aufweist als in intakten Mitochondrien. Dies wird auf die unterschiedliche Membranzusammensetzung sowie fehlende Regulationsfaktoren zurückgeführt. Durch Verwendung von Asolektin-Vesikeln sollte die Membranzusammensetzung weitgehend den Verhältnissen in den SR-Vesikeln angeglichen werden, jedoch sind geringfügige Abweichungen nicht zu vermeiden. Andererseits spielt auch der Zustand der künstlichen Vesikel eine große Rolle. Das Auftreten löchriger Vesikel, die kein Sulfat akkumulieren können, kann Hemling (1994) zufolge jedoch ausgeschlossen werden. Allerdings traten bei der nativen Aufreinigung des Kanals quantitative Probleme auf, so daß die Rekonstitution des VDAC in künstliche Vesikel im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt werden konnte.

Durch die Verwendung bekannter Effektoren des mitochondrialen VDAC sollte dessen Einfluß auf den Sulfat-Efflux im SR weitergehend untersucht werden. Eine Möglichkeit bietet dabei die Verwendung monoklonaler Antikörper gegen das Kanalprotein. Deren Epitop, der α -helikale, N-terminale Bereich des VDAC, ragt im Mitochondrium in das Cytosol (Thinnes et al. 1989) oder, wie ebenfalls vermutet, in das Innere der Pore (Mannella 1998). Ebenso diskutiert wird die Beteiligung dieses Bereichs am 'gating' des Kanals. Punktmutationen in dieser Domäne verändern die Ionenselektivität und die Spannungsabhängigkeit der Pore und weisen auf deren Eigenschaft als Spannungssensor hin (Blachly-Dyson et al. 1990, Thomas et

al. 1993). Monoklonale Antikörper gegen diese Region zeigen dagegen keinen Einfluß auf die Kanaleigenschaften des mitochondrialen VDAC (Benz et al. 1992).

Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper beeinflusst den Sulfat-Efflux ebenfalls nicht. Da die Orientierung des Kanals in der SR-Membran nicht bekannt ist, wurde der Antikörper mittels Liposofast-Technik in die SR-Vesikel eingebracht, jedoch zeigte sich auch hier keine Wirkung auf den Sulfattransport.

DCCD inhibiert in PLB-Experimenten den aus SR-Membranen aufgereinigten und rekonstituierten VDAC bei hohen Membranpotentialen in dessen Kationen-selektiven Zustand (Shafir et al. 1998). Neben seiner Wirkung auf den VDAC modifiziert DCCD auch den RyR, indem es die Bindung von Ryanodin und Ca^{2+} an den Rezeptor verhindert und somit dessen Kanalaktivität in planaren Lipiddoppelmembranen vermindert.

Im Vesikelsystem führt DCCD zu einer Stimulation des Sulfat-Efflux. Welchen Mechanismen dieser Effekt zugrunde liegt, ist fraglich. Jedoch gliedert sich das Ergebnis nahtlos in die von Schuster (2001) ein, der eine gegensätzliche Wirkung von Effektoren des RyR im Anionentransportsystem beobachten konnte. Ob dies auf eine gegenläufige Regulation beider Kanäle und/oder auf eine mögliche Vermittlung des Anionentransports durch den RyR zurückzuführen ist, muß weitergehend untersucht werden.

NADH gilt ebenfalls als Inhibitor des mitochondrialen VDAC in PLB-Experimenten. Es vermindert dessen Spannungsabhängigkeit und erleichtert somit den Verschluß des Kanals, wodurch dessen Permeabilität für Adeninnucleotide reduziert wird (Zizi et al. 1994). In den Sulfat-Efflux-Messungen zeigt es dagegen wie die anderen Nicotinamidadenosindinucleotide NAD(P)^+ , NADPH, NAAD^+ und NAADP^+ und deren Metabolite ADP-Ribose und Nicotinamidribosemonophosphat keine Wirkung.

Der starke Anionenkanal-Inhibitor DIDS moduliert die Spannungsabhängigkeit des VDAC und führt zu dessen Verschluß. Es wird vermutet, daß der Kanal die Stilbendisulfonatgruppe des Wirkstoffs bindet (Thinnes et al. 1994). In den Sulfat-Efflux-Experimenten stellt DIDS zudem einen sehr guten Hemmstoff ($I_{50} = 4 \mu\text{M}$) dar. Durch Affinitätschromatographie mit dem N-acetylierten DIDS-Derivat SITS sollte einerseits eine Bindung von SITS an den VDAC aus dem SR nachgewiesen und gleichzeitig eine quantitativ verbesserte Aufreinigung des Proteins erzielt werden. Um eine Sättigung der Bindungsstellen durch die Ca^{2+} -ATPase,

die ebenfalls durch DIDS gehemmt wird (Kasai und Taguchi 1981, Campbell und Mac Lennan 1980), zu vermeiden, wurde die Ca^{2+} -ATPase mittels Affinitätschromatographie aus der Vesikel-suspension eliminiert. Der VDAC weist allerdings keine Affinität zu SITS auf und kann nur im Durchlauf der Säulenchromatographie detektiert werden. Das Eluat enthielt geringe Mengen Ca^{2+} -ATPase und das Glycoprotein 53. Eine Änderung der Puffersysteme sowie der Detergenzkonzentration zeigte keine gesteigerte Affinität. Ein möglicher Grund für die ausbleibende Bindung des Stilbenderivats durch den VDAC könnte eine vollständige Verhüllung des Kanals in den Detergenz-Micellen darstellen. Dies wurde ebenfalls bei der Aufreinigung des mitochondrialen VDAC beschrieben, jedoch nicht bei der Verwendung des Detergenzes Nonidet P-40 (De Pinto et al. 1989). Zudem bindet der Kanal unter den gleichen Solubilisierungsbedingungen an CM-Cellulose und an eine Affinitätssäule mit dem anti-VDAC Antikörper. Die unterschiedlichen Affinitäten der beiden Kanäle zu SITS deuten demnach vielmehr auf verschiedene Funktionen und Regulationsfaktoren im Mitochondrium und im SR hin.

Die abweichenden Versuchsbedingungen in PLB- und Vesikel-Flux-Experimenten erschweren eine vergleichbare Wirkung verschiedener Effektoren in beiden Systemen. Eine Beteiligung des VDAC bei der Vermittlung des Sulfat-Austauschs im SR erscheint jedoch sehr unwahrscheinlich.

Vielmehr könnte er an dem Transport von Nucleotiden in das SR-Lumen beteiligt sein. Dort befinden sich einige Ca^{2+} -bindende Proteine wie Sarcalumenin, HCP (*'histidine-rich calcium-binding protein'*) und Calsequestrin, die den RyR in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsgrad regulieren (Orr und Shoshan-Barmatz 1996, Shoshan-Barmatz et al. 1996b, Szegedi et al. 1999). Neben einer möglichen Autophosphorylierung (Varsanyi und Heilmeyer 1980) zählen die Casein Kinase II (CKII) sowie die Calmodulin-abhängige Proteinkinase (Hadad et al. 1999, Leddy et al. 1993) zu den möglichen Vermittlern.

Da im SR keine ATP-generierenden Systeme bekannt sind, ist ein Eintransport von Nucleotiden notwendig. Shoshan-Barmatz et al. (1996a) konnten indirekt über die endogene Phosphorylierung der intraluminalen Proteine Sarcalumenin und HCP durch $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ einen ATP-Transport in die SR-Vesikel nachweisen. Im SR des Herzmuskels wurde in PLB-Experimenten ein Anionenkanal beschrieben, der durch die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) aktiviert wird und für Adeninnucleotide permeabel ist (Kawano et al. 1999). Zudem konnte in unserem Institut der Eintransport von ATP, GTP und AMP-PNP in die SR-Vesikel

nachgewiesen werden, der mit unterschiedlicher Effizienz und Geschwindigkeit erfolgt (Schuster 2001).

3.3 Funktion von G-Proteinen im SR

GTP-bindende Proteine konnten im Sarcolemma und in den transversalen Tubuli (T-Tubuli) nachgewiesen werden und spielen wahrscheinlich bei der Excitations-Kontraktions-Kopplung (EKK) im Skelettmuskel eine Rolle. Als mögliche Funktion wird die Regulation des Ca^{2+} -Release postuliert (Hasegawa und Kumagai 1989). Dafür sprechen eine Co-Lokalisation und Wechselwirkung mit spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen (DHPR) (Toutant et al. 1990, Carney-Anderson 1997) sowie die Modulation ihrer Aktivität (Yatani et al. 1988, Hamilton et al. 1991, Horne et al. 1988).

Neben der Lokalisation in den T-Tubuli konnten auch einige G_{α} -Untereinheiten von G-Proteinen in den Fraktionen des HSR und des LSR mittels ADP-Ribosylierung und Immunodetektion nachgewiesen werden. Dazu zählen $G_{i\alpha}$ -, $G_{q\alpha}$ - und $G_{s\alpha}$ -Untereinheiten (Carrasco et al. 1994, Kutchai et al. 1993, Doucet und Tuana 1991). Deren Funktion konnte bis jetzt jedoch noch nicht geklärt werden. Neben einer möglichen Wirkung auf den RyR könnten auch Anionenkanäle im SR durch G-Proteine direkt beeinflusst werden. Dies ist für einen Cl^{-} -Kanal aus den Acinus-Zellen des Pankreas bekannt (Martin 1993). Eine G-Protein-vermittelte Regulation von Chloridkanälen in Epithelzellen (ORCC, 'outwardly-rectified chloride channel') und in Myocyten wird ebenfalls diskutiert (Ismailov et al. 1996, Sun et al. 1993).

3.3.1 Nachweis von G-Proteinen im SR des Skelettmuskels

In den Vesikeln des HSR und des LSR konnten mittels Immunodetektion zwei G_{α} -Untereinheiten detektiert werden. Die Proteine besitzen ein Molekulargewicht von 48 kDa und 45 kDa, wobei letzteres wesentlich schwächer auftritt. Der verwendete monoklonale Antikörper richtet sich gegen einen konservierten Bereich der GTP-Bindungs-Domäne und erkennt deshalb verschiedene G_{α} -Untereinheiten. Eine nähere Klassifizierung der beiden G_{α} -Untereinheiten war aus diesem Grund nicht möglich. Kutchai et al. (1993) konnten allerdings bei 45 kDa mittels ADP-Ribosylierung und spezifischer Immunodetektion eine $G_{s\alpha}$ -Untereinheit in den Fraktionen des LSR und des Sarcolemmas nachweisen.

3.3.2 Hinweise auf eine G-Protein-vermittelte Regulation von Anionenkanälen im SR

Die im Vesikelsystem eingesetzten Antikörper gegen die G_{α} -Untereinheiten führten zu einer Hemmung des Sulfat-Efflux. Einige Anionenkanäle könnten demnach direkt durch ein G-Protein moduliert werden. Erste Hinweise auf eine direkte Wechselwirkung von GTP-bindenden Proteinen und Ionenkanälen stammen aus der Modulation von Ca^{2+} - und K^{+} -Kanälen durch muscarinische Agonisten in Herz-Myocyten (Dolphin 1990). Eine Regulation über 'second messenger' ist unwahrscheinlich, da cAMP den Sulfat-Efflux nicht beeinflusst (Schuster 2001). Inositolpolyphosphate modulieren zwar in Einzelkanal-Messungen die Leitfähigkeit des Ca^{2+} -aktivierten Cl^{-} -Kanals im SR (SCI) durch Bindung an eine Polyanionenbindungsstelle. Diese direkte Wirkung unterscheidet sich jedoch von ihrer traditionellen Rolle in der Phosphoinositid-Kaskade (Kourie 1997b).

Weitere Hinweise auf eine direkte Regulation von Anionenkanälen im SR durch G-Proteine sollten durch Affinitätsaufreinigung und -markierung mit verschiedenen Suraminderivaten erzielt werden.

Suramin weist neben seinen vielfältigen therapeutischen Einsatzmöglichkeiten auch unterschiedliche Wirkungen im SR auf. Der Ca^{2+} -Release wird durch den Wirkstoff stimuliert, die Ca^{2+} -Akkumulation durch die Ca^{2+} -ATPase dagegen gehemmt (Emmick et al. 1994). Zudem stellt es den bisher stärksten Inhibitor (I_{50} von 0.9 bis 1.16 μM) des Anionentransports im Vesikelsystem dar (Schuster 2001). Neben dieser Beobachtung wird auch eine Wechselwirkung zwischen Suramin und den G_{α} -Untereinheiten von G-Proteinen postuliert (Beindl et al. 1996, Huang et al. 1990, Hohenegger et al. 1998). Suramin verhindert einerseits die spontane Freisetzung von GDP und zerstört andererseits die ternäre Komplexbildung zwischen Agonist-Rezeptor-G-Protein (Freissmuth et al. 1999). Eine antagonistische Wirkung auf P2Y-Rezeptoren, die zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Ionenkanäle gehören, ist ebenfalls bekannt (Kugelgen und Wetter 2000).

Die Vermutung lag deshalb nahe, daß die inhibitorische Wirkung von Suramin auf den Sulfat-Efflux eventuell über die Modulation eines G-Proteins erfolgen könnte. Weiterhin besteht jedoch auch die Möglichkeit einer direkten Wechselwirkung des Inhibitors mit einem Ionenkanal.

Durch Affinitätsaufreinigung- und Affinitätsmarkierung mit verschiedenen im Arbeitskreis synthetisierten Suraminderivaten sollten deshalb mögliche Anionenkanäle oder andere regulatorische Proteine identifiziert werden.

Das kovalent reagierende Suraminderivat SB 9 weist eine gewisse Spezifität für G-Proteingekoppelte Ionenkanäle (P2Y₁-Rezeptoren) auf (Lambrecht et al. 2000) und hemmt den Sulfat-Efflux im Vesikelsystem ($I_{50} = 28 \mu\text{M}$). Zudem zeigt es Affinität zu einer G_α-Untereinheit (48 kDa) der SR-Vesikel, da diese an einer Säulenmatrix mit immobilisiertem SB 9 retardiert wird und in den eluierten Fraktionen mittels Immunodetektion nachgewiesen werden konnte. Ein erster Hinweis auf die Interaktion eines Suraminderivats mit einer G_α-Untereinheit aus den Vesikeln des sarcoplasmatischen Reticulums konnte hiermit dargestellt werden. Die zweite im SR vorliegende G_α-Untereinheit (45 kDa) konnte in den untersuchten Fraktionen nicht detektiert werden. Möglicherweise liegt sie nach der Chromatographie sehr stark verdünnt vor. Aus der Literatur ist außerdem bekannt, daß verschiedene Suraminderivate mit unterschiedlichen G_α-Untereinheiten wechselwirken (Hohenegger et al. 1998, Chahdi et al. 1998, Freissmuth et al. 1997). Eine Affinität beider Untereinheiten für SB 9 ist deshalb nicht zwingend.

Das Eluat enthält zusätzlich die Ca²⁺-ATPase, ein Protein bei 66 kDa sowie weitere Proteine, deren Charakterisierung den Rahmen dieser Arbeit überstieg. Der VDAC reagierte nicht mit SB 9, was eine Wechselwirkung mit Suramin bzw. den Suraminderivaten in den Sulfat-Efflux-Experimenten unwahrscheinlich erscheinen läßt.

Auf der Suche nach Suraminderivaten, die zur Affinitätsmarkierung eingesetzt werden können, erwies sich das Suraminderivat SB 22 als besonders geeignet, da es eine reaktive Gruppe enthält und zusätzlich mit ¹²⁵Jod radioaktiv markiert werden kann. Die maximale Hemmung des Sulfat-Efflux von 93% sowie die halbmaximale Inhibitorkonzentration ($I_{50} = 0.8 \mu\text{M}$) reichen an die Suraminwirkung in den Sulfat-Efflux-Experimenten sehr gut heran. SB 10 zeigt im Vesikelsystem ähnliche Effekte, geht aber keine irreversible Reaktion mit einem Zielprotein ein und kann deshalb nicht zur Affinitätsmarkierung eingesetzt werden.

Die Inkubation des kovalent reagierenden und jodierten Suraminderivats mit den nativen SR-Vesikeln ergab drei radioaktive Markierungen, darunter die Ca²⁺-ATPase sowie zwei Proteine bei 48 kDa und bei 40 kDa. Das 48 kDa Protein ist wahrscheinlich mit der G_α-Untereinheit von G-Proteinen identisch, die auch an die SB 9-Affinitätssäule adsorbiert wurde. Die

Identifizierung des 40 kDa Proteins steht zur Zeit noch aus. Eine mögliche Rolle als Anionentransport-Vermittler wird diskutiert.

Erstaunlicherweise konnte durch SB 22 keine Markierung des Ca^{2+} -Release-Kanals erzielt werden, obwohl eine direkte Wechselwirkung zwischen Suramin und dem RyR über eine Calmodulin-Bindungsstelle nachgewiesen wurde (Klinger et al. 1999). Die Markierung der Ca^{2+} -ATPase entspricht dagegen den Erwartungen. Neben den aus der Literatur bekannten Einflüssen auf das Transportprotein konnten auch in unserer Arbeitsgruppe eine Verminderung der ATP-Hydrolyse durch Suramin sowie eine Hemmung des Ca^{2+} -Transports in die SR-Vesikel ermittelt werden. Allerdings ist die Markierung der Ca^{2+} -ATPase als sehr schwach zu bezeichnen, wenn man gleichzeitig den hohen ATPase-Gehalt der Membran betrachtet. SB 22 weist zu der Ca^{2+} -ATPase demnach eine eher geringe Affinität auf, während die Markierung der beiden anderen Proteine trotz des vergleichsweise geringen Auftretens sehr stark ist.

In dem Molekulargewichtsbereich <20 kDa konnten neben den durch SB 22 hervorgerufenen Schwärzungen des Films keine weiteren Proteine detektiert werden.

SB 22 entfaltet seine Wirkung auf den Sulfat-Efflux im SR demnach entweder über die Modulation von G-Proteinen oder die Wechselwirkung mit dem 40 kDa Protein, einem möglichen Anionenkanal. Eine Vermittlung des Anionentransports durch die Ca^{2+} -ATPase, die das Derivat ebenfalls bindet, kann ausgeschlossen werden, da das Protein in rekonstituierten Vesikeln keine Permeabilität für Sulfat aufweist (Schuster 2001).

Da der VDAC von dem Suraminderivat nicht markiert wird, ist eine Beteiligung des VDAC an dem Sulfat-Efflux in den SR-Vesikeln unwahrscheinlich. Es sei denn, der Kanal wird ebenfalls indirekt über andere Metabolite oder G-Proteine reguliert.

3.4 Einfluß von Nucleotiden auf den Sulfat-Efflux

Nucleotide zeigen in den Sulfat-Efflux-Experimenten und in den Einzelkanal-Messungen ein vielfältiges Wirkungsspektrum. ATP ist in beiden Systemen der stärkste Inhibitor. In den PLB-Experimenten erfolgt der Einfluß seitenspezifisch (Kourie 1997a). Der BCl wird ausschließlich von der luminalen Seite durch ATP gehemmt, der SCl reagiert von beiden Seiten. Die Wirkung auf den VDAC ist strittig. Einige Arbeitsgruppen konnten in PLB-Experimenten keine Hemmung erkennen (Zizi et al 1994), andere detektierten eine verminderte Cl^- -Leitfähigkeit des Kanals nach Zusatz von ATP (Rostovtseva und Bezrukov 1998).

Jedoch zeigen auch andere Nucleotide wie GTP, UTP, CTP, ADP und Mg^{2+} -AMP-PNP in beiden Meßsystemen hemmende Einflüsse auf den Anionentransport (Schuster 2001).

In dieser Arbeit sollte besonders eine regulatorische Wirkung von GTP auf den Sulfat-Efflux, der eventuell über G-Proteine vermittelt wird, untersucht werden.

Ein speziell synthetisiertes, reaktives GTP-Analogon, das 6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphat (6-DNP-S-GTP), inhibierte den Sulfat-Efflux im Vesikelsystem halbmaximal bei 115 μ M mit einem maximalen Hemmeffekt von 56%. Durch Zugabe von Magnesiumionen konnten eine höhere Affinität ($I_{50} = 80 \mu$ M) und maximale Hemmung erzielt werden (68%). Das GTP-Analogon zeigt demnach vergleichbare Affinitäten wie GTP ($I_{50} = 120 \mu$ M, $I_{50\text{Magnesium}} = 100 \mu$ M). Die maximale Hemmung ist jedoch um 30% gesteigert und übertrifft sogar die Wirkung von ATP. Das kovalent reagierende 6-DNP-S-GTP führt wahrscheinlich nach der Bindung zu einer irreversiblen Modifikation der Effektorproteine, woraus der stärkere Hemmeffekt resultieren könnte. Da der Sulfat-Efflux nicht vollständig unterbunden wird, liegt die Vermutung nahe, daß nicht alle Kanalproteine durch Nucleotide reguliert werden oder diese nur bei einer geringen Zahl ihre vollständige Wirkung entfalten.

Durch Affinitätsmarkierung mit dem radioaktiv markierten GTP-Analogon sollten Proteine identifiziert werden, die eine Wechselwirkung mit dem Analogon eingehen und eventuell an den Anionentransportvorgängen im SR beteiligt sind.

Bei der radioaktiven Synthese des Analogons wurden zwei unterschiedliche Synthesewege gewählt. In einem ersten Ansatz wurde 6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-monophosphat durch [32 P]-Pyrophosphat in einem Reaktionsschritt phosphoryliert. Der Vorteil lag in einer leichteren Handhabung der Versuchsdurchführung. Die radioaktive Markierung trat jedoch gleichmäßig verteilt in β - und γ -Stellung auf, wodurch Proteine auch durch Phosphorylierung markiert werden. Eine Phosphorylierung der Anionenkanäle wird für ihre Regulation zwar nicht angenommen, da AMP-PNP ebenfalls den Sulfat-Efflux im Vesikelsystem und in Einzelkanal-Messungen hemmt (Schuster 2001, Kourie 1997a), sollte aber dennoch experimentell ausgeschlossen werden.

Bei einer alternativen Synthese wurde die Phosphorylierung stufenweise durchgeführt, wobei die radioaktive Markierung ausschließlich in β -Position erfolgte. Dieser Syntheseweg gestaltete sich aufgrund des zusätzlichen, säulenchromatographischen Aufreinigungsschrittes etwas aufwendiger, auch die Ausbeute und die spezifische Aktivität des Analogons waren

geringer. In den Inkubationsexperimenten mit SR-Vesikeln zeigte sich allerdings eine wesentlich deutlichere Markierung der SR-Proteine. Es ist deshalb davon auszugehen, daß das GTP-Analogon im SR sehr schnell hydrolysiert wird. Proteine, die mit dem in γ -Stellung markierten Wirkstoff wechselwirken, können dann nicht mehr detektiert werden. Im Arbeitskreis konnte gezeigt werden, daß ATP und GTP bei der Inkubation mit SR-Vesikeln sehr schnell metabolisiert werden. GTP wird allerdings wesentlich langsamer hydrolysiert.

Insgesamt wurden 8 SR-Proteine mit [32 P]-6-DNP-S-GTP markiert. Darunter die Ca^{2+} -ATPase, die eine Nucleotidbindungsstelle besitzt, und der VDAC, der sowohl in nativen SR-Vesikeln als auch nach präparativer Aufreinigung kovalent mit dem GTP-Analogon reagiert. Eine Wechselwirkung könnte über die Nucleotidbindungsstelle (GYGFG) des Kanals erfolgen, an die ATP-Bindung nachgewiesen werden konnte (Flörke et al. 1994, Thinnies et al. 1994). Außerdem weist die Isoform 1 des VDAC aus *Oryctolagus cuniculus* zwei Cysteine auf (Cys¹²⁷ und Cys²³²), die mit dem GTP-Analogon einen stabilen Thioether ausbilden können. GTP könnte einerseits die Kanalaktivität des VDAC regulieren, viel wahrscheinlicher jedoch ist, daß der Kanal unter anderem den Eintransport von GTP in das SR-Lumen vermittelt. GTP wird sogar effizienter in die Vesikel transportiert als ATP und könnte im Lumen ebenfalls regulatorische Funktionen wahrnehmen sowie als Substrat für die Casein-Kinase II dienen. Weitere Markierungen traten bei 65 kDa, 48 kDa, 45 kDa, 43 kDa, 40 kDa und 38 kDa auf. Bei den 48 kDa und 45 kDa Proteinen handelt es sich um die G_{α} -Untereinheiten von G-Proteinen, die in den SR-Vesikeln mittels Immunodetektion nachgewiesen werden konnten. Die restlichen vier Proteine konnten bis jetzt noch nicht identifiziert werden, eine nähere Charakterisierung steht noch aus.

Durch Zusatz von Magnesiumchlorid ließ sich die Affinität des Analogons zu den Zielproteinen nicht erhöhen, obwohl Magnesiumionen dessen hemmenden Wirkung auf den Sulfat-Efflux verstärken ($I_{50} = 80 \mu\text{M}$).

Neben 6-DNP-S-GTP wurde auch die Wirkung der GTP-/GDP-Analoga $\text{GTP}\gamma\text{S}$ und $\text{GDP}\beta\text{S}$ auf den Sulfat-Efflux untersucht. Das nicht-hydrolysierbare $\text{GTP}\gamma\text{S}$ aktiviert G-Proteine, $\text{GDP}\beta\text{S}$ dagegen stellt einen kompetitiven Inhibitor von GTP/ $\text{GTP}\gamma\text{S}$ dar. An isolierten Muskelfasern stimuliert $\text{GTP}\gamma\text{S}$ die Freisetzung von Ca^{2+} . $\text{GDP}\beta\text{S}$ dagegen hemmt den Ausstrom von Ca^{2+} (Carney-Anderson und Donaldson 1994). In den Vesikeln des sarcoplasmatischen Reticulums reduzieren beide Nucleotide den Sulfat-Efflux, wobei $\text{GDP}\beta\text{S}$ etwas

schwächer wirkt. Bei einer alleinigen Wirkung auf G-Proteine müßten beide Nucleotide gegensätzliche Effekte hervorrufen. Die Nucleotide scheinen demnach vorwiegend Anionenkanäle direkt zu modulieren. Daß die hemmende Wirkung der Nucleotide mit steigender Ladung zunimmt (Kourie 1997a), erklärt den geringeren Einfluß von GDP β S.

3.5 Einfluß von Fettsäuren und ihren Metaboliten auf den Sulfat-Efflux

Arachidonsäure, die aus Membranphospholipiden durch Phospholipase A₂ freigesetzt wird, entfaltet im sarcoplasmatischen Reticulum ein breites Wirkungsspektrum. Im SR des Herzmuskels moduliert sie die Struktur der Ryanodinbindungstasche und verhindert somit die Bindung von Ryanodin an den Ca²⁺-Release-Kanal (Uehara et al. 1996). Zudem induziert sie in isolierten SR-Vesikeln die Ca²⁺-Freisetzung durch den RyR und aufgrund der nur teilweisen Hemmung durch Rutheniumrot, einem starken Inhibitor des RyR, wahrscheinlich auch durch andere Kanäle (Dettbarn und Palade 1993).

Eine Wirkung auf die Ca²⁺-ATPase wurde ebenfalls beschrieben. Besonders Autooxidationsprodukte der Arachidonsäure hemmen den Ca²⁺-Transport in das SR (Kim und La Bella 1988). Arachidin-, Palmitin- und Stearinsäure weisen ähnliche Effekte auf (Cardoso und De Meis 1993).

In Patch-clamp Studien an L6 Myoblasten hemmt die Arachidonsäure einen Chloridkanal (*'large-conductance chloride channel'*) in Konzentrationen von 1-50 μ mol/l (Zachar und Hurnak 1994). Auch Chloridkanäle in der humanen Plazenta werden durch mikromolare Konzentrationen cis-ungesättigter Fettsäuren inhibiert (Riquelme und Parra 1999).

Eine regulatorische Wirkung von Fettsäuren auf G-Proteine wird ebenfalls postuliert. Arachidonsäure vermindert die GTPase-Aktivität von G-Proteinen in der Apikalmembran der Lunge (Mukhopadhyay et al. 1997). Auch andere ungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure und Ölsäure zeigen diesen Effekt.

Aufgrund der zahlreichen, beschriebenen Wirkungen sollte der Einfluß verschiedener Fettsäuren auf den Sulfat-Efflux im SR untersucht werden. Alle untersuchten Substanzen mit Ausnahme der gesättigten Arachidinsäure reduzieren den Sulfattransport aus den SR-Vesikeln. Der hemmende Einfluß nimmt mit der Kettenlänge und der Anzahl Doppelbindungen zu. Trans-ungesättigte Fettsäuren weisen ferner geringere Effekte als cis-ungesättigte Fettsäuren auf. Arachidonsäure (I₅₀ = 42 μ M) entfaltet im Vesikelsystem die stärkste Wirkung mit einer maximalen Hemmung von 90%.

Die Hemmung des Sulfat-Efflux durch Fettsäuren stellt einen interessanten Regulationsmechanismus dar und entspricht erneut der zuvor beschriebenen gegensätzlichen Wirkung von Effektoren des RyR auf den Anionentransport im SR.

Trotz der zahlreichen Untersuchungen ist die Wirkungsweise der Fettsäuren auf die Regulation von Kanalproteinen jedoch noch unbekannt. Eine Beeinflussung der Kanaleigenschaften durch die Bildung von Micellen scheint jedoch ausgeschlossen, da die kritische Micellenkonzentration für Arachidonsäure bei 73 μM liegt (Glick et al. 1996) und somit oberhalb der halbmaximalen Inhibitorkonzentration.

Weiterhin sollte die Frage geklärt werden, ob auch Metabolite der Arachidonsäure den Sulfattransport im SR beeinflussen. Prostaglandin E_2 (PGE_2) wird durch die Prostaglandin-Synthase, die eine Cyclooxygenase- und eine Hydroperoxidase-Komponente enthält, direkt aus Arachidonsäure gebildet. Aus der Literatur ist bekannt, daß PGE_2 die Anionensekretion in kultivierten Ratten- und Mausepithelien stimuliert (Wong et al. 1999, Fong und Chan 1998). Andere Prostaglandine sowie die weiteren Cyclooxygenase-Metabolite, Prostacycline und Thromboxane zeigen dagegen keine Wirkung. Ähnliche Effekte sind auch für die Chloridsekretion in anderen Epithelzellen bekannt (Deachapunya und Grady 1998, Bunce und Spraggs 1988, Bourke et al. 1995).

Prostaglandin E_2 führt in geringen Konzentrationen zu einer Stimulation des Sulfattransports aus den SR-Vesikeln. Höhere, unphysiologische Konzentrationen hemmen dagegen den Sulfat-Efflux.

Eine gegensätzliche Regulation des Anionentransports im SR durch Arachidonsäure und PGE_2 ist demnach denkbar. Ob diese Wirkung direkt erfolgt oder ebenfalls G-Proteinvermittelt abläuft, ist noch ungeklärt.

4. Zusammenfassung

1.) Die Vesikel des sarcoplasmatischen Reticulums (SR) aus der Skelettmuskulatur von Kaninchen enthalten neben Kanälen mit hoher (*'big chloride channel'*) und geringer (*'small chloride channel'*) Leitfähigkeit auch den aus der äußeren Mitochondrienmembran bekannten *'voltage-dependent anion-selective channel'* (VDAC).

Der Kanal konnte mittels Immunodetektion in den Vesikeln des *'heavy'* und des *'light'* SR nachgewiesen, durch Affinitätschromatographie aufgereinigt und nach der Spaltung mit Bromcyan teilsequenziert werden. Die Partialsequenzen der beiden erhaltenen Fragmente stimmen mit der Isoform 1 des VDAC aus dem Cornea-Endothel von *Oryctolagus cuniculus* (Kaninchen) sowie aus dem Mitochondrium überein.

Jedoch weist der Kanal im SR unterschiedliche Eigenschaften auf. Er zeigt im Gegensatz zu dem mitochondrialen VDAC keine Affinität zu dem Anionenkanal-Inhibitor SITS und bildet in der SR-Membran keine Komplexe mit anderen Proteinen aus.

Bekannte Effektoren des mitochondrialen VDAC wie NADH, DCCD und anti-VDAC Antikörper zeigen in den Sulfat-Efflux-Experimenten entweder keine oder eine gegensätzliche Wirkung, was einen weiteren Hinweis auf unterschiedliche Regulationsfaktoren gibt.

Die fehlenden Transporteigenschaften des rekonstituierten Kanals unter Sulfat-Efflux-Bedingungen machen seine Beteiligung am Sulfattransport und somit auch am Cl^- -Transport im SR sehr unwahrscheinlich. Vielmehr scheint er den Transport von Nucleotiden, besonders ATP, in das SR-Lumen zu vermitteln. Allerdings weist er auch hohe Affinitäten zu einem speziell synthetisierten GTP-Analogen auf und könnte deshalb an dem bekannten Eintransport von GTP in die SR-Vesikel beteiligt sein. Nucleotide werden im SR-Lumen zur Phosphorylierung verschiedener Proteine wie Sarcalumenin, HCP (*'histidine-rich protein'*) und Calsequestrin benötigt, die neben ihrer Funktion als Ca^{2+} -Speicher auch an der Regulation des Ca^{2+} -Release beteiligt sind.

2.) In den Vesikeln des sarcoplasmatischen Reticulums existieren mindestens zwei G-Proteine, die durch Immunodetektion und Affinitätsmarkierung mit einem radioaktiv markierten GTP-Analogen nachgewiesen wurden. Sie greifen regulierend in den Anionentransport des SR ein, da Antikörper gegen die G_α -Untereinheit dieser Proteine den

Sulfattransport hemmen. Diese Wirkung scheint allerdings direkt zu erfolgen und nicht über 'second messenger'.

3.) Einen weiteren Hinweis auf eine G-Protein-vermittelte Regulation des Anionentransports im SR stellt die sehr effiziente Hemmung des Sulfat-Efflux in den SR-Vesikeln durch Suramin und verschiedene im Arbeitskreis synthetisierte Suraminderivate dar.

Ein Analogon, SB 9, tritt spezifisch mit G-Protein-gekoppelten Ionenkanälen (P2Y₁-Purinoceptoren) in Wechselwirkung und bindet eine G_α-Untereinheit der SR-Vesikel.

Ein weiteres Derivat, SB 22, zeigt ebenfalls Affinität zu dieser G_α-Untereinheit sowie zu einem anderen Protein (40 kDa) und der Ca²⁺-ATPase. Da die Ca²⁺-ATPase keine Transporteigenschaften für Sulfat aufweist, muß die hemmende Wirkung des SB 22 auf den Anionentransport im SR entweder durch die Modifikation einer G_α-Untereinheit oder des zur Zeit noch nicht näher charakterisierten Proteins bei 40 kDa erfolgen.

Der VDAC zeigt sich den Suraminderivaten gegenüber inert und kommt deshalb nicht als Sulfattransporter des sarcoplasmatischen Reticulums in Frage.

5. Material und Methoden

5.1 Allgemeine Standardarbeitsmethoden

5.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Biuret

Die Proteinkonzentration wird nach einer modifizierten Biuret-Methode bestimmt (Gornall et al. 1949).

Von den während der SR-Präparation entnommenen Proben werden je 100 µl mit 5 ml Biuret-Reagenz versetzt. Nach 30 min werden 4.9 ml H₂O zugegeben und die Extinktion bei 546 nm an einem Photometer bestimmt. Als Referenzprobe dient anstelle der Proteinlösung der entsprechende Puffer.

Bei der Verwendung von Küvetten mit 2 cm Schichtdicke berechnet sich die Proteinkonzentration der Probe nach der folgenden Formel:

$$\text{Proteingehalt [mg/ml]} = \text{Extinktion}_{546} \times 17 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Verdünnungsfaktor beträgt normalerweise 10, da 100 µl Proteinprobe eingesetzt werden. Der Faktor 17 resultiert aus dem linearen Meßbereich der Eichkurve, der für diese Proteinbestimmung zwischen 0.5 mg und 4 mg Protein pro ml liegt.

Biuret-Reagenz:

9 g Kaliumnatriumtartrat in 400 ml 0.2 N NaOH lösen
3 g CuSO₄ x 5 H₂O
5 g KI
ad 1 Liter mit 0.2 N NaOH

5.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Popov

Die Proteinbestimmung nach Popov (Popov et al. 1975) stellt einen sehr empfindlichen Test dar, der durch Detergenzien, hohe Salzkonzentrationen und Lipide nur wenig beeinflusst wird. 5-200 µl Probe werden mit 10 µl 10% iger C₁₂E₉-Lösung versetzt, durchmischt und 10 min inkubiert. Nach der Zugabe von 600 µl Färbelösung wird die Probe 20 min geschüttelt. Der sich bildende Protein-Farbstoff-Komplex wird durch Zentrifugation (Biofuge 13, 13793 g, 10 min) sedimentiert, in 1.5 ml Waschlösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Waschvorgang wird dreimal wiederholt. Das Sediment wird dann in 1.5 ml 0.1 M NaOH aufgenommen. Nach 20 min Inkubation wird die Extinktion bei 635 nm gegen Wasser als Referenz gemessen. Als Proteinstandard dienen SR-Vesikel bekannter Konzentration.

Färbelösung:

541 mg Amidoschwarz 10 B

37.5 ml Methanol

4.91 ml Eisessig

Die Lösung wird über Nacht gerührt und vor dem Gebrauch filtriert.

Waschlösung:

Methanol/Eisessig (9:1)

5.1.3 Chloroform-Methanol-Fällung nach Wessel und Flüge

Bei dieser Fällung müssen sowohl die Mengenverhältnisse als auch die Reihenfolge der unten angegebenen Komponenten beibehalten werden.

1 Teil	Proteinlösung	200 µl
4 Teile	Methanol	800 µl
2 Teile	Chloroform	400 µl
3 Teile	H ₂ O	600 µl

Der Ansatz wird kurz geschüttelt und 5 min bei 13000 rpm (Biofuge 13, 13793 g) zentrifugiert. Das gefällte Protein sammelt sich an der Phasengrenze zwischen Chloroform und dem Methanol-Wasser-Gemisch. Die obere Phase wird vorsichtig abpipettiert, 3 Teile Methanol hinzugegeben und erneut geschüttelt. Nach weiteren 5 min Zentrifugation befindet sich das Protein als Sediment am Boden des Gefäßes, und der Überstand kann vorsichtig abgenommen werden.

5.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophoresen werden nach Laemmli (1970) durchgeführt. Bei den hier verwendeten Gelelektrophoresen handelt es sich um Minigele mit einer Plattengröße von 10 x 8.5 cm und 0.75-1 mm Dicke.

Lösungen für das Trenngel	7.5 %	12 %	15 %	18 %
29.5 % Acrylamid/0.5 % Bisacrylamid	3.75 ml	6 ml	7.5 ml	10 ml
3 M TRIS-HCl pH 8.8	3.8 ml	3.8 ml	3.8 ml	3.8 ml
H ₂ O	7 ml	4.8 ml	3.2 ml	0.75 ml
10 % SDS	0.15 ml	0.15 ml	0.15 ml	0.15 ml
20 % APS	0.15 ml	0.15 ml	0.15 ml	0.15 ml
Temed	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

Lösungen für das Sammelgel	5 %
29.5 % Acrylamid/0.5 % Bisacrylamid	1 ml
0.5 M TRIS-HCl pH 6.8	0.75 ml
H ₂ O	4.2 ml
10 % SDS	0.1 ml
20 % APS	36 µl
Temed	5 µl

Zu Beginn wird die Stromstärke auf 60 mA eingestellt, bis die Bromphenolblau-Bande das Trenngel erreicht hat. Anschließend wird die Stromstärke auf 80 mA erhöht. Dabei sollte die Spannung nicht über 200 V liegen. Nach dem Ende der Elektrophorese werden die Gele mit Coomassie Blau gefärbt und danach die Gelmatrix entfärbt.

Es werden folgende Lösungen verwendet:

Laufpuffer-Stammlösung (5x):

30.28 g TRIS

144 g Glycin

0.5 g SDS

ad 1 Liter mit H₂O

Nach der Verdünnung werden 10 ml 10% SDS pro Liter zugegeben.

Probenpuffer:

2.4 ml 0.1% Bromphenolblau-Lösung (in Ethanol)

3 g Saccharose

15 ml 10% SDS

1.2 ml β-Mercaptoethanol

ad 20 ml mit H₂O

Färbelösung:

2.5 g Coomassie Blau G 250

454 ml Methanol

92 ml Eisessig

ad 1 Liter mit H₂O

Entfärbelösung:

200 ml Isopropanol

70 ml Eisessig

30 ml Glycerin

ad 1 Liter mit H₂O

5.1.5 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Mit dieser Technik können Proteine nach elektrophoretischer Trennung auf einer Membran immobilisiert werden (Tobwin et al. 1979, Matsudaira 1987). Die Proteinbanden können auf der Membran angefärbt, gegebenenfalls ausgeschnitten und partiell sequenziert werden oder über Immunodetektion sichtbar gemacht werden. Angewandt wird hier die Methode des Tank-Blottings. Bei den verwendeten Membranen handelt es sich um eine Immobilon-P bzw. um eine speziell zum Sequenzieren geeignete Immobilon-P^{SQ} PVDF-Membran (Millipore).

Die PVDF-Membran wird einige Sekunden in 100% Methanol gelegt, um eine Bindung der Proteine an der Oberfläche der Membran zu ermöglichen. Anschließend wird die Membran etwa 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Das Gel sowie das 3 MM Blotting Papier werden ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wird das Gel zwischen die Filterpapiere und die PVDF-Membran gelegt. Die Transferkammer ist so gepolt, daß die Proteine zur Anode wandern, d. h. die Membran befindet sich zwischen Gel und Anode. Die Kammer wird mit Transferpuffer gefüllt und von innen und außen mit Eis gekühlt. Bei einem Stromfluß von 300 mA und einer Spannung von maximal 100 Volt ist der Transfer nach 2-2.5 h beendet.

Transferpuffer:

20 mM CAPS

10% Methanol

Der pH-Wert wird mit 6 N NaOH auf pH 11 eingestellt.

5.1.6 Nachweis von Proteinen mit Amidoschwarz

Die Membran wird nach der Beendigung des Transfers 60 Sekunden in einer Amidoschwarz-Färbelösung gefärbt und anschließend entfärbt. Nach dem Entfärben wird die Membran an der Luft getrocknet.

Amidoschwarz-Färbelösung:

250 ml Methanol

50 ml Eisessig

2.5 g Amidoschwarz 10 B

200 ml H₂O

Entfärbelösung:

450 ml Methanol

100 ml Eisessig

450 ml H₂O

5.1.7 Autoradiographie

Die Gele werden nach dem Trocknen auf photosensitiven Phosphorimager-Platten exponiert. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe eines Lasers am Phosphorimager (Molecular Dynamics).

5.1.8 Flüssigkeitsszintillationszählung

Die Bestimmung der Gesamtradioaktivität einer Probe erfolgt mit der Flüssigkeitsszintillationszählung. Zu einer Probe wird die 5-10 fache Menge Szintillationsflüssigkeit gegeben und durchmischt. Die Radioaktivität wird dann in einem Szintillationszähler (LS 6500 Beckmann) für 5 min gemessen und in cpm angegeben. 1 Bq entspricht 60 cpm.

5.2 Präparation und Charakterisierung von SR-Vesikeln

5.2.1 Isolierung von SR-Vesikeln aus Kaninchenmuskulatur

Die Präparation nativer SR-Vesikel erfolgt durch differentielle Zentrifugation nach einer modifizierten Methode von De Meis und Hasselbach (1971).

Alle Präparationsschritte werden bei 4°C in der Kältekammer durchgeführt.

Aus den Hinterläufen eines frisch geschlachteten Kaninchens werden 500 g Muskelfleisch entnommen und in einem Fleischwolf zerkleinert. Die Masse wird in drei Portionen aufgeteilt, in je 500 ml Puffer A suspendiert und jeweils 1 min im Mixer homogenisiert. Die Homogenisate werden vereinigt und 15 min bei 6870 g (GSA-Rotor, 6500 rpm, 4°C) zentrifugiert. Der Überstand (Überstand 1) wird durch Gaze filtriert, um die oben schwimmenden Fettbestandteile zu entfernen. Der pH-Wert des Filtrats wird mit 1 N KOH auf pH 7.4 eingestellt.

Die nächste Zentrifugation über 15 min bei 8250 g (GSA-Rotor, 7800 rpm, 4°C) dient der Entfernung der Mitochondrien (Pellet 2). Der Überstand (Überstand 2) wird erneut durch Gaze filtriert und anschließend 60 min bei 45000 g (SS 34-Rotor, 19500 rpm, 4°C) zentrifugiert. Das Sediment (Pellet 3) wird in 160 ml Puffer B aufgenommen und im Elvehjem Potter homogenisiert. Bei einer weiteren Zentrifugation über 15 min bei 4340 g (SS 34-Rotor, 6000 rpm, 4°C) bildet sich ein Sediment (Pellet 4). Der Überstand (Überstand 4) wird dekantiert und mit dem 1.5 fachen Volumen Puffer C versetzt. Die gesamte Menge wird auf 6 Ultrazentrifugen-Röhrchen verteilt und mit Puffer B/C aufgefüllt. Die Zentrifugation dauert 90 min bei 80000 g (45 Ti-Rotor, 30500 rpm, 4°C). Die SR-Vesikel befinden sich in

dem Sediment (Pellet 5) und werden in den folgenden Zentrifugationsschritten gereinigt und angereichert. Das Sediment wird mit 200 ml Puffer D im Elvehjem Potter homogenisiert, in 3 Ultrazentrifugen-Röhrchen gefüllt, und das fehlende Volumen mit Puffer D ergänzt. Die Zentrifugation erfolgt, wie zuvor, 90 min bei 80000 g (45 Ti-Rotor, 30500 rpm, 4°C). Das Proteinsediment (Pellet 6) wird in 200 ml Puffer E im Elvehjem Potter homogenisiert und in 3 Ultrazentrifugen-Röhrchen für 60 min bei 80000 g (45 Ti Rotor, 30500 rpm, 4°C) zentrifugiert. Die SR-Vesikel (Pellet 7) werden in 15 ml Puffer E aufgenommen und homogenisiert. Anschließend werden die SR-Vesikel in 10 Portionen zu je 20 µl (für Tests) und der Rest in Portionen zu je 100 µl und 200 µl aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Die Proteinbestimmung erfolgt nach der Biuret-Methode. Die Ausbeute an SR-Protein beträgt ausgehend von 500 g Muskelfleisch zwischen 200 mg und 430 mg bei einer Proteinkonzentration von 15-23 mg/ml.

Von den Überständen und Sedimenten werden Proben für eine gelelektrophoretische Charakterisierung der Präparation entnommen. Die Gelelektrophoresen werden nach Laemmli (1970) durchgeführt. Zur Analyse der Aufreinigung der Ca²⁺-ATPase während der Präparation wird eine Kombination aus 7.5% Trenngel und 5% Sammelgel gewählt.

Puffer A

100 mM KCl
2 mM EGTA
2.5 mM KH₂PO₄
2.5 mM K₂HPO₄
1 mM β-Mercaptoethanol
0.5 µg/ml Leupeptin
Der pH-Wert der Lösung wird mit KOH auf 7.4 eingestellt.

Puffer B

50 mM KCl
1 mM Triethanolamin
1 M Saccharose
1 mM β-Mercaptoethanol
0.5 µg/ml Leupeptin
Der pH-Wert der Lösung wird mit HCl auf 7.4 eingestellt.

Mischung Puffer B/Puffer C: 106 ml Puffer B + 160 ml Puffer C

Puffer C

1 M KCl
1 mM TEA
160 mM Saccharose
1 mM β -Mercaptoethanol
3.35 mM ATP
3.35 mM $MgCl_2$
0.5 $\mu g/ml$ Leupeptin

Der pH-Wert der Lösung wird mit KOH auf 7.4 eingestellt.

Puffer D

100 mM KCl
1 mM TEA
96 mM Saccharose
1 mM β -Mercaptoethanol
0.5 $\mu g/ml$ Leupeptin

Der pH-Wert der Lösung wird mit HCl auf 7.4 eingestellt.

Puffer E

100 mM KCl
1 mM TEA

Der pH-Wert der Lösung wird mit HCl auf 7.4 eingestellt.

Bis auf Puffer E enthalten alle Puffer Leupeptin als Protease-Inhibitor. Die Stammlösung in Wasser hat eine Konzentration von 5 mg/ml. Der Inhibitor wird kurz vor Beginn der Präparation in einer Endkonzentration von 0.5 $\mu g/ml$ zugesetzt.

5.2.2 Auftrennung der SR-Vesikel in HSR- und LSR-Vesikel

Die isolierten SR-Vesikel können durch diskontinuierliche Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation in 'heavy' (HSR) und 'light' (LSR) Vesikel aufgetrennt werden.

Der Gradient besteht aus je 12 ml Puffer E mit 40%, 32% und 23% Saccharose. Pro Zentrifugenröhrchen können bis zu 20 mg SR-Vesikel aufgetragen werden. Die Zentrifugation erfolgt 1.5 h bei 80000 g (SW28, 21000 rpm, 4°C). Die LSR-Vesikel sammeln sich in der oberen Zwischenphase an, die HSR-Vesikel in der unteren. Die beiden Fraktionen werden getrennt abgesaugt, mit Puffer E 1:5 verdünnt und 0.5 h bei 46000 g (SS 34, 20000 rpm, 4°C) sedimentiert. Die Vesikel werden dann in 100-200 μl Puffer E aufgenommen und die Proteinkonzentration nach der Biuret-Methode bestimmt.

5.2.3 Hydrolyseaktivität der Calcium-ATPase

Die Aktivität der Ca^{2+} -ATPase wird über die ATP-Hydrolyseaktivität des Enzyms bestimmt. Die hierbei verwendete Substratkonzentration beträgt 1 mM ATP. Anhand dieser Aktivitätsbestimmung läßt sich die Intaktheit der Ca^{2+} -ATPase und die Unversehrtheit der Vesikelmembran beurteilen.

Grundpuffer:

0.1 M KCl
0.1 M TEA
5 mM MgCl_2
0.15 mM CaCl_2
0.1 mM EGTA
0.1 M KCl

Der Puffer wird mit 6 N HCl auf pH 7.4 eingestellt.

Die freie Ca^{2+} -Konzentration liegt in den Testansätzen bei 50 μM . Die im Test eingesetzte Proteinkonzentration beträgt 50 $\mu\text{g/ml}$. Durch Zugabe von 1 mM ATP zum Testansatz wird die katalytische Reaktion gestartet.

Testansatz:

250 μl Grundpuffer
220 μl H_2O
25 μl SR-Protein bei 1 mg/ml
5 μl 100 mM ATP

Zur Bestimmung des freigesetzten Phosphats werden nach 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 und 4 min je 50 μl der Proben entnommen und mit 500 μl in Reaktionsgefäßen vorgelegter, kalter 0.2% iger SDS-Lösung gemischt. Hierbei wird die Hydrolyseaktivität der Ca^{2+} -ATPase durch die Denaturierung des Proteins gestoppt. Das gefällte Protein wird 10 min bei 13000 g sedimentiert, und die Phosphatkonzentration des Überstandes halbautomatisch im Phosphat-Autoanalyser (Bran+Luebbe) bestimmt.

Der Ca^{2+} -ATPase-Aktivitätstest wird in Gegenwart des Ca^{2+} -Ionophors A 23187 (Scarpa et al. 1972) wiederholt. Hierzu werden dem Testansatz 5 μl einer 1 mM Stammlösung in 95% Ethanol zugesetzt, so daß die Endkonzentration 10 μM beträgt. Der Start der Kinetik durch den Zusatz von ATP erfolgt jedoch erst nach 5 min Vorinkubation mit A 23187.

Die Phosphatbestimmung wird nach einer Methode von Fiske und SubbaRow (1925) durchgeführt. Dazu werden die Proben im Autoanalyser mit einer Ammoniumheptamolybdat- und einer Ascorbinsäurelösung versetzt. Hierbei bildet sich Phosphomolybdänsäure, die im

sauren Bereich durch Ascorbinsäure zu einem blaugefärbten Komplex reduziert wird. Die Extinktion dieses Komplexes läßt sich photometrisch bei 660 nm bestimmen. Die Menge an freigesetztem Phosphat wird nach folgender Formel berechnet:

$$\mu\text{Mol Pi/mg Protein} = \Delta E \times 0.022$$

Der Faktor 0.022 setzt sich aus einem Standardwert für die Eichproben (Herbette et al. 1981) und der Verdünnung der 50 μl Proteinprobe in 500 μl 0.2% SDS (Mac Lennan et al. 1983) zusammen. Dazu kommt noch die Umrechnung von molar in Mol (1/1000) sowie die Berechnung von 50 μg auf 1 mg Protein (Rousseau et al. 1988).

Molybdat-Lösung:

50 ml Molybdat-Stammlösung (8 g $(\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 5 \text{H}_2\text{O}$ /200 ml)
155 ml 5 N H_2SO_4
0.6 ml Antimon-Stammlösung (2.3 g Antimon-Kaliumtartrat/100 ml)
2 g SDS
ad 1000 ml mit H_2O

Reduktionslösung:

8 g Ascorbinsäure
45 ml Aceton
1 g SDS
ad 1000 ml mit H_2O

5.2.4 Transportaktivität der Ca^{2+} -ATPase

Die Messung der ATP-stimulierten Ca^{2+} -Aufnahme gibt Hinweise auf die Intaktheit der Ca^{2+} -ATPase und die Dichtheit der Vesikelmembran. Die Calcium-Transportmessungen werden nach einer Methode von Martonosi und Feretos (1964) durchgeführt.

Grundpuffer:

0.1 M KCl
0.3 M Saccharose
5 mM MgCl_2
0.1 M TEA
Der pH-Wert wird mit 6 N HCl auf 7.4 eingestellt.

 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Stammlösung:

5 μl $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (spez. Aktivität 0.8-1.8 mCi/mMol)
750 μl 50 mM CaCl_2 pH 7.4
ad 5 ml mit H_2O dest.

Testansatz:

1.625 ml	Grundpuffer	
747.5 µl	H ₂ O	
455 µl	7.5 mM ⁴⁵ Ca ²⁺ -Stammlsg.	im Test 1.05 mM
32.5 µl	100 mM EGTA pH 7.4	im Test 1.00 mM
325 µl	50 mM Kaliumoxalat pH 7.4	im Test 5.00 mM
32.5 µl	SR-Vesikel (1 mg/ml)	im Test 10 µg/ml
32.5 µl	100 mM ATP	im Test 1.00 mM

Das Kaliumoxalat muß langsam zugegeben werden, um eine Präzipitation von Calciumoxalat zu vermeiden. Die Konzentration an freiem Calcium beträgt 50 µM.

Die Transportmessung wird durch Zugabe von ATP gestartet. Nach 0.5, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50 und 60 min werden jeweils 250 µl entnommen und auf einen Nitrocellulosefilter (Millipore-Filter Typ HA 0.45 µm) pipettiert. Der Filter liegt auf einer Fritte, die mit einer Saugflasche verbunden ist. Über Membranpumpenvakuum wird das Testmedium abgesaugt, wobei die SR-Vesikel auf dem Filter zurückgehalten werden. Dadurch wird der Transport gestoppt. Die Vesikel werden dann mit 5 ml einer Lösung aus 100 mM KCl, 0.3 M Saccharose, 1.05 mM CaCl₂, 1 mM EGTA und 0.05 % NaN₃ gewaschen. Die Bestimmung der Radioaktivität (cpm) in den Vesikeln erfolgt im Szintillationszähler.

Die ermittelten Werte können dann in µMol Ca²⁺ pro mg Protein umgerechnet werden. Dazu muß noch ein Volumenwert ermittelt werden, indem man 50 µl des Testansatzes auf einen trockenen Filter pipettiert und die Radioaktivität dieser Probe bestimmt.

Die Menge an radioaktivem Calcium in den Vesikeln kann für jeden Zeitwert über folgende Formel berechnet werden:

$$\frac{\text{Eintransport an } ^{45}\text{Ca}}{\text{mg Protein}} \quad \frac{\mu\text{Mol}}{\text{mg}} = \frac{(\text{cpm} - \text{Background}) \cdot ^{45}\text{Ca im Test [mM]}}{\text{Volumenwert} \cdot 5 \cdot \text{Proteinkonzentration} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right]}$$

Der Ca²⁺-Transport wird sowohl ATP- als auch ADP-stimuliert gemessen.

5.3 Aufreinigung des VDAC aus SR-Vesikeln

5.3.1 Detektion des VDAC

Der Nachweis des VDAC in verschiedenen SR-Präparationen erfolgt durch Immunodetektion mit einem monoklonalen VDAC-Antikörper (Calbiochem, anti-Porin 31 HL, Human), der mit dem N-Terminus des VDAC von humanen B-Lymphozyten reagiert.

Die SR-Vesikel werden mittels 15% iger SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran, wie unter 5.1.5 beschrieben, transferiert.

Die Membran wird 1 h bei RT mit dem VDAC-Antikörper (Konzentration 1mg/ml) in einer Verdünnung von 1:150000 in 15 ml PBS-T, 1% Magermilchpulver inkubiert. Danach wird dreimal 10 min mit PBS-T gewaschen. Der zweite Antikörper (anti-Maus IgG, Sigma) richtet sich gegen den F_c-Teil des VDAC-Antikörpers und ist kovalent mit Peroxidase gekuppelt. Die Inkubation des anti-Maus Antikörpers erfolgt in 15 ml PBS-T, 1% Magermilchpulver in einer Verdünnung von 1:15000. Die Antikörperbindung wird über verstärkte Chemilumineszenz nachgewiesen (ECL-System, Amersham). Nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBS-T wird die Membran mit einer 1:1 Mischung der Chemilumineszenz-Lösungen 1 min inkubiert und auf einem Röntgenfilm (X-OMAT, Kodak) exponiert. Nach dem Entwickeln und Fixieren des Films zeigt sich an den Stellen, an denen der Antikörper gebunden hat, eine Schwärzung.

PBS-T:

124 mM NaCl

2.7 mM KCl

12 mM NaH₂PO₄ pH 7.4

0.1 % Tween 80

ad 1 Liter mit H₂O**Entwickler:**

Eurochrom 1:10 verdünnt

Photofixierer:

1 % Natriumpyrosulfit

10 % Natriumthiosulfat

5.3.2 Isolierung des VDAC

Die Aufreinigung des VDAC erfolgt leicht modifiziert nach einer Methode von Shoshan-Barmatz et al. (1996a). Die Flußgeschwindigkeit der verwendeten Säulen wird auf 0.25 ml/min eingestellt.

20 bis 30 mg SR-Vesikel werden in Solubilisierungspuffer (2 mg/ml) aufgenommen und 30 min auf Eis leicht gerührt. Nach der Solubilisierung wird die Suspension bei 192000 g (SW 50 Ti, 40000 rpm, 4°C) zentrifugiert, um die Membranbestandteile abzutrennen. Der Überstand wird auf eine Spermin-Agarose-Säule (Sigma, 1.5 x 8 cm) aufgetragen, die zuvor mit 10 mM TRIS-HCl pH 7.2 / 0.4% Nonidet P-40 äquilibriert wird.

Der Durchlauf (5-10 ml, 150-200 µg/ml) wird auf eine Carboxymethyl-Cellulose-Säule (1.5 x 6 cm) geladen, die zuvor ebenfalls mit 10 mM TRIS-HCl pH 7.2 / 0.4% Nonidet P-40 äquilibriert wird. Die Elution des VDAC erfolgt mit einem Stufengradienten von 50 und 100 mM NaCl oder einem kontinuierlichen Gradienten von 0-300 mM NaCl. Die Absorption erfolgt bei 280 nm.

Die Fraktionen werden eingeeengt, mit Methanol-Chloroform gefällt und mittels 15% iger SDS-PAGE und Immunodetektion getestet. Es zeigt sich, daß der VDAC kontinuierlich von der Säule eluiert wird und sich über 10 bis 15 Fraktionen a 2 ml (0.1-0.5 µg/ml) verteilt. Die Ausbeute liegt bei ca. 0.5 µg pro mg SR-Protein.

Solubilisierungspuffer:

10 mM TRIS-HCl pH 7.2
0.15 mM PMSF
0.5 µg/ml Leupeptin
3 mM DTT
1.4% Nonidet P-40 (NP-40)

5.3.2.1 Affinitätschromatographie mit 4-Acetamido-4'-isothiocyanatostilben-2,2'-disulfonat (SITS)

Die Affinitätschromatographie mit SITS-markierter Sepharose sollte eine weitere Methode zur VDAC-Aufreinigung darstellen. Die Kupplung erfolgt an EAH-Sepharose 4B (Epoxy-Aminoethylsepharose, Pharmacia). 8 ml EAH-Sepharose 4B werden mit ca. 100 ml 50 mM KCl, 50 mM TEA pH 9 gewaschen und mit 15 mg SITS für 48 h unter Lichtausschluß inkubiert. Das Säulenmaterial wird dann mit 10 mM TRIS-HCl pH 7.2 / 0.4 % Nonidet P-40 gewaschen und in eine 1.5 x 20 cm Säule überführt. Die Kupplung wird mittels Fluoreszenz-Mikroskopie kontrolliert.

Solubilisiertes SR (2 mg/ml) (s. 5.3.2) wird auf eine Spermin-Agarose-Säule aufgetragen und der Durchlauf (5-10 ml) 30 min mit SITS-Sepharose inkubiert. Nach dem Waschen der Säule mit 10 mM TRIS-HCl pH 7.2 / 0.4% Nonidet P-40 wird mit einem kontinuierlichen Gradienten von 0-300 mM NaCl eluiert. Alternativ dazu wird der Durchlauf der Spermin-Agarose-Säule gegen 20 mM Natrium-Acetat-Puffer pH 5 / 0.4% NP-40 dialysiert, und die SITS-Affinitätschromatographie mit diesem Puffersystem durchgeführt.

5.3.3 Präparative SDS-PAGE

Da die Ausbeute an VDAC nach der Carboxymethyl-Cellulose-Säule nur sehr gering ist, wird darauf im folgenden verzichtet, und eine Aufreinigung über präparative Gele bevorzugt.

Der Durchlauf der Spermin-Agarose-Säule wird eingeeengt, mit Chloroform-Methanol gefällt und mittels 15% iger SDS-PAGE (1 mm) aufgetrennt. Die Gele werden ohne Essigsäure gefärbt und entfärbt, um eine Fixierung der Proteine in der Gelmatrix zu verhindern und somit den Verlust an Protein so gering wie möglich zu halten (Baumgärtner 1998). Die Essigsäure wird dabei durch Wasser ersetzt. Die entsprechenden VDAC-Banden (Vergleich durch Immunoblots mit SR-Vesikeln) werden ausgeschnitten und elektroeluiert.

5.3.4 Elektroelution von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen

Die Elektroelution erfolgt mit einem Biotrap-Rückelutionssystem. Bevor die Elektroelution gestartet werden kann, müssen die ausgeschnittenen Gelbanden mindestens eine Stunde im Rückelutionspuffer (entspricht dem Laufpuffer der SDS-PAGE) äquilibriert werden (Hunkapiller et al. 1983). Für die Elektroelution wird eine Spannung von 300 V (100 V pro 10 cm Apparatur) angelegt. Nach 5 Stunden ist das Protein vollständig aus den Gelstücken rückeluiert und wird nun mit Chloroform-Methanol nach Wessel und Flügge (1984) gefällt.

5.3.5 Bromcyan-Spaltung des VDAC

Die Bromcyan-Spaltung (Gross 1967) eignet sich besonders als Eingangsspaltung, da sie sehr gut reproduzierbare Ergebnisse liefert, und die entstehenden Peptidfragmente groß genug sind, um noch auf einer hochprozentigen SDS-PAGE nachgewiesen werden zu können.

Die Präzipitate, die man nach der Chloroform-Methanol-Fällung des rückeluierten Proteins erhält, werden in je 30 µl 70% iger Ameisensäure aufgenommen und durch Schütteln gelöst.

Dazu gibt man 0.4 ml Bromcyan-Lösung, deren Konzentration 15 mg/ml in 70% iger Ameisensäure beträgt. Die Spaltung findet bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß und Schütteln statt (McIntosh 1992). Nach 18 Stunden sollte das Protein vollständig gespalten sein. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0.4 ml Wasser gestoppt, und die Proben im Vakuumkonzentrator fast bis zur Trockenheit eingeengt. Zum Waschen werden erneut 0.4 ml Wasser zugegeben, wie zuvor wird bis fast zur Trockenheit eingeengt, und ein drittes Mal 0.4 ml Wasser zugegeben, bevor die Proben endgültig getrocknet werden. Sie können dann bei -80°C gelagert werden.

Die Bromcyan-Fragmente werden in 10 µl 10% SDS 15 min geschüttelt, mit 20 µl Probenpuffer versetzt und 15 min auf 40°C erwärmt. Die Auftrennung erfolgt dann durch 18% ige SDS-PAGE. Nach dem Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran sowie der Färbung mit Coomassie Blau werden die beiden Banden ausgeschnitten und zur Sequenzierung gegeben.

5.3.6 Rekonstitution des VDAC in künstliche Asolektinvesikel

5.3.6.1 Herstellung der Liposomen

300 mg Asolektin werden in 5 ml Puffer H (100 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 6.5) aufgeschlämmt und 20 min bei 0°C beschallt (Branson Sonifier, Stufe 2). Die Suspension wird mehrmals durch eine Polycarbonatmembran mit einer Porenweite von 400 nm gepreßt, wodurch einschalige Asolektinvesikel definierter Größe entstehen. Die verwendete Apparatur stammt von der Firma Avestin (Liposofast).

5.3.6.2 Vorbereitung und Regenerierung der Beads

Die Vorbereitung der BioBeads (SM-2, BioRad) erfolgt leicht verändert nach Holloway (1973). Die Kügelchen bestehen aus einem Styrol-Divinylbenzol-Copolymer und adsorbieren nicht-ionische Detergenzien.

25 g trockene BioBeads werden dreimal mit je 500 ml Methanol und dreimal mit je 500 ml Wasser gewaschen. Vor dem Gebrauch werden die BioBeads in dem Puffer gespült, der für die Rekonstitution eingesetzt wird. Gebrauchte BioBeads werden mit Methanol gewaschen, bis das Filtrat klar ist, und im getrockneten Zustand aufbewahrt.

5.3.6.3 Rekonstitution

Um gute Rekonstitutionsergebnisse zu erzielen, sollte das Lipid-Protein-Verhältnis bei 20:1 bis 30:1 liegen. Wie unter 5.3.2 beschrieben, wird der Durchlauf der Spermin-Agarose-Säule für die Rekonstitution eingesetzt. Der Proteingehalt liegt bei ca. 150 µg/ml. 6 ml des Durchlaufs (ca. 1 mg) werden mit 0.5 ml der Asolektin-Suspension (ca. 30 mg) bei RT gerührt und nach 5 min auf 200 mM KCl eingestellt. Nach weiteren 30 min Rühren beginnt die Detergenz-entfernung durch Zugabe von 320 mg Beads pro ml Lösung. Nach einer Stunde Rühren werden die BioBeads über eine Glasfritte abfiltriert und mit 1-2 ml Puffer H (100 mM KCl, 10 mM HEPES pH 6.5) gespült. Zu der Lösung werden dann 640 mg Beads pro ml Lösung gegeben und der Ansatz weitere zwei Stunden gerührt. Die Beads werden entfernt und gespült. Die Proteoliposomen-Lösung wird dann zentrifugiert (78000 g, 70 Ti-Rotor, 90 min, 4°C). Das Sediment wird in 1 ml Puffer H homogenisiert und der Proteingehalt nach Popov bestimmt. Die Konzentration beträgt 200-240 µg/ml. Die Vesikel werden in Portionen zu 200 µl aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

5.3.7 Quervernetzungs-Experimente mit DEB und DADS

Die beiden Quervernetzungsreagenzien 1.2:3.4-Diepoxybutan (DEB) und 4.'4'-Diaminostilben-2.2'-disulfonsäure (DADS) dienen zur Untersuchung von intra- und intermolekularen Proteinwechselwirkungen. Pro Ansatz werden 30 µg SR-Vesikel mit den jeweiligen Reagenzien in Konzentrationen von 20-100 mM DEB bzw. 0.5-10 mM DADS 5 und 10 min bei RT inkubiert. DADS wird vor der Verwendung in das Diazoniumion überführt. Nach der Inkubation werden die Proben mit 15 µl Probenpuffer versetzt, 10 min auf 40°C erwärmt und mittels SDS-PAGE (12% oder 15% Polyacrylamid) aufgetrennt. Danach werden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und der VDAC nachgewiesen (siehe 5.3.1).

5.4 Synthese des 6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphats (6-DNP-S-GTP)

5.4.1 Synthese des 6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-monophosphats (6-DNP-S-GMP)

Für die Synthese des 6-DNP-S-GMP werden 2.77 g (9.25 mM) Thioguanosin (2-Amino-6-mercapto-purin-ribosid) in 18.02 ml destilliertem Triethylphosphat gelöst und in einem Rundkolben mit Trockenrohr auf -10°C abgekühlt. 1.28 ml Phosphoroxidchlorid (POCl₃) werden vorsichtig in 3 ml Triethylphosphat pipettiert und langsam (ein Tropfen pro Sekunde) in die

kalte Lösung getropft. Der Reaktionsansatz wird 2 h bei RT gerührt. Der Ansatz wird in eine Pipette aufgenommen und in eine stark gerührte Mischung aus 70 ml wäßriger Bariumacetatlösung (10%), 35 ml Aceton und 35 g Eis gegeben. Der pH-Wert wird sofort mit Triethylamin auf 7 eingestellt. Während der einstündigen Hydrolyse wird der pH-Wert kontrolliert und nachgestellt. Der Ansatz wird dann mit Ethanol bis zu einer Endkonzentration von 80% versetzt. Es bildet sich ein Niederschlag. Nach 30 min wird der Überstand dekantiert und das verbleibende Monophosphat zentrifugiert (4000 rpm, Hettich-Universal 16, 8 min). Danach wird viermal mit 200 ml 80% igem Ethanol sowie zweimal mit 200 ml Aceton gewaschen. Das Bariumsalz des Monophosphats wird sechsmal mit je 200 ml Wasser aus dem Niederschlag extrahiert, danach lyophilisiert und im Exsikkator über Phosphorpentoxid unter Vakuum aufbewahrt. Die Ausbeute liegt bei 90%.

Zur Synthese des Thioethers muß das Bariumsalz des 6-Thio-GMP in das Natriumsalz überführt werden. Dazu werden 2.5 g Dowex 50 WX 8 Ionenaustauscherharz (in der H⁺-Form) in 15 ml Wasser aufgeschlämmt, 0.8 g (1.5 mM) 6-Thio-GMP zugegeben und 10 min gerührt. Anschließend filtriert man die Lösung und eluiert mit ca. 200 ml Wasser die freie Säure. Um das Natriumsalz zu erhalten, wird der pH-Wert auf 6 eingestellt. Die Lösung wird bei -20°C eingefroren und anschließend lyophilisiert.

Die Ausbeute beträgt 1.6 g.

Das Natriumsalz des 6-Thio-GMP (3.8 mM) wird in 5 ml Wasser gelöst und mit ca. 5 Spatelspitzen Natriumhydrogencarbonat auf pH 8.3-8.5 eingestellt. 300 µl (zweifacher Überschuß) 2.4-Dinitro-1-fluor-benzol (DNFB) werden in 5 ml Ethanol aufgenommen und zugegeben. Die Reaktion läuft über Nacht. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und fünfmal mit Ethanol gewaschen. Dann wird der Thioether in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die Ausbeute liegt bei 1.5 g.

5.4.2 Synthese des 6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphats

1 g des als Natriumsalz vorliegenden Thioethers wird mit Dowex 50 WX 8 (H⁺-Form) in die freie Säure überführt und lyophilisiert. Die Ausbeute beträgt 230 mg.

230 mg (0.4 mM) Thioether werden in 10 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst, mit 400 mg 1.1-Carbonyldiimidazol versetzt und 1.5 h bei 30°C gerührt. Mit 60 µl Methanol wird das überschüssige 1.1-Carbonyldiimidazol abgefangen und weitere 30 min gerührt.

Zur Entfernung des Wasser werden 2 g Diphosphorsäure zweimal bei 30°C am Rotationsverdampfer unter Ölpumpenvakuum mit trockenem DMF eingengt. Die Diphosphorsäure

wird 5 min in 4 ml DMF gerührt, der Thioether zugesetzt und weitere 3 h gerührt (Trockenrohr). Der Reaktionsansatz wird unter Ölpumpenvakuum am Rotationsverdampfer eingeengt, in 0.01 M LiCl pH 3 aufgenommen und auf eine DEAE A25-Säule (2.5 x 20 cm) aufgetragen.

Gradient: je 1 l 0.01 M LiCl
je 1 l 0.6 M LiCl

Die Detektion erfolgt bei 254 nm. Das Elutionsprofil zeigt drei Produkte. Die drei Fraktionen werden getrennt eingeengt und mit Ethanol bei -20°C über Nacht gefällt. Nach der Zentrifugation (Hettich Universal 16, 4000 rpm, 8 min, RT) wird einmal mit Ethanol gewaschen, und die Substanzen lyophilisiert. Die Kontrollen mittels Papierelektrophorese bei pH 6.5 und Dünnschichtchromatographie (Elutionsmittel 1 N LiCl, 2 M Ameisensäure) zeigen, daß es sich bei den ersten beiden Produkten um das Mono- und das Diphosphat handelt. Das 6-DNP-S-GTP eluiert erwartungsgemäß zuletzt. Die Aubeute liegt bei 75 %.

5.4.2.1 Synthese des $[\gamma/\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{-6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphats}$

Die Synthese des $\gamma/\beta\text{-}[^{32}\text{P}]$ -markierten GTP-Analogons erfolgt wie unter 5.4.2 beschrieben, jedoch nur mit einem Zehntel des Gesamtansatzes. Zu ca. 20 mg Phosphorsäure werden 574 μl Natrium-Pyrophosphat (spez. Aktivität 2.4 Ci/mmol) zugegeben, dreimal mit je 3 ml DMF bis zur Trockenheit eingeengt und in 1 ml DMF gelöst.

Säule: DEAE A25 (2 x 10 cm)

Gradient: je 800 ml 0.01 M LiCl
je 800 ml 0.6 M LiCl

Flußgeschwindigkeit: 1 ml/min

Die Ausbeute beträgt 24 mg. Die spezifische Aktivität liegt bei 4 mCi/mmol.

5.4.3 Stufenweise Synthese des 6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphats

580 mg (1 mM) 6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-monophosphat werden in die freie Säure überführt, lyophilisiert und in 20 ml DMF gelöst. Danach wird zweimal mit je 15 ml DMF bis zur Trockenheit eingeengt. Die Aktivierung erfolgt durch Zugabe von 800 mg 1.1-Carbonyldiimidazol für 1.5 h. Überschüssiges 1.1-Carbonyldiimidazol wird durch Zugabe von 60 μl Methanol abgefangen (30 min rühren). 2 g Phosphorsäure (2 mM) werden in 20 ml Wasser gelöst, und 30 ml Pyridin sowie 8 ml frisch destilliertes (Kugeldestillation bei 100°C unter Ölpumpenvakuum) tri-n-Butylamin zugegeben. Danach wird zweimal mit DMF bis zur

Trockenheit eingeengt. Die in 10 ml DMF angelöste Phosphorsäure wird zu dem aktivierten Thioether gegeben und 3 h gerührt. Danach wird am Rotationsverdampfer unter Ölpumpenvakuum bis zur Trockenheit eingeengt und das Reaktionsprodukt in 20 ml 0.1 M Triethanolamin/CO₂ aufgenommen. Nach dem Auftragen auf eine DEAE A 25 -Säule (2 x 20 cm) wird mit einer Flußgeschwindigkeit von 1.5 ml/min und einem Gradienten von je 1.2 Liter 0.1 M und 0.8 M Triethanolamin/CO₂ pH 7.5 eluiert.

Es entstehen zwei Produkte, die beide eingeengt und im Exsikkator aufbewahrt werden. Die zweite Fraktion wird dann zur Weiterverarbeitung in 5 ml DMF gelöst, mit 800 mg 1.1-Carbonyldiimidazol versetzt und 1 h gerührt. 2 g in DMF getrocknete und gelöste Phosphorsäure werden zugegeben und 3 h gerührt. Der Ansatz wird unter Ölpumpenvakuum eingeengt und in 0.01 M LiCl pH 3 aufgenommen. Die Elution erfolgt mit einem kontinuierlichen Gradienten von je 0.8 Liter 0.01 M LiCl (pH 3) und 0.6 M LiCl (pH 3) bei einer Flußgeschwindigkeit von 2 ml/min

Das zuletzt eluierte Produkt wird eingeengt und mit Ethanol über Nacht gefällt. Danach wird der Niederschlag sedimentiert, mit Ethanol gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Die Ausbeute beträgt 240 mg. Der Nachweis erfolgt mittels Dünnschichtchromatographie in dem Elutionsmittel 1 N LiCl, 2 M Ameisensäure.

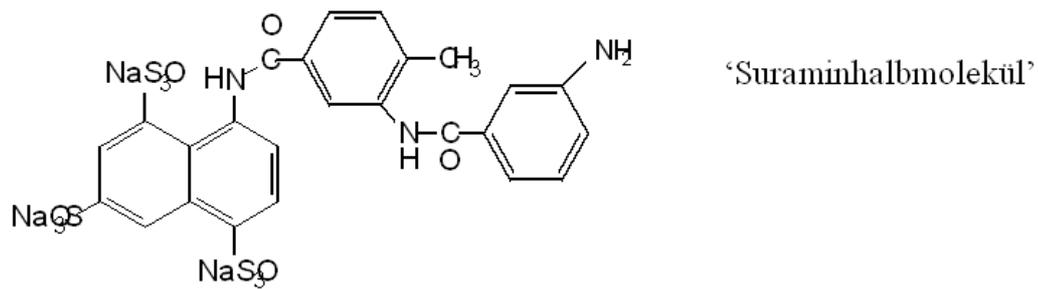
5.4.3.1 Synthese des [β -³²P]-6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphats

Die radioaktive Markierung des GTP-Analogons in β -Stellung erfolgt wie unter 5.4.3 beschrieben mit einem Zehntel-Ansatz. Abweichend dazu werden bei dem ersten Phosphorylierungsschritt 200 μ l [³²P] Orthophosphat (2 mCi, Aktivität 10 mCi/ml) zu 196 mg Phosphorsäure, die in 3 ml Wasser gelöst ist, zugegeben. Der zweite Phosphorylierungsschritt erfolgt wie zuvor beschrieben. Die Ausbeute beträgt 10 mg. Die spezifische Aktivität liegt bei 0.4 mCi/mmol.

5.5 Synthese von Suraminderivaten

Die Synthese der verschiedenen Suraminderivate beruht auf einer Methode der Arbeitsgruppe Nickel (Nickel et al. 1986) und eigenen Erfahrungen bezüglich der Synthese verschiedener Pyridoxalphosphatderivate.

5.5.1 Synthese von SB 9



Ausgehend von der vierten Stufe der Suraminsynthese nach Nickel et al. (1986) wird die Aminogruppe nach der indirekten Methode diazotiert und mit Pyridoxalphosphat gekuppelt. Dazu werden 300 mg (0.5 mM) des ‘Suraminhalbmoleküls’ in 1 N Natronlauge in Lösung gebracht und vorsichtig bei 0°C in 3 N Salzsäure getropft. Das hierbei entstehende Diazoniumsalz wird bei pH 6-8 mit einer äquimolaren Menge Pyridoxalphosphat gekuppelt. Die leuchtend rote Verbindung wird mit Isopropanol gefällt und durch eine D3 Glassinterfritte filtriert. Die Analyse der Substanz erfolgt massenspektroskopisch. Die Ausbeute liegt bei 65%.

5.5.2 Synthese von SB 10

Das ‘Suraminhalbmolekül’ dient auch hier als Ausgangsstoff. 300 mg (0.5 mM) der Substanz werden in Wasser gelöst und 90 mg in Aceton gelöstes Cyanurchlorid zugetropft. Der pH-Wert der Lösung wird kontrolliert (pH 7) und nachgestellt. 0.1 M Natriumhydrogencarbonat wird bei -5°C bis 0°C eingetropft.

Das entstehende Dichlorcyanurprodukt wird ohne weitere Aufreinigung erneut mit der vierten Stufe (300 mg) unter Kontrolle des pH-Wertes bei 20°C gekuppelt. Das Ende der Reaktion ist erreicht, wenn keine Änderungen des pH-Wertes auftreten. Das Produkt wird durch die Zugabe von Aceton gefällt und kann mittels Massenspektroskopie und Dünnschichtchromatographie als SB 10 identifiziert werden. Die Ausbeute beträgt 70%.

5.5.3 Synthese von SB 22

5-Nitroisophthalsäure wird mit dem Chlorierungsmittel Thionylchlorid unter Zusatz von katalytischen Mengen Dimethylformamid in Chloroform gelöst und zwei Stunden am

Rückfluß gekocht. Das Chloroform wird am Rotationsverdampfer abgedampft und der Rückstand mit Petrolether bei 40-80°C extrahiert. Es entstehen weiße Kristalle, deren Schmelzpunkt (63-65°C) mit dem der Literatur übereinstimmt (Beilstein III + IV, Bd. VIII).

Die Kupplung mit der vierten Stufe der Suraminsynthese wird nach Schotten-Baumann durchgeführt. 770 mg des in Wasser gelösten 'Suraminhalbmoleküls' (10%) werden mit 247 mg in Toluol gelöstem 5-Nitroisophthalsäuredichlorid gekuppelt. Das entstandene Produkt (SB 20) wird bis zur Trockenheit eingeeengt und aus wäßrigem Ethanol umkristallisiert.

SB 20 wird in 100 ml Wasser gelöst und in Gegenwart von 80 mg Palladium(10%)/Aktivkohle mit Wasserstoff unter Normaldruck reduziert. Das Produkt (SB 21) wird bis zur Trockenheit eingeeengt und aus wäßrigem Ethanol umkristallisiert.

500 mg SB 21 und 23 mg Natriumnitrit (0.3 mM) werden in Wasser gelöst und mit 1 N Natronlauge auf pH 8 eingestellt. Die Lösung wird dann langsam bei 0°C in 3 N Salzsäure getropft. Die sich bildende Diazoniumsalzlösung wird bei pH 8 mit einer äquimolaren Menge Pyridoxalphosphat gekuppelt. Das Reaktionsprodukt wird mit dem vierfachen Volumen Isopropanol gefällt. Nach der Sedimentation wird der Überstand dekantiert und das entstandene SB 22 im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet. Das Produkt wird massenspektroskopisch nachgewiesen. Die Ausbeute liegt bei 70%.

5.6 Markierung und Detektion von SR-Proteinen mit Anionentransport-Inhibitoren

5.6.1 Markierung von SR-Proteinen mit 6-S-Dinitrophenyl-thioguanosin-triphosphat

Pro Ansatz werden 40 µg SR-Vesikel mit 100 µM, 200 µM, 500 µM, 1 mM und 2 mM radioaktiv markiertem 6-DNP-S-GTP versetzt und das Volumen mit Puffer H (100 mM KCl, 10 mM HEPES pH 6.5) auf 30 µl aufgefüllt. Ein Teil der Ansätze erhält zusätzlich 2 mM MgCl₂. Nach 10 min Inkubation bei RT werden die Proben mit je 10 µl Probenpuffer versetzt, 10 min auf 40°C erwärmt, 5 min zentrifugiert und mittels 12% iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Färben und Entfärben werden die Gele getrocknet und nach 1-3 Tagen Exposition in einer lichtempfindlichen Kassette im Phosphorimager ausgewertet. Als Vergleich wird radioaktiv markiertes 6-DNP-S-GTP ohne SR aufgetragen. Es werden auch Ansätze ohne β-Mercaptoethanol im Probenpuffer getestet, um eine eventuelle Reduktion des bei der Reaktion mit den Sulfhydrylgruppen von Cysteinresten entstehenden Thioethers auszuschließen.

5.6.2 Markierung von SR-Proteinen mit radioaktiv markiertem SB 22

Jodiertes SB 22 wird in Konzentrationen von 0.5, 2, 5, 10, 20, 50 und 100 μM mit jeweils 40 μg SR-Vesikeln 15 min bei RT inkubiert, wobei alle Proben doppelt angesetzt werden. Ein Teil wird mit der zweifachen molaren Menge Natriumborhydrid (NaBH_4) versetzt (1, 4, 10, 40, 100, 200 μM). Als Puffer dienen Puffer H (100 mM KCl, 10 mM HEPES pH 6.5) bzw. Puffer E (100 mM KCl, 1mM TEA pH 7.4). Nach Zugabe von 10 μl Probenpuffer werden die Ansätze 10 min auf 40°C erwärmt und mittels 12% iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Färben/Entfärben mit Coomassie Blau werden die Gele getrocknet und 2-4 Tage in einer Phosphorimager-Kassette exponiert.

5.6.2.1 Jodierung von SB 22

18 mg SB 22 (0.01 mM) werden in 250 μl Wasser gelöst. 100 μl Na^{125}I (103 mCi/ml) werden in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und durch Zugabe einer Spatelspitze Chloramin-T zu Jod ($^{125}\text{I}_2$) oxidiert, das mit Natriumjodid den reaktiven Komplex $\text{Na}^{125}\text{I}_3$ bildet. Nach Hinzufügen des gelösten SB 22 wird der Reaktionsansatz 10 min inkubiert. Die Probe wird direkt im Anschluß über Gelfiltration (Sephadex G-15, 1 x 20 cm) aufgereinigt und lyophilisiert. Die Ausbeute beträgt 7.5 mg SB 22 mit einer spezifischen Aktivität von 0.004 mCi/mmol.

Alternativ erfolgt die Jodierung mit Lugolscher-Lösung (wäßrige Jod-Kaliumjodid-Lösung). 18 mg SB 22 werden mit 90 μl Na^{125}I versetzt und 150 μl Wasser sowie 6 μl Lugolsche-Lösung zugegeben. Die Reaktionszeit beträgt 20 min. Die Aufreinigung erfolgt ebenfalls über Gelfiltration. Die Ausbeute liegt bei 7 mg, die spezifische Aktivität bei nur 0.4 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$.

5.6.3 Affinitätschromatographie mit SB 9

EAH-Sepharose 4B (Pharmacia) besitzt freie Aminogruppen am Ende einer langen, hydrophilen Überbrückungskette (10-atom) an die Liganden mit Carbonylgruppen gekuppelt werden können.

44 mg des Suramin-Analogons SB 9 (50 μM) werden in 1 ml Natrium-Boratpuffer (20 mM) pH 9 gelöst und mit 10 ml EAH-Sepharose 4B 1 h bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von ca. 20 Tropfen 1 mM Natriumborhydrid wird die entstehende Schiff'sche Base reduziert.

Nach 30 min wird der pH-Wert mit 5 N HCl kurz auf pH 4 eingestellt und das Säulenmaterial dann mit 10 mM TRIS-HCl pH 7.2 / 0.4 % Nonidet P-40 äquilibriert. Die Säule wird, wie unter 5.3.2 beschrieben, auch zur Aufreinigung des VDAC verwendet.

5.7 Immunodetektion von G_{α} -Untereinheiten im SR

SR-Vesikel bzw. verschiedene Fraktionen der SB 9-Sepharose-Säule werden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran elektrotransferiert. Der monoklonale anti- G_{α} - Untereinheit Antikörper aus Kaninchen (Calbiochem) wird 1:150000 in PBS-T, 1% Magermilchpulver verdünnt (s. 5.3.1) und 1 h mit der Membran inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in PBS-T wird der zweite Antikörper (Sigma, anti-Kaninchen IgG) in einer 1:15000 Verdünnung zugegeben. Nach einstündiger Inkubation wird erneut mit PBS-T gewaschen, und die Membran mit dem ECL-System, wie unter 5.3.1 beschrieben, behandelt.

5.8 Sulfat-Transportmessung mit der Filterassay-Methode

200 μ l SR-Vesikel (ca. 3 mg) werden bei RT mit 15-20 μ l $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ (20 nM, spez. Aktivität 560 mCi/mmol) eine Stunde inkubiert. Nach dieser Zeit hat sich ein Gleichgewicht zwischen dem Sulfat in den Vesikeln und außerhalb der Vesikel eingestellt (Schuster 2001). Der Ansatz ist ausreichend für acht Messungen, wobei immer Doppelbestimmungen durchgeführt werden.

Pro Messung werden jeweils 25 μ l SR-Vesikel in 5 ml Puffer H (100 mM KCl, 10 mM HEPES pH 6.5) pipettiert und durch die eintretende Verdünnung der Suspension der Transport gestartet. Die zu testenden Substanzen werden in dem Meßpuffer vorgelegt. Der Ansatz wird 15 Sekunden stark gerührt und dann in eine 5 ml Multipipettenspitze (Eppendorf) aufgenommen. Nach 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3 und 6 min werden Aliquots von je 400 μ l auf einen Nitrocellulose-Filter (Millipore-Filter Typ HA 0.45 μ m), der auf der Fritte einer Saugflasche liegt, pipettiert und mit 5 ml 4°C kaltem Meßpuffer gewaschen. Der Filter wird dann in ein Szintillationsröhrchen gelegt und mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Für den Volumenwert werden am Ende jeder Meßreihe 50 μ l der Meßlösung auf einen Filter pipettiert und mit Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die Radioaktivität in den Vesikeln wird im Szintillationszähler bestimmt. Die erhaltenen cpm-Werte werden durch den Volumenwert dividiert, um die Meßreihen aneinander anzupassen. Die Auswertung der Kurven und die Bestimmung der k-Werte erfolgt mit den Programmen Plotit und Origin.

6. Literatur

- Adams, V., Griffin, L., Towbin, J., Gelb, B., Worley, K., McCabe, E.R.B., (1991), *Biochem. Med. Metabol. Biol.* 45, 271 - 291
- Al-Awqati, Q., (1995), *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 504 - 508
- Ahern, G.P., Junankar, P.R., Dulhunty, A.F., (1994), *FEBS Lett.* 352(3), 369 - 374
- Ahern, G.P., Laver, D.R., (1998), *Biophys. J.* 74, 2351 - 2355
- Allard, B., Rougier, O., (1994), *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 15(5), 563 - 571
- Babel, D., et al. (1991), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 372, 1027.
- Ballatori, N., et al., (1995), *Mol. Pharmacol.* 48, 472 - 476
- Bathori, G., et al., (1993), *Biochim. Biophys. Acta* 1145(1), 168-176
- Bathori, G., et al., (1998), *Biochim. Biophys. Res. Com.* 243(1), 258-263
- Baumgärtner, P., (1998), Dissertation, J.W.G.-Universität Frankfurt am Main
- Beindl, W., et al. (1996), *Mol. Pharmacol.* 50, 415 - 423
- Benz, R., Maier, E., Thinnes, F.P., Götz, H., Hilschmann, N., (1992), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 373, 295 - 303
- Benz, R., Kottke, M., Brdiczka, D. (1990), *Biochim. Biophys. Acta* 1022, 311 - 318
- Benz, R., Wojtczak, L., Bosch, W., Brdiczka, D. (1988), *FEBS Lett.* 231, 75 - 80
- Benz, R., (1994), *Biochim. Biophys. Acta* 1197, 167 - 196
- Bera, A.K. Gosh., S., Das, S., (1995), *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 209, 213 - 217
- Berman, M.C. (1999), *Biochim. Biophys. Acta* 1418(1), 48 - 60
- Blachly-Dyson, E., Peng, S.Z., Colombini, M., Forte, M., (1990), *Science* 247, 1233 - 1236
- Blachly-Dyson, E., Zambronicz, E.B., Yu, W.H., Adams, V., McCabe, E.R., Adelman, J., Colombini, M., Forte, M., (1993), *J. Biol. Chem.* 268 (3), 1835 - 1841
- Blachly-Dyson, E., et al. (1994), *Genomics* 20, 62 - 67
- Blatz, A.L., Magleby, K.L., (1983), *Biophys. J.* 43, 237 - 241
- Blatz, A.L., Magleby, K.L., (1985), *Biophys. J.* 47, 119 - 123
- Bourke, J.R., et al. (1995), *J. Endocrinol.* 147(3), 441 - 448
- Brdiczka, D., (1991), *Biochim. Biophys. Acta* 1071, 291 - 312
- Brojatsch, J., (1987), Dissertation J.W.Goethe-Universität Frankfurt am Main
- Bunce, K.T., Spraggs, C.F., (1988), *J. Physiol.* 400, 381 - 394
- Bureau, M.H., Khrestchatsky, M., Heeren, M.A., Zambrowicz, E.B., Kim, H., Grisar, T.M., Colombini, M., Tobin, A.J., Olsen, R.W., (1992), *J. Biol. Chem.* 267, 8679 - 8684

- Campbell, K.P., Franzini-Armstrong, C., Shamo, A.E., (1980), *Biochim. Biophys. Acta* 602(1). 97 - 116
- Campbell, K.P., Mac Lennan, D.H., (1980), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 358, 328 - 331
- Campbell, K.P., Mac Lennan, D.H., (1981), *J. Biol. Chem.* 256, 10118 - 10124
- Campbell, K.P., Mac Lennan, D.H., (1983), *J. Biol. Chem.* 258, 1391 - 1394
- Carney-Anderson, L., Donaldson, S.K., (1994), *Am. Physiol. Soc.* C1087 - C1094
- Carney-Anderson, L., et al. (1997), *Am. J. Physiol.* 272, C572 - 581
- Carrasco, M.A., Sierralta, J., deMazancourt, P., (1994), *Biochim. Biophys.* 310, 76 - 81
- Chahdi, A., et al. (1998), *Fundam. Clin.Pharmacol.* 12(2), 121 - 132
- Chen, S.R., MacLennan, D.H., (1994), *J.Biol.Chem.* 269(36), 22698 - 22704
- Chu, A., et al., (1983a), *J. Biol. Chem.* 258(3), 1656 - 1664
- Chu, A., et al., (1983b), *J. Biol. Chem.* 258(3), 10543 - 10550
- Chu, A., (1986), *Biochemistry* 25(25), 8314 - 8324
- Chu, A., Saito, A., Fleischer, S., (1987), *Arch. Biochem. Biophys.* 258(1), 13 - 23
- Cole, T., Awni, L.A., Nyakature, E., Götz, H., Walter, G., Thinner, F.P., Hilschmann, N., (1992), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374, 297 - 304
- Colombini, M., (1979), *Nature* 279, 643 - 645
- Colombini, M., (1980), *J. Membr. Biol.* 53, 79 - 84
- Colombini, M., Yeung, C.L., Tung, J., König, T., (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 905, 279 - 286
- Colombini, M., (1989), *J. Membr. Biol.* 111, 103 - 111
- Colombini, M., Blachly-Dyson, E., Forte, M., (1996), *Ion Channels Vol. 4 New York Plenum*
- Coonan, J.R., Lamb, G.D., (1998), *Pflugers Arch.* 435, 720 - 730
- Coronado, R., et al. (1980), *J. Gen. Physiol.* 76, 425 - 446
- Cowan, S.W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Gosh, R., Pauptit, R.A., Jansonius, J.N., Rosenbusch, J.P., (1992), *Nature* 358, 727 - 733
- Damiani, E., Picello, E., Saggin, L., Margreth, A., (1995), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 457 - 465
- Deachapunya, C., O'Grady, S.M., (1998), 508, 31 - 47
- De Meis, L., Hasselbach, W., (1971), *J.Biol.Chem.* 246, 4579-4763
- De Pinto, V., Prezioso, G., Thinner, F.P., Link, T.A., Palmieri, F., (1991), *Biochemistry* 30, 10191 - 10200
- De Pinto, V., Aljamal, J.A., Palmieri, F., (1993), *J. Biol. Chem.* 268, 12977 - 12982

- De Pinto, V., Tommasino, M., Benz, R., Palmieri, F., (1985), *Biochim. Biophys. Acta* 813, 230 - 242
- De Pinto, V., Benz, R., Palmieri, F., (1989), *Eur. J. Biochem.* 183, 179 - 187
- De Pinto, V., et al., (1991), *Biochemistry* 30, 10191 - 10200
- Dettbarn, C., Palade, P., (1993), *Biochem. Pharmacol.* 45(6), 1301 - 1309
- Dolder, M., et al., (1999), *J. Struct. Biol.* 127, 64 - 71
- Dolphin, A.C., (1990), *G-Protein as Mediators of Cellular Signalling Processes*, ed. M.D. Houslay, G. Milligan, Chapter 9, 125 - 150
- Doucet, J.-P., Tuana, B.S., (1991), *J. Biol. Chem.* 266 (26), 17613 - 17620
- Dulhunty, A.F. et al (1996), *Acta Physiol. Scand.* 156 (3), 375 - 385
- Dupont, Y. (1977), *Eur. J. Biochem.* 72, 185 - 190
- Eckert, R., (1986), *Thieme Verlag Stuttgart*, Tierphysiologie, 318.
- Edwards, G., Weston, (1993), *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33, 597 - 637
- Eich, R., (1987), *Dissertation, J.W. Goethe-Universität Frankfurt*
- Emmick, J.T., Kwon, S., Bidasee, K.R., Besch, K.T., Besch, H.R., (1994), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269 (2), 717 - 724
- Feng, W., et al. (1996), *Mol. Membr. Biol.* 13(2), 85 - 93
- Fiske, C. SubbaRow, Y.P., (1925), *J. Biol. Chem.* 66, 375-400
- Fink, R.H., Veigel, C., (1996), *Acta Physiol. Scand.* 156, 387 - 396
- Fiek, C., Benz, R., Roos, N., Brdiczka, D., (1982), *Biochim. Biophys. Acta* 688, 429 - 440
- Flörke, H., et al. (1994), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 375, 513 - 520
- Fong, S.K., Chan, H.C., (1998), *Biol. Reprod.* 58(4), 1020 - 1025
- Forte, M., Guy, H.R., Manella, C.A., (1987); *J. Bioenerg. Biomembr.* 19, 341 - 350
- Franzini-Armstrong, C., Protasi, F., (1997), *Physiol. Rev.* 77, 699 - 729
- Freissmuth, M., et al. (1997), *Pharmacochem. Libr.* 28, 71 - 80
- Freissmuth, M., Waldhoer, M., Bofill-Cardona, E., Nanoff, C., (1999), *TiPS*, 20, 237 - 245
- Gambling, L., Olver, R.E., Fyfe, G.K., Kemp, P.J., Baines, D.L., (1998), *Biochim. Biophys. Acta* 1372, 187 - 197
- Glick, J., Santoyo, G., Casey, P.J., (1996), *J. Biol. Chem.* 271, 2949 - 2954
- Goldsmith, P.P. et al., (1987), *J. Biol. Chem.* 262, 14683.
- Gordon, A.M., Homsher, E., Regnier, M., (2000), *Physiol. Rev.* 80(2), 853 - 924
- Gornall, G.M., Badawill, C.H., David, M.M. (1949), *J. Biol. Chem.* 117, 751 - 766
- Gross, E., (1967), *Meth. Enzymol.* 11, 238 - 255

- Guggino, W.B., (1994), *Current Topics in Membranes* Vol. 42, Acad. Press NY
- Hadad, N., et al. (1999), *J. Membr. Biol.* 170(1), 39 - 49
- Hals, G.D., (1989), *J. Gen. Physiol.* 93, 385 - 410
- Hamilton, S.L., et al. (1991), *J. Biol. Chem.* 266, 19528 - 19535
- Hartung, K., et al., (1987), *Biochim. Biophys. Acta* 900(2), 209 - 220
- Hasegawa, T., Kumagai, S., (1989), *FEBS Lett.* 244 (2), 283 - 286
- Hasselbach, W., Makinose, M., (1963), *Biochem. Zeitschrift* 333, 518 - 528
- Hasselbach, W., Makinose, M., (1963), *Biochem. Zeitschrift* 339, 94 - 111
- Hasselbach, W., Migala, A., (1992), *Z. Naturforsch.* 47 (1-2), 136 - 147
- Heider, P., (1992), Dissertation J.W.G.-Universität Frankfurt am Main
- Heiden, M., Kroll, K., Thinnes, F.P., Hilschmann, N., (1996), *J Bioenerg. Biomembr.* 28, 171 - 180
- Hellmann, K.P., Siadat, S., Reymann, S., Thinnes, F.P., (1999), *Mol. Gen. Metabol.* 67, 176 - 180
- Herbette, L., Scorpa, A. et al., (1981); *Biophys. J.* 36, 27 - 46
- Hemling, U., (1994), Dissertation, J.W.G.-Universität Frankfurt am Main
- Hille, B., (1992), *Ionic Channels of Excitable Membranes (ed B.Hille)* 2nd ed: Sinaure Associates; Sunderland, MA
- Hodge, T., Colombini, M., (1997), *J. Membr. Biol.* 157(3), 271 - 279
- Hohenegger, M., et al. (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95(1), 346 - 351
- Holevinsky, K.O., (1994), *J. Membr. Biol.* 137, 59 - 70
- Holden, M.J., Colombini, M., (1993), *Biochim. Biophys. Acta* 1144, 396 - 402
- Holloway, P.W., (1973), *Anal. Biochem.* 53, 304 - 308
- Hongre, A-S., et al. (1994), *Pfluegers Arch.* 426, 284 - 287
- Horne, W.A., et al. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3718 - 3722
- Hoyle, C.H.V., Knight, G.E., Burnstock, E., (1990), *Br. J. Pharmacol.* 99, 617 - 621
- Huang, R.C., et al. (1990), *Mol. Pharmacol.* 37, 304 - 310
- Hudson, A.J., Ebers, G.C., Bulman, D.E., (1995), *Brain* 118, 547 - 563
- Hunkapiller, M.W., Lujan, E., Ostrander, F., Hood, L.E., (1983), *Meth. Enzymol.* 91, 227 - 236
- Ide, T.H., Sakamoto, T., Morita, T., Taguchi, T., Kasai, M., (1991), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 38 - 44
- Ikemoto, N., et al., (1994), *Biochemistry* 33, 10961 - 10968

- Inesi, G., Kirtley, M.R., (1992), *J. Bioenerg. Biomembr.* 24, 271 - 283
- Ismailov, I.J., et al. (1996), *J. Biol. Chem.* 271(9), 4776 -4780
- Jakob, C., Götz, H., Hilschmann, N., (1995), *FEBS Lett.* 368, 5 - 9
- Junankar, P.R., Curtis, S.M., Pace, S.M., Dulhunty, A.F., (1993), *Proc. Aust. Physiol. Pharm. Soc.* 24, 179 P
- Junankar, P.R., Dulhunty, A.F., Curtis, S.M., Pace, S.M., Thinnes, F.P., (1995), *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 16, 595 - 610
- Jürgens, L., Ilsemann, P., Kratzin, H.D., Hesse, D., Eckart, K., Thinnes, F.P., Hilschmann, N., (1991), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 372, 455 - 463
- Jürgens, L., Kleineke, J., Brdiczka, D., Thinnes, Hilschmann, N., (1995), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* Vol. 376, 685 - 689
- Kasai, M., Ide, T., (1996), *Ion Channels, Plenum Press NY* Vol. 4, 303 - 331
- Kasai, M., Miyamoto, H., (1976), *J. Biochem (Tokyo)* 99(4), 1071 - 1080
- Kasai, M., Taguchi, T., (1981), *Biochim. Biophys. Acta* 643, 213 - 219
- Kasai, M., (1981), *J. Biochem.* 89, 943 - 953
- Kawano, S., et al. (1999), *J. Biol. Chem.* 274, 2085 - 2092
- Kawasaki, T. Kasai, M., (1994), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 1120 - 1127
- Kayser, H., et al. (1989), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 370, 1265 - 1278
- Kim, R.S., La Bella, F.S., (1988), *J. Mol. Cell. Cardiol.* 20(2), 119 - 130
- Kinally, K.W. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1374 - 1378
- Klinger, M., Freissmuth, M., Nickel, P., Stäbler-Schwarzbart, M., Kassack, M., Suko, J., Hohenegger, M., (1999), *Mol. Pharmacol.* 55(3), 462 - 472
- Kometani, T., Kasai, M., (1978), *J. Membr. Biol.* 41(4), 295 - 308
- König, U., Götz, H., Walter, G., Babel, D., Hohmeier, H.E., Thinnes, F.P., Hilschmann, N., (1991), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 372, 565 - 572
- Koppel, D.A., Kinnally, K.W., Mannells, C.A., (1997), *Biophys. J.* 72 A38
- Kourie, JI, Laver, D.R., Junankar, P.R., Gage, P.W., Dulhunty, A.F., (1996a), *Biophys. J.* 70, 202 - 221
- Kourie; JI, et al. (1996b), *Am J. Physiol.* 270, C1675 - 1686
- Kourie, JI., (1997a), *J. Membr. Biol.* 157, 39 - 51
- Kourie, JI., (1997b), *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 68, 263 - 300
- Kourie, JI. (1998), *J. Membr. Biol.* 164(1), 47 - 58
- Kourie, JI.; (1999), *J. Membr. Biol.* 167(1), 73 - 83

- Krause, J., et al. (1986), *Biochim. Biophys. Acta* 860, 690 - 698
- Kugelgen, I., Wetter, A., (2000), *Naunyn Achmiedebergers Arch. Pharmacol.* 362, 310 - 323
- Kutchai, H., Geddis, L.M., Otero, A.S., (1993), *Biochim. Biophys. Acta* 1175, 140 - 146
- Laemmli, U.K., (1970), *Nature* 227, 680 - 685
- Lambrecht, G., Friebe, T., Grimm, U., Windscheif, U., Bungrardt, E., Hildebrandt, C., Bäumert, H.G., Spatz-Kümbel, G., Mutschler, E., (1992), *Eur. J. Pharmacol.* 217, 217 - 219
- Lambrecht, G., Ganso, M., Bäumert, H.G., Spatz-Kümbel, G., Hildebrandt, C., Braun, K., Mutschler, E., (2000), *J. Autonomic Nervous System* 81, 171 - 177
- Leberer, E., et al., (1990), *J. Biol. Chem.* 265(17), 10118 - 10124
- Leddy, J.J. et al. (1993), *Biochem. J.* 295, 849 - 856
- Lee, A., Xu, X., Colombini, M., (1996), *J. Biol. Chem.* 271(43), 26724 - 26731
- Lee, A., Zizi, M., Colombini, M., (1994), *J. Biol. Chem.* 49, 30974 - 30980
- Lewis, T.M., Roberts, M.L., Bretag, A.H., (1994), *Neurosci. Lett.* 181, 83 - 86
- Linden, M., Gellerfors, P., Nelson, B.D., (1982), *FEBS Lett.* 141 189 - 192
- Linden, M., Gellerfors, P., (1983), *Biochim. Biophys. Acta* 736 125 - 129
- Linden, M., Karlsson, G., (1996), *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 218, 833 - 836
- Lisanti, M.P., Scherer, P.E., Vidugiriene, P.E., Tang, Z.L., Hermanowski-Vosatka, A., Tu, Y.H., Cook, R.F., Sargiacomo, M., (1994), *J. Cell. Biol.* 126, 111 - 126
- Liu, M.Y., Colombini, M., (1992), *Biochim. Biophys. Acta* 1098, 255 - 260
- Liu, M.Y., Colombini, M., (1994), *Biochim. Biophys. Acta* 1185, 203 - 212
- Louis, C.F., et al., (1980), *Eur. J. Biochem.* 111(1), 1 - 9
- Lu, X., Xu, L., Meissner, G., (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 6511 - 6516
- Ma, J., Zhao, J., (1994), *Biophys. J.* 67, 626 - 633
- Mac Lennan, D.H., Brandel, J., Korczak, B., Green, N.M., (1985), *Nature* Vol. 326, 696 - 706
- Mac Lennan, D.H., Campbell, K.P. Reithmeier, R.A.F., (1983), *Calcium and Cell Function* Vol. IV, 151 - 173
- Mannella, C.A., (1981), *Biochim. Biophys. Acta* 645, 33 - 40
- Mannella, C.A., (1987), *J. Bioenerg. Biomembr.* 19, 329 - 340
- Mannella, C.A., (1990), *Experientia* 46, 137 - 145
- Mannella, C.A., Guo, X.W., (1992), *Trans. Am. Crystallogr. Assoc.* 28, 176 - 182
- Mannella, C.A., (1998), *J. Struct. Biol.* 121, 207 - 218
- Martin, D.K., (1993), *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 192(3), 1266 - 1273
- Martonosi, A.N., Feretos, R., (1964), *J. Biol. Chem.* 239, 648 - 658

- Martonosi, A.N., (1984), *Physiol. Rev.* 64(4), 1240 - 1320
- Matsudaira, P., *J. Biol. Chem.* 262, 10035 - 10038
- Mc Cabe, E.R.B., (1994), *J. Bioenerget. Biomembr.* 26, 307 - 315
- McEnery, M.W., et al. (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3170 - 3174
- McIntosh, D.B. (1992), *J. Biol. Chem.* 267:31, 22328 - 22335
- Meissner, G., (1975), *Biochim. Biophys. Acta* 389, 51 - 68
- Meissner, G., McKinley, (1976), *J. Membr. Biol.* 30, 79 - 98
- Meissner, G., McKinley, (1982), *J. Biol. Chem.* 257, 7704 - 7711
- Meissner, G., (1994), *Annu. Rev. Physiol.* 56, 485 - 508
- Miller, C., (1978), *J. Membr. Biol.* 40, 1 - 23
- Miller, C., Racker, E., (1976), *Cell* 9, 283 - 300
- Mitchell, R.D., Palade, P., Fleischer, S., (1983), *J. Cell Biol.* 96, 1008 - 1016
- Morimoto, T., Kasai, M., (1986), *J. Biochem.* 99, 1071 - 1080
- Mukhopadhyay, S., Ramminger, S.J., McLaughlin, M., Gambling, L., Olver, R.E., Kemp, P.J., (1997), *Biochem. J.* 326, 725 - 730
- Mumby, S.M., Gilman, A.G., (1991), *Methods Enzymol.* 195, 215.
- Nagasaki, K., Kasai, M., (1983), *J. Biochem.* 94, 1101 - 1109
- Nakashima, R.A., Mangan, P.S., Colombini, M., Pedersen, P.L., (1986), *Biochemistry* 25, 1015 - 1020
- Nickel, P., et al. (1986), *Drug. Res.* 36(II), Nr.8, 1153 - 1157
- Ohnberger, C.E., Khan, S.A., Meisheri, K.D., (1993), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267(1), 25 - 30
- Orr, I., Shoshan-Barmatz, V., (1996), *Biochim. Biophys. Acta.* 1283, 80 - 88
- Palmieri, F., De Pinto, V., (1989), *J. Bioenerg. Biomembr.* 21, 417 - 425
- Patel, J.R., et al. (1996), *J. Membr. Biol.* 154, 81 - 89
- Payne, M.R., Rudnick, S.E., (1989), *Trends Biochem Sci.* 14(9), 357 - 360
- Peng, S., Blachly-Dyson, E., Colombini, M., Forte, M., (1992a), *J. Bioenerg. Biomembr.* 24, 27 - 31
- Peng, S., Blachly-Dyson, E., Forte, M., Colombini, M., (1992b), *Biophys. J.* 62, 123 - 135
- Picher, M., Decrouy, A., Rousseau, E., (1996), *Can. Biochim. Biophys. Acta* 1279(1), 93 - 103
- Popov, N., Schmitt, M., Schulzeck, S., Matthies, H., (1975), *Acta Biol. Med. Germ.* 34, 1441 - 1446
- Popp, B., court, D.A., Benz, R., Neupert, W., Ilil, R., (1996), *J. Biol. Chem.* 271,

13593 - 13599

- Portzehl, H., (1957), *Biochim. Biophys. Acta* 26, 375 - 377
- Puchelle, E., Jacquot, J., Fuchey, C., Bulet, H., Klossek, J.M., Gilain, L., Triglia, J.M., Thinnes, F.P., Hilschmann, N., (1993), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374, 297 - 304
- Rae, J.L., (2000), submitted *Physiol. Biophys.*
- Reymann, S., Flörke, H., Heiden, M., Jakob, Ch., Stadtmüller, U., Steinacker, P., Lalk, V.E., Pardowitz, I., Thinnes, F.P., (1995), *Biochem. Mol. Med.* 54, 75 - 87
- Reymann, S., et al. (1999), *Anal. Biochem.* 274, 289 - 295
- Rauch, G., Moran, O., (1994), *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 200, 908 - 915
- Riquelme, G., Parra, M., (1999), *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180, 469 - 475
- Roos, N., et al. (1982), *Biochim. Biophys. Acta* 686, 204 - 214
- Rostovtseva, T.K., Bezrukov, S.M., (1998), *Biophys. J.* 74(5), 2365 - 2373
- Rostovtseva, T.K., Colombini, M., (1997), *Biophys. J.* 72(5), 1954 - 1962
- Rousseau, E., Robertson, M., Meissner, G., (1988), *Eur. Biophys. J.* 16, 143 - 151
- Rousseau, E., (1989), *J. Membr. Biol.* 110, 39 - 47
- Rousseau, E., Pinkos, J., (1990), *Pfluegers Arch.* 415, 645 - 647
- Saito, A., et al. (1988), *J. Cell Biol.* 107 (1), 136 - 147
- Salama, G., Scarpa, A., (1985) *J. Biol Chem.* 260 (21) 11697 - 11705
- Scarpa, A. Baldassare, J., Inesi, G., (1972), *J. Gen. Physiol.* 60, 735 - 766
- Schein, S.J., Colombini, M., Finkelstein, A., (1976), *J. Membr. Biol.* 30, 99 - 120
- Scherer, N.M., Toro, M.J., Entman, M.L., Birnbaumer, L., (1987), *Arch. Biochem. Biophys.* 259, 431 - 440
- Schuster, A., (1995), Diplomarbeit, J.W.G.-Universität Frankfurt am Main
- Schuster, A., (2001), Dissertation, J.W.G.-Universität Frankfurt am Main
- Shafir, I., Feng, W., Shoshan-Barmatz, V., (1998), *Eur. J. Biochem.* 253, 627 - 636
- Shao, L., Kinnally, K.W., Mannella, C.A., (1996), *Biophys. J.* 71, 778 - 786
- Sheppard, D.N., Welsh, M.J., (1992), *J. Cell Biol.* 99, 875 - 885
- Shoshan-Barmatz, V., Hada, N., Feng, W., Shafir, I., Orr, I., Varsanyi, M., Heilmeyer, L.M.G., (1996a), *FEBS Letters* 386, 205 - 210
- Shoshan-Barmatz, V., Orr, I., Weil, S., Meyer, H., Vasanyi, M., Heilmeyer, L.M.G., (1996b), *Biochim. Biophys. Acta* 1283, 89 - 100
- Sitsapesan, R., *J. Membr. Biol.* (1999), 168 (2), 159 - 168
- Smith, J.S., Coronado, R., Meissner, G., (1985), *Nature* 316, 446 - 449

- Soler, F., et al. (1994), *J. Bioenerg. Biomembr.* 26(1), 127 - 136
- Somasundaram, B., Tregear, R.T., (1993), *J. Muscle Res. Cell Mot.* 14(3), 341 - 346
- Song, J., et al. (1998), *J. Biol. Chem.* 273(38), 24406 - 24413
- Sorgato, M.C., Moran, O., (1993), *Bioch. Mol. Biol.* 18, 127 - 171
- Standen, N.B., et al. (1989), *Science* 245, 177 - 180
- Stanley, S., (1994), *MS Thesis, State Univ. of New York at Albany*
- Stienen, G.J., (2000), *J. Physiol.* 527, 1.
- Sukhareva, M., et al. (1994), *Biophys. J.* 67, 751 - 765
- Sun, X.P., et al. (1993), *Am. J. Physiol.* 264, 774 - 785
- Szegedi, C.S., Sarkoezi, S., Herzog, Jona, I., Varsanyi, M., (1999), *J. Biochem.* 106, 872 - 877
- Tanifuji, M., Sokabe, M., Kasai, M., (1987), *J. Membr. Biol.* 99 103 - 111
- Terzic, A., Jahagir, A., Kurachi, Y., (1995), *Am. J. Physiol.* 269, C525 - C545
- Thinnes, F.P., Götz, H., Kayser, H., Benz, R., Schmidt, Kratzin, H.D., Hilschmann, N., (1989), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* Vol. 370, 1253 - 1264
- Thinnes, F.P., Schmid, A., Benz, R., Hilschmann, N., (1990), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 371, 1047 - 1050
- Thinnes, F.P., Babel, D., Hein, A., Jürgens, L., König, U., Schmid, A., Hilschmann, N., (1991), *Klein. Wochenschr.* 69, 283 - 288
- Thinnes, F.P., (1992), *J. Bioenerg. Biomembr.* Vol. 24, No 1, 71 - 86
- Thinnes, F.P., Flörke, H., Winkelbach, H., Stadtmüller, U., Hilschmann, N., (1994), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 375, 315 - 322
- Thinnes, F.P., Reymann, S., (1997), *Naturwissenschaften* 84, 480 - 498
- Thomas, L., Blachly-Dyson, E., Colombini, M., Forte, M., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5446 - 5449
- Thinnes, F.P., Flörke, H., Winkelbach, H., Stadtmüller, U., Heiden, M., Karabinos, A., Hesse, D., Kratzin, H.D., Fleer, E., Hilschmann, N., (1994), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* Vol. 375, 315 - 322
- Thomas, L., Kocsis, E., Colombini, M., Erbe, E., Trus, B.L., Steven, A.C., (1991), *J. Struct. Biol.* 106, 161 - 171
- Tobwin, H., Staehelin, T., Gordon, J., (1979), *Proc. Natl. Sci. USA* 76, 4350 - 4354
- Tominaga, T., et al. (1995), *Circ. Res.* 77, 417 - 423

- Toutant, M., Gabrion, J., Vandaele, S., Peraldi-Roux, S., Barhanin, J., Bockaert, J., Rouot, B., (1990), *EMBO J.* 9 (2), 363 - 369
- Tuana, B.S., Mac Lennan, D.H., (1980), *FEBS Lett.* 235(1-2), 219 - 223
- Uehara, A., Yasukochi, M., Imanaga, I., (1996), *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 28(1), 43 - 51
- Valdivia, H.H., Coronado, (1989), *FEBS Lett.* 244 (2), 333 - 337
- Varsanyi, M., Heilmeyer, L.M.G., (1980), *FEBS Lett.* 103, 85 - 88
- Villaz, M., Robert, M., Carrier, L., Beeler, T., Rouot, B., Toutant, M., Dupont, Y., (1989), *Cellular Signalling* 1 (5), 493 - 506
- Volz, C., (1987), Diplomarbeit J.W.G.-Universität Frankfurt am Main
- Weik, R., Neumcke, B., (1989), *J. Membr. Biol.* 110, 217 - 226
- Weik, R., Neumcke, B., (1990), *Naunyn-Schmeideberg's Arch. Pharmacol.* 342, 258 - 263
- Weiss, M.S., Schulz, G.E., (1992), *J. Mol. Biol.* 227, 493 - 509
- Wessel, D., Flügge, U.I., (1984), *Anal. Biochem.* 138, 141 - 143
- Winkelbach, H., et al. (1994), *Biochem. Med and Metab. Biol.* 52, 120.
- Wong, P.Y.D., et al., (1999), *J. Physiol.* 514, 809 - 820
- Yamamoto, N., Kasai, M., (1982), *J. Biochem.* 92, 465 - 475 und 477 - 484
- Yatani, A., et al. (1988), *J. Biol. Chem.* 263, 9887 - 9895
- Young, R.C., Allen, R., Meissner, G., (1981), *Biochim. Biophys. Acta* 640, 490 - 499
- Yu, X., et al., (1993), *Biophys. J.* 64(4), 1232 - 1242
- Yu, X., Hao, L., Inesi, G., (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 16656 - 16661
- Zachar, J., Hurnak, O., (1994), *Gen. Physiol. Biophys.* 13(3), 193 - 213
- Zimniak, P., Racker, E., (1978), *J. Biol. Chem.* 253, 4631 - 4637
- Zizi, M., Forte, M., Blachly-Dyson, E., Colombini, M., (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 1614 - 1616
- Zizi, M., et al. (1998), *Biophys. J.* 75(2), 704 - 713
- Zucchi, R., Ronca-Testoni, S., (1997), *Pharmacol. Rev.* 49, 1-51

8. Danksagungen

Herrn Professor Dr. Dr. H. Fasold danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit. Seine pädagogischen Fähigkeiten, seine Menschlichkeit und sein Geschick im entscheidenden Moment die richtigen Worte zu finden haben die Zeit am Institut für Biochemie zu einer unvergeßlichen werden lassen.

Herr Dr. H.G. Bäumert hat mich stets sehr gut angeleitet und mir viel Eigenständigkeit ermöglicht. Seine aufmunternden Worte und seine fachkundigen Ratschläge haben mich immer wieder motiviert und auf den 'richtigen' Weg gebracht. Danke für das angenehme Arbeitsklima.

Herrn Dr. K.-H. Mann danke ich für die unermüdlichen Sequenzierungsversuche, die letztendlich doch noch erfolgreich waren.

Vielen Dank auch an Gudrun und Gerhard für ihre sachkundige und tatkräftige Unterstützung bei der Synthese vielversprechender 'Stöffchen', ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie danke ich für die tolle Zusammenarbeit in den vergangenen Jahren und die unzähligen Diskussionen über experimentelle Fragen und alltägliche Probleme (wie Hochzeitsvorbereitungen.....), die mich sehr geprägt haben. Es war sehr schön mit Euch: Achim, Christa, Else, Eva, Frank, Gerhard, Gudrun, Hans, Heidi, Iris, Jörg, Jürgen, Marlies, Petra, Sabine, Sigrun, Susann, Thomas und Thorsten.

Meiner Familie danke ich für die langjährige finanzielle und moralische Unterstützung, besonders meiner Oma, die immer in höchsten Maßen um mein leibliches Wohl besorgt war und um die Mittagszeit für Gesprächsstoff sorgte.

Und natürlich Alex, der gerade einmal weiß, wofür SR steht, mir aber immer geduldig bei technischen Notfällen zur Seite gestanden hat. Vielen Dank für Deine Gelassenheit und Ruhe, die ich in den etwas hektischen letzten Wochen sehr genossen habe.

Lebenslauf

Name: Silke Flebbe, geb. Frankenbach
Geburtsdatum 1. August 1970
Geburtsort Frankfurt am Main
Familienstand: verheiratet
Anschrift: Sindlinger Straße 8
65795 Hattersheim
Telefon 06190/6902
E-Mail Silke@Flebbe.de

Schulbildung:

1976-1981 Grundschole in Hattersheim
1981-1987 Helene Lange-Gymnasium in Ffm-Höchst
1987-1990 Friedrich Dessauer-Gymnasium in Ffm-Höchst
Abiturnote 1.6

Hochschulstudium:

1990-1992 Grundstudium Biologie an der J.W. Goethe-Universität Frankfurt
Vordiplom in Biologie
1992-1996 Studium der Biochemie und der biophysikalischen Chemie
an der J.W. Goethe-Universität Frankfurt
Nebenfach Pharmakologie
Abschluß als Diplom-Biochemikerin mit der Note sehr gut

Diplomarbeit: Untersuchungen zur Biosynthese der Ca^{2+} -ATPase des
sarcoplasmatischen Reticulums in Muskelzellen

Promotion:
Februar 1997 Beginn der Promotion am Institut für Biochemie und
biophysikalische Chemie der Universität Frankfurt
unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. H. Fasold

Thema: Affinitätsmarkierung von Anionenkanälen und regulatorischen
Proteinen im sarcoplasmatischen Reticulum