

**Identifizierung eines am Steroid- und Tetrapyrroltransport
beteiligten Proteins in Pflanzen**



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Antje Koch

geb. am: 15.10.1970 in: Gera

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Martin Luckner
2. Prof. Bernhard Grimm
3. Prof. Birgit Dräger

Halle (Saale), den 11.12.2002

urn:nbn:de:gbv:3-000004465

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004465>]

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Pregnenolonbiosynthese in der Pflanze	1
1.2	Die Pregnenolonbiosynthese im Säugetier	2
1.3	Der Periphere Benzodiazepin-Rezeptor	4
1.4	Charakterisierung des PBR durch Bindungsstudien	5
1.5	Struktur und Funktion des tierischen PBR	7
1.6	Porphyrine und die Tetrapyrrolbiosynthese	8
1.7	Mögliche Wege der Regulation des PBR	11
1.8	Zielstellung der Arbeit	12
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Materialien	13
2.1.1	Pflanzenmaterial	13
2.1.2	Bakterienstämme	14
2.1.3	Hefestämme	14
2.1.4	Vektoren	15
2.1.5	cDNA-Banken	15
2.1.6	Oligonukleotide	16
2.1.7	Medien, Puffer, Standardlösungen	17
2.1.8	Kits und Enzyme	17
2.1.9	Chemikalien und Standards	18
2.2	Zellbiologische und Molekularbiologische Methoden	19
2.2.1	Zellfraktionierung zur Isolierung von Mitochondrien	19
2.2.2	Fütterungsversuche mit Blättern von <i>D. lanata</i>	22
2.2.3	Aufnahmestudien an isolierten Mitochondrien	22
2.2.4	Radioliganden-Bindungs-Assay	23
2.2.5	Gas-Chromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (GC-MS)	23
2.2.6	Proteinbestimmung	24
2.2.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	24
2.2.8	Western-Blot und Antikörpernachweis	25
2.2.9	PCR (Polymerasekettenreaktion)	26
2.2.9.1	Deletionsmutanten	26
2.2.10	Klonierung und Sequenzierung	27
2.2.10.1	Allgemeines	27
2.2.10.2	Das pflanzliche PBR-homologe Protein aus <i>A. thaliana</i>	28
2.2.10.3	Vektoren für das Hefe Two-Hybrid-System (2.2.15.)	28
2.2.10.4	Vektoren für das in-vitro-GST-Interaktionsassay	29
2.2.11	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	29
2.2.12	Transformation der <i>E. coli</i> Stämme	29
2.2.13	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	30
2.2.14	GST-Pull-Down Assay	30
2.2.15	Das Two-Hybrid-System in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
2.2.16	Hefe-Transformation	32
2.2.17	Filterassay zum Nachweis von β -Galactosidase-Aktivität	33
2.2.18	Plasmidisolierung aus Hefe	33

3	ERGEBNISSE	35
3.1	Cholesterolaufnahme von Blättern von <i>Digitalis lanata</i>	35
3.2	Aufnahmestudien an isolierten Mitochondrien	36
3.3	Bindungsstudien an isolierten Mitochondrien	38
3.4	Amplifizierung eines PCR-Fragmentes, eines pflanzlichen PBR-Homologons, aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
3.5	Deletionsanalysen	42
3.5.1	Deletionsmutanten	42
3.5.2	Cholesterol- und Protoporphyrin IX- Aufnahme	43
3.5.3	Bindung von Benzodiazepinen und Isoquinolincarboxamid PK 11195	45
3.6	Two-Hybrid-Analyse zur Identifizierung von Interaktionspartnern des pflanzlichen PBR-homologen Proteins	46
3.6.1	Two-Hybrid-Analyse	46
3.6.2	Überprüfung der Bindung in der direkten Interaktion	48
3.7	GST-Pull-Down Assay	50
4	DISKUSSION	53
4.1	Vorkommen von PBR und PBR-Pflanzenhomologen	53
4.2	Sequenzanalyse	56
4.3	Cholesterolaufnahme von <i>D. lanata</i> -Blättern und von isolierten Mitochondrien	58
4.4	Charakterisierung der Full-length-Klone, Deletionsmutanten und des nativen Proteins in Mitochondrien	59
4.4.1	Cholesterol- und Protoporphyrin IX- Aufnahme	59
4.4.2	Bindung von Benzodiazepinen und Isochinolincarboxamid PK 11195	60
4.5	Interaktionspartner des pflanzlichen PBR-homologen Proteins	61
4.5.1	Two-Hybrid-Analyse	61
4.6	Ausblick	66
5	ZUSAMMENFASSUNG	67
6	LITERATURVERZEICHNIS	69

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Acc.No.	Registriernummer für Sequenzeinträge in Datenbanken (Accession Number)
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin)
CTP	Cytidintri-phosphate
cDNA	komplementäre DNA (copy DNA)
cpm	Zerfälle pro Minute (<u>c</u> ounts <u>p</u> er <u>m</u> inute)
CrtK	weitere Bezeichnung für TspO
DBI	Diazepam-Bindender Inhibitor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP's	Desoxynucleosidtri-phosphate
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	Europäisches Molekularbiologisches Laboratorium (European <u>M</u> olecular <u>B</u> iology <u>L</u> aboratory)
EST	<u>E</u> xpressed <u>S</u> equences <u>T</u> ag (ermittelte Nukleotidsequenz einer mRNA)
FSH	follikelstimulierendes Hormon
g	Fallbeschleunigung $g = 9,81 \text{ ms}^{-2}$
GABA	Gamma-Aminobuttersäure (<u>G</u> amma <u>A</u> mino <u>B</u> utyric <u>A</u> cid)
GC-MS	Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanidintri-phosphate
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
His	Histidin
IP	Isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K	Lysin
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Leu	Leucin
M	molar
MBR	Mitochondrialer Benzodiazepin-Rezeptor
mRNA	Boten-RNA (<u>m</u> essenger RNA)
NBT	Nitroblautetrazolium
Nm I	Nährmedium I
OD _x	optische Dichte bei x nm
ORF	offener Leserahmen (<u>O</u> pen <u>R</u> eading <u>F</u> rame)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAP7	PBR-assoziertes Protein 7

PBR	Peripherer Benzodiazepin-Rezeptor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (P <u>o</u> lymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
PEMs	Proembryogene Massen
pfu	Plaque bildende Einheiten (p <u>l</u> aque <u>f</u> orming <u>u</u> nits)
PVP	Polyvinylpyrolidin
R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumduodecylsulfat (S <u>o</u> dium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
SDS-PAGE-Gel	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese-Gel
SWISS-Prot	Proteinsequenzdatenbank
Tab.	Tabelle
TBS	Tris Buffered Saline (Tris-HCL)
TBT	Tris Buffered Saline (Tris-HCL) mit Tween 20
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminoethan
Trp	Tryptophan
TspO	Tryptophan-reiches Sensorisches Protein
TTP	Thymidintriphosphat
U	Units (Enzym-Einheiten)
V	Valin
X-Gal	5-Brom-4-chlor-indolyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Die Pregnenolonbiosynthese in der Pflanze

Phytosterole sind die in höheren Pflanzen vorkommenden Sterole bzw. Sterine. Sterole sind Steroidalkohole, die als Begleitstoffe tierischer und pflanzlicher Neutralfette weit verbreitet vorkommen. Die wichtigsten Vertreter leiten sich vom Cholestan ab. Sie spielen als Bestandteile von Biomembranen eine Rolle und sind als Cardenolid-, Hormon-, Vitamin- und Alkaloidvorstufen von Bedeutung (Rimpler, 1990). Ihre Biosynthese verläuft in den höheren Pflanzen ausgehend vom Acetyl-CoA über Squalen zum Cycloartenol (Luckner, 1990). Hier teilt sich der Weg, der einerseits zum Cholesterol und auf der anderen Seite zu den 24-Alkylsterolen wie Sitosterol führt. Aus diesen Sterolen wird Pregnenolon gebildet.

Cardenolide entstehen aus den genannten Sterolen über Pregnenolon, Progesteron und verschiedenen Pregnanen. Die Pflanzen *Digitalis lanata* und *Digitalis purpurea* synthetisieren die Herzglykoside durch Spaltung der Seitenkette von Cholesterol oder anderen 24-Alkylsterolen (Wickramasinghe et al., 1969; Pilgrim, 1972). Die Seitenketten-Spaltung ist nicht auf *Digitalis* oder andere Cardenolid-produzierende Pflanzen beschränkt, sie ist in den verschiedensten Pflanzenfamilien zu finden (Tschesche, 1969). *In vitro* Studien weisen auf das Vorkommen eines Seitenkettenspaltenden Enzymes in Mitochondrienpräparationen von *D. purpurea* hin (Pilgrim, 1972, Palazon et al., 1995). Es wird angenommen, daß die Verfügbarkeit von Cholesterol für ein mitochondriales Seitenkettenspaltendes Enzym auch ein regulativer Schritt in der Cardenolidbiosynthese ist. Darauf weisen die Ergebnisse der Aufnahmeexperimente von Proembryogenen Massen (PEM) und somatischen Embryonen von *D. lanata* mit Cholesterol und Progesteron hin. Nach der Zugabe von Cholesterol war die Menge des im Biosyntheseweg nachfolgenden Pregnenolons nur geringfügig höher. Sich daraus ableitende Pregnane konnten nicht detektiert werden. Die Inkubation mit Progesteron jedoch führte zu einer eindeutigen Erhöhung der Pregnandione und Pregnanolone, der nachfolgenden Produkte der Cardenolidbiosynthese. Die geringe Rate der Pregnenolonbildung nach der Zugabe von Cholesterol weist darauf hin, daß das Seitenkettenspaltende Enzym keinen freien Zugang zum Cholesterol hat (Lindemann und Luckner, 1997).

Daraus kann man die Hypothese für eine räumliche Trennung in Pflanzenzellen aufstellen. Die Steroidbiosynthese findet im endoplasmatischen Retikulum (ER) statt

(Hartmann und Benveniste, 1987; Moreau et al., 1998) und das Seitenkettenspaltende Enzym befindet sich in den Mitochondrien, dafür haben Pilgrim (1972) und Palazon et al. (1995) Anhaltspunkte gefunden. Auch Lindemann und Luckner (1997) haben in der Mitochondrienfraktion von Proembryogenen Massen (PEM), somatischen Embryonen und Blättern von *D. lanata* die Aktivität des Seitenkettenspaltenden Enzymes gefunden. Die Voraussetzung für eine funktionierende Biosynthese würde der Import von Cholesterol in die Mitochondrien zur weiteren Metabolisierung mit Hilfe des Seitenkettenspaltenden Enzymes sein.

1.2 Die Pregnenolonbiosynthese im Säugetier

Die Bildung von Steroidhormonen in steroidogenem Gewebe von Säugetieren, wie Gonaden, Nebennieren, Placenta und Gehirn, wird auf zellulärer Ebene durch den Import von Cholesterol in die Mitochondrien reguliert (Papadopoulos, 1998).

Die zelluläre Organisation des Steroidbiosyntheseweges ist in Säugerzellen in den Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum (ER) kompartimentiert (Hall, P. F., 1984). In den Mitochondrien wird Cholesterol durch ein Cytochrom P450, dem Seitenkettenspaltenden Enzym (P450_{sc}), zu Pregnenolon, einer Vorstufe der Steroidhormone, umgewandelt. Es wurde gezeigt, daß der Periphere Benzodiazepin-Rezeptor (PBR) in den Mechanismus der Cholesterolaufnahme und des Transports von der äußeren zur inneren mitochondrialen Membran eingebunden ist (Papadopoulos, 1998; Li und Papadopoulos, 1998). Wie das Cholesterol in die Mitochondrienmatrix gelangt, ist noch ungeklärt. Ein Knockout des PBR-Genes oder eine Herabregulierung des PBR führen zu einer Inhibition des Cholesteroltransportes zur inneren mitochondrialen Membran und Hemmung der Steroidbiosynthese (Amri et al., 1996; Papadopoulos et al., 1997).

Die Abbildung 1 soll die Steroidhormonbiosynthese und die Einbindung des PBR in der tierischen Zelle verdeutlichen. Der Signaltransduktionsweg ausgehend von einem Peptidhormonrezeptor an der Zelloberfläche für Hypophysenhormone wie ACTH oder FSH, die Bindung sowie der Transport von Proteinen und der Transport von Cholesterol innerhalb der Zelle bis zur äußeren mitochondrialen Membran sind noch nicht geklärt. Die drei Pfeile ausgehend von der Proteinkinase sollen verschiedene mögliche Wege symbolisieren. Ein Bestandteil dieses Signaltransduktionsweges könnte das PAP7, als Proteinkinase A-Substrat, sein. Das PAP7 reagierte im Two-Hybrid Experiment und in einem GST-Pull-Down mit dem PBR (Li et al., 2001, siehe auch 1.6.).

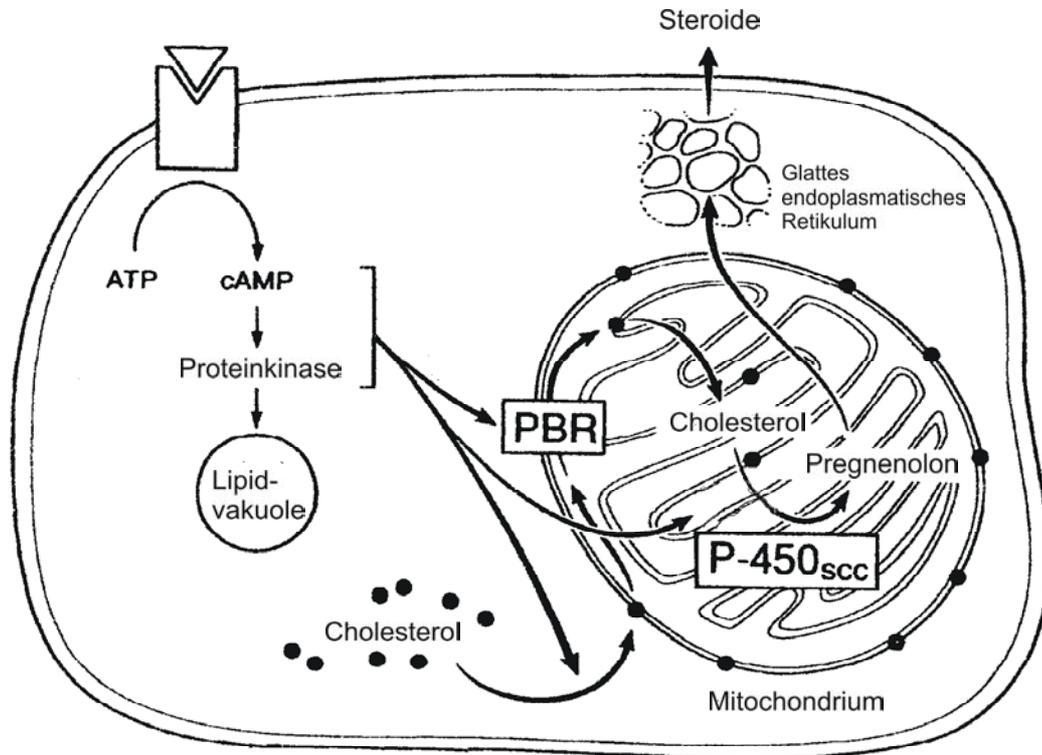


Abbildung 1: Die Steroidbiosynthese in der tierischen Zelle. Der PBR ist in den Mechanismus der Cholesterolaufnahme und des Transports von der äußeren zur inneren mitochondrialen Membran eingebunden (Papadopoulos, 1998; Li und Papadopoulos, 1998). Der Signaltransduktionsweg ausgehend von einem Peptidhormonrezeptor an der Zelloberfläche bis zur äußeren mitochondrialen Membran ist noch nicht vollständig geklärt. Von der Proteinkinase bis zum PBR sind verschiedene Wege möglich.

Die Abbildung wurde aus Papadopoulos und Brown (1995) entnommen und verändert.

1.3 Der Periphere Benzodiazepin-Rezeptor

Die Benzodiazepine sind die wichtigste Gruppe innerhalb der Tranquillantien. Sie weisen eine angst- und spannungslösende, antikonvulsive, muskelrelaxierende und schlafanstoßende Wirkung auf. Ihre Wirkung ist an den intakten Siebenring und die Lactamstruktur gebunden (siehe Abb. 2). Benzodiazepine greifen am GABA-System (Gamma Amino Butyric Acid) an. Es wurden spezifische Bindungsstellen für Benzodiazepine (*Benzodiazepin-Rezeptoren*) im gesamten Zentralnervensystem, in hoher Dichte vor allem in der frontalen und okzipitalen Hirnrinde, im Hippocampus und im Kleinhirn gefunden. An diesen Bindungsstellen wirken die Benzodiazepine als Agonisten. Das GABA-System, genauer als GABA_A-Rezeptor-Chloridkanal-Komplex bezeichnet, ist ein Heteropentamer, das aus zwei α -, zwei β - und einer γ -Untereinheit besteht. Die Benzodiazepinbindungsstelle befindet sich auf einer α -Untereinheit, die GABA-Bindungsstelle liegt auf einer β -Untereinheit. Durch die Interaktion der Benzodiazepine mit ihren Bindungsstellen wird die Affinität von GABA zu ihrer Bindungsstelle und damit auch die GABA-Wirkung erhöht, die Chloridkanäle werden geöffnet, damit strömen vermehrt Chloridionen in die Zelle ein. Durch Hyperpolarisation kommt es somit zu einer verminderten Erregbarkeit der entsprechenden Zellen (Mutschler, 2001).

Aufgrund des Auftretens dieses Rezeptorkomplexes im Zentralnervensystem wurde er als *Zentraler Benzodiazepin-Rezeptor* bezeichnet.

Aus der Substanzklasse der Benzodiazepine ist Diazepam einer der am besten untersuchten Stoffe. Auch die meisten therapeutisch angewandten Substanzen leiten sich vom Diazepam bzw. dessen Metaboliten ab.

1977 wurde eine andere hoch affine Bindungsstelle für Diazepam in der Niere gefunden (Braestrup und Squires, 1977).

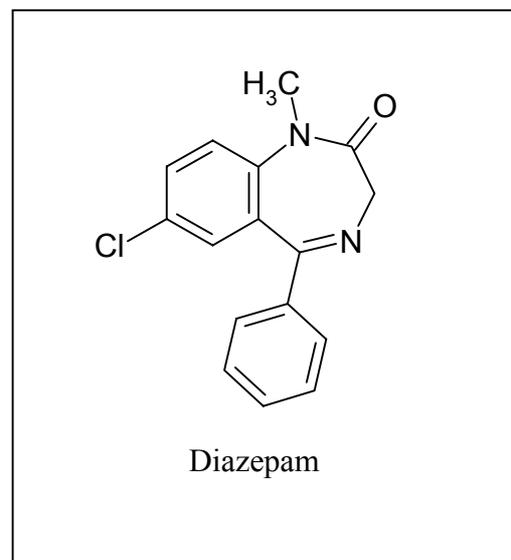


Abbildung 2: Das Benzodiazepin Diazepam.

Daraufhin wurden in fast allen anderen Geweben neben dem Zentralnervensystem Bindungsstellen für Benzodiazepine entdeckt. Diese Bindungsstelle ließ sich auch durch ein anderes Ligandenspektrum von dem *Zentralen Benzodiazepin-Rezeptor* unterscheiden. Das Vorkommen einer zweiten Bindungsstelle für Diazepam und dessen Unterschied zum *Zentralen Benzodiazepin-Rezeptor* führten zu der Bezeichnung *Peripherer Benzodiazepin-Rezeptor* (PBR).

Der PBR wird auch als *Mitochondrialer Benzodiazepin-Rezeptor* (MBR) bezeichnet, da er überwiegend in Mitochondrien gefunden wurde. Weiterhin gibt es eine historische Bezeichnung als *mitochondrialer DBI-Rezeptor*, da das Polypeptid Diazepam-Bindungs-Inhibitor (DBI) als ein endogener Ligand identifiziert wurde (Papadopoulos et al., 1992).

1.4 Charakterisierung des PBR durch Bindungsstudien

Der PBR weist Affinitäten zu mehreren verschiedenen Verbindungen auf. Einige von diesen Substanzen, welche mit hoher Affinität an den PBR binden, binden mit niedriger Affinität an den GABA_A Rezeptor. Das Benzodiazepin Ro5-4864 (4-Chlorodiazepam) bindet an den PBR mit hoher Affinität und zeigt nur wenig Affinität zum GABA_A Rezeptor. 1983 wurde das Isochinolincarboxamid PK 11195 (1-(2-Chlorphenyl)-N-Methyl-(1-Methylpropyl)-3-Isochinolincarboxamid) entwickelt, welches eine hohe Affinität zum PBR und eine sehr niedrige Affinität zum GABA_A Rezeptor hat (Le Fur et al., 1983). Zu den verschiedenen Verbindungen, mit denen der PBR charakterisiert wird, zählt auch das Benzodiazepin Flunitrazepam, das an beide Rezeptoren, den PBR und den

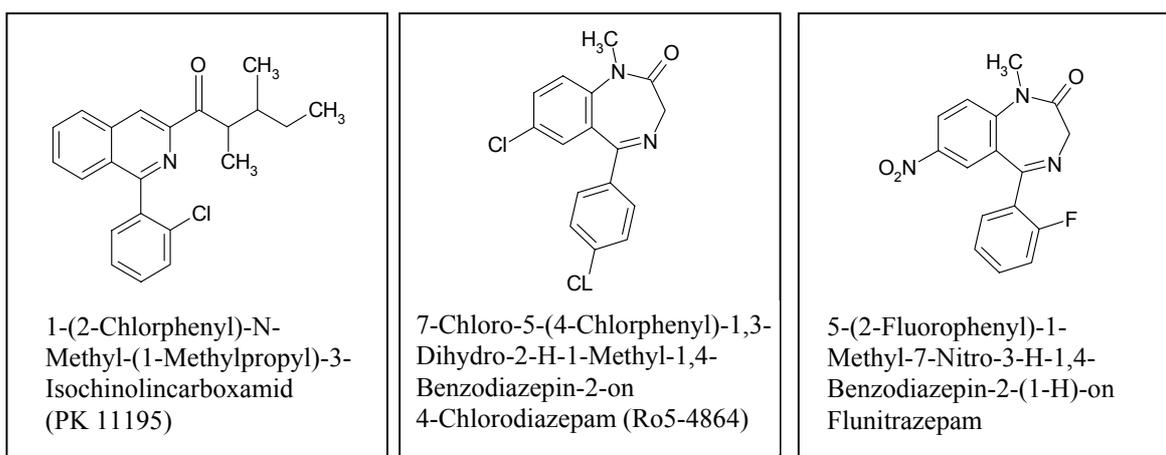


Abbildung 3: Die PBR-Liganden PK 11195, Ro5-4864 und Flunitrazepam.

GABA_A Rezeptor mit nanomolarer Affinität bindet. Andere Verbindungen, wie die Imidazopyridine Alpidem und Zolpidem (Benavides et al., 1983), das Lidocain (Clark et al., 1990) und verschiedene Steroide (Deckert et al., 1996) binden an den PBR mit unterschiedlichen Affinitäten.

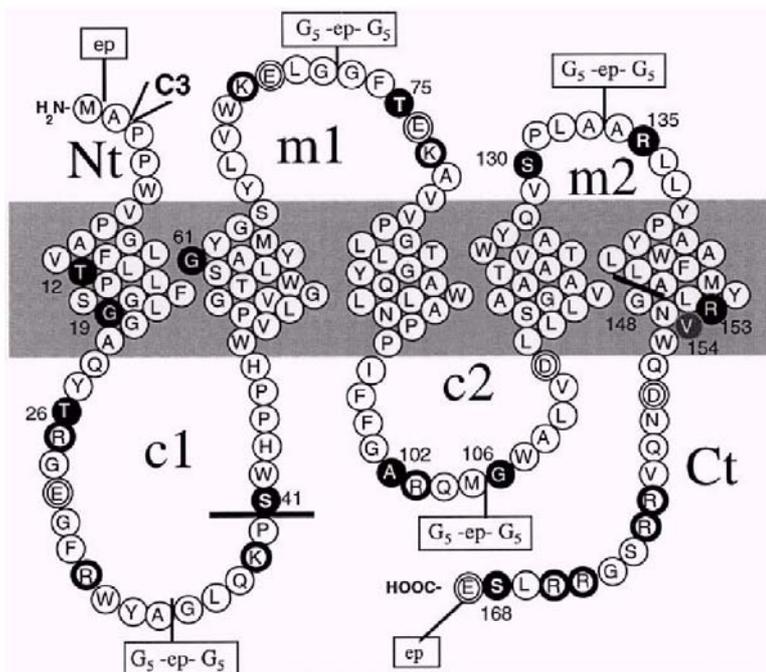


Abbildung 4: Die schematische Struktur des tierischen PBR mit den fünf Transmembrandomänen.

Joseph-Liauzun et al. (1998) haben die Topologie durch Immunodetektion von C-Myc-Markierungen und Punktmutationen einzelner markierter AS untersucht. Die Ergebnisse sind in Form dieses PBR-Modells dargestellt. Der Aminoterminus (Nt) und die beiden Schleifen m1 und m2 befinden sich im

innermitochondrialen Periplasma. Der Carboxyterminus und die Schleifen c1 und c2 liegen im externen Cytoplasma der Zelle und bilden die Benzodiazepin-Bindungsstelle. Die Positionen der C-Myc-Markierung sind mit ep oder einer Bindung mit je fünf mal Glycin (G₅-ep-G₅) bezeichnet. Schwarz unterlegte AS wurden durch Punktmutationen ausgetauscht. Weitere Markierungen wie z. B. Valin 154 werden im Kapitel 4.2. diskutiert. Die schwarzen Linien mit den Zahlen 41 und 148 unterteilen die Sequenz in die Bereiche vom Aminoterminus bis AS 41, AS 42-147 und AS 148-169.

In den letzten Jahren wurden verschiedene endogene Benzodiazepine in Pflanzen, wie Delorazepam und Temazepam identifiziert (Wildmann, 1988; Kavvadias et al., 2000; Sand et al., 2000). Es wurde berichtet, daß sie in Konzentrationen bis zu 450 ng/g Gewebe in Pflanzen, welche zu unterschiedlichen Familien gehören, vorkommen (*Solanum tuberosum*, *Mentha spicata*, *Artemisia dracunculus*, *Catharanthus roseus* und andere). Das weist auf eine weite Verteilung dieser Substanzgruppe hin (Kavvadias et al., 2000). Außerdem wurde berichtet, daß Flavonoide eine selektive Affinität zu Benzodiazepinrezeptoren haben (Medina et al., 1997).

Zusätzlich zu den hochaffin bindenden Benzodiazepinen und dem Isochinolincarboxamid PK 11195 wurden Bindungen von Porphyrinen festgestellt (Snyder et al., 1987; Verma et al., 1987; Verma und Snyder, 1989; Krueger und Papadopoulos, 1992). Es wurde auch über eine Bindung von Protoporphyrin IX mit dem PBR in verschiedenen Zellmodellen berichtet (Verma et al., 1998). Weiterhin wurde gezeigt, daß Protoporphyrin IX in der Lage ist, [³H]PK 11195 vom PBR der Ratten zu verdrängen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß Protoporphyrin IX ein weiterer Ligand des PBR ist.

1.5 Struktur und Funktion des tierischen PBR

Der PBR wird in allen bisher untersuchten Geweben exprimiert, die höchsten Expressionsraten wurden in den Nebennieren, den Hoden, den Eierstöcken und dem Gehirn gefunden (De Souza et al., 1985; Papadopoulos, 1993). Hohe Expressionsraten des PBR traten auch unter verschiedenen neuropathologischen Bedingungen, so zum Beispiel in einem Gliom (Miettinen et al., 1995) oder in der Hirnsubstanz bei Vorliegen der Alzheimer-Krankheit, (McGeer et al., 1988) auf. Durch immunohistochemische Studien wurde von Lacor et al. (1999) die Expression des PBR in peripheren nervalen Stützgeweben, speziell den Schwann-Zellen, gezeigt. Weitere Untersuchungen weisen darauf hin, daß der PBR eine Rolle bei der Bildung von Neurosteroiden im Gehirn spielen könnte. In Karzinomgeweben ist ebenfalls eine verstärkte PBR-Expression anzutreffen (Culty et al., 1999).

Der PBR, ein 18 kDa schweres integrales Membranprotein, ist mit dem 32 kDa schweren Adenosintransportprotein (ADC) und dem 30 kDa schweren spannungsabhängigen Anionenkanal (VDAC) assoziiert, die beide dem mitochondrialem Porinkomplex zugeordnet werden, der eine Rolle im Energiestoffwechsel der Mitochondrien spielt (McEnery et al., 1992). McEnery und Mitarbeiter isolierten den PBR zusammen mit dem VDAC. Daher nahm man ursprünglich an, daß der VDAC für ein Funktionieren des PBR notwendig sei. Li et al. konnten 1998 am rekombinanten PBR der Maus (Expression des 18 kDa Proteins in *E. coli* Protoplasten) zeigen, daß Liganden wie Diazepam, Flunitrazepam, PK 11195 und Ro5-4864 binden. Weiterhin wurde eine spezifische Aufnahme von radioaktiv markiertem Cholesterol gezeigt. Eine Aufnahme von anderen radioaktiv markierten Steroiden fand nicht statt.

Untersuchungen von Lacapere et al. (2001) zeigten, daß das 18 kDa Monomer die minimale Funktionseinheit darstellt. Das rekombinante 18 kDa Protein der Maus wurde exprimiert, gereinigt und in Liposomen (Protein-Lipid-Mizellen) rekonstituiert. Damit wurde eine Aufnahme von Cholesterol und Bindung mit dem PBR-Liganden PK 11195 bestätigt. Auch Joseph-Liauzun et al. (1997) haben demonstriert, daß der VDAC entgegen früherer Annahmen für die Benzodiazepin Bindungsstelle entbehrlich ist. Nur die 18 kDa Untereinheit trägt die Domänen für die Bindung von Benzodiazepinen und von dem Isochinolincarboxamid PK 11195.

Der PBR ist an den Kontaktstellen der äußeren und inneren mitochondrialen Membran lokalisiert (Culty et al., 1999).

Molekulare Studien bestimmten für den PBR im Tier fünf Transmembrandomänen, welche eine kanalähnliche Struktur bilden (vergleiche Abb. 4). Das unterstützt die Annahme, daß der PBR als Transportprotein in der mitochondrialen Membran dient (Bernassau et al., 1993; Culty et al., 1999; Joseph-Liauzun et al., 1998). Er funktioniert als Kanal oder Tor für Cholesterol und wahrscheinlich für andere Substanzen. Cholesterol kommt von intrazellularen Speicherorganellen und bindet spezifisch an den zytosolischen Carboxyterminus des PBR (Li et al., 2001). Der Cholesteroltransport von der äußeren zur inneren mitochondrialen Membran kann stimuliert werden durch nanomolare Konzentrationen von hoch affinen PBR Liganden wie dem Benzodiazepin Ro5-4864 und dem Isochinolincarboxamid PK 11195 (Krueger und Papadopoulos, 1990; Li und Papadopoulos, 1998).

1.6 Porphyrine und die Tetrapyrrolbiosynthese

Porphyryne sind Tetrapyrrole, die in allen Zellen vorkommen. Sie bilden die prostethischen Gruppen von verschiedenen Proteinen, wie Hämen, Cytochromen oder Phytochromen. Ihre Fähigkeit zum Elektronentransfer macht sie unerlässlich für die energetischen Prozesse in den Zellen und bedingt somit ihre Verbreitung in allen Organismen.

Porphyryne sind unentbehrliche Vorstufen auf dem Weg der Hämbiosynthese. Daher wurde versucht, ihre endogene Produktion durch exogene Bereitstellung des Vorläufers δ -Aminolävulinsäure zu steigern (Pottier et al., 1986). δ -Aminolävulinsäure entsteht bei Pflanzen und vielen Bakterien auf dem sogenannten C₅-Weg aus Glutamat, im tierischen Organismus jedoch auf dem Shemin-Weg aus Glycin und Succinyl-CoA.

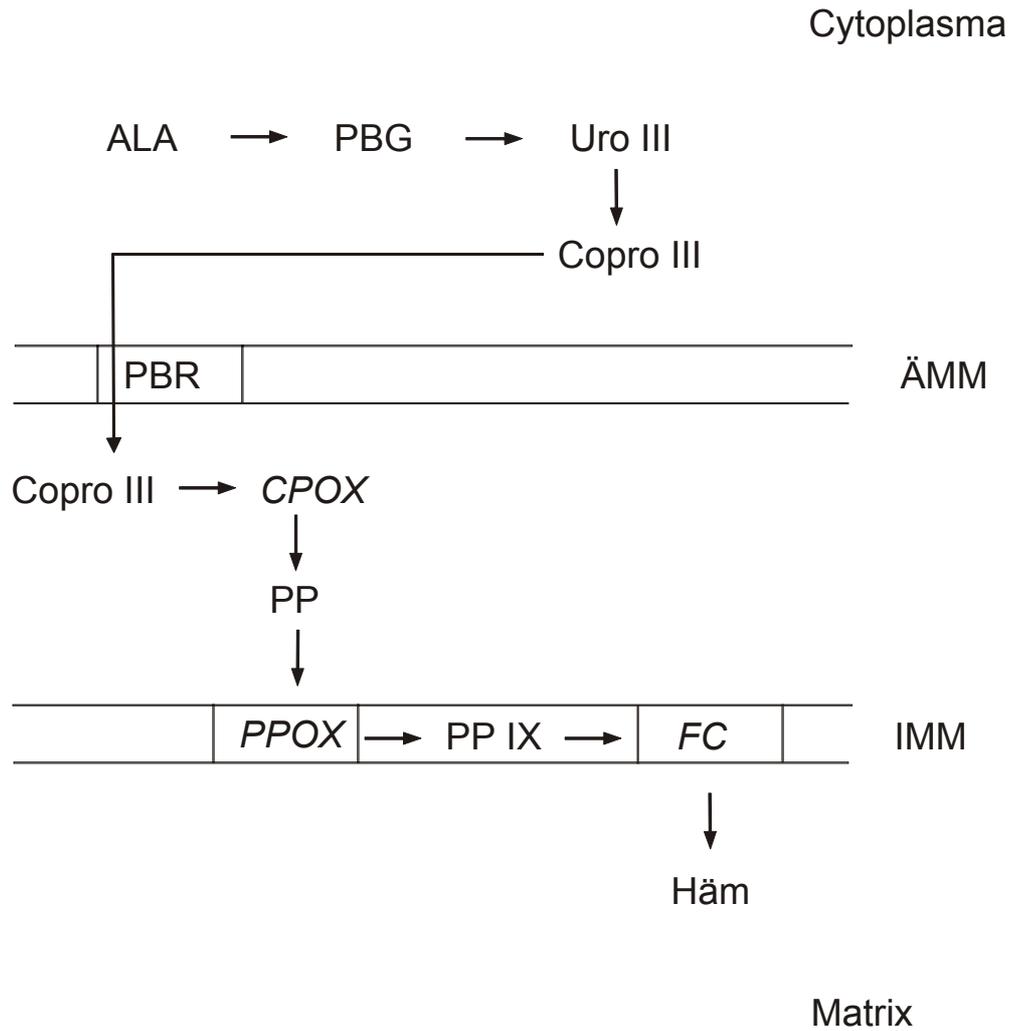


Abbildung 5: Die Einbindung des PBR in die Hämbiosynthese. ÄMM und IMM bedeuten äußere bzw. innere Mitochondrienmembran. Weiterhin wurden folgende Abkürzungen verwendet: ALA für δ -Aminolävulinsäure, PBG für Porphobilinogen, URO III für Uroporphyrinogen, Copro III für Coproporphyrinogen, CPOX für Coproporphyrinogen-Oxidase, PP für Protoporphyrinogen, PPOX für Protoporphyrinogen-Oxidase, PP IX für Protoporphyrin IX und FC für Ferrochelatase. Die Abbildung wurde in Anlehnung an Wendler (2002) gestaltet.

Es wurde vermutet, daß der PBR in den Tetrapyrrol-Metabolismus der Säugetiere eingebunden ist (Taketani et al., 1994). Das Tryptophan-reiche Sensorische Protein (TspO), auch als CrtK-Protein bezeichnet, in *Rhodobacter sphaeroides* wurde als ein bakterielles Homologon des PBR beschrieben (Yeliseev und Kaplan, 1995). Hier konnte gezeigt werden, daß das TspO Protein in den Transport von Porphyrin-Zwischenstufen eingebunden ist (Yeliseev und Kaplan, 1999; Yeliseev und Kaplan, 2000).

Wie in Abbildung 5 gezeigt, findet die Hämbiosynthese teilweise außerhalb und innerhalb der Mitochondrien statt. Sie beginnt mit der Kondensation von zwei Molekülen δ -Aminolävulinsäure (ALA) zu Porphobilinogen (PBG), gefolgt von der Kondensation von vier Molekülen Porphobilinogen zu Uroporphyrinogen III (Uro III). Uroporphyrinogen III wird decarboxyliert zu Coproporphyrinogen III (Copro III), welches durch die äußere Mitochondrienmembran transportiert wird. Taketani et al. (1994) vermuteten, daß der PBR in den Transport von Coproporphyrinogen III durch die Mitochondrienmembran beteiligt ist. Zwischen der äußeren und inneren mitochondrialen Membran wird Coproporphyrinogen III zu Protoporphyrinogen (PP) und später zu Protoporphyrin IX (PP IX) oxidiert. Nach der Oxidation zu Protoporphyrin IX an der inneren Mitochondrienmembran vollendet die Ferrochelatase (FC) die Biosynthese, indem aus Eisen und Protoporphyrin IX das Häm gebildet wird. Ähnlich zu der Einbindung des PBR in die Steroidbiosynthese und der Fähigkeit, Coproporphyrin III durch die Mitochondrienmembran zu transportieren, wurde eine Funktion des PBR beim Transport von Protoporphyrin IX während der Hämbiosynthese vorgeschlagen (Mesenhöller et al., 2000).

Lermontova und Grimm (2000) führten Untersuchungen zur Überexpression der plastidären Protoporphyrinogen IX-Oxidase aus *A. thaliana* in *Nicotiana tabacum* durch. Die Protoporphyrinogen-Oxidase (PPOX) ist ein Enzym im gemeinsamen Tetrapyrrolbiosyntheseweg, bevor der Syntheseweg sich in die Chlorophyllbiosynthese und Hämbiosynthese aufteilt. Die PPOX katalysiert die sauerstoffabhängige Oxidation des nicht fluoreszierenden Protoporphyrinogen IX zum fluoreszierenden Protoporphyrin IX. Parallel zum plastidären Tetrapyrrolbiosyntheseweg wurden in den Mitochondrien die Aktivitäten der letzten beiden Enzyme des Hämbiosyntheseweges, der PPOX und der Ferrochelatase gefunden (Jacobs et al., 1991; Smith et al., 1993). So wird Protoporphyrinogen IX an die plastidäre Chlorophyllbiosynthese und die mitochondriale Hämbiosynthese verteilt. Der Kontrollmechanismus der interkompartimentären Verteilung ist noch nicht bekannt.

Lermontova et al. (1997) identifizierten zwei verschiedene cDNA-Sequenzen für die PPOX in *Nicotiana tabacum*. Die abgeleiteten Proteinsequenzen wurden als PPOX I und PPOX II bezeichnet, haben unterschiedliche molaren Massen von 60 und 55 kDa und weisen nur 30 % Ähnlichkeit auf. Es konnte gezeigt werden, daß die Proteine in die Plastiden (PPOX I) oder in die Mitochondrien (PPOX II) importiert werden. Mittels des

Hefe Two-Hybrid-Systems wurde eine Interaktion der PPOX II und des PBR-homologen Proteins aus *A. thaliana* gezeigt (mündliche Mitteilung B. Grimm). Protoporphyrinogen IX als Vorläufer, der entweder in die Plastiden oder in die Mitochondrien importiert wird, ist nicht stabil und konnte nicht für weitere Untersuchungen eingesetzt werden, es wurde Protoporphyrin IX genutzt.

1.7 Mögliche Wege der Regulation des PBR

Li et al. (2001) beschreiben den PBR im Tier als unentbehrliches Element der Cholesterol-Transport-Vorgänge. Peptidhormone und cAMP stimulieren die Steroidbiosynthese durch Beschleunigung des Cholesteroltransports in die Mitochondrien. Unter Nutzung des Hefe Two-Hybrid-Systems und des PBR als „Bait“ (Köder) identifizierten sie ein Protein, welches mit dem PBR interagiert, das PBR-assoziierte Protein PAP7. Die regulatorische Untereinheit RI α der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) als „Bait“ nutzend, wurde ebenfalls PAP7 isoliert. Das GST-PAP7 Protein interagiert sowohl mit dem mitochondrialen PBR als auch mit der cytosolischen PKA-RI α in MA-10Leydig-Zellen. Dieses Ergebnis bestätigt die im Two-Hybrid-Screen gefundenen Interaktionen und weist damit auf einen möglichen Signal-Transduktions-Mechanismus unter Beteiligung von PKA, PAP7 und PBR hin.

Peptidhormone reagieren mit ihren Zielgeweben durch Binden an einen G-Protein gekoppelten Zelloberflächenrezeptor. Daraus resultiert eine erhöhte Adenylat-Cyclase Aktivität, die den cAMP-Spiegel erhöht und damit eine cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) aktiviert. Die PKA-RI α -Untereinheit reagiert mit dem PAP7, dieses wiederum mit dem PBR in der äußeren mitochondrialen Membran (Krueger und Papadopoulos, 1990; Li et al., 2001).

Vorstellungen über einen ähnlichen Signaltransduktionsweg in Pflanzen sind zur Zeit nicht bekannt.

1.8 Zielstellung der Arbeit

Untersuchungen an der Pflanze *Digitalis lanata* über eine Cholesterolumsetzung in den Mitochondrien (Lindemann und Luckner, 1997), das Feststellen einer Bindung des Benzodiazepines Flunitrazepam an ein 18 kDa Protein in den Mitochondrien durch Photoaffinitätsmarkierungen (Lindemann et al., 2000) sowie Berichte über endogene Benzodiazepine in Pflanzen (Kavvadias et al., 2000; Sand et al., 2000) gaben Anregungen, nach dem Vorkommen, der Struktur, der Funktion und der Regulierung eines PBR-homologen Proteins in Pflanzen zu suchen.

Das Ziel dieser Arbeit sollte die Aufklärung einer eventuellen Beteiligung des pflanzlichen PBR-homologen Proteins am Import von Steroiden und Tetrapyrrolen in die Mitochondrien von Pflanzen sein. Diese Untersuchungen sollten anhand der Modellsubstanzen Cholesterol und Protoporphyrin IX durchgeführt werden.

Es sollte untersucht werden, welche Liganden an ein pflanzliches PBR-homologes Protein binden und wie sie die Funktion der Aufnahme von Cholesterol als auch Protoporphyrin IX beeinflussen.

Von großem Interesse ist auch die Frage, ob das pflanzliche PBR-homologe Protein an regulatorischen Prozessen beteiligt ist. Daher sollte nach Proteinliganden gesucht werden, welche die möglichen Bestandteile einer Signaltransduktionskette darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Pflanzenmaterial

Blattmaterial:

Einjährige Blätter von *Digitalis lanata* EHRH. var. Dresdner wurden von Pflanzen aus der Gärtnerei des Institutes für Pharmazeutische Biologie in Halle geerntet.

Zellkulturen:

Es wurden Proembryogene Massen (PEM) des Stammes VIII von *Digitalis lanata* EHRH. verwendet (Reinbothe et al., 1990; Thomar et al., 1998). Der Stamm VIII wurde aus späten Embryonalstadien angelegt, die durch somatische Embryogenese aus einer Suspensionskultur des embryogenen Stammes VII (Tewes et al., 1982) gewonnen wurden.

Kultivierung der Suspensionszellen von *D. lanata*:

Die undifferenzierten, somatischen Zellen wurden in modifizierten Nährmedien nach Murashige und Skoog (1962) kultiviert. Die Zusammensetzung der Nährmedien ist bei Thomar (1994) beschrieben. Die Nährmedien wurden mit KOH (1 mol/l) bzw. HCl (1 mol/l) vor dem Autoklavieren auf den pH-Wert 6.0 eingestellt. Die Suspensionszellkultur des Stammes VIII wurde in 500 ml Standkolben in 125 ml Nährmedium I (Nm I) im Dämmerlicht (0.5 W/m²) auf Rundschüttlern (KS 501 D, IKA, 130 U/min 23 °C) kultiviert. Die Passage der Kulturen erfolgte wöchentlich durch Übertragung von 25 ml Zellsuspension in 125 ml frisches Nm I. Die Zellen wurden geerntet, indem das Nährmedium über einen Filter abgesaugt und die Zellen mit flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Bis zur Weiterverwendung erfolgte die Lagerung der Zellen bei -20 °C.

Weiterhin wurde mit Zellkulturen von *A. thaliana* "Wildtyp Columbia" gearbeitet, die unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden. Die Zellkulturen wurden von N. Nass, Institut für Pflanzenbiochemie in Halle zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Bakterienstämme

Alle *E. coli* Stämme wurden bei 37 °C je nach Verwendung als Flüssig-Schüttel-Kultur oder auf Festmedium kultiviert. Der BL21 Stamm wurde zur Expression von GST-Fusionsproteinen verwendet. Dieser Stamm ist Proteasen-defizient und ermöglicht somit eine gute Ausbeute wirtsfremder Proteine.

BL21	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻), <i>gal</i> (52,53) (Amersham Pharmacia Biotech)
DH5α	<i>supE44</i> , U169 λ ⁻ (Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> (Stratagene)
XL1-Blue MRF'	(<i>mcrA</i>)183, (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F', <i>proAB</i> , <i>lacIqZ</i> (M15, Tn10, (Tetr))] (Stratagene)
One Shot TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> D (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) F80 <i>lacZ</i> ΔM15 D <i>lacX74recA1</i> <i>deoR araD139 D(araleu)7697 galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> (Invitrogen)
SG13009[pREP4]	(Nal ^S , Str ^S , Rif ^S , Lac ⁻ , Ara ⁻ , Gal ⁻ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecQA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺) (Qiagen)
KC8	<i>hsdR</i> , <i>leuB600</i> , <i>trpC9830</i> , <i>pyrF</i> ;Tn5, <i>hisB463</i> , <i>lacDX74</i> , <i>strA</i> , <i>galU</i> , K(3) (Clontech)

2.1.3 Hefestämme

Die Hefen wurden bei 30 °C ebenfalls je nach Verwendung als Flüssig-Schüttel-Kultur oder auf Festmedium kultiviert. Es wurde der von Clontech bezogene Stamm Y190 benutzt.

Y190 *MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3,112, gal4Δ, gal80Δ, cyh^r2*

2.1.4 Vektoren

PCR 2.1 TOPO T/A	Amp ^r (Invitrogen)
PQE 30 Expressionsvektor	Amp ^r , (Qiagen)
PQE 60 Expressionsvektor	Amp ^r , (Qiagen)
pGEX-5X-1 Expressionsvektor	Amp ^r , (apb)
pGEX-4T-1 Expressionsvektor	Amp ^r , (apb)
pGAD10 Gal4 Aktivierungsdomäne (AD) Vektor	Amp ^r , Leu2 (Clontech)
pGAD424 Gal4 Aktivierungsdomäne (AD) Vektor	Amp ^r , Leu2 (Clontech)
pGBT9 Gal4 DNA-Bindungsdomäne (BD) Vektor	Amp ^r , TRP1 (Clontech)
pAS2-1 Gal4 DNA-Bindungsdomäne (BD) Vektor	Amp ^r , TRP1 (Clontech)

2.1.5 cDNA-Banken

◦ eine von Dr. A. Peterson (Biozentrum Halle/S., Scholze et al. 1999) hergestellte cDNA-Bank der embryogenen Suspensionszellkultur des Stammes VIII von *Digitalis lanata* EHRH.

◦ *Arabidopsis thaliana* MATCHMAKER cDNA Library

 Klonierungsvektor: pGAD10, Klonierungsenzym: *EcoR* I

 mRNA Quelle: 3 Wochen altes vegetatives Gewebe

 Anzahl unabhängiger Klone: $3,0 \times 10^6$

 durchschnittliche Größe der Inserts: 1,2 kb, Insertgröße von-bis: 0,6-4,0 kb

◦ CD4-22 *Arabidopsis* λACT cDNA expression library for yeast two hybrid screening,

J. Kim and A. Theologis

 Klonierungsvektor: lambda-ACT, Klonierungsenzym: *Xho* I

 mRNA Quelle: 3 Tage alte etiolierte Keimlinge

 Anzahl unabhängiger Klone: $3,6 \times 10^6$

 durchschnittliche Größe der Inserts: 1 kb, Insertgröße von-bis: 0,6-2,5 kb

2.1.6 Oligonukleotide

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firmen Pharmacia und MWG Biotech.

Name	Sequenz	Enzym
AbA1/99	5' AAC ATG <u>CCA TGG</u> ATT CTC AGG ACA TCA GA 3'	<i>Nco</i> I
AbA2/99	5' TCT GGA <u>AGA TCT</u> TCA CGC GAC TGC AAG CTT TAC 3'	<i>Bgl</i> II
PBR1	5' CGG <u>GGT ACC</u> ATG GAT TCT CAG GAC ATC AGA 3'	<i>Kpn</i> I
PBR2	5' AAA <u>CTG CAG</u> TCA CGC GAC TGC AAG CTT 3'	<i>Pst</i> I
PBR3	5' CGG <u>GGT ACC</u> ATG GCG AAA CGT GGT CTC AAG 3'	<i>Kpn</i> I
PH1	5' TAC CCA RAM MGA CGM ACC GAA CAW ACC 3'	
PH2	5' ACC WAR GGY GSA GAY ACC 3'	
PR	5' AGC CCA WGC MAA ACA MGG 3'	
Del1H	5' ACG TGT CTC GCT TCT AGT GGT CTG ATG 3' 5'phosphoryliert	
Del1R	5' CGA GGA CTT AGC TCG ATT CCC GTA TCC 3' 5'phosphoryliert	
Del2H	5' GCG AAA CGT GGT CTC AAG TCT CTG ACG 3' 5'phosphoryliert	
Del2R	5' GCG GAT CCC ATG GTG ATG GTG ATG GTG 3' 5'phosphoryliert	
Del3H	5' TGA GTC GAC CTG CAG CCA AGC 3' 5'phosphoryliert	
Del3R	5' ACA CGG CTT TAC CAG ATT ACC 3' 5'phosphoryliert	
D3kH	5' CAT <u>GCA TGC</u> ATG GAT TCT CAG GAC ATC 3'	<i>Sph</i> I
D3kR	5' GCG <u>AAG CTT</u> TCA ACA CGG CTT TAC CAG ATT 3'	<i>Hind</i> III
FT2H	5' <u>GCC ATG</u> GAT TCT CAG GAC ATC AGA 3'	<i>Nco</i> I
FT2R	5' <u>CTG CAG</u> TCA CGC GAC TGC AAG CTT TAC 3'	<i>Pst</i> I
FT9H	5' <u>GAA TTC</u> ATG GAT TCT CAG GAC ATC AGA 3'	<i>Eco</i> RI
Pap2H	5' <u>CCA TGG</u> ATG TTA GGG AAT ACC ATT 3'	<i>Nco</i> I
Pap2R	5' <u>CTG CAG</u> TCA ATG GAG GTT TTC TTA GAG 3'	<i>Pst</i> I
Pap9H	5' <u>GAA TCC</u> ATG TTA GGG AAT ACC ATT 3'	<i>Eco</i> RI
PIh	5' CGG <u>GAT CCA</u> TGA AGA AGA AGA TGA TTC 3'	<i>Bam</i> HI
PIah	5' CGG <u>GAT CCG</u> CAG CTA AAG ATT GG 3'	<i>Bam</i> HI
PIr	5' GCG <u>GAA TTC</u> CTA AAT AAG CTT CTT CTT TTC 3'	<i>Eco</i> RI
PIIh	5' CGG <u>GAT CCA</u> TGA CGG GGA AGC GAT 3'	<i>Bam</i> HI
PIIr	5' CGG <u>AAT TCT</u> CAG GGG ATA TAA TAG TCG CTT AG 3'	<i>Eco</i> RI
PIIIh	5' CGG <u>GAT CCA</u> TGG CTT CCT TAT CCT TC 3'	<i>Bam</i> HI
PIIIr	5' CGG <u>AAT TCT</u> CAC TTG GTC ATA ACT TCA ACC 3'	<i>Eco</i> RI
RTPIh	5' CGG <u>AAT TCA</u> TGA AGA AGA AGA TGA TTC 3'	<i>Eco</i> RI
RTPIah	5' CGG <u>AAT TCG</u> CAG CTA AAG ATT GG 3'	<i>Eco</i> RI
RTPIr	5' CGG <u>GAT CCC</u> TAA ATA AGC TTC TTC TTT TC 3'	<i>Bam</i> HI
RTPIIh	5' CGG <u>AAT TCA</u> TGA CGG GGA AGC GAT C 3'	<i>Eco</i> RI
RTPIIr	5' CGG <u>GAT CCT</u> CAG GGG ATA TAA TAG TCG CTT AG 3'	<i>Bam</i> HI
RTPIIIh	5' CGG <u>AAT TCA</u> TGG CTT CCT TAT CCT TC 3'	<i>Eco</i> RI
RTPIIIr	5' CGG <u>GAT CCT</u> CAC TTG GTC ATA ACT TCA ACC 3'	<i>Bam</i> HI
Ir	5' ACG <u>TCG ACC</u> TAA ATA AGC TTC TTC TTT TC 3'	<i>Sal</i> I
IIr	5' CGC <u>GTC GAC</u> TCA GGG GAT ATA ATA GTC GC 3'	<i>Sal</i> I
IIIr	5' ACG <u>TCG ACT</u> CAC TTG GTC ATA ACT TCA ACC 3'	<i>Sal</i> I
PIh	5' GGG <u>AAT TCA</u> TGA AGA AGA AGA TGA TTC 3'	<i>Eco</i> RI
PIah	5' GGG <u>AAT TCG</u> CAG CTA AAG ATT GGG AC 3'	<i>Eco</i> RI
PIr	5' GCG <u>GCC GCC</u> TAA ATA AGC TTC TTC TTT TC 3'	<i>Not</i> I
P2h	5' <u>GGG AAT TCA</u> TGA CGG GGA AGC GAT CAA AG 3'	<i>Eco</i> RI
P2r	5' <u>GCG GCC GCT</u> CAG GGG ATA TAA TAG TCG C 3'	<i>Not</i> I

Material und Methoden

P3h	5' CGG <u>GAA TTC</u> ATG GCT TCC TTA TCC TTC G 3'	<i>Eco RI</i>
P3r	5' <u>GCG GCC GCT</u> CAC TTG GTC ATA ACT TC 3'	<i>Not I</i>

Tab. 1: PCR Primer. Folgende Codes wurden verwendet: M: A+C, R: A+G, S: C+G, W: A+T Y: C+T

Name	Sequenz
pGAD10	5' TTC GAT GAT GAA GAT ACC CCA CC 3'
pGAD10 rev	5' GCG GGG TTT TTC AGT ATC TAC G 3'
5pGEX	5' GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG 3'
3pGEX	5' CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG 3'
30-8ALF	5' ATC GCT TCC CCG TCA TAA G 3'
30-8ALF2	5' CTA TTG ACG GAG CAG ACG AG 3'
30-8-7r	5' GAC GGG GAA GCG ATC AAA GAC 3'
30-8-0	5' GTA ATA ATT CAA AAC CAC TGT CAC C 3'
30-8-1	5' TGC ATC AAA ATA TAT AAA CCG G 3'
30-8-2	5' TTG TTG TTG GTG GTG TTA GTG G 3'
30-8-3	5' TAG TGT CTC ACT CTC CAG AAC C 3'
30-8-4	5' TGT ATA GGA CCC TCT ACT ACA CC 3'
30-8-5	5' TCA CAG AGC TGC AGC AGC CG 3'
30-8-6	5' TTA GTC TTT GAT CGC TTC CCC G 3'

Tab. 2: Primer für die Sequenzierung. Für die A.L.F. Sequenzierung waren diese Cy5-Fluoreszenz markiert.

2.1.7 Medien, Puffer, Standardlösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer, Medien und Lösungen entsprechen den Vorschriften nach Sambrook et al. (1989). Abweichungen sind gesondert aufgeführt.

Bakterienstämme wurden in LB Medium oder SB Medium (3,5% Trypton; 1,5% Hefeextrakt; 0,5% NaCl) angezogen. Alle Arbeiten mit dem GST-Gen-Fusions-System wurden nach den Vorschriften des Herstellers Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) ausgeführt, dort sind alle verwendeten Puffer und Medien aufgeführt.

Alle Vorschriften für die zur Arbeit mit Hefen notwendigen Medien, Puffer und Lösungen sind dem MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid User Manuals (Clontech) entnommen.

Für alle proteinchemischen Arbeiten wurde membranfiltriertes, deionisiertes und pyrogenfreies Wasser verwendet, für die molekularbiologischen Arbeiten wurde dieses zusätzlich sterilisiert.

2.1.8 Kits und Enzyme

ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Kit

Perkin Elmer

ALFexpress AutoRead Sequencing Kit

Amersham Pharmacia Biotech

Low Weight Electrophoresis Calibrations Kit	Amersham Pharmacia Biotech
Lysozym	Boehringer Mannheim
<i>Pfu</i> Turbo™ DNA Polymerase	Stratagene
Plasmid Midi Kit	Qiagen
Plasmid Mini Kit	Qiagen
Protein Assay Kit No. P 5656	Sigma
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen
Restriktionsendonucleasen	NEB, Boehringer Mannheim
RNase A	Boehringer Mannheim
T4 Ligase	Peqlab
Taq-Polymerase (5 U/μl)	Peqlab
TOPO-TA-Cloning Kit	Invitrogen

2.1.9 Chemikalien und Standards

Falls nicht anders angegeben, entsprachen alle verwendeten Chemikalien dem analytischen Reinheitsgrad und wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), AppliChem (Darmstadt), Difco (Augsburg) oder Serva (Heidelberg) bezogen.

1 kb DNA-Leiter	NEB
100 bp DNA-Leiter	NEB
2-Log DNA-Leiter	NEB
Ampicillin	Boehringer Mannheim
Kanamycin	Boehringer Mannheim

2.2 Zellbiologische und Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Zellfraktionierung zur Isolierung von Mitochondrien

Fraktionierungsmethode:

Alle Arbeitsschritte wurden bei einer Temperatur von 4 °C ausgeführt.

1 cm² große Blattstückchen wurden im Standkolben in Flüssigmedium kultiviert. Die Blattstückchen wurden mit Hilfe eines Siebes vom flüssigen Nährmedium abgetrennt und mit destilliertem Wasser gespült. Sie wurden mit der 2- bis 4fachen Menge Extraktionspuffer (0,4 M Saccharose, 50 mM Tris-HCL pH 7,5, 3 mM EDTA, 0,2 mM β -Mercaptoethanol) und 1% unlöslichem PVP versetzt. Anschließend wurden sie mit dem Ultra-Turrax 2 min bei 9500 U/min bearbeitet (längere Zeiten hätten einen besseren Zellaufschluß, aber auch eine stärkere Beschädigung der Zellorganellen zur Folge). Das heller grün und cremig werdende Homogenisat wurde durch Miracloth gefiltert. Der Extrakt wurde 10 min bei 1000 x g zentrifugiert (SORVALL RC-5B automatic superspeed refrigerated centrifuge).

Das Präzipitat bestehend aus Zellkernen und anderen Zelltrümmern wurde verworfen. Aus dem Überstand wurden die Chloroplasten 5 min bei 3000 x g abzentrifugiert. Das Chloroplastenpräzipitat wurde in 2 ml Extraktionspuffer aufgenommen.

Der Überstand wurde 20 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der hierbei verbleibende Überstand wurde für die spätere Ultrazentrifugation aufbewahrt. Das Mitochondrienpräzipitat wurde in 8 ml Puffer aufgenommen und zur Reinigung von groben Bestandteilen noch einmal bei 1000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder bei 10000 x g zentrifugiert.

Die nach der Differentialzentrifugation erhaltene Mitochondrienfraktion ist noch verunreinigt durch verschiedene Membranvesikel, beschädigte Mitochondrien, Plastidenbruchstücke, Peroxisomen, lösliche hydrolytische Enzyme, Bakterien (Douce et al., 1987). Die Mitochondrien müssen durch isopyknische Zentrifugation (abhängig von der Schwebedichte) im Saccharose- oder Percoll-Gradienten gereinigt werden. Percoll hat den Vorteil gegenüber Saccharose, daß es osmotisch nicht wirksam ist. Aus diesem Grund wurde ein Percoll-Gradient folgender Schichtung angewandt:

- 1) 45%ige Percoll-Lösung
- 2) 21%ige Percoll-Lösung
- 3) 13%ige Percoll-Lösung

Die Percoll-Lösungen setzten sich jeweils aus 100% Percoll, 2fach konzentriertem Extraktionspuffer und destilliertem Wasser zusammen.

Um die Hydrophobizität der 13- und 21%- Schicht zu erhöhen wurden 100 mM Propan-1,2-diol zugesetzt (Gualberto et al.,1995).

Die gewaschene Mitochondrienfraktion wurde in 1 ml Puffer aufgenommen und vorsichtig auf den Percoll-Gradienten gegeben. Der Gradient wurde 30 min bei 13000 x g in der Ultrazentrifuge (SORVALL COMBI PLUS ultraspeed centrifuge) zentrifugiert. Dabei bildet sich zwischen der 13%- und 21%-Schicht ein breiter dunkelgrüner Ring, der Thylakoidmembranen enthält. Eine schmale Bande (bräunlich-dunkelgrün) befindet sich an der Grenzschicht zwischen der 21%- und 45%-Phase. Diese Bande enthält die Mitochondrien und wurde mit einer Pipette abgenommen, mit dem 10fachen Volumen Puffer versetzt und wiederum bei 10000 x g zentrifugiert. Das lockere Mitochondrienpräzipitat wurde in Puffer resuspendiert und bei 10000 x g zentrifugiert, um noch eventuell enthaltenes Percoll abzutrennen. Das erhaltene Mitochondrienpräzipitat wurde in 1 ml Puffer aufgenommen.

Der nach der ersten 10000 x g Zentrifugation erhaltene Überstand wurde 120 min bei 100000 x g ultrazentrifugiert. Das Präzipitat stellt die Mikrosomenfraktion dar, die in 2 ml Puffer aufgenommen wurde.

Die 3 erhaltenen Fraktionen: Chloroplasten, Mitochondrien, Mikrosomen, jeweils in einem kleinen Volumen Puffer suspendiert, wurden nun mit der jeweils doppelten Menge Chloroform zweimalig extrahiert. Die vereinigten Chloroformphasen wurden nach Zugabe des internen Standards: 50 µg Etiocholan bei 60°C im DRI- BLOCK abgedampft. Nach dem Abdampfen wurde der Rückstand in 200 µl Methanol (GC) aufgenommen. Nach 5 min Ultraschallbad und 10 min Zentrifugation wurde die Lösung in ein GC-Probengläschen gegeben. Die Vermessung der Extrakte erfolgte mit GC-MS.

Beurteilung der Reinheit der präparativen Fraktionen:

Ein bedeutsames Kriterium zur Beurteilung der Reinheit der erhaltenen Fraktionen ist die Aktivitätsbestimmung von ausgewählten Enzymen (Leit- oder Markerenzyme).

Es wurde die Aktivität des für die jeweilige Fraktion ausgewählten Leitenzyms (Quail,1979)

in allen drei Fraktionen bestimmt. Als Leitenzyme wurden untersucht:

- die Succinat-Dehydrogenase für die Mitochondrien,
- die NADPH-abhängige Cytochrom c Reduktase für das ER in der Mikrosomenfraktion und
- eine Bestimmung des Pheophytins für die Chloroplasten.

Ein Test auf Integrität der Mitochondrien wurde einmalig positiv durchgeführt (Modern Methods of Plant Analysis Vol.1, 1984, Test for Integrity of Mitochondria), aber dann für zu aufwendig für die Charakterisierung der Fraktionierungsmethode befunden und somit nicht wiederholt untersucht.

Es konnte eine gute Trennung und Reinheit der Fraktionen besonders der Mitochondrien festgestellt werden, da die entsprechenden Markerenzyme nur in ihrer jeweiligen Fraktion eindeutig meßbar waren (Abb.6).

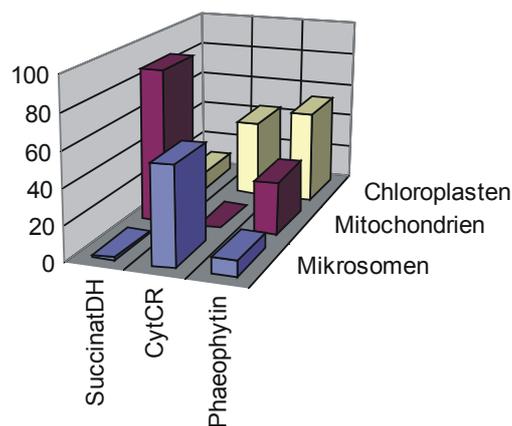


Abbildung 6: Prozentuale Enzymaktivitäten für die drei Fraktionen:

Die Werte wurden 2-malig durch 3-fach Bestimmung ermittelt. Es wurde die Absorption pro mg Protein pro ml Fraktion in einer vorgegebenen Zeiteinheit gemessen. Anschließend wurde die Enzymaktivität in $M \times s^{-1} \times mg^{-1}$ bestimmt. Im Diagramm erfolgte die prozentuale Angabe pro Fraktion. Die Standardabweichung beträgt 10-20% von den Mittelwerten.

2.2.2 Fütterungsversuche mit Blättern von *D. lanata*

In Vorversuchen wurde ermittelt, wie lange Cholesterol angeboten werden muß, um eine Sättigung bzw. einen maximalen Cholesterolgehalt in den Mitochondrien, den Chloroplasten und den Mikrosomen zu erreichen. Mit Hilfe von Zellkulturen wurde beobachtet, daß bereits am zweiten Tag keine weitere Steigerung des Cholesterolgehaltes stattfand. Somit wurde die Fütterungsdauer von einem Tag festgelegt.

Die 1 cm² Blattstückchen wurden mit Nährmedium I/4(OH) infiltriert, das 1 µM Flunitrazepam, Ro5-4864 oder PK 11195 enthielt. Nach eintägiger Inkubation mit dem Liganden erfolgte die Zugabe von 50 µM Cholesterol und erneute Zugabe von 1 µM Ligand. Am dritten Tag wurden die Blattstückchen aufgearbeitet und der Cholesterolgehalt der einzelnen Zellfraktionen mittels GC-MS bestimmt.

Aufgrund zu hoher Schwankungen zwischen den einzelnen Präparationen erfolgte die Auswertung der Cholesterolkonzentrationen prozentual bezogen auf die ungefütterte Kontrolle.

2.2.3 Aufnahmestudien an isolierten Mitochondrien

Mitochondrien wurden 30 min bei 37°C mit 10 verschiedenen ansteigenden Cholesterolkonzentrationen bis zu 40 µM in einem Volumen von 1 ml in der Gegenwart von 5 µM eines Liganden inkubiert.

Anschließend wurde der Ansatz 30 min bei 14000 x g bei 4°C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde getrocknet, in 100 µl Methanol mit 10 µg/ml Etiocholan als interner Standard aufgenommen und nochmals zentrifugiert, um unlösliche Verunreinigungen abzutrennen. Der Cholesterolgehalt wurde mittels GC-MS bestimmt.

Die Aufnahme von Protoporphyrin IX wurde in analoger Weise bestimmt. Das Präzipitat wurde nach dem Trocknen in einer frisch hergestellten Mischung aus Aceton/Methanol/0,1N NH₃OH 1:1:1 mit Bilirubin als interner Standard gelöst. Nach Zentrifugation wurde die Probe auf eine RP18 HPLC Säule zur Trennung mittels 1050 System (Hewlett-Packard, Waldbronn Deutschland) aufgetragen. Es wurde ein linearer Gradient von Lösung A: 0,1M NH₄-Acetat pH 5,2; 10% MeOH zu Lösung B: 0,1M NH₄-Acetat pH 5,2; 90% MeOH von 7 min (1 ml/min), gefolgt von 13 min B genutzt. Die

Detektion erfolgte mit einem UV-Detektor bei 405 nm und einem Fluoreszenz-Detektor bei 625 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{obs}} = 625 \text{ nm}$).

K_s und V_{max} Werte wurden durch Eadie-Scatchard Relationen (Segel, 1993) bestimmt.

Graphisch wurde die spezifische Aufnahme dargestellt. Das bedeutet, daß die Werte für die Aufnahme und Adsorption in Abwesenheit der stimulierenden Liganden abgezogen wurden.

2.2.4 Radioliganden-Bindungs-Assay

[³H]PK 11195 (80 Ci/mmol) und [³H]Ro5-4864 (82 Ci/mmol) wurden von den Firmen NEN oder Biotrend (Köln, BRD) bezogen. Die Bindungsexperimente wurden für jede Konzentration in Gegenwart von radioaktiven sowie von radioaktiven und kalten Liganden zweimalig durchgeführt. Es erfolgte jeweils eine 3-fach Bestimmung. Die Proben wurden für 2 Stunden bei 4 °C und den angegebenen Konzentrationen des Liganden im Dunkeln inkubiert. Die Proteinkonzentrationen lagen bei 0,6 - 1,8 mg/Assay in einem Endvolumen von 150 µl. Nach Inkubation der Pflanzenmitochondrien oder *E.coli* Protoplasten wurde mit 1 ml eiskaltem Extraktionspuffer (2.2.1.) verdünnt und für 20 min bei 14000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in Extraktionspuffer gewaschen, zentrifugiert und in Wasser resuspendiert. Die Radioaktivität wurde mit einem Flüssig-Scintillations-Spektrometer (Lumasafe Canberra-Packard, Dreieich, BRD) bestimmt. Die Bindungsdaten wurden mittels des Programmes Radling of the KELL package (Biosoft, Ferguson, MO, USA) ausgewertet. Die Differenz zwischen Gesamtbindung (Bindung ohne kalten Liganden) und unspezifischer Bindung (Bindung in Anwesenheit eines 100-1000fachen Überschusses von kaltem Liganden) wird als sättigbare oder spezifische Bindung bezeichnet.

2.2.5 Gas-Chromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (GC-MS)

Cholesterol wurde identifiziert und quantifiziert. Zur Verbesserung der Empfindlichkeit wurden SIM-Methoden (single ion monitoring mode) erstellt. Die Detektion erfolgte hierbei nach spezifischen Ionenmassen. Die quantitative Auswertung basierte auf der zu jeder Methode erstellten Eichkurve. Proportional zur Wiederfindungsrate des internen Standards wurden die Steroidmengen korrigiert. Es wurde mit folgender Geräteausstattung gearbeitet:

Hewlett Packard Gaschromatograph HP 5890 Serie II Plus

Detektor: massenselektiver Detektor HP 5972

Säule: HP-5 M.S.; 30m x 0,25mm; 0,25 µm Filmdicke

Stationäre Phase: Crosslinked 5% Phenylmethylsilikon

Mobile Phase: Helium 5.0

Flußrate: 1 ml/min

Injektionsvolumen: 5 µl

Aufheizrate: 30°C/min

Detektortemperatur: 280°C

2.2.6 Proteinbestimmung

Eine Bestimmung der Proteinkonzentration in Zellaufschlüssen erfolgte nach der durch Peterson (1977) modifizierte Methode nach Lowry et al. (1951). Dazu wurde der Protein Assay Kit No. P 5656 (Sigma) unter Verwendung von BSA als Standard genutzt.

2.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Analyse der Proteine wurde eine vertikale diskontinuierliche SDS-Page nach Laemmli (1970) bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA durchgeführt. Es wurden 12%, 15% bzw. 25% Trenngele (pH 8,8) und ein 4% Sammelgel (pH 6,8) in der Mini-Protean Dual Slab Cell Apparatur (Bio-Rad) verwendet. Die Proben wurden 1:1 mit Probenpuffer (0,125 M Tris/HCl pH 6,8; 20% Glycerol, 5% Mercaptoethanol, 4% SDS, 0,01% Bromphenolblau) versetzt und 10 min bei 95°C denaturiert. Als Molekulargewichtsmarker diente der Low Weight Electrophoresis Calibrations Kit von Pharmacia. Zur Auswertung der Gele wurde die Coomassie-Färbung verwendet, die bei den untersuchten Proteinmengen mit einer Empfindlichkeit von 200 ng/Bande ausreichend war. Die Gele wurden über 3 Stunden oder über Nacht entsprechend den Angaben des Herstellers (Roth, Karlsruhe) der Coomassie-Färbelösung (Roti-Blue Kolloidale Coomassie-Färbung) gefärbt.

2.2.8 Western-Blot und Antikörpernachweis

Die Durchführung erfolgte nach Towbin et al. (1979). Die ungefärbten SDS-Gele sind unmittelbar nach der Elektrophorese in einer Mini Trans-Blot Electrophoretical Transfer Cell (Bio-Rad) auf PVDF-Membranen (Immobilon, Millipore) übertragen worden. Die Membranen wurden zuvor kurz in Methanol gelegt. Die Übertragung erfolgte bei 30 mA etwa 3 Stunden in Transferpuffer (10 mM CAPS, pH11; 20% MeOH). Um den Erfolg des Proteintransfers überprüfen zu können, wurde ein vorgefärbter Molekulargewichtsmarker (Rainbow coloured protein molecular weight makers, apb) verwendet.

Die Analyse der auf die PVDF-Membranen geblotteten Proteine wurde in dieser Reihenfolge durchgeführt:

1. Blockieren: 30 min auf Schüttler in Blockierlösung
2. primärer Antikörper: 1:500 in Blockierlösung, über Nacht, 4°C
3. Waschen: 3 x 15 min mit TBST
4. sekundärer Antikörper: 1:10000 in TBST+3%Magermilchpulver, 1 Stunde
5. Waschen: 3 x 15 min mit TBST
6. Waschen: 2 x 15 min mit TBS
7. Equilibrieren: 1 x 15 min in Substratpuffer
8. Färbung: 33 µl BCIP und 66 µl NBT in 10 ml Substratpuffer bis zur Bandenentwicklung (unter Lichtausschluß)
9. Färbung stoppen: Wasser

TBS: 50 mM Tris/HCl, pH 7,2; 100 mM NaCl

TBST: TBS mit 0,2% Tween 20

Blockierlösung: TBST mit 10% Magermilchpulver

primärer Antikörper: wurde gegen das Peptid LMGLAAWLVWVDGGFHKKP von der Firma Biogenes (Berlin) hergestellt

sekundärer Antikörper: Protein A Alkalische Phosphatase

BCIP: 50 mg/ml Dimethylformamid 100%

NBT: 50 mg/ml Dimethylformamid 70%

Substratpuffer: 100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM Ethanolamin

2.2.9 PCR (Polymerasekettenreaktion)

Die PCR wurde in der Regel im 50 µl Maßstab mit dem T3 Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Als DNA-Polymerase wurden je PCR-Ansatz 1 µl Taq-Polymerase (2,5 U/µl, Peqlab) eingesetzt. Die abgeleiteten sense und antisense Primer (Pharmacia, MWG Biotech) wurden mit Wasser auf eine Konzentration von 100 mM eingestellt. Folgender Standard-PCR-Ansatz (Endkonzentration) wurde verwendet:

Primer		10 µM
10 x PCR-Puffer		5 µl
dNTP`s		100 µM (je)
Matrix (cDNA, Plasmid)		1 µl
Aqua dest.	ad	50 µl

Folgende PCR-Bedingungen wurden gewählt:

- Denaturierung: 5 min bei 95 °C
- Anzahl der Zyklen: 35
- Denaturierung: 1 min bei 95 °C
- Primer-Anlagerung: 1 min bei entsprechender Temperatur
- Kettenverlängerung: 1 min bei 72 °C
- abschließende Kettenverlängerung 10 min bei 72 °C

Die PCR wurde zur Isolierung von cDNA aus cDNA-Banken von *D. lanata* und *A. thaliana*, zur Einführung von Restriktionsschnittstellen, als Plasmid-PCR zur Gewinnung von Fragmenten und deren Subklonierung, zum Nachweis rekombinanter Klone und in bestimmter Modifizierung zur Erzeugung von Deletionsmutanten genutzt.

Beim Nachweis rekombinanter Klone wurde die DNA einschließlich der Plasmide aus den Bakterien durch einmalige Hitzedenaturierung für die PCR zugänglich gemacht (10 min bei 95°C).

2.2.9.1 Deletionsmutanten

In Anlehnung an den QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) wurden jeweils ein Strang- und ein Gegenstrangprimer (Del1H und Del1R, Del3H und Del3R), die homolog zu den Basen vor und hinter der Deletion sind und die phosphoryliert sind, abgeleitet. Mit einer Proofreading-Polymerase (PfuTurbo DNA-Polymerase, 2,5 U/µl pro Ansatz) wurde ein Produkt amplifiziert und der Templatestrang anschließend mit *Dpn I* verdaut (*Dpn I* schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA, nicht aber

unmethylierte). Das übriggebliebene PCR-Produkt wurde ligiert und in SG13009[pREP4] Zellen transformiert. Folgender Ansatz und PCR-Bedingungen wurden festgelegt:

10 x PCR-Puffer		5 µl
Plasmid 482 (Template)		30 ng
Primer 1		200 ng
Primer 2		200 ng
dNTP's		100 µM (je)
Aqua dest.	ad	50 µl

◦ Denaturierung:	3 min bei 95 °C
Anzahl der Zyklen:	25
◦ Denaturierung:	30 sec bei 95 °C
◦ Primer-Anlagerung:	1 min bei 55 °C
◦ Kettenverlängerung:	12 min bei 68 °C
◦ abschließende Kettenverlängerung	10 min bei 69,5 °C

2.2.10 Klonierung und Sequenzierung

2.2.10.1 Allgemeines

Die elektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren in Agarosegelen, allgemeine Klonierungsschritte, DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen, Ligationen und Plasmidisolation wurden nach den Protokollen von Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Für einige dieser Standardmethoden standen Kits zur Verfügung (vgl. 2.1.8.).

Die Sequenzierung erfolgte nach Sanger et al. (1977) und Chen und Seeburg (1985) mit dem A.L.F.-Sequenziergerät (Pharmacia) oder mit dem ABI Prism 377 DNA Sequenzer (Perkin Elmer). Die Sequenzierung wurde von Dr. A. Peterson (Biozentrum Halle/S.) unter Verwendung Cy5-markierter Oligonukleotide und des ALFexpress AutoRead Sequencing Kits (Pharmacia) durchgeführt. Sequenzhomologien zu Einträgen in der EMBL-, GeneBank und SWISS-Prot Datenbank wurden unter Nutzung der BLAST- und FASTA- Algorithmen gesucht (Altschul et al., 1990, 1997; Pearson, 1990). Mit dem Programm CLUSTALW (Thompson et al., 1994) erfolgten Sequenzvergleiche.

2.2.10.2 *Das pflanzliche PBR-homologe Protein aus A. thaliana*

Zu der in der Datenbank gefundenen Sequenz (3.4.) wurden genspezifische Primer abgeleitet (AbA1/99, AbA2/99), die Restriktionsenzymststellen für Nco I und Bgl II enthalten. Ein durch PCR (2.2.9. Annealingtemperatur: 53°C) erhaltenes Produkt wurde im Agarosegel aufgereinigt (QIAEX II Gel Extraction Kit, Qiagen), entsprechend den Anweisungen des Herstellers mit dem pCR 2.1 Topo-Vektor ligiert und anschließend in kompetente One Shot *E.coli* Zellen transformiert (TOPO-TA-Kloning Kit, Invitrogen).

Die codierende Sequenz konnte nun mit den entsprechenden Restriktionsenzymen aus dem pCR 2.1 TOPO-Vektor herausgeschnitten und im richtigen Leserahmen in den pQE 60 Expressionsvektor (Qiagen) inkloniert werden. Dieser Vektor wurde in *E. coli* Zellen SG13009[pREP4] transformiert und der sequenzierte Klon mit Fl bezeichnet. Die 6xHis-Fusion wurde hierbei nicht verwendet.

Aus dem Klon Fl wurden 2 weitere Sequenzen abgeleitet. Mit genspezifischen Primern (PBR1, PBR2, PBR3) und dem Klon Fl als Matrize wurde mittels PCR ein Produkt ab dem Startmethionin und ein Weiteres ab dem 3. Methionin (AS 42) erhalten. Nach Zwischenklonierung im pCR 2.1 TOPO-Vektor wurde in den pQE 30 Expressionsvektor kloniert und wiederum in SG13009[pREP4] Zellen transformiert. Die Sequenzierung bestätigte hier die Verwendung der 6xHis-Fusion.

2.2.10.3 *Vektoren für das Hefe Two-Hybrid-System (2.2.15.)*

Die Sequenz des pflanzlichen PBR-Analogons wurde wieder mit genspezifischen Primern (FT9H, FT2R) mittels PCR amplifiziert und über Zwischenklonierung unter Nutzung der eingefügten Restriktionsschnittstellen *EcoR* I und *Pst* I mit dem DNA-BD-Klonierungsvektor pGBT9 ligiert. Es wurde auch ein Konstrukt im DNA-BD-Klonierungsvektor pAS2-1 hergestellt, welches im weiteren Verlauf nicht genutzt werden konnte, da die mit diesem Plasmid transformierten Hefen nicht entsprechend lebensaktiv waren (sehr verzögertes Wachstum). Eine Sequenzierung bestätigte die Insertion der gesamten 591bp in richtiger Orientierung und Leserahmen.

Die cDNA-Sequenzen (I, Ik, II, III) für die drei interagierenden Proteine (3.6.) wurden mittels PCR amplifiziert (Annealingtemperatur: 57 °C bzw. 58 °C) und direkt nach Reinigung (QIAEX II Gel Extraction Kit, Qiagen) mit dem AD-Klonierungsvektor pGAD424 ligiert.

2.2.10.4 Vektoren für das *in-vitro*-GST-Interaktionsassay

Die GST-Gen-Fusions-Vektoren pGEX-5X-1 oder pGEX-4T-1 wurden mit den wiederum durch PCR erhaltenen cDNA-Sequenzen (I, Ik, II, III) ligiert, transformiert und sequenziert.

Bei allen Arbeiten mit dem GST-Gen-Fusionssystem wurden die Empfehlungen und Protokolle von amersham pharmacia biotech (apb) zu Grunde gelegt.

2.2.11 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

SG13009[pREP4] Zellen wurden nach einer Vorschrift der Firma Quiagen kompetent gemacht (The QIAexpressionistTM, 1999). Die Zellen wurden aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Nach der gleichen Methode wurden auch kompetente DH5 α Zellen hergestellt. One Shot TOP10 konnten als chemisch kompetente Zellen von Invitrogen bezogen werden. BL21 Zellen wurden nach einer Vorschrift des Manuals GST Gene Fusion System (Third Edition, Revision 2, apb) kompetent gemacht. Diese so behandelten Zellen müssen immer frisch verwendet werden.

KC8 Zellen und DH5 α Zellen wurden für die Elektroporation verwendet. Dafür müssen die Bakterien einer frisch angezogenen Flüssigkultur dreimal mit kaltem sterilem Wasser gewaschen werden und in 10 % (V/V) Glycerinlösung suspendiert werden. Die so behandelten Bakterienzellen wurden aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

2.2.12 Transformation der *E. coli* Stämme

Transformationen wurden den Angaben der jeweiligen Hersteller folgend durchgeführt (2.1.4.), dabei wieder für SG13009[pREP4] Zellen: The QIAexpressionistTM, 1999 und für BL21 Zellen: GST Gene Fusion System (Third Edition, Revision 2, apb). Diese Transformationen beruhen auf der Hitzeschock-Methode (Cohen et al., 1972).

Für die Elektrotransformation wurden 40 μl aliquotierte Zellen aufgetaut, mit bis zu 1 μg DNA gemischt und dieser Ansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Invitrogen) überführt und auf Eis gelagert. Das Elektroporationsgerät (Electroporator II, Invitrogen) wurde auf 25 μF und 2,5 kV, der Puls-Controller auf 200 Ω eingestellt und die Küvette in die Halterung gebracht. Der Puls wurde mit einer Zeitkonstante von 4,5-5.0 ms ausgelöst.

Der Ansatz wurde in ein Eppendorf-Tube überführt, mit 1 ml SOC-Medium 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert und anschließend auf LB-Selektivmedium ausplattiert.

2.2.13 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Das pflanzliche PBR-homologe Protein wurde im pQE 30 bzw. pQE 60 Expressionsvektor als Klone Fl, Fl(His)₆, sowie in modifizierter Form als Klone Δ_{1-41} , Δ_{82-92} , $\Delta_{180-196}$ (3.5.1.) als rekombinantes Protein heterolog exprimiert. Dazu wurden 3 ml bzw. 50 ml Kulturen (SG13009[pREP4] Zellen) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen und für 5 h mit 1 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, in SDS-Page Proben-Puffer aufgenommen, 2 x 15 sec. mit Ultraschall behandelt, 10 min bei 95°C inkubiert und durch SDS-Page aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele mittels Coomassie gefärbt. Im erwarteten Molekulargewichtsbereich war gegenüber einer nicht induzierten Kontrolle eine verstärkte Proteinbande zu beobachten.

Die drei interagierenden Proteine (I, Ik, II, III) in den Vektoren pGEX-5X-1 bzw. pGEX-4T-1 wurden in BL21 Zellkulturen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen und für 5 h mit 1 mM IPTG induziert. Die weitere Aufarbeitung ist in 2.2.15. GST-Pull-Down Assay beschrieben. Die verschiedenen Proteine wurden exprimiert, befanden sich aber nach Bakterienaufschluss in der unlöslichen Fraktion, eventuell in Einschluss-Körperchen (Abb.17).

Die Aufarbeitung erfolgte nach Frangioni and Neel (1993), bei der die Einschluss-Körperchen mit dem anionischen Detergens N-Laurylsarkosin aufgelöst wurden.

2.2.14 GST-Pull-Down Assay

Für die Überexpression der GST-Fusionsproteine wurde ein Kulturvolumen von 800 ml gewählt. Nach Kultivierung unter beschriebenen Bedingungen (2.2.13.) wurden die Zellen 10 min bei 4°C und 7700 x g zentrifugiert, in 40 ml STE-Puffer (10 mM Tris, pH 8,0; 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) mit 100 µg/ml Lysozym resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Es wurde DTT bis zu einer Endkonzentration von 5 mM und anschließend N-Laurylsarkosin bis zu einer Endkonzentration von 1,5% (m/V) zugegeben und mindestens 5 sec. gevortext. Es folgten 1 min Ultraschallbehandlung im Wasserbad. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 4°C wurde dem Überstand Triton X-100 bis zu einer Konzentration von

2% (m/V) zugesetzt. Dieser Ansatz wurde durch einen 0,45 µm Filter gegeben und auf eine mit 10 ml STE-Puffer equilibrierte Glutathion-Sepharose-Säule (GST TrapTM FF 5 x 1 ml) aufgetragen. Die Flußrate wurde auf 1 ml/min eingestellt.

Die Säule wurde mit 50 ml STE-Puffer gewaschen und anschließend mit 50 ml HMS-Puffer (10 mM HEPES, pH 7,4; 230 mM Mannitol, 70 mM Sucrose) equilibriert. Es wurde die lösliche Mitochondrienpräparation auf die Säule aufgetragen. Die Mitochondrien wurden aus einer *A. thaliana* Zellkultur gewonnen (2.2.1.) und nach Krueger und Papadopoulos (1990) behandelt. Dabei wurde mit Hilfe von Digitonin das entsprechende Membranprotein solubilisiert. Es erfolgten Waschen mit 30 ml HMS-Puffer und Equilibrieren mit 50 ml Elutionspuffer ohne reduziertes Glutathion. Mit 20 ml Elutionspuffer (75 mM HEPES, pH 7,4; 150 mM NaCl, 10 mM reduziertes Glutathion, 5 mM DTT, 0,1% Triton X-100) wurde der Proteinkomplex von der Säulenmatrix gelöst und in 2 ml Fraktionen gesammelt. Diese wurden, nachdem 200 µl zur Bestimmung des Proteingehaltes entnommen wurden, mit dem 5fachen Volumen Aceton versetzt und die ausgefällten Proteine abzentrifugiert. Jetzt wurden diese in 200 µl SDS-Page Proben-Puffer aufgenommen, 10 min im Wasserbad gekocht und durch SDS-Page aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele mittels Coomassie gefärbt und jeweils ein weiteres Gel zur Durchführung des Western-Blots mit anschließendem Antikörpernachweis genutzt.

2.2.15 Das Two-Hybrid-System in *Saccharomyces cerevisiae*

nach Fields & Song, 1989

Das Two-Hybrid-System in Hefe basiert auf der Entdeckung, daß viele eukaryotische Transkriptionsaktivatoren aus zwei trennbaren, funktionell unabhängigen Domänen bestehen (Ma und Ptashne, 1987). Der Gal4-Transkriptionsaktivator wird experimentell häufig verwendet. Dieser Transkriptionsaktivator besteht aus einer DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) und einer Aktivierungsdomäne (AD). Die DNA-BD erkennt und bindet an eine Sequenz (UAS_G) in der stromaufwärts liegenden (upstream) Region der Gal4-kontrollierten Gene, wohingegen die AD mit anderen Komponenten des Systems reagiert, welches für die Transkriptionsaktivierung notwendig ist. Die Domänen agieren als unabhängige Moleküle, aber keines kann allein die Transkription aktivieren.

GAL1, GAL7 und GAL10 sind Gene in *Saccharomyces cerevisiae*, die für den Galaktose-Metabolismus (Katabolismus) erforderlich sind. Gal4, ein Protein aus 881 Aminosäuren, ist verantwortlich für die Expression dieser Gene und bindet spezifisch an die upstream Sequenz (UAS_G), welche zwischen den divergierend transkribierten Gal1- und Gal10-Genen liegt (Ma und Ptashne, 1987). Die AD leitet den Polymerase II-Komplex, der zur Transkription notwendig ist (Clontech Matchmaker Gal4 Two-Hybrid User Manual).

Mit Hilfe von 2 verschiedenen Klonierungsvektoren werden Fusionen der DNA-Sequenzen der GAL4-Domänen mit Genen, die für potentiell interagierende Proteine codieren, hergestellt. Die rekombinanten Hybridproteine werden in einem Hefe-Reporterstamm coexprimiert. Im Nukleus können beide Hybridproteine miteinander interagieren und die DNA-BD gelangt dadurch in räumliche Nähe der AD. So wird durch diese Two-Hybrid-Interaktion der GAL4-Transkriptionsaktivator funktionell rekonstituiert und aktiviert die Transkription eines Reportergenes (z.B. *lacZ* und *HIS3*) durch Bindung an die UAS_G-Sequenz.

Die Fusion eines Gens mit der DNA-BD ergibt ein als „Bait“ bezeichnetes Protein. Die AD kann mit den verschiedensten Genen einer Bank fusioniert sein und somit einem Bankscreening dienen oder mit einem Gen eines potentiell interagierenden Proteins und wird dann „Prey“ genannt.

2.2.16 Hefe-Transformation

Zur Durchführung des Two-Hybrid-Screens wurde der Hefestamm Y190 stufenweise mit dem Baitplasmid und der cDNA-Bank transformiert. Die Transformationen beruhen auf der LiAc/ss-DNA/PEG Methode (Lithiumacetat/single-stranded carrier DNA/Polyethylenglykol). Der DNA-BD-Vektor wurde nach dem Quick and Easy TRAF0 Protocol (Gietz and Woods, 1994) transformiert. Die Bibliothekstransformation erfolgte den Anweisungen des MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid User Manuals (Clontech) entsprechend. In einer 150 ml Flüssigkultur wurde die Bait-transformierte Hefe bis zur stationären Wachstumsphase herangezogen. Von dieser Vorkultur wurden 20 ml in YPAD-Medium überführt und weitere 3 h bei 30°C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 inkubiert. Die Hefen wurden zentrifugiert (10 min, RT, 1000 x g), in 500 ml sterilem

Wasser gewaschen und in 8 ml 1 x TE/LiAc resuspendiert. 20 mg denaturierte Carrier-DNA, 0,350 mg Bibliotheks-DNA und 8 ml der kompetenten Hefezellen wurden gemischt. Nach der Zugabe von 60 ml PEG/LiAc-Lösung (40% PEG 4000, 1 x TE, 1 x LiAc) und Vortexen wurde nochmals für 30 min bei 30°C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Es wurden 7 ml DMSO zugegeben und vorsichtig gemischt. Der Hitzeschock erfolgte 15 min bei 42°C. Die Zellen wurden 2 min auf Eis gekühlt, abzentrifugiert (5min, 4000 rpm) und in 10 ml sterilem Wasser vorsichtig resuspendiert. Je 200 µl des transformierten Ansatzes wurden auf SD Agar Platten ohne Tryptophan, Leucin und Histidin ausplattiert. Zur Kalkulation der Transformationseffizienz wurden 100 µl des transformierten Ansatzes in den Verdünnungen 1:1000, 1:100 und 1:10 auf SD Agarplatten ohne Tryptophan und Leucin ausplattiert.

2.2.17 Filterassay zum Nachweis von β -Galactosidase-Aktivität

Diese Untersuchung wurde mit frischen Kolonien (2-3 Tage nach Ausplattierung, 1-3 mm im Durchmesser) durchgeführt. Für jede zu untersuchende Agarplatte wurde ein steriler Whatmanfilter in eine Petrischale (100 oder 150 mm) gegeben und mit 2-5 ml Z-Puffer/X-GAL-Lösung angefeuchtet. Ebenfalls ein steriler Whatmanfilter wurde auf die Oberfläche der zu untersuchenden Agarplatte gelegt und leicht mit einem Drigalsky-Spatel angedrückt. Dadurch haften die Hefekolonien an der Unterseite des Filters. Mit einer sterilen Nadel wurden Löcher durch den Filter in den Agar gestochen, um den Filter nach Abschluß des Assays wieder auf der Agarplatte orientieren zu können. Der Filter wurde nun mit den daran haftenden Hefekolonien nach oben für 10 Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht. Der gefrorene Filter wurde mit den Kolonien nach oben in die vorbereitete Petrischale mit feuchtem Filter gelegt. Durch den Gefrier-Auftau-Schritt wurden die Zellen permeabilisiert. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für max. 8 Stunden. Bei Aktivierung des Reportergenes kam es zur Blaufärbung der entsprechenden Hefekolonien.

2.2.18 Plasmidisolierung aus Hefe

Eine Hefekolonie wurde für 36 Stunden in 10 ml SD bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. 2 x 1,5 ml wurden zentrifugiert (1 min, 13000 rpm) und in 200 µl Lysepuffer (10 mM

Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 2% Triton X-100) resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform und 0,3 g Glasperlen (0,45-0,50 mm, Roth). Nach 2-minütigem Vortexen wurde für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die wäßrigen Phasen der Parallelproben wurden vereinigt und es erfolgte die Zugabe von 40 µl 3 M Ammoniumacetat und 280 µl Isopropanol. Nach der Zentrifugation (15 min, 13000 rpm) wurde das Präzipitat mit 200 µl 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 20 µl TE aufgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Cholesterolaufnahme von Blättern von *Digitalis lanata*

Ausgehend von der Annahme, daß in Pflanzen ein ähnliches Transportprotein oder Kanalprotein wie der PBR in den Säugetieren existiert, sollte die Aufnahme von Cholesterol untersucht werden. Würde zugesetztes Cholesterol von den Mitochondrien der Pflanzenzellen aufgenommen werden, so setzt dieser Vorgang einen bestimmten Eintrittsmechanismus oder einen Transport durch die Mitochondrienmembranen voraus. Im Tier ist dieser Transport von Cholesterol durch Liganden stimulierbar (Li und Papadopoulos, 1998).

Zunächst wurde untersucht, ob Liganden des tierischen PBR einen Einfluß auf die Cholesterolakkumulation haben. Nach Inkubation von Blattstückchen mit Cholesterol und Liganden wurden diese nach der Fraktionierungsmethode (2.2.1.) aufgearbeitet und der Cholesterolgehalt der einzelnen Zellfraktionen mittels GC-MS bestimmt. Durch die Gehaltsbestimmung in den einzelnen Fraktionen sollten zusätzlich Erkenntnisse gewonnen werden, in welche Zellorganellen eine Aufnahme erfolgte.

In den Mitochondrien ist eine Zunahme des Cholesterolgehaltes nach Applikation von Cholesterol zu verzeichnen (Abb. 7). Die Cholesterolakkumulation wird durch Liganden beeinflusst, Ro5-4864 und PK 11195 inhibieren die Aufnahme in die Mitochondrien während Flunitrazepam keinen Einfluß zeigt.

Eine geringere Cholesterolakkumulation konnte in den Chloroplasten beobachtet werden. Flunitrazepam und Ro5-4864 haben keinen signifikanten Einfluß. Lediglich PK 11195 inhibiert die Aufnahme von Cholesterol (Daten nicht gezeigt).

Für die Mikrosomenfraktion war keine signifikante Veränderung des Cholesterolgehaltes zu verzeichnen, der sich auf PBR-Liganden zurückführen läßt.

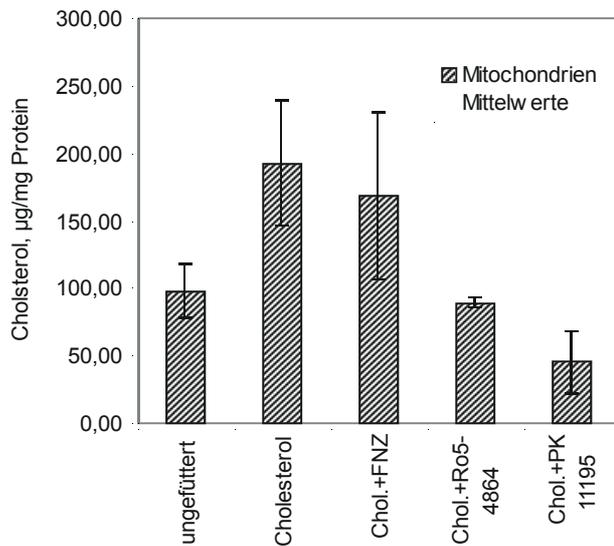


Abbildung 7: Cholesterolaufnahme der Mitochondrien im Vergleich zur ungefütterten Kontrolle. Es wurde mit 50 µM Cholesterol und je 1 µM Ligand inkubiert.

Die Cholesterolakkumulation wird durch PK 11195 und etwas schwächer durch Ro5-4864 inhibiert. Flunitrazepam hat keinen signifikanten Einfluß.

3.2 Aufnahmestudien an isolierten Mitochondrien

Die Cholesterolaufnahme von Blättern wird als einzelner Vorgang neben allen weiteren Lebensvorgängen in der Zelle und im Zellverband durch viele Faktoren beeinflusst. So erfolgt z.B. die Aufnahme in das Phloem, der Transport durch das Phloem, und der Weg vom Leitgewebe bis zu den einzelnen Zellen muß zurückgelegt werden.

Bei Aufnahmestudien an isolierten Organellen sollten diese Einflüsse minimiert sein. Es erfolgte eine weiterführende Untersuchung der Aufnahme durch Inkubation von isolierten Mitochondrien und Chloroplasten mit 50 µM Cholesterol und anschließender Bestimmung des Cholesterolgehaltes (Lindemann et al., 2000). Hier konnte ebenfalls eine Akkumulation von Cholesterol in den Mitochondrien festgestellt werden, die jedoch durch 1 µM Flunitrazepam, Ro5-4864 oder PK 11195 stimuliert werden konnte. Auf den ebenfalls untersuchten Cholesterolgehalt der Chloroplasten hatten die PBR-Liganden keinen Einfluß, weder stimulierend noch inhibierend. Somit konnte eine ligandenstimulierte Cholesterolaufnahme nur an isolierten Mitochondrien beobachtet werden.

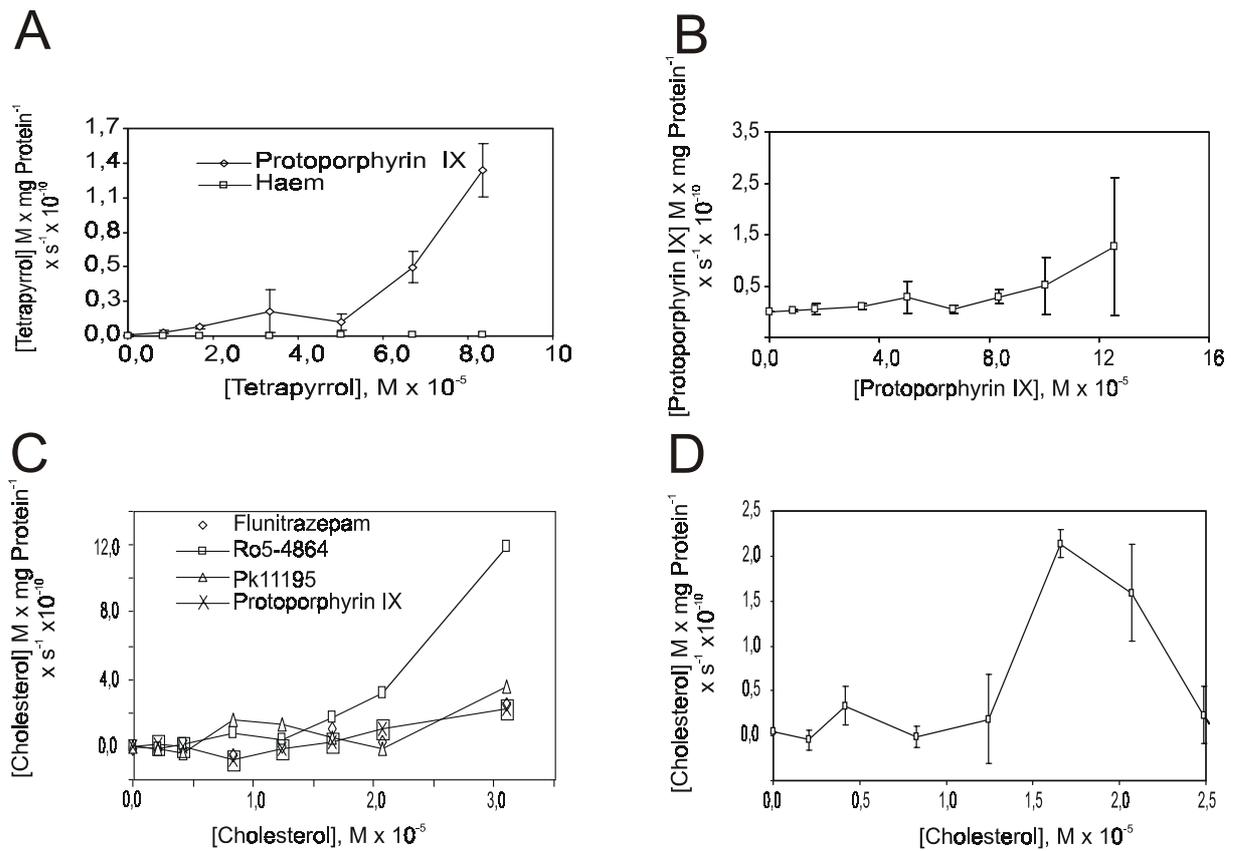


Abbildung 8: Spezifische Protoporphyrin IX- bzw. Tetrapyrrol-Aufnahme der *D. lanata* (A)- und *A. thaliana* (B)-Mitochondrien sowie spezifische Cholesterolaufnahme der *D. lanata* (C)- und *A. thaliana* (D)-Mitochondrien in Gegenwart von $5 \mu\text{M}$ Ro5-4864 bzw. von vier verschiedenen Liganden (C).

(A): *D. lanata*-Mitochondrien nahmen Protoporphyrin IX auf, Haem wurde nicht aufgenommen

(C): Die Cholesterolaufnahme der *D. lanata*-Mitochondrien wurde durch Ro5-4864 und PK 11195 stimuliert, in geringerem Maß durch Flunitrazepam und Protoporphyrin IX

Weiterhin wurden Mitochondrien mit verschiedenen aufsteigenden Cholesterolkonzentrationen bis zu $40 \mu\text{M}$ in der Gegenwart eines Liganden inkubiert, um die Aufnahme zu charakterisieren. Es wurde eine ligandenstimulierte Cholesterolaufnahme beobachtet, die durch Ro5-4864, PK 11195, und in geringem Ausmaß durch Flunitrazepam sowie durch Protoporphyrin IX stimuliert wurde (Abb. 8 C). Die Substratbindungskonstante K_S und die maximale Aufnahmegeschwindigkeit V_{max} liegen bei *D. lanata*- und *A. thaliana*-Mitochondrien in der gleichen Größenordnung (Tab. 3).

Aufgrund der Stimulation der Cholesterolaufnahme durch Protoporphyrin IX und verschiedener früherer Berichte über die Bindung von Protoporphyrin IX an den tierischen PBR wurde untersucht, ob auch Protoporphyrin IX selbst aufgenommen wird. Die Aufnahme von Protoporphyrin IX konnte bei *D. lanata*- und *A. thaliana*-Mitochondrien durch Ro5-4864, PK 11195 und in geringem Ausmaß durch Flunitrazepam stimuliert werden (Abb. 8). Untersuchungen an *D. lanata*-Mitochondrien zeigten, daß Protoporphyrin IX transportiert wird, nicht aber Häm (Abb. 8 A). Die K_S -Werte entsprechen denen der Cholesterolaufnahme. Die maximale Geschwindigkeit der Aufnahme ist höher.

Aufnahme Mitochondrien	Protoporphyrin IX		Cholesterol	
	K_S $\mu\text{M} \times \text{L}^{-1}$	V_{max} $\text{pM} \times \text{s}^{-1}$	K_S $\mu\text{M} \times \text{L}^{-1}$	V_{max} $\text{pM} \times \text{s}^{-1}$
<i>D. lanata</i>	6,4	25,1	6,5	1,2
<i>A. thaliana</i>	0,3	15	0,4	6,5

Tabelle. 3: Substratbindungskonstanten K_S und maximale Aufnahmegeschwindigkeiten V_{max} der Protoporphyrin IX- und Cholesterolaufnahme der *D. lanata*- und *A. thaliana*-Mitochondrien

3.3 Bindungsstudien an isolierten Mitochondrien

Im Tier benötigt der PBR-vermittelte Transport von Cholesterol durch eine Membran eine Stimulation durch Liganden. Daher wurde untersucht, wie affin die Bindung dieser Liganden zu dem pflanzlichen PBR-homologen Protein ist (*D. lanata*, *A. thaliana*). Es wurden Bindungsstudien mit Ro5-4864, PK 11195 und Flunitrazepam durchgeführt. PK 11195 und Ro5-4864 wiesen eine spezifische Bindung von 30% bis über 40% auf (Abb. 14). Flunitrazepam zeigte keine spezifische Bindung. Daher wurden alle weiteren Versuche mit Ro5-4864 durchgeführt. Die ermittelten Daten wurden mit der Methode nach Scatchard analysiert. Daraus wurden die zugehörigen Dissoziationskonstanten K_D und die maximale Zahl der Bindungsstellen B_{max} ermittelt (Tab. 4). Die Form der Kurve bei der grafischen Darstellung läßt auf zwei Bindungsstellen schließen. Es sind nur die Parameter für die hoch affine Bindungsstelle angegeben. Die K_D Werte für die niedrig affine Bindungsstelle für Ro5-4864 liegen im mikromolaren Bereich.

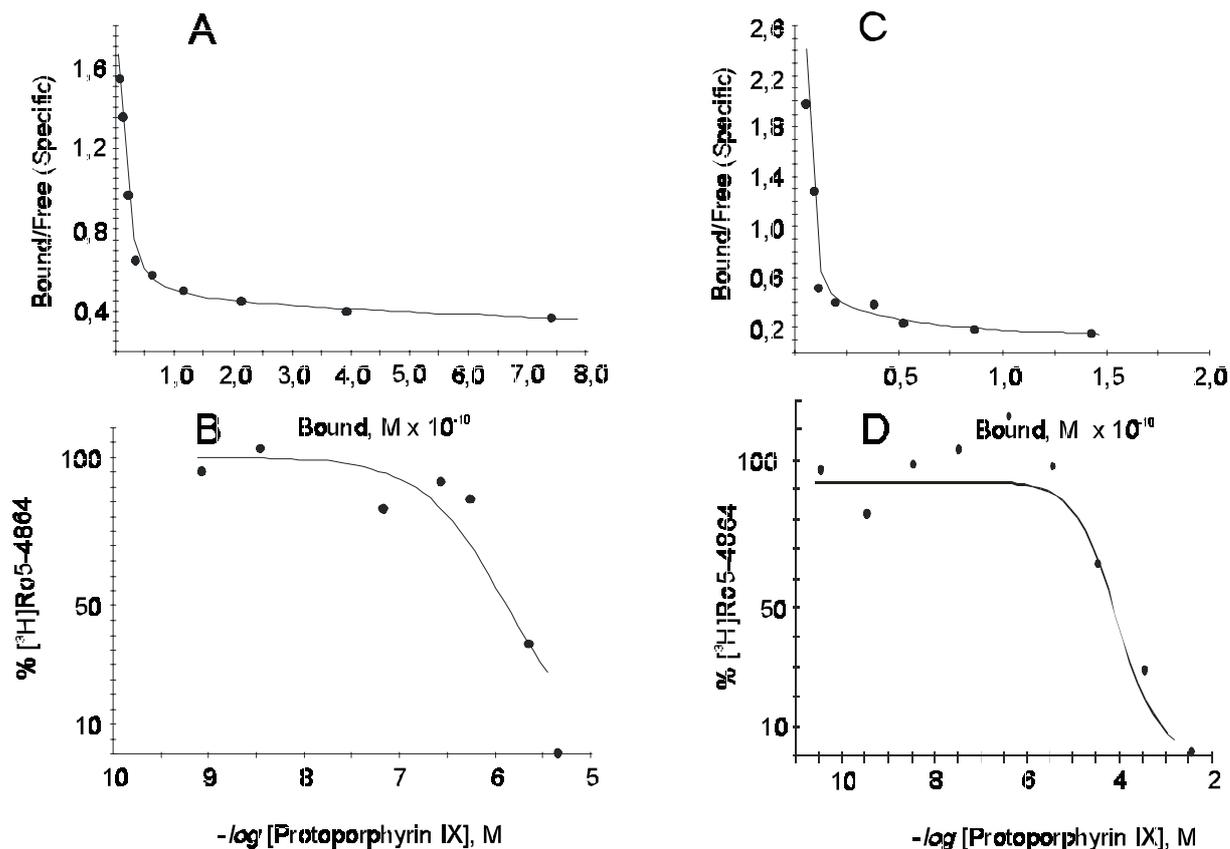


Abbildung 9: Scatchard-Plots der Ro5-4864-Bindung der *A. thaliana* (A)- und *D. lanata* (C)-Mitochondrien und Verdrängungskurven von Ro5-4864 durch Protoporphyrin IX bei *A. thaliana* (B)- und *D. lanata* (D)-Mitochondrien

Ro5-4864 Bindung		
Mitochondrien	K_D pM	B_{max} pmol x mg Protein ⁻¹
<i>D. lanata</i>	21,2	14,4
<i>A. thaliana</i>	9,3	15,9

Tabelle 4: Dissoziationskonstanten K_D und maximale Anzahl der Bindungsstellen B_{max} der Ro5-4864-Bindung der *D. lanata*- und *A. thaliana*-Mitochondrien

Es wurde auch untersucht, ob Liganden, die eine spezifische Bindung zum pflanzlichen PBR-homologen Protein haben, sich von ihren Bindungsstellen verdrängen lassen.

[³H]Ro5-4864 konnte mit Protoporphyrin IX von seiner Bindungsstelle verdrängt werden (Abb. 9), während [³H]PK 11195 auf diese Weise nicht verdrängt werden konnte. Für die

A. thaliana Mitochondrien beträgt die Verdrängungskonstante IC_{50} (Ro5-4864) $2,8 \mu\text{M}$ und für die *D. lanata* Mitochondrien wurde eine IC_{50} (Ro5-4864) von $71,1 \mu\text{M}$ ermittelt.

3.4 Amplifizierung eines PCR-Fragmentes, eines pflanzlichen PBR-Homologons, aus *Arabidopsis thaliana*

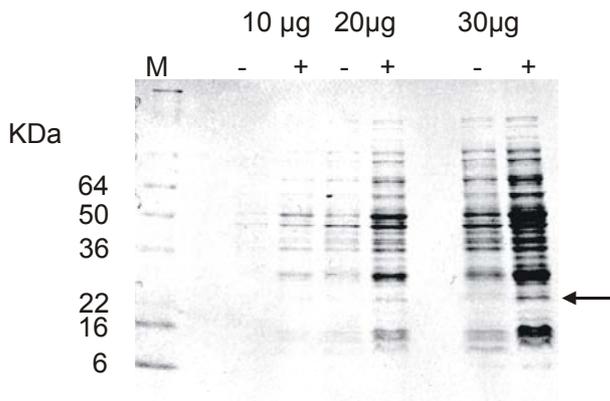


Abbildung 10: Expression des pflanzlichen PBR-homologen Proteins [Klon FL(His)₆] in *E. coli*. Von links nach rechts wurden drei verschiedene Konzentrationen aufgetragen. + bzw. – bedeuten mit oder ohne IPTG Induktion.

Die Versuche, eine PBR-homologe Sequenz aus *D. lanata* zu isolieren, führten nicht zum gewünschten Ziel. Das Screening einer cDNA-Bank der embryogenen Suspensionszellkultur des Stammes VIII von *D. lanata* Ehrh. bzw. die Amplifizierung eines PCR-Fragmentes mittels degenerierter Primer waren nicht erfolgreich.

Daher wurde versucht, ein PBR-homologes Protein aus *Arabidopsis thaliana* für weitergehende Studien am rekombinanten Protein zu erhalten.

Ausgehend von der für das PBR

codierenden Protein-Sequenz des Rindes wurden mittels einer Datenbankrecherche (BLAST) Ähnlichkeiten zu einem hypothetischen F17A22.16 Genprodukt, mit der TREMBL Acc.No. O82245, gefunden (Abb. 11). Das vom *A. thaliana* Chromosom II (locus At2g47770, GenBank Acc.No. AC005309) kodierte Protein hat ein theoretisches Molekulargewicht von $21,1 \text{ kDa}$ und 196 Aminosäuren. Der isoelektrische Punkt liegt bei $9,34$. Die Sequenz umfasst den kodierenden Bereich von 591 bp im offenen Leserahmen (ORF).

Diese Sequenz wurde zunächst amplifiziert, dann in den Expressionsvektor pQE 60 ohne Verwendung der 6xHis-Fusion einkloniert und der Klon als Full-length-Klon mit der Abkürzung Fl bezeichnet. Ein Klon, der die gleiche Sequenz im pQE 30 Expressionsvektor enthält, wurde mit einer N-terminalen Markierung bestehend aus 6 Histidinen kloniert

(freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der AG Grimm, IPK Gatersleben) und mit Fl(His)₆ bezeichnet.

Abbildung 10 zeigt die heterolog exprimierten Proteine in *E. coli* nach Auftrennung in einer SDS-Page und anschließender Silberfärbung.

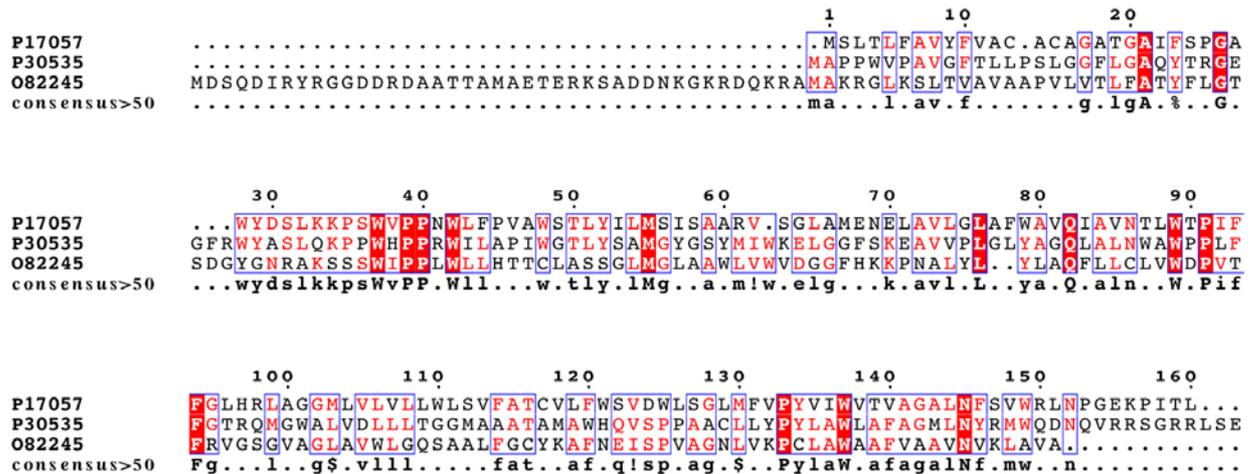


Abbildung 11: Aminosäurevergleich des PBR aus dem Rind *Bos taurus* (P30535), des CrtK-Proteins aus *Rhodobacter capsulatus* (P17057) und des PBR-homologen Proteins aus *A. thaliana*. Der Aminosäurevergleich wurde mit CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) erstellt. Rot unterlegte AS sind in allen 3 Sequenzen identisch, rot geschriebene AS sind in jeweils zwei Sequenzen identisch und die umrahmten Bereiche ergeben Konsensus-Bereiche der PBR- und PBR-homologen Sequenzen.

3.5 Deletionsanalysen

Mit Hilfe der Mutagenese wurde die Funktion einzelner Domänen des pflanzlichen PBR-homologen Proteins untersucht. Ziel war es, verschiedene Deletionsmutanten herzustellen, um die Funktionalität, d.h. die Cholesterol- sowie Protoporphyrin IX-Aufnahme und Ligandenbindung des pflanzlichen PBR-homologen Proteins aus *A. thaliana*, zu untersuchen.

3.5.1 Deletionsmutanten

Das pflanzliche PBR-homologe Protein aus *A. thaliana* weist einen Aminoterminus auf, der ungefähr 40 Aminosäuren länger ist, verglichen mit den bekannten PBR-Sequenzen im Tier oder des TspO in *Rhodobacter sphaeroides*. Um diese Unterschiede untersuchen zu können, wurden zwei Sequenzen aus *A. thaliana* abgeleitet.

Mit dem Full length Klon Fl als Matrize für die PCR-Reaktionen wurden eine Sequenz ab dem Startmethionin und eine Sequenz ab dem 3. Methionin (Aminosäure 42) kloniert. Der verkürzte Klon erhielt die Bezeichnung Δ_{1-41} .

Li and Papadopoulos (1998) führten Cholesterolaufnahme- und PK 11195-Bindungsstudien mit verschiedenen Deletionsmutanten des bakteriell exprimierten PBR der Maus durch. Eine Deletion der AS 41-51 des PBR aus der Maus erniedrigte die Bindungsfähigkeit des PBR für PK 11195 um 30-45%. Diese Deletion hatte keine bedeutenden Effekte auf das Vermögen des rekombinant exprimierten Rezeptors, radioaktiv markiertes Cholesterol aufzunehmen. Ausgehend von der Vermutung, daß in diesem Bereich ein Teil der Bindungsstelle für Liganden, wie das Isochinolincarboxamid PK 11195 und Benzodiazepine liegt, wurde eine Deletion im entsprechenden Bereich des pflanzlichen PBR-homologen Proteins vorgenommen. Aufgrund des ungefähr 40 AS längeren Aminoterminus, verglichen mit den bekannten PBR-Sequenzen im Tier, wurden die AS 82-92 entfernt. Diese Deletionsmutante wurde mit Δ_{82-92} bezeichnet.

Li and Papadopoulos (1998) zeigten weiterhin, daß die Deletion der letzten AS 153-169 im Carboxyterminus des PBR der Maus drastische Effekte auf die Cholesterolaufnahme zeigt. Im bakteriell exprimierten Protein wurde die Aufnahmefähigkeit um 70% erniedrigt. Es

wurden die letzten 17 AS der pflanzlichen Sequenz aus *A. thaliana* entfernt (AS 180-196) und diese Deletionsmutante mit $\Delta_{180-196}$ bezeichnet.

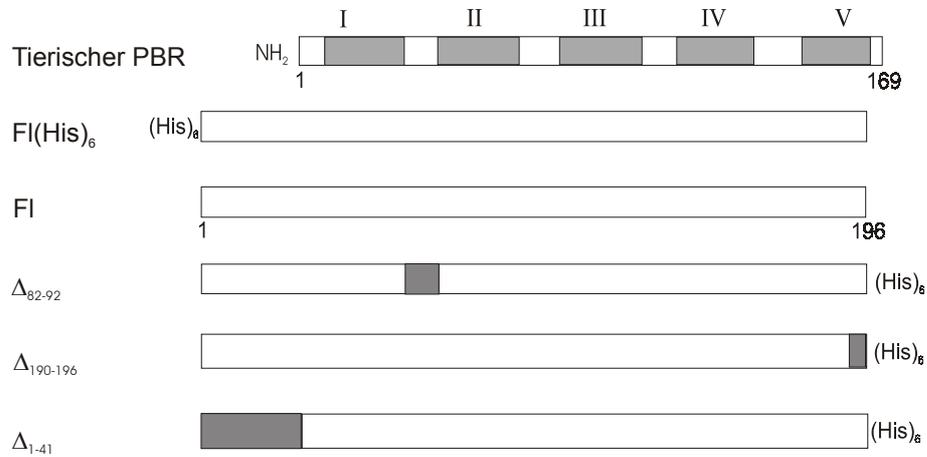


Abbildung 12: Deletionsmutanten des pflanzlichen PBR-homologen Proteins im Vergleich zu dem tierischen PBR. Deletierte Bereiche sind dunkel schattiert dargestellt. Die Membran-durchspannenden Segmente des tierischen PBR sind schattiert und mit römischen Zahlen markiert.

3.5.2 Cholesterol- und Protoporphyrin IX- Aufnahme

Cholesterol und Protoporphyrin IX wurden in verschiedenen Konzentrationen bis zu 40 μM in der Gegenwart eines Liganden zugegeben. Nur die Protoplasten von *E. coli* Zellen, die die vollständige PBR-Sequenz (FI) enthielten, und die Deletionsmutante Δ_{1-41} zeigten eine signifikant stimulierte Cholesterol- und Protoporphyrin IX-Aufnahme, ähnlich der der isolierten Mitochondrien. Bei der Cholesterolaufnahme sind die Substratbindungskonstanten K_S fast gleich, während die Deletionsmutante Δ_{1-41} eine 10-fach schnellere maximale Aufnahme zeigte. Die K_S -Werte der Protoporphyrin IX-Aufnahme sind etwas niedriger als die der Cholesterolaufnahme. Die Werte der maximalen Aufnahmegeschwindigkeiten sind größer (Tab. 5).

Der Klon FI(His)₆ nimmt nur Protoporphyrin IX auf, kein Cholesterol. Die für die Protoporphyrin IX-Aufnahme bestimmte Substratbindungskonstante K_S ist ungefähr so groß wie die des Klonen FI und der Deletionsmutante Δ_{1-41} . Die maximale

Aufnahmegeschwindigkeit für Protoporphyrin IX ist jedoch die geringste dieser drei Klone.

Die Deletionsmutante Δ_{82-92} zeigte keine Cholesterol-oder Protoporphyrin IX-Aufnahme.

Aus den graphischen Darstellungen wurden die entsprechenden K_s - und V_{max} -Werte abgeleitet.

Aufnahme	Protoporphyrin IX		Cholesterol	
	$K_s \mu\text{M} \times \text{L}^{-1}$	$V_{max} \text{pM} \times \text{s}^{-1}$	$K_s \mu\text{M} \times \text{L}^{-1}$	$V_{max} \text{pM} \times \text{s}^{-1}$
Fl	1,9	145,0	8,6	1,6
Fl(His) ₆	2,9	16,4	-	-
Δ_{1-41}	2,1	81,7	9,2	11,0
Δ_{82-92}	-	-	-	-

Tabelle 5: Substratbindungskonstanten K_S und maximale Aufnahmegeschwindigkeiten V_{max} der Protoporphyrin IX- und Cholesterolaufnahme der Full-length-Klone und Deletionsmutanten.

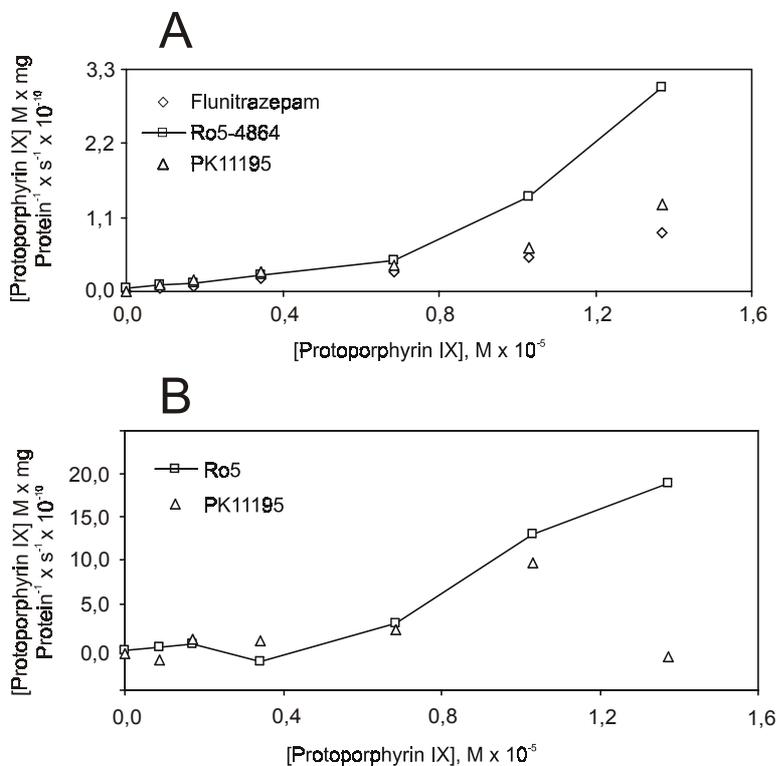


Abbildung 13:

A: Spezifische Protoporphyrin IX-Aufnahme des Klones Fl(His)₆, stimuliert durch verschiedene Liganden, Ro5-4864 hat den stärksten Einfluß.

B: Spezifische Protoporphyrin IX-Aufnahme der Deletionsmutante Δ_{1-41} , stimuliert durch Ro5-4864 und PK 11195, Ro5-4864 hat den stärkeren Einfluß.

3.5.3 Bindung von Benzodiazepinen und Isoquinolincarboxamid PK 11195

Die untersuchten Deletionsmutanten und Full-length-Klone weisen spezifische Bindung von 10% bis über 40% zu Ro5-4864 und PK 11195 auf (Abb. 14). Aufgrund der hohen spezifischen Bindung des Klones Fl und der Mitochondrien zu Ro5-4864 wurden fast alle weiteren Versuche mit Ro5-4864 durchgeführt. Flunitrazepam zeigte keine spezifische Bindung. Der Klon Fl(His)₆ wurde im Rahmen dieser Versuchsreihe (Abb. 14) nicht auf Ro5-4864-Bindung getestet, spätere Versuche bestätigten eine spezifische Ro5-4864-Bindung.

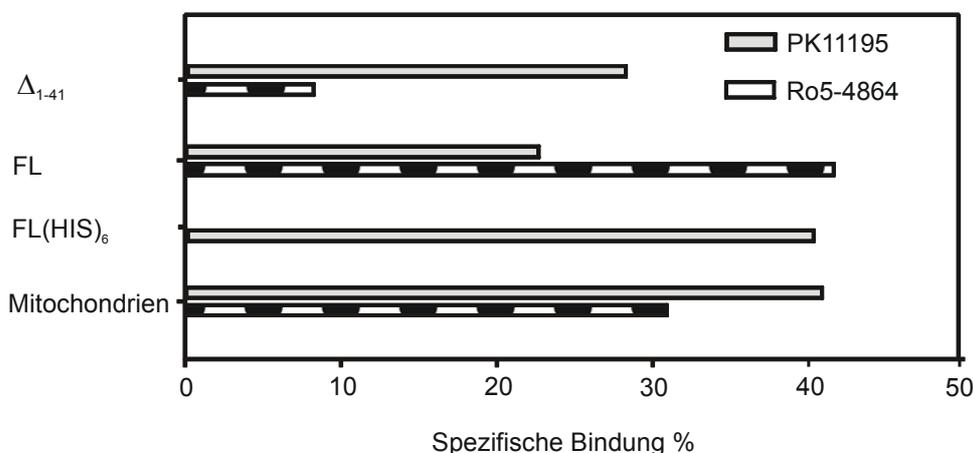


Abbildung 14: Ergebnisse der Bindungsstudien der Bindung von PK 11195 und Ro5-4864 der Full-length-Klone, Deletionsmutante Δ_{1-41} und der isolierten *A. thaliana*-Mitochondrien - Angabe der spezifischen Bindung in Prozent. Die Bindung von Ro5-4864 an Fl(His)₆ wurde hier nicht untersucht.

Die Ergebnisse der Bindungsstudien wurden mit der Methode nach Scatchard analysiert. Es wurden die zugehörigen Dissoziationskonstanten K_D und die maximale Zahl der Bindungsstellen B_{max} ermittelt. In Tab. 6 sind die Parameter für die hoch affine Bindungsstelle der Ro5-4864 Bindung angegeben (3.3.). Die K_D Werte für die niedrig affine Bindungsstelle liegen im mikromolaren Bereich. Es konnten keine reproduzierbaren B_{max} Werte für diese Bindungsstelle ermittelt werden.

Ro5-4864 Bindung		
	K_D pM	B_{max} pmol x mg Protein ⁻¹
Fl(His) ₆	18,0	26,8
Δ_{1-41}	9,5	31,8
Δ_{82-92}	6,7	7,6

Tabelle 6: Dissoziationskonstanten K_D und maximale Anzahl der Bindungsstellen B_{max} der Ro5-4864-Bindung eines Full-length-Klones und der untersuchten Deletionsmutanten.

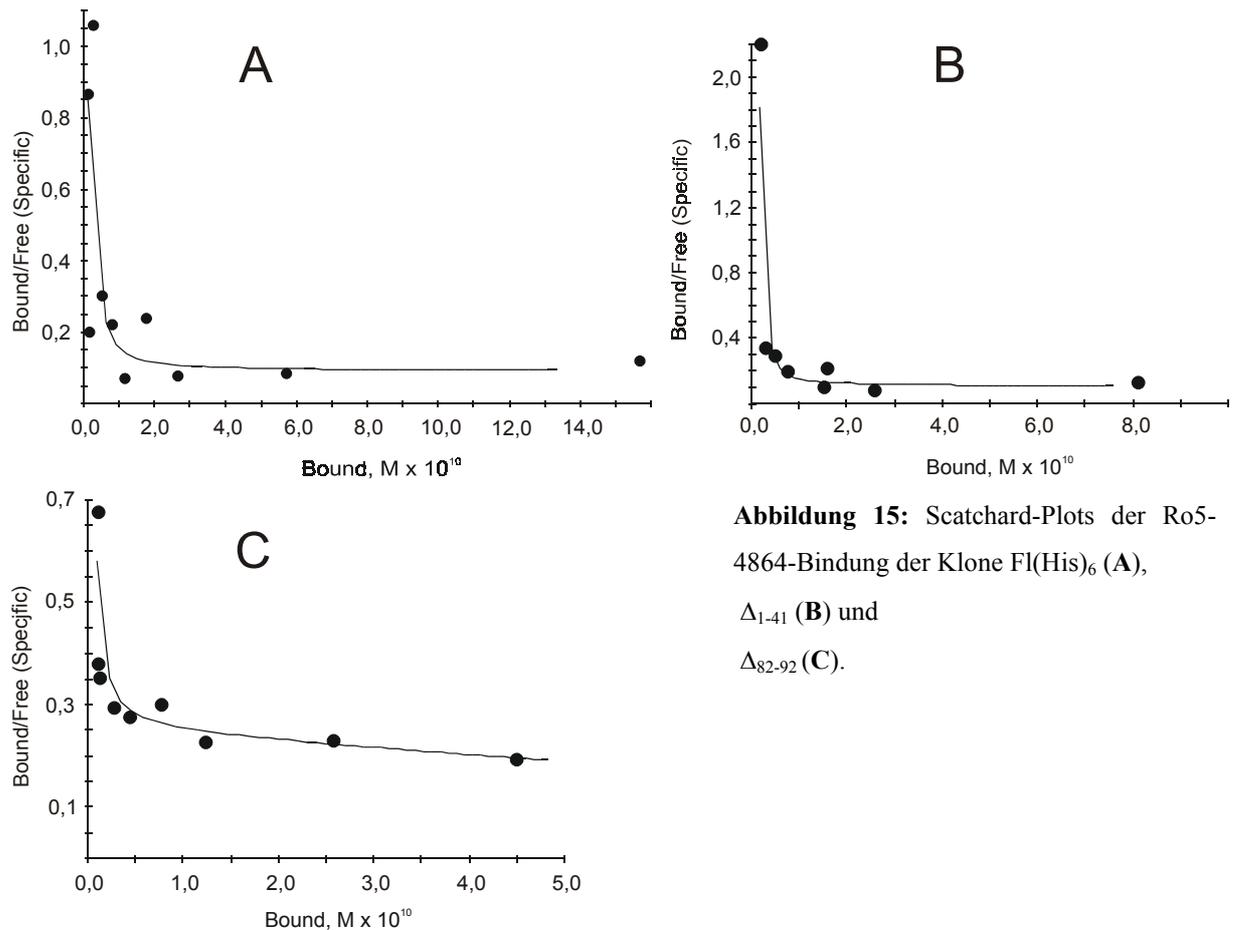


Abbildung 15: Scatchard-Plots der Ro5-4864-Bindung der Klone Fl(His)₆ (A), Δ_{1-41} (B) und Δ_{82-92} (C).

3.6 Two-Hybrid-Analyse zur Identifizierung von Interaktionspartnern des pflanzlichen PBR-homologen Proteins

3.6.1 Two-Hybrid-Analyse

Über die Funktionen des pflanzlichen PBR-homologen Proteins gibt es bisher keine weiteren Arbeiten. Mittels der Two-Hybrid-Methode wurde nach Proteinen gesucht, die

mit dem pflanzlichen PBR-homologen Protein interagieren, um Aufschluß über die Funktionen, z. B. Transportvorgänge innerhalb der Zelle, zu bekommen.

Die Sequenz des pflanzlichen PBR-Analogons aus *A. thaliana* wurde in den DNA-BD-Klonierungs-Vektor pGBT9 kloniert. Der *Saccharomyces cerevisiae* Reporterstamm Y190 wurde mit dem rekombinanten Plasmid pGBT9 transformiert. Als Kontrolle wurde das DNA-BD-Protein auf eine eventuell mögliche alleinige Transkriptionsaktivierung getestet. Da dies nicht der Fall war, konnte nun das Screening der AD-fusionierten *A. thaliana* MATCHMAKER cDNA Bibliothek durchgeführt werden. Der bereits pGBT9-transformierte Hefestamm wurde in einem zweiten Transformationsschritt mit der MATCHMAKER cDNA Bibliothek (Klonierungsvektor pGAD 10) transformiert. Die Hefen wurden anschliessend auf Selektivmedium ausplattiert. Die Selektion erfolgt über eine Aminosäure-Auxotrophie, die im Hefegenom festgelegt ist. So konnten nur Hefekolonien wachsen, die aufgrund der Anwesenheit des DNA-BD-Vektors Tryptophan, des AD-Vektors Leucin und nach Aktivierung des Reportergenes Histidin bildeten. Die entsprechenden Hefekolonien, die die His⁺, Trp⁺, Leu⁺ Transformanten darstellen, wurden einem β -Galactosidase-Filter-Assay unterzogen. In vier Durchgängen wurden insgesamt $2,5 \times 10^6$ Kolonien durchmustert. Dabei wiesen 7 Hefekolonien das aktivierte *lacZ*-Reporter gen auf, d.h. sie konnten durch Zusatz von X-Gal angefärbt werden. Es erfolgte eine Plasmid isolation aus diesen Hefekolonien und Transformation in den *E. coli*-Stamm KC 8. Die Transformation wurde mittels Elektroporation ausgeführt. Dieser Bakterienstamm hat die Besonderheit, ebenfalls über eine im Genom festgelegte Aminosäure-Auxotrophie wie der verwendete Hefestamm zu selektieren. Somit konnten auf entsprechendem Leu⁻-Selektivmedium nur die Bakterienkolonien wachsen, die ein Bibliotheksplasmid mit der codierenden Sequenz für ein neues interagierendes Protein enthielten. Nach Plasmid isolation aus dem *E. coli*-Stamm KC 8, Restriktionsanalyse und Sequenzierung wurden 3 verschiedene Sequenzen ermittelt.

Sequenz I kodiert für ein putatives Membranprotein, die gesamte Größe beträgt 639 bp. Es war jedoch nur ein Fragment im Bibliotheksvektor kloniert. Die Sequenzierung zeigte, daß ein Protein erst ab Aminosäure 125 bis 212 exprimiert werden konnte. Das theoretische Molekulargewicht beträgt für das gesamte Protein 23,89 kDa und für das Fragment 9,8 kDa. Der zugehörige Datenbankeintrag ist unter der Zugangsnummer Q9FVUO (TREMBL) zu finden.

Sequenz II mit einer Größe von 1462 bp kodiert für ein Protein unbekannter Funktion und war vollständig. Das theoretische Molekulargewicht für das Protein beträgt 54,08 kDa, die Zugangsnummer ist Q9SGQO (TREMBL).

Sequenz III umfaßt 828 bp im offenen Leserahmen und kodiert wahrscheinlich eine Ribose-5-Phosphat-Isomerase mit einem Molekulargewicht von 29,3 kDa und der Zugangsnummer Q9S726 (TREMBL). Die Zuordnung für die Funktion dieses Proteins erfolgte in der *Arabidopsis* Genom Datenbank aufgrund der Homologie zu anderen Ribose-5-Phosphat-Isomerasen mit nachgewiesener Funktion.

3.6.2 Überprüfung der Bindung in der direkten Interaktion

Es wurden als Kontrolle die 3 cDNA-Sequenzen mittels PCR amplifiziert, in den AD-Klonierungsvektor pGAD424 kloniert und ein weiterer Two-Hybrid-Interaktionstest durchgeführt. Dafür wurden die beiden Fusionsplasmide pGBT9 und pGAD424 nacheinander in den Hefestamm Y190 transformiert (Gietz et al., 1997), wiederum auf Selektivmedium ausplattiert und die entsprechenden His⁺, Trp⁺, Leu⁺ Transformanten einem β -Galactosidase-Filter-Assay unterzogen. Vom Interaktionspartner I wurde die verkürzte (AS 125-212) und die volle Länge der Sequenz einkloniert. Außerdem wurde als Negativkontrolle der Leervektor pGAD424 in die Hefe transformiert. Somit wurden 5 Hefeklonen getestet: die drei cDNA-Sequenzen (I, II, III) in voller Länge und Sequenz I verkürzt (Ik) im pGAD424-Vektor sowie der Vektor allein ohne Insert, die jeweils zusammen mit dem DNA-BD-Vektor in die Hefen transformiert wurden. Der durchgeführte β -Galactosidase-Filter-Assay zeigte nun eine Blaufärbung, eine Aktivierung des Reportergenes und damit die Interaktion zwischen dem pflanzlichen PBR-Homologon und dem Proteinfragment Ik, dem gesamten Protein II und III. Die Negativkontrolle bestätigte, daß ohne einen Proteininteraktionspartner (Vektor ohne Insert) keine Aktivierung des Reportergenes stattfand. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 und Abbildung 16 zusammengefaßt.

Ergebnisse

DNA-BD-Fusion mit pflanzlichen PBR-homologen Protein im Vektor pGBT9

AD-Fusion mit... im Vektor pGAD424	Name	keine, IIDleer	I, IkD ¹	I, ID	II, IID	III, IIID
β-Galactosidase-Filter- Assay		-	+	-	+	+

1 „k“ bedeutet verkürzte Sequenz (AS 125-212), entspricht dem in der Two-Hybrid-Analyse der *A. thaliana* cDNA Bibliothek aufgefundenem Sequenzfragment.

Tabelle 7: Ergebnisse der Kontrolle der Two-Hybrid-Analyse zur Identifizierung von Interaktionen des pflanzlichen PBR-homologen Proteins. Es wurden Interaktionen mit dem Proteinfragment Ik, dem Protein II und III festgestellt.



Abbildung 16: Die jeweils mit dem pflanzlichen PBR-homologen Protein und den Proteinen I, Ik, II oder III transformierten Hefen sowie die Negativkontrolle auf Selektivmedium (links) und der von dieser Platte abgenommene β-Galactosidase-Filter-Assay (rechts).

Die Blaufärbung war bei den, die Proteine Ik, II, und III enthaltenen Hefen zu beobachten.

Somit konnte hier die Bindung für das pflanzliche PBR-homologe Protein mit 3 verschiedenen Proteinen bestätigt werden. Diese Interaktionen sollten nun durch einen anderen Versuchsansatz überprüft werden.

3.7 GST-Pull-Down Assay

Glutathion S-Transferase (GST)-Fusionsproteine können über eine Bindung an Glutathion-Sepharose selektiv isoliert werden. Damit können Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen durchgeführt werden. In Anlehnung an die Versuchsdurchführung von Li et al. (2001) wurden GST-Fusionsproteine mit den 3 verschiedenen „Pray-Proteinen“ hergestellt (hierbei wieder Protein I verkürzt und in gesamter Länge). Es ergab sich zunächst das Problem, daß die verschiedenen Proteine exprimiert wurden, sich aber nach Bakterienaufschluss in der unlöslichen Fraktion, eventuell in Einschluss-Körperchen, befanden (Abb.17).

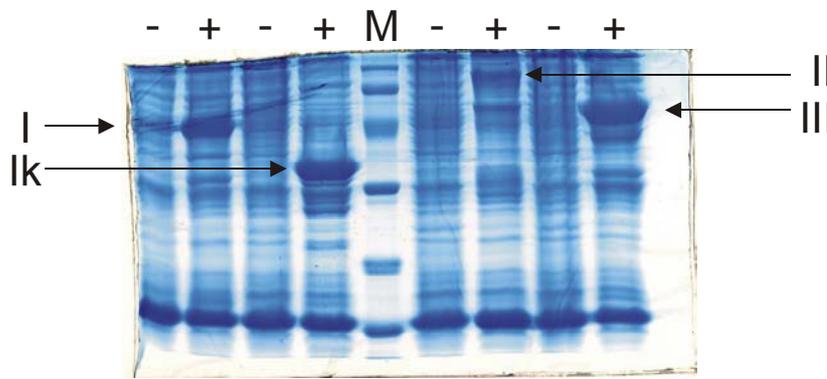


Abbildung 17: SDS-Page mit anschließender Coomassiefärbung der Proben aus dem Präzipitat der *E. coli*-Zellen (unlösliche Fraktion). + bzw. – bedeuten mit oder ohne IPTG Induktion. Der Marker (2.1.8.) weist Proteinbanden in den Größen von 94, 67, 43, 30, 20,1 und 14,4 kDa auf. Die GST-Fusionsproteine haben eine Größe von I: 52,9 kDa, Ik: 38,8 kDa, II: 83 kDa und III: 58,3 kDa.

Änderungen der Wachstumsbedingungen wie Erniedrigung der Temperatur und gleichzeitige Verlängerung der Induktionszeit, Erniedrigung der IPTG Konzentration bis zu 0,1 mM sowie Erhöhung der Belüftung führten nicht zu löslichen Fusionsproteinen. Die Aufarbeitung erfolgte schließlich nach Frangioni and Neel (1993), bei der die Einschluss-Körperchen mit dem anionischen Detergens N-Laurylsarkosin aufgelöst wurden und die Fusionsproteine zur weiteren Untersuchung zugänglich waren. Die Fusionsproteine wurden unter Verwendung einer Säule an Glutathion Sepharose gebunden. Auf diese Affinitätssäule wurde anschließend eine lösliche Mitochondrienpräparation gegeben. Die Mitochondrienfraktion wurde nach Krueger und Papadopoulos (1990) behandelt, um das

pflanzliche PBR-homologe Protein als solubilisiertes Membranprotein zur Verfügung zu haben.

Es wurde somit die Möglichkeit geschaffen, daß das pflanzliche PBR-homologe Protein aus den Mitochondrien von *A. thaliana* mit den GST-fusionierten, aufgereinigten Proteinen interagieren kann. Sollte dies der Fall sein, so müsste sich der jeweilige Proteinkomplex der miteinander in Verbindung getretenen Proteine mittels Glutathion-Elutionspuffer von der Säulematrix lösen lassen. Zwischen den Auftragungen der Proteine auf die Säule erfolgten Waschschrte mit dem 20-50fachen Säulenvolumen. Dies war notwendig, um möglichst viele Fremdbestandteile z.B. aus dem Bakterienlysat zu entfernen. Die gereinigten und eluierten Proteine wurden anschließend in einer SDS-Page aufgetrennt und im Western Blot durch Antikörperdetektion das interagierende pflanzliche PBR detektiert. Dieser Versuchsansatz wurde mit den vier Fusions-Proteinen (GST-Gen mit Sequenzen I, Ik, II, und III) und als Negativkontrolle mit dem reinen GST-Protein ohne Fusion durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß nur das verkürzte Protein Ik und Protein II mit dem pflanzlichen PBR-homologen Protein interagierten.

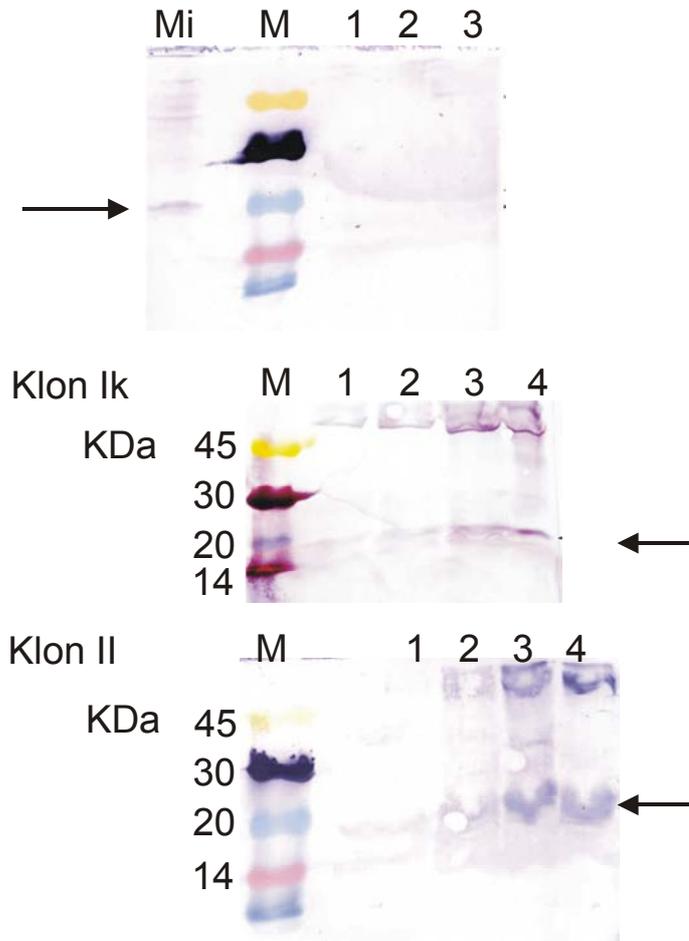


Abbildung 18: Western-Blot der jeweils ersten 3 oder 4 Proteinfractionen des GST-Pull-Down Assay mit den Proteinen Ik und II sowie die Negativkontrolle, bei der isolierte Mitochondrien [Mi] mit untersucht wurden.

Im Vergleich zum vorgefärbten Molekulargewichtsmarker [M] wurden vom Antikörper (2.2.8.) in einer Größe von knapp 20 kDa das pflanzliche PBR-homologe Protein (Pfeil) in den Mitochondrien von *A. thaliana* und bei dem GST-Pull-Down Assay mit dem Protein Ik und dem Protein II detektiert.

Bei der Negativkontrolle konnte durch das Nicht-Stattfinden einer Interaktion auch kein pflanzliches PBR-homologes Protein detektiert werden.

4 Diskussion

4.1 Vorkommen von PBR und PBR-Pflanzenhomologen

Die am meisten bearbeiteten PBR-Sequenzen im Säugetier sind die von der Ratte, der Maus, dem Rind und die PBR-Sequenz vom Mensch.

Datenbankrecherchen führten uns, ausgehend vom PBR im Tier, zu pflanzlichen PBR-homologen Sequenzen. Ihre Anzahl ist in den letzten Jahren auf über 30 angestiegen. Es gibt bereits Datenbankeinträge (InterPro), die TspO- und MBR verwandte Proteine in Pflanzen beschreiben. Für *Physcomitrella*, *Medicago* und *Lycopersicon* wurden jeweils zwei nicht identische Sequenzen beschrieben, die auf die Anwesenheit von Isoformen oder Familien von Transportproteinen hinweisen (Tab. 8). Das Vorkommen dieses Proteins ist nicht beschränkt auf die in dieser Arbeit untersuchten Pflanzen, sondern umfaßt Vertreter von niederen Pflanzen wie Rotalgen, Moose und die hochentwickelten Dikotyledonen-Pflanzenfamilien. Somit kann das pflanzliche PBR-homologe Protein als weit verbreitet und daher wahrscheinlich ubiquitär vorkommend angesehen werden (Abb. 19).

Es gibt weiterhin Untersuchungen von einem bakteriellen PBR-Homologen, dem Tryptophan-reichen Sensorischen Protein (TspO) in *Rhodobacter* (Yeliseev et al., 1997; Yeliseev und Kaplan 1995, 1999, 2000). Die α -3-Unterabteilung der Purpurbakterien (Proteobakterien), zu der *Rhodobacter* zählt, wird als mögliche Quelle der Endosymbionten, die zu den Mitochondrien führen, angesehen. Auch das Vorkommen eines PBR/TspO-Homologen in Cyanobakterien, die mögliche Vorstufe von pflanzlichen Plastiden, wird beschrieben (Yeliseev et al., 1997). Die Homologie des Proteins aus Cyanobakterien zu allen in Tabelle 8 aufgelisteten Sequenzen ist allerdings niedriger (12%-20% identische Aminosäuren). Das läßt darauf schließen, daß die untersuchten pflanzlichen PBR-Homologen ihren Ursprung in der Gruppe der α -Proteobakterien haben. Die relativ geringe Anzahl übereinstimmender Aminosäuren sowie die Verbreitung des pflanzlichen PBR-homologen Proteins in weit entfernten Ordnungen könnte die Ursache dafür sein, daß es nicht möglich war, eine Sequenz aus *D. lanata* zu bestimmen.

Betrachtet man allerdings die Einbindung des PBR in die Tetrapyrrolbiosynthese der Säugetiere und das Vorkommen der Porphyrine aufgrund ihrer Elektronentransferfunktion in praktisch allen Zellen, kommt man zu dem Schluß, daß der PBR eine „Housekeeping-Funktion“ innehaben könnte.

Tabelle 8: Die prozentualen Identitäten der verschiedenen PBR-Homologen wurden durch ein Alignment ohne „End-gap-Funktion“ analysiert. Der phylogenetische Stammbaum (Abb. 19) wurde mit Hilfe dieser Daten erstellt (entnommen aus Lindemann et al., eingereicht).

Acc.No	Länge	Spezies	Beschreibung	Identitäten in %		
				Q9R9N7	O82245	Q13850
Q9R9N7	164	<i>Rhizobium meliloti</i>	TSPO ^a	-	20.6	34.5
P17057	160	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	CRTK ^b	41.0	16.3	26.3
Q54791	158	<i>R. sphaeroides</i>	TSPO ^c	38.4	20.6	27.8
AV434051	130	<i>Porphyra yezoensis</i>	EST ^c	29.2	18.3	21.5
AV438145	138	<i>Porphyra yezoensis</i>	EST ^c	32.5	17.7	31.8
AU081713	180	<i>Marchantia polymorpha</i>	EST	37.8	19.9	31.7
AW476860	162	<i>Physcomitrella patens</i>	EST ^d	43.8	19.8	33.1
AW561667	149	<i>Physcomitrella patens</i>	EST ^{c,d}	41.3	18.1	32.2
AI725033	167	<i>Pinus taeda</i>	EST ^d	38.5	21.1	28.7
BE040003	173	<i>Oryza sativa</i>	EST ^c	9.7	11.7	11.4
AU089526	97	<i>Lotus japonicus</i>	EST ^c	11	22.5	13.2
AW686397	209	<i>Medicago trunculata</i>	EST ^e	17.0	34.9	16.3
AW684107	203	<i>Medicago trunculata</i>	EST ^e	18.5	33.0	17.1
AW568173	148	<i>Glycine max</i>	EST ^c	23.7	35.2	19.8
AW031978	140	<i>L. esculentum</i>	EST ^{c,f}	21.3	33.7	20.7
AI782627	135	<i>L. esculentum</i>	EST ^{c,f}	20.7	32.1	18.9
O82245	196	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TREMBL	20.6	-	19.6
P16257	169	<i>Rattus rattus</i>	PBR	38.2	17.6	78.1
L17306	169	<i>Mus musculus</i>	PBR	38.2	19.1	78.1
P30535	169	<i>Bos taurus</i>	PBR	36.3	21.8	88.8
Q13850	169	<i>Homo sapiens</i>	PBR	34.5	20.5	-

^a Durch Homologie.

^b Armstrong et al. 1989.

^c Fragment.

^d Die *Physcomitrella* ESTs weisen 95.8% Identität untereinander auf.

^e Die *Medicago* ESTs weisen 81.8% Identität untereinander auf.

^f Die *Lycopersicon* ESTs weisen 95.7% Identität untereinander auf.

Aus Tabelle 8 ist ersichtlich, daß die niederen Pflanzen (*Porphyra*, *Marchantia*, *Physcomitrella*, *Pinus*) die höchsten Homologien zu Bakterien aufweisen, das würde auch einer entwicklungsgeschichtlichen Ableitung entsprechen. Bei den höheren Pflanzen (*Lotus*, *Medicago*, *Glycine*, *Lycopersicon*, *Arabidopsis*) sind die Homologien innerhalb der Sequenzen der höheren Pflanzen am größten. Von allen aufgeführten Sequenzen haben jedoch die Säugetiersequenzen mit 78-88 % identischen Aminosäuren den höchsten Grad der Homologie aufzuweisen.

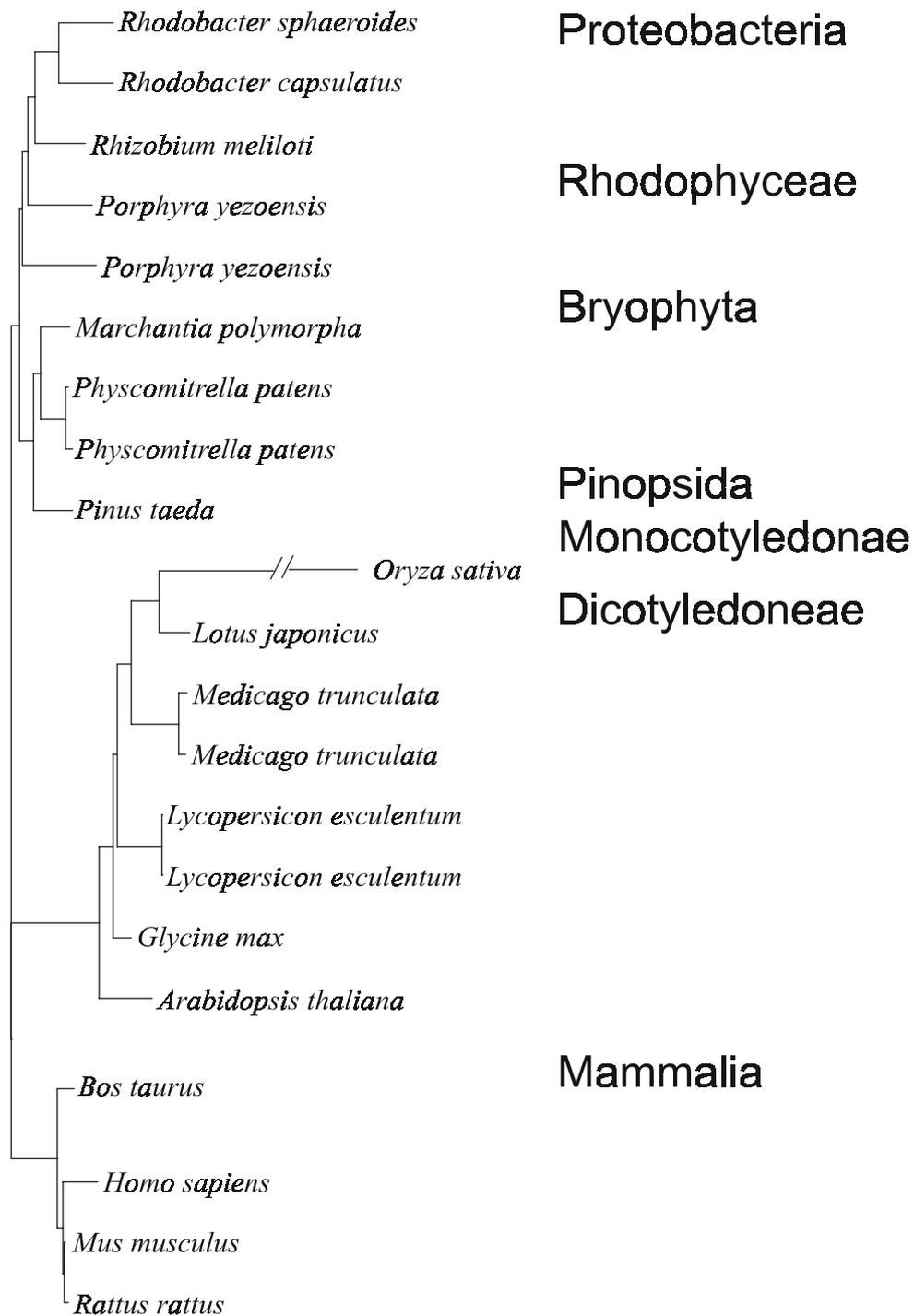


Abbildung 19: Phylogenetischer Stammbaum der pflanzlichen PBR-homologen Proteine, des CrtK und TspO-Proteins und der PBR im Säugetier. Der Stammbaum wurde aus den Sequenzen erstellt, die für Tabelle 8 genutzt wurden. Dieser Stammbaum zeigt, daß das pflanzliche PBR-homologe Protein dieselbe phylogenetische Entfernung zu den CrtK/TspO Proteinen wie zu den PBR in Säugetieren aufweist (entnommen aus Lindemann et al., eingereicht).

4.2 Sequenzanalyse

Das pflanzliche PBR-homologe Protein weist ungefähr 20% Identität mit den *Rhodobacter* TspO Proteinen und den PBR-Proteinen der Säugetiere auf.

Unter den Gruppen von Proteinsequenzen, die sich von ESTs ableiten, befindet sich eine Gruppe mit einem ungefähr 40 Aminosäuren längeren Aminotermus (*Arabidopsis* und *Medicago*), die ein rechnerisches Molekulargewicht von 21 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 9,3 aufweisen.

Immuno-Blot-Analysen und Photoaffinitätsstudien zeigten, daß das pflanzliche mitochondriale Protein aus *D. lanata* ein Molekulargewicht zwischen 18 und 20 kDa aufweist (Lindemann et al., 2000). Das *A. thaliana* rekombinante Protein konnte mit einem Molekulargewicht von ungefähr 20 kDa durch Immuno-Blot-Analyse detektiert werden (Abb. 18). Die Differenzen zwischen der detektierten Größe und dem rechnerischen Molekulargewicht können auf den ungewöhnlichen isoelektrischen Punkt von 9,34 zurückgeführt werden. Auch das tierische PBR mit einem isoelektrischen Punkt von 9,72 weist eine solche Abweichung in der SDS-Page auf (siehe Abbildung in Krueger et al., 1990).

Das pflanzliche PBR-homologe Protein und die PBR-Proteine der Säugetiere weisen kein Targeting-Signal auf, wenn man die Analysenmethode von Claros et al. (1996) nutzt.

Die Aminosäuresequenz in *A. thaliana*, die der PK 11195 Bindungsstelle im Säugetier entspricht (AS 82-92, Li and Papadopoulos, 1998), ist die am höchsten konservierte Region bei allen verglichenen Sequenzen (vergleiche Abb.11).

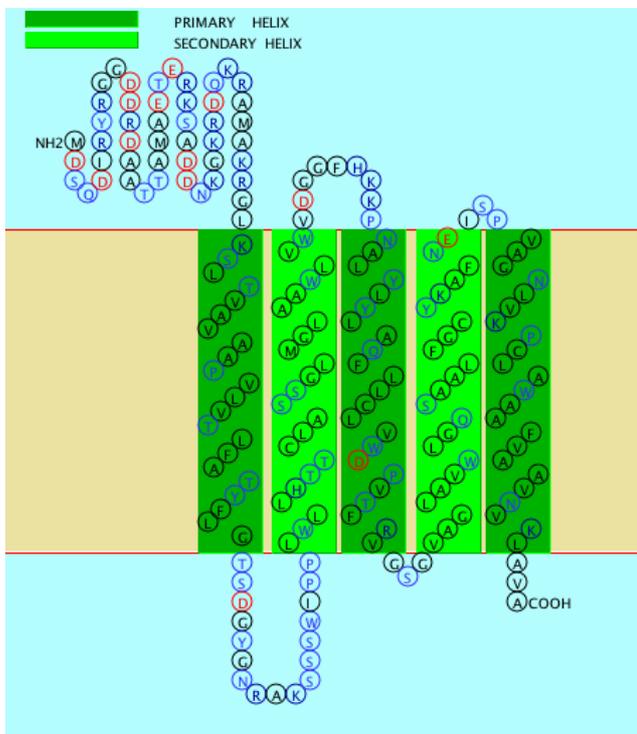
Die PK 11195 Bindungsstelle (AS 41-51) im Säugetier scheint mit der Bindungsstelle für Protoporphyrin IX zu überlappen. In der Pflanze (Verdrängungsstudien mit *D. lanata*- und *A. thaliana*-Mitochondrien) dagegen scheinen Ro5-4864 und Protoporphyrin IX überlappende Bindungsstellen zu haben. Die Deletionsmutante Δ_{82-92} , bei der diese Bindungsstelle entfernt wurde, zeigt weder Protoporphyrin IX- noch Cholesterolaufnahme. Das weist darauf hin, daß diese Stelle funktionell bedeutsam ist. Li und Papadopoulos (1998) berichten von einer korrespondierenden Deletionsmutante des PBR im Säugetier eine erniedrigte Bindungsfähigkeit für PK 11195, aber keinen Einfluß auf die Cholesterolaufnahme.

[³H] Ro5-4864 kann mit PK 11195 verdrängt werden (Papadopoulos, 1993; Li and Papadopoulos, 1998). Beide Bindungsstellen befinden sich an der cytosolischen Seite der

äußeren mitochondrialen Membran (vergleiche Abb.4). Joseph-Liauzun et al. (1998) diskutierten auch, daß der Carboxyterminus auf derselben Seite der Membran zu finden ist und V154 die Ro5-4864 Bindung beeinflussen kann. Weiterhin wurde durch Mutagenese- und Bindungsexperimente gezeigt, daß sich E29, R32 und K39 in Form einer Schleife im Cytoplasma befinden und die Ro5-4864 Bindung beeinflussen (siehe Abb. 4). Diese Region ist nur schwach konserviert.

Der im Säugetier für die Cholesterolaufnahme bedeutende Carboxyterminus ist im *A. thaliana*-Homologon verkürzt. Genaue Untersuchungen mit der Deletionsmutante $\Delta_{180-196}$ konnten nicht mehr durchgeführt werden.

Für den tierischen PBR wurden fünf Transmembrandomänen bestimmt, welche eine



kanalähnliche Struktur bilden. Das unterstützt die Vorstellung vom PBR als Transportprotein in der mitochondrialen Membran (siehe 1.4.). Für das pflanzliche PBR-homologe Protein werden ebenfalls fünf Transmembranbereiche vorhergesagt (Abb. 20). Aufgrund der Vorstellungen für den tierischen PBR und der Untersuchungen am pflanzlichen PBR-homologen Protein, kann man auch hier eine kanalähnliche Struktur annehmen.

Abbildung 20: Vorhersage der Transmembransegmente (Methode nach Hirokawa et al., 1998) des pflanzlichen PBR-homologen Proteins aus *A. thaliana*. Die Transmembranhelices sind denen aus der Arbeit von Joseph-Liauzun et al. (1998) für ein tierisches PBR homolog (siehe Abb. 4). Δ_{1-41} entspricht dem N-terminalen Bereich bis M41 vor der Transmembranhelix I. Δ_{81-91} umfaßt ungefähr den Bereich zwischen den Transmembranhelices I und II.

4.3 Cholesterolaufnahme von *D. lanata*-Blättern und von isolierten Mitochondrien

Der PBR im Säugetier ist in den Mechanismus der Cholesterolaufnahme und des Transports von der äußeren zur inneren mitochondrialen Membran eingebunden (Papadopoulos, 1998; Li und Papadopoulos, 1998).

In der Pflanze *Digitalis lanata* ist der erste Schritt bei der Bildung von Herzglykosiden die Pregnenolonbiosynthese ausgehend von Cholesterol und Sitosterol. Weiterhin wird angenommen, daß die Verfügbarkeit von Cholesterol für ein mitochondriales Seitenkettenspaltendes Enzym auch ein regulativer Schritt in der Cardenolidbiosynthese sein kann (Lindemann und Luckner, 1997).

Daher wurde für das pflanzliche PBR-homologe Protein die Cholesterolaufnahme zunächst durch Inkubation von Blattstückchen mit Cholesterol und verschiedenen Liganden des tierischen PBR und anschließender Zellfraktionierung untersucht. Genauer wurde die Aufnahme dann an isolierten Zellorganellen untersucht. Damit konnte gezeigt werden, in welche Zellorganellen, durch Liganden beeinflußt, Cholesterol aufgenommen wird (3.1 und 3.2.).

Die Cholesterolaufnahmestudien an Blättern und isolierten Mitochondrien führten zu widersprüchlichen Ergebnissen.

Die Inkubation von Blättern mit Cholesterol führt in den Mitochondrien zu einer Cholesterolakkumulation, die durch PK 11195 und etwas schwächer durch Ro5-4864 inhibiert wird (3.1.). Die Cholesterolinkubation von isolierten Mitochondrien führte ebenfalls zu einer Akkumulation, die jedoch durch Flunitrazepam, Ro5-4864 oder PK 11195 stimuliert werden konnte. Den stärksten Effekt zeigte PK 11195 (3.2.). Diese Gegensätzlichkeit kann erklärt werden durch die Funktion des PBR als Kanal, welches den Cholesteroltransport mit einem Konzentrationsgradienten ermöglicht, wie er von Li et al. (1998) diskutiert wird. Bei einer Inkubation der Organellen in einem Medium, das 50 µM Cholesterol enthält, wird diese Konzentration höher gewesen sein als die Cholesterolkonzentration in den Mitochondrien. Somit kommt es zum Influx in Gegenwart stimulierender PBR-Liganden. Die Blattstückchen wurden ebenfalls mit 50 µM Cholesterol inkubiert. Das Cytosol der inkubierten Blätter konnte jedoch nie eine solche Konzentration erreichen, deshalb kommt es wahrscheinlich sogar zum Efflux aus den Mitochondrien in der Gegenwart von PK 11195.

4.4 Charakterisierung der Full-length-Klone, Deletionsmutanten und des nativen Proteins in Mitochondrien

4.4.1 Cholesterol- und Protoporphyrin IX- Aufnahme

Die Cholesterol- und Protoporphyrin IX-Aufnahme verhält sich bei den Mitochondrien, den Full-length-Klonen und der Deletionsmutante Δ_{1-41} ohne wesentliche Unterschiede gleich. Das läßt darauf schließen, daß der Aminoterminus hier keine Funktion hat.

Geringe Unterschiede weisen die Substratbindungskonstanten für Protoporphyrin IX und Cholesterol auf. Die etwas niedrigeren K_S -Werte (Tab.5) weisen auf eine Bevorzugung von Protoporphyrin IX als Substrat hin.

Untersuchungen an *D. lanata*-Mitochondrien zeigten, daß Protoporphyrin IX als Substrat für den Transport akzeptiert wird, nicht aber das Häm. Das läßt darauf schließen, daß das pflanzliche PBR-homologe Protein relativ spezifisch mit Protoporphyrin IX reagiert, aber nicht allgemein mit Tetrapyrrolen, die z.B. einen Metallkern enthalten.

Die Untersuchungen mit dem Klon Fl(His)₆ zeigten nur eine Protoporphyrin IX-Aufnahme, Cholesterol wurde nicht aufgenommen. Es wurde hier das gesamte Protein exprimiert, für das eine vollständige Funktionalität erwartet wurde. Die N-terminalen Markierung bestehend aus 6 Histidinen beeinflußt eventuell das Aufnahmeverhalten. Bei einer Behinderung der Aufnahme könnte dann nur noch das Substrat aufgenommen werden, zu dem eine höhere Affinität besteht. Die Substratbindungskonstanten der untersuchten Klone sind für Protoporphyrin IX niedriger als für Cholesterol.

Die Deletionsmutante Δ_{82-92} zeigte weder Cholesterol- noch Protoporphyrin IX-Aufnahme. Daraus kann man ableiten, daß die AS 82-92 für die Regulation der Transportfunktion des pflanzlichen PBR-Proteins, analog des homologen Sequenzfragmentes des tierischen PBR (Li et al., 1998), funktionell bedeutsam sind.

Die Kurve der Cholesterolaufnahme der *A. thaliana*-Mitochondrien (Abb. 8 D), wie auch aller anderen Aufnahmestudien (wurde hier nicht gezeigt) fällt nach Erreichen eines Maximalwertes wieder ab. Es kommt wahrscheinlich bei Überschreiten einer bestimmten Konzentration zur Verdrängung des stimulierenden Liganden durch das transportierte Substrat (Wendler et al., eingereicht).

4.4.2 Bindung von Benzodiazepinen und Isochinolincarboxamid PK 11195

Isolierte Mitochondrien, die Full-length-Klone und die Deletionsmutanten Δ_{1-41} und Δ_{82-92} weisen spezifische Bindung zu Ro5-4864 und PK 11195 auf. Die Form der Kurve bei der Auftragung der Bindungswerte für Ro5-4864 (Abbildungen der Scatchard-Plots) läßt auf zwei Bindungsstellen schließen. Die Werte für die hoch affine Bindungsstelle, die Dissoziationskonstanten der *D. lanata*- und *A. thaliana*-Mitochondrien und der rekombinanten Proteine und die maximale Anzahl der Bindungsstellen liegen in ähnlichen Größenordnungen (K_D 6-21 pM, B_{max} 7-27 pmol x mg Protein⁻¹) und sind vergleichbar mit denen des PBR im Säugetier (Joseph-Liauzun et al., 1998).

Je kleiner die Dissoziationskonstante K_D ist, desto höher affin ist eine Bindung. Daher weisen auch die niedrigen Werte für die Dissoziationskonstanten auf eine hoch spezifische Bindung von Ro5-4864 hin.

Die K_D -Werte für die niedrig affine Bindungsstelle liegen im mikromolaren Bereich. Es war nicht möglich, reproduzierbare B_{max} -Werte für die niedrig affine Bindungsstelle zu bestimmen. Aus diesem Grund und den vergleichsweise sehr hohen K_D -Werten, die auf eine wenig affine und wenig spezifische Bindung schließen lassen, kann die niedrig affine Bindungsstelle vernachlässigt werden. Ähnliche Effekte wurden schon von Yeliseev und Kaplan (1999) bei der Expression von tierischem PBR in *Rhodobacter sphaeroides* beschrieben und als Akkumulation von radioaktiven Liganden in *R. sphaeroides* interpretiert.

An *D. lanata*- und *A. thaliana*-Mitochondrien und dem Klon Fl(His)₆ konnte eine Verdrängung von [³H] Ro5-4864 durch Protoporphyrin IX gezeigt werden. Diese Analyse erfolgte unter der Annahme einer Bindungsstelle. [³H] PK 11195 konnte nicht durch Protoporphyrin IX verdrängt werden. Daraus ergibt sich, daß die Bindungsstellen für Protoporphyrin IX und Ro5-4864 im pflanzlichen PBR-homologen Protein überlappen.

Beim tierischen PBR ist ein umgekehrtes Verhalten gezeigt worden. Hier läßt sich [³H] PK 11195 mit Protoporphyrin IX verdrängen, während [³H] Ro5-4864 nicht verdrängt werden kann (Wendler, 2002). Das läßt darauf schließen, daß im tierischen PBR (Maus) die Bindungsstellen für Protoporphyrin IX und PK 11195 überlappen, sozusagen in derselben Tasche sitzen.

Wahrscheinlich sind die Bindungsstellen für Ro5-4864, PK 11195, und Protoporphyrin IX sowohl im tierischen als auch wahrscheinlich im pflanzlichen PBR eng benachbart aber nicht identisch.

Verdrängungsstudien mit Cholesterol müssen mit einem steroidfreien System durchgeführt werden. Ein entsprechendes System stand für die Untersuchungen dieser Arbeit nicht zur Verfügung. Lacapere et al. (2001) haben das 18 kDa PBR-Protein der Maus exprimiert, gereinigt und in definierten Liposomen rekonstituiert. Mit diesen PBR-Liposomen wurde eine hochaffine Bindung von Cholesterol und PK 11195 gezeigt. Eine Verdrängung von Cholesterol konnte noch nicht gezeigt werden.

4.5 Interaktionspartner des pflanzlichen PBR-homologen Proteins

4.5.1 Two-Hybrid-Analyse

Das Hefe Two-Hybrid-System ist eine bedeutende *in-vivo*-Methode zum Identifizieren neuer Gene, die für Proteine kodieren, welche mit einem bekannten Protein interagieren. Die Fähigkeit, beide, ein interagierendes Protein und das dafür kodierende Gen zu identifizieren, macht das Two-Hybrid-System zu einem wichtigen Werkzeug (Gietz et al., 1997). Es ist die erste genetische und molekulare Methode, die *in vivo* ausgeführt wird und damit das interagierende Protein in seiner wahrscheinlich nativen Konformation bestimmt. Das Hefe Two-Hybrid-System und dabei das pflanzliche PBR-homologe Protein als „Bait“ (Köder) nutzend, wurden Interaktionen mit 3 verschiedenen Proteinen detektiert.

Die Anwendung des Two-Hybrid-Systems führte bisher zur Identifizierung ungezählter neuer interagierender Proteinpartner, ist aber dennoch begrenzt.

Sie kann nicht für alle Proteine angewandt werden. Einige erfordern Modifikationen wie Glykosilierungen, andere sind nur in spezifischen zellulären Kompartimenten und nicht im Zellkern aktiv (Gietz et al., 1997). Es können auch unerwartete Interaktionen bekannter Proteine festgestellt werden, die *in vivo* nicht auftreten (Chien et al., 1991), da sie dort in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert sind. Falsch-positive Klone können diese Interaktion vortäuschen. Dieser Fall könnte bei Protein III vorliegen. Die im Two-Hybrid-System in Hefe gefundene Interaktionen sollten deshalb immer unter Nutzung einer weiteren Methode verifiziert werden. Mögliche Methoden sind z.B. Co-Immunopräzipitation, GST Fusion Protein Pull-Down Technique, Far Western with GST Fusion Proteins (Protokolle 2, 3 und 4 im Kapitel 18 von Sambrook et al., 2001) oder Enzymaktivitätstests.

Die GST Fusion Protein Pull-Down Technique ist keine absolut festgelegte Methode. Man kann unterschiedliche Modifizierungen vornehmen. Der durchgeführte GST-Pull-Down Assay wurde an die gegebenen Vorlagen angepaßt.

Es wurde eine Fraktionierungsmethode erstellt, die zu einer guten Trennung und Reinheit der Mitochondrienfraktion führte. Krueger und Papadopoulos (1990) beschrieben eine Methode, mit der Digitonin-solubilisierete Mitochondrienmembranen erhalten werden können. Im Tier ist der PBR an der Kontaktstelle zwischen der äußeren und der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert (Culty et al., 1999). Somit wurde davon ausgegangen, mittels Fraktionierungsmethode und Herstellung einer löslichen Mitochondrienfraktion, das pflanzliche PBR-homologe Protein für den Protein-Protein-Interaktionstest bereitzustellen.

Die mittels Two-Hybrid-Analyse detektierten Proteine I bzw. Ik, II und III wurden als GST-Fusionsproteine aufgereinigt. Anschließend daran konnte mit vergleichsweise experimentell geringem Aufwand das pflanzliche PBR-homologe Protein in Form der löslichen Mitochondrienpräparation auf die Glutathion-Sepharose-Säule gegeben werden. Der Komplex der miteinander in Verbindung getretenen Proteine wurde eluiert, in einer SDS-Page aufgetrennt, und da ein Antikörper für das pflanzliche PBR-homologe Protein bereits früher hergestellt wurde, dieses damit detektiert.

Mittels dieses unkomplizierten GST-Pull-Down-Assays wurden die Interaktionen zwischen dem pflanzlichen PBR-homologen Protein und den Proteinen Ik und II bestätigt.

Protein I :

Die Sequenz von Protein I kodiert für ein putatives Membranprotein. An der Interaktion war das verkürzte Protein (Aminosäuren 125-212) beteiligt. Eine Methode zur Vorhersage von Transmembranbereichen (Hirokawa et al., 1998) gibt an, daß sich ein Transmembransegment außerhalb des Bereiches der Aminosäuren 125-212 befindet (Abb. 21). Der Teil des Proteines, der mit dem pflanzlichen PBR-homologen Protein interagiert (AS 125-212) enthält also keine unzugänglichen membrandurchspannenden Bereiche.

Eine Homologiesuche in einschlägigen Datenbanken, ausgehend vom Protein I, ergab Homologien zu einer emp24/gp25L/p24 Proteinfamilie. Die Mitglieder dieser Familie sind in den Transport von Proteinen weg vom ER eingebunden. Sie binden an die Coatmer-Proteine der sich abschnürenden Vesikel mit ihrer cytoplasmatischen Domäne. Sie sind an der Proteinselektion am ER sowie am intrazellularen Transport beteiligt (Dominguez et al., 1998). Das für die Bindung der Proteine notwendige Motiv K (X) K XX ist auch im Protein I aus *A. thaliana* vorhanden. Es befindet sich nicht innerhalb der

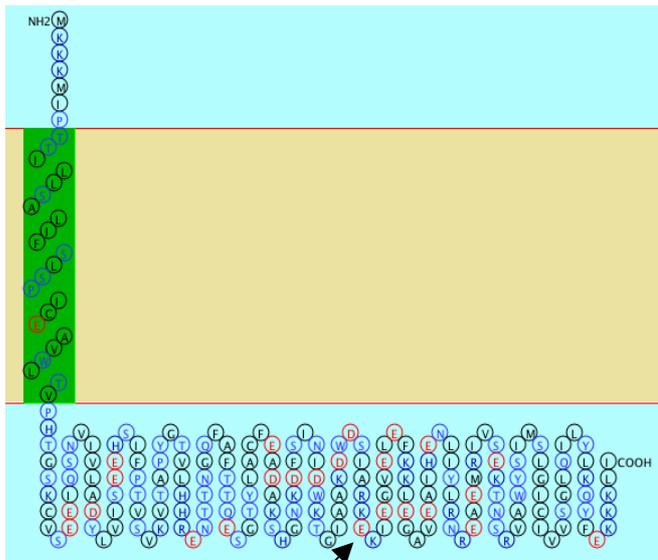


Abbildung 21: Vorhersage des Transmembransegmentes (Methode nach Hirokawa et al., 1998) des Proteins I mit der Datenbankzugangnummer Q9FVUO. Der Pfeil deutet auf das Motiv K (X) K XX, welches hier durch die Aminosäuren K (E) K (IE) gebildet wird.

Transmembrandomäne und liegt in dem Teil des Proteins, der im Two-Hybrid-Interaktionstest mit dem pflanzlichen PBR-homologen Protein reagiert hat. Man könnte somit eine Zuordnung des Proteins I zu den emp24/gp25L/p24 Proteinen, die am intrazellularen Transport beteiligt sind, vornehmen. Dies könnte auch ein Hinweis auf die Prozessierung des pflanzlichen PBR-homologen Proteins nach Transkription und Translation sein und auf bisher unbekannte Modifikationen des pflanzlichen PBR-homologen Proteins im ER hinweisen.

Protein II :

Die Sequenz von Protein II kodiert für ein unbekanntes Protein. Hier wurde die vollständige Sequenz in den Bibliotheksvektor kloniert.

Ausgehend von der Proteinsequenz II wurde eine Homologiesuche durchgeführt. Unter den ersten 20 Einträgen (Tab.9) befanden sich 12 Sequenzen für unbekannte, hypothetische oder putative Proteine. Unter den restlichen 8 gibt es 6 Sequenzen von NAM (no apical meristem) Proteinen bzw. NAC-like Proteinen, ein Mitglied der Familie der NAM Proteine (Acc.No. PF02365 Protein families database of alignments and HMMs Pfam). Die NAM Proteine gehören zur Proteinfamilie der Homeoboxproteine, das sind

DNA-bindende, regulatorische Proteine. Die verbleibenden zwei Proteine sind ein putatives DNA-bindendes Protein und eine rezeptorähnliche Proteinkinase.

Die Sequenz des Proteins II weist keine Konsensmuster der NAM-oder NAC-like Proteine auf. Möglicherweise gehört das Protein II zu einer weiteren neuen Gruppe der NAM Proteine.

Tabelle 9: Die ersten 20 Einträge der Homologiesuche ausgehend vom Protein II (F3M18.4)

Acc.No.	Beschreibung	Ähnlichkeiten	
		Score (bits)	E Value
At1g28520 F3M18.4	unknown protein	388	e-108
At2g42400 MHK10.12	hypothetical protein predicted...	32	1.3
At4g28500 F20O9.190	predicted protein CUC2...	31	2.2
At3g10010 T22K18.18	hypothetical protein similar...	31	2.2
At3g49530 T9C5.120	NAC2-like protein NAC2 – A.thal...	31	2.2
At2g23350 T20D16.2	putative poly(A) binding protein	31	2.2
At4g21430 F18E5.50	putative protein ...	31	2.8
At1g06510 F12K11.16	hypothetical protein ...	31	2.8
At1g65910 F12P19.8	jasmonic acid, putative similar...	31	2.8
At1g77450 T5M16.4	GRAB1-like protein , a novel member of the NAC domain family	31	2.8
At5g17260 MKP11.11	NAM (no apical meristem)-like protein	30	3.7
At1g74500 F1M20.18	putative DNA-binding protein...	30	3.7
At3g57830 T10K17.40	receptor-like protein kinase...	30	3.7
At5g15880 F1N13.20	putative protein	30	4.9
At1g33060 T9L6.13	NAC domain containing...	30	4.9
At2g07420 T13E11.19	putative retroelement pol protein...	30	4.9
At5g24590 K18P6.12	NAC2-like protein	29	6.4
At1g34180 F23M19.14	hypothetical protein...	29	6.4
At3g03200 T17B22.11	NAM-like protein (no apical...	29	6.4
At3g19060 K13E13.5	hypothetical protein predicted...	29	6.4
At1g25580 F2J7.1	unknown protein similar...	29	6.4

Eine weiter entfernte Homologie besteht zum PAP7 der Maus. Ein Alignment der 486 AS des Protein II mit den 445 AS des PAP7 der Maus ergab 53 identische AS und 175 ähnliche AS. Konservierte Bereiche sind nicht ersichtlich. Die vorhergesagten isoelektrischen Punkte befinden sich mit 5,73 für das Protein II und 5,48 für das PAP7 beide im sauren Bereich. Die Vorhersage für Sequenzmotive eines Proteins anhand der Aminosäurestruktur (Prosites) ergibt für beide Proteine (Protein II und PAP7):

- N-Glykosilierungsstellen,
- N-Myristilierungsstellen,
- Casein-Kinase II Phosphorylierungsstellen,
- Phosphorylierungsstellen für PKC (Proteinkinase C Phosphorylierungsstelle) und

- Phosphorylierungsstellen für PKA (cAMP-abhängige Proteinkinase Phosphorylierungsstelle).

Ausgehend von der Interaktion des Proteins II mit dem pflanzlichen PBR-homologen Protein und seinen Homologien zu einer Familie von regulatorischen Proteinen, sowie der entfernten Homologie zum PAP7 besteht die Möglichkeit, daß das Protein II ein regulatorisches Protein und Bestandteil eines Signaltransduktionsweges ist.

Protein III :

Die Sequenz von Protein III verschlüsselt eine putative Ribose-5-Phosphat-Isomerase. Es ist bekannt, daß die Ribose-5-Phosphat-Isomerase im Tier am Pentosephosphat-Cyclus beteiligt ist, der in Pflanzen jedoch in den Chloroplasten abläuft (Michal, 1999). Es ist mittels einschlägiger Programme keine eindeutige Vorhersage möglich, ob das detektierte Protein III in Chloroplasten oder Mitochondrien lokalisiert sein könnte. Eine Homologiesuche für die Sequenz von Protein III ergibt die höchsten Homologien zu Sequenzen von Ribose-5-Phosphat-Isomerasen (keine putativen) aus Bakterien. Es ist also nicht bekannt, welche Funktionen die putative Ribose-5-Phosphat-Isomerase in *A. thaliana* hat und wo sie lokalisiert ist.

Protein III hat wahrscheinlich im in vivo Bindungstest mit dem Two-Hybrid-System als falsch positiver Klon eine Interaktion vorgetäuscht. Diese konnte nicht im GST-Pull-Down-Assay bestätigt werden. Diese putative Ribose-5-Phosphat-Isomerase in *A. thaliana* könnte also in den Chloroplasten lokalisiert sein und somit in der natürlichen Umgebung nicht mit einem mitochondrialen pflanzlichen PBR-homologen Protein in Berührung kommen. Durch das Fehlen des Kompartimentes Chloroplast in der Hefe konnte es hier zu einer Bindung kommen, die in der Pflanze nicht möglich wäre. Die Lokalisation des pflanzlichen PBR-homologen Proteins konnte durch folgende Arbeiten gezeigt werden:

- Der GST-Pull-Down Assay wurde mit einer löslichen Mitochondrienfraktion durchgeführt. Es konnte jeweils eine Interaktion des pflanzlichen PBR-homologen Proteins aus der löslichen Mitochondrienfraktion gezeigt werden. Weiterhin konnte das pflanzliche PBR-homologe Protein in einer reinen Mitochondrienpräparation mittels Antikörper detektiert werden (Abb. 18).
- Die Aufnahme- und Bindungsstudien wurden mit isolierten Mitochondrien durchgeführt. Diese funktionellen Untersuchungen erbrachten Ergebnisse für ein pflanzliches PBR-homologes Protein in Mitochondrien.

- Durch einen Two-Hybrid-Interaktionstest wurde eine Interaktion der PPOX II mit dem pflanzlichen PBR-homologen Protein aus *A. thaliana* gezeigt (mündliche Mitteilung B. Grimm). Translokalisierungsstudien und immunologische Analysen bewiesen einen Transport der PPOX II in die Mitochondrien von *Nicotiana tabacum* (Lermontova et al., 1997).
- Photoaffinitätsmarkierungen von Mitochondrien mit [³H]Flunitrazepam detektierten ein 30 kDa Protein und etwas schwächer ein 18 kDa Protein, welches aufgrund der Bindung des Benzodiazepines Flunitrazepam und der entsprechenden Größe das pflanzliche PBR-homologe Protein sein müßte (Lindemann et al., 2000).

4.6 Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit konnten einige Erkenntnisse über ein pflanzliches PBR-homologes Protein gewonnen werden. Weiterführende Arbeiten sollten eine Isolation eines pflanzlichen PBR-homologen Proteins sowie dessen Charakterisierung beinhalten. Damit könnte man die Ergebnisse der Untersuchungen am rekombinant exprimierten Protein vergleichen.

Man muß die mittels Two-Hybrid-Analyse detektierten Interaktionspartner des pflanzlichen PBR-homologen Proteins weiter untersuchen, um Aufschluß über eine mögliche Einbindung des pflanzlichen PBR-homologen Proteins in Regulationsprozesse der Zelle zu gewinnen,.

Mittels des Hefe Two-Hybrid-Systems oder weiteren GST-Pull-Down Experimenten könnte man versuchen, interagierende Proteine für das Protein II oder Protein I zu finden und damit eine Reaktionskette, eventuell einen Signaltransduktionsweg bestimmen.

Weiterhin sollte man das Steroid-Seitenkettenspaltende Enzym aus der Pflanze isolieren und lokalisieren. Damit könnten die hier gewonnenen Ergebnisse besser eingeordnet werden.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein pflanzliches PBR-homologes Protein charakterisiert.

Es sind zahlreiche pflanzliche PBR-homologen Sequenzen bekannt. Das Vorkommen dieses Proteins ist nicht beschränkt auf die in dieser Arbeit untersuchten Pflanzen *Digitalis lanata* und *Arabidopsis thaliana*, sondern umfaßt Vertreter von niederen Pflanzen wie Rotalgen, Moose und die hochentwickelten Dikotyletonen-Pflanzenfamilien. Somit kann das pflanzliche PBR-homologe Protein als weit verbreitet angesehen werden.

In dieser Arbeit wurden für das pflanzliche Protein folgende Erkenntnisse gewonnen.

- Es wurde eine Fraktionierungsmethode zur Gewinnung von Mitochondrien aus grünem pflanzlichem Gewebe von *D. lanata* erstellt, die auch für Zellkulturen und *A. thaliana* anwendbar war. Somit konnten Aufnahme- und Bindungsstudien an isolierten Mitochondrien durchgeführt werden.
- Eine PBR-homologe Sequenz aus *A. thaliana* wurde mittels homologer Primer amplifiziert und in einen Expressionsvektor kloniert. Anschließend wurde das 21,1 kDa schwere Protein in *E. coli*-Zellen exprimiert.
- Aufnahmestudien an Blättern, isolierten Mitochondrien und *E. coli*-Zellen mit dem rekombinant exprimierten pflanzlichen PBR-homologen Protein zeigten, daß Cholesterol ligandenabhängig in die Mitochondrien aufgenommen wird. Protoporphyrin IX wird von isolierten Mitochondrien und *E. coli*-Zellen mit dem rekombinant exprimierten Protein ligandenabhängig aufgenommen. Als beeinflussende Liganden wurden Ro5-4864, PK 11195, Flunitrazepam und Protoporphyrin IX eingesetzt. Ro5-4864 hat den stärksten Einfluß auf die Aufnahme.
- Man kann annehmen, daß das pflanzliche PBR-homologe Protein eine Transportfunktion ähnlich einem Kanal aufweist. Es wird konzentrationsabhängig und ligandenabhängig Cholesterol und Protoporphyrin IX transportiert.
- Durch Bindungsstudien wurde gezeigt, daß das pflanzliche PBR-homologe Protein spezifische Bindung zu Ro5-4864 und PK 11195 aufweist.

- Aufgrund von Verdrängungsexperimenten können wir annehmen, daß die Bindungsstellen für Ro5-4864, PK 11195 und Protoporphyrin IX im pflanzlichen PBR eng benachbart sind.
- Es wurden verschiedene Deletionsmutanten hergestellt, um die Funktion einzelner Domänen des pflanzlichen PBR-homologen Proteins zu untersuchen. Der Aminoterminus hat keine erkennbare Funktion bei der Cholesterol- oder Protoporphyrin IX-Aufnahme. Wichtig für diese Funktion sind die Aminosäuren 82-92. Wurden diese entfernt, so konnten am rekombinant exprimierten Protein die Funktionen der Cholesterol- oder Protoporphyrin IX-Aufnahme nicht mehr gezeigt werden. Die Deletionen der Aminosäuren 1-41 und 82-92 haben keinen wesentlichen Einfluß auf die Bindung zu den untersuchten Liganden Ro5-4864 und PK 11195. Im tierischen PBR (Maus) ist der Carboxyterminus funktionell mit der Cholesterolaufnahme verbunden. Eine Deletion dieses Bereiches erniedrigt die Cholesterolaufnahme um 70 Prozent. Für die Deletionsmutante des Carboxyterminus $\Delta_{180-196}$ des pflanzlichen PBR muß diese Funktion noch untersucht werden.
- Für das pflanzliche PBR-homologe Protein werden fünf Transmembrandomänen vorhergesagt. Diese Transmembranhelices sind denen für ein tierisches PBR homolog und könnten ebenfalls eine kanalähnliche Struktur bilden, die eine Funktion als Transportprotein charakterisieren würde.
- Mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems wurden Interaktionspartner des pflanzlichen PBR-homologen Proteins identifiziert.
- Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurde ein GST-Pull-Down-Assay durchgeführt. Es konnten zwei Interaktionen festgestellt werden. Eine Interaktion erfolgte mit einem putativen Membranprotein (Protein I), die andere mit einem Protein unbekannter Funktion (Protein II). Aufgrund der Homologien des putativen Membranproteins zu einer Familie von Proteinen, die als Proteinträger am intrazellularen Transport beteiligt sind und der Analysen des Proteins II, die zu den Annahmen führen, daß das Protein II regulatorische Funktionen aufweist, könnte man eine Einbindung des pflanzlichen PBR-homologen Proteins in Regulationsprozesse der Zelle postulieren, die durch zukünftige Arbeiten aufzuklären sind.

6 Literaturverzeichnis

- Aljamal, Jalal Ahmad, G. Genchi, V. De Pinto, L. Stefanizzi, A. De Santis, R. Benz, and F. Palmieri. „Purification of Porin from Corn (*Zea mays* L.) Mitochondria“ Plant Physiol. 102 (1993): 615-21.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman. „Basic local alignment search tool“ Journal of Molecular Biology 215 (1990): 403-10.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. „Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs“ Nucleic Acids Research 25(17) (1997): 3389-402.
- Amri, H., S. O. Ogwuegbu, N. Boujrad, K. Drieu, and V. Papadopoulos. „In vivo regulation of the peripheral-type benzodiazepin receptor and glucocorticoid synthesis by the ginkgo biloba extract Egb 761 and isolated ginkgolides“ Endocrinology 137 (1996): 5707-18.
- Anholt, Robert R. H., P. L. Pedersen, E. B. De Souza, and S. H. Snyder. „The Peripheral-type Benzodiazepine Receptor Localization to the Mitochondrial Outer Membrane“ Journal of Biological Chemistry 261 (1986): 576-83.
- Antkiewicz-Michaluk, Lucyna, A. G. Mukhin, A. Guidotti, and K. E. Krueger. „Purification and Characterization of a Protein Associated with Peripheral-type Benzodiazepine Binding Sites“ Journal of Biological Chemistry 263 (1988): 17317-21.
- Banno, Hiroharu and Nam-Hai Chua. „Characterization of the *Arabidopsis* Forming-Like Protein AFH1 and Its Interacting Protein“ Plant Cell Physiology 41(5) (2000): 617-26.
- Benavides, J., D. Quarteronet, F. Imbault, C. Malgouris, A. Uzan, C. Renault, M. C. Dubroeuq, C. Gueremy, and G. Le Fur. „Labeling of peripheral-type benzodiazepine binding sites in the rat brain by using [³H]PK 11195, an isoquinoline carboxamide derivative: kinetic studies and autoradiographic localisation“ Journal of Neurochem. 41 (1983): 1744-50.
- Bergensträhle, Annika, E. Tillberg, and L. M. V. Jonsson. „Effects of ethephon and norbornadiene on sterol and glycoalkaloid biosynthesis in potato tuber discs“ Physiologia Plantarum (DK) 89 (1993): 301-8.
- Bergensträhle, Annika, P. Borgå, and L. M. V. Jonsson. „Sterol Composition and Synthesis in Potato Tuber Discs in Relation to Glycoalkaloid Synthesis“ Phytochemistry (GB) 41 (1996): 155-61.
- Bernassau, J. M., J. L. Reversat, P. Ferrara, D. Caput, and G. Le Fur. „A 3D model of the peripheral benzodiazepine receptor and its implication in intra mitochondrial cholesterol transport“ J. Mol. Graph. 11 (1993): 236-45.

- Bianchini, Graciela M., B. A. Stermer, and N. L. Paiva. „Induction of early Mevalonate Pathway Enzymes and Biosynthesis of End Products in Potato (*Solanum tuberosum*) Tubers by Wounding and Elicitation“ Phytochemistry (GB) 42 (1996): 1563-71.
- Blumenthal, Amnon, K. Kahn, O. Beja, E. Glun, M. Colombini, and A. Breiman. „Purification and Characterization of the Voltage-Dependent Anion-Selective Channel Protein from Wheat Mitochondrial Membranes“ Plant Physiology 101 (1993): 579-87.
- Braestrup, C., R. F. Squires. „Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity [³H]diazepin binding“ Proceedings of the National Academic Society USA 74 (1977): 3805-09.
- Brent, Roger and Russel L. Finley Jr.. „Understanding Gene and Allele Function with Two-Hybrid Methods“ Annual Review Genetics 31 (1997): 663-704.
- Bürgi, B., W. Lichtensteiger, M. E. Lauber, and M. Schlumpf. „Ontogeny of Diazepam Binding Inhibitor/Acyl-CoA Binding Protein mRNA and Peripheral Benzodiazepine Receptor mRNA Expression in the Rat“ Journal of Neuroendocrinology 11 (1999): 85-100.
- Chappell, Joseph. „Biochemistry and Molecular Biology of the Isoprenoid Biosynthetic Pathway in Plants“ Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 46 (1995): 521-47.
- Chen, E. J., and P. S. Seeburg. „Supercoiling sequencing: A simple method for sequencing plasmid DNA“ DNA 4 (1985): 165-70.
- Chien, C.-T., P. L. Bartel, R. Sternglanz, and S. Fields. „The two-hybrid-system: A method to identify and clone genes for Proteins that interact with a protein of interest“ Proceedings of the National Academic Society USA 88 (1991): 9578-82.
- Clark, M., and R. M. Post. „Lidocaine binds with high affinity to peripheral-type benzodiazepine receptors“ European Journal of Pharmacology 179 (1990): 473-5.
- Claros, M. P. and P. Vincens. „Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences“ Eur. J. Biochem. 241 (1996): 779-86.
- Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, L. Hsu. „Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA“ Proceedings of the National Academic Society USA 69 (1972): 2110.
- Cosson, Pierre, Y. Lefkir, C. Dömling, and F. Letourneur. „New COP1-binding motifs involved in ER retrieval“ The EMBO Journal 17(No.23) (1998): 6863-70.
- Crowther, Gregory J., and D. V. Lynch. „Characterization of Sphinganine Kinase Activity in Corn Shoot Microsomes“ Archives of Biochemistry and Biophysics 337 (1997): 284-90.

- Culty, M., H. Li, N. Boujrad, J. M. Bernassau, J. L. Reversat, H. Amri, B. Vidic, and V. Papadopoulos. „In vitro studies on the role of the peripheral benzodiazepine receptor in steroidogenesis” Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 69 (1999): 123-30.
- Debnam, P. M., and M. J. Emes „Subcellular distribution of enzymes of the oxidative pentose phosphate pathway in root and leaf tissues” Journal of Experimental Botany Vol. 50 No. 340 (1999): 1653-61.
- Deckert, J., and P. J. Marangos. „Hormonal interactions with benzodiazepine binding sites in vitro” Life Science 39 (1986): 675-83.
- De Souza, E. B., R. R. H. Anholt, K. M. M. Murphy, S. H. Snyder, and M. S. Kuhar. „Peripheral-type benzodiazepine receptors in endocrine organs: autoradiographic localisation in rat pituitary, adrenal and testis” Endocrinology 116 (1985): 567-73.
- Dixon, Richard A., and N. L. Paiva. „Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism“ Plant Cell (USA) 7 (1995):1085-97.
- Domínguez, Michel, K. Dejgaard, J. Füllekrug, S. Dahan, A. Fazel, J.-P. Paccaud, D. Y. Thomas, J. J. M. Bergeron, and T. Nilsson. „gp25L/emp24/p24 Protein Family Members of the *cis*-Golgi Network Bind Both COP I and II Coatomer“ The Journal of Cell Biology 140(No.4) (1998): 751-65.
- Donath, Jens, and W. Boland. „Biosynthesis of Acyclic Homoterpenes in Higher Plants Parallels Steroid Hormone Metabolism“ Journal of Plant Physiology 143 (1994): 473-8.
- Douce, Roland, J. Bourguignon, R. Brouquisse, and M. Neuburger. „Isolation of Plant Mitochondria: General Principles and Criteria of Integrity“ Methods in Enzymology 148 (1987): 403-15.
- Duport, Catherine, R. Spagnoli, E. Degryse, and D. Pompon. „Self-Sufficient Biosynthesis of Pregnenolone and Progesterone in Engineered Yeast“ Nature Biotechnology 16 (1998): 1-6.
- Færgeman, Joakim and Jens Knudsen. „Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling“ Biochem. J. 323 (1997): 1-12.
- Fennel, D. A., and F. E. Cotter. Review „Controlling The Mitochondrial Gatekeeper For Effective Chemotherapy” British Journal of Haematology 111 (2000): 52-60.
- Fields, Stanley & Ok-kyu Song. „A novel genetic system to detect protein-protein interactions“ Nature 340 (1989): 245-6.
- Fischer, Karsten, A. Weber, S. Brink, B. Arbinger, D. Schünemann, S. Borchert, H. W. Heldt, B. Popp, R. Benz, T. A. Link, C. Eckerskorn, and U.-I. Flügge. „Porins from Plants Molecular Cloning and Functional Characterization of two new Members of the Porin Family“ Journal of Biochemical Chemistry 269 (1994): 25754-60.

- Framm, J. J., A. Peterson, C. Thoeringer, A. Pangert, E. Hornung, I. Feussner, M. Luckner, and P. Lindemann. „Cloning and Functional Expression in *Escherichia coli* of a cDNA Encoding Cardenolide 16'-O-Glucohydrolase from *Digitalis lanata* Ehrh.“ Plant Cell Physiol. 41(11) (2000): 1293-8.
- Frangioni, John V. and B. G. Neel. „Solubilisation and Purification of Enzymatically Active Glutathione S-Transferase (pGEX) Fusion Proteins“ Analytical Biochemistry 210 (1993): 179-87.
- Galiegue, S., O. Jbilo, T. Combes, E. Bribes, P. Carayon, G. Le Fur, and P. Casellas. „Cloning and Characterisation of PRAX-1 A New Protein That Specifically Interacts With The Peripheral Benzodiazepine Receptor“ The Journal of Biological Chemistry 274 (1999): 2938-52.
- Garnier, M., A. Dimchev, N. Boujrad, J. Price, N. Musto, and V. Papadopoulos. „In vitro reconstitution of a functional peripheral-type benzodiazepin receptor from mouse Leydig tumor cells“ Molecular Pharmacology 45 (1994): 201-11.
- Garnier, M., N. Boujrad, S. O. Ogwuegbu, J. R. Hudson, and V. Papadopoulos. „The Polypeptid Diazepam-binding Inhibitor and a Higher Affinity Mitochondrial Peripheral-type Benzodiazepine Receptor Sustain Constitutive Steroidogenesis in the R2C Leydig Tumor Cell Line“ The Journal of Biological Chemistry 269 (1994): 22105-12.
- Gavish, M., I. Bachman, R. Shoukrun, Y. Katz, L. Veenman, G. Weisinger, and A. Weizman. „Enigma of the Peripheral Benzodiazepine Receptor“ Pharmacological Reviews by The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics 51 (1999): 629-50.
- Gietz, R. Daniel, B. Triggs-Raine, A. Robbins, K. C. Graham, and R. A. Woods. „Identification of proteins that interact with a protein of interest: Applications of the yeast two-hybrid system“ Molecular and Cellular Biochemistry 172 (1997): 67-79.
- Gietz, R. Daniel, Woods, R. A. „High efficiency transformation of yeast with lithium acetate“ in: J.R. Johnston(ed.) Molecular Genetics of Yeast: A Practical Approach. Oxford University Press, Oxford, (1994): 121-34.
- Gualberto, Jose Manuel, H. Handa, and J. M. Grienenberger. „Isolation and Fractionation of Plant Mitochondria and Chloroplasts“ in „Methods in Plant Cell Biology Part B“ Methods in Cell Biology 50 (Galbraith, David W., D. P. Bourque, H. J. Bohnert, eds.) Academic Press, San Diego, CA, USA (1995): 161-75.
- Hall, Peter F.. „The roles of calmodulin, actin, and vimentin in steroid synthesis by adrenal cells“ Steroids 62 (1997): 185-9.
- Hall, Peter F.. „Cellular organisation for steroidogenesis“ International Review of Cytology 84 (1984): 53-95.
- Hanson, Maureen R., M. L. Boeshore, P. E. McClean, M. A. O'Connell, and H. T. Nivison. „The Isolation of Mitochondria and Mitochondrial DNA“ in „Methods For

- Plant Molecular Biology Selected Methods in Enzymology“ (A. Weissbach, and H. Weissbach. eds.) Academic Press, San Diego, CA, USA (1988): 257-73.
- Hardwick, Matthew, D. Fertikh, M. Culty, H. Li, B. Vidic, and V. Papadopoulos. „Peripheral-type Benzodiazepine Receptor (PBR) in Human Breast Cancer: Correlation of Breast Cancer Cell Aggressive Phenotype with PBR Expression, Nuclear Localization, and PBR-mediated Cell Proliferation and Nuclear Transport of Cholesterol“ Cancer Research 59 (1999): 831-42.
- Hartmann, M.-A., and P. Benveniste. „Plant sterols: isolation, identification and biosynthesis” Methods Enzymol. 148 (1987): 632-50.
- Haudenschild, Christian, and M.-A. Hartmann. „Inhibition of Sterol Biosynthesis During Elicitor-Drug-Induced Accumulation of Furanocoumarins in Parsley Cell Suspension Cultures“ Phytochemistry (GB) 40 (1995): 1117-24.
- Hill, Kerstin, K. Model, M. T. Ryan, K. Dietmeier, F. Martin, R. Wagner, and N. Pfanner. Letter. „Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins“ Nature 395 (1988): 516-21.
- Hirokawa, T., S. Boon-Chieng, and S. Mitaku. „SOSUI: Classification and Secondary Structure Prediction System for Membran Proteins“ Bioinformatics (formerly CABIOS), 14 (4) (1998): 378.
- Inoue, Hiroaki, H. Nojima, and H. Okayama. „High efficiency transformation of *Eschericia coli* with plasmids“ Gene 96 (1990): 23-28.
- Jackson, Christopher, J. E. Dench, D. O. Hall, and A. L. Moore. „Separation of Mitochondria from Contaminating Subcellular Structures Utilizing Silica Sol Gradient Centrifugation“ Plant Physiology 64 (1979): 150-3.
- Jacobs, J. M., N. J. Jacobs, T. D. Sherman, S.O. Duke. „Effect of diphenyl ether herbicides on oxidation of protoporphyrinogen to protoporphyrin in organellar and plasma membrane enriched fractions of barley” Plant Physiology 97 (1991): 197-203.
- Jefcoate, C. R., B. C. McNamara, I. Artemenko, and T. Yamazaki. „Regulation Of Cholesterol Movement To Mitochondrial Cytochrome P450_{scc} in Steroid Hormone Synthesis” J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 43 (1992): 751-67.
- Joseph-Liauzun, E., P. Delmas, D. Shire, and P. Ferrara. „Topological Analysis of the Peripheral Benzodiazepin Receptor in Yeast Mitochondrial Membranes Supports a Five-transmembrane Structure” The Journal of Biological Chemistry 273 (1998): 2146-52.
- Joseph-Liauzun, E., R. Farges, P. Delmas, P. Ferrara, and G. Loison. „ The M_r 18,000 Subunit of the Peripheral-type Benzodiazepine Receptor Exhibits Both Benzodiazepine and Isoquinoline Carboxamide Binding Sites in the Absence of the Voltage-dependent Anion Channel or of the Adenine Nucleotide Carrier” The Journal of Biological Chemistry 272 (1997): 28102-106.

- Kavvadias, D., A. A. Abou-Mandour, F. C. Czygan, H. Beckman, P. Sand, P. Riederer, and P. Schreier. „Identification of Benzodiazepines in *Artemisia dracuncululus* and *Solanum tuberosum* Rationalizing their endogenous formation in plant tissue” Biochem. Biophys. Res. Com. 269 (2000): 290-5.
- Kelly-Herschkovitz, R. Weizman, I. Spanier, S. Leschiner, M. Lahav, G. Weisinger, and M. Gavish. „Effects of Peripheral-type Benzodiazepine Receptor Antisense Knockout on MA-Leydig Cell Proliferation and Steroidogenesis“ Journal of Biological Chemistry 273 (1998): 5478-83.
- Klebe, Robert J., J. V. Harriss, Z. D. Sharp, and M. G. Douglas. „A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast“ Gene 25 (1983): 333-41.
- Kreis, W., A. Hensel, and U. Stuhlemmer, „Cardenolide Biosynthesis in Foxglove“ Planta Medica 64 (1998): 491-9.
- Krueger, Karl E. and Vassilios Papadopoulos. „Mitochondrial Benzodiazepine Receptors and the Regulation of Steroid Biosynthesis“ Annual Review of Pharmacology and Toxicology 32 (1992): 211-37.
- Krueger, Karl E. and Vassilios Papadopoulos. „Peripheral-type Benzodiazepine Receptors Mediate Translocation of Cholesterol from Outer to Inner Mitochondrial Membranes in Adrenocortical Cells“ The Journal Of Biological Chemistry 265 No.25 (1990): 15015-22.
- Krueger, Karl E., A. G. Mukhin, L. Antkiewicz-Michaluk, M. R. Santi, D. R. Grayson, and A. Guidotti. „Purification, Cloning, And Expression Of A Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor” GABA and Benzodiazepine Receptor Subtypes, edited by Giovanni Biggio and Erminio Costa, Raven Press, New York (1990): 1-13.
- Lacapere J.-J., F. Delavoie, H. Li, G. Peranzi, J. Maccario, V. Papadopoulos, and V. Branislav. „Structural and Functional Study of Reconstituted Peripheral Benzodiazepine Receptor” Biochemical and Biophysical Research Communications 284 (2001): 536-41.
- Lacor, P., P. Gandolfo, M.-C. Tonon, E. Brault, I. Dalibert, M. Schumacher, J. Benavides, B. Ferzaz. „Regulation of the expression of peripheral benzodiazepine receptors and their endogenous ligands during rat sciatic nerve degeneration and regeneration: a role for PBR in neurosteroidogenesis“ Brain Research 815 (1999): 70-80.
- Laemmli, U. K. „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4“ Nature 227 (1970): 680-5.
- Le Fur G., N. Vaucher, M. L. Perrier, A. Famier, J. Benavides, C. Renault, M. C. Dubroeuq, C. Gueremy, and A. Uzan. „Differentiation between two ligands for peripheral benzodiazepine binding sites, [³H]Ro5-4864 and [³H]PK 11195, by thermodynamic studies” Life Science 33 (1983): 449-457.

- Lermontova, Inna and B. Grimm. „Overexpression of Plastidic Protoporphyrinogen IX Oxidase leads to Resistance to the Diphenyl-Ether Herbicide Acifluorfen“ Plant Physiology 122 (2000): 75-83.
- Lermontova, I., E. Kruse, H. P. Mock, and B. Grimm. „Cloning and Characterization of plastidal and mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase“ Proceedings of the National Academic Society USA 94 (1997): 8895-900.
- Li, Hua, B. Degenhardt, D. Tobin, Z.-X. Yao, k. Tasken and Vassilios Papadopoulos. „Identification, Localisation, and Function in Steroidogenesis of PAP7: A Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor- and PKA (RI)-Associated Protein“ Molecular Endocrinology 15(12) (2001):
- Li, Hua, and Vassilios Papadopoulos. „Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor Function in Cholesterol Transport. Identification of a Putative Recognition/Interaction Amino Acid Sequence and Consensus Pattern“ Endocrinology 139 No.12 (1998): 4991-7.
- Lieberman, Seymour, and V. V. K. Prasad. „Heterodox Notions on Pathways of Steroidogenesis“ Endocrine Reviews (USA) 11/4 (1990): 469-93.
- Lindemann, Peter, and M. Luckner. „Biosynthesis of Pregnane Derivatives in Somatic Embryos of *Digitalis Lanata*“ Phytochemistry (GB) 46 (1997): 507-13.
- Lindemann, Peter, A. Koch, G. Hause, V. Papadopoulos, and M. Luckner. „Evidence for a Benzodiazepine binding Protein in plants“ Molecular Steroidogenesis 2000 by Academy Press, Inc. And Yamada Science Foundation 297-300.
- Lindemann, Peter, A. Koch, B. Degenhardt, G. Hause, B. Grimm, M. Luckner, and V. Papadopoulos. „A novel *Arabidopsis thaliana* Protein ia a functional Peripheral-type Benzodiazepine Receptor“ Biochemical Journal (2002) eingereicht.
- Liscum, Laura and Kathryn W. Underwood. „Intracellular Cholesterol Transport and Compartmentation“ Journal of Biological Chemistry 270 (1995): 15443-6.
- Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Randall. „Protein measurment with the folin phenol reagent“ J. Biol. Chem. 193 (1951): 265-75.
- Luckner, M. „Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals“ Springer-Verlag, Berlin (1990)
- Luzikov, V. N., L. A. Novikova, V. A. Spiridonova, L. V. Isaeva, J. Whelan, M. Hugosson, and E. Glaser. „Construction of Heterologous Mitochondria: Import of Bovine Cytochrome P450_{sec} Precursor into Plant Mitochondria“ Biochemistry (Moscow) 59 (1994): 823-5.
- Ma, Jun and M. Ptashne. „A New Class of Yeast Transkriptional Activators“ Cell 51 (1987): 113-119.

- Mannella, Carmen A.. „The ‘ins’ and ‘outs’ of mitochondrial membrane channels“ TIBS (1992): 315-20.
- Marston, Fiona A. O. „The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*“ Review Article Biochem. Journal 240 (1986): 1-12.
- Maurey, Karen, F. Wolf, and J. Golbeck. „3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reduktase Activity in *Ochromonas malhamensis* A System to Study the Relationship Between Enzyme Activity and Rate of Steroid Biosynthesis“ Plant Physiology 82 (1986): 523-7.
- McEnery, Maureen W., A. M. Snowman, R. R. Trifiletti, and S. H. Snyder. „Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: Association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier“ Proceedings of the National Academic Society USA 89 (1992): 3170-4.
- McGeer, E. G., E. A. Singh, and P. L. McGeer. „Peripheral-type benzodiazepine binding in Alzheimer disease“ Alzheimer Disease Assoc. Disord. 2 (1988): 331-6.
- Medina, J. H., H. Viola, C. Wolfman, M. Marder, C. Wasakowski, D. Calvo, and A. C. Paladini. „Overview- flavanoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands“ Neurochem. Research 22 (1997): 419-25.
- Mesenhöller, M., and E. K. Matthews. „A key role for the mitochondrial benzodiazepine receptor in cellular photosensitization with δ -aminolaevulinic acid“ European Journal of Pharmacology 406 (2000): 171-80.
- Michal, Gerhard „Biochemical Pathways Biochemie-Atlas“ (1999) Spectrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin.
- Miettinen, H., J. Kononen, H. Haapasalo, P. Helen, P. Sallinen, T. Harjuntausta, H. Helin, and H. Alho. „Expression of peripheral-type benzodiazepine receptor and dizepam binding inhibitor in human astrocytomas: relation to cell proliferation“ Cancer Research 15 (1995): 2691-5.
- Milek, Frank, E. Reinhard, and W. Kreis. „Influence of precursors and inhibitors of the sterol pathway on sterol and cardenolide metabolism in *Digitalis lanata* EHRH“ Plant Physiol. Biochem. 35/2 (1977): 111-21.
- Moreau, P., M.-A. Hartmann, A.-M. Perret, B. Sturbois-Balzerzak, and C. Cassagne. „Transport of Sterols to the Plasma Membrane of Leek Seedlings“ Plant Physiology 117 (1998): 931-7.
- Murashige, T. and F. Skoog. „A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture“ Physiologica Plantarum 15 (1962):473-97.
- Mutschler, E. „Die Psyche beeinflussende Pharmaka“ in „Arzneimittelwirkungen“ Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1996): 161-2.

- Neufeld, Edward B., M. Wastney, S. Patel, S. Suresh, A. M. Cooney, N. K. Dwyer, C. F. Roff, K. Ohno, J. A. Morris, E. D. Carstea, J. P. Incardona, J. F. Stauss III, M. T. Vanier, M. C. Patterson, R. O. Brady, P. G. Pentchev, and E. J. Blanchette-Mackie. „The Niemann-Pick C1 Protein Resides in a Vesicular Compartment Linked to Retrograde Transport of Multiple Lysosomal Cargo“ Journal of Biological Chemistry 274 (1999): 9627-35.
- Nivison, Helen T., L. E. Fish, and A. T. Jagendorf. „Translation of Isolated Pea Chloroplasts“ in „Methods For Plant Molecular Biology“ Academic Press, San Diego, CA, USA (1988): 159-72.
- Palazon, J., M. Bonfill, R. M. Cusido, M. T. Pinol, and C. Morales. „Effects of Auxin and Phenobarbital on Morphogenesis and Production of Digitoxin in *Digitalis Callus*“ Cell Physiology 36 (1995): 247-52.
- Papadopoulos, Vassilios. „Structure and Function of the Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor in Steroidogenic Cells“ Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 217 (1998): 130-42.
- Papadopoulos, Vassilios, and A. S. Brown. „Role of the Peripheral-type Benzodiazepine Receptor and the Polypeptide Diazepam Binding Inhibitor in Steroidogenesis“ J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 53 (1995): 103-10.
- Papadopoulos, Vassilios, H. Amri, M. Boujrad, C. Cascio, M. Culty, M. Garnier, M. Hardwick, H. Li, B. Vidic, A. S. Brown, J. L. Reversa, J. M. Bernassau, and K. Drieu. „Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis“ Steroids 62 (1997): 21-8.
- Papadopoulos, Vassilios, M. Boujrad, M. D. Ikonovic, P. Ferrara, and B. Vidic. „Topography of the Leydig cell mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor“ Molecular and Cellular Endocrinology 104 (1994): R5-9.
- Papadopoulos, Vassilios. „Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function“ Endocr. Rev. 14 (1993): 222-40.
- Papadopoulos, Vassilios, P. Guarneri, K. E. Krueger, A. Guidotti, and E. Costa. „Pregnenolone biosynthesis in C6 glioma cell mitochondria: regulation by a diazepam binding inhibitor mitochondrial receptor“ Proceedings of the National Academic Society USA 89 (1992): 5118-22.
- Parthier, Benno. „Chloroplast Development in Euglena“ in „Biochemistry and Physiology of Protozoa“ 2.Ed. 4 (1988): 261-96.
- Parthier, Benno. „Die Cytologische Symbiose am Beispiel der Biogenese von Zellorganellen“ Sitzungsberichte der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig 114/4 (1981)
- Pearson, W. R. „Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA“ Methods. Enzymol. 183 (1990): 63-98.

- Petersen, Henning Willads, P. Mølgaard, U. Nyman, and C. E. Olsen. „Chemotaxonomy of the Tuber-bearing *Solanum* Subspecies *Potatoe* (Solanaceae)“ Biochemical Systematics and Ecology (GB) 21 (1993): 629-44.
- Peterson, G. L. „A simplification of the protein assay method of Lowry et al. wich is more generally applicable“ Anal. Biochem. 83 (1977): 346-56.
- Pilgrim, H. „Cholesterol Side-Chain Cleaving Enzym, Aktivität in Keimlingen und in vitro kultivierten Geweben von *Digitalis purpurea*“ Phytochemistry 11 (1972):1725-8.
- Pottosin, Igor I.. Letter. „One of the chloroplast envelope ion channels is probably related to the mitochondrial VDAC“ FEBS 330 (1993): 211-4.
- Quail, Peter H.. „Plant Cell Fractionation“ Annual Review of Plant Physiology 30 (1979): 425-84.
- Ray, Peter M.. „Auxin-binding Sites of Maize Coleoptiles Are Localized on Membranes of the Endoplasmatic Reticulum“ Plant Physiology 59 (1977): 594-9.
- Reinbothe, C., B. Diettrich, M. Luckner. „Regeneration of plants from somatic embryos of *Digitalis lanata*“ J. Plant Physiology 137 (1990): 224-8.
- Rimpler, H. „Pharmazeutische Biologie II. Biogene Arzneistoffe“ Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York (1990)
- Sambroock, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis. „Molecular cloning: a laboratory manual“ Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)
- Sand, P., D. Kavvadias, D. Feineis, P. Riederer, P. Schreier, M. Kleinschitz, F.-C. Czygan, A. A. Abou-Mandour, G. Bringmann, and H. Beckmann. „Naturally occuring benzodiazepines: current status of research and clinical implications“ Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neuroscience 250 (2000): 194-202.
- Sanger, F., S. Nicklen, A. R. Coulsen. „DNA sequencing with chain terminating inhibitors“ Proceedings of the National Academic Society USA 74 (1977): 5463-7.
- Scheibner, Hartmut, B. Diettrich, U. Schulz, and M. Luckner. „Somatic Embryos of *Digitalis lanata* Synchronization of Development and Cardenolide Biosynthesis“ Biochem. Physiol. Pflanzen 184 (1989): 311-20.
- Scholze, C., A. Peterson, B. Diettrich, und M. Luckner. „Cyclophilin isoforms from *Digitalis lanata*. Sequences and Expression during embryogenesis and stress“ Journal of Plant Physiology 155 (12) (1999): 212-19.
- Schiestl, Robert H. and R. D. Gietz. „High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier“ Current Genetics 16 (1989): 339-346.

- Segel, S.H. „Enzyme Kinetics-Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems“ Wiley Interscience New-York (1993)
- Seitz, Hanns Ulrich, and D. E. Gärtner. „Enzymes in cardenolide-accumulating shoot cultures of *Digitalis Purpurea* L.“ Plant Cell, Tissue and Organ Culture (NL) 38 (1994): 337-44.
- Shi, Jinrui, R. A. Gonzales, and M. K. Bhattacharyya. „Identification and Characterization of an *S*-Adenosyl-L-methionine: Δ^{24} -Sterol-C-Methyltransferase cDNA from Soybean“ Journal of Biological Chemistry 271 (1996): 9384-9.
- Smith, A. G., O. Marsh, and G. H. Elder. „Investigation of the subcellular location of the tetrapyrrole-biosynthesis enzyme coproporphyrinogen oxidase in higher plants“ Biochem. Journal 292 (1993): 503-8.
- Smith, D. B., and K. S. Johnson. „Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase“ Gene 67 (1988): 31-40.
- Snyder, S. H., A. Verma, and R. R. Trifiletti. „The peripheral-type benzodiazepine receptor: A protein of mitochondrial outer membranes utilizing porphyrins as endogenous ligands“ FASEB Journal 1 (1987): 282-88.
- Srinivas, Meenakshi, and R. Krishan. Letter. „Effect of Grafting on Solasodine Content in *Solanum viarum*“ Planta Medica 62 (1996): 360-1.
- Taketani, S., H. Kohno, M. Okuda, T. Furukawa, and R. Tokunaga. „Induction of Peripheral-type Benzodiazepin Receptors during Differentiation of Mouse Erythroleukemia Cells. A Possible Involvement Of These Receptors In Heme Biosynthesis“ The Journal of Biological Chemistry 269 (1994): 7527-31.
- Tewes, A., A. Wappler, E.M. Peschke, R. Garve, and L. Nover. „Morphogenesis and embryogenesis in long-term cultures of *Digitalis*.“ Z. Pflanzenphysiol. 106 (1982): 311-24.
- Thomar, S., U. Dumke-Lehmann, B. Diettrich, M. Luckner. „Gene control in somatic embryos of *Digitalis lanata*: Expression of the β -glucuronidase gene fused to a plastocyanin promotor“ Botanica Acta 111_(1988): 22-27.
- Thomar, S. „Transformation eines embryogenen Zellstammes von *Digitalis lanata* und Untersuchungen zur Expression der eingeführten Gene während der somatischen Embryogenese“ Dissertationsschrift der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg (1994).
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, T. J. Gibson. „CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice“ Nucleic Acids Res. 22 (1994): 4673-80.

- Towbin, H., T. Staehlin, J. Gordon. „Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications“ Proceedings of the National Academic Society USA 76 (1979): 4350-4.
- Tschesche, R. „C₂₁-Steroide des Pflanzenreiches“ Angewandte Chemie 22 (1961): 727-35.
- Verma, A., S. Nye, and S. H. Snyder. „Porphyrins are endogenous ligands for the mitochondrial (peripheral-type) benzodiazepine receptor“ Biochemistry 84 (1987): 225660.
- Verma, S., and S. H. Snyder. „Peripheral type benzodiazepine receptors“ Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29 (1989):307-22.
- Verma, S., L. Stephen, L. Facchina, D. Hirsch, S. Song, L. Dillahey, J. Williams, and S. H. Snyder. „Photodynamic Tumor Therapy: Mitochondrial Benzodiazepine Receptors as a Therapeutic Target“ Mol. Medicine 4 (1998): 40-45.
- Vernon, Leo P.. „Spectrophotometric Determination of Chlorophylls and Pheophytins in Plant Extracts“ Analytical Chemistry 32 (1960): 1144-50.
- Walker, David A., Z. Cerovic, and S. P. Robinson. „Isolation of Intact Chloroplasts: General Principles and Criteria of Integrity“ Methods in Enzymology 148 (1987): 145-57.
- Walker, C. J., and R. D. Willows. Review Article „Mechanism and regulation of Mg-chelatase“ Biochem. J. 327 (1997): 321-33.
- Wendler, G. „Interaction of Protoporphyrin IX with recombinant mice Peripheral-type Benzodiazepine Receptor in *Escherichia coli* cells“ Diplomarbeit am Fachbereich Pharmazie, Institut für Pharmazeutische Biologie der MLU Halle-Wittenberg
- Wickramasinghe, J. A. F., E. P. Burrows, R. K. Sharma, J. B. Greig, and E. Caspi. „The obligatory involvement of a C₂₁ Intermediate in the Biosynthesis of Cardenolides from Cholesterol“ Phytochemistry 8 (1969): 1433-40.
- Wichtl, Max, W. Bühl, and G. Huesman. „Fingerhut *Digitalis* L. bekannte und weniger bekannte Vertreter einer wichtigen Arzneipflanzengattung“ Deutsche Apotheker Zeitung 12.Nov.1987: 2391-400.
- Yeliseev, Alexei A. and Samuel Kaplan. „TspO of *Rhodobacter sphaeroides* A Structural And Functional Model For The Mammalian Perpheral Benzodiazepine Receptor“ Journal of Biological Chemistry 275 (2000): 5657-67.
- Yeliseev, Alexei A. and Samuel Kaplan. „A Novel Mechanism for the Regulation of Photosynthesis Gene Expression by the TspO Outer Membrane Protein of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1“ Journal of Biological Chemistry 274 (1999): 21234-43.

- Yeliseev, Alexei A. and Samuel Kaplan. „A Sensory Transducer Homologous to the Mammalian Peripheral-type Benzodiazepine Receptor Regulates Photosynthetic Membrane Complex Formation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1“ Journal of Biological Chemistry 270 (1995): 21167-75.
- Yeliseev, Alexei A., Karl E. Krueger, and Samuel Kaplan. „A mammalian mitochondrial drug receptor functions as a bacterial ‘oxygen’ sensor“ Proceedings of the National Academic Society USA 94 (1997): 5101-6.
- Zilz, Alexandra, H. Li, R. Castello, V. Papadopoulos and E. P. Widmaier. „Developmental Expression of the Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor and the Advent of Steroidogenesis in Rat Adrenal Glands“ Endocrinology 140 (1999): 859-64.
- Zimowski, Jan. „Specificity and some other Properties of Cytosolic and Membranous UDPGlc: 2 β -Hydroxysteroid Glycosyltransferases from *Solanum tuberosum* Leaves“ Phytochemistry (GB) 31 (1992): 2977-81.
- Zook, Michael N., and J. A. Kluge. „The use of sterol inhibitor to investigate changes in the rate of synthesis of 2,3-oxidosqualene in elicitor treated potato tuber tissue“ Physiological and Molecular Plant Pathology 39 (1991): 391-401.

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Die Steroidbiosynthese in der tierischen Zelle	3
Abbildung 2: Das Benzodiazepin Diazepam	4
Abbildung 3: Die PBR-Liganden PK 11195, Ro5-4864 und Flunitrazepam	5
Abbildung 4: Die Struktur des tierischen PBR mit den fünf Transmembrandomänen	6
Abbildung 5: Die Einbindung des PBR in die Hämbiosynthese	9
Abbildung 6: Prozentuale Enzymaktivitäten der Markerenzyme der drei Fraktionen	21
Abbildung 7: Cholesterolaufnahme der Mitochondrien	36
Abbildung 8: Spezifische Protoporphyrin IX- bzw. Tetrapyrrol-Aufnahme der <i>D. lanata</i> - und <i>A. thaliana</i> - Mitochondrien sowie spezifische Cholesterolaufnahme der <i>D. lanata</i> - und <i>A. thaliana</i> - Mitochondrien	37
Abbildung 9: Scatchard-Plots der Ro5-4864-Bindung der <i>A. thaliana</i> - und <i>D. lanata</i> - Mitochondrien und Verdrängungskurven von Ro5-4864 durch Protoporphyrin IX bei <i>A. thaliana</i> - und <i>D. lanata</i> - Mitochondrien	39
Abbildung 10: Expression des pflanzlichen PBR- homologen Proteins in <i>E. coli</i>	40
Abbildung 11: Aminosäurevergleich des PBR aus dem Rind <i>Bos taurus</i> (P30535), des CrtK-Proteins aus <i>Rhodobacter capsulatus</i> (P17057) und des PBR-homologen Proteins aus <i>A. thaliana</i>	41
Abbildung 12: Deletionsmutanten des pflanzlichen PBR-homologen Proteins im Vergleich zu dem tierischen PBR	43
Abbildung 13: A: Spezifische Protoporphyrin IX-Aufnahme des Klones Fl(His) ₆ B: Spezifische Protoporphyrin IX-Aufnahme der Deletionsmutante Δ_{1-41}	44
Abbildung 14: Ergebnisse der Bindungsstudien der Bindung von PK 11195 und Ro5-4864	45
Abbildung 15: Scatchard-Plots der Ro5-4864-Bindung der Klone Fl(His) ₆ , Δ_{1-41} und Δ_{82-92}	46
Abbildung 16: Die jeweils mit dem pflanzlichen PBR-homologen Protein und den Proteinen I, Ik, II oder III transformierten Hefen sowie die Negativkontrolle auf Selektivmedium und der von dieser Platte abgenommene β -Galactosidase-Filter-Assay	49
Abbildung 17: SDS-Page mit anschließender Coomassiefärbung der Proben aus dem Präzipitat der <i>E. coli</i> -Zellen (unlösliche Fraktion)	50
Abbildung 18: Western-Blot der jeweils ersten 3 oder 4 Proteinfractionen des GST-Pull-Down Assay mit den Proteinen Ik und II sowie die Negativkontrolle	52
Abbildung 19: Phylogenetischer Stammbaum der pflanzlichen PBR-homologen Proteine, des CrtK und TspO-Proteins und der PBRs im Säugetier	55
Abbildung 20: Vorhersage der Transmembransegmente des pflanzlichen PBR-homologen Proteins	57
Abbildung 21: Vorhersage des Transmembransegmentes des Proteins I	63

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: PCR Primer	16
Tabelle 2: Primer für die Sequenzierung	17
Tabelle 3: Substratbindungskonstanten K_S und maximale Aufnahmegeschwindigkeiten V_{max} der Protoporphyrin IX- und Cholesterolaufnahme der <i>D. lanata</i> - und <i>A. thaliana</i> -Mitochondrien	38
Tabelle 4: Dissoziationskonstanten K_D und maximale Anzahl der Bindungsstellen B_{max} der Ro5-4864-Bindung der <i>D. lanata</i> - und <i>A. thaliana</i> -Mitochondrien	39
Tabelle 5: Substratbindungskonstanten K_S und maximale Aufnahmegeschwindigkeiten V_{max} der Protoporphyrin IX- und Cholesterolaufnahme der Full-length-Klone und Deletionsmutanten	44
Tabelle 6: Dissoziationskonstanten K_D und maximale Anzahl der Bindungsstellen B_{max} der Ro5-4864-Bindung eines Full-length-Klones und der untersuchten Deletionsmutanten	46
Tabelle 7: Ergebnisse der Kontrolle der Two-Hybrid-Analyse zur Identifizierung von Interaktionen des pflanzlichen PBR-homologen Proteins	49
Tabelle 8: Die prozentualen Identitäten der verschiedenen PBR-Homologen wurden durch ein Alignment ohne „End-gap-Funktion“ analysiert	54

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet sowie die wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben.

Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Halle (Saale), den 11.09.2002

Antje Koch

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Antje Koch
geboren am	15.10.1970 in Gera
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	BRD

Schulbildung

1977-1987	Besuch der Polytechnischen Oberschule in Gera
1989-1991	Erwerb der Hochschulreife an der Volkshochschule (Abendschule) in Gera
1991-1992	Erwerb der Hochschulreife im Fach Englisch an der Volkshochschule (Abendschule) in Gera

Berufsausbildung, Arbeitstätigkeit

1987-1989	Berufsausbildung zum Apothekenfacharbeiter
1989-1992	Tätigkeit als Apothekenfacharbeiter im Klinikum der Stadt Gera

Hochschulbildung

10/1992-09/1994	Grundstudium der Pharmazie an der MLU Halle-Wittenberg
10/1994-09/1996	Hauptstudium der Pharmazie an der MLU Halle-Wittenberg
10/1996-03/1997	Praktische Ausbildung in der Kronen-Apotheke Halle
04/1997-10/1997	Diplomarbeit am Institut für Pharmazeutische Biologie des FB Pharmazie der MLU Halle-Wittenberg

Promotion

01/1998-12/2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Biologie des FB Pharmazie der MLU Halle-Wittenberg
-----------------	---

Derzeitige Tätigkeit

Apothekerin in der Paulus-Apotheke in Halle