



Reversible Dissoziation der V-ATPase
bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. Nat.)

Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Osnabrück

vorgelegt von
Andrea Albertmelcher

Osnabrück, April 2010

„Das Schönste, was wir entdecken können, ist das Geheimnisvolle.“

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1. Transport-ATPasen	4
1.2. Die V-ATPase	4
1.2.1. Die Struktur der V-ATPase	5
1.2.2. Assemblierung der V-ATPase	8
1.2.3. Inhibitoren der V-ATPase	9
1.2.4. Regulationsmechanismen der V-ATPase	10
1.3. Aufgabenstellung	19
2. Material	20
2.1. <i>Escherichia coli</i> Stämme	20
2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämme	20
2.3. Oligonukleotide und Vektoren	22
2.4. Chemikalien und Enzyme	23
2.5. Puffer und Medien	24
3. Methoden	29
3.1. Methoden der Molekularbiologie	29
3.1.1. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	29
3.1.2. Konservierung von <i>E. coli</i>	29
3.1.3. Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	29
3.1.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mit QIAprep Spin Miniprep Kit	29
3.1.5. Transformation in <i>E. coli</i>	30
3.1.6. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	30
3.1.7. Polymerasekettenreaktion	30
3.1.8. DNA-Agarosegelelektrophorese	31
3.1.9. DNA-Extraktion aus Agarosegelen	31
3.1.10. Reinigung von DNA	31
3.1.11. Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme	32
3.2. Methoden der Hefegenetik	32
3.2.1. Konservierung von <i>S. cerevisiae</i>	32

3.2.2.	Bestimmung der Zelldichte von <i>S. cerevisiae</i>	32
3.2.3.	Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	32
3.2.4.	Transformation in <i>S. cerevisiae</i>	33
3.2.5.	Kreuzung haploider <i>S. cerevisiae</i> Stämme	33
3.2.6.	Tetradenanalyse von <i>S. cerevisiae</i>	33
3.2.7.	Genetische Manipulation von Hefezellen	34
3.3.	Methoden der Biochemie	35
3.3.1.	Reinigung rekombinanter Untereinheit C	35
3.3.2.	Co-Pelletierungsassay mit Tubulin	35
3.3.3.	Proteinbestimmung	35
3.3.4.	Proteinfällung	36
3.3.5.	SDS-PAGE	36
3.3.6.	Coomassiefärbung	36
3.3.7.	Silberfärbung	37
3.3.8.	Western Blot	37
3.3.9.	Immunfärbung	37
3.3.10.	Tandem Affinity Purification	38
3.3.11.	Massenspektrometrie	39
3.3.12.	Hefevakuolenpräparation	40
3.3.13.	ATPase-Aktivitätstest und Phosphatnachweis	41
3.4.	Methoden der Mikroskopie	42
3.4.1.	Aluminiumnitratfixierung von Hefezellen	42
3.4.2.	Fluoreszenzmikroskopie	42
4.	Ergebnisse	43
4.1.	Reversible Dissoziation der V-ATPase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
4.1.1.	V-ATPase Aktivität von GFP markierten Hefestämmen	43
4.1.2.	Reversible Dissoziation der V-ATPase unter <i>in vivo</i> Bedingungen	46
4.2.	Bedeutung des Zytoskeletts bei der Dissoziation	48
4.2.1.	Die V-ATPase und Aktin	48
4.2.2.	Die V-ATPase und Mikrotubuli	51
4.2.3.	Interaktion der Hefe V-ATPase Untereinheit C mit Mikrotubuli	52
4.3.	Einfluss von Agenzien auf die reversible Dissoziation der V-ATPase	54

4.3.1.	Bafilomycin A ₁	54
4.3.2.	Ammoniumchlorid	55
4.3.3.	H89	57
4.3.4.	Okadainsäure	58
4.4.	Proteinkinase A-Signaltransduktionsweg und die V-ATPase	59
4.4.1.	Die Rolle des Glucosesensors Gpr1 bei der reversiblen Dissoziation der V-ATPase	59
4.4.2.	Die Rolle der Proteinkinase A bei der reversiblen Dissoziation der V-ATPase	62
4.5.	Der RAVE-Komplex und die V-ATPase	70
4.5.1.	V-ATPase Aktivität der RAVE Deletionsstämme	71
4.5.2.	Reversible Dissoziation bei den RAVE Deletionsstämmen	72
4.6.	Interaktionspartner der V-ATPase Untereinheit C	74
5.	Diskussion	77
5.1.	Reversible Dissoziation der V-ATPase	77
5.2.	Das Zytoskelett und die reversible Dissoziation der V-ATPase	79
5.3.	Einfluss von Agenzien auf die reversible Dissoziation der V-ATPase	82
5.4.	Der PKA-Signaltransduktionsweg und die V-ATPase	85
5.5.	Der RAVE-Komplex und die V-ATPase	90
5.6.	Ausblick	91
6.	Zusammenfassung	93
7.	Literaturverzeichnis	95
8.	Anhang	109
8.1.	Abkürzungsverzeichnis	109
8.2.	Mascotdaten der Interaktionspartner der V-ATPase Untereinheit C	112
8.3.	Lebenslauf	118
9.	Danksagung	119
10.	Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistung	120

1. Einleitung

1.1. Transport-ATPasen

Transport-ATPasen sind Enzyme, die in biologischen Membranen lokalisiert sind und dort verschiedene Ionen und Moleküle aktiv über diese transportieren. Sie können in vier Klassen aufgeteilt werden: P-, F- und V-ATPasen sowie ABC Transporter. In den letzten Jahren konnte viel zur Aufklärung der Struktur, des Mechanismus und der Regulation dieser ATPasen, aber auch zu ihrer physiologischen Bedeutung und der Rolle in der Medizin beigetragen werden. Die Forschung an den Transport-ATPasen hat eine neue Ära erreicht, in welcher die gewonnenen Erkenntnisse neue Therapien für viele Krankheiten ermöglichen. Krankheiten, die durch Fehlfunktionen von ATPasen hervorgerufen werden können, sind z.B. Krebs, Herzkrankheiten, Osteoporose, zystische Fibrose oder auch Diabetes (Frattini *et al.* 2000; Rojas *et al.* 2004; Sennoune *et al.* 2004; Pedersen 2007).

1.2. Die V-ATPase

V-ATPasen sind in fast allen eukaryotischen Zellen zu finden und spielen eine wichtige Rolle bei völlig unterschiedlichen physiologischen Prozessen (Pedersen 2007). Hierbei spielte die Lokalisierung in den Membranen der Vakuolen von *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae* die entscheidende Rolle bei der Namensgebung dieser ATPase (Pedersen and Carafoli 1987; Nelson and Taiz 1989). V-ATPasen wurden aber nicht nur in Organellen wie Lysosomen, Endosomen usw. gefunden, sondern auch in Plasmamembranen, wo sie unter anderem die Ionenhomeostase im Insektendarm oder den Knochenabbau durch Osteoklasten beeinflussen (Blair *et al.* 1989; Wieczorek *et al.* 1991).

Im Gegensatz zu den F-ATPasen, deren hauptsächliche Funktion in allen eukaryotischen Zellen die Synthese von ATP durch Aufwendung der protonenmotorischen Kraft ist, erzeugen die V-ATPasen eine protonenmotorische Kraft durch die Hydrolyse von ATP und dem anschließenden, daran gekoppelten aktiven Transport von Protonen über die Membran (Saroussi and Nelson 2008). Die so generierte protonenmotorische Kraft wird für eine Vielzahl von sekundären Transportprozessen in der Zelle verwendet.

1.2.1. Die Struktur der V-ATPase

V-ATPasen sind aus zwei Komplexen aufgebaut, dem peripheren V_1 -Komplex, der für die ATP Hydrolyse verantwortlich ist, und dem integralen V_0 -Komplex, dessen Aufgabe die Translokation von Protonen ist (Abb. 1.1 A). Diese Organisation der beiden Komplexe weist eine strukturelle Ähnlichkeit mit der F-ATPase auf und dürfte auf gemeinsame Vorläufer zurück zu führen sein (Pedersen and Amzel 1993; Futai *et al.* 1994). So entspricht der V_1 -Komplex dem F_1 -Komplex der F-ATPase und der V_0 -Komplex dem F_0 -Komplex, der seinen Namen aufgrund der Sensitivität der mitochondrialen F-ATPase gegenüber Oligomycin erhielt (Pedersen and Carafoli 1987).

Der periphere V_1 -Komplex hat eine Molekularmasse von ca. 650 kDa und besteht aus den acht Untereinheiten A, B, C, D, E, F, G und H. Die Aminosäuresequenzen der beiden Untereinheiten A und B sind zu ca. 25 % identisch mit den Untereinheiten β und α der F-ATPase (Nelson and Taiz 1989). Die anderen Untereinheiten des V_1 -Komplexes zeigen indes keinerlei Sequenzhomologien zu den Untereinheiten der F-ATPase.

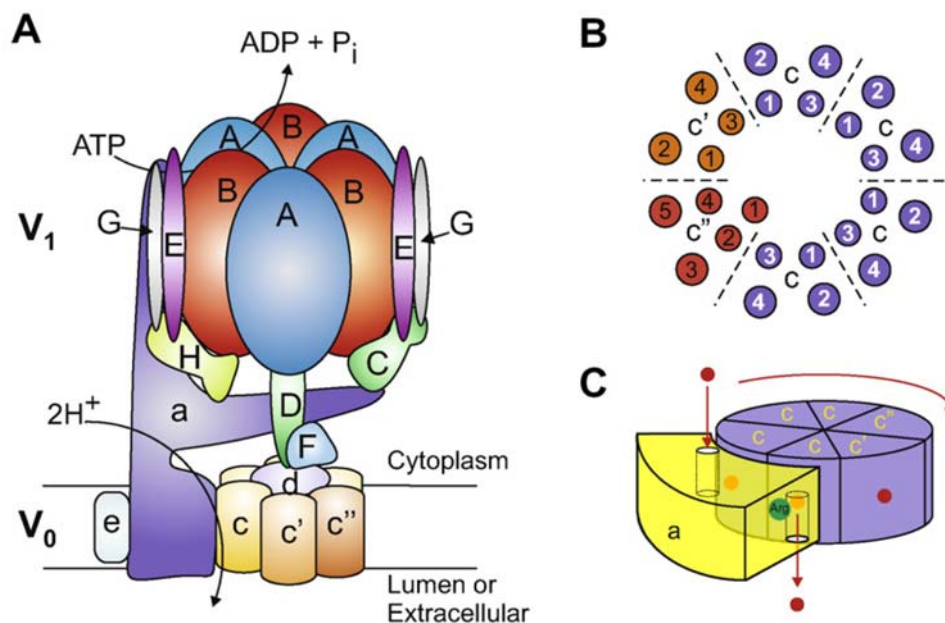


Abb. 1.1: Strukturelle und mechanische Eigenschaften der V-ATPase

A: Schematische Darstellung der V-ATPase aus *Saccharomyces cerevisiae*. **B:** Schematische Darstellung des Proteolipidrings. **C:** Mechanismus der Protonentranslokation im V_0 -Komplex. (Jefferies *et al.* 2008)

Die Stöchiometrie des V_1 -Komplexes entspricht $A_3B_3CDE_3FG_3H$, wobei die Anzahl der Untereinheiten E und G im V_1 -Komplex erst kürzlich durch unsere und andere Gruppen geklärt wurde (Arai *et al.* 1988; Xu *et al.* 1999; Ohira *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2008;

Muench *et al.* 2009). Die Cryo-Elektronenmikroskopie der V-ATPase aus *Manduca sexta* und der daraus berechneten ersten 3D Rekonstruktion dieser intakten Pumpe in ihrem nativen Zustand in Abbildung 1.2 zeigt (Muench *et al.* 2009), dass die V-ATPase eine deutlich komplexere Struktur als die F-ATPase aufweist (Rubinstein *et al.* 2003). Ein Netzwerk aus vier Stielen, welche den V_1 -Komplex mit dem V_0 -Komplex verbinden, lässt sich in der 3D Rekonstruktion in Abbildung 1.2 erkennen. Dabei werden drei Stiele jeweils aus den Untereinheiten E und G gebildet, gekennzeichnet durch die Pfeile in Abbildung 1.2, und der vierte Stiel ist eine zentrale Achse aus den Untereinheiten D und F, die vor allem Kontakt mit dem V_0 -Komplex aufweisen (Muench *et al.* 2009). Auch wenn die drei peripheren Stiele eine ähnliche Verbindung zum zytoplasmatischem Ende jeweils mit einer Untereinheit B (Arata *et al.* 2002) des V_1 -Komplexes aufweisen, so ist ihre Kopplung an den Zwischenbereich und an V_0 sehr unterschiedlich. Die V-ATPase Untereinheiten C und H stellen jeweils eine Verbindung zu zwei der drei peripheren Stiele her, wobei sich die beiden Untereinheiten jedoch nicht berühren und somit keine direkte Verbindung der drei peripheren Stiele untereinander aufbauen.

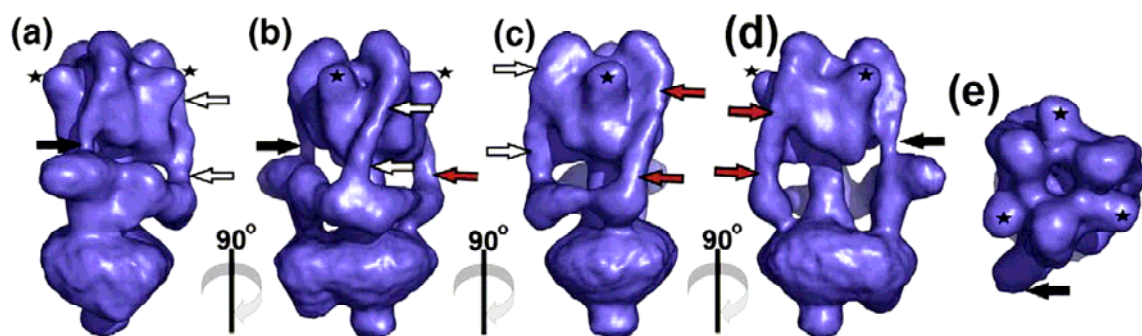


Abb. 1.2: 3D Rekonstruktion der *Manduca sexta* V-ATPase

a-d: Seitliche Ansicht mit dem V_1 -Komplex oben und dem V_0 -Komplex unten, wobei die 3D Rekonstruktion schrittweise jeweils um 90° gedreht wurde. Die drei peripheren Stiele aus den Untereinheiten E und G sind durch die Pfeile markiert. e: Untere Ansicht des katalytischen Kopfes der V-ATPase bestehend aus den Untereinheiten A und B. Der nicht-homologe Bereich der Untereinheit A ist durch die Sterne gekennzeichnet. (Muench *et al.* 2009)

Je drei Kopien der Untereinheiten A und B bilden den katalytischen Kopf der V-ATPase, wobei es sich bei der Untereinheit A um die katalytisch aktive Untereinheit handelt, die genau wie die F-ATPase Untereinheit β das Walker-Motiv enthält, welches eine Glycinreiche nukleotidbindende Sequenz ist (Walker *et al.* 1982). Die Untereinheit B wird genau wie ihr Pedant bei der F-ATPase als regulatorische Untereinheit bezeichnet. Die Hydrolyse von ATP am katalytischem Kopf führt zu einer Rotation des zentralen Stiels und resultiert

in einer Drehung des Proteolipidrings, was letztlich die Translokation der Protonen über die Membran bedingt.

Der integrale V_0 -Komplex besteht bei *Saccharomyces cerevisiae* aus sechs verschiedenen Untereinheiten mit einer vermuteten Stöchiometrie von $a_{c_4-5}c'c''de$ und einer Molekularmasse von ca. 260 kDa (Arai *et al.* 1988; Powell *et al.* 2000; Sambade and Kane 2004). Bei höheren Eukaryoten ist in manchen Fällen zusätzlich die Untereinheit Ac45 vorhanden, die jedoch kein direkter Bestandteil des Proteolipidrings ist (Supek *et al.* 1994). Die Untereinheiten c , c' und c'' , von denen c' nur bei den Hefen vorkommt (Forgac 2007), werden als Proteolipide bezeichnet, da sie sehr hydrophob sind. Sie sind homolog zueinander und zu der 8 kDa Untereinheit c aus der F-ATPase (Fillingame 1997; Hirata *et al.* 1997). Die F-ATPase Untereinheit c besteht aus zwei Transmembran-Helices (TM) mit einer Carboxylgruppe im essentiellen Aspartat in TM2, welche essentiell für den Protonentransport ist (Fillingame 1997). Die V-ATPase Untereinheiten c und c' bestehen aus vier Transmembran-Helices mit einer Carboxylgruppe im essentiellen Glutamat in TM4 und einer Molekularmasse von 16 kDa, wobei beide offensichtlich durch Genduplikation eines gemeinsamen Vorfahr mit der F-ATPase Untereinheit c entstanden sind (Mandel *et al.* 1988). Die V-ATPase Untereinheit c'' hat im Gegensatz zu den anderen beiden Proteolipiden eine Molekularmasse von 23 kDa und besteht aus fünf Transmembran-Helices mit dem essentiellen Glutamat in TM3 (Hirata *et al.* 1997; Flannery *et al.* 2004). Die Proteolipide c , c' und c'' der V-ATPase bilden eine asymmetrische Ringstruktur (Wilkens and Forgac 2001), wobei die Anzahl der Proteolipid Untereinheiten, welche den Ring formen, noch ungeklärt ist. Gesichert ist, dass die Untereinheiten c' und c'' jeweils nur in einer Kopie im Ring vorkommen, es bedarf jedoch genauerer Klärung, ob Untereinheit c in vier- oder fünffacher Kopie vorliegt (Arai *et al.* 1988; Powell *et al.* 2000). Die Untereinheiten im Ring sind in einer bestimmten Anordnung orientiert, wobei Untereinheit c' angrenzend und rechtslaufend von Untereinheit c'' positioniert ist, in Bezug auf die Blickrichtung vom Zytoplasma auf die Membran (Abb. 1.1 B) (Wang *et al.* 2007). Die 100 kDa Untereinheit a ist eine weitere wesentliche Komponente des V_0 -Komplexes, welche zusammen mit dem Proteolipidring an der Translokation von Protonen beteiligt ist (Abb. 1.1 C). Topologische Studien zeigen, dass die Untereinheit a aus zwei Bereichen besteht, einem N-terminalen hydrophilen Bereich von ca. 50 kDa, der auf der zytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert ist und einem C-terminalen Bereich, der mutmaßlich acht Transmembran-Helices besitzt (Leng *et al.* 1999; Wang *et al.* 2008). Bei *Saccharomyces* zeigen die beiden Isoformen der Untereinheit a (Vph1 und Stv1), deren

Aminosäuresequenz zu 54 % identisch sind (Manolson *et al.* 1992; Manolson *et al.* 1994), Unterschiede in der Lokalisierung, Assemblierung und Kopplungseffizienz (Kawasaki-Nishi *et al.* 2001; Kawasaki-Nishi *et al.* 2001). Letztere ist abhängig vom C-terminalen Bereich, die Lokalisierung und Assemblierung hingegen vom N-terminalen Bereich. Der C-terminale Bereich der Untereinheit a, der 2 Halbkanäle enthält, die den Protonen den Kontakt mit den Carboxylgruppen des Proteolipidrings in der Membran ermöglichen, besitzt Ähnlichkeiten zur F-ATPase Untereinheit a. In Abbildung 1.1 C ist der vermutliche Mechanismus der Protonentranslokation durch den V_0 -Komplex dargestellt. Des Weiteren ist in TM8 ein essentielles Arginin lokalisiert, welches absolut notwendig für den Protonentransport ist (Kawasaki-Nishi *et al.* 2001). Die Nähe des Arginin zur Carboxylgruppe der Untereinheit c bewirkt wahrscheinlich aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen ein kurzes Verharren des Proteolipidrings und gibt somit den Protonen die Möglichkeit in den Proteolipidring zu gelangen.

Die V-ATPase Untereinheit d mit einem Molekulargewicht von 36 kDa ist wie ein Boxhandschuh geformt (Bauerle *et al.* 1993; Wilkens and Forgac 2001; Iwata *et al.* 2004; Thaker *et al.* 2007), besitzt keinerlei Transmembran-Helices (Wang *et al.* 1988), lokalisiert möglicherweise auf dem Proteolipidring und könnte so die zentrale Achse des V_1 -Komplexes mit dem Proteolipidring des V_0 -Komplexes verbinden. Die genauere Funktion der Untereinheit d ist jedoch ebenso unbekannt wie die der Untereinheit e. Die V-ATPase Untereinheit e wurde zuerst bei *Bos taurus* und *Manduca sexta* als Teil des V_0 -Komplexes entdeckt (Ludwig *et al.* 1998; Merzendorfer *et al.* 1999) und erst Jahre später konnte sie als Teil der V-ATPase bei der Hefe nachgewiesen werden (Davis-Kaplan *et al.* 2004; Sambade and Kane 2004). Sie ist im Gegensatz zur Untereinheit d ein integrales Membranprotein mit 2 Transmembran-Helices und einer Molekularmasse von 9 kDa (Compton *et al.* 2006); bei *Manduca* beträgt ihre Molekularmasse wegen der starken Glykolysierung 20 kDa (Merzendorfer *et al.* 1999).

1.2.2. Assemblierung der V-ATPase

Die Biosynthese der V-ATPase in der Hefe erfolgt über zwei unabhängige Prozesse, wobei der V_1 -Komplex im Zytoplasma synthetisiert wird und der V_0 -Komplex über den sekretorischen Weg zur Vakuole gelangt (Doherty and Kane 1993; Bryant *et al.* 1998). Generell führt die Deletion einer der V_1 -Untereinheiten nicht zum Abbau der anderen Untereinheiten, verhindert aber die Assemblierung des V_1 -Komplexes an der Vakuolenmembran, der V_0 -Komplex hingegen liegt in diesen Mutanten stabil in der

Vakuolenmembran vor (Kane *et al.* 1992; Doherty and Kane 1993; Ho *et al.* 1993). Die Deletion einer V_0 -Untereinheit führt zum Verlust des assemblierten V_0 -Komplexes in der Vakuolenmembran sowie zu einer reduzierten Menge an V_0 -Untereinheiten, wohingegen der V_1 -Komplex weiterhin stabil im Zytoplasma vorliegt (Kane *et al.* 1992; Doherty and Kane 1993).

In Zellen mit einer Deletion der Untereinheit F wie auch der Untereinheit E sind die anderen V_1 -Untereinheiten weiterhin als Teilkomplex im Zytoplasma zu finden, aber es ist ihnen nicht möglich, an die Vakuolenmembran zu assemblieren (Tomashek *et al.* 1996). Überraschenderweise führte die Deletion der Untereinheit F auch zu einer Reduzierung der Anzahl an voll assemblierten V_0 -Komplexen an der Vakuolenmembran (Graham *et al.* 1994). Damit ist die Untereinheit F die einzige Untereinheit, die bei einem Fehlen beide Komplexe in ihrer Assemblierung beeinflusst. Eine weitere Besonderheit zeigt die V_1 -Untereinheit H, da es bei einer Deletion dieser trotzdem zu einer vollständig assemblierten, allerdings inaktiven V-ATPase kommt (Ho *et al.* 1993). In Abwesenheit der Untereinheit H ist der V_1 -Komplex weniger fest an der Membran verankert und kann leichter biochemisch gelöst werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Untereinheit H die Aktivität der V-ATPase reguliert. Auch bei einem Fehlen der V-ATPase Untereinheit C kommt es weiterhin zu einem vollständig assemblierten V_1 -Komplex im Zytoplasma (Doherty and Kane 1993; Tomashek *et al.* 1996). Eine Deletion der Untereinheit A, B oder D führt hingegen zu einem Fehlen jeglicher größerer V_1 -Teilkomplexe im Zytoplasma (Tomashek *et al.* 1996).

1.2.3. Inhibitoren der V-ATPase

Für die V-ATPase gibt es eine Reihe von spezifischen Inhibitoren, wie die beiden Plecomakrolide Bafilomycin und Concanamycin, die schon in nanomolaren Konzentrationen hemmen (Bowman *et al.* 1988; Dröse *et al.* 1993). Beide Inhibitoren weisen dabei jedoch für verschiedene Spezies unterschiedliche IC_{50} -Werte auf (Dröse *et al.* 2001). Durch Bindungsstudien mit dem radioaktiv markierten Plecomakrolid J-Concanolid A konnte gezeigt werden, dass die V-ATPase Untereinheit c als Bindungspartner für diese Inhibitoren dient (Huss *et al.* 2002).

Eine andere Klasse von Inhibitoren sind die Benzolacton-Enamide. Zu dieser Gruppe gehören Salicylilhalamid, Lobatamid und Apicularen, die wie die Plecomakrolide IC_{50} -Werte in nanomolaren Bereichen haben (Boyd *et al.* 2001; Huss *et al.* 2002; Xie *et al.* 2004; Huss *et al.* 2005). Die Benzolacton-Enamide weisen in Bezug auf bisher gefundene

Inhibitoren der V-ATPase eine Besonderheit auf, da sie ausschließlich V-ATPasen aus Säugetieren hemmen, nicht aber diejenigen aus *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae* (Boyd *et al.* 2001). Der Nachweis, an welche der V-ATPase Untereinheiten die Benzolacton-Enamide binden, ist jedoch noch nicht erbracht worden. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte nur gezeigt werden, dass die Benzolacton-Enamide nicht die gleiche Bindungstasche wie die Plecomakrolide haben, da sie diese in Bindungsstudien nicht verdrängen konnten (Huss *et al.* 2005). Dennoch konnte die Bindungstasche auf den V_0 -Komplex eingeschränkt werden, da Salicylhalamid nicht nur die Protonentranslokation des Holoenzym sondern auch die Aktivität des H^+ -Kanals von rekonstruierten V_0 -Komplexen aus Rinder-Clathrinvesikeln hemmt (Xie *et al.* 2004). Ein weiteres Benzolacton-Enamid, das Cruentaren, stellte sich während eines Zellscreenings als kein spezifischer Inhibitor für die V-ATPase heraus. Überraschenderweise hemmt Cruentaren stattdessen die mitochondriale F-ATPase in nanomolaren Konzentrationen und bindet zudem an den F_1 -Komplex (Kunze *et al.* 2006; Kunze *et al.* 2007).

Einer der neueren Inhibitoren der V-ATPase ist das Macrolacton Archazolid, welches durch Myxobakterien produziert wird (Sasse *et al.* 2003). Getestet an V-ATPasen, Na^+/K^+ -ATPasen und F-ATPasen erwies sich Archazolid als exklusiver und hochwirksamer Inhibitor der V-ATPase mit IC_{50} -Werten im nanomolaren Bereich (Huss *et al.* 2005). Obwohl Archazolid erst ein kürzlich identifizierter V-ATPase Inhibitor ist, ist schon ein Teil der Bindungstasche innerhalb der V-ATPase bekannt. Durch erneute Bindungsstudien mit dem radioaktiv markierten Plecomakrolid J-Concanolid A konnte die V_0 -Untereinheit c als Partner für Archazolid identifiziert werden (Huss *et al.* 2005).

1.2.4. Regulationsmechanismen der V-ATPase

Bei einem komplexen Enzym wie der V-ATPase, welches in fast allen eukaryotischen Zellen vorkommt und dort die unterschiedlichsten Prozesse, angetrieben durch die Hydrolyse von ATP, beeinflusst, ist es für den Energiehaushalt der Zelle entscheidend, dass dieses Enzym genau definierten und schnellen Regulationsmechanismen unterliegt.

1.2.4.1. Die reversible Dissoziation der V-ATPase

Die reversible Dissoziation des löslichen V_1 -Komplexes vom membrangebundenen V_0 -Komplex ist ein für V-ATPasen charakteristischer Regulationsmechanismus, der zu einer Stilllegung der ATP Hydrolyse und dem Blockieren des Transportes der Protonen über die Membran führt. Dieser Prozess der Dissoziation wurde erstmals bei *Manduca sexta*

während der Häutung der Raupen beobachtet. Dabei konnte durch Gelelektrophorese und Immunfärbung eine physikalische Trennung der V_1 -Untereinheiten vom V_0 -Komplex nachgewiesen werden (Sumner *et al.* 1995). Ein Jahr später konnte an hungernden Raupen gezeigt werden, dass dieser Prozess reversibel ist und die V_1 -Komplexe wieder zur Membran gelangen, nachdem die Raupen erneut ihr Futter bekamen (Gräf *et al.* 1996). Nach der Dissoziation zeigt der freie V_1 -Komplex keinerlei Hydrolyse von ATP unter den in der Zelle normalen Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Konzentrationen (Gräf *et al.* 1996), und der freie V_0 -Komplex gewährt Protonen keinen Durchlass (Beltran and Nelson 1992; Zhang *et al.* 1992). Bei unphysiologisch hohen millimolaren Ca^{2+} -Konzentrationen oder in Gegenwart von 25 % Methanol hingegen kommt es zur Hydrolyse von ATP durch den V_1 -Komplex (Gräf *et al.* 1996).

Kurz nach der Entdeckung der reversiblen Dissoziation der V-ATPase von *Manduca* konnte diese auch in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* durch indirekte Immunfluoreszenz und subzelluläre Fraktionierung beobachtet werden. Dabei wurde gezeigt, dass bei einem Entzug von Glucose die V-ATPase nach 5 min zu 70 % dissoziiert vorliegt und bei Zugabe von Glucose zum Medium es zu einer schnellen Reassemblierung des V_1 -Komplexes an den V_0 -Komplex kommt (Kane 1995). Nach dem Nachweis in der Säuger-Niere scheint die reversible Dissoziation der V-ATPase somit ein universeller Regulationsmechanismus zu sein (Sautin *et al.* 2005). Dabei handelt es sich nicht um eine Neusynthese von Proteinen, da eine Inhibierung der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid keinen Einfluss auf den Prozess der reversiblen Dissoziation hat (Kane 1995; Jäger *et al.* 1996).

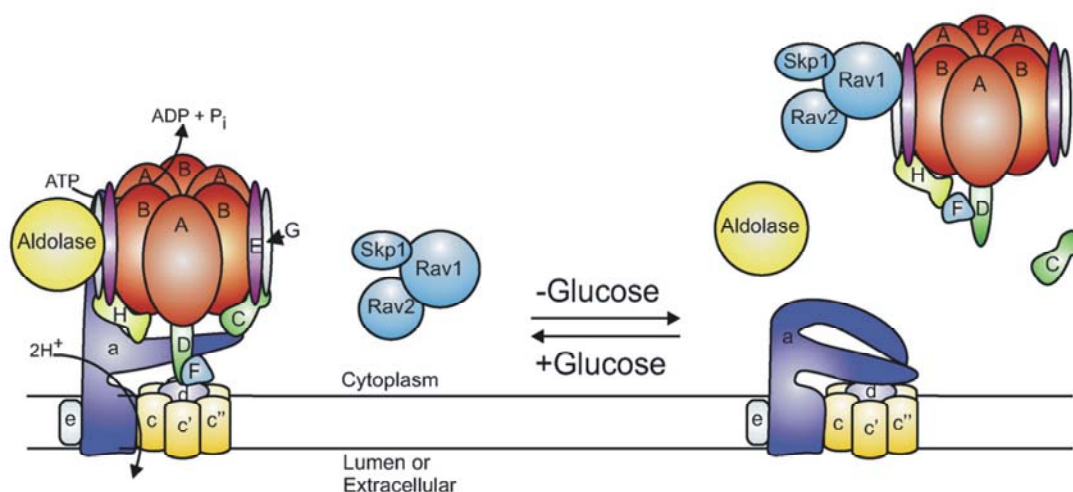


Abb. 1.3: Regulationsmechanismen der V-ATPase aus *Saccharomyces cerevisiae*
 Regulation der Aktivität der V-ATPase durch reversible Dissoziation in ihren V_1 - und V_0 -Komplex (Jefferies *et al.* 2008)

Eine besondere Stellung während der reversiblen Dissoziation nimmt die V_1 -Untereinheit C ein, da sie nach der Dissoziation getrennt vom V_1 -Komplex im Zytoplasma vorliegt (Gräf *et al.* 1996; Merzendorfer *et al.* 2000; Vitavska *et al.* 2003). Neuere Studien legen deswegen den Gedanken nahe, dass die Untereinheit C eine zentrale Rolle bei der reversiblen Dissoziation der V-ATPase spielt, wobei die genaue Funktion der Untereinheit C in diesem Zusammenhang erst noch vollends geklärt werden muss. Die Untereinheiten C und H scheinen den V_1 -Komplex mit dem V_0 -Komplex zu verbinden und so zu stabilisieren (Inoue and Forgac 2005; Muench *et al.* 2009). Im Gegensatz zur Untereinheit C, die unabhängig vom V_1 -Komplex im Zytoplasma zu finden ist, verbleibt die Untereinheit H am V_1 -Komplex und geht eine Bindung mit der Untereinheit F der zentralen Achse ein (Jefferies and Forgac 2008). Durch diese Bindung scheint die ATP Hydrolyse inhibiert zu werden, da bei einer Deletion der Untereinheit H der freie V_1 -Komplex seine Mg^{2+} -abhängige ATPase Aktivität behält (Parra *et al.* 2000; Rizzo *et al.* 2007).

Die V-ATPase Untereinheit A besitzt einen Bereich, der bei der F-ATPase nicht zu finden ist und daher als „nicht-homologer Bereich“ bezeichnet wird (Abb. 1.2, mit Sternchen markiert). Dieser Bereich besteht aus 90 Aminosäuren, und spezifische Punktmutationen in diesem Bereich führen zu einer Veränderung der Kopplung von Protonentransport und ATPase Aktivität sowie zu einer Inhibierung der Dissoziation der V-ATPase (Shao *et al.* 2003). Der allein exprimierte „nicht-homologe Bereich“ der Untereinheit A geht in Immunpräzipitationsstudien eine Bindung mit dem V_0 -Komplex ein, wobei in Zellen ohne Glucose im Medium es zu einer Reduzierung dieser Bindung kommt. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass der „nicht-homologe Bereich“ der V-ATPase Untereinheit A als Auslöser für die Aktivierung der Dissoziation dient (Shao and Forgac 2004).

Das Membranumfeld, in dem die V-ATPase lokalisiert ist, scheint ebenfalls ein wichtiger Faktor bei der reversiblen Dissoziation zu sein. Bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gibt es zwei Isoformen der V-ATPase Untereinheit a (Vph1 und Stv1), wobei V-ATPasen mit integriertem Stv1 in der Membran des Golgi-Apparats zu finden sind und diese bei einem Entzug der Glucose nicht dissoziieren (Kawasaki-Nishi *et al.* 2001). V-ATPasen mit der Isoform Stv1, welche nach einem *knockout* von Vph1 in der Vakuolenmembran lokalisieren, beteiligen sich wiederum an der reversiblen Dissoziation als Antwort auf wechselnde Glucosekonzentrationen. Vph1 dagegen lokalisiert als Teil der V-ATPase in der Vakuolenmembran der Hefe und ist bei Glucoseentzug an der Dissoziation beteiligt (Kawasaki-Nishi *et al.* 2001). Die Glucose-abhängige Dissoziation der V-ATPase scheint somit abhängig von der zellulären Umgebung zu sein, sprich von der Membrenumgebung

in der Zelle (Kawasaki-Nishi *et al.* 2001; Qi and Forgac 2007). Welche umgebungsbedingten Signale die reversible Dissoziation kontrollieren, ist dabei noch nicht geklärt. Erste Ergebnisse zeigen jedoch, dass der innere pH-Wert der Kompartimente eine Rolle dabei spielt (Shao and Forgac 2004). Eine Behandlung von Hefezellen mit der schwachen Base Chloroquin führt, durch Immunpräzipitationsstudien bestätigt, zu einem Verlust der Dissoziation der V-ATPase bei Glucosemangel (Shao and Forgac 2004).

1.2.4.2. Die V-ATPase und das Zytoskelett

Aktinfilamente an der Plasmamembran sorgen für mechanische Stabilität, festigen die Zellform und Adhäsion. Eine Vielzahl von integralen Membranproteinen sorgt dabei für die Verankerung der Aktinfilamente mit der Plasmamembran. Diese Membrananker gehören generell zu zwei Klassen: den Adhäsionsmolekülen und unterschiedlichen Ionentransport-Proteinen (Denker and Barber 2002).

1999 wurde zum ersten Mal eine Interaktion zwischen einer V-ATPase und dem Aktin-Zytoskelett beschrieben. Dabei handelt es sich um die V-ATPase aus Mäuse Osteoklasten (Lee *et al.* 1999). Die Interaktion variiert mit dem Zustand der Aktivität der Osteoklasten, was einen Hinweis auf ihre mögliche Rolle bei der Regulation des Transports der V-ATPasen an die Membran liefert. Des weiteren zeigten Versuche, dass die V-ATPase in Osteoklastenzellkulturen zusammen mit Aktin und Myosin II als detergenzienunlöslicher Komplex vorkam, was auf eine direkte Bindung der V-ATPase an die Aktinfilamente schließen lässt (Lee *et al.* 1999). Dies wurde durch Co-Immunpräzipitation mit einem monoklonalen Antikörpern gegen die V-ATPase Untereinheit E bestätigt, und Co-Pelletierungsassays erbrachten den endgültigen Beweis einer direkten Interaktion der V-ATPase mit Aktinfilamenten.

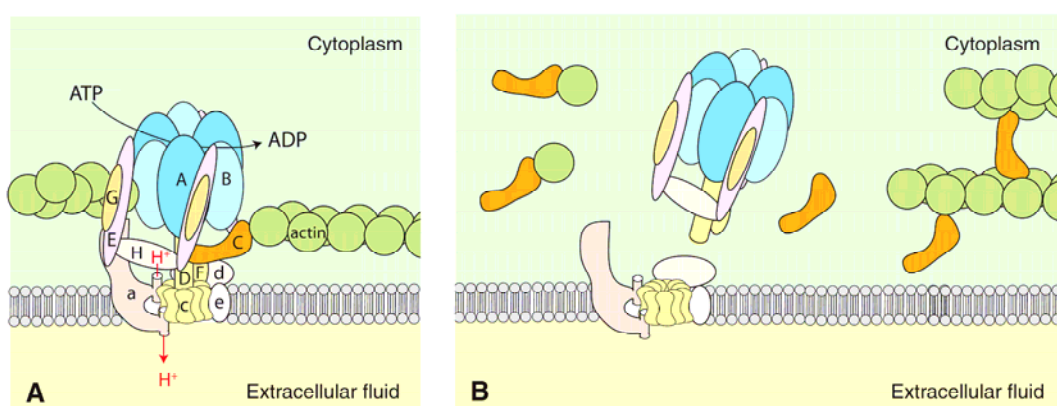


Abb. 1.4: Interaktion der V-ATPase mit Aktin

A: Holoenzym. Aktinfilamente binden an Untereinheit B und C. **B:** Reversible Dissoziation der V-ATPase in V_1 - und V_0 -Komplex. Untereinheit C bindet an F-Aktin wie auch an G-Aktin. (Wieczorek *et al.* 2009)

Im Overlayblot der V-ATPase mit Aktin wurde die V-ATPase Untereinheit B als Partner für die Interaktion identifiziert. Dabei konnte eine 11 Aminosäuren umfassende Profilin-ähnliche Domäne in der N-terminalen Hälfte von B durch Mutagenesestudien als Aktinbindungsdomäne bestimmt werden (Holliday *et al.* 2000; Chen *et al.* 2004).

Zum Nachweis der Universalität der Interaktion der V-ATPase mit Aktin wurden in unserer Arbeitsgruppe weiterführende Experimente mit der V-ATPase aus *Manduca sexta* durchgeführt. Durch Immunfärbungen von V-ATPase und Aktin in der Gobletzellapikalmembran der Raupen von *Manduca* konnte eine Co-Lokalisation der beiden Partner ermittelt werden, welche bei einer Dissoziation des V_1 -Komplexes vom V_O -Komplex nicht mehr beobachtet werden konnte (Vitavska *et al.* 2003). Overlayblots bestätigten Untereinheit B als Bindungspartner, aber es wurde mit Untereinheit C ein bis dahin noch unbekannter Partner identifiziert (Vitavska *et al.* 2003). Durch die rekombinante V-ATPase Untereinheit C aus *Manduca* konnte in Overlayblots und Co-Pelletierungsassays diese Interaktion mit F-Aktin bestätigt werden (Vitavska *et al.* 2003). Co-Pelletierungsassays zeigten, dass der V_1 -Komplex eine geringere Affinität zu Aktin besitzt als das Holoenzym. Diese kann durch eine Rekonstitution des V_1 -Komplexes mit Untereinheit C deutlich erhöht werden (Vitavska *et al.* 2003), was Untereinheit C als Interaktionspartner für Aktin im Holoenzym bestätigt. In weiteren Experimenten zeigte sich, dass die V-ATPase Untereinheit C aus *Manduca* nicht nur F-Aktin, sondern auch G-Aktin mit einer hohen Affinität bindet. Besonders interessant war die Tatsache, dass die Untereinheit C die Aktinfilamente nicht destabilisiert, sondern F-Aktin stabilisiert und bündelt (Vitavska *et al.* 2005). Aktinbindungsstellen in der Untereinheit C sowohl im N- als auch im C-terminalen Bereich des Proteins scheinen dabei das Bündeln der Aktinfilamente zu ermöglichen.

Neben Insekten und Säugetieren konnte auch in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eine Interaktion der V-ATPase Untereinheit B mit F-Aktin nachgewiesen werden, was zusätzlich auf die Universalität dieses Phänomens schließen lässt (Zuo *et al.* 2008). Welche Rolle jedoch diese Interaktion spielt, ist noch nicht geklärt, da Immunpräzipitationsstudien der Hefe V-ATPase nahelegen, dass die Regulation der V-ATPase durch den Mechanismus der reversiblen Dissoziation des V_1 -Komplexes nicht vom Aktin-Zytoskelett abhängig ist (Xu and Forgac 2001).

Im Gegensatz zum Aktin-Zytoskelett haben die Mikrotubuli offensichtlich einen Einfluss auf die reversible Dissoziation der V-ATPase bei der Hefe. Durch Depolymerisierung der Mikrotubuli mit Nocodazol zeigte sich eine Inhibierung der Dissoziation der V-ATPase,

aber nicht der Reassoziaton. Dieses wurde wie beim Aktin-Zytoskelett durch Immunpräzipitationsstudien bewiesen (Xu and Forgac 2001). Die Ergebnisse legen weiterhin den Schluss nahe, dass Dissoziation und Reassoziaton zwei unabhängig voneinander kontrollierte Prozesse sind. Es ist möglich, dass die Mikrotubuli an der Bewegung des V_1 -Komplexes bei der Dissoziation beteiligt sind. In Nierenzellen zeigte sich eine Abhängigkeit der Lokalisation der V-ATPase von intakten Mikrotubuli, wobei in Colchicin behandelten Zellen die V-ATPase im Zytoplasma in Vesikeln und nicht an der apikalen Membran lokalisiert ist (Brown *et al.* 1991; Brown *et al.* 1992). Eine direkte Interaktion der V-ATPase mit den Mikrotubuli konnte jedoch durch die Immunpräzipitationsversuche mit der V-ATPase aus der Hefe nicht detektiert werden (Xu and Forgac 2001).

Somit scheinen die Mikrotubuli zwar einen Einfluss auf die Dissoziation des V_1 -Komplexes zu haben, gehen dabei aber keine Interaktion mit der V-ATPase ein. Das Aktin-Zytoskelett spielt jedoch keine Rolle bei der reversiblen Dissoziation, kann aber direkt mit den V-ATPase Untereinheiten B und C interagieren.

1.2.4.3. Signaltransduktionswege und ihre Rolle bei der Regulation der V-ATPase

Da die Glucose-abhängige Dissoziation der V-ATPase mit weniger als 2 Minuten nach Glucoseentzug sehr schnell vonstatten geht (Kane 1995), ist es sehr wahrscheinlich, dass sie durch Signalwege vermittelt wird. Mehrere Glucose-abhängige Signalwege wurden daher im Hinblick auf ihren Einfluss auf die V-ATPase in der Hefe getestet (Parra and Kane 1998). Dabei stellte sich heraus, dass der Ras-cAMP Weg, der Snf1 Kinase-vermittelte Glucose-Hemmungs/Enthemmungsweg und der Proteinkinase C-abhängige Weg keine Rolle spielen. Bei einer Erhöhung oder auch Verringerung der intrazellulären cAMP Konzentration war kein Einfluss auf die reversible Dissoziation zu beobachten, auch die Deletion der zentralen Kinase Snf1 für die Glucosehemmung bewirkte keine Veränderung des Phänotyps. Die Proteinkinase C, die u.a. die Phosphorylierung und Aktivierung der Plasmamembran H^+ -ATPase auslöst, und die Proteinphosphatase 2A zeigten ebenfalls keine Auswirkung auf die V-ATPase.

Somit dürfte die Regulation der V-ATPase durch die reversible Dissoziation unabhängig von den Hauptsignalkaskaden sein. Dennoch scheint die Glykolyse bei der Regulation der Dissoziation involviert zu sein, da mehrere andere Kohlenstoffquellen (Raffinose, Glycerin, Ethanol, Galactose, Lactat und Xylulose) keine Reassemblierung nach einer

Dissoziationsinitiierung durch Glucoseentzug bewirkten (Parra and Kane 1998). Nur die rasch verwertbaren Kohlenstoffquellen Fructose und Mannose können die Glucose als Auslöser der Reassemblierung ersetzen (Parra and Kane 1998). Die Verstoffwechslung dieser drei Zucker geschieht frühzeitig während der Glykolyse, da beide nach ihrer Umwandlung als Fructose-6-Phosphat in die Glykolyse eingeschleust werden. Dies lässt vermuten, dass eine oder mehrere Komponenten der Glykolyse als Signal für die reversible Dissoziation eine Rolle spielen. Bei der Suche nach weiteren Interaktionspartnern der V-ATPase war es daher nicht verwunderlich, dass das glykolytische Enzym Aldolase als neuer Partner entdeckt wurde (Lu *et al.* 2001). Dabei bindet es sowohl die V_1 -Untereinheiten B und E als auch die V_0 -Untereinheit a (Lu *et al.* 2001; Lu *et al.* 2004). Hefen mit einer Deletion der Aldolase weisen eine dissoziierte V-ATPase auf, was eine direkte Kopplung von Glykolyse und Regulation der V-ATPase vermuten lässt. Eine Überexpression des Enzyms bei der Hefe bewirkt dagegen eine Inhibierung der Dissoziation der V-ATPase (Lu *et al.* 2001). Die Aldolasedeletionsmutante zeigt ferner mit keinerlei Wachstum bei einem pH-Wert von 7,5 den typischen Vma^- -Phänotyp von V-ATPase Deletionsstämmen, was auf einen Verlust der V-ATPase Aktivität schließen lässt (Lu *et al.* 2004). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen Aldolase und V-ATPase sich in Gegenwart von Glucose erhöht; somit scheint eine Funktion der Aldolase als Glucosesensor für die Regulation der V-ATPase nahe zu liegen, wobei die Aktivität der Aldolase nicht für die Assemblierung benötigt wird (Lu *et al.* 2007).

Durch einen „Yeast Two Hybrid Assay“ gegen die V-ATPase Untereinheit C aus *Arabidopsis thaliana* konnte die Serin-/Threonin-Proteinkinase WNK8 als Interaktionspartner identifiziert werden, welche nicht nur die V-ATPase Untereinheit C aus *Arabidopsis*, sondern auch die aus *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Manduca sexta* phosphoryliert. Des weiteren konnte in einem Hybrid V_1 -Komplex aus *Manduca* mit Untereinheit C aus *Arabidopsis* die Phosphorylierung der Untereinheiten A, G und B oder E durch die WNK8 Kinase gezeigt werden (Hong-Hermesdorf *et al.* 2006).

In Speicheldrüsen der Schmeißfliege *Calliphora vicina* induziert Serotonin die cAMP-vermittelte Reassemblierung der V-ATPase und die daraus resultierende Aktivität der V-ATPase (Zimmermann *et al.* 2003; Dames *et al.* 2006; Rein *et al.* 2006). Ferner konnte die cAMP-aktivierte Proteinkinase A (PKA) als Schlüssel für die Induzierung der Reassemblierung der V-ATPase identifiziert werden, was bedeutet, dass zumindest ein Protein im Signalweg der Reassemblierung eine Phosphorylierung durch die PKA

durchläuft (Rein *et al.* 2008). Ein möglicher Kandidat scheint dabei die Untereinheit C zu sein, da sie in der *Manduca* V-ATPase die einzige Untereinheit ist, die durch PKA phosphoryliert wird (Voss *et al.* 2007). Untereinheit C kann sowohl als rekombinantes Protein als auch im V_1 -Komplex eingebettet phosphoryliert werden, jedoch nicht im Holoenzym. Die phosphorylierte wie die unphosphorylierte Untereinheit C sind in der Lage, mit dem von Untereinheit C befreiten V_1 -Komplex zu reassemblieren. In den Speicheldrüsen der Schmeißfliege führen ein membrandurchlässiges cAMP-Analog sowie Serotonin zu einer Phosphorylierung der V-ATPase Untereinheit C, die durch den PKA Inhibitor H89 aufgehoben wird (Voss *et al.* 2007). Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass Untereinheit C wahrscheinlich mehr als eine Phosphorylierungsstelle besitzt.

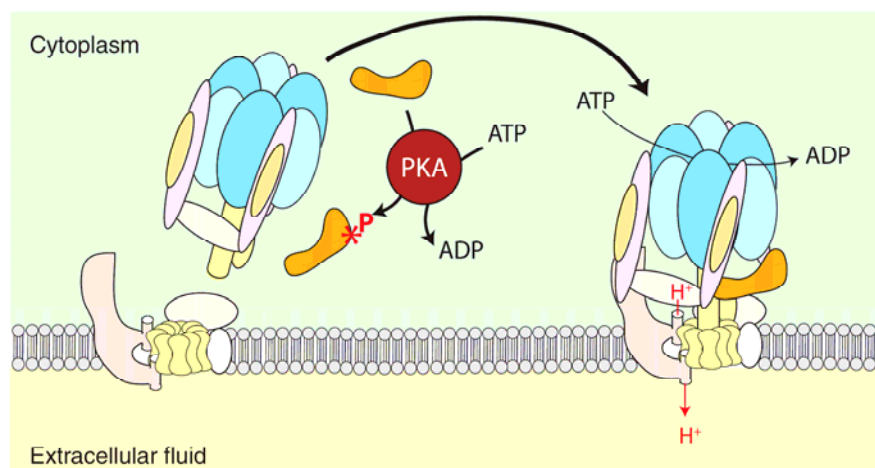


Abb. 1.5: Phosphorylierung der V-ATPase Untereinheit C durch Proteinkinase A (PKA) und ihre vermutliche Rolle bei der reversiblen Dissoziation (Wieczorek *et al.* 2009)

Die Proteinkinase A kommt bei *Saccharomyces* in 3 verschiedenen katalytischen Isoformen (Tpk1, Tpk2 und Tpk3) und einer regulatorischen Untereinheit (Bcy1) (Toda *et al.* 1987) vor. cAMP aktiviert die Kinasen durch Bindung an die regulatorische Untereinheit des tetrameren Holoenzym im Zellkern und anschließender Spaltung in zwei katalytische Untereinheiten und einer dimeren regulatorischen Untereinheit (Krebs and Beavo 1979). Die Lokalisierung des Holoenzym der Hefe im Zellkern bis zur Aktivierung steht im Gegensatz zur zytoplasmatischen Lokalisierung in Säugetieren. Nach Aktivierung verbleibt die regulatorische Untereinheit weiterhin im Zellkern, wohingegen Tpk1 und die schwach exprimierte Kinase Tpk3 ins Zytoplasma wandern und dort ihre Zielproteine phosphorylieren (Mazon *et al.* 1993; Griffioen *et al.* 2000). Tpk2 zeigt hingegen nur während eines Wachstums auf Glycerin oder in der stationären Phase eine Lokalisierung im

Zytoplasma (Tudisca *et al.* 2009). 2008 konnte durch Immunpräzipitation bei der Hefe gezeigt werden, dass die Deletion des hemmenden Regulators Ira2 des Ras/cAMP-Signalweges mit einer Inhibierung der Dissoziation der V-ATPase korreliert (Bond and Forgac). Weiterhin wird die Dissoziation durch eine konstitutiv aktive PKA gehemmt, was durch eine Deletion der regulatorischen Untereinheit Bcy1 bewirkt wurde (Bond and Forgac 2008). Dies lässt den Schluss zu, dass eine aktive PKA bei der Hefe die Ursache für die Reassemblierung oder für das Verhindern der Dissoziation der V-ATPase ist.

1.2.4.4. Die V-ATPase und der RAVE-Komplex

Der RAVE-Komplex (regulator of the H⁺-ATPase of vacuolar and endosomal membranes) wurde während einer Suche nach neuen Bindungspartnern der Hefe Ubiquitin Ligase Skp1 gefunden. Als Bindungspartner wurden dabei Rav1 und Rav2 identifiziert, welche zusammen mit Skp1 einen Komplex bilden, der keine Ubiquitin Ligase ist (Seol *et al.* 2001). Eine Affinitätschromatographie mit dem RAVE-Komplex unter reduzierter Detergenzienkonzentration zeigte eine Reihe von V₁-Untereinheiten, die mit dem RAVE-Komplex zusammen als potentielle Interaktionspartner gereinigt wurden (Seol *et al.* 2001). Die funktionelle Relevanz dieser Interaktion wurde durch einen partiellen Vma⁻-Phänotyp der *rav1Δ* und *rav2Δ* Mutanten bestätigt. Dabei zeigte sich, dass bei einer Deletion eines dieser Gene die Hefezellen bei 37°C in Medium mit einem pH-Wert von 7,5 und erhöhter Calciumkonzentration kein Wachstum aufweisen, aber bei einer Temperatur von 30°C unter diesen Bedingungen ein verringertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp. Mit diesen Ergebnissen im Einklang zeigten Quinacrin-Färbungen bei 30°C eine geringe Anfärbung der Vakuolen im Vergleich zum Wildtyp und bei 37°C keinerlei Färbung (Seol *et al.* 2001). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass isolierte Vakuolen von RAVE Deletionsmutanten eine deutlich geringere Menge von V₁-Komplex an der Membran sowie eine reduzierte V-ATPase Aktivität besitzen, auch wenn die Zellen bei 30°C angezogen wurden (Smardon *et al.* 2002).

Der RAVE-Komplex bindet den im Zytoplasma frei vorliegenden V₁-Komplex und gibt ihn nach Zugabe von Glucose wieder frei. Die RAVE-abhängige Assemblierung der V-ATPase ist also ein Glucose-induzierter aber Glucose-unabhängiger Prozess, da der RAVE-Komplex sowohl unter Glucose-Mangel als auch unter Sättigung an den V₁-Komplex bindet, wenn dieser frei im Zytoplasma vorliegt (Smardon *et al.* 2002). Die V-ATPase Untereinheiten E, G und C wurden in mehreren Experimenten als Bindungspartner des RAVE-Komplexes gefunden (Smardon and Kane 2007). Ohne den RAVE-Komplex kann die Untereinheit C

nicht stabil mit der V-ATPase assemblieren, was die Vermutung nahe legt, dass der RAVE-Komplex als Chaperon für die Assemblierung der V-ATPase dient. Für die Dissoziation ist der RAVE-Komplex jedoch nicht notwendig, was wiederum den Schluss zulässt, dass Dissoziation und Reassoziatio n unterschiedlichen Kontrollmechanismen unterliegen.

1.3. Aufgabenstellung

In der vorliegenden Doktorarbeit sollte mit Hilfe der V-ATPase aus *Saccharomyces cerevisiae* als Modellobjekt die reversible Dissoziation *in vivo* untersucht werden, da bis jetzt alle gewonnenen Erkenntnisse über diesen Regulationsmechanismus der V-ATPase aus *in vitro* Untersuchungen stammen. Für die *in vivo* Experimente sollten Hefestämme verwendet werden, in denen jeweils eine der V-ATPase Untereinheiten mit einem GFP markiert ist. Ein primäres Ziel war dabei die Beobachtung der reversiblen Dissoziation im Hinblick auf den V_1 -Komplex und die Untereinheit C. Des weiteren sollte geklärt werden, welche Faktoren die Regulation der reversiblen Dissoziation beeinflussen. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf dem Zytoskelett sowie dem RAVE-Komplex und der Proteinkinase A. Aber auch andere Faktoren sollten überprüft werden hinsichtlich ihres Einflusses auf die V-ATPase, um den Mechanismus der Regulation der reversiblen Dissoziation der Hefe V-ATPase *in vivo* aufzuklären.

2. Material

2.1. *Escherichia coli* Stämme

Zur Transformation wurde der Stamm DH5 α verwendet und für die Expression von Proteinen der Stamm BL21. Bei diesen Stämmen handelt es sich um Derivate des *E. coli* Stammes K12.

Tab. 2.1: In dieser Arbeit verwendete *E. coli* Stämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
DH5 α	F ⁻ Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>endA1 recA1 hscR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>deoR thi-1 supE44 λ-gyrA96 relA1</i>	Hanahan (1983)
BL21 (DE3) pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS(Cam ^R)	Novagen

2.2. *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

Tab. 2.2: In dieser Arbeit verwendete *S. cerevisiae* Stämme

Hefestamm	Genotyp	Referenz
S288C	MATa <i>his3</i> Δ 200 <i>leu2</i> Δ 1 <i>ura3-52</i>	Brachmann <i>et al.</i> (1998)
BMA64 1B <i>vma3</i> Δ	MATa <i>ura3</i> Δ 52 <i>trp1</i> Δ 2 <i>leu2</i> Δ 3,112 <i>his3</i> Δ 11 <i>ade2</i> Δ 1 <i>can1</i> Δ 100 <i>vma3</i> Δ ::HIS3	Johanna Bahr
ATCC201388 VMA1-GFP	MATa <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0 VMA1-GFP(S65T)-His3MX6	Huh <i>et al.</i> (2003)
ATCC201388 VMA2-GFP	MATa <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0 VMA2-GFP(S65T)-His3MX6	Huh <i>et al.</i> (2003)
ATCC201388 VMA5-GFP	MATa <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0 VMA5-GFP(S65T)-His3MX6	Huh <i>et al.</i> (2003)
ATCC201388 VMA8-GFP	MATa <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0 VMA8-GFP(S65T)-His3MX6	Huh <i>et al.</i> (2003)
ATCC201388 VMA4-GFP	MATa <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0 VMA4-GFP(S65T)-His3MX6	Huh <i>et al.</i> (2003)
ATCC201388 VMA7-GFP	MATa <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0 VMA7-GFP(S65T)-His3MX6	Huh <i>et al.</i> (2003)
ATCC201388 VMA10-GFP	MATa <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0 VMA10-GFP(S65T)-His3MX6	Huh <i>et al.</i> (2003)
ATCC201388 VMA13-GFP	MATa <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0 VMA13-GFP(S65T)-His3MX6	Huh <i>et al.</i> (2003)
ATCC201388 VPH1-GFP	MATa <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0 VPH1-GFP(S65T)-His3MX6	Huh <i>et al.</i> (2003)
ATCC201388 FBA1-GFP	MATa <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0 FBA1-GFP(S65T)-His3MX6	Huh <i>et al.</i> (2003)
HPS330	MAT α <i>ura3 his3 leu2 trp1::GFP-Tub1-TRP1 ade2</i>	Dr. H.-P. Schmitz
ATCC201388 TOM20-GFP	MATa <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0 TOM20-GFP(S65T)-His3MX6	Huh <i>et al.</i> (2003)
DHD5	MATa/ α <i>ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 MAL/MAL SUC/SUC GAL/GAL</i>	Kirchrath <i>et al.</i> (2000)
DHD5 <i>rav1</i> Δ B-GFP	MATa <i>ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 MAL SUC GAL rav1::CaURA3 VMA2-GFP-His3MX6</i>	diese Arbeit
DHD5 <i>rav1</i> Δ C-GFP	MATa <i>ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 MAL SUC GAL rav1::CaURA3 VMA5-GFP-His3MX6</i>	diese Arbeit

DHD5 <i>rav1Δ</i> E-GFP	MAT α <i>ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 MAL SUC GAL</i> <i>rav1::CaURA3 VMA4-GFP-His3MX6</i>	diese Arbeit
DHD5 <i>rav1Δ</i> G-GFP	MAT α <i>ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 MAL SUC GAL</i> <i>rav1::CaURA3 VMA10-GFP-His3MX6</i>	diese Arbeit
DHD5 <i>tpk1Δ</i> B-GFP	MATa <i>ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 MAL SUC GAL</i> <i>tpk1::CaURA3 VMA2-GFP-His3MX6</i>	diese Arbeit
DHD5 <i>tpk1Δ</i> C-GFP	MAT α <i>ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 MAL SUC GAL</i> <i>tpk1::CaURA3 VMA5-GFP-His3MX6</i>	diese Arbeit
DHD5 <i>tpk1Δ</i> D-GFP	MATa <i>ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 MAL SUC GAL</i> <i>tpk1::CaURA3 VMA8-GFP-His3MX6</i>	diese Arbeit
DHD5 <i>tpk3Δ</i> B-GFP	MAT α <i>ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 MAL SUC GAL</i> <i>tpk3::CaURA3 VMA2-GFP-His3MX6</i>	diese Arbeit
DHD5 <i>tpk3Δ</i> C-GFP	MATa <i>ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 MAL SUC GAL</i> <i>tpk3::CaURA3 VMA5-GFP-His3MX6</i>	diese Arbeit
DHD5 <i>tpk3Δ</i> B-GFP	MAT α <i>ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 MAL SUC GAL</i> <i>tpk3::CaURA3 VMA8-GFP-His3MX6</i>	diese Arbeit
DHD5 <i>tpk1Δ tpk3Δ</i> B-GFP	MATa <i>ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 MAL SUC GAL</i> <i>tpk1::CaURA3 tpk3::LEU2 VMA2-GFP-His3MX6</i>	diese Arbeit
DHD5 <i>tpk1Δ tpk3Δ</i> C-GFP	MAT α <i>ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 MAL SUC GAL</i> <i>tpk1::CaURA3 tpk3::LEU2 VMA5-GFP-His3MX6</i>	diese Arbeit
DHD5 <i>tpk1Δ tpk3Δ</i> D-GFP	MAT α <i>ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 MAL SUC GAL</i> <i>tpk1::CaURA3 tpk3::LEU2 VMA8-GFP-His3MX6</i>	diese Arbeit
DHD5 <i>bcy1Δ</i> C-GFP	MATa <i>ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 MAL SUC GAL</i> <i>bcy1::CaURA3 VMA5-GFP-His3MX6</i>	diese Arbeit
W303 1A	MATa <i>leu2-3,112 ura3-1 trp1-92 his 3-11,15 ade2-1 can1-100</i> <i>GAL SUC2 mal</i>	Thomas und Rothstein (1989)
JT20242 (LK5)	MATa <i>W303 gpr1(+1386/2584)::LEU2</i>	Kraakman <i>et al.</i> (1999)
JT21871	MATa <i>W303 tpk1::KanMX4 tpk2::KanMX4 tpk3::LEU2</i> <i>mouseCα2::URA3</i>	Peeters <i>et al.</i> (2006)
JT20242 B-GFP	MATa <i>W303 gpr1(+1386/2584)::LEU2 VMA2-GFP-KanMX6</i>	diese Arbeit
JT20242 C-GFP	MATa <i>W303 gpr1(+1386/2584)::LEU2 VMA5-GFP-KanMX6</i>	diese Arbeit
JT21871 B-GFP	MATa <i>W303 tpk1::KanMX4 tpk2::KanMX4 tpk3::LEU2</i> <i>mousePKA Caα::URA3 VMA2-GFP-His3MX6</i>	diese Arbeit
JT21871 C-GFP	MATa <i>W303 tpk1::KanMX4 tpk2::KanMX4 tpk3::LEU2</i> <i>mouse PKA Caα::URA3 VMA5-GFP-His3MX6</i>	diese Arbeit
SC0000	MATa <i>ade2 arg4 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52</i>	Euroscarf
SC0317	MATa <i>ade2 arg4 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 VMA5-TAP-</i> <i>KIURA3</i>	Euroscarf

2.3. Oligonukleotide und Vektoren

Tab. 2.3: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Zweck
dRAV1-PURA_for	TGAGAAAGTAAACAAACGTGCACACGCAAAGGTAGTTCTCGTAG GTCAGGTTGCTTTC	Deletion von <i>RAV1</i> durch <i>URA3</i>
dRAV1-URA_rev	GGCTGAAATTTGAGATTAATAACCCAATATGAAAACACTACTC GATGAATTCGAGCTCG	
dTPK1-URA_for	AATATAGATACGAGAGGAAAATACAACAAAACATTAGTCAGTAG GTCAGGTTGCTTTC	Deletion von <i>TPK1</i> durch <i>URA3</i>
dTPK1-URA_rev	AGCTTAAGCAGTGCATGAATTATAGCTGATTGTGTGAAAGTCGA TGAATTCGAGCTCG	
dTPK3-URA_for	CATGGCCCTGTTAGACTCACCAAGAATCTATAACCAGGTGTAGG TCAGGTTGCTTTC	Deletion von <i>TPK3</i> durch <i>URA3</i>
dTPK3-URA_rev	TGTATATCGGTGGTTGTACAAGGAAAGAGCGAGCCTGCACTCGA TGAATTCGAGCTCG	
dTPK3-LEU_for	TGTATATCGGTGGTTGTACAAGGAAAGAGCGAGCCTGCACGGC TCCAGTTATCCAAGTAG	Deletion von <i>TPK3</i> durch <i>LEU2</i>
dTPK3-LEU_rev	CATGGCCCTGTTAGACTCACCAAGAATCTATAACCAGGTTAGAG ATCCGCAGGCTAACC	
RAV1_for	TTAAAGCTGCCCGCATAG	Überprüfung der Deletionen
TPK1_for	TTTGGAGCCACCAATTGC	
TPK3_for	GTAGCAGGCTCACTTATG	
URA_rev	AATCCAACCTCCAGGTGTC	
LEU_rev	CGATTTTCGTCGCTGTTAGAG	
YMAT_rev	AGTCACATCAAGATCGTTTATG	Bestimmung des Matingtyps (Huxley <i>et al.</i> 1990)
YMAT-alpha_for	GCACGGAATATGGGACTACTTCG	
YMAT-a_for	ACTCCAACCTCAAGTAAGAGTTTG	
VMA2-mOrange_for	CGGTAAGAAGAAGGACGCCAGCCAAGAAGAATCTCTAATCCGGA TCCCCGGGTTAATTA	VMA2-GFP Klonierung
VMA2-CFP_rev	CGGACAAAATAAAAAAGCCTTTTTCTTCAGCAACCGTCCTCTC GATGAATTCGAGCTCG	
VMA5-mRFP_for	ACACAGAGTATGAACCATTTGTGATGTATATAATCAATTTACGG ATCCCCGGGTTAATTA	VMA5-GFP Klonierung
V5-YFP_rev	AAAAAAAACAGAAATATATTAATCTAAGTTAGTATTATAAATC GATCGATGAATTCGAGCTCG	
VMA2_for	AAGGACGCTGCTGCTATG	Überprüfung der GFPs
VMA5_for	TGACTCTGCTGCCAGTTTAG	
GFP_rev	ATAACCTTCGGGCATGGC	
KanMX6_rev	ATCGCGAGCCCATTTATACC	

Tab. 2.4: In dieser Arbeit verwendete Vektoren

Name	Resistenz und Merkmale	Referenz
pFA6a-GFP(S65T)-His3MX6	Amp, GFP(S65T), SpHIS3	Wach <i>et al.</i> (1997)
pFA6a-GFP(S65T)-KanMX6	Amp, GFP(S65T), KanMX6	Wach <i>et al.</i> (1997)
pKT174	Amp, eCFP, CaURA3	Sheff and Thorn (2004)
pUG73	Amp, LEU2	Gueldener <i>et al.</i> (2002)
pET16b-VMA5	Amp, His-Tag-VMA5	Dr. Olga Vitavska

2.4. Chemikalien und Enzyme

Tab. 2.5: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien

Alle Chemikalien hatten, sofern nicht anders erwähnt, p.a. Qualität.

Hersteller	Produkt
Biomol	Pefabloc SC
BD Biosciences	Hefeextrakt, Hefeextrakt ohne Aminosäuren, Trypton
Calbiochem	Protease Inhibitor Cocktail Set 1
Erkol	Polyvinylalkohol 28/20
Eurogentec	SmartLadder
Fachbereich Chemie	Ethanol, Isopropanol, Methanol
Fermentas	PageRuler Prestained Protein Ladder
Fluka	Acetonitril, CaCl ₂ , Dimethylsulfoxid, Essigsäure, Ficoll-400, Formaldehyd, Galactose, Glycerin, KCl, Lithiumacetat, MgCl ₂ , NaOH, Natriumthiosulfat, Nickelsulfat, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1), Phosphat, Rubidiumchlorid, Schwefelsäure, Silbernitrat, Trichloressigsäure
GE Healthcare	Low Molecular Weight Marker
Merck	Amidoschwarz, Brilliant-Blue R-250, , CaCl ₂ , e-Amino-n-Caprinsäure, Coomassie, NaMolybdat, Kaliumacetat, Kaliumhexacyanoferrat (III), Kaliumhydroxid, Triton X-100
Riedel	Aceton, Ammoniumhydrogencarbonat, Manganchlorid
Roche	dNTP-Mix
Roth	Magermilch, Sorbitol, Tween 20
Serva	Acrylamid, Agar Agar, Ammoniumpersulfat, BCIP, Bisacrylamid, Bromphenolblau, Dithiothreitol, EDTA, EGTA, Ethidiumbromid, FY, Glucose, Glycin, GTP, Hepes, MOPS, MES, NaCl, Na ₂ -EDTA, NBT, Nitrozellulose, Pepton, PIPES, SDS, Tris
Sigma	Aluminiumnitrat, Aminosäuren, ATP, Azid, BSA, Concanamycin A, Dimethylformamid, Igepal C-630, Imidazol, Iodacetamid, Malachitgrün, β-Mercaptoethanol, NaOH, PMSF, Polyethylenglykol, PonceauS, RNase A, TEMED

Tab. 2.6: In dieser Arbeit verwendete Enzyme

Name	Hersteller
Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs
<i>E. coli</i> DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	New England Biolabs
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	New England Biolabs
T4-DNA Ligase	New England Biolabs
TEV-Protease	Invitrogen
Trypsin	Roche
Zymolyase 100T	MP Biomedicals

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs bezogen.

Tab. 2.7: In dieser Arbeit verwendete Antikörper

Primäre Antikörper	Beschreibung	Verdünnung
Anti-VMA6 (d)	Monoklonal, Kaninchen (Takeda <i>et al.</i> 2008)	1:3.000
Anti-VMA1 (A)	Monoklonal, Maus (Molecular Probes)	1:4.000
CS-7	Polyklonaler Antikörper zu VMA5, Meerschweinchen	1:10.000
Sekundäre Antikörper		Verdünnung
Alkalische Phosphatase-konjugierte Anti-Kaninchen IgG (Sigma)		1:10.000
Alkalische Phosphatase-konjugierte Anti-Maus IgG (Sigma)		1:10.000
Alkalische Phosphatase-konjugierte Anti-Meerschweinchen IgG (Sigma)		1:10.000

2.5. Puffer und Medien

Tab. 2.8: In dieser Arbeit verwendete Puffer

Methoden	Name	Rezept
3.1.3.	P1	50 mM Tris-HCl, pH 8 10 mM EDTA 100 mg/ml RNase A
	P2	200 mM NaOH 1 % [w/v] SDS
	P3	3 M K-Acetat, pH 5,5
3.1.6.	TfbI	30 mM KOAc 100 mM RbCl 10 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin 50 mM MnCl ₂ , pH 5,8
	TfbII	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin, pH 6,5
3.1.8.	TAE-Puffer	40 mM Tris 10 mM NaAc 1 mM EDTA pH 8,0 mit Essigsäure
	DNA-Ladepuffer	1x TAE 30 % Glycerin 0,25 % Bromphenolblau
3.2.4.	Extraktionspuffer	50 mM NaCl 1 mM EDTA 10 mM Tris-HCl, pH 8 0,5 % Triton X-100
3.3.1.	Ladepuffer	50 mM NiSO ₄
	Bindepuffer	5 mM Imidazol 0,5 mM NaCl 20 mM Tris-HCl, pH 7,9

	Waschpuffer	60 mM Imidazol 0,5 mM NaCl 20 mM Tris-HCl, pH 7,9
	Elutiosnpuffer	0,5 mM Imidazol 0,25 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 7,9
	Strippuffer	50 mM Imidazol 0,25 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 7,9
3.3.2.	BRB80	80 mM PIPES/KOH 1 mM EGTA 1 mM MgCl ₂ , pH 6,8
	Glycerinkissen	5,4 % Glycerin 9,6 mM β-Mercaptoethanol 1,25 μM Taxol 0,1 mM GTP in BRB80
3.3.3.	Lösung A	Essigsäure/Methanol 1:10
	Lösung B	26 mg Amidoschwarz in 100 ml Lsg. A
	Lösung C	0,1 N NaOH
3.3.4.	Laemmlipuffer	125 mM Tris-HCl, pH 6,8 2 % SDS 0,005 % Bromphenolblau 2 % β-Mercaptoethanol
3.3.5.	SDS-Laufpuffer	100 mM Tris 100 mM Glycin 0,1 % SDS
3.3.7.	Farmer's Reducer	0,03 M K ₃ [Fe(CN) ₆] 0,032 M Na ₂ S ₂ O ₃
3.3.8.	Blotpuffer 1	300 mM Tris 20 % Methanol
	Blotpuffer 2	30 mM Tris 20 % Methanol

	Blotpuffer 3	40 mM e-Amino-n-Caprone Säure in 30 mM Tris 20 % Methanol
3.3.9.	TBSN	20 mM Tris-HCl, pH 7,5 500 mM NaCl 0,02 % NaN ₃
	TTBSN	0,05 % Tween 20 in TBSN
	Blockpuffer	5 % Magermilchpulver in TTBSN
	Verdünnungspuffer	2,5 % Magermilchpulver in TTBSN
	APP	50 mM Tris-HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂
	NBT-Stammlösung	75 mg/ml Nitroblau Tetrazolium (NBT) in 70 % Dimethylformamid (DMF)
	BCIP-Stammlösung	50 mg/ml 5-Bromo-4Chloroindoxylphosphat (BCIP) in reinem DMF
	Reaktionspuffer	45 µl NBT-Stammlsg + 35 µl BCIP-Stammlsg in 10 ml APP
3.3.10.	10x Lysispuffer (LB)	3 M NaCl 0,5 M Hepes, pH 7,5 15 mM MgCl ₂ 1,5 % Igepal C-630
	Puffer I	5 ml 10x LB 250 µl 0,1 mM PMSF 500 µl FY 45 ml H ₂ O
	Puffer II	5 ml 10x LB 50 µl 1 M DTT 250 µl 0,1 mM PMSF 500 µl FY 45 ml H ₂ O
	Puffer III	5 ml 10x LB 45 ml H ₂ O

	PufferIV	5 ml 10x LB 25 µl 1 M DTT 45 ml H ₂ O
	Puffer V	5 ml 10x LB 25 µl 1 M DTT 100 µl 1 M CaCl ₂ 45 ml H ₂ O
	Puffer VI	100 µl 10x LB 25 µl 200 mM EGTA, pH 8,0 875 µl H ₂ O
3.3.11.	Entfärberlösung	30 % Acetonitril in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat (NH ₄ HCO ₃), pH 8,5
	Reduktionslösung	10 mM DTT in 100 mM NH ₄ HCO ₃ , pH 8,5
	Alkylierunslösung	54 mM Iodacetamid in 100 mM NH ₄ HCO ₃ , pH 8,5
	Trypsinlösung	0,1 mg/ml Trypsin in 10 mM HCl
	Verdauungslösung	5 % Acetonitril 50 mM NH ₄ HCO ₃ , pH 8,5
	Trypsin-Verdauungslösung	10 % Trypsinlösung 90 % Verdauungslösung
3.3.12.	Puffer A	10 mM MES/Tris, pH 6,9 0,1 mM MgCl ₂ 12 % Ficoll-400
	Puffer B	10 mM MES/Tris, pH 6,9 0,5 mM MgCl ₂ 8 % Ficoll-400
	Puffer C	10 mM MES/Tris, pH 6,9 5 mM MgCl ₂ 25 mM KCl
	Zymolyaselösung	50 mM Tris-HCl, pH 7,7 1 mM EDTA 50 % Glycerin 400 U/ml Zymolyase

Tab. 2.9: In dieser Arbeit verwendete Medien

Name	Rezept
LB	1 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl
Ψb	2 % Pepton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % MgSO ₄ pH 7,6 mit KOH
YPD	2 % Pepton 1 % Hefeextrakt 2 % Glucose
YPD pH 5,5 oder 7,5	YPD 50 mM MES 50 mM MOPS titriert mit HCl oder NaOH
YPDA	YPD plus 200 mg/l Adeninhemisulfat
YPG	2 % Pepton 1 % Hefeextrakt 2 % Galactose
YPDS	YPD plus 1,2 M Sorbitol
SD	0,67 % Hefeextrakt ohne Aminosäuren 2 % Glucose 10 % Dropoutlösung
SD Galac	0,67 % Hefeextrakt ohne Aminosäuren 2 % Galactose 10 % Dropoutlösung
Dropout-Lösung	200 mg/l L-Adeninhemisulfat 200 mg/l L-Arginin HCL 200 mg/l L-Histidin HCL-monhydrat 300 mg/l L-Isoleucin 1000 mg/l L-Leucin 300 mg/l L-Lysin HCL 200 mg/l L-Methionin 500 mg/l L-Phenylalanin 2000 mg/l L-Threonin 200 mg/l L-Tryptophan 300 mg/l L-Tyrosin 200 mg/l L-Uracil 1500 mg/l L-Valin

Für feste Medien wurden jeweils 1,5 % Agar-Agar vor dem Autoklavieren hinzugegeben und das Medium danach in Petrischalen gegossen. Falls Notwendig wurde zur Selektion das Antibiotikum Geneticinsulfat (G418) in einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml zugegeben.

3. Methoden

3.1. Methoden der Molekularbiologie

3.1.1. Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte auf festem oder in flüssigem Luria-Bertani-Medium (LB-Medium), ggf. unter Zugabe von Antibiotika. Die Bakterienzellen wurden bei 37°C kultiviert.

3.1.2. Konservierung von *E. coli*

Für die Konservierung von *E. coli* wurden 800 µl einer über Nacht gewachsenen Kultur mit 70 µl DMSO vermischt, dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

3.1.3. Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mittels der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly 1979). Hierzu wurden die Zellen von einer LB-Platte in ein Reaktionsgefäß überführt und in 200 µl P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl P2 wurde das Reaktionsgefäß 4-6x invertiert; hierbei werden die Zellen durch das SDS aufgeschlossen und das NaOH im Puffer denaturiert DNA und Proteine. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die alkalische Lyse durch Neutralisieren mittels Zugabe von 200 µl P3 gestoppt, was durch das Kaliumacetat eine schnelle Renaturierung der Plasmid-DNA zur Folge hat. Durch Zentrifugation für 20 min bei 15.700 x g wurden Zelltrümmer sowie denaturierte DNA und Proteine sedimentiert. Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung mit 600 µl Isopropanol versetzt. Die durch erneutes Zentrifugieren für 30 min bei 15.700 x g pelletierte DNA, wurde anschließend mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Das gewaschene Pellet wurde unter dem Abzug getrocknet und in 50 µl H₂O resuspendiert.

3.1.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit QIAprep Spin Miniprep Kit

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* mit dem Qiagen Kit erfolgte nach Herstellerangaben. Die Elution der DNA erfolgte dabei mittels H₂O.

3.1.5. Transformation in *E. coli*

Die Transformation von Plasmiden fand stets unter Verwendung des DH5 α -Stammes statt. 200 μ l kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Maximal 100 ng zu transformierende DNA wurde zu den Zellen pipettiert und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 2,5 min bei 42°C behandelt und für 5 min auf Eis abgekühlt. Der Zellsuspension wurde nun 1 ml LB-Medium zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien auf LB-Platten mit dem entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert.

3.1.6. Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung chemisch-kompetenter Zellen nach Hanahan (1983) wurden 5 ml Ψ b-Medium mit der gewünschten DMSO-Dauerkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden 100 ml vorgewärmtes Ψ b-Medium mit 5 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37°C, 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 wachsen gelassen. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Zellen für 5 min auf Eis abgekühlt und 5 min bei 5.000 x g, 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 40 ml eiskaltem TfbI-Puffer resuspendiert und wiederum für 5 min auf Eis belassen, um es anschließend für 5 min bei 5.000 x g und 4°C zu zentrifugieren. Nach Resuspendieren der Zellen in 40 ml TfbII wurden diese 15 min auf Eis gestellt und zu 200 μ l Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

3.1.7. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.* 1988) wurde in einem Gerät der Firma MWG Biotech (Primus) durchgeführt. Standard-PCR-Ansätze mit der *Taq* Polymerase enthielten 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0,1 % Triton X-100, je 200 μ M dNTP, 15 pmol Primer, maximal 200 ng Template-DNA sowie 2 Units *Taq* Polymerase; überschichtet wurden sie mit einem Tropfen Mineralöl. Die Zugabe der Polymerase erfolgte stets nach dem ersten Denaturierungsschritt bei 94°C für 2 Minuten. Die Annealingtemperatur wurde nach der empirischen Formel $T_m = 4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C}) + 2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) - 3^\circ\text{C}$ ermittelt (Lion and Haas 1990). Ein typischer Reaktionszyklus verlief wie folgt: 1 x 2 min 94°C, 35 x (30-60 sec 94°C, 30-60 sec T_m , 1 min/kb 72°C), 10 min 72°C.

Waren möglichst fehlerfreie PCR Amplifikate von Nöten, wurde das „Expand Long Template PCR System“ von Roche nach den Herstellerangaben verwendet. Dieses enthält ein Polymerasegemisch aus der *Taq* Polymerase und der *Tgo* DNA Polymerase, welche eine thermostabile Polymerase mit Korrekturleseaktivität ist.

Die PCR-Produkte wurden über Gelelektrophorese in Agarose aufgetrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

3.1.8. DNA-Agarosegelelektrophorese

Für die Auftrennung der DNA-Fragmente kamen Agarosegele mit Konzentrationen von 0,8 bis 1,2 % (w/v) zum Einsatz. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer aufgekocht, in eine Gelaussparung, die sich in der Elektrophoresekammer befand, gegeben und ein Probenkamm eingesetzt. Nach Erstarren des Gels wurde die Elektrophoresekammer mit 1 x TAE-Puffer befüllt.

Nach Entfernen des Probenkammes wurden die mit DNA-Ladepuffer versetzten Proben in die einzelnen Taschen pipettiert und zur Bestimmung der Länge der Proben-DNA ein Längenstandard mit DNA-Fragmenten definierter Größe mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V und wurde beendet, wenn die Bromphenolblaubande etwa 1 cm vor Ende des Gels erreicht hatte. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde die DNA mit Ethidiumbromid gefärbt und anschließend die Banden im Gel mittels UV-Licht durch den VersaDoc 4000 (Bio-Rad) sichtbar gemacht und fotografisch festgehalten.

3.1.9. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Nach erfolgter Ethidiumbromidfärbung wurden die gewünschten DNA-Fragmente unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die sich nun anschließende Reinigung erfolgte mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen nach Herstellerangaben.

3.1.10. Reinigung von DNA

Um DNA von Primern, Enzymen oder sonstigen Komponenten zu reinigen, wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen eingesetzt.

Während der Reinigung kommt es bei hoher Ionenstärke zur Bindung der Nukleinsäure an eine silicagelhaltige Matrix, und die Verunreinigungen können durch Waschschriffe entfernt werden. Die Elution erfolgte mit H₂O.

3.1.11. Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Die eingesetzten TypII-Endonukleasen sind in der Lage, doppelsträngige DNA an spezifischen Basensequenzen zu erkennen und zu spalten. Die enzymatische Spaltung geschah dabei in einem 30 µl Ansatz nach Herstellerangaben, und die Analyse der Produkte erfolgte mittels der Agarosegelelektrophorese.

3.2. Methoden der Hefegenetik

Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Anzucht von *S. cerevisiae* erfolgte auf festem oder in flüssigem YPD bzw. YPDA Medium, zur Selektion erfolgte die Anzucht auf SD Medium. Die Hefezellen wurden auf Festmedium bei 30°C für 2-4 Tage inkubiert, in Flüssigmedium wurden die Hefezellen mit 180-200 rpm bei 30°C über Nacht kultiviert.

3.2.1. Konservierung von *S. cerevisiae*

Für die Konservierung von *S. cerevisiae* durch eine Lagerung bei -80°C wurden 700 µl einer über Nacht gewachsenen Kultur mit 300 µl 50 % Glycerin vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.2.2. Bestimmung der Zelldichte von *S. cerevisiae*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem SpectraMax Plus (Molecular Devices) bei 600 nm bestimmt. Dabei entspricht eine OD₆₀₀ von 1 ca. 20 x 10⁶ Zellen. Um im linearen Bereich zu messen, wurden die Kulturen so verdünnt, dass Messwerte unter einer OD₆₀₀ von 1 lagen. Zur Einstellung des Nullwerts wurde das jeweilige Kulturmedium verwendet.

3.2.3. Isolierung von Gesamt-DNA aus *S. cerevisiae*

Hefezellen wurden auf Platte angezogen. Ein paar Zellen wurden in 200 µl Extraktionspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von ca. 300 µl Glasperlen (Ø 0,4 mm) und 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurden die Zellen durch Vortexen (10 min bei 4°C) aufgeschlossen und anschließend auf Eis gestellt. Nach einer Zentrifugation bei 17.000 x g bei 4°C für 15 Minuten wurden 10 µl der DNA enthaltenden oberen, wässrigen Phase abgenommen und mit 90 µl H₂O versetzt. Für einen 25 µl PCR-Ansatz wurden 2,5 µl dieser Suspension verwendet und der Rest bei 4°C gelagert.

3.2.4. Transformation in *S. cerevisiae*

Für die Transformation in *S. cerevisiae* wurde die Lithiumacetat-vermittelte Methode nach Ito *et al.* (1983) in modifizierter Form durchgeführt. Für eine Verbesserung der Transformationsrate enthielt der Ansatz nach Schiestl und Gietz (1989) bzw. Gietz *et al.* (1992) hochmolekulare einzelsträngige Träger-DNA in Form von Lachssperma-DNA.

Die Anzucht der Hefen für die Erzeugung kompetenter Zellen erfolgte in YPD bzw. YPDA-Medium. Aus einer Übernachtskultur wurden 50 ml frische Kultur angeimpft. Bei einer OD₆₀₀ von 1,0 wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 3.000 x g für 5 min sedimentiert, einmal mit dest. H₂O gewaschen und in 1 ml 100 mM Lithiumacetat (LiAc) resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden sie in 400 µl 100 mM LiAc resuspendiert. Es wurden pro Transformation 50 µl Zellen sedimentiert und dazu 240 µl 50 % PEG 4000, 36 µl 1 M LiAc, 15 µl PCR-Produkt und 10 µl Lachssperma-DNA (10 mg/ml) gegeben und anschließend durchmischt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 30°C inkubiert. Es folgte ein 20-minütiger Hitzeschock bei 42°C. Die Zellen wurden bei 3.000 x g für 5 min sedimentiert, in 500 µl H₂O resuspendiert und 200 µl des Ansatzes auf Selektionsmedium ausplattiert.

3.2.5. Kreuzung haploider *S. cerevisiae* Stämme

Zum Kreuzen haploider Hefezellen komplementären Paarungstyp wurden Übernachtskulturen von Stämmen des Matingtyps a und α als überlappende Striche auf eine Selektivmedium-Platte aufgetragen und inkubiert. Die gewachsenen Einzelkolonien wurden ein weiteres Mal auf Selektivmedium ausgestrichen und die Analyse der gewachsenen Klone erfolgte mittels PCR.

3.2.6. Tetradenanalyse von *S. cerevisiae*

Für die Tetradenanalyse wurden die diploiden Hefestämme auf relativ nährstoffarmen Sporulationsplatten (3 M Kaliumacetat) zur Sporulation angeregt. Die Platten wurden solange bei 30°C inkubiert, bis sich unter dem Mikroskop erkennbare Asci gebildet hatten. Diese besitzen eine Kapsel, die vor Trennung der Sporen mit Zymolyase entfernt wird. Dazu wurden Zellen in 100 µl Wasser aufgenommen und 10 min mit 1,5 mg/ml Zymolyase bei RT inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Asci mit einem Mikromanipulator aufgenommen. Die Sporen wurden getrennt und einzeln an definierte Positionen auf der Platte übertragen. Nachdem die Sporen zu Kolonien hochgewachsen waren, wurde der Phänotyp und die Aufspaltung von Auxotrophiemarkern auf selektiven

Medien untersucht, sowie anschließend die Richtigkeit der gewünschten Mutationen und des Paarungstyps per PCR nachgewiesen.

3.2.7. Genetische Manipulation von Hefezellen

3.2.7.1. Fusion eines Zielgens mit einem Fluorophor

Um ein beliebiges Gen am C-terminalen Ende mit einem Fluorophor zu fusionieren, wurde eine auf PCR-basierende Strategie verwendet (Longtine *et al.* 1998; Sheff and Thorn 2004). Hierzu wurde mittels PCR Kassetten amplifiziert, die neben dem gewünschten zu fusionierenden Fluorophor einen Auxotrophiemarker zur Selektion enthielten. Als Matrize dienten die als pFA6a bezeichneten Plasmide. Die verwendeten Primer enthalten neben den Sequenzen zur Amplifikation der Kasette auch ca. 40 Basenpaare, die homolog zum Bereich vor und hinter dem Stopcodon des Zielgens sind. Diese Bereiche erlaubten, nach Transformation des PCR-Produktes in die Hefezellen, die Integration des Fluorophors über homologe Rekombination der Kasette in den entsprechenden Bereich des Zielgens. Dabei wurde das ursprüngliche Stopcodon des Zielgens ersetzt und so das Zielgen mit dem Fluorophor fusioniert. Die korrekte Integration der Kasette wurde mittels PCR überprüft.

3.2.7.2. Gendeletion

Um die chromosomale Deletion eines Gens zu erreichen, wurde eine ähnliche PCR-basierende Strategie wie für die Insertion des Fluorophors verfolgt (Sheff and Thorn 2004). Die hierfür verwendeten Primer enthalten neben Sequenzen für die Amplifizierung der Deletionskasette aus einem Plasmid, ca. 40 Basenpaare, die zum 5' Bereich des Startcodons bzw. zum 3' Bereich des Stopcodons des Zielgens homolog sind. Nach Transformation des PCR-Produktes mit der Kasette wurde das entsprechende Zielgen über homologe Rekombination in der Hefe durch die Kasette ersetzt. Die Überprüfung auf richtige Integration erfolgte mittels PCR.

Erstellung serieller Verdünnungsreihen zur Überprüfung funktioneller V-ATPasen

Die seriellen Verdünnungsreihen zur Analyse der Funktionalität der V-ATPase in den verschiedenen Hefestämmen wurden auf Vollmediumplatten mit einem pH-Wert von 5,5 und 7,5 durchgeführt, da nur Hefezellen mit einer funktionellen V-ATPase dazu in der Lage sind, bei einem pH-Wert von 7,5 zu wachsen (Nelson and Nelson 1990). Hierzu wurden Kulturen der Hefestämme in Vollmedium über Nacht bei 30°C angezogen. Nach Ermittlung der OD₆₀₀ wurden alle Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 1 verdünnt, um davon

ausgehend Verdünnungsreihen bis 10^{-4} herzustellen. 5 μ l der jeweiligen Verdünnungen von 10^{-2} bis 10^{-4} wurden auf die unterschiedlichen Medien aufgetropft und für mehrere Tage bei 30°C inkubiert. Die bewachsenen Platten wurden anschließend fotografisch mit dem VersaDoc 4000 festgehalten.

3.3. Methoden der Biochemie

3.3.1. Reinigung rekombinanter Untereinheit C

Die Reinigung der rekombinanten V-ATPase Untereinheit C aus *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte mittels einer Ni-NTA-Säule nach dem vom Hersteller (Novagen) vorgegebenen Protokoll. Hierzu wurde von Dr. Olga Vitavska die V-ATPase Untereinheit C aus Hefe in den Expressionsvektor pET16b kloniert und in BL21 Zellen transformiert. Die Reinigung erfolgte nach dem Protokoll von Novagen bis auf die Elution, die mit 0,5 mM Imidazol in 10 mM Tris-HCl, 0,25 M NaCl, pH 7,9 durchgeführt wurde. Zu den eluierten Fraktionen wurde EDTA in einer Endkonzentration von 5 mM gegeben, um anschließend die gewünschten Fraktionen zu poolen und in den gewünschten Puffer umzupuffern.

3.3.2. Co-Pelletierungsassay mit Tubulin

Das aus Kalbshirn isolierte Tubulin wurde von Prof. Dr. Roland Brandt (Universität Osnabrück) zur Verfügung gestellt (Brandt and Lee 1993). Das gefrorene Tubulin wurde auf Eis aufgetaut und dann bei 100.000 x g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Das Tubulin wurde in drei 5-minütigen Schritten mit jeweils 0,1, 1 und 10 μ M Taxol bei 37°C polymerisiert. Die Mikrotubuli wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

Mikrotubulibindungsassays mit einem Endvolumen von 50 μ l beinhalteten 0,5 oder 1 μ M Tubulin, 2 μ M rekombinant hergestellte V-ATPase Untereinheit C, 12,5 μ M Taxol, 5 mM GTP und BRB80 Puffer. Nach einer Inkubation von 30 min bei 30°C wurde die Lösung auf ein 50 μ l Glycerinkissen pipettiert und für 1 Stunde bei 30°C und 114.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 50 μ l BRB80 resuspendiert. Alle Proben wurden per SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung analysiert.

3.3.3. Proteinbestimmung

Die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration mit Amidoschwarz ist eine sehr sensitive, gegen Detergenzien und Reduktionsmittel relativ unempfindliche Methode

(Wieczorek *et al.* 1990). Die Proben wurden zunächst mit 300 µl Amidoschwarzlösung (Lösung B) versetzt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde bei 15.700 x g für 4 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet zweimal mit 500 µl Essigsäure/Methanol (1:10) (Lösung A) gewaschen. Für die photometrische Bestimmung wurde das Pellet in 350 µl 0,1 N NaOH (Lösung C) gelöst und die Absorption bei 615 nm gemessen. Die Proteinmengen wurden mit einer parallel erstellten Eichreihe aus BSA-Standardlösungen (2, 4 und 6 µg) bestimmt.

3.3.4. Proteinfällung

Waren die Proteinkonzentrationen sehr niedrig, wurden sie zur Ankonzentrierung mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Hierzu wurden die Proben auf eine Endkonzentration von 10 % TCA gebracht und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 17.000 x g bei 4°C zentrifugiert und das Pellet zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen. Das Pellet wurde in einem entsprechenden Volumen 1 x Laemmlipuffer mit 2 % β-Mercaptoethanol resuspendiert und bis zu 3 min bei 98°C erhitzt, um die Proben dann für die SDS-PAGE einzusetzen.

3.3.5. SDS-PAGE

Angewendet wurde die Methode der diskontinuierlichen Polyacrylamidgelelektrophorese in vertikalen Gelkammern (Bio-Rad Mini 2-D, Hoefer SE 600) (Laemmli 1970). Proteinproben wurden in 5 x Laemmlipuffer mit 2 % β-Mercaptoethanol 1-3 Minuten bei 98°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Die Proben wurden direkt verwendet oder bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Sammelgele bestanden aus 5,4 % T/ 2,3 % C Acrylamid in 125 mM Tris-HCl (pH 6,8) und 0,2 % SDS und die Trenngele aus 17 % T/ 0,4 % C Acrylamid in 330 mM Tris-HCl (pH 8,7) und 0,1 % SDS. Die Elektrophorese wurde im SDS-Laufpuffer mit einer konstanten Stromstärke von 15 mA/Gel für das Sammelgel und 30 mA/Gel für das Trenngel durchgeführt.

3.3.6. Coomassiefärbung

Die SDS-Gele wurden nach der Elektrophorese für mindestens 30 min bei RT in Coomassie-Lösung (0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant-Blue R-250, 50 % Methanol, 10 % Essigsäure) fixiert und gefärbt (Bollag and Edelstein 1991). In der Regel wurden die Gele anschließend in ausreichend Wasser in der Mikrowelle (600 W) für jeweils 10 min gekocht oder mit Hilfe eines zweiteiligen Puffersystems entfärbt. Hierfür wurden die Gele zuerst

für 30 min in Entfärber I (25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure) und dann für mindestens 60 min in Entfärber II (7,5 % Methanol, 10 % Essigsäure) geschüttelt.

3.3.7. Silberfärbung

Wenn eine höhere Sensitivität erforderlich war, wurden die Proteine im SDS-Gel mittels Silberfärbung visualisiert (Damerval *et al.* 1987). Hierzu wurden die SDS-Gele nach der Elektrophorese für 15 min in 50 % Methanol und 10 % Essigsäure fixiert, anschließend wurden sie für 2 min mit Farmer's Reducer behandelt. Nach mehreren Waschschritten mit H₂O und vollständigem Entfernen des Farmer's Reducers wurden die Gele für 15-30 min in 0,01 % Silbernitrat inkubiert. Danach folgte ein zweimaliges Waschen mit H₂O und der Äquilibration mit 2,5 % Natriumcarbonat. Die Entwicklung erfolgte dann in 0,08 % (v/v) Formaldehyd in 2,5 % Natriumcarbonat und wurde durch Zugabe von 10 % Essigsäure gestoppt.

3.3.8. Western Blot

Zur Übertragung der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurden Western Blots im Semidry-Verfahren (Transblot SD, Bio-Rad) nach Towbin *et al.* (1979) durchgeführt, wofür das dreiteilige Blotpuffersystem nach Kyhse-Andersen (1984) verwendet wurde. Der Transfer erfolgte in einer Stunde bei 1 mA/cm² Gelfläche, wobei die Übertragung der Proteine durch reversible Färbung der Membran mit 0,02 % Ponceau S und Färbung des SDS-Gels mit Coomassie kontrolliert wurde.

3.3.9. Immunfärbung

Nach der Übertragung der Proteine auf eine Membran wurde diese zunächst zur Verhinderung unspezifischer Bindungen 60 min in Blockpuffer gebadet, bevor sie dann für eine Stunde mit dem primären Antikörper in Verdünnungspuffer inkubiert wurde. Nach dreimaligem Waschen der Membran für jeweils 5 min mit TTBSN zur Entfernung von überschüssigem primären Antikörper erfolgte für eine weitere Stunde die Inkubation mit dem sekundären Antikörper in Verdünnungspuffer. Der sekundäre Antikörper war mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt, die nach einem erneuten Waschen der Membran mit TTBSN und Spülen mit destilliertem Wasser eine Farbreaktion durch Zugabe des Reaktionspuffers an den spezifisch immunmarkierten Proteinbanden auslöst.

3.3.10. Tandem Affinity Purification

Zur Identifizierung neuer Interaktionspartner der V-ATPase Untereinheit C (Vma5) unter nativen Bedingungen wurde das Vma5-TAP-Fusionsprotein in einer Variation der Methode nach Rigaut *et al.* (1999) gereinigt. Der TAP-Tag kodiert für die Protein-A-Bindedomäne, einer Erkennungssequenz der TEV-Protease (*Tobacco Etch Virus*), sowie einer Calmodulin-Bindedomäne. Die Reinigungsschritte umfassen eine Affinitätschromatographie an IgG-Beads, die Freisetzung des gebundenen Proteins durch Spaltung mit der TEV-Protease, Affinitätschromatographie an Calmodulin-Beads und Elution der rekombinanten Proteine durch Zugabe von EGTA. Durch Expression der TAP-Tag-Proteine im authentischen, zellulären Kontext ist es möglich, die Dynamik der Interaktionen eines Proteins mit seinen Bindungspartnern unter wechselnden Bedingungen zu untersuchen.

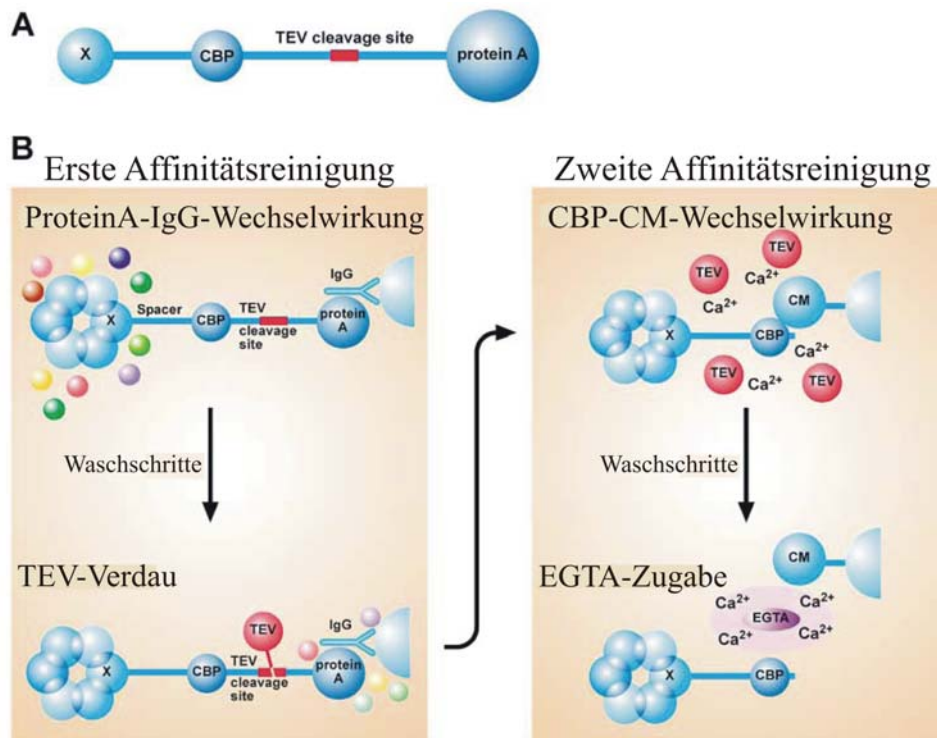


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Tandem Affinity Purification (TAP)

A) Struktur des TAP-Tags. **B)** TAP-Strategie. Ein Proteinkomplex, der ein TAP-Tag enthält, wird über zwei unabhängige, aufeinanderfolgende Reinigungsschritte über IgG- und Calmodulinbeads gereinigt. Im ersten Schritt wird der immobilisierte TAP-Tag durch Abspaltung des Protein A (TEV) wieder in Lösung gebracht. Im zweiten Reinigungsschritt wird die calciumabhängige Bindung von CBP an Calmodulin durch EGTA-Zugabe erniedrigt. CBP, Calmodulin binding peptide; CM, Calmodulin; TEV, Tobacco Etch Virus Protease (Bauer and Kuster 2003)

Eine 1,5 l Hefekultur mit dem TAP-Fusionsprotein wurde über Nacht bis zu einer OD_{600} von 3-5 angezogen, um die Zellen dann durch Zentrifugation bei 5.000 x g für 8 min zu ernten. Das Pellet wurde einmal mit H_2O gewaschen, wieder wie oben beschrieben

pelletiert, anschließend in 500 ml YPDA oder YPDAG aufgenommen und für 15 min bei 30°C inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

Vor dem Zellaufschluss wurden die Pellets aufgetaut und in 25 ml Puffer I aufgenommen, bei 3.000 x g für 10 min zentrifugiert und anschließend auf ein Endvolumen von 25 ml durch Zugabe von Puffer II gebracht. Die Suspension wurde mit 25 ml Glasperlen (\varnothing 0,5 mm) vermengt und dann in der Pulverisette bei 500 rpm, 4 min mit 2 Wiederholungen und 1 min Pause aufgebrochen. Die Suspension wurde anschließend von den Glasperlen gereinigt und bei 3.000 x g für 10 min zentrifugiert. Der klare Proteinextrakt im Überstand wurde für die weitere Reinigung verwendet und das Sediment verworfen.

Für die Proteinreinigung wurden 600 μ l IgG Sepharose mit 15 ml Puffer III gewaschen und anschließend zu dem Proteinextrakt gegeben. Zur Kopplung wurde die Suspension für 1 h bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit den Beads bei 800 x g für 3 min abzentrifugiert, der Überstand bis auf ein Aliquot fürs SDS-Gel verworfen und die Beads in eine kleine Säule überführt. Das Waschen der Beads erfolgte mit 10 ml Puffer IV. Die Säule wurde verschlossen und mit 150 μ l Puffer IV + 4 μ l TEV (1 mg/ml) über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Das Eluat wurde in einer neuen Säule aufgefangen und es wurden 600 μ l mit Puffer V gewaschene Calmodulin-Sepharose dazugegeben. Die Säule wurde wieder verschlossen und für 1 h bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Beads mit 10 ml Puffer V gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte mittels zwei Schritten mit jeweils 400 μ l Puffer VI für jeweils 20 min bei 30°C im Thermoschüttler. Die Eluate wurden jeweils in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und gepoolt. Für die Ankonzentrierung der Proteine wurde eine TCA-Fällung durchgeführt, um die Proben anschließend mittels SDS-PAGE aufzutrennen und die Proteinbanden durch ESI-MS zu analysieren.

3.3.11. Massenspektrometrie

3.3.11.1. Trypsinverdau von Proteinen im Gel

Als Vorbereitung für eine Proteinidentifizierung mittels Elektrospray Ionisations Massenspektrometrie (ESI-MS) wurden die zu untersuchenden Proteinbanden aus dem SDS-Gel in ca. 1 mm² große Gelwürfel geschnitten und in ein Safe-lock Reaktionsgefäß überführt. Nach zweimaligem Waschen unter Schütteln in 250 μ l H₂O folgten mindestens 4 Entfärbungsschritte mit je 250 μ l Entfärberlösung und zwei erneute Waschschr

250 µl H₂O. Anschließend wurden die Gelstücke in 250 µl 100 %igem Acetonitril inkubiert, der Überstand entfernt und die entfärbten Gelstücke für 15 min bei 37°C in einer SpeedVac (Eppendorf) getrocknet. Zur Reduktion der vorhandenen Disulfidbrücken des Proteins schloss sich nun eine Inkubation mit 100 µl Reduktionslösung für 5 min bei 20°C an, gefolgt von einer 30-minütigen Einwirkzeit bei 50°C. Nach einer erneuten Überschichtung mit 100 %igem Acetonitril wurden die nun reduziert vorliegenden SH-Gruppen durch Einsatz von 100 µl Alkylierungslösung für 15 min im Dunkeln carboxymethyliert und anschließend zweimal mit Entfärberlösung behandelt. Es folgte eine erneute Trocknung in der SpeedVac und schließlich wurden die Gelstücke mit 50 µl Trypsin-Verdauungslösung versetzt. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 25°C. Nach dem Verdau wurde der Überstand abgenommen und für später verwahrt. Die Gelstücke wurden mit 100 %igem Acetonitril versetzt, für 20-30 min inkubiert und anschließend für 3 min im Ultraschallbad sonifiziert. Der Überstand mit den Peptiden wurde abgenommen und in einer SpeedVac getrocknet. Die getrockneten Peptide wurden mit dem zuvor abgenommen Überstand resuspendiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde in Probenfläschchen für die HPLC überführt und zur ESI-MS gegeben.

3.3.11.2. Fahndung nach möglichen Interaktionspartnern mittels ESI-MS

Für die Identifizierung von Proteinen im ESI-MS wurden die Proteine zuvor mit Trypsin proteolytisch verdaut und die so erhaltenen Peptidfragmente über eine vorgeschaltete HPLC mittels einer C8-Säule aufgetrennt und ankonzentriert. Anhand der detektierten MS- sowie MS/MS-Spektren wurden mit der Software Data Analysis die Peptidsequenzen errechnet. Diese wurden für die anschließende Suche über Mascot in der Datenbank nach übereinstimmenden Proteindaten herangezogen. Die erhaltenen Daten wurden über das Programm Biotoools dargestellt und weiter ausgewertet.

3.3.12. Hefevakuolenpräparation

Hefevakuolen wurden nach einem Protokoll von Uchida *et al.* (1985) mit ein paar Variationen nach Kane *et al.* (1989) isoliert. Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase wurden durch Zentrifugation bei 4.500 x g für 5 min geerntet, einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und in 100 ml 1 M Sorbitol plus 20 mM DTT resuspendiert. Zymolyase wurde bis zu einer Endkonzentration von 400 Units zugegeben und die Zellen wurden für 90 min bei 30°C und 80 rpm inkubiert. Die Überführung der Zellen in Spheroblasten wurde überprüft, anschließend wurden die Zellen bei 2.200 x g für 5 min pelletiert, in 100

ml YPDS aufgenommen und wieder bei 30°C und 80 rpm für 20 min inkubiert zur Induzierung der Reassemblierung der V-ATPase. Die Zellen wurden wie oben beschrieben zentrifugiert und in 25 ml Puffer A aufgenommen, in einem lockeren Dounce Homogenisator aufgeschlossen und für 10 min bei 2.200 x g bei 4°C zentrifugiert. Zur Isolierung der Vakuolen wurde der Überstand in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und mit 6 ml Puffer A überschichtet. Die Röhrchen wurden in einem Ausschwingrotor bei 107.000 x g für 60 min bei 4°C zentrifugiert. Die obere weiße Schicht, welche den Hauptanteil der Vakuolen enthält, wurde abgenommen und in 6 ml Puffer A resuspendiert. Anschließend wurde die Probe mit 6 ml Puffer B überschichtet und wie oben beschrieben in der Ultrazentrifuge für 30 min zentrifugiert. Die Hefevakuolen wurden durch Aufnahme in 1 ml Puffer C zu Vesikeln umgewandelt, Aliquots der Präparation wurden bei -80°C gelagert.

3.3.13. ATPase-Aktivitätstest und Phosphatnachweis

Standard Assays für die Detektion der V-ATPase Aktivität wurden in einem Volumen von 160 µl mit 2-6 µg Protein, 50 mM Mes/Tris, pH 6,9, 0,5 mM Na-Azid, 20 mM KCl, 0,1 mM *ortho*-Vanadat und 3,75 mM MgCl₂ durchgeführt. Nach einer Vorinkubation von 5-10 min bei 30°C mit oder ohne 1 µM spezifischen V-ATPase Inhibitor Concanamycin A wurde Tris-ATP in einer Endkonzentration von 2 mM dazugegeben und nach einer Inkubation von 10 min die Reaktion durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt.

Das produzierte anorganische Phosphat wurde durch das in Wieczorek *et al.* (1990) publizierte Protokoll photometrisch als Malachitgrün-Phosphomolybdat-Komplex bestimmt. Zu der tiefgefrorenen 160 µl Probe des Aktivitätstest wurden 50 µl 20 % Trichloressigsäure (TCA) pipettiert und das Ganze im Wasserbad bei 70°C aufgetaut. Das ausgefallenen Protein wurde durch Zentrifugation bei 15.600 x g für 1 min pelletiert. Genau 3,5 min nach Zugabe des TCA's wurden 60 µl des Überstands in 100 µl saures Molybdat (2,4 % H₂SO₄, 60 mM Na-Molybdat) überführt und gemischt. Nach weiteren 15 sec erfolgte die Zugabe von 30 µl Malachitgrünlösung (7,4 % Malachitgrün in gesättigtem filtrierten Polyvinylalkohol). 5 min 45 sec nach Beginn des Tests erfolgte die Zerstörung des nicht komplexierten Malachitgrün durch Zugabe von 200 µl 7,8 % H₂SO₄. Die photometrische Messung (SpectraMax Plus, Molecular Devices) der Lösung bei 625 nm erfolgte nach einer Inkubation von mindestens 90 min. Der Phosphatgehalt wurde an Hand von mitgeführten Phosphatstandards (0, 10 und 25 nmol) errechnet. Dabei

entspricht eine Extinktion von 0,3 in etwa 4 nmol Pi. Die katalytische Aktivität der V-ATPase wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivität (Units / mg Protein)} = \text{nmol Pi} \cdot 10^{-3} / \text{mg Protein} \cdot t$$

3.4. Methoden der Mikroskopie

3.4.1. Aluminiumnitratfixierung von Hefezellen

Zur Analyse der Hefestämme unter verschiedenen Bedingungen mit dem Mikroskop war es notwendig, eine Möglichkeit zur Immobilisierung der Hefezellen auf einem Objektträger zu finden, so dass die Zellen noch leben, aber auch nach einem Mediumwechsel auf dem Objektträger noch an Ort und Stelle verbleiben. Diese Methode der Immobilisierung wurde mittels Inkubation der Zellen mit Aluminiumnitrat in einer Endkonzentration von 0,37 mM bei einem pH von 4 gefunden (Van Haecht *et al.* 1985). Dafür wurden Zellen mit einer OD₆₀₀ von unter 1 sedimentiert, in Aluminiumnitrat aufgenommen und 1 Stunde bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 20 µl dieser Suspension auf einen Objektträger getropft und die restlichen Zellen nach 20 min mit Wasser abgespült. Auf die immobilisierten Zellen wurde etwas SD Medium gegeben und das Ganze mit einem Lifterslipdeckgläschen abgedeckt. Die so präparierten Zellen waren somit fertig für die Analyse des Dissoziationsverhalten der V-ATPase unter *in vivo* Bedingungen mittels der Fluoreszenzmikroskopie.

3.4.2. Fluoreszenzmikroskopie

Für die *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie wurde ein Zeiss Axioplan II Fluoreszenzmikroskop mit einem Zeiss alpha Plan Fluor (100x/NA 1,45) Objektiv benutzt. Die Zellen wurden mittels Differential Interferenz Kontrast (DIC) und Fluoreszenz beobachtet, wobei die Fluoreszenz mittels Quecksilberdampf Lampe angeregt wurde. Es wurde der entsprechende Filtersatz für GFP (Anregungsmaximum: 488; Emissionsmaximum: 510) der Firma Zeiss verwendet. Die Bilder wurden als Einzelaufnahmen mittels einer CoolSnap HQ Kamera aufgenommen und mit der Software MetaMorph v6.2 bearbeitet und von 16-bit in 8-bit-Bilder konvertiert.

4. Ergebnisse

4.1. Reversible Dissoziation der V-ATPase aus *Saccharomyces cerevisiae*

Wie bereits mehrfach veröffentlicht wurde, erfolgt die Regulation der V-ATPase sowohl bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als auch im Mitteldarm der Raupe des Tabakswärmers *Manduca sexta* durch den Vorgang der reversiblen Dissoziation des V_1 -Komplexes vom membranständigen V_0 -Komplex (Kane 1995; Sumner *et al.* 1995). Bei der Raupe des Tabakswärmers geschieht dies nach Nahrungsentzug oder während der Häutung der Raupen, in der Hefe kommt es zur Dissoziation der V-ATPase bei Entzug der Glucose aus dem Medium. Dieser universelle Mechanismus wurde in mehreren Organismen durch *in vitro* Untersuchungen gefunden und bestätigt, doch bis heute konnte keiner diesen Mechanismus *in vivo* zeigen. Dieses sollte nun in der vorliegenden Arbeit durch GFP markierte V-ATPase Untereinheiten in der Hefe realisiert werden.

4.1.1. V-ATPase Aktivität von GFP markierten Hefestämmen

Da die Fusion einer V-ATPase Untereinheit mit GFP einen Einfluss auf die Vitalität der Hefezellen durch eine Funktionsbeeinträchtigung der V-ATPase zur Folge haben kann, sollte zuerst das Wachstum der Hefestämme und damit die Aktivität der V-ATPase überprüft werden. Wie erwartet, wuchsen alle GFP markierten Stämme bei einem pH von 5,5 sehr gut (Abb. 4.1), da unter diesen Bedingungen keine aktive V-ATPase für die Vitalität der Hefen benötigt wird, wohingegen bei einem pH von 7,5 nur Hefen mit einer aktiven V-ATPase wachsen können. Auf den Vollmediumplatten mit einem pH von 7,5 wuchsen 6 Stämme mit einer GFP markierten V-ATPase Untereinheit (B, C, D, E, H und a) wie der Wildtyp, die Stämme mit den GFP markierten Untereinheiten A und G zeigten ein deutlich vermindertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp. Der Stamm mit der GFP markierten Untereinheit F zeigte keinerlei Wachstum, was auf eine verminderte oder keine Aktivität der V-ATPase dieses Stammes schließen lässt. Der Wachstumstest bei den unterschiedlichen pH Werten lässt zwar eine Schlussfolgerung über die generelle Aktivität der V-ATPase zu, gibt aber keine genauen Auskünfte darüber, wie hoch die Aktivität im Vergleich zum Wildtyp ist.

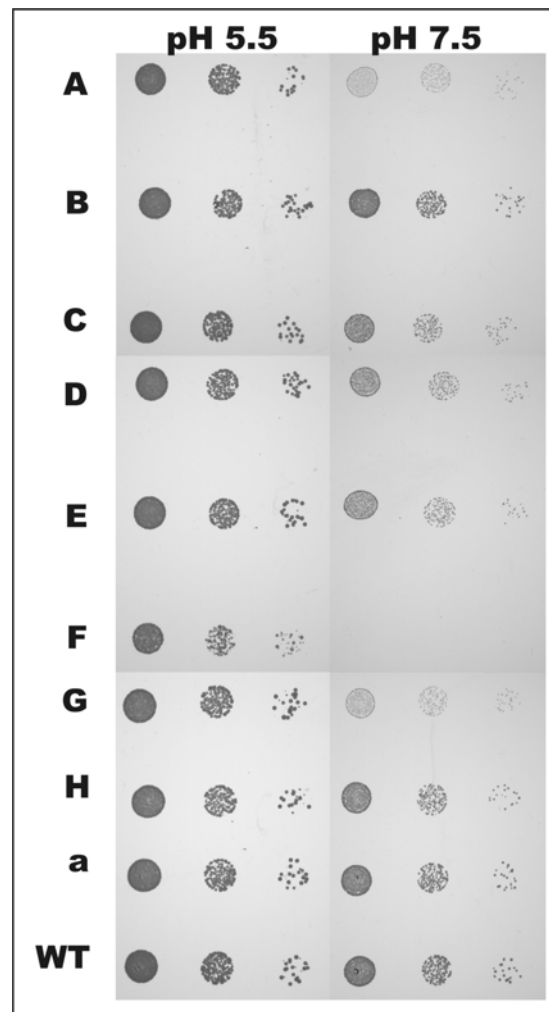


Abb. 4.1: Einfluss einer GFP Markierung auf die V-ATPase Aktivität

Die *Saccharomyces cerevisiae* Stämme S288C als Wildtyp (WT) und die Stämme mit einer GFP markierten V-ATPase Untereinheit wurden, wie im Methodenteil beschrieben, auf YPD Platten mit einem pH von 5,5 oder 7,5 getropft und für 3 Tage bei 30°C inkubiert.

Um genauere Daten zur Aktivität der V-ATPase in den GFP markierten Stämmen zu erhalten, wurden vier der neun Stämme sowie der Wildtyp für weitere Experimente ausgesucht. Die durchgeführten Hefevakuolenpräparationen mit anschließendem Aktivitätstest zeigten, wie im Wachstumstest erwartet, bei allen ausgesuchten Stämmen eine messbare Aktivität der V-ATPase (Abb. 4.2 III). Dennoch gab es Unterschiede. So zeigte sich, dass ein GFP an der V-ATPase Untereinheit B keinen Einfluss auf die Aktivität der V-ATPase hat, da dieser Stamm eine ähnliche Aktivität wie der Wildtyp zeigt, wohingegen ein GFP an den Untereinheiten C, D und a zu einer Verringerung der Aktivität der V-ATPase von 38 % bis 86 % führt.

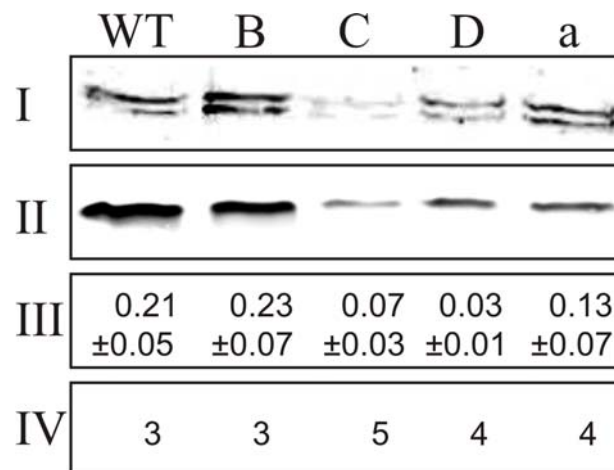


Abb. 4.2: Quantitative Analyse der Hefevakuolen auf Menge und Aktivität der V-ATPase

I + II: Hefevakuolen von Stämmen mit den GFP markierten Untereinheiten B, C, D oder a sowie der WT wurden per Western Blot (je 8 µg Protein) auf den Gehalt an V-ATPase durch die Antikörper gegen die V-ATPase Untereinheiten A (I) und d (II) untersucht. **III:** Spezifische V-ATPase Aktivität der Hefevakuolenpräparationen der oben genannten Stämme (U/mg Protein, ± Standardabweichung). **IV:** Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Hefevakuolenpräparationen.

Immunoblots der Hefevakuolenpräparationen mit den Antikörpern gegen die V_1 -Untereinheit A (Abb. 4.2 I) und die V_0 -Untereinheit d (Abb. 4.2 II) zeigen einen möglichen Zusammenhang zwischen der Menge der V-ATPase und deren spezifischer Aktivität, da die Stämme mit einer geringeren spezifischen V-ATPase Aktivität auch eine reduzierte Menge an V-ATPase Untereinheiten an der Vakuole zeigen. Aufgrund dieser Ergebnisse zeigt sich, dass eine GFP Markierung an den V-ATPase Untereinheiten C, D und a offensichtlich zu einer geringeren Assemblierung der V-ATPase während der Biosynthese führt. Dies wiederum führt zu einer reduzierten spezifischen Aktivität, die jedoch generell keinen Einfluss auf die Vitalität der Hefestämme hat. Die doppelte Bande in Abb. 4.2 I, welche mit dem monoklonalen Antikörper gegen die V-ATPase Untereinheit A produziert wurde, rührt wahrscheinlich von einer Degradation von Untereinheit A während der Isolation der V-ATPase her.

4.1.2. Reversible Dissoziation der V-ATPase unter *in vivo* Bedingungen

Da die V-ATPasen in den GFP markierten Stämmen aktiv sind, konnten Versuche unter *in vivo* Bedingungen zur reversiblen Dissoziation durchgeführt werden. Dazu wurden die Hefezellen durch Inkubation mit Aluminiumnitrat auf einem Objektträger immobilisiert. Zur Überprüfung der Vitalität der Hefezellen wurden jeweils der WT und der Stamm mit der GFP markierten Untereinheit C einem Wachstumstest nach Aluminiumnitratbehandlung unterzogen. Dabei zeigte sich kein Unterschied im Wachstum mit oder ohne Behandlung. Die Zellen wurden auf dem Objektträger zuerst für 10 min unter dem Fluoreszenzmikroskop in SD-Medium mit 2 % Glucose beobachtet, und anschließend die Dissoziation der V-ATPase durch ein Mediumwechsel auf SD-Medium mit 2 % Galactose induziert. Nach 20 min wurde auf SD-Medium mit 2 % Glucose zurückgewechselt, um die Reassoziations der V-ATPase an die Vakuolenmembran zu dokumentieren. Während jeder Inkubation wurden alle 5 min Aufnahmen des GFP Signals gemacht, um die Lokalisation der jeweiligen V-ATPase Untereinheit zu klären.

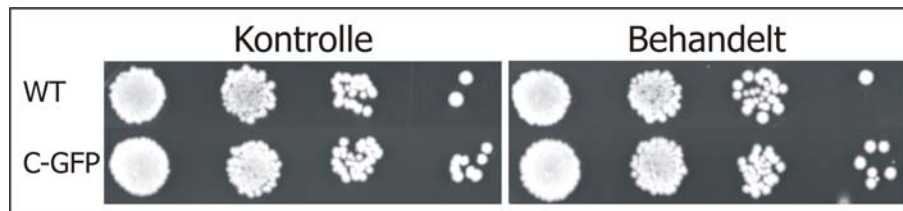


Abb. 4.3: Vergleich des Wachstumsverhalten nach Aluminiumnitrat-Behandlung

Um die Auswirkung der Aluminiumnitrat-Behandlung zur Festlegung der Hefezellen auf einen Objektträger zu testen, wurden der WT Stamm DHD5 und der C-GFP Stamm entweder für 1 h in SD-Medium inkubiert oder der Aluminiumnitrat-Behandlung unterzogen. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe erstellt und die Zellen auf eine YPD Platte getropft und für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Es zeigte sich kein Unterschied im Wachstum mit oder ohne Aluminiumnitrat-Behandlung.

Die V-ATPase Untereinheit a befand sich dabei erwartungsgemäß während der gesamten Zeit an der Vakuole (Abb. 4.4 I), da sie zum membranständigen V_0 -Komplex gehört. Die V-ATPase Untereinheit C zeigte hingegen wie erwartet eine Dissoziation bei Inkubation in Medium mit Galactose statt Glucose, was durch ein diffuses zytoplasmatisches Signal deutlich zu erkennen ist (Abb. 4.4 II Bild 3). Bei Wechsel auf Glucose zeigt sich einer reassozierten V-ATPase entsprechend wieder ein Signal an der Vakuole (Abb. 4.4 II Bild 4). Überraschenderweise konnte dieses Verhalten der Dissoziation und Reassoziations nicht

bei den anderen V_1 -Untereinheiten B und D gefunden werden, die bei einem Wechsel auf Galactose weiterhin an der Vakuole lokalisiert blieben (Abb. 4.4 III + IV).

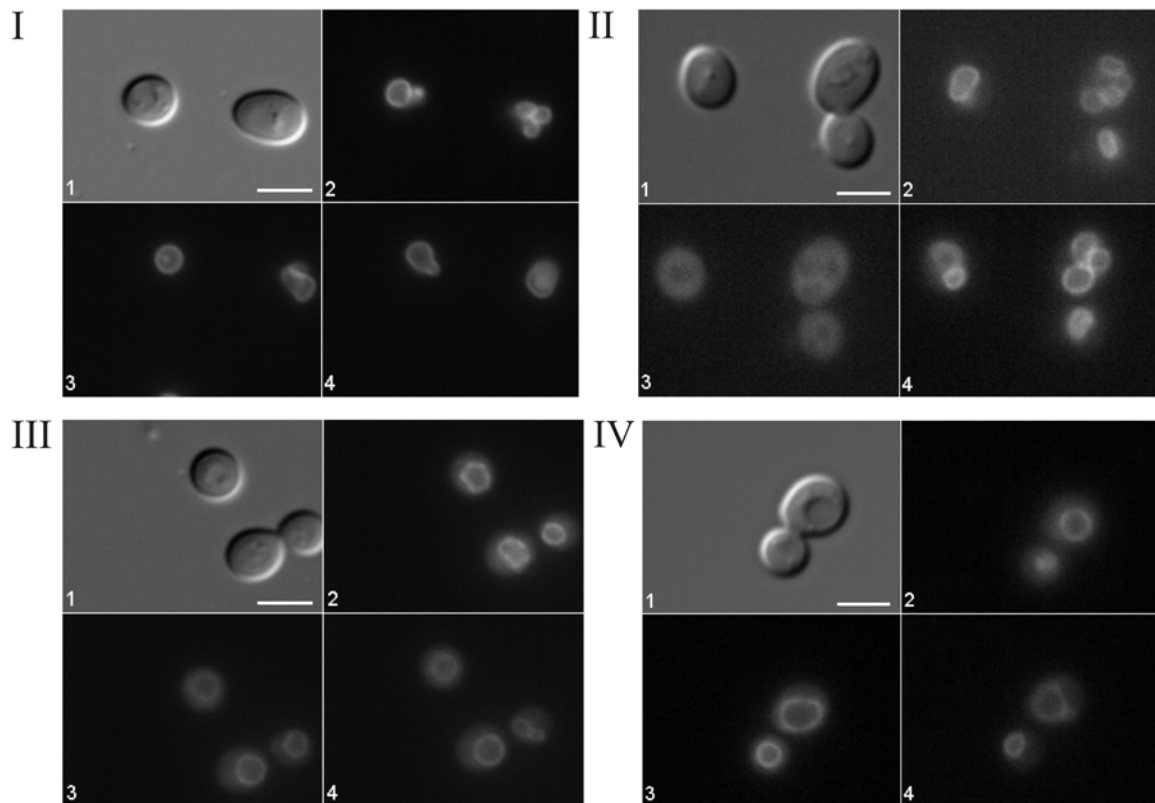


Abb. 4.4: Lokalisierung der V-ATPase Untereinheiten *in vivo*

Hefezellen mit jeweils einer GFP markierten V-ATPase Untereinheit wurden auf Objektträgern fixiert und mit dem Differential Interferenz Kontrast visualisiert (Bild 1 von I – IV). Das GFP Signal der Untereinheiten a (I), C (II), B (III) und D (IV) ist in den anderen Bildern dargestellt. Zuerst nach einer Inkubation mit Glucose (Bild 2), dann nach einer Inkubation von 20 min mit 2 % Galactose (Bild 3) und nach einer erneuten 20-minütigen Inkubation mit 2 % Glucose (Bild 4). Maßstab: 5 μ m

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu bisherigen Veröffentlichungen, nachdem der vollständige V_1 -Komplex dissoziiert vorliegt und nicht, wie hier gefunden, nur die Untereinheit C. Zur Verifizierung der Daten wurden auch die anderen funktionellen GFP markierten Stämme auf ihr Dissoziationsverhalten in großem Stichprobenumfang untersucht.

Tabelle 4.1 belegt, dass nur die Untereinheit C bei einem Wechsel auf Galactose ins Zytoplasma dissoziiert und nach Zugabe von Glucose wieder reassoziert. Alle anderen Untereinheiten verbleiben während der Medienwechsel an der Vakuole und unterliegen nicht dem Regulationsmechanismus der reversiblen Dissoziation.

Tab. 4.1: V-ATPase Dissoziation nach einem Mediumwechsel von Glucose zu Galactose und zurück zu Glucose

Stamm	n	Zellen mit dissoziierter Untereinheit		
		1) Glucose	2) Galactose	3) Glucose
a-GFP	62	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)
C-GFP	154	5 (3%)	146 (95%)	6 (4%)
B-GFP	116	2 (2%)	6 (5%)	1 (1%)
D-GFP	70	6 (8%)	6 (8%)	5 (7%)
A-GFP	19	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
E-GFP	65	0 (0%)	4 (6%)	2 (3%)
G-GFP	12	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
H-GFP	40	1 (3%)	1 (3%)	0 (0%)

4.2. Bedeutung des Zytoskeletts bei der Dissoziation

4.2.1. Die V-ATPase und Aktin

Im Jahr 2000 wurde durch Overlayblots gezeigt, dass die V-ATPase Untereinheit B aus Osteoklasten eine Aktinbindungsdomäne besitzt, welche durch Co-Sedimentierungsexperimente der N-terminalen Hälfte von B zugeordnet werden konnte (Holliday *et al.* 2000). Um nachzuweisen, ob die Bindung der V-ATPase an Aktin eine universelle Eigenschaft ist, wurden in unserer Arbeitsgruppe weiterführende Experimente mit der V-ATPase in den apikalen Membranen der Gobletzellen des Mitteldarms der Raupen des Tabakswärmers *Manduca sexta* durchgeführt. Durch Immunfärbungen konnte im konfokalen Mikroskop gezeigt werden, dass es eine Co-Lokalisation von V-ATPase und Aktin gibt. Co-Pelletierungsassays belegten, dass es eine Interaktion zwischen V-ATPase und Aktin gibt, wobei jedoch das Holoenzym eine höhere Affinität zu Aktin aufweist als der V_1 -Komplex. In Overlayblots konnten diese Daten verifiziert werden. Zusätzlich zur Untereinheit B kristallisierte sich dabei mit der V-ATPase Untereinheit C ein weiterer Bindungspartner heraus, welcher durch Co-Pelletierungsassays bestätigt wurde (Vitavska *et al.* 2003). Die V-ATPase C aus *Manduca* bindet dabei überraschenderweise nicht nur F-Aktin, sondern auch G-Aktin (Vitavska *et al.* 2005).

Aufgrund dieser *in vitro* gewonnenen Ergebnisse stellte sich die Frage, ob das Aktin-Zytoskelett *in vivo* einen Einfluss bei der reversiblen Dissoziation der V-ATPase in

Saccharomyces cerevisiae hat. Dafür wurde zuerst die Wirkung von Latrunculin B (Lat B) auf die Depolymerisierung von F-Aktin mit Hilfe des GFP markierten mitochondrialen Proteins Tom20 getestet. Bei einer Inkubation von 30 min mit 200 μ M Lat B zeigt sich die Auflösung der typischen Ringstruktur der Mitochondrien durch Depolymerisierung des Aktin-Zytoskeletts (Abb. 4.5 I) (Boldogh *et al.* 1998; Kawai *et al.* 2001). Die Auswirkungen der Depolymerisierung des Aktin-Zytoskeletts auf die reversible Dissoziation der V-ATPase wurde mit Hilfe der Hefestämme mit den GFP markierten V-ATPase Untereinheiten B, C, D und a untersucht. Wie in Abbildung 4.5 II zu sehen ist, hat die Depolymerisierung des Aktin-Zytoskeletts keinen Einfluss auf die reversible Dissoziation der V-ATPase Untereinheit C. Auch konnte keine Veränderung der Lokalisation der Untereinheiten B und D gefunden werden. Des weiteren ist der Tabelle 4.2 zu entnehmen, dass es keine Veränderung der Lokalisation der Untereinheit a gibt.

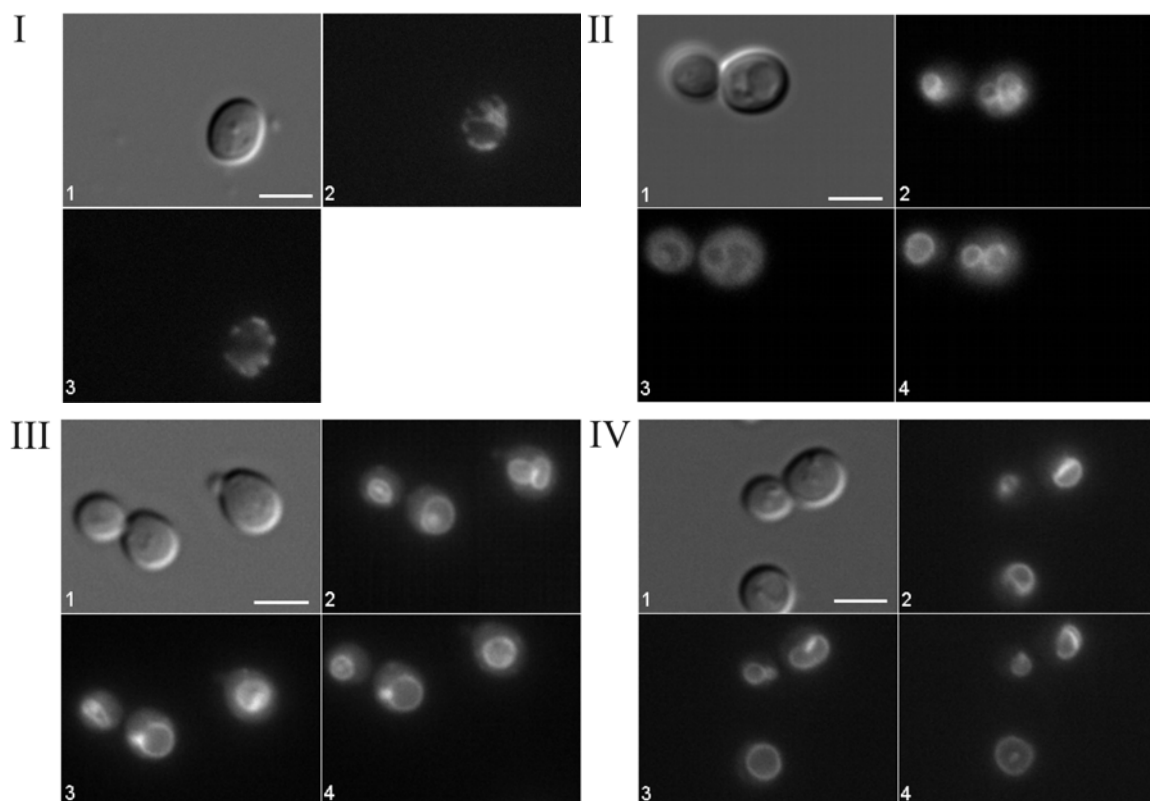


Abb. 4.5: Effekt von Latrunculin B auf die reversible Dissoziation der V-ATPase Untereinheiten

Als Kontrolle für die erfolgreiche Depolymerisierung des Aktin-Zytoskeletts diente der GFP markierte Tom20 Stamm. Die Zellen wurden vor der Inkubation mit Lat B aufgenommen (Bild 1 + 2) und nach einer Inkubation mit Lat B (200 μ M) für 30 min (Bild 3). Die Hefestämme mit den GFP markierten V-ATPase Untereinheiten C (II), B (III) und D (IV) wurden ebenfalls für 30 min mit 200 μ M Lat B in 2 % Glucose inkubiert (Bild 2), anschließend erfolgte wie in Abb. 4.3 beschrieben ein Wechsel auf Galactose (Bild 3) und wieder zurück auf Glucose (Bild 4). In allen Medien war während der gesamten Zeit Lat B vorhanden. Bild 1 zeigt jeweils die Hefezellen visualisiert mit dem Differential Interferenz Kontrast. Maßstab: 5 μ m

Tab. 4.2: Einfluss von F-Aktin auf die reversible Dissoziation der V-ATPase

Stamm	n	Zellen mit dissoziierter Untereinheit	
		1) Glucose mit Lat B	2) Galactose mit Lat B
a-GFP	39	0 (0%)	0 (0%)
C-GFP	150	8 (5%)	129 (86%)
B-GFP	33	0 (0%)	0 (0%)
D-GFP	63	7 (11%)	6 (10%)
		1) Galactose mit Lat B	2) Glucose mit Lat B
C-GFP	87	87 (100%)	0 (0%)

Die Ergebnisse dieser *in vivo* Experimente unterstützen die 2001 von Xu und Forgac veröffentlichten Daten, wo nach Behandlung mit Latrunculin kein Unterschied im Vergleich zu Zellen ohne Latrunculin Behandlung bei der Immunpräzipitation festzustellen ist (Xu and Forgac 2001). Damit konnte gezeigt werden, dass die V-ATPase zwar an Aktin bindet, aber das Aktin-Zytoskelett keinen Einfluss auf die Glucose-abhängige Dissoziation der V-ATPase hat.

4.2.2. Die V-ATPase und Mikrotubuli

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass das Aktin-Zytoskelett keine Rolle bei der reversiblen Dissoziation der V-ATPase in der Hefe spielt. Xu und Forgac legten 2001 dar, dass es durch eine Depolymerisierung der Mikrotubuli zu einer partiellen Blockierung der Glucose-abhängigen Dissoziation der V-ATPase kommt. Es stellte sich nun die Frage, wie sich die Dissoziation unter diesen Bedingungen *in vivo* in der Hefe darstellt. Dazu wurde als Kontrolle der erfolgreichen Depolymerisierung der Mikrotubuli ein GFP-markierter Tub1 Hefestamm verwendet, der nach einer Inkubation mit 60 µg/ml Benomyl für 1 Stunde die Auflösung der Mikrotubuli zeigte (Abb. 4.6 I) (Thomas *et al.* 1985; Stearns *et al.* 1990).

Tab. 4.3: Einfluss der Mikrotubuli auf die reversible Dissoziation der V-ATPase

Stamm	n	Zellen mit dissoziierter Untereinheit	
		1) Glucose mit Benomyl	2) Galactose mit Benomyl
a-GFP	14	1 (7%)	0 (0%)
C-GFP	95	1 (1%)	11 (12%)
B-GFP	31	1 (3%)	1 (3%)
D-GFP	57	3 (5%)	4 (7%)
		1) Galactose mit Benomyl	2) Glucose mit Benomyl
C-GFP	40	40 (100%)	2 (5%)

Tabelle 4.3 und Abbildung 4.6 zeigen deutlich, dass die Depolymerisierung der Mikrotubuli keinen Einfluss auf die Lokalisation der V-ATPase Untereinheiten B, D und a hat. Bemerkenswerterweise verhinderte die Depolymerisierung der Mikrotubuli die Dissoziation von C bei einem Mediumwechsel von Glucose auf Galactose (Abb. 4.6 II), aber nicht deren Reassoziierung (Abb. 4.6 III). Diese Beobachtungen sind, bezogen auf die V-ATPase Untereinheit C, vergleichbar mit den von Xu und Forgac 2001 zur Rolle des Zytoskeletts bei der Glucose-abhängigen Dissoziation veröffentlichten Ergebnissen.

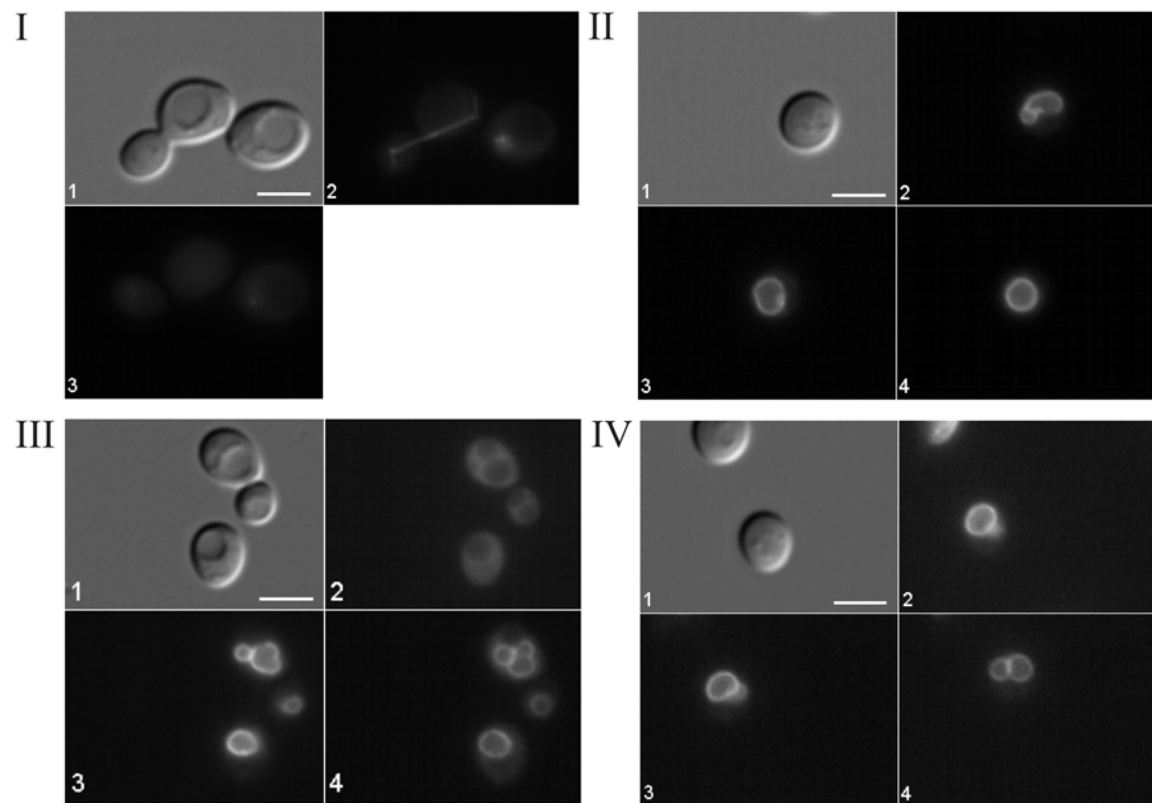


Abb. 4.6: Effekt von Benomyl auf die reversible Dissoziation der V-ATPase Untereinheiten

I: Hefezellen mit einem GFP markierten Tub1 wurden zuerst ohne (Bild 1 + 2) und dann mit (Bild 3) dem Mikrotubuli depolymerisierendem Benomyl (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 1 h inkubiert. **II + IV:** Die Zellen mit den GFP markierten Untereinheiten C (II) und D (IV) wurden für 1 h mit 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Benomyl in Medium mit 2 % Glucose inkubiert (Bild 2), um anschließend wieder einem Wechsel auf Galactose mit Benomyl (Bild 3) und zurück zu Glucose mit Benomyl (Bild 4) zu unterliegen. **III:** Das Gleiche Vorgehen wie bei II und IV, nur das die Bilder Untereinheit C erst in 2 % Galactose (Bild 2), dann in Glucose (Bild 3) und anschließend wieder in Galactose (Bild 4) zeigen. Bild 1 zeigt jeweils die Hefezellen visualisiert mit dem Differential Interferenz Kontrast. Maßstab: 5 μm

4.2.3. Interaktion der Hefe V-ATPase Untereinheit C mit Mikrotubuli

Die wichtige Rolle, die die Mikrotubuli bei der Dissoziation der V-ATPase Untereinheit C spielen, lässt die Frage aufkommen, ob die Untereinheit C direkt an die Mikrotubuli bindet oder dieses durch Linkerproteine geschieht. In Overlayblots (Abb. 4.7) konnte gezeigt werden, dass eine direkte Bindung von Untereinheit C an Tubulin und Aktin vorliegt. Da neben der Hefe C auch die Untereinheit C aus *Manduca sexta* und *Arabidopsis thaliana* an Tubulin und Aktin bindet, scheint dies eine universelle Eigenschaft der V-ATPase zu sein.

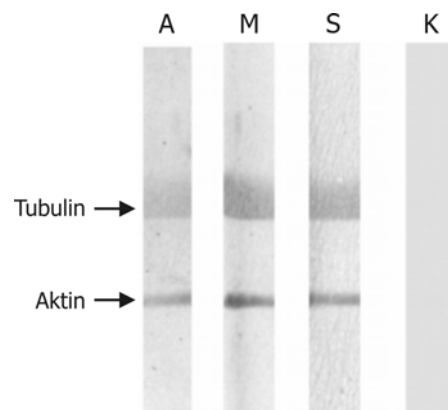


Abb. 4.7: Im Overlayblot bindet Untereinheit C an Tubulin und Aktin

Tubulin und Aktin auf einer Nitrocellulosemembran nach Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden jeweils mit rekombinanter Untereinheit C aus *Arabidopsis thaliana* (A), *Manduca sexta* (M) oder *Saccharomyces cerevisiae* (S) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Immunfärbung mit einem Antikörper gegen Untereinheit C. Als Kontrolle (K) diente eine Immunfärbung ohne vorherige Inkubation mit Untereinheit C. Das Bild wurde mir von Dr. Olga Vitavska überlassen.

Die Interaktion zwischen der Hefe V-ATPase Untereinheit C und Tubulin wurde auch mittels Co-Pelletierung überprüft. Die rekombinant hergestellte Untereinheit C wurde in einer Konzentration von 2 μM mit 0,5 μM (Abb. 4.8 I) oder 1 μM (Abb. 4.8 II) aus Kalbshirn isoliertem polymerisiertem Tubulin inkubiert und schließlich bei 114.000 x g für 1 h zentrifugiert. Auf den SDS-Gelen ist zu erkennen, dass bis zur Hälfte der Untereinheit C (42 kDa) zusammen mit Tubulin (50 kDa) ins Pellet (Abb. 4.8) geht, als Kontrolle ohne Tubulin ist sie überwiegend im Überstand zu sehen (Abb. 4.8).

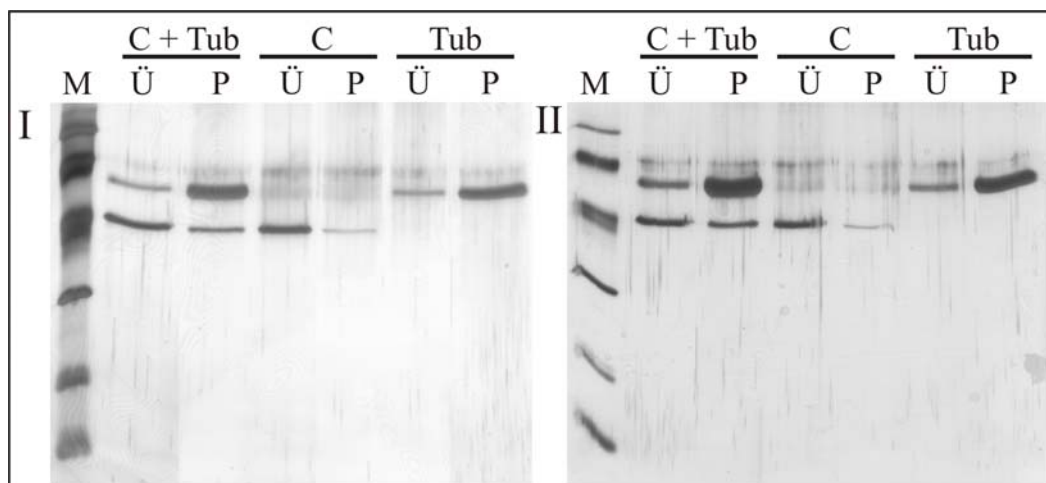


Abb. 4.8: Die rekombinante V-ATPase Untereinheit C co-pelletiert mit polymerisiertem Tubulin

Die rekombinante Untereinheit C (1 μM) und polymerisiertes Tubulin (0,5 μM (I) und 1 μM (II)) wurden in BRB80 Puffer für 30 min bei 30°C inkubiert und danach 60 min bei 114.000 x g sedimentiert. Der resultierende Überstand (Ü) und das Pellet (P) wurden mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. Als Kontrollen dienten die Inkubation von rekombinanter Untereinheit C allein und polymerisiertes Tubulin ohne Untereinheit C.

Die Bindung von Untereinheit C an das polymerisierte Tubulin zeigte sich unabhängig von der Konzentration der Mikrotubuli. Damit konnte die direkte Interaktion zwischen Untereinheit C und den Mikrotubuli endgültig bestätigt werden.

4.3. Einfluss von Agenzien auf die reversible Dissoziation der V-ATPase

Um die Regulation der reversiblen Dissoziation der V-ATPase etwas mehr im Detail zu verstehen und z.B. herauszufinden, welche weiteren Komponenten in der Zelle eine Rolle dabei spielen könnten, sollten zunächst Vorversuche mit verschiedenen Inhibitoren durchgeführt werden. Da die vorangegangenen Experimente dieser Arbeit jedoch zeigten, dass nur die V-ATPase Untereinheit C dem Regulationsmechanismus der reversiblen Dissoziation unterliegt, wurde für die folgenden Studien das Hauptaugenmerk auf diese Untereinheit gelegt. Dabei könnten die neuen Ergebnisse erste Hinweise auf den Regulationsmechanismus der reversiblen Dissoziation liefern.

4.3.1. Bafilomycin A₁

Parra und Kane (1998) beschrieben, dass der V-ATPase Inhibitor Concanamycin A zu etwa 75 % die Dissoziation, aber nicht die Reassoziierung der V-ATPase in der Hefe hemmt. Deswegen sollte überprüft werden, ob die Hemmung der Dissoziation auch *in vivo* bestätigt werden kann. Hierzu sollte Bafilomycin verwendet werden, das wie auch Concanamycin zu den Makrolidantibiotika gehört und ebenfalls als ein spezifischer V-ATPase Inhibitor im nanomolaren Bereich wirkt (Bowman and Bowman 2005). Zur Inhibierung der Aktivität der V-ATPase wurden die Hefezellen mit 10 µM Bafilomycin A₁ für 60 min unterm Fluoreszenzmikroskop inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Inhibitor wurde durch einen entsprechenden Medienwechsel das Dissoziations- bzw. Reassoziationsverhalten der V-ATPase Untereinheit C betrachtet.

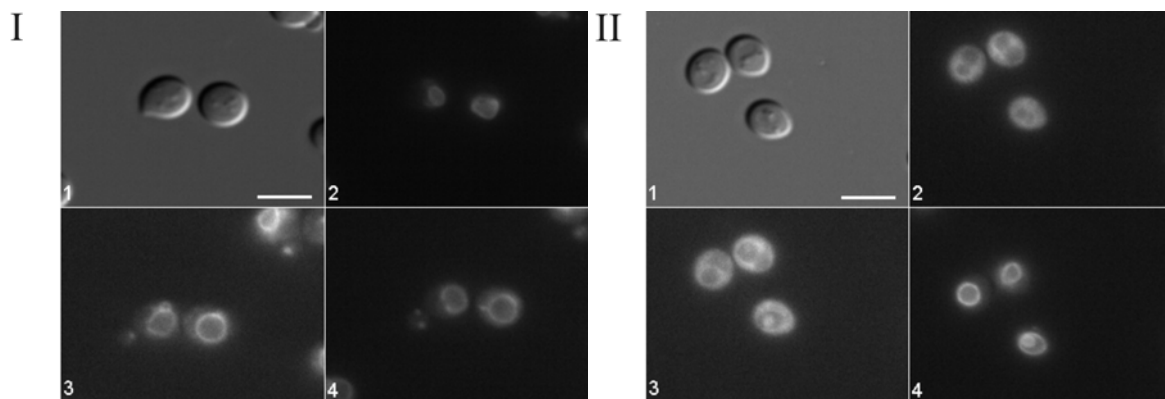


Abb. 4.9: Einfluss von Bafilomycin A₁ auf die reversible Dissoziation von Untereinheit C

Der Hefestamm mit der GFP markierten Untereinheit C wurde auf einem Objektträger fixiert und zunächst ohne Inhibitor 10 min in Medium mit 2 % Glucose (I) oder 2 % Galactose (II) inkubiert (Bild 2). Anschließend wurden die Zellen für 60 min mit dem V-ATPase Inhibitor Bafilomycin (10 μ M) behandelt (Bild 3), um die Versuchsreihe durch einen entsprechenden Wechsel auf Medium mit 2 % Galactose (I) oder 2 % Glucose (II) abzuschließen (Bild 4). Bild 1 zeigt jeweils die Hefezellen visualisiert mit dem Differential Interferenz Kontrast. Maßstab: 5 μ m

Die Ergebnisse in Abbildung 4.9 und Tabelle 4.4 bestätigen die *in vitro* Ergebnisse von Parra und Kane (1998), nach dem eine aktive V-ATPase für die Dissoziation der Untereinheit C vorhanden sein muss, die Inhibierung der V-ATPase jedoch keinen Einfluss auf die Reassoziierung der Untereinheit C hat.

Tab. 4.4: Effekt von Bafilomycin A₁ auf die reversible Dissoziation der V-ATPase Untereinheit C

n	Zellen mit dissoziierter Untereinheit C	
	1) Glucose mit Bafilomycin	2) Galactose mit Bafilomycin
81	5 (6%)	11 (14%)
n	Zellen mit assoziierter Untereinheit C	
	1) Galactose mit Bafilomycin	2) Glucose mit Bafilomycin
69	65 (94%)	5 (7%)

4.3.2. Ammoniumchlorid

Ammoniumchlorid (NH₄Cl) ist ein pH-Entkoppler und erhöht den inneren pH-Wert der Lysosomen also auch den der Vakuole in der Hefe (Maxfield 1982). Um zu untersuchen, ob ein saurer pH-Wert in der Vakuole eine Rolle bei der Dissoziation der V-ATPase spielt, wurden die Hefen mit 10 mM Ammoniumchlorid für 60 min inkubiert und anschließend

unter dem Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich der reversiblen Dissoziation der V-ATPase Untereinheit C beobachtet.

Tab. 4.5: Effekt von NH_4Cl auf die reversible Dissoziation der V-ATPase Untereinheit C

n	Zellen mit dissoziierter Untereinheit C	
	1) Glucose mit NH_4Cl	2) Galactose mit NH_4Cl
95	1 (1%)	27 (28%)
n	1) Galactose mit NH_4Cl	2) Glucose mit NH_4Cl
	88	74 (84%)

Die Ergebnisse in Tabelle 4.5 und Abbildung 4.10 legen dar, dass die Behandlung durch Ammoniumchlorid dazu führt, dass es nur noch in 28 % aller Fälle zu einer Dissoziation der Untereinheit C unter diesen Bedingungen kommt. Es hat aber wie auch bei Bafilomycin keinen Einfluss auf die Reassoziierung.

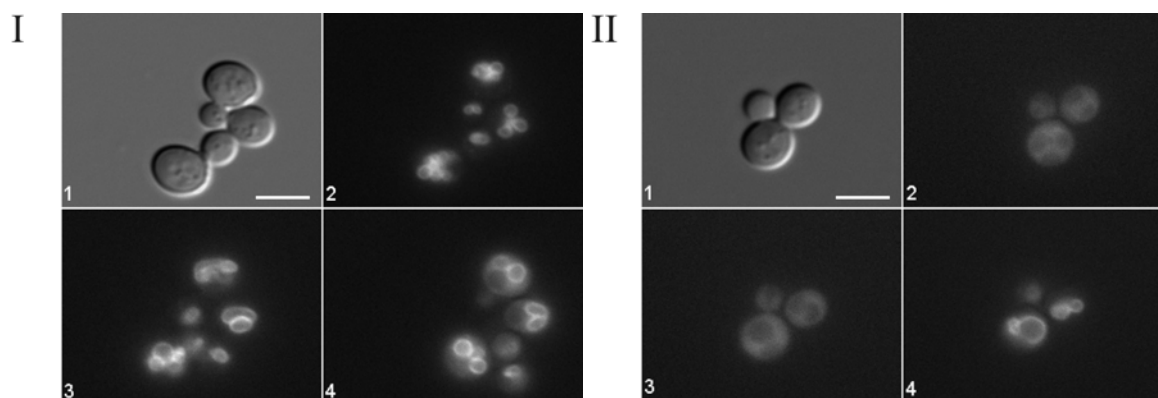


Abb. 4.10: Einfluss von Ammoniumchlorid auf die reversible Dissoziation von Untereinheit C

Der Hefestamm mit der GFP markierten Untereinheit C wurde auf einem Objektträger fixiert und erst ohne Inhibitor 10 min in Medium mit 2 % Glucose (I) oder 2 % Galactose (II) inkubiert (Bild 2). Anschließend wurden die Zellen für 60 min mit dem Inhibitor Ammoniumchlorid (10 mM) behandelt (Bild 3), um die Versuchsreihe durch einen entsprechenden Wechsel auf Medium mit 2 % Galactose (I) oder 2 % Glucose (II) abzuschließen (Bild 4). Bild 1 zeigt jeweils die Hefezellen visualisiert mit dem Differential Interferenz Kontrast. Maßstab: 5 μm

4.3.3. H89

Für die *Manduca sexta* V-ATPase Untereinheit C konnte gezeigt werden, dass sie durch die Protein Kinase A (PKA) phosphoryliert wird und es dadurch zu einer Reassoziierung der V-ATPase kommt (Voss *et al.* 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde deswegen *in vivo* der Einfluss der PKA auf die reversible Dissoziation der V-ATPase überprüft. Zur Inhibierung der PKA in der Hefe wurde der universelle und spezifische Inhibitor H89 verwendet (Chijiwa *et al.* 1990). Die Hefezellen wurden vor einem jeweiligen Medienwechsel mit 100 μ M H89 für 30 min inkubiert (Gabriel *et al.* 2004; Mouillon and Persson 2005).

Tab. 4.6: Effekt von H89 auf die reversible Dissoziation der V-ATPase Untereinheit C

n	Zellen mit dissoziierter Untereinheit C	
	1) Glucose mit H89	2) Galactose mit H89
115	3 (3%)	2 (2%)
n	1) Galactose mit H89	2) Glucose mit H89
	106	105 (99%)

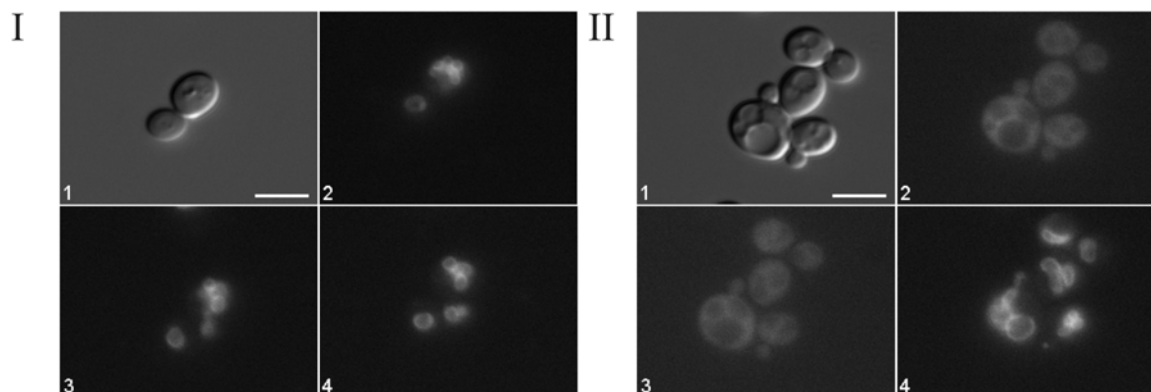


Abb. 4.11: Einfluss von H89 auf die reversible Dissoziation von Untereinheit C

Der Hefestamm mit der GFP markierten Untereinheit C wurde auf einem Objektträger fixiert und erst ohne Inhibitor 10 min in Medium mit 2 % Glucose (I) oder 2 % Galactose (II) inkubiert (Bild 2). Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit dem PKA spezifischen Inhibitor H89 behandelt (Bild 3), um die Versuchsreihe durch einen entsprechenden Wechsel auf Medium mit 2 % Galactose (I) oder 2 % Glucose (II) abzuschließen (Bild 4). Bild 1 zeigt jeweils die Hefezellen visualisiert mit dem Differential Interferenz Kontrast. Maßstab: 5 μ m

Überraschenderweise wurde die Dissoziation und nicht die Reassoziierung durch die Inhibierung der PKA mit H89 gehemmt (Tabelle 4.6, Abbildung 4.11). Dies bedeutet, dass

es möglicherweise Unterschiede in der Hefe im Gegensatz zu *Manduca* und *Calliphora vicina* bei der Regulation durch Phosphorylierung der Untereinheit C gibt.

4.3.4. Okadainsäure

Nachdem die Ergebnisse von der Behandlung der Hefezellen mit H89 eine Beteiligung der PKA an der reversiblen Dissoziation durch Phosphorylierung der V-ATPase Untereinheit C impliziert, muss es auch wieder zu einer Dephosphorylierung durch Phosphatasen kommen. Okadainsäure wurde erstmals aus den marinen Schwämmen *Halichondria okadaei* und *Halichondria melanodocia* isoliert und wird von verschiedenen Dinoflagellaten produziert. Durch diese Polyether-C₃₈-Fettsäure werden die Serin-/Threonin-Phosphatasen des Typs 1 und 2A spezifisch im nanomolaren Bereich gehemmt, wobei letztere etwa 10 bis 100fach besser inhibiert wird (Bialojan and Takai 1988; Dawson and Holmes 1999).

Zur Inhibierung der Phosphatasen wurde der Hefestamm mit der GFP markierten Untereinheit C für 60 min mit 10 μ M Okadainsäure inkubiert und anschließend das Dissoziation- und Reassoziationsverhalten untersucht. Hierbei zeigte sich, dass eine Inhibierung der Proteinphosphatasen des Typs 1 und 2A bei der Untereinheit C zu einer Inhibierung der Dissoziation (Abb. 4.12 I) führt, die Reassoziationsverhalten (Abb. 4.12 II) jedoch nicht davon beeinflusst wird (Tab. 4.7).

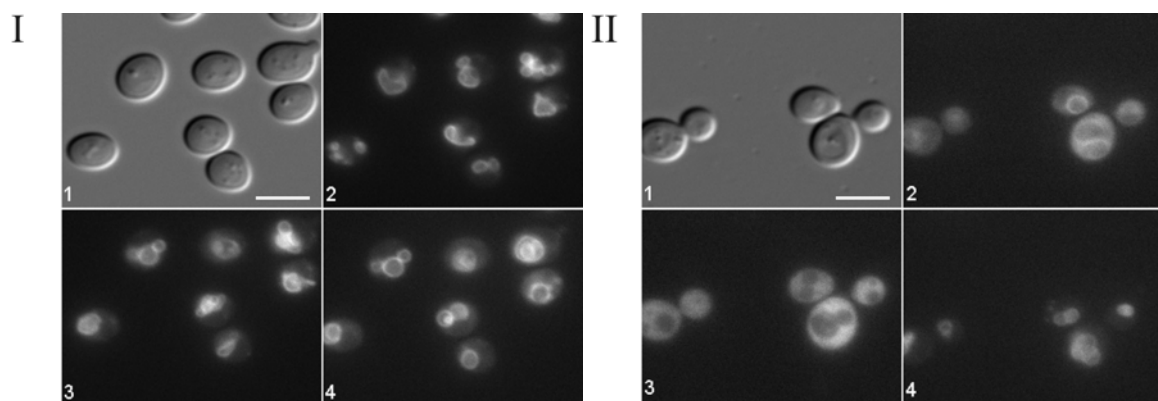


Abb. 4.12: Einfluss von Okadainsäure auf die reversible Dissoziation von Untereinheit C

Die Hefezellen mit GFP markierter Untereinheit C wurden wie in Abbildung 4.9 beschrieben behandelt, nur dass in dieser Versuchsreihe der Serin-/Threonin-Phosphatase Inhibitor Okadainsäure eingesetzt wurde. Die Zellen wurden dazu mit 10 μ M Okadainsäure für 60 min inkubiert. Bild 1 zeigt jeweils die Hefezellen visualisiert mit dem Differential Interferenz Kontrast. Maßstab: 5 μ m

Tab. 4.7: Effekt von Okadainsäure auf die reversible Dissoziation der V-ATPase Untereinheit C

n	Zellen mit dissoziierter Untereinheit C	
	1) Glucose mit Okadainsäure	2) Galactose mit Okadainsäure
121	4 (3%)	27 (22%)
n	1) Galactose mit Okadainsäure	2) Glucose mit Okadainsäure
	99	99 (100%)

4.4. Proteinkinase A-Signaltransduktionsweg und die V-ATPase

Der durch Inhibierung mit H89 demonstrierte Einfluss der PKA auf die Dissoziation der V-ATPase Untereinheit C lässt die Frage offen, ob die PKA der Hefe einen direkten Einfluss auf die Dissoziation hat oder ob noch andere Faktoren des PKA-Signaltransduktionswegs eine Rolle spielen. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besitzt drei katalytische Untereinheiten der PKA (Tpk1, Tpk2 und Tpk3) und die regulatorische Untereinheit Bcy1 (Toda *et al.* 1987). cAMP aktiviert die Kinasen durch Bindung an Bcy1 des tetrameren Holoenzym und anschließender Spaltung in zwei katalytische Untereinheiten und einer dimeren regulatorischen Untereinheit (Krebs and Beavo 1979). In der Hefe ist das Holoenzym im Gegensatz zu Säugetierzellen bis zur Aktivierung im Zellkern lokalisiert und nach Aktivierung verbleibt die regulatorische Untereinheit weiterhin im Zellkern, wohingegen Tpk1 und Tpk3 ins Zytoplasma wandern und dort Proteine phosphorylieren (Griffioen *et al.* 2000). Tpk2 dagegen lokalisiert erst in der stationären Phase der Hefezelle oder bei Wachstum auf Glycerol im Zytoplasma (Tudisca *et al.* 2009).

4.4.1. Die Rolle des Glucosesensors Gpr1 bei der reversiblen Dissoziation der V-ATPase

Die Aktivierung der Proteinkinase A geschieht unter anderem durch eine Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration. Die Erhöhung der cAMP Konzentration in der Hefezelle wird durch die Adenylatzyklase gesteuert, welche durch zwei unterschiedliche Wege aktiviert werden kann, zum einen durch Ras und zum anderen durch den Glucose-induzierten Weg über den Glucosesensor Gpr1 und das G-Protein Gpa2 (Kraakman *et al.* 1999). Da die reversible Dissoziation ein Glucose-abhängiger Schritt ist und durch

Inhibierung der PKA durch H89 die V-ATPase Untereinheit C keiner Dissoziation mehr unterlag, liegt eine Beteiligung des PKA-Signaltransduktionswegs an der reversiblen Dissoziation als Regulationsmechanismus nahe. Es sollte deswegen geklärt werden, ob die Aktivierung der PKA über den Glucosesensor eine Rolle bei der reversiblen Dissoziation spielt.

Es wurden Hefestämme mit einer Deletion des *GPR1* Gens über homologe Rekombination hergestellt, wobei zusätzlich entweder die V-ATPase Untereinheit B oder C mit einem GFP markiert wurde. Die so konstruierten Hefestämme wurden hinsichtlich der Aktivität ihrer V-ATPase getestet. Beim Wachstumstest zeigte sich nur ein geringer Unterschied zum Wildtypstamm (Abb. 4.13), was auf eine aktive V-ATPase hin deutet.

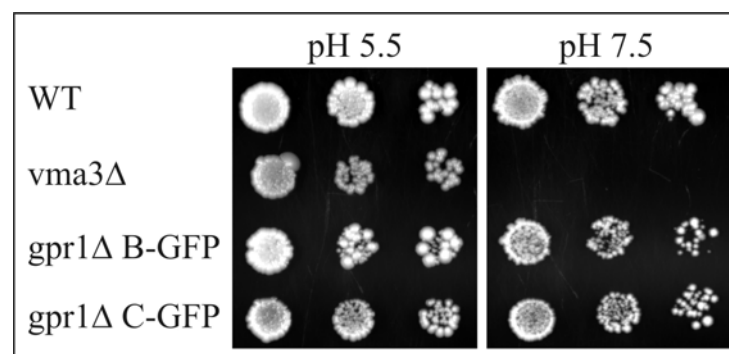


Abb. 4.13: Aktivität der V-ATPase in den *GPR1* Deletionsstämmen

Die *Saccharomyces cerevisiae* Stämme W303 als Wildtyp (WT) und die Stämme mit einer Deletion von *GPR1* sowie einer zusätzlich GFP markierten V-ATPase Untereinheit wurden wie im Methodenteil beschrieben auf YPD Platten mit einem pH von 5,5 oder 7,5 getropft und für 3-5 Tage bei 30°C inkubiert. Als Negativkontrolle diente der Hefestamm W303 mit einer Deletion der V-ATPase Untereinheit c (*Vma3*).

Der Wachstumstest konnte durch die Aktivitätstest der Hefevakuolen bestätigt werden (Abb. 4.14), es zeigte sich jedoch wie auch schon bei einer alleinigen GFP Markierung von Untereinheit C eine geringere spezifische Aktivität der V-ATPase in der Deletionsmutante mit der GFP Markierung an Untereinheit C.

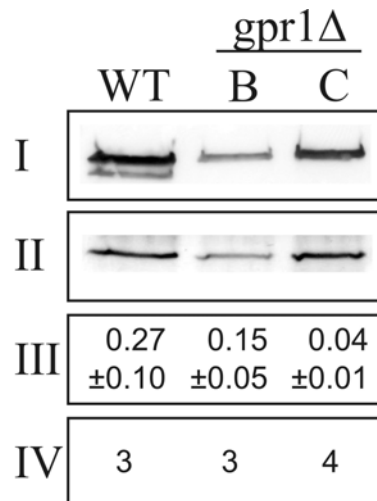


Abb. 4.14: Quantitative Analyse der Hefevakuolen auf Menge und Aktivität der V-ATPase

I + II: Hefevakuolen von *GPR1* Deletionsstämmen mit den GFP markierten Untereinheiten B oder C sowie der WT wurden per Western Blot (je 10 µg Protein) auf den Gehalt an V-ATPase durch die Antikörper gegen die V-ATPase Untereinheiten A (I) und d (II) untersucht. **III:** Spezifische V-ATPase Aktivität der Hefevakuolenpräparationen der oben genannten Stämme (U/mg Protein, ± Standardabweichung). **IV:** Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Hefevakuolenpräparationen.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Hefestämme mit einer Deletion des Glucosesensors Gpr1 zeigen, dass es keinerlei Veränderung des Verhaltens der reversiblen Dissoziation gibt (Abb. 4.15, Tab. 4.8). Somit konnte nachgewiesen werden, dass die reversible Dissoziation zwar ein Glucose-abhängiger Prozess ist, aber der Glucosesensor keine direkte Rolle dabei spielt.

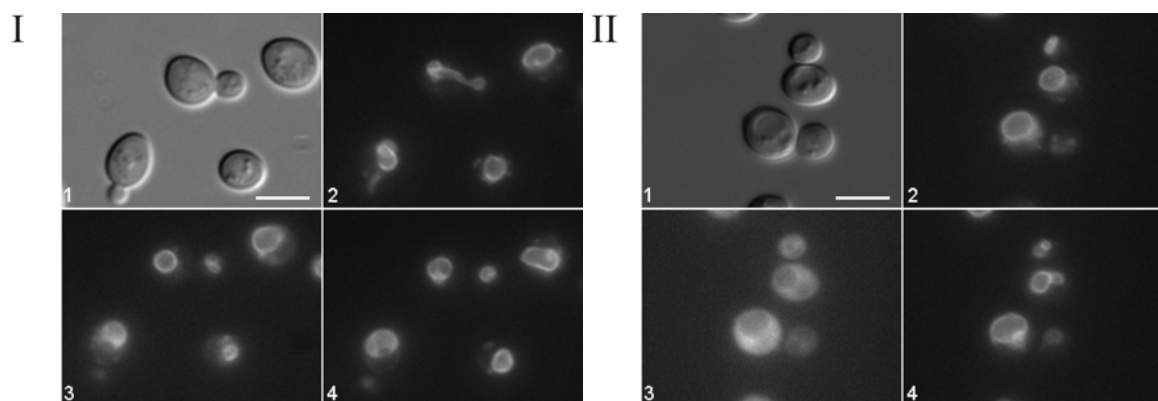


Abb. 4.15: Einfluss des Glucosesensors Gpr1 auf die reversible Dissoziation der V-ATPase

Hefezellen mit einer Deletion von *GPR1* und jeweils einer GFP markierten V-ATPase Untereinheit wurden auf Objektträgern fixiert und mit dem Differential Interferenz Kontrast visualisiert (Bild 1 von I + II). Das GFP Signal der Untereinheiten B (I) und C (II) ist in den anderen Bildern dargestellt. Zuerst nach einer Inkubation mit Glucose (Bild 2), dann nach einer Inkubation von 20 min mit 2 % Galactose (Bild 3) und nach einer erneuten 20-minütigen Inkubation mit 2 % Glucose (Bild 4). Maßstab: 5 µm

Tab. 4.8: Einfluss des Glucosesensors auf die reversible Dissoziation der V-ATPase

Stamm	n	Zellen mit dissoziierter Untereinheit		
		1) Glucose	2) Galactose	3) Glucose
B-GFP	48	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
C-GFP	66	0 (0%)	66 (100%)	0 (0%)

4.4.2. Die Rolle der Proteinkinase A bei der reversiblen Dissoziation der V-ATPase

Um zu klären, welchen Einfluss die PKAs der Hefe bei der reversiblen Dissoziation haben, wurden Hefedeletionsstämme konstruiert. Diese hatten jeweils *TPK1* oder *TPK3*, *TPK1* und *TPK3* oder alle drei *TPKs* deletiert, wobei jeweils die V-ATPase Untereinheit B oder C eine GFP Markierung aufwies. Da eine Deletion aller drei *TPKs* für die Hefe lethal ist, wurde die PKA $C\alpha$ der Maus in diesem Stamm als einzige Quelle der katalytischen Untereinheit der PKA kloniert (Peeters *et al.* 2006). Die durch homologe Rekombination hergestellten Hefestämme wurden durch Wachstumstest, Aktivitätstest der präparierten Hefevakuolen und anschließender Immunfärbung auf die Aktivität der V-ATPase hin getestet.

Eine Deletion von *Tpk1* oder *Tpk3* sowie von beiden zusammen in einem Stamm zeigte keinen negativen Einfluss auf die Aktivität der V-ATPase im Vergleich zum Wildtyp. Die Deletionsstämme mit der GFP Markierung an der Untereinheit B wiesen sogar eine höhere Aktivität als der Wildtyp auf (Abb. 4.17 III). Bezogen auf die Stämme mit der GFP markierten Untereinheit C zeigt sich ein Unterschied zwischen Aktivität der V-ATPase und Menge an assemblierter V-ATPase an der Vakuole (Abb. 4.17).

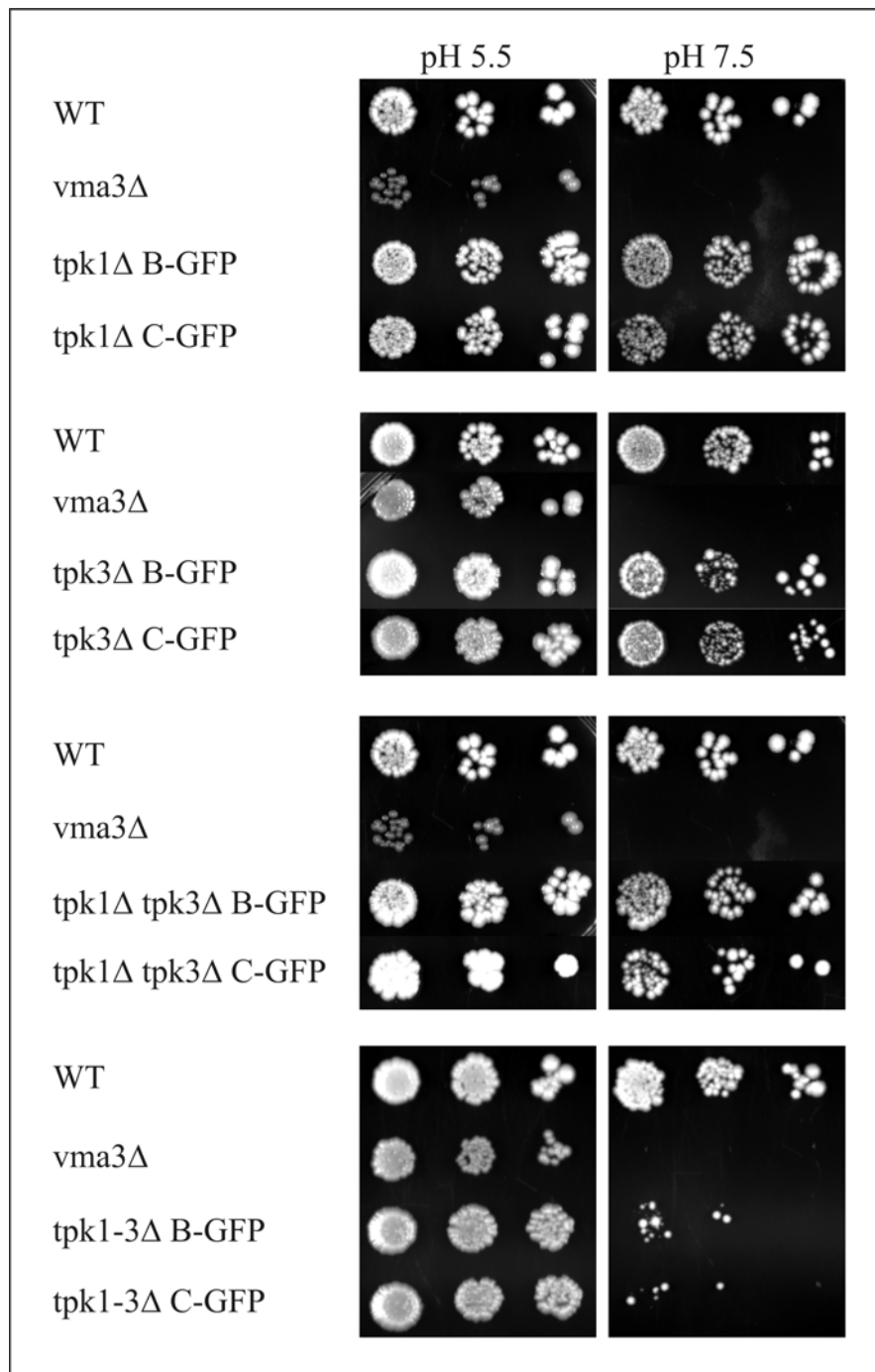


Abb. 4.16: Aktivität der V-ATPase in den *TPK* Deletionsstämmen

Die *Saccharomyces cerevisiae* Stämme DHD5 bzw. W303 bei der Tripelmutante als Wildtyp (WT) und die Stämme mit einer Deletion von *TPK1* bzw. *TPK3*, beiden oder einer Dreifachdeletion von allen *TPKs* sowie einer zusätzlich GFP markierten V-ATPase Untereinheit wurden wie im Methodenteil beschrieben auf YPD Platten bei einem pH von 5,5 oder 7,5 getropft und für 3-5 Tage bei 30°C inkubiert. Als Negativkontrolle diente der Hefestamm W303 mit einer Deletion der V-ATPase Untereinheit c (*Vma3*).

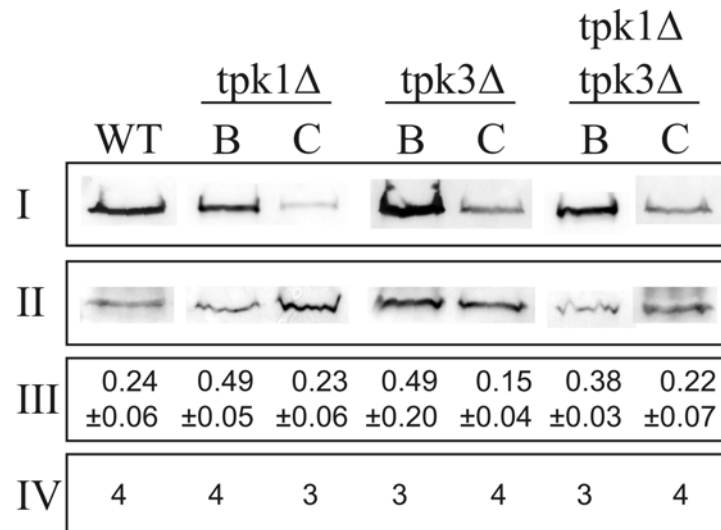


Abb. 4.17: Quantitative Analyse der Hefevakuolen auf Menge und Aktivität der V-ATPase

I + II: Hefevakuolen von *TPK* Deletionsstämmen mit der GFP markierten Untereinheit B oder C sowie der WT wurden per Western Blot (je 10 µg Protein) auf den Gehalt an V-ATPase durch die Antikörper gegen die V-ATPase Untereinheiten A (I) und d (II) untersucht. **III:** Spezifische V-ATPase Aktivität der Hefevakuolenpräparationen der oben genannten Stämme (U/mg Protein, ± Standardabweichung). **IV:** Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Hefevakuolenpräparationen.

Die *TPK* Tripelmutante wächst beim Wachstumstest im Vergleich zum Wildtyp bei einem pH von 7,5 deutlich schlechter (Abb. 4.16), was auf eine geringere Aktivität der V-ATPase schließen lässt. Diese verringerte Aktivität zeigt sich auch in den Aktivitätstests der Hefevakuolen (Abb. 4.18 III), wobei diese jedoch nicht so gering ist, wie der Wachstumstest vermuten lassen würde. Hierbei gibt es eine Korrelation zwischen Aktivität und Menge an V-ATPase. (Abb. 4.18)

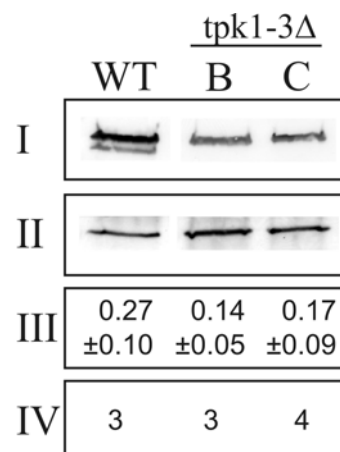


Abb. 4.18: Quantitative Analyse der Hefevakuolen auf Menge und Aktivität der V-ATPase

I + II: Hefevakuolen von *TPK* Tripelmutanten mit der GFP markierten Untereinheit B oder C sowie der WT wurden per Western Blot (je 10 µg Protein) auf den Gehalt an V-ATPase durch die Antikörper gegen die V-ATPase Untereinheiten A (I) und d (II) untersucht. **III:** Spezifische V-ATPase Aktivität der Hefevakuolenpräparationen der oben genannten Stämme (U/mg Protein, ± Standardabweichung). **IV:** Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Hefevakuolenpräparationen.

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass die konstruierten *TPK* Deletionsmutanten alle eine funktionelle V-ATPase besitzen. Somit ist die Assemblierung der V-ATPase nicht durch diese Deletionen gestört. Welchen Einfluss das Fehlen der *TPKs* nun auf die reversible Dissoziation der V-ATPase hat, sollte *in vivo* durch fluoreszenzmikroskopische Lokalisationsstudien geklärt werden. Die Hefestämme mit einer Deletion in *TPK1* (Abb. 4.19) oder *TPK3* (Abb. 4.20) zeigten im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderung der Lokalisation der Untereinheiten B, C oder D während der Initiierung der reversiblen Dissoziation durch einen Medienwechsel. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass entweder die PKA keinen Einfluss auf die V-ATPase in der Hefe hat oder dass sich die PKA Isoformen wechselseitig in ihrer Funktion ersetzen können.

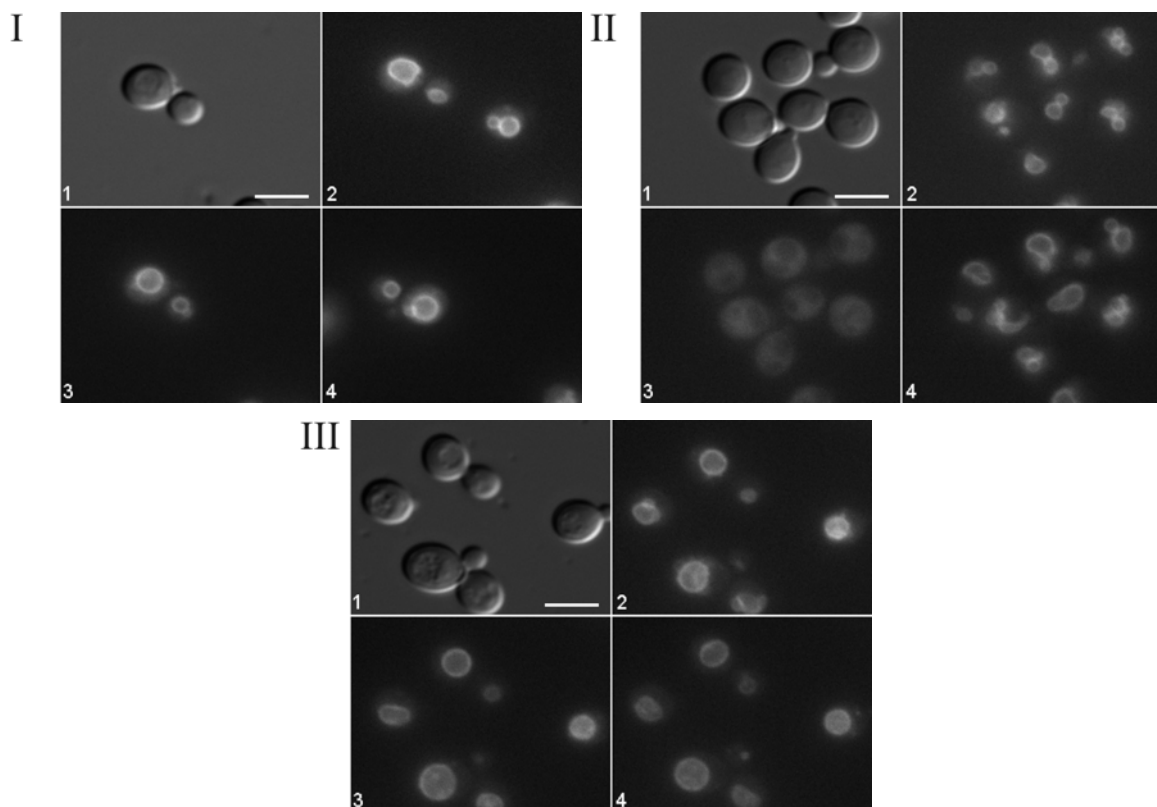


Abb. 4.19: Einfluss der PKA Isoform Tpk1 auf die reversible Dissoziation der V-ATPase
 Hefezellen mit einer Deletion von *TPK1* und jeweils einer GFP markierten V-ATPase Untereinheit wurden auf Objektträgern fixiert und mit dem Differential Interferenz Kontrast visualisiert (Bild 1 von I – III). Das GFP Signal der Untereinheiten B (I), C (II) und D (III) ist in den anderen Bildern dargestellt. Zuerst nach einer Inkubation mit Glucose (Bild 2), dann nach einer Inkubation von 20 min mit 2 % Galactose (Bild 3) und nach einer erneuten 20-minütigen Inkubation mit 2 % Glucose (Bild 4). Maßstab: 5 μ m

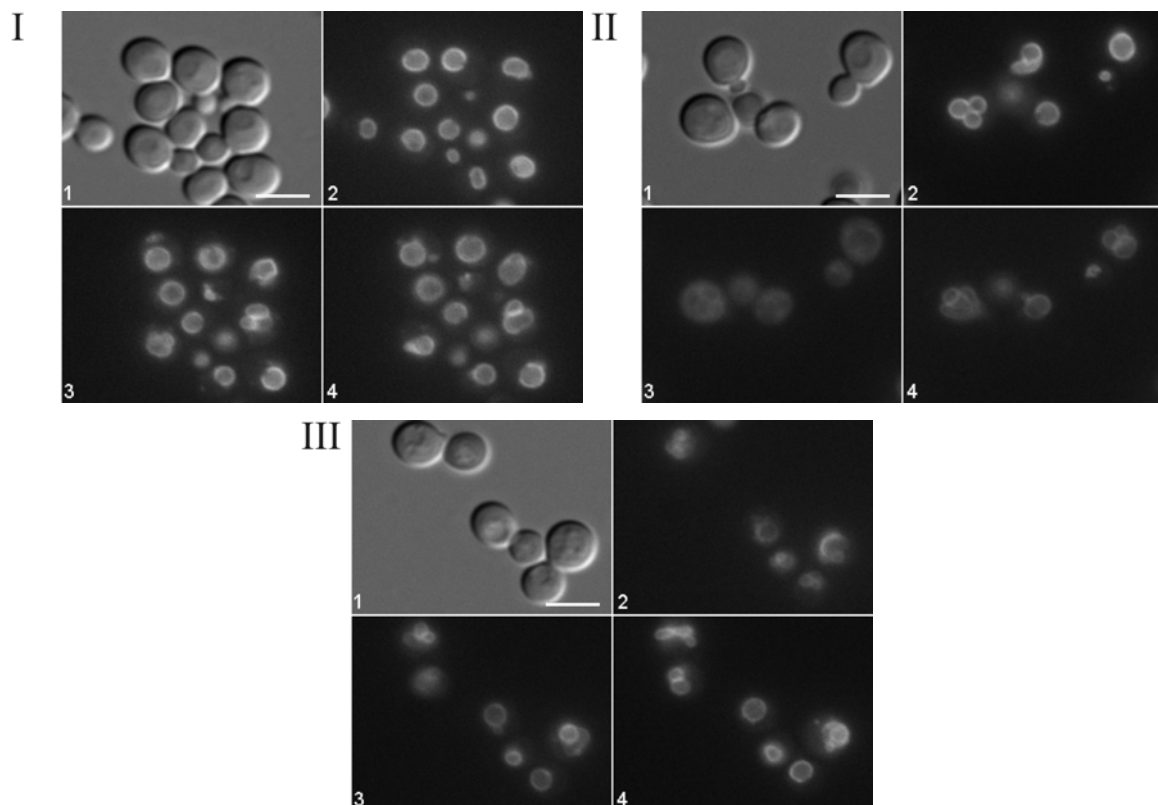


Abb. 4.20: Einfluss der PKA Isoform Tpk3 auf die reversible Dissoziation der V-ATPase

Hefezellen mit einer Deletion von *TPK3* und jeweils einer GFP markierten V-ATPase Untereinheit wurden auf Objektträgern fixiert und mit dem Differential Interferenz Kontrast visualisiert (Bild 1 von I – III). Das GFP Signal der Untereinheiten B (I), C (II) und D (III) ist in den anderen Bildern dargestellt. Zuerst nach einer Inkubation mit Glucose (Bild 2), dann nach einer Inkubation von 20 min mit 2 % Galactose (Bild 3) und nach einer erneuten 20-minütigen Inkubation mit 2 % Glucose (Bild 4). Maßstab: 5 μ m

Um die Frage zu klären, ob die PKA einen Einfluss auf die reversible Dissoziation der V-ATPase hat, wurden die Doppel- und Tripelmutante der PKA hinsichtlich der Lokalisation der Untereinheit B bzw. D und C *in vivo* fluoreszenzmikroskopisch beobachtet. Dabei zeigte sich bei einer Deletion von *TPK1* und *TPK3*, dass die V_1 -Untereinheiten B und D wie beim Wildtyp während der reversiblen Dissoziation an der Vakuole lokalisieren (Abb. 4.21). Bei der Untereinheit C kommt es ebenfalls zu keiner Veränderung der Lokalisation während des Mediumwechsel auf Galactose und der damit verbundenen Initiierung der Dissoziation (Abb. 4.21 II). Dieser Phänotyp konnte in der Tripelmutante (Abb. 4.22) bestätigt werden.

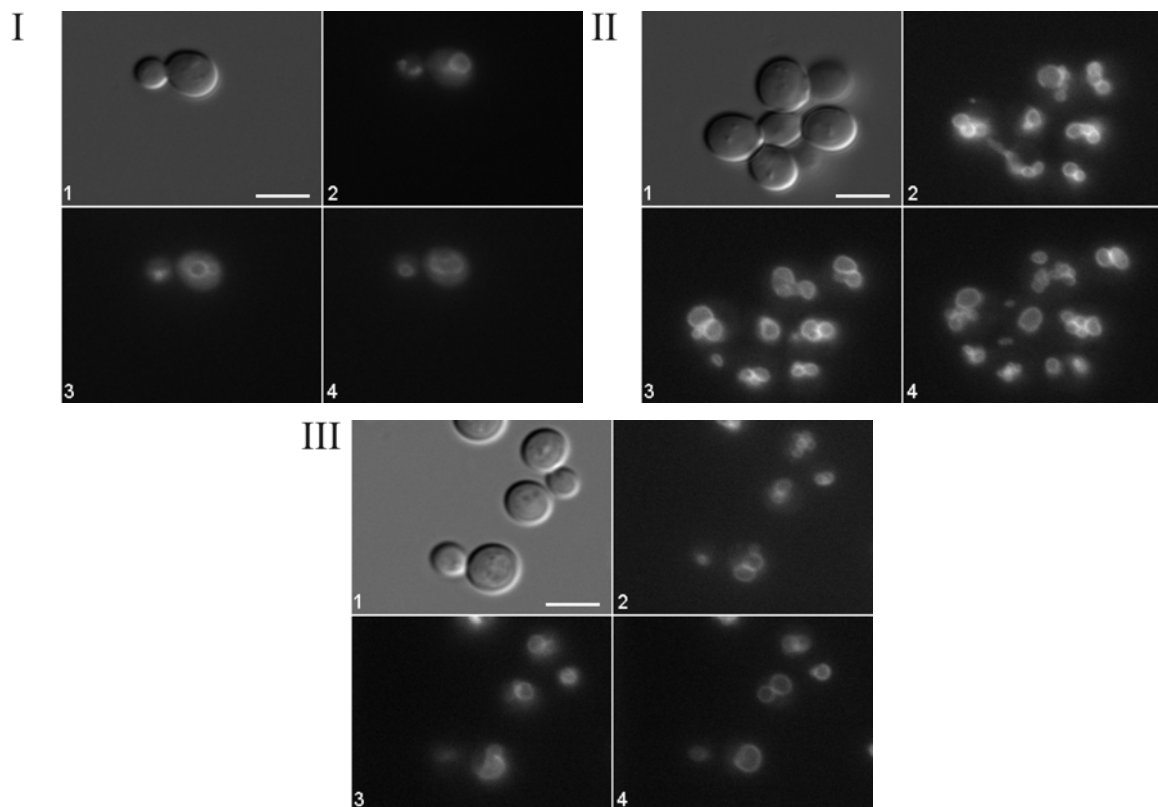


Abb. 4.21: Einfluss einer Doppelmutante der PKA Isoformen auf die reversible Dissoziation der V-ATPase Hefezellen mit einer Deletion von *TPK1* und *TPK3* sowie jeweils einer GFP markierten V-ATPase Untereinheit wurden auf Objektträgern fixiert und mit dem Differential Interferenz Kontrast visualisiert (Bild 1 von I – III). Das GFP Signal der Untereinheiten B (I), C (II) und D (III) ist in den anderen Bildern dargestellt. Zuerst nach einer Inkubation mit Glucose (Bild 2), dann nach einer Inkubation von 20 min mit 2 % Galactose (Bild 3) und nach einer erneuten 20-minütigen Inkubation mit 2 % Glucose (Bild 4). Maßstab: 5 μ m

Die Ergebnisse belegen damit, dass die PKA der Hefe einen Einfluss auf die reversible Dissoziation der Untereinheit C hat. Dieser Phänotyp kann in der Hefe nicht durch die Maus PKA komplementiert werden. Ob der beobachtete Phänotyp durch eine Verhinderung der Dissoziation oder einer sofortigen Reassoziation zustande kommt, kann auf diesem Wege jedoch nicht geklärt werden.

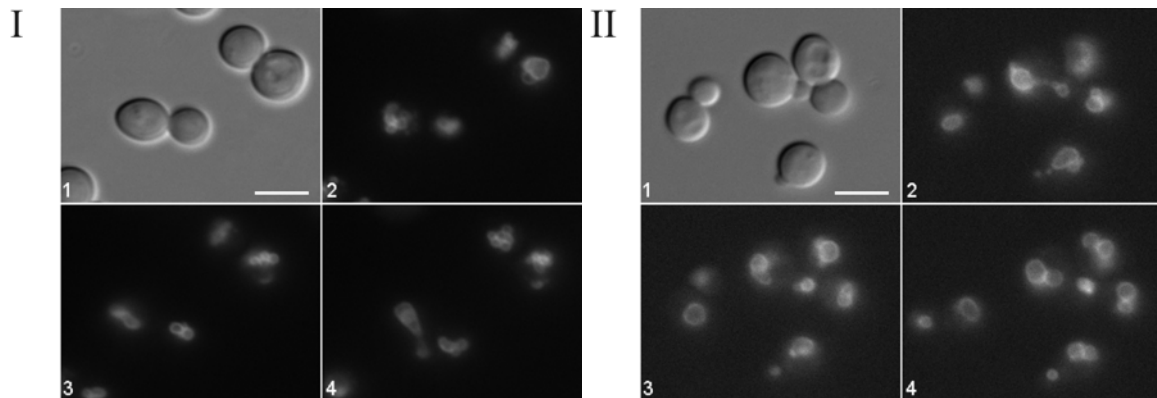


Abb. 4.22: Einfluss der Proteinkinase A auf die reversible Dissoziation der V-ATPase

Hefezellen mit einer Deletion der drei PKA Isoformen sowie jeweils einer GFP markierten V-ATPase Untereinheit wurden auf Objektträgern fixiert und mit dem Differential Interferenz Kontrast visualisiert (Bild 1 von I + II). Das GFP Signal der Untereinheiten B (I) und C (II) ist in den anderen Bildern dargestellt. Zuerst nach einer Inkubation mit Glucose (Bild 2), dann nach einer Inkubation von 20 min mit 2 % Galactose (Bild 3) und nach einer erneuten 20-minütigen Inkubation mit 2 % Glucose (Bild 4). Maßstab: 5 μ m

Tab. 4.9: Einfluss der PKA auf die reversible Dissoziation der V-ATPase

Stamm	n	Zellen mit dissoziierter Untereinheit		
		1) Glucose	2) Galactose	3) Glucose
tpk1 Δ B-GFP	171	4 (2%)	18 (10%)	7 (4%)
tpk1 Δ C-GFP	217	0 (0%)	207 (95%)	0 (0%)
tpk1 Δ D-GFP	140	0 (0%)	0 (0%)	1 (1%)
tpk3 Δ B-GFP	179	0 (0%)	19 (11%)	2 (1%)
tpk3 Δ C-GFP	151	0 (0%)	149 (99%)	0 (0%)
tpk3 Δ D-GFP	90	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
tpk1 Δ tpk3 Δ B-GFP	186	3 (2%)	10 (5%)	9 (5%)
tpk1 Δ tpk3 Δ C-GFP	94	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
tpk1-3 Δ B-GFP	77	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
tpk1-3 Δ C-GFP	148	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Da eine inaktive PKA bzw. eine vollständige Deletion zu einer Inhibierung der Dissoziation der Untereinheit C führt, stellt sich die Frage im Umkehrschluss, welchen Einfluss übt eine ständig aktive PKA auf die V-ATPase und ihre Regulation aus. Hierzu wurde die regulatorische Untereinheit *BCY1* der Hefe PKA durch homologe Rekombination deletiert und anschließend die Untereinheit C mit einem GFP markiert.

Der so konstruierte Hefestamm wurde durch Wachstumstests, Aktivitätstests der Hefevakuolen und anschließender Immunfärbung hinsichtlich der Aktivität der V-ATPase getestet.

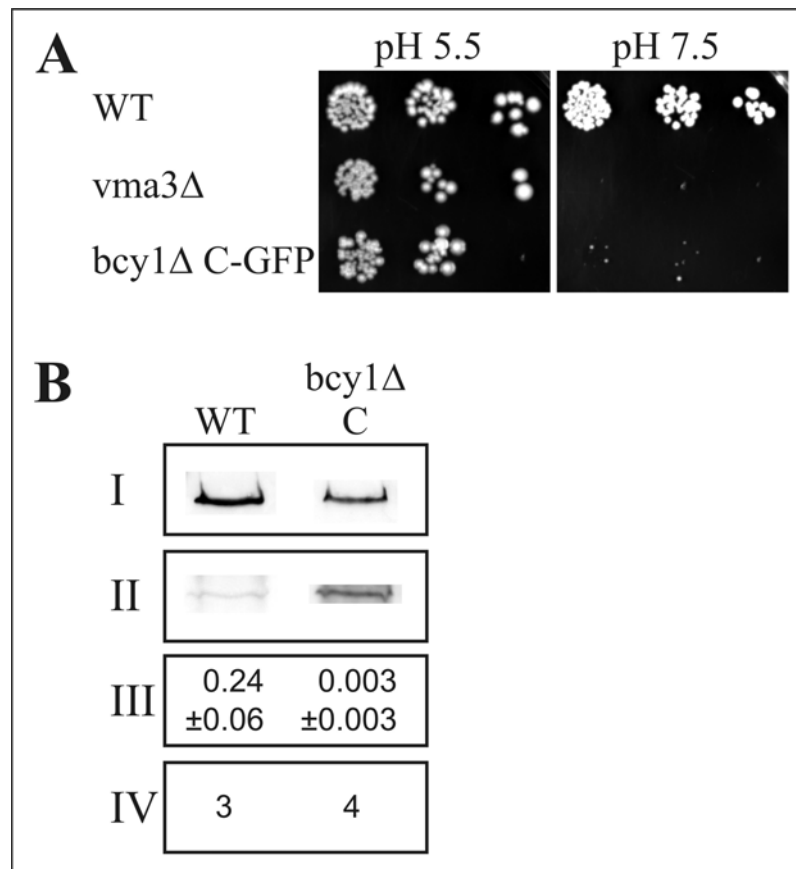


Abb. 4.23: Analyse der Aktivität der V-ATPase bei einer ständig aktiven PKA

A: Die *Saccharomyces cerevisiae* Stämme DHD5 als Wildtyp (WT) und der Stamm mit einer Deletion von *BCY1* sowie einer GFP markierten Untereinheit C wurden wie im Methodenteil beschrieben auf YPD Platten bei einem pH von 5,5 oder 7,5 getropft und für 3-5 Tage bei 30°C inkubiert. Als Negativkontrolle diente der Hefestamm W303 mit einer Deletion der V-ATPase Untereinheit c (*Vma3*).

B: **I + II:** Hefevakuolen des *BCY1* Deletionsstamms mit der GFP markierten Untereinheit C sowie der WT wurden per Western Blot (je 10 µg Protein) auf den Gehalt an V-ATPase durch die Antikörper gegen die V-ATPase Untereinheiten A (I) und d (II) untersucht. **III:** Spezifische V-ATPase Aktivität der Hefevakuolenpräparationen der oben genannten Stämme (U/mg Protein, ± Standardabweichung). **IV:** Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Hefevakuolenpräparationen.

Die Ergebnisse des Wachstumstest (Abb.4.23 A) zeigen, dass eine Deletion von *BCY1* offensichtlich zu einer inaktiven V-ATPase führt, da kein Wachstum bei einem pH von 7,5 beobachtet werden konnte. Die Aktivitätstest der Hefevakuolen belegen die Ergebnisse des Wachstumstest, da trotz einer vollständig assemblierten V-ATPase an der Vakuole (Abb. 4.23 B) keine Aktivität gemessen werden konnte.

Tab. 4.10: Einfluss einer ständig aktiven PKA auf die reversible Dissoziation der V-ATPase

Stamm	n	Zellen mit dissoziierter Untereinheit		
		1) Glucose	2) Galactose	3) Glucose
bcy1 Δ C-GFP	123	0 (0%)	9 (7%)	0 (0%)

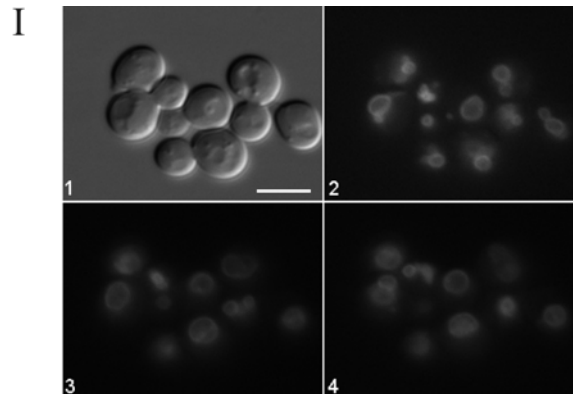


Abb. 4.24: Einfluss der regulatorischen Untereinheit der Proteinkinase A auf die reversible Dissoziation der V-ATPase Hefezellen mit einer Deletion der regulatorischen Untereinheit *BCY1* der PKA sowie einer GFP markierten Untereinheit C wurden auf Objektträgern fixiert und mit dem Differential Interferenz Kontrast visualisiert (Bild 1). Das GFP Signal der Untereinheit C ist in den anderen Bildern dargestellt. Zuerst nach einer Inkubation mit Glucose (Bild 2), dann nach einer Inkubation von 20 min mit 2 % Galactose (Bild 3) und nach einer erneuten 20-minütigen Inkubation mit 2 % Glucose (Bild 4). Maßstab: 5 μ m

Aufgrund der inaktiven V-ATPase unterliegt die Untereinheit C in dem Hefestamm mit der Deletion der regulatorischen Untereinheit der PKA wie erwartet keiner Dissoziation (Abb. 4.24, Tab. 4.10).

4.5. Der RAVE-Komplex und die V-ATPase

Der RAVE-Komplex dient möglicherweise als Chaperon für die Assemblierung oder Reassoziierung der V-ATPase, da es bei einer Deletion von RAVE zu einer deutlichen Reduzierung der Aktivität der V-ATPase kommt (Smardon *et al.* 2002). RAVE bindet den im Zytoplasma frei vorliegenden V_1 -Komplex und hat anscheinend einen speziellen Einfluss auf die V-ATPase Untereinheit C, da diese bei einer Deletion von RAVE nicht stabil mit der V-ATPase an der Vakuole assemblieren kann (Smardon and Kane 2007).

In dieser Arbeit stellte sich heraus, dass nur die Untereinheit C der reversiblen Dissoziation zur Regulation der V-ATPase unterliegt. Da der RAVE-Komplex aber sowohl als Chaperon für die Assemblierung als auch als Partner für die Reassoziierung postuliert

wird, sollte die Rolle des RAVE-Komplexes bei der reversiblen Dissoziation genauer untersucht werden. Hierzu wurden über homologe Rekombination Hefestämme konstruiert, die eine Deletion des *RAV1* Gens aufwiesen und jeweils eine der V-ATPase Untereinheiten B, C, E oder G GFP markiert hatten.

4.5.1. V-ATPase Aktivität der RAVE Deletionsstämme

Bevor die konstruierten Hefedeletionsstämme hinsichtlich der reversiblen Dissoziation der V-ATPase fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden konnten, sollte die Aktivität der V-ATPase in diesen Stämmen ermittelt werden. Wie der Wachstumstest in Abb. 4.25 zeigt, weisen die Deletionsstämme bei einem pH von 7,5 ein reduziertes Wachstum auf, was auf eine verminderte V-ATPase Aktivität im Vergleich zum Wildtyp DHD5 hinweist. Nur der Deletionsstamm mit einer GFP markierten V-ATPase Untereinheit C zeigt ein fast genauso gutes Wachstum wie der Wildtyp.

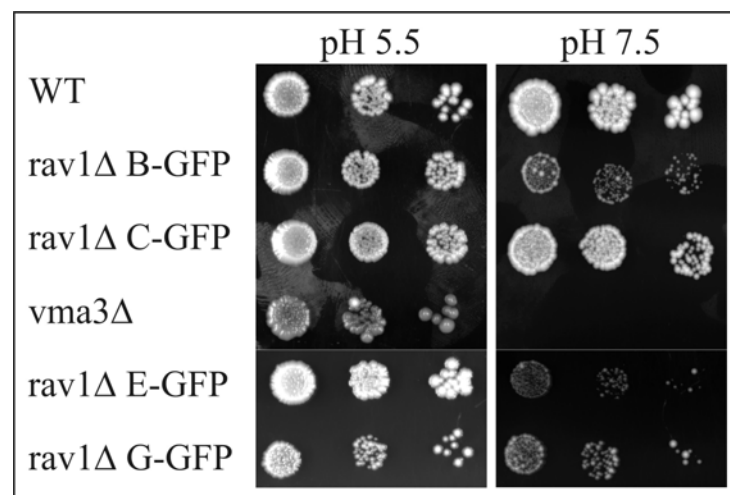


Abb. 4.25: Aktivität der V-ATPase in den *RAV1* Deletionsstämmen

Die *Saccharomyces cerevisiae* Stämme DHD5 als Wildtyp (WT) und die Stämme mit einer Deletion von *RAV1* sowie einer zusätzlich GFP markierten V-ATPase Untereinheit wurden wie im Methodenteil beschrieben auf YPD Platten mit einem pH von 5,5 oder 7,5 getropft und für 3-5 Tage bei 30°C inkubiert. Als Negativkontrolle diente der Hefestamm W303 mit einer Deletion der V-ATPase Untereinheit c (*Vma3*).

Die Aktivitätstests der Hefevakuolenpräparationen (Abb. 4.26 III) der Deletionsstämme mit den GFP Markierungen an den Untereinheiten E und G bestätigen im Vergleich zum Wildtyp die Ergebnisse des Wachstumstests. Der Deletionsstamm mit der GFP markierten Untereinheit B wächst bei einem pH von 7,5 vergleichbar mit den Stämmen mit einer GFP Markierung von E oder G, zeigt aber eine deutlich höhere Aktivität der V-ATPase. Hingegen führt die Deletion von *RAV1* zusammen mit einer GFP Markierung der

Untereinheit C im Gegensatz zu dem Ergebnis des Wachstumstest zu einer reduzierten Aktivität der V-ATPase. Somit hat eine Deletion von *RAV1* wie auch schon bei Smardon *et al.* (2002) eine Reduzierung der V-ATPase Aktivität im Vergleich zum Wildtyp zur Folge, allerdings messen Smardon *et al.* in dem *RAV1* Deletionsstamm ohne GFP Markierung eine Aktivität der V-ATPase von 2 % im Vergleich zum Wildtyp, was hier so nicht bestätigt werden kann, da alle Stämme eine V-ATPase Aktivität im Vergleich zum Wildtyp zwischen 29 % und 67 % haben. Die Immunfärbung (Abb. 4.26 I + II) belegt, dass die geringere Aktivität der V-ATPase in diesen Stämmen einhergeht mit einer reduzierten Menge an vollständig assemblierter V-ATPase an der Vakuole.

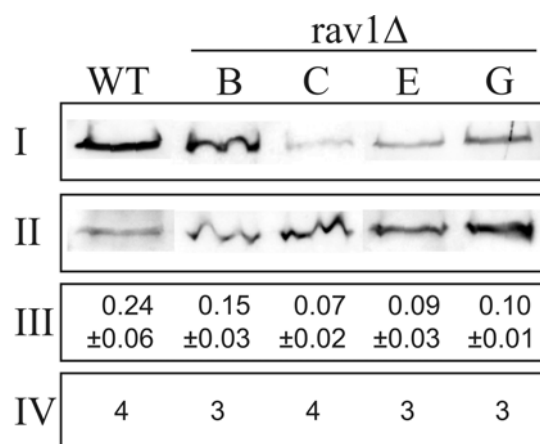


Abb. 4.26: Quantitative Analyse der Hefevakuolen auf Menge und Aktivität der V-ATPase

I + II: Hefevakuolen von *RAV1* Deletionsstämmen mit den GFP markierten Untereinheiten B, C, E oder G sowie der WT wurden per Western Blot (je 10 µg Protein) auf den Gehalt an V-ATPase durch die Antikörper gegen die V-ATPase Untereinheiten A (I) und d (II) untersucht. **III:** Spezifische V-ATPase Aktivität der Hefevakuolenpräparationen der oben genannten Stämme (U/mg Protein, ± Standardabweichung). **IV:** Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Hefevakuolenpräparationen.

4.5.2. Reversible Dissoziation bei den RAVE Deletionsstämmen

Der Einfluss einer Deletion von *RAV1* auf die Aktivität der V-ATPase hat eine Auswirkung auf die Lokalisation der Untereinheiten B (Abb. 4.27 I) und G (Abb. 4.27 IV). Vor allem die Untereinheit B zeigt einen gemischten Phänotyp mit einem klarem Signal an der Vakuole, aber auch einem diffusen Signal im Zytoplasma. Die Untereinheit G lokalisiert zwar auch im Zytoplasma, aber das Signal an der Vakuole ist deutlich stärker. Dahingegen zeigt die Untereinheit C (Abb. 4.27 II) während der gesamten Zeit hauptsächlich eine Lokalisation im Zytoplasma, was jedoch im Gegensatz zur ermittelten Aktivität der V-ATPase steht, da die V-ATPase nur vollständig assembliert aktiv ist. Kaum eine Auswirkung auf die Lokalisation hat die Deletion von *RAV1* bei der Untereinheit E (Abb. 4.27 III). Die

Untereinheit verbleibt auch bei einem Mediumwechsel von Glucose zu Galactose und wieder zurück zu Glucose an der Vakuole. Ein eindeutiger Phänotyp ist für die einzelnen Untereinheiten nicht zu bestimmen, daher wurden hier nur exemplarische Mikroskopbilder ausgewählt, die der Mehrheit der beobachteten Zellen entsprechen.

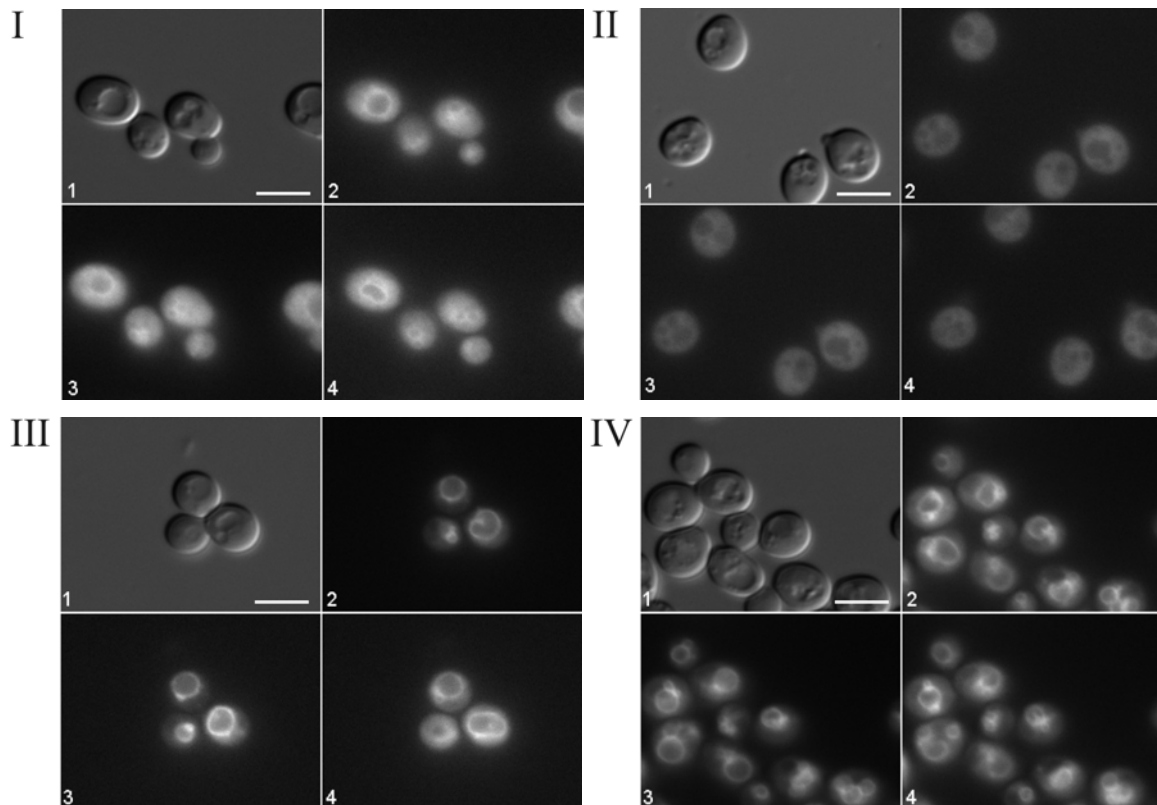


Abb. 4.27: Einfluss des RAVE-Komplexes auf die reversible Dissoziation der V-ATPase
Hefezellen mit einer Deletion von *RAV1* und jeweils einer GFP markierten V-ATPase Untereinheit wurden auf Objektträgern fixiert und mit dem Differential Interferenz Kontrast visualisiert (Bild 1 von I – IV). Das GFP Signal der Untereinheiten B (I), C (II), E (III) und G (IV) ist in den anderen Bildern dargestellt. Zuerst nach einer Inkubation mit Glucose (Bild 2), dann nach einer Inkubation von 20 min mit 2 % Galactose (Bild 3) und nach einer erneuten 20-minütigen Inkubation mit 2 % Glucose (Bild 4). Maßstab: 5 μ m

Tab. 4.11: Anzahl getesteter Zellen hinsichtlich der Lokalisation der V-ATPase Untereinheit bei einer Deletion von *RAV1*

Stamm	n
rav1 Δ B-GFP	177
rav1 Δ C-GFP	145
rav1 Δ E-GFP	69
rav1 Δ G-GFP	109

Die Ergebnisse belegen, dass der RAVE-Komplex generell keinen Einfluss auf die Assemblierung des gesamten V_1 -Komplexes hat, da die Untereinheit E und zum Teil auch B und G stabil an der Vakuole vorliegen. Dennoch scheint der RAVE-Komplex eine spezielle Funktion hinsichtlich der Untereinheit C einzunehmen, da diese auch nach 20 min Inkubation mit Glucose nicht an der Vakuole lokalisiert, die Deletionsstämme aber dennoch eine Aktivität der V-ATPase aufweisen. Somit scheint eine Chaperonfunktion des RAVE-Komplexes für die Untereinheit C bei der Reassoziaton sehr wahrscheinlich.

4.6. Interaktionspartner der V-ATPase Untereinheit C

Die vorangegangenen Experimente haben eine Vielzahl von Faktoren aufgedeckt, die bei der Regulation der Dissoziation der V-ATPase Untereinheit C einen Einfluss haben. Sie ist unter anderem abhängig von den Mikrotubuli, einer aktiven V-ATPase, einer aktiven PKA und noch ein paar anderen Faktoren. Diese Ergebnisse sind Hinweise auf die Regulation der Dissoziation der Untereinheit C, wohingegen es mit dem RAVE-Komplex nur einen einzigen Hinweis auf die Regulation der Reassoziaton gibt. Da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen kleinen Blick auf den Mechanismus der reversiblen Dissoziation geben, stellt sich die Frage, ob außer den gefunden Proteinen noch andere Interaktionspartner für die Untereinheit C in der Hefe unter verschiedenen Bedingungen gefunden werden können. Durch das Bestimmen neuer Interaktionspartner kommen wir hoffentlich einen Schritt näher, den Mechanismus der reversiblen Dissoziation besser zu verstehen.

Da die meisten Methoden zur Identifizierung von Interaktionen zwischen Proteinen nicht den *in vivo* Zustand darstellen, sollte eine geeignete Methode zur Identifizierung neuer Interaktionspartner unter wechselnden nativen Bedingungen verwendet werden. Solch eine Methode stellt die „Tandem Affinity Purification“ dar, wobei das zu untersuchende Protein mit einem TAP-tag fusioniert wird und in den Hefezellen durch den nativen Promoter des Gens exprimiert wird. Der TAP-tag besteht aus zwei Bindedomänen getrennt durch eine Erkennungssequenz für die TEV-Protease. Dadurch ist es möglich, dass Fusionsprotein und mögliche Interaktionspartner schonend über zwei Affinitätschromatographien zu reinigen (Puig *et al.* 2001).

Der Hefestamm mit dem C-TAP Fusionsprotein sollte einmal unter Glucosebedingungen und einmal unter Galactosebedingungen präpariert werden, um so neue Interaktionspartner der Untereinheit C zu finden, wenn C entweder im Holoenzym an der Vakuole lokalisiert ist oder frei im Zytoplasma vorliegt.

Das C-TAP Fusionsprotein konnte mittels der TAP Methode erfolgreich gereinigt werden. Jedoch konnte ein geringer Verlust des Fusionsproteins in den Durchflüssen der beiden Affinitätschromatographien beobachtet werden, wie die Immunfärbung mit dem Antikörper gegen die Untereinheit C der einzelnen Schritte der Reinigung zeigt (Abb. 4.28 A). Mittels Coomassiefärbung wurde das Fusionsprotein und seine möglichen Interaktionspartner im SDS-Gel sichtbar gemacht (Abb. 4.28 B). Die Banden wurden ausgeschnitten und zur Analyse zur ESI-MS gegeben. Dabei konnten die V-ATPase Untereinheiten A, B, E und G als Interaktionspartner von C eindeutig in allen drei durchgeführten TAP-Reinigungen identifiziert werden, wobei es keinen Unterschied ausmachte, ob die Zellen mit Glucose oder Galactose behandelt wurden. Interessanterweise wurden im ersten Screen 3 Enzyme der Glykolyse als Interaktionspartner von C mitgereinigt. Dabei handelt es sich um die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, die Enolase II und die Pyruvat Kinase, welche jeweils mit einem Score von über 30 eindeutig identifiziert werden konnten. In den folgenden beiden TAP-Reinigungen konnten diese Interaktionen jedoch nicht erneut gefunden werden. Als Kontrolle der erfolgreichen spezifischen Reinigung des Fusionsprotein wurde auch der WT SC0000 durch die TAP Methode gereinigt und wie sich in Abb. 4.28 B zeigt, kommt es nicht zu unspezifischen Bindungen von Proteinen. Die Ergebnisse der ersten TAP-Reinigung lassen den Gedanken einer Kopplung von V-ATPase und Glykolyse an der Vakuole aufkommen.

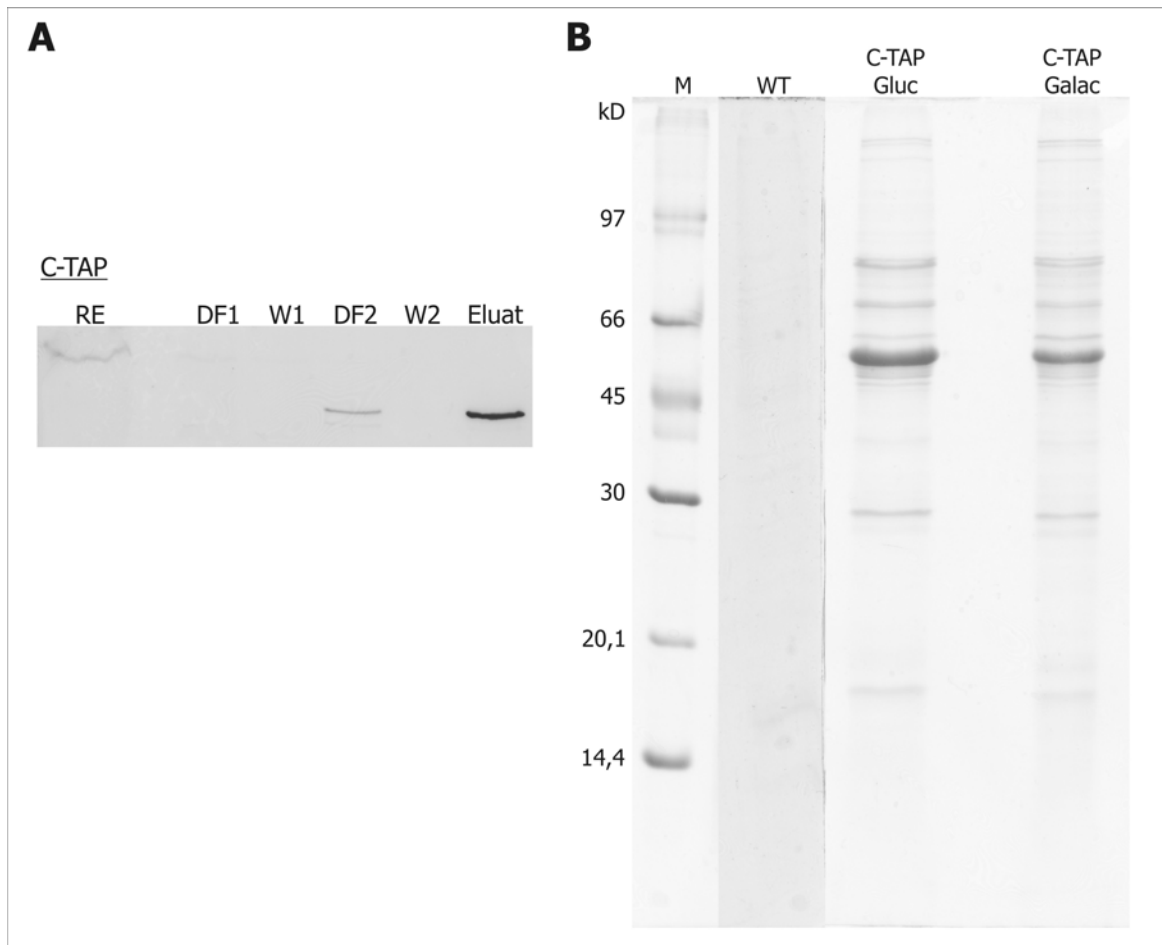


Abb. 4.28: Reinigung von Untereinheit C zur Identifizierung neuer Interaktionspartner

A: Zur Kontrolle der Reinigung wurden von jedem Schritt der Reinigung Aliquots genommen und per Immunfärbung mit dem CS-7 Antikörper gegen die Untereinheit C analysiert. Das erwartete Molekulargewicht von C-TAP entspricht 66 kDa und nach der TEV von 48 kDa. Marker. **B:** Die *Saccharomyces cerevisiae* Stämme WT (SC0000) und C-TAP (SC0317) wurden wie im Methodenteil beschrieben der TAP Methode unterzogen. Die Eluate wurden durch eine TCA-Fällung ankonzentriert und über ein 17 % SDS-Gel aufgetrennt, sowie mittels Coomassie angefärbt. M = Low Molecular Weight

5. Diskussion

Die reversible Dissoziation ist ein Hauptregulationsmechanismus für die Aktivität von V-ATPasen. Durch die *in vivo* Studien an der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte in der vorliegenden Arbeit mit GFP markierten V-ATPase Untereinheiten nachgewiesen werden, dass nicht wie bisher gezeigt der komplette V_1 -Komplex dissoziiert, sondern allein die Untereinheit C der Dissoziation unterliegt. Wenn im Folgenden von der reversiblen Dissoziation die Rede ist, gilt bei der alten Literatur dies für die Dissoziation des V_1 -Komplexes und bei der vorliegenden Arbeit nur für die Untereinheit C.

Für die *in vivo* Studien wurden die Zellen mit Aluminiumnitrat behandelt und konnten danach so auf einen Objektträger fixiert werden (Van Haecht *et al.* 1985), dass sie auch nach einem Mediumwechsel unter dem Fluoreszenzmikroskop noch an der gleichen Stelle lagen. Dadurch war es möglich, die selben Zellen über einen längeren Zeitraum unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen zu beobachten. Beobachtungsartefakte aufgrund der Behandlung der Hefezellen mit Aluminiumnitrat können ausgeschlossen werden, da ein Wachstumstest nach Behandlung mit Aluminiumnitrat keinen Unterschied im Vergleich zu Zellen ohne Behandlung zeigte (Abb. 4.3). Ferner bestätigen die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen *in vivo* Ergebnisse viele *in vitro* Ergebnisse vorheriger Studien. So zeigt sich, dass das Aktin-Zytoskelett keine Rolle bei der reversiblen Dissoziation spielt (Abb. 4.5) (Bond and Forgac 2008), wohingegen Mikrotubuli eine Beteiligung an der Dissoziation der V-ATPase, aber nicht an deren Reassoziierung zeigen (Abb. 4.6) (Bond and Forgac 2008).

5.1. Reversible Dissoziation der V-ATPase

Die reversible Dissoziation der V-ATPase wurde bis jetzt durch *in vitro* Studien erforscht (Kane 1995; Sumner *et al.* 1995). Dieser einzigartige Mechanismus konnte im Mitteldarm der Raupen des Tabakswärmers *Manduca sexta* durch Immunocytochemie mit monoklonalen Antikörpern unter verschiedenen physiologischen Bedingungen wie auch an Hand von SDS-Gelen gereinigter Gobletzellapikalmembranen nachgewiesen werden (Sumner *et al.* 1995). Bei der Hefe war durch Immunfluoreszenz schon 5 min nach Glucoseentzug eine Dissoziation des V_1 -Komplexes vom V_0 -Komplex beobachtet worden, wobei nach Zugabe von Glucose eine schnelle vollständige Reassemblierung gezeigt werden konnte (Kane 1995). Bestätigt wurden die Ergebnisse in der Hefe durch Immunpräzipitationen (Kane 1995). Nachdem durch Immunocytochemie mit monoklonalen

Antikörpern und Immunpräzipitation bei menschlichen und schweinishen Zellkulturen die gleichen Ergebnisse gezeigt wurden, konnte die reversible Dissoziation als ein universeller Regulationsmechanismus der V-ATPase bestätigt werden (Sautin *et al.* 2005).

In der vorliegenden Arbeit erbrachten die *in vivo* Untersuchungen der einzelnen GFP markierten V-ATPase Untereinheiten den Befund, dass nur die Untereinheit C, die bei der Dissoziation unabhängig vom V_1 -Komplex im Zytoplasma vorliegt (Merzendorfer *et al.* 2000), bei Glucosemangel eine Lokalisation im Zytoplasma zeigt (Abb. 4.4 II). Der V_1 -Komplex verbleibt im Gegensatz zu bisher *in vitro* gewonnenen Ergebnissen an oder in der Nähe der Vakuolenmembran, da sich die Lokalisation der Untereinheiten während der Initiierung der reversiblen Dissoziation nicht verändert (Abb. 4.4 III + IV). In Clathrinesikeln aus Rindern konnte beobachtet werden, dass ein stabiler V_1V_0 -Komplex nur in Anwesenheit von Untereinheit C gebildet wird (Puopolo *et al.* 1992). Eine Deletion der Untereinheit C aus der Hefe führte in Immunpräzipitationsstudien zu einem Verlust der Stabilität des Holoenzym (Doherty and Kane 1993), sowie zu einem typischen Vma^- -Phänotyp, der mit einem Verlust der V-ATPase Aktivität einhergeht (Ho *et al.* 1993). Somit gab es schon früh erste Hinweise auf eine besondere Rolle der Untereinheit C. Da die Bindung des V_1 -Komplexes an den V_0 -Komplex durch das Fehlen der Untereinheit C an Stabilität verliert, ist es nicht auszuschließen, dass dieser Umstand zu den Ergebnissen der *in vitro* Untersuchungen führte. Mutagenesestudien von Untereinheit C in der Hefe bewiesen ebenfalls die Instabilität des Holoenzym bei Verlust der Funktion von Untereinheit C (Curtis *et al.* 2002). Demnach führten einige Mutationen dazu, dass das Holoenzym zwar in Anwesenheit des Crosslinkers Dithio-bis-(succinimidyl-propionat) durch Immunpräzipitation gereinigt werden konnte, es aber bei der Reinigung der Vakuolen ohne den Einsatz des Crosslinkers zu einer Trennung von V_1 - und V_0 -Komplex kam. Desweiteren deutet die Geschwindigkeit der Reassoziaton eher darauf hin, dass nur die Untereinheit C der reversiblen Dissoziation unterliegt, da diese innerhalb von 5 min fast vollständig abgeschlossen ist (Kane 1995); dies legt den Schluss nahe, dass möglichst wenige Komponenten beteiligt sind, da eine gleichzeitige Koordination von drei Komponenten (V_1 , V_0 und C) die Kinetik der Reassoziaton herab setzen würde. Ob dies tatsächlich so ist, muss allerdings erst molekulardynamisch analysiert werden. Die Schnelligkeit der Assemblierung erscheint umso wahrscheinlicher vor dem Hintergrund, dass die Regulation der V-ATPase durch reversible Dissoziation höchstwahrscheinlich der Energieeinsparung dient. Sowohl bei der Hefe wie auch bei *Manduca* unterliegt die V-ATPase der reversiblen Dissoziation bei Nährstoffmangel (Kane 1995; Sumner *et al.*

1995). Wichtig hierfür ist, dass die Hydrolyse von ATP gestoppt wird, da ansonsten die V-ATPase sehr viel ATP in der Zelle verbrauchen würde. Die Untereinheit H spielt dabei eine entscheidende Rolle bei der Inhibierung der ATP Hydrolyse im zytoplasmatischen V_1 -Komplex (Parra *et al.* 2000). Durch Crosslinking Studien konnte gezeigt werden, dass ihr C-terminaler Bereich unter 10 Å an die Untereinheit F im freien V_1 -Komplex, aber nicht im Holoenzym heran reicht (Jefferies and Forgac 2008). Diese Ergebnisse erwecken die Vorstellung, dass die Untereinheit H die Aktivität des V_1 -Komplexes durch Überbrücken des Rotors mit den Stielen inhibiert und so physikalisch die durch Hydrolyse von ATP erzeugte Rotation verhindert. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass nur die Untereinheit C dem Mechanismus der reversiblen Dissoziation unterliegt und der V_1 -Komplex an der Vakuole verbleibt. Somit ist eine Inaktivierung des verbleibenden V_1V_0 -Komplexes ein hohes Anliegen. Eine Inhibierung der Aktivität durch Konformationsänderung der Untereinheit H ist sehr wahrscheinlich, da diese im freien V_1 -Komplex eine Interaktion mit der Untereinheit F des zentralen Stiels eingeht und so dessen Rotation verhindert. Eindeutig kann dies jedoch nicht belegt werden, da keinerlei Crosslinking Studien der Untereinheit H mit einem V_1V_0 -Komplex ohne Untereinheit C durchgeführt wurden.

5.2. Das Zytoskelett und die reversible Dissoziation der V-ATPase

Im Mitteldarm der Raupen von *Manduca sexta* co-lokalisiert die V-ATPase mit Aktinfilamenten in den apikalen Membranen der Gobletzellen (Vitavska *et al.* 2003). Während der Aktivierung von Mäuse-Osteoklasten konnte ebenfalls ein Co-Lokalisation von V-ATPase und F-Aktin beobachtet werden (Lee *et al.* 1999). Da die V-ATPase aus beiden Organismen mit Aktinfilamenten interagiert, könnte dies eine generelle Eigenschaft von V-ATPasen darstellen. Ungewöhnlich dabei ist jedoch die direkte Bindung der V-ATPase an Aktinfilamente. Untersuchungen mit der V-ATPase aus Osteoklasten und der Rinderniere detektierten die Untereinheit B als Bindungspartner für F-Aktin (Holliday *et al.* 2000; Chen *et al.* 2004). Sequenzvergleiche der Aktinbindungsdomäne in der Untereinheit B der V-ATPase von den *Archaea* bis zum Menschen zeigten, dass von der Hefe aufwärts diese Domäne überall vorhanden ist und recht konserviert vorliegt (Holliday *et al.* 2005). Bei *Manduca* konnte zusätzlich durch Overlayblots und Co-Präzipitation die Untereinheit C mit zwei Bindungsdomänen als Interaktionspartner ermittelt werden (Vitavska *et al.* 2003; Vitavska *et al.* 2005). Dabei besitzt die Untereinheit C nur eine relativ niedrige Affinität zu Aktinfilamenten, erhöht aber, im V_1 -Komplex lokalisiert, deutlich die Affinität des

Holoenzym zu Aktin (Vitavska *et al.* 2003). Sowohl für die Untereinheit C aus Hefe als auch die aus *Arabidopsis thaliana* konnte eine Interaktion mit Aktin anhand von Overlayblots nachgewiesen werden (Abb. 4.7).

Die Depolymerisierung des Aktin-Zytoskeletts zeigte bei der Hefe allerdings *in vivo* keinerlei Auswirkungen auf das Dissoziations- oder Reassoziationsverhalten der Untereinheit C (Abb. 4.5 II). Auch der Verlust der möglichen Interaktion zwischen V_1 -Komplex und Aktin bewirkte keine Veränderung der Lokalisation der V_1 -Untereinheiten (Abb. 4.5. III + IV). Diese Ergebnisse sind konform mit den *in vitro* durch Immunpräzipitationsstudien gewonnenen Erkenntnissen von Xu und Forgac (2001), nach denen eine Depolymerisierung des Aktin-Zytoskeletts keinerlei Auswirkungen auf die reversible Dissoziation hat. Letzterer Befund zeigt allerdings nur den V_1 -Komplex und zeigt nicht, was mit Untereinheit C geschieht. Beide sich ergänzenden Resultate lassen den Schluss zu, dass das Aktin-Zytoskelett keinerlei Einfluss auf die reversible Dissoziation hat. Dennoch müssen die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse unter dem Gesichtspunkt gesehen werden, dass es aufgrund der Methodenwahl zu Reinigungsartefakten gekommen ist, da der V_1 -Komplex aufgrund seiner Instabilität bei Verlust der Untereinheit C offensichtlich leicht vom V_0 -Komplex getrennt werden kann.

Versuche mit Osteoklasten gaben Aufschluss darüber, welche Funktion die Interaktion zwischen der V-ATPase und dem Aktin-Zytoskelett haben könnte, da ein Einfluss bei der Regulation der reversiblen Dissoziation zumindest bei der Hefe ausgeschlossen werden kann. Mutationen in der Aktinbindungsdomäne der Osteoklasten V-ATPase Untereinheit B führten dazu, dass die Untereinheit B nicht korrekt zur Membran transportiert wurde (Zuo *et al.* 2006). Dies führte zu der Spekulation, dass die Aktinbindung an der vesikulären Sortierung von V-ATPasen beteiligt sein könnte. Als generelles Phänomen ist die Beteiligung des Aktin-Zytoskeletts an vesikulären Sortierungen gut dokumentiert (Lanzetti 2007). Die Hefe V-ATPase Untereinheit B bindet Aktinfilamente mit einer ähnlichen Affinität wie bei der Säugetier-Untereinheit B (Zuo *et al.* 2008). Des weiteren zeigt sich bei einem Verlust der funktionellen Aktinbindungsdomäne ein reduziertes Wachstum der Hefezellen in Anwesenheit von sublethalen Mengen von Cycloheximid und Wortmannin im Vergleich zum Wildtyp (Zuo *et al.* 2008). Die Aktinbindung spielt also eine wichtige Rolle beim Wachstum und Überleben unter spezifischen Stress-Konditionen.

Da Aktin als Partner für die reversible Dissoziation durch die *in vivo* Experimente ausgeschlossen werden konnte, sollte *in vivo* auch die Aussage von Xu und Forgac (2001) über die Beteiligung der Mikrotubuli an der Dissoziation der V-ATPase überprüft werden.

Hierbei zeigte sich für den V₁-Komplex keinerlei Veränderung in der Lokalisation während des Prozesses der reversiblen Dissoziation, er verblieb unabhängig von den Mikrotubuli an der Vakuole lokalisiert und dissoziierte nicht ins Zytoplasma (Abb. 4.6 IV). Die Untereinheit C zeigte, wie auch Xu und Forgac (2001) für den gesamten V₁-Komplex veröffentlicht haben, keinerlei Dissoziation mehr nach Depolymerisierung der Mikrotubuli (Abb. 4.6 II), die Reassoziations ist davon jedoch nicht beeinflusst (Abb. 4.6 III). Xu und Forgac (2001) erhielten ihre Ergebnisse durch Immunpräzipitationsstudien gegen die V-ATPase Untereinheit A und anschließender Immunfärbung gegen die Untereinheit A zur Lokalisierung des V₁-Komplexes und gegen die Untereinheit a für den V₀-Komplex. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, unterliegt *in vivo* nur die Untereinheit C der reversiblen Dissoziation. Jedoch wird der V₁-Komplex anscheinend ohne C instabil, was eine Erklärung für die Ergebnisse der *in vitro* Studien ist. Die Beteiligung der Mikrotubuli an der reversiblen Dissoziation der Untereinheit C scheint ein Hefespezifischer Mechanismus zu sein, wobei generell viele Signalprozesse von intakten Mikrotubuli abhängig sind (Gundersen and Cook 1999). In der Niere lokalisieren bei einer Depolymerisierung der Mikrotubuli die V-ATPasen in Vesikeln im Zytoplasma und werden nicht zur Membran transportiert (Brown *et al.* 1991; Brown *et al.* 1992). Motorproteine der Mikrotubuli sind in der Niere somit wahrscheinlich am Vesikeltransport beteiligt und regulieren darüber die V-ATPase. In der Hefe sind die Mikrotubuli hingegen an der direkten Regulation der V-ATPase durch die reversible Dissoziation beteiligt.

In Overlayblots konnte eine direkte Interaktion der Untereinheit C aus *Arabidopsis*, *Manduca* und *Saccharomyces* mit Tubulin gezeigt werden (Abb. 4.7). Bestätigt wurden diese Ergebnisse für die Untereinheit C aus Hefe mittels eines Co-Pelletierungsversuchs (Abb. 4.8). Xu und Forgac (2001) konnten durch Immunpräzipitationsstudien gegen die Untereinheit A keine Interaktion zwischen V-ATPase und Mikrotubuli nachweisen. Die zu den in der vorliegenden Arbeit erzielten Erkenntnissen scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse sind offensichtlich durch die unterschiedlichen methodischen Vorgehensweisen bedingt. Es wurde bei Xu und Forgac nur die Untereinheit A nachgewiesen und nicht, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, der Interaktionspartner für Tubulin, die Untereinheit C. Wenn Untereinheit C während der Reinigung fehlt, kann auch Tubulin nicht mit gereinigt werden.

5.3. Einfluss von Agenzien auf die reversible Dissoziation der V-ATPase

Die reversible Dissoziation der Untereinheit C ist abhängig von der Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Glucose im Medium, erfordert jedoch keine direkte Interaktion mit Glucose sowie keine Neusynthese von Proteinen (Kane 1995). Daher ist es wahrscheinlich, dass Signalkaskaden die Dissoziation und Reassoziation vermitteln und steuern. Für eine Reihe Glucose-abhängiger Prozesse bei der Hefe konnte keine Involvierung bei der reversiblen Dissoziation der V-ATPase festgestellt werden. So wurden unter anderem der Ras-cAMP Weg, der Snf1 Kinase-vermittelte Weg und der Proteinkinase C-abhängige Weg getestet (Parra and Kane 1998). Dennoch zeigen neuere Studien eine Beteiligung des Phosphoinositid-3-Kinasewegs (PI-3) in der Niere (Sautin *et al.* 2005) und des Proteinkinase A Signalwegs in Insekten (Voss *et al.* 2007).

In vivo Studien der Untereinheit C unter Einfluss verschiedener Agenzien erbrachten in der vorliegenden Arbeit zum Teil bestätigende Hinweise auf weitere Faktoren, die an der Regulation der reversiblen Dissoziation beteiligt sein könnten. So konnten mit Hilfe von Bafilomycin die *in vitro* Studien bekräftigt werden (Parra and Kane 1998), nach denen die V-ATPase zur Dissoziation der Untereinheit C aktiv sein muss (Abb. 4.9 I). Hingegen hat Bafilomycin jedoch keine Auswirkung auf die Reassoziation (Abb. 4.9 II). Die Bindung des Inhibitors am Proteolipidring verhindert offensichtlich die Rotation und dadurch die Hydrolyse von ATP im V_1 -Komplex (Crider *et al.* 1994; Zhang *et al.* 1994). Bei der Hefe zeigte sich bei Mutanten, deren V-ATPasen ihre Fähigkeit zur ATP Hydrolyse verloren hatten, dass diese auch ihre Möglichkeit zur Dissoziation bei Glucoseentzug nicht mehr besaßen (MacLeod *et al.* 1998; Parra and Kane 1998). Auf der anderen Seite zeigte sich in einem Hefestamm mit einer Mutation in der Untereinheit D, welche mit einer Reduzierung der Aktivität der V-ATPase um 90 % einhergeht, ein Dissoziationsverhalten wie im Wildtyp (Xu and Forgac 2000). Bei *Manduca* konnten *in vitro* 1,7 Moleküle ADP pro V_1 -Komplex und nur 0,3 Moleküle ADP pro Holoenzym detektiert werden (Huss and Wiczorek 2007). Ferner zeigte sich, dass ein Molekül ATP pro V-ATPase für die Dissoziation in V_1 - und V_0 -Komplex ausreicht (Huss and Wiczorek 2007). Dies führte zu der Idee, dass unter normalen Umständen direkt nach der Hydrolyse von ATP das ADP im Holoenzym durch ein neues ATP ersetzt wird. Durch ein ungünstiges ATP/ADP Verhältnis in der Zelle verbleibt ADP in der Bindetasche, wobei diese Konformation anscheinend relativ instabil ist und somit die Dissoziation der V-ATPase begünstigt. Wenn jedoch keine Hydrolyse von

ATP stattfindet, verbleibt das ATP in der Tasche und der Komplex bleibt stabil, was die Dissoziation verhindert.

Das mit Ammoniumionen im Gleichgewicht stehende NH_3 gelangt schnell über Diffusion in die Lysosomen der Zelle, was intralysosomal durch Binden von H^+ zu einer Erhöhung des pH-Werts führt (Ohkuma and Poole 1978; Poole and Ohkuma 1981; Maxfield 1982). Die Erhöhung des pH-Werts in der Vakuole führte in der vorliegenden Arbeit zu einer Reduktion der Dissoziation der Untereinheit C um 72 % (Abb. 4.10 I, Tab. 4.5). Die Reassoziation wiederum wurde davon nicht beeinflusst (Abb. 4.10 II). Immunpräzipitationsstudien von Hefezellen, die mit der schwachen Base Chloroquin behandelt wurden, hatten ebenfalls eine Reduzierung der Dissoziation des V_1 -Komplexes gezeigt, aber keinen Verlust der V-ATPase Aktivität an isolierten Vakuolen (Shao and Forgac 2004). Die Resultate dieser *in vitro* Experimente und der *in vivo* Experimente in der vorliegenden Arbeit legen den Gedanken nahe, dass die Dissoziation abhängig vom luminalen pH-Wert ist. Auch wenn der Mechanismus unklar ist, würde die Blockierung der Dissoziation bei einem zu alkalischen Kompartiment eine weitere Erhöhung des pH-Werts verhindern. Der pH-Wert des Golgiapparates ist alkalischer als der von Vakuolen (Schapiro and Grinstein 2000). Damit scheint die Stv1-haltige V-ATPase im Golgiapparat ständig einer pH-abhängigen Verhinderung der Dissoziation zu unterliegen. Dies steht im Einklang mit dem Befund, dass Stv1-haltige V-ATPasen bei einer normalen Lokalisation im Golgiapparat keine Dissoziation zeigen, bei ihrer Lokalisation in der Vakuole kommt es hingegen zur Dissoziation (Kawasaki-Nishi *et al.* 2001).

In den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* konnte nach einer Stimulierung durch Serotonin eine Erhöhung der V-ATPase Aktivität gemessen werden, die zusammen mit der Reassoziation der zytosolischen V_1 -Komplexe an die Plasmamembran auftritt (Zimmermann *et al.* 2003; Rein *et al.* 2006). Serotonin aktiviert in der Speicheldrüse den cAMP-Weg, was zu einer Beteiligung der Proteinkinase A (PKA) an der Regulation der reversiblen Dissoziation führt (Rein *et al.* 2008). Die V-ATPase Untereinheit C aus *Manduca sexta* interagiert mit der PKA und kann durch diese phosphoryliert werden (Voss *et al.* 2007). Auch in den Speicheldrüsen zeigte sich bei Inkubation mit Serotonin eine Phosphorylierung der Untereinheit C, welche durch Inhibierung der PKA mit H89 aufgehoben wurde (Voss *et al.* 2007). Eine Inhibierung der PKA bei der Hefe führte hingegen zu einer Inhibierung der Dissoziation der Untereinheit C (Abb. 4.11 I), die Reassoziation war im Gegensatz zu den Befunden bei Insekten nicht von der Inhibierung der PKA betroffen (Abb. 4.11 II). Die gegensätzlichen Ergebnisse bei der Hefe und

Insekten bedeuten, dass es möglicherweise Unterschiede in der Regulation der V-ATPase auf Grund der unterschiedlichen Grundzustände gibt. In den Speicheldrüsen von *Calliphora* wird die V-ATPase nach einer Stimulierung durch Serotonin aktiviert (Zimmermann *et al.* 2003), wohingegen die V-ATPase in der Hefe hauptsächlich aktiv vorliegt und bei Glucoseentzug der reversiblen Dissoziation unterliegt (Kane 1995). Daher wäre es nicht verwunderlich, wenn die V-ATPase in den verschiedenen Organismen unterschiedlich reguliert wird. Beiden gemeinsam ist jedoch eine Beteiligung der PKA an der reversiblen Dissoziation. In welcher Form dies geschieht, bedarf dabei noch genauerer Klärung.

Nach der Phosphorylierung der Untereinheit C sollte diese auch wieder dephosphoryliert werden. Um mögliche Phosphatasen auf ihre Beteiligung zu untersuchen, wurden bei der Hefe *in vivo* die Serin-/Threonin-Phosphatasen des Typ 1 und 2A durch den spezifischen Inhibitor Okadainsäure (Bialojan and Takai 1988; Dawson and Holmes 1999) inhibiert. Eine Inhibierung dieser Proteinphosphatasen führte in der vorliegenden Arbeit zu einer Reduzierung der Dissoziation der V-ATPase Untereinheit C um 78 % (Abb. 4.12 I), hatte aber keinen Effekt auf die Reassoziierung der V-ATPase (Abb. 4.12 II). Bei der Hefe kodiert *GLC7* für die Proteinphosphatase des Typs 1. In einem „synthetic genetic array“ wurden die V-ATPase Untereinheiten B und E als Interaktionspartner von Glc7 identifiziert (Logan *et al.* 2008). Glc7 reguliert viele physiologische Prozesse in der Zelle, unter anderem den Glycogenmetabolismus, die Glucose-Repression, die Transkription, die Membranfusion, die Sporulation, die Mitose und die Zellwandorganisation (Wek *et al.* 1992; Cannon *et al.* 1994; Hisamoto *et al.* 1994; Tu and Carlson 1994; Andrews and Stark 2000). Glc7 selber hat eine geringe Substratspezifität (Stark 1996), stattdessen wird die Spezifität durch ihre regulatorischen Untereinheiten gewährleistet. *PPH21* und *PPH22* kodieren in der Hefe für Protein Phosphatasen des Typ 2A und spielen eine Rolle bei der Morphologie, dem Zellzyklus und der Signaltransduktion (Ronne *et al.* 1991; Lin and Arndt 1995; Sugajska *et al.* 2001; Zabrocki *et al.* 2002). Interessant sei noch zu erwähnen, dass eine Überexpression von *PPH22* den Phänotyp einer überaktiven Proteinkinase A imitiert (Sugajska *et al.* 2001). Da eine globale Hemmung der Aktivität dieser Phosphatasen somit viele zelluläre Prozesse beeinflusst, können die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit sowohl direkte Effekte als auch Nebeneffekte sein. Es lassen sich somit nur Mutmaßungen anstellen, welche betroffenen Signalkaskaden eine Rolle bei der Regulierung der reversiblen Dissoziation spielen, und weitere Untersuchungen sollten folgen, um eine genauere Eingrenzung zu erreichen.

5.4. Der PKA-Signaltransduktionsweg und die V-ATPase

Bei *Saccharomyces cerevisiae* erfolgt, wie auch bei anderen Organismen, die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) durch eine Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration (Krebs and Beavo 1979). Die Funktion der PKA bei der Hefe ist dabei nicht auf Glucose gesteuerte Signale limitiert, vielmehr wird eine grundlegende PKA Aktivität zum Überleben der Zelle benötigt (Toda *et al.* 1987; Mbonyi *et al.* 1988). Für eine Basisaktivität der Adenylatzyklase Cyr1 und damit der PKA sind das kleine G-Protein Ras und Cdc25 essentiell. Die Zugabe von Glucose ins Inkubationsmedium aktiviert in Glucose-defizienten Zellen die Adenylatzyklase und führt zu einer 4-fachen Erhöhung der cAMP Konzentration auf ca. 10 μ M innerhalb von 2 min (van der Plaats 1974), gefolgt von einer erhöhten PKA Aktivität (Rolland *et al.* 2000). Eine längerfristige Erhöhung der cAMP Konzentration erfolgt aufgrund einer intrazellulären Ansäuerung der Zelle und der daraus resultierenden Aktivierung des Ras Proteins (Colombo *et al.* 1998). Die Aktivierung der Adenylatzyklase wird in der Hefe durch zwei verschiedene G-Proteine gesteuert (Colombo *et al.* 1998; Rolland *et al.* 2000; Wang *et al.* 2004; Tamaki 2007). Zum einen geschieht dies durch das schon genannte Ras Protein, dessen Aktivität über die GTPase aktivierenden Proteine (GAP) Ira1 bzw. Ira2 und durch das Guaninnukleotidaustausch Protein Cdc25 kontrolliert wird (van Aelst *et al.* 1991; Thevelein 1994; Colombo *et al.* 1998). Zum anderen ist das sogenannte GPCR-System involviert, welches aus dem Glucosesensor Gpr1, dem $G\alpha$ Protein Gpa2 und dem GTPase-aktivierenden Protein Rgs2 besteht (Xue *et al.* 1998; Yun *et al.* 1998; Kraakman *et al.* 1999; Versele *et al.* 1999). Sowohl Ras als auch Gpa2 stimulieren in ihrer aktivierten Form die Adenylatzyklase Cyr1, was in einer Aktivierung der PKA resultiert und schlussendlich in der Umstellung der Proteinbiosynthese und Proteinaktivierung für ein fermentatives Wachstum (Abb. 5.1). *Saccharomyces cerevisiae* zeigt, wie auch andere Hefen, schon ab einer Konzentration von weniger als 1 mM Glucose eine Bevorzugung des fermentativen Wachstums gegenüber der Atmung; diese Besonderheit des aeroben fermentativen Wachstums wird als Crabtree-Effekt bezeichnet (De Deken 1966).

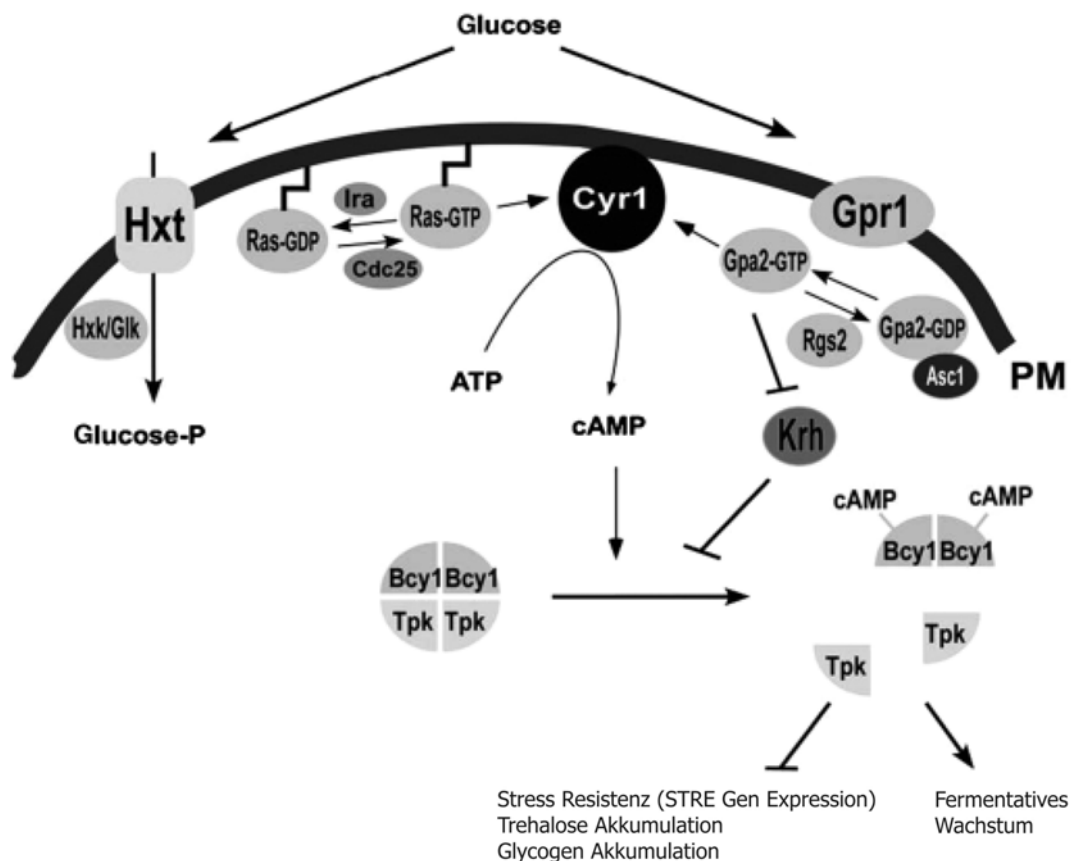


Abb. 5.1: Glucose-induzierte Aktivierung der cAMP Synthese

Glucose-induzierte Aktivierung der cAMP Synthese über die zwei unabhängig voneinander agierenden G-Proteine, Ras und Gpa2. (Rubio-Teixeira *et al.* 2009)

Eine Inhibierung der PKA mit H89 bewirkte bei der Hefe eine Inhibierung der Dissoziation der V-ATPase Untereinheit C (Abb. 4.11). Da, wie schon erwähnt, sowohl bei *Calliphora vicina* als auch bei *Manduca sexta* eine Phosphorylierung der Untereinheit C durch die PKA gezeigt werden konnte (Voss *et al.* 2007), liegt der Gedanke nahe, dass der PKA-Signaltransduktionsweg generell an der reversiblen Dissoziation beteiligt ist. Eine Schlüsselrolle des Glucosesensors Gpr1 an der reversiblen Dissoziation wäre somit eine logische Schlussfolgerung, da die reversible Dissoziation ein Glucose-abhängiger Prozess ist. Eine Deletion des Glucosesensors erbrachte jedoch im Hinblick auf die reversible Dissoziation der Untereinheit C unter *in vivo*-Bedingungen keinen Unterschied zum Wildtyp (Abb. 4.15). Somit spielt das Glucose-induzierte GPCR System als Regulator für die reversible Dissoziation anscheinend keine Rolle und die Beteiligung der PKA wird über andere Faktoren gesteuert.

Als einer dieser Faktoren scheint das kleine G-Protein Ras an der reversiblen Dissoziation der V-ATPase beteiligt zu sein, wie durch Immunpräzipitationsstudien mit einem

Antikörper gegen die V-ATPase Untereinheit A gezeigt wurde (Bond and Forgac 2008). Eine Deletion der GTPase aktivierenden Proteine Ira1 oder Ira2 reduziert die Dissoziation der V-ATPase bei Glucosemangel erheblich, wobei die Stabilität oder die Aktivität der V-ATPase davon nicht beeinflusst werden (Bond and Forgac 2008). Nicht nur eine Stimulierung der PKA durch eine Reduzierung der Ras-GAP Aktivität, sondern auch die Expression eines konstitutiv aktiven Ras2 und auch die Deletion der regulatorischen Untereinheit Bcy1 der PKA verhindern die Dissoziation der V-ATPase bei Glucoseentzug (Bond and Forgac 2008). Eine Deletion von Ras1 oder von Ras2 hat wiederum keinen Einfluss auf das Dissoziationsverhalten der V-ATPase (Bond and Forgac 2008).

Die V-ATPase Untereinheit C zeigte in der vorliegenden Arbeit bei einer Deletion der regulatorischen Untereinheit Bcy1 keine Dissoziation (Abb. 4.24), was im Einklang mit den *in vitro* Studien von Bond und Forgac (2008) steht. Hierbei ist jedoch zu erwähnen, dass nicht, wie dort vermutet, die Inhibierung der Dissoziation bzw. die ständige Aktivierung der Assemblierung ein Effekt der überaktiven PKA ist. Vielmehr kann die Dissoziation der Untereinheit C nicht stattfinden, da eine Deletion der regulatorischen Untereinheit Bcy1 eine inaktive V-ATPase zur Folge hat (Abb. 4.23). Wie schon erwähnt, haben Experimente mit spezifischen V-ATPase Inhibitoren gezeigt, dass die V-ATPase aktiv sein muss, um kompetent für die Dissoziation zu sein (Parra and Kane 1998). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass eine durch Deletion der regulatorischen Untereinheit daueraktive PKA eine Inhibierung der V-ATPase zur Folge hat. Im umgekehrten Fall hat eine Deletion der PKA Isoformen Tpk1 oder Tpk3 sowie eine gleichzeitige Deletion beider Enzyme keinen Einfluss auf die V-ATPase Aktivität. Bei der Tripel-Tpk-Mutante konnte weiterhin eine wenn auch geringere Aktivität der V-ATPase gemessen werden. Somit ist die beobachtete Inhibierung der Dissoziation in der Doppel- (Abb. 4.21) und Tripelmutante (Abb. 4.22) kein Effekt einer inaktiven V-ATPase, sondern ein Effekt der fehlenden Proteinkinase A Isoformen. In den Einfachmutanten zeigte sich weiterhin eine reversible Dissoziation der Untereinheit C (Abb. 4.19, 4.20); dies lässt darauf schliessen, dass sich die PKA Isoformen in ihrer Funktion ersetzen können, auch wenn sie unterschiedliche physiologische Rollen haben (Toda *et al.* 1987; Tudisca *et al.* 2009).

Hefezellen mit einem überaktiven cAMP-PKA Signalweg zeigen einen mit fermentativem Wachstum verbundenen Phänotyp (Thevelein *et al.* 2005). Dieser Sachverhalt gibt einen Hinweis darauf, warum Bond und Forgac (2008) bei einer Deletion von Ira1 bzw. Ira2 oder mit dem konstitutiv aktiven G-Protein Ras, was in beiden Fällen in einer daueraktiven PKA resultiert, keine Dissoziation der aktiven V-ATPase finden. Des weiteren wird die

Dissoziation von Untereinheit C auch durch cAMP verhindert (Katharina Tabke, persönliche Mitteilung). Für die Initiierung der Dissoziation spielt anscheinend eine Umstellung der Stoffwechselwege eine Rolle, der bei einem Wechsel auf andere Substrate aktiviert wird. Da jedoch eine überaktive PKA in der Hefe zum Phänotyp des fermentativen Wachstums führt, bewirkt ein Wechsel der Substrate in diesen Mutanten keine Veränderung der Stoffwechselwege und somit bleibt auch die daraus resultierende Regulierung der V-ATPase über den Mechanismus der reversiblen Dissoziation aus. Unter diesem Gesichtspunkt betrachtet, lassen sich die in der vorliegenden Arbeit und die dazu widersprüchlichen *in vitro* gewonnenen Ergebnisse im Bezug auf die PKA in Einklang bringen. Sowohl eine Daueraktivität als auch ein Nichtvorhandensein der PKA führen dazu, dass es in der Zelle zu keinen Veränderungen innerhalb der Stoffwechselwege kommt, die anscheinend als Auslöser für die reversible Dissoziation benötigt werden.

Die Befunde der vorliegenden Arbeit und vorangegangener Publikationen führen zu unterschiedlichen Vermutungen darüber, welche Beteiligung die Proteinkinase A an der Regulation der V-ATPase hat. Zum einen ist eine Beteiligung der PKA an der Initiierung der Assemblierung bzw. Reassoziierung durch Phosphorylierung der Plasmamembran V-ATPase in Insekten und Menschen wahrscheinlich, da bei einer Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration in *Calliphora* eine Reassoziierung der V-ATPase an der Apikalmembran beobachtet werden kann, die durch Behandlung der Zellen mit dem PKA spezifischen Inhibitor H89 verhindert wird (Zimmermann *et al.* 2003; Dames *et al.* 2006; Voss *et al.* 2007; Rein *et al.* 2008). Auch in den Zellen des menschlichen Nebenhodens kann nach Aktivierung der PKA eine Akkumulierung der V-ATPase in den apikalen Mikrovilli beobachtet werden (Pastor-Soler *et al.* 2008). Des Weiteren konnte *in vitro* eine Phosphorylierung der menschlichen V-ATPase Untereinheit A durch die PKA gezeigt werden (Hallows *et al.* 2009). Bei der Hefe scheint der Sachverhalt jedoch anders zu sein. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei einer Inhibierung durch H89 oder durch eine Deletion der PKA, sowie von Bond und Forgac (2008) gezeigt, bei einer daueraktiven PKA es zu keiner Dissoziation der Untereinheit C kommt. Die Reassemblierung zeigt hingegen keine Abhängigkeit von der Aktivität der PKA, wie die Experimente mit H89 beweisen. Somit scheint sowohl bei der Hefe als auch bei höheren Eukaryonten eine generelle Beteiligung der PKA sicher. Allerdings lassen die Befunde den Schluss zu, dass bei der Hefe die Beteiligung der PKA an der reversiblen Dissoziation nicht direkt erfolgt. Eine Phosphorylierung der Untereinheit C im Holoenzym zur Initiierung der Dissoziation ist unwahrscheinlich, da für die *Manduca* Untereinheit C gezeigt werden

konnte, dass diese im Holoenzym eingebettet nicht phosphorylierbar ist (Voss *et al.* 2007). Auch konnte in einem Phosphorylierungsscreen des Hefeproteoms mit den Kinasen der Hefe keine Phosphorylierung der Untereinheit C durch eine der PKA Isoformen beobachtet werden (Ptacek *et al.* 2005). Stattdessen wurde die Untereinheit C durch die Serin-/Threonin-Proteinkinase Prr2, welche die Pheromon-induzierten Signale unterhalb von MAPK inhibiert, und die putative Serin-/Threonin-Proteinkinase Ptk2, welche bei der Regulation des Ionentransports über die Plasmamembran beteiligt ist, phosphoryliert. Deshalb wäre in weiterführenden Experimenten zu klären, ob diese beiden Proteinkinasen bei der Regulation der reversiblen Dissoziation eine entscheidende Rolle spielen und ob die Phosphorylierung der Untereinheit C durch diese Kinasen in weiteren Experimenten bestätigt werden kann. Des Weiteren muss ein entscheidender Unterschied hinsichtlich der Lokalisierung der V-ATPase in den unterschiedlichen Organismen berücksichtigt werden. Bei höheren Eukaryonten sind die V-ATPasen häufig nicht nur in den Membranen von Organellen, sondern auch in der Plasmamembran lokalisiert. Hingegen kommen V-ATPasen bei der Hefe nur an der Vakuole und im Golgiapparat vor, was eine unterschiedliche Regulierung der V-ATPase in diesen Organismen allein schon aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation wahrscheinlich macht.

Die vorliegenden Befunde legen den Gedanken nahe, dass die Aktivierung der PKA durch den G-Protein Ras vermittelten Zweig eine entscheidende Rolle bei der reversiblen Dissoziation spielt. Diese scheint jedoch weniger direkter Art zu sein, als vielmehr mit der Anpassung an unterschiedliche Lebensbedingungen zusammen zu hängen. Ein Indiz dafür ist die nachgewiesene Interaktion der V-ATPase Untereinheiten a, B und E im Holoenzym mit dem glykolytischen Enzym Aldolase (Lu *et al.* 2001; Lu *et al.* 2004). Hefemutanten mit einer Deletion der Aldolase zeigen keinerlei V-ATPase Aktivität und weisen eine dissoziierte V-ATPase auf (Lu *et al.* 2004). Bei einer Überexpression der Aldolase hingegen zeigt sich eine normale Assemblierung der V-ATPase auch ohne Glucose (Lu *et al.* 2007). Die Zugabe von Glucose führt in Hefezellen zu einem raschen Anstieg der cAMP-Konzentration und dadurch zu einer Aktivierung der PKA (van der Plaats 1974; Thevelein *et al.* 1987). Die aktivierte PKA reguliert unter anderem auch Schlüsselenzyme der Glykolyse (Dihazi *et al.* 2003). Eine folglich aktivierte Aldolase scheint nun eine Interaktion mit der V-ATPase einzugehen und dadurch den Ort der Glykolyse mit der V-ATPase koppeln. Damit wäre die benötigte Menge an ATP am Ort des Verbrauchs gewährleistet. Konform mit dieser Idee sind die in der vorliegenden Arbeit gefundenen möglichen Interaktionspartner, die zusammen mit der Untereinheit C durch die TAP-Methode

gereinigt wurden. Hierbei handelt es sich um weitere Enzyme der Glykolyse, was eine direkte Kopplung von Glykolyse und V-ATPase wahrscheinlich macht. Ferner führt ein überaktives G-Protein Ras nicht nur zu einer Inhibierung der Dissoziation der V-ATPase, sondern auch zu einer Reduzierung der Aldolase-V-ATPase Interaktion (Bond and Forgac 2008). Damit scheint die Aldolase nicht nur eine wichtige Rolle bei der Assemblierung zu spielen, sondern auch bei der Dissoziation der V-ATPase.

5.5. Der RAVE-Komplex und die V-ATPase

Der RAVE-Komplex wurde aufgrund von *in vitro* Studien als Hilfsprotein für die Assemblierung der V-ATPase nach der Biosynthese der Untereinheiten und/oder der Reassoziierung der V-ATPase nach vorangegangener Dissoziation postuliert. Die Deletion von *RAV1* oder *RAV2* zeigte bei 30°C einen partiellen Vma^- -Phänotyp und bei 37°C kein Wachstum bei einem pH von 7,5 (Seol *et al.* 2001; Smardon *et al.* 2002). Die Deletion von *RAV1* zusammen mit der GFP Markierung verschiedener V-ATPase Untereinheiten erbrachte in der vorliegenden Arbeit bei 30°C eine Aktivität der V-ATPase zwischen 29 % und 67 % im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.26). Im Vergleich zur V-ATPase Aktivität in Hefestämmen mit einer GFP-Markierung gibt es eine Reduzierung der Aktivität aufgrund der Deletion von *RAV1*, die jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht so stark ausgefallen ist, wie sie von Smardon *et al.* (2002) veröffentlicht wurde. Diese Diskrepanz der gemessenen Aktivitäten kann aufgrund der unterschiedlich gewählten Temperaturen für die Aktivitätstests zustande gekommen sein, da in der vorliegenden Arbeit die Tests bei 30°C und bei Smardon *et al.* (2002) bei 37°C durchgeführt wurden. Die Deletion von *RAV1* führte bei der V-ATPase Untereinheit B zu keinem eindeutigen Phänotyp. So ist ein Teil des Signals deutlich an der Vakuole zu erkennen, aber auch ein unterschiedlich starkes Signal im Zytoplasma (Abb.4.27 I). Dieser Phänotyp konnte auch für die Untereinheit G (Abb. 4.27 IV) bestätigt werden und ist konform mit den von Smardon und Kane (2007) publizierten Ergebnissen. Die *in vivo* Ergebnisse der Untereinheit C (Abb. 4.27 II) bestätigten ebenfalls die Erkenntnisse der Immunlokalisationsstudien, nach denen C bei einer Deletion von *RAV1* vollständig im Zytoplasma lokalisiert. Nur die Untereinheit E zeigte überraschenderweise eine hauptsächliche Lokalisation an der Vakuole (Abb. 4.27 III). Die Daten lassen die Vermutung aufkommen, dass der RAVE-Komplex für einige der V_1 -Untereinheiten als Hilfsprotein für die Assemblierung benötigt wird. Der RAVE-Komplex interagiert aber nicht nur mit den V_1 -Untereinheiten E und G, sondern auch mit der Untereinheit C (Smardon *et al.* 2002; Smardon and Kane 2007). Daher wäre es denkbar,

dass der RAVE-Komplex nicht für die schnelle Assemblierung des V_1 -Komplexes sondern vor allem für die Integration der Untereinheit C in den V_1V_0 -Komplex an der Vakuole verantwortlich ist. Ein Hinweis für diese spezielle Rolle des RAVE-Komplexes an der Assemblierung/Reassoziaton von C liegt in der Tatsache begründet, dass bei einer Deletion der Untereinheit C ein ähnlicher Phänotyp beobachtet werden kann wie bei einer Deletion von RAVE. Hierbei ist nicht nur die reduzierte bzw. keine Aktivität der V-ATPase bei einer Deletion von C ein wichtiges Indiz, sondern auch die fehlende stabile Assemblierung der V-ATPase (Kane *et al.* 1999; Curtis *et al.* 2002). Denkbar wäre also folgendes Modell: Der RAVE-Komplex bindet die frei im Zytoplasma vorliegende Untereinheit C und sorgt auf diesem Weg für deren Transport an die Vakuole. Der RAVE-Komplex bindet dort an die Untereinheiten E und G der V-ATPase und ermöglicht somit den Einbau von C ins Holoenzym, woraufhin der RAVE-Komplex freigesetzt werden kann und die V-ATPase stabil und aktiv an der Vakuolenmembran vorliegt.

5.6. Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben nur erste Hinweise auf die Beteiligung von bestimmten Faktoren, die Einfluss auf die reversible Dissoziation der V-ATPase nehmen. Da es sich hierbei nur um die Dissoziation der V-ATPase handelt, bieten die Ergebnisse vielfältige Ansätze für weitere Versuche, die nicht nur auf Hefe als Modellorganismus beschränkt bleiben sollten. Zur weiteren Eingrenzung der Rolle des PKA-Signaltransduktionsweges an der reversiblen Dissoziation könnten weitere Mutanten hinsichtlich ihres Effekts auf die Regulation der V-ATPase getestet werden, wie z.B. durch Deletion der Adenylatzyklase. Weiterhin sollte durch ein Tet-Promotor System in den vorliegenden Mutanten der Einfluss der Mutationen auch von der Seite der Reassoziaton beleuchtet werden. Ferner sollte die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass bei der Hefe die V-ATPase Untereinheit C nicht durch die PKA phosphoryliert wird, sondern eventuell durch eine der beiden Proteinkinasen Prr2 oder Ptk2 und dass die Beteiligung der PKA eher indirekter Natur ist. Ein Phosphorylierungsscreen dürfte die mögliche Phosphorylierbarkeit der Untereinheit C durch diese Phosphatasen zeigen, genauso wie eine mögliche direkte Interaktion der Komponenten durch einen Yeast-Two-Hybrid Screen getestet werden sollte.

Ein weiterer wichtiger Ansatz ist die Analyse der Konformationsänderungen der Untereinheit C und der restlichen Untereinheiten im V_1V_0 -Komplex während der reversiblen Dissoziation. Hierzu sollten FRET-Versuche durchgeführt werden, um z.B. die

Hypothese zu überprüfen, ob Untereinheit H eine Konformationsänderung durchläuft und so im verbleibenden Komplex an der Vakuole bei der Dissoziation von Untereinheit C die Hydrolyse von ATP verhindert.

Des Weiteren sollte die Kinetik der reversiblen Dissoziation mit Hilfe einer Durchflussskammer genauer bestimmt werden. Mit dieser Kammer würde ein schneller Wechsel zwischen verschiedenen Medien möglich, wodurch weitere Erkenntnisse zur Regulation der reversiblen Dissoziation der V-ATPase zu erwarten wären.

6. Zusammenfassung

V-ATPasen kommen bei *Saccharomyces cerevisiae* in den Membranen der Vakuole und des Golgiapparats vor. Durch ihre Aktivität wird das Lumen dieser Organellen, wenn auch in unterschiedlichem Maße, angesäuert. Da die V-ATPase ATP verbraucht, erscheint eine strikte Regulierung der Enzymaktivität unter Hungerbedingungen zwingend notwendig. Der Hauptregulationsmechanismus zur Deaktivierung der V-ATPase ist die reversible Dissoziation. In der vorliegenden Doktorarbeit wurden einige Faktoren hinsichtlich ihrer Beteiligung an der reversiblen Dissoziation der V-ATPase durch *in vivo* Beobachtungen an einzelnen Hefezellen untersucht.

Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen unter *in vivo*-Bedingungen zeigten, dass nur die V₁-Untereinheit C dem Mechanismus der reversiblen Dissoziation unterliegt und nicht, wie bisher angenommen, der gesamte V₁-Komplex. Die restlichen V₁-Untereinheiten verbleiben weiterhin an oder in der Nähe der Vakuolenmembran. Durch Depolymerisierung des Zytoskeletts zeigte sich eine Beteiligung der Mikrotubuli an der Dissoziation, während Aktin keinen Einfluss auf die reversible Dissoziation der Untereinheit C hatte. Mit Hilfe von Overlayblots und Co-Pelletierungsversuchen konnte eine direkte Interaktion der Untereinheit C mit den Mikrotubuli nachgewiesen werden.

Fluoreszenzmikroskopische Lokalisationsstudien der Untereinheit C erbrachten bei Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Agenzien den Beweis, dass für die Dissoziation der Untereinheit C die V-ATPase nicht nur aktiv sein, sondern dass auch das intrazelluläre Lumen der Vakuole einen sauren pH-Wert haben muss. Die Reassoziierung erfolgt jedoch unabhängig von diesen Faktoren.

Ein anscheinend weiterer wichtiger Faktor bei der reversiblen Dissoziation der Untereinheit C ist der cAMP-PKA-Signalweg. Es konnte gezeigt werden, dass der Glucosesensor Gpr1 dabei keine Rolle spielt, während die Deletion der PKA Isoformen die Dissoziation von C inhibiert. Eine überaktive PKA durch Deletion der regulatorischen Untereinheit Bcy1 hatte hingegen eine Inaktivierung der V-ATPase zur Folge, was zum Verlust der Dissoziationsfähigkeit führte. Die Behandlung mit dem PKA Inhibitor H89 erbrachte den Nachweis, dass die PKA für die Reassoziierung der Untereinheit C nicht gebraucht wird. Eine Phosphorylierung der Untereinheit C im Holoenzym durch die PKA zur Initiierung der Dissoziation scheint jedoch unwahrscheinlich. Stattdessen ist eine indirekte Beteiligung der PKA durch Regulierung von Stoffwechselwegen wahrscheinlicher,

nachdem durch die TAP-Reinigung Enzyme der Glykolyse als Interaktionspartner von C gefunden wurden.

Alle in der vorliegenden Arbeit gefundenen Faktoren spielen anscheinend eine Rolle bei der Dissoziation, nicht aber bei der Reassoziaton. Im Gegensatz dazu ergab die Deletion des RAVE-Komplexes einen ersten Hinweis für eine Beteiligung an der Reassoziaton bzw. Assemblierung, da Untereinheit C in diesem Stamm eine zytoplasmatische Lokalisation zeigte und die anderen V_1 -Untereinheiten eine Lokalisation an der Vakuole und im Zytoplasma.

7. Literaturverzeichnis

- Andrews, P. D. and M. J. Stark** (2000). "Type 1 protein phosphatase is required for maintenance of cell wall integrity, morphogenesis and cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*." J Cell Sci **113** (Pt 3): 507-20.
- Arai, H., G. Terres, S. Pink and M. Forgac** (1988). "Topography and subunit stoichiometry of the coated vesicle proton pump." J Biol Chem **263**(18): 8796-802.
- Arata, Y., J. D. Baleja and M. Forgac** (2002). "Cysteine-directed cross-linking to subunit B suggests that subunit E forms part of the peripheral stalk of the vacuolar H⁺-ATPase." J Biol Chem **277**(5): 3357-63.
- Bauer, A. and B. Kuster** (2003). "Affinity purification-mass spectrometry. Powerful tools for the characterization of protein complexes." Eur J Biochem **270**(4): 570-8.
- Bauerle, C., M. N. Ho, M. A. Lindorfer and T. H. Stevens** (1993). "The *Saccharomyces cerevisiae* VMA6 gene encodes the 36-kDa subunit of the vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase membrane sector." J Biol Chem **268**(17): 12749-57.
- Beltran, C. and N. Nelson** (1992). "The membrane sector of vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase by itself is impermeable to protons." Acta Physiol Scand Suppl **607**: 41-7.
- Bialojan, C. and A. Takai** (1988). "Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics." Biochem J **256**(1): 283-90.
- Birnboim, H. C. and J. Doly** (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Blair, H. C., S. L. Teitelbaum, R. Ghiselli and S. Gluck** (1989). "Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump." Science **245**(4920): 855-7.
- Boldogh, I., N. Vojtov, S. Karmon and L. A. Pon** (1998). "Interaction between mitochondria and the actin cytoskeleton in budding yeast requires two integral mitochondrial outer membrane proteins, Mmm1p and Mdm10p." J Cell Biol **141**(6): 1371-81.
- Bollag, D. M. and S. J. Edelstein** (1991). "Protein Methods." John Wiley & Sons Inc.
- Bond, S. and M. Forgac** (2008). "The Ras/cAMP/protein kinase A pathway regulates glucose-dependent assembly of the vacuolar (H⁺)-ATPase in yeast." J Biol Chem **283**(52): 36513-21.
- Bowman, E. J. and B. J. Bowman** (2005). "V-ATPases as drug targets." J Bioenerg Biomembr **37**(6): 431-5.
- Bowman, E. J., A. Siebers and K. Altendorf** (1988). "Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(21): 7972-6.
- Boyd, M. R., C. Farina, P. Belfiore, S. Gagliardi, J. W. Kim, Y. Hayakawa, J. A. Beutler, T. C. McKee, B. J. Bowman and E. J. Bowman** (2001). "Discovery of a novel antitumor benzolactone enamide class that selectively inhibits mammalian vacuolar-type (H⁺)-atpases." J Pharmacol Exp Ther **297**(1): 114-20.

- Brachmann, C. B., A. Davies, G. J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter and J. D. Boeke** (1998). "Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications." Yeast **14**(2): 115-32.
- Brandt, R. and G. Lee** (1993). "Functional organization of microtubule-associated protein tau. Identification of regions which affect microtubule growth, nucleation, and bundle formation in vitro." J Biol Chem **268**(5): 3414-9.
- Brown, D., I. Sabolic and S. Gluck** (1991). "Colchicine-induced redistribution of proton pumps in kidney epithelial cells." Kidney Int Suppl **33**: S79-83.
- Brown, D., I. Sabolic and S. Gluck** (1992). "Polarized targeting of V-ATPase in kidney epithelial cells." J Exp Biol **172**: 231-43.
- Bryant, N. J., R. C. Piper, S. R. Gerrard and T. H. Stevens** (1998). "Traffic into the prevacuolar/endosomal compartment of *Saccharomyces cerevisiae*: a VPS45-dependent intracellular route and a VPS45-independent, endocytic route." Eur J Cell Biol **76**(1): 43-52.
- Cannon, J. F., J. R. Pringle, A. Fiechter and M. Khalil** (1994). "Characterization of glycogen-deficient *glc* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **136**(2): 485-503.
- Chen, S. H., M. R. Bubb, E. G. Yarmola, J. Zuo, J. Jiang, B. S. Lee, M. Lu, S. L. Gluck, I. R. Hurst and L. S. Holliday** (2004). "Vacuolar H⁺-ATPase binding to microfilaments: regulation in response to phosphatidylinositol 3-kinase activity and detailed characterization of the actin-binding site in subunit B." J Biol Chem **279**(9): 7988-98.
- Chijiwa, T., A. Mishima, M. Hagiwara, M. Sano, K. Hayashi, T. Inoue, K. Naito, T. Toshioka and H. Hidaka** (1990). "Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells." J Biol Chem **265**(9): 5267-72.
- Colombo, S., P. Ma, L. Cauwenberg, J. Winderickx, M. Crauwels, A. Teunissen, D. Nauwelaers, J. H. de Winde, M. F. Gorwa, D. Colavizza and J. M. Thevelein** (1998). "Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." EMBO J **17**(12): 3326-41.
- Compton, M. A., L. A. Graham and T. H. Stevens** (2006). "Vma9p (subunit e) is an integral membrane V₀ subunit of the yeast V-ATPase." J Biol Chem **281**(22): 15312-9.
- Crider, B. P., X. S. Xie and D. K. Stone** (1994). "Bafilomycin inhibits proton flow through the H⁺ channel of vacuolar proton pumps." J Biol Chem **269**(26): 17379-81.
- Curtis, K. K., S. A. Francis, Y. Oluwatosin and P. M. Kane** (2002). "Mutational analysis of the subunit C (Vma5p) of the yeast vacuolar H⁺-ATPase." J Biol Chem **277**(11): 8979-88.
- Damerval, C., M. le Guilloux, J. Blaisonneau and D. De Vienne** (1987). "A simplification of Heukeshoven and Dernick's silver staining of proteins." Electrophoresis **8**: 158-159.

- Dames, P., B. Zimmermann, R. Schmidt, J. Rein, M. Voss, B. Schewe, B. Walz and O. Baumann (2006). "cAMP regulates plasma membrane vacuolar-type H⁺-ATPase assembly and activity in blowfly salivary glands." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(10): 3926-31.
- Davis-Kaplan, S. R., D. M. Ward, S. L. Shiflett and J. Kaplan (2004). "Genome-wide analysis of iron-dependent growth reveals a novel yeast gene required for vacuolar acidification." *J Biol Chem* **279**(6): 4322-9.
- Dawson, J. F. and C. F. Holmes (1999). "Molecular mechanisms underlying inhibition of protein phosphatases by marine toxins." *Front Biosci* **4**: D646-58.
- De Deken, R. H. (1966). "The Crabtree effect: a regulatory system in yeast." *J Gen Microbiol* **44**(2): 149-56.
- Denker, S. P. and D. L. Barber (2002). "Ion transport proteins anchor and regulate the cytoskeleton." *Curr Opin Cell Biol* **14**(2): 214-20.
- Dihazi, H., R. Kessler and K. Eschrich (2003). "Glucose-induced stimulation of the Ras-cAMP pathway in yeast leads to multiple phosphorylations and activation of 6-phosphofructo-2-kinase." *Biochemistry* **42**(20): 6275-82.
- Doherty, R. D. and P. M. Kane (1993). "Partial assembly of the yeast vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase in mutants lacking one subunit of the enzyme." *J Biol Chem* **268**(22): 16845-51.
- Dröse, S., K. U. Bindseil, E. J. Bowman, A. Siebers, A. Zeeck and K. Altendorf (1993). "Inhibitory effect of modified bafilomycins and concanamycins on P- and V-type adenosinetriphosphatases." *Biochemistry* **32**(15): 3902-6.
- Dröse, S., C. Boddien, M. Gassel, G. Ingenhorst, A. Zeeck and K. Altendorf (2001). "Semisynthetic derivatives of concanamycin A and C, as inhibitors of V- and P-type ATPases: structure-activity investigations and developments of photoaffinity probes." *Biochemistry* **40**(9): 2816-25.
- Fillingame, R. H. (1997). "Coupling H⁺ transport and ATP synthesis in F1F0-ATP synthases: glimpses of interacting parts in a dynamic molecular machine." *J Exp Biol* **200**(Pt 2): 217-24.
- Flannery, A. R., L. A. Graham and T. H. Stevens (2004). "Topological characterization of the c, c', and c" subunits of the vacuolar ATPase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **279**(38): 39856-62.
- Forgac, M. (2007). "Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(11): 917-29.
- Frattini, A., P. J. Orchard, C. Sobacchi, S. Giliani, M. Abinun, J. P. Mattsson, D. J. Keeling, A. K. Andersson, P. Wallbrandt, L. Zecca, L. D. Notarangelo, P. Vezzoni and A. Villa (2000). "Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis." *Nat Genet* **25**(3): 343-6.
- Futai, M., M. Park, A. Iwamoto, H. Omote and M. Maeda (1994). "Catalysis and energy coupling of H⁽⁺⁾-ATPase (ATP synthase): molecular biological approaches." *Biochim Biophys Acta* **1187**(2): 165-70.
- Gabriel, I., J. Olchoway, A. Stanislawska-Sachadyn, T. Mio, J. Kur and S. Milewski (2004). "Phosphorylation of glucosamine-6-phosphate synthase is

- important but not essential for germination and mycelial growth of *Candida albicans*." FEMS Microbiol Lett **235**(1): 73-80.
- Gietz, D., A. St Jean, R. A. Woods and R. H. Schiestl** (1992). "Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells." Nucleic Acids Res **20**(6): 1425.
- Gräf, R., W. R. Harvey and H. Wieczorek** (1996). "Purification and properties of a cytosolic V1-ATPase." J Biol Chem **271**(34): 20908-13.
- Graham, L. A., K. J. Hill and T. H. Stevens** (1994). "VMA7 encodes a novel 14-kDa subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar H(+)-ATPase complex." J Biol Chem **269**(42): 25974-7.
- Griffioen, G., P. Anghileri, E. Imre, M. D. Baroni and H. Ruis** (2000). "Nutritional control of nucleocytoplasmic localization of cAMP-dependent protein kinase catalytic and regulatory subunits in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **275**(2): 1449-56.
- Gueldener, U., J. Heinisch, G. J. Koehler, D. Voss and J. H. Hegemann** (2002). "A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast." Nucleic Acids Res **30**(6): e23.
- Gundersen, G. G. and T. A. Cook** (1999). "Microtubules and signal transduction." Curr Opin Cell Biol **11**(1): 81-94.
- Hallows, K. R., R. Alzamora, H. Li, F. Gong, C. Smolak, D. Neumann and N. M. Pastor-Soler** (2009). "AMP-activated protein kinase inhibits alkaline pH- and PKA-induced apical vacuolar H+-ATPase accumulation in epididymal clear cells." Am J Physiol Cell Physiol **296**(4): C672-81.
- Hanahan, D.** (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-80.
- Hirata, R., L. A. Graham, A. Takatsuki, T. H. Stevens and Y. Anraku** (1997). "VMA11 and VMA16 encode second and third proteolipid subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar membrane H+-ATPase." J Biol Chem **272**(8): 4795-803.
- Hisamoto, N., K. Sugimoto and K. Matsumoto** (1994). "The Glc7 type 1 protein phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for cell cycle progression in G2/M." Mol Cell Biol **14**(5): 3158-65.
- Ho, M. N., K. J. Hill, M. A. Lindorfer and T. H. Stevens** (1993). "Isolation of vacuolar membrane H(+)-ATPase-deficient yeast mutants; the VMA5 and VMA4 genes are essential for assembly and activity of the vacuolar H(+)-ATPase." J Biol Chem **268**(1): 221-7.
- Ho, M. N., R. Hirata, N. Umemoto, Y. Ohya, A. Takatsuki, T. H. Stevens and Y. Anraku** (1993). "VMA13 encodes a 54-kDa vacuolar H(+)-ATPase subunit required for activity but not assembly of the enzyme complex in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **268**(24): 18286-92.
- Holliday, L. S., M. R. Bubb, J. Jiang, I. R. Hurst and J. Zuo** (2005). "Interactions between vacuolar H+-ATPases and microfilaments in osteoclasts." J Bioenerg Biomembr **37**(6): 419-23.
- Holliday, L. S., M. Lu, B. S. Lee, R. D. Nelson, S. Solivan, L. Zhang and S. L. Gluck** (2000). "The amino-terminal domain of the B subunit of vacuolar H+-ATPase contains a filamentous actin binding site." J Biol Chem **275**(41): 32331-7.

- Hong-Hermesdorf, A., A. Brux, A. Gruber, G. Gruber and K. Schumacher** (2006). "A WNK kinase binds and phosphorylates V-ATPase subunit C." *FEBS Lett* **580**(3): 932-9.
- Huh, W. K., J. V. Falvo, L. C. Gerke, A. S. Carroll, R. W. Howson, J. S. Weissman and E. K. O'Shea** (2003). "Global analysis of protein localization in budding yeast." *Nature* **425**(6959): 686-91.
- Huss, M., G. Ingenhorst, S. König, M. Gassel, S. Drose, A. Zeeck, K. Altendorf and H. Wiczorek** (2002). "Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V(o) subunit c." *J Biol Chem* **277**(43): 40544-8.
- Huss, M., F. Sasse, B. Kunze, R. Jansen, H. Steinmetz, G. Ingenhorst, A. Zeeck and H. Wiczorek** (2005). "Archazolid and apicularen: novel specific V-ATPase inhibitors." *BMC Biochem* **6**: 13.
- Huss, M. and H. Wiczorek** (2007). "Influence of ATP and ADP on dissociation of the V-ATPase into its V(1) and V(O) complexes." *FEBS Lett* **581**(29): 5566-72.
- Huxley, C., E. D. Green and I. Dunham** (1990). "Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR." *Trends Genet* **6**(8): 236.
- Inoue, T. and M. Forgac** (2005). "Cysteine-mediated cross-linking indicates that subunit C of the V-ATPase is in close proximity to subunits E and G of the V1 domain and subunit a of the V0 domain." *J Biol Chem* **280**(30): 27896-903.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura** (1983). "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations." *J Bacteriol* **153**(1): 163-8.
- Iwata, M., H. Imamura, E. Stambouli, C. Ikeda, M. Tamakoshi, K. Nagata, H. Makyio, B. Hankamer, J. Barber, M. Yoshida, K. Yokoyama and S. Iwata** (2004). "Crystal structure of a central stalk subunit C and reversible association/dissociation of vacuole-type ATPase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(1): 59-64.
- Jäger, D., F. J. Novak, W. R. Harvey, H. Wiczorek and U. Klein** (1996). "Temporal and spatial distribution of V-ATPase and its mRNA in the midgut of moulting *Manduca sexta*." *J Exp Biol* **199**(Pt 5): 1019-27.
- Jefferies, K. C., D. J. Cipriano and M. Forgac** (2008). "Function, structure and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases." *Arch Biochem Biophys* **476**(1): 33-42.
- Jefferies, K. C. and M. Forgac** (2008). "Subunit H of the vacuolar (H⁺) ATPase inhibits ATP hydrolysis by the free V1 domain by interaction with the rotary subunit F." *J Biol Chem* **283**(8): 4512-9.
- Kane, P. M.** (1995). "Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase in vivo." *J Biol Chem* **270**(28): 17025-32.
- Kane, P. M., M. C. Kuehn, I. Howald-Stevenson and T. H. Stevens** (1992). "Assembly and targeting of peripheral and integral membrane subunits of the yeast vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase." *J Biol Chem* **267**(1): 447-54.
- Kane, P. M., M. Tarsio and J. Liu** (1999). "Early steps in assembly of the yeast vacuolar H⁺-ATPase." *J Biol Chem* **274**(24): 17275-83.
- Kane, P. M., C. T. Yamashiro and T. H. Stevens** (1989). "Biochemical characterization of the yeast vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase." *J Biol Chem* **264**(32): 19236-44.

- Kawai, A., S. Nishikawa, A. Hirata and T. Endo** (2001). "Loss of the mitochondrial Hsp70 functions causes aggregation of mitochondria in yeast cells." J Cell Sci **114**(Pt 19): 3565-74.
- Kawasaki-Nishi, S., K. Bowers, T. Nishi, M. Forgac and T. H. Stevens** (2001). "The amino-terminal domain of the vacuolar proton-translocating ATPase a subunit controls targeting and in vivo dissociation, and the carboxyl-terminal domain affects coupling of proton transport and ATP hydrolysis." J Biol Chem **276**(50): 47411-20.
- Kawasaki-Nishi, S., T. Nishi and M. Forgac** (2001). "Arg-735 of the 100-kDa subunit a of the yeast V-ATPase is essential for proton translocation." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12397-402.
- Kawasaki-Nishi, S., T. Nishi and M. Forgac** (2001). "Yeast V-ATPase complexes containing different isoforms of the 100-kDa a-subunit differ in coupling efficiency and in vivo dissociation." J Biol Chem **276**(21): 17941-8.
- Kirchrath, L., A. Lorberg, H. P. Schmitz, U. Gengenbacher and J. J. Heinisch** (2000). "Comparative genetic and physiological studies of the MAP kinase Mpk1p from *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*." J Mol Biol **300**(4): 743-58.
- Kraakman, L., K. Lemaire, P. Ma, A. W. Teunissen, M. C. Donaton, P. Van Dijck, J. Winderickx, J. H. de Winde and J. M. Thevelein** (1999). "A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose." Mol Microbiol **32**(5): 1002-12.
- Krebs, E. G. and J. A. Beavo** (1979). "Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes." Annu Rev Biochem **48**: 923-59.
- Kunze, B., F. Sasse, H. Wieczorek and M. Huss** (2007). "Cruentaren A, a highly cytotoxic benzolactone from Myxobacteria is a novel selective inhibitor of mitochondrial F1-ATPases." FEBS Lett **581**(18): 3523-7.
- Kunze, B., H. Steinmetz, G. Hofle, M. Huss, H. Wieczorek and H. Reichenbach** (2006). "Cruentaren, a new antifungal salicylate-type macrolide from *Byssovorax cruenta* (myxobacteria) with inhibitory effect on mitochondrial ATPase activity. Fermentation and biological properties." J Antibiot (Tokyo) **59**(10): 664-8.
- Kyhse-Andersen, J.** (1984). "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." J Biochem Biophys Methods **10**(3-4): 203-9.
- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lanzetti, L.** (2007). "Actin in membrane trafficking." Curr Opin Cell Biol **19**(4): 453-8.
- Lee, B. S., S. L. Gluck and L. S. Holliday** (1999). "Interaction between vacuolar H(+)-ATPase and microfilaments during osteoclast activation." J Biol Chem **274**(41): 29164-71.
- Leng, X. H., T. Nishi and M. Forgac** (1999). "Transmembrane topography of the 100-kDa a subunit (Vph1p) of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase." J Biol Chem **274**(21): 14655-61.

- Lin, F. C. and K. T. Arndt** (1995). "The role of *Saccharomyces cerevisiae* type 2A phosphatase in the actin cytoskeleton and in entry into mitosis." *EMBO J* **14**(12): 2745-59.
- Lion, T. and O. A. Haas** (1990). "Nonradioactive labeling of probe with digoxigenin by polymerase chain reaction." *Anal Biochem* **188**(2): 335-7.
- Logan, M. R., T. Nguyen, N. Szapiel, J. Knockleby, H. Por, M. Zadworny, M. Neszt, P. Harrison, H. Bussey, C. A. Mandato, J. Vogel and G. Lesage** (2008). "Genetic interaction network of the *Saccharomyces cerevisiae* type 1 phosphatase Glc7." *BMC Genomics* **9**: 336.
- Longtine, M. S., A. McKenzie, III, D. J. Demarini, N. G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen and J. R. Pringle** (1998). "Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **14**(10): 953-61.
- Lu, M., D. Ammar, H. Ives, F. Albrecht and S. L. Gluck** (2007). "Physical interaction between aldolase and vacuolar H⁺-ATPase is essential for the assembly and activity of the proton pump." *J Biol Chem* **282**(34): 24495-503.
- Lu, M., L. S. Holliday, L. Zhang, W. A. Dunn, Jr. and S. L. Gluck** (2001). "Interaction between aldolase and vacuolar H⁺-ATPase: evidence for direct coupling of glycolysis to the ATP-hydrolyzing proton pump." *J Biol Chem* **276**(32): 30407-13.
- Lu, M., Y. Y. Sautin, L. S. Holliday and S. L. Gluck** (2004). "The glycolytic enzyme aldolase mediates assembly, expression, and activity of vacuolar H⁺-ATPase." *J Biol Chem* **279**(10): 8732-9.
- Ludwig, J., S. Kerscher, U. Brandt, K. Pfeiffer, F. Getlawi, D. K. Apps and H. Schagger** (1998). "Identification and characterization of a novel 9.2-kDa membrane sector-associated protein of vacuolar proton-ATPase from chromaffin granules." *J Biol Chem* **273**(18): 10939-47.
- MacLeod, K. J., E. Vasilyeva, J. D. Baleja and M. Forgac** (1998). "Mutational analysis of the nucleotide binding sites of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase." *J Biol Chem* **273**(1): 150-6.
- Mandel, M., Y. Moriyama, J. D. Hulmes, Y. C. Pan, H. Nelson and N. Nelson** (1988). "cDNA sequence encoding the 16-kDa proteolipid of chromaffin granules implies gene duplication in the evolution of H⁺-ATPases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(15): 5521-4.
- Manolson, M. F., D. Proteau, R. A. Preston, A. Stenbit, B. T. Roberts, M. A. Hoyt, D. Preuss, J. Mulholland, D. Botstein and E. W. Jones** (1992). "The VPH1 gene encodes a 95-kDa integral membrane polypeptide required for in vivo assembly and activity of the yeast vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase." *J Biol Chem* **267**(20): 14294-303.
- Manolson, M. F., B. Wu, D. Proteau, B. E. Taillon, B. T. Roberts, M. A. Hoyt and E. W. Jones** (1994). "STV1 gene encodes functional homologue of 95-kDa yeast vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase subunit Vph1p." *J Biol Chem* **269**(19): 14064-74.
- Maxfield, F. R.** (1982). "Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts." *J Cell Biol* **95**(2 Pt 1): 676-81.

- Mazon, M. J., M. M. Behrens, E. Morgado and F. Portillo (1993). "Low activity of the yeast cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit Tpk3 is due to the poor expression of the TPK3 gene." Eur J Biochem **213**(1): 501-6.
- Mbonyi, K., M. Beullens, K. Detremmerie, L. Geerts and J. M. Thevelein (1988). "Requirement of one functional RAS gene and inability of an oncogenic ras variant to mediate the glucose-induced cyclic AMP signal in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **8**(8): 3051-7.
- Merzendorfer, H., M. Huss, R. Schmid, W. R. Harvey and H. Wieczorek (1999). "A novel insect V-ATPase subunit M9.7 is glycosylated extensively." J Biol Chem **274**(24): 17372-8.
- Merzendorfer, H., S. Reineke, X. F. Zhao, B. Jacobmeier, W. R. Harvey and H. Wieczorek (2000). "The multigene family of the tobacco hornworm V-ATPase: novel subunits a, C, D, H, and putative isoforms." Biochim Biophys Acta **1467**(2): 369-79.
- Mouillon, J. M. and B. L. Persson (2005). "Inhibition of the protein kinase A alters the degradation of the high-affinity phosphate transporter Pho84 in *Saccharomyces cerevisiae*." Curr Genet **48**(4): 226-34.
- Muench, S. P., M. Huss, C. F. Song, C. Phillips, H. Wieczorek, J. Trinick and M. A. Harrison (2009). "Cryo-electron microscopy of the vacuolar ATPase motor reveals its mechanical and regulatory complexity." J Mol Biol **386**(4): 989-99.
- Nelson, H. and N. Nelson (1990). "Disruption of genes encoding subunits of yeast vacuolar H(+)-ATPase causes conditional lethality." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(9): 3503-7.
- Nelson, N. and L. Taiz (1989). "The evolution of H⁺-ATPases." Trends Biochem Sci **14**(3): 113-6.
- Ohira, M., A. M. Smardon, C. M. Charsky, J. Liu, M. Tarsio and P. M. Kane (2006). "The E and G subunits of the yeast V-ATPase interact tightly and are both present at more than one copy per V1 complex." J Biol Chem **281**(32): 22752-60.
- Ohkuma, S. and B. Poole (1978). "Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(7): 3327-31.
- Parra, K. J. and P. M. Kane (1998). "Reversible association between the V1 and V0 domains of yeast vacuolar H⁺-ATPase is an unconventional glucose-induced effect." Mol Cell Biol **18**(12): 7064-74.
- Parra, K. J., K. L. Keenan and P. M. Kane (2000). "The H subunit (Vma13p) of the yeast V-ATPase inhibits the ATPase activity of cytosolic V1 complexes." J Biol Chem **275**(28): 21761-7.
- Pastor-Soler, N. M., K. R. Hallows, C. Smolak, F. Gong, D. Brown and S. Breton (2008). "Alkaline pH- and cAMP-induced V-ATPase membrane accumulation is mediated by protein kinase A in epididymal clear cells." Am J Physiol Cell Physiol **294**(2): C488-94.
- Pedersen, P. L. (2007). "Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease." J Bioenerg Biomembr **39**(5-6): 349-55.

- Pedersen, P. L. and L. M. Amzel** (1993). "ATP synthases. Structure, reaction center, mechanism, and regulation of one of nature's most unique machines." J Biol Chem **268**(14): 9937-40.
- Pedersen, P. L. and E. Carafoli** (1987). "Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function." Trends Biochem Sci **12**: 146-150.
- Peeters, T., W. Louwet, R. Gelade, D. Nauwelaers, J. M. Thevelein and M. Versele** (2006). "Kelch-repeat proteins interacting with the Galpha protein Gpa2 bypass adenylate cyclase for direct regulation of protein kinase A in yeast." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(35): 13034-9.
- Poole, B. and S. Ohkuma** (1981). "Effect of weak bases on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages." J Cell Biol **90**(3): 665-9.
- Powell, B., L. A. Graham and T. H. Stevens** (2000). "Molecular characterization of the yeast vacuolar H⁺-ATPase proton pore." J Biol Chem **275**(31): 23654-60.
- Ptacek, J., G. Devgan, G. Michaud, H. Zhu, X. Zhu, J. Fasolo, H. Guo, G. Jona, A. Breitkreutz, R. Sopko, R. R. McCartney, M. C. Schmidt, N. Rachidi, S. J. Lee, A. S. Mah, L. Meng, M. J. Stark, D. F. Stern, C. De Virgilio, M. Tyers, B. Andrews, M. Gerstein, B. Schweitzer, P. F. Predki and M. Snyder** (2005). "Global analysis of protein phosphorylation in yeast." Nature **438**(7068): 679-84.
- Puig, O., F. Caspary, G. Rigaut, B. Rutz, E. Bouveret, E. Bragado-Nilsson, M. Wilm and B. Seraphin** (2001). "The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification." Methods **24**(3): 218-29.
- Puopolo, K., M. Sczekan, R. Magner and M. Forgac** (1992). "The 40-kDa subunit enhances but is not required for activity of the coated vesicle proton pump." J Biol Chem **267**(8): 5171-6.
- Qi, J. and M. Forgac** (2007). "Cellular environment is important in controlling V-ATPase dissociation and its dependence on activity." J Biol Chem **282**(34): 24743-51.
- Rein, J., M. Voss, W. Blenau, B. Walz and O. Baumann** (2008). "Hormone-induced assembly and activation of V-ATPase in blowfly salivary glands is mediated by protein kinase A." Am J Physiol Cell Physiol **294**(1): C56-65.
- Rein, J., B. Zimmermann, C. Hille, I. Lang, B. Walz and O. Baumann** (2006). "Fluorescence measurements of serotonin-induced V-ATPase-dependent pH changes at the luminal surface in salivary glands of the blowfly *Calliphora vicina*." J Exp Biol **209**(Pt 9): 1716-24.
- Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann and B. Seraphin** (1999). "A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration." Nat Biotechnol **17**(10): 1030-2.
- Rizzo, J. M., M. Tarsio, G. A. Martinez-Munoz and P. M. Kane** (2007). "Diploids heterozygous for a vma13Delta mutation in *Saccharomyces cerevisiae* highlight the importance of V-ATPase subunit balance in supporting vacuolar acidification and silencing cytosolic V1-ATPase activity." J Biol Chem **282**(11): 8521-32.
- Rojas, J. D., S. R. Sennoune, G. M. Martinez, K. Bakunts, C. J. Meininger, G. Wu, D. E. Wesson, E. A. Seftor, M. J. Hendrix and R. Martinez-Zaguilan** (2004). "Plasmalemmal vacuolar H⁺-ATPase is decreased in microvascular endothelial cells from a diabetic model." J Cell Physiol **201**(2): 190-200.

- Rolland, F., J. H. De Winde, K. Lemaire, E. Boles, J. M. Thevelein and J. Winderickx** (2000). "Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process." Mol Microbiol **38**(2): 348-58.
- Ronne, H., M. Carlberg, G. Z. Hu and J. O. Nehlin** (1991). "Protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on cell growth and bud morphogenesis." Mol Cell Biol **11**(10): 4876-84.
- Rubinstein, J. L., J. E. Walker and R. Henderson** (2003). "Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy." EMBO J **22**(23): 6182-92.
- Rubio-Teixeira, M., G. Van Zeebroeck, K. Voordeckers and J. M. Thevelein** (2009). "*Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane nutrient sensors and their role in PKA signaling." FEMS Yeast Res.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich** (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.
- Sambade, M. and P. M. Kane** (2004). "The yeast vacuolar proton-translocating ATPase contains a subunit homologous to the *Manduca sexta* and bovine e subunits that is essential for function." J Biol Chem **279**(17): 17361-5.
- Saroussi, S. and N. Nelson** (2008). "Vacuolar H(+)-ATPase-an enzyme for all seasons." Pflugers Arch **457**(3): 581-7.
- Sasse, F., H. Steinmetz, G. Hofle and H. Reichenbach** (2003). "Archazolids, new cytotoxic macrolactones from *Archangium gephyra* (Myxobacteria). Production, isolation, physico-chemical and biological properties." J Antibiot (Tokyo) **56**(6): 520-5.
- Sautin, Y. Y., M. Lu, A. Gaugler, L. Zhang and S. L. Gluck** (2005). "Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated effects of glucose on vacuolar H⁺-ATPase assembly, translocation, and acidification of intracellular compartments in renal epithelial cells." Mol Cell Biol **25**(2): 575-89.
- Schapiro, F. B. and S. Grinstein** (2000). "Determinants of the pH of the Golgi complex." J Biol Chem **275**(28): 21025-32.
- Schiestl, R. H. and R. D. Gietz** (1989). "High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier." Curr Genet **16**(5-6): 339-46.
- Senoune, S. R., K. Bakunts, G. M. Martinez, J. L. Chua-Tuan, Y. Kebir, M. N. Attaya and R. Martinez-Zaguilan** (2004). "Vacuolar H⁺-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity." Am J Physiol Cell Physiol **286**(6): C1443-52.
- Seol, J. H., A. Shevchenko and R. J. Deshaies** (2001). "Skp1 forms multiple protein complexes, including RAVE, a regulator of V-ATPase assembly." Nat Cell Biol **3**(4): 384-91.
- Shao, E. and M. Forgac** (2004). "Involvement of the nonhomologous region of subunit A of the yeast V-ATPase in coupling and in vivo dissociation." J Biol Chem **279**(47): 48663-70.

- Shao, E., T. Nishi, S. Kawasaki-Nishi and M. Forgac (2003). "Mutational analysis of the non-homologous region of subunit A of the yeast V-ATPase." J Biol Chem **278**(15): 12985-91.
- Sheff, M. A. and K. S. Thorn (2004). "Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast **21**(8): 661-70.
- Smardon, A. M. and P. M. Kane (2007). "RAVE is essential for the efficient assembly of the C subunit with the vacuolar H(+)-ATPase." J Biol Chem **282**(36): 26185-94.
- Smardon, A. M., M. Tarsio and P. M. Kane (2002). "The RAVE complex is essential for stable assembly of the yeast V-ATPase." J Biol Chem **277**(16): 13831-9.
- Stark, M. J. (1996). "Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation." Yeast **12**(16): 1647-75.
- Stearns, T., M. A. Hoyt and D. Botstein (1990). "Yeast mutants sensitive to antimicrotubule drugs define three genes that affect microtubule function." Genetics **124**(2): 251-62.
- Sugajska, E., W. Swiatek, P. Zabrocki, I. Geyskens, J. M. Thevelein, S. Zolnierowicz and S. Wera (2001). "Multiple effects of protein phosphatase 2A on nutrient-induced signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Microbiol **40**(4): 1020-6.
- Sumner, J. P., J. A. Dow, F. G. Earley, U. Klein, D. Jager and H. Wiczorek (1995). "Regulation of plasma membrane V-ATPase activity by dissociation of peripheral subunits." J Biol Chem **270**(10): 5649-53.
- Supek, F., L. Supekova, S. Mandiyan, Y. C. Pan, H. Nelson and N. Nelson (1994). "A novel accessory subunit for vacuolar H(+)-ATPase from chromaffin granules." J Biol Chem **269**(39): 24102-6.
- Takeda, K., M. Cabrera, J. Rohde, D. Bausch, O. N. Jensen and C. Ungermann (2008). "The vacuolar V1/V0-ATPase is involved in the release of the HOPS subunit Vps41 from vacuoles, vacuole fragmentation and fusion." FEBS Lett **582**(10): 1558-63.
- Tamaki, H. (2007). "Glucose-stimulated cAMP-protein kinase A pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*." J Biosci Bioeng **104**(4): 245-50.
- Thaker, Y. R., M. Roessle and G. Gruber (2007). "The boxing glove shape of subunit d of the yeast V-ATPase in solution and the importance of disulfide formation for folding of this protein." J Bioenerg Biomembr **39**(4): 275-89.
- Thevelein, J. M. (1994). "Signal transduction in yeast." Yeast **10**(13): 1753-90.
- Thevelein, J. M., M. Beullens, F. Honshoven, G. Hoebeeck, K. Detremmerie, B. Griewel, J. A. den Hollander and A. W. Jans (1987). "Regulation of the cAMP level in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the glucose-induced cAMP signal is not mediated by a transient drop in the intracellular pH." J Gen Microbiol **133**(8): 2197-205.
- Thevelein, J. M., R. Gelade, I. Holsbeeks, O. Lagatie, Y. Popova, F. Rolland, F. Stolz, S. Van de Velde, P. Van Dijck, P. Vandormael, A. Van Nuland, K. Van Roey, G. Van Zeebroeck and B. Yan (2005). "Nutrient sensing systems for rapid activation of the protein kinase A pathway in yeast." Biochem Soc Trans **33**(Pt 1): 253-6.

- Thomas, B. J. and R. Rothstein** (1989). "Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA." Cell **56**(4): 619-30.
- Thomas, J. H., N. F. Neff and D. Botstein** (1985). "Isolation and characterization of mutations in the beta-tubulin gene of *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **111**(4): 715-34.
- Toda, T., S. Cameron, P. Sass, M. Zoller and M. Wigler** (1987). "Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase." Cell **50**(2): 277-87.
- Tomashek, J. J., J. L. Sonnenburg, J. M. Artimovich and D. J. Klionsky** (1996). "Resolution of subunit interactions and cytoplasmic subcomplexes of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase." J Biol Chem **271**(17): 10397-404.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon** (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Tu, J. and M. Carlson** (1994). "The GLC7 type 1 protein phosphatase is required for glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **14**(10): 6789-96.
- Tudisca, V., V. Recouvreux, S. Moreno, E. Boy-Marcotte, M. Jacquet and P. Portela** (2009). "Differential localization to cytoplasm, nucleus or P-bodies of yeast PKA subunits under different growth conditions." Eur J Cell Biol.
- Uchida, E., Y. Ohsumi and Y. Anraku** (1985). "Purification and properties of H⁺-translocating, Mg²⁺-adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **260**(2): 1090-5.
- van Aelst, L., A. W. Jans and J. M. Thevelein** (1991). "Involvement of the CDC25 gene product in the signal transmission pathway of the glucose-induced RAS-mediated cAMP signal in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." J Gen Microbiol **137**(2): 341-9.
- van der Plaats, J. B.** (1974). "Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate stimulates trehalose degradation in baker's yeast." Biochem Biophys Res Commun **56**(3): 580-7.
- Van Haecht, J. L., M. Bolipombo and P. G. Rouxhet** (1985). "Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* by adhesion: Treatment of the cells by Al ions." Biotechnol Bioeng **27**(3): 217-24.
- Versele, M., J. H. de Winde and J. M. Thevelein** (1999). "A novel regulator of G protein signalling in yeast, Rgs2, downregulates glucose-activation of the cAMP pathway through direct inhibition of Gpa2." EMBO J **18**(20): 5577-91.
- Vitavska, O., H. Merzendorfer and H. Wiczorek** (2005). "The V-ATPase subunit C binds to polymeric F-actin as well as to monomeric G-actin and induces cross-linking of actin filaments." J Biol Chem **280**(2): 1070-6.
- Vitavska, O., H. Wiczorek and H. Merzendorfer** (2003). "A novel role for subunit C in mediating binding of the H⁺-V-ATPase to the actin cytoskeleton." J Biol Chem **278**(20): 18499-505.
- Voss, M., O. Vitavska, B. Walz, H. Wiczorek and O. Baumann** (2007). "Stimulus-induced phosphorylation of vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase by protein kinase A." J Biol Chem **282**(46): 33735-42.

- Wach, A., A. Brachat, C. Alberti-Segui, C. Rebischung and P. Philippsen (1997). "Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **13**(11): 1065-75.
- Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick and N. J. Gay (1982). "Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold." *EMBO J* **1**(8): 945-51.
- Wang, S. Y., Y. Moriyama, M. Mandel, J. D. Hulmes, Y. C. Pan, W. Danho, H. Nelson and N. Nelson (1988). "Cloning of cDNA encoding a 32-kDa protein. An accessory polypeptide of the H⁺-ATPase from chromaffin granules." *J Biol Chem* **263**(33): 17638-42.
- Wang, Y., D. J. Cipriano and M. Forgac (2007). "Arrangement of subunits in the proteolipid ring of the V-ATPase." *J Biol Chem* **282**(47): 34058-65.
- Wang, Y., M. Pierce, L. Schneper, C. G. Guldal, X. Zhang, S. Tavazoie and J. R. Broach (2004). "Ras and Gpa2 mediate one branch of a redundant glucose signaling pathway in yeast." *PLoS Biol* **2**(5): E128.
- Wang, Y., M. Toei and M. Forgac (2008). "Analysis of the membrane topology of transmembrane segments in the C-terminal hydrophobic domain of the yeast vacuolar ATPase subunit a (Vph1p) by chemical modification." *J Biol Chem* **283**(30): 20696-702.
- Wek, R. C., J. F. Cannon, T. E. Dever and A. G. Hinnebusch (1992). "Truncated protein phosphatase GLC7 restores translational activation of GCN4 expression in yeast mutants defective for the eIF-2 alpha kinase GCN2." *Mol Cell Biol* **12**(12): 5700-10.
- Wieczorek, H., K. W. Beyenbach, M. Huss and O. Vitavska (2009). "Vacuolar-type proton pumps in insect epithelia." *J Exp Biol* **212**(Pt 11): 1611-9.
- Wieczorek, H., M. Cioffi, U. Klein, W. R. Harvey, H. Schweikl and M. G. Wolfersberger (1990). "Isolation of goblet cell apical membrane from tobacco hornworm midgut and purification of its vacuolar-type ATPase." *Methods Enzymol* **192**: 608-16.
- Wieczorek, H., M. Putzenlechner, W. Zeiske and U. Klein (1991). "A vacuolar-type proton pump energizes K⁺/H⁺ antiport in an animal plasma membrane." *J Biol Chem* **266**(23): 15340-7.
- Wilkens, S. and M. Forgac (2001). "Three-dimensional structure of the vacuolar ATPase proton channel by electron microscopy." *J Biol Chem* **276**(47): 44064-8.
- Xie, X. S., D. Padron, X. Liao, J. Wang, M. G. Roth and J. K. De Brabander (2004). "Salicylilamide A inhibits the V₀ sector of the V-ATPase through a mechanism distinct from bafilomycin A1." *J Biol Chem* **279**(19): 19755-63.
- Xu, T. and M. Forgac (2000). "Subunit D (Vma8p) of the yeast vacuolar H⁺-ATPase plays a role in coupling of proton transport and ATP hydrolysis." *J Biol Chem* **275**(29): 22075-81.
- Xu, T. and M. Forgac (2001). "Microtubules are involved in glucose-dependent dissociation of the yeast vacuolar [H⁺]-ATPase in vivo." *J Biol Chem* **276**(27): 24855-61.

- Xu, T., E. Vasilyeva and M. Forgac** (1999). "Subunit interactions in the clathrin-coated vesicle vacuolar (H(+))-ATPase complex." *J Biol Chem* **274**(41): 28909-15.
- Xue, Y., M. Batlle and J. P. Hirsch** (1998). "GPR1 encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p Galpha subunit and functions in a Ras-independent pathway." *EMBO J* **17**(7): 1996-2007.
- Yun, C. W., H. Tamaki, R. Nakayama, K. Yamamoto and H. Kumagai** (1998). "Gpr1p, a putative G-protein coupled receptor, regulates glucose-dependent cellular cAMP level in yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochem Biophys Res Commun* **252**(1): 29-33.
- Zabrocki, P., C. Van Hoof, J. Goris, J. M. Thevelein, J. Winderickx and S. Wera** (2002). "Protein phosphatase 2A on track for nutrient-induced signalling in yeast." *Mol Microbiol* **43**(4): 835-42.
- Zhang, J., Y. Feng and M. Forgac** (1994). "Proton conduction and bafilomycin binding by the V0 domain of the coated vesicle V-ATPase." *J Biol Chem* **269**(38): 23518-23.
- Zhang, J., M. Myers and M. Forgac** (1992). "Characterization of the V0 domain of the coated vesicle (H+)-ATPase." *J Biol Chem* **267**(14): 9773-8.
- Zhang, Z., Y. Zheng, H. Mazon, E. Milgrom, N. Kitagawa, E. Kish-Trier, A. J. Heck, P. M. Kane and S. Wilkens** (2008). "Structure of the yeast vacuolar ATPase." *J Biol Chem* **283**(51): 35983-95.
- Zimmermann, B., P. Dames, B. Walz and O. Baumann** (2003). "Distribution and serotonin-induced activation of vacuolar-type H+-ATPase in the salivary glands of the blowfly *Calliphora vicina*." *J Exp Biol* **206**(Pt 11): 1867-76.
- Zuo, J., J. Jiang, S. H. Chen, S. Vergara, Y. Gong, J. Xue, H. Huang, M. Kaku and L. S. Holliday** (2006). "Actin binding activity of subunit B of vacuolar H+-ATPase is involved in its targeting to ruffled membranes of osteoclasts." *J Bone Miner Res* **21**(5): 714-21.
- Zuo, J., S. Vergara, S. Kohno and L. S. Holliday** (2008). "Biochemical and functional characterization of the actin-binding activity of the B subunit of yeast vacuolar H+-ATPase." *J Exp Biol* **211**(Pt 7): 1102-8.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-Diphosphat
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
DIC	engl.: „differential interference contrast“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N'N'-tetraessigsäure
ESI-MS	Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie
F-Aktin	filamentöses Aktin
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (und andere)
G418	Geneticinsulfat
G-Aktin	globuläres Aktin
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GTP	Guanosin-Triphosphat
H89	N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinsulfonamid dihydrochlorid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration

IgG	Immunglobulin G
LB	Luria Bertani / <i>E.coli</i> Vollmedium
Lsg.	Lösung
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
n	Anzahl der Wiederholungen
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid-Hydrat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: „rounds per minute“)
RT	Raumtemperatur
SD	„synthetic dextrose“ / Hefe Synthetisches Minimalmedium
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: „sodium dodecyl sulfate“)
Tab.	Tabelle
TAP	Tandem Affinitäts Reinigung (engl.: „tandem affinity purification“)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N'-Tetramethylethyldiamin
TEV	engl.: „ <i>Tobacco etch virus</i> “
Tgo	<i>Thermococcus gorgonarius</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-ether
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
WT	Wildtyp
x g	-fache Erdbeschleunigung
YPD	„Yeast extract peptone dextrose“ / Hefe Vollmedium
YPDA	„Yeast extract peptone dextrose adeninhemisulfate“ / Hefe Vollmedium
YPG	„Yeast extract peptone galactose“ / Hefe Vollmedium
z. B.	zum Beispiel

Einheiten

Å	Ångström
μ	mikro
Da	Dalton (g/mol)
g	Gramm
h	Stunde
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
m	milli
mA	Milliampere
min	Minute
nm	Wellenlänge in Nanometer
OD	Optische Dichte
pH	latein.: „potentia hydrogenii“
U	Unit
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: „revolutions per minute“)
W	Watt
w/v	Masse pro Volumen
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen

Nukleotide und Aminosäuren sind mit dem Ein-Buchstaben-Code („IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature“) abgekürzt.

8.2. Mascotdaten der Interaktionspartner der V-ATPase Untereinheit C

Die Mascotdaten der ersten TAP Reinigung sind im Folgenden aufgelistet. Als mögliche Interaktionspartner wurden nur die Daten mit mindestens zwei positiven Peptiden und einem Score von über 30 gewertet. In Rot sind die durch ESI-MS identifizierten Peptide gekennzeichnet.

1) Unter Glucose:

V-ATPase Untereinheit A

M_r: 68029; Berechneter pI: 5,17

Sequenzübereinstimmung: 27 %; Score: 148

1	MAGAIENARK	EIKRISLEDH	AESEYGAIYS	VSGPVVIAEN	MIGCAMYELV
51	KVGH DNLVGE	VIR IDGDKAT	IQVYEETAGL	TVGDPVLR TG	KPLSVELGPG
101	LMETIYDGIQ	RPLKAIKEES	QSIYIPRGID	TPALDRTIKW	QFTPGKFQVG
151	DHISGGDIYG	SVFENSLISS	HKILLPPRSR	GTITWIAPAG	EYTLDEKILE
201	VEFDGKKSDF	TLYHTWPVRV	PRPVTEK LSA	DYPLLTGQRV	LDALFPCVQG
251	GTTICIPGAFG	CGK TVISQSL	SKYSNSDAII	YVCGGERGNE	MAEVLMEFPE
301	LYTEMSGTKE	PIMKR TTLVA	NTSNMPVAAR	EASIYTGITL	AEYFRDQGN
351	VSMIADSSSR	WAEALREISG	RLGEMPADQG	FPAYLGAKLA	SFYERAGKAV
401	ALGSPDRTGS	VSIVAAVSPA	GGDFSDPVT	ATLGITQVFW	GLDKKLAQRK
451	HFPSINTSVS	YSK YTNVLNK	FYDSNYPEFP	VLRDRMKEIL	SNAEELEQVV
501	QLVGKSALS	SDK ITLDVAT	LIKEDFLQQN	GYSTYDAFCP	IWKTFDMMRA
551	FISYHDEAQK	AVANGANWSK	LADSTGDVKH	AVSSSKFFEP	SRGEKEVHGE
601	FEKLLSTMQE	RFAESTD			

V-ATPase Untereinheit B

M_r: 57771; Berechneter pI: 4,95

Sequenzübereinstimmung: 63 %; Score: 533

1	MVLSDKELFA	INKKAVEQGF	NVKPRLNYNT	VSGVNGPLVI	LEKVKFPR YN
51	EIVNLTLPDG	TVRQGVLEI	RGDR AIVQVF	EGTSGIDVKK	TTVEFTGESL
101	RIPVSEDMLG	RIFDGSGRPI	DNGPKVFAED	YLDINGSPIN	PYARIYPEEM
151	ISTGVSAIDT	MNSIARGQKI	PIFSASGLPH	NEIAAQICRQ	AGLVRPTKDV
201	HDGHEENFSI	VFAAMGVNLE	TARFFKQDFE	ENGLERTSL	FLNLANDPTI
251	ERIITPR LAL	TAEYLA YQT	ERHVL TILTD	MSSYADALRE	VSAAREEVPG
301	RR GYPGMYT	DLSTIYERAG	RVEGRNGSIT	QIPILTMPND	DITHIPDLT
351	GYITEGQIFV	DRQLHNKGIY	PPINVLPSLS	RLMKSAGEG	MTRKDHGDVS
401	NQLYAK YAIG	KDAAAMKAVV	GEEALSIEDK	LSLEFLEKFE	KTFFITQGAYE
451	DRTVFESLDQ	AWSLLR IYPK	EMLNRISPKI	LDEFYDRARD	DADEDEEDPD
501	TRSSGKKKDA	SQEESLI			

V-ATPase Untereinheit CM_r: 44088; Berechneter pI: 6,24

Sequenzübereinstimmung: 78 %; Score: 841

```

1 ATALYTANDF ILISLPQNAQ PVTAPGSKTD SWFNETLIGG RAFVSDFKIP
51 EFKIGSLDTL IVESEELSKV DNQIGASIGK IIEILQGLNE TSTNAYRTLTP
101 INNMPVPEYL ENFQWQTRKF KLDKSIKDLI TLISNESSQL DADVRYATYAN
151 YNSAKTNLAA AERKKTGDLS VRSLHDIVKP EDFVLNSEHL TTVLVAVPKS
201 LKSDFEKSYE TLSKNVVPAS ASVIAEDAIEY VLFNVHLFKK NVQEF'TTAAR
251 EKFKFIPREFN YSEELIDQLK KEHDSAASLE QSLRVQLVRL AKTAYVDVFI
301 NWFHIKALRV YVESVLRVGL PPHFNKIIEA VPPKNLSKCK SELIDAFGFL
351 GGNAFMKDKK GKINKQDTSI HQYASLVDE YEPFVMIIN L

```

Enolase IIM_r: 46812; Berechneter pI: 5,67

Sequenzübereinstimmung: 22 %; Score: 66

```

1 AVSKVYARSV YDSRGNPTVE VELTTEKGVF RSIVPSGAST GVHEALEMRD
51 EDKSKWMGKG VMNAVNNVNN VIAAAFVKAN LDVKDQKAVD DFLLSLDGTA
101 NKSCLGANAI LGVSMMAARA AAAEKNVPLY QHLADLSKSK TSPYVLPVPF
151 LNVNLGGSHA GGALALQEFM IAPTGAKTFA EAMRIGSEVY HNLKSLTKKR
201 YGASAGNVGD EGGVAPNIQT AEEALDLIVD AIKAAGHDGK VKIGLDCASS
251 EFFFKDGKYDL DFKNPESDKS KWLTVGVELAD MYHSLMKRYP IVSIEDPFAE
301 DDWEAWSHFF KTAGIQIVAD DLTVTNPARI ATAIEKKAAD ALLLKVNQIG
351 TLSESIKAAQ DSFAANWGMV VSHRSGETED TFIADLVVGL RTGQIKTGAP
401 ARSERLAKLN QLLRIIEEEL GKAVYAGENF HHGDKL

```

EnolaseM_r: 46845; Berechneter pI: 6,16

Sequenzübereinstimmung: 18 %; Score: 43

```

1 MAVSKVYARS VYDSRGNPTV EVELTTEKGV FRSIVPSGAS TGVHEALEMR
51 DGDKSKWMGK GVLHAVKNVN DVIAPAFVKA NIDVKDQKAV DDFLISLDGT
101 ANKSKLGANA ILGVSLAASR AAAAEKNVPL YKHLADLSKS KTSPYVLPVP
151 FLNVNLGGSH AGGALALQEF MIAPTGAKTFA AEALRIGSEV YHNLKSLTKK
201 RYGASAGNVG DEGGVAPNIQ TAEALDLIV DAIKAAGHDG KIKIGLDCAS
251 SEFFFKDGKYD LDFKNPNSDK SKWLTGPQLA DLYHSLMKRY PIVSIEDPFA
301 EDDWEAWSHF FKTAGIQIVA DDLTVTNPKR IATAIEKKA DALLLKVNQI
351 GTLSESIKAA QDSFAAGWGV MVSHRSGETE DTFIADLVVGL LRTGQIKTGA
401 PARSERLAKL NQLLRIIEEEL GDNAVYAGEN FHHGDKL

```

Glyceraldehyd-3-Phosphat DehydrogenaseM_r: 35940; Berechneter pI: 6,46

Sequenzübereinstimmung: 15 %; Score: 123

```

1 MVRVAINGFG RIGRLVMRIA LQRKNVEVVA LNDFPISNDY SAYMFKYDST
51 HGRYAGEVSH DDKHIIVDGH KIATFQERDP ANLPWASLNI DIAIDSTGVF
101 KELDTAQKHI DAGAKKVIT APSSTAPMFV MGVNEEKYTS DLKIVSNASC
151 TTNCLAPLAK VINDAFGIEE GLMTTVHSMT ATQKTVDGPS HKDWRGGRTA
201 SGNIIPSSTG AAKAVGKVLPELQGKLTGMA FRVPTVDVSV VDLTVKLNKE
251 TTYDEIKKVV KAAAEGKLGK VLGYTEDAVV SSDFLGDSNS SIFDAAAGIQ
301 LSPKFKLVS WYDNEYGYST RVVDLVEHVA KA

```

V-ATPase Untereinheit EM_r: 26324; Berechneter pI: 5,33

Sequenzübereinstimmung: 59 %; Score: 306

```

1 SSAITALTPN QVNDELNKMQ AFIRKEAEEK AKEIQLKADQ EYEIEKTNIV
51 RNETNNIDGN FKSKLKAAML SQQITKSTIA NKMRLKVLSA REQSLDGIFE
101 ETKEKLSGIA NNRDEYKPIIL QSLIVEALLK LLEPKAIVKA LERDVDLIES
151 MKDDIMREYG EKAQRAPLEE IVISNDYLNK DLVSGGVVVS NASDKIEINN
201 TLEERLKLLLS EEALPAIRLE LYGPSKTRKF FD

```

V-ATPase Untereinheit HM_r: 12705; Berechneter pI: 8,96

Sequenzübereinstimmung: 37 %; Score: 102

```

1 MSQKNGIATL LQAEKEAHEI VSKARKYRQD KLKQAKTDAA KEIDSYKIQK
51 DKELKEFEQK NAGGVGELEK KAEAGVQGEL AEIKKIAEKK KDDVVKILIE
101 TVIKPSAEVH INAL

```

2) Unter Galactose:

V-ATPase Untereinheit AM_r: 119258; Berechneter pI: 5,83

Sequenzübereinstimmung: 21 %; Score: 314

1	MAGAIENARK	EIKRISLEDEH	AESEYGAIYS	VSGPVVIAEN	MIGCAMYELV
51	KVGH DNLVGE	VIR IDGDKAT	IQV YEETAGL	TVG DPVLR TG	KPL SV ELG PG
101	LMET IYDGIQ	RPL KA IK EE S	QSI YIPRGID	TPAL DR TI KW	QFT PG K FQ VG
151	DHISGGDIY G	SVFENSLISS	HKILLPPRSR	GTIT WIAPAG	EYTL DEKILE
201	VEFD GK K SDF	TLYHTWPVRV	PRPVTEK LSA	DYPL LTGQ RV	LDAL FPC VQ G
251	GTTCIPGAF G	CGK TVIS QSL	SKY SNSDAII	YVGC FA KGT N	VL MAD GSIE C
301	IENIEVGN KV	MGKDGRPREV	IKLPRGRE TM	YSV VQ KSQ HR	AHKSDSSRE V
351	PELLK F TCNA	THELVV R TPR	SVRRLS R TIK	GVEY F EVIT F	EMGQ K KAPD G
401	RIVELVKE VS	KSYPISEG PE	RANELVES YR	KAS N KAY F EW	TIEAR D LSL L
451	GSHVRKAT YQ	TYAPIL Y END	HFFD Y M Q KS K	FHL T IEG P K V	LAYLL G LW I G
501	DGLSDRAT F S	VDSRDT S LME	RVTE Y AE K LN	LCAE Y KDR K E	PQVAK T VN L Y
551	SKVVRG N GIR	NNLNTEN P LW	DAIV G L G FL K	DG V KNIP S FL	STDN I G T RET
601	FLAGLIDSD G	YVTDEHG I KA	TIK T IHT S VR	DGL V SLAR S L	GLV V SVNA E P
651	AKVDMNG T KH	KISYAI Y MSG	GDVLL N VLS K	CAG S KK F RP A	PAA A FA R EC R
701	GFYFELQ E LK	EDDY Y GIT L S	DDSD H Q F LL A	NQ V VH N CG E	RGNE M AEV L M
751	EFPELY T EMS	GTKEP I M K R T	TL VANTS N MP	VA AREAS I Y T	GIT LA E Y F RD
801	QK AV NS M IAD	SS SRWAEAL R	EISGR L G E MP	AD Q G F P AY L G	AK LAS F Y E RA
851	GKAVALG S PD	RTGSVS I VAA	VSPAG G DFSD	PVT T TAT L GIT	QVFW G L D KK L
901	AQRKH F PSIN	TSVSY S KY T N	VLN K F Y DS N Y	PE FP V LR D RM	KE IL S NA E E L
951	EQ V V Q L V G K S	ALS D SD K IT L	DV AT L IK E DF	LQ Q NGY S TY D	AF C PIW K TF D
1001	MM R A F IS Y HD	EA Q K AVANGA	NWS K LAD S T G	DVK H AV S SS K	FF E PSR G E K E
1051	VHGE F E K LLS	TMQ E R F A E ST	D		

Pyruvat KinaseM_r: 54916; Berechneter pI: 7,56

Sequenzübereinstimmung: 6 %; Score: 33

1	MSRLERL T SL	NVVAGSD L RR	TSIIG T IG P K	TNN P ETL V AL	RKAGLN I VR M
51	NFSHG S Y E Y H	KSVIDN A RKS	EELY P GR P LA	IALD T K G PE I	RTG T TTND V D
101	YPIPP N HE M I	FTTDD K Y A KA	CDDK I MY V DY	KNIT K VIS A G	RII Y VDD G V L
151	SFQ V LE V V D D	KTLK V KAL N A	GKIC S H K GV N	LP GT D V D L P A	L SE K D K E D L R
201	FGV K NG V H M V	FASF I RT A ND	VL T IRE V L G E	Q G K D V K I I V K	IEN Q Q G V N N F
251	DEIL K V T D G V	MVARG D L G IE	IPAP E V L AV Q	KK L IA K SN L A	G K P V ICAT Q M
301	LES M T Y N P RP	TRAEV S D V GN	AILD G AD C V M	LS G ET A K G NY	PINAV T TM A E
351	TAVIA E QA I A	YLP N Y D DM R N	CT P K P T S T T E	TVAAS A V A AV	FE Q K A K A I I V
401	L ST S GT T PR L	VSK Y RP N CP I	IL V TR C PR A A	R F SH L Y R GV F	PF V FE K EP V S
451	DWTDD V E A R I	N F G I E K A K E F	GIL K K G D T Y V	SI Q G F K A G A G	HS N T L Q V S T V

V-ATPase Untereinheit BM_r: 57771; Berechneter pI: 4,95

Sequenzübereinstimmung: 56 %; Score: 426

```

1  MVLSDKELFA  INKKAVEQGF  NVKPRLNYNT  VSGVNGPLVI  LEKVKFPRYN
51  EIVNLTLPDG  TVRQQVLEI  RGDRAIVQVF  EGTSGIDVKK  TTVEFTGESL
101 RIPVSEDLG  RIFDGSRPI  DNGPKVFAED  YLDINGSSPIN  PYARIYPEEM
151 ISTGVSAIDT  MNSIARGQKI  PIFSASGLPH  NEIAAQICRQ  AGLVRPTKDV
201 HDGHEENFSI  VFAAMGVNLE  TARFFKQDFE  ENGLERTSL  FLNLANDPTI
251 ERIITPRLAL  TTAEYLAYQT  ERHVLTILTD  MSSYADALRE  VSAAREEVPG
301 RRGYPGYMYT  DLSTIYERAG  RVEGRNGSIT  QIPILTMPND  DITHPIPDLT
351 GYITEGQIFV  DRQLHNKGIY  PPINVLPSLS  RLMKSAIGEG  MTRKDHGDVS
401 NQLYAKYAIG  KDAAAMKAVV  GEALSIEDK  LSLEFLEKFE  KTFITQGAYE
451 DRTVFESLDQ  AWSLLRIYPK  EMLNRISPKI  LDEFYDRARD  DADEDEEDPD
501 TRSSGKKKDA  SQEESLI

```

V-ATPase Untereinheit CM_r: 44088; Berechneter pI: 6,24

Sequenzübereinstimmung: 76 %; Score: 900

```

1  ATALYTANDF  ILISLPQNAQ  PVTAPGSKTD  SWFNETLIGG  RAFVSDFKIP
51  EFKIGSLDTL  IVESEELSKV  DNQIGASIGK  IIEILQGLNE  TSTNAYRTLP
101 INNMPVPEYL  ENFQWQTRKF  KLDKSIKDLI  TLISNESSQL  DADVRATYAN
151 YNSAKTNLAA  AERKKTGDLS  VRSLHDIVKP  EDFVLNSEHL  TTVLVAVPKS
201 LKSDFEKSYE  TLSKNVVPAS  ASVIAEDAEY  VLFNVHLFKK  NVQEFTTAAR
251 EKKFIPREFN  YSEELIDQLK  KEHDSAASLE  QSLRVQLVRL  AKTAYVDVFI
301 NWFHIKALRV  YVESVLRYGL  PPHFNIKIIA  VPPKNLSKCK  SELIDAFGFL
351 GGNAFMKDKK  GKINKQDTSL  HQYASLVDTE  YEPFVMYIIN  L

```

Enolase IIM_r: 46812; Berechneter pI: 5,67

Sequenzübereinstimmung: 27 %; Score: 55

```

1  AVSKVYARSV  YDSRGNPTVE  VELTTEKGVF  RSIVPSGAST  GVHEALEMRD
51  EDKSKWMKGK  VMNAVNNVNN  VIAAAFVKAN  LDVKDQKAVD  DFLLSLDGTA
101 NKSKLGANAI  LGVSMAAARA  AAAEKNVPLY  QHLADLSKSK  TSPYVLPVPF
151 LNVLNGGSHA  GGALALQEFM  IAPTGAKTFA  EAMRIGSEVY  HNLKSLTKKR
201 YGASAGNVGD  EGGVAPNIQT  AEEALDLIVD  AIKAAGHDGK  VKIGLDCCASS
251 EFFKDGKYDL  DFKNPESDKS  KWLTGVELAD  MYHSLMKRYP  IVSIEDPFAE
301 DDWEAWSHFF  KTAGIQIVAD  DLTVTNPARI  ATAIEKKAAD  ALLLKVNQIG
351 TLSESIKAAQ  DSFAANWGVM  VSHRSGETED  TFIADLVVGL  RTGQIKTGAP
401 ARSERLAKLN  QLLRIEEEELG  DKAVYAGENF  HHGDKL

```

EnolaseM_r: 46845; Berechneter pI: 6,16

Sequenzübereinstimmung: 20 %; Score: 44

```

1 MAVSKVYARS VYDSRGNPTV EVELTTEKGV FRSIVPSGAS TGVHEALEMR
51 DGDKSKWMGK GVLHAVKQVN DVIAPAFVKA NIDVKDQKAV DDFLISLDGT
101 ANKSKLGANA ILGVSLAASR AAAAEKNVPL YKHLADLSKS KTSPYVLPVP
151 FLNVLNGGSH AGGALALQEF MIAPTGAKTF AEALRIGSEV YHNLKSLTKK
201 RYGASAGNVG DEGGVAPNIQ TAEERALDLIV DAIKAAGHDG KIKIGLDCAS
251 SEFFKDGKYD LDFKNPNSDK SKWLTGPQLA DLYHSLMKRY PIVSIEDPFA
301 EDDWEAWSHF FKTAGIQIVA DDLTVTNPKR IATAIEKKAA DALLLKVNQI
351 GTLSESIKAA QDSFAAGWGV MVSHRSGETE DTFIADLVVG LRTGQIKTGA
401 PARSERLAKL NQLLRIEEEEL GDNAVFAGEN FHHGDKL

```

Glyceraldehyd-3-Phosphat DehydrogenaseM_r: 35940; Berechneter pI: 6,46

Sequenzübereinstimmung: 12 %; Score: 50

```

1 MVRVAINGFG RIGRLVMRIA LQRKNVEVVA LNDFPISNDY SAYMFKYDST
51 HGRYAGEVSH DDKHIIVDGH KIATFQERDP ANLPWASLNI DIAIDSTGVF
101 KELDTAQKHI DAGAKKVIT APSSSTAPMFV MGVNEEKYTS DLKIVSNASC
151 TTNCLAPLAK VINDAFGIEE GLMTTVHSMT ATQKTVDGPS HKDWRGGRTA
201 SGNIIPSSTG AAKAVGKVLV ELQGKLTGMA FRVPTVDVSV VDLTVKLNKE
251 TTYDEIKKVV KAAAEGKLG VLGYTEDAVV SSDFLGDSNS SIFDAAAGIQ
301 LSPKFVKLVS WYDNEYGYST RVVDLVEHVA KA

```

V-ATPase Untereinheit EM_r: 26324; Berechneter pI: 5,33

Sequenzübereinstimmung: 46 %; Score: 99

```

1 SSAITALTPN QVNDELNMQ AFIRKEAEEK AKEIQLKADQ EYEIEKTNIV
51 RNETNNIDGN FKSKLKKAML SQQITKSTIA NKMRLKVLSA REQSLDGIFE
101 ETKEKLSGIA NNRDEYKPIL QSLIVEALLK LLEPKAIVKA LERDVDLIES
151 MKDDIMREYG EKAQRAPLEE IVISNDYLNK DLVSGGVVVS NASDKIEINN
201 TLEERLKLLLS EEALPAIRLE LYGPSKTRKF FD

```

8.3. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Andrea Albertmelcher
geb. Kosthorst
Anschrift: Berliner Str. 8
49176 Hilter
Kontakt: 0179/7553267
albertmelcher@web.de
Geburtsdatum: 18.03.1977
Geburtsort: Hamminkeln
Familienstand: verheiratet

Studium und Ausbildung

2005-2010 Promotion an der Universität Osnabrück
Wissenschaftliche Mitarbeiterin im SFB 431 am Fachbereich
Biologie/Chemie, Abteilung Tierphysiologie
Thema: „Reversible Dissoziation der V-ATPase bei der Hefe
Saccharomyces cerevisiae“

1998-2004 Studium der Biologie an der Universität Bielefeld
Abschluss: Diplom-Biologin
Diplomarbeit angefertigt am Fachbereich Biologie, Abteilung
Gentechnologie und Mikrobiologie
Thema: „Stabilität und Transfer von Plasmiden in *Clavibacter
michiganensis* subsp. *michiganensis*“

1997 Mariengymnasium Bocholt
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Publikationen

Albertmelcher, A., O. Vitavska, M. Huss und H. Wiczorek (2010). „Reversible disassembly of the yeast V-ATPase revisited“ (Manuskript nahezu fertig gestellt)

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Danke sagen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Helmut Wiczorek möchte ich danken, dass ich meine Promotion unter seiner Betreuung durchführen durfte. Hierbei bin ich ihm nicht nur dankbar für die Bereitstellung des interessanten Themas sondern auch für die vielen fruchtbaren Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Aber vor allem möchte ich mich für das von ihm in mich gesetzte Vertrauen bedanken. Ich hätte keinen besseren Doktorvater finden können. Danke!

Prof. Dr. Jürgen Heinisch danke ich für die Übernahme des Zweitgutachters und der bereitwilligen Nutzung der Gerätschaften in der Genetik. Danke!

Dr. Hans-Peter Schmitz danke ich für die Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie, aber auch für die vielen kleinen und großen Hilfestellungen während meiner Promotion und der Entdeckung der Hefe. Danke!

Dr. Olga Vitavska danke ich für die vielen nicht nur wissenschaftlichen Gespräche, die mir den Alltag im Labor versüßt haben. Danke!

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Tierphysiologie möchte ich mich für die schöne Zeit bedanken. Vor allem den Bewohnern des Südlabors sage ich Danke für die vielen geselligen Stunden, bei denen der Spaß nicht zu kurz kam. Auch möchte ich mich insbesondere bei den Mädels für die schöne Zeit bedanken, die wir nicht nur im Labor miteinander verbracht haben. Danke!

Mein besonderer Dank gilt auch den Studenten, die ich während meiner Promotion betreuen durfte und die auf diesem Wege auch ihren Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben. Danke!

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Genetik möchte ich mich für die ständige Hilfsbereitschaft bei allen möglichen Anfragen meinerseits bedanken. Danke!

Mein Dank gilt natürlich auch meinen Eltern für die Unterstützung während des Studiums aber auch während der Promotion. Ich danke euch für euer Vertrauen und für die Liebe, die ihr mir schenkt. Danke!

Der größte Dank aber gebührt meinem Mann Philipp, der mir während der ganzen Zeit zur Seite gestanden hat und mir immer wieder den Rücken gestärkt hat. Ich danke dir für all deine Liebe und Hilfsbereitschaft. Ich liebe dich!

10. Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise entgeltlich / unentgeltlich geholfen.

1. Im Rahmen von Abschlussarbeiten wurde ein Teil der Laborarbeiten gemeinsam mit Studenten durchgeführt. Dabei sind die Abbildungen 4.16, 4.17, 4.25 und 4.26 in Kooperation mit Anna Lürick und Oliver Birkholz entstanden.
2. Im Rahmen eines Studentischen Aushilfsjobs wurde mir von Anna Lürick bei den Laborarbeiten für die Erstellung der Abbildungen 4.13, 4.14, 4.18 und 4.23 geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlichen materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)