

Wechselwirkungen von Bafilomycin, Concanamycin und Apicularen mit der V-ATPase

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Osnabrück

Christin Osteresch

Wallenhorst, November 2012

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	.1
1.1	Ionentranslozierende ATPasen	1
1.2	Zur Struktur der V-ATPase	3
1.2	2.1 Der Aufbau des V ₁ -Komplexes	4
1.2	2.2 Der Aufbau des V ₀ -Komplexes	5
	1.2.2.1 Die Untereinheit a des V ₀ -Komplexes	7
	1.2.2.2 Die Proteolipiduntereinheiten des V ₀ -Komplexes	9
1.2	2.3 Die Assemblierung der V-ATPase	11
1.3	Zur Funktion der V-ATPase	12
1.3	B.1 Der Mechanismus des Protonentransports	12
1.3	Die Regulation der V-ATPase	14
1.3	B.3Die physiologische und pathophysiologische Bedeutung der V-ATPase der Säuger	15
1.4	Inhibitoren der V-ATPase	17
1.4	1.1 Die Inhibitor-Klasse der Plecomakrolide	17
1.4	1.2 Die Inhibitor-Klasse der Archazolide	20
1.4	Die Benzolacton Enamide	21
1.5	Modellorganismen der V-ATPase	23
1.5	Die V-ATPase im Mitteldarm von <i>Manduca sexta</i>	23
1.5	5.2 Die V-ATPase von Saccharomyces cerevisiae	24
1.6	Ziele dieser Arbeit	25
2	MATERIAL UND METHODEN	27
2.1	Material	27
2.1	.1 Chemikalien, Reagenzien und Materialien	27
2.1	.2 Antikörper	27
2.1	.3 Inhibitoren	28
2.1	.4 Versuchstiere	28
2.1	.5 Kulturmedien	28
2.1	.6 Escherichia coli Stämme	29
2.1	.7 Saccharomyces cerevisiae Stämme	29
2.1	.8 Plasmide	30
2.1	.9 Oligonukleotide	32
2.2	Molekularbiologische Methoden	33
2.2	Polymerase-Kettenreaktion	33
2.2	2.2 Gerichtete Mutagenese	33
2.2	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	33
2.2	Plasmidisolierung aus <i>S. cerevisiae</i>	34
2.2	2.5 Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	34

2.2.6	Restriktionsverdau und Ligation von DNA	34
2.2.7	Agarosegelelektrophorese	35
2.2.8	Reinigung und Gelextraktion von DNA	35
2.2.9	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	35
2 2 10	Transformation von <i>S</i> cerevisiae mittels Elektroporation	35
2.2.11	Transformation von <i>S</i> cerevisiae mittels Freeze"-Methode	36
2.2.12	Kreuzung hanloider Hefestämme zur Herstellung von Mehrfachdeletionsmutanten	36
2.2.12	2.1 Sporulation von diploiden Hefestämmen	37
2.2.1	 2.1 Sportauton von approach notestammenten 2.2 Verifizierung der Mehrfachdeletionen mittels PCR 	37
2.2.1	 Partine and the interface of the interface o	38
2.2.1	Wachstumsteet	38
2.2.13 2.2.13	Sonstige Methoden	30
2.2.17	Sonstige Methoden	57
2.3 Bi	ochemische Methoden	39
231	Reinigung des V_1V_0 -Holoenzyms des V_0 - und des V_1 -Komplexes aus <i>Manduca</i>	•
2.5.1	sexta	39
232	Hefevakuolennränaration	39
2.3.2	Proteinhestimmung mit Amidoschwarz	40
2.5.5 231		0 //0
2.3.4	SDS Calalaktronhorasa	10
2.3.5	Wastern Plat	40
2.3.0	Western Blot	41
2.3.0	2 Incompariser	41
2.3.0	0.2 Immuniarbung	41
2.3.7	V-A I Pase-Aktivitätstest und Phosphätbestimmung	41
2.3.8	Markierungsversuche mit radioaktiven, photoaktivierbaren Inhibitoren	42
2.3.9	Massenspektrometrie	43
2.3.10	Minimum-Energie-Kalkulation für D-Concanolid	44
3 ER(GEBNISSE	45
3.1 No	eue PAL-Derivate von Bafilomycin, Concanamycin und Apicularen zur Analyse	
de	er Inhibitor-Bindestellen an der V-ATPase	45
3.1.1	Hemmung des V ₁ V ₀ Holoenzyms von <i>M. sexta</i> durch die neuen PAL-Inhibitoren	45
3.1.2	Eigenschaften der Diazirinylgruppe	47
3.1.3	Bindung der radioaktiven PAL-Inhibitoren an das V_1V_0 -Holoenzym, den V_0 - und	
	den V ₁ -Komplex	48
3.1.4	Labeleffizienz der radioaktiven PAL-Inhibitoren an den V_0 -Untereinheiten a und c	52
3.2 Ei	ngrenzung der Bindestellen von Bafilomycin, Concanamycin und Apicularen	54
3.2.1	Die Bafilomycin-Bindestelle	54
3.2.2	Die Concanamycin-Bindestelle	56
3.2.3	Die Apicularen-Bindestelle	58
2.2.0	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
3.3 Ef	ffekt von F-PAL-Inhibitoren auf die V-ATPase-Aktivität von <i>M. sexta</i>	60
3.4 G	enetische Manipulationen der V-ATPase-Untereinheit a von <i>S. cerevisiae</i>	63
3.4.1	Gegenseitige Komplementationsfähigkeit von Vph1 und Stv1	63

3	.4.2	Generation von Hybrid-a-Untereinheiten aus Vph1 und den humanen Isoformen a3
3	.4.3	Expression der Hybrid-Untereinheiten Vph1/a3 und Vph1/a4 in <i>S. cerevisiae</i> 67
3.5 3	Ko r .5.1	nplementationsstudien in <i>S. cerevisiae</i> : Austausch der c-Untereinheit (Vma3) 69 Expression der c-Untereinheiten der V-ATPasen von <i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i>
3	52	und Manduca sexta 69 Finfluss von Bafilomycin und Anicularen auf die Hybrid-V-ATPasen 71
3	.5.3	Expression der humanen c-Untereinheit und der Hybrid-Untereinheit Vph1/a4 in einer Deletionsmutante für Vma3 und Vph1
3.6	Mu	tagenese der essentiellen Glutamate im Proteolipidring der V-ATPase von
	<i>S. c</i>	erevisiae74
3	.6.1	Austausch des essentiellen Glutamats in der c-Untereinheit (Vma3) der V-ATPase von <i>S. cerevisiae</i>
3	.6.2	Austausch der essentiellen Glutamate in den drei Proteolipid-Untereinheiten Vma3, Vma11 und Vma16 von <i>S. cerevisiae</i>
4	DISK	USSION
4.1 4	Neu .1.1	Erkenntnisse zum Bindeort und zum Wirkmechanismus der Plecomakrolide 78 Die Plecomakrolide wirken zwischen den Untereinheiten a und c des V _O -Komplexes.
1	1 2	
4	.1.3	Überlegungen zur Anzahl der Plecomakrolid-Bindestellen an der V-ATPase
4.2 4 4	Ers .2.1 .2.2	te nähere Erkenntnisse zur Apicularen-Bindung im V₀-Komplex
4.3	Neu	e Mutationsstudien am Vo-Komplex von <i>Saccharomvces cerevisiae</i>
4 4	.3.1	Integration speziesfremder c-Untereinheiten in die V-ATPase von <i>S. cerevisiae</i> 94 Erste Versuche zur Integration von Hybrid-a-Untereinheiten in die V-ATPase von
4	.3.3	S. cerevisiae
5	ZUSA	AMMENFASSUNG102
6	LITE	RATURVERZEICHNIS104
7	ANH	ANG115
7.1	Abl	kürzungsverzeichnis115
7.2	Pub	likationen116
7.3	Leb	enslauf

7.4	Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistung 11	8
8	DANKSAGUNG11	9

1 Einleitung

Krebs und Osteoporose sind nur zwei von vielen Gründen, an der Entwicklung spezifischer Hemmstoffe für die V-ATPase zu forschen. In beiden Fällen ist die V-ATPase an der Ansäuerung der extrazellulären Umgebung beteiligt und treibt so die Metastasierung von Krebszellen bzw. den Abbau von Knochengewebe durch die Osteoklasten an (Überblick in Hinton *et al.*, 2009). Verbindungen zwischen verschiedenen Erkrankungen und der Funktion der V-ATPase werden immer häufiger festgestellt. Demzufolge sind V-ATPase-spezifische Inhibitoren und die V-ATPase selbst als potentielles Angriffsziel für Therapeutika mittlerweile häufig Gegenstand der aktuellen Forschung (Bowman und Bowman, 2005; Fais *et al.*, 2007; Niikura, 2006; Yuan *et al.*, 2010). Um zukünftig hochspezifische und effiziente Medikamente entwickeln zu können, ist die Aufklärung der Bindestellen und Wirkmechanismen von Hemmstoffen von zentraler Bedeutung.

1.1 Ionentranslozierende ATPasen

Die V-ATPase (vakuoläre H⁺-ATPase) gehört neben den F- und P-ATPasen zur Klasse der ionentranslozierenden ATPasen, die aus der Hydrolyse von ATP Energie für den Aufbau elektrochemischer Gradienten über Membranen gewinnen (Pedersen und Carafoli, 1987). Trotz ihrer Gemeinsamkeiten gibt es große funktionelle und strukturelle Unterschiede zwischen P-, F- und V-ATPasen.

Ein besonderes Charakteristikum der P-ATPasen, die sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten an verschiedensten Transportprozessen beteiligt sind, ist die Bildung eines phosphorylierten Intermediats während der ATP-Hydrolyse (Pedersen und Carafoli, 1987). Einer der bekanntesten Vertreter der sehr großen Membranproteinfamilie ist die Na⁺/K⁺-ATPase, die als erste ionentranslozierende ATPase bereits 1957 entdeckt wurde (Skou, 1957). Von der ATP-Hydrolyse-Energie angetrieben generiert und erhält sie einen elektrochemischen Gradienten für Na⁺ und K⁺ über die Plasmamembranen tierischer Zellen, was u. a. die Grundlage für die elektrische Erregbarkeit von Nervenzellen und Na⁺-gekoppelte sekundäre Transportmechanismen ist (Überblick in Pedersen, 2007). Die Kristallisation der Na⁺/K⁺-ATPase, die aus einer katalytischen α - und einer β -Untereinheit aufgebaut ist und zudem von einer dritten Untereinheit, der γ -Untereinheit, reguliert werden kann, lieferte neue Informationen über ihren Mechanismus, der hier jedoch nicht näher erläutert werden soll (Morth *et al.*, 2007). Neben der Na⁺/K⁺-ATPase ist die an der Muskelkontraktion beteiligte Ca²⁺-ATPase im sarkoplasmatischen Retikulum eine der am intensivsten untersuchten P-ATPasen (Pedersen, 2007).

F-ATPasen funktionieren, im Gegensatz zu den P- und V-ATPasen, unter aeroben Zellbedingungen in Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten als ATP-Synthasen, wobei sie den durch die Elektronentransportkette generierten elektrochemischen Ionengradienten an die Synthese von ATP aus ADP und P_i koppeln. Unter anaeroben Bedingungen kann die F-ATPase in bakteriellen Membranen auch umgekehrt agieren und die aus der ATP-Hydrolyse gewonnene Energie zum Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten nutzen (Muench et al., 2011; von Ballmoos et al., 2009; Wieczorek et al., 1999a). F-ATPasen sind, wie auch die V-ATPasen, in zwei Komplexen organisiert und zeichnen sich durch einen Rotationsmechanismus aus (Überblick in Muench et al., einem peripheren, ATP-synthetisierenden 2011). Die F-ATPase besteht aus oder -hydrolysierenden F₁-Komplex und dem membranständigen F₀-Komplex, der den Ionentransport über die Membran ermöglicht (Muench et al., 2011). Die Zusammensetzung der Komplexe aus verschiedenen Untereinheiten variiert in Eukaryoten und Prokaryoten. Die F-ATPase von Escherichia coli weist bei insgesamt etwa 530 kDa eine Stöchiometrie von $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ für die F₁-Untereinheiten und von ab₂c₁₀ für die F₀-Untereinheiten auf (Muench et al., 2011). Bei der ATP-Synthese folgen die Protonen ihrem elektrochemischen Gradienten durch den F_O-Komplex und treiben den aus den Untereinheiten c, γ und ε bestehenden Rotor an. Dabei erreichen und verlassen die Protonen den aus zehn c-Untereinheiten zusammengesetzten rotierenden Ring über die statische a-Untereinheit. Die Bindung an die c-Untereinheiten wird durch die Protonierung und Deprotonierung des essentiellen Aspartats in jeder c-Untereinheit vermittelt. Über die peripheren, statischen δ - und b-Untereinheiten und die zentralen Untereinheiten γ und ε ist der membranständige Motor mit dem ATP-Synthese-Motor aus dem $\alpha_3\beta_3$ -Hexamer verbunden. Durch die Rotation des Rotors werden über die γ -Untereinheit Konformationsänderungen in den drei
ß-Untereinheiten und damit Affinitätsänderungen der dort enthaltenen Nukleotidbindestellen induziert. Durch diesen Mechanismus werden ADP und Pi gebunden sowie ATP synthetisiert und freigesetzt (Überblick in von Ballmoos et al., 2009).

V-ATPasen gehören ATPasen Die ebenfalls zu den mit einem Rotationsmechanismus. Sie kommen praktisch in jeder eukaryotischen Zelle vor, wo sie unter ATP-Verbrauch Protonengradienten aufbauen und damit sekundär aktive Transportprozesse energetisieren und den pH-Wert im Zytosol sowie in den Organellen regulieren (Beyenbach und Wieczorek, 2006). Im Gegensatz zu den F-ATPasen wurde für die V-ATPasen die Möglichkeit zur Synthese von ATP bisher nur in vitro gezeigt (Hirata et al., 2000). Dennoch ähneln sich beide Enzyme sowohl in ihrer Struktur als auch Funktion als Protonenpumpen, sodass in evolutionsgeschichtlichen in ihrer Untersuchungen von einem gemeinsamen Vorläufer ausgegangen wird (Überblick in Müller und Grüber (2003) und Mulkidianian et al. (2007)). Auch die V-ATPase, die eine Molekularmasse von ca. 900 kDa besitzt, ist aus zwei Komplexen aufgebaut: dem zvtosolischen, ATP-hydrolysierenden V1-Komplex und dem membranständigen, protonentransportierenden V₀-Komplex. Dabei sind beide wiederum aus verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt (Forgac, 2007). Die genaue Struktur und Funktion der V-ATPase werden in den folgenden Abschnitten beschrieben. Als ATP-verbrauchendes Enzym verfügt die V-ATPase über einen Regulationsmechanismus, bei dem die Enzym-Aktivität durch die reversible Dissoziation des V1-Komplexes vom V0-Komplex reguliert wird (Überblick in Huss et al., 2011). Auch darauf wird später näher eingegangen.

In die Gruppe der rotierenden ATPasen wird neben den F- und V-ATPasen als ein weiteres Mitglied die A-ATPase eingeordnet, die hier jedoch nur kurz Erwähnung finden soll. In verschiedenen Archaeen und Bakterien vorkommend kann die A-ATPase sowohl als ATP-Synthase als auch als Ionenpumpe fungieren. Genau wie die F- und V-ATPasen besteht die A-ATPase aus zwei Komplexen, einem A₁- und einem A₀-Komplex, jeweils mit mehreren Untereinheiten (Überblick in Muench *et al.*, 2011). Es wird davon ausgegangen, dass A-ATPasen aus dem gleichen evolutiven Vorläufer wie die F- und V-ATPasen entstanden sind, wobei die A-ATPasen eine größere Ähnlichkeit zu den V-ATPasen aufweisen (Müller und Grüber, 2003).

1.2 Zur Struktur der V-ATPase

Die Aufklärung der Topologie der V-ATPase ist seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Holoenzyms sowie des V₁- und des V₀-Komplexes führten zusammen mit dreidimensionalen Rekonstruktionen der Abbildungen zu immer genaueren Strukturmodellen der V-ATPase (Überblick in Wilkens et al., 2005). In den letzten Jahren brachten verbesserte 3D-Rekonstruktionen der V-ATPase weiteres Licht ins Dunkel: Für die V-ATPase der Hefe Saccharomyces cerevisiae konnte mit Hilfe der Analyse von durch Negativkontrast gewonnenen elektronenmikroskopischen Daten ein dreidimensionales Modell des fast vollständigen Enzyms mit einer Auflösung von 25 Å erstellt werden (Abb. 1.1D; Diepholz et al., 2008a; Diepholz et al., 2008b; Zhang et al., 2008). Die erste 3D-Rekonstruktion auf der Basis von Cryo-elektronenmikroskopischen Aufnahmen, gewonnen aus der nativen V-ATPase aus dem Mitteldarm der Larve des Tabakschwärmers Manduca sexta, führte, mit einer Auflösung von 16,5 Å, zum ersten vollständigen Modell einer V-ATPase (Abb. 1.1A; Muench et al., 2009). Übereinstimmend zeigen diese Modelle erstmals, dass der V₁-Komplex neben einem zentralen über drei periphere Stiele mit dem V₀-Komplex verbunden ist (Muench et al., 2011). Die peripheren Stiele aus den Untereinheiten E und G, in Abb. 1.1A und 1.1C als S1, S2 und S3 gekennzeichnet, funktionieren in der aktiven V-ATPase zusammen mit den Untereinheiten C, H und a als Statoren (Abb. 1.1C, grau eingefärbt). Neben ihren statischen verfügt die V-ATPase auch über rotierende Bestandteile, in Abb. 1.1C in blauer Farbe dargestellt, zu denen die zentrale Achse und der membranständige c-Ring gehören. Während der Protonentranslokation fixieren die Statoren den ATP-Hydrolyse-Motor, sodass dieser nicht mit der zentralen Achse und dem c-Ring rotieren kann (Muench et al., 2009; Muench et al., 2011). Ihrem einfacheren Aufbau entsprechend verfügt die F-ATPase dagegen neben dem zentralen über nur einen einzelnen, peripheren Stiel (Muench et al., 2011).

Im dreidimensionalen Modell (Abb. 1.1A) sind weitere Besonderheiten der komplexer aufgebauten V-ATPase zu erkennen. Im mittleren Bereich der V-ATPase ist ein horizontaler Steg zu sehen, der die Untereinheiten C und H beherbergt und über diese die im V₁-Komplex verankerten, peripheren Stiele letztlich an die Untereinheit a des V₀-Komplexes koppelt (Muench *et al.*, 2009; Muench *et al.*, 2011). Des Weiteren ist am Boden des membranständigen V₀-Komplexes von *M. sexta* ein Vorsprung zu erkennen (Abb. 1.1A), der bisher noch nicht identifiziert werden konnte. Im V₀-Komplex der Rinder-V-ATPase wurde ein entsprechender Vorsprung der akzessorischen V₀-Untereinheit Ac45 zugeschrieben (Wilkens *et al.*, 1999). In der V-ATPase der Hefe dagegen ist die Untereinheit Ac45 nicht vorhanden (Abb. 1.1D; Zhang *et al.*, 2008). In massenspektrometrischen Untersuchungen der V-ATPase von *M. sexta* konnte keine der Untereinheit Ac45 entsprechende Masse gefunden werden, sodass die Identität des Vorsprungs weiter ungeklärt bleibt (Huss und Wieczorek, 2007; Muench *et al.*, 2009).





A, 3D-Modell der V-ATPase aus *M. sexta*. Die drei peripheren Stiele sind mit S1, S2 und S3 gekennzeichnet (Muench *et al.*, 2011). Cryo-elektronenmikroskopische Aufnahmen des nativen Holoenzyms aus dem Mitteldarm der Tabakschwärmer-Larve führten erstmals zu diesem dreidimensionalen Modell mit einer Auflösung von 16.5 Å (Muench *et al.*, 2009). **B**, In das 3D-Modell der V-ATPase aus *M. sexta* wurden die Strukturen bereits kristallisierter Untereinheiten verschiedener ATPasen eingepasst (Muench *et al.*, 2009). **C**, Schematisches Modell der V-ATPase aus *M. sexta* (Muench *et al.*, 2009). Die ATP-Hydrolyse findet am löslichen V₁-Komplex statt und versetzt die blau markierten Rotor-Untereinheiten. Die drei peripheren Stiele sind mit S1, S2 und S3 bezeichnet. **D**, Elektronenmikroskopische Aufnahmen führten zu diesem 3D-Modell der V-ATPase aus *S. cerevisiae* mit einer Auflösung von 25 Å (Zhang *et al.*, 2008). Die Abkürzungen nt und ct stehen für den N-Terminus bzw. den C-Terminus der jeweiligen Untereinheiten. Auch in die Rekonstruktion der Hefe-V-ATPase wurden die Kristallstrukturen verschiedener Untereinheiten eingesetzt.

1.2.1 Der Aufbau des V₁-Komplexes

Der V₁-Komplex besteht bei einer Molekularmasse von ca. 600 kDa aus den acht verschiedenen Untereinheiten A-H, für die die Stöchiometrie $A_3B_3CDE_3FG_3H$ angenommen wird (Kitagawa *et al.*, 2008). Die Untereinheiten A und B bilden alternierend ein Hexamer, das katalytische Kopfstück des V₁-Komplexes, in dem die ATP-Hydrolyse stattfindet (Kartner und Manolson, 2011). Die bei der ATP-Hydrolyse entstehende Energie treibt die Rotation des zentralen Stiels an, zu dem die V₁-Untereinheiten D und F gehören (Kartner und Manolson, 2011). Mit Hilfe der 3D-Rekonstruktion der Cryo-Elektronenmikroskopie-Aufnahmen der V-ATPase aus *M. sexta*

wurde deutlich gezeigt, dass die Untereinheiten E und G als Heterodimere drei periphere Stiele bilden und dabei über die Interaktion von Untereinheit E mit Untereinheit B im V₁-Komplex verankert sind (Arata *et al.*, 2002; Muench *et al.*, 2009). Im mittleren Bereich der V-ATPase sind die Untereinheiten C und H horizontal angeordnet. Die Untereinheit C kontaktiert die Statoren 1 und 2 und die Untereinheit H die Statoren 2 und 3 (Abb. 1.1C), sodass sie in ihrer horizontalen Position alle drei peripheren Statoren miteinander verbinden und den Kontakt zur V₀-Untereinheit a herstellen (Muench *et al.*, 2009). Es wird angenommen, dass der Stator 3 (Abb. 1.1C), der wahrscheinlich das funktionelle Analogon des einzelnen Stators der F-ATPase darstellt, alleine nicht den mechanischen Kräften innerhalb der aktiven V-ATPase standhalten könnte, sodass das Gerüst aus den peripheren Statoren und dem C/H-Element unter anderem für die Stabilität der V-ATPase notwendig ist (Muench *et al.*, 2009).

1.2.2 Der Aufbau des V_O-Komplexes

Die Analyse der Struktur des V_O-Komplexes erweist sich als weitaus schwieriger als die des V₁-Komplexes. Der Grund dafür liegt in der Hydrophobizität des membraneingebetteten Proteinkomplexes, die die Reinigung des Vo-Komplexes und nachfolgende Strukturanalysen erheblich erschwert. Zudem differiert die Zusammensetzung des V₀-Komplexes verschiedener Organismen. Im Allgemeinen ist der V₀-Komplex aus den Untereinheiten a, d, c und e zusammengesetzt, wobei die Stöchiometrie der c-Untereinheiten, die den membranständigen, protonentranslozierenden Proteolipidring bilden, variieren kann (Muench et al., 2011). Im Jahr 2005 wurde der Proteolipidring der A-ATPase aus Enterococcus hirae mit einer Auflösung von 2,1 Å kristallisiert und es wurde gezeigt, dass der Ring aus zehn K-Untereinheiten besteht, die homolog zur c-Untereinheit der V-ATPase sind (Murata et al., 2005). Für die dreidimensionale Rekonstruktion der V-ATPasen aus M. sexta und S. cerevisiae stellte sich heraus, dass sich die Struktur des K₁₀-Rings sehr passgenau in beide Modelle einsetzen lässt, sodass für beide V-ATPasen ein aus zehn c-Untereinheiten bestehender Ring in Frage kommt (Abb. 1.1B und 1.1D; Muench et al., 2009; Zhang et al., 2008). Demnach wird für den V₀-Komplex aus *M. sexta* die Stöchiometrie ac₁₀de vermutet (Muench et al., 2009). In S. cerevisiae werden zusätzlich zwei Isoformen der c-Untereinheit, c' und c'', exprimiert, wobei c' spezifisch für die V-ATPase von Pilzen zu sein scheint (Chavez et al., 2006; Hirata et al., 1997). Während c' und c'' jeweils nur einmal im Proteolipidring der Hefe vorkommen, wird angenommen, dass c in vier bis fünf Kopien vorliegt, was für den V₀-Komplex der Hefe zur Stöchiometrie ac₄₋₅c'c''de führen würde (Powell et al., 2000). Die genaue Anzahl der Proteolipide in S. cerevisiae ist noch unklar. Der V_O-Komplex der Säuger-V-ATPase setzt sich aus den Untereinheiten a, c, c'', d, e und zusätzlich der Untereinheit Ac45 zusammen und es wird vermutet, dass die Anzahl der c-Untereinheiten im Ring fünf beträgt (Kartner und Manolson, 2011). Funktionell werden die Untereinheiten c und d den rotierenden und die Untereinheit a den statischen Bestandteilen der V-ATPase zugeordnet (Abb. 1.1C; Muench et al., 2011).

Die Untereinheit d, deren Funktion und Lokalisation anhand der Kristallstruktur der homologen Untereinheit C der A-ATPase von *Thermus thermophilus* näher bestimmt wurde (Iwata *et al.*, 2004), stellt vermutlich die Verbindung zwischen dem V₀- und dem V₁-Komplex dar. Die Kristallstruktur der bakteriellen C-Untereinheit lässt sich außerdem sehr gut in das Modell der V-ATPase aus *M. sexta* einpassen (Abb. 1.1B; Muench *et al.*, 2009). Dabei scheint die d-Untereinheit von *M. sexta* als eine Art "Stöpsel" oben im intrazellulären Teil des c-Rings zu stecken und diesen so an die V₁-Untereinheiten D und F zu koppeln (Muench *et al.*, 2009).

Tab. 1.1: Überblick über die V-ATPase-Untereinheiten von M. sexta, S. cerevisiae und Säugern

Die Tabelle fasst die verschiedenen Untereinheiten wie die jeweiligen molekularen Massen, Isoformen und Lokalisationen zusammen. Die molekularen Massen der V-ATPase-Untereinheiten von *M. sexta (M. s.)* stammen aus Merzendorfer *et al.* (2000), die Informationen über die V-ATPase-Untereinheiten von *S. cerevisiae (S. c.)* und Säugern aus Toei *et al.* (2010) und Kartner und Manolson (2011). Für die Untereinheiten C2, H und al-4 der Säuger-V-ATPase gibt es zusätzlich alternative Splice-Varianten (siehe Toei *et al.* (2010). n. v. = nicht vorhanden; * = Sequenz wurde im *M. sexta* Genomprojekt gefunden (Agripestbase.org/Manduca).

Untereinheit	Molekulare Masse (kDa)	Isoformen & Lokalisation			
	<i>M. s. / S. c. /</i> Säuger	M. sexta	S. cerevisiae	Säuger	
V ₁ -Komplex					
А	66 / 70 / 70	А	VMA1	А	
В	56 / 60 / 56	В	VMA2	B1 (Niere, Epididymis, Riechepithel) B2 (ubiquitär)	
С	43 / 40 / 42	С	VMA5	C1 (ubiquitär) C2 (Lunge, Niere, Epididymis)	
D	30 / 34 / 34	D	VMA8	D	
Е	27 / 33 / 31	Е	VMA4	E1 (Hoden, Riechepithel) E2 (ubiquitär)	
F	14 / 14 / 14	F	VMA7	F	
G	16 / 13 / 13	G	VMA10	G1 (ubiquitär) G2 (Nervenzellen) G3 (Niere, Epididymis)	
Н	55 / 50 / 50	Н	VMA13	Н	
V ₀ -Komplex					
a	100 / 100 / ca. 100	a	VPH1 (Vakuole) STV1 (Golgi)	 a1 (Nervenzellen,) a2 (Endothel, Neuronen) a3 (Osteoklasten, pankreatische β-Zellen, Prämelanosomen) a4 (Niere, Epididymis) 	
c	17 / 17 / 16	c	VMA3	с	
c´	- / 17 / -	n. v.	VMA11		
c''	- / 21 / 21	*	VMA16	c′′	
d	40 / 38 / 38-42	d	VMA6	d1 (ubiquitär) d2 (Niere, Epididymis, Osteoklasten, Dendritische Zellen)	
e	20 / 9 / 9	e	VMA9	e	
Ac45	- / - / 45		-	Ac45	

Funktion und Lokalisation der Untereinheit e sind noch weitgehend unbekannt. Sie wurde als konstitutive V-ATPase-Untereinheit zum ersten Mal für das *M. sexta*-Enzym beschrieben (Merzendorfer *et al.*, 1999) und kommt auch bei den V-ATPasen von Säugern und Hefen vor (Ludwig *et al.*, 1998; Sambade und Kane, 2004). Im Mitteldarm der *M. sexta*-Raupe liegt die e-Untereinheit stark glycosyliert vor, und die Zuckerreste bilden hier etwa die Hälfte der molekularen Masse von 20 kDa (Merzendorfer *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass sie mit dem in die Membran eingebetteten Teil der a-Untereinheit assoziiert ist (Muench *et al.*, 2009). Obwohl sie in verschiedenen Modellen des V₀-Komplexes häufig neben der a-Untereinheit positioniert wird, gibt es bisher keine experimentellen Daten über eine direkte Interaktion zwischen der e-Untereinheit und den anderen Untereinheiten des V₀-Komplexes (Compton *et al.*, 2006; Toei *et al.*, 2010).

Die Existenz der akzessorischen Untereinheit Ac45 wurde in den chromaffinen Granula des Rindes und in Osteoklasten gezeigt (Feng *et al.*, 2008; Supek *et al.*, 1994). Dort wurde sie als Membranprotein charakterisiert, das wahrscheinlich an der luminalen Seite des V_O-Komplexes lokalisiert ist und mit den Untereinheiten c und c' sowie mit der Osteoklasten-spezifischen Isoform a3 der a-Untereinheit interagiert. Zusätzlich wurde die Untereinheit Ac45 in *Xenopus*-Zellen gefunden (Holthuis *et al.*, 1995), wo ihr eine V-ATPase-kontrollierende Rolle im regulatorischen Sekretionsweg in neuroendokrinen Zellen zugeschrieben wird (Jansen *et al.*, 2008).

1.2.2.1 Die Untereinheit a des Vo-Komplexes

Die V₀-Untereinheit a ist mit 95-116 kDa die größte Untereinheit der V-ATPase. Sie ist direkt am Protonentransport beteiligt und gehört zu den statischen Untereinheiten, wobei sie, eingebettet in die Membran, die peripheren Statoren, vertreten durch die Untereinheiten C, E, G und H, verbindet und damit wesentlich an der Kopplung und Verankerung von V₁- und V₀-Komplex beteiligt ist (Abb. 1.1C; Muench *et al.*, 2011). Die a-Untereinheit kann in zwei Domänen eingeteilt werden. Dabei wird zwischen dem ca. 40 kDa großen, löslichen N-Terminus, der mit den eben genannten V₁-Untereinheiten interagiert, und dem ca. 55 kDa-großen, membranintegralen C-Terminus unterschieden (Muench *et al.*, 2011). Biochemische Analysen zeigten erst kürzlich, dass der N-Terminus der a-Untereinheit ebenfalls Membranprotein-ähnliche Charakteristika aufweist, da seine Faltung mittels Detergenzien stabilisiert werden konnte und eine Co-Präzipitation mit synthetischen Liposomen erfolgreich war. Daher wird eine sehr enge Assoziation des N-Terminus mit der Membran vermutet (Merkulova *et al.*, 2010).

Für die Topologie der a-Untereinheit konnte im Hinblick auf die Isoform Vph1 der Hefe-V-ATPase ein plausibles Modell für die membraneingebettete C-terminale Domäne mit acht Transmembranhelices (TMH), deren C-Terminus im Zytosol endet, und einer zytoplasmatisch lokalisierten N-terminalen Domäne erstellt werden (Abb. 1.2; Wang *et al.*, 2008). Bei der Hefe ist sie die einzige V-ATPase-Untereinheit, die durch zwei verschiedene Gene kodiert wird und in den beiden Isoformen Vph1 und Stv1 mit einer Aminosäure-Identität von 54% vorliegt (Manolson *et al.*, 1994). Die Expression der Untereinheit Vph1 führt zur Lokalisation der V-ATPase in der Vakuolenmembran, während die Isoform Stv1 in der V-ATPase im Golgi exprimiert wird (Kawasaki-Nishi et al., 2001a; Manolson et al., 1994). Mit Hilfe von chimären Proteinen, zusammengesetzt aus dem N-Terminus von Vph1 und dem C-Terminus von Stv1 oder umgekehrt, konnte bei der Hefe gezeigt werden, dass die für die Ziel-Lokalisation der Isoformen erforderlichen Informationen in der N-terminalen Domäne angesiedelt sind (Kawasaki-Nishi et al., 2001a). Auch Informationen, die die in vivo Dissoziation der V-ATPase betreffen, sind in der Sequenz des N-Terminus kodiert, wohingegen die Kopplungseffizienz von ATP-Hydrolyse und Protonentransport durch den C-Terminus bestimmt wird (Kawasaki-Nishi et al., 2001a). Der C-Terminus enthält zudem die für den Protonentransport wichtigen Eigenschaften der a-Untereinheit. Es wird angenommen, dass hier zwei Halbkanäle enthalten sind, über die die Protonen während ihres Transports den Proteolipidring erreichen und verlassen können (Überblick in Forgac, 2007). Essentiell für den Protonentransport ist ein Argininrest in TMH7, der sich in der a-Isoform Vph1 der Hefe an Position 735 befindet (Abb. 1.2; Kawasaki-Nishi et al., 2001b). Auf weitere Eigenschaften der a-Untereinheit, die den Protonentransport betreffen, wird in Abschnitt 1.3.1 näher eingegangen.



Abb. 1.2: Topologisches Modell der Isoform Vph1 der a-Untereinheit von *S. cerevisiae* Das Modell (modifiziert nach Wang *et al.* (2008)) zeigt die zytoplasmatische N-terminale Domäne sowie acht TMHs in der membranständigen C-terminalen Domäne, deren Ende im Zytosol lokalisiert ist.

In Säugerzellen kommt die a-Untereinheit ebenfalls in verschiedenen Isoformen (a1-4) vor, die eine Aminosäureidentität von 47-61% aufweisen und jeweils entsprechend ihrer enthaltenen Informationen an verschiedenen Orten in der Zelle lokalisiert sind (Tab. 1.1) (Überblick in Toei et al., 2010). Die Isoform al wurde in Nervenzellen sowohl in synaptischen Plasmamembranen als auch in synaptischen Vesikeln identifiziert, weshalb vermutet wird. dass sie eine Rolle bei Membranfusionen während des Neurotransmittertransports und auch bei der Endozytose spielt (Toei et al., 2010). Über die Isoform a2 ist bekannt, dass sie in verschiedenen Organen wie Lunge, Niere und Milz lokalisiert ist (Peng et al., 1999). Die Isoform a3 wird in u.a. Osteoklasten exprimiert und sorgt dort für die Lokalisation der V-ATPase in der Plasmamembran, wo sie in die Resorption von Knochengewebe involviert ist. Die Isoform a4, die u.a. in der Niere exprimiert wird, sorgt für die Lokalisation der V-ATPase in der apikalen Membran der α-Schaltzellen im späten distalen Tubulus und dem Sammelrohr (Toei et al., 2010; Wagner et al., 2004). Trotz der Lokalisationsspezifität der Isoformen ist es wahrscheinlich, dass viele Zellen mehrere Isoformen einer Untereinheit exprimieren und so ihre V-ATPasen in verschiedenen zellulären Membranen lokalisieren (Toei et al., 2010).

1.2.2.2 Die Proteolipiduntereinheiten des Vo-Komplexes

Die c-Untereinheiten, die in den Isoformen c, c' und c'' vorkommen können, werden aufgrund ihrer sehr hydrophoben Eigenschaften auch als Proteolipide bezeichnet und bilden den in der Membran liegenden, protonentranslozierenden c-Ring (Abb. 1.1C und Abb. 1.3; Forgac, 2007). Dieser ist der Hauptbestandteil des Rotors der V-ATPase, zu dem auch die V_0 -Untereinheit d und die V_1 -Untereinheiten D und F gehören (Abb. 1.1C; Muench et al., 2011). Wie bereits erwähnt, wird der membranständige Ring auch in den F- und A-ATPasen aus den Proteolipiduntereinheiten gebildet, die wahrscheinlich von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen (Mandel et al., 1988; Müller und Grüber, 2003). Dabei haben die c-Untereinheiten der F-ATPasen je zwei transmembrane α-Helices und molekulare Massen von ca. 8 kDa, während die durch Genduplikation und anschließende Fusion entstandenen c-Untereinheiten der V-ATPasen je vier Transmembranhelices (TMH1-4) mit molekularen Massen von 16 kDa aufweisen (Saroussi und Nelson, 2009). Alle c-Untereinheiten besitzen einen für die Protonentranslokation essentiellen sauren Aminosäurerest, der in der c-Untereinheit der F-ATPase von E. coli durch ein Aspartat in der zweiten Helix an Position 61 und in der c-Untereinheit der V-ATPase von S. cerevisiae in der vierten Helix durch ein Glutamat an Position 137 vertreten ist (Überblick in Saroussi und Nelson, 2009). Der zweite saure Aminosäurerest in TMH2 der V-ATPase-c-Untereinheit ist vermutlich während der Evolution verlorengegangen (Mandel et al., 1988). Diese essentiellen, sauren Aminosäurereste der c-Untereinheiten sind die Bindestellen des kovalenten Inhibitors N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD), der sowohl F- als auch V-ATPasen hemmt und für Inhibitorstudien im Allgemeinen gerne eingesetzt wird (Arai et al., 1987; Huss et al., 2011). Auch die Isoformen c' und c'' weisen je ein essentielles Glutamat auf. In der c'-

Untereinheit der Pilze befindet sich der Glutamatrest in ebenfalls in TMH4 und im Fall der c'-Untereinheit von *S. cerevisiae* an Position 145. Die c''-Untereinheit, die anders als ihre Isoformen fünf TMHs (TMH1-5) aufweist und mit 23 kDa eine größere Masse besitzt, birgt in *S. cerevisiae* sowohl an Position 108 in TMH3 als auch an Position 188 in TMH5 Glutamatreste, wobei nur der in TMH3 lokalisierte für die Protonentranslokation essentiell ist (Hirata *et al.*, 1997; Powell *et al.*, 2000).





A, Arrangement der Isoformen c, c' und c'' im Proteolipidring der V-ATPase von *S. cerevisiae* (Abb. modifiziert nach Wang *et al.*, 2007. Mit Hilfe von Fusionen von c, c' und c'' wurde die Anordnung der Proteolipide im Ring bestimmt (Wang *et al.*, 2007). Bei Betrachtung des Proteolipidrings von der zytosolischen Seite folgen die Untereinheiten c'' und c' im Uhrzeigersinn aufeinander. Der Buchstabe "E" zeigt die essentiellen Glutamatreste an. **B**, Kristallstruktur des Proteolipidrings von *E. hirae* nach Murata *et al.* (2005), Abb. aus Saroussi und Nelson (2009). Der K-Ring besteht aus zehn identischen Untereinheiten, die je vier TMHs besitzen. Das negativ geladene, essentielle Glutamat-139 (als orangefarbener, waagerechter Arm dargestellt, markiert mit einem roten Pfeil) in TMH4 (orange) bindet das positiv geladene Ion (gelb). TMH1 ist Rot, TMH2 Blau und TMH3 Violett eingefärbt. TMH2, TMH3 und TMH4 bilden die Ionenbindetasche für das essentielle Glutamat.

Für eine funktionelle Hefe-V-ATPase müssen alle drei Isoformen der c-Untereinheit exprimiert werden, da sie sich nicht gegenseitig ersetzen können (Hirata et al., 1997). Hinzu kommt das spezifische Arrangement der Proteolipide im Ring, das mit Hilfe unterschiedlich kombinierter Fusionen von c (Vma3), c' (Vma11) und c'' (Vma16) bei der Hefe analysiert worden war (Wang et al., 2007). Dabei resultierte nur die benachbarte Anordnung von c' und c'' in einer aktiven V-ATPase, wenn unter Betrachtung des Proteolipidrings von der zytosolischen Seite c' im Uhrzeigersinn auf c'' folgt (Abb. 1.3A; Wang et al., 2007). In einer aktuelleren Arbeit untersuchten Finnigan und seine Mitarbeiter (2012)die Komplementation von Vma3bzw. Vma11-Deletionsmutanten der Hefe mit wahrscheinlichen. einer evolutiven Vorläuferuntereinheit von beiden Untereinheiten. Diese führte bei der Hefe zusammen mit Vma16 zu einem funktionsfähigen Ring. Es wurde festgestellt, dass erst Genduplikationen und der komplementäre Verlust, asymmetrische Interaktionen mit den

anderen c-Isoformen im Ring einzugehen, zu den obligatorischen Rollen von Vma3 und Vma11 und dem spezifischen Arrangement im Ring führten (Finnigan *et al.*, 2012).

Topologische Analysen der c-Untereinheit und ihrer Isoformen c' und c'' aus der Hefe zeigten mit Hilfe von Epitop-Markierungen und Fusionen von c und c'', dass die Nund C-Termini von c und c', die wie bereits erwähnt jeweils vier TMHs aufweisen, im Lumen der Hefevakuole lokalisiert sind (Flannery *et al.*, 2004). Für die c''-Untereinheit mit fünf TMHs wurde festgestellt, dass der N-Terminus im Zytosol und der C-Terminus im Lumen lokalisiert ist (Flannery *et al.*, 2004). Die Funktion der zusätzlichen TMH1 der c''-Untereinheit ist weitgehend unklar. Die Deletion dieser Helix hat keine Auswirkung auf die Funktion der Hefe-V-ATPase (Nishi *et al.*, 2003b). Es wird spekuliert, dass die TMH1 ein evolutionäres Relikt in den c''-Untereinheiten von Pilzen und Tieren ist, da sie in den pflanzlichen c''-Untereinheiten nicht vorkommt (Flannery *et al.*, 2004).

Analog zu dem Proteolipidring von *E. hirae* wird für den c-Ring der Hefe angenommen, dass die protonierbare Carboxylgruppe des essentiellen Glutamats in der Mitte von TMH4 in einer von TMH2, TMH3 und TMH4 gebildeten Tasche liegt (Abb. 1.3B; Murata *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007). Im Proteolipidring der Hefe ergibt sich durch die Anwesenheit der c''-Untereinheit mit dem essentiellen Glutamat in TMH3 eine Unregelmäßigkeit für die Lokalisation der Protonenbindetasche, die begründen könnte, dass der freie V₀-Komplex im Gegensatz zum freien F₀-Komplex keine passive Protonenleitfähigkeit aufweist (Wang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 1992). Der Transport der Protonen durch den Proteolipidring der V-ATPase geschieht in engem Zusammenspiel mit der a-Untereinheit des V₀-Komplexes und wird in Abschnitt 1.3.1 ausführlicher beschrieben.

1.2.3 Die Assemblierung der V-ATPase

Die in vivo Assemblierung der V-ATPase wurde bisher am besten bei S. cerevisiae untersucht (Überblick in Forgac, 2007). Dabei wurde festgestellt, dass der korrekte Zusammenbau des V₀-Komplexes im Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Hefe die Anwesenheit von verschiedenen Assemblierungsfaktoren erfordert. Diese werden von den Chaperonen Vma12, Vma21, Pkr1 und Vma22 im ER vertreten (Forgac, 2007). Vma21 interagiert als integrales Membranprotein direkt mit der Untereinheit c' und unterstützt so die Formation des Proteolipidrings sowie dessen Assemblierung mit der Untereinheit d. Des Weiteren scheint Vma21 eine Rolle beim Export des assemblierten V_O-Komplexes in Vesikeln des ERs zu spielen (Malkus et al., 2004). Ein Komplex aus Vma12 und Vma22 interagiert mit der Untereinheit a und vermittelt ihre Assoziation mit dem Proteolipidring (Graham et al., 2003). Pkr1, ebenfalls ein Membranprotein, steigert die Effizienz der Assemblierung und des Exports des Vo-Komplexes aus dem ER (Davis-Kaplan et al., 2006). Der Zusammenbau des V₁V₀-Holoenzyms findet letztendlich im Golgi-Apparat statt, wo entweder die einzelnen oder teilweise assemblierten V₁-Untereinheiten oder aber der bis auf die Untereinheit C, die immer separat angekoppelt wird, komplette V₁-Komplex mit dem V₀-Komplex

assoziieren (Forgac, 2007). Die intrazelluläre Ziel-Lokalisation der V-ATPase hängt schließlich, wie schon beschrieben, von Informationen in der Sequenz des zytosolischen N-Terminus der a-Untereinheit ab. Homologe Proteine der für die Assemblierung des V_0 -Komplexes in Hefe wichtigen Chaperone wurden auch in höheren Eukaryoten entdeckt, allerdings wurde ihre Rolle bisher nicht näher untersucht (Forgac, 2007).

1.3 Zur Funktion der V-ATPase

1.3.1 Der Mechanismus des Protonentransports

So wie die Struktur der V-ATPase sich in den Anfängen an der der F-ATPase orientierte, verhielt es sich auch mit dem Rotationsmechanismus, der erstmals bei F-ATPasen gezeigt worden war (Muench *et al.*, 2011). Die Rotation der V-ATPase konnte inzwischen anhand der eng verwandten vakuolären Na⁺-ATPase aus *T. thermophilus* direkt nachgewiesen werden. Während der V₁-Komplex mit Biotin versehen auf einer Glasoberfläche immobilisiert wurde, konnte eine ATP-abhängige Rotation der Streptavidin-Kügelchen beobachtet werden, die einmal an die D- bzw. F-Untereinheit (Imamura *et al.*, 2003) und einmal an eine der Proteolipiduntereinheiten im V₀-Komplex gebunden wurden (Yokoyama *et al.*, 2003).

Als aktive Protonenpumpe nutzt die V-ATPase die Energie aus der ATP-Hydrolyse zum Antrieb ihres rotierenden Motors. Analog zur F-ATPase wird für die V-ATPase angenommen, dass die zentrale Achse asymmetrisch ist und diese aufgrund von Konformationsänderungen im A/B-Hexamer während der ATP-Hydrolyse zur Rotation gebracht wird (Muench *et al.*, 2011). Bei diesem Vorgang, der in der F-ATPase als "binding change mechanism" beschrieben wurde, liegen die drei Nukleotidbindestellen des Hexamers in verschiedenen Konformationen mit unterschiedlichen Nukleotid-Affinitäten für ATP bzw. ADP und P_i vor (Überblick in Boyer (1997) und von Ballmoos *et al.* (2009)). Die Konformationsänderungen der Nukleotidbindestellen führen im F₁-Komplex zur Rotation der asymmetrischen γ -Untereinheit in 120°-Schritten für jedes ATP-Molekül, das synthetisiert oder hydrolysiert wurde. In der V-ATPase rotieren als Folge der ATP-Hydrolyse die an das A/B-Hexamer gekoppelte D-Untereinheit und damit der gesamte zentrale Stiel sowie der Proteolipidring (Muench *et al.*, 2011).

Die Rotation des Proteolipidrings relativ zur statischen a-Untereinheit ermöglicht schließlich den Protonentransport über die Membran, wobei die Schlüsselelemente dafür die beiden Halbkanäle in der a-Untereinheit und die essentiellen Glutamatreste in jeder c-Untereinheit sind (Muench *et al.*, 2011). Bei der Hefe wurde in der a-Isoform Vph1 zudem ein essentieller Argininrest an Position 735 in TMH7 identifiziert (Abschnitt 1.2.2.1) (Kawasaki-Nishi *et al.*, 2001b). Neben diesem birgt die Untereinheit Vph1 weitere Aminosäurereste, die für einen optimalen Protonentransport erforderlich sind und in verschiedenen Mutagenesestudien identifiziert werden konnten (Kawasaki-Nishi *et al.*, 2001b; Leng *et al.*, 1998; Leng *et al.*, 1996). Dazu gehören Histidin-729, Histidin-743, Glutamat-789 und Arginin-799, wobei die ersten beiden der TMH7 und die letzteren

beiden der TMH8 zugeordnet werden konnten (Abb. 1.2; Wang *et al.*, 2008). Weitergehende topologische Untersuchungen der Untereinheit Vph1 lassen vermuten, dass die für den Protonentransport wichtigen, polaren und geladenen Aminosäuren zum einen auf der zytoplasmatischen Hälfte von TMH7 und TMH8 und zum anderen auf der luminalen Hälfte von TMH3, TMH4 und TMH7 liegen und so die beiden Halbkanäle bilden, über die die Protonen den Proteolipidring erreichen und verlassen (Toei *et al.*, 2011).

Der Weg der Protonen durch den V₀-Komplex verläuft schließlich folgendermaßen: Über den zytoplasmatischen Halbkanal in der a-Untereinheit erreicht ein Proton aus dem Zytoplasma den Proteolipidring und protoniert dort die Carboxylgruppe des Glutamats in TMH4 derjenigen c-Untereinheit, die sich zu diesem Zeitpunkt an diesem "Eingangs"-Halbkanal befindet (Abb. 1.4; Jefferies *et al.*, 2008). Vom Zytoplasma aus betrachtet rotiert der c-Ring im Uhrzeigersinn und die protonierten, d. h. nun ungeladenen Glutamatreste bewegen sich durch das hydrophobe Lipid-Milieu in der Membran bis sie den zweiten, luminalen Halbkanal der a-Untereinheit erreichen. Dort stabilisiert nun das essentielle Arginin-735 in der a-Untereinheit die deprotonierte Form des Glutamats der c-Untereinheit, was die Dissoziation des Protons zur Folge hat und damit dessen Austritt auf der luminalen Seite der Membran vermittelt.





Die schematische Abbildung zeigt den membranständigen C-Terminus der a-Untereinheit in hellgrau, den Proteolipidring der Hefe-V-ATPase in dunkelgrau sowie die Protonen als rote Punkte (Abb. modifiziert nach Jefferies *et al.*, 2008). Jedes in den c-Untereinheiten enthaltene essentielle Glutamat wird protoniert, sobald es per Rotation den zytoplasmatischen Halbkanal der a-Untereinheit erreicht. Der jetzt neutrale Glutamatrest in der c-Untereinheit rotiert mit dem c-Ring weiter und erreicht so den zweiten, luminalen Halbkanal der a-Untereinheit. Hier interagiert das essentielle Arginin-735 der a-Untereinheit mit dem protonierten Glutamat und führt zur Deprotonierung des Glutamats und zur Abgabe des Protons. Dieses erreicht durch den zweiten Halbkanal die luminale Seite der Membran.

1.3.2 Die Regulation der V-ATPase

Nicht nur weil die V-ATPase in der Zelle Energie in Form von ATP verbraucht, sondern auch aufgrund ihrer Beteiligung an diversen physiologischen Prozessen, die im nächsten Abschnitt näher beschrieben werden, ist die Regulation der V-ATPase von entscheidender Bedeutung. Zu den verschiedenen Regulationsmechanismen gehören die reversible Dissoziation des V₁V₀-Holoenzyms, die Kontrolle der zellulären Lokalisation der V-ATPase, Änderungen der Kopplungseffizienz von Protonentransport und ATP-Hydrolyse sowie mehrere, regulierende Interaktionspartner der V-ATPase (Überblick in Forgac, 2007). In dieser Arbeit soll nur auf die reversible Dissoziation der V-ATPase näher eingegangen werden.

Die Dissoziation des V₁V₀-Holoenzyms wurde zuerst im Mitteldarm von sich häutenden oder hungernden Raupen des Tabakschwärmers M. sexta nachgewiesen (Gräf et al., 1996; Sumner et al., 1995). Im dissoziierten Zustand weist der freie V1-Komplex keine Mg²⁺-ATP-Hydrolyse (Gräf et al., 1996) und der V₀-Komplex keinen Protonentransport (Zhang et al., 1992) mehr auf. Durch erneutes Füttern der Raupen kann die Dissoziation rückgängig gemacht werden (Gräf et al., 1996). In vitro Versuche demonstrierten, dass die aus M. sexta isolierte V-ATPase abhängig vom ATP/ADP-Verhältnis, das den Energiegehalt in der Zelle demonstriert, dissoziiert (Huss und Wieczorek, 2007). Es wurde darauf geschlossen, dass das Holoenzym durch die Bindung von ADP in Abwesenheit von ATP destabilisiert wird. Ein Mangel an Energie in Form eines Glucose-Entzugs führte auch bei S. cerevisiae zur Dissoziation der V-ATPase, während die erneute Glucose-Zufuhr in einer schnellen Reassemblierung der V-ATPase resultierte (Kane, 1995). Bei der Hefe wurde auch gezeigt, dass nur eine katalytisch aktive V-ATPase dissoziiert, da dieser Prozess durch den V-ATPase-Inhibitor Concanamycin unterbunden wird (Parra und Kane, 1998). Außerdem wird die Dissoziation auch pH-abhängig bei sauren, extrazellulären aber nicht bei neutralen pH-Werten induziert (Diakov und Kane, 2010; Parra et al., 2000). Dissoziation und Reassemblierung scheinen zudem voneinander unabhängig kontrolliert zu sein, da nur der erste Prozess intakte Mikrotubuli und nur der zweite Prozess den sogenannten RAVE (Regulator der H⁺-ATPase vakuolärer und endosomaler Membranen)-Komplex benötigt, der wohl generell bei der Assemblierung der V-ATPase mit den Untereinheiten E und G des freien V₁-Komplexes und mit der C-Untereinheit interagiert (Seol et al., 2001; Smardon und Kane, 2007; Smardon et al., 2002; Xu und Forgac, 2001). Des Weiteren ist das glykolytische Enzym Aldolase an der Regulierung der V-ATPase-Aktivität beteiligt (Lu et al., 2007; Lu et al., 2004). Die Funktionen der C-Untereinheit, welcher bei der reversiblen Dissoziation eine besondere Rolle zugeschrieben wird, sind in Huss et al. (2011) zusammengefasst.

1.3.3 Die physiologische und pathophysiologische Bedeutung der V-ATPase der Säuger

Zunächst in intrazellulären Kompartimenten identifiziert, wurde mit der Zeit immer häufiger gezeigt, dass die V-ATPase auch in den Plasmamembranen einer Vielfalt von Zelltypen eine wichtige Rolle spielt (Hinton *et al.*, 2009; Wieczorek *et al.*, 1999a). Wie bereits erwähnt, ist die physiologische Bedeutung der V-ATPase für diverse Prozesse in Säugerzellen enorm und eine mögliche Fehlfunktion der V-ATPase kann weitreichende Auswirkungen auf den gesamten Organismus haben, sodass eine Beteiligung der V-ATPase an verschiedenen Erkrankungen nicht verwunderlich ist.

In Endomembranen ist die V-ATPase für die pH-Regulation im Zytoplasma und Zellkompartimenten verantwortlich. Durch die Ansäuerung intrazellulärer in Kompartimente wie Endosomen, Lysosomen, den Golgi-Apparat, Clathrin-Vesikeln oder sekretorischen Vesikeln ist die V-ATPase in Prozesse wie die Rezeptor-vermittelte Endozytose und den intrazellulären Membrantransport, die Reifung und den Abbau von Proteinen sowie den sekundären Transport verschiedener Moleküle und Ionen involviert (Überblick in Hinton et al., 2009). Über die Ansäuerung endosomaler Kompartimente ermöglicht die V-ATPase allerdings auch verschiedenen Viren und bakteriellen Toxinen, wie zum Beispiel dem Influenza-Virus und dem Anthrax-Toxin, den Eintritt in die Zelle. Weitere Informationen über die Beteiligung der intrazellulären V-ATPase an humanen Erkrankungen sind in Hinton et al. (2009) zusammengefasst.

In Plasmamembranen lokalisiert spielt die V-ATPase eine entscheidende Rolle in einer Reihe von normalen physiologischen Prozessen, z. B. der Knochenresorption durch die Osteoklasten, der Säuresekretion durch die α -Schaltzellen in der Niere, der pH-Homöostase in Makrophagen und Neutrophilen, der Angiogenese sowie der Spermienreifung und -speicherung im Nebenhoden (Überblick in Hinton *et al.*, 2009). Im Folgenden wird nur auf wenige Beispiele näher eingegangen, wobei aber auch der jeweilige pathophysiologische Aspekt Beachtung findet.

In der Niere ist die V-ATPase in der luminal orientierten Apikalmembran der α -Schaltzellen im späten distalen Tubulus und im Sammelrohr lokalisiert (Karet, 2005). Hier sezerniert die V-ATPase Protonen, die durch die zytosolische Carboanhydrase II produziert werden, über die apikale Membran und säuert das Lumen des Sammelrohrs stark an. Die Protonensekretion ist an einen Cl⁻/HCO₃⁻-Antiporter in der basalen Plasmamembran gekoppelt, der durch den Export von HCO₃⁻ ins Blut die Alkalinisierung des Zytoplasmas verhindert (Hinton *et al.*, 2009). In der V-ATPase der Nieren werden die Isoformen B1, C2, G3, a4 und d2 exprimiert (Wagner *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in den Untereinheiten B1 und a4 zu der erblichen Form der distalen tubulären Azidose sowie zu einer sensorineuralen Schwerhörigkeit führen können (Karet *et al.*, 1999; Stehberger *et al.*, 2003).

In der Plasmamembran von Osteoklasten fördert die V-ATPase den Abbau der mineralischen Knochensubstanz, indem sie Protonen in den geschlossenen Extrazellulärraum, der bei der Anheftung der Osteoklasten an den zu resorbierenden Knochen entsteht, transportiert (Abb. 1.5A; Hinton *et al.*, 2009). Zusätzlich sezernieren die Osteoklasten Hydrolasen in den Hohlraum, was zum Abbau der organischen Substanz führt. Im Zusammenspiel mit den Osteoblasten, die für den Aufbau des Knochengewebes verantwortlich sind, sorgen sie für ein Gleichgewicht des Knochenauf- und abbaus. Bei der Osteopetrose kommt es durch den Wegfall der Knochenresorption zu einer krankhaften Verdickung der Knochen. Dies geschieht aufgrund eines genetischen Defekts mit Mutationen in der V-ATPase-Isoform a3, die in den Osteoklasten exprimiert wird (Frattini *et al.*, 2000; Hinton *et al.*, 2009; Toyomura *et al.*, 2003; Toyomura *et al.*, 2000).

Neben den genetischen Erkrankungen, die auf Mutationen in Genen einzelner V-ATPase-Untereinheiten zurückzuführen sind, gibt es auch Krankheiten, die mit einer funktionellen Plasmamembran-V-ATPase assoziiert sind. Ein Beispiel dafür ist die Osteoporose, die durch eine geringe Knochendichte aufgrund einer gesteigerten Knochenresorption durch die Osteoklasten, die nicht mehr im Gleichgewicht mit dem Knochenaufbau durch die Osteoblasten steht, charakterisiert ist (Yuan *et al.*, 2010). Mit der V-ATPase in der Plasmamembran der Osteoklasten als Angriffspunkt könnte der übermäßige Knochenabbau reduziert werden. Tatsächlich gibt es bereits einige Ansätze, die V-ATPase über die Osteoklasten-spezifische Isoform a3 gezielt zu hemmen (Überblick in Yuan *et al.*, 2010).





A, Die V-ATPase in der Plasmamembran der Osteoklasten unterstützt den Knochenabbau, indem sie den Raum zwischen Osteoklast und Knochen ansäuert (Abb. modifiziert nach Forgac, 2007). Die V-ATPase der Osteoklasten exprimiert die Isoform a3. **B**, Auch Tumorzellen exprimieren die V-ATPase in ihrer Plasmamembran (Abb. modifiziert nach Forgac, 2007). Indem die V-ATPase auch hier die extrazelluläre Umgebung ansäuert, ist sie zusammen mit Cathepsinen, die in der sauren Umgebung aktiviert werden, an der Metastasierung von Krebszellen beteiligt.

In den letzten Jahren wurde ein Zusammenhang zwischen der Aktivität der V-ATPase und der Metastasierung von Tumorzellen festgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass hochinvasive Brustkrebszellen (MB231) eine größere Menge an V-ATPasen an ihrer Zelloberfläche exprimieren als die nur geringfügig metastasierenden MCF7-Zellen (Sennoune *et al.*, 2004). Die V-ATPase der Plasmamembran von Tumorzellen säuert mit ihrem Protonentransport die extrazelluläre Umgebung an und kann damit zur Invasion und Metastasierung der Tumorzellen beitragen, da der niedrige pH-Wert zudem die Aktivität sezernierter Cathepsine fördert (Abb. 1.5B; Hinton *et al.*, 2009). Es wird vermutet, dass Cathepsine, die als proteolytische Enzyme normalerweise in Lysosomen vorkommen, von bestimmten Tumorzellen in die extrazelluläre Umgebung abgegeben werden. Sie sollen die Invasion der Zellen durch den Verdau von Proteinen der extrazellulären Matrix oder durch die Aktivierung anderer Proteasen und damit letztlich die Metastasierung der Tumorzellen begünstigen (Gocheva und Joyce, 2007). Letztlich konnte die Invasion der MB231-Brustkrebszellen, aber nicht die der MCF7-Zellen mit Hilfe der spezifischen V-ATPase-Inhibitoren Bafilomycin und Concanamycin in einem *in vitro* Migrationsversuch gehemmt werden (Sennoune *et al.*, 2004).

1.4 Inhibitoren der V-ATPase

Im Hinblick auf die diversen V-ATPase-assoziierten Krankheitsbilder rückt die Analyse spezifischer Hemmstoffe der V-ATPase zur Entwicklung neuer Therapeutika immer mehr in den Vordergrund der biomedizinischen Forschung. Zudem sind Inhibitoren der V-ATPase wertvolle Instrumente für die Charakterisierung von Transportprozessen sowohl in Geweben als auch auf der zellulären Ebene. Letztlich ist die Analyse der Interaktion der V-ATPase mit ihren Inhibitoren auf molekularer Ebene die Grundvoraussetzung für den therapeutischen Einsatz von Hemmstoffen der V-ATPase (Huss und Wieczorek, 2009).

Die bisher entdeckten spezifischen Inhibitoren der V-ATPase können in verschiedene Klassen eingruppiert werden. Neben den Plecomakroliden, den Makrolactonen und den Benzolacton Enamiden, die in den folgenden Abschnitten eingehend behandelt werden, gibt es weitere Klassen, die hier nur kurz Erwähnung finden sollen. Dazu gehören u.a. die Destruxine, die im Falle des Destruxin B die V-ATPase der Hefe mit einem IC₅₀-Wert von 5 μ M hemmen (Muroi *et al.*, 1994), oder die Chondropsine, die die V-ATPasen der chromaffinen Granula und des Pilzes *Neurospora crassa* in mikromolaren Konzentrationen hemmen (Bowman *et al.*, 2003; Cantrell *et al.*, 2000). Der erst kürzlich entdeckte spezifische V-ATPase-Inhibitor Diphyllin hemmt die V-ATPase in chromaffinen Granula des Rinds und die Ansäuerung von Lysosomen in humanen Osteoklasten mit einem IC₅₀-Wert von 17 nM (Sørensen *et al.*, 2007).

1.4.1 Die Inhibitor-Klasse der Plecomakrolide

Neben dem bereits in den 1980er Jahren als erstes entdeckten V-ATPase-Inhibitor Bafilomycin gehört ein weiterer Hemmstoff der V-ATPase, Concanamycin, zu der Klasse der Plecomakrolide (Bowman *et al.*, 1988; Dröse *et al.*, 1993). Beide Naturstoffe werden durch Streptomyceten produziert, hemmen die V-ATPase spezifisch in nanomolaren Konzentrationen (Bowman et al., 1988; Dröse et al., 1993) und werden seit vielen Jahren als Instrument zur Identifizierung der V-ATPase genutzt. Als Plecomakrolide mit einem Makrolacton- und einem Hemiketalring teilen sie sich strukturelle Eigenschaften (Dröse und Altendorf, 1997), wobei Concanamycin mit einem 18-gliedrigen Makrolactonring im Vergleich zu Bafilomycin mit einem 16-gliedrigen Makrolactonring etwas größer ist (Abb. 1.6). Zudem besitzt Concanamycin im Gegensatz zu Bafilomycin eine zusätzliche Zuckergruppe, die an den Hemiketalring gekoppelt ist und dem Molekül Stabilität verleiht, jedoch keinen Einfluss auf die inhibitorischen Eigenschaften hat (Abb. 1.6; Dröse und Altendorf, 1997). Untersuchungen der Beziehung von Struktur und Funktion verschiedener Bafilomycin-Derivate zeigten, dass sowohl der Makrolacton- als auch der Hemiketalring für optimale Hemmeigenschaften essentiell sind (Dröse und Altendorf, 1997; Dröse et al., 1993; Gagliardi et al., 1998a). Auf der Basis der Kenntnis dieser strukturellen Schlüsselelemente konnten neue V-ATPase-Inhibitoren entwickelt und synthetisiert werden (Gagliardi et al., 1998b). Der potenteste dieser Indol-Inhibitoren, Indol0 (2Z,4E)-5-(5,6-dichloro-2-indolyl)-2-methoxy-N-(1,2,2,6,6-pentamethylpiperidin-4-yl)-2,4-Pentadienamid), weist für die Hemmung der V-ATPase von Osteoklasten einen IC₅₀-Wert von 30 nM auf (Nadler et al., 1998). Aufgrund von Ergebnissen von EPRspektroskopischen Untersuchungen mit Spin-markierten Proteolipiduntereinheiten der V-ATPase bzw. Spin-markierten Indol-Derivaten wurde eine Interaktion des Indol0 mit der V₀-Untereinheit c vermutet (Dixon et al., 2008; Páli et al., 2004).



Abb. 1.6: Strukturen der Plecomakrolide Bafilomycin, Concanamycin und Concanolid Die Plecomakrolide Bafilomycin A₁ (A), Concanamycin A (B) und Concanolid A (C) zeichnen sich strukturell durch ihren 16- bzw. 18-gliedrigen Makrolactonring sowie einen Hemiketalring aus (Dröse und Altendorf, 1997). Concanamycin A besitzt zusätzlich eine Zuckergruppe, deren Fehlen bei Concanolid keine Auswirkung auf die inhibitorischen Eigenschaften hat.

Die Bindestelle der Plecomakrolide wurde aufgrund der Ergebnisse verschiedener Studien im V₀-Komplex der V-ATPase vermutet (Crider et al., 1994; Hanada et al., 1990; Zhang et al., 1994). Dabei gab es einerseits Hinweise auf die Lokalisation der Bindestelle in der Untereinheit a (Zhang et al., 1994), andererseits deutete die sinkende Affinität der V-ATPase während der Reinigung über eine Bafilomycin C-Affinitätschromatographie in Anwesenheit von DCCD, das an die c-Untereinheit bindet, auf die V_O-Untereinheit c als Bindestelle hin (Rautiala et al., 1993). Schließlich konnten zwei unabhängige Versuchsansätze zeigen, dass die Plecomakrolide mit der c-Untereinheit interagieren. Erstens senkten bestimmte Aminosäureaustausche in der c-Untereinheit von Neurospora crassa die Sensitivität der V-ATPase gegenüber Bafilomycin (Bowman und Bowman, 2002). Zweitens konnte die c-Untereinheit der V-ATPase von M. sexta in einem Photoaffinitäts-Labelversuch (PAL) spezifisch mit einem radioaktiven Diazirinyl-Derivat von Concanamycin, dem ¹²⁵I-Concanolid A (9-O-[p-(trifluoroethyldiazirinyl)-benzoyl]-21,23-dideoxy-23-[¹²⁵I]Iodconcanolid), markiert werden (Huss et al., 2002). Die Kombination weiterer Mutationsstudien mit der c-Untereinheit von N. crassa und den Informationen über die Struktur des K-Rings von E. hirea (Abb. 1.3B) konnte die Bafilomycin-Bindestelle schließlich an der Schnittstelle zweier benachbarter c-Untereinheiten im c-Ring lokalisieren (Bowman et al., 2006; Bowman et al., 2004; Murata et al., 2005). Die weitere Untersuchung der Bindestelle mit Hilfe von Mutationsstudien an der c-Untereinheit (Vma3) von S. cerevisiae und dem Einpassen der Aminosäuresequenz von VMA3 in die Struktur des K-Rings von E. hirae konnte die Beteiligung von TMH1 und TMH2 der einen c-Untereinheit und TMH4 der benachbarten c-Untereinheit zeigen (Bockelmann et al., 2010; Bowman et al., 2004). Weiter wurde angenommen, dass sich die Bindestellen der Plecomakrolide und des DCCDs, das an das essentielle Glutamat auf der anderen Seite von TMH4 bindet, nicht überlappen (Abb. 1.7; Huss et al., 2011). Diese Vermutung stützt sich auf die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen: Erstens hatten die Mutationen, die in der c-Untereinheit von N. crassa die Sensitivität der V-ATPase gegenüber Bafilomycin änderten, keinen Einfluss auf die Sensitivität der V-ATPase gegenüber DCCD (Bowman und Bowman, 2002) und zweitens konnte die Markierung der c-Untereinheit von M. sexta mit dem fluoreszierenden DCCD-Derivat NCD-4 nicht durch eine vorherige Inkubation mit Bafilomycin, Concanamycin oder Concanolid A verdrängt werden (Bockelmann et al., 2010). Eine Beteiligung der Untereinheit a an der Bindung der Plecomakrolide ist dennoch ebenso wahrscheinlich, da in Mutationsstudien mit der Vph1-Untereinheit der Hefe-V-ATPase mehrere Aminosäurereste identifiziert wurden, deren Austausch die Resistenz der V-ATPase gegenüber Bafilomycin um etwas mehr als maximal das Doppelte erhöht (Wang et al., 2005). Demnach wird die Interaktion der Plecomakrolide mit der V-ATPase an der Schnittstelle der Untereinheiten a und c vermutet. Deshalb wird für den Inhibierungsmechanismus angenommen, dass die Rotation des c-Rings vorbei an der a-Untereinheit mechanisch blockiert wird (Huss et al., 2011).



Abb. 1.7: Die Bindestellen der Inhibitoren Bafilomycin, Archazolid und DCCD im c-Ring Dargestellt sind die Inhibitorbindestellen von Bafilomycin und Archazolid in Bezug auf die Bindestelle von DCCD im K-Ring von *E. hirae* (Abb. aus Bockelmann, 2011). Die Abbildung zeigt eine Aufsicht des K-Rings von *E. hirae* (PDB Code 2DB4) mit den dreidimensionalen Strukturen von Bafilomycin (gelb), Archazolid (grün) und DCCD am Glutamat-139 der K-Untereinheit (rot). Die K-Untereinheiten sind abwechselnd in hellgrau und grau eingefärbt. An der Bindung von Bafilomycin sind Aminosäurereste in TMH1 und TMH2 der einen c-Untereinheit sowie Aminosäurereste in TMH4 der benachbarten c-Untereinheit beteiligt. Die Bindestelle des Archazolids konzentriert sich auf die TMH4 einer c-Untereinheit.

1.4.2 Die Inhibitor-Klasse der Archazolide

Ein vor nicht allzu langer Zeit entdeckter V-ATPase-Inhibitor ist Archazolid, ein Makrolacton, das von den Myxobakterien *Archangium gephyra* und *Cystobacter* sp. produziert wird (Sasse *et al.*, 2003). Die strukturellen Eigenschaften der Archazolide zeichnen sich durch einen makrozyklischen Lactonring und eine daran angehängte Thiazolseitenkette aus (Abb. 1.8; Sasse *et al.*, 2003).



Abb. 1.8: Struktur des Makrolactons Archazolid A

Die Struktur von Archazolid A besteht aus einem makrozyklischen Lactonring mit angehängter Thiazolseitenkette (Sasse *et al.*, 2003). Für einen Überblick über die zu der Familie der Archazolide gehörenden Derivate siehe Huss und Wieczorek (2009).

Archazolid A und B hemmen spezifisch die V-ATPase verschiedener Säugerzellen und die aus *M. sexta* isolierte V-ATPase mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich (Huss *et al.*, 2005; Sasse *et al.*, 2003). Die Bindestelle des Archazolids innerhalb der V-ATPase wurde bereits sehr gut eingegrenzt. Erste Ergebnisse ließen vermuten, dass sie mit der der Plecomakrolide überlappt, da das radioaktive ¹²⁵I-Concanolid-Label an der c-Untereinheit der V-ATPase durch eine Vorinkubation mit Archazolid verdrängt wurde (Huss et al., 2005). Umgekehrt wurde die Markierung der c-Untereinheit mit einem radioaktiven Derivat von Archazolid durch die vorherige Zugabe von Concanamycin A verhindert (Bockelmann et al., 2010). Letztlich wurde mit Hilfe von Mutationsstudien mit der Untereinheit Vma3 von S. cerevisiae und Markierungsversuchen mit dem fluoreszierenden DCCD-Derivat NCD-4 festgestellt, dass sich die Bindestellen von Bafilomycin und Archazolid weniger stark überlappen als zunächst erwartet (Bockelmann et al., 2010). In den Mutationsstudien im VMA3-Gen der Hefe wurden von den Aminosäuren mit einem Einfluss auf die Bindung von Bafilomycin nur die Aminosäuren Tyrosin-142 und Leucin-144 für eine Beteiligung an der Archazolid-Bindung identifiziert, da nur ihr Austausch einen Einfluss auf den IC₅₀-Wert für Archazolid hatte (Bockelmann et al., 2010). In einem weiteren Versuchsansatz konnte gezeigt werden, dass Archazolid im Gegensatz zu Bafilomycin die Markierung des essentiellen Glutamats-137 in TMH4 mit dem fluoreszierenden NCD-4 verhindern kann (Bockelmann et al., 2010). Auf der Basis dieser Ergebnisse wird davon ausgegangen, dass Archazolid im Bereich des essentiellen Glutamats sowie der Aminosäuren Tyrosin-142 und Leucin-144 in TMH4 und dementsprechend in der äquatorialen Ebene einer einzelnen c-Untereinheit bindet (Abb. 1.7; Bockelmann et al., 2010). Demnach wird vermutet, dass Archazolid die V-ATPase wie Bafilomycin über die Blockierung der Rotation des c-Rings inhibiert (Bockelmann et al., 2010).

1.4.3 Die Benzolacton Enamide

Die Inhibitor-Familie der Benzolacton Enamide umfasst eine Reihe von zytotoxischen Naturstoffen, die von verschiedenen Organismen produziert werden: Apicularen konnte aus Myxobakterien *Chondromyces* sp. isoliert werden (Kunze *et al.*, 1998), die Lobatamide aus dem Tunicaten *Aplidium lobatum* (Galinis *et al.*, 1997), Oximidin aus *Pseudomonas* sp. (Kim *et al.*, 1999) und Salicylihalamid aus dem marinen Schwamm *Haliclona* sp. (Erickson *et al.*, 1997). Das gemeinsame strukturelle Merkmal der Inhibitoren ist der Benzolacton-Ring, an den eine Enamid-Seitenkette angehängt ist (Abb. 1.9; Huss und Wieczorek, 2009). Untersuchungen der strukturellen Schlüsselmerkmale ergaben im Fall von Apicularen A, dass Strukturmodifikationen an der Enamid-Seitenkette zur Verringerung der Inhibitoreffizienz führen, während Modifikationen am Lactonring weniger starke Auswirkungen haben (Überblick in Huss und Wieczorek, 2009).

Alle Benzolacton Enamide wiesen sowohl in Tests mit verschiedenen Zelllinien als auch in Inhibierungsversuchen mit Membranpräparationen von Säugerzellen oder der gereinigten V-ATPase von *M. sexta* IC₅₀-Werte im nanomolaren Bereich auf und konnten als spezifische Inhibitoren der V-ATPase identifiziert werden (Überblick in Huss und Wieczorek, 2009). Interessanterweise stellte sich für die Lobatamide, Oximidine und Salicylihalamide in Versuchen mit Vakuolenmembranenpräparationen von *N. crassa* und *S. cerevisiae* sowie für Apicularen in Aktivitätstests mit isolierten Vakuolenmembranen von *S. cerevisiae* heraus, dass die Benzolacton Enamide die V-ATPase der Pilze nicht hemmen (Boyd *et al.*, 2001; S. Bockelmann, M. Huss und H. Wieczorek, unveröffentlichte Daten). Vielmehr bilden sie durch diese besondere Eigenschaft die erste Klasse von V-ATPase-Inhibitoren, die nicht ubiquitär auf V-ATPasen aller Spezies wirken (Huss und Wieczorek, 2009). Damit gehören die Benzolacton Enamide zu den vielversprechendsten Kandidaten für den therapeutischen Einsatz von V-ATPase-Inhibitoren.



Abb. 1.9: Struktur der Benzolacton Enamide Apicularen A, Salicylihalamid und Saliphenylhalamid Das gemeinsame Strukturmerkmal von Apicularen A (A), Salicylihalamid (B) und Saliphenylhalamid (C) ist der Benzolacton-Ring, an den eine Enamid-Seitenkette angehängt ist (Huss und Wieczorek, 2009).

Die Wirkung des Apicularens und auch des Salicylihalamids wird derzeit in verschiedenen Studien im Hinblick auf einen zukünftigen therapeutischen Einsatz untersucht. Bei der Untersuchung der inhibitorischen Effekte des Apicularen A auf diverse Krebs- und Osteoklasten-Zelllinien wurde festgestellt, dass Apicularen A Apoptose-induzierend wirkt, wobei die molekularen Zusammenhänge aktuell weiter analysiert werden (Hong *et al.*, 2005a; Hong *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2005b; Hong *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007). Für ein Derivat von Salicylihalamid wurde im Zusammenspiel mit einem anderen Chemotherapeutikum die sehr effektive Inhibition einer Krebszelllinie nachgewiesen, wohingegen der separate Einsatz der beiden Inhibitoren den gleichen Effekt erst bei weitaus höheren Konzentrationen erreichte (Whitehurst *et al.*, 2007).

Über die Bindestelle der Benzolacton Enamide innerhalb der V-ATPase sind bisher nur wenige Informationen verfügbar. Inhibierungsversuche mit Salicylihalamid A und dem V₁V₀-Holoenzym, dem freien V₁- bzw. V₀-Komplex identifizierten den V₀-Komplex als Wirkort der Benzolacton Enamide (Xie *et al.*, 2004). In Verdrängungsversuchen konnten Salicylihalamid und Apicularen A die radioaktive Markierung der c-Untereinheit durch das ¹²⁵I-Concanolid A nicht verhindern, sodass davon ausgegangen wurde, dass die Benzolacton Enamide eine andere Bindestelle besetzen als die Plecomakrolide (Huss *et al.*, 2002; Huss *et al.*, 2005). Auch in Markierungsversuchen mit Archazolid und NCD-4 wurde keine Interferenz mit Apicularen A festgestellt (Bockelmann *et al.*, 2010).

1.5 Modellorganismen der V-ATPase

1.5.1 Die V-ATPase im Mitteldarm von Manduca sexta

Einer der Modellorganismen zur Erforschung der V-ATPase ist die Raupe des Tabakschwärmers *M. sexta* (Wieczorek *et al.*, 1999b). Die hohe Dichte der V-ATPase in der apikalen Plasmamembran der Gobletzellen des Mitteldarmepithels der Raupe ermöglicht die Reinigung des Enzyms in Milligramm-Mengen, und so stellt der Mitteldarm von *M. sexta* ein Modellgewebe dar, das zur Untersuchung genereller Aspekte der V-ATPase bestens geeignet ist (Huss *et al.*, 2002; Wieczorek *et al.*, 1990; Wieczorek *et al.*, 1999b).



Hämolymphe (basal): pH=6,8, [K⁺]=25 mM

Abb. 1.10: Energetisierung des Mitteldarmepithels der *M. sexta* Raupe durch die Plasmamembran-V-ATPase

Die V-ATPase (V) in der Gobletzellapikalmembran (GCAM) treibt durch den Export von Protonen aus dem Gobletzelllumen einen K⁺/2H⁺-Antiporter (A) an. Zusammen erzeugen beide eine transepitheliale Spannung von \geq 150 mV und einen pH-Wert von >11 im Mitteldarmlumen. Außerdem werden sekundäre Transporte wie die Aufnahme von Aminosäuren (AA) durch den AA/K⁺-Symport (S) über die Columnarzellapikalmembran (CCAM) energetisiert. (Abbildung leicht modifiziert nach Wieczorek *et al.*, 2000).

Durch den primär aktiven Protonentransport energetisiert die V-ATPase alle transepithelialen sekundären Transportprozesse einschließlich der Regulation des hohen luminalen pH-Werts (pH>11) und der Absorption von Aminosäuren (Wieczorek *et al.*, 2000). Der durch das Zusammenspiel mit einem $K^+/2H^+$ -Antiporter erzeugte hohe pH-Wert im Mitteldarm der Raupe dürfte dem Schutz vor Tanninen in der pflanzlichen Nahrung dienen, während die transepitheliale Spannung von 150 mV die Absorption von Aminosäuren durch K^+ -Symporter in der Columnarzellapikalmembran unterstützt (Abb. 1.10; Dow, 1984; Wieczorek *et al.*, 2000).

1.5.2 Die V-ATPase von Saccharomyces cerevisiae

Die Möglichkeit der einfachen genetischen Manipulation etablierte die Bäckerhefe S. cerevisiae als Modellsystem zur Untersuchung der eukaryotischen V-ATPase. Von großem Vorteil ist dabei, dass bei der Hefe jede V-ATPase-Untereinheit mit Ausnahme der a-Untereinheit durch nur ein Gen kodiert wird, während die V-ATPase-Untereinheiten in Säugerzellen häufig in mehreren Isoformen vorliegen (Tab. 1.1). Die Deletion jedes einzelnen Gens oder die gleichzeitige Deletion beider Gene für die Isoformen der a-Untereinheit führt bei der Hefe zu einem charakteristischen Vma--Phänotyp (Kane, 2006; Manolson et al., 1994). Dabei ist die Lebensfähigkeit der Mutanten, in denen V-ATPase-Untereinheiten deletiert wurden, auf Medium mit einem pH-Wert von 5,5 (Nelson und Nelson, 1990) ein weiterer Vorteil der Hefe als Modellorganismus. Mittlerweile ist dank umfangreicher genomischer Screens eine reichhaltige Kollektion von intensiv untersuchten Vma-Phänotypen verfügbar (Überblick in Kane, 2007). Der Vma-Phänotyp zeichnet sich dadurch aus, dass die Zellen nicht mehr auf Medium mit einem pH-Wert >6,5 oder mit einer erhöhten Calcium-Konzentration (100 mM CaCl₂) wachsen, sondern nur noch auf Medium mit einem sauren pH-Wert von etwa 5,5 überleben (Nelson und Nelson, 1990; Ohya et al., 1991). Begründet wird dieser Phänotyp vor allem damit, dass die in der Vakuolenmembran lokalisierte V-ATPase bei der Hefe eine zentrale Rolle in der pH- und Calcium-Homöostase spielt (Kane, 2006).

Bei S. cerevisiae ist die V-ATPase abhängig davon, welche Isoform der a-Untereinheit exprimiert wird (Abschnitt 1.2.2.1), in der Membran des Golgi-Apparats oder in der Vakuolenmembran lokalisiert, wo sie für die luminale Ansäuerung der verantwortlich ist. Dadurch werden zum Kompartimente einen sekundäre Transportsysteme energetisiert, zum anderen dient das saure Milieu der proteolytischen Aktivierung von Proteasen zur Reifung von Vorläuferproteinen und der Sortierung der Proteine nach Ziel (Klionsky et al., 1990). Die Vakuole der Hefe spielt zudem eine wichtige Rolle bei der Metabolitspeicherung und der pH- und Ionen-Homöostase der Zelle (Klionsky et al., 1990). Die Ca²⁺-Homöostase wird dabei durch den sekundär aktiven Ca²⁺/H⁺-Antiporter Vcx1 in der Vakuolenmembran sichergestellt, indem die zytosolische Ca²⁺-Konzentration durch Ca²⁺-Aufnahme in die Vakuole reguliert wird (Miseta et al., 1999). Dementsprechend kann bei einem Verlust der V-ATPase-Aktivität keine Ca²⁺-Homöostase mehr stattfinden, die Hefezellen überleben nicht in Medium mit einer erhöhten Ca²⁺-Konzentration und zeigen den charakteristischen Vma⁻-Phänotyp. Als ein kompensatorischer Mechanismus für die Ca²⁺-Homöostase kann bei dem Verlust der Vcx1-Aktivität die Proteinphosphatase Calcineurin und infolgedessen die beiden Ca²⁺-Pumpen Pmr1 und Pmc1 aktiviert werden (Kane, 2006). Zur Aufrechterhaltung der pH-Homöostase bei einer inaktiven V-ATPase können durch Endozytose schwache Säuren aus dem umgebenen Medium, wenn dies einen sauren pH-Wert aufweist, aufgenommen werden (Plant et al., 1999).

S. cerevisiae kann als eukaryotischer Modellorganismus auch für die Untersuchung der V-ATPase höherer Organismen dienen. Im Jahr 1990 gelang dem

Ehepaar Nelson die Komplementation von Deletionsmutanten für die Untereinheiten Vma2 und Vma3 durch die Transformation mit Plasmiden, die die entsprechende kodierende Sequenz der deletierten V-ATPase-Untereinheit trug (Nelson und Nelson, 1990). Bereits wenig später wurde die Komplementation der Deletionsmutante für die Untereinheit c (Vma3) durch die homologen Proteolipiduntereinheiten der Taufliege Drosophila melanogaster und des Hummers Nephrops norvegicus erfolgreich durchgeführt (Finbow et al., 1994; Harrison et al., 1994). Auch mit den c-Untereinheiten des Malariaerregers Plasmodium falciparum und der marinen Alge Acetabularia acetabulum konnte die vma3-Mutante komplementiert werden (Ikeda et al., 2001; Yatsushiro et al., 2005). Die funktionelle Expression einer Säuger-c-Untereinheit in Hefe ist allerdings bisher nicht gelungen. Im Gegensatz dazu konnte die Isoform d1 der murinen V-ATPase in der entsprechenden Deletionsmutante der Hefe exprimiert werden, während dies mit der Isoform d2 nicht glückte (Nishi et al., 2003a). Auch der Austausch der V₀-Untereinheit a der Hefe resultierte bislang nicht in einer funktionellen V-ATPase, wie die Versuche, eine Doppeldeletionsmutante für Vph1 und Stv1 mit der homologen a-Untereinheit (LEMAC) der V-ATPase der Zitrone (Aviezer-Hagai et al., 2000) oder der Isoform a4 der humanen V-ATPase (Su et al., 2008) zu komplementieren, demonstrierten. Es wurde vermutet, dass die Sequenzunterschiede von LEMAC und Vph1 im membranständigen, für die Assemblierung und den Protonentransport wichtigen Teil für dieses negative Ergebnis verantwortlich waren (Aviezer-Hagai et al., 2000).

1.6 Ziele dieser Arbeit

Für den Einsatz von V-ATPase-Inhibitoren als Therapeutika ist das Wissen über deren Bindestelle und Wirkmechanismus essentiell, um die sehr komplexen Strukturen der Naturstoffe auf einfachere Moleküle zu reduzieren bzw. diese zielgenau modifizieren zu können. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit zum einen die Bindestelle der Plecomakrolide, die wie schon erwähnt bereits in früheren Analysen untersucht wurde, weiter charakterisiert werden. Zum anderen sollte erstmals die Bindestelle der Benzolacton Enamide bestimmt werden, über die bisher nur wenig bekannt ist. Dazu sollten die neuen Inhibitor-Derivate von Bafilomycin, Concanamycin und Apicularen, die ¹⁴C-gelabelten 4-(3-trifluoromethyl-3H-diazirin-3entwickelten mit der neu yl)Benzoesäure (Bender et al., 2007) modifiziert wurden, in Markierungsversuchen mit der gereinigten V-ATPase aus M. sexta erstmals Anwendung finden und neue Erkenntnisse über die Inhibitor-Bindestellen liefern.

Da die V-ATPase der Hefe nicht durch Apicularen gehemmt wird, kann sie bisher nicht zur Untersuchung der Apicularen-Bindestelle in Mutationsstudien auf der Ebene von Aminosäuren genutzt werden. Mit Hilfe der Komplementation von Deletionsmutanten von *S. cerevisiae* mit V₀-Untereinheiten Apicularen-sensitiver Organismen sollte versucht werden, Hybrid-V-ATPasen als Modellsystem für die Gewinnung neuer Informationen zur Apicularen-Hemmung zu entwickeln. Zusätzlich sollte, wie für die F-ATPase durch die Substitution des essentiellen Aspartats gezeigt (Hoppe *et al.*, 1982), die Möglichkeit einer Entkopplung von Protonentransport und ATP-Hydrolyse bei der V-ATPase durch die gerichtete Mutagenese der essentiellen Glutamate im Proteolipidring der Hefe überprüft werden. Dies sollte auch im Hinblick auf die Aufklärung des Mechanismus der V-ATPase-Hemmung geschehen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Materialien

Alle verwendeten Chemikalien hatten, sofern nicht anders erwähnt, p.a.-Qualität. Die nicht aufgeführten Standardchemikalien wurden in der Regel von den Firmen Fluka, Serva, Sigma-Aldrich und Roth bezogen. Die verwendeten Materialien stammten von den Firmen Böttger, Eppendorf, Greiner BioOne, Sarstedt und Waldeck.

Hersteller	Chemikalien		
BD Biosciences	Bacto TM Hefeextrakt, Bacto TM Trypton, Difco TM Yeast Nitrogen Base w/o amino acids		
Bioline	Agarose		
Biomol	Pefabloc SC		
Calbiochem	Protease-Inhibitor-Cocktail Nr. 535142		
Erkol	Polyvinylalkohol 28/20		
Eurogentec	SmartLadder DNA-Standard		
Fermentas	Page Ruler Prestained Protein Ladder		
Fluka	e-Amino-n-Capronsäure, Ficoll-400, Polyethylenglycol 100		
GE Healthcare	LMW (low molecular weight) SDS Standard		
Merck	Amidoschwarz 10B (C.I. 20470), Natriummolybdat, Triton X100		
MP Biomedicals	Zymolyase 100T, Gypsy Moth Diet, Agar		
Roche	dNTP (Desoxynukleosidtriphosphate) Mix, Trypsin		
Serva	Acrylamid, Agar Agar, BCIP, Bisacrylamid, Coomassie Brilliant Blau R250, NBT		
Sigma-Aldrich	Acetonitril, Aminosäuren, Di-Tris-ATP, BSA, C ₁₂ E ₁₀ , G418 (Geneticin), Malachitgrün, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)		

Tab. 2.1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Herstellernachweis

2.1.2 Antikörper

Tab. 2.2: Verwendete Antikörper

Auflistung der verwendeten Antiköper mit Herkunftsorganismus, Verdünnung für Western Blot und Bezugsquelle.

Antikörper	Herkunftsorganismus	Verdünnung	Bezugsquelle
anti-A (Vma1)	Maus (monklonal)	1:3000	8B1, A6422, Invitrogen
anti-B (Vma2)	Maus (monoklonal)	1:4000	13D11, A6427, Invitrogen
anti-d (Vma6)	Kaninchen (monoklonal)	1:2000	Christian Ungermann,
	Kammenen (monokionar)		Universität Osnabrück
anti-Vph1	Maus (monoklonal)	1:1000	10D7, A6426, Invitrogen
anti-A (Manduca sarta:		1:20	Abteilung Tierphysiologie,
$\Delta K 221-9)$	Maus (monoklonal)		Universität Osnabrück;
/ iii 221-7)			Sumner et al., 1995
			Abteilung Tierphysiologie,
anti-e (<i>M. sexta</i> ; AK 224-3)	Maus (monoklonal)	1:20	Universität Osnabrück;
			Merzendorfer et al., 1999
anti-HA	Maus (monoklonal)	1:1000	16B12, MMS-101P, Covance
anti-Maus (sek. AK)	Ziege (polyklonal)	1:10000	A3687, Sigma
anti-Kaninchen (sek. AK)	Ziege (polyklonal)	1:10000	A3562, Sigma

2.1.3 Inhibitoren

Alle V-ATPase-spezifischen Inhibitoren wurden in DMSO gelöst und als 10 mM Stocklösung in Aliquots bei -80°C gelagert. Die Abkürzung "D-" steht für Diazirinylbenzoyl-gelabelte Inhibitoren.

Name	Chemische Bezeichnung	Herkunft/Quelle	
Apicularen A		B. Kunze, HZI Braunschweig (Kunze <i>et al.</i> , 1998)	
D-Apicularen	3-O-[4-(3-Trifluoromethyldiazirin-3-yl)benzoyl]- Apicularen	S. Grond, Universität Tübingen	
¹⁴ C-D-Apicularen	3-O-[4-(3-Trifluoromethyldiazirin-3-yl)-[1- ¹⁴ C]benzoyl]-Apicularen	S. Grond, Universität Tübingen	
Archazolid A		F. Sasse, HZI Braunschweig	
Azid	NaN ₃ , Natriumazid	Sigma	
Bafilomycin A ₁		LC Laboratories	
D-Bafilomycin	21-O-[4-(3-Trifluoromethyldiazirin-3-yl)benzoyl]- Bafilomycin A ₁	S. Grond, Universität Tübingen (Bender <i>et al.</i> , 2007)	
¹⁴ C-D-Bafilomycin	21-O-[4-(3-Trifluoromethyldiazirin-3-yl)-[1- ¹⁴ C]benzoyl]-Bafilomycin A ₁	S. Grond, Universität Tübingen (Bender <i>et al.</i> , 2007)	
C ₄ F ₉ -D-Bafilomycin	21-O-[4-(3-Perfluorobutyldiazirin-3-yl)benzoyl]- Bafilomycin	S. Grond, Universität Tübingen (Burkard <i>et al.</i> , 2010)	
C ₈ F ₁₇ -D-Bafilomycin	21-O-[4-(3-Perfluorooctyldiazirin-3-yl) benzoyl]Bafilomycin	S. Grond, Universität Tübingen (Burkard <i>et al.</i> , 2010)	
Concanamycin A		S. Grond, Universität Tübingen	
Concanolid A	21-Deoxyconcanolid A	S. Grond, Universität Tübingen	
D-Concanolid	23-O-[4-(3-Trifluoromethyldiazirin-3-yl)benzoyl]- 21-Deoxyconcanolid A	S. Grond, Universität Tübingen (Bender <i>et al.</i> , 2007)	
¹⁴ C-D-Concanolid	23-O-[4-(3-Trifluoromethyldiazirin-3-yl)-[1- ¹⁴ C]benzoyl]-21-Deoxyconcanolid A	S. Grond, Universität Tübingen (Bender <i>et al.</i> , 2007)	
C ₄ F ₉ -D-Concanolid	23-O-[4-(3-Perfluorobutyldiazirin-3-yl)benzoyl]-21- Deoxyconcanolid	S. Grond, Universität Tübingen (Burkard <i>et al.</i> , 2010)	
C ₈ F ₁₇ -D-Concanolid	23-O-[4-(3-Perfluorooctyldiazirin-3-yl)benzoyl]-21- Deoxyconcanolid	S. Grond, Universität Tübingen (Burkard <i>et al.</i> , 2010)	
Saliphenylhalamid		XS. Xie, Dallas, USA	
Vanadat	Na ₃ VO ₄ , Natriumorthovanadat	Merck	

Tab. 2.3: Verwendete Inhibitoren

2.1.4 Versuchstiere

Für V-ATPase-Präparationen wurden Raupen (5. Larvalstadium) des Tabakschwärmers *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) verwendet. Die Tiere wurden unter 16 h Langtag-Bedingungen und 27°C in einem Laborbrutschrank gehalten und mit synthetischem Futter (Gypsy Moth Diet, MP Biomedicals) ernährt.

2.1.5 Kulturmedien

Alle Medien wurden mit gereinigtem H₂O (Milli-Q, Millipore) angesetzt und anschließend autoklaviert. Aminosäure-Lösungen, Antibiotika sowie separat autoklaviertes 1 M CaCl₂ wurden erst nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf etwa 50°C zugegeben. Für Platten wurden LB- und YPDA-Medien vor dem

Autoklavieren mit 2% Agar Agar versetzt, bei SD-Platten betrug die Agar Agar-Konzentration 1,5%.

Medium	Zusammensetzung			
LB 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl				
LB _{amp}	LB mit 100 µg/ml Ampicillin (sterilfiltriert)			
ψb	2% Pepton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% MgSO ₄ , pH 7,6 mit KOH			
YPD	1% Hefeextrakt, 2% Peptone, 2% Glucose			
YPDA	YPD mit 0,02% L-Adenin			
YPDA pH 5,5	YPDA mit 50 mM MES und 50 mM MOPS			
YPDA G418	YPDA pH 5,5 mit 250 µg/ml G418 (Stocklösung 50 mg/ml)			
YPDA pH 7,5	YPDA mit 50 mM MES und 50 mM MOPS, pH 7,5 mit NaOH			
YPDA CaCl ₂	YPDA pH 5,5 mit 0,1 M CaCl ₂			
Sporulationsmedium	2% K-Acetat, 1,5% Agar			
SD	0,67% Hefeextrakt ohne Aminosäuren, 2% Glucose, 50 mM MES, 50 mM MOPS, pH 5,5			
	mit NaOH			
	0,02% L-Adenin, 0,02% L-Arginin, 0,02% L-Histidin, 0,03% L-Isoleucin, 0,03% L-Lysin			
	HCl, 0,1% L-Leucin, 0,02% L-Methionin, 0,05% L-Phenylalanin, 0,2% L-Threonin,			
Aminosäure-Lösung	0,02% Tryptophan, 0,03% L-Tyrosin, 0,02% L-Uracil, 0,15% L-Valin			
zur Selektion	Für Selektionsmedien wurde die Aminosäure-Lösung ohne die entsprechende Aminosäure			
	hergestellt, autoklaviert und im Verhältnis 1:10 mit dem separat autoklavierten SD-			
	Medium gemischt.			

Tab. 2.4: Kulturmedien für Bakterien und Hefen

2.1.6 Escherichia coli Stämme

Für Dauerkulturen von *E. coli* wurden 800 μ l einer ÜN-Kultur (LB_{amp}) mit 70 μ l DMSO gemischt, umgehend in flüssigem N₂ tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
DH5a	$F^- \Phi 80 lacZ\Delta M15 \Delta (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK^-, mK^+) phoA supE44 \lambda^- thi-1 gyrA96 relA1$	Hanahan, 1983
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacl ⁴ ZAM15 Tn10 (Tet [*])]	Stratagene
Tet Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1XL10-GoldrecA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet') Amy Cam ^r]		Stratagene

Tab. 2.5: Verwendete Bakterienstämme

2.1.7 Saccharomyces cerevisiae Stämme

Für *S. cerevisiae*-Dauerkulturen wurden 1 ml einer ÜN-Kultur (YPDA pH 5,5) und 500 μ l steriles 50% iges Glycerin gemischt und nach 20-minütiger Inkubation bei RT in flüssigem N₂ tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft	
DMA64 1D	<i>MATα</i> ; ura3-52; trp1Δ 2; leu2-3,112; his3-11; ade2-1;	EUROSCARF,	
BMA04-1B	can1-100	Frankfurt	
BMA64 1BAyma3	<i>MATα</i> ; ura3-52; trp1Δ 2; leu2-3,112; his3-11; ade2-1;	Bockelmann et al.,	
BMA04-1BAVmu5	can1-100; vma3::HIS3	2010	
BV4741	MATa · his 3 11 · low 2 10 · mot 15 10 · wa 3 10	EUROSCARF,	
D14/41	MATU, MISSET, 120220, Met1520, Uruse0	Frankfurt	
BV4741Auma3	MATa; his $3\Delta 1$; leu $2\Delta 0$; met $15\Delta 0$; ura $3\Delta 0$;	EUROSCARF,	
$D14/41\Delta vmus$	YEL027w::kanMX4	Frankfurt	
BV47424.1mg11	<i>MAT</i> α ; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;	EUROSCARF,	
B14/42/2 <i>vmu11</i>	YPL234c::kanMX4	Frankfurt	
BV4741 Approx 16	MATa; his $3\Delta 1$; leu $2\Delta 0$; met $15\Delta 0$; ura $3\Delta 0$;	EUROSCARF,	
B14/41\(\Delta\)/mu10	YHR026w::kanMX4	Frankfurt	
\mathbf{RV} 4742 A yma 3 A yma 11	<i>MAT</i> α ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0;	Diese Arbeit	
$B14/42\Delta vmu S\Delta vmu 11$	YEL027w::kanMX4; YPL234c::kanMX4	Diese Albeit	
	MATa; his $3\Delta 1$; leu $2\Delta 0$; met $15\Delta 0$; ura $3\Delta 0$;		
BY4741 $\Delta vma3\Delta vma11\Delta vma16$	YEL027w::kanMX4; YPL234c::kanMX4;	Diese Arbeit	
	YHR026w::kanMX4		
$\mathbf{RV}4741$ Augh 1	MATa; his $3\Delta 1$; leu $2\Delta 0$; met $15\Delta 0$; ura $3\Delta 0$;	EUROSCARF,	
$B14/41\Delta v pn1$	YOR270c::kanMX4	Frankfurt	
BV17124 styl	<i>MAT</i> α ; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;	EUROSCARF,	
$D 1 4 / 42 \Delta 5 i V I$	YMR054w::kanMX4	Frankfurt	
BV4741Aunh 1A styl	MATa; his $3\Delta 1$; leu $2\Delta 0$; met $15\Delta 0$; ura $3\Delta 0$;	Diese Arbeit	
$B14/41\Delta v pn1\Delta siv1$	YOR270c::kanMX4; YMR054w::kanMX4	Diese Albeit	
$\mathbf{RV}_{4741} \wedge \mathbf{vnh}_{1} \wedge \mathbf{vma}_{3}$	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;</i>	Diago Arboit	
$D 1 + 7 + 1 \Delta v pn 1 \Delta v mus$	YOR270c::kanMX4; YEL027w::kanMX4	Diese Alben	

Tab. 2.6: Verwendete Hefestämme

2.1.8 Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pXJ40-KKO-16k	Plasmid mit der kodierenden Sequenz der c-Untereinheit	Mhairi A. Skinner, Guelph, Kanada
	(ATP6VOC) von Homo sapiens	(Skinner und Wildeman, 2001)
pXJ40-ATP-16k	Plasmid mit der kodierenden Sequenz der c-Untereinheit	Mhairi A. Skinner, Guelph, Kanada
	von Mus musculus	(Skinner und Wildeman, 2001)
pGADT7	Amp, LEU2, ADH-Promoter	Clontech
pRS316/VMA21	Amp, URA3, mit der kodierenden Sequenz der	Tom Stevens, Eugene, Oregon,
	Untereinheit Vma21 (mit HA-Tag) von S. cerevisiae	USA (Hill und Stevens, 1994)
pRS415	CEN/ARS, Amp, LEU2	Laborbestand der Abteilung
		Tierphysiologie,
		Universität Osnabrück
pRS415/VMA3	pRS415 mit VMA3 unter nativem Promoter	Bockelmann et al., 2010
YCplac22_msc	Amp, <i>TRP1</i> , mit der kodierenden Sequenz der c- Untereinheit von <i>M. sexta</i>	S. Bockelmann, Diplomarbeit 2006,
		Abteilung Tierphysiologie,
		Universität Osnabrück
pCR-II/ha3	Plasmid mit der kodierenden Sequenz für die	Mike Harrison, Leeds, England
	Untereinheit a3 der V-ATPase von H. sapiens	
pJV97/ha4	Plasmid mit der kodierenden Sequenz für die	Fiona Karet, Cambridge, England
	Untereinheit a4 der V-ATPase von H. sapiens	
Tab. 2.8: In dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Die zugehörigen Primersequenzen zu den angegebenen Ziffern (z.B. 3/4) sind in Tab. 2.9 aufgelistet.

Bezeichnung	Insert	Beschreibung / Konstruktion		
pGADT7/ <i>Hsc</i>	<i>H. sapiens</i> c-Untereinheit <i>ATP6VOC</i>	Amplifikation von <i>ATP6VOC</i> mit einfachem HA- Tag mit der Primerkombination 1/2, Klonierung über HindIII in pGADT7		
pGADT7/Mmc	<i>M. musculus</i> c- Untereinheit	Amplifikation von <i>M. musculus</i> c-UE mit einfachem HA-Tag mit 3/4, Klonierung über HindIII in pGADT7		
pGADT7/ <i>Msc</i>	M. sexta c-Untereinheit	Amplifikation von <i>M. sexta</i> c-UE aus YCplac22_msc mit 5/6, Klonierung über HindIII in pGADT7		
pRS415/VMA3_E137A	<i>VMA3</i> mit E137A	Gerichtete Mutagenese an pRS415/ <i>VMA3</i> mit 7/8, Codon Austausch: GAA \rightarrow CAA		
pRS415/VMA3_E137G	<i>VMA3</i> mit E137G	Gerichtete Mutagenese an pRS415/ <i>VMA3</i> mit 9/10, Codon Austausch: GAA \rightarrow CAA		
pRS415/VMA3_E137Q	<i>VMA3</i> mit E137Q	Gerichtete Mutagenese an pRS415/ <i>VMA3</i> mit 11/12, Codon Austausch: GAA \rightarrow CAA		
pRS415/VMA11	<i>VMA11</i> mit nativem Promoter und Terminator	Amplifikation von VMA11 inkl. nativem Promoter und Terminator mit 13/14, Klonierung in pRS415 über EagI/BamHI		
pRS415/VMA16 VMA16 mit nativem Promoter und Terminator		Amplifikation von <i>VMA16</i> inkl. nativem Promoter und Terminator mit 15/16, Klonierung in pRS415 über EagI/PstI		
pRS415/VMA3_VMA11	<i>VMA3, VMA11</i> , je mit nativem Promoter und Terminator	Restriktion von pRS415/VMA3 mit SacII/SmaI, sowie von pRS415/VMA11 mit SacI/SmaI, Klonierung von VMA3 und VMA11 über SacI/SacII in pRS415		
pRS415/VMA3_VMA11_VMA16	<i>VMA3, VMA11, VMA16,</i> je mit nativem Promoter und Terminator	Restriktion von pRS415/VMA3_VMA11 mit SacI/SacII, Klonierung von VMA3_VMA11 über SacI/SacII in pRS415/VMA16		
pRS415/3_11_16eGlu	pRS415 mit VMA3_E137Q, VMA11_E145Q und VMA16_E108Q	Gerichtete Mutagenese von VMA3 und VMA11 in pRS415/VMA3_VMA11 (nacheinander mit 11/12 für VMA3 und 29/30 für VMA11), sowie von VMA16 in pRS416/VMA16 (mit 31/32), danach Klonierung wie bei pRS415/VMA3_VMA11_VMA16		
pRS415/VPH1	<i>VPH1</i> mit nativem Promoter und Terminator	Amplifikation von <i>VPH1</i> inkl. nativem Promoter und Terminator mit 17/18, Klonierung in pRS415 mit EagI/BamHI		
pRS415/STV1	<i>STV1</i> mit nativem Promoter und Terminator	Amplifikation von <i>STV1</i> inkl. nativem Promoter und Terminator mit 19/20, Klonierung in pRS415 mit EagI/BamHI		
pRS415/VPH1/a3 Hybrid-Untereinheit VPH1/a3		Amplifikation der C-terminalen Hälfte der humanen Untereinheit a3 mit 21/22 aus pCR- II/ha3, homologe Rekombination des PCR- Produkts in pRS415/VPH1 (zuvor linearisiert mit Bsgl) durch Transformation in <i>S. cerevisiae</i> Wildtypstamm BY4741, Selektion auf Leucin- freiem SD-Medium, Plasmidisolierung aus		
pRS415/VPH1/a4 Hybrid-Untereinheit VPH1/a4		Amplifikation der C-terminalen Hälfte der humanen Untereinheit a4 mit 21/23 aus pJV97/ha4, anschließend homologe Rekombination des PCR-Produkts in pRS415/VPH1 (linearisiert). Für das weitere		

		Vorgehen siehe pRS415/VPH1/a3.	
		Amplifikation von VPH1/a4 mit 24/25 aus	
		pRS415/VPH1/a4, anschließend homologe	
	Homo sapiens c-	Rekombination des PCR-Produkts in	
CADT7/IIco VDII1/c4	Untereinheit ATP6VOC	pGADT7/Hsc (zuvor linearisiert mit NotI) durch	
pGAD1//Hsc_VFH1/d4	und Hybrid-Untereinheit VPH1/a4	Transformation in S. cerevisiae Wildtypstamm	
		BY4741, Selektion auf Leucin-freiem SD-	
		Medium, Plasmidisolierung aus S. cerevisiae,	
		Transformation in <i>E. coli</i> .	

2.1.9 Oligonukleotide

Die hier verwendeten Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Programms Clone Manager Suite 7 entworfen und bis auf eine Ausnahme von der Firma MWG bezogen. Der Primer Nr. 21 wurde über die Firma Microsynth Laboratories (Schweiz) erworben und zusätzlich mittels einer PAGE-Reinigung auf Richtigkeit überprüft. Alle Primer wurden mit H₂O zu einer Stocklösung von 100 pmol/ μ l gelöst und zehnfach verdünnt in PCR-Reaktionen eingesetzt.

Tab.	2.9:	Verwendete	Primer

Nr.	Bezeichnung	Sequenz $5' \rightarrow 3'$
1	hs_c_HindIII_for	TACTCAAAGCTTATGTCCGAGTCCAAGAGC
2	hs_c_HindIII_rev	TACTCAAAGCTTCTAAGCGTAATCTGGTACGTCGTATGGGTACTTTGT
		GGAGAGGATGAG
3	mm_c_HindIII_for	TACTCAAAGCTTATGGCTGACATCAAGAAC
4	mm_c_HindIII_rev	TACTCAAAGCTTCTAAGCGTAATCTGGTACGTCGTATGGGTACTTTGT
		GGAGAGGATTAG
5	c-blue_for	TACTCAAAGCTTATGGCCGAAAATCCAATC
6	c-blueHindIII_rev	TACTCAAAGCTTTTACTGTTTCGTGTACAG
7	Vma3_E137A_for	GATTTTGATTTTGATTTTTGCTGCAGTTTTGGGTCTATACGG
8	Vma3_E137A_rev	CCGTATAGACCCAAAACTGCAGCAAAAATCAAAATCAAAATC
9	Vma3_E137G_for	GATTTTGATTTTGATTTTTGCTGGAGTTTTGGGTCTATACGG
10	Vma3_E137G_rev	CCGTATAGACCCAAAAACTCCAGCAAAAATCAAAATCAAAATC
11	Vma3_E137Q_for	GATTTTGATTTTGATTTTTGCTCAAGTTTTGGGTCTATACGG
12	Vma3_E137Q_rev	CCGTATAGACCCAAAACTTGAGCAAAAATCAAAATCAAAATC
13	Vma11_EagI_for	TACTCACGGCCGCAGGCTTAAAGAGCCATTTC
14	Vma11_BamHI_rev	TACTCAGGATCCCCTGATGCCATGGATACTAC
15	Vma16_EagI_for	TACTCACGGCCGGATGGTGCTAGCGTCGAACA
16	Vma16_PstI_rev	TACTCACTGCAGCACAAGCCATATTGAGGGGCG
17	Vph1_EagI_for	TACTCACGGCCGGCTAGTAATCCAGTTGCCGAGC
18	Vph1_BamHI_rev	TACTCAGGATCCGGGCATCTTTCGTGGGTTAGAG
19	Stv1_EagI_for	TACTCACGGCCGAGGTGCTTCTTCCAGGGT
20	Stv1_BamHI_rev	TGAGTAGGATCCCCGGATTTTGATGCTGACGAG
21	HaggC-Vph1_for	CGGTATTGCTCAGTACAGAGAAATCAATGCTGGTTTACCCTACACCAT
		CATCACCTTCCCCTTCC
22	a3ggCVph1_rev	GGTGGATTGGATTGCAAGTCTAACGTTTTCATGAGATAAGCTAGTCAT
		CTGTGGCAGCGAAGG
23	a4ggCVph1_rev	GGTGGATTGGATTGCAAGTCTAACGTTTTCATGAGATAAGCTACTCCT
		CGGCTGTGCCATCCA
24	Vph1_a4_c_for	GTTTACGTCCAGCCAAGCTAGCTTGGCTGCAGGTCGAGCCCGCGGTG
		GCGGCCGGCTAGTAATC
25	Vph1_a4_c_rev	GCATACATTATACGAAGTTATATTAAGGGTTCCGGATCGCCCGGGGG

		ATCCGGGCATCTTTCGTG
26	YMat-a-for	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG
27	YMat-α-for	GCACGGAATATGGGACTACTTCG
28	YMat-rev	AGTCACATCAAGATCGTTTATG
29	Vma11_E145Q_for	CGTTTTGATTCTAATTTTCTCTCAAGTTTTAGGGTTATATGG
30	Vma11_E145Q_rev	CCGTAAATGGCAACCACTTGACAGAAAATAATGGAAATTAAATTC
31	Vma16_E108Q_for	GAATTTAATTTCCATTATTTTCTGTCAAGTGGTTGCCATTTACGG
32	Vma16_E108Q_rev	CCGTAAATGGCAACCACTTGACAGAAAATAATGGAAATTAAATTC
33	KanMX6_rev	ATCGCGAGCCCATTTATACC
34	Vma3_EagI_for	TACTCACGGCCGTCTACGGCCTATTC
35	Vma3prom_EagI_for	TACTCACGGCCGGTCTACGGCCTATTCCATTG
36	Stv1_prom_for	GACATAGGCCCACGAAGGTG

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Zur DNA-Amplifikation wurden für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verschiedene Ansätze mit unterschiedlichen DNA-Polymerasen gewählt, die je nach Herstellerangaben eingesetzt wurden. Die Taq DNA Polymerase (New England Biolabs (NEB) oder Fermentas) wurde für einfache PCR-Reaktionen zur Überprüfung von Fragmentgrößen oder Vorhandensein eines Gens verwendet. Die Pfu DNA Polymerase (Fermentas) oder die Expand Long Template DNA Polymerase (Roche) wurde für die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus genomischer Hefe-DNA, die danach weiter verwendet werden sollten, genutzt. Die Phusion DNA Polymerase (Finnzymes) wurde bei Überprüfungen von Hefe-Genotypen mit genomischer DNA eingesetzt.

2.2.2 Gerichtete Mutagenese

Die gerichtete Mutagenese in den Genen *VMA3*, *VMA11* und *VMA16* wurde mit Hilfe des QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit bzw. mit dem QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene nach Anleitung durchgeführt. Als DNA-Matrize wurden die Plasmide pRS415/*VMA3*, pRS415/*VMA11* oder pRS415/*VMA16* verwendet. Die Oligonukleotide wurden nach den Herstellerangaben im Kit konstruiert und enthielten den jeweilig gewünschten Basenaustausch.

2.2.3 Plasmidisolierung aus E. coli

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das QIAprep Miniprep Kit (Qiagen) oder das Nucleospin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) entsprechend der jeweiligen Anleitung verwendet. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 30-50 μ l H₂O.

2.2.4 Plasmidisolierung aus S. cerevisiae

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* erfolgte nach einem mechanischen Aufschluss der stabilen Hefezellwand mit dem Nucleospin Plasmid Kit (Macherey-Nagel). Dazu wurde eine 5 ml ÜN-Kultur (YPDA pH 5,5) des Hefestammes mit dem zu isolierenden Plasmid pelletiert (4.000 x g, 5 min, RT), in 250 μ l Puffer A2 (Nucleospin Plasmid Kit) resuspendiert und mit 0,2 g Glasperlen für 5 min bei 4°C gevortext. Nach einminütigem Kochen bei 99°C wurden weitere 100 μ l Puffer A2 zugegeben, das Zelllysat gemischt und 350 μ l Puffer A3 hinzugefügt. Auf mehrmaliges Invertieren der Probe folgte schließlich eine 10-minütige Zentrifugation (11.000 x g, 10 min, RT) und die weitere Reinigung der Plasmid-DNA, die sich im Überstand befindet, analog zu der Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* über die im Nucleospin Plasmid Kit enthaltenen Silicamembran-Säulen.

2.2.5 Isolierung genomischer DNA aus S. cerevisiae

Die genomische DNA aus Hefezellen wurde nach alkalischer Lyse und mechanischer Zerstörung der Zellwände mittels anschließender Phenolextraktion der DNA isoliert. Dazu wurden 1,5 ml einer ÜN-Kultur (YPDA pH 5,5) pelletiert (5.000 x g, 5 min, RT) und in 200 μ l Extraktionspuffer (50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5% Triton X100) resuspendiert. Zum mechanischen Zellaufschluss wurden ca. 0,2 g Glasperlen (ø 0,4 mm) hinzugefügt. Nach kurzem Mischen wurden 100 μ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zur Extraktion der genomischen DNA zugegeben und das Gemisch 10 min bei 4°C gevortext. Zur Beschleunigung der Phasentrennung wurde die Probe 5 min bei 17.000 x g und 4°C zentrifugiert, und von der oberen, wässrigen Phase mit der DNA wurden 10 μ l abgenommen und zur weiteren Verwendung mit 90 μ l H₂O verdünnt.

2.2.6 Restriktionsverdau und Ligation von DNA

Für den Restriktionsverdau von DNA wurden Restriktionsendonukleasen und entsprechende Puffer der Firmen NEB oder Fermentas verwendet. Die Ansätze wurden nach Herstellerempfehlungen zusammengesetzt, für mindestens 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend je nach Angaben hitzeinaktiviert. Sollte verdaute Vektor-DNA anschließend für eine Ligation eingesetzt werden, wurde sie, um eine Selbstligation zu verhindern, zur Entfernung der Phosphatgruppen am 5'-Ende des Vektors mit 10 U CIP (calf intestine alkaline phosphatase, NEB) für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Vektor-DNA gereinigt (Abschnitt 2.2.8). Für die Ligation von DNA wurden Insertund Vektor-DNA in einem Verhältnis von 3:1 mit T4-DNA-Ligase (NEB oder Fermentas) und dem zugehörigen Puffer in einem 30 μl Ansatz gemischt und ÜN zur Erzeugung eines Temperaturgradienten von 0°C bis RT in einem tauendem Eisbad oder im Falle der Fermentas-Ligase für 2 h bei 22 °C inkubiert.

2.2.7 Agarosegelelektrophorese

Zur Größentrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarosegele mit 1% Agarose in 1 x TAE-Laufpuffer (40 mM Tris pH 8,0, 10 mM NaAc, 1 mM EDTA) verwendet. Die DNA-Proben wurden im Verhältnis von 1:5 mit DNA-Ladepuffer (1 x TAE, 30% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau) gemischt, neben dem Größenstandard (5 μ l SmartLadder (Eurogentec)) in die Geltaschen pipettiert und für 1 h bei 95 V in einer Elektrophoresekammer (Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad) separiert. Anschließend wurde das Agarosegel mit Ethidiumbromid (2 μ g/ml) 20 min gefärbt, mit H₂O gewaschen und mit einem VersaDoc 4000 (Bio-Rad) mittels UV-Licht visualisiert und dokumentiert.

2.2.8 Reinigung und Gelextraktion von DNA

Um DNA nach enzymatischen Reaktionen zu reinigen oder aus einem Agarosegel zu extrahieren, wurde das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) oder das Nucleospin Extract II Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Nach den jeweiligen Herstellerangaben wurde die DNA unter Hochsalzbedingungen an die Silicamembran der Säulen der Kits gebunden, gewaschen und schließlich eluiert.

2.2.9 Transformation chemisch kompetenter E. coli-Zellen

Um E. coli-Zellen zur Aufnahme von DNA aus dem umgebenen Medium chemisch kompetent zu machen, wurde eine Behandlung mit Rubidiumchlorid durchgeführt (Hanahan, 1983). E. coli vom Stamm DH5α wurden in 5 ml ψb-Medium bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD_{550nm} von 0,3 kultiviert. Mit dieser Vorkultur wurden 100 ml auf 37°C temperiertes wb-Medium angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{550nm} von 0,5 geschüttelt. Die Kultur wurde anschließend 5 min auf Eis abgekühlt und 5 min bei 5.000 x g und 4°C abzentrifugiert. Nach dem Resuspendieren der Zellen in 40 ml eiskaltem TfbI-Puffer (30 mM KOAc, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂*2H₂O, 15% Glycerin, auf pH 5,8 titriert mit 0,2 M Essigsäure, 50 M MnCl₂*4H₂O, sterilfiltriert) wurden sie erneut wie oben auf Eis inkubiert und zentrifugiert. Schließlich wurden die Zellen in 4 ml TfbII (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂*2H₂O, 10 mM RbCl, 15 % Glycerin, auf pH 6,5 titriert mit KOH, sterilfiltriert) resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und in Aliquots in flüssigem N₂ tiefgefroren. Zur Transformation wurden die Zellen bei RT aufgetaut und 10 min auf Eis stehen gelassen. Maximal 100 ng DNA/200 µl Zellen wurden hinzugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 90 s und ein- bis zweiminütigem Abkühlen auf Eis wurden 4 Volumenteile wb-Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden nach 1 h bei 37°C und sanftem Schütteln (140 rpm) zur Selektion auf LB_{amp}-Platten ausplattiert und bei 37°C inkubiert.

2.2.10 Transformation von S. cerevisiae mittels Elektroporation

Um DNA mittels Elektroporation in *S. cerevisiae* zu bringen, wurde eine 5 ml ÜN-Kultur in YPD pH 5,5 angeimpft, am Folgetag in 40 ml YPD pH 5,5 überführt und unter Schütteln bei 30°C bis zur frühen stationären Phase ($OD_{600nm} = 1,0$) kultiviert. Nach dem Ernten der Zellen (1.600 x g, 5 min, 4°C) wurden sie nacheinander mit 20 ml und 40 ml sterilem, eiskaltem H₂O gewaschen und 5 min bei 1.100 x g und 4°C pelletiert. Nach Resuspension in 5 ml eiskaltem 1 M Sorbitol und erneutem Abzentrifugieren (700 x g, 5 min, 4°C) wurde das Zellpellet in 150 µl 1 M Sorbitol aufgenommen und auf Eis gelagert. Für die Elektroporation wurden zunächst maximal 5 µg DNA mit 50 µl der Hefezellsuspension gemischt, nach 5 min Inkubation auf Eis wurde dann ein elektrischer Puls (V = 1,5 kV, 25 µF, 200 Ohm, T = 4 bis 5 ms) gegeben (Gene Pulser Xcell, Bio-Rad). Danach wurde umgehend 1 ml YPDS zugegeben. Nach 2 h bei 30°C und 140 rpm im Schüttelinkubator wurden die Zellen pelletiert (800 x g, 3 min, RT), in 500 µl H₂O resuspendiert, zur Selektion auf SD-Platten ausplattiert und bei 30°C kultiviert.

2.2.11 Transformation von S. cerevisiae mittels "Freeze"-Methode

Für die Transformation von *S. cerevisiae* wurde die "Freeze"-Methode nach Klebe *et al.* leicht modifiziert verwendet (Klebe *et al.*, 1983). Dazu wurde eine 5 ml ÜN-Kultur in 20 ml YPDA pH 5,5 überführt und bei 30°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 kultiviert. Die Zellen wurden pelletiert (1.600 x g, 3 min, RT), mit 15 ml SBEG (1 M Sorbit, 10 mM Bicin pH 8,35, 3% Ethylenglycol) gewaschen, erneut abzentrifugiert und nach Resuspension mit 1 ml Lösung SBEG in 200 μ l Aliquots für mindestens 30 min vor der weiteren Verwendung bei -80°C gefroren. Zur Transformation der kompetenten Zellen wurden 2 μ g Plasmid-DNA sowie 50 μ g denaturierte (65°C, 5 min) Lachssperma-DNA zu der gefrorenen Zellsuspension hinzugefügt. Nach einem fünfminütigem Hitzeschock bei 37°C und leichtem Schütteln folgten die Zugabe von 1 ml 40% PEG 100 in 200 mM Bicin (pH 8,35) und eine Inkubation für 1 h bei 30°C. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 1.200 x g pelletiert, im Rücklauf resuspendiert und zur Selektion auf SD-Platten ausplattiert. Im Falle einer anschließenden Selektion auf G418 wurden die Zellen in 5 ml YPDS resuspendiert, ÜN bei 30°C inkubiert und erst danach auf dem Selektionsmedium ausplattiert.

2.2.12 Kreuzung haploider Hefestämme zur Herstellung von

Mehrfachdeletionsmutanten

Die Doppeldeletionsmutanten BY4741 $\Delta vph1\Delta stv1$, BY4741 $\Delta vph1\Delta vma3$ und BY4742 Δ vma3 Δ vma11 wurden mittels Kreuzung der jeweiligen haploiden Einfachdeletionsmutanten (Tab. 2.6) hergestellt. Die Dreifachdeletionsmutante BY4741 Δ *vma*3 Δ *vma*11 Δ *vma*16 wurde durch die Kreuzung der Deletionsmutanten BY4742 Δ vma3 Δ vma11 und BY4741 Δ vma16 erzeugt. Um zwei haploide Hefestämme unterschiedlicher Paarungstypen (Mat a und Mat α) miteinander zu kreuzen, wurden 500 µl der jeweiligen ÜN-Kulturen (YPDA pH 5,5) steril vermischt und 5 min bei 800 x g (RT) pelletiert. Nach der Resuspension des Zellpellets im Rücklauf wurden die Zellen mittig auf einer Agarplatte (YPDA pH 5,5) auf einer Fläche von etwa 4 cm Durchmesser ausplattiert und ÜN bei RT inkubiert. Am Folgetag wurde mit Hilfe von

Zellabstrichen überprüft, ob sich Zygoten mit ihrer charakteristischen Hantelform auf der Platte befinden. In diesem Fall wurde eine kleine Zellmenge abgenommen und in 100 μ l H₂O resuspendiert, wovon anschließend 20 μ l in einem schmalen Streifen am Rand einer Agarplatte (YPDA pH 5,5) aufgetragen wurden. Nach dem Trocknen des Zellstreifens wurden mehrere Zygoten mit dem Mikromanipulator SingerMSM auf der Platte vereinzelt und für mehrere Tage bei 30°C inkubiert.

2.2.12.1 Sporulation von diploiden Hefestämmen

Zur Sporulation diploider Hefestämme wurden ÜN-Kulturen (5 ml, YPDA pH 5,5) angesetzt, am Folgetag 5 min bei 1.600 x g (RT) pelletiert, im Rücklauf resuspendiert und auf einer Kaliumacetat-Platte (2% Kaliumacetat) ausplattiert. Unter diesen Nährstoffmangelbedingungen kommt es bei diploiden Hefen zur Ausbildung von Ascosporen mit vier haploiden Tetraden, die sich nach ihrer Vereinzelung vegetativ vermehren und sich auf ihren, ausgehend von der Mutterzelle, neu kombinierten Genotyp untersuchen lassen (Kück, 2005). Nach 8 bis 10 Tagen Inkubation bei 30°C wurde durch einen Zellabstrich die Existenz von Ascosporen auf der Kaliumacetat-Platte überprüft. Bei positivem Ergebnis wurden einige Zellen in 100 µl H₂O resuspendiert und ihre Zellwand mit 100 µg Zymolyase (10 mg/ml) für 10 min bei RT verdaut. 20 µl der Zellsuspension wurden vorsichtig in einem Streifen am Rand einer Agarplatte (YPDA pH 5,5) aufgetragen, die Tetraden mit Hilfe des Mikromanipulators SingerMSM vereinzelt und erneut bis zur Koloniebildung bei 30°C inkubiert. Jene Tetraden, deren vier Einzelzellen angewachsen waren, wurden auf neue Agarplatten mit YPDA pH 5,5 und zur Überprüfung ihres Wachstumsverhaltens auf Platten mit YPDA pH 5,5 und 250 µg/ml G418 ausgestrichen und bei 30°C kultiviert. Bei positivem Ergebnis sollte sich ein "2/2"-Phänotyp ergeben, d. h. während alle 4 Einzelzellen der Tetraden auf YPDA pH 5,5-Platten wachsen sollten, sollten nur zwei der Kolonien auf YPDA pH 5,5 + 250 µg/ml G418 wachsen, da nur diese beiden Stämme nach der Neukombination des Genotyps die zur Kontrolle der Einfachdeletionen eingefügte Geneticin-Resistenzen vereinen (Tab. 2.6). Die Ergebnisse wurden mit dem VersaDoc 4000 (Bio-Rad) dokumentiert.

2.2.12.2 Verifizierung der Mehrfachdeletionen mittels PCR

Um zu überprüfen, ob der in Abschnitt 2.2.12.1 beobachtete "2/2"-Phänotyp der vier Einzelkolonien aus einer Tetrade mit dem vermuteten Genotyp übereinstimmt, wurden PCR-Analysen durchgeführt. Dazu wurde die genomische DNA aus allen vier Tetraden-Kolonien isoliert und die Deletion der jeweiligen Gene mit den in Tab. 2.10 aufgeführten Primerkombinationen überprüft. Der jeweilige forward-Primer bindet dabei in der Promotorregion des deletierten Gens, der reverse-Primer in der Sequenz des Geneticin-Resistenzgens KanMX4. Als Kontrolle wurde die genomische DNA des Wildtyps BY4741 und des jeweiligen Kreuzung eingesetzten zur Einfachdeletionsstammes (Tab. 2.6) eingesetzt.

Stamm	Deletion	Primerkombination		
RV4741 Aunh 1 A styl	vph1	17/33		
$B 14/41 \Delta v pn1 \Delta siv1$	stv1	36/33		
BV4741Aunh lAuma	vph1	17/33		
$D14/41\Delta v pn1\Delta v mas$	vma3	35/33		
\mathbf{BV} 4742 A ym a^{3} A ym a^{11}	vma3	34/33		
$D14/42\Delta vma 3\Delta vma 11$	vmal1	13/33		
	vma3	34/33		
BY4741∆vma3∆vma11∆vma16	vmal1	13/33		
	vma16	15/33		

Tab. 2.10: Primerkombinationen zur Überprüfung der Genotypen der Mehrfachdeletionsmutanten

2.2.12.3 Bestimmung des Paarungstyps

Der Paarungstyp der haploiden Mehrfachdeletionsmutanten wurde in einer Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung der genomischen DNA und gleichzeitigem Einsatz der drei Primer YMat-a-for (Nr. 26), YMat- α -for (Nr. 27) und YMat-rev (Nr. 28) (Tab. 2.9) bestimmt. Die Größe des PCR-Amplifikats beträgt bei Paarungstyp a 544 Bp und bei Paarungstyp α 404 Bp.

2.2.13 Wachstumstest

Zur Analyse des V-ATPase-Phänotyps der Hefestämme wurden Verdünnungsreihen der zu untersuchenden Stämme auf Agarplatten mit verschiedenen Medien aufgetropft. Wie bereits in Abschnitt 1.5.2 beschrieben, weisen Hefezellen, die keine funktionsfähige V-ATPase exprimieren und dementsprechend keine pH- und Calcium-Homöostase mehr leisten können, einen typischen Vma-Phänotyp auf. Dabei wachsen die Zellen nicht mehr auf Medium mit einem pH-Wert >6,5 oder mit einer erhöhten Calcium-Konzentration (100 mM CaCl₂) sondern nur noch auf Medium mit einem sauren pH-Wert von etwa 5,5 (Nelson und Nelson, 1990; Ohya et al., 1991). Da der aktive Protonentransport der V-ATPase bei der Hefe für die pH- und Calcium-Homöostase essentiell ist (Kane, 2006), kann also bei einem im Wachstumstest gezeigten Vma⁻ Phänotyp indirekt auf einen nicht mehr funktionierenden Protonentransport geschlossen werden, auch wenn dieser nicht unmittelbar gemessen wird. Für die Durchführung des Wachstumstests wurde pro Stamm eine 5 ml ÜN-Kultur (YPDA pH 5,5) mit H₂O auf 10^5 Zellen/ml verdünnt (OD_{600nm} 1 = 1,8 * 10^6 Zellen/ml). Davon ausgehend wurde eine Verdünnungsreihe mit 10^4 bis 10^0 Zellen/ml angefertigt und je 5 µl dieser Verdünnungen wurden auf Agarplatten mit YPDA pH 5,5, YPDA pH 5,5 mit 0,1 M CaCl₂, YPDA pH 7,5 oder Selektionsmedium (SD) aufgetropft und 3 Tage bei 30°C inkubiert. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit dem VersaDoc 4000 (Bio-Rad).

2.2.14 Sonstige Methoden

Die Bestimmung von Zelldichten erfolgte bei 600 nm mit dem SpectraMax Plus (Molecular Devices). DNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe des NanoPhotometers von Implen bestimmt. DNA-Sequenzierungen wurden bei der Firma Seqlab (Sequence Laboratories Göttingen) durchgeführt.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Reinigung des V₁V₀-Holoenzyms, des V₀- und des V₁-Komplexes aus Manduca sexta

Das V₁V₀-Holoenzym und der V₀-Komplex wurden, wie in Wieczorek *et al.* (1990) und Huss *et al.* (2002) beschrieben, aus dem Mitteldarm von Raupen des Tabakschwärmers *M. sexta* im 5. Larvenstadium (ca. 6 g Gewicht) gereinigt. Die Reinigung des V₁-Komplexes erfolgte, wie von Gräf *et al.* (1996) beschrieben, ebenfalls aus dem Mitteldarm der *M. sexta*-Raupe.

2.3.2 Hefevakuolenpräparation

Die Präparation von Hefevakuolenmembranen erfolgte leicht modifiziert nach Protokollen von Uchida et al. (1985) und Kane (1995). Dazu wurde 1 L YPDA pH 5,5-Medium mit zwei 5 ml ÜN-Kulturen (YPDA pH 5,5) des zu präparierenden Stammes angeimpft und ÜN bis zu einer OD_{600nm} von mindestens 2 kultiviert. Am Folgetag wurden die Zellen geerntet (4.500 x g, 5 min, 25°C), das Zellpellet mit 100 ml H₂O gewaschen und erneut pelletiert. Zur Konvertierung in Spheroblasten wurden die Zellen in 100 ml 1 M Sorbitol mit 20 mM Dithiothreitol resuspendiert und nach Zugabe von 1 ml Zymolyase-Lösung (ca. 500 U Zymolyase-100T (100 U/mg, MP Biomedicals) in 50 mM Tris-HCl pH 7,7, 1 mM EDTA, 50% Glycerin) für 90 min bei 30°C und 80 rpm inkubiert. Der Zellwandverdau wurde anschließend mittels Osmolyse von 50 µl Zellsuspension in 450 µl Puffer A (10 mM Tris-MES pH 6,9, 0,1 mM MgCl₂, 12% Ficoll-400) überprüft. Nach dem Ernten der Spheroblasten für 5 min bei 2.200 x g und 25°C folgten weitere 30 min Inkubation bei 30°C und 80 rpm in 100 ml YPDA pH 5,5. Nach erneutem Abzentrifugieren der Spheroblasten wurden diese zur osmotischen Lyse in 15 ml Puffer A mit 50 µl Protease-Inhibitor-Cocktail (Calbiochem, No. 535142, 100 x Stock) auf Eis resuspendiert und in einem lockeren Dounce Homogenizer mit zehn Hüben mechanisch aufgeschlossen. Das Lysat wurde 10 min bei 2.200 x g und 4°C zentrifugiert, und der Überstand wurde auf zwei Ultrazentrifugenröhrchen für den Ausschwingrotor SW41Ti (Beckman) verteilt und mit 6 ml Puffer A überschichtet. Während der einstündigen Ultrazentrifugation bei 107.000 x g (Rotor SW41Ti, Beckman) und 4°C sammeln sich die Hefevakuolenmembranen aufgrund ihrer geringen Dichte oben auf dem Ficoll-Gradienten und können anschließend mit einem mit Puffer A benetzten Löffelspatel einfach abgenommen und in einem sauberen Ultrazentrifugenröhrchen in 6 ml Puffer A resuspendiert werden. Nach Überschichtung mit 6 ml Puffer B (10 mM Tris-MES pH 6,9, 0,5 mM MgCl₂, 8% Ficoll-400) wurde für 30 min erneut bei 107.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die gereinigten Vakuolenmembranen wurden von dem Ficoll-Gradienten abgenommen und in 1 ml Puffer C (10 mM Tris-MES pH 6,9, 5 mM MgCl₂, 25 mM KCl) mit 10 μ l Protease-Inhibitor-Cocktail resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.3.3 Proteinbestimmung mit Amidoschwarz

Proteinkonzentrationen wurden mit Amidoschwarz bestimmt (Wieczorek *et al.*, 1990). Dabei wurden die jeweils doppelt angesetzten Proteinproben und Standardproben (20, 40 und 60 μ l mit 1 μ g BSA/10 μ l 16 mM Tris-HCl pH 8,1, 0,32 mM EDTA) mit je 300 μ l Amidoschwarz-Lösung (26 mg Amidoschwarz in 100 ml Essigsäure/Methanol 1:10) versetzt und nach fünfminütiger Inkubation 4 min bei 16.000 x g und RT zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 500 μ l Essigsäure/Methanol 1:10 wurde das Amidoschwarz in den Protein- und Standardproben in 350 μ l 0,1 mM NaOH gelöst und die Extinktion bei 615 nm gemessen.

2.3.4 TCA-Fällung

Gereinigte Hefevakuolenmembranen wurden in 10% TCA 15 min auf Eis inkubiert und danach bei 21.000 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 500 µl eiskaltem Aceton gewaschen. Abschließend wurde das Aceton zur vollständigen Verflüchtigung für 10-20 min unter dem Abzug gelagert. Das Pellet wurde in 1 x Laemmli-Probenpuffer (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 5% Saccharose, 4% SDS, 0,005% Bromphenolblau, 2% β-Mercaptoethanol) aufgenommen und wie in Abschnitt 2.3.5 beschrieben für eine SDS-PAGE vorbereitet und eingesetzt.

2.3.5 SDS-Gelelektrophorese

Zur Größentrennung wurden Proteine auf diskontinuierliche Polyacrylamidgele nach Laemmli (1970) aufgetragen. Es wurde das Mini PROTEAN 3 Cell Gelsystem (Bio-Rad) verwendet. Das Trenngel mit einer Gesamtgelkonzentration von T=17% und einer Quervernetzung von C=0,4% enthielt des Weiteren 333 mM Tris-HCl pH 8,7, 0,1% SDS, 0,05% APS und 0,1% TEMED. Das darüber geschichtete Sammelgel enthielt eine Gelgesamtkonzentration von T=5,3% mit einer Quervernetzung von C=2,3%, 123 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,2% SDS, 0,2% APS und 0,13% TEMED. Zur Vorbereitung wurden die Proben mit 5 x Laemmli-Probenpuffer (625 mM Tris-HCl pH 6,8, 25% Saccharose, 20% SDS, 0,025% Bromphenolblau, 10% β-Mercaptoethanol) versetzt, 45 s bei 98°C gekocht, auf Eis abgekühlt und schließlich neben 5 µl LMW-Standard (GE Healthcare) in die Probentaschen des Sammelgels gegeben. Die Elektrophorese wurde für 10 min bei 20 mA/Gel zum Einlaufen der Proben und weitere 30 min bei 30 mA/Gel durchgeführt. Für große Kammer ergänzen

2.3.6 Western Blot

2.3.6.1 Elektrotransfer

Um die in einer SDS-Gelelektrophorese separierten Proteine nach Wieczorek *et al.* (1991) auf eine Nitrocellulosemembran NC2 (Serva) zu übertragen, wurde das Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell-System (Bio-Rad) benutzt. Je drei Filterpapiere (Whatman 3MM) wurden in Blotpuffer 1 (300 mM Tris, auf 20% Methanol eingestellt), 2 (30 mM Tris, auf 20% Methanol eingestellt) und 3 (40 mM e-Amino-n-Capronsäure in 30 mM Tris, auf 20% Methanol eingestellt) getränkt. Die Nitrocellulosemembran wurde in Blotpuffer 2 und das SDS-Gel in Blotpuffer 3 eingelegt. Anschließend wurde alles wie folgt übereinandergeschichtet: 3x Filterpapier (Blotpuffer 1), 3x Filterpapier (Blotpuffer 2), Nitrocellulosemembran, SDS-Gel, 3x Filterpapier (Blotpuffer 3). Für 1 h wurde eine Stromstärke von 1 mA/cm² Gelfläche angelegt. Im Anschluss wurde die Nitrocellulosemembran zur Überprüfung der Bloteffizienz mit 0,02% PonceauS gefärbt.

2.3.6.2 Immunfärbung

Für eine Immunfärbung zum speziellen Nachweis bestimmter Proteine auf der Nitrocellulosemembran wurde diese zunächst für 45 min bei 25°C in Blockpuffer (5% Milchpulver in TTBSN (0,05% Tween 20, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl, 0,02% NaN₃)) inkubiert. Anschließend wurde ein primärer Antikörper entsprechend der Angaben in Tab. 2.2 in Verdünnungspuffer (2,5% Milchpulver in TTBSN) verdünnt und bei 25°C und leichtem Schütteln auf die Nitrocellulosemembran gegeben. Nach 1 h wurde die Membran drei Mal mit TTBSN gewaschen und dann mit dem entsprechenden sekundären. mit einer alkalischen Phosphatase konjugierten. ebenfalls in Verdünnungspuffer verdünnten Antikörper (Tab. 2.2) für 1 h bei 25°C leicht geschüttelt. Danach wurde die Membran erneut drei Mal mit TTBSN gewaschen und schließlich mit H₂O abgespült. Die Phosphatase-Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 ml Reaktionspuffer APP (50 mM Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂) mit 35 µl BCIP (50 mg/ml in 100% Dimethylformamid) und 45 µl NBT (75 mg/ml in 70% Dimethylformamid) gestartet und schließlich durch Waschen der Membran mit H₂O gestoppt.

2.3.7 V-ATPase-Aktivitätstest und Phosphatbestimmung

ATPase-Aktivitätstests wurden in Anlehnung an Wieczorek *et al.* (1990) durchgeführt. Es wurden verschiedene Ansätze gewählt, um die Aktivität der gereinigten V-ATPase oder des V₁-Komplexes aus dem *M. sexta* Mitteldarm oder der V-ATPase in gereinigten Hefevakuolenmembranen zu testen. Proben mit der V-ATPase und dem V₁-Komplex von *M. sexta* zur Bestimmung der IC₅₀-Werte der Inhibitoren wurden jeweils dreifach angesetzt. Zeitreihen zur Überprüfung der V-ATPase-Aktivität in Hefevakuolenmembranen wurden mit Doppelwerten durchgeführt. Standards wurden immer in Doppelwerten angefertigt.

Für Aktivitätstests mit dem V₁V₀-Holoenzym von *M. sexta* wurden 160 μl-Ansätze mit 3 μg Enzym, 0,01% C₁₂E₁₀, 50 mM Tris-MOPS pH 8,1, 1 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 2,4 mM β-Mercaptoethanol, 5 mM Tris, 1 mM ATP und 6,25% DMSO mit oder ohne Inhibitor angesetzt. Für Mg²⁺-ATPase-Aktivitätstests mit dem V₁-Komplex wurden 160 μl-Ansätze mit 3 μg Enzym, 50 mM Tris-MOPS pH 8,1, 1 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 3 mM β-Mercaptoethanol, 25% Methanol, 5 mM Tris, 1 mM ATP und 6,25% DMSO mit oder ohne Inhibitor angesetzt. Für Ca²⁺-ATPase-Aktivitätstests mit dem V₁-Komplex wurden 160 μl-Ansätze mit 10 μg Enzym, 50 mM Tris-MOPS pH 8,1, 3 mM CaCl₂, 20 mM KCl, 5 mM Tris, 3 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM ATP und 6,25% DMSO mit oder ohne Inhibitor angesetzt. Die Proben wurden ohne ATP für maximal 10 min bei 30°C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von ATP gestartet und nach 2 min durch Einfrieren der Probe in flüssigem Stickstoff gestoppt. Die Standards mit 0, 10 oder 25 nmol P_i wurden gleich nach der Vorinkubation in flüssigem Stickstoff eingefroren und erst danach wurde das ATP zugegeben. Alle Proben wurden bei -20°C gelagert.

Um die Aktivität der V-ATPase in gereinigten Hefevakuolenmembranen zu testen, wurden 480 μ l-Ansätze mit je 9 μ g Protein, 50 mM Tris-MES pH 6,9, 3,75 mM MgCl₂, 0,1 mM Vanadat, 20 mM KCl, 0,5 mM Azid, 5 mM Tris, 2 mM ATP und 6,25% DMSO mit oder ohne Inhibitor hergestellt. Nach einer maximal 10-minütigen Vorinkubation bei 30°C wurde die Reaktion durch ATP-Zugabe gestartet. Nach 5 min wurden 160 μ l aus dem Ansatz entnommen und in einem separaten Eppendorfgefäß in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. 10 min nach ATP-Zugabe wurden weitere 160 μ l eingefroren und die Reaktion in den restlichen 160 μ l wurde schließlich nach 20 min gestoppt. Die Standards wurden wie oben beschrieben behandelt. Die Bafilomycin-hemmbare Aktivität wurde aus der Gesamtaktivität (Proben ohne Bafilomycin) abzüglich der Restaktivität (Proben mit 3 μ M Bafilomycin) errechnet.

Der Nachweis des beim Aktivitätstest entstandenen anorganischen Phosphats erfolgte ebenfalls nach Wieczorek *et al.* (1990). Hierbei bildet das Phosphat mit Molybdat einen Komplex, der dann wiederum einen Komplex mit Malachitgrün generiert. Die Extinktion dieser Verbindung wurde bei 625 nm photometrisch im SpectraMax Plus (Molecular Devices) bestimmt. Mit Hilfe von Standardwerten wurde schließlich die Menge an anorganischem Phosphat ermittelt.

2.3.8 Markierungsversuche mit radioaktiven, photoaktivierbaren Inhibitoren

Für Photoaffinitätslabelversuche (PAL) wurden jeweils 30 μ g V₁V₀-Holoenzym aus *M. sexta*, 20 μ g V₁ Komplex oder 10 μ g V₀ Komplex in LO-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8,1, 50 mM NaCl, 9,6 mM β-Mercaptoethanol, 0,01% C₁₂E₁₀) mit 52 μ M ¹⁴C-D-Bafilomycin, 52 μ M ¹⁴C-D-Concanolid oder 100 μ M ¹⁴C-D-Apicularen für 5 min bei RT inkubiert (die vollständigen chemischen Bezeichnungen der Inhibitoren sind in Tab. 2.3 aufgelistet). Mit der Mg-ATP-Zugabe (Endkonzentration 1 mM ATP in 1.5 mM MgCl₂) wurde ein Probenvolumen von 40 µl eingestellt. Für Verdrängungsversuche wurden 30 µg V₁V₀-Holoenzym zunächst mit dem 10-fachen Überschuss (625 µM) eines nichtradioaktiven Inhibitors für 5 min bei RT vorinkubiert und anschließend mit jeweils 62.5 µM eines radioaktiven Inhibitors versetzt. Die photoaktivierbare Quervernetzung des Diazirinyl-Inhibitors mit dem Protein über die Bildung eines reaktiven Carbens wurde durch eine einminütige Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) auf Eis induziert und durch die Zugabe von 5 x Laemmli-Probenpuffer (Abschnitt 2.3.5) und dem Kochen (45 s, 98°C) der Proben gestoppt. Anschließend wurden die Proben mittels einer SDS-PAGE (T=17%, C=0,4%, siehe Abschnitt 2.3.5) in einer PROTEAN II xi Cell (Bio-Rad) für 45 min bei 16 mA/Gel und 4 h bei 24 mA/Gel separiert (Page Ruler Prestained Protein Ladder als Standard), mit Coomassie-Färbelösung (0,25% w/v Coomassie Serva Blue R-250, 50% Methanol, 10% Eisessig) gefärbt und mit Entfärbe-Lösung I (25% Isopropanol, 10% Eisessig) und Entfärbe-Lösung II (7,5% Methanol, 10% Eisessig) entfärbt. Die Gele wurden auf Whatman Filterpapier getrocknet, für 72 h auf einen Phosphorscreen aufgelegt und mit einem Phosphorimager (Molecular Dynamics) ausgewertet. Im Anschluss wurden Coomassie-gefärbte Proteinbanden und die dazwischenliegenden Banden ausgeschnitten und die darin enthaltene Radioaktivität mit einem Szintillationszähler (Beckman LS6500) ermittelt. Pro Probe wurden dabei bis 10.000 counts gezählt, was aufgrund der Poisson-Verteilung eine Standardabweichung von 100 zur Folge hatte. Damit war die Standardabweichung der cpm-Werte 1%.

2.3.9 Massenspektrometrie

Für massenspektrometrische Analysen (ESI) wurde ein In-Gel-Verdau durchgeführt. Dazu wurden die zu untersuchenden Coomassie-gefärbten Protein-Banden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und jeweils in Eppendorfgefäße transferiert. Nach zweimaligem Waschen mit 250 µl H₂O und 10-minütigem Schütteln bei 25°C wurden 250 µl Entfärbe-Lösung (30% Acetonitril in 100 mM NH₄HCO₃ (auf pH 8,5 titriert mit 2 M NH₄OH)) zugegeben und die Proben erneut wie zuvor inkubiert. Der Entfärbeschritt wurde so lange wiederholt bis die Entfärbe-Lösung sowie die Gelstücke farblos blieb. Anschließend wurden die Gelstücke zwei Mal mit 250 µl H2O gewaschen und dabei jeweils für 15 min bei 25°C unter Schütteln inkubiert. Die Proben wurden danach mit 250 µl Acetonitril für 15 min bei 25°C geschüttelt, das Acetonitril wurde entfernt und gegebenenfalls wurden die Gelstücke noch weitere 15 min bei 37°C im Vakuumkonzentrator (Eppendorf) getrocknet bis sie weiß erschienen. Es wurden 100 µl Reduktionslösung (100 mM Dithiothreitol in 100 mM NH₄HCO₃ (auf pH 8,5 titriert mit 2 M NH₄OH)) zugegeben und unter Schütteln zunächst 5 min bei 25°C und weitere 30 min bei 50°C inkubiert. Nach Abnahme der Lösung und Zugabe von 250 µl Acetonitril wurden die Proben wieder 15 min bei 25°C inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgenommen und die Proben wurden in 100 µl Alkylierungslösung (54 mM Iodacetamid

in 100 mM NH₄HCO₃ (pH 8,5 mit 2 M NH₄OH)) für 15 min abgedunkelt stehen gelassen. Nach erneuter Abnahme der Lösung wurden die Proben wieder in 250 μ l Entfärbe-Lösung für 10 min bei 15-25°C geschüttelt und danach in 250 μ l Acetonitril für 15 min bei gleicher Temperatur getrocknet. Nach vollständigem Entfernen des Acetonitrils wurden die Proben 15 min bei 10 mbar und 37°C im Vakuumkonzentrator getrocknet. Zum tryptischen Verdau wurden die Proteinproben mit jeweils 50 μ l frischer Trypsin-Verdaulösung (25 μ g Trypsin in 250 μ l 10 mM HCl, verdünnt auf 0,01 μ g/ μ l Trypsin mit Verdaupuffer (5% Acetonitril mit 50 mM NH₄HCO₃)) versetzt und ÜN bei 25°C inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und für später aufbewahrt. Die Gelstücke wurden mit 30 μ l Acetonitril 20-30 min geschüttelt bis sie weiß erschienen. Nach 3 min im Ultraschallbad wurde der Überstand in neue Eppendorfgefäße transferiert und das Acetonitril im Vakuumkonzentrator evaporiert. Mit dem zuvor aufbewahrten Überstand wurde ndie gelöst, feste Partikel abzentrifugiert und schließlich wurde der Überstand in HPLC-Glasgefäße überführt.

Die massenspektrometrische Analyse (LC-MS/MS) wurde im Fachbereich durchgeführt. Zur Identifizierung wurden die Peptide über eine HPLC (C18-Säule) separiert, die Peptidmassen mit Hilfe einer ESI-Ionenfalle (Esquire-HCT oder amaZon speed ETD, Bruker Daltonics, Bremen) bestimmt und anschließend wurden die MS/MS-Daten mit der Mascot-Analyse (Matrix Science; www.matrixscience.com) ausgewertet, um die Peptidsequenzen zu erhalten.

2.3.10 Minimum-Energie-Kalkulation für D-Concanolid

Um die Reichweite und die Flexibilität der an die Inhibitoren Bafilomycin, Concanolid bzw. Apicularen gekoppelte Diazirinylgruppe einschätzen zu können, wurden Minimum-Energie-Kalkulationen am Beispiel von D-Concanolid wie in Osteresch *et al.* (2012) beschrieben durchgeführt. Für die Kalkulationen, welche von der Arbeitsgruppe von Stefanie Grond (Universität Tübingen) übernommen wurden, wurden die Programme CS Chem3D Pro 12.0.2.1076, Gaussian 98, (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA) verwendet und eine Energieminimierung mit dem MM2-Algorithmus durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Neue PAL-Derivate von Bafilomycin, Concanamycin und Apicularen zur Analyse der Inhibitor-Bindestellen an der V-ATPase

Für die Bindestellen der Plecomakrolide Bafilomycin und Concanamycin konnte bereits gezeigt werden, dass beide Inhibitoren mit der c-Untereinheit des V_O-Komplexes interagieren (Bowman und Bowman, 2002; Bowman et al., 2006; Bowman et al., 2004; Huss et al., 2002). Außerdem scheint die Untereinheit a des Vo-Komplexes ebenfalls an der Bindung von Bafilomycin beteiligt zu sein (Wang et al., 2005). Informationen über die Bindestelle der Benzolacton Enamide waren bisher allerdings kaum vorhanden. Für das Benzolacton Enamid Salicylihalamid A wurde festgestellt, dass es an einer anderen Stelle bindet als die Plecomakrolide, aber die Protonentranslokation durch den Vo-Komplex hemmt (Huss et al., 2002; Xie et al., 2004). Für das Benzolacton Enamid Apicularen wurde gezeigt, dass es nicht mit der Bindung der Plecomakrolide, der Archazolide und des NCD-4 interferiert (Bockelmann et al., 2010; Huss et al., 2005). Die Entwicklung des neuen, radioaktiv markierten Photoaffinitätslabels (PAL) [1-¹⁴C]4-(3-Trifluormethyldiazirin-3-yl)Benzoesäure (Bender et al., 2007), welches an die Inhibitoren Bafilomycin, Concanolid sowie Apicularen gekoppelt wurde (Bender et al., 2007; Osteresch et al., 2012), ermöglicht nun neue Inhibitor-Bindestudien. In dieser Arbeit sollen die neuen radioaktiven Diazirinyl-Derivate erstmals zur Identifizierung der Bindestellen der genannten Inhibitoren genutzt werden.

3.1.1 Hemmung des V₁V₀ Holoenzyms von *M. sexta* durch die neuen PAL-Inhibitoren

Um die radioaktiv markierten PAL-Derivate von Bafilomycin, Concanolid und Apicularen (Abb. 3.1) für Markierungsversuche verwenden zu können, musste zunächst überprüft werden, ob die Modifikationen einen Einfluss auf die Hemmung der ATPase-Aktivität der V-ATPase haben. Dazu wurden ATPase-Aktivitätstests mit den nichtradioaktiven Diazirinyl-Derivaten und dem V_1V_0 Holoenzym von *M. sexta* durchgeführt. Verglichen mit den nativen Substanzen ist das Inhibitor-Potenzial der PAL-Derivate nur 5-100-fach reduziert (Abb. 3.1 und Tab. 3.1), sodass sie sich sehr gut für die folgenden Labelversuche eigneten.



Abb. 3.1: Hemmung der V-ATPase-Aktivität von *M. sexta* durch Bafilomycin, Concanamycin, Apicularen und den jeweiligen PAL-Derivaten

Dargestellt sind die Hemmkurven sowie die Strukturen der Inhibitoren und ihrer Diazirinyl-Derivate, deren vollständige chemische Bezeichnungen in Tab. 2.3 aufgelistet sind. A, Bafilomycin A₁ und D-Bafilomycin A₁; **B**, Concanamycin A, Concanolid A und D-Concanolid A; **C**, Apicularen A und D-Apicularen. Die Hemmkurven beinhalten die Mittelwerte (\pm Standardabweichungen) aus drei verschiedenen Präparationen. Die spezifische Aktivität der Kontrollen ohne Inhibitoren betrug 1,6 \pm 0,4 µmol*mg⁻¹*min⁻¹. (\blacktriangle)

(**△**) Einige Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits in Osteresch *et al.* (2012) publiziert.

Inhibitor	IC ₅₀ [nM]
Bafilomycin A ₁	1
D-Bafilomycin A ₁	100
Concanamycin A	10
Concanolid A	3
D-Concanolid A	16
Apicularen A	16
D-Apicularen A	300

Tab. 3.1: IC₅₀-Werte der Inhibitoren und ihrer PAL-Derivate für die Hemmung des V_1V_0 -Holoenzyms von *M. sexta* (\blacktriangle)

3.1.2 Eigenschaften der Diazirinylgruppe

Um die Reichweite und die Flexibilität der an Bafilomycin, Concanolid und Apicularen gekoppelten Diazirinylgruppe einschätzen zu können, wurden von der Arbeitsgruppe von Stephanie Grond (Universität Tübingen) Minimum-Energie-Kalkulationen am Beispiel von D-Concanolid durchgeführt. Wie in Abb. 3.2A zu sehen ist, beträgt die Reichweite der Diazirinylgruppe etwa 6,4 Å, wobei ihr Abstand zum Makrolactonring auf etwa 5,4 Å kalkuliert wurde. Das Modell demonstriert außerdem die theoretischen Positionen der Diazirinylgruppe, die sich in Bezug auf den Pharmakophor des Concanolids flexibel um ihre einfache Bindung der Estergruppe bewegen kann. Dabei ergaben die Berechnungen zwei präferierte Konformationen des D-Concanolids, in denen sich die Diazirinylgruppe einmal über (Abb. 3.2B) und einmal unter (Abb. 3.2C) dem Makrolactonring des Plecomakrolids befinden.





Die Länge der Diazirinylgruppe wurde mit 6,4 Å berechnet, ihr Abstand vom Makrolactonring des Concanolids beträgt etwa 5,4 Å (A). Präferierte Positionen der Diazirinylgruppe in Bezug auf den Inhibitor befinden sich einmal über dem Makrolactonring (B) und einmal unter dem Makrolactonring (C). (\blacktriangle)

3.1.3 Bindung der radioaktiven PAL-Inhibitoren an das V₁V₀-Holoenzym, den V₀- und den V₁-Komplex

Um die V-ATPase-Untereinheiten zu identifizieren, mit denen die Inhibitoren interagieren, wurden das V₁V₀ Holoenzym, der V₁-Komplex sowie der V₀-Komplex von *M. sexta* mit den ¹⁴C-Diazirinyl-gelabelten Derivaten von Bafilomycin, Concanolid bzw. Apicularen inkubiert und UV-induziert vernetzt. Abb. 3.3 stellt die Ergebnisse der Autoradiografie nach erfolgter SDS-PAGE dar. Der Vergleich der mit UV-Licht bestrahlten Proben (Abb. 3.3: Spuren mit geraden Zahlen von 4-20) mit den unbelichteten (Spuren mit ungeraden Zahlen, 5-21) zeigt, dass sowohl die V₀-Untereinheit a als auch die V₀-Untereinheit c im V₁V₀-Holoenzym und im V₀-Komplex radioaktiv markiert wurden. In den belichteten Proben des V₀-Komplexes taucht jeweils unterhalb der Untereinheit a ein weiteres Signal auf (Spuren 8, 14 und 20), das sehr wahrscheinlich auf ein Degradationsprodukt der a-Untereinheit zurückzuführen ist, welches auch in der Coomassie-Färbung des V₀-Komplexes zu sehen ist (Spur 3). Auch in den Proben des V₁-Komplexes sind radioaktive Markierungen zu sehen, diese sind jedoch auf unspezifische Inhibitor-Bindungen zurückzuführen, da sie sowohl in den belichteten als auch in den unbelichteten Proben zu sehen sind (Spuren 6, 7, 12, 13, 18 und 19).





Für die Labelversuche wurden 30 μ g V₁V₀-Holoenzym, 20 μ g V₁-Komplex oder 10 μ g V₀-Komplex für 5 min bei 25°C mit je 52 μ M ¹⁴C-D-Bafilomycin, 52 μ M ¹⁴C-D-Concanolid oder 100 μ M ¹⁴C-D-Apicularen inkubiert. Nach Zugabe von 1 mM Mg-ATP wurden die Proben 1 min mit UV-Licht (366 nm) bestrahlt (+) oder im Dunkeln gehalten (-). Im Anschluss wurden die Untereinheiten per SDS-PAGE separiert, die Gele mit Coomassie-Blau gefärbt, getrocknet und auf einen Phosphorscreen aufgelegt. Spuren 1-3, typische Coomassie-Blau-Färbung; Spuren 4-21, Autoradiogramme der ausgelesenen Phosphorscreens. (\blacktriangle)

Spezifische Interaktionen der PAL-Inhibitoren mit dem V₁-Komplex können so gut wie ausgeschlossen werden, da bereits in früheren Untersuchungen festgestellt worden war, dass die ATPase-Aktivität des V₁-Komplexes von *M. sexta* bzw. Hefe nicht durch das Plecomakrolid Concanamycin und der V₁-Komplex von Clathrin-Vesikeln des Rindes nicht durch das Benzolacton Enamid Salicylihalamid gehemmt wird (Gräf *et al.*, 1996; Parra *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2004). Um spezifische Bindungen der PAL-Inhibitoren an den V₁-Komplex endgültig ausschließen zu können, wurde der Effekt von jeweils 30 µM D-Bafilomycin, D-Concanolid und D-Apicularen sowie der nativen Inhibitoren auf die Ca²⁺- und die Mg²⁺-ATPase-Aktivität des V₁-Komplexes von *M. sexta* in einem Versuch getestet. Die in Abb. 3.4 dargestellten Ergebnisse zeigen wie erwartet, dass selbst in dieser hohen Konzentration von 30 µM weder die PAL-Derivate noch deren Ursprungssubstanzen den V₁-Komplex hemmen.



Abb. 3.4: Effekt der Inhibitoren und ihrer Diazirinyl-Derivate auf die Aktivität des V₁-Komplexes von *M. sexta*

Je 30 μ M der Inhibitoren Bafilomycin A₁ (Baf A₁), D-Bafilomycin (D-Baf), Concanamycin (Con), Concanolid (Ccl), D-Concanolid (D-Ccl), Apicularen (Api) und D-Apicularen (D-Api) wurden eingesetzt, um den Effekt der PAL-Inhibitoren auf die Ca²⁺- bzw. die Mg²⁺-ATPase-Aktivität des V₁-Komplexes von *M. sexta* zu testen. DMSO wurde als Kontrolle eingesetzt. Das Balkendiagramm repräsentiert die relative Aktivität. Die spezifische Aktivität der Kontrolle ohne Inhibitoren betrug für Ca²⁺-ATPase 0,6 µmol*mg⁻¹*min⁻¹ und für die Mg²⁺-ATPase 1,3 µmol*mg⁻¹*min⁻¹.

Ein weiteres Label, das in der Nähe der V₁-Untereinheiten F und G auftritt, ist in den V₁V₀- sowie in den V₀-Proben zu finden, jedoch nicht in den V₁-Proben, weshalb eine Markierung dieser beiden Untereinheiten zunächst auszuschließen ist. Um die Herkunft dieses unerwarteten Signals eindeutig zu klären, wurden die Banden mit den Untereinheiten F und G sowie darüber-, dazwischen- und darunterliegende Bereiche aus dem Gel ausgeschnitten und die darin enthaltene Radioaktivität mittels eines Szintillationszählers bestimmt. Eine erhöhte Radioaktivität wurde allerdings nur in den Bereichen zwischen den beiden Untereinheiten sowie oberhalb von Untereinheit G bzw. unterhalb von Untereinheit F und nicht in den Banden mit den Untereinheiten F und G gemessen (Daten nicht gezeigt). Massenspektrometrische Analysen der genannten Bereiche bestätigten die Untereinheiten F und G (Tab. 3.2), allerdings wurden keine Proteine in den Proben der darüber-, dazwischen- und darunterliegenden Bereiche detektiert. Somit sind diese Label vermutlich auf Vernetzungen der radioaktiven Inhibitoren mit Lipiden oder Detergenzien, die speziell bei der Reinigung des V₁V₀-Holoenzyms und des V₀-Komplexes am V₀-Komplex haften bleiben, zurückzuführen. Diese Annahme wird zudem durch die Ergebnisse von von Ballmoos *et al.* (2002) gestützt, die zeigten, dass Vernetzungen zwischen Lipiden und Diazirinyl-gelabelten Carbodiimid-Inhibitoren, die mit der F₀-Untereinheit c der ATP Synthase interagieren, möglich sind.

Tab. 3.2: Massenspektrometrische Analyse der Proteinbanden F und G der V-ATPase von M. sexta
Die Proteinbanden in der Höhe der Untereinheiten F und G wurden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten, mit
Trypsin verdaut und massenspektrometrisch (ESI-MS) analysiert. Die detektierten Peptidsequenzen sind
fett markiert und unterstrichen.

Untereinheit	Proteinsequenz
	1 MALHAAVKGK LISVIGDEDT CVGFLLGGIG EINKNRHPNF MVVDKNTPVS
F	51 EIEECFKRFV KRDDIDIILI NQNVAELVRH VIDAHTAPVP SVLEIPSKDH
	101 PYDASKDSIL RRAK <mark>GMFNPE DLVR</mark>
	1 MASQTHGIQQ LLAAEKRAAE KUSEARKRKA KRLKQAKEEA QDEVEKYRQE
G	51 <u>r</u> erqfk efea k hmgtr egva ak idaetr ik idemnk mvqt qk eavikdvl
	101 NLVYDIKPEL HINYRVV

Sowohl beim V₁V₀-Holoenzym als auch beim V₀-Komplex war eine weitere radioaktive Bande mit einer ungefähren molekularen Masse von 20 kDa zu beobachten (Abb. 3.3). Am stärksten trat diese Bande beim Labeling mit ¹⁴C-D-Apicularen hervor (Spuren 16 und 20). Dieser Größe entsprechend würden sowohl eine Untereinheit c'' als auch die Untereinheit e des V₀-Komplexes als weitere gelabelte Untereinheit(en) in Frage kommen. Ein möglicherweise für eine Untereinheit c'' kodierendes Gen mit einer kalkulierten molekularen Masse von 27 kDa wurde inzwischen im Rahmen des M. sexta Genomprojekts identifiziert (http://agripestbase.org/manduca). Dennoch gibt es bisher keinen Hinweis auf ein entsprechendes Genprodukt in der aus der Plasmamembran des Mitteldarms von M. sexta gereinigten V-ATPase. Die Analyse sämtlicher Proteine des gereinigten V₁V₀-Holoenzyms, des V₀-Komplexes oder aus deren Chloroform/Methanol-Extraktionen mittels MALDI-MS und ESI-MS lieferten keinen Hinweis auf ein Vorhandensein einer Untereinheit c'' (Huss et al., 2002; Huss und Wieczorek, 2007; M. Huss und H. Wieczorek, unveröffentlichte Daten). Demnach ist es äußerst unwahrscheinlich, dass hier die Untereinheit c^{''} durch ¹⁴C-D-Apicularen markiert wurde. Mit Hilfe eines Western Blots mit dem ¹⁴C-D-Apicularen-gelabelten V₁V₀-Holoenzym und monoklonalen Antikörpern gegen die Untereinheit e der V-ATPase von M. sexta konnte die Bande schließlich der Untereinheit e zugeordnet werden (Abb. 3.5, Spur 3). Diese ist im V₀-Komplex vermutlich mit der Untereinheit a assoziiert (Muench et al., 2009), sodass eine Markierung der Untereinheit e entweder auf die direkte Nachbarschaft zu Untereinheit a oder eine Positionierung am Proteolipidring zurückgeführt werden könnte. Eine direkte Beteiligung an der Inhibitorbindung kann also nicht ausgeschlossen

werden. Die genaue Lokalisation der e-Untereinheit in der V-ATPase konnte allerdings, wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, bisher nicht bestimmt werden.

Zusammengenommen konnten durch die radioaktiven Markierungsversuche die beiden V_0 -Untereinheiten a und c als Interaktionspartner von Bafilomycin, Concanolid und Apicularen identifiziert werden. Somit bilden diese beiden Untereinheiten die Bindestelle sowohl für die Plecomakrolide als auch für die Benzolacton Enamide aus. Für die Bindung von Apicularen kann eine Beteiligung der Untereinheit e nicht ausgeschlossen werden, da diese ebenfalls, wenn auch deutlich schwächer als die Untereinheiten a und c, radioaktiv markiert wurde.





Zur Identifizierung der ¹⁴C-D-Apicularen gelabelten Bande mit einer molekularen Masse von etwa 20 kDa wurden 30 μ g V₁V₀-Holoenzym mit 100 μ M ¹⁴C-D-Apicularen für 5 min bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 mM Mg-ATP wurden die Proben 1 min mit UV-Licht (366 nm) bestrahlt oder im Dunkeln gehalten. Im Anschluss wurden die Untereinheiten in einer SDS-PAGE separiert. Spur 1, Coomassie-Blau-Färbung; Spur 2, PonceauS-Färbung der Proteine nach dem Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran; Spur 3, Immunfärbung mit monoklonalen Antikörpern anti-A (221-9) und anti-e (224-3); Spur 4, Autoradiographie der unbelichteten Probe; (\blacktriangle)

3.1.4 Labeleffizienz der radioaktiven PAL-Inhibitoren an den V₀-Untereinheiten a und c

Neben der Identifizierung der an der Inhibitor-Bindung beteiligten V-ATPase-Untereinheiten über die radioaktive Markierung sollten massenspektrometrische Analysen nähere Informationen liefern. Dazu sollte die V-ATPase UV-induziert mit den nichtradioaktiven, Diazirinyl-gelabelten Inhibitoren vernetzt werden. Nach einem tryptischen Verdau sollten massenspektrometrische Untersuchungen diejenigen V-ATPase-Peptide, an die ein Inhibitor gebunden hat, identifizieren und zu der genauen Bindestelle der einzelnen Inhibitoren führen. Um zunächst die Inhibitor-Menge, die bei den Photoaffinitätslabelversuchen tatsächlich an die V-ATPase-Untereinheiten a und c bindet, zu bestimmen, wurden wiederum die radioaktiven PAL-Inhibitoren eingesetzt. Die Radioaktivität der gesamten eingesetzten Inhibitormenge wurde zusammen mit der an der a- oder c-Untereinheit detektierten Radioaktivität betrachtet und letztlich auf die Menge an gebundenem Inhibitor bezogen. Dazu wurde die Gesamtradioaktivität in 2,5 µl Inhibitor mit einer Konzentration von 62,5 µM im Szintillationszähler ermittelt (Tab. 3.3). Die Radioaktivität an den Untereinheiten a und c wurde bestimmt, indem die entsprechenden Banden aus einem getrockneten SDS-Gel ausgeschnitten wurden und die Radioaktivität ebenfalls im Szintillationszähler gemessen wurde. So wurde letztlich die Markierungseffizienz ermittelt, d.h. wie viel Mol a- oder c-Untereinheit von der gesamten enthaltenen Menge radioaktiv gelabelt wurde. Für die a-Untereinheit wurde dabei ermittelt, dass nur etwa 0,012% der gesamten Menge der a-Untereinheit mit ¹⁴C-D-Bafilomycin bzw. ¹⁴C-D-Concanolid radioaktiv markiert wurden. Im Vergleich dazu war die Labeleffizienz durch ¹⁴C-D-Apicularen an der a-Untereinheit mit 0,005% nochmals etwa um die Hälfte reduziert. Für die c-Untereinheit ist die Labeleffizienz durch die radioaktiven PAL-Inhibitoren noch 10-fach geringer, da die c-Untereinheit im Proteolipidring von M. sexta vermutlich in 10-facher Kopie vorliegt (Muench et al., 2009) und die Menge an gebundenem Inhibitor sich auf zehn Untereinheiten verteilt. Mit 0,0006% ist die Markierungseffizienz des ¹⁴C-D-Apicularens im Vergleich zu ¹⁴C-D-Bafilomycin mit 0,0009% und ¹⁴C-D-Concanolid mit 0,0012% am geringsten.

Insgesamt bleibt festzustellen, dass die Labeleffizienz aller drei radioaktiver PAL-Inhibitoren sehr gering ist. Zudem sind die Inhibitormengen, die, bezogen auf die gesamte eingesetzte Inhibitormenge, an den Untereinheiten a und c gebunden haben, mit 0,011% bis 0,027% für alle drei PAL-Inhibitoren ebenfalls sehr gering. Damit kann erklärt werden, warum in ersten massenspektrometrischen Untersuchungen zwar die keine entsprechenden V-ATPase-Untereinheiten, aber V-ATPase-Peptide mit gebundenem Inhibitor identifiziert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Mit neueren, hochempfindlichen Geräten könnte die Identifizierung der Inhibitor-gebundenen Peptide dennoch zukünftig möglich werden. Ein weiterer Ansatz zur Analyse der Inhibitor-Bindestellen mittels Massenspektrometrie wird in Abschnitt 3.3 beschrieben.

Tab. 3.3: Labeleffizienz der ¹⁴C-Diazirinyl-Derivate von Bafilomycin, Concanolid und Apicularen Berechnung der Labeleffizienz, d.h. der insgesamt eingesetzten Inhibitormenge in Bezug auf die tatsächlich an die Untereinheiten a und c gebundene Inhibitormenge sowie in Bezug auf die Gesamtmenge der Untereinheiten a und c. Die Radioaktivität der ¹⁴C-D-Inhibitoren in 2,5 μ l der 62,5 μ M-Verdünnung, die auch in den Markierungsversuchen eingesetzt wurde, wurde mit einem Szintillationszähler bestimmt. Die Radioaktivität an den Untereinheiten a und c wurde ebenfalls mit einem Szintillationszähler bestimmt. Zur Zählung wurden dabei die Banden der getrockneten SDS-Gele mit den mit je mit 62,5 μ M Inhibitor gelabelten V₁V₀-Proben ausgeschnitten (n=4).

	Inhibitor		Protein				Labeleffizienz
¹⁴ C-D- Inhibitor	Radio- aktivität in 2,5 µl, 62,5 µM [cpm]	Gesamt- menge in 2,5 µl, 62,5 µM [mol]	$\begin{array}{c} \text{Gesamt-} \\ \text{menge} \\ \text{UE a in} \\ \text{30 } \mu g V_1 V_0 \\ [\text{mol}] \end{array}$	Radio- aktivität an UE a [cpm]	Inhibitor- menge an UE a [mol]	Inhibitor- menge an UE a / Gesamtmenge Inhibitor [%]	Inhibitormenge an UE a / Gesamtmenge UE a [%]
Bafilomycin	263760	1,56E-11	3,33E-11	70	4,14E-15	0,027	0,012
Concanolid	228165	1,56E-11	3,33E-11	57	3,90E-15	0,025	0,012
Apicularen	315825	1,56E-11	3,33E-11	35	1,73E-15	0,011	0,005
¹⁴ C-D- Inhibitor	Radio- aktivität in 2,5 µl, 62,5 µM [cpm]	Gesamt- menge in 2,5 µl, 62,5 µM [mol]	Gesamt- menge UE c in 30 μg V ₁ V ₀ [mol]	Radio- aktivität an UE c [cpm]	Inhibitor- menge an UE c [mol]	Inhibitor- menge an UE c / Gesamtmenge Inhibitor [%]	Inhibitormenge an UE c / Gesamtmenge UE c [%]
Bafilomycin	263760	1,56E-11	3,33E-10	48	2,84E-15	0,018	0,0009
Concanolid	228165	1,56E-11	3,33E-10	59	4,03E-15	0,026	0,0012
Apicularen	315825	1,56E-11	3,33E-10	38	1,88E-15	0,012	0,0006

3.2 Eingrenzung der Bindestellen von Bafilomycin, Concanamycin und Apicularen

Um zu überprüfen, ob die Bindestellen von Bafilomycin, Concanolid und Apicularen innerhalb des V₀-Komplexes überlappen, wurde das V₁V₀-Holoenzym von *M. sexta* in Gegenwart des 10-fachen Überschusses eines anderen Inhibitors mit den entsprechenden radioaktiven PAL-Derivaten inkubiert und UV-induziert vernetzt.

3.2.1 Die Bafilomycin-Bindestelle

Zur Eingrenzung der Bafilomycin-Bindestelle wurde das V_1V_0 -Holoenzym mit DMSO, Bafilomycin, D-Bafilomycin, Concanamycin, Archazolid, Apicularen, D-Apicularen oder Saliphenylhalamid vorinkubiert und anschließend mit ¹⁴C-D-Bafilomycin gelabelt. Das Autoradiogramm des Versuchs zeigt, dass die Plecomakrolide Bafilomycin, D-Bafilomycin und Concanamycin im Vergleich zu der Kontrolle mit DMSO zu einer signifikanten Reduktion der Markierung an den V₀-Untereinheiten a und c führten (Abb. 3.6A, Spuren 2, 4, 6 und 8, 3.6B). Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen für die Verdrängung des PAL-Bafilomycins durch andere Plecomakrolide voll und ganz. Auffallend ist lediglich, dass Concanamycin das Bafilomycin-Label an der a-Untereinheit nicht so effektiv verdrängte wie an der c-Untereinheit (Spur 8).

Das Makrolid Archazolid reduzierte das Bafilomycin-Signal sehr deutlich auf nur noch etwa ein Drittel seiner Intensität (Spur 10). Dieses Ergebnis deutet auf eine deutliche Überlappung der Bindestellen hin und entspricht damit dem früherer Untersuchungen, in denen festgestellt worden war, dass Archazolid sowie Bafilomycin und Concanamycin das Label durch ¹²⁵I-Concanolid oder ¹⁴C-BD-Archazolid an der c-Untereinheit reduzieren (Bockelmann *et al.*, 2010; Huss *et al.*, 2002; Huss *et al.*, 2005).

Die Benzolacton Enamide Apicularen und Saliphenylhalamid dagegen verdrängten das ¹⁴C-D-Bafilomycin-Label nicht, und im Falle der Vorinkubation mit Apicularen wurde die Markierung sogar deutlich verstärkt (Spuren 12 und 16). Dies deutet auf unterschiedliche Bindestellen von Apicularen und Bafilomycin innerhalb des V_O-Komplexes hin und bestätigt vorhergegangene Untersuchungen, die gezeigt hatten, dass sich die Bindestelle der Benzolacton Enamide von der der Plecomakrolide unterscheidet (Huss *et al.*, 2005; Huss und Wieczorek, 2009; Xie *et al.*, 2004). Die Vorinkubation mit D-Apicularen führte zur Reduktion des ¹⁴C-D-Bafilomycin-Labels an der c-Untereinheit (Spur 14), was vermutlich auf eine Interferenz des ¹⁴C-D-Bafilomycins mit der Diazirinylgruppe des Apicularens, die wahrscheinlich die Bindestelle von Bafilomycin hineinragt, zurückzuführen ist.

Zusammengenommen lassen die Ergebnisse der Verdrängungsversuche mit dem radioaktiven PAL-Bafilomycin darauf schließen, dass sich die Bindestellen der Plecomakrolide und des Archazolids deutlich überlappen und dass die Benzolacton Enamide vermutlich an einer anderen Stelle innerhalb des V_O-Komplexes mit den Untereinheiten a und c interagieren.



Abb. 3.6: Radioaktive Markierung der V-ATPase mit ¹⁴C-D-Bafilomycin nach Vorinkubation mit verschiedenen Inhibitoren

Die Proben mit 30 μ g V₁V₀-Holoenzym wurden für 5 min bei RT mit DMSO, 625 μ M Bafilomycin (Baf), D-Bafilomycin (D-Baf), Concanamycin (Con), Archazolid (Arch), Apicularen (Api), D-Apicularen (D-Api) oder Saliphenylhalamid (Saliphe) vorinkubiert und anschließend für 5 min bei 25°C mit 62,5 μ M ¹⁴C-D-Bafilomycin inkubiert. Nach Zugabe von 1 mM Mg-ATP wurden die Proben für 1 min mit UV-Licht (366 nm) belichtet (+) bzw. im Dunkeln gehalten (-). Anschließend wurden die Proben per SDS-PAGE separiert, die Gele mit Coomassie gefärbt, getrocknet und auf einen Phosphorscreen aufgelegt. **A**, Spur 1, typische Coomassie-Färbung, Spuren 2-17, Autoradiogramm. **B**, Analyse der Pixelintensitäten der belichteten a- und c-Untereinheiten mit dem Computerprogramm ImageQuantTL. Dargestellt sind die Mittelwerte (± Standardabweichungen) von zwei unabhängigen Präparationen mit Ausnahme von DMSO (n=8) und Apicularen (n=5). (**A**)

3.2.2 Die Concanamycin-Bindestelle

Um die Bindestelle des Plecomakrolids Concanamycin näher zu bestimmen, wurden neben Concanamycin die Derivate Concanolid und D-Concanolid sowie die auch im vorherigen Versuch verwendeten Inhibitoren Bafilomycin, Archazolid, Apicularen, D-Apicularen und Saliphenylhalamid zur Verdrängung des ¹⁴C-D-Concanolids eingesetzt. Das Autoradiogramm sowie die Analyse der Pixelintensitäten zeigen wie erwartet eine deutliche Reduktion der radioaktiven Markierung an den V₀-Untereinheiten a und c nach der Vorinkubation mit den Plecomakroliden Bafilomycin, Concanolid und D-Concanolid (Abb. 3.7A, Spur 4, 8 und 10, 3.7B). Durch die Vorinkubation mit Concanamycin dagegen konnte wie auch bei der Verdrängung von ¹⁴C-D-Bafilomycin (Abschnitt 3.2.1) nur das Signal an der c-Untereinheit und nicht an der a-Untereinheit reduziert werden (Spur 6). Auch hier verdeckte Concanamycin effektiv die Bindestelle am c-Ring. Da an der Bindung von ¹⁴C-D-Concanolid aber auch die a-Untereinheit beteiligt zu sein scheint, ist dort weiterhin eine deutliche Markierung zu sehen. Unter Berücksichtigung der IC₅₀-Werte für Concanamycin und D-Concanolid fällt außerdem auf, dass sich diese mit 10 nM und 16 nM nur sehr geringfügig unterscheiden, sodass der 10-fache Überschuss an Concanamycin möglicherweise nicht ausreicht, um das ¹⁴C-D-Concanolid-Label vollständig zu verdrängen.

Das Makrolacton Archazolid verdrängt das radioaktive Signal des D-Concanolids sehr deutlich an den beiden V_0 -Untereinheiten a und c (Spur 12). So wird in diesem Versuch erneut bestätigt, dass sich die Bindestellen der Plecomakrolide und die des Archazolids überlappen.

Apicularen, D-Apicularen und Saliphenylhalamid verdrängten ¹⁴C-D-Concanolid an der a- und c-Untereinheit gar nicht oder nur geringfügig, was abermals darauf hindeutet, dass die Benzolacton Enamide eine andere Bindestelle als die Plecomakrolide besetzen (Spuren 14, 16 und 18).

Verglichen mit den Ergebnissen der Verdrängungsversuche mit ¹⁴C-D-Bafilomycin wurde auch in diesem Versuch die Annahme bestätigt, dass es eine Überlappung der Bindestellen für die Plecomakrolide und das Archazolid gibt, während die Benzolacton Enamide an einer anderen Stelle mit den V_O-Untereinheiten a und c interagieren.



Abb. 3.7: Radioaktive Markierung der V-ATPase mit ¹⁴C-D-Concanolid nach Vorinkubation mit verschiedenen Inhibitoren

Die Proben mit 30 μ g V₁V₀-Holoenzym wurden für 5 min bei RT mit DMSO, 625 μ M Bafilomycin (Baf), Concanamycin (Con), Concanolid (Ccl), D-Concanolid (D-Ccl), Archazolid (Arch), Apicularen (Api), D-Apicularen (D-Api) oder Saliphenylhalamid (Saliphe) vorinkubiert und anschließend für 5 min bei RT mit 62,5 μ M ¹⁴C-D-Concanolid inkubiert. Nach Zugabe von 1 mM Mg-ATP wurden die Proben für 1 min mit UV-Licht (366 nm) belichtet (+) bzw. im Dunkeln gehalten (-). Anschließend wurden die Proben per SDS-PAGE separiert, die Gele mit Coomassie gefärbt, getrocknet und auf einen Phosphorscreen aufgelegt. **A**, Spur 1, typische Coomassie-Färbung, Spuren 2-19, Autoradiogramm. **B**, Analyse der Pixelintensitäten der belichteten a- und c-Untereinheiten mit dem Computerprogramm ImageQuantTL. Dargestellt sind die Mittelwerte (± Standardabweichungen) von zwei unabhängigen Präparationen mit Ausnahme von DMSO (n=10), Concanamycin (n=6), D-Concanolid (n=3), Apicularen (n=6) und D-Apicularen (n=3). (**A**)

3.2.3 Die Apicularen-Bindestelle

Die nähere Untersuchung der Bindestelle von Apicularen erfolgte durch die Verdrängung des radioaktiven PAL-Derivats nach Vorinkubation mit den Inhibitoren Bafilomycin, Concanamycin, Archazolid, Apicularen, **D**-Apicularen und Saliphenylhalamid. Das Autoradiogramm und die Analyse der Pixelintensitäten zeigen für die Verdrängung durch die Plecomakrolide Bafilomycin und Concanamycin eine leichte Reduktion des ¹⁴C-D-Apicularen-Signals an den Untereinheiten a und c (Abb. 3.8A, Spuren 4 und 6, 3.8B). Dieses Ergebnis ist zunächst überraschend, da Apicularen selbst die Plecomakrolid-Label nicht verdrängen konnte. Allerdings kam es in den Versuchen, in denen das Diazirinyl-Derivat von Apicularen zur Verdrängung der radioaktiven Plecomakrolid-Derivate eingesetzt wurde, zu einer teilweisen, leichten Reduktion der Markierung (Abb. 3.6A, Spur 14, Abb. 3.7A, Spur 16). Auf diesen Ergebnissen basierend liegt die Vermutung nahe, dass die Diazirinylgruppe des D-Apicularens bei der Apicularen-Bindung in die Bindestelle der Plecomakrolide hineinragt und dadurch ihre Bindung stört und umgekehrt. Dennoch besetzt das native Apicularen eine offenbar andere Bindestelle als die Plecomakrolide, was durch die deutlich fehlende Verdrängung dieser nach Apicularen-Vorinkubation demonstriert wurde (Abb. 3.6A, Spur 12, und 3.7A, Spur 14).

Die Vorinkubation mit dem Makrolacton Archazolid konnte das ¹⁴C-D-Apicularen-Label nicht reduzieren (Abb. 3.8A, Spur 8). Demnach besetzen Archazolid und Apicularen offensichtlich verschiedene Bindestellen. Dieses Ergebnis stimmt mit den Erwartungen aufgrund vorangegangener Versuche überein, in denen die Verdrängung des fluoreszierenden Carbodiimids NCD-4 durch Archazolid nicht durch die Vorinkubation mit Apicularen gestört wurde (Bockelmann *et al.*, 2010).

Die Verdrängung des ¹⁴C-D-Apicularens durch das native Apicularen führte zu einem zunächst unerwarteten Resultat, da das radioaktive Signal an den Untereinheiten a und c nur sehr geringfügig reduziert wurde (Abb. 3.8A, Spur 10, 3.8B). Eine effektivere Reduktion wurde durch die Vorinkubation mit dem nicht-radioaktiven D-Apicularen sowie mit Saliphenylhalamid erreicht (Spuren 12 und 14). Zusammengenommen liegt der Schluss nahe, dass das native Apicularen wegen seiner geringfügigeren räumlichen Ausdehnung möglicherweise zu klein ist, um die komplette Bindestelle des ¹⁴C-D-Apicularens abzudecken. D-Apicularen und Saliphenylhalamid dagegen sind strukturell identisch bzw. ähnlich groß (Abb. 3.1C und 1.9C), sodass beide ¹⁴C-D-Apicularen bzw. die Diazirinylgruppe dieses Derivats verdrängen können.

Zusammengenommen ergaben die ¹⁴C-D-Apicularen-Verdrängungsversuche, dass Apicularen eine andere Bindestelle als die Plecomakrolide oder Archazolid besetzt, aber auch, dass ein Überlappen der Bindestellen in geringem Maße möglich ist und nicht ausgeschlossen werden kann. Die in Abschnitt 3.1.3 beschriebene mögliche Beteiligung der Untereinheit e an der Apicularen-Bindung wurde hier aufgrund der bereits erwähnten Gründe und auch wegen der Schwäche der radioaktiven Markierung der e-Untereinheit nicht berücksichtigt.



Abb. 3.8: Radioaktive Markierung der V-ATPase mit ¹⁴C-D-Apicularen nach Vorinkubation mit verschiedenen Inhibitoren

Die Proben mit 30 μ g V₁V₀-Holoenzym wurden für 5 min bei RT mit DMSO, 625 μ M Bafilomycin (Baf), Concanamycin (Con), Archazolid (Arch), Apicularen (Api), D-Apicularen (D-Api) oder Saliphenylhalamid (Saliphe) vorinkubiert und anschließend für 5 min bei RT mit 62,5 μ M ¹⁴C-D-Apicularen inkubiert. Nach Zugabe von 1 mM Mg-ATP wurden die Proben für 1 min mit UV-Licht (366 nm) belichtet (+) bzw. im Dunkeln gehalten (-). Anschließend wurden die Proben in einer SDS-PAGE separiert, die Gele mit Coomassie gefärbt, getrocknet und auf einen Phosphorscreen aufgelegt. **A**, Spur 1, typische Coomassie-Färbung, Spuren 2-15, Autoradiogramm. **B**, Analyse der Pixelintensitäten der belichteten a- und c-Untereinheiten mit dem Computerprogramm ImageQuantTL. Dargestellt sind die Mittelwerte (± Standardabweichungen) von unabhängigen Präparationen: DMSO (n=10), Bafilomycin (n=4), Concanamycin (n=4), Archazolid (n=4), Apicularen (n=5), D-Apicularen (n=4) und Saliphenylhalamid (n=3). (**A**)

3.3 Effekt von F-PAL-Inhibitoren auf die V-ATPase-Aktivität von M. sexta

Im Zuge der Weiterentwicklung der Methoden zur Identifizierung der Inhibitor-Bindestellen innerhalb der V-ATPase und als Konsequenz aus dem Wissen, dass die Labeleffizienz mit den Diazirinyl-Inhibitoren sehr gering ist (Abschnitt 3.1.4), wurden neue Diazirinylbenzoesäuren mit Perfluorobutyl- und Perfluorooctylketten (F-PAL) entwickelt und an die Plecomakrolide Bafilomycin und Concanamycin gekoppelt (Burkard et al., 2010). Mit Hilfe dieser neuen F-PAL-Derivate (Abb. 3.9) sollte es nach dem Photoaffinitätslabeln der V-ATPase, einem tryptischen Verdau des Proteins und der Anreicherung der gelabelten Fragmente mittels Fluorchromatografie möglich werden, die Aminosäuren, an die der F-PAL-Inhibitor gebunden hat, massenspektrometrisch zu identifizieren. Voraussetzung für diese Untersuchungen ist, dass die neuen Derivate trotz ihrer Modifikationen die V-ATPase effektiv inhibieren. Um diese Frage zu klären, wurden ATPase-Aktivitätstests mit dem V₁V₀-Holoenzym von M. sexta durchgeführt und die IC₅₀-Werte der F-PAL-Inhibitoren ermittelt. Ein möglicher Effekt der Perfluorobutyloder Perfluorooctylketten selbst auf die Hemmung der V-ATPase wurde durch das Anhängen der Fluorketten an Tetrahydronaphtalin (Tetralin), einer Kontrollsubstanz ohne Effekt auf die V-ATPase, ausgeschlossen (Abb. 3.10A).



Abb. 3.9: Überblick über die Strukturen der neuen F-PAL-Derivate

Dargestellt sind die F-PAL-Derivate von Concanolid und Bafilomycin mit angehängten Perfluorobutyloder Perfluorooctylketten. Zum Vergleich mit den Ursprungssubstanzen siehe Abb. 3.1. Als Kontrollsubstanz wurde Tetralin mit den Fluorketten gekoppelt.



Abb. 3.10: Hemmung der ATPase-Aktivität des *M. sexta* V₁V₀-Holoenzyms mit den neuen F-PAL-Inhibitoren

A, Hemmkurven der V-ATPase mit Concanamycin A, D-Concanolid, C_4F_9 -D-Concanolid A und C_8F_{17} -D-Concanolid A, sowie den Kontrollverbindungen C_4F_9 -D-Tetralin (C_4F_9 -D-Tetrahydronaphthalin) und C_8F_{17} -D-Tetralin (C_8F_{17} -D-Tetrahydronaphthalin) zum Ausschluss eines möglichen Effekts der Fluorketten. **B**, Hemmkurven der V-ATPase mit Bafilomycin A₁, D-Bafilomycin A₁ und den F-PAL-Derivaten C_4F_9 -D-Bafilomycin und C_8F_{17} -D-Bafilomycin. Dargestellt sind die Mittelwerte (± Standardabweichungen) aus zwei verschiedenen Präparationen, wobei die beiden Tetralin-Derivate nur einmal als Verdünnungsreihe getestet und im zweiten Ansatz nur noch die beiden höchsten Konzentrationen (10^3 und 10^4 nM) eingesetzt wurden. Die spezifische Aktivität der Kontrollen ohne Inhibitor beträgt $1,3 \pm 0,1 \,\mu\text{mol*mg}^{-1}$ *min⁻¹. Diese Ergebnisse wurden bereits in der Arbeit Burkard *et al.* (2010) veröffentlicht.

Die Hemmkurven mit den F-PAL-Concanolid-Derivaten C_4F_9 -D-Concanolid und C_8F_{17} -D-Concanolid (für die vollständigen chemischen Bezeichnungen siehe Tab. 2.3) zeigen, dass die Verlängerung der Perfluorobutyl- oder Perfluorooctylketten den IC₅₀-Wert nur geringfügig auf 70 nM bzw. 80 nM senkt (Abb. 3.10A). Damit haben die neuen F-PAL-Derivate des Concanamycins noch immer ein ausreichend hohes Inhibitor-

Potenzial und eignen sich sehr gut für folgende Labelversuche. Im Falle der F-PAL-Bafilomycin-Derivate stellte sich dagegen heraus, dass die Modifikationen die Inhibitor-Bindung an die V-ATPase stören und offensichtlich dadurch das Inhibitor-Potential erheblich, d. h. um mehr als den Faktor 100, gesenkt wird (Abb. 3.10B). Dementsprechend sind diese Derivate nicht für die Fluor-Labelversuche geeignet. Für diese Diskrepanz zwischen den F-PAL-Derivaten der beiden Plecomakrolide kommt möglicherweise die kürzere Struktur des Bafilomycins, im Vergleich zum Concanamycin, als Begründung in Frage, da dort das Anhängen der Fluorketten möglicherweise einen größeren, störenden Effekt hat.

3.4 Genetische Manipulationen der V-ATPase-Untereinheit a von

S. cerevisiae

3.4.1 Gegenseitige Komplementationsfähigkeit von Vph1 und Stv1

Die gegenseitige Komplementationsfähigkeit der Untereinheiten Vph1 und Stv1 bei der Hefe war bereits in früheren Arbeiten untersucht worden (Kawasaki-Nishi et al., 2001c; Manolson et al., 1994; Perzov et al., 2002; Tarsio et al., 2011). Da jedoch in dieser Arbeit für weiterführende Untersuchungen zur Identifizierung der Bindestelle von Apicularen eine neue Doppeldeletionsmutante für Vph1 und Stv1 sowie neue Vektoren zur Expression der beiden Isoformen unter dem jeweiligen nativen Promotor (Tab. 2.8) hergestellt werden sollten, wurden die Eigenschaften der resultierenden Stämme hier erneut analysiert. Die Deletionsmutanten BY4741 $\Delta vph1$ und BY4742 $\Delta stv1$ sowie ihre Komplementationsstämme mit den Vektoren pRS415/VPH1 und pRS415/STV1 wuchsen im Wachstumstest alle auf Medium mit einer erhöhten CaCl2-Konzentration oder mit einem pH von 7,5 (Abb. 3.11A). Damit besitzen diese Stämme eine soweit funktionstüchtige V-ATPase, dass ein wildtypgleiches Wachstum erreicht wird. Während Einfachdeletionsmutanten die aus der Kreuzung der beiden entstandene Doppeldeletionsmutante BY4741\(\Delta\)vph1\(\Delta\)stv1 als Einzige einen vollständigen Vma--Phänotyp aufwies, führte die Transformation mit Vph1 oder Stv1 erneut zu wildtypgleichem Wachstum auf Medium mit erhöhter CaCl₂-Konzentration oder erhöhtem pH (Abb. 3.11A). Vph1 und Stv1 scheinen sich also im Wachstumstest gleichermaßen komplementieren zu können. In den weiteren Untersuchungen zur Analyse V-ATPase-Assemblierung und der -Aktivität in den ieweils isolierten Vakuolenmembranen zeigte sich jedoch ein anderes Bild. Die Menge an assemblierter V-ATPase, die im Western Blot mit Antikörpern gegen die V₁-Untereinheit B (Vma2) und die Vo-Untereinheit d (Vma6) nachgewiesen wurde, ist in dem Stamm ohne Vph1-Untereinheit ($\Delta vph1$) deutlich reduziert (Abb. 3.11B). Die Deletion von Vph1 konnte durch die Transformation mit dem Vph1-Plasmid ($\Delta v ph1 + VPH1$) komplementiert werden, während dies mit der Untereinheit Stv1 ($\Delta vph1+STV1$) bei der hier durchgeführten Expression unter dem nativen Promotor nur in sehr geringem Ausmaß möglich war. Die Deletion von Stv1 und damit auch die Expression von Vph1 oder Stv1 in dem $\Delta stv1$ -Stamm haben keinen Einfluss auf die Menge an assemblierter V-ATPase in den gereinigten Vakuolenmembranen. Wie erwartet hatte die gleichzeitige Deletion von Vph1 und Stv1 zur Folge, dass keine V-ATPase mehr in den Vakuolenmembranen exprimiert wurde ($\Delta vph1\Delta stv1$). Die Doppeldeletion von Vph1 und Stv1 wurde nur durch die Expression von Vph1 vollständig komplementiert ($\Delta v ph1 \Delta stv1 + VPH1$), während die Expression von Stv1 nur zu einer sehr geringen Menge assemblierter V-ATPase in den gereinigten Vakuolenmembranen ($\Delta v phl\Delta stvl+STVl$) führte.

А	pН	15,5	0	CaCl ₂	pH 7	,5	SD ^{-Leu}
WT	. 🚸 🕻	: .	• *	a.	🔮 🎂 🎋		
∆vph1	د 🛞 🕄	<u> </u>	•	z		•	
∆vph1+VPH1	. @ (,*•	۰		S & :	۰.	🔘 🌸 🤼
∆vph1+STV1		ν.	•	2	💿 🚳 .4		• • * .
∆stv1) 🔅 ·	•	• · · · ·	*	S & S	• //	
∆stv1+VPH1		:		•		•	
∆stv1+STV1		•			1 miles		S ::
∆vph1∆stv1	●	• •					
Δvph1Δstv1+VPH1		;	🍘 tán		@ % .•		a 4 ··· .
· Δvph1Δstv1+STV1			A AL		· · ·		
			32	•	, e		an da e
B anti-B anti-d	47	but but	Beht Busht St	40h2	Rept 100	the start of the s	Low And
С			V-/	ATPase-Aktivita	ät		
		\A/T		µmol/min/mg	relativ [%]	n	
		Δvph1		0.06 ± 0.014	17	2	
		$\Delta v ph1 + V P$	H1	0,335 ± 0,035	5 93	2	
		$\Delta v ph1 + ST$	V1	0,11 ± 0,057	30	2	
		$\Delta stv1$		0,344 ± 0,142	2 95	2	
		∆stv1 + VPł	-11	0,346 ± 0,153	3 96	2	
		$\Delta stv1 + ST$	/1	0,301 ± 0,023	3 83	2	
		∆vph1∆stv1		0	0	1	
		∆vph1∆stv1	+ VPH1	$0,482 \pm 0,078$	5 134 7 11	2	
		$\Delta v ph1 \Delta stv1$	+SIV1	$0,039 \pm 0,021$	/ 11	2	

Abb. 3.11: Gegenseitige Komplementationsfähigkeit von Vph1 und Stv1

Für die Analyse der gegenseitigen Komplementationsfähigkeit von Vph1 und Stv1 wurden der Vma-Phänotyp sowie die Assemblierung und Aktivität der V-ATPase in den gereinigten Vakuolenmembranen der folgenden Stämme untersucht: BY4741 (WT), BY4741\(\Delta\)vph1 (\(\Delta\)vph1), BY4741\(\Delta\)vph1+pRS415/VPH1 $(\Delta vph1 + VPH1)$, BY4741 $\Delta vph1 + pRS415/STV1$ ($\Delta vph1 + STV1$), BY4742 $\Delta stv1$, BY4742 $\Delta stv1 + STV1$), BY4742 $\Delta stv1 + STV1$, BY4742 Δs $(\Delta stv1 + VPH1)$, BY4742 $\Delta stv1 + pRS415/STV1$ ($\Delta stv1 + STV1$), BY4741 $\Delta vph1\Delta stv1$ pRS415/VPH1 $(\Delta v ph l \Delta s t v l),$ BY4741 Δ vph1 Δ stv1+ pRS415/VPH1 (Δ vph1 Δ stv1+VPH1), BY4741 Δ vph1 Δ stv1+ pRS415/STV1 (Avph1Astv1+STV1). A, Wachstumstest zur Analyse des Vma-Phänotyps: Jeweils 5 µl der Verdünnungen von 10⁴ bis 10⁰ Zellen/ml wurden auf Agarplatten mit YPDA pH 5,5 (pH 5,5), YPDA pH 5,5 mit 0,1 M CaCl₂ (CaCl₂), YPDA pH 7,5 (pH 7,5) sowie auf Selektionsmedium ohne Leucin (SD^{-Leu}) aufgetropft. B, V-ATPase-Assemblierung: Western Blot mit jeweils 10 µg der gereinigten, TCA-gefällten Vakuolenmembranen. Die Assemblierung wurde mit Antikörpern gegen die Untereinheiten B und d geprüft. C, Bafilomycin-hemmbare V-ATPase-Aktivität der Vakuolenmembranen. Dargestellt sind die Mittelwerte (± Standardabweichungen) der Aktivitäten, die relative Aktivität abgeleitet von der Wildtyp-Aktivität sowie die Anzahl (n) der getesteten unabhängigen Präparationen.

Die V-ATPase-Aktivität in den Vakuolenmembranen der hier untersuchten Stämme entspricht den Erwartungen aus den Untersuchungen zur V-ATPase-Assemblierung (Abb. 3.11C). Die Deletion von Vph1 resultierte in einer reduzierten Aktivität von nur noch 17% verglichen mit der V-ATPase-Aktivität des Wildtyps. Während durch die Transformation des $\Delta v phl$ -Stammes mit der Vphl-Untereinheit eine nahezu wildtypgleiche Aktivität von 93% erreicht wurde, hatte die Stv1-Expression nur eine V-ATPase-Aktivität von 30% zur Folge. Die Deletion von Stv1 ($\Delta stv1$) sowie die Komplementation mit Vph1 oder Stv1 hatten nahezu keine Auswirkung auf die V-ATPase-Aktivität, die wie erwartet fast Wildtypniveau erreichte. In den Vakuolenmembranen der Doppeldeletionsmutante für Vph1 und Stv1 konnte keine V-ATPase-Aktivität gemessen werden, jedoch führte die Expression von Vph1 in dem Mutationsstamm zu einer V-ATPase-Aktivität von über 100%. Dagegen konnte bei der Expression von Stv1 nur eine V-ATPase-Aktivität von 11% gemessen werden.

Zusammengenommen bestätigen die hier vorgestellten Ergebnisse die Resultate vorangegangener Untersuchungen, dass eine gegenseitige Komplementationsfähigkeit von Vph1 und Stv1 in gewissem Ausmaß möglich ist (Manolson *et al.*, 1994; Perzov *et al.*, 2002). Während im Wachstumstest kaum Auswirkungen festzustellen waren, zeigte sich bei der hier betrachteten Expression von Vph1 und Stv1 unter dem jeweiligen natürlichen Promotor, dass Stv1 die gravierenden Folgen des Vph1-Verlusts für die Assemblierung und die Aktivität der V-ATPase in den gereinigten Vakuolenmembranen jedoch nur sehr geringfügig komplementieren konnte. Dennoch ist letztendlich eine Doppeldeletionsmutante für Vph1 und Stv1 notwendig, um weitere Untersuchungen zur Komplementation mit mutagenisierten oder speziesfremden a-Untereinheiten durchführen zu können.

3.4.2 Generation von Hybrid-a-Untereinheiten aus Vph1 und den humanen Isoformen a3 bzw. a4

Die radioaktiven PAL-Experimente mit ¹⁴C-D-Apicularen führten zu dem Ergebnis, dass innerhalb des V_O-Komplexes sowohl die a- als auch die c-Untereinheit markiert werden (Abschnitt 3.1.3). Um herauszufinden, ob die Untereinheit a die Apicularen-Bindestelle beinhaltet, wurde die Tatsache genutzt, dass die V-ATPase von *S. cerevisiae* nicht durch Apicularen gehemmt wird (S. Bockelmann, M. Huss und H. Wieczorek, unveröffentlichte Daten). Um die Apicularen-Bindestelle zu charakterisieren, sollte nun die a-Untereinheit der V-ATPase aus einem Organismus, der sensitiv gegenüber Apicularen ist, in einer Hefe-Doppeldeletionsmutante für Vph1 und Stv1 exprimiert werden. Sollte daraus eine aktive Hybrid-V-ATPase entstehen, die mit Apicularen gehemmt werden kann, so wäre auf eine elegante Art und Weise nachgewiesen, dass die a-Untereinheit der Hauptinteraktionspartner für Apicularen ist. Des Weiteren könnte die Apicularen-Bindestelle dann mittels gerichteter Mutagenese der Plasmid-kodierten a-Untereinheit identifiziert werden. Für die a-Untereinheit aus der

Zitrone und die Isoform a4 der humanen V-ATPase war allerdings bereits festgestellt worden, dass sie die Deletion von Vph1 und Stv1 nicht komplementieren (Aviezer-Hagai *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2008). Der Grund hierfür liegt möglicherweise darin, dass die im N-Terminus von Vph1 für die richtige Lokalisation von Vph1 enthaltenen Informationen bei den a-Untereinheiten anderer Spezies fehlen (Kawasaki-Nishi *et al.*, 2001a). Der Einbau dieser speziesfremden a-Untereinheiten könnte auch die korrekte Interaktion des N-Terminus von Vph1 mit Vma1 und Vma13 stören (Landolt-Marticorena *et al.*, 2000). Um die in Vph1 enthaltenen und offenbar für eine funktionierende V-ATPase essentiellen Informationen zu erhalten, sollten in dieser Arbeit Hybrid-Untereinheiten, bestehend aus der N-terminalen Hälfte von Vph1 und der C-terminalen Hälfte der humanen a-Isoformen a3 bzw. a4, hergestellt werden. So sollten die Untereinheiten Vph1/a3 und Vph1/a4 angelehnt an die Hybrid-Untereinheit aus Vph1 und Stv1 (Kawasaki-Nishi *et al.*, 2001a) entstehen.



Abb. 3.12: Entstehung der Hybrid-Untereinheiten Vph1/a3 und Vph1/a4

A, Austausch der C-terminalen Hälfte von Vph1 gegen den C-Terminus von Untereinheit a3 bzw. a4 mittels homologer Rekombination. Der C-Terminus von Untereinheit a3 bzw. a4, genauer AS 391-830 bei a3 bzw. AS 396-840 bei a4, wurde mit den Primerkombinationen 21/22 bzw. 21/23 aus den Plasmiden pCR-II/ha3 bzw. pJV96/ha4 (Tab. 2.7) amplifiziert, wobei zusätzlich homologe Basensequenzen von 40 Bp angehängt wurden. Parallel wurde das Plasmid pRS415/*VPH1* über die im C-Terminus befindliche BsgI-Schnittstelle linearisiert und anschließend durch die homologe Rekombination des C-Terminus von a3 bzw. a4 wieder geschlossen. **B**, Sequenzvergleiche der Untereinheiten Vph1 und *H.s.* a3 bzw. *H.s.* a4., Ausschnitt des Übergangs von der N- zur C-terminalen Domäne der a-Untereinheiten. (\blacktriangle)
Praktisch erfolgte die Zusammenführung der N-terminalen Hälfte von Vph1, wobei die Aminosäuren 1-410 gewählt wurden, um die konservierte Aminosäure Prolin beizubehalten, die möglicherweise hier als helixbrechende, hydrophobe Aminosäure eine wichtige Rolle beim Membraneintritt der TMH spielt, mit der C-terminalen Hälfte der humanen Isoform a3 (AS 391-830) bzw. a4 (AS 396-840) mittels homologer Rekombination in Leucin-defizienten Wildtypzellen des Stammes BY4741 (Abb. 3.12A). Nach erfolgreicher Integration des C-Terminus von a3 bzw. a4 über die homologen Bereiche in den zuvor linearisierten Vektor pRS415/VPH1 lag ein geschlossenes Plasmid – im Folgenden pRS415/VPH1/a3 bzw. pRS415/VPH1/a4 genannt – vor, das über das Wachstum der Wildtypzellen Leucin-freiem Medium erfolgreich selektiert wurde. Abb. 3.12B zeigt den Ausschnitt des Vergleichs der Aminosäuresequenzen Vph1, *H.s.* a3 und *H.s.* a4 im Bereich der Schnittstelle der N- und C-terminalen Domäne. Die beiden Hybrid-Untereinheiten wurden im Folgenden zur Komplementation der Doppeldeletion für Vph1 und Stv1 eingesetzt.

3.4.3 Expression der Hybrid-Untereinheiten Vph1/a3 und Vph1/a4 in S. cerevisiae

Zur Analyse der Funktionalität der beiden neuen Hybrid-Untereinheiten wurde die Doppeldeletionsmutante für Vph1 und Stv1 mit den Plasmiden pRS415/Vph1/a3 bzw. pRS415/Vph1/a4 transformiert. Der Wachstumstest der resultierenden Hefestämme auf verschiedenen Medien zeigte, dass die Stämme mit den Hybrid-Untereinheiten Vph1/a3 und Vph1/a4 wie die Deletionsmutante $\Delta vph1\Delta stv1$ und auch die zur Kontrolle mit der humanen a4-Untereinheit (Plasmid pJV96ha4) transformierte Doppeldeletionsmutante H.s.-a4 einen Vma⁻-Phänotyp besitzen (Abb. 3.13A). Sie wuchsen im Gegensatz zum Wildtyp nicht auf Medium mit erhöhter CaCl₂-Konzentration oder auf Medium mit einem pH von 7,5. Die beiden neuen Hybrid-Untereinheiten komplementierten die Doppeldeletion von Vph1 und Stv1 also offenbar nicht funktionell. Die Überprüfung der Assemblierung der V-ATPase in den Vakuolenmembranen der Hybrid-Stämme mittels Western Blot fiel allerdings positiv aus. In schwachem, aber deutlichem Ausmaß konnten die V₀-Untereinheit d (Vma6) und die V₁-Untereinheit B (Vma2) in den Hybrid-Stämmen Vph1/a3 und Vph1/a4 detektiert werden (Abb. 3.13B, für die humane a4-Untereinheit nicht gezeigt). In den Vakuolenmembranen des Stammes Vph1/a4 wurde zusätzlich die Expression der Vph1-Untereinheit nachgewiesen, für den Stamm Vph1/a3 allerdings nicht. ATPase-Aktivitätstests mit gereinigten Vakuolenmembranen demonstrierten jedoch, dass die Stämme mit den Hybrid-Untereinheiten keine nachweisbare V-ATPase-Aktivität besitzen (Abb. 3.13C, für die humane a4-Untereinheit nicht gezeigt), was die aus den Wachstumstests hervorgegangene Vermutung bestätigt. Damit konnten die beiden Hybrid-Untereinheiten einerseits so in die Hefe-V-ATPase integriert werden, dass sie zwar assembliert, andererseits aber nicht aktiv ist.

Zusammengenommen belegen die Ergebnisse, dass die Integration der Hybrid-Untereinheiten Vph1/a3 und Vph1/a4 in den Deletionsstamm für Vph1 und Stv1 nicht in einer funktionsfähigen Hybrid-V-ATPase resultierte. Dementsprechend können aus



diesen Versuchen keine Rückschlüsse auf die Interaktion von Apicularen und der a-Untereinheit gezogen werden.

Abb. 3.13: Wachstum, V-ATPase-Assemblierung und –Aktivität der Stämme mit den Hybrid-Untereinheiten Vph1/a3 und Vph1/a4

Analyse der Komplementation der Doppeldeletionsmutante für Vph1 und Stv1 durch die neuen Hybrid-BY4741\Delta vph1\Delta stv1+pRS415/VPH1/a3 Untereinheiten: (VPH1/a3)und BY4741 $\Delta vph1\Delta stv1+$ pRS415/VPH1/a4 (VPH1/a4). Kontrollstämme: Wildtyp BY4741 (WT) und Doppeldeletionsmutante BY4741 $\Delta vph1\Delta stv1$ ($\Delta vph1\Delta stv1$). Im Wachstumstest wurde zudem die Komplementation durch die humane a4-Untereinheit (BY4741\(\Delta\)vph1\(\Delta\)stv1+pJV96/ha4 (H.s.-a4)) getestet. A, Wachstumstest auf Agarplatten mit YPDA pH 5,5 (pH 5,5), YPDA pH 5,5 mit 0,1 M CaCl₂ (CaCl₂), YPDA pH 7,5 (pH 7,5) sowie auf Selektionsmedium ohne Leucin (SD^{-Leu}) oder ohne Uracil (SD^{-Ura}). B, Assemblierung der V-ATPase: Western Blot mit je 10 µg Vakuolenmembranen und Antikörpern gegen die V-ATPase-Untereinheiten B und d. Zusätzlich wurde die Expression der Untereinheit Vph1 mit einem Vph1-C, Bafilomycin-hemmbare V-ATPase-Aktivität der Vakuolenmembranen. Antikörper überprüft. Dargestellt sind die Mittelwerte (± Standardabweichungen) der Aktivitäten, die relative Aktivität abgeleitet von der Wildtyp-Aktivität sowie die Anzahl (n) der getesteten unabhängigen Präparationen. (**A**)

3.5 Komplementationsstudien in *S. cerevisiae*: Austausch der c-Untereinheit (Vma3)

3.5.1 Expression der c-Untereinheiten der V-ATPasen von *Homo sapiens*, *Mus musculus* und *Manduca sexta*

Die Expression der neuen Hybrid-Untereinheiten Vph1/a3 und Vph1/a4 in dem Hefe-Deletionsstamm für Vph1 und Stv1 führte zwar zu einer assemblierten V-ATPase, jedoch war keine V-ATPase-Aktivität messbar (Abschnitt 3.4.3). Als Konsequenz daraus sollten nun speziesfremde c-Untereinheiten in Hefe exprimiert werden, da die radioaktiven Markierungsexperimente mit ¹⁴C-D-Apicularen darauf hindeuteten, dass Apicularen innerhalb des Vo-Komplexes neben der a-Untereinheit auch mit der c-Untereinheit interagieren könnte (Abschnitt 3.1.3). Idealerweise sollte nun die Expression von Homologen der c-Untereinheit Apicularen-sensitiver V-ATPasen, wie die der Säuger und Insekten, in einer Hefe-Deletionsmutante für Vma3 in einer Hybrid-V-ATPase resultieren, die aktiv und assembliert vorliegt und durch Apicularen gehemmt werden kann. Dadurch wäre eindeutig nachgewiesen, dass die c-Untereinheit die Bindestelle für Apicularen beherbergt. Die Möglichkeit speziesfremde Untereinheiten in einer vma3-Deletionsmutante zu exprimieren war bereits für die 16 kDa Proteolipide von Drosophila melanogaster und Nephrops norvegicus gezeigt worden (Finbow et al., 1994; Harrison et al., 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde die vma3-Deletionsmutante BMA64-1BAvma3 mit Plasmiden, die die kodierenden Sequenzen der c-Untereinheiten der V-ATPase von Homo sapiens, Mus musculus und Manduca sexta tragen, transformiert. Das Wachstum der resultierenden Hefestämme auf verschiedenen Medien ist in Abb. 3.14A dargestellt. Die Transformation der vma3-Deletionsmutante mit der hefeeigenen c-Untereinheit VMA3 als Kontrolle führte zu einem WT-gleichen Phänotyp: Beide Stämme, WT und VMA3, wuchsen sowohl auf Medium mit erhöhter Calcium-Konzentration (CaCl₂) als auch auf Medium mit einem pH von 7,5 (Abb. 3.14A). Die c-Untereinheiten von H. sapiens, M. musculus und M. sexta wurden ebenfalls erfolgreich in die vma3-Deletionsmutante integriert (Wachstum auf SD-Leu). Die drei resultierenden Stämme konnten zwar nicht auf Medium mit pH 7,5, aber auf Medium mit erhöhter Calciumkonzentration wachsen. Das deutet darauf hin, dass in diesen drei Stämmen eine zumindest teilweise funktionelle V-ATPase vorliegt.

Die Assemblierung der V-ATPase in den Vakuolenmembranen dieser Stämme wurde in Western Blots mit Hilfe der Antikörper gegen die V₁-Untereinheit B (Vma2) und gegen die V₀-Untereinheit d (Vma6) nachgewiesen. In den Kontrollen mit Vakuolenmembranen vom Wildtyp und dem mit der hefeeigenen *VMA3*-Untereinheit komplementierten Deletionsstamm konnten sowohl die B- als auch die d-Untereinheit detektiert werden (Abb. 3.14B). In den Hybridstämmen mit der humanen c-Untereinheit und der c-Untereinheit von *M. sexta* wurden ebenfalls beide Untereinheiten erfolgreich nachgewiesen. Ebenso wurde die Expression der humanen c-Untereinheit über den Cterminal angehängten HA-Tag demonstriert. Im Fall des Hybridstammes mit der murinen c-Untereinheit sind nur sehr schwache Banden bei den Untereinheiten B (Vma2) und d (Vma6) zu erkennen. Zwar führte der Einbau dieser c-Untereinheit zu einem im Wachstumstest teilweise aktiven Hybridstamm (Abb. 3.14A), jedoch war die Menge an assemblierter V-ATPase sehr gering oder die Hybrid-V-ATPase war sehr instabil und zerfiel offenbar bei der Reinigung der Vakuolenmembranen sehr leicht.



Abb. 3.14: Wachstum sowie V-ATPase-Assemblierung und -Aktivität der Hybridstämme mit den c-Untereinheiten von *H. sapiens*, *M. musculus* und *M. sexta*

Neben den Hybridstämmen BMA64-1BΔvma3+pGADT7/Hsc (H.s.-c), BMA64-1BΔvma3+pGADT7/Mmc BMA64-1BΔ*vma3*+pGADT7/Msc (M.s.-c)und BMA64-1BAvma3+pGADT7/Hsc+ (M.m.-c),pRS316/VMA21 (H.s.-c+VMA21) wurden als Kontrollen der Wildtypstamm BMA64-1B (WT), die Deletionsmutante für VMA3, BMA64-1B $\Delta vma3$ ($\Delta vma3$), die mit VMA3 komplementierte Deletionsmutante BMA64-1B Δ vma3 + pRS415/VMA3 (VMA3) sowie im Wachstumstest zusätzlich die mit dem leeren Vektor pGADT7 transformierte Deletionsmutante BMA64-1BAvma3+pGADT7 (pGADT7) untersucht. A, Wachstumstest auf Agarplatten mit YPDA pH 5,5 (pH 5,5), YPDA pH 5,5 mit 0,1 M CaCl₂ (CaCl₂), YPDA pH 7,5 (pH 7,5) sowie auf Selektionsmedium ohne Leucin (SD^{-Leu}). **B**, Western Blot mit je 10 µg Vakuolenmembranen. Die V-ATPase-Assemblierung wurde mit Antikörpern gegen die Untereinheiten B und d geprüft, mit einem Antikörper gegen den HA-Tag wurde die Expression der H.s.-c-Untereinheit untersucht. C, Bafilomycin-hemmbare V-ATPase-Aktivität der Vakuolenmembranen. Dargestellt sind die Mittelwerte (± Standardabweichungen) der Aktivitäten, die relative Aktivität abgeleitet von der Wildtyp-Aktivität sowie die Anzahl (n) der getesteten unabhängigen Präparationen. * = Wert aus Bahr, 2008 (Diplomarbeit, Universität Osnabrück). (▲)

Zur Bestimmung der V-ATPase-Aktivität in den verschiedenen Hybrid-Stämmen wurden die Hefevakuolenmembranen gereinigt und ATPase-Aktivitätstests durchgeführt. In Abb. 3.14C sind die getesteten Stämme sowie ihre Bafilomycin-hemmbare Aktivität aufgelistet, und es wird deutlich, dass die ATPase-Aktivitäten der Hybridstämme teilweise erheblich hinter denen des Wildtyps BMA64-1B zurückblieben. Der Stamm mit der humanen V-ATPase-c-Untereinheit wies eine ATPase-Aktivität von 0,056 \pm 0,018 U/mg auf, was etwa 16% der Wildtypaktivität entspricht und damit fast an die 25%-Grenze heranreicht, die laut (Leng *et al.*, 1996) ausreicht, um Wildtypniveau zu erreichen. Der Stamm mit der c-Untereinheit von *M. sexta* besaß eine Aktivität von 0,046 \pm 0,025 U/mg, entsprechend 13% der Wildtypaktivität. Dagegen ging die ATPase-Aktivität des Stammes mit der murinen V-ATPase-c-Untereinheit Richtung null. Das liegt möglicherweise an dem schon erwähnten Zerfall der instabilen Hybrid-V-ATPase während der Reinigung der Vakuolenmembranen.

Einem Hinweis nach persönlicher Kommunikation mit Tom Stevens folgend wurde der Effekt der Co-Expression des V-ATPase-Assemblierungsfaktors Vma21, der durch die Interaktion mit den Proteolipiduntereinheiten die Assemblierung des V₀-Komplexes vermittelt, auf die Aktivität der Hybrid-V-ATPase mit der humanen c-Untereinheit überprüft. Es zeigte sich, dass die vollständig assemblierten Hybrid-V-ATPasen (*H.s.-c* + *VMA21*) eine ATPase-Aktivität von 0,177 \pm 0,07 U/mg haben. Demnach konnte die ATPase-Aktivität tatsächlich auf fast 50% der Wildtypaktivität und somit auf das 3-fache der Hybrid-V-ATPase mit der humanen c-Untereinheit ohne *VMA21*-Co-Expression gesteigert werden.

Insgesamt konnten die c-Untereinheiten von *H. sapiens* und *M. sexta* erfolgreich in die *vma3*-Deletionsmutante integriert werden, was in einer funktionellen und assemblierten V-ATPase mit messbarer V-ATPase-Aktivität resultierte, während der Einbau der c-Untereinheit aus *M. musculus* zu einer sehr instabilen V-ATPase führte. Im nächsten Schritt sollte nun die Apicularen-Sensitivität der neuen Hybrid-V-ATPasen überprüft werden.

3.5.2 Einfluss von Bafilomycin und Apicularen auf die Hybrid-V-ATPasen

Um nun die Frage zu beantworten, ob die beiden aktiven Hybrid-V-ATPasen mit der humanen c-Untereinheit oder der c-Untereinheit von *M. sexta* durch Apicularen gehemmt werden können, wurden im nächsten Schritt ATPase-Aktivitätstests mit Apicularen durchgeführt. Bei positivem Ergebnis könnte direkt auf die c-Untereinheit als Bindestelle geschlossen werden. Allerdings zeigte sich, dass keine der beiden aktiven Hybrid-Untereinheiten sensitiv gegenüber Apicularen ist (Abb. 3.15, für die c-Untereinheit von *M. sexta* nicht gezeigt). Der erfolgreiche Einbau der c-Untereinheiten von *H. sapiens* und *M. sexta* führte also nicht zur Bindung von Apicularen, sodass die c-Untereinheit nicht allein die Bindestelle von Apicularen bilden kann, sondern auch die Untereinheit a eine wichtige Rolle dabei spielt. Interessanterweise ergab sich in der Hemmkurve der Hybrid-V-ATPase mit der humanen c-Untereinheit eine Verschiebung des IC₅₀-Wertes für Bafilomycin in Richtung einer erhöhten Sensitivität gegenüber der V-ATPase des Wildtypstammes (Abb. 3.15). Während der IC₅₀-Wert für Bafilomycin bei der Wildtyp-V-ATPase 3 nM beträgt, ist der IC₅₀-Wert bei der Hybrid-V-ATPase mit 0,4 nM um den Faktor 7,5 geringer. Für die V-ATPasen verschiedener Säugerzellmembranen wurden ebenfalls sehr niedrige IC₅₀-Werte für Bafilomycin gemessen, z. B. liegt der IC₅₀-Wert für Bafilomycin bei der aus humanen Nieren gereinigten V-ATPase auch bei 0,4 nM (Boyd *et al.*, 2001). Dementsprechend konnte die erhöhte Bafilomycin-Sensitivität von Säuger-V-ATPasen durch den Einbau der humanen c-Untereinheit auf die Hefe-Hybrid-V-ATPase übertragen werden. Dies ist zudem ein weiterer Hinweis auf die Untereinheit c als Bafilomycin-Bindestelle.



Abb. 3.15: Hemmung der V-ATPase des Hybridstammes mit der humanen c-Untereinheit und des Wildtyps mit Bafilomycin A₁ und Apicularen

Hemmung der V-ATPase Aktivität in den gereinigten Vakuolenmembranen des Hybridstammes BMA64-1B $\Delta vma3+pGADT7/H.s.c$ (Hybrid) und des Wildtyps BMA64-1B (WT) mit Bafilomycin A₁ und Apicularen. Dargestellt sind die Mittelwerte (± Standardabweichungen) aus zwei unabhängigen Präparationen. Die spezifische Aktivität der Kontrollen betrug 0,064 ± 0,005 µmol*mg⁻¹*min⁻¹ (Hybrid) und 0,41 ± 0,1 µmol*mg⁻¹*min⁻¹ (WT). (\blacktriangle)

3.5.3 Expression der humanen c-Untereinheit und der Hybrid-Untereinheit Vph1/a4 in einer Deletionsmutante für Vma3 und Vph1

Die Expression der Hybrid-Untereinheit Vph1/a4 führte in der Doppeldeletionsmutante für Vph1 und Stv1 zu einer assemblierten, jedoch inaktiven V-ATPase (Abschnitt 3.4.3). Um ein möglicherweise gestörtes Zusammenspiel der Hybrid-Untereinheit mit den hefeeigenen c-Untereinheiten im Proteolipidring auszuschließen, sollte die Hybrid-Untereinheit Vph1/a4 zusammen mit der humanen c-Untereinheit, die erfolgreich in eine *vma3*-Deletionsmutante integriert werden konnte (Abschnitt 3.5.1), in einer Deletionsmutante für Vph1 und Vma3 exprimiert werden. Parallel dazu sollte die gleichzeitige Expression der humanen c- mit der humanen a4-Untereinheit in der $\Delta vph1\Delta vma3$ -Mutante, die ebenfalls in dieser Arbeit hergestellt wurde (Abschnitt 2.2.12), erfolgen. Mittels homologer Rekombination sollte ein Vektor erstellt werden, der die Untereinheit Vph1/a4 und die humane c-Untereinheit, die bisher beide einzeln auf den Plasmiden pRS415/VPH1/a4 und pGADT7/H.s.c vorlagen, vereint (Tab. 2.8). Der neu pGADT7/Hsc VPH1/a4 (Tab. 2.8) entstandene Vektor wurde in die Doppeldeletionsmutante für Vma3 und Vph1 gebracht und der resultierende Stamm H.s.c VPH1/a4 auf die Funktion und Assemblierung seiner Hybrid-V-ATPase geprüft. In Abb. 3.16A ist das Ergebnis des Wachstumstests zur Analyse des Phänotyps dargestellt. Genau wie die Doppeldeletionsmutante $\Delta vph1\Delta vma3$ weist der Stamm H.s.-c VPH1/a4 einen typischen, vollständigen Vma⁻-Phänotyp auf, da kein Wachstum auf Medium mit erhöhter CaCl₂-Konzentration oder mit einem pH von 7,5 festzustellen war. Auch die mit den humanen Untereinheiten a4 und c transformierte $\Delta v ph l \Delta v ma 3$ -Mutante, resultierend in dem Stamm H.s.-a4+H.s.-c, wies den typischen Vma⁻-Phänotyp auf. Ebenso konnte die alleinige Expression der humanen c-Untereinheit die Deletion von Vph1 und Vma3 nicht komplementieren (H.s.-c). Die mit den Plasmiden pRS415/VPH1 und pRS415/VMA3 transformierte Doppeldeletionsmutante (VPH1+VMA3) wächst zwar auf Medium mit erhöhter CaCl2-Konzentration, nicht aber auf Medium mit einem pH von 7,5. Die erfolgreiche Expression beider hefeeigener Untereinheiten hätte diesen Komplementationsstamm erwartungsgemäß zu wildtypähnlichem Wachstum befähigen sollen. Auch die Überprüfung der Assemblierung mittels eines Western Blots und Antikörpern gegen die V₁-Untereinheit B (Vma2) und die V₀-Untereinheit d (Vma6) (Abb. 3.16B) zeigte, dass dieser Stamm nicht auf Wildtypniveau assembliert war, da die Untereinheit d nur in einer sehr geringen Menge vorkam. Offensichtlich wurden beide Untereinheiten nur in schwachem Ausmaß exprimiert, sodass nur eine kleine Menge an assemblierter V-ATPase detektiert werden konnte. Der Grund dafür ist vermutlich, dass beide separat auf dem gleichen Ursprungsplasmid pRS415 kodiert sind und dieser Umstand in der Zelle möglicherweise problematisch ist, da dieses low copy-Plasmid centromer-basiert abgelesen wird, sodass hier theoretisch nur die Hälfte der natürlicherweise benötigten Menge von Vph1 und Vma3 vorhanden ist. Besser wäre die Expression beider Untereinheiten auf einem einzelnen Plasmid. Auch die V-ATPase-Aktivität blieb mit 18% deutlich hinter der des Wildtyps zurück (Abb. 3.16C). Dennoch müssen beide Untereinheiten, d.h. Vph1 und Vma3 vorhanden sein, da sich dieser Stamm bezüglich seines Wachstums sowie der V-ATPase-Assemblierung und -Aktivität doch deutlich von der Doppeldeletionsmutante für Vph1 und Vma3 unterschied. Für den Stamm mit der humanen c-Untereinheit und der Hybrid-Untereinheit Vph1/a4 (H.s.c VPH1/a4) und auch für den Stamm mit den beiden humanen Untereinheiten a4 und c konnte weder die Assemblierung der V-ATPase in den Vakuolenmembranen (Abb. 3.16B) noch eine aktive V-ATPase festgestellt werden (Abb. 3.16C). Keiner der beiden Ansätze resultierte demnach in einer funktionsfähigen Hybrid-V-ATPase.





Komplementation der Doppeldeletionsmutante für Vph1 und Vma3 mit den hefeeigenen Untereinheiten Vph1 und Vma3 sowie mit der Hybrid-Untereinheit Vph1/a4 und der humanen Untereinheit c oder mit den beiden humanen Untereinheiten a4 und c: BY4741 Δ vph1 Δ vma3+pRS415/VPH1+pRS415/VMA3 (VPH1+VMA3), BY4741 Δ vph1 Δ vma3+pGADT7/Hsc_VPH1/a4 (H.s.-c_VPH1/a4), BY4741 Δ vph1 Δ vma3+pJV96/ha4+pGADT7/Hsc (H.s.-a4+H.s.-c) und zusätzlich im Wachstumstest BY4741 Δ vph1 Δ vma3+pGADT7/Hsc (H.s.-c). Kontrollstämme: Wildtyp BY4741 (WT) und Doppeldeletionsmutante BY4741 Δ vph1 Δ vma3 (Δ vph1 Δ vma3). A, Wachstumstests auf Agarplatten mit YPDA pH 5,5 (pH 5,5), YPDA pH 5,5 mit 0,1 M CaCl₂ (CaCl₂), YPDA pH 7,5 (pH 7,5) sowie auf Selektionsmedium ohne Leucin (SD^{-Leu}) oder ohne Uracil (SD^{-Ura}). B, V-ATPase-Assemblierung: Western Blot mit jeweils 10 µg Vakuolenmembranen und Antikörpern gegen die Untereinheiten B und d geprüft. C, Bafilomycinhembare V-ATPase-Aktivität. Dargestellt sind die Mittelwerte (± Standardabweichungen) der Aktivitäten, die relative Aktivität abgeleitet von der Wildtyp-Aktivität sowie die Anzahl (n) der getesteten unabhängigen Präparationen.

3.6 Mutagenese der essentiellen Glutamate im Proteolipidring der

V-ATPase von S. cerevisiae

3.6.1 Austausch des essentiellen Glutamats in der c-Untereinheit (Vma3) der

V-ATPase von S. cerevisiae

In diesem Teil der Arbeit sollte überprüft werden, ob ein Austausch der essentiellen Glutamate in allen drei Isoformen der c-Untereinheit bei *S. cerevisiae* zu einem entkoppelten c-Ring in der V-ATPase führt, d.h. ATP-Hydrolyse unabhängig vom Protonentransport stattfindet. Für die F-ATPase war gezeigt worden, dass der Austausch des essentiellen Aspartat-61 gegen Glycin bzw. Asparagin zu einer solchen Entkopplung führt und auch ohne Protonentransport weiterhin eine dem Wildtyp entsprechende ATPase-Aktivität gemessen werden kann (Fillingame *et al.*, 1984; Hoppe *et al.*, 1982). Hintergrund dieser Analyse bei der V-ATPase ist die Frage, ob die ATP-Hydrolyse einer V-ATPase ohne aktive Protonentranslokation durch die Inhibitoren Bafilomycin, Concanamycin und Archazolid gehemmt und damit der Mechanismus der Inhibition

bestimmt werden kann, der möglicherweise über die Blockierung des Proteolipidrings funktioniert. Für eine Entkopplung der V-ATPase von S. cerevisiae wurde hier zunächst das essentielle Glutamat der c-Untereinheit (Vma3) gegen die Aminosäuren Alanin, Glutamin und Glycin ausgetauscht. Da die c-Untereinheit in mehrfacher Kopie und damit am häufigsten im Proteolipidring vorkommt, lag die Vermutung nahe, dass allein der Austausch des essentiellen Glutamats in dieser Untereinheit in einer V-ATPase mit vom Protonentransport entkoppelter ATP-Hydrolyse resultiert. Die gerichtete Mutagenese des essentiellen Glutamats der Untereinheit Vma3 (VMA3) gegen Alanin (E137A), Glycin (E137G) sowie Glutamin (E137Q) führte in allen drei Stämmen zum Verlust des Protonentransports, wie das Ergebnis des Wachstumstests auf verschiedenen Medien zeigte (Abb. 3.17A). Die drei mutagenisierten Stämme wuchsen weder auf Medium mit erhöhter CaCl₂-Konzentration noch auf Medium mit einem pH von 7,5. Der Immunoblot der gereinigten Hefevakuolenmembranen der verschiedenen Stämme demonstrierte durch die Detektion der V₁-Untereinheit A (Vma1) sowie der V₀-Untereinheit d (Vma6) allerdings, dass die V-ATPase in allen drei mutagenisierten Stämme assembliert vorlag (Abb. 3.17B). Letztendlich konnte aber in ATPase-Aktivitätstests keine Hydrolyse-Aktivität in den Hefevakuolenmembranen gemessen werden (Daten nicht gezeigt).



Abb. 3.17: Wachstum und V-ATPase-Assemblierung der Stämme nach Austausch des essentiellen Glutamats in Vma3

Stämmen mit ausgetauschtem essentiellen Glutamat: BMA64-1B $\Delta vma3$ +pRS415/VMA3_E137A (*E137A*), BMA64-1B $\Delta vma3$ +pRS415/VMA3_E137G (*E137G*) und BMA64-1B $\Delta vma3$ +pRS415/VMA3_E137Q (*E137Q*). Kontrollen: BMA64-1B (WT), die Deletionsmutante BMA64-1B $\Delta vma3$ ($\Delta vma3$) und der Komplementationsstamm BMA64-1B $\Delta vma3$ +pRS415/VMA3 (*VMA3*). **A**, Wachstumstest auf Agarplatten mit YPDA pH 5,5 (pH 5,5), YPDA pH 5,5 mit 0,1 M CaCl₂ (CaCl₂), YPDA pH 7,5 (pH 7,5) sowie auf Selektionsmedium ohne Leucin (SD^{-Leu}) aufgetropft. **B**, Western Blot mit 10 µg Vakuolenmembranen. Die V-ATPase-Assemblierung wurde mit Antikörpern gegen die Untereinheiten A und d geprüft.

Der Austausch des essentiellen Glutamats gegen die verschiedenen Aminosäuren störte zwar die Assemblierung der V-ATPase nicht, führte jedoch offenbar nicht zur Entkopplung von Protonentransport und ATP-Hydrolyse-Aktivität. Als Grund hierfür ist das Verbleiben der beiden essentiellen Glutamate in den Isoformen c' und c'' vorstellbar, die unterschiedliche Ladungen innerhalb des Proteolipidrings verursachen. Bei der F-ATPase hingegen wurden alle protonierbaren Reste des c-Rings gegen ungeladene Reste ausgetauscht. Um dies für die V-ATPase zu überprüfen, wurden im nächsten Schritt auch die essentiellen Glutamate von c' und c'' gegen das ungeladene Glutamin substituiert.

3.6.2 Austausch der essentiellen Glutamate in den drei Proteolipid-Untereinheiten Vma3, Vma11 und Vma16 von *S. cerevisiae*

Da der Austausch des essentiellen Glutamats allein in der c-Untereinheit (Abschnitt 3.6.1) nicht in einer vom Protonentransport entkoppelten ATPase-Aktivität resultierte, sollte nun überprüft werden, ob dies durch den Austausch der essentiellen Glutamate in allen drei Isoformen der c-Untereinheit, sprich c (Vma3), c' (Vma11) und c'' (Vma16) erreicht werden kann. Die essentiellen Glutamate in den drei c-Isoformen wurden gegen die ungeladene Aminosäure Glutamin ausgetauscht (Tab. 2.8) und der resultierende Vektor pRS415/3 11 16 -eGlu in die in dieser Arbeit hergestellte Dreifachdeletionsmutante BY4741 Δ vma3 Δ vma11 Δ vma16 (Abschnitt 2.2.12) gebracht. In einem Wachstumstest auf verschiedenen Medien wurde zunächst die Fähigkeit zum Protonentransport überprüft (Abb. 3.18A). Während der Wildtyp-Stamm und die mit den Proteolipid-Untereinheiten komplementierte Dreifachdeletionsmutante (c/c'/c'') sowohl auf Medium mit erhöhter Calciumkonzentration als auch auf alkalischem Medium wuchsen, verhielt sich die Mutante, deren drei essentielle Glutamate in den Proteolipiduntereinheiten gegen Glutamin (c E137Q/c' E145Q/c'' E108Q) ausgetauscht wurden, wie die Deletionsmutante ($\Delta c \Delta c' \Delta c''$). Wie erwartet konnte die V-ATPase in diesem Stamm keine Protonen mehr transportieren. In einem Western Blot wurde anschließend die Assemblierung der V-ATPase in den Hefevakuolenmembranen überprüft (Abb. 3.18B). Dabei konnte in dem Stamm ohne essentielle Glutamate in allen drei c-Isoformen genau wie im Wildtyp und dem Komplementationsstamm (c/c'/c'') eine vollständig assemblierte V-ATPase über die erfolgreiche Detektion der V₁-Untereinheit B (Vma2) sowie der Vo-Untereinheit d (Vma6) nachgewiesen werden. Die ATPase-Aktivitätstests zeigten jedoch, dass die V-ATPase in den Vakuolenmembranen des Stammes ohne essentielle Glutamate im Proteolipidring nicht aktiv ist (Abb. 3.18C). Letztlich konnte durch den Austausch der essentiellen Glutamate keine V-ATPase mit einer von Protonentransport entkoppelten ATP-Hydrolyse erzeugt werden.

Aufgrund der vollständigen Assemblierung der V-ATPase ohne essentielle Glutamate in den Proteolipiduntereinheiten ergab sich trotz ihrer Inaktivität bereits eine Anwendungsmöglichkeit. In EPR (Elektronenparamagnetische Resonanz) Messungen (durchgeführt von Johann Klare aus der Arbeitsgruppe von Heinz-Jürgen Steinhoff (Universität Osnabrück)) mit einem Spin-gelabelten Archazolid-Derivat sollten Hefevakuolenmembranen dieses Stammes im Vergleich mit den Vakuolenmembranen des Hefe-Wildtypstammes eingesetzt werden, um einen möglichen Einfluss der essentiellen Glutamate des Proteolipidrings auf die Bindung des Archazolids zu untersuchen (Bockelmann, 2011). Erste vorläufige Daten deuteten darauf hin, dass der Verlust der Carboxylgruppe möglicherweise einen Einfluss auf die Bindung des Archazolids haben könnte.



Abb. 3.18: Gleichzeitiger Austausch des essentiellen Glutamats in allen drei Proteolipiduntereinheiten

Stamm ohne essentielle Glutamate im Proteolipidring: BY4741 Δ *vma*3 Δ *vma*11 Δ *vma*16+pRS415/3_11_16_eGlu (c_E137Q/c'_E145Q/c''_E108Q), Kontrollstämme: Wildtyp BY4741 (WT), Deletionsmutante BY4741 Δ *vma*3 Δ *vma*11 Δ *vma*16 (Δ c Δ c' Δ c'') und Komplementationsstamm BY4741 Δ *vma*3 Δ *vma*11 Δ *vma*16 +pRS415/*VMA*3_*VMA*11_*VMA*16 (c/c'/c''). Im Wachstumstest wurde auch die mit der humanen oder der murinen c-Untereinheit transformierte Dreifachdeletionsmutante analysiert: BY4741 Δ *vma*3 Δ *vma*11 Δ *vma*16 + pGADT7/*Hsc (H.s.-c)* und BY4741 Δ *vma*3 Δ *vma*11 Δ *vma*16 + *pGADT7/Msc (M.s.-c)*. **A**, Analyse des Vma-Phänotyps auf Agarplatten mit YPDA pH 5,5 (pH 5,5), YPDA pH 5,5 mit 0,1 M CaCl₂ (CaCl₂), YPDA pH 7,5 (pH 7,5) sowie auf Selektionsmedium ohne Leucin (SD^{-Leu}). **B**, Western Blot mit jeweils 10 µg Vakuolenmembranen und Antikörpern gegen die Untereinheiten B und d. C, Bafilomycin-hemmbare V-ATPase-Aktivität. Dargestellt sind die Mittelwerte (± Standardabweichungen) der Aktivitäten, die relative Aktivität abgeleitet von der Wildtyp-Aktivität sowie die Anzahl (n) der getesteten unabhängigen Präparationen.

4 Diskussion

4.1 Neue Erkenntnisse zum Bindeort und zum Wirkmechanismus der Plecomakrolide

4.1.1 Die Plecomakrolide wirken zwischen den Untereinheiten a und c des V₀-Komplexes

Vor Beginn dieser Arbeit gab es bereits einige Informationen zur Bindestelle der Plecomakrolide. Radioaktive Markierungsexperimente mit einem ¹²⁵I-markierten Concanamycin-Derivat und der gereinigten M. sexta V-ATPase hatten die Vo-Untereinheit c als Plecomakrolid-Bindestelle identifiziert (Huss et al., 2002). Auch Mutationsanalysen mit der c-Untereinheit der V-ATPase von N. crassa und S. cerevisiae grenzten die Plecomakrolid-Bindestelle, in diesem Fall für Bafilomycin und Concanamycin, innerhalb der c-Untereinheit weiter ein (Bowman und Bowman, 2002; Bowman et al., 2006; Bowman et al., 2004). Außerdem wurde zum einen mit der Rekonstitution einzelner bzw. mehrerer, verschieden kombinierter V₀-Untereinheiten in Liposomen und zum anderen mit Mutationsstudien mit der Vph1-Untereinheit von S. cerevisiae eine Beteiligung der V₀-Untereinheit a an der Bindung von Bafilomycin postuliert (Wang et al., 2005; Zhang et al., 1994). Die Entwicklung des neuen, radioaktiv Photoaffinitätslabels [1-¹⁴C]4-(3-Trifluormethyldiazirin-3-yl)Benzoesäure markierten (Bender et al., 2007) und die Kopplung dieses Labels an Bafilomycin (an Position C21) und an das Concanamycin-Derivat Concanolid (an Position C23) ermöglichte nun weitergehende Analysen der Plecomakrolid-Interaktionen mit dem Vo-Komplex. In der vorliegenden Arbeit wurden mit den neuen, radioaktiven Diazirinyl-Derivaten sowie dem V₁V₀-Holoenzym und dem V₀-Komplex sowohl die V₀-Untereinheit a als auch die V₀-Untereinheit c markiert (Abb. 3.3). Mit dem in den früheren Untersuchungen verwendeten ¹²⁵I-Concanolid wurde ausschließlich die c-Untereinheit der V-ATPase von M. sexta markiert (Huss et al., 2002). Die photoreaktive Diazirinylgruppe dieses Derivats befand sich an Position C9 der Struktur, d. h. am makrozyklischen Ring des Inhibitors (Abb. 4.1). In Mutationsstudien mit den V-ATPase-c-Untereinheiten von N. crassa und S. cerevisiae war die Plecomakrolid-Bindestelle zwischen Helix 1 und 2 der einen c-Untereinheit und Helix 4 der benachbarten c-Untereinheit lokalisiert worden (Bowman et al., 2006; Bowman et al., 2004). Dabei liegt der Makrolactonring des Concanolids bei der Inhibitorbindung wahrscheinlich tief verborgen zwischen den zwei benachbarten c-Untereinheiten. Die Diazirinylgruppe des neuen Diazirinyl-Derivats von Concanolid dagegen befindet sich an Position C23 der Inhibitorstruktur und damit am Hemiketalring (Abb. 4.1). Bezogen auf die Reichweite von 6,4 Å und die Flexibilität der Diazirinylgruppe könnte sie, positioniert am C23 des ¹⁴C-D-Concanolids, in den Zwischenraum der Untereinheiten a und c hineinragen und dadurch je nach Position der Diazirinylgruppe entweder die a- oder die c-Untereinheit markieren.



Abb. 4.1: Strukturen von ¹⁴C-D-Concanolid mit ¹²⁵I-Concanolid ¹⁴C-D-Concanolid (links) mit der Diazirinylgruppe an Position C23, ¹²⁵I-Concanolid (rechts) mit der Diazirinylgruppe an C9.

Eine Veränderung der Inhibitorbindung allein durch das Anhängen der Diazirinylgruppe an die Inhibitoren ist nicht zu erwarten. Zum einen wurde bereits bei der Synthese aller hier verwendeten Diazirinyl-Inhibitoren dafür Sorge getragen, dass die Modifizierungen an Positionen durchgeführt wurden, die keinen großen Effekt auf die Inhibitoreffizienz erwarten ließen, da sie nicht zu dem hauptsächlichen Pharmakophor des jeweiligen Inhibitors gehören (Dröse *et al.*, 2001; Gagliardi *et al.*, 1998a; Huss und Wieczorek, 2009; Ingenhorst *et al.*, 2001). Zum anderen haben sich die IC₅₀-Werte der Diazirinyl-Inhibitoren nur geringfügig gegenüber den IC₅₀-Werten der Ursprungsinhibitoren reduziert (Tab. 3.1).

Obwohl mit den neuen, radioaktiven Diazirinyl-Derivaten der Plecomakrolide die Untereinheiten a und c gleichermaßen markiert wurden, deutet vieles darauf hin, dass der Hauptteil der Plecomakrolid-Bindestelle zwischen zwei c-Untereinheiten lokalisiert ist und dass die a-Untereinheit eher einen kleineren Beitrag an der Inhibitorbindung leistet. Es wurde festgestellt, dass Concanamycin mit gleicher Affinität sowohl an den V₀-Komplex von S. cerevisiae als auch an rekonstituierte Proteolipide von N. norvergicus bindet (Whyteside et al., 2005). Auch Bowman et al. (2006) vermuten die eigentliche Plecomakrolid-Bindestelle zwischen zwei c-Untereinheiten und vertreten die Idee, dass die Inhibitorbindung an den c-Untereinheiten dann stattfindet, wenn sie in engem Kontakt zu Untereinheit a stehen. Dies würde auch die Affinitätsänderungen gegenüber Bafilomycin aufgrund verschiedener Mutationen in der a-Untereinheit der Hefe-V-ATPase erklären (Wang et al., 2005). Hinzu kommt, dass die Erhöhung der Bafilomycin-Resistenz, die für die Mutationen in der a-Untereinheit beobachtet wurden, mit einem Faktor von 2-2,5 (Wang et al., 2005) sehr viel geringer ist als die bis zu 90-fache Resistenzerhöhung, die für einzelne Mutationen in der c-Untereinheit von N. crassa beobachtet wurde (Bowman und Bowman, 2002; Bowman et al., 2006). Auch Mutationen in der c-Untereinheit von S. cerevisiae, die in Anlehnung an die in N. crassa getesteten Mutationen überprüft wurden, zeigten bis zu 70-fache Resistenzerhöhungen gegenüber Bafilomycin (Bockelmann et al., 2010). Die in der vorliegenden Arbeit in S. cerevisiae generierte Hybrid-V-ATPase, deren Deletion des VMA3-Gens erfolgreich durch die Expression der humanen c-Untereinheit komplementiert wurde, wies im

Vergleich zur Wildtyp-V-ATPase eine um den Faktor 7,5 erhöhte Bafilomycin-Sensitivität auf (Abb. 3.15). So zeigt sich auch hier nicht nur der deutliche Einfluss der c-Untereinheit auf die Plecomakrolid-Bindung, sondern auch die Sequenz- und Speziesabhängigkeit der Inhibitorwirkung.

Wie bereits erwähnt weisen die c-Untereinheiten von *N. crassa* bzw. *H. sapiens* zu der c-Untereinheit von *S. cerevisiae* eine Identität von 80% bzw. 67% auf. In dem in Abb. 4.2 dargestellten Sequenzvergleich der c-Untereinheiten von *S. cerevisiae*, *N. crassa* und *H. sapiens* wurden die Aminosäurereste, deren Austausch in verschiedenen Untersuchungen einen Effekt auf die Bafilomycin-Bindung hatten (Bockelmann *et al.*, 2010; Bowman und Bowman, 2002; Bowman *et al.*, 2006; Bowman *et al.*, 2004), markiert: mit roter Farbe für eine erhöhte Sensitivität, mit gelber Farbe für eine erhöhte Resistenz. Die bereits bekannten, die Sensitivität der V-ATPase erhöhenden Austausche sind in allen drei c-Untereinheiten konserviert. Dementsprechend kann die erhöhte Sensitivität der Hybrid-V-ATPase der Hefe mit der humanen c-Untereinheit nicht auf diese Aminosäurereste zurückgeführt werden.



Abb. 4.2: Aminosäuresequenzvergleich der c-Untereinheiten von S. cerevisiae, N. crassa und H. sapiens

Der Sequenzvergleich wurde mit der Internetanwendung ClustalW2 (EMBL-EBI), dem Programm GeneDoc Version 2.3 und den Aminosäuresequenzen der c-Untereinheiten von *S. cerevisiae* (Swiss-Prot.-Nr.: P25515.1), *N. crassa* (Swiss-Prot.-Nr.: P31413.1) und *H. sapiens* (Swiss-Prot.-Nr.: P27449.1) durchgeführt. Konservierte Aminosäurereste wurden mit schwarzer Farbe hinterlegt, ähnliche Reste mit hellgrauer Farbe. Das essentielle Glutamat der jeweiligen c-Untereinheiten wurde mit roter Farbe geschrieben. Die rot hinterlegten Reste stellen die Aminosäuren dar, deren Mutation zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Bafilomycin führten (Bockelmann *et al.*, 2010; Bowman *et al.*, 2006). Die Aminosäuren, deren Mutation zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber Bafilomycin führten, wurden mit gelber Farbe markiert (Bockelmann *et al.*, 2010; Bowman und Bowman, 2002; Bowman *et al.*, 2006; Bowman *et al.*, 2004). Die Identität der Sequenzen beträgt im Vergleich zu der c-Untereinheit von *S. cerevisiae* 80% für die c-Untereinheit von *N. crassa* und 67% für die c-Untereinheit von *H. sapiens*.

Die Mutation von Cystein an Position 25 der c-Untereinheit-Sequenz von *N. crassa* zu einem Alanin führte in der Arbeit von Bowman *et al.* (2006) zu einer 2,4fachen Erhöhung der Bafilomycin-Resistenz. Möglicherweise ist die Aminosäure an dieser Position, die in der Sequenz der c-Untereinheit von *H. sapiens* einem Alanin entspricht, eine Art "Schlüssel"-Aminosäure, obwohl die Expression der humanen cUntereinheit zu dem gegenteiligen Effekt, nämlich einer Sensitivitätserhöhung, führt. Auch Leucin an Position 49 der *N. crassa*-Sequenz, das zu Phenylalanin ausgetauscht wurde und eine 2,2-fachen Resistenzerhöhung zur Folge hatte (Bowman *et al.*, 2006), könnte ein für die Effekte der humanen c-Untereinheit auf die Bafilomycin-Bindung entscheidender Rest sein. Möglicherweise hätte der Austausch des hydrophoben Leucins zu einem polaren Glutamin, das in der Sequenz der humanen c-Untereinheit an dieser Position vorliegt, den Effekt einer erhöhten Sensitivität. Deshalb wäre es interessant, die Effekte einer Kombination der Austausche von Cystein-25 und Leucin-49 zu untersuchen. Zudem könnte auch die parallele Substitution benachbarter Reste von Leu-49, die nicht konserviert sind, weitere Informationen über die Bafilomycin-Bindung liefern. Nichtsdestotrotz liegt mit der gesteigerten Bafilomycin-Empfindlichkeit der humanen V-ATPase aus verschiedenen Zelllinien (Boyd *et al.*, 2001) und der hier vorgestellten Hybrid-V-ATPase ein weiterer Hinweis darauf vor, dass die Plecomakrolid-Bindestelle hauptsächlich von der c-Untereinheit gebildet wird, da diese Empfindlichkeit offensichtlich übertragbar ist.



Abb. 4.3: Interaktion der Untereinheiten im membranständigen Komplex der A-ATPase von *T. thermophilus*.

A, Modell der Untereinheit I (grün) und des L_{12} -Rings (magenta) der A-ATPase von *T. thermophilus* (Abb. modifiziert nach Lau & Rubinstein (2011). **B**, Querschnitt durch das Modell. Die roten Pfeilspitzen markieren die äußeren Helices des L_{12} -Rings, die Transmembranhelices der I-Untereinheit sind mit grüner und die Mitte des L_{12} -Rings mit gelber Farbe gekennzeichnet. Etwa in der Mitte der Membran kontaktiert die I-Untereinheit eine L-Untereinheit und bildet wahrscheinlich das in der Membran liegende Ende des zytoplasmatischen Halbkanals (mit rotem Kreis im rechten Bild gekennzeichnet). **C**, etwa 6 Å weiter in Richtung Periplasma kontaktiert die I-Untereinheit eine andere L-Untereinheit, wodurch vermutlich das in der Membran liegende Ende des periplasmatischen Halbkanals (mit blauem Kreis im rechten Bild gekennzeichnet).

Die Tatsache, dass in dieser Arbeit die beiden Untereinheiten a und c mit den neuen Diazirinyl-Derivaten der Plecomakrolide markiert wurden, ist möglicherweise durch die enge Interaktion dieser beiden Untereinheiten bedingt. Diese konnte anhand von Cryo-elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit einer Auflösung von 9,7 Å der verwandten A-ATPase von T. thermophilus auch auf struktureller Ebene näher untersucht werden (Lau und Rubinstein, 2012). Der membranständige Motor der ATP-Synthase besteht aus einem Ring mit zwölf L-Untereinheiten, die jeweils zwei TMHs besitzen, und dem C-terminalen Teil der I-Untereinheit mit acht TMHs, wobei diese Untereinheiten äquivalent zu den Untereinheiten c bzw. a der meisten anderen rotierenden ATPasen sind (Lau und Rubinstein, 2012). Der Querschnitt zeigt den engen Kontakt zwischen den Helices der I-Untereinheit und den L-Untereinheiten während des Protonentransports (Abb. 4.3). Dabei werden vor allem in der Mitte der Membran enge Kontaktstellen ausgebildet, die zudem auf die Halbkanäle innerhalb der I-Untereinheit hindeuten, durch welche die Protonen die L-Untereinheiten erreichen und verlassen (Lau und Rubinstein, 2012). Bezogen auf die Labelexperimente mit der V-ATPase, deren Untereinheiten a und c wahrscheinlich ebenfalls enge Kontakte an ihrer Schnittstelle aufweisen, ist eine Markierung der a-Untereinheit sehr wahrscheinlich, wenn der Inhibitor zwischen zwei c-Untereinheiten bindet und seine Diazirinylgruppe in den Zwischenraum ragt.

Um die Bindestellen von Bafilomycin und Concanamycin weiter zu charakterisieren, wurden in der vorliegenden Arbeit Verdrängungsversuche mit den Diazirinyl-Derivaten und verschiedenen anderen Inhibitoren durchgeführt (Abschnitte 3.2.1 und 3.2.2). Es zeigte sich erwartungsgemäß, dass sowohl das ¹⁴C-D-Bafilomycinals auch das ¹⁴C-D-Concanolid-Label an den Untereinheiten a und c von den jeweiligen nicht-radioaktiven Diazirinyl-Derivaten und den natürlichen Ursprungsinhibitoren verdrängt wird. Diesen Resultaten zufolge besetzen Bafilomycin und Concanamycin die gleiche Bindestelle. Obwohl beide Strukturen einander sehr ähnlich sind, ist Concanamycin mit einem 18-gliedrigen Makrolactonring etwas größer als Bafilomycin mit einem 16-gliedrigen Makrolactonring (Abb. 1.6), was möglicherweise zu mehr Kontaktstellen und einer festeren Bindung führt. Es wird angenommen, dass der 18gliedrige Ring flexibler ist und sich deshalb besser und auch fester in die Inhibitor-Bindestelle einpasst (Bindseil und Zeeck, 1994). Tatsächlich konnte für Concanamycin A ein 2-5-fach erhöhtes Inhibitorpotential im Vergleich zu Bafilomycin A₁ ermittelt werden (Dröse et al., 2001). Zudem wurde festgestellt, dass die meisten untersuchten Mutationen in der c-Untereinheit der V-ATPase von N. crassa weniger die Concanamycin- als die Bafilomycin-Bindung beeinflussen, also einen weitaus höheren Anstieg der Resistenz gegenüber Bafilomycin zur Folge hatten, auch wenn die Mutationen mit den größten Affinitätsänderung für Concanamycin innerhalb der für Bafilomycin vermuteten Bindetasche lagen (Bowman et al., 2006). Auch die Analyse von Mutationen der Vph1-Untereinheit von S. cerevisiae stützen diese Annahme: Während drei der 25 Mutationen in Vph1 einen signifikanten Effekt auf die Bafilomycin-Wirkung hatten, gab es nur eine Mutation mit einem leichten Einfluss auf die Concanamycin-Wirkung (Wang et al.,

2005). Ein weiterer Hinweis ist die bei Concanolid weniger störende Kopplung der Perfluorobutyl- und Perfluorooctylketten an die Plecomakrolide. Während sich die IC₅₀-Werte für C₄F₉-D-Concanolid und C₈F₁₇-D-Concanolid im Vergleich mit D-Concanolid nur etwa 5-fach reduzierten, war das Inhibitor-Potential von C₄F₉-D-Bafilomycin und C₈F₁₇-D-Bafilomycin um mindestens das 100-fache verringert (Abb. 3.10). Letztendlich konnte gezeigt werden, dass beide Plecomakrolide unabhängig von ihrer Größe prinzipiell die gleiche Bindestelle besetzen, wobei das etwas größere Concanolid eine stabilere und weniger beeinflussbare Interaktion eingeht.

Eine deutliche Verdrängung der ¹⁴C-D-Plecomakrolide wurde durch die Vorinkubation mit dem Makrolid Archazolid, dessen Bindestelle bereits in früheren Arbeiten näher bestimmt wurde, erreicht (Abb. 3.6 und 3.7). In Verdrängungsversuchen mit ¹²⁵I-Concanolid bzw. mit einem radioaktiven Diazirinyl-Derivat von Archazolid war bereits eine Überlappung der Bindestellen an der c-Untereinheit für Archazolid und die Plecomakrolide festgestellt worden (Bockelmann et al., 2010; Huss et al., 2005), die jedoch weniger stark ausgeprägt ausfiel, als zunächst angenommen (Bockelmann et al., 2010). In Mutagenesestudien wurden einige Mutationen, die bei N. crassa einen Einfluss auf die Plecomakrolid-Bindung hatten, auf die c-Untereinheit der V-ATPase von S. cerevisiae übertragen und die Effekte auf Archazolid untersucht (Bockelmann et al., 2010). Dabei hatten nur die Aminosäuren Tyrosin-142 und Leucin-144 einen Einfluss auf die Archazolid-Bindung, während die anderen für Bafilomycin untersuchten Mutationen die Affinität für Archazolid kaum änderten (Bockelmann et al., 2010). Auch Markierungsexperimente mit dem fluoreszierenden DCCD-Derivat NCD-4, das an das essentielle Glutamat der c-Untereinheit in TMH4 bindet, ließen Unterschiede für die Bindestellen für Archazolid und die Plecomakrolide erkennen (Bockelmann et al., 2010). Dabei war das NCD-4-Label an der c-Untereinheit von Archazolid, jedoch nicht von Bafilomycin und Concanamycin verdrängt worden. Demzufolge wurde geschlossen, dass Archazolid bei seiner Bindung das essentielle Glutamat in TMH4 bedeckt, während die Plecomakrolide mit dieser Region nicht interferieren. Die Bindestelle für Archazolid wurde letztlich in der TMH4, die Aminosäuren Glutamat-137, Tyrosin-142 und Leucin-144 bedeckend, in der äquatorialen Ebene des c-Rings lokalisiert (Bockelmann et al., und 2010). Weitergehende Untersuchungen der Archazolid-Bindestelle des Bindemechanismus mit Hilfe von ATPase-Aktivitätstests und Computeranalysen bestätigten die Annahme, dass Archazolid an der Oberfläche des c-Rings und im Gegensatz zu den Plecomakroliden nicht zwischen zwei Untereinheiten bindet (Bowman et al., 2006; Dreisigacker et al., 2012).

Umso überraschender war daher das Ergebnis, dass Archazolid die ¹⁴C-D-Plecomakrolid-Label nicht nur an der c- sondern auch an der a-Untereinheit verdrängt. Letztlich dürfte dies auch auf die Überlappung der Bindestellen zurückzuführen sein, die ebenfalls in den Analysen von Dreisigacker *et al.* (2012) nachgewiesen worden war. Archazolid ragt auf der Ringoberfläche bindend in die Bindestelle der Plecomakrolide hinein, sodass die ¹⁴C-D-Plecomakrolid-Label an den Untereinheiten a und c verdrängt werden.

Die Gesamtheit der bislang vorliegenden Informationen ermöglicht ein erstes Modell für die räumliche Beziehung zwischen der Plecomakrolid- und der Archazolid-Bindestelle (Abb. 4.4). Die Plecomakrolid-Bindestelle ist zwischen TMH1 und TMH2 der einen und TMH4 der benachbarten c-Untereinheit lokalisiert, die Untereinheit a ist an der Bindung beteiligt. Die Archazolid-Bindestelle überlappt mit der Bindestelle von Bafilomycin und Concanamycin, konzentriert sich jedoch auf die vierte TMH einer einzelnen c-Untereinheit in der Region des essentiellen Glutamatrests. Auch die Positionen der Diazirinylgruppen der ¹⁴C-D-Plecomakrolide am C21 bzw. C23 sowie die des ¹²⁵I-Concanolids am C9 wurden eingezeichnet, um noch einmal zu verdeutlichen, wie es zur Markierung der Untereinheiten a und c kommt bzw. im Fall des ¹²⁵I-Concanolids nur Untereinheit en markiert wird.





Das Modell (links, Seitenansicht; rechts, Aufsicht) zeigt der Einfachheit halber die C-terminale Hälfte der a-Untereinheit als Zylinder und nur zwei c-Untereinheiten des Proteolipidrings. Die vier TMHs der c-Untereinheiten sind nummeriert (1-4). Die Inhibitor-Bindestellen wurden farblich markiert: Blau für die Plecomakrolide und gelb für Archazolid. Die Position des essentiellen Glutamats in TMH4 der c-Untereinheit wurde mit einem "E" gekennzeichnet. Mit einem Sternchen (*) bzw. einem Kringel (°) wurden die Positionen der Diazirinylgruppen bei den verschiedenen Derivaten (D-Plecomakrolide bzw. I-Concanolid) angedeutet.

4.1.2 Überlegungen zum Wirkmechanismus der Plecomakrolide

Aufgrund der Resultate, die eine Interkalation der Inhibitoren in die Helices der c-Untereinheiten nachwiesen, wird vermutet, dass die Plecomakrolide die V-ATPase hemmen, indem sie als "Steinchen im Getriebe" die Rotation des c-Rings verhindern (Bowman *et al.*, 2004). Eine andere Wirkweise bestünde in der Verhinderung helikaler Konformationsänderungen der a- und der c-Untereinheiten während der Protonentranslokation. Diese waren für die vergleichbaren Untereinheiten der F-ATPase beobachtet worden (Fillingame *et al.*, 2002; Rastogi und Girvin, 1999) und werden auch für die V-ATPase angenommen (Kawasaki-Nishi *et al.*, 2003; Toei *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2004).

Auf die Protonenbindung nehmen die Plecomakrolide offensichtlich keinen Einfluss, da die Protonenbindestelle in TMH4 der c-Untereinheit durch die Plecomakrolide nicht bedeckt wird (Bockelmann et al., 2010). Demnach greift der für die DCCD-Bindung angenommene Mechanismus, nach dem DCCD mit dem protonierten Glutamatrest interagiert (Mizutani et al., 2011), nicht für die Plecomakrolide, da das fluoreszierende DCCD-Derivat NCD-4 trotz Vorinkubation mit Bafilomycin noch an die c-Untereinheit bindet (Bockelmann et al., 2010). Eine Bindung an die Protonenbindestelle wurde hingegen für Archazolid postuliert, da dieser Inhibitor das essentielle Glutamat abschirmt und keine NCD-4-Markierung an der c-Untereinheit mehr auftritt (Bockelmann et al., 2010). Jedoch ist aufgrund der sperrigen Größe des Moleküls (Abb. 1.8) auch für Archazolid nicht auszuschließen, dass die V-ATPase durch die Verhinderung der c-Ring-Rotation gehemmt wird (Bockelmann et al., 2010).

Der Umstand, dass die a-Untereinheit an der Plecomakrolid-Bindung zwar beteiligt (Bowman *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2005), aber nicht unbedingt notwendig ist (Whyteside *et al.*, 2005), führte zu der Annahme, dass die a-Untereinheit nicht direkt zur Inhibitor-Bindetasche gehört (Bowman *et al.*, 2006). Es wird stattdessen vermutet, dass die Inhibitor-Bindung am c-Ring dann stattfindet, wenn die c-Untereinheiten in engem Kontakt zur a-Untereinheit stehen und diese die Affinität der Bindung beeinflussen kann (Bowman *et al.*, 2006). Dafür spricht auch, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten ¹⁴C-D-Plecomakrolide mit der reaktiven Diazirinylgruppe am Hemiketalring beide Untereinheiten gleichermaßen markierten, wohingegen in früheren Arbeiten mit ¹²⁵I-Concanolid, das die reaktive Diazirinylgruppe am Makrolactonring trägt (Abb. 4.1), ausschließlich die c-Untereinheit markiert wurde (Huss *et al.*, 2002). Diese Tatsachen lassen im Zusammenhang mit der sehr engen Interaktion der Untereinheiten a und c (Abb. 4.3) letztlich den Schluss zu, dass die Hypothese, die Inhibitoren würden als "Steinchen im Getriebe" die Rotation des c-Rings relativ zur a-Untereinheit verhindern (Bowman *et al.*, 2004), vermutlich richtig ist.

4.1.3 Überlegungen zur Anzahl der Plecomakrolid-Bindestellen an der V-ATPase

Es stellt sich nun die Frage, ob die Anzahl der Plecomakrolid-Bindestellen der Anzahl der c-Untereinheiten im Proteolipidring entspricht, oder ob es möglicherweise nur eine Plecomakrolid-Bindestelle im aktiven V_0 -Komplex gibt, entsprechend der Anzahl der engen Kontakte der Untereinheit a mit zwei c-Untereinheiten (Abb. 4.3). Für die V-ATPase von *M. sexta* werden zehn c-Untereinheiten im Proteolipidring vermutet (Muench *et al.*, 2009). Dementsprechend könnte theoretisch eine 10-fach intensivere Markierung der c-Untereinheit bei den radioaktiven Markierungsversuchen erwartet werden. Da dies jedoch nicht der Fall ist, kann eher von der Annahme ausgegangen werden, dass es nur eine Plecomakrolid-Bindestelle an der Interaktionsstelle der a-Untereinheit mit zwei c-Untereinheiten gibt. Auch die Tatsache, dass die für die c-Untereinheit berechnete Labeleffizienz durch ¹⁴C-D-Bafilomycin bzw. ¹⁴C-D-Concanolid (Tab. 3.3) mit 0,001% etwa 10-fach geringer ist als die für die a-Untereinheit mit 0,012%, spricht dafür. Die Labeleffizienz wäre für beide Untereinheiten gleich, wenn für die c-Untereinheit nicht durch die Anzahl der zehn Untereinheiten im Ring geteilt würde, sondern durch eins, entsprechend einer Bindestelle für die Plecomakrolide. Demzufolge ist die Vorstellung von nur einer Bindestelle zwischen zwei c-Untereinheiten an der Schnittstelle zur a-Untereinheit durchaus nicht abwegig.

Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass die Anzahl besetzter Inhibitor-Bindestellen von der Aktivität des Enzyms abhängt. Erst vor kurzem wurde eine hochauflösende (1,9 Å) Kristallstruktur für den an den c₁₀-Ring der mitochondrialen F-ATPase von S. cerevisiae gebundenen Inhibitor Oligomycin veröffentlicht (Symersky et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass Oligomycin an die TMH2 der F-ATPase-c-Untereinheit bindet, also an die im Ring außen liegende Helix. Obwohl theoretisch zehn Bindestellen im c₁₀-Ring vorhanden sind, wurden nur sieben Oligomycin-Moleküle an der Ringstruktur detektiert, was auf die Kristallisationsbedingungen zurückgeführt wird (Symersky et al., 2012). Aufgrund dessen, dass wahrscheinlich hydrophobe Wechselwirkungen des Oligomycins mit der c-Untereinheit einen Großteil der Bindeenergie ausmachen, wird vermutlich ein Teil der hydrophoben Oberfläche des c-Rings bei der Oligomycin-Bindung durch die hydrophile Seite des Inhibitors abgeschirmt, während seine hydrophobe Seite an den Ring bindet. Für den Inhibitionsmechanismus wird daher vorgeschlagen, dass Oligomycin nur an die c-Untereinheiten bindet, die in Kontakt zu den Protonenhalbkanälen der a-Untereinheit stehen. Es wird angenommen, dass die Oligomycin-Bindestellen bei der intakten F-ATPase auf die Bindestellen, die in Kontakt zur a-Untereinheit stehen, limitiert sind, obwohl die Kristallstruktur sieben Oligomycinmoleküle am c₁₀-Ring zeigte (Symersky et al., 2012). Da auch für die Oligomycin-Bindung bereits früher eine Beteiligung der a-Untereinheit über Affinitätsänderungen in Mutationsstudien festgestellt wurde (John und Nagley, 1986), wird vermutet, dass die Bindestelle für Oligomycin eine ursprüngliche Inhibitor-Bindestelle darstellt, die sowohl in F-ATPasen auch in den strukturell und funktionell verwandten V-ATPasen vorliegt (Bowman und Bowman, 2002; Symersky et al., 2012). Dementsprechend könnte auch für Bafilomycin und Concanamycin davon ausgegangen werden, dass sie zwischen zwei c-Untereinheiten binden, wenn diese mit der a-Untereinheit interagieren und so die Ringrotation effektiv blockieren. Es kann dabei allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass zunächst alle Inhibitor-Bindestellen am Proteolipidring besetzt werden und dass erst anschließend gebundene Inhibitormoleküle in Folge der Rotation zwischen dem Proteolipidring und der a-Untereinheit eingeklemmt und fixiert werden. Auch die Beobachtung, dass Bafilomycin den säureinduzierten, passiven Protonenfluss durch den aus Clathrin-Vesikeln isolierten V₀-Komplex mit einer

molaren Rate von 1:1 komplett inhibiert (Crider *et al.*, 1994), stützt diese Annahme. Letztlich sei darauf hingewiesen, dass für die radioaktiven Markierungsversuche in der vorliegenden Arbeit ebenfalls die aktive V-ATPase von *M. sexta* in Anwesenheit von Mg-ATP verwendet wurde. Zusammengefasst kann für die Plecomakrolide wahrscheinlich nur eine einzige effektive Bindestelle in der aktiven V-ATPase angenommen werden, was letztlich auch mit dem vermuteten Wirkmechanismus der Blockade der Ringrotation durch die Bindung der c-Untereinheiten relativ zur a-Untereinheit übereinstimmt.

4.2 Erste nähere Erkenntnisse zur Apicularen-Bindung im Vo-Komplex

4.2.1 Bindet Apicularen im Vo-Komplex an die V-ATPase-Untereinheit a?

Im Gegensatz zu den Plecomakroliden gab es für Benzolacton Enamide wie Apicularen bisher kaum nähere Informationen zur Bindestelle in der V-ATPase. Für das Benzolacton Enamid Salicylihalamid A konnte lediglich der V₀-Komplex als Wirkort identifiziert werden (Xie et al., 2004). Verdrängungsversuche für ¹²⁵I-Concanolid A mit Salicylihalamid oder Apicularen A ließen darauf schließen, dass die Benzolacton Enamide eine andere Bindestelle besetzen als die Plecomakrolide (Huss et al., 2002; Huss et al., 2005). Ebenfalls war in Markierungsversuchen mit Archazolid und NCD-4 keine Interferenz mit Apicularen A festgestellt worden (Bockelmann et al., 2010). So wurde bisher davon ausgegangen, dass sich die Bindestelle für Apicularen deutlich von denen der Plecomakrolide und Archazolid unterscheidet. In dieser Arbeit lieferten nun radioaktive Markierungsversuche erstmals nähere Informationen zur Apicularen-Bindestelle. Die Versuche mit ¹⁴C-D-Apicularen und dem V₁V₀-Holoenzym sowie den isolierten V₁- und V₀-Komplexen identifizierten a und c als die an der Bindung beteiligten Untereinheiten, womit Apicularen sich auf den ersten Blick wie die Plecomakrolide verhält (Abb. 3.3). Neben den Untereinheiten a und c trat jedoch eine weitere ¹⁴C-D-Apicularen-markierte Bande mit einer ungefähren molekularen Masse von 20 kDa hervor, die mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern als die Vo-Untereinheit e identifiziert wurde (Abb. 3.5). Da diese möglicherweise mit der a-Untereinheit assoziiert ist (Compton et al., 2006), wurde sie vermutlich aufgrund ihrer engen Nachbarschaft zu Untereinheit a markiert. Unglücklicherweise gibt es zur genauen Lokalisation und Funktion der e-Untereinheit kaum Informationen, außer dass sie ein essentieller Bestandteil des Vo-Komplexes ist (Compton et al., 2006; Huss et al., 2002; Merzendorfer et al., 1999; Sambade und Kane, 2004). Obwohl die e-Untereinheit in verschiedenen Modellen immer wieder neben der a-Untereinheit positioniert wird, gibt es bisher keine experimentellen Daten, die eine direkte Interaktion der e-Untereinheit mit anderen Vo-Untereinheiten zeigen (Compton et al., 2006; Toei et al., 2010). Letztlich kann eine Beteiligung der e-Untereinheit an der Bindung von D-Apicularen nicht vollständig ausgeschlossen werden. In jedem Fall deutet das Ergebnis, dass D-Apicularen als erster Inhibitor auch die e-Untereinheit markiert, erneut darauf hin, dass die Bindestelle der Benzolacton Enamide sich tatsächlich von der der Plecomakrolide und des Archazolids unterscheidet.

Um die Bindestelle für Apicularen innerhalb des V₀-Komplexes weiter einzugrenzen, wurde sowohl mit Apicularen, D-Apicularen und Saliphenylhalamid als auch mit den Plecomakroliden und Archazolid versucht, das ¹⁴C-D-Apicularen-Label zu verdrängen (Abb. 3.8). Dabei konnten aufgrund der fehlenden Verdrängung des Labels nach Vorinkubation mit Archazolid vorangegangene Ergebnisse, die bereits eine Überlappung der beiden Bindestellen ausschlossen (Bockelmann *et al.*, 2010), eindeutig bestätigt werden. Demnach bindet Apicularen offensichtlich jenseits des essentiellen Glutamats in TMH4 der c-Untereinheit, das sich innerhalb der Archazolid-Bindestelle befindet.

Überraschend war zunächst der Umstand, dass natives Apicularen die radioaktive D-Apicularen-Markierung kaum reduzierte. Eine effektivere Verdrängung wurde durch die Vorinkubation mit Saliphenylhalamid und dem nicht-radioaktiven D-Apicularen erreicht. Das führte zu der Annahme, dass das weniger raumgreifende, native Apicularen möglicherweise zu klein ist um die komplette Bindestelle für ¹⁴C-D-Apicularen abzuschirmen. Im Gegensatz dazu hat das nicht-radioaktive D-Apicularen die identische Struktur und Saliphenylhalamid eine ähnliche Molekülgröße wie ¹⁴C-D-Apicularen (Abb. 1.9A,C und 3.1C), sodass beide die radioaktive Markierung anscheinend besser verdrängen können. Die Möglichkeit, dass ¹⁴C-D-Apicularen aufgrund seiner Diazirinylgruppe an eine andere Stelle als Apicularen bindet, kann aus mehreren Gründen ausgeschlossen werden. Zum einen hatte die Diazirinylgruppe, gekoppelt an die Kontrollsubstanz Tetralin, keinen inhibitorischen Effekt auf die V-ATPase von M. sexta (Abb. 3.10A). Zum anderen reduzierte das Anhängen der Diazirinylgruppe das im nanomolaren Bereich liegende Inhibitorpotenzial des nativen Apicularens nur geringfügig um einen Faktor von etwa 20, sodass D-Apicularen trotz der Modifikation ein sehr potenter und effektiver Inhibitor ist (Tab. 3.1). Die große Flexibilität der Diazirinylgruppe spricht dafür, dass Apicularen wahrscheinlich ungehindert binden kann. Zudem wurde die Diazirinylgruppe an die Position C3 des Makrolactonrings platziert, wo Modifikationen kaum einen Einfluss auf das Inhibitorpotenzial haben (Überblick in Huss und Wieczorek, 2009). All diese Informationen lassen den Schluss zu, dass D-Apicularen die gleiche Bindestelle wie Apicularen besetzt und nur aufgrund seiner etwas raumgreifenderen Größe vermutlich auch über die Randbereiche der Apicularen-Bindestelle hinwegragt.

Für die Benzolacton Enamide und die Plecomakrolide wurde bislang von unterschiedlichen Bindestellen ausgegangen, da in früheren Arbeiten bei dem Einsatz von Saliphenvlhalamid und Apicularen keine Verdrängung des ¹²⁵I-Concanolids beobachtet worden war (Huss et al., 2002; Huss et al., 2005). Das zunächst überraschende Ergebnis, dass die Plecomakrolide zu einer leichten Verdrängung des radioaktiven D-Apicularens führen (Abb. 3.8), spricht erneut für die bereits angesprochene, etwas weiterreichende Bindestelle für D-Apicularen im Vergleich zur nativen Substanz. Jedoch auch umgekehrt kam es zu einer schwachen Reduktion der ¹⁴C-D-Plecomakrolid-Label nach der Vorinkubation mit D-Apicularen, wohingegen Apicularen das Label nicht reduzierte, sondern eher noch verstärkte (Abb. 3.6 und 3.7). Diese Verstärkung ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Bafilomycin besser an das durch Apicularen inhibierte und vermutlich fixierte Enzym binden kann und dass seine Bindestelle nicht durch Apicularen abgeschirmt wird. Insbesondere die Beeinflussbarkeit des ¹⁴C-D-Bafilomycin-Labels, aber auch seine D-Apicularen bedingte Reduktion an der c-Untereinheit auf 50%, während das Label an der a-Untereinheit nicht verändert ist, scheinen die Vermutung zu bestätigen, dass D-Apicularen die Apicularen-Bindestelle etwas überragt. Demnach kommt es wohl zu einer Überlappung der Bindestellen für Bafilomycin und D-Apicularen, die wahrscheinlich allein auf die Diazirinylgruppe von D-Apicularen

zurückzuführen ist, da Apicularen selber nicht in die Bindestelle der Plecomakrolide hineinragt.

Die geschilderten Ergebnisse zeigen somit, dass die Bindung der Benzolacton Enamide ebenfalls an den Untereinheiten a und c stattfindet, wobei eine Beteiligung der Untereinheit e nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Zu einer Überlappung mit der Bindestelle für Archazolid kommt es nicht, jedoch ist eine Interferenz bei der Bindung der Plecomakrolide und D-Apicularen festzustellen, die auf die Diazirinylgruppe des D-Apicularens zurückzuführen ist.

Um herauszufinden, ob die a- oder die c-Untereinheit vornehmlich die Apicularen-Bindestelle beherbergt, wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich hefegenetische Ansätze verfolgt. Da die V-ATPase von S. cerevisiae nicht sensitiv gegenüber Apicularen ist (S. Bockelmann, M. Huss, und H. Wieczorek, unveröffentlichte Daten), wurde versucht, mit Hilfe der Expression der V-ATPase-Untereinheiten a und c Apicularen-sensitiver Organismen in entsprechenden Hefe-Deletionsmutanten Hybrid-V-ATPasen zu generieren, die aktiv sind und Sensitivität gegenüber Apicularen zeigen. Auf diese Weise könnte auf direktem Weg eine Beteiligung der a- oder c-Untereinheit oder beider Untereinheiten nachgewiesen werden. Die Expression speziesfremder a-Untereinheiten konnte den Vma-Phänotyp einer Hefe-Deletionsmutante für die beiden Isoformen Vph1 und Stv1 bisher nicht komplementieren (Aviezer-Hagai et al., 2000; Su et al., 2008), da vermutlich die in der N-terminalen Domäne von Vph1 für eine richtige Lokalisation von Vph1 in den anderen a-Untereinheit fehlten (Kawasaki-Nishi et al., 2001a). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Hybrid-a-Untereinheiten aus der Nterminalen Hälfte von Vph1 und der C-terminalen Hälfte der Isoformen a3 und a4 der humanen a-Untereinheit generiert und in einer S. cerevisiae-Deletionsmutante für Vph1 und Stv1 exprimiert (Abschnitte 3.4.2 und 3.4.3). Da jedoch keine der beiden Hybrid-Untereinheiten aktiv war, waren Rückschlüsse auf eine durch die Untereinheit a vermittelte Apicularen-Sensitivität nicht möglich.

Im Gegensatz zu den Hybrid-a-Untereinheiten führte die Expression der c-Untereinheiten der V-ATPasen sowohl von *H. sapiens* als auch von *M. sexta* in der *vma3*-Deletionsmutante von *S. cerevisiae* zu einem teilweise komplementierten Vma⁻-Phänotyp (Abb. 3.14). Beide Hybrid-V-ATPasen waren vollständig assembliert, wiesen jedoch im Vergleich zur Wildtyp-V-ATPase eine reduzierte V-ATPase-Aktivität auf. Letztlich stellte sich aber heraus, dass keine der beiden Hybrid-V-ATPasen durch Apicularen inhibiert werden konnte (Abb. 3.15). Demnach wird die Apicularen-Bindestelle zumindest nicht von der c-Untereinheit allein gebildet. Im Umkehrschluss steuert hingegen die a-Untereinheit höchst wahrscheinlich einen erheblichen Beitrag zur Apicularen-Bindung bei, was jedoch leider nicht mit Hilfe des hier vorgestellten hefegenetischen Ansatzes direkt gezeigt werden konnte, da die Hybrid-a-Untereinheiten nicht funktionell in die V-ATPase von *S. cerevisiae* integriert wurden. Auch der gleichzeitige Austausch der Untereinheiten Vph1 und Vma3 gegen die Hybrid-Untereinheit Vph1/a4 bzw. die humane a-Isoform a4 und die humane c-Untereinheit (Abb. 3.16), der mögliche fehlerhafte Interaktionen zwischen den speziesfremden V_{O} -Untereinheiten vermindern sollte, resultierte nicht in aktiven Hybrid-V-ATPasen und damit auch nicht in weiterführenden Erkenntnissen zur Apicularen-Bindestelle.

Die a-Untereinheit als Apicularen-Bindungsort ist auch im Hinblick auf die Aminosäuresequenzen und ihre Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies wahrscheinlicher als an der c-Untereinheit. Letztere ist eine hochkonservierte V-ATPase-Untereinheit mit einer Sequenzidentität von fast 70% für die c-Untereinheiten von *H. sapiens* bzw. *M. sexta* verglichen mit Vma3 von *S. cerevisiae*. Untereinander weisen die c-Untereinheiten von *H. sapiens* und *M. sexta* sogar eine Identität von 80% auf. Im Gegensatz dazu entsprechen die Sequenzen der a-Untereinheiten von *M. sexta* bzw. der Isoformen a3 und a4 von *H. sapiens* nur zu etwa 35% der Sequenz von Vph1. Die Identität der a-Untereinheit von *M. sexta* und der Isoform a3 bzw. a4 von *H. sapiens* beträgt hingegen etwa 40% bzw. 50%. Da Apicularen die V-ATPase der Säuger und Insekten hemmt, nicht aber die der Hefe, könnte somit vermutet werden, dass die Bindestelle sich eher an der a-Untereinheit befindet, da diese weniger konserviert vorliegt als die c-Untereinheit.



Abb. 4.5: Modell der Bindestelle für Apicularen in der Nachbarschaft der Plecomakrolid- und Archazolid-Bindestellen

Das Modell (links, Seitenansicht; rechts, Aufsicht) zeigt der Einfachheit halber die C-terminale Hälfte der a-Untereinheit als Zylinder und nur zwei c-Untereinheiten des Proteolipidrings. Die vier TMHs der c-Untereinheiten sind nummeriert (1-4). Die Inhibitor-Bindestellen wurden farblich markiert: Rot für Apicularen, blau für die Plecomakrolide und gelb für Archazolid. Die Position des essentiellen Glutamats in TMH4 der c-Untereinheit wurde mit einem "E" gekennzeichnet. Außerdem wurden die Halbkanäle in der a-Untereinheit, über die die Protonen Zugang zum Proteolipidring gewinnen, angedeutet (hellgrau).

Insgesamt können die hier gewonnen Informationen zur Bindestelle für Apicularen in einem schlüssigen Modell zusammengefasst werden (Abb. 4.5). ¹⁴C-D-Apicularen führte zur radioaktiven Markierung der Untereinheiten a und c, wobei eine Beteiligung der e-Untereinheit nicht ausgeschlossen werden kann. Auf das Einzeichnen der e-Untereinheit in das Modell wurde wie bereits erwähnt verzichtet, weil ihre genaue Lokalisation in der V-ATPase noch unbekannt ist. Die Mutationsstudien bei der Hefe zeigten, dass die c-Untereinheit als alleinige Bindestelle für Apicularen nicht in Frage kommt. Die Untereinheit a als Trägerin des Großteils der Bindestelle konnte zwar nicht direkt bestätigt werden, dennoch ist es wahrscheinlich, dass Apicularen vorzugsweise an der a-Untereinheit bindet, sodass die Bindestelle dort eingezeichnet wurde. Während keine Interferenz der Bindung des nativen Apicularens mit der Bindung der Plecomakrolide oder Archazolid festgestellt wurde, gab es durch die Verdrängung der Plecomakrolide durch D-Apicularen, insbesondere des ¹⁴C-D-Bafilomycins an der c-Untereinheit, und auch durch die umgekehrte, ebenfalls vorhandene Verdrängung des ¹⁴C-D-Apicularens durch die Plecomakrolide deutliche Hinweise auf ein Überlappen der Diazirinylgruppe des **D**-Apicularens mit der Plecomakrolid-Bindestelle. Dementsprechend wurde die D-Apicularen-Bindestelle so im Modell platziert, dass die Bindestelle für Apicularen selber zwar nicht mit denen für die Plecomakrolide und Archazolid überlappt, die Diazirinylgruppe des Apicularens aber wohl in die Plecomakrolid-Bindestelle hineinragt. Alles in allem konnte erstmals die Benzolacton-Enamid-Bindestelle erfolgreich so stark eingegrenzt werden, dass nun davon ausgegangen werden kann, dass Apicularen offensichtlich vorzugsweise an der a-Untereinheit der V-ATPase bindet.

4.2.2 Ein möglicher Wirkmechanismus für Apicularen

Die bisher vorliegenden Ergebnisse deuten auf eine weitgehende Lokalisation der Apicularen-Bindestelle in der a-Untereinheit hin (Abschnitt 4.2.1). Bei der Frage nach einem möglichen Wirkmechanismus kann zunächst festgestellt werden, dass eine Blockierung der Protonenbindestelle und die Verhinderung der Protonierung der c-Untereinheiten ausgeschlossen werden kann, da die c-Untereinheit trotz einer Vorinkubation mit Apicularen mit NCD-4 markierbar ist (Bockelmann *et al.*, 2010).

Wahrscheinlicher ist der für die Plecomakrolide vermutete Mechanismus, bei dem die Inhibitoren als "Steinchen im Getriebe" die Rotation des Proteolipidrings relativ zur a-Untereinheit verhindern (Bowman *et al.*, 2006; Bowman *et al.*, 2004). Für Apicularen kann allerdings umgekehrt angenommen werden, dass durch die Bindung an die a-Untereinheit die Ringrotation blockiert wird. Aber auch eine Zugangssperre für Protonen zum c-Ring ist vorstellbar, wenn Apicularen in unmittelbarer Nähe der Halbkanäle der a-Untereinheit binden sollte (Abb. 4.5). Dabei ist durchaus vorstellbar, dass es während der

Apicularen-Bindung zu Helixverschiebungen innerhalb des membranständigen Teils der a-Untereinheit kommt, die schließlich die Protonenhalbkanäle verschließen.

Derzeit können zum Wirkmechanismus von Apicularen allerdings nur Vermutungen geäußert werden. Nichtsdestotrotz dürfte sich die Schnittstelle zwischen der a- und der c-Untereinheit als ein allgemeingültiger und effektiver Wirkort für verschiedene Inhibitoren etabliert haben.

4.3 Neue Mutationsstudien am V₀-Komplex von *Saccharomyces cerevisiae*

4.3.1 Integration speziesfremder c-Untereinheiten in die V-ATPase von

S. cerevisiae

Im Zuge der Entwicklung einer Modell-V-ATPase zur Untersuchung der Hemmung durch Apicularen wurden in dieser Arbeit Untereinheiten des V₀-Komplexes von *Saccharomyces cerevisiae*, deren V-ATPase nicht sensitiv gegenüber Apicularen ist, gegen V-ATPase-Untereinheiten Apicularen-sensitiver Organismen ausgetauscht. Im Hinblick auf die Deletion von Vma3 war bereits bekannt, dass eine Komplementation der mit den c-Untereinheiten von *Drosophila melanogaster* (Finbow *et al.*, 1994), *Nephrops norvegicus* (Harrison *et al.*, 1994), *Acetabularia acetabulum* (Ikeda *et al.*, 2001) und *Plasmodium falciparum* (Yatsushiro *et al.*, 2005) möglich ist. In der vorliegenden Arbeit wurde darüber hinaus eine erfolgreiche Komplementation mit den c-Untereinheiten von *M. sexta* und denen der Säuger *H. sapiens* und *Mus musculus* nachgewiesen (Abschnitt 3.5.1).

Der Sequenzvergleich der verschiedenen c-Untereinheiten legt die ausgeprägte Homologie unter den c-Untereinheiten dar (Abb. 4.6). Es besteht eine hohe Identität zwischen den c-Untereinheit-Sequenzen im Vergleich zur c-Untereinheit von *S. cerevisiae*. Demnach lässt sich durchaus nachvollziehen, dass die c-Untereinheiten von evolutionär z. T. weit entfernten Arten die der Bäckerhefe zumindest teilweise funktionell ersetzen können.

S cerevisi	:	MTELCPVYAPFEGAIGC	SAIIFTSLGAAYGTAKSG <mark>V</mark> GICATC\	/LRPDILFKNIVPVIMAGIIAIYGLVVSVLVCYSLGQ : 8
H_sapiens	:	MSESKSGPEYAS <mark>SE</mark> AV <mark>MG</mark> A	AAMVFSALGAAYGTAKSC <mark>T</mark> GIAAMSV	/MRPEQIMKSIIPVVMAGIIAIYGLVVAVLIANS <mark>L</mark> ND : 81
M_musculus	;	MADIKNNPEYSSFEGVMGA	SAMVFSAMGAAYGTAKSC <mark>T</mark> CIAAMSV	/MRPELIMKSIIPVVMAGIIAIYGLVVAVLIANS <mark>L</mark> TD : 8:
M_sexta	:	MAENPIYGPFFGVMGA	SAIIFSALGAAYGTAKSG <mark>T</mark> GI <mark>A</mark> AMSV	/MRPELIMK <mark>S</mark> IIPVVMAGIIA <mark>IYGLVVAVLIA</mark> GS <mark>L</mark> DSPS : 8
N_norvegic	:	MSEEGS PMYSPFEGVMGA	SAMVFSALGAAYGTAKSG <mark>V</mark> GI <mark>S</mark> AMSV	/MRPELIMK <mark>CIIPVVMAGIIA</mark> IYGLVVAVLIAGK <mark>L</mark> DEAP : 8:
D_melanoga	:	MSSEVSSDNPIYGP <mark>FE</mark> GV <mark>MG</mark> A	SAIIFSALGAAYGTAKSC <mark>T</mark> CIAAMSV	/MRPELIMKSIIPVVMAGIIAIYGLVVAVLIAGALEEPS : 8
P_falcipar	;	MRQCDPNSAFEGFMGI	assifsnlgaafgtaksg <mark>w</mark> gw <mark>g</mark> svgv	/MRPDLIMKSILPVVMAGVL <mark>GIYGIIM</mark> S <mark>ILI</mark> YGKMTP-A : 8
A_acetabul	;	MADEIYGPVQLTASFYGFLGA	FALIFSC <mark>MGAAYGTAKSG</mark> IGIAQMGV	MRPELVMKSIVPVVMAGVLGIYGLIIAVIISTNVKK : 8
S cerevisi				
		-KQALYTGELQLGAGLSVGLS	LAAGFAIGIVGDAGVRGSSQQPRLFV	CMILILIFAEVLGLYGLIVALLDNSRATQDVVC : 160
H sapiens	÷	- KQALYTGFIQLGAGLSVGLS - DISLYKSFLQLGAGLSVGLS	LAAGFAIGIVGDAGVRGS <mark>S</mark> QQPRLF\ LAAGFAIGIVGDAGVRGTAQQPRLF\	/GMILILIFAEVLGLYGLIVALLENSRATQDVVC : 160 /GMILILIFAEVLGLYGLIVALLLSTK : 155
H_sapiens M musculus	:	-KQALYTCFIOLGAGLSVGLS -DISLYKSFLQLGAGLSVGLS -GITLYRSFLQLGAGLSVGLS	LAAGFAIGIVGDAGVRGS <mark>S</mark> QQPRLFN LAAGFAIGIVGDAGVRGTAQQPRLFN LAAGFAIGIVGDAGVRGTAQQPRLFN	/GMILILIFAB/UCLYGLIVALLUNSRATQD/VC : 160 /GMILILIFAB/UCLYGLIVALIDSTK : 155 /GMILILIFAB/UCLYGLIVALIDSTK : 155
H_sapiens M_musculus M_sexta	:	- KQALYTGFIOLGAGLSVGLS - DISIYKSFLQLGAGLSVGLS - GITIYRSFLQLGAGLSVGLS NNYTIYRGFIHLGAGLAVGPS	LAAGFAIGIVGDAGVRGS <mark>S</mark> QQPRLF\ LAAGFAIGIVGDAGVRGTAQQPRLF\ LAAGFAIGIVGDAGVRGTAQQPRLF\ LAAGFAIGIVGDAGVRGTAQQPRLF\	/cmililifa&VlclyGlivalLENSRAiqdvvc : 160 /gmililifa&VlclyGlivalILSTK : 155 /gmililifa&VlclyGlivalILSTK : 155 /cmililifa&VlclyGlivalYLYTKQ : 156
H_sapiens M_musculus M_sexta N norvegic		- KOALYTEFIOLGAGLSVELS - DISTYKSFLOLGAGLSVELS - GITTYRSFLOLGAGLSVELS NNYTTYREFIHLGAGLSVELS - TYTTYOEFVHMGAGLSVELS	LAAGFAIGIVGDAGVRG5800PRLFV LAAGFAIGIVGDAGVRG7A00PRLFV LAAGFAIGIVGDAGVRG7A00PRLFV LAAGFAIGIVGDAGVRG7A00PRLFV LAAGFAIGIVGDAGVRG7A00PRLFV	/GMILILIFAB/UGLYGLYALLENSRATQD/VC : 160 /GMILILIFAB/UGLYGLYALIESTK : 155 /GMILILIFAB/UGLYGLIVALIESTK : 155 /GMILILIFAB/UGLYGLIVALYEN/TKPS5 : 159
H_sapiens M_musculus M_sexta N_norvegic D_melanoga		-KOAINTICEIDLAAGLSVGLS -DISLYKSFLOLGAGLSVGLS -GITLYRSFLOLGAGLSVGLS -NYYIYRCFIHLAAGLAVGES -TYINGCFVHMCAGLSVGLS -KYSLYRCFIHLGAGLAVGES	LAAGFAIGIVGDAGVRGSBOOPRLFU LAAGFAIGIVGDAGVRGTAQOPRLFU LAAGFAIGIVGDAGVRGTAQOPRLFU LAAGFAIGIVGDAGVRGTAQOPRLFU LAAGFAIGIVGDAGVRGTAQOPRLFU LAAGFAIGIVGDAGVRGTAQOPRLFU	/GMILILIFABVUGLYGLYALLENSRATQDVVC : 160 /GMILILIFABVUGLYGLIVALIESTK : 155 /GMILILIFABVUGLYGLIVALIESTK : 155 /GMILILIFABVUGLYGLIVALYEYTKFSS : 159 /GMILILIFABVUGLYGLIVALYEYTKFSS : 159
H_sapiens M_musculus M_sexta N_norvegic D_melanoga P_falcipar		-KOAINTEELOLAASLSVGIS -DISINKSELOLAASLSVGIS -GITINKSELOLAASLSVGIS NNYTINKEELOLAASLSVGIS -TYTINGEEVHMAASLSVGIS -KYSINKEELLAASLAVGES EGYSTEAASVAHUSSGIVGIS	LAAGFAIGIVGDAGVRCESCOPRLFV LAAGFAIGIVGDAGVRCTAQOPRLFV LAAGFAIGIVGDAGVRCTAQOPRLFV LAAGFAIGIVGDAGVRCTAQOPRLFV LAAGFAIGIVGDAGVRCTAQOPRLFV LAAGFAIGIVGDAGVRCTAQOPRLFY LAAGFAIGIVGDAGVRANQONRLFI	CGMILILIFAEVUGLYGLIVALLENSRATQDVVC : 160 /GMILILIFAEVUGLYGLIVALILESTK : 155 /GMILILIFAEVUGLYGLIVALILESTK : 155 /GMILILIFAEVUGLYGLIVAIYLYTKSS : 159 /GMILILIFAEVUGLYGLIVAIYLYTK /GMILILFAEVUGLYGLIVAIYLYTK /GMILILFAEVUGLYGLIVAIYLYTK : 159 /GMILILFEST <mark>H</mark> ALYGLIJGIYLSIAETPKLCTPYNV : 165

Abb. 4.6: Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener c-Untereinheiten

Der Sequenzvergleich wurde mit der Internetanwendung CLUSTAL Omega (1.1.0) (EMBL-EBI), dem Programm GeneDoc Version 2.3 und den Aminosäuresequenzen der c-Untereinheiten folgender Organismen durchgeführt: *S. cerevisiae* (Swiss-Prot.-Nr.: P25515.1), *H. sapiens* (Swiss-Prot.-Nr.: P27449.1), *M. musculus* (Swiss-Prot.-Nr.: P63082.1), *M. sexta* (Swiss-Prot.-Nr.: P31403.1), *N. norvegicus* (Swiss-Prot.-Nr.: Q26250.1), *D. melanogaster* (Swiss-Prot.-Nr.: P23380.1), *P. falciparum* (GenBank-Nr.: AAW28115.1), *A. acetabulum* (GenBank-Nr.: BAA21682.1). Die c-Untereinheiten weisen im Vergleich zur c-Untereinheit von *S. cerevisiae* folgende Identitäten auf: *H. sapiens* 67%, *M. musculus* 67%, *M. sexta* 69%, *N. norvegicus* 67%, *D. melanogaster* 68%, *P. falciparum* 50%, *A. acetabulum* 52%.

Durch die Überexpression des Assemblierungsfaktors Vma21 konnte die Aktivität der Hybrid-V-ATPasen mit der humanen c-Untereinheit erreicht werden (Abb. 3.14). Vma21 spielt eine insofern entscheidende Rolle, als das Chaperon über die direkte Interaktion mit der Proteolipid-Untereinheit c' zunächst die Bildung des Proteolipidrings und schließlich des kompletten V₀-Komplexes vermittelt, und darüber den V₀-Komplex beim Transport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi zu eskortieren scheint (Malkus et al., 2004). Durch die Vma21-Überexpression konnte vermutlich die Interaktion der humanen c-Untereinheit mit den Untereinheiten c' und c'' des Hefe-Proteolipidrings verbessert werden. Im Gegensatz dazu steht die fehlgeschlagene Komplementation des Hefedeletionsstammes für alle drei Proteolipiduntereinheiten (c, c' und c'') mit den c-Untereinheiten von H. sapiens und M. sexta (Abb. 3.18A). Hier kann vermutlich die Interaktion von Vma21 mit den c-Untereinheiten von H. sapiens und M. sexta nicht so wie mit der c'-Untereinheit von S. cerevisiae stattfinden, sodass die Biogenese des V₀-Komplexes nicht unterstützt wird. Für die nicht geglückte Komplementation mit der humanen c-Untereinheit könnte allerdings auch noch das Fehlen der humanen c''-Untereinheit verantwortlich sein, die im Gegensatz dazu in der V-ATPase von M. sexta wahrscheinlich nicht vorkommt (Huss et al., 2002; Huss und Wieczorek, 2007; M. Huss und H. Wieczorek, unveröffentlichte Daten). Letztlich ist aber auch eine optimale Interaktion von Vma21 mit der humanen c''-Untereinheit fraglich, da die eigentlich mit Vma21 interagierende Untereinheit c' bei der humanen V-ATPase nicht vorkommt.

Um dieses Problem zu umgehen und die Interaktion von Vma21 mit speziesfremden c-Untereinheiten zu verbessern bzw. zu ermöglichen, wären Mutagenesestudien angelehnt an die Untersuchungen von (Finnigan et al., 2012) denkbar. Der Arbeitsgruppe gelang es, Proteolipiduntereinheiten nach evolutivem Vorbild zu generieren, indem sie Deletionsmutanten für die Proteolipidisoformen der Hefe (Vma3, Vmal1 und Vmal6) mit putativen Vorläufern bzw. auch mit dem mutmaßlich gemeinsamen Vorläufer von Vma3 und Vma11, genannt Anc.3-11 komplementierten. Eventuell könnte das Einfügen von Mutationen in die c-Untereinheiten von H. sapiens und M. sexta nach einem Vergleich mit der Aminosäuresequenz von Anc.3-11 eine funktionelle Expression in der Dreifachdeletionsmutante der Hefe erlauben. Außerdem könnte die gleichzeitige Expression der am Beispiel von Anc.3-11 mutierten c-Untereinheiten von H. sapiens und M. sexta mit dem Protein Anc.16, dem gemeinsamen c''-Vorläufer von homologen Proteinen verschiedener Organismen (Finnigan et al., 2012), erfolgen. Möglicherweise wäre so die Komplementation der Deletionsmutante für alle drei Proteolipide der Hefe und die Assemblierung eines speziesfremden Proteolipidrings erfolgreich.

4.3.2 Erste Versuche zur Integration von Hybrid-a-Untereinheiten in die V-ATPase von *S. cerevisiae*

Aufgrund der Schwierigkeit, speziesfremde a-Untereinheiten in der V-ATPase von *S. cerevisiae* zu exprimieren, wurden die neuen Hybrid-Untereinheiten Vph1/a3 und Vph1/a4 nach dem Vorbild der chimären Proteine aus Vph1 und Stv1 (Kawasaki-Nishi *et al.*, 2001a) generiert (Abschnitt 3.4.2), um zumindest Teile von a-Untereinheiten Apicularen-sensitiver Organismen in die Hefe einzuschleusen. Dabei wurde die Nterminale Domäne von Vph1 mit der C-terminalen Domäne der humanen a3- bzw. a4-Untereinheiten fusioniert, um die Expression der speziesfremden C-terminalen Region, die am Protonentransport und vermutlich auch an der Apicularen-Bindung beteiligt ist, in der Hefe zu ermöglichen. Allerdings komplementierte keines der beiden Hybride Vph1/a3 und Vph1/a4 die $\Delta vph1\Delta stv1$ -Mutante funktionell, obwohl eine geringe Menge assemblierter V-ATPasen in den Vakuolenmembranen detektiert wurde (Abb. 3.13).

Welche Eigenschaften der Hybrid-Untereinheiten sind für diesen schlechten Einbau verantwortlich? Entsprechend den Hybriden aus Vph1 und Stv1 (Kawasaki-Nishi *et al.*, 2001a) war für Vph1/a3 und Vph1/a4 angenommen worden, dass sich die N-terminale, periphere Region von Vph1 auf die Aminosäuren 1-409 beschränkt und dass ihre Beibehaltung die darin kodierte korrekte Lokalisation der Hybride gewährleistet. Außerdem wurden so die Aminosäuren 362-407, die die Verbindung zwischen der N- und der C-terminalen Domäne von Vph1 bilden und für die Funktion und Assemblierung der V-ATPase von *S. cerevisiae* essentiell sind (Ediger *et al.*, 2009), beibehalten, sodass die Verbindung zwischen den beiden Domänen nicht gestört sein sollte.

Im Hinblick auf die jeweilige C-terminale Region der a-Untereinheiten zeigte der Sequenzvergleich der Aminosäuren, d.h. bei Vph1 AS 410-840, bei Untereinheit a3 AS 391-830 und bei Untereinheit a4 AS 396-840, allerdings nur eine Identität von 41% für Vph1 und a3 und 43% für Vph1 und a4. Das bedeutet, dass es trotz der konservierten Bereiche noch große Sequenzunterschiede gibt, die vermutlich den Einbau der Hybrid-a-Untereinheiten in die Hefe-V-ATPase beeinflussen. Hinzu kommt, dass die Sequenzen der Hybride mit 850 AS bei Vph1/a3 und 855 AS bei Vph1/a4 im Vergleich zu den Sequenzen von Vph1 und a4 mit je 840 und von a3 mit 830 Aminosäuren eine größere Gesamtlänge aufweisen. Auch diese hat wahrscheinlich Auswirkungen auf die Integration der Hybriduntereinheiten in die V-ATPase der Hefe.



Abb. 4.7: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Untereinheiten Vph1 von *S. cerevisiae* und a3 und a4 von *H. sapiens*

Der Vergleich wurde mit der Internetanwendung CLUSTAL Omega (1.1.0) (EMBL-EBI), dem Programm GeneDoc Version 2.3 und den folgenden Aminosäuresequenzen durchgeführt: Vph1 von *S. cerevisiae* (Swiss-Prot.-Nr.: P32563.3), Untereinheiten a3 (NCBI Referenz-Nr.: NP_006010.2) und a4 (NCBI Referenz-Nr.: NP_570856.2) von *H. sapiens*. Die im Modell von Toei *et al.* (2011) farblich markierten Aminosäuren und die Auswirkung ihrer Mutationen wurden auf den hier gezeigten Sequenzvergleich übertragen: Kein Effekt = blau; reduzierte Assemblierung = gelb; um 30-50% reduzierte Aktivität = grün; weniger als 30% Aktivität = rot. Aminosäuren, deren Mutation in Vph1 einen Effekt auf die V-ATPase-Aktivität hatte und die nicht konserviert sind, wurden mit Sternchen markiert.

Der Aminosäuresequenzvergleich von Vph1/a3 und Vph1/a4 mit Vph1 und den humanen Isoformen a3 und a4 im Bereich des Übergangs der N-terminalen Region zur Cterminalen Region bringt ein weiteres, möglicherweise störendes Merkmal der Hybride zum Vorschein: Die Aminosäure Tyrosin an Position 411 der beiden Hybride (Abb. 4.8) ist in der Sequenz von Vph1 an dieser Stelle nicht vorhanden. Als erste Aminosäure der vermuteten C-terminalen Domänen der humanen Untereinheiten a3 und a4 (Tyrosin-391 bzw. Tyrosin-396) schließt sie an die N-terminale Sequenz von Vph1 an. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Tyrosin an dieser Stelle zu einer ungünstigen Verlängerung der Sequenz führt und möglicherweise eine strukturelle Veränderung zur Folge hat, die den Membraneintritt der C-terminalen Region sowie den Einbau und die Funktion der Hybrid-Untereinheiten in der V-ATPase der Hefe stören könnte. Daher könnte die Deletion des Tyrosin-411 bei Vph1/a3 und Vph1/a4 einen positiven Effekt auf den Einbau der Hybrid-Untereinheiten in die V-ATPase der Hefe haben.



Abb. 4.8: Ausschnitt des Aminosäuresequenzvergleich der Untereinheiten Vph1 von *S. cerevisiae*, a3 und a4 von *H. sapiens* und den beiden Hybrid-Untereinheiten Vph1/a3 und Vph1/a4 im Bereich des Übergangs der Hybride.

Der Vergleich wurde mit der Internetanwendung CLUSTAL Omega (1.1.0) (EMBL-EBI), dem Programm GeneDoc Version 2.3 und den folgenden Aminosäuresequenzen durchgeführt: Vph1 von *S. cerevisiae* (Swiss-Prot.-Nr.: P32563.3), Untereinheiten a3 (NCBI Referenz-Nr.: NP_006010.2) und a4 (NCBI Referenz-Nr.: NP_570856.2) von *H. sapiens*. Der rote Pfeil markiert Tyrosin-411 der Hybrid-Untereinheiten.

Um das Ziel der Herstellung einer Modell-V-ATPase für die Untersuchung der Apicularen-Hemmung zu erreichen, könnte, abgesehen von dem Austausch der kompletten a-Untereinheit oder der C-terminalen Domäne der a-Untereinheit, die Synthese einer neuen a-Untereinheit nach dem Vorbild der von Finnigan et al. (2011) publizierten Untereinheit Anc.a einen schonenderen Eingriff darstellen und die negativen Effekte auf die Assemblierung und die Aktivität reduzieren. Die Untereinheit Anc.a ersetzt als vermutete Vorläufer-Untereinheit von Vph1 und Stv1 beide Isoformen funktionell, d. h. ihre Expression in Hefe führte zur Ansäuerung der Vakuole und des Golgis bzw. des endosomalen Netzwerks (Finnigan et al., 2011). Im Hinblick auf eine mögliche Hemmung könnte zunächst überprüft werden, ob Apicularen einen Effekt auf die ATPase-Aktivität der Anc.a-exprimierenden V-ATPase hat, da sich die Apicularen-Sensitivität eventuell erst später entwickelte. Sollte dies nicht der Fall sein, könnte die Rekonstruktion einer a-Untereinheit, die evolutiv noch früher angesiedelt ist, d. h. noch vor der Trennung zwischen den Pilzen und anderen Organismen, zu Apicularensensitiven V-ATPasen führen. Unabhängig davon könnte die Einführung von Aminosäuren, die in den humanen Isoformen der a-Untereinheit aber nicht in Vph1 konserviert sind, in die Sequenz von Anc.a zu einer a-Untereinheit führen, deren Einbau in die Hefe-V-ATPase die Assemblierung und Aktivität aber auch die Hemmung durch Apicularen ermöglicht.

Zusammenfassend ist für die Mutation der a-Untereinheit der Hefe-V-ATPase festzustellen, dass durchaus Möglichkeiten denkbar sind, um die Generation einer

Apicularen-hemmbaren V-ATPase in Hefe in einer folgenden Arbeit letztendlich doch zu realisieren.

4.3.3 Zur engen Kopplung von Protonentransport und ATP-Hydrolyse bei der V-ATPase von *S. cerevisiae*

In Anlehnung an die Experimente von Hoppe *et al.* (1982) und Fillingame *et al.* (1984), die durch die Mutagenese des essentiellen Aspartat-61 zu Glycin bzw. Asparagin eine F-ATPase ohne Protonentransport- aber mit ATPase-Aktivität generierten, sollten in der vorliegenden Arbeit die essentiellen Glutamatreste der V-ATPase-Proteolipiduntereinheiten ausgetauscht werden (Abschnitt 3.6). Auch wenn in keinem Fall eine Enzymaktivität messbar und damit Versuche zur Inhibition hinfällig waren, verdeutlichen die negativen Ergebnisse die strenge Kopplung von ATP-Hydrolyse und Protonentransport bei der V-ATPase.

Die zunächst nur in der c-Untereinheit durchgeführten Substitutionen hatten keinen Einfluss auf die Assemblierung. Für das Ausbleiben der ATP-Hydrolyse war zunächst vor allem ein Grund denkbar: In der V-ATPase von S. cerevisiae sind neben mehreren Kopien der c-Untereinheit (Vma3) auch die beiden Proteolipidisoformen c' (Vma11) und c'' (Vma16) je einfach vorhanden (Hirata et al., 1997). Dagegen wird der c-Ring der F-ATPase von E. coli ausschließlich von einer einzigen Art c-Untereinheit, die in zehnfacher Kopie vorliegt, gebildet (Überblick in Muench et al., 2011). Dementsprechend werden beim Austausch des essentiellen Aspartats der F-ATPase gegen Asparagin oder Glycin alle essentiellen Carboxylgruppen im c-Ring eliminiert, während im Proteolipidring der Hefe nach der Substitution des Glutamat-137 in Vma3 die beiden essentiellen Glutamate von Vma11 (E145) und Vma16 (E108) verbleiben. Vma11 und Vma16 sind im c-Ring direkt nebeneinander angeordnet (Abb. 4.9) und bedingen eine Asymmetrie des Hefe-Proteolipidrings, die im c-Ring der F-ATPase nicht vorhanden ist. Hinzu kommt die Lokalisation des essentiellen Glutamatrests von Vma16 (c'') in TMH3 statt in TMH5, wodurch im Ring eine Unregelmäßigkeit der Anordnung der essentiellen Glutamate und eine größere Lücke für die protonierbaren Reste entsteht (Abb. 4.9) (Wang et al., 2007). Es wird vermutet, dass diese Unregelmäßigkeit auch dafür verantwortlich ist, dass, im Gegensatz zum freien F_O-Komplex (Fillingame et al., 1983), der freie V_O-Komplex keine passive Protonenleitfähigkeit aufweist (Zhang et al., 1992) und dass diese Eigenschaft eine Grundvoraussetzung für den Regulationsmechanismus der reversiblen Dissoziation des V₁- und des V₀-Komplexes ist (Wang *et al.*, 2007). Bei einer normal funktionierenden V-ATPase wird diese Lücke zwischen dem negativ geladenen Glutamatrest in TMH3 von Vma16 und dem in TMH4 von Vma11, wahrscheinlich aktiv übersprungen, indem die Ringrotation durch die ATP-Hydrolyse angetrieben wird. Möglicherweise spielt hier auch der für die F-ATPase beschriebene Rotations-Ratschen-Mechanismus eine Rolle, bei dem die Generation des Drehmoments des c-Rings auf die

Brownsche Molekularbewegung, die relativ zur a-Untereinheit stattfindet, zurückgeführt wird (Junge et al., 1997; Junge und Nelson, 2005). Die essentiellen Glutamatreste des Rotors müssen dabei zum einen negativ geladen sein, wenn sie der positiven Stator-Untereinheit a zugewandt sind, zum anderen müssen sie durch die Protonenbindung neutralisiert werden, bevor sie in die hydrophobe Membran weiterdrehen können (Junge et al., 1997; Junge und Nelson, 2005). Vermutlich kommt es bei der V-ATPase während angetriebenen Protonentransports zu ähnlichen, des aktiv ladungsbedingten Wechselwirkungen zwischen der Untereinheit a und dem Proteolipidring, die nach dem Austausch des essentiellen Glutamats von Vma3 nicht mehr möglich sind. Demzufolge könnte vermutet werden, dass die Ringrotation in dem Moment stoppt, in dem die c-Untereinheit aufgrund der Ladungsveränderung der Aminosäure an Position 137 nicht mehr mit der a-Untereinheit interagieren und keine Deprotonierung mehr stattfinden kann (Abb. 4.9). Des Weiteren kann spekuliert werden, dass die Bewegung der c-Untereinheit mit einem neutralen Aminosäurerest anstatt des unter physiologischen Bedingungen negativ geladenen Glutamats vom zytoplasmatischen zum luminalen Halbkanal in der a-Untereinheit nicht mehr erfolgen kann und die Ringrotation an diesem Punkt abbricht.





Ansicht des Proteolipidrings und der a-Untereinheit vom Zytosol aus (modifiziert nach (Jefferies *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007). Der Pfeil oberhalb des c-Rings deutet die Rotationsrichtung an. Der Austausch der essentiellen Glutamate in den TMH4 der c-Untereinheiten ist durch ein rotes X markiert. Der weiße Buchstabe E kennzeichnet die essentiellen Glutamatreste der c'-Untereinheit in TMH4 und der c''-Untereinheit in TMH3. Die schematische Darstellung der a-Untereinheit beinhaltet den positiv geladenen, essentiellen Argininrest-735 (Kawasaki-Nishi *et al.*, 2001b) und die beiden Halbkanäle (hellgrau), durch die die Protonen den Proteolipidring erreichen bzw. verlassen. Die Bewegungsrichtung der Protonen durch die Halbkanäle ist durch Pfeile angedeutet.

Der zusätzliche Austausch der beiden protonierbaren essentiellen Glutamate von Vma11 und Vma16 gegen das strukturell identische, aber ungeladene Glutamin führte jedoch auch nicht zur erwarteten Entkopplung von Protonentransport und ATPase-Aktivität. Demnach können die Ergebnisse für die F-ATPase von *E. coli* (Hoppe *et al.*, 1982) nicht auf die V-ATPase von *S. cerevisiae* übertragen werden. Wie bereits oben für den Austausch E137Q bei Vma3 diskutiert, kommt es wahrscheinlich auch bei dem Proteolipidring ohne protonierbare Reste zu einer Rotationsblockade aufgrund der veränderten Ladung, die wahrscheinlich die korrekte Interaktion der Proteolipide mit der a-Untereinheit verhindern.

Über die Rotationsblockade des c-Rings und den dadurch fest gestellten zentralen Stiel der V-ATPase werden vermutlich die zur ATP-Hydrolyse notwendigen, sequenziellen Konformationsänderungen in den katalytischen Untereinheiten im V₁-Komplex verhindert (Abschnitt 1.3.1). So zeigt auch die Beobachtung, dass Concanamycin, das im V₀-Komplex wirkt und die Mg²⁺-ATPase-Aktivität der V-ATPase von *M. sexta*, nicht aber die Hydrolyse von Ca²⁺-ATP hemmt, dass es eine Art Kommunikation des V₁-Komplexes mit dem V₀-Komplex gibt (Huss, 2001). Umgekehrt induziert die Ca²⁺-ATPase-Aktivität der V-ATPase keine Protonentranslokation (Huss, 2001). Für diese Entkopplung von ATP-Hydrolyse und Protonentransport in Gegenwart von Ca²⁺ wird vermutet, dass die Ca²⁺-ATP-Hydrolyse an nur einer der katalytischen Stellen des V₁-Komplexes stattfindet (Huss, 2001).

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass es innerhalb der hier vorgestellten, vollständig assemblierten V-ATPase mit nicht-protonierbarem Proteolipidring wahrscheinlich über die Rotationsblockade des c-Rings zur mechanischen Inhibition des ganzen Enzyms kommt. Diese präzise mechanische Kopplung dient letztlich der Kontrolle von Protonenfluss und ATP-Verbrauch durch die V-ATPase.

5 Zusammenfassung

Die erwiesene Verbindung der V-ATPase mit Krankheiten wie Osteoporose oder Krebs erfordert die umfassende Analyse des Enzyms und seiner Inhibitoren, um entsprechende therapeutische Ansätze zu ermöglichen. V-ATPasen befinden sich sowohl in Endomembranen eukaryotischer Zellen als auch in Plasmamembranen vieler tierischer Zellen. Strukturell gliedern sie sich in einen membranständigen, protonentranslozierenden V₀-Komplex und einen peripheren, ATP-hydrolysierenden V₁-Komplex. Über die Kopplung von ATP-Hydrolyse und Protonentransport energetisiert die V-ATPase viele transmembrane Transportprozesse und reguliert den pH-Wert in Organellen und Zellen. Die etablierten Plecomakrolid-Inhibitoren Bafilomycin und Concanamycin, welche schon seit den 1980er Jahren untersucht werden, hemmen die V-ATPase spezifisch in nanomolaren Konzentrationen. In vorangegangenen Arbeiten war der Hauptteil ihrer Bindestelle bereits der c-Untereinheit des V_O-Komplexes zugeordnet worden, wobei aber auch die V₀-Untereinheit a an der Bindung beteiligt zu sein scheint. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindestelle mit Hilfe von Photoaffinitätsmarkierungen mit neuen Plecomakrolid-Derivaten und der V-ATPase aus Manduca sexta weiter charakterisiert. Dabei wurde bestätigt, dass die Plecomakrolide an die V₀-Untereinheit c binden. Außerdem konnte die Beteiligung der V₀-Untereinheit a erstmals direkt gezeigt werden. Sie ist vermutlich auf die engen Interaktionen der Untereinheiten innerhalb des Vo-Komplexes zurückzuführen, weshalb ein Inhibitionsmechanismus naheliegt, bei dem Bafilomycin und Concanamycin als "Stöckchen im Getriebe" die Rotation des c-Rings relativ zur a-Untereinheit verhindern.

Mit dem Inhibitor Apicularen wurde in dieser Arbeit erstmals die Bindestelle eines Benzolacton Enamids an der V-ATPase bestimmt. Eine Besonderheit der Benzolacton Enamide ist die Tatsache, dass sie als erste Inhibitor-Klasse die V-ATPasen von Pilzen nicht hemmen. Nach Kenntnisstand zu Beginn dieser Arbeit binden die Benzolacton Enamide zwar innerhalb des Vo-Komplexes, aber an anderer Stelle als die Plecomakrolide und der Inhibitor Archazolid. Überraschenderweise wurden aber bei Photoaffinitätslabelversuchen mit einem Diazirinyl-Derivat von Apicularen ebenfalls die Vo-Untereinheiten a und c markiert. Es konnte bestätigt werden, dass sich die Apicularen-Bindestelle deutlich von der des Archazolids unterscheidet, sie jedoch teilweise mit der Plecomakrolid-Bindestelle überlappt. Für die weitere Untersuchung der Apicularen-Bindung wurden Komplementationsstudien mit Deletionsmutanten von Saccharomyces cerevisiae und Vo-Untereinheiten Apicularen-sensitiver Organismen durchgeführt. Während der funktionelle Austausch der a-Untereinheit gegen Hybrid-a-Untereinheiten aus S. cerevisiae und Homo sapiens nicht glückte, resultierte der Austausch der c-Untereinheit gegen Homologe von H. sapiens und M. sexta in vollständig assemblierten und aktiven Hybrid-V-ATPasen. Damit gelang es erstmals, eine humane V-ATPase-Untereinheit in Hefe funktionell zu exprimieren. Dadurch, dass die Hybrid-V-ATPasen nicht durch Apicularen gehemmt werden, kann angenommen werden,
dass die Apicularen-Bindestelle zumindest nicht von der c-Untereinheit allein gebildet wird, sondern dass im Umkehrschluss die V_0 -Untereinheit a einen erheblichen Beitrag zur Bindung beisteuert.

6 Literaturverzeichnis

Arai, H., Berne, M. und Forgac, M. (1987). Inhibition of the Coated Vesicle Proton Pump and Labeling of a 17,000-Dalton Polypeptide by *N*,*N*'-Dicyclohexylcarbodiimide. *J. Biol. Chem.* 262, 11006-11011.

Arata, Y., Baleja, J. D. und Forgac, M. (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, 3357-3363.

Aviezer-Hagai, K., Nelson, H. und Nelson, N. (2000). Cloning and expression of cDNAs encoding plant V-ATPase subunits in the corresponding yeast null mutants. *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 489-498.

Bender, T., Huss, M., Wieczorek, H., Grond, S. und von Zezschwitz, P. (2007). Convenient Synthesis of a [1-¹⁴C]Diazirinylbenzoic Acid as a Photoaffinity Label for Binding Studies of V-ATPase Inhibitors. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 3870-3878.

Beyenbach, K. W. und Wieczorek, H. (2006). The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J. Exp. Biol.* **209**, 577-589.

Bindseil, K. U. und Zeeck, A. (1994). Spectroscopic and Biosynthetic Investigations of the V-Type ATPase Inhibitor Concanamycin A. *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 305-312.

Bockelmann, S. (2011). Molecular interactions of archazolid with the V-ATPase. Dissertation im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Osnabrück.

Bockelmann, S., Menche, D., Rudolph, S., Bender, T., Grond, S., von Zezschwitz, P., Muench, S. P., Wieczorek, H. und Huss, M. (2010). Archazolid A Binds to the Equatorial Region of the c-Ring of the Vacuolar H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **285**, 38304-38314.

Bowman, B. J. und Bowman, E. J. (2002). Mutations in Subunit c of the Vacuolar ATPase Confer Resistance to Bafilomycin and Identify a Conserved Antibiotic Binding Site. J. Biol. Chem. 277, 3965-3972.

Bowman, B. J., McCall, M. E., Baertsch, R. und Bowman, E. J. (2006). A Model for the Proteolipid Ring and Bafilomycin/Concanamycin-binding Site in the Vacuolar ATPase of *Neurospora crassa. J. Biol. Chem.* **281**, 31885-31893.

Bowman, E. J. und Bowman, B. J. (2005). V-ATPases as Drug Targets. J. Bioenerg. Biomembr. 37, 431-435.

Bowman, E. J., Graham, L. A., Stevens, T. H. und Bowman, B. J. (2004). The Bafilomycin/Concanamycin Binding Site in subunit c of the V-ATPases from *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem.* **279**, 33131-33138.

Bowman, E. J., Gustafson, K. R., Bowman, B. J. und Boyd, M. R. (2003). Identification of a New Chondropsin Class of Antitumor Compound That Selectively Inhibits V-ATPases. *J. Biol. Chem.* **278**, 44147-44152.

Bowman, E. J., Siebers, A. und Altendorf, K. (1988). Bafilomycins: A class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7972-7976.

Boyd, M. R., Farina, C., Belfiore, P., Gagliardi, S., Kim, J. W., Hayakawa, Y., Beutler, J. A., McKee, T. C., Bowman, B. J. und Bowman, E. J. (2001). Discovery of a Novel Antitumor Benzolactone Enamide Class That Selectively Inhibits Mammalian Vacuolar-Type (H⁺)-ATPases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **297**, 114-120.

Boyer, P. D. (1997). The ATP synthase--a splendid molecular machine. Annu. Rev. Biochem. 66, 717-749.

Burkard, N., Bender, T., Westmeier, J., Nardmann, C., Huss, M., Wieczorek, H., Grond, S. und von Zezschwitz, P. (2010). New Fluorous Photoaffinity Labels (F-PAL) and Their Application in V-ATPase Inhibition Studies. *Eur. J. Org. Chem.* 2010, 2176-2181.

Cantrell, C. L., Gustafson, K. R., Cecere, M. R., Pannell, L. K. und Boyd, M. R. (2000). Chondropsins A and B: Novel Tumor Cell Growth-Inhibitory Macrolide Lactams from the Marine Sponge *Chondropsis* sp. J. Am. Chem. Soc. **122**, 8825-8829.

Chavez, C., Bowman, E. J., Reidling, J. C., Haw, K. H. und Bowman, B. J. (2006). Analysis of Strains with Mutations in Six Genes Encoding Subunits of the V-ATPase: Eukaryotes Differ in the Composition of the V_0 Sector of the Enzyme. *J. Biol. Chem.* **281**, 27052-27062.

Compton, M. A., Graham, L. A. und Stevens, T. H. (2006). Vma9p (Subunit e) is an Integral Membrane V₀ Subunit of the Yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* **281**, 15312-15319.

Crider, B. P., Xie, X. S. und Stone, D. K. (1994). Bafilomycin Inhibits Proton Flow Through the H⁺ Channel of Vacuolar Proton Pumps. *J. Biol. Chem.* **269**, 17379-17381.

Davis-Kaplan, S. R., Compton, M. A., Flannery, A. R., Ward, D. M., Kaplan, J., Stevens, T. H. und Graham, L. A. (2006). *PKR1* Encodes an Assembly Factor for the Yeast V-type ATPase. *J. Biol. Chem.* **281**, 32025-32035.

Diakov, T. T. und Kane, P. M. (2010). Regulation of Vacuolar Proton-translocating ATPase Activity and Assembly by Extracellular pH. *J. Biol. Chem.* **285**, 23771-23778.

Diepholz, M., Borsch, M. und Böttcher, B. (2008a). Structural organization of the V-ATPase and its implications for regulatory assembly and disassembly. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1027-1031.

Diepholz, M., Venzke, D., Prinz, S., Batisse, C., Flörchinger, B., Rössle, M., Svergun, D. I., Böttcher, B. und Fethiere, J. (2008b). A Different Conformation for EGC Stator Subcomplex in Solution and in the Assembled Yeast V-ATPase: Possible Implications for Regulatory Disassembly. *Structure* **16**, 1789-1798.

Dixon, N., Pali, T., Kee, T. P., Ball, S., Harrison, M. A., Findlay, J. B., Nyman, J., Vaananen, K., Finbow, M. E. und Marsh, D. (2008). Interaction of Spin-Labeled Inhibitors of the Vacuolar H^+ -ATPase with the Transmembrane V₀-sector. *Biophys. J.* **94**, 506-514.

Dow, J. A. (1984). Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport. *Am. J. Physiol.* 246, R633-R636.

Dreisigacker, S., Latek, D., Bockelmann, S., Huss, M., Wieczorek, H., Filipek, S., Gohlke, H., Menche, D. und Carlomagno, T. (2012). Understanding the Inhibitory Effect of Highly Potent and Selective Archazolides Binding to the Vacuolar ATPase. *J. Chem. Inf. Model* 52, 2265-2272.

Dröse, S. und Altendorf, K. (1997). Bafilomycins and Concanamycins as Inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J. Exp. Biol.* **200**, 1-8.

Dröse, S., Bindseil, K. U., Bowman, E. J., Siebers, A., Zeeck, A. und Altendorf, K. (1993). Inhibitory Effect of Modified Bafilomycins and Concanamycins on P- and V-type Adenosinetriphosphatases. *Biochemistry* **32**, 3902-3906.

Dröse, S., Boddien, C., Gassel, M., Ingenhorst, G., Zeeck, A. und Altendorf, K. (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**, 2816-2825.

Ediger, B., Melman, S. D., Pappas, D. L., Jr., Finch, M., Applen, J. und Parra, K. J. (2009). The Tether Connecting Cytosolic (N Terminus) and Membrane (C Terminus) Domains of Yeast V-ATPase Subunit a (Vph1) is Required for Assembly of V₀ Subunit d. *J. Biol. Chem.* **284**, 19522-19532.

Erickson, K. L., Beutler, J. A., Cardellina, I. J. und Boyd, M. R. (1997). Salicylihalamides A and B, Novel Cytotoxic Macrolides from the Marine Sponge Haliclona sp. J. Org. Chem. 62, 8188-8192.

Fais, S., De Milito, A., You, H. und Qin, W. (2007). Targeting Vacuolar H⁺-ATPases as a New Strategy against Cancer. *Cancer Res* **67**, 10627-10630.

Feng, H., Cheng, T., Pavlos, N. J., Yip, K. H., Carrello, A., Seeber, R., Eidne, K., Zheng, M. H. und Xu, J. (2008). Cytoplasmic Terminus of Vacuolar Type Proton Pump Accessory Subunit Ac45 Is Required for Proper Interaction with V₀ Domain Subunits and Efficient Osteoclastic Bone Resorption. *J. Biol. Chem.* **283**, 13194-13204.

Fillingame, R. H., Angevine, C. M. und Dmitriev, O. Y. (2002). Coupling proton movements to *c*-ring rotation in F_1F_0 ATP synthase: aqueous access channels and helix rotations at the *a*-*c* interface. *Biochim. Biophys. Acta* **1555**, 29-36.

Fillingame, R. H., Mosher, M. E., Negrin, R. S. und Peters, L. K. (1983). H⁺-ATPase of *Escherichia coli uncB402* mutation leads to loss of chi subunit of subunit of F₀ sector. *J. Biol. Chem.* **258**, 604-609.

Fillingame, R. H., Peters, L. K., White, L. K., Mosher, M. E. und Paule, C. R. (1984). Mutations Altering Aspartyl-61 of the Omega Subunit (*uncE* Protein) of *Escherichia coli* H^+ - ATPase Differ in Effect on Coupled ATP Hydrolysis. *J. Bacteriol.* **158**, 1078-1083.

Finbow, M. E., Goodwin, S. F., Meagher, L., Lane, N. J., Keen, J., Findlay, J. B. und Kaiser, K. (1994). Evidence that the 16 kDa proteolipid (subunit c) of the vacuolar H⁺-ATPase and ductin from gap junctions are the same polypeptide in Drosophila and Manduca: molecular cloning of the Vha16k gene from *Drosophila*. J. Cell. Sci. **107**, 1817-1824.

Finnigan, G. C., Hanson-Smith, V., Houser, B. D., Park, H. J. und Stevens, T. H. (2011). The reconstructed ancestral subunit a functions as both V-ATPase isoforms Vph1p and Stv1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* **22**, 3176-3191.

Finnigan, G. C., Hanson-Smith, V., Stevens, T. H. und Thornton, J. W. (2012). Evolution of increased complexity in a molecular machine. *Nature* **481**, 360-364.

Flannery, A. R., Graham, L. A. und Stevens, T. H. (2004). Topological Characterization of the c, c', and c'' Subunits of the Vacuolar ATPase from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem.* **279**, 39856-39862.

Forgac, M. (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8, 917-929.

Frattini, A., Orchard, P. J., Sobacchi, C., Giliani, S., Abinun, M., Mattsson, J. P., Keeling, D. J., Andersson, A. K., Wallbrandt, P., Zecca, L. *et al.* (2000). Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nat. Genet.* **25**, 343-346.

Gagliardi, S., Gatti, P. A., Belfiore, P., Zocchetti, A., Clarke, G. D. und Farina, C. (1998a). Synthesis and Structure-activity Relationships of Bafilomycin A_1 Derivatives as Inhibitors of Vacuolar H⁺-ATPase. *J. Med. Chem.* **41**, 1883-1893.

Gagliardi, S., Nadler, G., Consolandi, E., Parini, C., Morvan, M., Legave, M. N., Belfiore, P., Zocchetti, A., Clarke, G. D., James, I. *et al.* (1998b). 5-(5,6-Dichloro-2-indolyl)-2-methoxy-2,4-pentadienamides: Novel and Selective Inhibitors of the Vacuolar H⁺-ATPase of Osteoclasts with Bone Antiresorptive Activity. *J. Med. Chem.* **41**, 1568-1573.

Galinis, D. L., McKee, T. C., Pannell, L. K., Cardellina, J. H. und Boyd, M. R. (1997). Lobatamides A and B, novel cytotoxic macrolides from the tunicate *Aplidium lobatum*. J. Org. Chem. **62**, 8968-8969.

Gocheva, V. und Joyce, J. A. (2007). Cysteine Cathepsins and the Cutting Edge of Cancer Invasion. *Cell Cycle* 6, 60-64.

Gräf, R., Harvey, W. R. und Wieczorek, H. (1996). Purification and Properties of a Cytosolic V₁-ATPase. J. Biol. Chem. 271, 20908-20913.

Graham, L. A., Flannery, A. R. und Stevens, T. H. (2003). Structure and assembly of the yeast V-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **35**, 301-312.

Hanada, H., Moriyama, Y., Maeda, M. und Futai, M. (1990). Kinetic studies of chromaffin granule H^+ -ATPase and effects of bafilomycin A_1 . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**, 873-878.

Hanahan, D. (1983). Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. J. Mol. Biol. 166, 557-580.

Harrison, M. A., Jones, P. C., Kim, Y. I., Finbow, M. E. und Findlay, J. B. (1994). Functional properties of a hybrid vacuolar H⁺-ATPase in *Saccharomyces* cells expressing the *Nephrops* 16-kDa proteolipid. *Eur. J. Biochem.* **221**, 111-120.

Hill, K. J. und Stevens, T. H. (1994). Vma2lp Is a Yeast Membrane Protein Retained in the Endoplasmic Reticulum by a Di-lysine Motif and Is Required for the Assembly of the Vacuolar H⁺-ATPase Complex. *Molecular Biology of the Cell* **5**, 1039-1050.

Hinton, A., Bond, S. und Forgac, M. (2009). V-ATPase functions in normal and disease processes. *Pflugers Arch* **457**, 589-598.

Hirata, R., Graham, L. A., Takatsuki, A., Stevens, T. H. und Anraku, Y. (1997). *VMA11* and *VMA16* Encode Second and Third Proteolipid Subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* Vacuolar Membrane H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **272**, 4795-4803.

Hirata, T., Nakamura, N., Omote, H., Wada, Y. und Futai, M. (2000). Regulation and Reversibility of Vacuolar H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **275**, 386-389.

Holthuis, J. C., Jansen, E. J., van Riel, M. C. und Martens, G. J. (1995). Molecular probing of the secretory pathway in peptide hormone-producing cells. *J. Cell Sci.* 108 3295-3305.

Hong, J., Ishihara, K., Zee, O. und Ohuchi, K. (2005a). Induction of Apoptosis by Apicularen A in Human Promyelocytic Leukemia Cell Line HL-60. *Planta Med* **71**, 306-312.

Hong, J., Sasaki, H., Niikura, K., Yanai, M., Nakano, Y., Yokomakura, A., Ishihara, K., Hirasawa, N., Kang, Y. S., Oh, J. S. *et al.* (2007). Inhibition of Bone Resorption in Cultures of Mouse Calvariae by Apicularen A. *Planta Med* **73**, 173-175.

Hong, J., Yamaki, K., Ishihara, K., Ahn, J. W., Zee, O. und Ohuchi, K. (2003). Induction of apoptosis of RAW 264.7 cells by the cytostatic macrolide apicularen A. *J. Pharm. Pharmacol.* **55**, 1299-1306.

Hong, J., Yokomakura, A., Nakano, Y., Ban, H. S., Ishihara, K., Ahn, J. W., Zee, O. und Ohuchi, K. (2005b). Induction of Nitric Oxide Production by the Cytostatic Macrolide Apicularen A [2,4-Heptadienamide, N-[(1*E*)-3-[(3*S*,5*R*,7*R*,9*S*)-3,4,5,6,7,8,9,10-octahydro-7,14 Dihydroxy-1-oxo-5,9-epoxy-1*H*-2-benzoxacyclododecin-3-yl]-1 propenyl]-, (2*Z*,4*Z*)-(9CI)] and Possible Role of Nitric Oxide in Apicularen A-Induced Apoptosis in RAW 264.7 Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**, 968-977.

Hong, J., Yokomakura, A., Nakano, Y., Ishihara, K., Kaneda, M., Onodera, M., Nakahama, K., Morita, I., Niikura, K., Ahn, J. W. *et al.* (2006). Inhibition of vacuolar-type (H^+) -ATPase by the cytostatic macrolide apicularen A and its role in apicularen A-induced apoptosis in RAW 264.7 cells. *FEBS Lett.* **580**, 2723-2730.

Hoppe, J., Schairer, H. U., Friedl, P. und Sebald, W. (1982). An Asp-Asn substitution in the proteolipid subunit of the ATP-synthase from *Escherichia coli* leads to a non-functional proton channel. *FEBS Lett.* **145**, 21-29.

Huss, M. (2001). Struktur, Funktion und Regulation der Plasmamembran V-ATPase von *Manduca sexta*. Dissertation im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Osnabrück.

Huss, M., Ingenhorst, G., König, S., Gassel, M., Dröse, S., Zeeck, A., Altendorf, K. und Wieczorek, H. (2002). Concanamycin A, the Specific Inhibitor of V-ATPases, binds to the V_o Subunit c. *J. Biol. Chem.* 277, 40544-40548.

Huss, M., Sasse, F., Kunze, B., Jansen, R., Steinmetz, H., Ingenhorst, G., Zeeck, A. und Wieczorek, H. (2005). Archazolid and apicularen: Novel specific V-ATPase inhibitors. *BMC Biochem.* **6**, 13.

Huss, M., Vitavska, O., Albertmelcher, A., Bockelmann, S., Nardmann, C., Tabke, K., Tiburcy, F. und Wieczorek, H. (2011). Vacuolar H⁺-ATPases: Intra- and intermolecular interactions. *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 688-695.

Huss, M. und Wieczorek, H. (2007). Influence of ATP and ADP on dissociation of the V-ATPase into its V_1 and V_0 complexes. *FEBS Lett.* **581**, 5566-5572.

Huss, M. und Wieczorek, H. (2009). Inhibitors of V-ATPases: old and new players. J. Exp. Biol. 212, 341-346.

Ikeda, M., Hinohara, M., Umami, K., Taguro, Y., Okada, Y., Wada, Y., Nakanishi, Y. und Maeshima, M. (2001). Expression of V-ATPase proteolipid subunit of *Acetabularia acetabulum* in a *VMA3*-deficient strain of *Saccharomyces cerevisiae* and its complementation study. *Eur. J. Biochem.* **268**, 6097-6104.

Imamura, H., Nakano, M., Noji, H., Muneyuki, E., Ohkuma, S., Yoshida, M. und Yokoyama, K. (2003). Evidence for rotation of V₁-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**, 2312-2315.

Ingenhorst, G., Bindseil, K. U., Boddien, C., Dröse, S., Gaßel, M., Altendorf, K. und Zeeck, A. (2001). Synthesis of a Doubly Labelled Concanamycin Derivative for ATPase Binding Studies. *Eur. J. Org. Chem.* 2001, 4525-4532.

Iwata, M., Imamura, H., Stambouli, E., Ikeda, C., Tamakoshi, M., Nagata, K., Makyio, H., Hankamer, B., Barber, J., Yoshida, M. *et al.* (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, 59-64.

Jansen, E. J., Scheenen, W. J., Hafmans, T. G. und Martens, G. J. (2008). Accessory subunit Ac45 controls the V-ATPase in the regulated secretory pathway. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 2301-2310.

Jefferies, K. C., Cipriano, D. J. und Forgac, M. (2008). Function, structure and regulation of the vacuolar (H^+) -ATPases. *Arch. Biochem. Biophys.* **476**, 33-42.

John, U. P. und Nagley, P. (1986). Amino acid substitutions in mitochondrial ATPase subunit 6 of *Saccharomyces cerevisiae* leading to oligomycin resistance. *FEBS Lett.* **207**, 79-83.

Junge, W., Lill, H. und Engelbrecht, S. (1997). ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics. *Trends Biochem. Sci.* 22, 420-423.

Junge, W. und Nelson, N. (2005). Structural biology. Nature's Rotary Electromotors. *Science* 308, 642-644.

Kane, P. M. (1995). Disassembly and Reassembly of the Yeast Vacuolar H⁺-ATPase *in Vivo. J. Biol. Chem.* **270**, 17025-17032.

Kane, P. M. (2006). The Where, When, and How of Organelle Acidification by the Yeast Vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 177-191.

Kane, P. M. (2007). The long physiological reach of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. J. *Bioenerg. Biomembr.* **39**, 415-421.

Karet, F. E. (2005). Physiological and Metabolic Implications of V-ATPase Isoforms in the Kidney. *J. Bioenerg. Biomembr.* **37**, 425-429.

Karet, F. E., Finberg, K. E., Nelson, R. D., Nayir, A., Mocan, H., Sanjad, S. A., Rodriguez-Soriano, J., Santos, F., Cremers, C. W., Di Pietro, A. *et al.* (1999). Mutations in the

gene encoding B1 subunit of H^+ -ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nat. Genet.* **21**, 84-90.

Kartner, N. und Manolson, M. F. (2011). V-ATPase Subunit Interactions: The Long Road to Therapeutic Targeting. *Curr. Protein Pept. Sci.*

Kawasaki-Nishi, S., Bowers, K., Nishi, T., Forgac, M. und Stevens, T. H. (2001a). 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**, 47411-47420.

Kawasaki-Nishi, S., Nishi, T. und Forgac, M. (2001b). 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**, 12397-12402.

Kawasaki-Nishi, S., Nishi, T. und Forgac, M. (2001c). 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, 17941-17948.

Kawasaki-Nishi, S., Nishi, T. und Forgac, M. (2003). Interacting Helical Surfaces of the Transmembrane Segments of Subunits a and c' of the Yeast V-ATPase Defined by Disulfidemediated Cross-linking. *J. Biol. Chem.* **278**, 41908-41913.

Kim, J. S., Lee, Y. C., Nam, H. T., Li, G., Yun, E. J., Song, K. S., Seo, K. S., Park, J. H., Ahn, J. W., Zee, O. *et al.* (2007). Apicularen A Induces Cell Death through Fas Ligand Up-Regulation and Microtubule Disruption by Tubulin Down-Regulation in HM7 Human Colon Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* **13**, 6509-6517.

Kim, J. W., Shin-Ya, K., Furihata, K., Hayakawa, Y. und Seto, H. (1999). Oximidines I and II: novel antitumor macrolides from *Pseudomonas* sp. . J. Org. Chem. 64, 153-155.

Kitagawa, N., Mazon, H., Heck, A. J. und Wilkens, S. (2008). Stoichiometry of the Peripheral Stalk Subunits E and G of Yeast V₁-ATPase Determined by Mass Spectrometry. *J. Biol. Chem.* **283**, 3329-3337.

Klebe, R. J., Harriss, J. V., Sharp, Z. D. und Douglas, M. G. (1983). A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* **25**, 333-341.

Klionsky, D. J., Herman, P. K. und Emr, S. D. (1990). The Fungal Vacuole: Composition, Function, and Biogenesis. *Microbiol. Rev.* 54, 266-292.

Kück, U. (2005). Praktikum der Molekulargenetik. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.

Kunze, B., Jansen, R., Sasse, F., Höfle, G. und Reichenbach, H. (1998). Apicularens A and B, New Cytostatic Macrolides from *Chondromyces* Species (Myxobacteria): Production, Physico-chemical and Biological Properties. *J. Antibiot.* **51**, 1075-1080.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Landolt-Marticorena, C., Williams, K. M., Correa, J., Chen, W. und Manolson, M. F. (2000). Evidence That the NH_2 Terminus of Vph1p, an Integral Subunit of the V_0 Sector of the Yeast V-ATPase, Interacts Directly with the Vma1p and Vma13p Subunits of the V_1 Sector. J Biol Chem 275, 15449-57.

Lau, W. C. und Rubinstein, J. L. (2012). Subnanometre-resolution structure of the intact *Thermus thermophilus* H^+ -driven ATP synthase. *Nature* **481**, 214-218.

Leng, X. H., Manolson, M. F. und Forgac, M. (1998). Function of the COOH-terminal Domain of Vph1p in Activity and Assembly of the Yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* **273**, 6717-6723.

Leng, X. H., Manolson, M. F., Liu, Q. und Forgac, M. (1996). Site-directed Mutagenesis of the 100-kDa Subunit (Vph1p) of the Yeast Vacuolar H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 271, 22487-22493.

Lu, M., Ammar, D., Ives, H., Albrecht, F. und Gluck, S. L. (2007). Physical Interaction between Aldolase and Vacuolar H⁺-ATPase Is Essential for the Assembly and Activity of the Proton Pump. *J. Biol. Chem.* **282**, 24495-24503.

Lu, M., Sautin, Y. Y., Holliday, L. S. und Gluck, S. L. (2004). The Glycolytic Enzyme Aldolase Mediates Assembly, Expression, and Activity of Vacuolar H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **279**, 8732-8739.

Ludwig, J., Kerscher, S., Brandt, U., Pfeiffer, K., Getlawi, F., Apps, D. K. und Schägger, H. (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, 10939-10947.

Malkus, P., Graham, L. A., Stevens, T. H. und Schekman, R. (2004). Role of Vma21p in Assembly and Transport of the Yeast Vacuolar ATPase. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 5075-5091.

Mandel, M., Moriyama, Y., Hulmes, J. D., Pan, Y. C., Nelson, H. und Nelson, N. (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**, 5521-5524.

Manolson, M. F., Wu, B., Proteau, D., Taillon, B. E., Roberts, B. T., Hoyt, M. A. und Jones, E. W. (1994). STV1 Gene Encodes Functional Homologue of 95-kDa Yeast Vacuolar H⁺-ATPase Subunit Vph1p. *J. Biol. Chem.* **269**, 14064-14074.

Merkulova, M., McKee, M., Dip, P. V., Grüber, G. und Marshansky, V. (2010). Nterminal domain of the V-ATPase a2-subunit displays integral membrane protein properties. *Protein Sci.* 19, 1850-1862.

Merzendorfer, H., Huss, M., Schmid, R., Harvey, W. R. und Wieczorek, H. (1999). A Novel Insect V-ATPase Subunit M9.7 Is Glycosylated Extensively. *J. Biol. Chem.* **274**, 17372-17378.

Merzendorfer, H., Reineke, S., Zhao, X. F., Jacobmeier, B., Harvey, W. R. und Wieczorek, H. (2000). The multigene family of the tobacco hornworm V-ATPase: novel subunits a, C, D, H, and putative isoforms. *Biochim. Biophys. Acta* **1467**, 369-379.

Miseta, A., Kellermayer, R., Aiello, D. P., Fu, L. und Bedwell, D. M. (1999). The vacuolar Ca^{2+}/H^+ exchanger Vcx1p/Hum1p tightly controls cytosolic Ca^{2+} levels in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett.* **451**, 132-136.

Mizutani, K., Yamamoto, M., Suzuki, K., Yamato, I., Kakinuma, Y., Shirouzu, M., Walker, J. E., Yokoyama, S., Iwata, S. und Murata, T. (2011). Structure of the rotor ring modified with *N*,*N*'-dicyclohexylcarbodiimide of the Na⁺-transporting vacuolar ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **108**, 13474-13479.

Morth, J. P., Pedersen, B. P., Toustrup-Jensen, M. S., Sorensen, T. L., Petersen, J., Andersen, J. P., Vilsen, B. und Nissen, P. (2007). Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* **450**, 1043-1049.

Muench, S. P., Huss, M., Song, C. F., Phillips, C., Wieczorek, H., Trinick, J. und Harrison, M. A. (2009). Cryo-electron Microscopy of the Vacuolar ATPase Motor Reveals its Mechanical and Regulatory Complexity. *J. Mol. Biol.* **386**, 989-999.

Muench, S. P., Trinick, J. und Harrison, M. A. (2011). Structural divergence of the rotary ATPases. *Q. Rev. Biophys.* 44, 311-356.

Mulkidjanian, A. Y., Makarova, K. S., Galperin, M. Y. und Koonin, E. V. (2007). Inventing the dynamo machine: the evolution of the F-type and V-type ATPases. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 892-899.

Müller, V. und Grüber, G. (2003). ATP synthases: structure, function and evolution of unique energy converters. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 474-494.

Murata, T., Yamato, I., Kakinuma, Y., Leslie, A. G. und Walker, J. E. (2005). Structure of the Rotor of the V-Type Na⁺-ATPase from *Enterococcus hirae*. *Science* **308**, 654-659.

Muroi, M., Shiragami, N. und Takatsuki, A. (1994). Destruxin B, a specific and readily reversible inhibitor of vacuolar-type H⁺-translocating ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 1358-1365.

Nadler, G., Morvan, M., Delimoge, I., Belfiore, P., Zocchetti, A., James, I., Zembryki, D., Lee-Rycakzewski, E., Parini, C., Consolandi, E. *et al.* (1998). (2Z,4E)-5-(5,6-dichloro-2-indolyl)-2-methoxy-N-(1,2,2,6,6- pentamethylpiperidin-4-yl)-2,4-pentadienamide, a Novel, Potent and Selective Inhibitor of the Osteoclast V-ATPase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 3621-3626.

Nelson, H. und Nelson, N. (1990). Disruption of genes encoding subunits of yeast vacuolar H⁺-ATPase causes conditional lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**, 3503-3507.

Niikura, K. (2006). Vacuolar ATPase as a Drug Discovery Target. *Drug News Perspect* **19**, 139-144.

Nishi, T., Kawasaki-Nishi, S. und Forgac, M. (2003a). Expression and Function of the Mouse V-ATPase d Subunit Isoforms. *J. Biol. Chem.* **278**, 46396-46402.

Nishi, T., Kawasaki-Nishi, S. und Forgac, M. (2003b). The First Putative Transmembrane Segment of Subunit c" (Vma16p) of the Yeast V-ATPase Is Not Necessary for Function. *J. Biol. Chem.* 278, 5821-5827.

Ohya, Y., Umemoto, N., Tanida, I., Ohta, A., Iida, H. und Anraku, Y. (1991). Calcium-sensitive *cls* Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Showing a Pet⁻ Phenotype Are Ascribable to Defects of Vacuolar Membrane H⁺-ATPase Activity. *J. Biol. Chem.* **266**, 13971-13977.

Osteresch, C., Bender, T., Grond, S., von Zezschwitz, P., Kunze, B., Jansen, R., Huss, M. und Wieczorek, H. (2012). The Binding Site of the V-ATPase Inhibitor Apicularen Is in the Vicinity of Those for Bafilomycin and Archazolid. *J. Biol. Chem.* **287**, 31866-31876.

Páli, T., Whyteside, G., Dixon, N., Kee, T. P., Ball, S., Harrison, M. A., Findlay, J. B., Finbow, M. E. und Marsh, D. (2004). Interaction of Inhibitors of the Vacuolar H^+ -ATPase with the Transmembrane V₀-Sector. *Biochemistry* **43**, 12297-12305.

Parra, K. J. und Kane, P. M. (1998). Reversible Association between the V_1 and V_0 Domains of Yeast Vacuolar H⁺-ATPase is an Unconventional Glucose-induced Effect. *Mol. Cell Biol.* **18**, 7064-7074.

Parra, K. J., Keenan, K. L. und Kane, P. M. (2000). The H subunit (Vma13p) of the Yeast V-ATPase Inhibits the ATPase Activity of Cytosolic V₁ Complexes. *J. Biol. Chem.* **275**, 21761-21767.

Pedersen, P. A. und Carafoli, E. (1987). Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties and significance to cell function. *Trends Biochem. Sci.* 12, 146-150.

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**, 349-355.

Peng, S. B., Li, X., Crider, B. P., Zhou, Z., Andersen, P., Tsai, S. J., Xie, X. S. und Stone, D. K. (1999). Identification and reconstitution of an isoform of the 116-kDa subunit of the vacuolar proton translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **274**, 2549-2555.

Perzov, N., Padler-Karavani, V., Nelson, H. und Nelson, N. (2002). Characterization of yeast V-ATPase mutants lacking Vph1p or Stv1p and the effect on endocytosis. *J. Exp. Biol.* **205**, 1209-1219.

Plant, P. J., Manolson, M. F., Grinstein, S. und Demaurex, N. (1999). Alternative Mechanisms of Vacuolar Acidification in H⁺-ATPase-deficient Yeast. *J. Biol. Chem.* **274**, 37270-37279.

Powell, B., Graham, L. A. und Stevens, T. H. (2000). Molecular Characterization of the Yeast Vacuolar H⁺-ATPase Proton Pore. *J. Biol. Chem.* **275**, 23654-23660.

Rastogi, V. K. und Girvin, M. E. (1999). Structural changes linked to proton translocation by subunit *c* of the ATP synthase. *Nature* **402**, 263-268.

Rautiala, T. J., Koskinen, A. M. und Väänänen, H. K. (1993). Purification of vacuolar ATPase with Bafilomycin C₁ affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**, 50-56.

Sambade, M. und Kane, P. M. (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**, 17361-17365.

Saroussi, S. und Nelson, N. (2009). The little we know on the structure and machinery of V-ATPase. *J. Exp. Biol.* **212**, 1604-1610.

Sasse, F., Steinmetz, H., Höfle, G. und Reichenbach, H. (2003). Archazolids, New Cytotoxic Macrolactones from *Archangium gephyra* (Myxobacteria). Production, Isolation, Physico-chemical and Biological Properties. *J. Antibiot.* **56**, 520-525.

Sennoune, S. R., Bakunts, K., Martinez, G. M., Chua-Tuan, J. L., Kebir, Y., Attaya, M. N. und Martinez-Zaguilan, R. (2004). Vacuolar H⁺-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 286, 1443-1452.

Seol, J. H., Shevchenko, A. und Deshaies, R. J. (2001). Skp1 forms multiple protein complexes, including RAVE, a regulator of V-ATPase assembly. *Nat. Cell Biol.* **3**, 384-391.

Skinner, M. A. und Wildeman, A. G. (2001). Suppression of Tumor-related Glycosylation of Cell Surface Receptors by the 16-kDa Membrane Subunit of Vacuolar H^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 276, 48451-48457.

Skou, J. C. (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta* 23, 394-401.

Smardon, A. M. und Kane, P. M. (2007). RAVE Is Essential for the Efficient Assembly of the C Subunit with the Vacuolar H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **282**, 26185-26194.

Smardon, A. M., Tarsio, M. und Kane, P. M. (2002). The RAVE Complex Is Essential for Stable Assembly of the Yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* 277, 13831-13839.

Sørensen, M. G., Henriksen, K., Neutzsky-Wulff, A. V., Dziegiel, M. H. und Karsdal, M. A. (2007). Diphyllin, a Novel and Naturally Potent V-ATPase Inhibitor, Abrogates Acidification of the Osteoclastic Resorption Lacunae and Bone Resorption. *J. Bone Miner. Res.* **22**, 1640-1648.

Stehberger, P. A., Schulz, N., Finberg, K. E., Karet, F. E., Giebisch, G., Lifton, R. P., Geibel, J. P. und Wagner, C. A. (2003). Localization and Regulation of the ATP6VOA4 (a4) Vacuolar H⁺-ATPase Subunit Defective in an Inherited Form of Distal Renal Tubular Acidosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 3027-3038.

Su, Y., Blake-Palmer, K. G., Sorrell, S., Javid, B., Bowers, K., Zhou, A., Chang, S. H., Qamar, S. und Karet, F. E. (2008). Human H⁺-ATPase a4 subunit mutations causing renal tubular acidosis reveal a role for interaction with phosphofructokinase-1. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **295**, F950-F958.

Sumner, J. P., Dow, J. A., Earley, F. G., Klein, U., Jäger, D. und Wieczorek, H. (1995). Regulation of Plasma Membrane V-ATPase Activity by Dissociation of Peripheral Subunits. *J. Biol. Chem.* **270**, 5649-5653.

Supek, F., Supekova, L., Mandiyan, S., Pan, Y. C., Nelson, H. und Nelson, N. (1994). A Novel Accessory Subunit for Vacuolar H⁺-ATPase from Chromaffin Granules. *J. Biol. Chem.* **269**, 24102-24106.

Symersky, J., Osowski, D., Walters, D. E. und Mueller, D. M. (2012). Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 109, 13961-13965.

Tarsio, M., Zheng, H., Smardon, A. M., Martinez-Munoz, G. A. und Kane, P. M. (2011). Consequences of Loss of Vph1 Protein-containing Vacuolar ATPases (V-ATPases) for Overall Cellular pH Homeostasis. *J. Biol. Chem.* **286**, 28089-28096.

Toei, M., Saum, R. und Forgac, M. (2010). Regulation and Isoform Function of the V-ATPases. *Biochemistry* **49**, 4715-4723.

Toei, M., Toei, S. und Forgac, M. (2011). Definition of Membrane Topology and Identification of Residues Important for Transport in Subunit a of the Vacuolar ATPase. *J. Biol. Chem.* **286**, 35176-35186.

Toyomura, T., Murata, Y., Yamamoto, A., Oka, T., Sun-Wada, G. H., Wada, Y. und Futai, M. (2003). From Lysosomes to the Plasma Membrane: Localization of Vacuolar-type H⁺ - ATPase with the a3 Isoform during Osteoclast Differentiation. *J. Biol. Chem.* **278**, 22023-22030.

Toyomura, T., Oka, T., Yamaguchi, C., Wada, Y. und Futai, M. (2000). Three Subunit a Isoforms of Mouse Vacuolar H⁺-ATPase. Preferential Expression of the a3 Isoform during Osteoclast Differentiation. *J. Biol. Chem.* **275**, 8760-8765.

Uchida, E., Ohsumi, Y. und Anraku, Y. (1985). Purification and Properties of H⁺translocating, Mg²⁺-Adenosine Triphosphatase from Vacuolar Membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 260, 1090-1095.

von Ballmoos, C., Appoldt, Y., Brunner, J., Granier, T., Vasella, A. und Dimroth, P. (2002). Membrane Topography of the Coupling Ion Binding Site in Na⁺-translocating F_1F_0 ATP Synthase. *J. Biol. Chem.* **277**, 3504-3510.

von Ballmoos, C., Wiedenmann, A. und Dimroth, P. (2009). Essentials for ATP Synthesis by F_1F_0 ATP Syntheses. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 649-672.

Wagner, C. A., Finberg, K. E., Breton, S., Marshansky, V., Brown, D. und Geibel, J. P. (2004). Renal Vacuolar H⁺-ATPase. *Physiol. Rev.* 84, 1263-1314.

Wang, Y., Cipriano, D. J. und Forgac, M. (2007). Arrangement of Subunits in the Proteolipid Ring of the V-ATPase. J. Biol. Chem. 282, 34058-34065.

Wang, Y., Inoue, T. und Forgac, M. (2004). TM2 but Not TM4 of Subunit c" Interacts with TM7 of Subunit a of the Yeast V-ATPase as Defined by Disulfide-mediated Cross-linking. *J. Biol. Chem.* **279**, 44628-44638.

Wang, Y., Inoue, T. und Forgac, M. (2005). Subunit a of the Yeast V-ATPase Participates in Binding of Bafilomycin. J. Biol. Chem. 280, 40481-40488.

Wang, Y., Toei, M. und Forgac, M. (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**, 20696-20702.

Whitehurst, A. W., Bodemann, B. O., Cardenas, J., Ferguson, D., Girard, L., Peyton, M., Minna, J. D., Michnoff, C., Hao, W., Roth, M. G. *et al.* (2007). Synthetic lethal screen identification of chemosensitizer loci in cancer cells. *Nature* **446**, 815-819.

Whyteside, G., Meek, P. J., Ball, S. K., Dixon, N., Finbow, M. E., Kee, T. P., Findlay, J. B. und Harrison, M. A. (2005). Concanamycin and Indolyl Pentadieneamide Inhibitors of the Vacuolar H⁺-ATPase Bind with High Affinity to the Purified Proteolipid Subunit of the Membrane Domain. *Biochemistry* 44, 15024-15031.

Wieczorek, H., Brown, D., Grinstein, S., Ehrenfeld, J. und Harvey, W. R. (1999a). Animal plasma membrane energization by proton-motive V-ATPases. *Bioessays* **21**, 637-648.

Wieczorek, H., Cioffi, M., Klein, U., Harvey, W. R., Schweikl, H. und Wolfersberger, M. G. (1990). Isolation of Goblet Cell Apical Membrane from Tobacco Hornworm Midgut and Purification of Its Vacuolar-type ATPase. *Methods Enzymol.* **192**, 608-616.

Wieczorek, H., Grüber, G., Harvey, W. R., Huss, M. und Merzendorfer, H. (1999b). The Plasma Membrane H⁺-V-ATPase from Tobacco Hornworm Midgut. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**, 67-74.

Wieczorek, H., Grüber, G., Harvey, W. R., Huss, M., Merzendorfer, H. und Zeiske, W. (2000). Structure and regulation of insect plasma membrane H⁺ V-ATPase. *J. Exp. Biol.* **203**, 127-135.

Wieczorek, H., Putzenlechner, M., Zeiske, W. und Klein, U. (1991). A Vacuolar-type Proton Pump Energizes K⁺/H⁺ Antiport in an Animal Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* **266**, 15340-15347.

Wilkens, S., Vasilyeva, E. und Forgac, M. (1999). Structure of the Vacuolar ATPase by Electron Microscopy. *J. Biol. Chem.* **274**, 31804-10.

Wilkens, S., Zhang, Z. und Zheng, Y. (2005). A structural model of the vacuolar ATPase from transmission electron microscopy. *Micron* **36**, 109-126.

Xie, X. S., Padron, D., Liao, X., Wang, J., Roth, M. G. und De Brabander, J. K. (2004). Salicylihalamide A Inhibits the V_0 Sector of the V-ATPase through a Mechanism Distinct from Bafilomycin A₁. J. Biol. Chem. 279, 19755-19763.

Xu, T. und Forgac, M. (2001). Microtubules Are Involved in Glucose-dependent Dissociation of the Yeast Vacuolar H⁺-ATPase *in Vivo. J. Biol. Chem.* **276**, 24855-24861.

Yatsushiro, S., Taniguchi, S., Mitamura, T., Omote, H. und Moriyama, Y. (2005). Proteolipid of vacuolar H⁺-ATPase of *Plasmodium falciparum*: cDNA cloning, gene organization and complementation of a yeast null mutant. *Biochim. Biophys. Acta* **1717**, 89-96.

Yokoyama, K., Nakano, M., Imamura, H., Yoshida, M. und Tamakoshi, M. (2003). Rotation of the Proteolipid Ring in the V-ATPase. J. Biol. Chem. **278**, 24255-24258.

Yuan, F. L., Li, X., Lu, W. G., Li, C. W., Li, J. P. und Wang, Y. (2010). The vacuolar ATPase in bone cells: a potential therapeutic target in osteoporosis. *Mol. Biol. Rep.* **37**, 3561-3566.

Zhang, J., Feng, Y. und Forgac, M. (1994). Proton Conduction and Bafilomycin Binding by the V₀ Domain of the Coated Vesicle V-ATPase. *J. Biol. Chem.* **269**, 23518-23523.

Zhang, J., Myers, M. und Forgac, M. (1992). Characterization of the V_o Domain of the Coated Vesicle H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **267**, 9773-9778.

Zhang, Z., Zheng, Y., Mazon, H., Milgrom, E., Kitagawa, N., Kish-Trier, E., Heck, A. J., Kane, P. M. und Wilkens, S. (2008). Structure of the yeast vacuolar ATPase. *J. Biol. Chem.* 283, 35983-35995.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumin)
D-	Diazirinylbenzoyl-
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
G418	Geneticin
IC ₅₀	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria Bertani
MES	2-(N-Morpholino)Ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure
NEB	New England Biolabs
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
OD	Optische Dichte
PAL	Photoaffinitätslabel
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
Pi	anorganisches Phosphat
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMH	Transmembranhelix
TRIS	Tris(hydroxymethyl)Aminomethan
TCA	Trichloressigsäure
U	Unit
UE	Untereinheit
ÜN	Über Nacht
SD	Synthetisch definiert
SDS	Sodiumdodecylsulfat
YPDA	Hefe (yeast)-Extrakt, Pepton, Glucose und Adenin

7.2 Publikationen

Osteresch, C., Bender, T., Grond, S., von Zezschwitz, P., Kunze, B., Jansen, R., Huss, M. and Wieczorek, H. (2012). The Binding Site of the V-ATPase Inhibitor Apicularen Is in the Vicinity of Those for Bafilomycin and Archazolid. *J. Biol. Chem.* 287, 31866-31876.

Huss, M., Vitavska, O., Albertmelcher, A., Bockelmann, S., <u>Nardmann, C.</u>, Tabke, K., Tiburcy, F. and Wieczorek, H. (2011). Vacuolar H⁺-ATPases: Intra- and intermolecular interactions. *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 688-695.

Burkard, N., Bender, T., Westmeier, J., <u>Nardmann, C.</u>, Huss, M., Wieczorek, H., Grond, S. and von Zezschwitz, P. (2010). New Fluorous Photoaffinity Labels (F-PAL) and Their Application in V-ATPase Inhibition Studies. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2176-2181.

7.3 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

7.4 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.

- Im Rahmen von Abschlussarbeiten wurden einige Laborarbeiten gemeinsam mit Studenten durchgeführt. Dabei haben folgende Personen zu den angegebenen Abbildungen beigetragen: Felizia Voss (Diplom) Abb. 3.17 und Abb. 3.18, Mareike Fröhling (Master) Abb. 3.11, Abb. 3.13 und Abb. 3.16 und Carsten Slotta (Bachelor) Abb. 3.16.
- 2. Die Minimum-Energie-Kalkulation für den Inhibitor D-Concanolid (Abb. 3.2) wurde von der Arbeitsgruppe von Stephanie Grond an der Universität Tübingen durchgeführt.

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)

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt und begleitet haben. Mein herzlicher Dank gilt...

... Prof. Dr. Helmut Wieczorek für die Möglichkeit meine Promotion in seiner Abteilung durchführen zu dürfen. Außerdem bedanke ich mich für all seine Ratschläge, die mir im Laufe meiner Arbeit sowohl in den praktischen als auch in den theoretischen Bereichen weitergeholfen haben.

... Prof. Dr. Karlheinz Altendorf für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Dissertation. Des Weiteren möchte ich mich noch ausdrücklich für die Möglichkeit der Teilnahme an der sehr spannenden Israel-Exkursion während des Biologie-Studiums bedanken.

... PD Dr. Hans-Peter Schmitz für die Teilnahme an meiner Prüfungskommission.

... Dr. Markus Huß für die Betreuung meiner Arbeit, seine vielen Ideen, sein Vertrauen und seine Unterstützung bei allen Fragen und Problemen, die es sowohl in den experimentellen als auch in den theoretischen Teilen meiner Arbeit zu beantworten und zu lösen gab. Zudem danke ich ihm für die Teilnahme an meiner Prüfungskommission.

... Svenja Bockelmann für die langjährige harmonische Zusammenarbeit und für jeglichen Rat und Beistand. Für die schöne und sehr unterhaltsame gemeinsame Zeit in der Tierphysiologie bedanke ich mich auch bei Katharina Tabke, Felix Tiburcy, Philipp Stein, Olga Vitavska, Thomas Krüppel, Hans Merzendorfer, Harald Mikoleit, Sabine Heuer, Margret Düvel, Derek Meissner, Gunnar Bröhan, Andrea Albertmelcher, Rabea Bartölke, Simon Gohlke, Daniela Heine, Marco Kelkenberg, Jana Wulftange, Felizia Voss und Mareike Fröhling.

... Martin Dransmann für den stetigen V-ATPase-Nachschub und dafür, dass er immer Lösungen für technische Probleme aller Art parat hatte. In dem Zusammenhang bedanke ich mich auch bei Gundula Key für einige Hefevakuolen. Mein besonderer Dank gilt Marion Scott, die auf alle bürokratischen Fragen immer die richtigen Antworten wusste.

... Nadja Burkard und der Arbeitsgruppe von Stephanie Grond an der Universität Tübingen für die gute Zusammenarbeit.

... den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Genetik für ihre fachkundige Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei allen Fragen zur Genetik und Mikromanipulation von Hefe.

... meinen Mädels für ihre treue Freundschaft, die stets offenen Ohren und die vielen gemeinsam verbrachten Stunden. Besonders danke ich Kerstin Rosemann für ihre bedingungslose Freundschaft und auch für die Durchsicht dieser Arbeit.

... meiner Familie für ihren Rückhalt und ihre uneingeschränkte Unterstützung auch in schwierigeren Zeiten. Ganz besonders danke ich mich meinem Mann Stefan für seine

Rücksicht, sein Vertrauen und dafür, dass er mich immer mit Rat und Tat unterstützt und für mich da ist.