

Der Multiproteinkomplex der vakuolären H⁺-ATPase höherer Pflanzen:

Klonierung, Expression und subzelluläre Lokalisation
der Untereinheiten

Dissertation

Zur Erlangung des Akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld

vorgelegt von Christoph Kluge aus Darmstadt

Bielefeld, Juni 2002

1 EINLEITUNG	1
1.1 DIE VAKUOLE, EIN ZENTRALES KOMPARTIMENT DER PFLANZE	1
1.2 TRANSPORTPROZESSE AN BIOMEMBRANEN	2
1.3 PROTONENTRANSPORTIERENDE ENZYME IN PFLANZLICHEN BIOMEMBRANSYSTEMEN	3
1.4 DIE FEINSTRUKTUR DER V-ATPASE	4
1.5 ÄNDERUNGEN DES PHÄNOTYPES DURCH MUTATION VON UNTEREINHEITEN DER V-ATPASE	7
1.6 DIE REGULATION DER AKTIVITÄT DER V-ATPASE.....	8
1.7 EXPRESSIONSÄNDERUNGEN DER V-ATPASE-GENE ALS ANTWORT AUF STRESS	9
1.8 MODIFIKATION DER QUARTÄRSTRUKTUR DER V-ATPASE	9
1.9 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	10
2 MATERIAL UND METHODEN	11
2.1 PFLANZENANZUCHT.....	11
2.1.1 <i>Wachstum von Mesembryanthemum crystallinum in hydroponischen Kulturen</i>	11
2.1.2 <i>Keimung von Mais</i>	12
2.1.3 <i>Anzucht von Nicotiana tabacum Zell-Suspensionskultur (BY2)</i>	12
2.2 MANIPULATION VON DNA	12
2.2.1 <i>Plasmidisolierung und Aufreinigung der DNA mit dem „Flexiprep-Kit“</i>	13
2.2.2 <i>Polymerasekettenreaktion</i>	13
2.2.3 <i>Kolonien-PCR</i>	14
2.2.4 <i>Sequenzspezifische Restriktion von DNA Fragmenten</i>	14
2.2.5 <i>Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden</i>	14
2.2.6 <i>Ligation</i>	14
2.2.7 <i>Reinigung und Fällung von DNA-Fragmenten</i>	15
2.2.8 <i>Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	15
2.2.9 <i>Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren</i>	15
2.2.10 <i>Elektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren</i>	16
2.2.10.1 <i>Tris-Acetat-Gele</i>	16
2.2.10.2 <i>MOPS-Formaldehyd-Gele</i>	17
2.3 NACHWEIS VON NUKLEINSÄUREN DURCH HYBRIDISIERUNG MIT GEEIGNETEN NUKLEINSÄURESONDEN	17
2.3.1 <i>Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen</i>	18
2.3.1.1 <i>Southern Blot</i>	18
2.3.1.2 <i>Northern Blot</i>	18
2.3.2 <i>Synthese von cDNA</i>	18
2.3.3 <i>Markierung von Nukleinsäuren mit Digoxigenin-gekoppelten Nukleotiden</i>	19
2.3.3.1 <i>Synthese DIG-markierter cDNA</i>	19
2.3.3.2 <i>PCR mit DIG-markierten Nukleotiden</i>	20
2.3.3.2 <i>Reinigung und Überprüfung DIG-markierter cDNAs</i>	20
2.4 NACHWEIS MEMBRAN-GEBUNDENER DNA MIT DIG MARKIERTER cDNA-SONDE	21
2.4.1 <i>Hybridisierung</i>	21
2.4.2 <i>Detektion durch Chemilumineszenz</i>	21
2.5 cDNA-ARRAYS	23
2.5.1 <i>Herstellung der cDNA-Arrays</i>	23
2.5.2 <i>Hybridisierung der cDNA-Arrays mit DIG-markierter cDNA</i>	23
2.5.3 <i>Auswertung von cDNA-Arrays</i>	23
2.6 SEQUENZIERUNGEN	24
2.7 SEQUENZANALYSE	24
2.8 KLONIEREN VON DNA.....	25
2.8.1 <i>Klonierung von PCR-Produkten</i>	25
2.8.2 <i>Klonierung von Genen aus cDNA-Banken</i>	25
2.8.2.1 <i>Anzucht und Lagerung von cDNAs in E. coli</i>	25
2.8.2.2 <i>Herstellung kompetenter Zellen</i>	26
2.8.2.3 <i>Transformation von E.coli mit Plasmiden</i>	26
2.8.2.4 <i>RACE-PCR</i>	27
2.9 IN VITRO TRANSLATION VON PROTEINEN	27
2.9.1 <i>Translation von klonierter DNA mit „TNT® Coupled“ Retikulozytenlysats</i>	28
2.9.2 <i>Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)</i>	28
2.9.3 <i>Analyse von Translationsprodukten mittels Fluorographie von SDS-Polyacrylamid-Gelen</i>	29
2.10 GEWINNUNG VON PFLANZLICHER RNA MIT DER GUANIDINISOTHIOCYANANT-METHODE	29
2.11 KLONIERUNG VON FUSIONSPROTEINEN	30
2.11.1 <i>6x His-Fusionsproteine</i>	30
2.12 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	31

2.12.1 Elektrophoretische Trennung von Proteinen mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)...	31
2.12.2 Detektion von Proteinen.....	32
2.12.2.1 Coomassie-Blau-Färbung.....	32
2.12.2.2 Silberfärbung von PAGE-Gelen.....	33
2.12.3 Western-Blot.....	34
2.12.4 Immunchemische Nachweise.....	34
2.12.4.1 Nachweis der Aktivität der alkalinen Phosphatase mit NBT und BCIP.....	35
2.12.4.2 Detektion mittels Chemilumineszenz.....	35
2.12.5 Heterologe Expression von rekombinanten Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	36
2.12.5.1 <i>E. coli</i> -Kulturen für präparative Aufreinigung.....	36
2.12.5.2 Präparation und Aufreinigung von Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i> -Lysaten.....	37
2.12.5.2.1 Präparation von nativen <i>E. coli</i> -Lysaten und Aufreinigung von Fusionsproteinen unter nativen Bedingungen.....	37
2.12.5.2.2.. Herstellung von denaturierten <i>E. coli</i> -Lysaten und Aufreinigung von 6x His-Fusionsproteinen.....	38
2.12.5.3 Elution von Proteinen aus präparativen PAGE-Gelen.....	39
2.12.6 Isolierung von Pflanzenmembranen.....	39
2.12.7 Proteinbestimmung mit dem Biorad-Assay.....	40
2.12.8 Herstellung eines Antiserums gegen McVHA-a _{nterm}	40
2.13 UNTERSUCHUNG VON PROTEIN-PROTEIN INTERAKTIONEN.....	40
2.13.1 Immunpräzipitation von assoziierten Proteinkomplexen.....	40
2.13.2 FRET-Messungen.....	41
2.14 MIKROSKOPISCHE METHODEN.....	42
2.14.1 Immunocytochemie mit Maiswurzelquetschpräparaten.....	43
2.14.2 Konfokale Laserscanning Mikroskopie.....	44
2.14.3 Immunocytochemie mit dem Elektronenmikroskop.....	45
2.15 BIOLISTISCHE TRANSFORMATION.....	45
2.15.1 Präparation der „micro-carrier“:.....	46
2.15.2 Präzipitation der DNA an die „micro-carrier“ und Beladung der „macro-carrier“.....	46
2.15.3 Transformation pflanzlichen Gewebes.....	46
3 ERGEBNISSE:.....	48
3.1 AUSGANGSSITUATION UND GRUNDSÄTZLICHE ERWÄGUNGEN ZU BEGINN DES PROJEKTS.....	48
3.2 IDENTIFIZIERUNG VON EST-EINTRÄGEN FÜR V-ATPASE-UNTEREINHEITEN AUS M. CRYSTALLINUM.....	49
3.3. DIE ANALYSE DER PRIMÄRSTRUKTUR DER V-ATPASE-UNTEREINHEITEN AUS M. CRYSTALLINUM.....	52
3.4 DIE CHARAKTERISTIKA DER V-ATPASE-UNTEREINHEITEN AUS M. CRYSTALLINUM.....	53
3.4.1 Untereinheit A.....	53
3.4.2 Untereinheit B.....	55
3.4.3 Untereinheit G.....	57
3.4.4 Untereinheit H.....	57
3.4.5 Untereinheit a.....	59
3.4.6 Untereinheit d.....	63
3.4.7 Untereinheit e.....	64
3.4.8 Zusammenfassung des Vergleichs der Untereinheiten.....	67
3.5 TRANSKRIPTOMANALYSE ZUR EXPRESSION DER V-ATPASE-UNTEREINHEITEN IN <i>MESEMBRYANTHEMUM CRYSTALLINUM</i>	67
3.5.1 Herstellung des cDNA-Arrays.....	68
3.5.2 Stress-abhängige Expressionsänderungen der V-ATPase-Untereinheiten.....	70
3.6 EXPRESSION VON V-ATPASE-UNTEREINHEITEN UND DIE HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG POLYKLONALER ANTISEREN.....	74
3.6.1 Expression eines cytoplasmatisch orientierten Teilfragments des N-Terminus von McVHA-a und die Herstellung eines heterologen Antiserums.....	76
3.6.2 DIE EXPRESSION UND DENATURIERENDE AUFREINIGUNG EINES MEMBRANSTÄNDIGEN EPITOPS VON MCVHA-a.....	78
3.6.3 Expression und Aufreinigung von McVHA-e.....	79
3.6.4 Native Aufreinigung der Untereinheiten McVHA-A und McVHA-B.....	79
3.7 Nachweis von Untereinheiten der V-ATPase in pflanzlichen Endomembranpräparationen.....	81
3.8 DIE DETEKTION VON UNTEREINHEITEN-INTERAKTIONEN.....	83
3.8.1 Vorbemerkungen.....	83
3.8.2 In vitro-Translation und Immunpräzipitation von McVHA-A und McVHA-B.....	83
3.8.3 FRET-Analyse interagierender Proteinkomplexe.....	85
3.9 DETEKTION VON V-ATPASE-UNTEREINHEITEN AN PFLANZLICHEN ENDOMEMBRANEN MIT CLSM.....	91
3.9.1 Grundsätzliche Erwägungen zur Immunlokalisation.....	91
3.9.2 Immunlokalisation von V-ATPase-Untereinheiten an Tabak-Suspensions-Kulturen.....	92

3.9.3 Immunlokalisation an Zellen der Maiswurzelspitze	94
3.9.3 Immunlokalisation von VHA-A.....	95
3.9.4 Immunlokalisation von VHA-E.....	97
3.9.5 Immunlokalisation von VHA-D _i	98
3.9.6 Immunmarkierungsmuster von Anti-VPH1 und Anti-VHA-a _{n-term}	99
3.9.7 Immundoppellokalisierungen von V-ATPase-Untereinheiten mit zellulären Markern für Membrankompartimente	101
3.9.7.1 Immun-Doppellokalisation von Untereinheiten der V-ATPase mit Calreticulin.....	102
3.9.7.2 Doppellokalisation von V-ATPase-Untereinheiten und JIM-84, einem Marker für den Golgi-Apparat.....	106
3.9.7.3 Doppellokalisation von V-ATPase-Untereinheiten und dem prävakuolären Sortierrezeptor BP80.....	108
3.9.7.4 Doppellokalisation von VHA-A mit dem Aquaporin gamma-TIP.....	109
3.9.8 Transiente Transformation von Zwiebelschuppen-Epidermiszellen mit CFP-fusionierten V-ATPase-Untereinheiten.....	110
3.9.13 Immunologische Lokalisierung von V-ATPase-Untereinheiten in Maiswurzelzellen mit Elektronenmikroskopie.....	113
3.9.14 Zusammenfassung der Ergebnisse der Immunlokalisation	115
4 DISKUSSION	116
4.1 DIE KLONIERUNG ALLER CDNAS FÜR UNTEREINHEITEN DER V-ATPASE VON <i>M. CRYSTALLINUM</i>	116
4.2 DIE SEQUENZVARIABILITÄT DER UNTEREINHEITEN DES V ₁ -SEKTORS.....	117
4.2.1 Der Kopf der V-ATPase	117
4.2.2 Weitere Untereinheiten des V ₁ -Sektors	120
4.2 DER V ₀ -SEKTOR DER V-ATPASE IN PFLANZEN	121
4.2.1 Die 100 kDa-Untereinheit in der pflanzlichen V-ATPase	121
4.2.2 Die Zusammensetzung des pflanzlichen Proteolipidringes	122
4.2.3 Andere Untereinheiten des pflanzlichen V ₀ -Sektors	125
4.2.4 Die Charakteristika der posttranslationalen Regulation der V-ATPase sind hochkonserviert.....	125
4.3 DIE EXPRESSIONSÄNDERUNG VON TRANSKRIPTEN DER V-ATPASE-UNTEREINHEITEN VON <i>M. CRYSTALLINUM</i> NACH KURZFRISTIGEM EINWIRKEN VON ABIOTISCHEM STRESS	126
4.4 REGULATION DER GENEXPRESSION ODER POSTTRANSLATIONALE REGULATION UNTER ABIOTISCHEM STRESS	131
4.5 DIE LOKALISATION VON UNTEREINHEITEN DES V ₀ - UND DES V ₁ -SEKTORS AN DEN ENDOMEMBRANKOMPARTIMENTEN VON MAISWURZELZELLEN.....	132
5 ZUSAMMENFASSUNG	137
6 LITERATUR.....	140
I ANHANG	I

1 Einleitung

1.1 Die Vakuole, ein zentrales Kompartiment der Pflanze

Ein wesentliches Merkmal der ausdifferenzierten Pflanzenzelle ist die Vakuole. Die pflanzliche Vakuole ist ein multifunktionales Organell, dem eine wesentliche Bedeutung bei Entwicklungsprozessen der Pflanze zukommt. Sie teilt einige grundlegende Eigenschaften mit den Vakuolen von Hefen und Pilzen sowie mit den Lysosomen tierischer Zellen (Schneider, 1987). Bei ausdifferenzierten pflanzlichen Zellen nimmt die große zentrale Vakuole bzw. eine Vielzahl kleinerer Vakuolen in der Regel mehr als 90 % des Zellvolumens ein. Der Vakuoleninhalt wird gegen das Cytosol durch eine selektiv permeable Membran, den Tonoplasten, abgegrenzt.

In der Pflanze sind Vakuolen lytische Kompartimente (Boller und Wiemken, 1986), Depots für Metabolite (Martinoia et al., 2000) und Pigmente (Taiz, 1992). Weiterhin sind sie Speicherorte für Ionen (Netting, 2002) und leisten einen wesentlichen Beitrag zur allgemeinen Zellhomöostase (Serrano, 1996). Manche Inhaltsstoffe der Vakuole dienen der intrazellulären Detoxifikation (Vogeli-Lange et al., 1990; Blumwald und Poole, 1985), andere Einlagerungen der Abwehr von Fraßfeinden (Taiz, 1992). Darüber hinaus sind Vakuolen wesentlich an der Signaltransduktion beteiligt, die es der Pflanze ermöglicht, kurz- und langfristig auf die Einwirkung von Stressfaktoren zu reagieren, beispielsweise dient die Vakuole als intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher (Netting, 2002).

Darüber hinaus sind Vakuolen ein essentieller Bestandteil des osmotischen Systems, das die pflanzliche Zelle darstellt. In Wechselwirkung mit der Zellwand sind sie zusammen mit der Plasmamembran verantwortlich für die Erzeugung des hydrostatischen Binnenendrucks der Zelle (Turgor), der u.a. für die hydraulische Steifheit des Pflanzenkörpers, für Streckungswachstum und Bewegungen der Pflanze verantwortlich ist (Taiz, 1992).

In Samen und spezialisierten Vorratsgeweben speichern Vakuolen Reserveproteine und lösliche Kohlenhydrate (Muntz et al., 1998). All diese Funktionen dokumentieren die Bedeutung der Vakuole für den Metabolismus, die Entwicklung und Anpassung des pflanzlichen Organismus.

1.2 Transportprozesse an Biomembranen

Das Be- und Entladen der Vakuole und damit das Funktionieren der Vakuole ist mit vielen verschiedenartigen Transportprozessen verbunden, die sich an Tonoplasten abspielen. Diese sind entweder passiver oder aktiver Natur und beruhen entweder auf freier Diffusion durch die Lipidmembran oder laufen unter Vermittlung von Proteinen, also Karriern und Kanälen ab. Das Verstehen des Funktionierens der Vakuole setzt die Kenntnis der am Tonoplasten ablaufenden Transportprozesse voraus (Miller et al., 2001). Besonders gilt dies für die Frage, auf welche Weise aktiver Transport in die Vakuole energetisiert wird. Durch die Trennung von zwei durch Membranen gegeneinander abgegrenzten Kompartimenten kann ein biologisches System chemische oder elektrische Gradienten aufbauen, die für verschiedenartige Prozesse genutzt werden können. Aktiver Transport von Ionen ist einer der grundlegenden Vorgänge zur Herstellung von Gradienten zwischen Kompartimenten. In den meisten Fällen erfolgt die Energetisierung von aktivem Transport durch Hydrolyse der universellen „Energiewährung der Zelle“, des ATP. Die dabei freigesetzte chemische Energie wird im Sinne von Energiekopplung zur Energetisierung chemischer Arbeit verwandt, d.h. zum Transport von Ionen und Molekülen entgegen den anliegenden Konzentrations- oder Ladungsgradienten. Zwei Möglichkeiten des aktiven Transports werden unterschieden, der primär und sekundär aktive Transport. Erfolgt der Transport des Moleküls unter direktem Energieverbrauch des ATP oder einer anderen energiereichen Verbindung, spricht man von primär aktivem Transport und der beteiligte Translokator wird auch als Pumpe bezeichnet (Rea et al., 1998). Beim sekundär aktiven Transport sind zwei Schritte miteinander verknüpft. Bei Pflanzen und Pilzen werden Protonen unter Energieverbrauch, d.h. unter Spaltung von ATP oder Pyrophosphat, durch die begrenzende Membran in ein abgeschlossenes Kompartiment gepumpt und dort angereichert. Dies bewirkt die Bildung eines elektrochemischen Protonengradienten am Tonoplasten und damit einer elektrochemischen Potentialdifferenz zwischen dem Inneren und dem Äußeren des Kompartiments. Diese Potentialdifferenz stellt einen Energiespeicher dar, der in einem zweiten Schritt zum selektiven „Bergauf“-Transport von Ionen und organischen Molekülen genutzt werden kann (Barkla und Pantoja, 1996). **Abbildung 1.2.1** illustriert anhand von Beispielen die verschiedenen Möglichkeiten der Flusskoppelungen zwischen membranabgegrenzten Kompartimenten innerhalb der Pflanzenzelle.

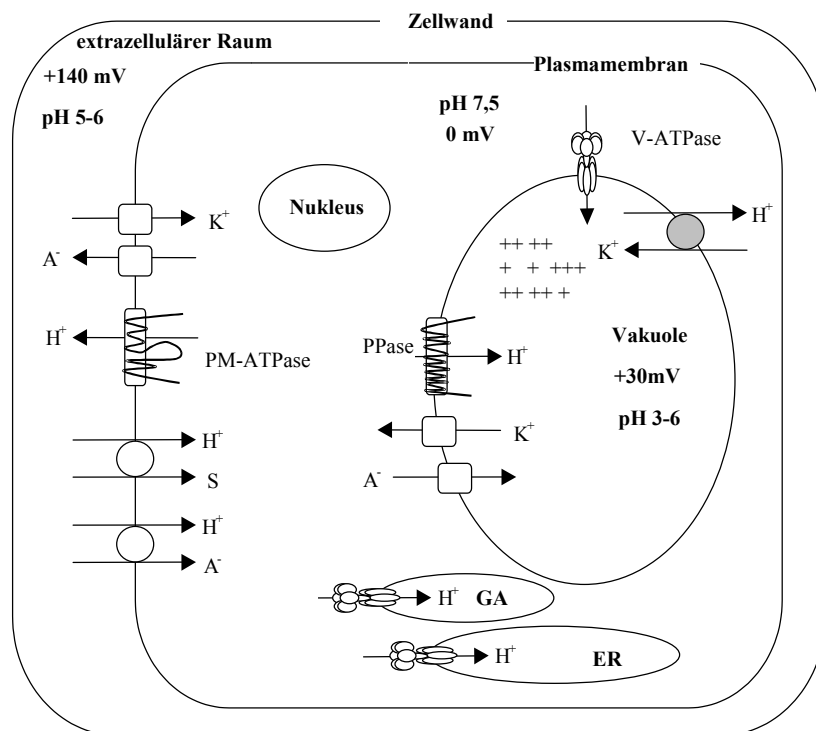


Abb. 1.2.1: Übersicht über die verschiedenen Flusskopplungen des durch die Aktivitäten der ATPasen und Pyrophosphatasen energetisierten, sekundär aktiven Transportes in der pflanzlichen Zelle. Abkürzungen: PM-ATPase: Plasmamembran-ATPase, PPase: tonoplastidäre Pyrophosphatase, V-ATPase: vakuoläre H⁺-ATPase, A⁻: Anion, K⁺: Kation, S: elektrisch neutrales Substrat, ER: Endoplasmatisches Reticulum, GA Golgi Apparat.

1.3 Protonentransportierende Enzyme in pflanzlichen Biomembransystemen

Protonengradienten werden durch Protonenfluss katalysierende Enzyme erzeugt. Abgesehen von der an der Tonoplastenmembran lokalisierten Pyrophosphatase (H⁺-PPase), die Protonen unter Verbrauch von Pyrophosphat (Diphosphat) transportiert (Rea und Poole, 1993; Drozdowicz und Rea, 2001), setzen alle anderen Protonenfluss katalysierende Enzyme ATP um, weshalb man sie unter dem Oberbegriff H⁺-ATPasen gruppiert hat. Da der Prozess reversibel ist in Abhängigkeit der thermodynamischen Gegebenheiten, kann der katalysierte Protonentransport auch mit der Synthese energiereicher Verbindungen gekoppelt sein. Dementsprechend unterscheidet man zwischen der V-Typ-ATPase (vakuoläre H⁺-ATPase) bzw. der P-Typ-ATPase (Plasmamembran-ATPase), die die bei der Spaltung von ATP freiwerdende Energie zum aktiven Protonentransport nutzen und der F-Typ-ATP-Synthase, die die Energie eines meist durch eine Elektronentransportkette generierten Protonen-

gekoppelten Potentialgradienten nutzt, um ATP zu synthetisieren. Diese F-Typ-ATP-Synthasen befinden sich in der inneren Membranen der Mitochondrien (Futai et al., 1989) und in der Thylakoidmembran des Chloroplasten (Richter und Gao, 1996; Richter et al., 2000). V-ATPasen befinden sich am Tonoplasten und anderen Endomembran-Kompartimenten der Pflanzenzellen (Ratajczak, 2000), die P-Typ-ATPase vor allem an der Plasmamembran (Portillo, 2000). V- und F-ATPasen teilen wesentliche Strukturmerkmale (Nelson und Harvey, 1999). So besitzen beide eine Kopf-Stiel-Struktur, die einer Gliederung in einen ATP- bzw. ADP-umsetzenden Kopf und einen Protonenkonduktiven Membranteil entspricht. Beide Enzyme besitzen Untereinheiten, deren kodierende Sequenzen auf einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung hinweisen (Gogarten et al., 1992a). Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass die beiden unterschiedlichen Funktionen der F- und V-ATPasen ursprünglich von einem einzigen Enzym ausgeführt werden konnten (Nelson und Taiz, 1989), wie dies noch heute bei Archaeobakterien zu finden ist (Muller et al., 1999a).

1.4 Die Feinstruktur der V-ATPase

Wie die F-ATP-Synthase ist die V-ATPase ein aus mehreren Untereinheiten zusammengesetztes Enzym. Die beiden ATPasen besitzen unter allen in pflanzlichen Zellen bekannten Enzymen die höchste Komplexität.

Die aktive pflanzliche V-ATPase besteht aus vermutlich 12 Untereinheiten (Ratajczak, 2000). Weitere am Zusammenbau der V-ATPase beteiligte Untereinheiten, die jedoch nicht mit der Aktivität der V-ATPase in Verbindung stehen, konnten bisher nur bei Hefe nachgewiesen werden. Beispiele für derartige Untereinheiten sind die durch die Genfamilien der VTCs (vacuolar transport chaperones; Cohen et al., 2000) und des RAVE-Komplexes (regulator of the (H⁺)-ATPase of the vacuolar and endosomal membranes; Smardon et al., 2002) kodierten Polypeptide.

Die Gesamtordnung des V-ATPase-Komplexes unterscheidet sich auf der Basis der bisherigen Strukturuntersuchungen zwischen den verschiedenen Organismenphyla nicht wesentlich. Dies gilt sowohl für den Kopfbereich (Radermacher et al., 1999; Wilkens et al., 1999) als auch für den Membranbereich der V-ATPase (Radermacher et al., 2001; Wilkens und Forgac, 2001; Domgall et al., 2002). Ausgehend von der Kopf-Stiel-Basis-Struktur der V-ATPase wird auch zwischen dem membranständigem V₀-Sektor und dem cytoplasmatischen V₁-Sektor unterschieden. Beide können nach der Aufreinigung der Gesamt-V-ATPase *in vitro*

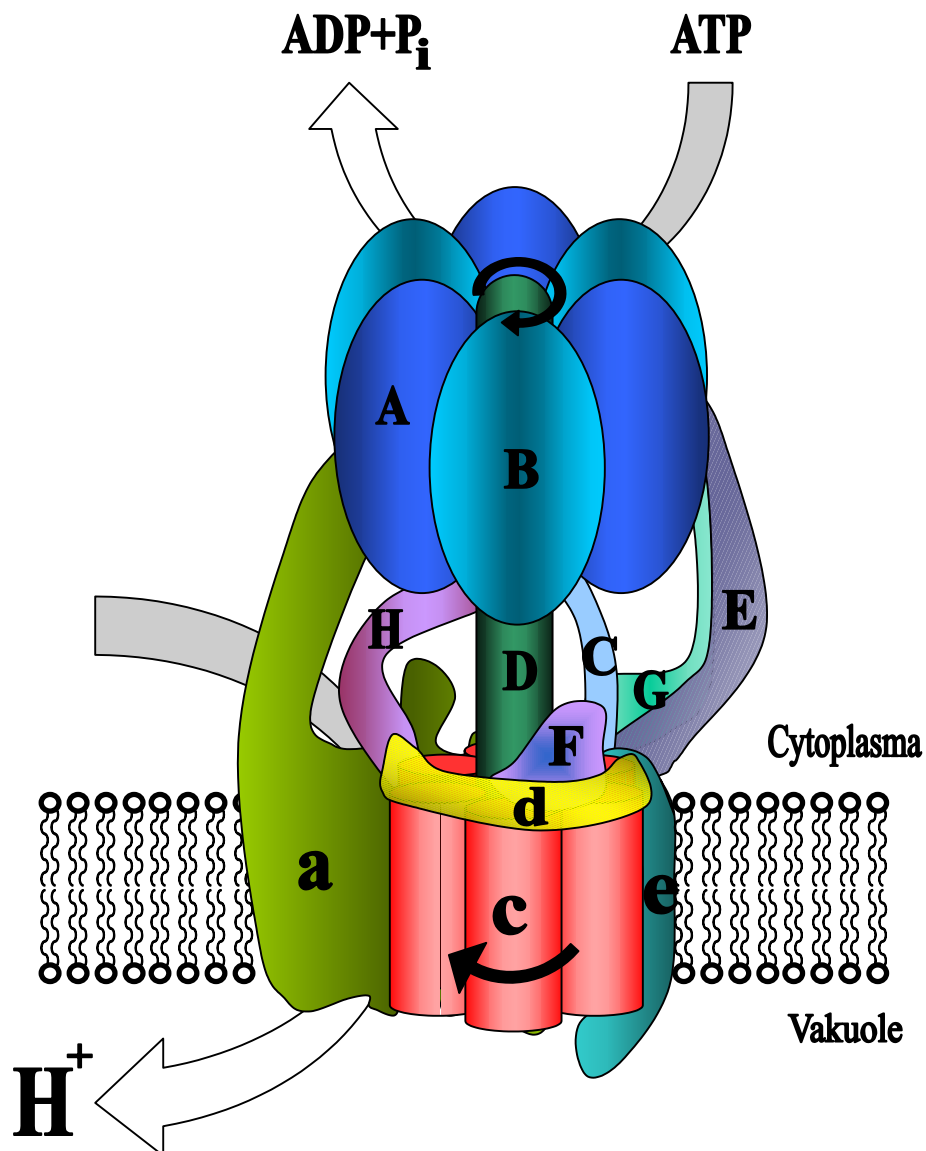


Abb. 1.4.1: Schematische Darstellung der Feinstruktur der V-ATPase. Eingeflossen in die Darstellung sind Modellvorstellungen zur V-ATPase von *Manduca sexta* (Radermacher et al., 2001; Radermacher et al., 1999), *Bos bovis* (Wilkins et al., 1999; Wilkins und Forgac, 2001) und *Kalanchoe daigremontiana* (Domgall et al., 2002). Die Untereinheiten des katalytischen V₁-Sektors sind mit großen Buchstaben bezeichnet, die des protonenkonduktiven V₀-Sektors mit kleinen Buchstaben

durch Zugabe von chaotropen Reagenzien leicht voneinander getrennt werden. Die Dissoziation könnte auch funktionell wichtig sein, da *in vivo* eine Trennung von Kopf- und Membran-Teil der V-ATPase auftritt und zur Regulation der Aktivität genutzt werden könnte. Die Regulation dieser Assoziation/Dissoziation des V₁- vom V₀-Sektors wurde dabei in Abhängigkeit von der intrazellulären Glucosekonzentration bzw. durch den Einfluss von tiefen Temperaturen gesteuert (Kane, 2000). **Abb. 1.4.1** zeigt das Modell der vollständig assemblierten V-ATPase-Struktur mit allen bisher für die Funktionen der ATP-Hydrolyse und

der Protonenkonduktion als essentiell erkannten Untereinheiten. Innerhalb dieser Arbeit erfolgt die Benennung der Untereinheiten in Analogie zu den bisher charakterisierten Sequenzen der V-ATPase von *S. cerevisiae* sowie weitestgehend nach der von Sze et al. (2002) vorgeschlagenen Nomenklatur der pflanzlichen Untereinheiten. Nach dieser Nomenklatur werden allen zur pflanzlichen V-ATPase gehörigen Untereinheiten der Präfix VHA- (Vacuolar H⁺-ATPase) vorangestellt, an die sich die Buchstabenbezeichnung der Untereinheit anschließt, sowie bei etwaigen Isoformen der Untereinheit eine Zahl. Zur eindeutigen Charakterisierung wird die Abkürzung des Artnamens vorangestellt. So wird beispielsweise eine Isoform der Untereinheit B von *A. thaliana* mit AtVHA-B1 bezeichnet.

Fasst man die durch Aufreinigung der aktiven V-ATPase verschiedener Organismen gewonnenen Erkenntnisse (Nishi und Forgac, 2002; Wieczorek et al., 2000; Kane und Parra, 2000; Dietz et al., 2001) zusammen, so ergibt sich das folgende übereinstimmende Bild der Feinstruktur: Der in das Cytosol ragende V₁-Sektor besteht aus den Untereinheiten VHA-A(3), -B(3), -C, -D, -E, -F, -G(2) und -H, der membranständige V₀-Sektor aus den Untereinheiten VHA-c(6), -a, -d und -e. Hierbei ist anzumerken, dass es für den V₀-Sektor pflanzlicher V-ATPasen bezüglich des Vorhandenseins der Untereinheiten a und e sowie der genauen Zusammensetzung des protonenkonduktiven Proteolipidringes bisher noch unterschiedliche Auffassungen gibt. Beim Proteolipidring war bisher vor allem die Anzahl und Isoformenvarianz von VHA-c strittig (Ratajczak et al., 2000).

Hinsichtlich der Funktion der einzelnen Untereinheiten innerhalb der gesamten V-ATPase können Hinweise durch eine Homologie zu Untereinheiten der F-ATPase abgeleitet werden. So geschieht die katalytische Umsetzung von ATP zu ADP an der Untereinheit A (Hirata et al., 1990). Eine teilweise Komplementation der VMA1-Mutation (Untereinheit A) in *S. cerevisiae* konnten Kim et al. (1999) durch die Expression eines pflanzlichen Homologen zu VMA1 zeigen. VHA-A entspricht damit in Bezug auf ihre Funktion der Untereinheit β der F-ATPase, an der die gleiche Reaktion, jedoch in umgekehrter Richtung, abläuft. Die regulatorische Nukleotid-Bindung erfolgt bei der V-ATPase an Untereinheit B (Liu et al., 1996, a). Diese entspricht damit in ihrer Funktion der Untereinheit α der F-ATPase. Die Untereinheit c der V-ATPase ist ein stark hydrophobes Protein mit vier Transmembrandomänen (Lai et al., 1991), das direkt am Protonentransport beteiligt ist. In Hefe erwies sich, dass das Vorhandensein von Glu-137 in der vierten Transmembranhelix essentiell für den H⁺-Transport ist (Nuomi et al., 1991). In allen bekannten Sequenzen der hochkonservierten Untereinheit c konnte an gleicher oder ähnlicher Position das Vorhandensein eines Glutamatrests gezeigt werden (Nelson und Harvey, 1999).

Bindungsstudien mit dem V-ATPase-Inhibitor N, N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) erwiesen, dass mindestens sechs Untereinheiten c pro pflanzlichem V-ATPase-Holoenzym vorhanden sind (Kaestner et al., 1988). Die Homologie zur 8 kDa großen Untereinheit c der F-ATPase legt den Schluss nahe, dass die Untereinheit c der V-ATPase durch Genverdopplung des F-ATPase-Genes entstanden ist (Nelson, 1992a). Bei anderen Untereinheiten ist die eindeutige Zuordnung zu einer Funktion innerhalb des V-ATPase-Komplexes aufgrund von Homologievergleichen nicht möglich.

Eine funktionelle Zuordnung der einzelnen Untereinheiten kann auch aufgrund von Modellen zur Funktionsweise der ATPasen, z.B. dem „Rotor-Stator-Prinzip“ (Junge et al., 1997), oder durch Struktur- und Mutationsanalysen der V-ATPase erfolgen (Nelson und Harvey, 1999). Aufgrund derartigen Informationen besteht das katalytische und regulatorische Zentrum des Enzyms aus einem Hexamer, das aus jeweils drei Untereinheiten A und B zusammengesetzt ist. Die Untereinheit E oder die Untereinheit D bilden zusammen mit den ringförmig angeordneten Isoformen von Untereinheit c den die Konformationsänderung des katalytischen Teils übertragenden „Rotor“. Die membrandurchspannende Untereinheit a kann als „Turbine“ aufgefasst werden, welche die übertragene Konformationsänderung zum Protonentransport nutzt (Junge et al., 1997). Bezüglich der Zusammensetzung des Stators, der als Widerlager des Rotors dient, kann außer der Beteiligung der Untereinheit G (Hunt und Bowman, 1997) derzeit nur spekuliert werden. Für die Untereinheiten C, F, H und e konnte bisher keine funktionelle Zuordnung erfolgen.

1.5 Änderungen des Phänotyps durch Mutation von Untereinheiten der V-ATPase

Untersuchungen der pflanzlichen V-ATPase wurden bisher hauptsächlich in Bezug auf eine Regulation der Aktivität von aufgereinigter V-ATPase und der Regulation der Transkriptmengenänderung für Gene der Untereinheiten vorgenommen (für eine Übersicht: Dietz et al., 2001). Eine genetische Untersuchung der V-ATPase in Bezug auf die Mutation einzelner Untereinheiten und die Veränderung einzelner Aminosäuren erfolgte *in vivo* bisher nur bei *S. cerevisiae*, da in diesem Modellsystem die Mutation eines Gens der V-ATPase klar erkennbare Änderungen des Phänotyps bewirkt. Hefen mit Mutationen im Bereich der V-ATPase-Gene sind zwar weiterhin lebensfähig, aber nicht mehr in der Lage, auf basischen Medien zu wachsen (Anraku et al., 1992). Die biochemische Grundlage dieses Effekts ist bisher noch nicht im Detail aufgeklärt. Die Gene der V-ATPase liegen im Genom

von *S. cerevisiae* in jeweils einer Kopie vor, mit Ausnahme der Untereinheit a, die von zwei Isoformen kodiert wird (Manolson et al., 1994).

In Pflanzen war die Hemmung der Expression von Genen der pflanzlichen V-ATPase bisher nicht erfolgreich. Mittels „anti-sense“-RNA wurde die Expression von Untereinheit A in Zellkulturen der Karotte inhibiert (Gogarten et al., 1992). Aufgrund von für die Untereinheit A kodierenden Isogenen hatte dieser Ansatz aber keine direkte Änderung des Phänotyps zur Folge. Die *det3*-Mutante von *A. thaliana* (Schumacher et al., 1999), bei der eine Mutation des für VHA-C kodierenden Gens gezeigt werden konnte, besaß charakteristische phänotypische Merkmale. Wahrscheinlich bedingt durch die in dieser Mutante reduzierte Menge an VHA-C zeigte sich eine Veränderung des Schließverhaltens der Stomata sowie, bei Wachstum im Dunkeln, kein Etiolment, d.h. die Pflanze hatte einen deetiolierten Phänotyp im Dunkeln (Allen et al., 2000). Diese nicht unmittelbar vorhersehbaren Änderungen des Phänotyps zeigen, dass eine Beteiligung der Funktion der V-ATPase der Pflanzen in einem weit größeren Zusammenhang, als lediglich an der Energetisierung des sekundär aktiven Transports gesehen werden muss.

Die Detektion von Änderungen des Phänotyps bei Mutationen der pflanzlichen V-ATPase wird durch die Struktur der Familien der für pflanzliche V-ATPase-Untereinheiten kodierenden Gene erschwert. So zeigte die Sequenzierung des Genoms von *A. thaliana*, dass für die mutmaßlich 12 Untereinheiten mehr als 24 verschiedene Gene kodieren (Dietz et al., 2001; Sze et al., 2002). Eventuell kann der mögliche Effekt der Störung eines spezifischen Gens durch die Expression eines seiner Isoformen kompensiert werden. Zudem besitzt die Pflanze mit der „Back-up“-Aktivität der Pyrophosphatase (Maeshima, 2001) ein weiteres Protonen-pumpendes System am Tonoplasten, so dass auch bei Hemmung oder gar Ausfall der V-ATPase die Energetisierung des Protonentransports am Tonoplasten in einem Mindestmaß aufrecht erhalten werden kann.

1.6 Die Regulation der Aktivität der V-ATPase

Die Regulation der Aktivität der pflanzlichen V-ATPase verläuft auf mehreren Ebenen (zur Übersicht: Dietz et al., 2001):

- a) die Regulation der Expression durch Änderung der Menge an Transkript für einzelne Untereinheiten,

- b) die Assemblierung der V-ATPase, verbunden mit einer Änderung der Stöchiometrie bzw. einer Modifikation vorhandener Untereinheiten und
- c) die posttranslationale Regulation der Aktivität der assemblierten V-ATPase.

Während die Regulation der V-ATPase auf der Ebene der Genexpression und Assemblierung der Untereinheiten vor allem der längerfristigen Anpassung an Stress dient (Lüttge und Ratajczak, 1997), ist eine posttranslationale Modulation durch Effektoren oder interne Signale wichtig, um auf plötzlich auftretende Änderungen des cytosolischen pH-Werts, des Ionengleichgewichts (Randall und Sze, 1986), des ATP/ADP-Verhältnisses (Dietz et al., 1998) und des Redoxzustands der Zelle (Tavakoli et al., 2001) kurzfristig mit einer Verstärkung des sekundär aktiven Transport reagieren zu können (Dietz et al., 2001).

1.7 Expressionsänderungen der V-ATPase-Gene als Antwort auf Stress

Besonders gut sind Änderungen der Transkriptmengen von V-ATPase-Genen in Reaktion auf abiotischen Stress charakterisiert (z.B. Ratajczak, 2000; Dietz et al., 2001). Generell ist zu sagen, dass in Reaktion auf Salzstress die Transkripte der meisten bisher untersuchten Untereinheiten in signifikanter Weise verstärkt exprimiert werden (Lehr et al., 1999; Dietz et al., 1996; Tsiantis et al., 1996). Diese Änderung der Expression eines kleinen Teils der Untereinheiten erwies sich längerfristig spezifisch für die Gewebe und Organe, nicht jedoch in Bezug auf die Untereinheiten (Golldack und Dietz, 2001). Nicht immer korrelierten die Änderungen der Transkriptmengen der Gene mit der Gesamtmenge an V-ATPase (Ratajczak, 2000). Aufgrund von fehlenden Sequenzinformationen wurden bisher bei Pflanzen hauptsächlich die Änderung der Transkriptmengen der für VHA-A, -B, -E und -c kodierenden Gene untersucht (Dietz et al., 2001).

1.8 Modifikation der Quartärstruktur der V-ATPase

Eine interessante weitere Regulationsebene konnte für die V-ATPase identifiziert und soll hier kurz dargestellt werden. Die Quartärstruktur der pflanzlichen V-ATPase, d.h. ihre Zusammensetzung aus Untereinheiten, kann im Rahmen von Entwicklungsprozessen modifiziert werden (Zhigang et al., 1996). Bei *M. crystallinum* traten während der stressbedingten Umstellung von C3-Photosynthese auf den CAM-Stoffwechsel in der V-

ATPase zusätzliche Polypeptide auf, die dann nach Aufreinigung des Enzyms detektiert werden konnten. Eines dieser zusätzlichen Polypeptide konnte als ein Spaltprodukt der Untereinheit B identifiziert werden. Bei *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass Untereinheit H die Aktivität der V-ATPase zu modulieren vermag (Ho et al., 1993), jedoch wird diese Untereinheit nicht beim Zusammenbau der V-ATPase benötigt. Weitere Untersuchungen bei Hefe zeigten, dass die Zusammensetzung des V₁-Sektors im Zuge der regulatorischen Trennung in Hinsicht auf die Untereinheiten C und H verändert wird (Kane, 2000). Neben einer Modifikation der Quartärstruktur im V₁-Sektor der V-ATPase konnte im V₀-Sektor eine Änderung des Durchmessers im Verlauf der Induzierung des CAM-Zyklus bei fakultativen CAM-Pflanzen beobachtet werden (Rockel et al., 1994). Mit einem gegen das V-ATPase-Holoenzym gerichtetem Serum wurden bei Pflanzen, die bei verschiedenen Nährstoffangebot gewachsen waren, im Western-Blot unterschiedliche Muster von immunmarkierten Untereinheiten gefunden (Fischer-Schliebs et al., 1997). Dies könnte auf eine unterschiedliche Zusammensetzung bzw. eine Modifikation der beiden Sektoren hindeuten.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Wie aus den bisherigen Ausführungen ersichtlich wird, war das Wissen um die Primärstruktur der V-ATPase-Untereinheiten bei pflanzlichen Organismen zu Beginn der Arbeit noch sehr fragmentarisch. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit versucht werden, bei einer höheren Pflanze mittels EST-gestützter RACE-PCR-Ansätze die Gesamtheit der Sequenzen für Untereinheiten der V-ATPase zu klonieren. Als für dieses Vorhaben am geeignetsten erschien die halophytische, fakultative CAM-Pflanze *Mesembryanthemum crystallinum* da in diesem Organismus bereits viele Untersuchungen zur genetischen und posttranslationalen Regulation der V-ATPase durchgeführt wurden. Zur Untersuchung der Funktion der V-ATPase *in vivo* sollten weitere Erkenntnisse über die physiologischen Funktionen bestimmter Untereinheiten der pflanzlichen V-ATPase, über die Feinstruktur dieses Systems, seine regulatorische Beantwortung von Stresssignalen und über die intrazelluläre Verteilung bestimmter Untereinheiten gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenanzucht

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende pflanzliche Organismen verwendet:

- *Mesembryanthemum crystallinum*-Pflanzen (2.1.1)
- *Zea mays* der Varietät LG20.80. (Huntseeds, England) (2.1.2)
- Zellkulturen von *Nicotiana tabacum* (BY2) (2.1.3)
- Zwiebel (*Allium cepa*)

2.1.1 Wachstum von *Mesembryanthemum crystallinum* in hydroponischen Kulturen

0,5 x Hoagland's Medium:

3 mM	KNO ₃
0,5 mM	(NH ₄)H ₂ PO ₄
1 mM	MgSO ₄
2 mM	Ca(NO ₃) ₂
0,005 ‰	Fe-EDTA
1,25 µM	CuSO ₄
6,25 µM	H ₃ BO ₃
1,50 µM	MnSO ₄
0,125 µM	Na ₂ MoO ₄
0,5 µM	ZnSO ₄

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte auf hydroponischer Kultur in einer Klimakammer des Institutes bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 14 h bei 25 °C und einer Quantenflussdichte von 400 µmol Quanten m²s⁻¹ sowie 10 h im Dunkeln bei 18 °C. Die relative Luftfeuchte betrug 50 bis 60 %. Die *M. crystallinum*-Samen wurden auf autoklaviertem und angefeuchtetem Vermiculit für zwei Wochen vorgekeimt, bevor dann jeweils vier gut entwickelte Keimlinge auf ein 5 l Gefäß mit 0,5 x Hoagland's-Medium (Hoagland und Arnon, 1938) umgesetzt wurden. Der Wechsel der Nährlösung erfolgte alle drei Tage.

2.1.2 Keimung von Mais

Die 48-stündige Keimung von vorgequollenen Maiskörnern erfolgte unter Lichtausschluss, bei 100 % Luftfeuchte und einer Temperatur von 25 °C. Zur Immuncytochemie (2.14.1) wurden die Zellen von 48 h gekeimten Wurzelzellspitzen verwendet. Diese Zellen wurden aus der Spitze der ersten zwei Millimeter der Wurzelspitze durch Fixierung und Verdau (2.14.1) der Zellwände gewonnen.

2.1.3 Anzucht von *Nicotiana tabacum* Zell-Suspensionskultur (BY2)

BY2-Medium (pro Liter):

4,3 g	MS Mikro- und Makroelemente (Imperial Labs, USA)
200 mg/ ml	KH ₂ PO ₄
100 mg/ ml	Thiamin-HCl
0,2 mg/ l	2,4-Dichlorophenoxazonsäure
30 g	Saccharose
2 g	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)
pH 5,8	(1 M KOH) autoklavieren

Zur Kultivierung von 100 ml Zellsuspensionen wurden 300 ml Kolben ohne Schikane verwendet. Das Umsetzen der Kulturen erfolgte wöchentlich durch eine 1:10-Verdünnung mit frischem Medium. Die Kolben wurden auf einem Rundschüttler bei 25 °C und 100 U/ min im Dunkeln plaziert.

2.2 Manipulation von DNA

Zur gezielten Klonierung bestimmter DNA-Fragmente war es wichtig, DNA-Fragmente durch die Methoden der PCR zu vervielfältigen, mit Restriktionsenzymen und Phosphatasen zu modifizieren und mit Ligasen neue Phosphatbindungen zwischen DNA-Fragmenten zu knüpfen. Darüber hinaus wurden die Konstrukte durch Anzucht in *E. coli* vervielfältigt.

2.2.1 Plasmidisolierung und Aufreinigung der DNA mit dem „Flexiprep-Kit“

Plasmide wurden aus transformierten *E. coli*-Kulturen (2.8.2.3) mit dem Flexiprep-Kit (Amersham, Schweden) isoliert. Die Isolation beruht auf der Methode der alkalischen Lyse von Bakterien (Birnboim und Doly, 1979), beinhaltet jedoch einen zusätzlichen Reinigungsschritt durch Bindung der DNA an eine Glasmatrix. Die Aufreinigung wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.2.2 Polymerasekettenreaktion

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) können spezifische DNA-Fragmente *in vitro* durch das Aneinanderreihen mehrerer Reaktionszyklen exponentiell vervielfacht werden. Jeder Reaktionszyklus besteht aus einer Denaturierungsphase, bei der die DNA in Einzelstränge aufgeschmolzen wird, einer „Annealing-Phase“, in der die Primer mit ihren Zielsequenzen hybridisieren, und einer Polymerisationsphase, in der die Primer entsprechend der Vorlage der DNA-Matrize verlängert werden.

Ein typischer PCR-Ansatz (50 µl) enthielt:

> 1 fmol	DNA
1x	PCR-Reaktionspuffer mit MgCl ₂ (Promega, USA)
je 25 pM	der beiden Primer
je 0,2 mM	dATP, dGTP, dCTP, dTTP
1-2 U	Taq-Polymerase (Promega, Madison, USA)

Im Routineansatz umfasste die PCR 30 Zyklen (Robocycler, Stratagene, USA) mit 1 min Denaturierungsphase bei 95 °C, einer „Annealing“-Phase von 1-2 min bei einer Temperatur, die durch den Schmelzpunkt der Primer vorgegeben war und einer 1-2 min dauernden Polymerisationsphase bei 72 °C. Um die Ausbeute an PCR-Produkt zu erhöhen, wurde nach den 30 Reaktionszyklen eine 5-minütige Polymerisationsphase angehängt („final extension“). Zur Vermeidung unspezifischer Nebenprodukte wurde vor den Beginn der Reaktionszyklen eine 2-minütige Denaturierungsphase gesetzt. Die für die PCR verwendeten Primer sind im **Anhang** aufgelistet.

2.2.3 Kolonien-PCR

Die Kolonien-PCR wurde zur schnellen Analyse von Kolonien transformierter *E. coli*-Zellen durchgeführt. Hierzu wurde jeweils eine *E. coli*-Kolonie in 10 µl LB-Medium (2.8.2.1) aufgenommen. 1/10 dieses Ansatzes diente als Vorlage für die Polymerasekettenreaktion (2.2.2) mit genspezifischen Primern. Von in der PCR positiv erscheinenden Klonen wurden mit den Resten des LB-Medium-Bakteriengemisches DNA-Minipräparationen (2.2.1) angesetzt.

2.2.4 Sequenzspezifische Restriktion von DNA Fragmenten

DNA-Proben wurden mit TypII Restriktionsendonukleasen (Roche, Mannheim; Promega, Madison, USA) in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern bei der empfohlenen Temperatur sequenzspezifisch geschnitten. Die Enzymmenge und Inkubationszeit wurde an die zu verdauende DNA-Menge angepasst.

2.2.5 Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden

Um die Rezirkulation eines linearisierten Vektors zu vermeiden, wurden die 5'-Enden dephosphoryliert. Dazu wurde der Vektor für 1 h mit alkalischer Phosphatase (CIP, Roche, Mannheim) (1U/ µg DNA) im vom Hersteller mitgelieferten Puffer inkubiert. Ein Abstoppen der Reaktion erfolgte durch 10-minütiges Erhitzen auf 70 °C.

2.2.6 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung von T4-DNA-Ligase (Roche, Mannheim) nach Anleitung des Herstellers. Dabei wurden linearisierter Vektor und das zu inserierende DNA-Fragment im molaren Verhältnis 1:3 (Gesamtmenge 200 ng) 1 h bei Raumtemperatur mit 1 µl 1 x Ligationspuffer (10 µl Endvolumen) mit T4-DNA-Ligase inkubiert (1 U/ Ansatz).

2.2.7 Reinigung und Fällung von DNA-Fragmenten

Um DNA-Präparationen von Protein-Kontaminationen zu trennen, wurden sie mit einem Volumen wassergesättigten Phenol, das mit 1/50 Volumen 2,5 M Tris-Cl (pH 8,3) neutralisiert wurde, und einem Volumen Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) unter Schütteln extrahiert. Phenolreste in der wässrigen Phase wurden durch Reextraktion mit einem Volumen Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) entfernt. Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 1/2 Volumen 7 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumenteilen Ethanol für 15 min bei Raumtemperatur präzipitiert. Durch Zentrifugation (16000 x g, 15 min) wurden sie sedimentiert, das Präzipitat mit 70 % Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und im gewünschten Volumen Wasser aufgenommen.

2.2.8 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelstücken wurde der „EasyPure DNA Purification Kit“ (Biozym, Hessisch Oldendorf) verwendet. Hierzu wurde das die gewünschte DNA enthaltende Agarosegelstück fünf Minuten bei 55 °C in Gegenwart hoher chaotroper Salzkonzentrationen aufgelöst. Zur Bindung der DNA wurde anschließend Silica-Matrix zugegeben, die mit der im Kit enthaltenen „washing solution“ und mit 70 % EtOH gereinigt wurde. Die Elution der DNA von der luftgetrockneten Matrix erfolgte durch Zugabe von 15 µl Wasser.

2.2.9 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurekonzentration ergibt sich aus der Differenz der Absorption der Probe bei 260 nm und 320 nm. Eine Absorptionseinheit (OD_{260}) entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Die Reinheit der Probe wurde aus dem Quotienten der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm bestimmt, der bei proteinfreien Proben Werte zwischen 1,7 und 2,0 annimmt. Die Messungen wurden mit dem „Genequant“ (Pharmacia Biotech, Schweden) durchgeführt.

2.2.10 Elektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren

Einzel- und doppelsträngige DNA wurde in Agarosegelen mit Tris-Acetat-Puffer größenfraktioniert, während RNA-Trennungen im denaturierendem Agarosegel mit Formamid durchgeführt wurden.

2.2.10.1 Tris-Acetat-Gele

Tris-Acetat-Puffer:

40 mM	Tris-Acetat pH 7,5
1 mM	EDTA

Ladepuffer:

200 mM	Tris-Acetat pH 7,5
50 mM	EDTA
15 % (w/v)	Ficoll
0,5 % (w/v)	SDS
0,05 % (w/v)	Bromphenolblau
0,05 % (w/v)	Xylencyanol

DNA wurde in Tris-Acetat-Gelen aufgetrennt. Zur Herstellung des Gels wurden 0,8 bis 2,5 % Agarose in Tris-Acetat-Puffer im Mikrowellengerät geschmolzen. Vor dem Erstarren wurde 1 ‰ Ethidiumbromid-Stammlösung (5 mg/ ml) zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ ml zugesetzt. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen die aufgetrennte DNA. Dieser Komplex kann dann im UV-Licht ($\lambda = 245$ nm) detektiert werden. Die DNA-Proben wurden mit $\frac{1}{4}$ Volumen Ladepuffer versetzt und im elektrischen Feld bei 80-120 V aufgetrennt. Zur Längenabschätzung wurde der „1-kb ladder DNA-Marker“ (Gibco, USA) verwendet. Die Gele wurden in einer Gel-Dokumentationsanlage im UV-Durchlicht fotografiert (Intas, Göttingen) und auf einem Videoprinter dokumentiert (Sony, Japan).

2.2.10.2 MOPS-Formaldehyd-Gele

5 x MOPS-Puffer:

100 mM	MOPS, pH 7,0
25 mM	Natriumacetat
5 mM	EDTA

Ladepuffer:

50 mM	Tris-Cl pH 8,0
10 mM	EDTA
50 % (v/v)	Glyzerin
0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
0,25 % (w/v)	Xylencyanol

Die Auftrennung von RNA erfolgte im denaturierenden MOPS-Formaldehyd-Gel. Dieses wurde durch Schmelzen von 1 % (w/v) Agarose in 100 ml RNase-freiem DEPC-behandeltem Wasser (2.4) hergestellt. Nach Abkühlen auf 60 °C wurden 12 ml 10 x MOPS-Puffer und 8 ml Formaldehyd hinzugefügt.

Die aufzutrennende RNA wurde in 25 % (v/v) Formamid, 3,3 % Formaldehyd und 1 x MOPS-Puffer 10 min bei 65 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt, 1/10 Volumen Ladepuffer und 1/50 Volumen Ethidiumbromidlösung (10 mg/ ml) zugegeben und im denaturierendem MOPS-Formaldehyd-Gel bei 80 bis 100 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Die Dokumentation des Gels erfolgte wie unter (2.2.10.1) beschrieben.

2.3 Nachweis von Nukleinsäuren durch Hybridisierung mit geeigneten Nukleinsäuresonden

Zum spezifischen Nachweis von Nukleinsäuren mit markierten Sonden mussten die zu untersuchenden DNA bzw. RNA-Fragmente in entsprechenden Agarose-Gelen aufgetrennt werden und mittels einem Transfer-Verfahren auf eine ungeladene Nylonmembran transferiert werden. Die dauerhafte Fixierung erfolgte durch die Bestrahlung mit UV-Licht.

2.3.1 Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

2.3.1.1 Southern Blot

Beim Southern Blot (Southern, 1975) werden gel-elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente auf eine Trägermembran übertragen, auf der sie anschließend fixiert und damit für Hybridisierung mit Nukleinsäuresonden zugänglich gemacht werden.

Um die doppelsträngigen DNA-Fragmente zu denaturieren, wurden die Tris-Acetat-Gele (2.2.10.1) im Anschluss an die Elektrophorese zunächst 30 min in Denaturierungspuffer inkubiert. Anschließend wurden sie 30 min in Neutralisierungspuffer neutralisiert und 30 min in 20 x SSC äquilibriert. Für das eigentliche Blotten wurde das Gel mit der Oberseite nach unten auf drei Lagen 3MM Whatman-Papier (Whatman, Großbritannien) gelegt, von denen die unterste in eine mit 20 x SSC gefüllte Schale eintauchte. Auf das Gel wurde eine mit sterilem Wasser angefeuchtete Nylonmembran (HybondN, Amersham, Schweden, 0,45 µm) luftblasenfrei gelegt und die Kanten mit Parafilm abgedichtet. Die für den Transfer der DNA nötigen Kapillarkräfte wurden mit 5 Lagen 3MM Whatman-Papier und einer dicken Schicht Zellstoff erzeugt. Nach 4 bis 16 h wurden die Nukleinsäuren durch UV-Bestrahlung (240 nm; 0,125J/ cm²; Stratalinker, Stratagene) auf der Membran fixiert.

2.3.1.2 Northern Blot

Das Northern Blotting, bei dem RNA auf Membranen übertragen und fixiert wird, wurde vom Southern-Blot abgeleitet (Alwine et al., 1979) und unterschied sich von diesem in der hier durchgeführten Weise lediglich durch die Vorbehandlung der Agarosegele. Die denaturierenden RNA-MOPS-Gele wurden nach 20-minütiger Inkubation mit 20 x SSC wie unter (2.3.1.1) beschrieben, ohne Alkalibehandlung geblottet. Alle Lösungen, mit denen das Gel in Berührung kam, wurden mit RNase-freiem, DEPC-behandeltem Wasser angesetzt.

2.3.2 Synthese von cDNA

Bei der Synthese von „copy DNA“ (cDNA) wird mit Hilfe der reversen Transkriptase (RevT) eine DNA-Kopie der gesamten transkribierten RNA, der sogenannten „messenger RNA“ (mRNA), hergestellt. Vor der eigentlichen Transkription wurden 3 µg isolierte Pflanzen RNA (2.10) mit 1 µl DNase I und 1 µl 10 x Reaktionspuffer in einem 10 µl großem Ansatz 25 min

bei Raumtemperatur inkubiert. Diese DNase-Behandlung diente der Elimination von Resten genomischer DNA, die die Ergebnisse nachfolgender Verfahren wie Hybridisierung und RT-PCR verfälschen könnten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA und anschließender Inkubation bei +70 °C und -80 °C gestoppt und anschließend gelagert. Zur cDNA-Erststrangsynthese wurde ein 16 Bp langer Oligo-d(T)-Primer an den 3'-Poly-(A)-Schwanz der mRNA hybridisiert, von dem aus die reverse Transkriptase die Polymerisation der Nukleotidmoleküle beginnen kann. 1,5 µl Oligo-d(T) (0,5 µg/ µl) wurden 10 µl des DNase-Verdau zugesetzt und für 10 min bei 70 °C inkubiert, um eventuelle Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen und die Bindung der Primer zu ermöglichen. Anschließend wurde das Gemisch im Eisbad gekühlt. Pro cDNA-Ansatz wurde folgender Anteil eines Mastermixes zugegeben: 6 µl 5 x „First Strand Buffer (GIBCO BRL, Karlsruhe), 3 µl DTT (0,1 M), 1,5 µl dNTPs (je 10 mM), 1,5 µl RNasin (Promega, Mannheim), 4 µl H₂O. Nach 5-minütiger Inkubation bei 42 °C wurden pro Ansatz 1,5 µl Superscript RevT™ (200 U/ µl) (GIBCO-BRL, Karlsruhe) zugegeben und das Reaktionsgemisch bei 42 °C weitere 50 min inkubiert. Eine abschließende 15-minütige Inkubation bei 70 °C beendete die Reaktion.

2.3.3 Markierung von Nukleinsäuren mit Digoxigenin-gekoppelten Nukleotiden

Für den spezifischen Nachweis von DNA bzw. RNA-Fragmenten in Hybridisierungsexperimenten wurden zur Sondensynthese Digoxigenin (DIG)-gekoppelte Nukleotide (Roche, Mannheim) verwendet. Zum spezifischen Nachweis Digoxigenin-markierter DNA wurde ein Digoxigenin-spezifischer, monoklonaler Antikörper gekoppelt mit dem Enzym Alkaline Phosphatase (AP) (Roche, Mannheim) verwandt. Der Nachweis erfolgte mittels des chemilumineszenten Substrates CSPD™ (Roche, Mannheim), das beim durch AP gekoppelten Zerfall ein Lumineszenzsignal der Wellenlänge 447 nm emittiert, welches mit Röntgenfilm detektiert wurde.

2.3.3.1 Synthese DIG-markierter cDNA

Die Synthese DIG-markierter cDNA erfolgte wie bei (2.3.2) beschrieben, anstelle der dort beschriebenen Nukleotidmischung wurde eine Mischung von dATP, dGTP und dCTP mit einer

Konzentration von je 0,5 mM, von 0,195 mM dTTP und zusätzlich 0,07 mM DIG-11-dUTP (Roche, Mannheim) verwandt.

2.3.3.2 PCR mit DIG-markierten Nukleotiden

Zum Nachweis einer spezifischen cDNA auf dem cDNA-Array (2.5.2) diente eine homologe DIG-markierte Sonde, die mittels PCR (2.2.2) aus cDNA und genspezifischen Primern hergestellt wurde. Anstelle der herkömmlichen Nukleotide wurde der „PCR DIG Probe Synthesis Mix“ (Roche, Mannheim) verwendet, der neben dTTP DIG-markiertes UTP enthielt.

2.3.3.2 Reinigung und Überprüfung DIG-markierter cDNAs

Freie Nukleotide wurden von den Sonden mit „MicroSpin Columns S-300 Hr“ (Amersham, Schweden) abgetrennt. Dazu wurde der Sondenansatz mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt und auf die Säule aufgetragen. Während einer einminütigen Zentrifugation passieren freie Nukleotide und Oligonukleotide (< 100 Basen) die Säule, während die höhermolekularen DNA-Synthese- und PCR-Produkte an die Säulenmatrix binden. Die Elution erfolgte im geeigneten Volumen H₂O (30-50 µl). Zur Kontrolle der durch PCR gewonnenen DIG-markierten Sonden wurde 1/10 des Markierungsansatzes im Agarosegel aufgetragen und die Größe des PCR-Produkts überprüft. Um den Ertrag der DIG-Markierung von PCR-Sonde und DIG-markierter cDNA zu bestimmen, wurden die hergestellten Sonden mit markierter Kontroll-DNA aus dem „labeling-Kit“ (Roche, Mannheim) verglichen. Dazu wurden Verdünnungsreihen auf eine Membran aufgetropft und detektiert. Der Vergleich der Intensität der jeweiligen „Spots“ erlaubt die ungefähre Quantifizierung der Markierungsreaktion.

2.4 Nachweis Membran-gebundener DNA mit DIG markierter cDNA-Sonde

2.4.1 Hybridisierung

Hybridisierungspuffer:

4 x	SSC
0,1 %	SDS
0,5 %	N-Lauroylsarcosin
10 %	Blocking-Solution (Roche, Mannheim)
50 %	Formamid
0,1 mg/ ml	denaturierte Heringssperma-DNA

RNase-freies Wasser:

Zur Herstellung von RNase-freiem Wasser wurde 1 l Wasser mit 1 ml DEPC (Diethylpyrocarbonat) versetzt und 5 h lang gerührt. Anschließendes Autoklavieren führte zur Zersetzung des DEPCs.

Southern- und Northernblots wurden bei 42 °C in 30 ml Hybridisierungspuffer inkubiert. Nach 2 h wurde diese Lösung gegen frische Hybridisierungslösung ausgetauscht, die zwischen 5 und 15 ng denaturierte (10 min, 95 °C), DIG-markierte Sonde enthielt. Während der 10- bis 18-stündigen Inkubation konnte die Sonde mit der auf der Membran fixierten DNA hybridisieren. Nicht oder unspezifisch gebundene Sonde wurde anschließend in vier Waschstufen abgewaschen. Dazu wurden die Membranen zweimal 15 min in 2 x SSC/ 0,1 % SDS bei Raumtemperatur und zweimal für 15 min in 0,5 x SSC/ 0,1 % SDS bei 42 °C inkubiert. Bei Northern-Blots wurden alle Lösungen zur Vermeidung von RNase-Kontamination mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt.

2.4.2 Detektion durch Chemilumineszenz

Digoxigenin-markierte Nukleinsäuren wurden unter Verwendung des „DIG Nucleic Acid Detection Kit“ (Roche Mannheim) nachgewiesen. Es handelt sich dabei um einen Enzym-Immunassay, bei dem ein gegen Digoxygenin gerichteter Antikörper, der wiederum an alkalische Phosphatase konjugiert ist, die DIG-Markierungen der Sonde erkennt. Durch Umsetzung von CSPD (Roche, Mannheim) werden an den Stellen, an denen die Sonde

gebunden ist, Lichtquanten freigesetzt. Diese chemilumineszente Reaktion konnte mittels eines Röntgenfilmes visualisiert werden.

Maleinsäurepuffer:

100 mM	Maleinsäure/ NaOH pH 7,5
150 mM	NaCl

Waschpuffer:

Maleinsäurepuffer mit 0,3 % (v/v) Tween 20

Blockinglösung:

10% (w/v)	Blocking reagent (Roche Mannheim) in Maleinsäurepuffer
-----------	---

Blockpuffer:

1% (w/v)	Blockinglösung in Maleinsäurepuffer
----------	-------------------------------------

Detektionspuffer:

100 mM	Tris-Cl pH 9,5
100 mM	NaCl

Nach dem Hybridisieren und Waschen der Membranen folgte eine 1-minütige Äquilibration in Waschpuffer. Anschließend wurden diese zur Absättigung der unspezifischen Antikörperbindungsstellen für 30 min in Blockpuffer inkubiert und danach in 150 U/ ml Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat (in Blockpuffer) bewegt. Nicht gebundene Antikörper wurden durch zweimaliges jeweils 15-minütiges Waschen in Waschpuffer entfernt. Zur Detektion wurden die Membranen 1 min in Detektionspuffer äquilibriert, bevor sie zwischen zwei Lagen „Saran-Wrap“ Folien (Dow-Chemicals, USA) für 5 min mit dem chemilumineszenten Substrat CSPD (Roche, Mannheim) inkubiert wurden. Danach wurden die Membranen zum Reaktionsstart zwischen der Folie für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Membranen auf Röntgenfilm (x-Ray-Retina, XBD, Intas Göttingen) aufgelegt. Die Expositionszeiten des Röntgenfilms hingen von der Art der Anwendung ab und lagen zwischen 30 min und 12 h.

2.5 cDNA-Arrays

Neben den Methoden des Northern-Blots und der RT-PCR ist die Hybridisierung von cDNA- oder Oligonukleotid-basierten Arrays eine Methode der Expressionsanalyse, die im Vergleich zu den beiden erstgenannten Methoden den Vorteil bietet, eine Vielzahl von Genen gleichzeitig analysieren zu können (Baldwin et al., 1999).

2.5.1 Herstellung der cDNA-Arrays

Zur Herstellung von cDNA-Arrays wurden mit cDNA (2.3.2) von *M. crystallinum* als Matrize jeweils 500 Bp lange genspezifische Fragmente aus den kodierenden Bereichen der Transkripte amplifiziert. Nach Auftragung eines Aliquots auf ein Agarose-Gel zur Überprüfung der Homogenität des erhaltenen Produktes, wurde die DNA mit Ammonium-Acetat basierter Fällung präzipitiert und in dest. H₂O in einer Endkonzentration von 100 ng/µl aufgenommen. Die DNA wurde im Genom-Zentrum (Universität Bielefeld) mittels eines Pipettierroboters in einem 96-Muster auf eine Hybond N-Nylonmembran (Amershan, Schweden) aufgetragen.

2.5.2 Hybridisierung der cDNA-Arrays mit DIG-markierter cDNA

Die auf die Membran transferierten DNA-Fragmente wurden vor der Hybridisierung mittels UV-Bestrahlung (240 nm, 0,125 J/cm², Stratalinker, Stratagene) auf der Membran fixiert. Die Hybridisierung erfolgte wie in (2.4) beschrieben. Die Hybridisierung wurde mit den cDNAs von 6 verschiedenen Bedingungen (1 Kontrolle und 5 Stresszustände) parallel durchgeführt, die 6 Arrays wurden gleichzeitig auf Röntgenfilme gelegt und jeweils 1 h exponiert. Die belichteten Filme wurden im Durchlichtscanner (JX 303, Sharp, Japan) eingescannt.

2.5.3 Auswertung von cDNA-Arrays

Die Auswertung erfolgte mittels des Programms „Aida Image Analyzer“ (Raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland) durch Bestimmung der Grauwerte der detektierten Spots. Die

Grauwerte der beiden parallel gespotteten DNAs jedes spezifischen Transkripts wurden addiert und danach gemittelt, wenn beide Werte nicht mehr als 50 % differierten. Die Grauwerte der unbedruckten Mitte eines jeden gestempelten Blockes wurde als Nullwert definiert und von den erhaltenen Mittelwerten abgezogen. Die auf diese Weise ermittelten Grauwerte wurden für jede Hybridisierung im Vergleich zu dem für Aktin ermittelten Grauwert (= 100) normalisiert. Zum Vergleich der mit verschiedenen cDNAs inkubierten Arrays wurden die erhaltenen Werte jeder Position einer Hybridisierung im Vergleich zu der entsprechenden Positionen des mit der Kontroll-cDNA hybridisierten Arrays (= 100) normalisiert. Die Werte von jeweils drei durchgeführten Parallelen wurden anschließend addiert und ihre Standardabweichung errechnet. Als signifikant wurden Werte angesehen die 50 % über oder unter dem Wert der entsprechenden Position auf dem mit Kontroll-cDNA hybridisiertem Array lagen.

2.6 Sequenzierungen

Die Sequenzierung von PCR-Produkten bzw. Plasmid-DNA wurde von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt.

2.7 Sequenzanalyse

Zur Sequenzanalyse wurden die folgenden Internet-Angebote genutzt:

European Molecular Biology Laboratory (EMBL)	http://www.embl-heidelberg.de
EMBL European Bioinformatics Institute (EBI)	http://www.ebi.ac.uk
Datenbanken der Arabidopsis Genome Initiative	http://www.mips.gsf.de http://www.tigr.org
ExPASy Molecular Biology Server	http://www.expasy.ch
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
EBI-Sequence Retrieval System (SRS)	http://srs6.ebi.ac.uk/

Sequenzvergleiche wurden mittels des Programms ClustalW (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalW/>) erstellt.

Die Sequenzbearbeitung sowie die Analysen von DNA- und Aminosäuresequenzen erfolgte durch das Programm DNAsis (Hitachi, Japan)

2.8 Klonieren von DNA

Zur Analyse unbekannter Gensequenzen war es nötig diese aus einer cDNA-Bank von *M. crystallinum* (Bolte et al., 2000) mittels RACE-PCR zu amplifizieren, zu klonieren und zu sequenzieren.

2.8.1 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit dem „Topo TA Cloning Kit“ (Invitrogen, USA) kloniert. Das Prinzip beruht darauf, dass bei einer PCR mit Taq-Polymerase matrizenunabhängig ein Desoxyadenosin an das 3'-Ende des PCR-Produkts angehängt wird. Zur Klonierung wird das PCR-Produkt zusammen mit dem linearisierten pCR2.1-Vektor (Invitrogen, USA) mit Desoxythyminüberhang und rekombinanter Topoisomerase bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Das Ligationprodukt wurde in ultrakompetente „One Shot™ Cells“ des Stamms Top10F' (Invitrogen, USA) transformiert.

2.8.2 Klonierung von Genen aus cDNA-Banken

2.8.2.1 Anzucht und Lagerung von cDNAs in *E. coli*

LB-Medium:

1 % (w/v)	NaCl
1 % (w/v)	Bacto-Trypton
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt

LB-Nährböden:

1,5 % (w/v)	Agar-Agar in LB-Medium
-------------	------------------------

Die Bakterien wurden auf LB-Nährböden ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Vermehrung wurde ein gewachsener Bakterienklon in das gewünschte Volumen LB-Medium überführt, dem je nach Anforderungen des Stammes bzw. Vektors Hilfsstoffe (0,2 % (w/v) Maltose und 10 mM MgSO₄) bzw. Antibiotika (50 µg/ ml Ampicillin, 25 µg/ ml Kanamycin oder 5 µg/ ml Tetracyclin) zugesetzt wurden.

2.8.2.2 Herstellung kompetenter Zellen

CaCl₂-Lösung:

60 mM	CaCl ₂
10 mM	PIPES
15 % (w/v)	Glyzerin
pH 7,0 KOH	

Die Bakterien wurden in 200 ml LB-Medium bis zur logarithmischen Phase (OD₅₉₀= 1,0) angezogen, bevor die Zellen aus der 10 min auf Eis gekühlten Suspension sedimentiert (1600 x g für 7 min) und in 10 ml eiskaltem CaCl₂-Medium resuspendiert wurden. Nach zwei weiteren Zentrifugationsschritten (1600 x g für 5 min) und erneutem Resuspendieren in 10 ml eiskalter CaCl₂-Lösung wurden die Bakterien 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert (1600 x g, 5 min) und in 2 ml eiskaltem CaCl₂-Medium resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden Aliquots von je 200 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Kompetenz wurde durch eine Probetransformation eines bekannten Plasmids als Anzahl gewachsener Kolonien pro µg eingesetzter DNA bestimmt.

2.8.2.3. Transformation von *E.coli* mit Plasmiden

Zur Transformation wurden 200 µl kompetente Zellen (2.8.2.2) mit 10 bis 100 ng Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Durch einen Hitzeschock (42 °C, 30 s) wurde die Bakterienmembran für Makromoleküle permeabilisiert. Dadurch konnten einzelne Zellen Plasmide aufnehmen. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Zellen 1 h bei 37 °C

inkubiert. Selektioniert wurden die Transformanten durch Ausstreichen auf Nährböden, die einen nur für transformierte Zellen verträglichen Selektionsfaktor enthielten.

2.8.3.4 RACE-PCR

Die 5'- und 3'-RACE-PCR (Rapid-Amplification of cDNA 5' and 3'-Ends) mit dem Marathon cDNA-Amplifikationskit (Clontech, USA) wurde verwendet, um die Volllänge eines bereits bekannten Partialklons mittels PCR zu isolieren (Chenchik et al., 1996). Für die PCR wird eine cDNA-Bank mit an das 5'- und 3'-Ende der c-DNA ligierten Adaptoren verwendet. Diese Adaptoren besitzen an ihren 5'-Enden 50 bp lange Sequenzen mit Bindungsstelle für zwei einwärtsgerichtete Primer AP1 und AP2. Aus der bereits bekannten Sequenz des Partialklons werden zwei Primer abgeleitet, die zum 5'-Ende bzw. zum 3'-Ende des Klons weisen. Für das 5'- und das 3'-Ende werden zwei getrennte PCR-Ansätze durchgeführt.

PCR-Ansatz (50 µl):

5 µl	cDNA mit Adaptoren 1:250 verdünnt
5 µl	PCR-Puffer (Clontech, USA)
1 µl	Primer AP1 10 pM
1 µl	Primer für das 5'- oder 3'-Ende 10 pM
1 µl	dNTPs 10 µM
1 µl	Advantage Taq Poymerase Mix (Clontech, USA)

Die PCR-Produkte wurden zur Charakterisierung kloniert (2.8.1).

2.9 *In vitro* Translation von Proteinen

Neben der heterologen Expression von Proteinen in *E. coli* gibt es weitere Möglichkeiten Protein zu synthetisieren. Mittels einer *in vitro* Translationsreaktion wird der isolierte Translationsapparat der eukaryontischen Zelle (zumeist Retikulozytenlysat von Kaninchen oder Weizenkeim-Extrakt) zur Proteinproduktion genutzt. Um die dabei entstandenen geringen Mengen an Protein zu markieren, wird die Translationsreaktion zumeist in Gegenwart einer radioaktiv markierten Aminosäure durchgeführt.

2.9.1 Translation von klonierter DNA mit „TNT[®] Coupled“ Retikulozytenlysat

Im Gegensatz zu den einstufigen *in vitro*-Translationsverfahren entfällt bei der gekoppelten *in vitro*-Translation der vorhergehende Schritt der RNA-Transkription. Das Lysat enthält zusätzlich zum Apparat der eukaryotischen Proteinbiosynthese T7-RNA-Polymerase, die es ermöglicht, von DNA ausgehend Proteine zu synthetisieren. Ein Standard-Ansatz mit radioaktivem Methionin beinhaltet folgende Komponenten:

Ansatz:

25 µl	„TNT [®] Rabbit Reticulocyte Lysate“ (Promega GmbH, Mannheim)
2 µl	TNT [®] Reaktionspuffer
1 µl	TNT [®] T7-RNA-Polymerase
1 µl	1 mM Aminosäuremischung ohne Methionin
2 µl	³⁵ S-Methionin (> 1000 Ci/ mmol bei 10 mCi/ ml)
1 µl	RNasin [®] (Promega GmbH, Mannheim) Ribonuklease-Inhibitor (40 u/ µl)
2 µl	DNA-Matrize (0,5 µgr/ µl) Phenol/ Chloroform extrahiert
ad 50 µl	Nuclease-freies Wasser

Der Translationsansatz wurde auf Eis zusammengefügt und die Reaktion für 90 min bei 30 °C inkubiert. Der Erfolg der Translation wurde durch die Messung des Einbaus von ³⁵S-Methionin (2.9.2) und durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließendem Einbau eines Fluorophors (2.9.3) überprüft.

2.9.2 Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)

Die TCA-Fällung translatierter Proteine erlaubt die Abschätzung des tatsächlichen Einbaus von ³⁵S-Methionin. Hierzu wird ein Teil des Translationsansatzes auf einem Filter fixiert. Die nicht eingebauten ³⁵S-Methioninmoleküle bzw. mit ³⁵S-Methionin beladenen t-RNAs werden abgewaschen bzw. hydrolysiert.

2 µl der Translationsreaktion (2.9.1) wurden auf ein 1 cm² großes Stück Whatman-3MM Papier pipettiert und getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Filter für 10 min in kochende 25 %ige (w/v) TCA gegeben und anschließend mit eiskalter 25 %iger (w/v) TCA, H₂O und einer Aceton/ Ethanol-Lösung (1:1) gewaschen. Die getrockneten Filter wurden in Szintillationsröhrchen mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Aquasol-2, Packard BioScience,

Meriden, USA) überführt und die Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (1900CA TRI-Carb, Packard BioScience, USA) gemessen.

2.9.3 Analyse von Translationsprodukten mittels Fluorographie von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Mit Hilfe der Fluorographie können radioaktiv markierte Proteine nachgewiesen werden. Dazu werden Szintillatoren verwendet, die die radioaktive Energie in Fluoreszenz umwandeln, die dann mittels eines Röntgenfilms visualisiert werden kann. Zum Nachweis der ³⁵S-markierten Proteine in einem Translationsansatz wurden 20 µl dieses Ansatzes auf einem PAGE-Gel aufgetrennt und anschließend 20 min in 10 % (v/v) Essigsäure fixiert und durch Inkubation in Dimethylsulfoxid (DMSO) für 2 x 20 min entwässert. Die Imprägnierung mit der Szintillationssubstanz Diphenyloxzol (PPO) erfolgte mit 20 % (v/v) in DMSO. Beim anschließenden Waschen in Wasser (zweimal 20 min) kristallisierte das wasserunlösliche PPO aus. Im Anschluss an eine zweimalige 15-minütige Inkubation mit 40 % (v/v) Methanol wurde das Gel zwischen zwei Lagen Cellophan gespannt und über Nacht getrocknet. Zur Autoradiographie wurde ein Röntgenfilm auf dem Gel über Nacht bei -80 °C exponiert.

2.10 Gewinnung von pflanzlicher RNA mit der Guanidinisothiocyanant-Methode

RNA-Extraktionspuffer :

4 M	Guanidinisothiocyanat
25 mM	Natriumcitrat
0,5 %	N-Lauroylsarcosin
0,1 M	β-Mercaptoethanol

Je 1 g Pflanzenmaterial wurde in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser zu feinem Pulver zermahlen. Das noch gefrorene Pulver wurde mit 10 ml RNA-Extraktionspuffer versetzt. Nach 30-sekündigem Vortexen wurde 1 ml 2 M Natriumacetat hinzugegeben. Nach erneutem Durchmischen und anschließender Zugabe von 10 ml wassergesättigtem Phenol und eines 24:1 Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches und abschließender Zentrifugation (10 min, 20 °C, 5000 x g) erfolgte die Phasentrennung.

Die wässrige Phase wurde anschließend abgenommen und mit einem Volumenteil Isopropanol versetzt und bei -20 °C für 1 h inkubiert. Anschließende Zentrifugation (10 min, 4 °C, 10000 x g) bewirkte eine Sedimentation der RNA. Zum Reinigen wurde das Präzipitat in 5 ml Extraktionspuffer gelöst und wie oben mit Isopropanol gefällt. Nach einer 20-minütigen Lufttrocknung wurde das Präzipitat in 200 µl mit DEPC-behandeltem H₂O gelöst und bei -80 °C aufbewahrt. Mengen- und Reinheitsbestimmung erfolgte am Photometer durch Messung der Absorption bei 260 und 320 nm (2.2.9).

2.11 Klonierung von Fusionsproteinen

Im Gegensatz zur Aufreinigung von Proteinen aufgrund ihrer chemischen Charakteristika ist die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie ein zeitsparendes Verfahren. Das zu exprimierende Proteine wird hierbei in einen Expressionsvektor kloniert, der im selben Leseraster wie die zu exprimierende Sequenz N- oder C-terminal für einen zur Affinitätschromatographie geeigneten Anhang, wie z.B. Biotin oder 6 x His, codiert. Im Rahmen dieser Arbeit erwies sich die Aufreinigung mittels eines 6 x His-Anhangs als die geeignetste Methode, da die Chromatographie unter nativen, wie auch denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden konnte.

2.11.1 6 x His-Fusionsproteine

Zur heterologen Expression in *E. coli* wurden die für die Aminosäureabfolge kodierenden cDNA-Sequenzen in den Vektor pCR-T7-NT-Topo (Invitrogen, Holland) kloniert. Hierzu wurde die kodierende Sequenz mittels PCR (2.2.2) ausgehend von *M. crystallinum*-cDNA (2.3.2.) amplifiziert und auf einem Tris-Acetat-Gel aufgetrennt (2.2.10.1). Die amplifizierte Bande wurde aus dem Tris-Acetat-Gel ausgeschnitten und eluiert (2.2.8). 1 µl dieses Eluats wurde in Gegenwart von 0,5 µl linearisiertem, mit Topoisomerase versehenem Vektor pCR-T7-NT in einem Gesamtvolumen von 5 µl für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit dem entstandenen Ligationsprodukt wurden für die Aufnahme von DNA kompetente *E. coli*-Bakterien des Stamms JM109 (2.8.2.2) transformiert und auf für amp^r-Bakterien selektiven Platten ausgestrichen. Die Analyse der Klone erfolgte durch Kolonien-PCR (2.2.3) und durch Restriktionsverdau (2.2.4).

2.12 Proteinbiochemische Methoden

Um Proteine nachweisen zu können, mussten diese in denaturierenden und reduzierenden Präparationen mittels ihrer Größe elektrophoretisch in polymerisierten Acrylamid-Gelen aufgetrennt werden. Eine weitere Analyse erfolgte durch die Anfärbung von Proteinen mittels Silberfärbung oder Coomassie-Blau-Färbung im Gel. Um spezifische Proteine mit Antisera oder Antikörpern nachzuweisen, mussten die im Gel aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulose-Membranen transferiert werden. Anschließend konnten spezifische Proteine durch die Inkubation mit Antikörpern oder Antisera mit Methoden unterschiedlicher Sensitivität detektiert werden.

Zur Aufreinigung rekombinanter Fusionsproteine wurden diese in *E. coli* exprimiert. Der lösliche Anteil von lysierten *E. coli* wurde nach der Expression einer Metallionen-Affinitätschromatographie unterzogen.

2.12.1 Elektrophoretische Trennung von Proteinen mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Trenngel:

12- 16 % (w/v)	Acrylamid
34 % (w/v)	Bisacrylamid
25 % (v/v)	1,5 M Tris-Cl, pH 8,8
0,03 % (w/v)	TEMED
0,45 % (v/v)	AMPS (10 % (w/v))

Sammelgel:

5,84 % (w/v)	Acrylamid
34 % (w/v)	Bisacrylamid
25 % (v/v)	1,5 M Tris-Cl, pH 8,8
0,03 % (w/v)	TEMED
0,45 % (v/v)	AMPS (10 % (w/v))

Reservoirpuffer:

14,4 % (w/v)	Glycin
3 % (w/v)	Tris
0,1 % (w/v)	SDS

2x Probenpuffer

125 mM	Tris-Cl, pH 8,8
10 mM	DTT
2,3 % (w/v)	SDS
10 % (v/v)	Glyzerin
0,01 % (w/v)	Bromphenolblau

Die SDS-PAGE ist eine effiziente Methode, um Proteine aufgrund ihrer Größe zu trennen. SDS (Sodiumdodecylsulfat) dient dabei als anorganisches Detergenz, das an die hydrophoben Regionen denaturierter Proteine bindet und diese annähernd proportional zu ihrer Größe mit negativen Ladungen versieht. Bei der Elektrophorese wandern nun diese Proteine aufgrund ihrer Ladung durch das Gel in Richtung Anode und werden so entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Große Proteine wandern infolge der Molekularsiebwirkung des polymerisierten Polyacrylamids langsamer durch das Gel als kleine Proteine. Eventuell vorhandene Disulfidbrücken, die Tertiärstrukturen in Proteinen bilden, werden zuvor durch Zugabe von DTT oder β -Mercaptoethanol bei gleichzeitigem Erhitzen reduziert. Die Auftrennung der extrahierten Proteine erfolgte in Polyacrylamidgelen (12-16 % (w/v), pH 8,8) mit einem diskontinuierlichen Tris-Glycin-Puffersystem (Laemmli, 1970). Die Proteinextrakte wurden 1:1 mit Probenpuffer versetzt, 10 min auf 95 °C erhitzt und in einem Sammelgel (6 % (w/v) Acrylamid, pH 6,8) auf eine enge Startzone konzentriert, um eine schärfere Auftrennung der Polypeptide zu erreichen.

2.12.2 Detektion von Proteinen

2.12.2.1 Coomassie-Blau-Färbung

Die Coomassie-Färbung stellt eine einfache Methode dar, die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen. Die Nachweisgrenze liegt bei 100 ng. Die Gele wurden zunächst für mindestens 1 h in Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend bis zur Sichtbarkeit der Banden entfärbt. Zur Dokumentation wurden die Gele im Durchlichtscanner (Sharp JX 330) digitalisiert.

Färbelösung:

50 % (v/v)	Methanol
2 % (v/v)	Essigsäure
0,1 % (v/v)	Coomassie Brilliantblau

Entfärbelösung:

40 % (v/v)	Methanol
7 % (v/v)	Essigsäure

2.12.2.2 Silberfärbung von PAGE-Gelen

nach Blum et al. (1987)

Fixierlösung:

50 % (v/v)	Methanol
12 % (v/v)	Essigsäure
0,5 ml/l	37 % Formaldehyd

Färbelösung:

0,2 % (w/v)	AgNO ₃
0,75 ml/l	37 % Formaldehyd

Entwickler:

6 % (w/v)	Na ₂ CO ₃
4 mg/ml	Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O
0,5 ml/l	37 % Formaldehyd

Das Gel wurde im Anschluss an die PAGE (2.12.1) mindestens 15 min lang fixiert. Nachdem es dreimal 10 min in 50 % (v/v) EtOH inkubiert worden war, wurde es 60 s lang in 0,2 g/l Na₂S₂O₃ x 5 H₂O imprägniert. Vor und nach dem Färben (mind. 15 min) wurden die anhaftenden Lösungsreste mit H₂O abgewaschen (3 x 20 s). Anschließend wurden die Gele entwickelt, bis die Proteinbanden die gewünschte Intensität hatten. Die Reaktion wurde in 50 % (v/v) MeOH, 12 % (v/v) Essigsäure abgestoppt. Nach dem Spülen des Gels mit 50 % MeOH, 3 % Glycerin wurde es zur Lagerung zwischen zwei Zellophanfolien aufgespannt und getrocknet.

2.12.3 Western-Blot

10 x Blotpuffer Anode:

300 mM	Tris-Cl, pH 10,4
15 %	Methanol

1 x Blotpuffer Kathode:

20 mM	Tris-Cl, pH 9,4
40 mM	6-Amino-n-Caprone Säure
15 %	Methanol

TBS-Puffer:

25 mM	Tris-Cl, pH 7,5
150 mM	NaCl

TBST:

TBS-Puffer	mit 0,1 % Tween
------------	-----------------

Die Proteine wurden nach dem „semi-dry-Verfahren“ (Khyse-Anderson, 1984) aus Polyacrylamidgelen (2.12.1) auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Dazu wurde das Gel in einer Blot-Kammer (Milipore, USA) auf drei Lagen mit 10x Anodenpuffer und zwei Lagen mit 1x Anodenpuffer getränktes Blottingpapier (Whatman 3 mm) gelegt und mit der in H₂O befeuchteten Nitrocellulosemembran und fünf Lagen in 1x Kathodenpuffer getränktem Blottingpapier bedeckt. Nach einer Transferzeit von 30 min bei einer Stromstärke von 1,2 mA/ cm² Gelfläche wurde die Membran in TBST gewaschen und anschließend mit 1 % Milchpulver in TBST inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzudecken.

2.12.4 Immunochemische Nachweise

Um Proteine spezifisch nachweisen zu können, wurden auf Nitrocellulose immobilisierte Proteine mit Antiseren bzw. Antikörpern, die gegen das interessierende Protein oder Protein-Teilfragment gerichtet sind, inkubiert. Detektiert wurden die Protein-Antikörper-Komplexe durch Antikörper die spezifisch die Immunglobuline des zur Immunisierung verwendeten

Tiers erkennen. Diese sogenannten sekundären Antikörper sind wiederum mit Enzymen gekoppelt, die spezifisch Farb- oder Fluoreszenz-Substrate umsetzen können.

2.12.4.1 Nachweis der Aktivität der alkalinen Phosphatase mit NBT und BCIP

Entwicklerlösung:

30 mg/ ml	NBT in 70 % (v/v) Dimethylformamid/ 30 % H ₂ O
15 mg/ ml	BCIP in 100 % (v/v) Dimethylformamid

Carbonatpuffer:

100 mM	NaHCO ₃
1 mM	MgCl ₂

Der abgesättigte Western-Blot (2.12.3) wurde über Nacht mit Antiserum in geeigneter Verdünnung in 1 % (w/v) Milchpulver in TBST inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit 1 % (w/v) Milchpulver in TBST ausgewaschen. Um die spezifischen Antikörper-Antigen-Komplexe nachzuweisen, wurden Antikörper eingesetzt, die das Immunglobulin G (IgG) des Antiserum-produzierenden Tieres erkennen und an die das Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Der Western-Blot wurde mit diesem sekundären Antikörper in 1 % (w/v) Milchpulver in TBST für 3 h inkubiert. Die alkalische Phosphatase ermöglicht die Detektion der Protein-Antikörper-Anti-IgG-Komplexe durch radikalkatalysierte Umsetzung von NBT. Sie erfolgte nach dreimaligem Waschen der Membran in TBST und Voräquilibrieren in Carbonatpuffer mit 1:200 in Carbonatpuffer verdünnter Entwicklerlösung. Sobald die gewünschte Farbtiefe erreicht war, wurde die Reaktion durch Spülen mit Wasser gestoppt.

2.12.4.2 Detektion mittels Chemilumineszenz

Alternativ zur Detektion der auf den Western-Blot transferierten Proteine durch BCIP und NBT wurden diese mit dem Lumi-Light^{PLUS} Western-Blot-Substrat (Roche Mannheim) nachgewiesen, dessen chemilumineszentes Signal auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann. Die Vorteile dieses Substrats gegenüber der konventionellen Methode mit NBT und BCIP liegen in der erhöhten Sensitivität (> 5 pg Antigen) und der Möglichkeit, denselben

Blot mehrmals mit verschiedenen Antikörpern zu verwenden. Im Anschluss an den Transfer der aufgetrennten Proteine (2.12.3) wurde die Membran dreimal für 2 min in TBST gewaschen, um die Hintergrundfärbung zu reduzieren. Nach Absättigung der freien Proteinbindungsstellen auf der Membran mit 5 % (w/v) Milchpulver in TBST für mindestens 30 min wurde die Membran unter konstantem Schütteln für 60 min in primärer Antikörperlösung in geeigneter Verdünnung bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem 2-minütigen Waschen in TBST zur Entfernung ungebundenen Antikörpers, wurde die Membran in sekundärer Antikörperlösung in geeigneter Verdünnung inkubiert. Dieser sekundäre Antikörper ist an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, die das Substrat Lumi-Light^{PLUS} (Roche, Mannheim) umsetzt und ein chemilumineszentes Signal freisetzt, das auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht werden kann.

2.12.5 Heterologe Expression von rekombinanten Fusionsproteinen in *E. coli*

Die heterolog exprimierte Fusionsproteine enthielten N-terminal eine Abfolge von 6 Histidinresten („His-Tag“), die eine Aufreinigung durch eine Metall-Affinitäts-Chromatographie ermöglichte. Diese Methode basiert auf einer Säulenmatrix aus Nickel-Nitrilotriacetat (Ni-NTA). Die Histidinreste binden mit einer hohen Affinität an die Nickel-Ionen der Säulenmatrix und ermöglichen so die selektive Bindung der Fusionsproteine an die Säule und das Abtrennen der sonstigen Extrakt-Bestandteile. Durch geeignete Puffer kann das heterolog exprimierte Fusionsprotein anschließend von der Säule eluiert werden.

2.12.5.1 *E. coli*-Kulturen für präparative Aufreinigung

In 20 ml mit passenden Antibiotika versetztem LB-Medium wurde über Nacht bei 37 °C unter Schütteln eine mit einem geeigneten Vektor transformierte *E. coli*-Vorkultur angezogen. Mit der ÜN-Kultur wurde am nächsten Morgen eine 1 Liter-Kultur (LB und Antibiotika) versehen und bis zum Erreichen einer OD₅₉₀ von 0,6 bei 37 °C inkubiert. Die Expression des rekombinanten Proteins wurde durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 500 µM induziert. Zur Produktion des Proteins wurde die Kultur weitere vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienkulturen durch Zentrifugation bei 4000 x g sedimentiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

2.12.5.2 Präparation und Aufreinigung von Fusionsproteinen aus *E. coli*-Lysaten

2.12.5.2.1 Präparation von nativen *E. coli*-Lysaten und Aufreinigung von Fusionsproteinen unter nativen Bedingungen

nativer Lysepuffer:

50 mM	NaH ₂ PO ₄
300 mM	NaCl
10 mM	Imidazol
	pH 8, HCl

nativer Waschpuffer:

50 mM	NaH ₂ PO ₄
300 mM	NaCl
20 mM	Imidazol
	pH 8 HCl

nativer Elutionspuffer

50 mM	NaH ₂ PO ₄
300 mM	NaCl
250 mM	Imidazol
	pH 8, HCl

Die eingefrorenen *E. coli*-Sedimente wurden für 15 min auf Eis aufgetaut und in nativem Lyse-Puffer resuspendiert (5 ml/ g *E. coli* Nassgewicht). Nach Zugabe von 1 mg Lysozym (Sigma, Deisenhofen) pro ml resuspendiertem *E. coli*-Extrakt wurde das Gemisch für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Unterstützung der Lyse wurde das inkubierte Zelllysate mittels Ultraschall (6 x 10 s, Beschallung, 300 W) homogenisiert. Zum Abtrennen der nicht löslichen Zellbestandteile wurde das Gemisch für 30 min (10.000 x g) bei 4 °C zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde mit 1 ml 50 % Ni-NTA-Gemisch (Quiagen, Heidelberg) pro 4 ml nativem Lysat versetzt und für 60 min bei 4 °C geschüttelt. Anschließend wurde das Gemisch über eine leere Chromatographiesäule mit Glasfritte gegeben. Nicht an die Ni-NTA-Matrix gebundenes Protein befand sich in der Durchflussfraktion. Zum Entfernen von unspezifisch bindenden Proteinen wurde die Matrix anschließend zweimal mit 4 ml nativem Waschpuffer gewaschen. Die gebundenen Fusionsproteine wurden mit nativem Elutionspuffer in vier 0,5 ml Fraktionen von der Säule eluiert.

2.12.5.2.2.. Herstellung von denaturierten *E. coli*-Lysaten und Aufreinigung von 6x His-Fusionsproteinen

denaturierender Lyse-Puffer:

100 mM	NaH ₂ PO ₄
10 mM	Tris-Cl
8 M	Harnstoff
	pH 8,0

denaturierender Wasch-Puffer:

100 mM	NaH ₂ PO ₄
10 mM	Tris-Cl
8 M	Harnstoff
	pH 8,0

denaturierender Elutionspuffer A

100 mM	NaH ₂ PO ₄
10 mM	Tris-Cl
8 M	Harnstoff
	pH 5,9

denaturierender Elutionspuffer B

100 mM	NaH ₂ PO ₄
10 mM	Tris-Cl
8 M	Harnstoff
	pH 4,5

Die eingefrorenen *E. coli*-Sedimente wurden für 15 min auf Eis aufgetaut und pro Gramm *E. coli* Nassgewicht in 5 ml denaturierendem Lysepuffer resuspendiert. Das Gemisch wurde 30 min unter sachtem Schütteln bei RT inkubiert und anschließend für 30 min (10000 x g, RT) zentrifugiert. Zu jeweils 4 ml denaturierten und geklärten Überstand wurde 1 ml 50 %ige Ni-NTA-Matrix gegeben und 60 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Granulat-Lysat-Gemisch wurde anschließend in eine leere Chromatographiekolumne mit Glasfritteneinsatz gegeben. Der Durchlauf enthielt nicht an die Matrix gebundene Proteine. Unspezifisch bindende Proteine wurden durch viermaliges Waschen mit jeweils 4 ml denaturierendem Waschpuffer von der Säule entfernt. Spezifisch gebundene 6 x His-Fusionsproteine wurden in vier 0,5 ml Fraktionen mit denaturierendem Elutionspuffer eluiert.

2.12.5.3 Elution von Proteinen aus präparativen PAGE-Gelen

Zur präparativen Aufreinigung von heterolog exprimierten Fusionsproteinen wurde eine Elutionsfraktion (0,5 ml) einer Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit einer 0,01 % Coomassie-Blau-Lösung angefärbt. Die Entfärbung wurde mit 5 % Essigsäure in H₂O durchgeführt. Die unter diesen Entfärbbedingungen schwach sichtbare Proteinbande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und in 1 mm große Stücke zerkleinert. Aus diesen Stücken wurden in einem Elektroelutionsgerät (Biometra, Göttingen) das Protein mittels Elektrophorese unter Hochsalzbedingungen (3 M (NH₄)₂SO₄) eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden anschließend vereinigt und das Protein mittels weiterer Zugabe von (NH₄)₂SO₄ zu einer Endkonzentration von 5 M und in Kälte ausgefällt. Das präzipitierte Protein wurde nach einer anschließenden Zentrifugation in TBS aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.12.6 Isolierung von Pflanzenmembranen

Membranisolierungspuffer:

20 mM	Hepes
100 mM	NaCl
10 mM	EDTA
5 mM	MgCl ₂
1 mM	DTT
	pH 7,5

10 g Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff zerrieben und das Pulver anschließend in 10 ml Membranisolierungspuffer überführt. Nach dem Filtrieren durch Baumwollgaze wurde das Gemisch bei 2000 x g (5 min, 4 °C) zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand einer weiteren Zentrifugation bei 5000 x g (10 min, 4 °C) unterworfen. Der resultierende Überstand wurde bei 100.000 x g (1,5 h, 4 °C) zentrifugiert. Die sedimentierte Endomembranfraktion wurde danach in 600 µl Membranisolierungspuffer mit 0,5 % CHAPS aufgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.12.7 Proteinbestimmung mit dem Biorad-Assay

Der Biorad-Protein-Assay ist eine einfache colorimetrische Methode, um Proteinkonzentrationen zu bestimmen. Der Farbstoff Coomassie Brilliantblau bindet an basische und aromatische Aminosäurereste und die Intensität des Farbkomplexes kann spektralphotometrisch bestimmt werden. 10 µl Proteinpräparation wurden mit 200 µl Biorad-Assay-Lösung und 790 µl H₂O gemischt und die Absorption am Spektralphotometer bei 595 nm bestimmt. Zur Standardisierung wurden Eichreihen mit 2-100 µg BSA mitgeführt.

2.12.8 Herstellung eines Antiserums gegen McVHA-a_{nterm}

Nach heterologer Expression (2.12.5) des Proteins und anschließender präparativer Elution (2.12.5.3) wurde ein Antiserum gegen das rekombinante Fusionsprotein erhoben. Die Immunisierung und Serumaufbereitung wurde von der Firma Pineda (Berlin) durchgeführt.

2.13 Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen

Die Untersuchung der Eigenschaften der Interaktion von Proteinen ist ein wichtiger Aspekt der weitergehenden Charakterisierung eines Polypeptides. Diese Interaktionen lassen durch verschiedene Methoden *in vivo* und *in vitro* nachweisen.

2.13.1 Immunpräzipitation von assoziierten Proteinkomplexen

Die Immunpräzipitation ist eine Methode, um sowohl nicht kovalente wie auch kovalente Protein-Interaktionen zu untersuchen. Hierzu wird eine nativ aufgereinigte Zellfraktion mit dem interessierenden Antikörper inkubiert, der das mit anderen Proteinen wechselwirkende Antigen erkennt. Diese Komplexe werden durch Zugabe von an Sepharose-Kügelchen gekoppeltes Protein A (Pierce Immunochemicals, USA) präzipitiert. Protein A ist ein Protein aus *Staphylococcus aureus*, welches spezifisch die F_c-Domäne der meisten IgG-Moleküle bindet.

Immunpräzitationspuffer:

20 mM	NaH ₂ PO ₄ , pH 7,5
500 mM	NaCl
0,1 %	SDS
1 %	Nonidet P-40
0,5 %	Natriumdeoxycholat
0,02 %	NaN ₃

Nativ aufgereinigte Proteine (2.12.5.2.1), *in vitro*-translatiertes Protein (2.9.1) oder Endomembranpräparationen (2.12.6) wurden mit 50 µl Immunpräzitationspuffer versetzt. Dazu wurde ein molarer Überschuss an primärem Antikörper zugegeben und durch weitere Zugabe von Immunpräzitationspuffer auf ein Endvolumen von 200 µl gebracht. Das Gemisch wurde über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von an Sepharose immobilisiertem Protein A (Pierce Immunochemicals, USA) und zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die präzitierten Komplexe abzentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde sechsmal mit jeweils 200 µl Immunpräzitationspuffer gewaschen. Die an Protein A gebundenen Komplexe wurden durch die zweimalige Zugabe von 25 µl 2 x Probenpuffer (2.12.1) und 10-minütiger Inkubation bei 100 °C eluiert und durch eine SDS-PAGE (2.12.1) aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte anschließend mit Silberfärbung (2.12.2.2) oder Fluorographie.

2.13.2 FRET-Messungen

Die Messung der Interaktion bzw. des Zusammenwirkens zweier verschiedener Proteine ist eine der Kernfragen zur Funktionsanalyse von Proteinen. Neben Methoden wie dem „yeast-two-hybrid System“ ist hier vor allem die Messung von FRET (**F**luorescence **r**esonance **t**ransfer) geeignet, das Zusammenwirken zweier Interaktionspartner nachzuweisen. FRET ist der Transfer von Photonenenergie eines angeregten Fluorophors (dem Donor) auf ein anderes Fluorophor, den Akzeptor, wenn sich beide Fluorophore in ausreichender Nähe zueinander (1-10 nm) befinden (**Abb. 2.13.1 a**). Zur Messung der Interaktion von zwei Proteinen müssen diese mit einem geeigneten FRET-Paar von Fluorophoren gekoppelt sein.

Ein geeignetes FRET-Paar besteht aus zwei Fluorophoren, bei denen das Emissionsspektrum des Donor-Fluorophors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptor-Fluorophors überlappt, und somit bei einer Interaktion der zu untersuchenden Moleküle eine Energieübertragung vom

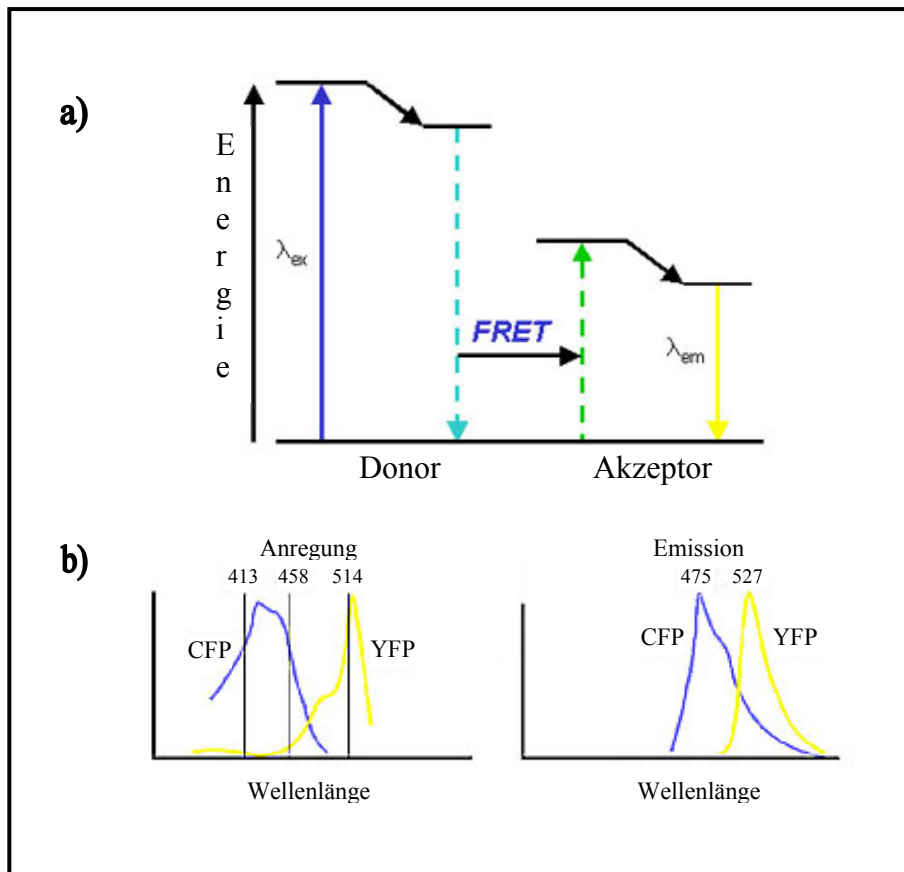


Abb.2.13.1: Prinzip des auf CFP-YFP beruhendem FRET-Effekts. a) Energiediagramm beim Auftreten von FRET. Der Donor (CFP) wird zunächst angeregt. Die meiste Energie der Anregung wird jedoch nicht durch Fluoreszenz des Donors verbraucht, sondern wird beim Vorhandensein von Akzeptoren geeigneter spektraler Eigenschaften, Orientierung und Entfernung strahlungslos auf den Akzeptorfluorophor (YFP) übertragen; dieser wird angeregt und emittiert nun Licht entsprechend seiner Fluoreszenzeigenschaften. b) Anregungs- (linke Abbildung) und Emissionsspektren (rechte Abbildung) des FRET-Paares YFP-CFP.

Donor auf den Akzeptor ermöglicht wird. Ein in der Biologie etabliertes FRET-System besteht aus dem Cyan Fluoreszierenden Protein (CFP) und dem Yellow Fluoreszierenden Protein (YFP) (Abb. 2.13.2 b)), welche Varianten des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP) darstellen. Zur Messung des Energietransfers wird die Fluoreszenz des CFP bei einer Wellenlänge von 420 nm angeregt und die Zunahme der Emission des YFP bzw. die Abnahme der Emission des CFP aufgenommen.

2.14 Mikroskopische Methoden

Zur Lokalisationsuntersuchung eines zu charakterisierenden Proteins innerhalb der pflanzlichen Zelle stehen verschiedene immunologische Methoden zur Verfügung. Zum Nachweis der Lokalisierung werden fixierte, für Antikörper permeabilisierbar gemachte

Zellen mit Antikörpern oder Seren inkubiert. Detektiert werden diese Antigen-Antikörper-Komplexe durch Fluorophor- oder Goldpartikel-gekoppelte sekundäre Antikörper. Bildlich dargestellt werden die markierten Strukturen mit konfokaler Laser-scannender Mikroskopie respektive mit Elektronenmikroskopie.

2.14.1 Immuncytochemie mit Maiswurzelquetschpräparaten

(nach Couchy et al., 1998)

Fixierungspuffer:

5 %	Paraformaldehyd
10 mM	MgSO ₄
10 mM	EGTA
	1 x PBS
	6,8 pH
	ad 50 ml H ₂ O

MBS-Puffer:

10 mM	MgSO ₄
10 mM	EGTA
1 x	PBS
	ad 50 ml H ₂ O

Enzymlösung:

0,1 g	Cellulase
100 µl	Pektinase
	in 10 ml MBS-Puffer

Permeabilisierungspuffer:

0,5 % Triton X-100	in MBS-Puffer
--------------------	---------------

„Blocking“-Puffer

1 % BSA	in MBS
---------	--------

Waschpuffer:

0,1 %	„Telostin Gelatine“ aus Tiefseefischknochen (Sigma, USA) in MBS-Puffer
-------	--

Gekeimte Maiswurzelzellspitzen (2.1.2) wurden 1-2 mm hinter der Wurzelspitze abgeschnitten und für 1 h in Fixierungspuffer inkubiert. Nach 5-maligem Waschen à 10 min wurden die Wurzelspitzen auf Vectobond™-beschichteten, zehnkammrigen Objektträgern mit einem angerauhtem Glasstab vorsichtig zerquetscht und bei RT getrocknet. Nach 15-minütigem Verdau der Zellwand mit Enzymlösung und dreimaligem Waschen in MBS-Lösung wurden die Membranen der auf dem Objektträger gebundenen Pflanzenzellen durch Zugabe von Permeabilisierungspuffer für Antikörper durchlässig gemacht. Nach Waschen und Blocken der unspezifischen Bindestellen durch zwanzigminütige Inkubation mit „Blocking“-Puffer wurde der erste spezifische Antikörper in geeigneter Verdünnung aufgebracht und ÜN bei 4 °C inkubiert. Vor dem Aufbringen des zweiten Antikörpers in geeigneter Verdünnung (spezifisch für IgG-Epitope des immunisierten Tieres, gekoppelt mit einem geeigneten Fluorophor (FITC, Cy3 oder Cy5) (Sigma, Taufkirchen) wurden die Zellen 5 x 10 min mit Waschpuffer inkubiert. Der zweite Antikörper wurde nach einstündiger Inkubation bei RT durch fünfmaliges Waschen entfernt. Zur Doppelimmunlokalisation am gleichen Präparat wurde mit dem zweiten spezifischen Antikörper ebenso verfahren. Zur Anfärbung des Chromatins wurde nach fünfmaligem Waschen des Präparates Propidiumiodid (Sigma, Taufkirchen) verwendet. Die Objektträger wurden anschließend mit Deckglas und Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingham, USA) abgedichtet und die Präparate wie unter (2.14.2) beschrieben analysiert.

2.14.2 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie wurde durchgeführt an einem TCS-Sp2-Mikroskop (Leica, Deutschland) unter Verwendung des LCS-Programms von Leica. Zur Anregung der Fluorophore Cy3 und FITC wurde ein 488 nm Argon-Laser verwandt, für Cy5 ein Helium-Neon Rot Laser mit 633 nm Wellenlänge. Die Emissionsbandbreiten von Cy3 wurden zwischen 560 und 580 nm aufgenommen, Emissionsbandbreiten von FITC zwischen 510 und 530 nm und von Cy5 zwischen 660 und 680 nm. Die anschließende Bildbearbeitung erfolgte mit dem Programm PhotoShop Ver. 6.0 (Adobe, USA).

2.14.3 Immuncytochemie mit dem Elektronenmikroskop

EM-Puffer:

50 mM	KH ₂ PO ₄
50 mM	NaH ₂ PO ₄ , pH 7,0

Zellen aus den Wurzelspitzen von 2 Tage lang gekeimten Maiskörnern (2.1.2) wurden in 2,5 % (w/v) Glutaraldehyd (Serva, Mannheim) in EM-Puffer für 45 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen in EM-Puffer folgte eine ansteigende Entwässerungsreihe in Aceton, anschließend wurden die Proben dreimal für jeweils 10 min in 100 % Aceton belassen. Danach wurden die Proben im Epoxyharz Transmit EM (TAAB Laboratories Equipment, Berkshire, GB) eingebettet. Aus den Präparaten wurden mit einem Diamantmesser (DuPont) ultradünne Schnitte (60-70 nm) an einem Ultramikrotom (Reichert Ultracut E) angefertigt und auf einem 200 mesh Goldnetz fixiert.

Zur Immunmarkierung wurden die Proben mit dem entsprechenden Antikörper in geeigneter Verdünnung (in 10 mM BSA/ TBS, 0,05 % (w/v) NaN₃) für eine Stunde inkubiert, die Netze anschließend fünfmal in TBS gewaschen und für eine weitere Stunde mit goldmarkiertem (15 nm) Antikörper gegen die IgG-Fraktion des Serums des ersten Antikörpers (1:30 in BSA/ TBS) inkubiert. Die Schnitte wurden in 0,1 % (w/v) Uranylacetat (5 s) und anschließend in 2 % (w/v) Bleicitrat entfärbt. Die Präparationen wurden an einem H500 Elektronenmikroskop (Hitachi, Japan) bei 75 kV analysiert.

2.15 Biolistische Transformation

Die biolistische Transformation (Sanford et al., 1987) ist eine Methode, um zellfremde Substanzen mit auf Hochgeschwindigkeit beschleunigten Partikeln in intakte Zellen und Gewebe einzubringen.

Zur transienten Expression von Fusionsproteinen unter Kontrolle des CAMV-35S-Promotors wurden die DNA-Konstrukte mit Hilfe der biolistischen Transformation in Zellen von Zwiebelhäutchen eingebracht. Die DNA wird hierzu an Goldpartikel, die sogenannten „micro-carrier“ (Bio-Rad, USA), präzipitiert. Die „micro-carrier“ werden auf sogenannte „macro-carrier“ (Bio-Rad, USA) aufgebracht, die dann mittels des heliumgetriebenen PDS-

1000 Systems (Bio-Rad, USA) im Vakuum beschleunigt werden. Der beschleunigte „macro-carrier“ trifft auf ein Metallnetz, der sogenannten „stopping-screen“. Dieses abrupte Abstoppen des „macro-carriers“ bewirkt ein Lösen der darauf angetrockneten „micro-carrier“, die daraufhin mit Hochgeschwindigkeit in das zu transformierende Gewebe eindringen.

2.15.1 Präparation der „micro-carrier“:

Für jede Transformation wurden 500 µg Goldpartikel (1,6 µm Ø, Bio-Rad, USA) mit Ethanol (70 % (v/v)) 15 min unter intensivem Vortexen inkubiert. Anschließend wurden diese dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und abschließend in sterilem Glycerin (50 % (v/v)) auf eine Konzentration von 60 µg/ µl eingestellt.

2.15.2 Präzipitation der DNA an die „micro-carrier“ und Beladung der „macro-carrier“

Vor der Präzipitation wurden die vorbehandelten „micro-carrier“ zur Zerstörung von Goldpartikelaggregaten 10 min intensiv durchmischt. Für jeden Transformationsansatz wurden 8,5 µl vorbehandelte „micro-carrier“ (2.15.1.) mit 2 µl DNA (1 µg/ µl), 10 µl CaCl₂ (2,5 M) und 4 µl Spermidin (0,1 M) unter ständigem, intensivem Schütteln drei Minuten inkubiert. Nach kurzem Zentrifugieren wurden die Partikel je einmal mit Ethanol (70 und 100 % (v/v)) gewaschen und zum Beladen der „macro-carrier“ in 10 µl EtOH (100 % (v/v)) resuspendiert. Die resuspendierten Goldpartikel wurden anschließend in einem Durchmesser von 1 cm mittig auf die „macro-carrier“ aufgetragen und luftgetrocknet.

2.15.3 Transformation pflanzlichen Gewebes

Zur Transformation wurden die innere Epidermis von Zwiebel (*Allium cepa*) verwendet. Mittels des heliumgetriebenen PDS-1000 Systems (Bio-Rad) wurden die Microcarrier beschleunigt. Hierzu wurden folgende Parameter verwendet: Heliumdruck 1200 psi, Kammervakuum 0,06 atm, Distanz „macro-carrier“-„stopping-screen“ 8 mm, Distanz „stopping-screen“ - Zwiebelschuppe 6 cm. Die Zwiebelschuppen wurden in Dunkelheit (RT, 100 % Luftfeuchte) nach der Transformation für 48 h inkubiert. Anschließend wurde die

Epidermis mit einer Pinzette abgezogen und auf einem Objektträger unter ein Deckglas gegeben und mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) nach transformierten Epidermiszellen untersucht. Bilder von den transformierten Zellen wurden dann mit Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (2.14.2) aufgenommen.

3 Ergebnisse:

3.1 Ausgangssituation und grundsätzliche Erwägungen zu Beginn des Projekts

Die fakultative CAM-Pflanze *Mesembryanthemum crystallinum* ist schon seit längerem einer der wichtigsten Modellorganismen zur Untersuchung der Mechanismen, die der Vermeidung von Schädigungen durch abiotischem Streß an Pflanzen, speziell bei Salzstress zugrunde liegen (Adams et al., 1998). Als Halophyt kann *M. crystallinum* über längere Zeit Salzkonzentrationen von mehr als 400 mM NaCl tolerieren. Viele Untersuchungen über die Regulation und biochemische Aktivität der V-ATPase in Reaktion auf Salzstress sind an diesem Organismus durchgeführt worden. **Abb. 3.1.1** gibt einen Überblick über die Entwicklungsstadien von *M. crystallinum*.

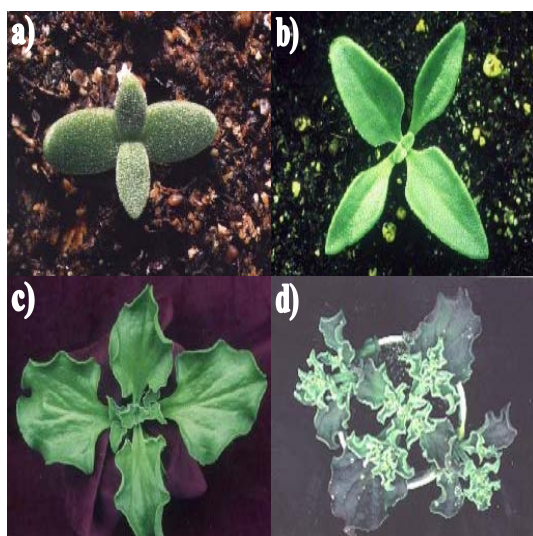


Abb. 3.1.1 Entwicklungsstadien von *M. crystallinum*. **a)** zeigt eine Pflanze mit einem Primärblattpaar im Alter von einer Woche. **b)** eine 3 Wochen alte Pflanze mit drei Primärblattpaaren **c)** stellt eine 5 Wochen alte Pflanze mit beginnender Sekundärblattbildung dar. In diesem Stadium beginnt die Pflanze gegen Salz-Stress resistent zu werden, eine Induktion des CAM ist möglich. **d)** zeigt eine 8 Wochen alte Pflanze, die für 2 Wochen Salzstress unterworfen war. Die Sekundärblätter unterscheiden sich morphologisch deutlich von den Primärblättern. Photos aus: Adams et al. (1998)

Während die biochemische Charakterisierung der V-ATPase in Pflanzen weit fortgeschritten ist, blieb die genetische Untersuchung der V-ATPase in Pflanzen bislang auf wenige Gene beschränkt (Ratajczak et al., 2000). Erschwert wurde die Suche nach Genen der V-ATPase vor allem durch die Tatsache, dass die Mutation eines Genes der V-ATPase bei Pflanzen keine sichtbaren Veränderungen des Phänotyps bedingt.

Die umfangreichsten Untersuchungen zur Expression der V-ATPase Gene wurden für die Untereinheit c, das sogenannte Proteolipid, durchgeführt. Verschiedene Autoren zeigten, dass die Expression der Untereinheit c unter Salzstress stark zunimmt (Tsiantis et al., 1996; Gollack et al., 2001).

Die Untersuchung der Expressionsregulation weiterer Untereinheiten zeigten bei *M. crystallinum* eine unterschiedliche Transkriptionsregulation für die Untereinheiten A, B und E

unter Salzstress (Löw et al., 1996; Dietz und Arbinger, 1996). Die Zusammenfassung aller bisherigen Ergebnisse spricht für eine sowohl streß- als auch organspezifische (Blatt/ Wurzel) Expression der Untereinheiten der V-ATPase.

Um für die Untersuchung der Wirkung von abiotischem Streß auf die Expression der Gene der V-ATPase möglichst vollständigen Satz an kodierenden Sequenzen zu erhalten, war die Wahl des Organismus wichtig: Das genetisch am besten charakterisierte pflanzliche Untersuchungsobjekt, der Modellorganismus *Arabidopsis thaliana*, kann nur geringe Salzkonzentrationen tolerieren und eine Genantwort auf Salzstress war in bisherigen Untersuchungen nicht nachzuweisen (Kluge et al., 1999).

Daher erschien es sinnvoll, den möglichst vollständigen Satz an cDNA-Sequenzen bei einem Halophyten zu klonieren. Hier bot sich aus den oben erwähnten Gründen *M. crystallinum* an. Zu Beginn dieser Arbeit war die genetische Klonierung von *M. crystallinum* V-ATPase-Sequenzen nicht sehr weit vorangeschritten: es lagen nur die cDNA-Sequenzen für die Untereinheiten c (Tsiantis et al., 1996) und E (Dietz und Arbinger, 1995) vor. Darüber hinaus waren noch Teilsequenzen der Untereinheiten A und B bekannt (Löw et al., 1996). Im Zeitrahmen dieser Arbeit wurde außerdem noch die Volllänge der cDNA für McVHA-C (Tavakoli et al., 1999) kloniert. Die Klonierung eines vollständigen Satzes an cDNA-Sequenzen aller V-ATPase-Untereinheiten wurde durch die öffentliche Zugänglichkeit der Daten des EST (Expressed Sequence Tags)-Projektes von J. Cushman (unveröffentlicht) in der Datenbank dbEST (NCBI, USA) erleichtert. Im Rahmen dieses EST-Projektes wurden mittlerweile 17,190 ansequenzierte Transkripte aus salzgestresstem und ungestresstem Gewebe veröffentlicht (Stand 15.3.2002).

3.2 Identifizierung von EST-Einträgen für V-ATPase-Untereinheiten aus *M. crystallinum*

Aus der Datenbank dbEST wurden durch Homologiesuche mittels des FASTA-Algorithmus (EMBL, Hinxton) Sequenzfragmente ausgewählt, die eine hohe Ähnlichkeit zu Gensequenzen der Untereinheiten der V-ATPase von *S. cerevisiae* und anderen publizierten V-ATPase-Sequenzen hatten. **Tabelle 1** zeigt unter anderem die EMBL-Zugangsnummern der hierbei identifizierten ESTs. Als erstes fiel die unterschiedliche Abundanz der für die verschiedenen Untereinheiten kodierenden ESTs auf. Während beispielsweise die Sequenz der Untereinheit A in vier verschiedenen ESTs vorhanden war, existierten für die Untereinheiten d und a jeweils nur eine EST-Sequenz. Diese Transkriptmengen-Verhältnisse zueinander blieben auch

erhalten, nachdem der Bestand der EST-Daten von *M. crystallinum* auf über 17.000 Teilsequenzen angewachsen war (2002).

McVHA-	Zugangsnummern der aus dbEST (NCBI, USA) identifizierten Fragmente von <i>M. crystallinum</i>	Name der für die RACE-PCR verwendeten Primer
A	AA762035 AA856216 AI822487 AI822804	McVATP-A-f McVATP-A-r
B	AA713368 AI823191	McVATP-B-f McVATP-B-r
G	AA74974 AA832528 AI043543	McVATP-G-f McVATP-G-r
H	AA896944	McVATP-H-f McVATP-H-r
a	AI822404	McVATP-a-f McVATP-a-r
d	BE034732 BE037224 BE034714	McVATP-d-f Mc-VATP-d-r
e	BF479681	McVATP-e-f Mc-VATP-e-r

Tabelle 1: Überblick über die zur Klonierung der V-ATPase-Sequenzen verwendeten EST-Sequenzen. Die Tabelle gibt einen Überblick über die in der Datenbank dbEST (NCBI, USA) gefunden EST-Sequenzen von *M. crystallinum* und die daraus abgeleiteten Primer. Die Sequenzen aller verwendeten Primer befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

Nach Abgleich der entsprechenden Sequenzen wurden aus Bereichen mit sehr hoher Sequenzhomologie der ESTs untereinander Primer für die 5'- und 3'-RACE-PCR (2.8.3.4.) abgeleitet. Diese Primer sind in **Tabelle 1** aufgeführt. Die Produkte der RACE-PCR wurden anschließend kloniert und sequenziert. Die Charakteristika der hierbei erhaltenen PCR-Produkte sind in **Tabelle 2** aufgeführt. Nach Sequenzierung der für Teilfragmente kodierenden cDNA-Klone wurden aus den nicht translatierten Bereichen im 5'- und 3'-Bereich gen-einwärtsgerichtete Primer abgeleitet, um spezifisch das gesamte Leseraster zu amplifizieren. Die Größen der cDNA-Klone und die Größe (in kDa) des theoretischen offenen Leserasters sind in **Tabelle 2** aufgeführt. Diese Tabelle wird vervollständigt durch Angaben zur Ähnlichkeit zu anderen bekannten Untereinheitensequenzen und zur Anzahl der vermuteten Isoformen der Gene in *M. crystallinum*. Diese Annahmen zur Isoformenvarianz beruhen auf der Analyse aller EST-Sequenzen von *M. crystallinum* in der Datenbank dbEST.

McVHA-	Resultate der RACE-PCR in 5'- und 3'-Richtung	Länge der klonierten cDNA aus <i>M. crystallinum</i> / Größe des abgeleiteten offenen Leserasters	Homologie zu <i>A. thaliana</i> -Isoformen/ V-ATPase-Genen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	vermutete Zahl von Isoformen in <i>M. crystallinum</i>
A	900 Bp/ 1200 Bp	2396 Bp/ 68,9 kDa	At1g78900 92% VMA1 61%	2
B	1500 Bp/ -	1962 Bp/ 58,5 kDa	At4g38510 96% At1g76030 94% At1g20260 91% VMA2 75%	3
C	(Tavakoli et al, 2001)	1398 Bp/ 42,7 kDa	At1g12840 77% VMA5 32%	4
D	-/ 650 Bp	-	At3g58730	1
E	(Dietz und Arbinger, 1995)	1070 Bp/ 26,2 kDa	At1g64200 76% At4g11150 76% At3g08560 66% VMA4 32%	3
F	ESTs decken die Volllänge ab	656 Bp/ 15 kDa	At4g02620 82% VMA7 56%	2
G	700 Bp/ 500 Bp	587 Bp/ 12,3 kDa	At4g23710 64% At3g01390 71% At4g25950 47% VMA10 30%	1
H	790 Bp/ 1200 Bp	1735 Bp/ 53,5 kDa	At3g42050 73% VMA13 28%	1
a	2000 Bp/ -	2783 Bp/ 93,1 kDa	At2g21410 77% At4g39080 76% At2g28520 60% VpH1 38% StV1 34%	3
c	Volllänge vorhanden (Tsiantis et al., 1996)	991 Bp/ 16 kDa	At4g38920 98% At2g16510 98% At4g34720 98% At1g19910 97% At1g75630 97% VMA3 59%	nicht bestimmbar
d	600 Bp/ 755 Bp	1141 Bp/ 40,3kDa	At3g28710 79% At3g28715 79%	2
e	500 Bp/ 400 Bp	698 Bp/ 7,9 kDa	At5g55290 85% At4g26710 80% kein Gen in <i>S. cerevisiae</i> bekannt <i>C. elegans</i> 35%	1

Tabelle 2 Zusammenstellung der Ergebnisse der RACE-PCR: Neben den Ergebnissen der RACE-PCRs für die aus *M. crystallinum* neu klonierten Untereinheiten, wurden die bisher oder im Zeitrahmen dieser Arbeit neu klonierten cDNA-Sequenzen aufgeführt. Gezeigt sind die Länge der cDNAs und die daraus abgeleiteten theoretischen offenen Leseraster. Verglichen wurden die Aminosäuresequenzen in Bezug auf Aminosäureidentitäten mit den aus *A. thaliana* Arabidopsis Datenbank Zugangsnummer (Atxxx) und *S. cerevisiae* (VMAx) bekannten Sequenzen. Die vermutete Zahl der Isoformen beruht auf einer Recherche in der Datenbank dbEST (NCBI, USA) mittels des FASTA-Algorithmus.

Mit Hilfe der klonierten Nukleotidsequenzen wurden mit dem Programm BLAST (NCBI, USA) die Ähnlichkeiten der EST-Sequenzen bestimmt, und aufgrund ihrer Identität in Gruppen unterteilt. Die Anzahl der Isoformen der V-ATPase-Gene in *M. crystallinum* bewegt sich zwischen einer und vier pro Gen. Die höchste Anzahl an Isoformen scheint das für die Untereinheit C kodierende Gen zu haben, die Gene der Untereinheiten H und c besitzen möglicherweise nur je eine Isoform.

Eine Analyse der Isoformen der V-ATPase-Gene in *Arabidopsis thaliana* zeigt eine ähnliche Verteilung der Isoformenvarianz. Unterschiede ergeben sich nur bei der Untereinheit A die in zwei Isoformvarianten in *M. crystallinum* und mit einer Isoform bei *Arabidopsis thaliana* vorzuliegen scheint sowie bei dem Gen für die Untereinheit C, dass in *M. crystallinum* von vier Isoformen codiert wird, in *A. thaliana* hingegen nur von einer einzigen.

3.3. Die Analyse der Primärstruktur der V-ATPase-Untereinheiten aus *M. crystallinum*

Um die Aminosäuresequenzen der verschiedenen Untereinheiten von *M. crystallinum* auf Homologien zu untersuchen, wurden mit dem Programm FASTA (EMBL, Hinxton) die aus den klonierten cDNA-Nukleotidsequenzen abgeleiteten Aminosäureabfolgen mit den Eintragungen der Datenbanken Swissprot und TREMBL (EMBL, Hinxton) verglichen. Hierbei zeigte sich eine hohe Ähnlichkeit zu den bekannten Aminosäuresequenzen der V-ATPase von Pflanzen (zwischen 60 und 96 %) und eine geringere aber signifikante Ähnlichkeit zu Sequenzen der V-ATPasen von *Bos bovis*, *Manduca sexta* und *Saccharomyces cerevisiae* (zwischen 35 und 90 %). Die geringste Übereinstimmung bestand zu den Sequenzen der V-ATPase von *Saccharomyces cerevisiae*. Über alle Arten hinweg zeigten sich die höchsten Sequenzähnlichkeiten bei den Untereinheiten A und B, der geringste Grad der Verwandtschaft bei der mutmaßlichen Untereinheit e, welche im Genom von *S. cerevisiae* bisher noch nicht identifiziert werden konnte. Für die Untereinheit e betrug die Ähnlichkeit zu den bekannten Sequenzen von *Bos taurus* und *Caenorhabditis elegans* 35 %.

Zur Untersuchung konservierter Proteindomänen wurden die Aminosäureabfolgen mittels des Programms ClustalW (EMBL, Hinxton) verglichen. Größerer Übersichtlichkeit zuliebe wurden in diesem Vergleich aber nur die neu klonierten V-ATPase-Sequenzen von *M. crystallinum* und die bereits bekannten Sequenzen von *A. thaliana* und von *S. cerevisiae* einbezogen. Dabei wurde einerseits ein Überblick über die Sequenzkonservierung von Proteindomänen bei pflanzlichen V-ATPase-Untereinheiten im Vergleich zwischen einem

Halophyten und einem Glykophyten erhalten. Andererseits erlaubt die Kenntnis des nun komplett sequenzierten Genoms von *A. thaliana* (The Arabidopsis Initiative, 2000) zum erstenmal bei zwei Arten den Vergleich aller pflanzlichen Isoformen der V-ATPase-Untereinheiten.

Der Vergleich pflanzlicher Sequenzen mit den Aminosäureabfolgen von *S. cerevisiae* sollte aufgrund des hohen evolutionären Abstands zwischen Pflanze und Hefe Aussagen zu den über Artgrenzen hinaus hochkonservierten Proteindomänen ermöglichen. Ein weiterer Vorteil des Einbeziehens von *S. cerevisiae* ist das bei diesem Organismus inzwischen besonders umfangreiche Wissen über die Funktion einzelner Aminosäuren und Domänen der Sequenzen der V-ATPase-Untereinheiten (Forgac, 1999; Forgac, 2000).

Um die Sequenzeigenschaften der im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu klonierten Untereinheiten von *M. crystallinum* zu untersuchen, werden diese im folgenden Abschnitt für jede Untereinheit einzeln vorgestellt. Hierbei wurden neben der zugrundeliegenden Alinierung ebenso die Analysen der Aminosäuresequenzen durch die Datenbanken Prosite, Predict-Protein (EMBL, Hinxton), sowie THMM (CBS, Dänemark) zu Hilfe genommen. Positionsangaben von Aminosäuren beziehen sich, soweit nicht explizit anders vermerkt, immer auf die Aminosäuresequenz der Untereinheiten von *M. crystallinum*.

3.4 Die Charakteristika der V-ATPase-Untereinheiten aus *M. crystallinum*

3.4.1 Untereinheit A

Die für die Untereinheit A der V-ATPase von *M. crystallinum* kodierende cDNA-Sequenz ist 2396 Bp lang und besitzt ein offenes Leseraster, welches in ein 68,9 kDa Protein translatiert werden kann. Die abgeleitete Aminosäuresequenz besitzt eine Homologie von 92% zu der von *A. thaliana*. Die Ähnlichkeit zur Sequenz der Untereinheit A von *S. cerevisiae* betrug 61%.

Der Sequenzvergleich (**Abb. 3.4.1**) zeigt eine Gliederung in zwei hoch konservierte Domänen. Ein 90 As langer Abschnitt am N-Terminus besitzt an den Positionen 24-86 die Signatur des β -Faltblattes der α/β -Familie der F-ATPase ((PFAM-Datenbank (EMBL, Hinxton) Zugangsnummer PF02874). In der Mitte der Sequenz der Untereinheit A befindet sich die zweite hochkonservierte Domäne, ein 250 AS langer Abschnitt, der die sogenannte ATP-Bindungsdomäne der α/β -Familie (PFAM-Zugangsnummer: PF00006) umfaßt. Hier

befindet sich an den Positionen 250-260 die Sequenz des sogenannten “P-Loops”. Bei der Kristallisation der F-ATPase konnte gezeigt werden, dass die hochkonservierten Aminosäuren des “P-Loops” mit den terminalen Phosphatresten des an der katalytischen Seite gebundenen ATP interagieren (Abrahams et al., 1994) und somit zur katalytischen Umsetzung des ATP beitragen. Ebenfalls in der zweiten hochkonservierten Domäne befindet sich das Phe-447, dessen Mutation zu Arginin die Aktivität der Hefe-V-ATPase völlig zum Erliegen kommen läßt (MacLeod et al., 1998).

McVHA-A	M-----PAVYGDRLTTFEDSEKESEYGYIRKVSQPVVVDGMNGAAMYELVRVGYDNLIGEIIIRL	60
At1g78900	M-----PAFYGGKLTTFEDDEKESEYGYVRKVSQPVVVDGMAGAAMYELVRVGHNDNLIGEIIIRL	60
VMA1	MAGAIENARKEIKRISLED-HAEESEYGATYSVSGPVVITENMIGCAMYELVKGHNDNLVGEVIRI	65
McVHA-A	EGDSATIQVYEETAGLTVNDPVLRTHKPLSVELGPGILGNIYFDGIQRPLKTIARISGDVY	120
At1g78900	EGDSATIQVYEETAGLTVNDPVLRTHKPLSVELGPGILGNIYFDGIQRPLKTIARISGDVY	120
VMA1	DGDKATIQQVYEETAGLTVGDVPLRITGKPLSVELGPGILMETTYDGIQRPLKAIKEESQSL	125
McVHA-A	I PRGVAVFPLDKDALWEFEFKKIGEGDLLTGGDLVAKVYENSLSMA-HRVALPPDAMGKIT	179
At1g78900	I PRGVSVFALDKDCLWEFQPNKFVEGDTITGGDLVATVFENTLMN-HLVALPPDAMGKIT	179
VMA1	I PRGIDTALDRTIKWQETEGKFQVGDHISGGDIYGSVFENSLISSHKILLPERSRGTIT	185
McVHA-A	YIAPPGQYSIQDVTLELEFQGVKKEFTMLQSWPVRTSPVASKLAADTPLLTGQRVLDAL	239
At1g78900	YIAPAGQYSLKDTVIELEFQGIKKSYTMLQSWPVRTSPRVASKLAADTPLLTGQRVLDAL	239
VMA1	WIAPAGEYTLDEKILEVEFDGKKSDFTLYHTWPVVRPREVTEKLSADYPLLTGQRVLDAL	245
McVHA-A	FPSVLGGTCAIPGAFGCGKTVISQALSKEYSNSDAVVYVCGGERGNEMAEVLMDFPOLTMT	299
At1g78900	FPSVLGGTCAIPGAFGCGKTVISQALSKEYSNSDAVVYVCGGERGNEMAEVLMDFPOLTMT	299
VMA1	FFCVOGGTTCIPGAFGCGKTVISQSLSKYSNSDAIIVYVCGGERGNEMAEVLMDFPELYTE	305
	-----*-----	
McVHA-A	LPDGREESVMKRTTLVANTSNMPVAAREASIYTGITIAEYFRDMGYNVSMADSTRWAE	359
At1g78900	LPDGREESVMKRTTLVANTSNMPVAAREASIYTGITIAEYFRDMGYNVSMADSTRWAE	359
VMA1	MS-GTKEPIMKRTTLVANTSNMPVAAREASIYTGITIAEYFRDQKKNVSMIADSSRWAE	365
McVHA-A	ALREISGRLAEMPADSGYPAYLAARLASFYERAGKVKCLGGPERTGSVTIVGAVSPGGD	419
At1g78900	ALREISGRLAEMPADSGYPAYLAARLASFYERAGKVKCLGGPERTGSVTIVGAVSPGGD	419
VMA1	ALREISGRLGEMPADQGFAYLGAKLASFYERAGKVAVALGSEDRTGSVSIIVAAVSPAGGD	425
McVHA-A	FSDPVTSATLSIVQVFWGLDKKLAQRKHFPVSNWLIYSKYTSALET FYEKFDPEFINIR	479
At1g78900	FSDPVTSATLSIVQVFWGLDKKLAQRKHFPVSNWLIYSKYTSALET FYEKFDPEFINIR	479
VMA1	FSDPVTATLGITQVFWGLDKKLAQRKHFPVSNVSVYSKYTNVFNKFDNSYEPFVIR	485
	+	
McVHA-A	TKAREVLQREDDLNEIVQLVGKDALAETDKITLETAKLLREDEYLAQNAFTPYDKFCPEVY	539
At1g78900	TKAREVLQREDDLNEIVQLVGKDALAEGDKITLETAKLLREDEYLAQNAFTPYDKFCPE-Y	538
VMA1	DRMKLILSNAEELEQVQLVGKSAISDSDKITLDVATLIKEDFLQNGYSTYDAFCPI-W	545
	*	
McVHA-A	KSVWMMRNIHFYNLANKAVERGAGSDGQKITYSLIKLRIGDLFYRLVSOQKPEDPAEGED	599
At1g78900	KSVWMMRNIHFYNLANKAVERAAGMDGQKITTYTLIKHRLGDLFYRLVSOQKPEDPAEGED	598
VMA1	KTFDMRAFTSYHDEAQKAVANGAN-----WSKLDASTGIVKHAVSSSKGFESRGGK	605
McVHA-A	TLVAKFKLYEDLSAARNLDDETR	624
At1g78900	TLVEKFKLYDDLNAFRALDEETR	624
VMA1	EVHGEFKLLSTMQERFAESTD	627

Abb. 3.4.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Untereinheit A der V-ATPase. Die Aminosäuresequenzen von *M. crystallinum* (McVHA-A), *A. thaliana* (At1g78900) und *S. cerevisiae* (VMA1) wurden mit dem Programm ClustalW (EMBL, Hinxtion) abgeglichen. Dunkelgrau markiert sind über alle verglichenen Arten hinweg identische Aminosäurereste, hellgrau sind die mit der Sequenz von *M. crystallinum* identischen Aminosäuren. Markiert mit - die Position des P-Loops, markiert mit * die beiden regulatorisch wirkenden Cysteine und mit + das für die ATPase-Aktivität essentielle Phe-447.

An diese beiden Domänen schließt sich der weniger konservierte C-Terminus an. Dessen konservierte aromatische Aminosäuren sind jedoch ebenfalls für die V-ATPase-Aktivität essentiell (MacLeod et al., 1998). Eine weitere wichtige Aminosäure im C-Terminus ist das

Cys-535, von dessen Pendant in Hefe gezeigt werden konnte, dass es mit einem Cystein aus dem P-Loop eine Disulfidbrücke bilden kann, die zur reversiblen Inaktivierung der V-ATPase führt (Feng und Forgac, 1992; Feng und Forgac 1994). Im geringer konservierten Bereich zwischen der ersten und zweiten Domäne befinden sich keine für die Katalyse essentiellen Aminosäurereste.

Diese beiden zuvor beschriebenen, hochkonservierten Domänen bilden zusammen mit dem C-Terminus den Bereich der katalytischen Bindung des ATP-Moleküls unter kooperativer Beteiligung der Untereinheit B (Liu und Kane, 1996).

3.4.2 Untereinheit B

Die Aminosäuresequenzen der Untereinheit B weisen den höchsten Konservierungsgrad aller V-ATPase Untereinheiten auf. Das Alinierungsschema (**Abb. 3.4.2**) der Aminosäuresequenz von *M. crystallinum* mit den Sequenzen der drei Isoformen von *A. thaliana* und VMA2, dem Gen der Untereinheit B von *S. cerevisiae* zeigt einen durchgängig hohen Grad an Sequenzkonservierung. Heterogen sind nur die ersten 20 amino-terminalen Aminosäuren und eine carboxy-terminale Domäne von 30 Aminosäuren, die nur bei Hefe vorkommt.

Untereinheit B besitzt zwar partielle Ähnlichkeiten mit den Untereinheiten α und β der F-ATPasen sowie zur Untereinheit A der V-ATPase, jedoch fehlt die Konsensussequenz zur Bindung von ATP, der sogenannte P-Loop. Peng konnte bei *S. cerevisiae* zeigen (1995), dass eine rekombinant exprimierte Untereinheit B allein ebenfalls in der Lage ist, ATP zu binden, wie dies bei der Untereinheit A der Fall ist. Weitere Untersuchungen bezüglich dieser nichtkatalytischen ATP-Bindung identifizierten als Bindungsbereich bei Hefe die Aminosäurereste Ile-145 und Ser-152 sowie Ser-174 und Glu-182. Diese beiden Domänen sind auch bei pflanzlichen Sequenzen hochkonserviert allerdings nicht auf jeder Position, wie dies bei der ATP-Bindedomäne von Untereinheit A der Fall ist. Zwischen Hefe und Pflanzen nichtkonservierte Aminosäureaustausche wie Isoleucin bei Hefe zu Threonin bei den pflanzlichen Sequenzen und Serin zu Alanin ändern die Hydrophobizität und damit die Stärke der Bindung von ATP in den Bindungsdomänen der Untereinheit B.

Auffällig sind zwei kurze Sequenzabschnitte, die sich von der ansonsten vorhandenen Homologie zwischen allen verglichenen Sequenzen der Untereinheit B deutlich abheben. Die Sequenz zwischen Lys-187 bis Asp-201 ist über alle Sequenzen hinweg sehr heterogen. Der Sequenzabschnitt zwischen Tyr-303 und Ser-321 ist dagegen über *M. crystallinum*, zwei Isoformen von *Arabidopsis* und VMA2 von Hefe hochkonserviert, er fehlt jedoch in der

Sequenz des Gens At1g22260 von *A. thaliana*. Innerhalb dieses Sequenzabschnittes befindet sich eine Phosphorylierungsstelle.

McVHA-B	MG--APNNLEMDENLEIG-----MEYRTVSGVAGPLVILEKVKGPKYQEIIVNIRLGDG	52
At4g38510	MGA-AENNLEM-EGTLEIG-----MEYRTVSGVAGPLVILEKVKGPKYQEIIVNIRLGDG	52
At1g76030	MG---TNDLDIEEGTLEIG-----MEYRTVSGVAGPLVILDKVKGPKYQEIIVNIRLGDG	51
At1g20260	MV---ETSIDMEEGTLEIG-----MEYRTVSGVAGPLVILDKVKGPKYQEIIVNIRLGDG	51
VMA2-Yeast	MVLSDKELFAINKKAVLEQGFNVKPRLNMTVSGVNGPLVILEKVKFFRYNEIVNLTLPLDG	60
McVHA-B	TTRRGQVLEVDGEKAVVQVFEFTSGIDNKYTTVQFTGEVLKTPVSLDMLGRIENFGSGKPI	112
At4g38510	TTRRGQVLEVDGEKAVVQVFEFTSGIDNKYTTVQFTGEVLKTPVSLDMLGRIENFGSGKPI	112
At1g76030	STRRGQVLEVDGEKAVVQVFEFTSGIDNKFTTVQFTGEVLKTPVSLDMLGRIENFGSGKPI	111
At1g20260	STRRGQVLEVDGEKAVVQVFEFTSGIDNKFTTVQFTGEVLKTPVSLDMLGRIENFGSGKPI	111
VMA2-Yeast	TVRQGVLEIRGDRAIVQVFEFTSGIDVKKTTVEFTGESLRIPVSEDMLGRIIDGSGRPI	120
McVHA-B	DNGPPIPEAYLDISGSSINPSERTYPEEMIQTGISTIDVMNSIARGQKIPLFSAAGLPH	172
At4g38510	DNGPPIPEAYLDISGSSINPSERTYPEEMIQTGISTIDVMNSIARGQKIPLFSAAGLPH	172
At1g76030	DNGPPIPEAYLDISGSSINPSERTYPEEMIQTGISTIDVMNSIARGQKIPLFSAAGLPH	171
At1g20260	DNGPPIPEAYLDISGSSINPSERTYPEEMIQTGISTIDVMNSIARGQKIPLFSAAGLPH	171
VMA2-Yeast	DNGEKVFAEDYLDINGSPINPYARIYPEEMISITGVSAIDTMNSIARGQKIPLFSAAGLPH	180
McVHA-B	NEIAAQICRQAGLVKRLKTEENLM-EGGEEDNFAIVFAAMGVNMETAQFFKRDFEENGSM	231
At4g38510	NEIAAQICRQAGLVKRLKESDNLLEHQBDDNFAIVFAAMGVNMETAQFFKRDFEENGSM	231
At1g76030	NEIAAQICRQAGLVKRLKTEVDLL-EDHGEDNFAIVFAAMGVNMETAQFFKRDFEENGSM	230
At1g20260	NEIAAQICRQAGLVKRLKTEENLIQEDHGEDNFAIVFAAMGVNMETAQFFKRDFEENGSM	231
VMA2-Yeast	NEIAAQICRQAGLVKRLKDVH-----DGHEENSIVFAAMGVNLETARFFKQDFEENGSL	235
McVHA-B	ERVTLFLNLANPTIERIITPRIALTTAEYLAECGKHVILVILDMSSYADALREVSAAAR	291
At4g38510	ERVTLFLNLANPTIERIITPRIALTTAEYLAECGKHVILVILDMSSYADALREVSAAAR	291
At1g76030	ERVTLFLNLANPTIERIITPRIALTTAEYLAECGKHVILVILDMSSYADALREVSAAAR	290
At1g20260	ERVTLFLNLANPTIERIITPRIALTTAEYLAECGKHVILVILDMSSYADALREVSAAAR	291
VMA2-Yeast	ERTSLFLNLANPTIERIITPRIALTTAEYLAQTERHVLITLDMSSYADALREVSAAAR	295
McVHA-B	EEVPGRRGYPGYMYTDLATIYERAGRIEGRSGSITQIPIILAMPNDITHPTPDLTGYTE	351
At4g38510	EEVPGRRGYPGYMYTDLATIYERAGRIEGRKSGSITQIPIILAMPNDITHPTPDLTGYTE	351
At1g76030	EEVPGRRGYPGYMYTDLATIYERAGRIEGRKSGSITQIPIILAMPNDITHPTPDLTGYTE	350
At1g20260	EEVPGRRGYPG-----KGSITQIPIILAMPNDITHPTPDLTGYTE	332
VMA2-Yeast	EEVPGRRGYPGYMYTDLSTIYERAGRVEGRNGSITQIPIILAMPNDITHPTPDLTGYTE	355
	++++	
McVHA-B	GQIYIDRQLHNRQIYPPINVLPSLSRLMKSAGGEMTRRDHSDVSNQLYANYAIGKDVQA	411
At4g38510	GQIYIDRQLHNRQIYPPINVLPSLSRLMKSAGGEMTRRDHSDVSNQLYANYAIGKDVQA	411
At1g76030	GQIYIDRQLHNRQIYPPINVLPSLSRLMKSAGGEMTRKDHSDVSNQLYANYAIGKDVQA	410
At1g20260	GQIYIDRQLHNRQIYPPINVLPSLSRLMKSAGGEMTRKDHSDVSNQLYANYAIGKDVQA	392
VMA2-Yeast	GQIFVDRQLHNRKIYPPINVLPSLSRLMKSAGGEMTRKDHSDVSNQLYAKYAIGKDAAR	415
McVHA-B	MKAVVGEEALSSDDLLEFLDKFERKFFVAQAYDTRNIFQSLDLAWTLRLRIFPRELLHR	471
At4g38510	MKAVVGEEALSSDDLLEFLDKFERKFFVAQAYDTRNIFQSLDLAWTLRLRIFPRELLHR	471
At1g76030	MKAVVGEEALSSDDLLEFLDKFERKFFVMQAYDTRNIFQSLDLAWTLRLRIFPRELLHR	470
At1g20260	MKAVVGEEALSSDDLLEFLDKFERKFFVMQAYDTRNIFQSLDLAWTLRLRIFPRELLHR	452
VMA2-Yeast	MKAVVGEEALSIEDKLSLEFLEKFEKTEITOGAYEDRTVESLDQAWSLRLRIYKEMLNR	475
McVHA-B	IPAKTLDQYYSRDASN-----	487
At4g38510	IPAKTLDQFYSRDTTN-----	487
At1g76030	IPAKTLDQFYSRDSTS-----	486
At1g20260	IPAKTLDQFYSRDSTS-----	468
VMA2-Yeast	ISPKILDFYDRARDDADEEDDPDRSSGKKKQDASQEEELI	517

Abb. 3.4.2: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Untereinheit B. Die Aminosäuresequenzen von Untereinheit B von *M. crystallinum*, den *A. thaliana*-Isoformen At4g38510, At1g76030, At1g20260 sowie dem VMA2-Gen von *S. cerevisiae* wurden aliniert. Dunkelgrau markiert sind über alle Sequenzen identische Aminosäuren, hellgrau die im Vergleich zu *Mesembryanthemum*-VHA-B konservierten Aminosäuren. Mit - markiert sind die Positionen der beiden mutmaßlichen Bindestellen der nichtkatalytischen ATP-Bindung, mit + ist die Position der konservierten Phosphorylierungsstelle bezeichnet.

3.4.3 Untereinheit G

Im Gegensatz zu den Untereinheiten A und B, die durch eine auch bei den phylogenetisch fernen Arten hohe Sequenz- und Domänenübereinstimmung auffallen, ist die Divergenz der Aminosäuresequenzen der Untereinheit G selbst beim Vergleich von *M. crystallinum* mit *A. thaliana* recht hoch. Die Sequenzähnlichkeiten betragen hier zwischen 47 % und 71 %. Die Alinierung (**Abb. 3.4.3**) zwischen Pflanzensequenzen und Hefe zeigt im Bereich der ersten 60 Aminosäuren eine höhere Identität als im carboxyterminalen Sektor. Dieser Aminoterminus ist für die Bildung einer α -helikalen Struktur verantwortlich, die als Verbindungsglied zwischen den V_0 und V_1 -Sektoren im Stiel der V-ATPase wirken soll. Mutationen in diesem Bereich führten zur Bildung einer instabilen V-ATPase Struktur (Charsky et al., 2000).

```

McVHA-G      MEASRAQNGTQLLLAAEQEAQHINAAKNAKTARLRQAKEEAKEKIAEFRAQMEADHQR 60
At4g23710    MES---AGTQQLLAAEREAQQTIVNAARTAKMTRLKQAKEEAETEVAEHKTSTEQGFORK 56
At3g01390    MESNRGQGSTQQLLAAEVEAQHIVNAARTAKMARLKQAKEEAKEKIAEYKAQTEQDFORK 60
At4g25950    MDSLRCQGGTQMLLTAEQEAQRIVSAARTAKLARMKQAKDEAEKEMEEYRSRLEEEYQTQ 60
VMA10        MSQ---KNGTATLLQAEKEAHEIVSKARKYRQDKLKQAKTDAAKEIDSYKIQKDKELKEF 57

McVHA-G      LAESTGDSGANVKRLEQETNAKIEQLKIQASTISPYVVEMLLRYVTSRE----- 109
At4g23710    LEATSGDSGANVKRLEQETDAKIEQLKNEATRISKDVVDMLLKNVTTVNN----- 106
At3g01390    LEETSGDSGANVKRLEQETDTKIEQLKNEASRISKDVVEMLLKHVTTVKN----- 110
At4g25950    VSGT--DQEADAKRLDDETDVRI TNLKESSSKVSKDIVKMLIKYVTTTAA----- 108
VMA10        EQKNAGGVGELEKKAEGAGVQGELAEIKKIAEKKKDDVVKIL IETVIKPSAEVHINAL 114

```

Abb. 3.4.3: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Untereinheit G. Die Aminosäuresequenzen von Untereinheit G von *M. crystallinum*, den *A. thaliana*-Isoformen At4g23710, At3g01390, At4g25950 sowie dem VMA10-Gen von *S. cerevisiae* wurden aliniert. Dunkelgrau markiert sind über alle Sequenzen identische Aminosäuren, hellgrau die im Vergleich zu Mc-VHA-G konservierten Aminosäurereste.

3.4.4 Untereinheit H

Den höchsten Grad an Primärsequenzvariabilität einer Untereinheit aus dem V_1 -Sektor besitzt die Untereinheit H. Die Identität der Sequenz von *M. crystallinum* beträgt im Vergleich zur Sequenz von *A. thaliana* 73%; die Sequenz der homologen Untereinheit der Bäckerhefe besitzt nur 28% identische Aminosäuren (**Abb. 3.4.4**). Eine Mutationsanalyse der Untereinheit H fand bis heute nicht statt. In Hefe wurde gezeigt, dass diese Untereinheit im Gegensatz zu den anderen Untereinheiten der V-ATPase nicht für den Zusammenbau benötigt wird. Statt dessen ist sie für die katalytische Aktivität essentiell, weshalb sie auch als Aktivatoruntereinheit bezeichnet wurde (Ho et al., 1993).

```

McVHA-H      M-----TIDHAELESTEQVMKR--DIPWETYMTTKLISGTSLQQLRRYD----KKPESQRA 49
At3g42050    M-----DQAELESTEQVLKR--DIPWETYMNTKLVSAKGLQQLRRYD----KKPESARA 47
VMA13        MGATKILMDSTHFNEIRSIIRSRVAVDALARSEELSEIDASTAKALESILVKKNIIGDGL 60

McVHA-H      SLLDDDGPAYVR-----VFVNIILRDIFKEETVEYVLSLIDEMLTAN---PKRARLFHFN 100
At3g42050    QLLEDGDPAYVH-----LFVSIILRDIFKEETVEYVLLALIYEMLSAN---PTRARLFHDE 98
VMA13        SSSNNAHSGFKVNGKTLIPLIHLSTSDNECDCKKSVQNLIAELLSSDKYGDGDTVKFFQED 120

McVHA-H      SLANEDVYEPFIRLLWKNWFTQEKSKILALIVSARPKNQSGRAINGEASDSKRKFTTI 160
At3g42050    SLANEDTYEPFLRLLWKNWFTQEKSKILAWIISARPK--AGNAVINGNG-----I 147
VMA13        PKQLQLFDVSLKGFQ-TVLIISGFNVVSLLVQNGLHNVKLVKELKLNKNN-----L 170

McVHA-H      DDVLKGLSWLALCTAKEAFSSQSGAFLIA--VNCIATLLKEPVVRSFVQADGVKLLVPL 218
At3g42050    DDVLKGL-VEWLCAQLKQPSHPTRGVPIA--ISCLSSLLKEPVVRSFVQADGVKLLVPL 204
VMA13        INILQNIQMDTCYVCIRLLQELAVIPEYRDVIWLEHKKFMETLTKILQRAATDSQLATRI 230
~~~~~

McVHA-H      INPVSNQSSSTPLASSHPNQOSIQLLYETCLCVWLLSFYEPAIEYLATS--RTLPLRMEVV 276
At3g42050    ISPAS-----TQOSIQLLYETCLCVWLLSYEPAIEYLATS--RTMQRLETVV 250
VMA13        VATNS-----NHLGIQIQVHSLLLIWLITFNPFVANEIVQKYLSDFLDLKLV 278
~~~~~

McVHA-H      KTSTKEKVVVRIVMTFKN-----LLPRGTFGAQMVDLGMPLVQNLKAHAWGDEDLVEA 331
At3g42050    KHSTKEKVVVRVILTFRN-----LLPKGTFGAQMVDLG-LPHIHSKIQAWSDLDLDA 304
VMA13        KITIKEKVSRLCISIIQQCSTRVKQHKKVIKQLLLLNALPTVQSLSERKYSDEELRQD 338
~~~~~

McVHA-H      LNQLEEGMKENIKKISSFDKMKQEVLLGHLDNSFVHKDTFFWRDNIITNFEENDFQILRVL 391
At3g42050    LNQLEEGLKDKIKKISSFDKMKQEVLLGHLDNPMHKETNFWRENVTCFEENDFQILRVL 364
VMA13        ISNLKEILENEYQELTSFDEMVAELDSDLKLCWSEPHVDNGFVSDNIDEKKKNYKFRQL 398
~~~~~
+++++
*

McVHA-H      ITIILDTSS-----DPRSLAVCKCEFDLSQFIQNHYPAGRMIVNDLKAERVMKLMNHEN 444
At3g42050    LTIILDTSS-----DPRSLAVA--CFDLSQFIQYHAAGRIVVADLKAERVMKLMNHEN 415
VMA13        TELIQAKVRNGDVNAKQEKIIIQVALNDIITHVVELLPESIDVLDKTTGGADIMELLNHSD 458
~~~~~
*

McVHA-H      AEVTKNALLCIQRLFLGAKYASFLQA 470
At3g42050    AEVTKNAIILCIQRLLLGAKYASFLQA 441
VMA13        SRVKEYALKATQ-ALICYTFK----- 478
~~~~~

```

Abb. 3.4.4: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Untereinheit H. Die Aminosäuresequenzen von *M. crystallinum* (McVHA-H), *A. thaliana* (At3g42050) und *S. cerevisiae* (VMA13) wurden aliniert. Mit ~ markiert sind die Positionen der „Armadillo-Repeats“, mit + sind die Position des konservierten Abschnittes mit den aromatischen As markiert und * markiert die an der Bildung der Salzbrücke beteiligten, konservierten His-367 und Asp-413. Die Erklärung der weiteren Markierungen siehe **Abb. 3.4.3**.

Die kürzlich erfolgte Kristallisierung der Untereinheit H von *S. cerevisiae* (Sagermann et al., 2001) erlaubt Voraussage der theoretischen Tertiärstruktur der Aminosäuresequenz von *M. crystallinum*. Wie aus dem Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen zu erkennen ist, kann in bezug auf Sequenzkonservierung von zwei Domänen verschieden hoher Sequenzähnlichkeit gesprochen werden: Der schwächer konservierte N-terminale Bereich der Untereinheit H der bei *M. crystallinum* von Arg 16 bis Ala 135 reicht und eine C-terminale Domäne von Ile 240 bis Ala 445 mit einer höheren Sequenzkonservierung. Der Sequenzbereich zwischen den erwähnten Domänen besitzt eine hohe Heterogenität, die bei *M. crystallinum* im Vergleich zu den Sequenzen von *A. thaliana* und *S. cerevisiae* von zwei inserierenden Aminosäuresequenzen geprägt ist. Dieses Muster scheint auf eine strukturelle Flexibilität zwischen den beiden Domänen hinzudeuten, wie dies auch bei Hefe vermutet wird (Sagermann et al., 2001). Im dreidimensionalen Strukturmodell der Untereinheit H von Hefe ist das Auftauchen des sogenannten Armadillo-Repeat-Motivs (Interpro-Datenbank AccNr.000225) für eine Superhelixbildung aus jeweils drei α -Helix-Strukturen

verantwortlich. Trotz schwacher Übereinstimmung auf dem Aminosäure-Niveau findet sich die Konsensus-Sequenz dieses Strukturmotives auch bei den Sequenzen von *M. crystallinum* und *A. thaliana*, so dass in diesem Bereich von einer Strukturhomologie zwischen den Sequenzen auszugehen ist, zumal die mit dem Programm "Predict-Protein" (EMBL, Hinxton) vorhergesagte Sekundärstruktur zwischen allen drei verglichenen Sequenzen in Bezug auf die Positionen der α -Helices konserviert ist. Die von den Armadillo-Repeat-Motiven gebildeten Superhelixstrukturen sind für die Bindung anderer Proteine wichtig (Hirschl et al., 1996).

Die konserviertere C-terminale Domäne besteht aus 120 Aminosäuren die acht unregelmäßig verteilte α -Helices bilden. Wichtigste Strukturbestandteile sind ein 30 Aminosäuren langer konservierter Abschnitt mit fünf aromatischen Aminosäuren an Position 358-388, die den hydrophoben Kern dieser Domäne bilden, sowie eine Salzbrücke zwischen dem konservierten His 367 und dem Asp 413.

Wichtig für die Funktion der Untereinheit H scheinen vor allem die beiden hydrophoben Furchen des C-Terminus zu sein, die im Bereich der Verbindung zwischen den beiden angesprochenen Domänen liegen; diese sind auch in den anderen verglichenen Aminosäuresequenzen vorhanden. Sie könnten der Interaktion mit anderen Untereinheiten dienen. In Quervernetzungs-Experimenten (Xu et al., 1999) konnten Interaktionen der Untereinheit H mit den Untereinheiten F und E der V-ATPase gezeigt werden, Landolt-Marticorena et al. (2000) beschrieben außerdem eine Interaktion der Untereinheit H mit der Untereinheit a des V_0 -Sektors. Diese Befunde deuten auf eine Funktion als flexibles Verbindungsglied zwischen den Untereinheiten des V_1 und des V_0 -Sektors hin. Wichtig für diese Aufgabe ist wohl vor allem die von den Primärsequenzen gebildete Tertiärstruktur und nicht die exakte Aminosäureabfolge. Bei Hefe blieb selbst eine 180 AS lange N-terminale Deletion der Untereinheit H ohne Auswirkung auf den Phänotyp (Sagermann et al., 2001).

3.4.5 Untereinheit a

Die größte Untereinheit der V-ATPase ist die 100 kDa-Untereinheit a, die als einzige Untereinheit der V-ATPase aus einer ausgeprägt zweigeteilten Struktur aufgebaut ist, nämlich aus einer 50 kDa großen hydrophilen Domäne am Aminoterminal und einer hydrophoben, carboxyterminalen Domäne (Perin et al., 1991; Manolson et al., 1992; Manolson et al., 1994). Durch Cysteinmarkierung und chemische Markierung spezifischer Aminosäuren wurde bei *S. cerevisiae* ein topologisches Modell der Untereinheit a erstellt.

McVHA-a	MADR-----GCCPPMDLMRSEPMQLVQLVIVLVESSHLTVSYLGLDGLVQFKDLNADKSPF	55
At2g21410	MAESHGGGGGCCPPMDLMRSEPMQLVQVIVVEMSAHLTVSYLGLDGLVQFKDLNSEKSPF	60
At4g39080	MAES-GGGGGCCPPMDLMRSEPMQLVQLVIVVEMSAHLTVSYLGLDGLVQFKDLNSEKSPF	59
At2g28520	MEEF----LDKLPQMDLMRSEKMTLVQLIIVVESAHRSTIYLGELGLQFRDLNADKSPF	56
VPH1	MAE-----KEEAIFRSAEMALVQFYIIPQETSRDSAYTLGQLGLVQFRDLNSKVRAF	51
STV1	M-----NQEEAIFRSDMTYVQLYIIVLVEVIREVTFLLGRMSVFMVMDLNKDLTAF	50
McVHA-a	QRTYANQIKKSGEMARLRVYFREQMLNAG-----ISIPAMTSN	93
At2g21410	QRTYAAQIKRCGEMARKIRFFKEQMSKAG-----VTPKETLDR	98
At4g39080	QRTYAAQIKRCGEMARKIRFFRDQMSKAG-----VPAKEMQOK	97
At2g28520	QRTFANQVKRCGEMSRKLRFFKQIDKAG-----LRCSPRLEI	94
VPH1	QRTFVNEIRRLDNVERQYRYFYSLKKHD-----IKLYEGDTDKYLDGSGELY---	101
STV1	QRGYVNLRRFDEVERMVGFLNEVVEKHAETWKYILIHIDDEGNDIAQPDMAIDLINTEP	110
McVHA-a	KNDIKVDDLEVKLAELESELSEMANNEKLRQRAYNELVEYKLVQKSG-----	141
At2g21410	ENDIDLDDVEVKLEELAEAEIIVNANNDKLQRSYNELVEYKLVLEKAG-----	146
At4g39080	ENDIDLDDVEVKLEELAEAEIIVNANNDKLQRSYNELVEYKLVLEKAG-----	145
At2g28520	EPDIALGDLERQLADHEHEVLEMNNSSEKLRQTYNELLEFKIVLEKVG-----	142
VPH1	PGSVIDDYVRNASYLEERLIQMEDATDQIEVQKND-LEQYRFILQSG-----	148
STV1	LSLENVNDMVKEITDCSRARQLDESLSLRSKLNDLEQRQVIFECSEKFIENVNPGIAGR	170
McVHA-a	-----EFFYSAQRSAAAQORETEPEHTEESLNTPLLMDDEKSAADPSKSIQL	187
At2g21410	-----EFFASAHRSATAQOSELETEQVGEDLLEAPLLEEKSVDETKQVKL	192
At4g39080	-----EFFSSAHRSAADQORETESQQAGEDLLESPLLOEKSIDSSTKQVKL	191
At2g28520	-----VAFRLRSTISISFLS-----LLIKQLFYSQEMNPGHSNQSGL	179
VPH1	-----DEFELKGDNT-----DSTSYMDEDMI DANGENIAAAI GASVN-----	185
STV1	ATNPEIEQEERDVDERMTDDISETLSDAFSFDDETPQDRGALGNLDRNQSVEDLSFL	230
McVHA-a	G-----FFTGLVPRDKSMAFERILFRATRGNVFRQAIVENPVTPDASGEKVEKNVVF	240
At2g21410	G-----FLTGLVPREKSMVFERILFRATRGNIFIRQSVIEESVVDPNSEKAEKNVVF	245
At4g39080	G-----FLTGLVPREKSMVFERILFRATRGNIFIRQSVIEEVPIDPNSEKAEKNVVF	244
At2g28520	R-----FISGLIINKDKLKFERMLFRATRGNMLFNQTSDEEIMDESTSEMVEKVVVF	232
VPH1	-----YVTGVIAIRDKVATLEQILWRVLRGNLFFKTEVIEQPVYDVKTRREYHKNAFI	237
STV1	EQGYQHRYMIGSIRRTKVDILNRIWRLLRGNLIFQNFPIEELLEGK--EKVEKDCFI	288
McVHA-a	IFYSGDRAKNKILKICEAFGANRYSFYEEAGKQAQMLKEVSGRLESELRTTIDAGLLHRGN	300
At2g21410	VFYSGERAASKILKICEAFGANRYPFSEDLGKQAQMMTEVSGRLESELKTTIGAGLDQRNI	305
At4g39080	VFYSGERAASKILKICEAFGANRYPFSEDLGRQAQMI TEVSGRLESELKTTIDAGLGQRNI	304
At2g28520	VFFSGEQARTKILKICEAFGANRYPVPEDTTKQRLTREVLSRLSLEATLDAGTRHRNK	292
VPH1	VFSHGDLIKRIRKIAESLDANLYDVSSENEGRSQOLAKVNKNLSLYTVLKTSTTTLES	297
STV1	IFTHGETLLKVKRVIDSLNGKIVSLNTRS---SELVDTLNRQIDDQRILDTTEQTLHT	345
McVHA-a	LLQITIGDQFEQWNLVLRKESIYHTLNMLSMDVTTKCLVAEGWCPVFATKEIQDTLHRAT	360
At2g21410	LLETIGDKFEQWNLKIRKRAIYHTLNMLSMDVTTKCLVGEWSPVFAATEIQDALHRAA	365
At4g39080	LLQITIGDKFELWNLKVRKEKAIYHTLNMLSMDVTTKCLVAEGWSPVFAASREIQDALRFAA	364
At2g28520	ALNSVGSYSLTNWITTVRREKAVYDILNMLNFDVTKKCLVGEWCPVFAKTIHEVLRAT	352
VPH1	ELYATAKELDSWFDQVTRERATFELNKSNYDTNRKILIAEGWIPRDELATLQARLGEMI	357
STV1	ELLVITHDQLPVWSAMTKREKYVYITLKNFQOES--QLLIAEGWVPESTELIHLQSLKDYI	403
McVHA-a	VDSNSEVEAIFQVLRHTRESLPTYFRNTKFTSSFOEIVDAYGIARYQEANPSVYITVTFPF	420
At2g21410	VDSNSQVGSIFQVLRHTKEMPPTFFRTNKFTTAFQOEVDAVGVARYQEANPSVFTIVTFPF	425
At4g39080	VDSNSQVGSIFQVLRHTKESPPTYFRNTKFTSAIQOEVDAVGVARYQEANPGVFTIVTFPF	424
At2g28520	FDSSSQVGVIFHVMQAVESPPTYFRNTKLNINAFQOEVDAVGVARYQEANPAVYVSVYTFPF	412
VPH1	ARLGDVPSI IQVLDTNHTPPTFFRTNKFTAGFQSI CDYGIAYREINAGLPIIVTFPF	417
STV1	ETLGEYSTVFNWILTNKLPPTYHRTNKFTQAFQSI VDAYGIATYKINAGLAVVTFPF	463
McVHA-a	LFAVMFGDWGHGICILLATSILILREKKLSSQKLGDIMEMAFGGRYVIFMMALFSIYTG	480
At2g21410	LFAVMFGDWGHGICILLATMYLILREKKLSSQKLGDIMEMAFGGRYVIFMMALFSIYTG	485
At4g39080	LFAVMFGDWGHGICILLATMYLILREKKLSSQKLGDIMEMAFGGRYVILMMALFSIYTG	484
At2g28520	LFAVMFGDWGHGICILLGALYLLARERKLSQKLGSMFEMLFGGRYVILMLALFSIYCG	472
VPH1	MFAIMFGDMGHGFLMTLAALSILVNEKKINKMKRGEIFDMAFTGRYILLNGVFSMTGTG	477
STV1	MFAIMFGDMGHGFLFLLMALFLVLERKFGAMHRDEIFDMAFTGRYVLLMGAFSVYTG	523
	+++++ +++++	
McVHA-a	IYNEFFSVPEFLFGKSAYECDPSCKDATVDGLIKVRDAYFFGLDPVWHGSRSEL PFLNS	540
At2g21410	IYNEFFSIPYPLEASSAYDCRDVSCSEATTIGLIKTRDTPFFGVDPVWHGTRSEL PFLNS	545
At4g39080	IYNEFFSIPFPLFAPSAYDCRDVSCSEATTIGLIKVRDTPFFGLDPVWHGSRSEL PFLNS	544
At2g28520	IYNEFFSVPEFHIIFGGSAYKCRDTCSDAYTVGLIKYRDPYFFGVDPSNRGSRTEL PFLNS	532
VPH1	LYNDIFSKMTIFKSGWKWPDHWKKGESITA---TSVGTYFIFGLDWAHGTENALLPFLNS	534
STV1	LYNDIFSKMTIFKSGWQWPSTFRKGESIEA---KKTGVYFFGLDFANHGTDNGLFLPFLNS	580
	+++ +++++	
McVHA-a	LKMKMSILLGVSQMNLGIMSFNARFFRS-----CVD-----IWF	576
At2g21410	LKMKMSILLGVAQMNGLGIMSFNARFFRS-----AVN-----IWF	581
At4g39080	LKMKMSILLGVSQMNLGIMSYFNARFFRS--SRALSSSSLSNKNQSSSQHLILRACRF	602
At2g28520	LKMKMSILLGIAQMNGLGILSFFNARFFRS-----SLD-----IRY	568
VPH1	YKMKLSILMGFIHMTYSYFFSLANHLYFNMSI-----D-----IIG	570
STV1	YKMKLSILMGYAHMTYSYFFSYINYRAKNKRV-----D-----IIG	616
	ooo +++++	
McVHA-a	QFIPQIIFLNSLFGYLSVLIIVKWCTGSKAD-----LYHVMIYMFSLPMDDELGENELFP	630
At2g21410	QFVPQMIFLNCLFGYLSVLIIVKWCTGSKAD-----LYHVMIYMFSLPMDDELGENELFP	635
At4g39080	QFIPQMIFLNSLFGYLSVLIIVKWCTGSKAD-----LYHVMIYMFSLPMDDELGENELFP	656
At2g28520	QFIPQMIFLNSLFGYLSVLIIVKWCTGSKAD-----LYH-----	602
VPH1	NFIPGLLEMQIFGYLSVQIVYKWAVDWVKDGKPAAGLNLMLINMFLSPG--TIDDELYP	628
STV1	NFIPGLVEMQIFGYLSVAVYKWSKDWIKDGKPAAGLNLMLINMFLAPG--TIDDQLYS	674
	+++++	

*

```

McVHA-a      GQKTAQQVLLLLALVAVPWWMLPKPFTMKWQHQN-----RH 666
At2g21410    NQRIVQLTFLFLALVSVPMMLPKPFTLKKQHEA-----RH 671
At4g39080    HQKTLQLVLLFLALVSVPCMLLPKPFLLKKQHEA-----RH 692
At2g28520    -----IVLLLLAFIAPVWMLFPKPFALRKIHME-----RF 632
VPH1         HQAKVQVFLLLMALVCI PWLLLVKPLHFKFTHKK-----KSHEPLPS-----TEADA 675
STV1         GQAKLQVLLLLALVAVPWWMLPKPFTLRRLNKNGGGGRPHGYQSVGNIEHEEQIAQQRH 734
            ++++++

McVHA-a      QGESYEPLQG-EESLQVETT--HDSHGGEHEEFSEVLVHQLIHTIEFVLGAVSNTASYL 723
At2g21410    QGLSYAQLDETDESLOVETN--GGG-HGHEEFSEIFVHQLIHTIEFVLGAVSNTASYL 728
At4g39080    QGQAYAPLDETDESLOVETN--GGGSHGHEEFSEIFVHQLIHTIEFVLGAVSNTASYL 750
At2g28520    QGRTYGVLVSSEVDLWVPEPSARGGGHHEEFSEIFVHQLIHTIEFVLGAVSNTASYL 692
VPH1         SSEDLAQQLISAMDADDAEEVEVSGSHG-EDFGDIMIHQVIHTIEFCLNCVSHHTASYL 734
STV1         SAEQFGQGMII SDVASVADSINESVGGGEQGFNF GDVMIHQVLIHTIEFCLNCISHTASYL 794
            ++++++

McVHA-a      RLWALSLAHSELSSVFYDKVLLLAWGFNN-----VLILIVGIIIVFIFATVGVLLVMETL 777
At2g21410    RLWALSLAHSELSSVFYKVLMLAWGFNN-----VFIWIVGILVVFIFATVGVLLVMETL 782
At4g39080    RLWALSLAHSELSSVFYKVLMLAWGFNN-----PLILIVGVLVVFIFATVGVLLVMETL 804
At2g28520    RLWALSLAHSELSTVFYKVLMLAWGFNN-----ILIRLIGVAVFAFAFAFILLMMETL 746
VPH1         RLWALSLAHSELSSVLTMTIQIAFGFRG---FVGVFMTVALFAMWFALTCAVLVLMEGT 791
STV1         RLWALSLAHSELSSVLDWMTISNIFSSKNVSGSPLAVMKVVFVLFAMWVFLVCIIVFMEGT 854
            ++++++

*           *

McVHA-a      SAFLHALRLHWVEFQNKFYLGDCYKFPFSESTIGEEEE----- 816
At2g21410    SAFLHALRLHWVEYQNKFYEGDCYKFAPTFTLVGNEDE----- 821
At4g39080    SAFLHALRLHWVEFQNKFYEGDCYKFAPTFTIETANDE----- 843
At2g28520    SAFLHALRLHWVEFMGKFFNGDCYKFPFSEFAL----- 780
VPH1         SAMLHSLRLHWVESMSKFFVGEGLPYEPPFAEYKDMEVAVASASSASS 840
STV1         SAMLHSLRLHWVEAMSKFEFEGYAYEPEFR-----AIIE----- 890
            ++++++
            *

```

Abb. 3.4.5: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Untereinheit a von *M. crystallinum*, *A. thaliana* und Hefe. Mit Hilfe des Programms ClustalW wurden die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *M. crystallinum* (McVHA-a), *A. thaliana* (At2g21410, At4g39080, At2g28520) und Hefe (VPH-1, STV1) aliniert. Über alle Arten hinweg identische Aminosäurereste sind dunkelgrau markiert, hellgrau die mit der Sequenz von *M. crystallinum* identischen Aminosäuren. Mit + eingezeichnet sind die mit Hilfe der Programme JPRED (EMBL, Hinxton) und THMM (EBS, Dänemark) ermittelten potentiellen Transmembran-Helix-Bereiche und mit * die für den Protonentransport essentiellen, geladenen Aminosäuren. Der mutmaßlich cytoplasmatisch orientierte Bereich des C-Terminus, der exprimiert werden konnte (3.6.2) ist mit ° markiert.

Demnach ist die Raumanordnung dieses Proteins gekennzeichnet durch neun membrandurchspannende α -Helices am C-Terminus, während der N-Terminus im Cytosol lokalisiert ist. Das Ende des C-Terminus befindet sich im Lumen der Vakuole (Leng et al., 1999).

Im Gegensatz zu allen anderen Untereinheiten der V-ATPase von *S. cerevisiae* ist die Untereinheit a durch zwei Gene codiert. Die Gene *vph1* und *stv1* kodieren für zwei funktionelle Proteine mit einer Sequenzidentität von 50 %. Für diese beiden Proteine konnte eine Lokalisation auf verschiedenen zellulären Kompartimenten beobachtet werden (Manolson, 1994).

In Pflanzen gibt es kontroverse Beobachtungen zur Frage, ob an einer funktionsfähig aufgereinigten V-ATPase eine Proteinmasse der Größe von 100 kDa nachgewiesen werden kann oder ob es sich bei den detektierten Komplexen um eine Zwischenstufe beim Zusammenbau der V-ATPase handelt (Ratajczak, 2000; Li und Sze, 1999).

Der Sequenzvergleich zwischen der abgeleiteten Aminosäuresequenz von McVHA-a mit den drei Isoformen von *A. thaliana* (At2g21410, At4g39080 und At2g28520) und den Aminosäureabfolgen der Gene *vph1* und *stv1* von Hefe (**Abb. 3.4.5**) zeigt schon aufgrund des unterschiedlichen hohen Grads der Sequenzkonservierung die Unterteilung des Proteins in zwei Domänen; nämlich den gering konservierten N-Terminus (AS 1-400) und den höher konservierten C-Terminus (AS 401-816). Dies entspricht der oben erwähnten Aufteilung bei *S. cerevisiae* in eine cytoplasmatische und eine membranständige Domäne. Die hohe Heterogenität der N-Termini äußert sich auch in einer Reihe von Deletionen und Insertionen, vor allem zwischen Gly 84-Ile 85 und Gly 141-Gln 142. An diesen Stellen besitzt STV1 im Gegensatz zu allen anderen Sequenzen zusätzliche Abschnitte von jeweils 20 AS. Der Bereich der ausgeprägten Heterogenität der verglichenen Sequenzen setzt sich noch bis Glu 193 fort. Die anderen Abschnitte des N-Terminus variieren weniger stark, vor allem am Übergang zur membranständigen Domäne.

Die über die Arten hindurch konservierten Aminosäuren des N-Terminus fallen durch einen hohen Anteil saurer und aromatischer Aminosäuren auf. Ein Vergleich der ersten 400 Aminosäuren der Untereinheit a von zehn verschiedenen Organismen zeigte, über alle Arten hinweg, das Vorhandensein von 34 konservierten Positionen. Von diesen trugen 10 Aminosäurereste eine saure Seitengruppe, 8 eine aromatische. Darüber hinaus gibt es einen hohen Anteil an aromatischen Aminosäuren die nicht über alle Arten hinweg konserviert sind. In Hefe konnte eine Beteiligung von Sequenzmotiven mit aromatischen Aminosäure-Resten an der Spezifität von Transportvorgängen gezeigt werden (Cooper und Stevens, 1996).

Eine eindeutige Zuordnung der untersuchten pflanzlichen Sequenzen aufgrund ihrer Identität bzw. Ähnlichkeit zu den Aminosäuresequenzen von VPH1 oder STV1 konnte aufgrund der hier gezeigten Alinierung nicht erfolgen.

Der Sequenzvergleich der vermutlich membranständigen Domäne der Untereinheiten a von *M. crystallinum* mit den Sequenzen von *A. thaliana* und Hefe ergab einen hohen Grad der Sequenzkonservierung, unterbrochen von kurzen variablen Bereichen bzw. Sequenzinsertionen. Eine Analyse der Sequenz von *M. crystallinum* in Bezug auf Sekundärstrukturvorhersage und membrandurchspannende Domänen ließ erkennen, dass die hochkonservierten Bereiche in den vorhergesagten Transmembrandomänen liegen. Diese Transmembrandomänen stimmen ebenfalls mit der von Leng et al. (1996) vorgeschlagenen Membrantopologie der Untereinheit a überein.

Die ortsgerichtete Mutation von Aminosäuren der Untereinheit a (VPH1) in Hefe erlaubte die Identifizierung von fünf geladenen Aminosäuren, deren Austausch eine deutliche Minderung

des Protonentransportes (Lys 743, His 743, Glu 789 und Arg 799) oder zu einer völligen Hemmung des ATP-getriebenen Protonentransportes (Arg 735) führte, ohne den Zusammenbau der V-ATPase zu beeinträchtigen (Kawasaki-Nishi et al., 2001; Leng et al., 1996; Leng et al., 1998). Diese Aminosäuren sind über die Arten hinweg hochkonserviert und finden sich somit auch in allen pflanzlichen Sequenzen.

3.4.6 Untereinheit d

Die Untereinheit d, die als fest assoziiertes Protein des V_0 -Sektors der V-ATPase von *Bos bovis* aufgereinigt wurde (Wang et al., 1988; Zhang et al., 1992) ist die am wenigsten charakterisierte Untereinheit des membranständigen V_0 -Sektors. Aufgrund ihrer Bindung an die cytoplasmatische Seite der V-ATPase wird vermutet, dass sie Interaktionen mit Untereinheiten des V_1 -Sektors vermittelt (Adachi et al., 1990). Trotz des Fehlens einer putativen Transmembrandomäne konnte das Genprodukt VMA6, die Untereinheit d in Hefe, nur mit stark chaotropen Mitteln vom V_0 -Sektor entfernt werden (Baeuerle, 1993). Baeuerle et al. konnten außerdem (1998) bei einer Aufreinigung von V-ATPase aus Roter Beete eine

McVHA-d	MYGFEAMNFNHGGYLEAIVRGYRSGLLTAADYNILCQCETLDDIKMHLSATDYGPLYQN	60
At3g28710	MYGFEALTFNIHGCYLEAIVRGHRAGLLTTADYNILCQCENLDDIKMHLSATRYGSPYLN	60
At3g28715	MYGFEALTFNIHGGYLEAIVRGHRAGLLTTADYNILCQCENLDDIKMHLSATRYGSPYLN	60
VMA6	M---EGVYFNIDNGFIEGVVRYRNGLLSNNQYINLTQCQDTELDLKLQLSSTDYGNFLSS	57
McVHA-d	EPS-PLHTTTLVEKCTLKLGDEYKHMLCQATEPLSTFLEYITYGHMIDNVVLIIGTGLTHE	119
At3g28710	EPS-PLHTTTIIVEKCTLKLVDDYKHMLCQATEPMSTFLEYIRYGHMIDNVVLIIVTGLTHE	119
At3g28715	EPS-PLHTTTIIVEKCTLKLVDDYKHMLCQATEPMSTFLEYIRYGHMIDNVVLIIVTGLTHE	119
VMA6	VSSESLETSLIQCYASSKLYHEFNFYIRDSSGSTRKEMDYITTYGYMIDNVALMIIGTIHD	117
McVHA-d	RDVQELLEKCHPLGMFDRIATLAVAQNMRLEYRLVLVDTPPLAPYFSECI-TSEDLDDMNI	178
At3g28710	RDVQELLEKCHPLGMFDSIATLAVAQNMRLEYRLVLVDTPPLAPYFSECL-TSEDLDDMNI	178
At3g28715	RDVQELLEKCHPLGMFDSIATLAVAQNMRLEYRLVLVDTPPLAPYFSECL-TSEDLDDMNI	178
VMA6	RDKGEILQRCHPLGFEDTLPPLSVAIDLESLEYETVLVDTPPLAPYFKNCFDTABELDDMNI	177
McVHA-d	EIMRNTLYKAYLEDFYRFC-QKLGWATGQNMSDLLAFEADRRADNITINSFG-PDLAPEG	236
At3g28710	EIMRNTLYKAYLEDFYKFC-QKLGGATAEIMSDLLAFEADRRAVNITINSIG-TELTRE-	235
At3g28715	EIMRNTLYKAYLEDFYRFC-QKLGGATAEIMSDLLAFEADRRAVNITINSIG-TELTRE-	235
VMA6	EIRNKLYKAYLEDFYRNVTEETPEPAKEMQTLGFEADRRSINIALNSLQSSDIDPD-	236
McVHA-d	DRTKLEHSTFGLLYPYGREKLAGCEDIYHARGEPEKDPYPPIFSAMSYGESEMLDWAFV	296
At3g28710	DRKKLYSNFGLLYPYGHEELAIICEDIDQVRGVMEKYPYPYQALFSKMSYGESQMLDKAFYE	295
At3g28715	DRKKLYSNFGLLYPYGHEELAIICEDIDQVRGVMEKYPYPYQALFSKMSYGESQMLDKAFYE	295
VMA6	LKSDLLPNIGKLYPLATFHLLAQDFFEGVRAALAN-----VVEYRGFLETGNLEDHFYQ	290
McVHA-d	EAVMRLCLSVSESLLEPSSLDMLMEQSRSRNLMWISQCVAHNQKHLRHDGCVVFMF	353
At3g28710	EEVRLCLAFEQQFHYAVFFAYMRLREQE-IRNLMWISQCVAQNQRSRIHDSVVYMF	351
At3g28715	EEVRLCLAFEQQFHYAVFFAYMRLREQE-IRNLMWISQCVAQNQRSRI-----	343
VMA6	LEMELCRDAFTQQFAISTVWAWMKSKEQE-VRNITWIAECIAQNRERINNYISVY-	345

Abb. 3.4.6: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Untereinheit d von *M. crystallinum*, *A. thaliana* und Hefe. Mit Hilfe des Programmes ClustalW wurden die abgeleiteten As-Sequenzen von *M. crystallinum* (McVHA-d), *A. thaliana* (At3g28710, At3g28715) und Hefe (VMA6) aliniert. Über alle Arten hinweg identische Aminosäurereste sind dunkelgrau markiert, hellgrau die mit der Sequenz von *M. crystallinum* identischen Aminosäuren.

Proteinmasse von 46 kDa identifizieren, die sich aus isolierten Tonoplasten mit chaotropen Reagenzien herauslösen ließ und mit einem Antikörper gegen VMA6 reagierte. Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *M. crystallinum*, *A. thaliana* und *S. cerevisiae* (**Abb. 3.4.6**) belegt einen hohen Konservierungsgrad über die gesamte Proteinsequenz hinweg, der nur von zwei Bereichen mit Sequenzinsertionen höherer Heterogenität unterbrochen wird. Interessant ist ein Bereich am C-terminalen Ende des Proteins zwischen Ser-304 und Asp-317, der zwischen den Isoformen von *A. thaliana* und Hefe hochkonserviert ist, mit einem hohen Anteil aromatischer Aminosäuren der jedoch keinerlei Ähnlichkeiten zu der Sequenz von *M. crystallinum* aufweist.

3.4.7 Untereinheit e

Die bisher kleinste Untereinheit der V-ATPase ist ein etwa 10 kDa großes Protein im V_0 -Sektor. Merzendorfer et al. konnten (1999) diese Untereinheit bei *Manduca Sexta* näher charakterisieren und beschrieben diese stark glykosylierte Untereinheit als eine konstitutive Untereinheit der V-ATPase. Im Gegensatz zu allen anderen V-ATPase-Untereinheiten, die in der Hefe eine Entsprechung haben, gibt es hier kein Protein, das in Größe und Funktion der bei den anderen verglichenen Arten vorhandenen Untereinheit e entspräche. Ludwig et al. zeigten (1998) eine zumindest strukturelle Ähnlichkeit zwischen der Untereinheit e von Rind und dem Hefe-Chaperon VMA21p, das beim Assemblieren der V-ATPase im Endoplasmatischen-Reticulum wichtig ist. In der funktionellen V-ATPase war VMA21p jedoch nicht nachweisbar. Eine Charakterisierung dieses Proteins durch Aufreinigung von funktioneller V-ATPase und anschließender Aminosäuresequenzierung gelang bei Larven des Tabak-Hornwurms (*Manduca sexta*) und aus der Nebenniere des Rindes (Merzendorfer et al., 1999; Ludwig et al., 1998).

Bei *M. crystallinum* konnte durch Recherchen in der Datenbank dbEST mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz der Untereinheit e von *M. sexta* (Acc.Nr. AJ006029) das EST-Fragment BF479681 identifiziert werden. Dieses Fragment enthielt ein offenes Leseraster für ein Protein von 70 AS. Das Protein wies eine Homologie von 37 % zur Sequenz der Untereinheit e (Subunit M 9.7; Merzendorfer et al., 1999) auf. Aus den nicht kodierenden Sequenzen stromauf- und stromabwärts wurden die Primer e-f1 und e-r1 abgeleitet. Eine PCR mit diesen beiden Primern ergab ein 700 Bp großes Produkt, dessen Sequenz das obige, für ein Protein der Größe 7,9 kDa kodierendes Leseraster enthielt. Ein Homologievergleich dieses

Leserasters mittels des Programmes FASTA (EMBL, Hinxton) ergab neben der Verwandtschaft mit der Sequenz von *Manduca sexta*, Ähnlichkeiten mit Sequenzen von *H. sapiens*, *C. elegans* und *Bos bovis* im Bereich zwischen 33 und 37 %. Die höchsten Homologiewerte wiesen zwei Sequenzeinträge von *A. thaliana* mit einer Identität von jeweils 80 % auf. In **Abb. 3.4.7** ist der Sequenzvergleich von VHA-e aus *M. crystallinum*, den beiden Isoformen von *A. thaliana* und sowie der Aminosäuresequenz *M. sexta* dargestellt. Auffällig ist vor allem die geringere Länge der drei aus Pflanzen bekannten Sequenzen (je 70 Aminosäuren), im Vergleich zu allen anderen bekannten Sequenzen der Untereinheit e (je 88 Aminosäuren).

```

McVHA-e      MG--FLITTLIFLVIIGIIASLCTRIICFNRGPESTNLLHLLTLVLTATVCCWMMWAIVVLAQM 58
At5g55290    MG--FLITTLIFVVVGIIASLCVRIICCNRGPESTNLLHLLTLVLTATVCCWMMWAIVVIAQM 58
At4g26710    MA--FVVTSLIFAVVGIIASICTRIICFNKGPESTNLLHLLTLVLTATVCCWMMWAIVVIAQM 58
MsVHA-e      MGASEVPIITVFTILWGVVGVICP--IFAPKGEENRGI IQVVLMLTAAT-CWLFMLCAVMAQM 58
              *****
              *****

McVHA-e      KPLINPILNESE----- 70
At5g55290    NPLIVPILSETE----- 70
At4g26710    NPLIVPILSEVE----- 70
MsVHA-e      NPLIGRINNETLIWISRTWGNPISNHTGA 88
              +++++
              +++++

```

Abb. 3.4.7: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Untereinheit e. Die Sequenzen der Untereinheit e von *M. crystallinum* (McVHA-e), *A. thaliana* (At5g55290, At4g26710) und *Manduca sexta* (MsVHA-e) wurden aliniert. Mit * markiert sind die Abschnitte der putativen Transmembranhelix-Domänen und mit + die Lage der N-Glykosylierungsstellen (Datenbank ProSiteAccNr. 00001) von *M. sexta* und *M. crystallinum*. Weitere Markierung wie **Abb. 3.4.6**.

Der hohe Konservierungsgrad der pflanzlichen Sequenzen zeigt sich über die gesamte Sequenz hinweg. Interessant sind die Austausch zweier aromatischer Aminosäuren Tyr 21 und Phe 25, die bei *M. crystallinum* und der Proteinsequenz des Genes At4g26710 von *A. thaliana* vorkommen, gegen die hydrophoben Aminosäuren Val-21 und Cys-25 der Isoform At5g55290. Der Vergleich der pflanzlichen Aminosäuresequenzen mit der Sequenz der Untereinheit e von *M. sexta* zeigt einen hohen Anteil konservierter aromatischer Aminosäuren an den über alle Spezies konservierten 22 Aminosäuren.

Trotz der insgesamt geringen Sequenzkonservierung der Untereinheit e über die Artgrenzen hinweg weisen alle hier verglichenen Sequenzen denselben stark hydrophoben Charakter auf. Dies wird auch durch eine Analyse der Sekundärstruktur (THMM, CBS, Dänemark) bestätigt: Alle Sequenzen besitzen dieselbe konservierte Abfolge von Gruppen aus jeweils zwei Transmembran-Helices die von einem kurzen extraplasmatischen Sequenzabschnitt und einem längeren cytoplasmatischen C-Terminus unterbrochen sind.

Merzendorfer et al. (1999) konstatierten bei *M. sexta*, dass die Nukleotidsequenz der Untereinheit e für ein Protein von 9,7 kDa codierte. Das mit einem spezifischen Antikörper markierte, entsprechende Protein der aufgereinigten V-ATPase wies jedoch eine Masse von

20 kDa auf. Diese zunächst unverständliche Diskrepanz zwischen theoretischer und tatsächlicher Molekülmasse wurde durch starke Glykolysierung des Proteins erklärt. In der Aminosäuresequenz von *M. sexta* wurden zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen identifiziert an Asn 68 bis Thr 71 und Asn 84 bis Gly 87 (Datenbank Prosite AccNr. 00001). Die Sequenz McVHA-e von *M. crystallinum* besitzt an ihrem C-Terminus im Gegensatz zu den anderen bisher charakterisierten Aminosäuresequenzen der Untereinheit e (Ludwig et al., 1998) ebenfalls ein N-Glykolisierungsmotiv. Zwei Ausnahmen bilden hierbei die beiden

Untereinheit der V-ATPase	Unterschiede/ Gemeinsamkeiten zwischen Untereinheiten der pflanzlichen V-ATPase und Hefe	Unterschiede/ Gemeinsamkeiten innerhalb der Sequenzen von <i>A. thaliana</i> und <i>M. crystallinum</i>
A	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ Alle für die katalytische Bindung des ATPs im P-Loop wichtigen Aminosäuren sind hochkonserviert. ⇒ Das für die ATPase-Aktivität essentielle Phe-477 ist in allen Sequenzen vorhanden ⇒ Eine regulatorische Cysteinbrücke zwischen dem konservierten Cystein aus dem P-Loop und Cys 535 ist konserviert 	⇒ <i>A. thaliana</i> besitzt 1 Isoform für das Gen der Untereinheit A, <i>M. crystallinum</i> hat 2 Isoformen
B	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ 20 aminoterninale AS sind nur bei den Pflanzlichen Sequenzen vorhanden ⇒ 30 AS des Carboxyterminus von Hefe fehlen bei pflanzlichen Sequenzen ⇒ Die nichtkatalytische ATP-Bindestelle zeigt Unterschiede in der Hydrophobizität zwischen Hefe und Pflanzen ⇒ Ein 20 As langer Abschnitt zwischen Lys187-Asp201 zeigt hohe Heterogenität über alle Sequenzen hinweg 	⇒ Phosphorylierungsstelle zwischen Tyr-303 und Ser-321 bei <i>M. crystallinum</i> und 2 Isoformen des Genes bei <i>A. thaliana</i> , nicht bei der Isoform At1g22260
G	⇒ Hohe Heterogenität zwischen allen Sequenzen, bei den ersten 60 As höherer Konservierungsgrad zwischen allen Sequenzen	
H	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ Aufteilung in zwei konservierte Domänen am N- und am C-Terminus ⇒ Sequenzmotiv für aus „Armadillo-repeats“ gebildete Superhelixstruktur ist bei allen Sequenzen vorhanden ⇒ Konservierter Bereich mit konservierten aromatischen Aminosäuren zwischen As 358-388. ⇒ Konservierte Salzbrücke zwischen His-367 und Asp-413 	
a	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ Aufteilung in einen heterologen N-Terminus und eine konservierte Transmembrandomäne ⇒ Hoher Anteil an konservierten aromatischen und sauren Aminosäuren im N-Terminus ⇒ Die Isoform STV1 von <i>S. cerevisiae</i> besitzt 2 20 As lange einzigartige Einschübe im N-Terminus 	
d		⇒ Hoher Anteil an aromatischen AS im zwischen den <i>A. thaliana</i> -Isoformen und Hefe konservierten Bereich Ser-304 und Asp-317. Dieser Bereich zeigt keine Ähnlichkeit zu der Sequenz von <i>M. crystallinum</i>
e	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ Funktionelle Ähnlichkeit der pflanzlichen Sequenzen zu Hefe-Chaperon VMA21p. ⇒ Pflanzliche Sequenzen sind kleiner (70 As) als die Sequenzen von <i>M. sexta</i> und <i>B. bovis</i> (je 88 As) ⇒ Hoher Anteil an über alle Sequenzen konservierte, aromatische Aminosäuren 	⇒ Sequenz von <i>M. crystallinum</i> codiert C-terminal für eine Glykolysierungsstelle, die Sequenzen von <i>A. thaliana</i> nicht.

Tabelle 3: Übersicht über Unterschiede und Gemeinsamkeiten der verglichenen Sequenzen der V-ATPase. Die Tabelle gibt einen Überblick über den Vergleich der Sequenzen der pflanzlichen V-ATPase mit den Sequenzen von Hefe in Bezug auf gemeinsame und unterschiedliche Sequenzeigenschaften, andererseits sind die Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den Isoformen der V-ATPase-Untereinheiten von *A. thaliana* und *M. crystallinum* aufgezeigt. Die angegebenen Aminosäurepositionen beziehen sich dabei immer auf die klonierten Sequenzen von *M. crystallinum*

Sequenzen der Isoformen von *A. thaliana*, denen dieses Sequenzmotiv fehlt. Eine Suche nach weiteren pflanzliche Sequenzen für VHA-e Gene in der Datenbank dbEST (NCBI, USA) zeigte bei keiner weiteren pflanzlichen Sequenz das Vorhandensein eines solches Glykosylierungsmotivs.

3.4.8 Zusammenfassung des Vergleichs der Untereinheiten

Zur besseren Übersicht wurden die gefunden Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten der Untereinheiten beim Vergleich zwischen pflanzlichen Sequenzen und Hefe sowie die Unterschiede zwischen den verglichenen Isoformen von *A. thaliana* und *M. crystallinum* in **Tabelle 3** dargestellt.

3.5 *Transkriptomanalyse zur Expression der V-ATPase-Untereinheiten in Mesembryanthemum crystallinum*

Neben der posttranskriptionellen Regulation der V-ATPase-Aktivität durch Redoxregulation und Modifikation der Untereinheitenzusammensetzung, ist die Regulation der Expression der für die V-ATPase kodierenden mRNA-Mengen ein wichtiger Mechanismus zur Modulation der Aktivität der V-ATPase im Verlauf der Zellentwicklung und in Reaktion auf abiotische Stressoren (Dietz et al., 2001). Untersuchungen zur Genexpressionsänderung der Untereinheiten der pflanzlichen V-ATPase wurden bisher in verschiedenen Pflanzen durchgeführt. Diese umfangreichsten Untersuchungen bei *M. crystallinum* beschränkten sich auf die Expression der Untereinheiten A, B (Löw et al., 1996) E (Dietz und Arbinger, 1996) und c (Miltos et al., 1996), sowie die Expression der Untereinheit F (Golldack und Dietz, 2001).

Es liegen bisher jedoch keinen umfassenden Ansätze vor, die Expression aller Untereinheiten der V-ATPase einer Pflanze im Kontext mit der Expression der anderen Protonen-pumpenden ATPasen sowie als Antwort auf verschiedene abiotische Stresszustände zu untersuchen.

Die beiden geläufigen Methoden zur Untersuchung der Transkriptspiegel, der Northern Blot (2.3.12) und die semiquantitative RT-PCR, eignen sich aufgrund des hohen Aufwands nicht zur Untersuchung der Expression einer größeren Anzahl von Genen.

Um die Expressionsänderung aller Untereinheiten der V-ATPase unter Stressbedingungen zu untersuchen, wurde deshalb ein cDNA-Array etabliert (2.5). Als Referenzen wurden neben den cDNA-Sequenzen der für die 12 Untereinheiten der V-ATPase kodierenden Gene auch zwei Sequenzen für die ebenfalls am Tonoplasten lokalisierte Pyrophosphatase und eine für die Plasmamembran-ATPase kodierende Sequenz auf die Membran aufgebracht. Durch Hybridisierung der Arrays mit cDNA-Sonden, die das jeweilige Genexpressionsmuster nach Applikation von Stress widerspiegeln, sollten die Expressionsänderungen der für die verschiedenen H^+ -ATPasen in der Pflanze kodierenden Gene in Blättern und Wurzeln von *M. crystallinum* untersucht werden.

3.5.1 Herstellung des cDNA-Arrays

Zur Herstellung des cDNA-Arrays wurden aus den für die Untereinheiten der V-ATPase von *M. crystallinum* kodierenden Sequenzen Abschnitte von etwa 500 bp Länge ausgesucht, die durch eine PCR mit spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert wurden (2.2.2). Zum Auffinden von EST-Fragmenten die für die Plasmamembran (PM)-ATPase in *M. crystallinum* kodieren, wurde mit der Sequenz des *aha1*-Genes von *A. thaliana* (Harper et al., 1989) die Datenbank dbEST (NCBI, USA) durchsucht. Für *M. crystallinum* fand sich die Sequenz eines 847 Bp langen EST-Fragments, dessen theoretische AS-Sequenz eine Homologie von über 90 % zur PM-ATPase verschiedener Pflanzenspezies hatte. Nach Ableitung der Primer PM-f-1 und PM-r-1 wurde ein 500 bp großes Fragment amplifiziert und sequenziert. Ebenso wurden

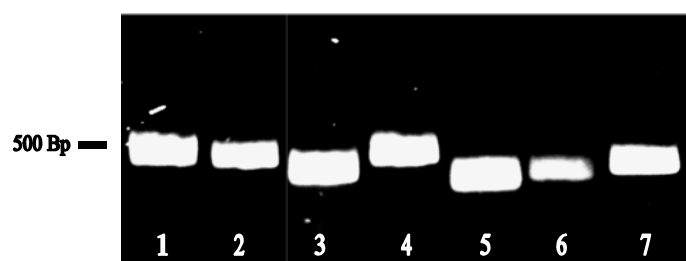


Abbildung 3.5.1: PCR-Amplifizierung von Sequenzfragmenten der Untereinheiten der V-ATPase. Zur Amplifizierung wurden im Anhang aufgeführte geninterne Primer verwendet. Die PCR wurde im 100 μ l Maßstab mit 2 μ l cDNA (2.3.2) von *M. crystallinum* als Matrize durchgeführt. Zur Kontrolle wurden 10 μ l des PCR-Ansatzes auf das Gel aufgetragen. Spur 1: VHA-A, Spur 2: VHA-B, Spur 3: VHA-D, Spur 4: VHA-E, Spur 5: VHA-G, Spur 6: VHA-H, Spur 7: VHA-a.

mit Hilfe des BLAST-Algorithmus zwei zur Sequenz der vakuolären Pyrophosphatase von *A. thaliana* (At1g15690) homologe Sequenzen aus *M. crystallinum* identifiziert (dbEST AccNr. Be037438 und Be037192). Mit den abgeleiteten Primer PP1-f und PP1-r sowie PP2-f und PP2-r wurde eine PCR mit *Mesembryanthemum*-cDNA als Matrize durchgeführt. Die erhaltenen 500 Bp großen Produkte wurden

ebenfalls sequenziert (2.6). **Abb. 3.5.1** zeigt das Ergebniss eines PCR-Ansatzes. Alle zur Amplifikation der spezifischen DNA-Fragmente verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt. Nach Fällung (2.2.7) der DNA wurden die PCR-Produkte auf eine Konzentration von 200 ng/μl eingestellt und auf Membranen transferiert (2.5). **Abb. 3.5.2 a)** zeigt das doppelte Auftragsschema der Proben. Um eine maximale Dynamik der Signale zu erzielen

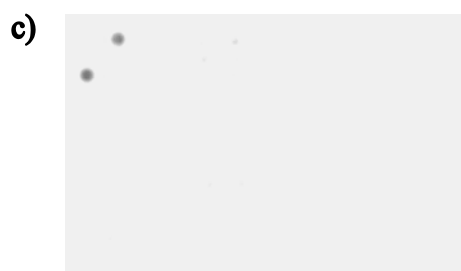
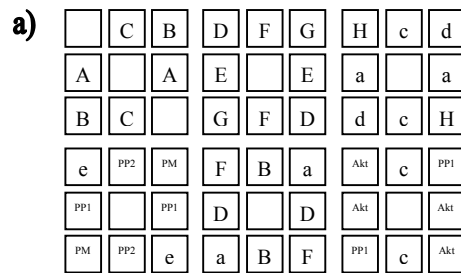


Abb. 3.5.2: Auftragsschema und Probe- und Kontrollhybridisierung des V-ATPase-cDNA-Arrays. a) stellt die schematische Darstellung der doppelten Auftragung der amplifizierten PCR-Produkte dar. Abk.: PP1: vakuoläre Pyrophosphatase Isoform 1, PP2 vakuoläre Pyrophosphatase Isoform 2, PM Plasmamembran-ATPase. b) zeigt eine Probehybridisierung durchgeführt mit 5 ng/ μl DIG-markierter cDNA aus unter Kontrollbedingungen gezogen *M. crystallinum*-Pflanzen. c) zeigt die Probehybridisierung des V-ATPase-Arrays mit einer DIG-markierten PCR-Sonde komplementär zur Sequenz der Untereinheit B von *M. crystallinum*. Die Sondenkonzentration betrug 1 ng/ μl.

wurden die Membranen mit verschiedenen Konzentrationen DIG-markierter cDNA aus unter Kontrollbedingungen angezogenen Pflanzen hybridisiert (2.4). Als optimal erwies sich hierbei eine Konzentration von 5 ng DIG-markierter cDNA pro ml Hybridisierungslösung. **Abb. 3.5.2 b)** präsentiert eine repräsentative Hybridisierung des V-ATPase-Arrays. Hierbei ist zu erkennen, dass die für die einzelnen Untereinheiten kodierenden DNA-Sequenzen unter den

gewählten Bedingungen ein Signal in der etwa gleichen Intensität ergaben. Eine Ausnahme macht hier die cDNA der Untereinheit H deren Signal in etwa die doppelte Intensität erreichte. Die Hybridisierung der beiden Isoformen der vakuolären Pyrophosphatase und die cDNA-Position der Plasmamembran-ATPase ergaben ebenfalls ein stärkeres Signal. Die für die Untereinheit e kodierende DNA konnte unter den verschiedenen getesteten Hybridisierungsbedingungen nicht markiert werden. Zum Test der Spezifität der Hybridisierung wurde mittels PCR eine zur Sequenz der Untereinheit B homologe DIG-markierte Sonde hergestellt (2.3.3.2) und der V-ATPase Array hybridisiert (**Abb. 3.5.2 c)**).

3.5.2 Stress-abhängige Expressionsänderungen der V-ATPase-Untereinheiten

Zur Untersuchung der Stressantwort von *M. crystallinum* wurden fünf verschiedene kurzzeitige Stresszustände gewählt. Jeweils fünf Wochen alte, auf Hydrokultur gezogene *M. crystallinum* (2.1.1.) wurden für 6 Stunden entweder (1.) mit 400mM NaCl gestresst, mit (2.) 700 mM Mannitol behandelt, (3.) bei 6 °C Kälte und (4.) bei 42 °C Hitze exponiert und (5.) doppelter Quantenflussdichte ($800 \mu\text{mol Quanten m}^2\text{s}^{-1}$ statt $400 \mu\text{mol Quanten m}^2\text{s}^{-1}$) ausgesetzt. In drei unabhängigen Experimenten wurde von den so behandelten Pflanzen das dritte Folgeblatt und die Wurzeln geerntet und daraus RNA isoliert (2.10). Die RNA diente als Matrize zur Herstellung einer DIG-markierten cDNA (2.3.3.1). Diese wurde dann in einer Konzentration von 5 ng/ μl zur Hybridisierung der V-ATPase-Arrays verwandt. Die Auswertung der Hybridisierung der V-ATPase-Arrays erfolgte wie in (2.5.3) beschrieben. **Abb. 3.5.3** zeigt die Ergebnisse der Auswertung der Hybridisierung des V-ATPase Arrays mit cDNA salzgestresster *Mesembryanthemum*-Pflanzen. Bei sechsstündiger Applikation von Salzstress steigt im Blatt die Expression aller untersuchten V-ATPase-Gene um das 1,5-2fache an, mit Ausnahme der Untereinheit C deren Expressionspiegel sich im Vergleich zu

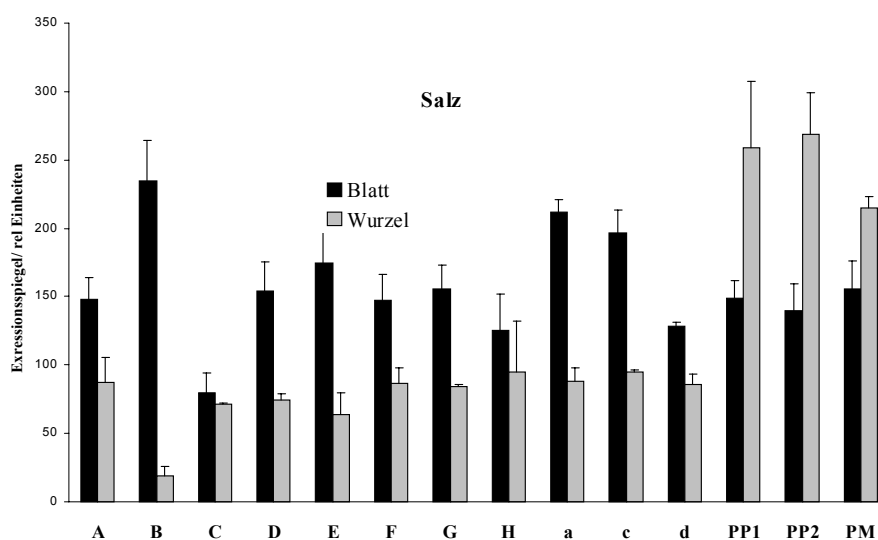


Abb. 3.5.3: Vergleich des Expressionspiegel der V-ATPase Untereinheiten unter Salzstress. Auswertung der Hybridisierung des V-ATPase-Arrays mit DIG-markierter cDNA aus Wurzeln und Blätter 5 Wochen alter, für 6 h mit 400 mM NaCl behandelter Pflanzen. Aus den Doppelwerten der Expressionspiegel jedes Arrays wurde der Mittelwert ermittelt und im Vergleich zu den Werten des Expressionspiegels von Aktin (=100) normalisiert. Die Ergebnisse eines von jeweils drei unabhängigen Experimenten wurden für Blatt und Wurzel addiert und im Vergleich zu den Werten des Kontrollexperimentes (=100) normalisiert. Anschließend wurden die Werte der drei Experimente addiert. Die Fehlerbalken markieren die Werte der berechneten Standardabweichung.

den Kontrollbedingungen nicht veränderte. Ebenfalls gesteigert waren die Transkriptmengen der für beiden Isoformen der V-PPase und die PM-ATPase codierenden Sequenzen. Völlig anders hingegen war die Änderung in der Wurzel. Während die Expressionsspiegel der V-ATPase-Untereinheiten nach 6 h Salzstress weitgehend unverändert blieben, stiegen die Transkriptmengen für die V-PPasen und die PM-ATPase um das 2 bis 3 fache. Der stärkste Unterschied in der Expression unter Salzstress zwischen Blatt und Wurzel ergab sich für die Transkriptmenge von McVHA-B, die im Blatt gegenüber der Wurzel um das 10fache gesteigert war, während bei den anderen Untereinheiten die Transkriptmengen zwischen Blatt und Wurzel sich maximal verdoppelten, wenn nicht gar konstant blieben.

Osmotischer Stress (**Abb. 3.5.4**), der durch die Applikation von Mannitol in einer Konzentration von 700 mM (osmotisch äquivalent zu einer NaCl-Konzentration von 400 mM, siehe oben) hervorgerufen wurde, führte im Vergleich zu Salzstress zu einer völlig andersartigen Beeinflussung der Expression von V-ATPase-Untereinheiten. Der osmotische Streß bewirkte in der Wurzel keine signifikante Veränderung der Expression der untersuchten Gene, im Blatt hingegen war eine Verringerung der Menge aller Transkripte zu beobachten. Die Ausnahme bildete hier die Untereinheit G, deren Expressionsspiegel in Wurzeln und Blättern im Vergleich zu den Kontrollen unverändert blieb.

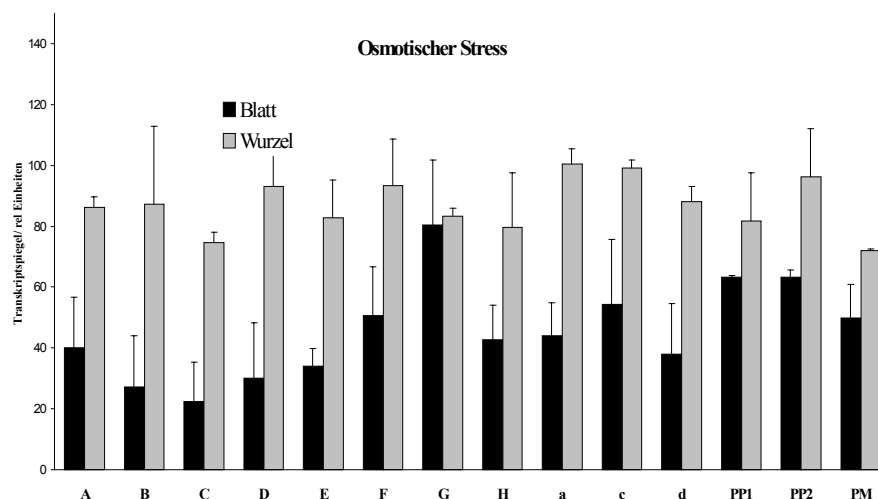


Abb. 3.5.4: Vergleich der Expressionsspiegel der V-ATPase Untereinheiten nach osmotischem Stress. Auswertung der Hybridisierung des V-ATPase-Arrays mit DIG-markierter cDNA aus Wurzeln und Blättern 5 Wochen alter, für 6 h mit 700 mM Mannitol behandelter Pflanzen. Die Auswertung der Arrays erfolgte wie in **Abb. 3.5.3** beschrieben.

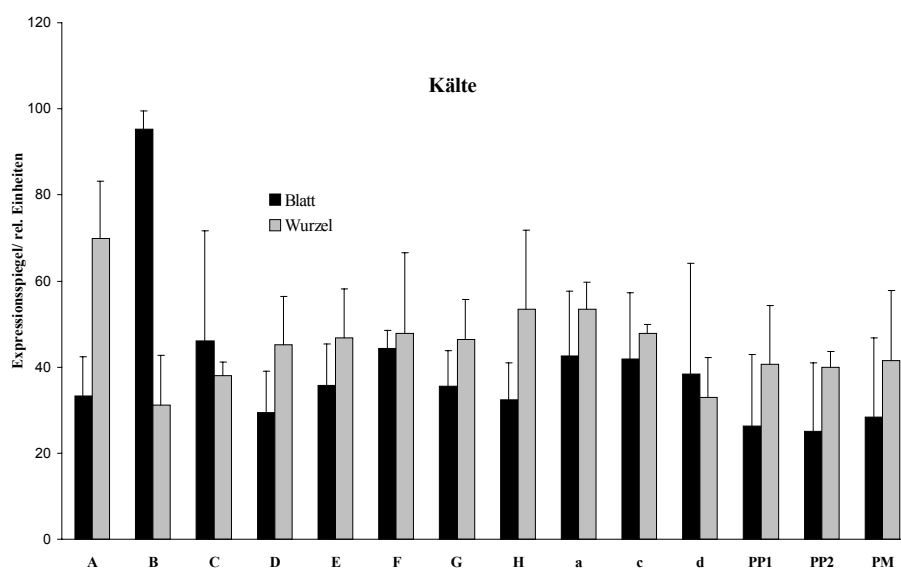


Abb. 3.5.5: Vergleich der Expressionsspiegel der V-ATPase Untereinheiten nach Kältestress. Dargestellt ist die Auswertung der Hybridisierung des V-ATPase-Arrays mit DIG-markierter cDNA aus Wurzeln und Blättern 5 Wochen alter, für 6 h mit 4°C kältegestresster Pflanzen. Die Auswertung erfolgte wie in **Abb. 3.5.3** beschrieben.

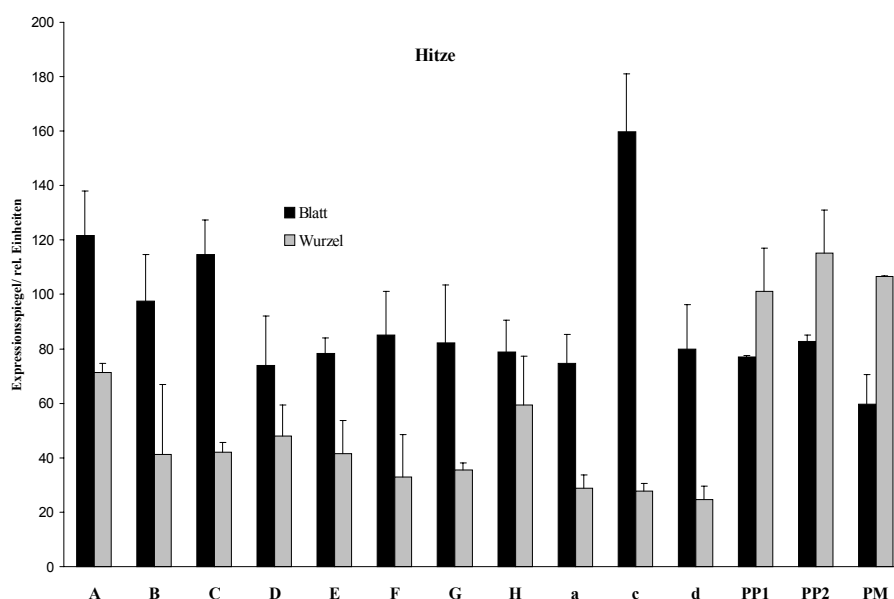


Abb. 3.5.6: Vergleich der Expressionsspiegel der V-ATPase Untereinheiten nach Hitzestress. Auswertung der Hybridisierung des V-ATPase-Arrays mit DIG-markierter cDNA aus Wurzeln und Blättern 5 Wochen alter, für 6 h mit 42 °C hitzegepressten Pflanzen. Die Auswertung erfolgte wie in **Abb. 3.5.3** beschrieben.

Sechsstündiger Kältestress (**Abb. 3.5.5**) bewirkte bei allen untersuchten Sequenzen eine Minderung der Transkriptspiegels, sowohl im Blatt als auch in der Wurzel. Die Ausnahme war die mRNA-Menge der Untereinheit B im Blatt, die unverändert blieb. Sechsstündiger

Hitzestress (**Abb. 3.5.6**) führte in der Wurzel bei V-ATPase-Untereinheiten zu einer Minderung des Expressionsspiegels. Die Expression der PPasen und der PM-ATPase blieben im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Im Blatt hingegen bewirkte Hitze eine leichte Steigerung des Expressionsniveaus aller untersuchten Gene, die stärkste Steigerung war bei der Transkriptmenge der Untereinheit c festzustellen.

Eine Verdopplung der Lichtintensität über sechs Stunden (**nicht dargestellt**) bewirkte im Blatt eine signifikante Senkung des Transkriptspiegels der Untereinheiten C, D, E, G, H, c und d, sowie der PPasen und der PM-ATPase. Die Transkriptspiegel der anderen Untereinheiten blieben im Blatt von Lichtstress unbeeinflusst. In der Wurzel hatte die Applikation von Lichtstress keinen Einfluss auf die Transkriptmengen der untersuchten Gene. Zur Übersicht sind in **Tabelle 3** die verschiedenen Expressionsmengenänderungen aufgelistet. Als signifikant wurden für die Auswertung nur Transkriptmengenänderungen betrachtet, die 50 % über oder unter dem Wert der Kontrolle lagen.

	Expressionsänderung nach 6 h Behandlung mit:				
	400 mM NaCl Blatt/ Wurzel	700 mM Mannitol Blatt/ Wurzel	4 °C Blatt/ Wurzel	42 °C Blatt/ Wurzel	800 µmol Quanten x (m ² s) ⁻¹ Blatt/ Wurzel
VHA-A	+ / 0	0 / 0	- / 0	0 / 0	0 / 0
VHA-B	++ / -	- / 0	0 / -	0 / 0	0 / 0
VHA-C	0 / 0	- / 0	0 / -	0 / -	0 / 0
VHA-D	+ / 0	- / 0	- / 0	0 / 0	0 / 0
VHA-E	+ / 0	- / 0	- / 0	0 / 0	0 / 0
VHA-F	0 / 0	0 / 0	- / 0	0 / 0	0 / 0
VHA-G	0 / 0	0 / 0	- / 0	0 / 0	0 / 0
VHA-H	0 / 0	0 / 0	- / 0	0 / 0	- / 0
VHA-a	+ / 0	0 / 0	0 / 0	0 / -	0 / 0
VHA-c	+ / 0	0 / 0	0 / 0	+ / -	0 / 0
VHA-d	0 / 0	0 / 0	0 / -	0 / -	- / 0
PP1	0 / ++	0 / 0	- / 0	0 / 0	- / 0
PP2	0 / ++	0 / 0	- / -	0 / 0	- / 0
PM	0 / ++	0 / 0	- / 0	0 / 0	- / 0

Tabelle 3: Übersicht über die Transkriptmengenänderungen der ATPasen unter verschiedenen Stressbedingungen. Übersicht über die Zunahme (+) bzw. Abnahme (-) der Transkriptmenge nach Applikation von 6 h Stress. Als signifikant wurden hierbei nur Mengenänderungen betrachtet, die 50 % über oder unter dem Wert der Kontrolle lagen. Als besonders stark (++) wurde eine Zunahme der Transkriptmenge um über 100 % betrachtet.

3.6 Expression von V-ATPase-Untereinheiten und die Herstellung und Charakterisierung polyklonaler Antiseren

Zur eingehenden Beschreibung der V-ATPase der Pflanze war es notwendig, deren Untereinheiten sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen aufzureinigen. Bisherige Untersuchungen zur V-ATPase in Pflanzen wurden mit Antiseren durchgeführt, die gegen das gesamte aufgereinigte Holoenzym gerichtet waren (Fischer-Schliebs et al., 1997). Außerdem wurden Antiseren gegen Untereinheiten der Hefe-V-ATPase benutzt (Li und Sze, 1999). Alternativ wurden Antikörper gegen im zweidimensionalen Gel aufgetrennte Polypeptide hergestellt, die sich dann bei der anschließenden genetischen Charakterisierung als Untereinheiten der V-ATPase erwiesen (Betz und Dietz., 1991). Mit der Klonierung von cDNAs aller V-ATPase-Untereinheiten von *M. crystallinum* eröffnete sich nun die Möglichkeit, gezielt Untereinheiten in voller Länge oder definierte Epitope der Untereinheiten heterolog zu exprimieren und diese rekombinanten Proteine anschließend aufzureinigen. Neben der Herstellung von Antiseren war die Expression von Untereinheiten unter nativen Bedingungen zur Untersuchung von Untereinheiteninteraktionen wichtig.

Ein für einen solchen Ansatz geeignetes Expressionssystem musste in der Lage sein, **a)** die Klonierung der offenen Leseraster in den spezifischen Expressionsvektor schnell und routinemäßig zu ermöglichen, **b)** große Mengen an rekombinantem Protein herzustellen und **c)** die Aufreinigung des exprimierten Proteins wahlweise unter nativen oder denaturierenden Bedingungen erlauben.

Diese Bedingungen wurden am besten von dem “Topo-pCR-NT-T7”-Expressionssystem“ (Invitrogen, Holland) erfüllt, das die schnelle, durch Topoisomerase-vermittelte Klonierung in einen Vektor, die Expression in *E. coli* und die Affinitätsaufreinigung des rekombinant exprimierten Proteins unter nativen und denaturierenden Bedingungen ermöglichte (2.12.2.1 und 2.12.5.2.2). Der Expressionsvektor pCRNT-T7-Topo codiert u.a. eine Bindestelle für die bakterielle T7-Polymerase und eine sechsfache Histidin-Aminosäuresequenz, an die im selben Leseraster die zu exprimierende Sequenz kloniert wurde. Am 3'-Ende der multiplen Klonierungsseite des Vektors befinden sich bakterielle Stopcodons in jedem Leseraster.

Zur Klonierung der einzelnen Untereinheiten in den Expressionsvektor wurden die entsprechenden Leseraster mittels PCR amplifiziert (2.2.2), die erhaltenen Produkte über ein Agarosegel aufgetrennt (2.2.10.1), die entsprechende Banden ausgestochen und aus dem Agarosestück eluiert (2.2.8). Die Topoisomerase gestützte Klonierung in den Expressionsvektor erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Das Vorliegen des korrekten Produktes in der richtigen Orientierung wurde durch Kolonien-PCR (2.2.3) und nachfolgende

Sequenzierung des PCR-Produktes (2.6) überprüft. Um die klonierten Fusionsprodukte zu exprimieren, wurde der bakterielle *E. coli*-Expressionsstamm BL21p lys (Invitrogen, Groningen) mit 10 ng des jeweiligen Konstrukts transformiert (2.8.2.3). Eine 1 l Kultur dieser transformierten Bakterien wurde mit 500 μ M IPTG als Endkonzentration zur Expression des Fusionsproteins induziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 8 der 12 für Untereinheiten der V-ATPase aus *M. crystallinum* kodierenden, klonierten Leseraster exprimiert. **Tabelle 5** gibt eine Übersicht über klonierten Konstrukte und den Erfolg der Expression. Nachfolgend wird die Expression von Proteinen beschrieben, die dann für das weitere experimentelle Vorgehen wichtig wurden.

McVHA-	Lokalisation/ eventuelle Funktion	Sequenzinformation in <i>M. crystallinum</i>: Größe des offenen Leserasters (Bp)/ theoretische Größe des Proteins (kDa)	Expression des rekombinanten Protein in <i>E. coli</i> mit dem Vektor pCR-NT- T7-Topo
A	V ₁ -Kopf/ katalytische ATP-Bindung	1890 Bp/ 70 kDa	Schwache Expression der mutmaßlichen Volllänge
B	V ₁ -Kopf/ regulatorische ATP- Bindung	1600 Bp/ 55 kDa	54 kDa Protein, gute Expression
E	V ₁ -Stiel/ evt. Rotor	1070 Bp/ 26 kDa (Dietz und Arbinger, 1996)	Starke Expression der Volllänge
G	V ₁ -Stiel/ Stator	950 Bp/ 18 kDa	Expression der Volllänge
H	V ₁ -Stiel? Katalytische Funktion	1654 Bp/ 54 kDa	Geringe Expression der mutmaßlichen Volllänge und von Abbruchprodukten
c	V ₀ / H ⁺ -Transport	961 Bp/ 16 kDa (Tsiantis et al., 1996)	Schwache Expression eines 16 kDa-Proteins
a	V ₀ /H ⁺ -Transport	1900 bp/ 95 kDa	Keine Induktion der Volllänge, starke Expression eines 42 kDa N-terminalen Teil-Fragments
e	V ₀ / Funktion unbekannt	207 bp/ 8,4 kDa	Expression eines 8 kDa großen Proteins

Tabelle 5: Überblick über die Exprimierung von McVHA-Untereinheiten. Die Tabelle gibt einen Überblick über alle Leseraster, die exprimiert wurden. Die Spalten zeigen unter anderem die Größe des offenen Leserasters, die theoretische Größe der abgeleiteten Aminosäuresequenz, sowie den Erfolg der Exprimierung der jeweiligen Untereinheit.

3.6.1 Expression eines cytoplasmatisch orientierten Teilfragments des N-Terminus von McVHA-a und die Herstellung eines heterologen Antiserums

Vor der Aufklärung der Genomsequenz von *A. thaliana* war das für McVHA-a kodierende Leseraster die einzige bekannte Sequenz der 100 kDa-Untereinheit bei Pflanzen. Über das Vorhandensein der 100 kDa-Untereinheit in der funktionellen pflanzlichen V-ATPase gab es widersprüchliche Angaben. Die Aufreinigung der funktionellen V-ATPase korrelierte nicht in jedem Fall mit dem Vorhandensein einer ca. 100 kDa großen Untereinheit. Die detaillierteste Untersuchung zu diesem Komplex wurde von Li und Sze (1999) durchgeführt. Die Autoren zeigten dass an der funktionsfähigen aufgereinigten V-ATPase aus *Avena sativa* kein 100 kDa-Polypeptid nachzuweisen war. Mit einem Antikörper gegen die Untereinheit a von Hefe (VPH1) wurde allerdings eine Lokalisierung der Untereinheit a an anderen Endomembranpartimenten beobachtet. Deshalb schrieben Li und Sze (1999) dem Protein eine Rolle beim Zusammenbau der pflanzlichen V-ATPase zu. Wegen des Auftretens von spezifischen geladenen Aminosäuren im membranständigen Teil der Sequenz von McVHA-a (siehe auch 3.4.5), von denen in Hefe eine unverzichtbare Beteiligung am Protonentransport gezeigt werden konnte, erschien eine ausschließliche Funktion der Untereinheit a im Zusammenhang mit dem Zusammenbau der des Holoenzym unwahrscheinlich.

Zur näheren Charakterisierung von McVHA-a sollte ein Antiserum gegen heterolog exprimiertes Protein gewonnen werden. Versuche zur Expression der Gesamtlänge des kodierenden Leserasters in *E. coli* schlugen fehl. Die Ursache könnte in dem stark hydrophoben Membranteil von McVHA-a liegen. Deshalb wurde der cytoplasmatische N-Terminus von McVHA-a mit der Primerkombination „a-nterm-f“ und „a-nterm-r“ durch eine PCR (2.2.2) mit der klonierten Volllänge von McVHA-a (3.4.5) als Matrize amplifiziert und in den Expressionsvektor kloniert.

Abb. 3.6.1 zeigt die Induktion und Aufreinigung des Fusionsproteins a_{nterm} unter denaturierenden Bedingungen (2.15.5.2.2). Die Induktion der Bakterienkultur führte zur Synthese eines Polypeptids von 42 kDa. Dieses Polypeptid fand sich auch in den weiteren Aufarbeitungen des Proteinextrakts wieder.

Zur Überprüfung des aufgereinigten, rekombinanten Proteins wurden je 20 μl verschiedener Elutionsfraktionen auf Nitrocellulose transferiert (2.12.3) und mit einem gereinigten, gegen das Gesamtprotein VPH1 der Untereinheit a aus Hefe, gerichteten Antiserum (Manolson et al., 1995) inkubiert. In **Abb. 3.6.2 a)** ist zu sehen, dass der VPH1-Antikörper in hoher Konzentration das exprimierte Fusionsprotein markierte.

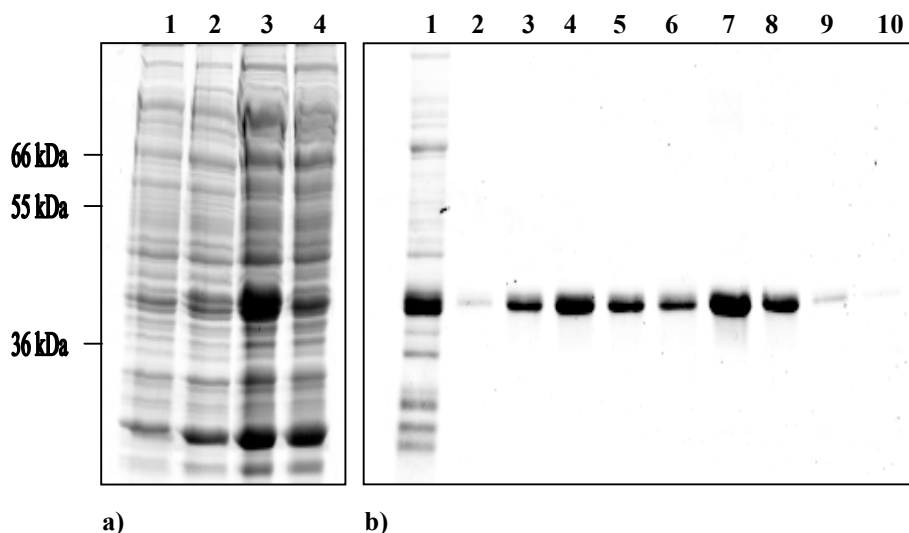


Abb. 3.6.1: Expression, Aufarbeitung und Reinigung des rekombinanten Fusionsproteins a_{nterm} . Die Abbildung zeigt von links nach rechts: **a)** Spur 1: nicht denaturierter Extrakt einer *E. coli*-B121-Kultur transformiert mit dem Konstrukt a_{nterm} in pCR-2.1-Topo vor Induktion, Spur 2: nativer Extrakt einer *E. coli*-Kultur, die für 4 h mit 0,5 μM IPTG Endkonzentration induziert wurde, Spur 3: denaturiertes Lysat, Spur 4: Durchfluss des Lysates nach Aufbringen auf die Säule. **b)** Die Waschfraktionen 1 und 2 sowie die Elutionsfraktionen 1-8 (Spuren 3-10).

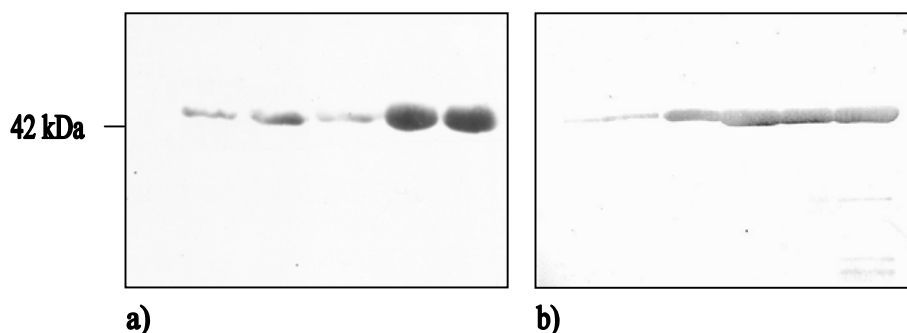


Abb. 3.6.2: Western-Blot der Elutionsfraktionen aus der Aufreinigung des rekombinanten N-Terminus der Untereinheit a. Verschiedene Elutionsfraktionen der Proteinaufreinigung von Untereinheit a wurden nach Auftrennung im SDS-Gel auf Nitrocellulose transferiert und mit **a)** der aufgereinigten IgG-Fraktion von Anti-VPH1-Serum 1:100 verdünnt **b)** mit dem anti a_{nterm} -Antiserum aus Meerschweinchen 1:5000 verdünnt inkubiert.

Um eine Kontamination der Fraktionen mit *E. coli*-Proteinen auszuschließen, wurden die Fraktionen nochmals in einer präparativen SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteinbande der interessierenden Größe ausgeschnitten und einer Elektroelution (2.12.5.3) unterworfen. 500 μg des auf diese Weise aufgereinigten Proteins wurden zur Immunisierung eines Meerschweinchens verwendet (2.12.8).

Der Erfolg der Immunisierung wurde monatlich an den auf Nitrocellulose transferierten Proteinen der Elutionsfraktionen getestet. **Abb. 3.6.2 b)** zeigt die Immundekoration mit dem

Serum des behandelten Meerschweinchens vier Monate nach Beginn der Immunisierung. Das exprimierte Fusionsprotein McVHA-a_{nterm} wurde mit dem Serum spezifisch erkannt.

3.6.2 Die Expression und denaturierende Aufreinigung eines membranständigen Epitops von McVHA-a

Aufgrund der erwähnten zweigeteilten Struktur von McVHA-a in einen über die Organismen hinweg recht heterogenen, cytoplasmatischen N-Terminus und einen konservierteren, membranständigen C-Terminus, erschien es sinnvoll, auch gegen ein Epitop des membranständigen Teils der 100 kDa-Untereinheit einen Antikörper herzustellen. Aufgrund seines hydrophoben Charakters war es jedoch nicht möglich die gesamte Länge des C-Terminus zu exprimieren. Infolge der Vorhersage der Transmembranhelix-Bereiche von McVHA-a wurde versucht ein mutmaßlich cytoplasmatisch orientiertes 10 kDa großes Teilfragment zu exprimieren. Im Schema des Vergleiches von McVHA-a mit anderen Untereinheiten a (3.4.5) ist dieser Bereich dargestellt.

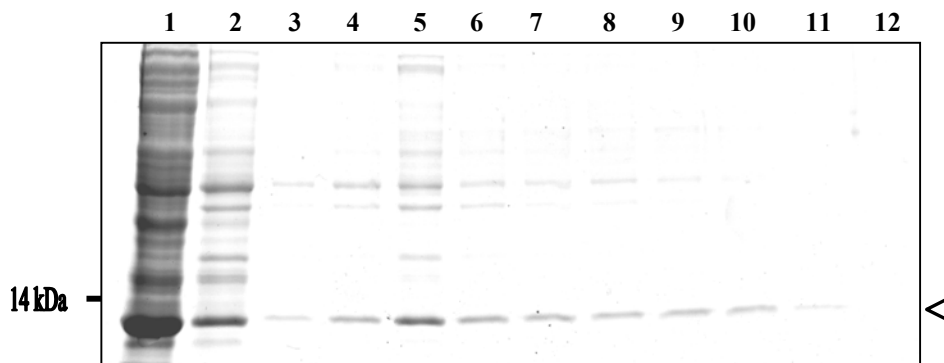


Abb. 3.6.3: Aufreinigung des rekombinanten Proteins a-membranpart von McVHA-a. Die Abbildung zeigt: Das unter denaturierenden Bedingungen hergestellte geklärte Bakterienlysat (Spur 1), die Fraktion nach Passage der Ni-NTA-Säule (Spur 2), die beiden Waschfraktionen (Spur 3+4) und die acht Elutionsfraktionen (Spuren 5-12).

Abb. 3.6.3 zeigt, dass es möglich war, ein Proteinfragment der erwarteten Größe zu exprimieren und durch Affinitätschromatographie anzureichern. Die Reinigung des Fragmentes a-membranpart bis zur Homogenität war jedoch nicht möglich, denn in den Elutionsfraktionen blieben stets Verunreinigungen erkennbar. Aufgrund der geringen Effizienz der Aufreinigung schlugen alle Versuche fehl, wie üblich durch Elution von aus SDS-PAGE ausgeschnittenen Gelfragmenten eine zur Erhebung eines Antiserums ausreichende Menge an Protein zu erhalten. Die Tatsache, dass *E. coli*-Bakterien in der Lage

waren, das rekombinante Proteinfragment aus dem Membranbereich von McVHA-a zu exprimieren zeigte, dass die vorhergesagte Membrantopologie des C-Terminus zumindest in diesem Bereich stimmig ist.

3.6.3 Expression und Aufreinigung von McVHA-e

Die Expression des für die mutmaßliche Untereinheit e kodierenden Leserasters war für die weitere Untersuchung des bisher nicht in Pflanzen charakterisierten Proteins wichtig.

Zur Expression der gesamten für die mutmaßliche Untereinheit e der pflanzlichen V-ATPase kodierenden Sequenz wurde das für ein Polypeptid von 7,9 kDa codierende offene Leseraster in den Expressionsvektor pCRT7-NT-Topo (Invitrogen, Groningen) kloniert. **Abb. 3.6.4** zeigt die Expression, Aufarbeitung und Reinigung des rekombinanten Proteins unter denaturierenden Bedingungen. Das Produkt konnte homogen aufgereinigt werden, aber die Ausbeute war sehr gering.

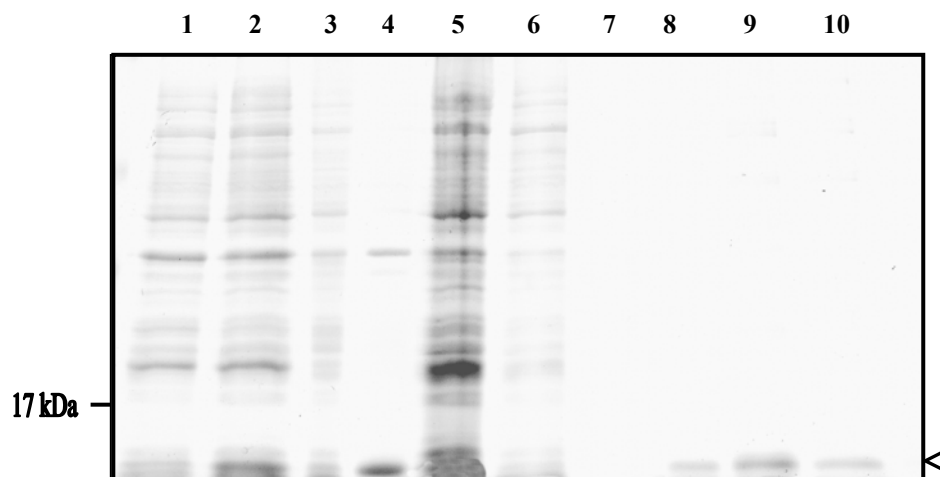


Abb. 3.6.4: Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins von McVHA-e. Das Bild zeigt die Aufreinigung von McVHA-e. Dargestellt ist: Die Bakterienkultur vor (Spur 1) und nach 4h Induktion mit IPTG (Spur 2), das unter denaturierenden Bedingungen hergestellte geklärte Bakterienlysate (Spur 3), die nach Passage der Ni-NTA-Matrix gesammelte Fraktion (Spur 4), die beiden Waschfraktionen (Spur 5 und 6), sowie die Elutionsfraktionen (Spur 7-10)

3.6.4. Native Aufreinigung der Untereinheiten McVHA-A und McVHA-B

Zur Untersuchung der Interaktion von Untereinheiten war es nötig, aufgereinigte V-ATPase-Untereinheiten in nativem Zustand zu gewinnen. Als Testsystem für das Zusammenwirken

der Untereinheiten bot sich die Assoziation *in vitro* von McVHA-A und B an, die das Hexamer der Kopfstruktur bilden. Aufgrund der geringeren Ausbeute bei der Aufreinigung unter nativen Bedingungen wurde versucht, die Expression durch Zugabe geringerer Mengen

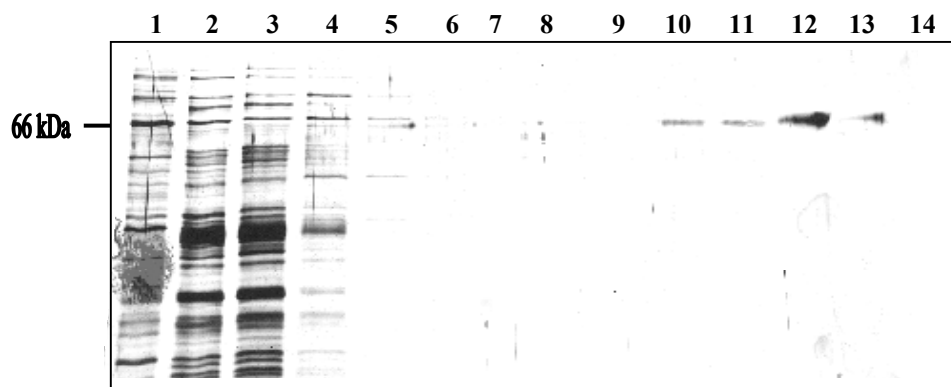


Abb. 3.6.5: Native Aufreinigung von heterolog exprimierter McVHA-A. Die Abbildung zeigt: Geklärtes Lysat aus 4h induzierter *E. coli*-Kultur (Spur 1), Durchfluss nach Säulenpassage (Spur 2), die 4 Waschfraktionen (Spur 3-6) und die acht Elutionsfraktionen (Spur 7-14). Das Gel wurde im Gegensatz zu den Gelen der anderen gezeigten Aufreinigungen einer Silberfärbung (2.12.2.2) unterzogen.

von IPTG und bei einer niedrigeren Temperatur zu induzieren, um der Bildung von „Inclusion-bodies“ vorzubeugen. Die **Abb. 3.6.5 und 3.6.6** zeigen die Aufreinigungen der Untereinheiten A und B unter nativen Bedingungen. Es ist zu erkennen, dass trotz einer recht starken Induktion von McVHA-B bzw. eines signifikanten Auftretens von McVHA-A im geklärten Lysat, die Ausbeute der Aufreinigung nicht sehr hoch war. McVHA-A war lediglich im silbergefärbten (2.12.2.2) Gel zu detektieren.

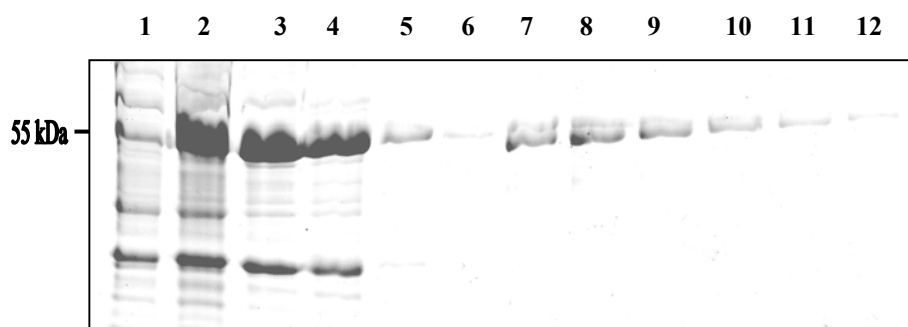


Abb. 3.6.6: Native Aufreinigung der Untereinheit B. Untereinheit B wurde in *E. coli* zur Expression induziert, unter nativen Bedingungen aufgearbeitet und aufgereinigt. Die Abbildung zeigt: Die Bakterienkultur vor (Spur 1) und nach Induktion mit 250 μ M IPTG (Spur 2), eine Probe des nativen geklärten Zell-Lysates (Spur 3), den Durchfluss nach Passage der Säule (Spur 4), die zwei Waschfraktionen, (Spur 5 und 6) sowie die sechs Elutionsfraktionen (Spur 7-12).

3.7 Nachweis von Untereinheiten der V-ATPase in pflanzlichen Endomembranpräparationen

Zum Nachweis von Untereinheiten der V-ATPase in pflanzlichen Präparationen wurden Membran- und Cytoplasmafraktionen (2.12.6) aus Blättern fünf Wochen alter, unter Kontrollbedingungen angezogener *M. crystallinum*-Pflanzen (2.1.1) gewonnen. Nach Auftrennung der Präparationen im SDS-PAGE konnten im Western-Blot nach Inkubation mit dem Serum anti-a_{nterm}, welches spezifisch den N-Terminus von McVHA-a erkannte (3.6.1),

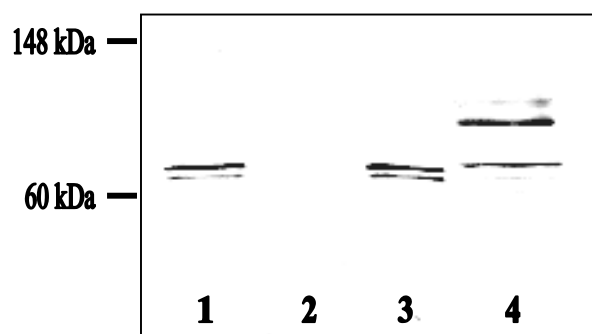


Abb. 3.7.1.: Die Gesamtlänge von McVHA-a kann in Endomembranpräparationen nur mit einer modifizierten Aufreinigung detektiert werden. Cytoplasma und Endomembrankompartimente aufgearbeitet aus Blättern 5 Wochen alter *M. crystallinum*-Pflanzen wurden im SDS-PAGE aufgetrennt. Der entsprechende Western-Blot wurde mit dem Antiserum a-term 1:1000 verdünnt immunodekoriert. Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit Antikörpern gegen Meerschweinchen-Immunglobuline, die mit alkaliner Phosphatase gekoppelt waren, detektiert. Spur 1 und 2: Cytoplasma- und Membran-Fraktionen aufgereinigt mit 100 mM NaCl im Puffer, Spur 3 und 4 Cytoplasma- und Membran-Fraktionen aufgereinigt mit 500 mM NaCl im Puffer.

nur in der Cytoplasma-Fraktion zwei Polypeptide mit einer apparenten molekularen Masse von 70 kDa detektiert werden (**Abb. 3.6.7 Spur 1 und 2**).

In Präparationen der V-ATPase von *Manduca sexta* war die Existenz eines Proteins der apparenten Masse von 100 kDa nur durch eine Abwandlung des üblichen Aufreinigungsprotokolls nachzuweisen. Durch die Erhöhung der Konzentration von NaCl im Aufreinigungspuffer wurde das Vorhandensein eines 100 kDa großen Proteins zusammen mit der aktiven V-ATPase gezeigt (Merzendorfer et al., 1999a).

In Anlehnung an die Methode dieser Autoren wurde die Reinigung pflanzlicher Endomembrankompartimente modifiziert: Zur Präparation pflanzlicher

Endomembranen wurden dem Homogenisierungs- und Suspensions-Puffer (2.12.6) NaCl in Endkonzentrationen von 100 bis 500 mM zugegeben. **Abb. 3.7.1** zeigt den Western-Blot von Membran- und Cytoplasma-Präparationen mit 100 mM und 500 mM NaCl im Aufreinigungsmedium. Bei steigender Salzkonzentration wurden zusätzlich zu dem Polypeptid von 70 kDa Größe zwei Peptide der apparenten Größe von ca. 95 kDa in den Membranpräparationen detektiert. In der cytoplasmatischen Präparation konnten weiterhin die beiden 70 kDa großen Proteinmassen detektiert werden. Mit dem Antikörper gegen die

Untereinheit a von Hefe (VPH1) konnte in diesen Membranpräparationen keine Bande detektiert werden.

Um zu überprüfen, ob die Zugabe von NaCl bei den Membranpräparationen ebenfalls die Effizienz der Aufreinigung anderer V-ATPase-Untereinheiten der beeinflusste, wurden die Western-Blots der Aufarbeitungen der Membranextrakte mit 100 bzw. 500 mM NaCl mit Antiseren gegen McVHA-E (Dietz et al. 1995) und das Spaltprodukt der Untereinheit B, D_i (Zhigang et al., 1996) inkubiert. Wie letztere Autoren zeigen konnten, markiert das Serum gegen D_i aus unbekanntem Gründen sowohl VHA-A als auch VHA-B. **Abb. 3.7.2** zeigt, dass die steigenden Salzkonzentrationen im Aufarbeitungsmedium keinen Einfluß auf die Stärke der Markierung durch die Antiseren hatten. Das Ergebniss dieses Western-Blots belegt, dass die V-ATPase-Untereinheiten des cytoplasmatischen V₁-Sektors sowohl im Cytoplasma als auch an Membranenpräparationen in ihrer Gesamtlänge detektiert werden konnten. Mit dem McVHA-a_{nterm} Antiserum konnte ein Polypeptid mit einer apparenten Masse von 95 kDa nur an den Membranfraktionen detektiert werden, die unter Hochsalzbedingungen isoliert worden waren.

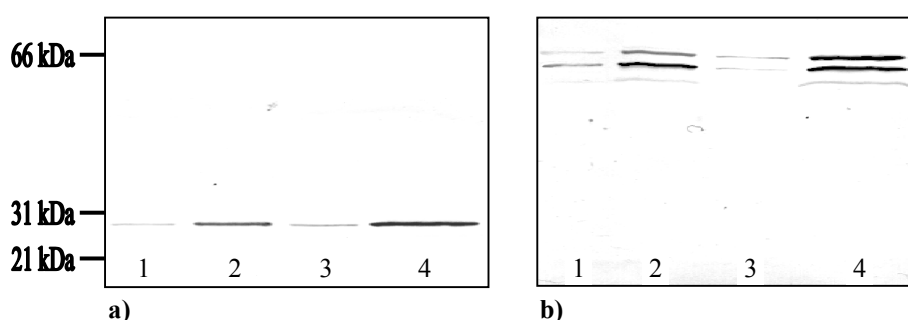


Abb. 3.7.2 Western-Blot der Aufreinigungen des Cytosols und von Endomembrancompartimenten inkubiert mit Antiseren gegen die Untereinheiten E und D_i: Aufarbeitungen von Cytosol (1) und Membranen (2) aufgereinigt mit 100 mM NaCl im Puffer, sowie Cytosol (3) und Endomembranfraktionen (4) mit 500 mM NaCl im Puffer aufgearbeitet wurden. Die beiden Western-Blots wurden **a)** mit einem Antiserum gegen VHA-E und **b)** mit einem Antiserum gegen Untereinheit D_i inkubiert.

3.8 Die Detektion von Untereinheiten-Interaktionen

3.8.1 Vorbemerkungen

Um Informationen über Struktur und Zusammenbau der hochkomplexen, molekularen Maschine der V-ATPase zu gewinnen, galt es die Frage zu beantworten, ob und wie weit einzelne Untereinheiten miteinander interagieren können. Außerdem war es sehr wichtig neben der groben Zuordnung der verschiedenen Untereinheiten zum membranständigen V_0 -Sektor und zum cytoplasmatischen V_1 -Sektor eine genauere Ortsauflösung der an der Bildung einer komplexen Struktur wie der assemblierten V-ATPase zu gewinnen. Neben methodisch äußerst aufwendigen Verfahren wie der Kristallisation von Proteinkomplexen, beispielsweise der F-ATPase von *E. coli* (Abrahams et al., 1994) oder der verrechnenden Verarbeitung hochauflösender EM-Bilder zur Gewinnung drei-dimensionaler Strukturen des V-ATPase-Holoenzymen verschiedener Arten (Radermacher et al., 2001; Domgall et al., 2002), ist die Untersuchung der Interaktion von Untereinheiten *in vitro* ein erster Schritt, um eine genauere Vorstellung der Struktur bzw. der Intermediate des Zusammenbaus der V-ATPase zu bekommen. Die Klonierung des gesamten Satzes der für die mutmaßlichen Untereinheiten der V-ATPase kodierenden Sequenzen des Halophyten *M. crystallinum* ermöglichte es nun, einzelne Untereinheiten zu exprimieren und die Interaktionseigenschaften dieser Untereinheiten gezielt und unabhängig vom Gesamtkomplex der V-ATPase zu betrachten. Das Fernziel dieser Charakterisierung ist die Assemblierung *in vitro* kleiner Subkomplexe der V-ATPase bis hin zur Rekonstitution des funktionellen Holoenzymen.

3.8.2 *In vitro*-Translation und Immunpräzipitation von McVHA-A und McVHA-B

Die native Aufreinigung der exprimierten cDNAs von McVHA-A und -B erwies sich als schwierig, so dass die effektive Gewinnung einer größeren Menge rekombinanten Proteins (3.6.3) nicht möglich war. Daher wurden die für McVHA-A und -B kodierenden Leseraster mit Hilfe von Reticulozyten-Lysat *in vitro* translatiert und dabei zur einfacheren Detektion radioaktiv markiert.

Im ersten Schritt wurde der gesamte kodierende Bereich der beiden Gene mittels PCR amplifiziert und dabei mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamH I und Hind III versehen (verwendete Primer siehe **Anhang**). Die hierbei erhaltenen PCR-Produkte wurden

mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (2.2.4). Nach Reinigung der jeweiligen Fragmente über ein Agarosegel wurden diese zusammen mit dem auf dieselbe Weise gespaltenen Vektor pBSC (Promega, Göttingen) ligiert (2.2.6). Die Orientierung der zu ligierenden cDNA wurde hierbei so gewählt, dass das Startcodon der kodierenden Bereiche stromabwärts der T7-DNA-Polymerase-Bindungsstelle des Vektors pBSC lag. Im zweiten

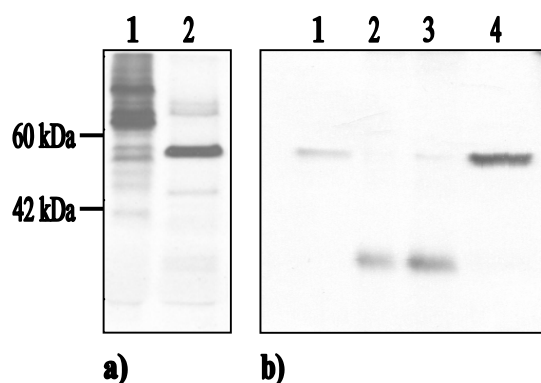


Abb. 3.8.1: In vitro-Translation und Immunpräzipitation von McVHA-A und -B.

a) Die für McVHA-A und -B kodierenden Sequenzen wurden vor den bakteriellen T7-Promoter des Plasmides pBSC kloniert und mit den „TNT-coupled“-Retikulozyten-Lysat (Promega, Göttingen) in Gegenwart von ^{35}S -Methionin translatiert (2.9.). Abgebildet sind die Translationsprodukte von vha-A (Spur 1) und vha-B (Spur 2). **b)** Immunpräzipitation (2.13.1) von radioaktiv markierter VHA-B. ^{35}S -markierte VHA-B wurde zusammen mit nativ aufgereinigter VHA-A über Nacht inkubiert. Durch Zugabe von Antiserum gegen VHA-A und anschließender Inkubation mit Protein A wurden die gebildeten Komplexe präzipitiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die an Protein A gebundenen Komplexe in SDS-Probenpuffer eluiert. Die Abbildung zeigt: die drei Waschfraktionen des Präzipitats (Spur 1 bis 3) und das Eluat (Spur 4).

Schritt wurde nach Charakterisierung des korrekten Fusionsprodukts jeweils 1 μg dieser aufgereinigten Konstrukte als Matrize zu einer mit T7-Polymerase gekoppelten, radioaktiven *in vitro*-Translationsreaktion (IVT) gegeben (2.9.1).

Die Auftragung und Detektion (2.9.3) der *in vitro*-Translation der Leseraster von McVHA-A und B (**Abb. 3.8.1. a)**) läßt erkennen, dass beide Leseraster translatiert wurden. Im Fall der Untereinheit B war dieses Translationsprodukt homogen und lag im Bereich der erwarteten Größe von 58 kDa. Außerdem waren drei distinkte Nebenprodukte in geringerer Konzentration zu erkennen. Die Translation der für VHA-A kodierenden Sequenz ergab neben einem Hauptprodukt der erwarteten Größe von 68 kDa auch eine größere Menge an Nebenprodukten mit Größen, die über und unterhalb der erwarteten Größe des Hauptprodukts lagen.

Zur Detektion einer etwaigen Interaktion dieser beiden Untereinheiten mittels Immunpräzipitation (2.13.1) war die Translationsreaktion des Leserasters für McVHA-A zu unsauber. Daher wurde das nativ aufgereinigte, rekombinante Protein der Untereinheit A (3.6.4) mit *in vitro* translatierter, ^{35}S -Methionin markierter McVHA-B ÜN inkubiert und anschließend mit einem Antiserum gegen McVHA-A (Fischer-Schliebs et al., 1997) versetzt. Die durch das Antiserum detektierten, interagierenden Komplexe wurden anschließend durch Zugabe von Protein A (Pierce Immunochemicals, USA) ausgefällt, gewaschen und in SDS-Probenpuffer eluiert. (**Abb. 3.8.1 b)**) zeigt die Auftrennung der drei Waschfraktionen und des

eluierten Präzipitates. In den Waschfraktionen sind die niedriger molekularen Nebenprodukte der IVT-Reaktion von VHA-B zu erkennen. In der ersten Fraktion findet sich eine geringe Menge von nicht komplexiertem VHA-B. Der Hauptanteil von McVHA-B ließ sich in der mit dem Antiserum gegen McVHA-A komplexierten, mit Protein A präzipitierten Elutionsfraktion detektieren.

3.8.3 FRET-Analyse interagierender Proteinkomplexe

Die Analyse interagierender Proteine mittels FRET (Förster Resonance Energy Transfer) ist eine Technik, die es gestattet, nicht nur die Interaktion zweier Proteine zu beobachten, sondern dabei auch Aussagen zur Dynamik und Konformation der beobachteten Interaktion zu treffen. Dieses Verfahren wurde bisher mehrfach angewandt um nach kovalenter Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an distinkte Aminosäurereste von Polypeptiden z.B. Cystein Interaktionen nachzuweisen bzw. Abstände abzuschätzen (dos Remedios et al., 1987; Selvin, 1995). Grundsätzlich kann die aufgenommene Anregungsenergie eines Fluoreszenzfarbstoffes auf einen Akzeptor übertragen werden, wenn sich das Donor-Akzeptor-Paar in geeigneter Nähe und Orientierung zueinander befindet. Ist der Akzeptor ein weiterer Fluoreszenzfarbstoff mit einer Anregungswellenlänge, die im Bereich der Emissionswellenlänge des primären Empfängers (= Donor) liegt, kann der Akzeptor angeregt werden. Wird dieses Donor-Akzeptor-Paar mit zwei zu untersuchenden Proteinen fusioniert, so kann eine eventuelle Interaktion dieser Proteine durch den Transfer der Anregungsenergie vom Donor-Fluoreszenzfarbstoff auf den Akzeptor gezeigt werden. Mit der Charakterisierung und Klonierung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) und dessen gelb bzw. cyan fluoreszierenden Varianten (YFP bzw. CFP), erweiterten sich die Möglichkeiten dieser Technik beträchtlich. CFP und YFP können hierbei als ein FRET-Donor-Akzeptor-Paar dienen und erlauben zudem die Untersuchung der Interaktion *in vitro* als auch *in vivo* in transient oder stabil mit den entsprechenden Konstrukten transformierten Zellen (Gadella et al., 1999).

Aufgrund der Ergebnisse der Immunpräzipitation von McVHA-A und McVHA-B wurde versucht, die Assemblierung bzw. Interaktion dieser beiden Untereinheiten mittels CFP/YFP-basiertem FRET zu detektieren.

Die den offenen Leserastern der beiden Untereinheiten entsprechenden cDNA-Sequenzen wurden mit den Primerpaaren „A-BamH I-f / A-Nco I-R“ und „B-BamH I-f / B-Nco I-r“

mittels einer PCR-Reaktion mit den klonierten Gesamtlängen als Matrize amplifiziert, um diese mit den für CFP bzw. YFP kodierenden Sequenzen zu fusionieren. Durch die gewählten Oligonukleotidfragmente wurden gleichzeitig mit der Amplifikation Restriktionsschnittstellen für die Enzyme BamH I und Nco I in die zu klonierenden Fragmente eingefügt. Nach dem Restriktionsverdau wurden die beiden Fragmente in die BamH I/ Nco I-Stellen der Vektoren pCFP bzw. pYFP (Clontech, Göttingen) kloniert. Die die jeweilige CFP/ YFP-Variante kodierenden Leseraster befanden sich am 3'-Ende der jeweiligen Sequenz der klonierten Untereinheit.

Aufgrund der Sequenz- und Struktur-Ähnlichkeit von McVHA-A und B zu den β - und α -Untereinheiten der kristallisierten F-ATPase von *E. coli* konnte ein theoretisches 3D-Strukturmodell erstellt werden (Swiss-Model, ExPasy, Schweiz). Dieses Modell sagte eine aus dem Komplex herausragende Orientierung des C-Terminus von VHA-A und B voraus. Deshalb wurde die Fusion des C-Terminus der beiden Untereinheiten mit den für CFP/ YFP kodierenden Sequenzen gewählt.

Nach Bestätigung der korrekten Fusion der jeweiligen Untereinheit mit der CFP bzw. YFP wurden die kodierenden Sequenzen der Fusionsproteine McVHA-A/CFP und McVHA-B/YFP durch PCR amplifiziert. Die beiden hierbei erhaltenen Fragmente wurde anschließend in den Expressionsvektor pCR-T7-NT-Topo (Invitrogen, Holland) kloniert. Dieser Expressionsvektor codiert N-terminal für ein 6 x Histidin-Epitop zur Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie.

Nach Charakterisierung des Konstruktes durch PCR und Sequenzierung wurden *E. coli* mit den Konstrukten A/CFP und B/YFP in pCRT7-NT-Topo transformiert. Die Größe der beiden GFP-Varianten beträgt 21 kDa (Gadella et al., 1999). Die Fusionsprodukte hatten dementsprechend die Größen 90 kDa (McVHA-A/CFP) und 80 kDa (McVHA-B/YFP).

Aufgrund der Schwierigkeiten nativ exprimiertes Protein von McVHA-A und B homogen aufzureinigen (3.6.4), wurden die ersten Charakterisierungen zur Expression der Fusionsproteine mit nativ aufgearbeiteten, geklärten *E. coli*-Zell-Lysaten (2.12.5.2.1) durchgeführt. Abb. (3.8.2 a)) zeigt die mit Coomassie-Blau gefärbte (2.12.2.1) PAGE-Auftrennung (2.12.1) nativer Zell-Lysate vor und nach der Induktion mit IPTG. In der Aufarbeitung unter nativen Bedingungen der mit den Fusionsprodukt A/CFP und B/YFP transformierten Zellen konnte jeweils ein 90 kDa bzw. 80 kDa großes Protein detektiert werden. Der Western-Blot dieser Aufarbeitungen, (Abb. 3.8.2 b)), immundekoriert mit einem Antikörper gegen das N-terminale 6 x His-Epitop, zeigte spezifisch jeweils ein Produkt in der erwarteten Größe der Fusionsprodukte von A/CFP und B/YFP. Die Konzentration der

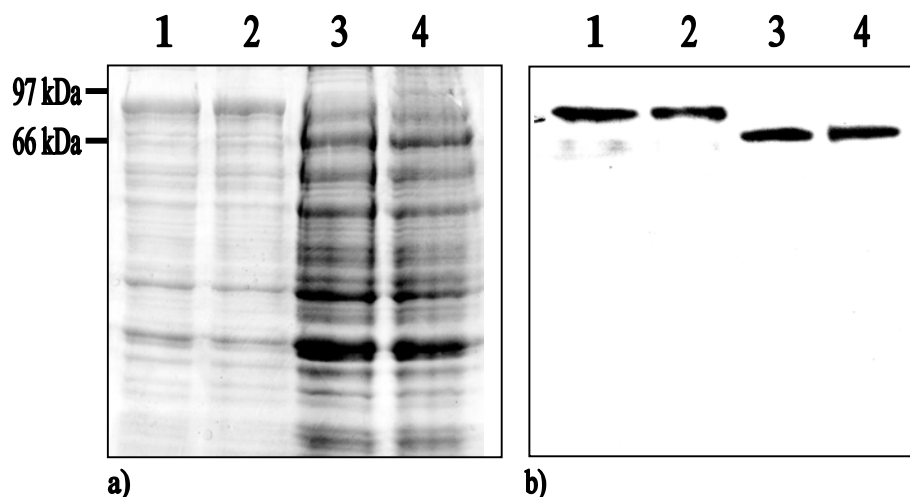


Abb. 3.8.2 Expression der rekombinanten Fusionsproteine VHA-A-CFP und VHA-B-YFP. a) Coomassie-Blau-Färbung der Auftrennung von Lysate aus mit den Konstrukten VHA-A-CFP und VHA-B-YFP transformierten *E. coli*-Expressionskulturen. A/CFP vor Induktion (Spur 1), nach 4 h Induktion (Spur 2), B/YFP vor Induktion (Spur 3) und nach 4 h Induktion (Spur 4). b) Der Western-Blot dieser Auftrennungen immundekoriert mit einem monoklonalen Antikörper gegen das 6 x His- Epitop (Invitrogen, Holland).

rekombinanten Fusionsproteine war allerdings in den nativen Aufarbeitungen der Bakterien vor und nach Induktion der Proteinexpression mit IPTG ähnlich hoch.

Die Unterdrückung der bakteriellen Expression vom bakteriellen T7-Promotor vor Induktion funktionierte aus unbekanntem Gründen nicht. Die Expression des Fusionsproteins McVHA-A/CFP in *E. coli* hatte einen wachstumshemmenden Effekt auf die Bakterien. Die Expressionskultur dieses Konstruktes enthielt daher im gleichen Kulturvolumen eine geringere Menge an Gesamtprotein. Die Ausbeute bei nativer Aufreinigung der exprimierten Fusionsproteine A/CFP und B/YFP aus den Lysaten war sehr niedrig und erbrachte kaum detektierbare Mengen an aufgereinigtem Protein. Hier ist anzumerken, dass sich Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine nicht von dem der unfusionierten Proteine McVHA und -B unterschied.

Die Charakterisierung der fluorophoren Eigenschaften von McVHA-A/CFP und McVHA-B/YFP wurde daher mit den geklärten *E. coli*-Lysaten durchgeführt. Diese Lysate wurden vor Beginn der Messung mit PD 10-Säulen (Amersham-Biotech, Schweden) entsalzt und auf eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml eingestellt. Die Emissionsspektren wurden am Fluorometer aufgenommen. Die nativen Lysate wurden mit den Wellenlängen 433 nm (Maximum der Anregung von CFP) und 500 nm (angenähertes Maximum der Anregung von YFP) angeregt und das emittierte Spektrum im Bereich von 450-550 nm detektiert. Die Spektren der Fusionsproteine (**Abb. 3.8.3**) zeigten einen für die jeweiligen GFP-Varianten typischen Kurvenverlauf: McVHA-CFP besitzt ein Emissionsmaximum im Bereich von

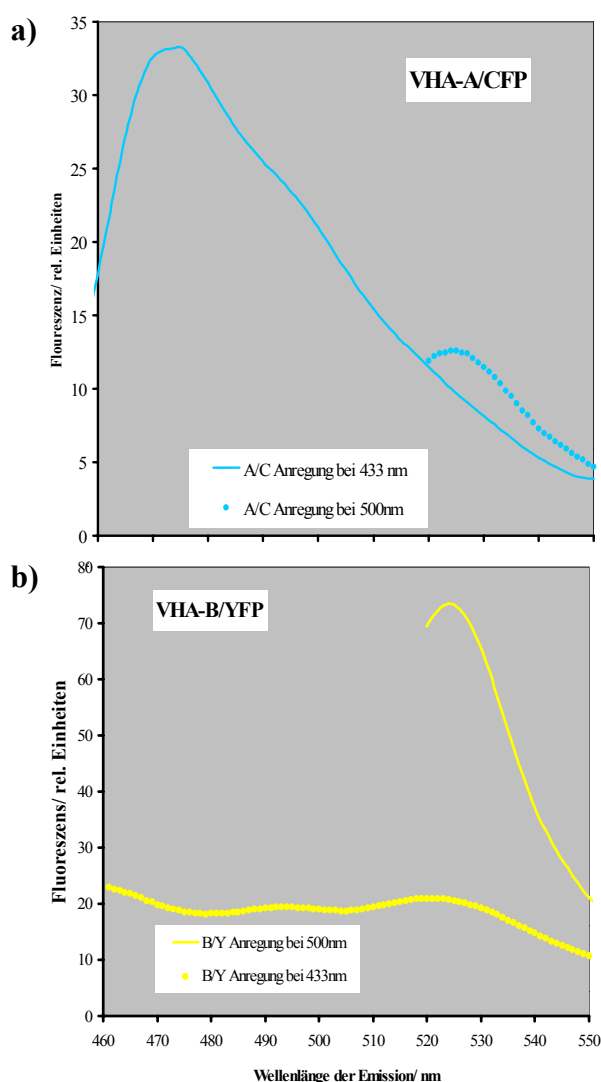


Abb. 3.8.3: Emissionsspektren der Konstrukte McVHA-A/CFP und McVHA-B/YFP.

Die Emissionsspektren wurden in geklärten, nativ aufgearbeiteten Zellysaten gemessen, die aus gewonnenen aus mit den Konstrukten McVHA-A/CFP und McVHA-B/YFP transformierter *E. coli*-Expressionskulturen gewonnen worden waren. Die Zellysate wurden entsalzt und auf eine Endkonzentration von 5 mg/ ml eingestellt. Die Vermessung erfolgte am Fluorometer.

a) Emissionsspektren von McVHA-A/YFP aufgenommen bei den Anregungswellenlängen 433 nm (Hauptanregung von CFP) und 500 nm (angenäherte Anregung von YFP). **b)** Emissionsspektren von McVHA-B/YFP bei 433 nm und 500 nm Anregung.

476 nm, das erwartete zweite Maximum der Emission bei 505 nm ist in diesem Spektrum nicht vorhanden, die Kurve besitzt in diesem Bereich eine Schulter. McVHA-B/YFP konnte aufgrund des geringen Abstands der Emissions- und Absorptionsmaxima nicht bei seinem eigentlichen Anregungsmaximum von 514 nm vermessen werden. Bei einer Anregungswellenlänge von 500 nm zeigte McVHA-B/YFP ein Maximum der Emission bei einer Wellenlänge von 525 nm. Die Intensitäten der Fluoreszenzen unterschieden sich erheblich: Die Emission von McVHA-B/YFP war knapp dreimal stärker als die gemessene Intensität von McVHA-A/CFP an ihrem jeweiligen Maximum der Anregung. Dieser Befund zeigte Übereinstimmung mit der Literatur, da die Mutation von Trp 66 zu Tyr bei der Cyanemittierenden GFP-Variante die Emissionsstärke entscheidend vermindert (Tsien et al., 1998). Zur Messung einer eventuellen Interaktion der beiden Untereinheiten wurde der Ansatz zur Messung der Emissionen abgewandelt. Die beiden geklärten Lysate wurden so in ihrer Proteinkonzentration eingestellt, dass die Werte der Emissionsmaxima beider

Fusionsprodukte bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge ihrer jeweiligen Absorptionsmaxima gleich war.

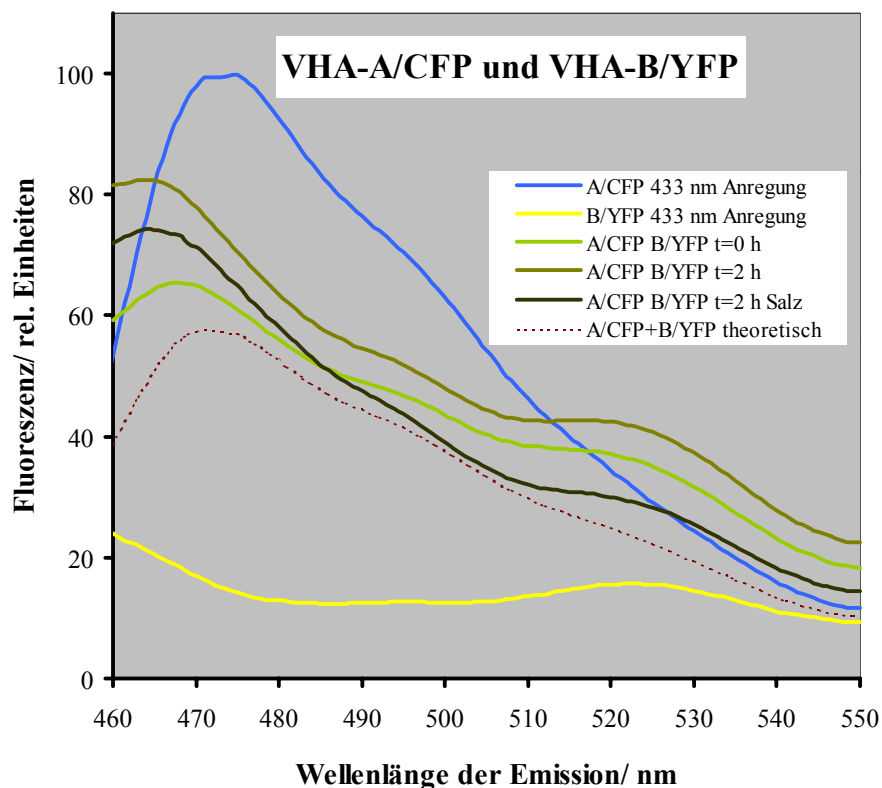


Abb. 3.8.4: Interaktion zwischen McVHA-A/CFP und McVHA-B/YFP. Es sind dargestellt: die Fluoreszenzemissionen der beiden Fusionsproteine angeregt bei 433 nm (blaue und gelbe Linien), sowie die Spektren beider Fusionsproteine in einem Ansatz zusammengegeben, gemessen zu den Zeitpunkten $t=0$ h (grüne Linie) und $t=2$ h (goldfarbene Linie). Als Kontrolle der Reversibilität des Effektes wurde dem Ansatz nach 2 h NaCl in einer Endkonzentration von 500 mM zugegeben (schwarze Linie). Die gepunktete Linie deutet den Verlauf der theoretischen Addition beider Spektren an. Aufgrund der unterschiedlichen Intensität beider Fluorophore wurden die Konzentrationen der bakteriellen Lysate so gewählt, dass das Maximum der Fluoreszenzemission bei dem für CFP bzw. YFP charakteristischen Anregungsmaximum 100 relative Fluoreszenzeinheiten betrug.

Abb. 3.8.4 zeigt unter anderem die beiden Emissionskurven der bei 433 nm Wellenlänge angeregten geklärten Lysate. Die Kurve von A/CFP ließ das charakteristische Emissionsmaximum bei 475 nm erkennen, während die Emission von B/YFP an ihrem Maximum von 527 nm bei dieser Anregung sehr gering war. Zur eigentlichen Messung wurden die beiden Lysate im selben Volumen wie in den Einzelansätzen vermischt und direkt nach dem Mischen ($t=0$) und nach 2 h am Fluorimeter mit einer Anregungswellenlänge von 433 nm vermessen. In **Abb. 3.8.4** sind die beiden Emissionskurven des Gemisches im Vergleich zur theoretisch addierten Kurve der beider Einzelemissionsspektren dargestellt. Das Maximum der Emission von CFP verschob sich um etwa 5 nm auf die linke Seite des

Spektrums, war jedoch höher als dies eigentlich bei einer Addition der Einzelspektren zu erwarten gewesen wäre. Die Emission bei 527 nm stieg ebenfalls signifikant höher an, als es bei einer bloßen Addition der Emission beider Spektren zu erwarten gewesen wäre. Dieser Effekt verstärkte sich über die Zeit von 2 h noch. Nach dem Mischen beider Lysate war eine leichte Trübung zu bemerken, die sich über die zwei Stunden der Messung noch verstärkte. Der Anstieg der Fluoreszenz bei 475 nm ist wahrscheinlich auf die Lichtstreuung durch ausgefallene Proteine zurückzuführen.

Die Zugabe von NaCl in einer Endkonzentration von 500 mM zu dem Gemisch beider Lysate sollte eine eventuelle, nicht kovalente Interaktion beider Fusionsproteine wieder lösen. Nach Salzzugabe nahm bei einer Anregung von 433 nm die Emission im Bereich von 475 nm im Vergleich zum Zeitpunkt 0 h wieder zu. Die Fluoreszenz bei 527 nm nahm hingegen ab. Die Kurve der Emission des Lysatgemisches näherte sich insgesamt der Kurve der berechneten Addition beider Fluoreszenzen an, mit Ausnahme des Bereiches zwischen den Wellenlängen 460-480 nm.

Die gestiegene Emission bei 527 nm nach Zusammengabe beider Fusionsproteine weist auf eine Interaktion beider Fusionsproteine hin. Die beiden an die Fusionsproteine gekoppelten GFP-Varianten müssen sich im Bereich des Förster-Radius (zwischen 30-60 Å) nahe gekommen sein müssen (Gadella et al., 1999). Nach diesen vielversprechenden ersten Experimenten zur Charakterisierung der Interaktion zwischen McVHA-A und -B werden die Messungen nun in einem größeren Rahmen in Zusammenarbeit mit der Abt. für Laserphysik der Fakultät für Physik im Rahmen des SFBs 1932 weitergeführt.

3.9 Detektion von V-ATPase-Untereinheiten an pflanzlichen Endomembranen mit CLSM

3.9.1 Grundsätzliche Erwägungen zur Immunlokalisation

Neben der Lokalisation am Tonoplasten wurden Untereinheiten der pflanzlichen V-ATPase an verschiedenen Komponenten des Endomembransystems sowie an der Plasmamembran detektiert. Hierbei wurden bei unterschiedlichen pflanzlichen Präparationen Untereinheiten gegen VHA-A und ein Antikörper gegen das aufgereinigte Holoenzym verwendet (Herman et al., 1994; Robinson et al., 1996).

Ob es sich bei den hierbei gezeigten Lokalisationen in allen Fällen um Bestandteile einer funktionellen V-ATPase oder um Zwischenstufen der Assemblierung der Untereinheiten auf ihrem Weg zu ihrem Bestimmungsort handelt, war bisher noch nicht endgültig geklärt. Um der Beantwortung dieser Frage näher zu kommen, wurden Untersuchungen mit Fraktionen aufgereinigter Endomembran-Vesikel durchgeführt, die mit Antikörpern gegen Untereinheiten der V-ATPase immundekoriert wurden (Matsuoka et al., 1997). Das Problem der Kontamination mit Proteinen anderer Organellen kann hierbei allerdings zu Falschaussagen führen.

Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der Lokalisation ist die Immunmarkierung spezifischer Proteine in fixierten, mikroskopischen Präparaten pflanzlicher Gewebe mit spezifischen Antikörpern. Diese spezifischen Antikörper werden mit sekundären Antikörpern, die an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, detektiert. Dadurch können mit dem Mikroskop hochaufgelöste Fluoreszenzbilder dieser Präparate erhalten werden. Die Technik der Confokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) übertrifft dabei die herkömmlichen Techniken der Fluoreszenzmikroskopie. Durch die Aufzeichnung von Bildinformation ausschließlich aus der konfokalen Ebene können hellere, kontrastreichere Bilder gewonnen werden, ohne dass die Schärfe durch Streuung beeinträchtigt wird (e.g. Hepler und Gunning, 1998).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Technik der CLSM angewendet, um Informationen über die zelluläre Lokalisation der 100 kDa-Untereinheit McVHA-a zu gewinnen. Im Vergleich dazu sollten Lokalisationsstudien mit Antiseren gegen die Untereinheiten VHA-A und VHA-E sowie gegen das Teilfragment D_i der Untereinheit B (Zhigang et al., 1996) in der pflanzlichen Zelle durchgeführt werden.

Um die in den CLSM-Bildern immunmarkierten Zellorganellen eindeutig identifizieren zu können, wurden Referenzexperimente durchgeführt. Hierbei wurden die mit den gegen die

interessierende Untereinheit gerichteten Antikörpern erhaltenen Markierungsmuster bei hoher Ortsauflösung mit dem Detektionsmuster verglichen, das man durch Immunreaktion mit Antiseren gegen Markerproteine spezifischer Zellkompartimente erhält: Dieser Vergleich erlaubt eine Zuordnung der Lokalisierung von V-ATPase-Antigenen zu bestimmten Zellorganellen oder zellulären Membransystemen.

3.9.2 Immunlokalisierung von V-ATPase-Untereinheiten an Tabak-Suspensions-Kulturen

Die erste wichtige Entscheidung im Zusammenhang mit den geplanten Untersuchungen zur zellulären Lokalisierung von V-ATPase-Untereinheiten mittels CLSM war die Wahl eines geeigneten Versuchsobjektes. Eine Untersuchung von *M. crystallinum*-Zellen wäre zwar naheliegend gewesen, jedoch erwies sich diese Pflanze für immuncytochemische Untersuchungen aufgrund der großen Vakuolen und der sehr instabilen Zellstruktur als ungeeignet.

Deshalb wurden die Experimente zur Markierung mit Antiseren gegen V-ATPase-Untereinheiten an Tabak-Zellkulturen (BY2: bright yellow-2, in Geelen und Inze, 2001) und an Maiswurzelzellen durchgeführt. Die Detektion des primären Antiserums erfolgte durch Inkubation mit sekundären Antikörpern, an die die Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein-isothiocyanat (FITC), oder Cyanidin3 (Cy3) bzw. Cyanidin5 (Cy5) gekoppelt waren. Die Fluoreszenz des sekundären Antikörpers wurde durch einen Laserstrahl angeregt und das emittierte Fluoreszenzsignal wurde am konfokalen Mikroskops detektiert.

Abb. 3.9.1 zeigt die Markierung von BY-2 Zellen mit Antiseren gegen die Untereinheit a von *S. cerevisiae* (VPH1, Manolson et al., 1995) und gegen die Untereinheit VHA-E (Dietz et al., 1995). Die Tabaksuspensionskulturen wurden eine Woche nach der Überimpfung geerntet, fixiert und immundekoriert (2.14.1). Die Inkubation der Tabakzellen mit anti-VPH1 führte zur Markierung des Cytosols und des Zellkerns (**Abb. 3.9.1 a) und b)**). Außerdem wurden zahlreiche Kompartimente mit einem Durchmesser von 0,5- 1 μm markiert. Die im Transmissionsbild deutlich zu erkennenden Vakuolen zeigten im Fluoreszenzbild der Immunmarkierung hingegen keine signifikante Markierung des Tonoplasten. Die Immundekoration von BY-2 Zellen mit anti-VHA-E zeigte hingegen eine deutliche Markierung des Tonoplasten (**Abb. 3.9.1 c)**). Der Zellkern war nicht markiert.

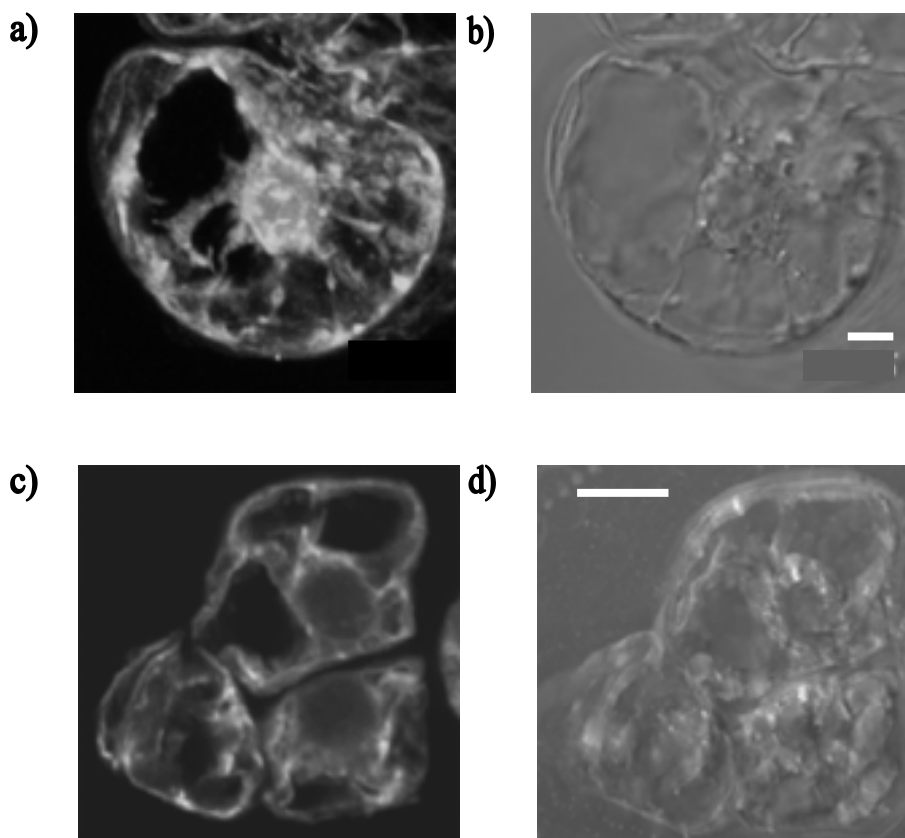


Abb. 3.9.1: Immunlokalisierung von V-ATPase-Untereinheiten in BY2-Zellen.

Die Tabakzellen wurden wie unter (2.14.2) beschrieben fixiert und immundekoriert. **a)** Fluoreszenzbild von BY2-Zellen mit Anti-VPH1 1:200 verdünnt inkubiert **b)** Transmissionsbild derselben Zelle **c)** Zellen mit Antiserum gegen McVHA-E 1:1000 verdünnt und inkubiert **d)** Transmissionsbild. Als sekundärer Antikörper wurde in beiden Fällen Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Ziege (FITC-gekoppelt) verwendet. Die Bilder wurden mit 40 x Vergrößerung aufgenommen, der weiße Balken entspricht 8 μm .

Ein weiterer Versuch der Immunlokalisierung wurde an Zellen einer zwei Wochen alten Tabaksuspensionskultur durchgeführt. Hier wurden die Antiseren gegen VHA-A, VHA-E, VHA-a_{nterm} sowie gegen das Spaltprodukt der Untereinheit B (D_i) verwendet. Die in (**Abb. 3.9.2**) dargestellten, zwei Wochen alten Zellen sind von wenigen großen Vakuolen durchzogen (V). Das Antiserum gegen VHA-A (**Abb. 3.9.2 a)**) markierte den Tonoplasten und die Plasmamembran. Die Markierung war nicht homogen verteilt, sondern fand sich in einem distinkten Bereichen mit einem Durchmesser von circa 0,5 μm . Das Cytoplasma war ebenfalls stark markiert, so dass die Bereiche um den Tonoplasten nicht eindeutig abgegrenzt waren. Das VHA-E Antiserum (**Abb. 3.9.2 b)**) markierte den Tonoplasten, jedoch wurde im Unterschied zu VHA-A markierten Zellen die Plasmamembran nicht markiert.

Die Immundekoration von BY-2 Zellen mit dem Serum gegen den N-Terminus von VHA-a resultierte in einer ausschließlichen Markierung von 0,5 bis 1 μm großen Strukturen im Cytoplasma. Eine dichtere Verteilung im Bereich des Tonoplasten oder eine Markierung des

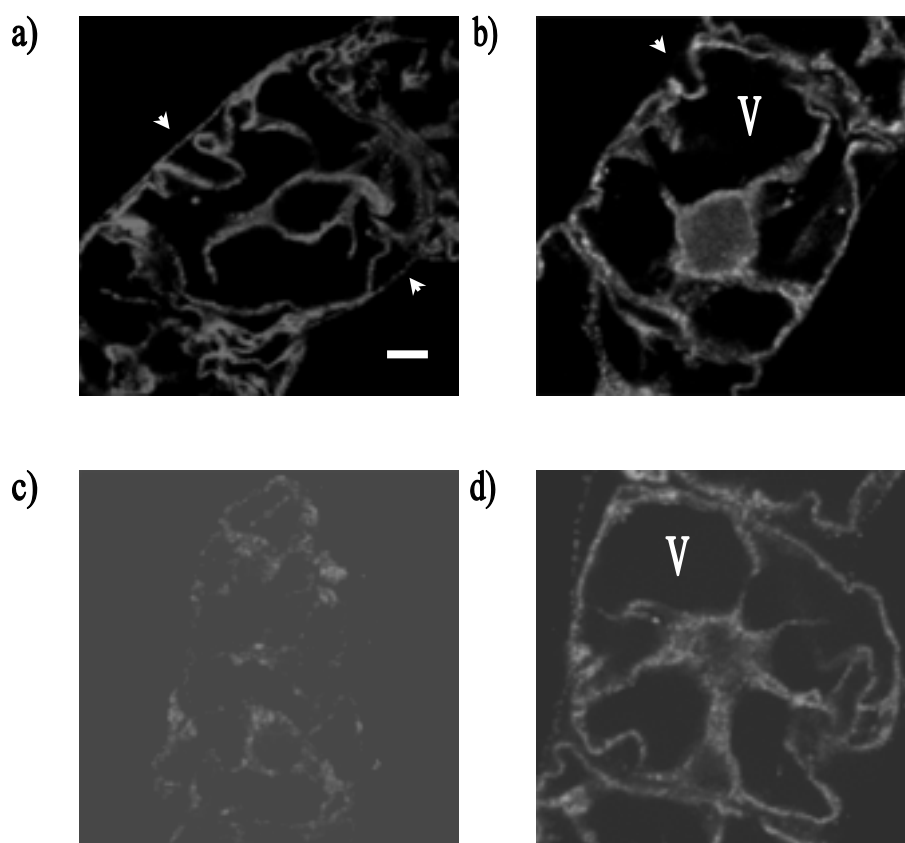


Abb. 3.9.2: Immunlokalisation an BY2-Tabak-Suspensionszellen. **a)** Das Präparat wurde mit Antiserum gegen McVHA-A (1:1000 verdünnt) immundekoriert. Der sekundärer Antikörper war Anti-Kaninchen-IgG mit Cy3 gekoppelt. **b)** Zeigt das mit Antiserum gegen McVHA-E (1:1000) inkubierte Präparat. Der sekundäre Antikörper war Anti-Kaninchen-IgG-FITC **c)** Das Präparat wurde mit Antiserum gegen McVHA- a_{nterm} (1:500 verdünnt) inkubiert. Der sekundäre Antikörper war Anti-Meerschweinchen-IgG-Cy5 **d)** Eine mit Antiserum gegen das Spaltprodukt von VHA-B (D_i) immundekorierte Tabakzelle. Der verwendete sekundäre Antikörper war Anti-Kaninchen-IgG. Die Pfeile zeigen auf die Plasmamembran die durch die Antiseren gegen McVHA-A nicht aber durch Anti-VHA-E markiert wurde. (V) Vakuole. Die weiße Markierung entspricht 8 μm .

Plasmalemmas wurde nicht beobachtet (**Abb. 3.9.2 c**)). Das Antiserum gegen VHA- D_i , das Teilfragment von VHA-B (Zhigang et al., 1996), markierte den Tonoplasten und die Plasmamembran ähnlich dem des Serums gegen VHA-A (**Abb. 3.9.2 d**)).

3.9.3. Immunlokalisation an Zellen der Maiswurzelspitze

Die weitere Immunlokalisierung von ATPase Untereinheiten erfolgte an Wurzelzellen von *Zea mays*, die durch teilweisen enzymatischen Verdau der Zellwand und leichtes Quetschen der Wurzelspitze gewonnen werden (Saitat-Jeunemaître et al., 1996). Neben der Stabilität der

präparierten Zellen ist es von großem Vorteil, dass die Zellen bedingt durch die Nähe zum Spitzenmeristem in den unterschiedlichsten Entwicklungsstadien und Abmessungen vorliegen, was gute Vergleichsmöglichkeiten bietet.

Die Größe der präparierten Zellen der Wurzelspitze betrug typischerweise zwischen 15 und 60 μm . Der Vakuolisierungsgrad hing vom jeweiligen Entwicklungszustand der Zellen ab. **Abb. 3.9.3** zeigt als Ergebnis eines Vorversuches den Vergleich des Transmissionsbilds einer

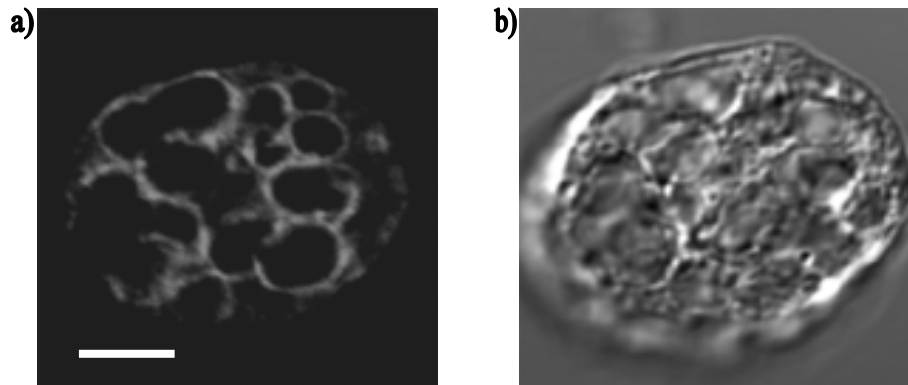


Abb. 3.9.3: Immuncytochemie und Durchlichtmikroskopie von Maiswurzelzellen: Mit Antiserum gegen Untereinheit E dekorierte fixierte Maiswurzelzellen wurden **a)** im konfokalen Modus und **b)** im Transmissionsmodus des Mikroskops aufgenommen. Die Bilder wurden bei 40 x Vergrößerung aufgenommen. Der Größenmaßstab entspricht 8 μm .

fixierten Maiswurzelzelle (Umfang 30 μm) mit der konfokalen Aufnahme der mit Anti-VHA-E markierten Zelle. Das Transmissionsbild der untersuchten Zelle in **Abb. 3.9.3 b)** zeigt, dass diese Zelle zum größten Teil von etwa 6 μm großen Vakuolen ausgefüllt war. Das immuncytochemische Fluoreszenzbild zeigte eine einheitliche Markierung des Tonoplasten. Diese Markierung setzte sich deutlich vom Cytoplasma ab, das bei den Zellen von Mais nicht markiert wurde.

3.9.3 Immunlokalisation von VHA-A

Abb. 3.9.4 zeigt die Markierung von Maiswurzelzellen mit dem gegen VHA-A gerichteten Antiserum. Die Immundekorationen von Zellen in drei unterschiedlichen Entwicklungsstadien ergeben folgendes Bild: In einer kleinen, sich ausdifferenzierenden Zelle in der noch keine klar ausgeprägten Vakuolen zu sehen sind wurden ausschließlich runde vesikuläre Zellkompartimente ($\text{\O} 0,5 \mu\text{m}$), die über die Gesamtheit des Zellinnenraums verteilt waren beobachtet **Abb. 3.9.4 a)**. Der Zellkern wurde nicht markiert. Die in **Abb. 3.9.4 b)** abgebildete

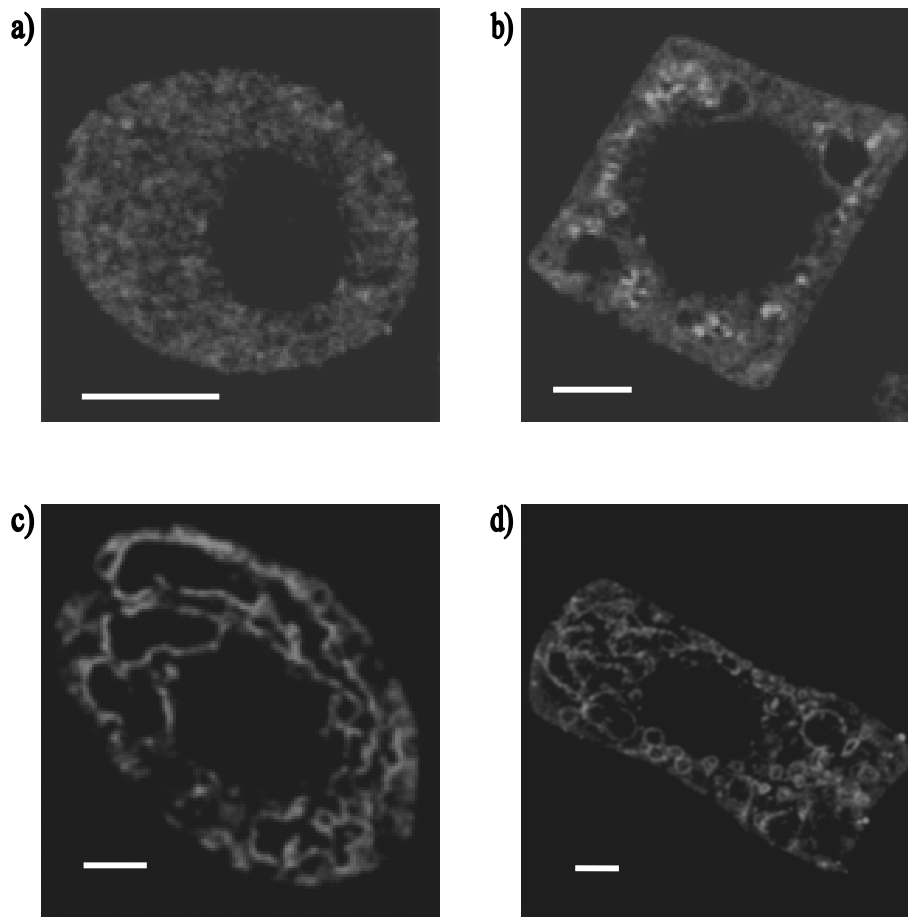


Abb. 3.9.4: Immunlokalisierung von VHA-A in Zellen der Maiswurzelspitze. Fixierte Maiswurzelquetschpräparate wurden mit Antiserum gegen Untereinheit A 1:1000 verdünnt inkubiert. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte durch ein gegen Kaninchen-IgG gerichtetes, mit CY3 gekoppeltes Antiserum (1:800). Der Balken entspricht einer Größe von 8 μ m.

Zelle zeigte die Ausformung kleinerer Vakuolen ($\text{\O} 5 \mu\text{m}$), deren Tonoplast teilweise markiert war. In geringerem Maße war eine Markierung des Cytoplasmas zu beobachten. Außerdem wurde die Markierung kleiner runder Zellkompartimente mit Durchmessern zwischen 0,5 und 2 μm beobachtet. Die Markierung von voll ausdifferenzierten Zellen mit Anti-VHA-A-Serum (**Abb. 3.9.4 c) und d)**) resultierte in einer vollständigen Markierung des Tonoplasten und einer unregelmäßigen Dekoration anderer Kompartimente. Im Gegensatz zu den Tabakzellen wurde die Plasmamembran von Wurzelzellen mit Anti-VHA-A-Serum nicht markiert

3.9.4 Immunlokalisation von VHA-E

Die Dekorationsmuster von Maiswurzelzellen nach Inkubation mit Anti-VHA-E-Serum glich der für Anti-VHA-A beschriebenen Markierung. **Abb. 3.9.5** zeigt ebenfalls die Analyse von Maiswurzelzellen in verschiedenen Entwicklungsstadien. In kleinen Zellen mit unausdifferenzierten Vakuolen erfolgte mit Anti-VHA-E-Serum eine Markierung kleiner, vesikulärer Zellkompartimente von 0,5 bis 1 μm Durchmesser (**Abb. 3.9.5 a) und b)**).

Die in **Abb. 3.9.5 c) und d)** dargestellten Objekte zeigen in Bezug auf die Verteilung und Ausprägung der Vakuolen und Endomembrankompartimente zwei verschiedene Typen (im folgenden Typ A bzw. B genannt) ausdifferenzierter Zellen. **Abb. 3.9.5 c)** präsentiert eine Zelle vom Typ A, in deren Lumen Vakuolen mit sehr unterschiedlicher Größe und Gestalt mehr oder weniger gleichmäßig verteilt sind. Es finden sich hier kugelförmige Vakuolen (\emptyset

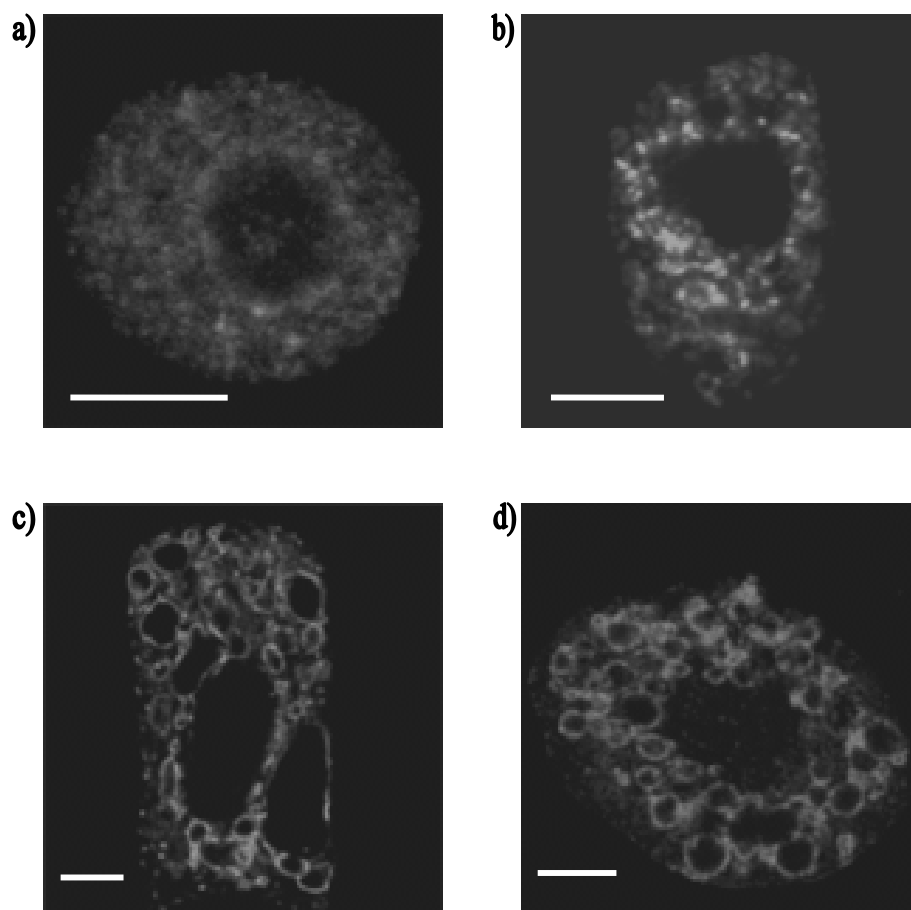


Abb. 3.9.5: Immunlokalisation von VHA-E in Maiswurzelzellen. Fixierte Maiswurzelquerschnitte wurden mit Serum gegen VHA-E (1:1000) immundekoriert. Detektiert wurden die Antikörper-Antigen-Komplexe mittels eines Anti-Kaninchen-IgG Cy3 gekoppelten sekundären Antikörpers. Der abgebildete Strich entspricht 8 μm .

im Bereich von 3 μm) bis hin zu Vakuolen in der Gestalt eines Elipsoids (\emptyset längs 20 μm , \emptyset 10 μm). **Abb. 3.9.5 d)** zeigt eine Typ B-Zelle, in der ausschließlich Vakuolen gleicher Größe (\emptyset 3 μm) vorkommen, die den Zellinnenraum gleichmäßig ausfüllen. Das Markierungsmuster dieses Zelltyps mit dem Serum gegen VHA-E zeigte eine geringe Dekoration von vesikulären Zellkompartimenten. Die Gesamtdichte der Vakuolen scheint beim Typ A geringer zu sein als beim Typ B. Neben der Dekoration des Tonoplasten war bei Typ A deutlich eine starke Markierung von 0,5-1 μm großen Membrankompartimenten zu beobachten.

3.9.5 Immunlokalisation von VHA-D_i

Die Markierung von Maiswurzelzellen mit dem Antiserum gegen VHA-D_i, dem Spaltprodukt der Untereinheit B (Zhigang et al., 1996), zeigte im Vergleich zu den Antiseren der bisher besprochenen Untereinheiten ein völlig neues Markierungsmuster (**Abb. 3.9.6**). Unabhängig vom jeweiligen Entwicklungszustand der Wurzelzellen und dem Ausprägungsgrad der Vakuolen markierte das VHA-D_i-Antiserum präferentiell die vesikulären Zellkompartimente, die auch von den Anti-VHA-A- und Anti-VHA-E-Seren dekoriert worden waren (3.9.3 und 3.9.4). Im Gegensatz zu anti-VHA-A und E markierte anti-VHA-D_i nicht den Tonoplasten. Die vesikulären Zellkompartimente wurden durch das Antiserum mit unterschiedlicher Intensität angefärbt. Die stark markierten Kompartimente waren entweder regelmäßig über den Bereich des gesamten Cytoplasmas verbreitet (**Abb. 3.9.6 a) und c)**) oder häuften sich in der Umgebung des Zellkerns an und waren in sich zusammengelagerten Strukturen organisiert (**Abb. 3.9.6 b) Pfeil**). In Zellen mit stark ausdifferenzierten Vakuolen (**Abb. 3.9.6. d) Pfeile**) war eine spezifische Dekoration um den Tonoplasten durch das VHA-D_i-Antiserum zu beobachten, die perlenschnurartig erschien.

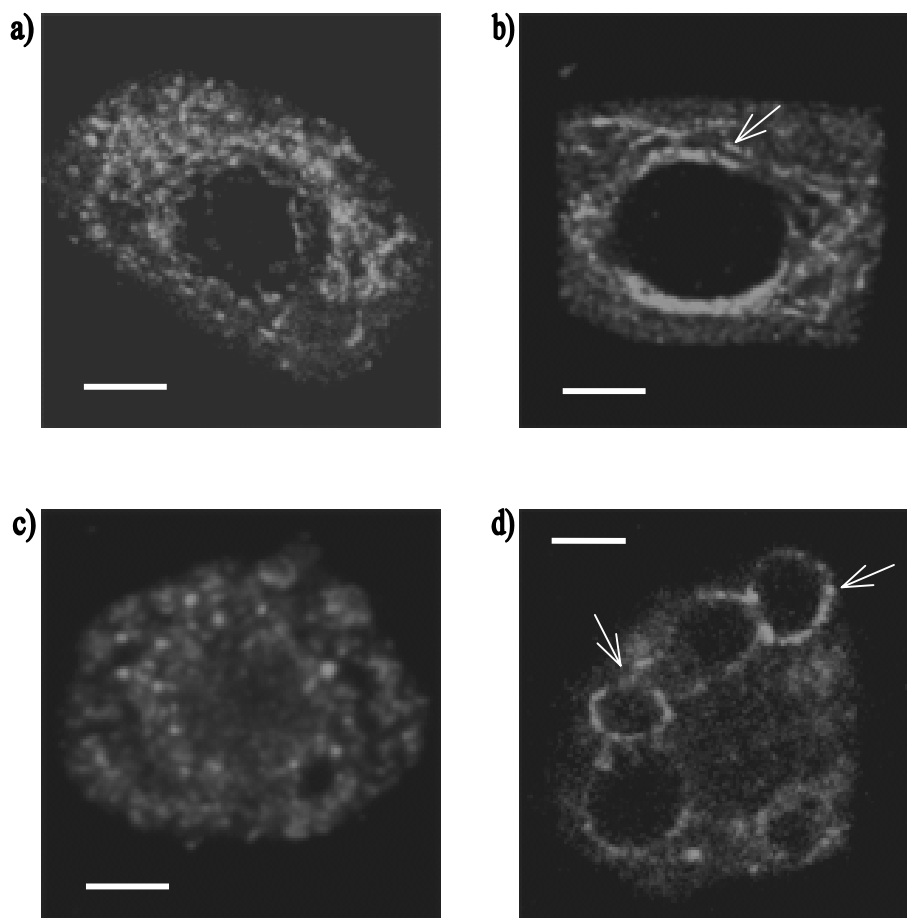


Abb. 3.9.6: Immunlokalisierung von VHA-D_i, dem Spaltprodukt von VHA-B. Maiswurzelzellen wurden mit Antiserum gegen Untereinheit D_i dekoriert und mit Anti-Kaninchen-IgG mit Cy3 gekoppelt detektiert. Die Zellen wurden am konfokalen Mikroskop mit 40 x Vergrößerung aufgenommen. Der Balken entspricht 8 μ m. **b)** Der Pfeil zeigt die im Bereich um den Zellkern verdichteten Strukturen **d)** die Pfeile zeigen die perlschnurartige Markierung in Bereichen um den Tonoplasten.

3.9.6 Immunmarkierungsmuster von Anti-VPH1 und Anti-VHA-a_{n-term}

Zur Immunlokalisierung von VHA-a wurde der gereinigte Antikörper gegen VPH1, der homologen Untereinheit a aus *S. cerevisiae* (Manolson et al., 1992), bzw. das Antiserum gegen den N-Terminus von McVHA-a verwendet. **Abb. 3.9.7** zeigt die Immundekoration von Maiswurzelspitzenzellen mit dem Antikörper gegen VPH1, der spezifisch das heterolog exprimierte Teilfragment der Untereinheit a von *M. crystallinum* erkannte (3.6.1). Da bei jungen undifferenzierten Wurzelspitzenzellen die Dichte der Immundekoration mit diesem Antikörper zu hoch war und somit einzelne Kompartimente nicht aufgelöst werden konnten, werden im Folgenden nur Ergebnisse von Zellen mit ausdifferenzierten Vakuolen dargestellt und ausgewertet.

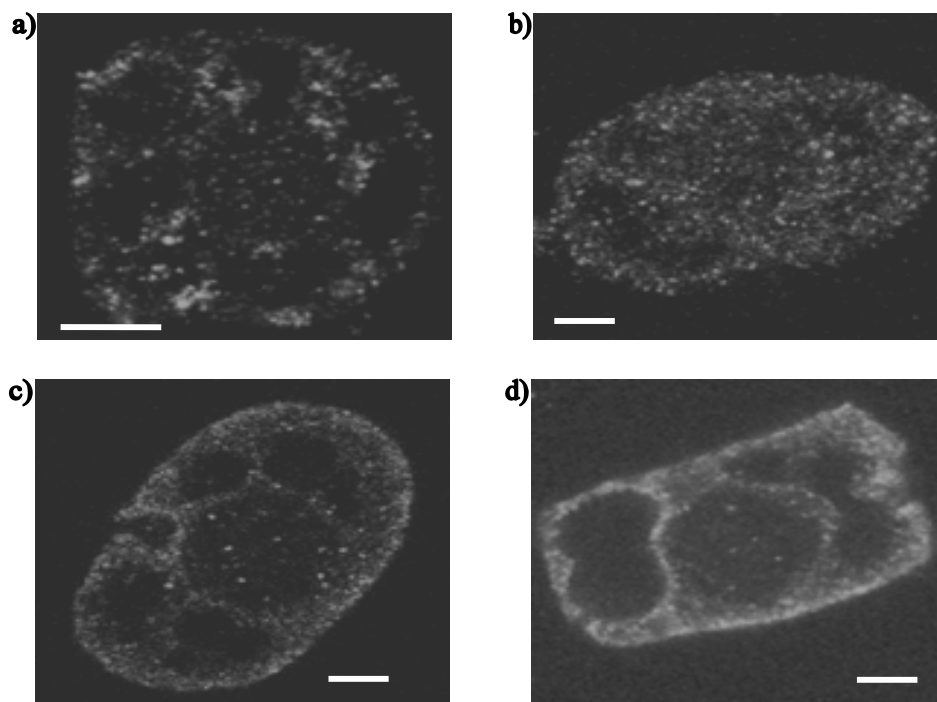


Abb. 3.9.7: Immunocytochemie mit dem Antikörper gegen Untereinheit a von *S. cerevisiae* (VPH1). Fixierte Maiswurzelzellen wurden mit gereinigtem Vph1-Antiserum 1:100 verdünnt inkubiert. Der sekundäre Antikörper war Cy3 gekoppelter Anti-Maus-IgG aus Ziege. Der Größenmaßstab entspricht 8 μm .

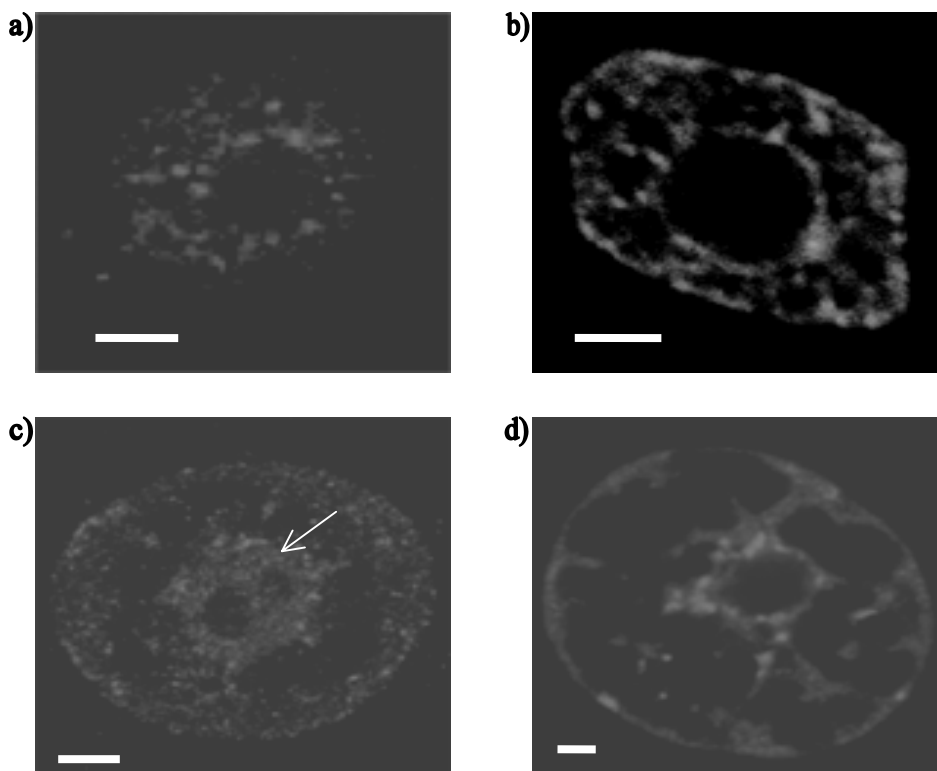


Abb. 3.9.8: Immunlokalisation von VHA-a_{nterm}. Maiswurzelspitzenzellen wurden mit Antiserum gegen den N-Terminus von McVHA-a (1:1000) inkubiert. Die gebundenen Serumbestandteile wurden mit Cy5-gekoppelten Ziegenserum gegen Meerschweinchen-IgG detektiert. c) Der Pfeil zeigt die Markierung des Kernbereichs. Der Größenmaßstab entspricht 8 μm .

In allen Bildern der **Abb. 3.9.7** ist eine starke Immundekoration kleinerer vesikulärer Zellkompartimente (\varnothing 0,5-1 μm) zu erkennen, die in kleineren Zellen **a)** unregelmäßig, in größeren Zellen hingegen gleichmäßig über das gesamte Cytoplasma verteilt waren **b)**. Obwohl die Vakuolen deutlich sichtbar waren (**Abb. 3.9.7 c) und d)**), konnte keine spezifische Dekoration des Tonoplasten mit VPH1-Antikörper beobachtet werden. Im Bereich um die großen Vakuolen kam es allerdings häufig zu einer Verdichtung der mit VPH1-Antikörper markierbaren Endomembranpartikel (**Abb. 3.9.7 d)**).

Die Markierung der Maiswurzelzellen mit dem Serum gegen den N-Terminus von McVHA-a (**Abb. 3.9.8**) führte zu einem Dekorierungsmuster, das dem mit dem VPH1-Antikörper erhaltenen Muster sehr ähnlich war. So erwiesen sich die mittels McVHA-a_{nterm}-Antiserums detektierbaren Endomembranpartikel hinsichtlich ihrer Größe in ausdifferenzierten Zellen (**Abb. 3.9.8 c)**) heterogener als in unvollständig differenzierten Zellen (**Abb. 3.9.8 a)**). Die Dichte der mit Anti-McVHA-a_{nterm} Serum markierten Endomembranpartikel war allerdings insgesamt geringer als bei der Dekoration mit dem Anti-VPH1-Antikörper. Deshalb ließ sich bei Applikation von McVHA-a_{nterm}-Antiserum die Markierung intrazellulärer Mikrokompartimente auch in jüngeren, unausdifferenzierten Zellen klar darstellen (**Abb. 3.9.8 a) und b)**). Eine Häufung dieser Mikrokompartimente im Bereich des Tonoplasten der gut sichtbaren Vakuolen (**Abb. 3.9.8 c) und d)**) war im Gegensatz zur Markierung mit anti-VPH1 nicht zu beobachten. Im Gegensatz zur Applikation von VPH1-Antikörper wurde mit McVHA-a_{nterm}-Antiserum der Kernbereich stärker markiert (**Abb. 3.9.8 c) Pfeil**).

3.9.7 Immundoppellokalisierungen von V-ATPase-Untereinheiten mit zellulären Markern für Membrankompartimente

Durch einfache Immunlokalisierung einzelner V-ATPase-Untereinheiten innerhalb der Zelle konnten VHA-A und -E wie erwartet auf dem Tonoplasten ausdifferenzierter Zellen lokalisiert werden. Die Dekoration intrazellulärer Mikrokompartimente sollte durch Doppellokalisationsstudien mit Markern für bekannte Endomembranproteine weiter untersucht werden.

Folgende Marker-Antikörper standen hierbei zur Verfügung:

- ein Antikörper gegen Calreticulin, ein exklusiv auf dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) vorkommendes Chaperon (Chrofts und Denecke, 1998);
- Jim 84, ein Antikörper, der spezifisch ein auf dem Golgi-Apparat (GA) der Pflanzen lokalisiertes Antigen erkennt (Horsley et al., 1993);
- ein Antikörper gegen den vakuolären Sortierrezeptor BP80 (Paris et al., 1996) zur Markierung von prävakuolären Kompartimenten (PVC); sowie
- ein gegen das Tonoplasten-intrinsische Protein (gamma-TIP) gerichteter Antikörper zur Markierung von lytischen Vakuolen (Jauh et al., 1999).

Zur Bildgewinnung wurden die doppelt markierten Präparate nacheinander mit der für die jeweilige Fluoreszenzanregung erforderlichen Wellenlänge angeregt und die Fluoreszenzbilder beider Markierungen aufgenommen. Anschließend wurden die beiden so erhaltenen Bilder mit Hilfe der LCS-Software (Leica, Deutschland) überlagert. Zur Kontrolle auf eine eventuelle Kreuzreaktivität der sekundären Antikörper gegen Seren aus unterschiedlichen Tieren wurde in Vorversuchen jedes verwendete Antiserum in jeder möglichen Kombination aus 1. und 2. Antikörper auf Ihre Kreuzreaktivität getestet.

3.9.7.1 Immun-Doppellokalisierung von Untereinheiten der V-ATPase mit Calreticulin

Die **Abb. 3.9.9** und **3.9.11** zeigen die intrazelluläre Lokalisierung der Immunmarkierungen von VHA-A, VHA-E und VHA-a_{nterm} und das Markierungsmuster des ER-Markers Calreticulin. Zum Vergleich ist jeweils das Markierungsmuster einer jungen Zelle ohne ausdifferenzierte Vakuolen und das einer Zelle mit ausdifferenzierten Vakuolen dargestellt. Der Antikörper gegen Calreticulin ist spezifisch für das endoplasmatische Retikulum. Das Endoplasmatische Retikulum geht aus der Kernmembran hervor und bildet ein ausgeprägtes Netzwerk innerhalb der Zelle. Daher wird bei einer Markierung mit Calreticulin sowohl die Kernmembran, als auch das Netzwerk das sich über das gesamte Cytoplasma erstreckt angefärbt. Die immuncytochemische Doppelmarkierung der Zellen mit großen ausdifferenzierten Vakuolen zeigte das für anti-VHA-A typische Markierungsmuster (siehe 3.9.3) und die typische ER-Markierung mit dem Calreticulin-Antikörper (**Abb 3.9.9, obere 6 Zellen**). Nach Überlagerung der Bilder zeigte sich eine Co-Lokalisierung der beiden Antikörper im kortikalen Bereich des Endoplasmatischen Retikulums (gelbes Signal), nicht aber auf der Kernmembran. Dies wurde durch die Messung der Fluoreszenzintensität entlang

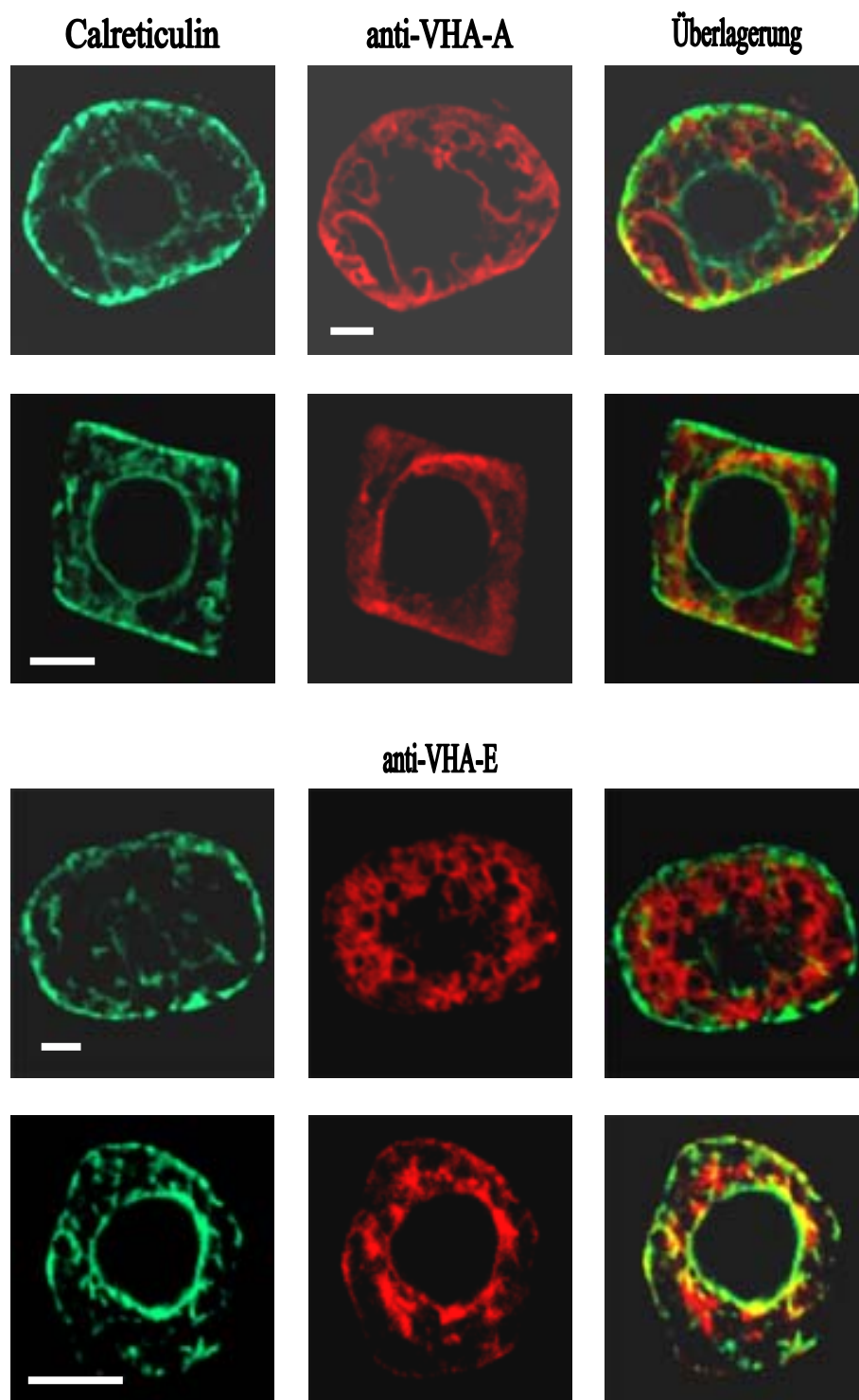


Abb. 3.9.9: Doppellokalisierung von Calreticulin mit VHA-A und VHA-E. Fixierte Maiswurzelzellen wurden mit einem Antikörper gegen den Endoplasmatischen Reticulum-Marker Calreticulin (Crofts und Denecke, 1998) und mit Seren gegen VHA-A und VHA-E inkubiert. Der unverdünnt eingesetzte Antikörper gegen Calreticulin wurde mit FITC-gekoppeltem Anti-Maus-IgG (1:800) detektiert, die Seren gegen VHA-A (1:2000) und VHA-E (1:4000) wurden mit Anti-Kaninchen-IgG mit CY3 gekoppelt (1:800) detektiert. Der Maßstab entspricht 8 μm .

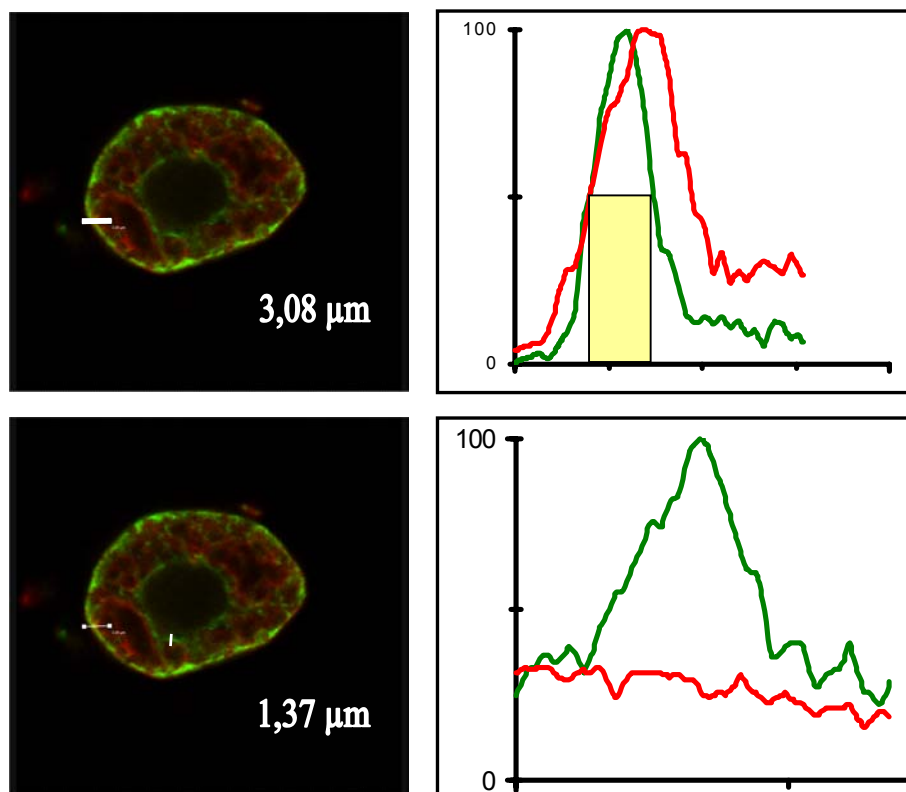


Abb. 3.9.10: Quantifizierung der Lokalisierung der Markierungen von anti-Calreticulin und anti-VHA-A. Entlang der im Bild gezeigten weißen Markierung wurden die Intensitäten der Einzelmarkierungen orts aufgelöst detektiert. Die Signalintensitäten der grünen Markierung (Calreticulin) und der roten Markierung (VHA-A) sind im nebenstehenden Diagramm in Abhängigkeit von der Länge des dargestellten Vektors dargestellt. Die gelbe Markierung im Diagramm zeigt den Bereich der Überlappung bei mindestens 50 %iger Signalstärke.

eines Vektors überprüft. Hierbei werden die Fluoreszenzintensitäten der beiden verwendeten Fluorochrome entlang eines Vektors beliebiger Länge gemessen und gegeneinander aufgetragen. Co-Lokalisation liegt vor, wenn die Entfernung der 50 %igen Intensitäten beider Fluorochrome größer sind als die Auflösung des verwendeten Objektivs (hier 160 nm) für die konfokale Aufnahme. Tatsächlich lag die Fluoreszenzintensität für VHA-A Signal im Bereich der Kernmembran nicht über der Hintergrundintensität, während die Fluoreszenzintensitäten im Bereich des kortikalen ER über 600 nm überlappen, was für eine echte Co-Lokalisation spricht (**Abb. 3.9.10**).

Abb 3.9.9 (untere 6 Zellen) zeigt die Doppelmarkierung von VHA-E Antiserum mit Calreticulin. Wie bereits für anti-VHA-A gezeigt, co-lokalisiert anti-VHA-E mit dem ER-Marker im kortikalen Bereich des ER aber nicht auf der Kernmembran. Diese Resultate wurden ebenfalls durch Fluoreszenzintensitätsprofile überprüft und bestätigt (hier nicht explizit dargestellt).

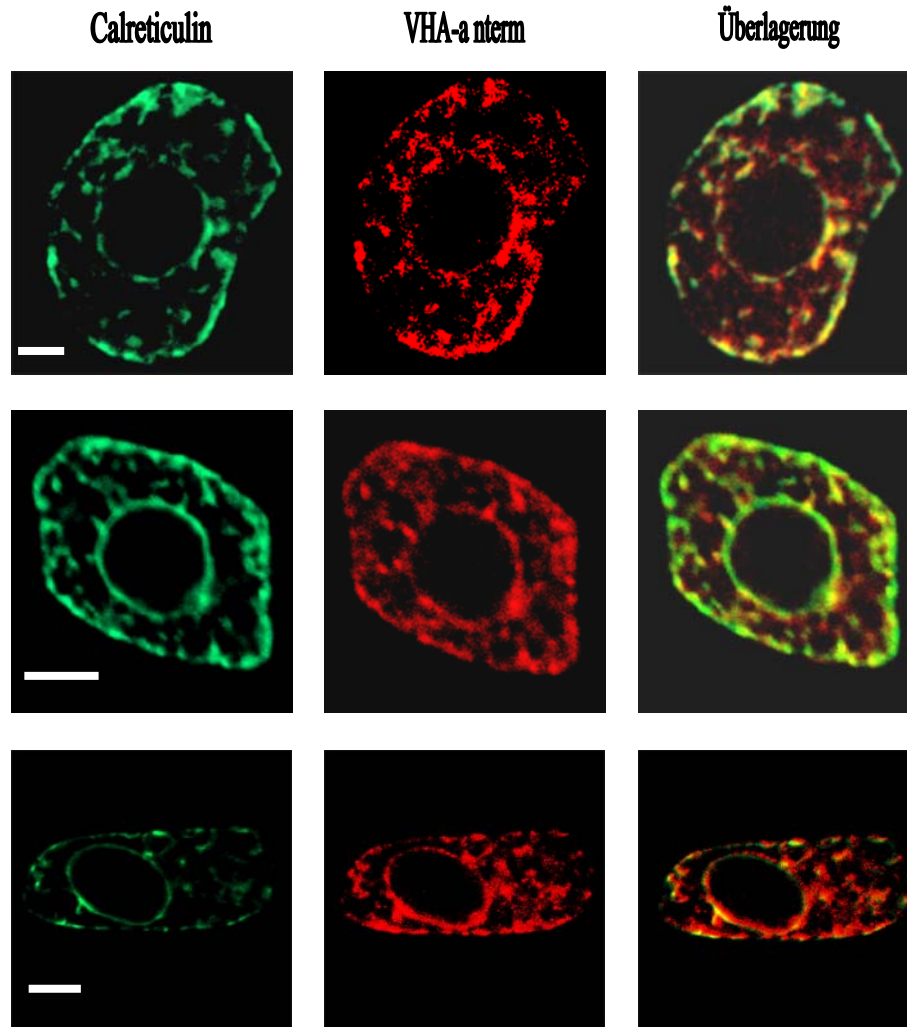


Abb. 3.9.10: Doppellokalisierung von VHA-a_{nterm} und Calreticulin. Die fixierten Maiswurzelzellen wurden mit Antikörper gegen Calreticulin (unverdünnt, ER-Marker) und Antiserum gegen den N-Terminus von VHA-a (1:2000) inkubiert. Die zur Detektion verwendeten sekundären Antikörper waren Cy5-gekoppeltes Anti-Meerschweinchen-IgG aus Ziege und Anti-Maus-IgG mit FITC gekoppelt. Beide wurden in einer Verdünnung von 1:800 eingesetzt. Der Maßstab entspricht 8 μ m.

Abb. 3.9.11 zeigt Zellen der Maiswurzelspitze nach sequentieller Behandlung mit dem Antiserum gegen den N-Terminus von VHA-a und dem Calreticulin-Antikörper. Die anti-VHA-anterm-Markierung zeigt das typische zuvor beschriebene Muster (3.9.6). Bei Überlagerung der Fluoreszenzsignale von anti-VHA-anterm und Calreticulin zeigte sich eine fast vollständige Co-Lokalisierung der beiden Markierungen. Diese Co-Lokalisierung wurde mittels Intensitätsprofilen überprüft. Sowohl im kortikalen Bereich, als auch auf der Kernmembran konnte eine vollständige Co-Lokalisierung gezeigt werden (**Abb. 3.9.12**).

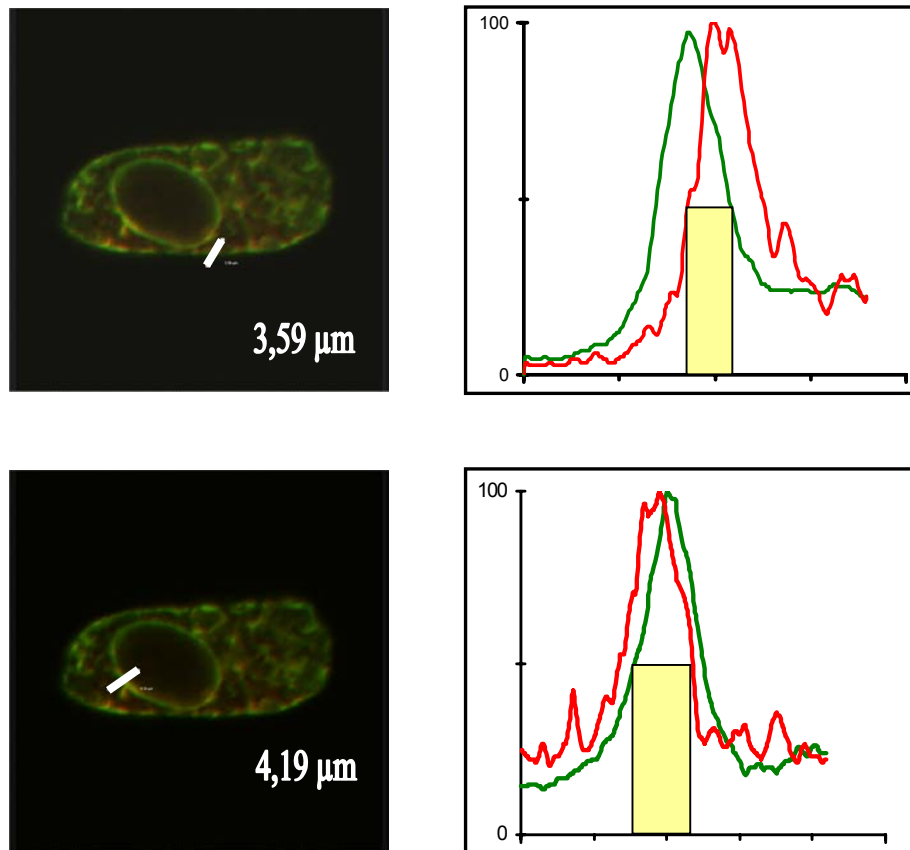


Abb. 3.9.12: Quantifizierung der Lokalisierung der Markierungen von anti-Calreticulin und anti-VHA-a_{nterm}. Entlang der im Bild gezeigten weißen Markierung wurden die Intensitäten der Einzelmarkierungen orts aufgelöst detektiert. Die Signalintensitäten der grünen Markierung (Calreticulin) und der roten Markierung (VHA-a_{nterm}) sind im nebenstehenden in Abhängigkeit von der Länge des gezeigten Vektors im Diagramm dargestellt. Die gelbe Markierung im Diagramm zeigt den Bereich der Überlappung bei mindestens 50 %iger Signalstärke.

3.9.7.2 Doppellokalisierung von V-ATPase-Untereinheiten und JIM-84, einem Marker für den Golgi-Apparat

Die Markierung von Maiswurzelzellen mit dem Antikörper JIM 84 (Horsley et al., 1993) (Abb. 3.9.13) zeigte die Immundekoration vesikulärer Endomembran-Kompartimente, die über den gesamten Bereich des Zellinneren verteilt waren, wobei die Dichte im näheren Bereich um den Zellkern abnimmt. Dieses Markierungsmuster entspricht dem in der Literatur beschriebenen Muster für Golgi-Markierungen (Couchy et al., 1998). Die Markierung mit den Antiseren gegen VHA-A und -E zeigten das typische Muster wie in der Einzelmarkierung gezeigt (3.9.3 und 3.9.4). Bereiche der Überlagerung der Signale fanden sich hauptsächlich in der Nähe der markierten Tonoplasten.

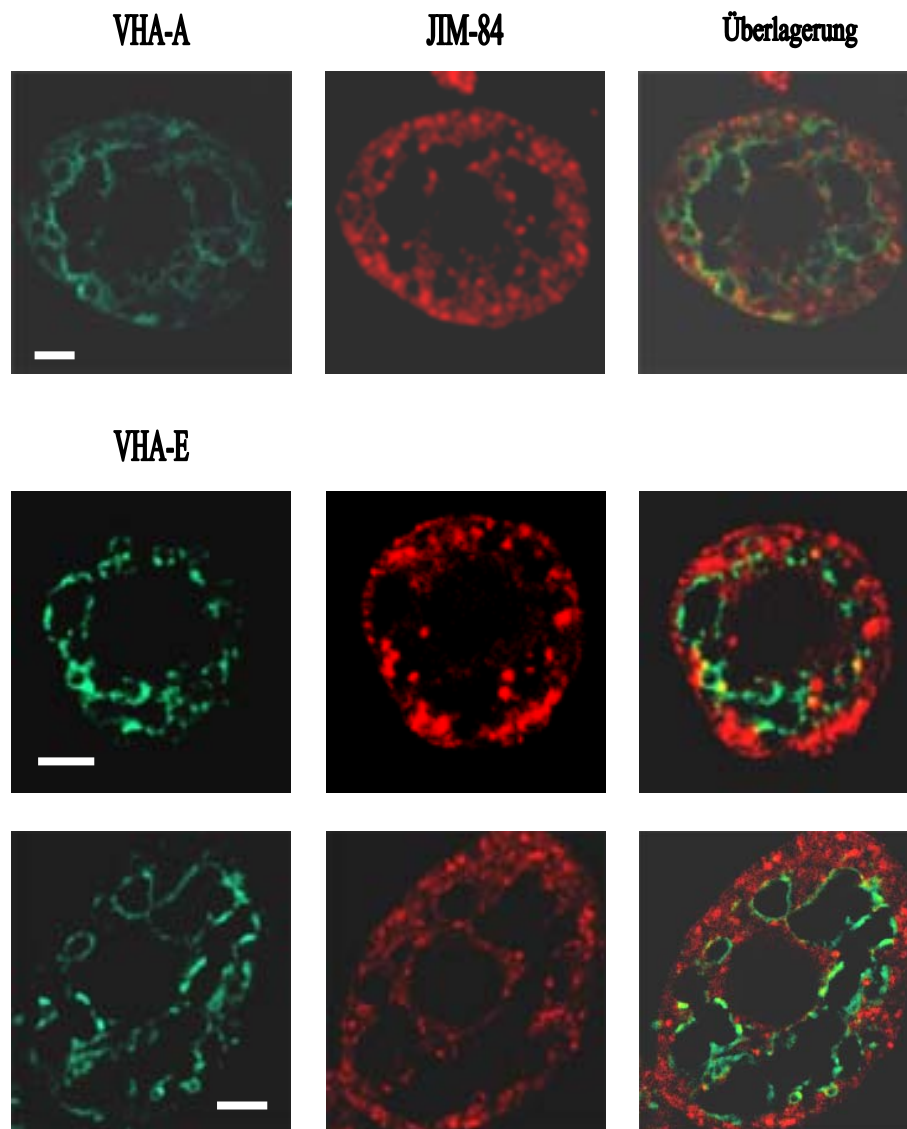


Abb. 3.9.13: Doppellokalisierung von VHA-A und VHA-E mit JIM-84. Fixierte Maiswurzelspitzenzellen wurden mit Antikörper gegen den Golgi-Apparat-Marker Jim-84 (unverdünnt) und Antiseren gegen VHA-A (1:2000 verdünnt) bzw. VHA-E (1:4000 verdünnt) inkubiert. Die Detektion durch sekundäre Antikörper erfolgte bei JIM-84 mit Anti-Ratte-IgG mit Cy3 gekoppelt (1:800), bei VHA-A und VHA-E mit Anti-Kaninchen-IgG mit FITC gekoppelt. Der weisse Strich entspricht 8 μm .

3.9.7.3 Doppellokalisation von V-ATPase-Untereinheiten und dem prävakuolären Sortierrezeptor BP-80

Die Immundekoration der Wurzelspitzenzellen mit dem Antikörper gegen BP-80, einem vakuolären Sortierrezeptor (Paris et al., 1996), zeigte die distinkte Markierung einiger weniger Mikrokompartimente (**Abb. 3.9.14**). Das Markierungsmuster des Antiserums gegen VHA-E zeigte keine Bereiche der Überschneidung von Signalen mit dem Markierungsmuster des Antikörpers gegen BP80.

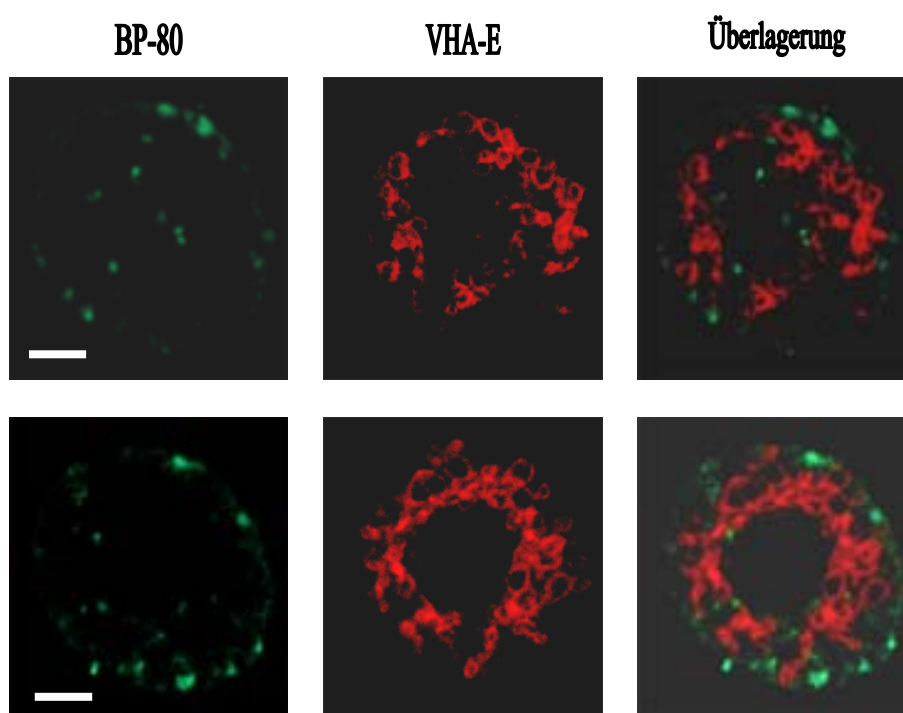


Abb. 3.9.14: Doppellokalisierung von BP-80 und McVHA-E. Maiswurzelspitzenzellen wurden mit einem Antikörper gegen den prävakuolären Marker BP-80 (Verdünnung 1:100) und gegen McVHA-E (1:4000) immundekoriert. Die sekundären Antikörper waren für VHA-E Anti-Kaninchen-IgG CY3 gekoppelt und für BP-80 Anti-Maus-IgG mit FITC gekoppelt. Der Größenmaßstab entspricht 8 μm .

3.9.7.4 Doppellokalisierung von VHA-A mit dem Aquaporin gamma-TIP

Zur Überprüfung der Frage, ob durch die gegen V-ATPase-Untereinheiten gerichteten Antiseren ein bestimmter Vakuolentyp oder die Gesamtheit aller Vakuolen markiert wird, wurde eine Doppellokalisierung mit dem Anti-VHA-A Serum und einem gegen das Aquaporin gamma-TIP gerichteten Antikörper durchgeführt. Das Aquaporin gamma-TIP ist an der lytischen Vakuole lokalisiert. **Abb. 3.9.15 (obere Reihe)** zeigt, dass in einer Maiswurzelzelle mit distinkt ausgeprägten vakuolären Kompartimenten die meisten, aber nicht alle, vom Antiserum gegen VHA-A markierten Vakuolen auch vom Antikörper gegen gamma-TIP markiert wurden. Bei einer jungen Zelle ohne ausdifferenzierte Vakuolen ergab sich vor allem bei der Dekoration mit Anti-VHA-A eine fast durchgängige Markierung der gesamten Zelle bei nur schwacher Markierung distinkter Kompartimente (**Abb. 3.9.15 untere Reihe**). Die Überlagerung beider Markierungen ließ erkennen, dass nur etwa 75 % der mit VHA-A markierten Kompartimente auch von dem gamma-TIP-Antikörper erkannt wurden.

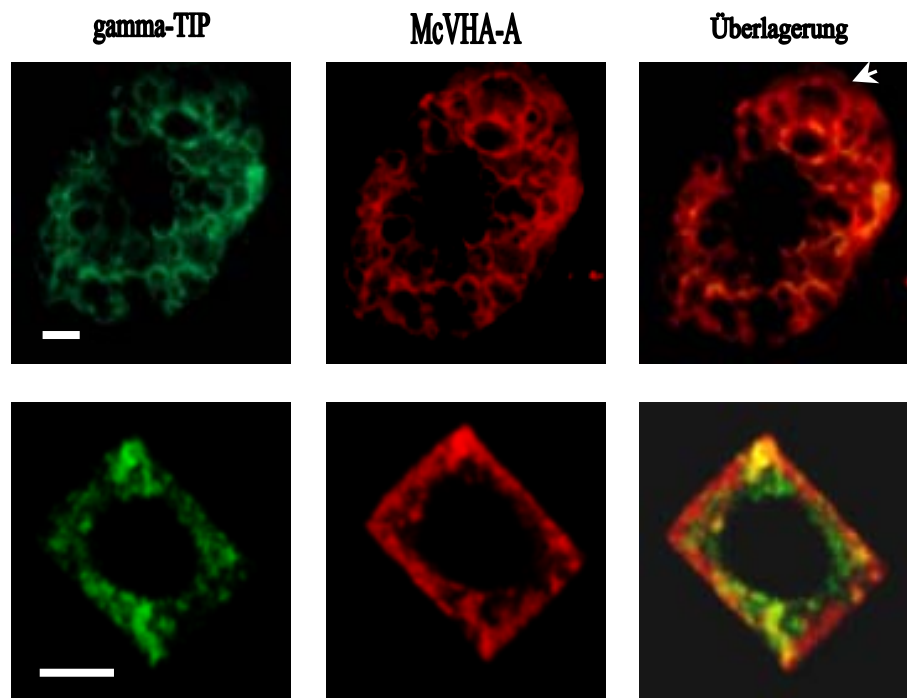


Abb. 3.9.13: Doppellokalisierung von gamma-TIP und VHA-A. Fixierte Maiswurzelspitzenzellen wurden mit Antikörper gegen gamma-TIP und Antiserum gegen McVHA-A immundekoriert. Der Pfeil zeigt auf vom Antikörper gegen gamma-TIP nicht dekoriertes vakuoläres Kompartiment. Das 1:2000 verdünnte Immunserum gegen VHA-A wurde mit Anti-Kaninchen-IgG mit Cy_3 gekoppelt detektiert. Die Detektion des 1:100 verdünnten gamma-TIP Antikörpers erfolgte durch Anti-Maus-IgG mit FITC gekoppelt. Beide sekundären Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:800 eingesetzt. Der Maßstab entspricht einer Größe von 8 μm .

3.9.8 Transiente Transformation von Zwiebschuppen-Epidermiszellen mit CFP-fusionierten V-ATPase-Untereinheiten

Neben der immunocytochemischen Detektion bestimmter Proteine in fixierten Zellen, ist die Lokalisation spezifischer Proteine am lebenden Objekt eine besonders aussagekräftige Methode zur subzellulären Analyse. Mit der Charakterisierung und Modifikation des GFP (Green Fluorescent Proteins) ergaben sich auch im Bereich der Pflanzenforschung ganz neue Möglichkeiten spezifischen Proteinen in der lebenden Zelle zu markieren (Hanson und Köhler, 2001).

Die Fusionen des zu untersuchenden Proteins mit einer für eine GFP-Variante codierenden Sequenz eröffnete neue Wege, Lokalisation und Transport von Proteinen in der lebenden Zelle zu erforschen. Neben der stabilen Transformation von Pflanzen mit fremden Gensequenzen hat sich das Verfahren der Mikroprojektilbombardierung (2.15.) zur transienten Expression von Konstrukten innerhalb der Pflanzenzelle als eine zuverlässige Methode erwiesen. Ein gut erprobtes System ist hier die Transformation von Zwiebelepidermiszellen, in denen eine Expression des Fusionsproteins bis zu 48 h nachgewiesen werden kann. Um die intrazelluläre Lokalisation von McVHA-a in Zwiebelepidermiszellen im Vergleich zur Lokalisierung von McVHA-c zu untersuchen, wurden Fusionsproteine mit den Gesamtlängen der codierenden Sequenzen von McVHA-a und c mit der GFP Variante CFP (Cyan Fluoreszent Protein) konstruiert.

Hierzu wurden mittels der Primerpaare „a-gesamt-BamH I-f / a-gesamt-Nco I-r“ und „c-BamH I-f / c-Nco I-r“ und den klonierten Gesamtlängen der jeweiligen Sequenzen als Matrize, die codierenden Bereiche beider Untereinheiten mittels PCR amplifiziert. Nach dem Schneiden beider PCR-Produkte durch einen Restriktionsdoppolverdau mit den Restriktionsenzymen BamH I und Nco I (2.2.4) wurden die geschnittenen Fragmente mit dem auf dieselbe Art behandelten Vektor pCFP (Promega, Göttingen) ligiert (2.2.6). Nach Überprüfung der Transformanten durch Kolonien-PCR wurden a/CFP und c/CFP zur Überprüfung der korrekten Fusion sequenziert. Die beiden Konstrukte wurden durch Klonierung in den für eine transiente Expression in Pflanzen geeigneten Vektor pRSGFP (Davis und Vierstra, 1998) unter die Expressionskontrolle des starken viralen Promotors CaMV35S gestellt, um die transiente Expression in der Pflanze zu ermöglichen. Dieser Vektor besitzt aufgrund der alleinigen Eignung für transiente Expression in Pflanzen nur die Sequenz des 35S-Promotors. Durch das Weglassen aller für eine Transformation mit Agrobakterien benötigten Sequenzen besitzt

dieser Vektor eine geringe Größe von 4,9 kBp, die eine standardmäßige Ligation und Transformation vereinfacht.

Die Klonierung erfolgte durch die Amplifizierung der codierenden Sequenzen beider Fusionsproteine durch die Primer-Kombinationen „a-gesamt-BamH I-f / SacI-GFP-r“ und „c-gesamt-BamH I-f - SacI-GFP-r“, durch die gleichzeitig an das 5' und 3' Ende der Sequenzen Schnittstellen für die Enzyme BamH I und Sac I addiert wurden. Nach dem Verdau der Konstrukte a/CFP und c/CFP sowie des Plasmids pRSGFP mit den entsprechenden Restriktionsenzymen wurden diese ligiert. Die nach Kolonien-PCR charakterisierten Konstrukte wurden zur ballistischen Transformation von Zwiebelepidermiszellen verwendet.

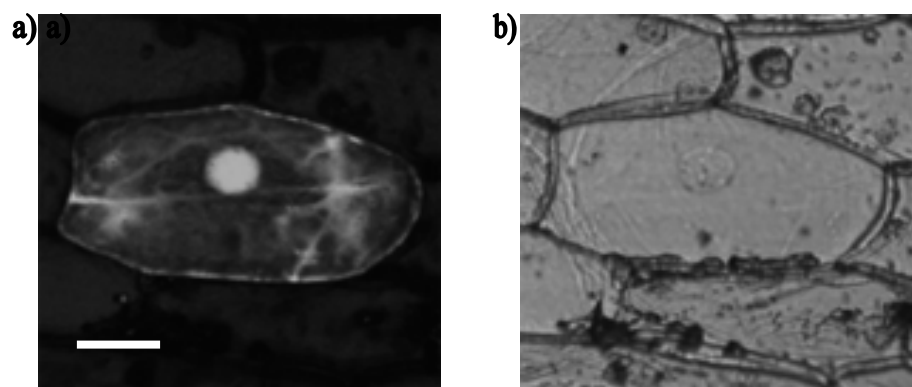


Abb. 3.9.16: Expression von McVHA-a in Zwiebschuppenzellen. Das Fusionsprotein McVHA-a-CFP wurde in den Vektor pRSGFP (Davis und Vierstra, 1998) c-terminal vor den pflanzlichen CaMV35S-Promotor kloniert. Das Konstrukt wurde mittels ballistischer Transformation in die Epidermis von Zwiebschuppenzellen eingebracht und nach 24h Inkubation bei 40-facher Vergrößerung detektiert. Die Abbildung zeigt in **a)** eine transformierte Zelle unter Anregung im Laserlicht der Wellenlänge 433 nm aufgenommen im konfokalen Modus und in **b)** dieselbe Zelle im Transmissionsmodus. Der Größenmaßstab entspricht 40 μm .

Abb. 3.9.16 zeigt die Fluoreszenzaufnahme einer mit dem Konstrukt McVHA-a transformierten Zwiebelepidermiszelle nach 24h Inkubation und die Transmissionsaufnahme derselben Zelle. Neben einer starken Anhäufung des CFP-Fusionsproteins um den Zellkern konnte exprimiertes Fusionsprotein auch in netzartigen Strukturen der Zelle detektiert werden. Insgesamt jedoch erwies sich die Menge des exprimierten Fusionsproteins nach 24 h als zu gering.

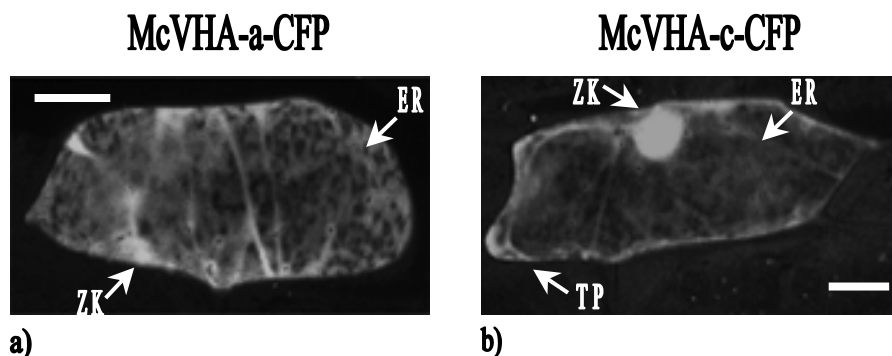


Abb. 3.9.17: Expression von McVHA-a und c in Zwiebelschuppenepidermis. Die Konstrukte McVHA-a-CFP und McVHA-c-CFP wurden mittels ballistischer Transformation transient in der Zwiebelschuppenepidermis exprimiert. Die Aufnahmen wurden 48 h nach der Transformation unter 40-facher Vergrößerung angefertigt. Der Maßstab entspricht einer Größe von 40 μm . Abk. ER: Endoplasmatisches Reticulum, ZK: Zellkern, TP: Tonoplast.

Abb. 3.9.17 zeigt einen Vergleich der Verteilung der Fusionsproteine McVHA-a-CFP und McVHA-c-CFP in der Zwiebelepidermiszelle nach 48-stündiger Inkubation. Neben der Lokalisation um den Zellkern ließ sich das Vorhandensein des Fusionsproteins McVHA-a-CFP im deutlich zu erkennenden Netzwerk des Endoplasmatischen Reticulums zeigen (**Abb. 3.9.17 a**). Das Fusionsprotein McVHA-c-CFP war hingegen um den Zellkern und in Membranen im Randbereich der Zelle nachweisbar (**Abb. 3.9.17 b**). Bei der in diesem Randbereich detektieren zweiten Membran handelt es sich wahrscheinlich um den Tonoplasten. Eine ausgeprägte Netzstruktur, die auf eine ER-Markierung hinweist, war nicht zu erkennen. Die Signalverteilung bei der Plasmolyse einer mit dem Konstrukt McVHA-c-CFP transformierten Zelle (**Abb. 3.9.18**) zeigte, dass sich die Lokalisierung des

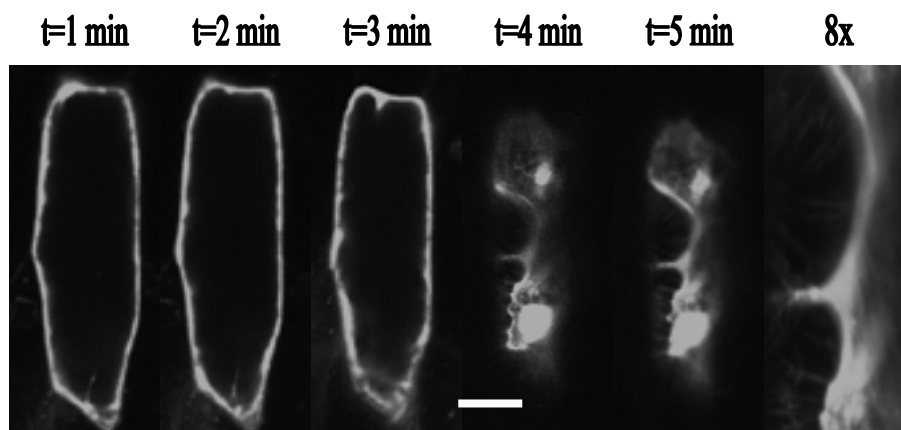


Abb. 3.9.18: Plasmolyse von Zwiebelschuppenzellen. Mit dem Konstrukt McVHA-c-CFP transformierte Zwiebelschuppen-Epidermiszellen wurden mit 1 M NaCl plasmolysiert, und im Abstand von 1 min Bilder im konfokalen Modus angefertigt. Der Maßstab entspricht 40 μm .

Fusionsproteins auf den Bereich der Membranen beschränkte und nicht im gesamten Protoplasten vorhanden war, da ansonsten der ganze Bereich des zusammengeschrumpften Cytoplasmas markiert gewesen wäre.

3.9.13 Immunologische Lokalisierung von V-ATPase-Untereinheiten in Maiswurzelzellen mit Elektronenmikroskopie

Um die Lokalisation von VHA-A, -E und -a mit einer weiteren Methode zu untersuchen, wurde die Immunlokalisation mit den Antiseren gegen die betreffenden Proteine an Maiswurzelzellen ebenfalls mit Hilfe der Elektronenmikroskopie durchgeführt. **Abb. 3.9.19** zeigt, dass sowohl VHA-A als auch VHA-E am Endoplasmatischen Reticulum (**Abb. 3.9.19 a) und c)** sowie an Dictyosomen des Golgi-Apparates (**Abb. 3.9.19 b) und d)**) nachgewiesen werden konnten. Allerdings konnte bei dieser Methode der Fixierung (2.14.3) die Struktur des Tonoplasten nicht erhalten werden, so dass eventuell an der Vakuolenmembran lokalisierte Untereinheiten nicht detektiert werden konnten. Im Gegensatz zum immunchemischen Nachweis mit CLSM konnte sowohl bei Inkubation der Präparate mit Anti-VHA-A-Serum als auch mit Anti-VHA-E-Serum eine deutliche Markierung der Plasmamembran ausgemacht werden (**Abb. 3.9.19 a) und c)**). Das Serum gegen McVHA-a_{nterm} markierte schwächer, aber signifikant Bereiche des Endoplasmatischen Reticulums (**Abb. 3.9.19 e)**) und Dictyosomen des Golgi-Apparates (**Abb. 3.9.19 f)**). Mit dem Prä-Immunsereum wurden entsprechende Bereiche nicht markiert (**Abb. 3.9.19. g) und h)**). Eine Dekoration der Plasmamembran wurde nicht beobachtet.

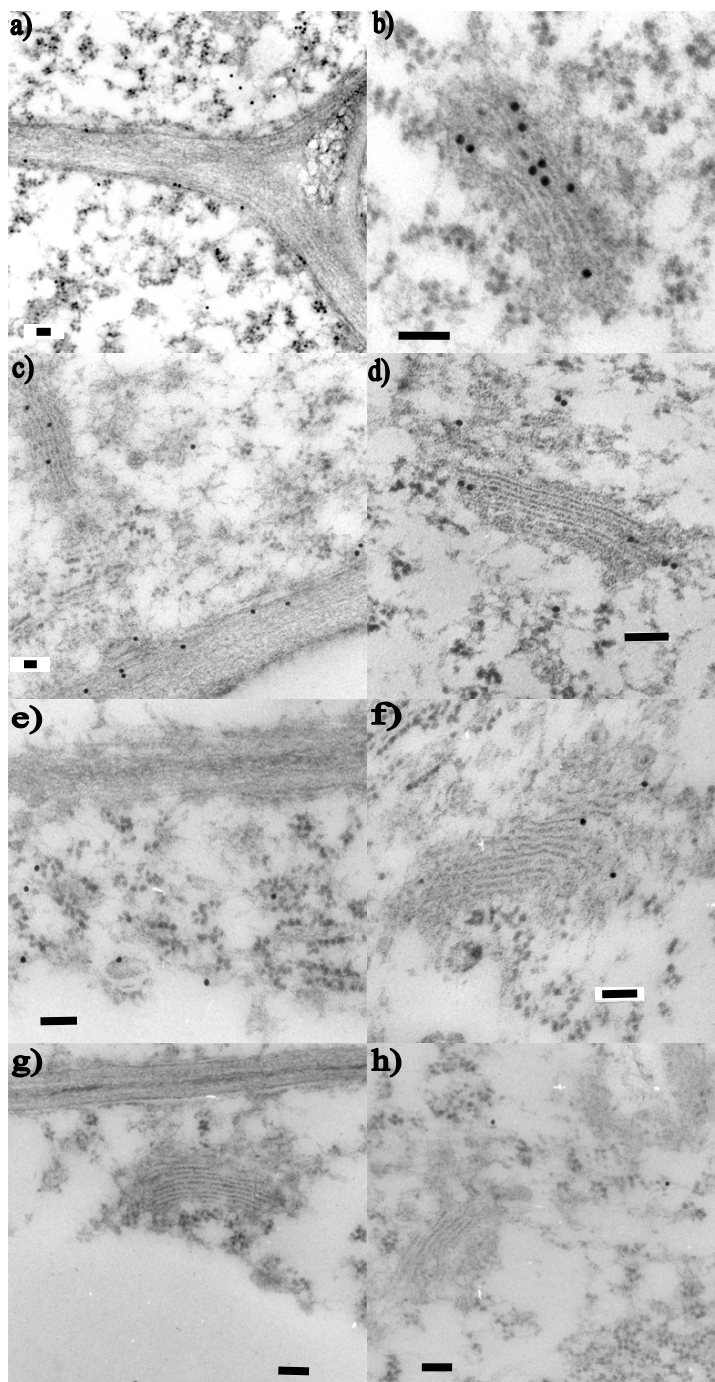


Abb. 3.9.19: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Maiswurzelspitzenzellen. Fixierte Maiswurzelzellen aus dem Bereich 1 mm über der Spitze wurden mit Antisera gegen McVHA-A und -E und VHA-a_{nterm} immundekoriert. Detektiert wurden spezifisch gebundene Antikörper durch Anti-Kaninchen-Serum (VHA-A und -E) und mit Anti-Meerschweinchen-Antiserum (McVHA-a_{nterm}) beide mit 15 nm Goldpartikeln gekoppelt. Der Balken entspricht einer Größe von 100 nm. **a)** Markierung des Plasmalemmas und des endoplasmatischen Reticulums mit Serum gegen VHA-A **b)** Markierung eines Dictyosoms des Golgi-Apparates mit Anti-VHA-A. **c)** und **d)** Markierung der Plasmamembran und eines Dictyosoms bzw. Markierung eines einzelnen Dictyosoms mit Serum gegen VHA-E. **e)** Immundekoration des endoplasmatischen Reticulums mit Anti-McVHA-a_{nterm} **f)** Immundekoration eines Dictyosoms der Golgi-Apparates. **g)** und **h)** zeigen repräsentative Abbildungen der Kompartimente dekoriert mit dem 0-Serum.

3.9.14 Zusammenfassung der Ergebnisse der Immunlokalisation

Tabelle 6 fasst die im Rahmen der Untersuchungen zur Immunlokalisierung erhaltenen Ergebnisse noch einmal zusammen.

	VHA-A		VHA-E		VHA-Di		VHA-a	
	CM	EM	CM	EM	CM	EM	CM	EM
ER	+	+	+	+	nd	nd	+	+
GA	+	+	+	+	nd	nd	-	+
PVC	-	nd	-	nd	nd	nd	-	-
TP	+	nd	+	nd	-	nd	-	-
PM	+	+	-	+	-	nd	-	-

Tabelle 6 Übersicht über die detektierte Verteilung von Untereinheiten der V-ATPase in Pflanzenzellen. + zeigt eine gefundene Lokalisierung, - keine Lokalisation, nd keine Markierung. Abk. ER: Endoplasmatisches reticulum, GA: Golgi Apparat, PVC: Prävacuoläres Kompartiment, TP: Tonoplastenmembran, PM: Plasmamembran. CM: Konfokale Laserscannende Mikroskopie, EM: Elektronenmikroskopie.

Mit den Methoden der Immuncytochemie und der Elektronenmikroskopie konnte unabhängig von einander eine Lokalisation von VHA-A und -E an den Membranen des endoplasmatischen Reticulums und des Golgi Apparates gezeigt werden. Ebenso wurde durch Immuncytochemie, Elektronenmikroskopie und durch GFP-Markierung eine Lokalisation von McVHA-a an den Membranen des endoplasmatischen Reticulums nachgewiesen.

4 Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur Analyse der Primärsequenzen der pflanzlichen V-ATPase-Untereinheiten, der Expressionsanalyse nach Applikation von kurzzeitigem Stress, sowie die Befunde der Immunlokalisierung sollen hier im Zusammenhang mit der Regulation und Verteilung der V-ATPase innerhalb der Pflanzlichen Zelle diskutiert werden.

4.1 Die Klonierung aller cDNAs für Untereinheiten der V-ATPase von M. crystallinum

In der hier vorgelegten Arbeit wurde nahezu zeitgleich die Klonierung und Expressionsanalyse der cDNA-Sequenzen aller V-ATPase-Untereinheiten von *M. crystallinum* durchgeführt. Damit eröffnete sich erstmals die Möglichkeit, regulatorische Mechanismen zur Anpassung der V-ATPase-Aktivität auf Nukleinsäure- und Proteinebene zu vergleichen. Im Folgenden sollen die in diesem Zusammenhang an *M. crystallinum* gewonnenen Erkenntnisse mit den bisher bereits von Pflanzen und anderen Organismen bekannten Ergebnissen verglichen werden.

Zu allen bisher charakterisierten Untereinheiten der V-ATPase aus verschiedenen Organismen konnten in der Datenbank dbEST (NCBI, USA) homologe Transkriptteilfragmente aus *M. crystallinum* identifiziert werden. Einzige Ausnahme bildete die Sequenz einer bisher bei Säugetieren charakterisierten, mit dem V_0 -Sektor assoziierten membranständigen 45 kDa Untereinheit (Supek et al., 1994). Ein zu dieser Sequenz homologes Teilfragment konnte in dbEST bei *M. crystallinum* nicht gefunden werden. Mit Ausnahme von McVHA-D gelang es mit Hilfe der identifizierten Informationen aus dbEST in der vorliegenden Arbeit, bei *M. crystallinum* für alle Untereinheiten der V-ATPase die entsprechende Volllänge zu klonieren. Die Gegenüberstellung der aus *M. crystallinum* klonierten Sequenzen der Untereinheiten der V-ATPase mit denen von *A. thaliana* und *S. cerevisiae* erlaubte zum ersten Mal den Vergleich von Sequenzen und Isoformen der V-ATPase-Untereinheiten eines Glykophyten (*A. thaliana*) mit denen eines Halophyten (*M. crystallinum*). Weiterhin ergibt die Sequenzanalyse im Vergleich zu der in Bezug auf die Funktion einzelner Domänen und Aminosäuren der V-ATPase sehr gut charakterisierten Hefe neue Einsichten darüber, ob und wie weit Funktions- und Regulationsmechanismen der V-ATPase über einen relativ großen evolutionären Abstand konserviert wurden. Zusammen mit der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalyse der Gesamtheit der Transkripte aller V-ATPase-Untereinheiten,

ermöglichen diese Ergebnisse einen umfassenden Blick auf die Regulationsmöglichkeiten der pflanzlichen V-ATPase in Reaktion auf abiotischen Stress.

4.2 Die Sequenzvariabilität der Untereinheiten des V_1 -Sektors

4.2.1 Der Kopf der V-ATPase

Die Kopfstruktur der V-ATPase wird kooperativ von je drei Kopien der Untereinheit A und B gebildet die zusammen das katalytische und regulatorische Hexamer des V_0 -Sektors der V-ATPase darstellen (Forgac, 1998). Der Vergleich der codierenden Sequenzen von *M. crystallinum*, *A. thaliana* und *S. cerevisiae*, erbrachte für die Untereinheiten A und B den höchsten Konservierungsgrad aller Untereinheiten des V_1 -Sektors (3.4.1). Untereinheit A besitzt im Vergleich zu Untereinheit B zwar über alle Artengrenzen hinweg die geringere Sequenzkonservierung, jedoch sind alle am Beispiel der Hefe als wichtig für die katalytische Bindung und den Mechanismus der Hydrolyse des ATP nachgewiesenen Aminosäuren und Sequenzabschnitte hochkonserviert. Dies erlaubt den Schluss, dass es hinsichtlich des Mechanismus der an der Kopfstruktur der V-ATPase ablaufenden Katalyse über die Organismengrenzen hinweg keine Varianz gibt.

Die redoxgesteuerte Modulation der ATP-Hydrolyse durch die V-ATPase geschieht durch die Bildung einer reversiblen, inhibitorischen Disulfidbrücke zwischen einem Cystein des ATP-bindenden P-Loops und dem konservierten Cystein des C-Terminus. Diese ausgebildete Cysteinbrücke unterbindet die für die ATP-Hydrolyse essentielle Drehbewegung des C-Terminus der Untereinheit A (Abrahams et al., 1994). Sie blockiert jedoch nicht die Bindung von ATP am P-Loop (Feng und Forgac, 1992). Die Voraussetzung für diesen grundlegenden Mechanismus der Regulation der katalytischen Umsetzung von ATP an Untereinheit A ist somit das Vorhandensein zweier Cysteine an entsprechender Stelle der Untereinheit A. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, finden sich die Aminosäurereste in allen verglichenen Isoformen der Untereinheit A von *A. thaliana* und der Sequenz von *M. crystallinum*. Bei Säugetieren konnte eine Isoform der Untereinheit A ohne das C-terminale Cystein identifiziert werden. Diese Strukturbesonderheit entsteht durch ein differenzielles Spleißen des Transkripts für Untereinheit A (Hernando et al., 1995). Ob bei Pflanzen eine differenzielle Modifikation der für V-ATPase codierenden mRNAs zur Erhöhung der Isoformenvariabilität der V-ATPase-

Untereinheiten beiträgt ist nicht geklärt. Eine Suche nach unterschiedlichen Transkripten der Untereinheit A in *A. thaliana*, die im Gegensatz zu allen anderen bekannten pflanzlichen VHA-A nur von einem Gen codiert wird, führte zwar zur Identifizierung von vier unterschiedlich polyadenylierten Transkripten, doch codierten diese alle für die gleiche Aminosäuresequenz (Magnotta und Gogarten, 2002).

Die oben geschilderte redoxgesteuerte Umlagerung der Disulfidbrücke der Untereinheit A hat neben einer Modulation der ATP-Hydrolyse-Aktivität der pflanzlichen V-ATPase auch Auswirkungen auf die Primärstruktur von V-ATPase-Untereinheiten von *H. vulgare* (Tavakoli et al., 1999). Die Bildung bzw. das Auflösen einer oder mehrerer regulatorischer Disulfidbrücken bewirkte neben der oben angesprochenen Änderung der Primärstruktur der Untereinheit A auch eine Modifikation der Untereinheit E. Die Auftrennung der mit H_2O_2 behandelten, aufgereinigten V-ATPase im nativen PAGE-Gel zeigte, dass sowohl Untereinheit E als auch Untereinheit A in zwei unterschiedlichen Konformationen vorkamen, die im nicht reduzierenden PAGE unterschiedliche Migrationsgeschwindigkeiten bedingten. Gleichzeitig zeigte die mit H_2O_2 inkubierte Membranpräparation eine Reduzierung der Bafilomycin-hemmbareren ATPase-Aktivität. Bezüglich des Oxidationsmittels der Cysteinbrücken der Untereinheiten A und E herrscht Unklarheit. Ein Ansatz zur Erklärung der inhibierenden Wirkung von Nitrat auf die Aktivität der V-ATPase (Lai et al., 1988) diskutierte die Induktion der Bildung von Cysteinbrücken durch die oxidierende Wirkung von Nitrat auf Cystein (Dschida und Bowman, 1995). Eine andere Erklärung zur inhibierenden Wirkung von Nitrat auf die V-ATPase berücksichtigt die chaotrope Wirkung von Nitrat, durch die die Dissoziation des V_1 -Sektors vom V_0 -Sektor der V-ATPase gefördert werden könnte (Kane et al., 1989). Fraglich ist ob die für eine gezeigte halbmaximale Hemmung der V-ATPase nötige Konzentration von 40 mM Nitrat (Kane et al., 1989) für einen chaotropen Effekt ausreicht.

Verglichen mit der Untereinheit A zeichnet sich die Untereinheit B der V-ATPase durch einen höheren Konservierungsgrad über den Gesamtbereich der Aminosäuresequenz aller verglichenen Sequenzen aus. Bei Betrachtung der vorhandenen Unterschiede der Primärsequenzen von Pflanzen und Hefe fällt auf, dass die funktionellen Abschnitte der regulatorischen Nukleotid-Bindung nicht konserviert sind. Die Aminosäureaustausche in der nichtkatalytischen Nukleotid-Bindedomäne der Untereinheit B zwischen Hefe und Pflanze bedingen eine Änderung der hydrophoben Umgebung und beeinflussen somit das Bindeverhalten des regulatorisch gebundenen Nukleotids. Ob die regulatorische Untereinheit B zur Bindung von ATP oder ADP befähigt ist und wie diese Bindung die Kinetik der

Katalyse beeinflusst, ist bisher nicht endgültig geklärt. Für die V-ATPase des Rindes konnte eine Beteiligung von ADP an der allosterischen Regulation nachgewiesen werden (Webster et al., 1995). Dietz et al. (1998) beobachteten eine Beeinflussung der Aktivität der pflanzlichen V-ATPase durch das intrazelluläre ATP/ADP-Verhältnis. Die trotz der hohen Sequenzkonservierung vorhandene Variabilität der Untereinheit B zeigt sich auch daran, dass *A. thaliana* und auch *M. crystallinum* jeweils 3 Isogene dieser Untereinheit besitzen.

Die Regulation der Nukleotid-Bindung durch Untereinheit B und damit die Regulation der katalytischen Aktivität der gesamten V-ATPase könnte durch Phosphorylierung modifiziert werden. Ein Einfluss von Phosphorylierung auf die Aktivität der pflanzlichen V-ATPase konnte in früheren Experimenten gezeigt werden (Martiny-Baron et al., 1992; Zocchi, 1985; Garbarino et al., 1991). Martiny-Baron et al. (1992) konnten die Phosphorylierung eines 58 kDa großen Polypeptides am Tonoplasten zeigen. Die Sequenz einer Isoform der drei für die 58 kDa große AtVHA-B codierenden Isogene unterscheidet sich von allen anderen verglichenen Aminosäuresequenzen durch das Fehlen eines für eine Phosphorylierungsstelle codierenden Sequenzabschnittes. Die Regulation der pflanzlichen V-ATPase-Aktivität durch akzessorische 14-3-3-Proteine, die eine Phosphorylierung der Untereinheit B erkennen, wäre ein plausibler Regulationsmechanismus. Ein solcher Mechanismus spielt beispielsweise bei der Regulation der Aktivität der pflanzlichen Nitratreduktase eine große Rolle (Chung et al., 1999). Die Bindung der regulatorischen 14-3-3-Proteine am Zielmolekül wird durch eine Deprotonierung der sauren Aminosäuren der 14-3-3 Proteine geregelt. Dies erfolgt sowohl durch eine Steigerung der Konzentration von Kationen als auch durch eine Senkung des pH-Wertes (Athwal et al., 1998a und b). Eine Modulation der pflanzlichen V-ATPase-Aktivität durch diese Bedingungen konnte in mehreren Untersuchungen aufgezeigt werden (Dietz et al., 2001).

Untereinheit B wird in Pflanzen selber durch Prozessierung modifiziert. Zhigang et al. (1996) konnten zeigen, dass nach Induktion des CAM (**crassulaceen acid metabolism**) durch Salzzugabe ins Nährmedium, an der V-ATPase von *M. crystallinum* eine zusätzliche Proteinmasse von 32 kDa auftrat. Dieses Polypeptid (McVHA-D_i) wurde als ein Teilfragment von McVHA-B identifiziert. Diese, bisher nur bei CAM-Pflanzen detektierte, spezifische Spaltung von McVHA-B konnte *in vitro* durch aufgereinigte Protease-Fractionen aus Pflanzen und durch reaktive Sauerstoffspezies gezeigt werden (Krisch et al., 2000). Die Entstehung dieses Teilfragmentes könnte mit einer regulativen Funktion dieses Fragmentes auf die Aktivität der V-ATPase in Verbindung stehen oder D_i könnte ein Abbauprodukt von VHA-B, bedingt durch einen höheren Protein-Umsatz, sein.

4.2.2 Weitere Untereinheiten des V₁-Sektors

Die Klonierung der Sequenz McVHA-G sowie deren Vergleich mit den Sequenzen von *A. thaliana* und *S. cerevisiae* konnten keine Hinweise auf eine regulatorische Funktion dieser Untereinheit geben. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, besitzen die Aminosäuresequenzen dieser Untereinheit einen geringen Konservierungsgrad, sie scheint bedingt durch ihre Ähnlichkeit mit dem cytoplasmatischen Teil der Untereinheit b der F-ATPase (Supekova et al., 1996) vor allem strukturelle Eigenschaften im Bereich des Stators zu besitzen.

Die Sequenz von McVHA-H kennzeichnet im Vergleich zu den Sequenzen von *A. thaliana* und *S. cerevisiae* die geringste Sequenzkonservierung aller Untereinheiten der V-ATPase. Trotzdem scheint die Funktion dieser Untereinheit über eine strukturelle Funktion hinauszugehen. Die Strukturen der Untereinheit H sind über die Arten hinweg konserviert. Aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften wirkt diese Untereinheit als ein flexibles Bindeglied zwischen dem V₀- und dem V₁-Sektor. Wie bei Untersuchungen der Interaktionspartner dieser Untereinheit in Hefe nachgewiesen wurde, interagiert Untereinheit H mit den Untereinheiten E und F des V₁-Sektors (Xu et al., 1999) und mit dem N-Terminus von Untereinheit a des V₀-Sektors (Landolt-Marticorena et al., 2000). Darüber hinaus scheint Untereinheit H strukturelle Konformationsänderungen durch Redoxmodulation vom V₁- auf den V₀-Sektor zu übertragen. So konnte an der V-ATPase vom Rind gezeigt werden, dass die Modifikation des an der Bildung der regulatorischen Disulfidbrücke der Untereinheit A beteiligten Cysteinrestes des P-Loops zu Cystin eine Abdissoziation der Untereinheit H vom Gesamt-ATPase-Komplex bewirkte (Xu et al., 1999). Eine direkte Interaktion mit der bei Pflanzen ebenfalls redoxregulierten Untereinheit E (Tavakoli et al., 2001) wurde für die Untereinheit H von Hefe gezeigt (Xu et al., 1999). In Hefe besitzt Untereinheit H weitere Funktionen (Parra et al., 2000). Die Autoren wiesen eine Beteiligung von Untereinheit H im Zusammenspiel mit ADP an der Inhibition der ATPase-Aktivität von cytosolischen V₁-Komplexen nach. Dies lässt erkennen, dass die Funktion der Untereinheit H und deren Beteiligung an der Regulation der V-ATPase in einem sehr komplexen Zusammenhang gesehen werden muss.

Eine Klonierung der Volllänge der für McVHA-D codierenden Sequenz war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Somit sind die Isogen-Sequenzen der Untereinheit D aus *A. thaliana* (Kluge et al., 1999) die einzigen bekannten, pflanzlichen Sequenzen für diese Untereinheit. Untereinheit D ist zusammen mit Untereinheit E ein möglicher Kandidat für

eine zur Untereinheit γ der F-ATPase homologe Funktion. Die Untereinheit γ der F-ATPase ist das rotierende Bindeglied zwischen dem Membran- und dem Kopfteil der ATPase. Die beiden möglichen Kandidaten für die Funktion des Rotors in der V-ATPase liegen in *A. thaliana* mit einer unterschiedlichen Isoformenvarianz vor. AtVHA-E wird von drei Isoformen kodiert, Untereinheit D hingegen nur von einem. Für die Funktion der Übertragung der durch die ATP-Hydrolyse verursachten Konformationsänderung des hochkonservierten Kopfes auf den Proteolipidring des V_0 -Sektors, der aus Untereinheiten der ebenfalls hochkonservierten Untereinheit c besteht, sollte das diese Funktion ausführende Protein eigentlich ebenfalls eine sehr hohe Homologie über alle Arten hinweg besitzen. Dies ist aber bei keiner dieser beiden Untereinheiten der Fall (**Tabelle 2**). Die vorhergesagte Sekundärstruktur der Untereinheit D war im Vergleich zur Untereinheit E über die Sequenzen der verglichenen Arten hinweg stärker konserviert (Kluge et al., 1999). Die Konformation der Untereinheit E ist in Pflanzen darüber hinaus vom Redoxzustand der Umgebung abhängig (Tavakoli et al., 2001). Somit spricht aus der Betrachtung der bekannten pflanzlichen Sequenzen für diese beiden Untereinheiten vieles für eine Funktion der Untereinheit D als Rotor der V-ATPase.

4.2 Der V_0 -Sektor der V-ATPase in Pflanzen

Die Klonierung von McVHA-a, -d und -e im V_0 -Sektor und der Vergleich mit den entsprechenden Sequenzen von *A. thaliana* ergab erstmals genauere Informationen über die an der Zusammensetzung des membranständigen Sektors der pflanzlichen V-ATPase beteiligten Untereinheiten.

4.2.1 Die 100 kDa-Untereinheit in der pflanzlichen V-ATPase

Das Vorhandensein eines Polypeptides von 100 kDa an der aktiven V-ATPase der Pflanzen war bisher umstritten (Ratajczak, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die cDNA für die Untereinheit a aus einer Pflanze kloniert und charakterisiert. Dabei konnte im Vergleich mit den anderen bisher bekannten Sequenzen die hohe Konservierung der für die Protonentranslokation essentiellen Aminosäuren gezeigt werden (3.4.5). Weitere Untersuchungen untermauern die Annahme, dass Untereinheit a bei allen tierischen und pflanzlichen Organismen Bestandteil der aktiven ATPase ist. Zhang et al. (1994) konnten an aufgereinigten Untereinheiten der V-ATPase von Rind zeigen, dass der Ort der Bindung des

auch die pflanzliche V-ATPase inhibierenden Makrolids Bafilomycin die Untereinheit a ist. Eine hochaffine Bindung an Untereinheit c konnte nicht festgestellt werden. Die Bindung von Bafilomycin an Untereinheit a konnte auch für die V-ATPase anderer Organismen verifiziert werden (Dröse und Altendorf, 1996).

Li und Sze (1999) detektierten in Aufreinigungen der am Tonoplasten lokalisierten V-ATPase von Hafer zwei unbekannte Polypeptide mit den apparenten Massen 63 und 54 kDa, die mit dem V-ATPase-Komplex assoziiert waren. Dies könnten Produkte des proteolytischen Abbaus der 100 kDa-Untereinheit sein, da diese im Vergleich mit anderen Untereinheiten der V-ATPase eine sehr hohe Sensitivität gegenüber Proteasen aufwies (Adachi et al., 1990). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass bei der Aufarbeitung von Endomembranpartikeln aus *M. crystallinum* McVHA-a gegenüber einer Degradation hochgradig anfällig ist. Die mutmaßliche Volllänge von McVHA-a, die eine aus der Aminosäuresequenz abgeleitete molekulare Masse von 95 kDa besitzt, konnte im Western-Blot mit dem Antiserum McVHA-a_{nterm}, das gegen den cytoplasmatischen N-Terminus gerichtet war, an Membranpräparationen nur durch eine Modifikation (Erhöhung der Konzentration der Na⁺-Ionen) des Protokolls der Membranpräparierung nachgewiesen werden (3.7). Ein mutmaßliches Degradationsprodukt von 60 kDa Größe konnte in Cytoplasma- und Membranfraktionen gezeigt werden. Da Li und Sze (1999) in ihrer Untersuchung ein Antiserum gegen den N-Terminus der Untereinheit a von Hefe (Vph1) verwendeten, ist es nicht ausgeschlossen, dass in den Aufreinigungen des Tonoplasten weiterhin ein nicht durch den verwendeten Antikörper erkennbares Teilfragment des membranständigen C-Terminus vorhanden war, dessen Anwesenheit im V-ATPase-Komplex ausreichend ist, um den Protonentransport über den Tonoplasten zu katalysieren.

4.2.2 Die Zusammensetzung des pflanzlichen Proteolipidringes

Da nach gängiger Hypothese die Präsenz der Untereinheit a zusammen mit dem Proteolipid für die Protonentranslokation verantwortlich ist (Kawasaki-Nishi et al., 2001) soll hier die mögliche Zusammensetzung des Proteolipids unter Berücksichtigung der Isogene von *A. thaliana* diskutiert werden.

McVHA-c war die erste Untereinheit der V-ATPase von *M. crystallinum*, die kloniert werden konnte (Tsiantis et al., 1995). Eine im Zusammenhang mit der Variabilität der Untereinheit c diskutierte Frage war die Zusammensetzung des protonenleitenden Proteolipidrings aus den

Isoformen (Lüttge und Ratajczak, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurden in der EST-Datenbank keine weiteren Isoformen der Untereinheit c zu identifiziert. Somit liegen auch keine Kenntnisse zur Sequenzvariabilität von McVHA-c vor. Alle identifizierten EST-Fragmente die Homologien zur Sequenz der Untereinheit c zeigten, waren vollständig identisch. Die Sequenzierung des Genoms von *A. thaliana* erlaubt nun zum ersten Mal die Frage nach der Zusammensetzung des protonenleitenden Proteolipidringes der pflanzlichen V-ATPase unter Einbeziehung aller Isogene zu untersuchen.

Entgegen früheren Annahmen, die von der Präsenz von 6 Untereinheiten c (16 kDa) ausgingen, konnten am V_0 -Sektor der V-ATPase von Hefe zwei weitere hydrophobe Polypeptide (c' (17 kDa) und c'' (23 kDa)) nachgewiesen werden, die beide ebenfalls essentiell für die Funktion der Protonenkonduktion waren (Hirata et al., 1997). In den Proteolipiden c' und c'' fand sich wie in Untereinheit c eine zur Protonentranslokation essentielle saure Aminosäure (Glu). Weitere Untersuchungen bei Hefe konnten zeigen, dass der Proteolipidring immer aus vier Untereinheiten c und jeweils einer Untereinheit c' und c'' besteht (Powell et al., 2000). Im Genom von *A. thaliana* konnten neben vier Isogenen für Untereinheit c zwei Isogene mit Homologien zur Untereinheit c' von Hefe detektiert werden (**Tabelle 2**). Entgegen früherer Vermutungen (Stevens und Forgac, 2000a; Dietz et al., 2001) konnte jedoch kein Homologes zur Untereinheit c'' detektiert werden. Keine dieser Isoformen weist im Bereich der für die Protonentranslokation wichtigen positiv geladenen Aminosäuren Veränderungen auf. Die Unterschiede in der Aminosäureabfolge beschränken sich auf den Bereich der ersten drei Aminosäuren des N-Terminus (**Abb. A.1 und A.2, Anhang**).

Dieser Befund hat Auswirkungen auf die Theorie zur Regulation der Stöchiometrie der V-ATPase. Ein zuerst bei Hefe charakterisiertes Phänomen war der so genannte „Protonen-slip“: Die Kopplungsrate, d.h. die Zahl der gepumpten Protonen pro hydrolysiertem ATP, war nicht konstant (Nelson, 1992a). Dies konnte auch an verschiedenen Präparationen der pflanzlichen V-ATPase gezeigt werden (Ratajczak, 2000). Die daraus abgeleitete Hypothese geht davon aus, dass eine Erniedrigung der Kopplungsrate eine Erhöhung der Effizienz des Protonentransports bedingt. In Pflanzen wurde dieser Befund im Zusammenhang mit der Erhöhung des Pumpbedarfs am Tonoplasten der Pflanze in Reaktion auf kurzfristig veränderte Ionen- und Protonenkonzentrationen innerhalb des Cytosols diskutiert. Über die Ursachen dieses Effekts bestand Unklarheit. Legt man die Theorie des Protonentransports durch den F_0 -Sektor der F-ATPase zugrunde (Junge et al., 1998), dessen Funktionsprinzip aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten auch für den V_0 -Sektor der V-ATPase gilt, so wäre eine Erniedrigung der Kopplungsrate durch eine Erhöhung der Anzahl positiv geladener

Aminosäuren in VHA-c zu erreichen. Alternativ könnte dies durch eine Erhöhung der Anzahl von Untereinheit c im Proteolipid erreicht werden. Tatsächlich konnte an V-ATPase-Präparationen von *M. crystallinum* nach Induktion von CAM eine Vergrößerung des Durchmessers des V_0 -Sektors gezeigt werden. Dies ging einher mit einer Veränderung der Kopplungsrate (Rockel et al., 1994; Ratajczak, 2000). Die strukturelle Modifikation des V_0 -Sektors konnte allerdings bisher nur bei CAM-Pflanzen gezeigt werden. Die V-ATPase von Gerste zeigte hingegen nach Salzstress eine Erniedrigung der Kopplungsrate aber keine detektierbare Veränderung des Durchmessers des V_0 -Sektors (Mariaux et al., 1997).

Eine weitere Möglichkeit zur Veränderung der Anzahl der geladenen Aminosäuren, die vor allem bei Pflanzen diskutiert wurde, ist die Expression anderer Isoformen der Untereinheit c mit einer eventuell erhöhten Anzahl geladener Aminosäuren (Ratajczak, 2000). Der hier gezeigte Vergleich (**Abb. A.1 und A.1, Anhang**) aller bekannten Sequenzen der Untereinheiten c und c' von *A. thaliana* ließ allerdings erkennen, dass es keine Isoform mit einer veränderten Anzahl geladener Aminosäuren gibt. Weiterhin ergab die Analyse aller Isoformen von AtVHA-c eine Ähnlichkeit von über 98 % untereinander, die sich im gleichen Bereich bewegte wie die Homologie der Isoformen der Untereinheit c'. Somit scheint eine Veränderung der Kopplungsrate als Funktion der qualitativen Veränderung der Zusammensetzung des Proteolipidrings ausgeschlossen zu sein. Neuere Untersuchungen belegen, dass die Zusammensetzung der Phospholipide des Tonoplasten in *Citrus limon* eine Veränderung der Kopplungsrate bewirkt (Muller et al., 1999). Dieser Effekt stand aber im Zusammenhang mit dem annualen Rhythmus und war nicht kurzfristiger Natur.

An Hefe konnte gezeigt werden, dass die Kopplungsrate vom pH-Wert und dem positiven Membranpotenzial der Vakuole aus thermodynamischen Gründen beeinflusst wird (Perzov et al., 2001). Dies könnte auch die bei verschiedenen CAM-Pflanzen beobachtete Erhöhung der Kopplungsrate im Verlauf der Induktion des CAM und der damit verbundenen Ansäuerung der Vakuole erklären (Ratajczak, 2000). Eine Regulation der V-ATPase durch Veränderung der Pump-Stöchiometrie ist daher im Bereich der extremen Azidifizierung anzusiedeln, wie dies bei der Säure-speichernden Vakuole von *Citrus limon* gezeigt werden konnte (Müller et al., 1999), nicht als ein allgemeines Regulationsprinzip.

4.2.3 Andere Untereinheiten des pflanzlichen V_0 -Sektors

Die Charakterisierung der Aminosäuresequenz von McVHA-d brachte bisher keine Erkenntnisse über die Funktion dieser Untereinheit. Ihre Funktion liegt wahrscheinlich im Bereich der Interaktion mit Untereinheiten des V_0 und V_1 -Sektors.

Die Klonierung von McVHA-e zeigte, dass neben den drei bekannten Untereinheiten VHA-a, -c und -d weitere Variabilität im V_0 -Sektor der V-ATPase der Pflanzen zu existieren scheint. Die Charakterisierung von McVHA-e auf funktionaler Ebene steht noch aus. Vor allem gilt zu klären, ob Untereinheit e in Pflanzen eventuell eine Funktionen im Endoplasmatischen Reticulum beim Zusammenbau der V-ATPase erfüllt, wie dies für VMA21p bei Hefe gezeigt werden konnte (Hill und Stevens, 1994). Denkbar wäre auch, dass VHA-e als Aktivator der V-ATPase-Aktivität wirkt oder an der Zielsteuerung der V-ATPase beteiligt ist. Das Vorhandensein des Glykosilierungsmotivs bei McVHA-e deutet aber zumindest auf eine Passage über den Golgi-Apparat hin, da dort die Glykosilierung erfolgt (Gomord et al., 1999).

4.2.4 Die Charakteristika der posttranslationalen Regulation der V-ATPase sind hochkonserviert

Die Klonierung und Analyse der Untereinheiten des V_1 -Sektors zeigten, dass die wichtigen Strukturmerkmale, die der die biochemische Regulation und dem Mechanismus der ATP-Hydrolyse zugrunde liegen, im Vergleich zwischen Organismen selbst mit hohem phylogenetischen Abstand, wie es für Pflanzen und Hefe zutrifft, im Laufe der Evolution hochgradig erhalten geblieben sind. Welche Regulationsmechanismen in der Pflanze *in vivo* aber vorherrschend zum Tragen kommen ist ohne eine weitergehende Untereinheitenspezifische Aufklärung der regulativen Mechanismen bisher kaum zu beurteilen.

Die Zusammensetzung des V_0 -Sektors der pflanzlichen V-ATPase ist im Vergleich zu Hefe unterschiedlich. Wie erwähnt, ist im Genom von *A. thaliana* keine zur Untereinheit c'' homologe Sequenz zu detektieren, ebenso wenig konnte in dieser Arbeit eine EST-Sequenz mit einer überzeugenden Ähnlichkeit zu c'' von *S. cerevisiae* bei *M. crystallinum* identifiziert werden. Für die im Genom von *M. crystallinum* und *A. thaliana* vorhandenen Sequenzen von VHA-e findet sich im Hefe-Genom kein homologes Gen. Die für den postulierten Mechanismus der Protonenkonduktion wichtigen Sequenzabschnitte der Untereinheiten a, c und c'' sind hingegen konserviert.

Im Zusammenhang mit der Frage nach den Mechanismen der Modulation der V-ATPase-Aktivität wurde die Hypothese vertreten, solche Modulation könne auf der Expression unterschiedlicher Isoformen mit unterschiedlichen Regulationsmöglichkeiten bzw. katalytischen Eigenschaften beruhen (Lüttge und Ratajczak, 1997). Abgesehen vom Nachweis des Vorhandensein einer nicht phosphorylierbaren Isoform von AtVHA-B konnten in der vorliegenden Arbeit keine Belege zur Unterstützung dieser Hypothese gefunden werden. Die hohe Zahl von Isoformen von V-ATPase-Untereinheiten, wie sie bei *A. thaliana* und *M. crystallinum* auftritt, lässt sich plausibler durch die Expression der Isoformen in verschiedenen Geweben oder in Reaktion auf erhöhten Pumpbedarf erklären als mit der Annahme, dass diese Diversität zur Modulierbarkeit der V-ATPase beiträgt.

Auch der Vergleich der Sequenzen der V-ATPase-Untereinheiten zwischen einem Halophyten und einem Glykophyten erbrachte keine einfachen Hinweise auf divergierende funktionelle, katalytische und regulative Mechanismen.

Der Mechanismus der ATP-Hydrolyse und der Protonenkonduktion der V-ATPase ist, wie die vorliegende Arbeit zeigt, über die Artgrenzen hinweg hoch konserviert. Wichtige kurzfristige adaptive Änderungen der V-ATPase-Aktivität sind offenbar posttranslationaler Natur. Entscheidende Stellgrößen sind hierbei der Redoxzustand des Cytosols, der intrazelluläre pH-Wert, die Konzentration von Cl⁻-Ionen, NO₃⁻, sowie das Verhältnis der ATP/ADP-Konzentration innerhalb der Zelle.

4.3 Die Expressionsänderung von Transkripten der V-ATPase-Untereinheiten von M. crystallinum nach kurzfristigem Einwirken von abiotischem Stress

Bei der Untersuchung der Mengenänderung der Transkripte für V-ATPase-Untereinheiten, der Pyrophosphatase des Tonoplasten, sowie der an der Plasmamembran lokalisierten ATPase als Antwort auf die Einwirkung von abiotischem Stress müssen langfristige und kurzfristige Effekte unterschieden werden. Ein Beispiel für solche langfristigen Auswirkungen auf das Muster der Genexpression ist das Umschalten von *M. crystallinum* vom C₃- zum CAM-Modus der Photosynthese bei Salz-Stress und Wassermangel. Diese Anpassung vollzieht sich im Zeitrahmen von einigen Tagen und ist im Sinne von Akklimation an längerfristiges Einwirken der Stresssituation zu deuten (Ratajczak et al., 1994). In der vorliegenden Arbeit wurden bei *M. crystallinum* jedoch kurzfristige Antworten der Genexpression auf

Stresssignale untersucht, die sich bereits sechs Stunden nach der Applikation des Stresses manifestieren.

Mit der Verwendung eines cDNA-basierten Arrays konnte dabei erstmalig die Gesamtheit der Transkriptmengen aller ATPase-Gene in Reaktion auf Stress analysiert werden. In diesem Ansatz wurde bewusst darauf verzichtet eine differenzielle Expression von, in ihrer Gesamtheit noch zu klonierenden, Isoformen verschiedener Untereinheiten der V-ATPase von *M. crystallinum* zu detektieren. Das Hauptziel dieser Untersuchung war vielmehr das Aufzeigen von Regulationsmechanismen auf dem Niveau der Gesamttranskriptmengen der verschiedenen Untereinheiten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden „array“-gestützte Analysen von stressbedingten, kurzfristigen Änderungen der Expressionsmuster von V-ATPase-Untereinheiten an *M. crystallinum* im Vergleich zu anderen Proteinen des Tonoplasten und der Plasmamembran durchgeführt. Dabei ergab sich eindeutig, dass die Expression der Gene der V-ATPase differenziell kontrolliert wird. So konnte für jeden applizierten Stress ein anderes, organspezifisches Expressionsmuster der untersuchten Gene aufgezeigt werden.

Den deutlichsten Effekt zeigte hierbei die Applikation von Salzstress. Die Expression bestimmter V-ATPase-Untereinheiten wurde im Blatt deutlich stimuliert, während in der Wurzel keine Hochregulation zu beobachten war. Die Mengen an Transkript für Untereinheiten, die an der Katalyse und der Regulation der ATP-Hydrolyse, sowie am Protonentransfer beteiligt sind, waren nach Salzstress deutlich erhöht (McVHA-A, -B, -D, E, -a und -c). Die Transkriptmenge von Untereinheiten, die an der Bildung des Stators beteiligt sind, blieb im Blatt hingegen unverändert (McVHA-C, -F, -G, -d). Ebenfalls unverändert war die Menge des für McVHA-H codierenden Transkripts, obwohl deren Funktion über eine strukturelle Funktion hinausgehen dürfte. In der Wurzel hingegen bewirkte Salzstress eine starke Erhöhung der Transkriptspiegel für die am Tonoplasten lokalisierten Pyrophosphatasen und die an der Plasmamembran lokalisierte ATPase. Wie auch schon in anderen Untersuchungen gezeigt werden konnte (Tsiantis et al., 1995), bedingt die Applikation von Mannitol in einer zu 400 mM NaCl osmotisch gleichwertigen Konzentration keine entsprechenden Änderungen der Expressionsmuster. Im Blatt waren die Mengen der Transkripte der von McVHA-B, -C, -D und -E erniedrigt.

Schädigungen des Cytoplasmas durch erhöhte Mengen der Ionen der Na^+ und Cl^- -Ionen lässt sich durch Akkumulation der Ionen in den großvolumigen Vakuolen verhindern, weshalb die Blätter von Halophyten, wie z.B. von *M. crystallinum*, bei Salzbelastung oft einen ausgesprochen sukkulenten Habitus („Salzsukkulenz“) ausprägen. Dies impliziert eine aktive

Aufnahme der Na^+ -Ionen unter Mitführung der Cl^- -Ionen durch die Wurzel, den Ferntransport der Ionen über das Xylem in die Blätter und schliesslich den sekundär aktiven Transport der Na^+ -Ionen über den Tonoplasten in die Vakuole (Chauhan et al., 2000). An der Energetisierung dieser sekundär aktiven Transportvorgänge sind Protonen-pumpende Enzyme beteiligt.

Die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigte Regulation der Transkriptmengen für die verschiedenen ATPasen des Blattes und der Wurzel in Reaktion auf Salzstress passt sehr gut in dieses Bild. Die Verstärkung der Expression des Transkriptes für die Plasmamembran-ATPase könnte die für die Aufnahme von NaCl in die Wurzeln erforderliche Erhöhung des sekundär aktiven Transport an der Plasmamembran widerspiegeln. Die Zunahme der Expression der beiden am Tonoplasten lokalisierten Pyrophosphatase-Isoformen deutet darauf hin, dass der symplastische Transport der Ionen zum Xylem der Wurzel kurzfristig nicht ausreicht, um eine schädigende Zunahme der cytosolischen Ionenkonzentration der Wurzelzellen zu verhindern. Daher könnte es erforderlich sein, schädigende Ionenüberschüsse im Cytosol kurzfristig durch sekundär aktiven Transport in die Vakuolen der Wurzelzellen zu entsorgen. Das „Back-up“-System der Pyrophosphatase ist unter den ungünstigeren energetischen Bedingungen der Wurzel gegenüber der ATP verbrauchenden V-ATPase bevorteilt sein (Maeshima, 2000). Der starke Rückgang an Transkript für die regulatorische Untereinheit VHA-B in der Wurzel deutet darauf hin, dass der verstärkte Bedarf für sekundär aktiven Transport am Tonoplasten der Wurzel nicht durch die Erhöhung der Transkriptmenge für V-ATPase-Untereinheiten reguliert wird.

Stress durch Überangebot von Salzen im Boden wird seitens der Pflanze naturgemäss zunächst von deren Wurzeln perzipiert. Die differenzielle Erhöhung der Transkriptmengen für die Untereinheiten der V-ATPase im Blatt nach sechsständiger Applikation von Salzstress hingegen zeigte, dass das Stresssignal und/ oder die transportierten Ionen von der Wurzel schnell in das Blatt übertragen und dort auf der Ebene der Genexpression bestimmter V-ATPase-Untereinheiten umgesetzt wird. Eine Erklärung für die ausschließliche Erhöhung an Transkript für katalytisch oder regulativ wirksame Untereinheiten der V-ATPase könnte sein, dass der „turnover“ dieser Untereinheiten durch erhöhten Pumpbedarf höher ist als der von Untereinheiten mit strukturellen Funktionen. Dies könnte zunächst kurzfristig durch Erhöhung der Nachproduktion der betreffenden Untereinheiten kompensiert werden. Längerfristige Anpassung von *M. crystallinum* an hohe Salzkonzentrationen im Boden bzw. der Nährlösung zeigte jedoch, dass sich am Tonoplasten die Gesamtmenge an V-ATPase über mehrere Tage hinweg verdoppelte (Ratajczak et al., 1994). Dies entspricht den bisherigen

Erkenntnissen, dass Aufregulation aller Transkripte der V-ATPase in Reaktion auf längerfristigen Salzstress gezeigt werden konnte (Golldack und Dietz, 2001; Löw et al., 1996). Dies könnte neben den anderen anatomischen Voraussetzungen eine spezifische Eigenschaft halophytischer Pflanzen gegenüber glykophytischer Pflanzen sein, da sich beispielsweise die Gesamtmenge von Gesamt-V-ATPase Protein am Tonoplasten von *Hordeum vulgare* nicht änderte (DuPont und Morrissey, 1992).

Die Applikation von Mannitol im Wurzelmedium bedingte, im Gegensatz zu Salzstress, keine Änderung der Transkriptmengen in der Wurzel, während im Blatt die Expression mehrerer V-ATPase-Untereinheiten zurückging. Dieser Befund deutet darauf hin, dass Mannitol nicht aktiv in die Zellen der Wurzel aufgenommen wird. Bedingt durch die daraus resultierende Senkung des Wasserpotentials der Umgebung, ist die Pflanze nicht in der Lage, ihr Wasserpotential kurzfristig durch die Aufnahme und Akkumulation von Ionen im Cytoplasma zu senken. Dies hat einen Einfluss auf die Turgeszens der Pflanze, die Pflanze ist Trockenstress unterworfen. Dies liess sich auch sechs Stunden nach Applikation von Salzstress und Mannitol bei den Blättern der behandelten Pflanzen beobachten. Die in Folge der Stressapplikation erkennbare Erschlaffung der Blätter von *M. crystallinum* war bei den mit Mannitol behandelten Blättern stärker ausgeprägt (eigene Beobachtung). Der Rückgang der Expression einiger Transkripte der V-ATPase könnte daraus resultieren. Dieses Ergebnis spricht sehr dafür, dass die oben im Zusammenhang mit Salzstress diskutierten Expressionsmuster Ioneneffekte widerspiegeln und nicht lediglich osmotisch bedingt sind. Es ist schwierig die Effekte von Mannitol und Salz innerhalb der Zelle miteinander zu vergleichen, da die Aufnahmearten beider Stoffe unterschiedlich sind und die resultierenden Effekte verschiedener Art sind. Möglicherweise beruht die Regulation der V-ATPase-Aktivität in Reaktion auf osmotischen Stress nicht auf einer Expressionsänderung, sondern auf einer direkten Aktivierung der V-ATPase-Aktivität. Munnik und Meijer (2001) konnten zeigen, dass ein Produkt des durch osmotischen Stress regulierten Phosphoinositid Signalwegs, $PI(3,5)P_2$, als ein direkter Aktivator der V-ATPase wirkt.

Im Gegensatz zu kurzfristigem Salzstress bewirkte die sechsstündige Applikation von Kälte bei *M. crystallinum* sowohl in der Wurzel als auch im Blatt eine Herabregulation der Transkriptmengen für die Untereinheiten der V-ATPase und der anderen verglichenen ATPasen. Nur die Transkripte der an der Protonenkonduktion beteiligten McVHA-a und -c zeigten keine Veränderung der Menge. Eine kältesensitive Pflanze wie *M. crystallinum* hat bei kurzzeitiger Temperaturniedrigung eine Inhibierung der V-ATPase zu verkräften (Yoshida et al., 1999) und damit einhergehend eine Acidifizierung des Cytosols. Ob diese

Inhibition aufgrund einer allgemeinen Verlangsamung enzymatischer Reaktionen oder durch die bei Hefe (Moriyama und Nelson, 1989) und Pflanzen (Matsuura-Endo et al., 1992) gezeigte kälteinduzierte Trennung des V_0 - vom V_1 -Sektor der ATPase zustande kommt ist derzeit bei *M. crystallinum* noch unbekannt. In Hefe spielt Untereinheit H bei der Trennung der beiden Sektoren eine Rolle, indem sie die ATPase-Aktivität des cytoplasmatischen V_1 -Sektors inhibiert (Parra et al., 2000). Im Blatt von *M. crystallinum* wird jedoch die Transkription für Untereinheit H ebenso wie für die anderen Untereinheiten im Blatt reprimiert.

Sechsstündiger Hitzestress beeinflusste die Expression von Genen der V-ATPase im Blatt nicht signifikant. Eine Ausnahme bildet hier McVHA-c. In diesem Falle konnte im Blatt eine Hochregulation und in der Wurzel eine Reprimierung der Transkriptmenge gezeigt werden. Diese Reprimierung zeigte sich bei allen Transkripten der Gene des V_0 -Sektors. Eine generelle Erniedrigung aller Transkripte, wie es nach Hitzestress aufgrund einer bevorzugten Expression von Transkripten für Hitzestressproteine (hsp) zu erwarten gewesen wäre (Howarth und Ougham, 1993) ist in diesem Fall nicht erkennbar.

Hitzestress bedingt jedoch einen erhöhten Bedarf an Membranfusionsereignissen (Saris und Makarow, 1998). Im Modellorganismus *S. cerevisiae* gibt es starke Hinweise darauf, dass der V_0 -Sektor der V-ATPase weitere Funktionen unabhängig von der ATPase-Aktivität besitzt. Es konnte gezeigt werden, dass der V_0 -Sektor am letzten, Calmodulin-getriggerten Schritt der Fusion zwischen membranumschlossenen Vesikeln in Hefe beteiligt ist. Dies geschieht durch die Bildung einer hydrophoben Pore, die aus den Proteolipiden zweier fusionierenden Membranen gebildet wird (Peters et al., 2001). Die Theorie der radialen Öffnung einer Proteinpore (ROPP), bestehend aus Untereinheiten des V_0 -Sektors, gewinnt an Plausibilität durch den Befund, dass bei den „Gap Junctions“ von Arthropoden das Proteolipid (Untereinheit c) ebenfalls ein essentieller Bestandteil ist (Finbow und Harrison, 1997).

Sechsstündiger Starklicht-Stress durch Verdopplung der Quantenflussdichte beeinflusste neben der Menge von Transkripten für die Pyrophosphatasen und die Plasmamembran-ATPase auch die Transkriptmengen für McVHA-H und -d negativ. Darüber hinaus hatte die unter Lichtstress erhöhte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Foyer und Noctor, 2000) keinerlei Einfluss auf die Regulation der Menge an Transkripten für die untersuchten Gene.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten cDNA-Array-basierten Analysen erstmals eindeutig zeigen konnten, dass verschiedene Arten von abiotischen Stressoren bei *M. crystallinum* die Transkriptmengen der Gesamtheit der V-ATPase-Gene differenziell beeinflussen. Dies spricht für eine

Beeinflussung des Transkriptionsprozesses oder eine Beeinflussung der Lebensdauer bestimmter Transkripte, zur Modulation der Menge des zur Translation verfügbaren Pools an Transkripten für Untereinheiten der V-ATPase. Wie der Vergleich in Blatt/ Wurzel zeigt, ist diese Beeinflussung zudem organspezifisch. Die hier diskutierten Ergebnisse der Array-Analysen im Vergleich zu früheren Untersuchungen bezüglich der Änderung der Menge von Transkripten für V-ATPase-Untereinheiten bei kurzzeitigem Salzstress in *M. crystallinum* durch die Methoden der RT-PCR (Dietz et al., 2001) und des Northern-Blot (Löw et al., 1996) zeigte, dass die erhaltenen Ergebnisse für McVHA-E und -A in ihrer Tendenz vergleichbar waren.

Speziell die Transkriptmengen der katalytischen und protonenkonduktiven Untereinheiten scheinen einer ausgeprägten Regulation auf Nukleinsäureebene zu unterliegen. In diesem cDNA-basierten Array wurde die Vielzahl der Isogene, die für einzelne Untereinheiten von *M. crystallinum* codieren (**Tabelle 2**) nicht berücksichtigt. Daher konnte die cDNA-Array-basierte Untersuchung der Änderung der Gesamtmenge der einzelnen Transkripte eine Theorie bezüglich des Vorhandenseins mehrerer Isogene untermauern. Sie besagt, dass diese kaum unterscheidbaren Isoformen ein „Back-up-System“ des pflanzlichen Genoms darstellen, das im Fall von Stress zusätzlich exprimiert werden kann (Lüttge und Ratajczak, 1997). Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Expressionsdaten passen zu dieser Theorie: Untereinheiten, die in *M. crystallinum* von mehreren Isogenen codiert werden, sind einer starken Regulation unterworfen (McVHA-A, -B, E, -a und -c), Gene mit nur einer Isoform hingegen unterliegen zumindest keiner starken positiven Kontrolle (McVHA-G, -H, -d). Das Vorhandensein von nur einer Isoform für VHA-A scheint im Pflanzenreich auf *A. thaliana* beschränkt zu sein, wie dies von Magnotta und Gogarten, (2002) gezeigt werden konnte. Bei *A. thaliana* konnte darüber hinaus eine gewebe- und entwicklungspezifische Regulation der Expression der Isoformen von AtVHA-E (Kawamura et al., 2000) und AtVHA-c (Ratajczak, 2000) festgestellt werden.

4.4 Regulation der Genexpression oder posttranslationale Regulation unter abiotischem Stress

Untereinheit B scheint im Licht der Analyse der Primärsequenz und der Expressionsänderung in Reaktion auf abiotischen Stress eine sehr wichtige Rolle innerhalb der Regulation und Modulation der V-ATPase-Aktivität zu spielen. Wie erwähnt ist bei *A. thaliana* innerhalb der

drei Isoformen der Untereinheit B ein Isogen mit einer fehlenden Phosphorylierungsstelle vorhanden. Dies könnte bedeutsam sein, da die Primärsequenz in der Umgebung um die Phosphorylierungsstelle ansonsten über alle verglichenen Arten stark konserviert ist. Darüber hinaus ist in Reaktion auf Salzstress die Transkriptmenge für Untereinheit B der stärksten Regulation unterworfen. Weiterhin ist das Protein selber Ziel einer posttranslationalen kovalenten Modifikation.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich der Unterschied, der sich zwischen einem Halophyten und einem Glykophyten im Hinblick auf den Mechanismus einer stressbedingten Erhöhung der Energetisierung des sekundär aktiven Transports auftut, nicht in den Mechanismen der Katalyse, der Protonenkonduktion und der biochemischen Regulation der V-ATPase widerspiegelt, sondern hauptsächlich im Bereich der Erhöhung der Transkriptmenge und der damit vermutlich verbundenen Erhöhung der Gesamtproteinmenge der V-ATPase am Tonoplasten und anderen Endomembrankompartimenten zu suchen ist. Nach dem derzeitigen Erkenntnisstand spielt die Expression von mit unterschiedlichen Eigenschaften ausgestatteten Isoformen der V-ATPase-Untereinheiten keine Rolle bei der Anpassung der Pflanze an abiotischen Stress. Mit den in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Untersuchungen über die Untereinheiten der pflanzlichen V-ATPase konnten innerhalb des pflanzlichen Holoenzym den gezeigten posttranslationalen Regulationsmechanismen der V-ATPase-Aktivität Funktionen für verschiedene Untereinheiten zugeordnet werden.

4.5 Die Lokalisation von Untereinheiten des V_0 - und des V_1 -Sektors an den Endomembrankompartimenten von Maiswurzelzellen

Immuncytochemische Untersuchungen zur Lokalisierung einzelner V-ATPase-Untereinheiten oder der Gesamt-ATPase innerhalb der Pflanzenzelle deuteten auf eine Lokalisierung an verschiedensten Membran-umschlossenen Kompartimenten hin (Depta et al., 1991; Herman et al., 1994; Oberbeck et al., 1994; Long et al., 1995). Neben einer Lokalisierung an Endomembranen konnte darüber hinaus in einigen Fällen V-ATPase an der Plasmamembran nachgewiesen werden (Robinson et al., 1998). Diese Befunde bestätigten das mehrfach gezeigte Vorhandensein von V-ATPase-Aktivität an selektiv aufgereinigten Endomembrankompartimente aus Pflanzen (Matsuoka et al., 1997; Churchill et al., 1983; Chanson und Taiz, 1985).

Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Immunlokalisierungen von Untereinheiten des membranständigen V_0 - und des cytoplasmatischen V_1 -Sektors weisen zum Teil starke Unterschiede auf. Dies zeigte sich sowohl in Bezug auf die Markierungsmuster der Antiseren innerhalb der Maiswurzelzelle, als auch in Bezug auf die Kompartimente, mit denen sie kolo-kalisiert. Diese unterschiedlichen Ko-Lokalisierungen konnten durch GFP-basierte Lokalisationsstudien und durch EM-Mikroskopie bestätigt werden.

Eine starke Übereinstimmung zeigten die Markierungen mit den Antiseren gegen McVHA-A und -E, deren Lokalisation am Endoplasmatischen Reticulum, am Golgi Apparat, am Tonoplasten und teilweise auch an der Plasmamembran gezeigt werden konnte. Da VHA-A und -E an der Bildung des V_1 -Sektors beteiligt sind, deutet die Lokalisierung dieser Untereinheiten an einer Membran auf das Vorhandensein einer voll assemblierten, funktionsfähigen V-ATPase hin. Der V_1 -Sektor wird unabhängig im Cytosol assembliert und am ER mit dem V_0 -Sektor assembliert (Li und Sze, 1999, Frey und Randall, 1998).

Das Vorhandensein einer funktionsfähigen V-ATPase an allen Endomembrankompartimenten entlang des sekretorischen Wegs des Transportes von löslichen Proteinen ist wichtig zur korrekten Zielsteuerung von vakuolären Proteinen (Matsuoka et al., 1997). Diese Autoren konnten nachweisen, dass sowohl Proteine mit Lokalisierungssignalen für die lytische Vakuole, als auch solche mit Zieladressen für die proteinspeichernde Vakuole aus Tabakzellen sekretiert wurden, wenn diese Zellkulturen mit dem V-ATPase-Inhibitor Bafilomycin behandelt wurden. Daraus folgerten sie, dass beide Transportwege von einer Aktivität der V-ATPase und damit von einer feinabgestuften pH-Regulation der Endomembrankompartimente abhängig waren. Ein Beispiel für eine solche pH-Abhängigkeit ist der am prävacuolären Kompartiment lokalisierte vakuoläre Sortierrezeptor BP-80, dessen Bindecharakteristika pH-Wert abhängig sind (Kirsch et al., 1994).

Aus diesem Grund wäre ein übereinstimmendes Markierungsmuster aller Antiseren gegen Untereinheiten der V-ATPase zu erwarten gewesen. Jedoch konnten mit dem Antiserum gegen McVHA-D_i, das im Westernblot die Untereinheiten A und B erkannte (3.7.) nur kleine Endomembrankompartimente unbekannter Natur markiert werden. Das Antiserum gegen McVHA-a_{nterm} markierte, wie in verschiedenen Ansätzen gezeigt werden konnte (3.9.7.1), zum Endoplasmatischen Reticulum gehörige Kompartimente.

Wie erwähnt ist Untereinheit a aufgrund ihrer hochkonservierten Sequenzeigenschaften in essentieller Weise an der Protonentransfer über Membranen beteiligt. Im Gegensatz zu Li und Sze (1999), die ein Vorhandensein eines mit der V-ATPase assoziierten 100 kDa großen Polypeptides auf den Membranen des Endoplasmatischen Reticulums mit einer Funktion

beim Zusammenbau der V-ATPase erklärten, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass eine der in *A. thaliana* drei Isoformen der pflanzlichen VHA-a ausschließlich mit der V-ATPase auf den Membranen des Endomembransystems zusammenwirkt. Dieser Endomembran-lokalisierter Untereinheit ist dabei ebenso wie den anderen Isoformen von VHA-a eine essentielle Funktion innerhalb der V-ATPase beim Protonentransport zuzuordnen. Diese Theorie einer Kompartiment-spezifischen Lokalisation von VHA-a-Isoformen wird durch mehrere Ergebnisse bei Pflanzen und Hefe gestützt.

In Hefe werden alle bekannten Untereinheiten und Chaperone der V-ATPase von einem einzigen Gen codiert. Nur für Untereinheit a sind zwei Isogene (*vph1* und *stv1*) bekannt (Manolson, 1994). Generell besitzen die Isogene der V-ATPase-Untereinheiten eines Organismus, soweit sie bisher charakterisiert werden konnten, sehr hohe Homologien untereinander (Nelson und Harvey, 1999). Im Gegensatz dazu sind die bekannten Isogene der Untereinheiten a von *S. cerevisiae* und *A. thaliana* sehr divergent (3.4.5) (Kawasaki-Nishi et al., 2001). Besonders hoch ist diese Divergenz im cytoplasmatischen N-Terminus der Untereinheit a. Für die beiden Isoformen (*VPH1* und *STV1*) konnte eine differenzielle Lokalisierung gezeigt werden (Manolson et al., 1994). Eine detaillierte Untersuchung (Kawasaki-Nishi et al., 2000a) zeigte eine Lokalisation von *VPH1* an der Vakuole, während *STV1* am späten Golgi-Apparat und am prevakuolären Kompartiment der Hefe lokalisierte. Die Autoren zeigten durch die Expression von chimären Proteinen aus beiden Isoformen, dass der cytoplasmatische N-Terminus für die Lokalisation von *STV1* verantwortlich war. Selektive Aufreinigungen dieser beiden an unterschiedlichen Membranen lokalisierten V-ATPasen konnten darüber hinaus zeigen, dass sich deren Kopplungseffizienzen und die Fähigkeit zur dissoziativen Trennung von V_0 - und V_1 -Sektor (Kane, 2000) stark unterschieden. Für die unterschiedliche Kopplungsaktivität war der C-Terminus, für das unterschiedliche Dissoziationsverhalten der N-Terminus verantwortlich.

In Rahmen ihrer Untersuchung über den Einfluss der Hemmung der V-ATPase auf die vakuoläre Zielsteuerung von löslichen Proteinen in Tabak-Suspensionskulturen konnten Matsuoka et al. (1997) das Vorhandensein zweier durch ihre unterschiedliche Hemmbarkeit gegenüber Bafilomycin unterscheidbare V-ATPase-Aktivitäten nachweisen. Diese V-ATPase-Aktivitäten waren in verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung von Endomembrankompartimenten und Tonoplasten lokalisiert. Darüber hinaus unterschieden sich die mit einem Antikörper gegen das Holoenzym der V-ATPase erhaltenen Immundekorationsmuster der Aufreinigungen der Endomembrankompartimente und der Tonoplasten-Aufreinigungen voneinander.

Diese Befunde zusammen mit den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten über die Sequenzeigenschaften der pflanzlichen Untereinheit a, sowie die intrazelluläre Lokalisierung von VHA-a in Mais lassen den Schluss zu, dass es ebenso wie in Hefe in Pflanzen mindestens zwei verschiedene V-ATPase-Aktivitäten gibt, die sich durch ihre Hemmbarkeit gegenüber Bafilomycin, sowie durch ihre Lokalisation innerhalb der Pflanzenzelle unterscheiden. Da die Hemmung durch Bafilomycin auf der Bindung an VHA-a beruht (Zhang et al., 1994), dürften sich diese verschiedenen V-ATPasen durch das Vorhandensein von Isoformen der Untereinheit a unterscheiden.

Eine eventuell veränderte Pumpstöchiometrie der verschieden lokalisierten V-ATPasen kann nicht durch eine qualitative Veränderung des Proteolipidsektors in Bezug auf dessen Isoformvarianz bewerkstelligt werden. Wie in 4.2.2 ausgeführt, kodiert der gesamte Satz an Untereinheiten-Isoformen der Proteolipid-Untereinheiten in *A. thaliana* für Untereinheiten mit denselben Charakteristika hinsichtlich der Protonenkonduktion. AtVHA-a zeigt hingegen im Bereich des Membransektors, neben den hochkonservierten, geladenen essentiellen Aminosäuren (3.4.5) eine höhere Varianz als Untereinheit c. Diese Unterschiede im Membransektor könnten auf eine bisher noch unbekannt Art die Effizienz des Protonentransports beeinflussen.

Diese Befunde führen zu einem komplexen Bild des Zusammenbaus und der Verteilung der V-ATPase innerhalb der pflanzlichen Zelle. In Analogie zum Modell des Zusammenbaus der V-ATPase in Hefe wurde ein unabhängiger Zusammenbau des V_0 -Sektors im rauhen Endoplasmatischen Reticulum unter Beteiligung von Chaperonen wie Calnexin und BiP (Binde-Protein) (Li et al., 1998), sowie eine vollständige Assemblierung des V_1 -Sektors im Cytosol (Frey und Randall, 1998) postuliert. Daran schließt sich ein Zusammenbau der Sektoren ebenfalls am ER an, von wo aus die voll assemblierte V-ATPase zur Tonoplastenmembran transportiert wird (Ratajczak et al., 2000). Postuliert man nun eine Funktion von sich unterscheidenden V-ATPasen an verschiedenen Endomembran-kompartimenten der Pflanzenzelle, so müssen diese unterschiedlich lokalisierten V-ATPasen auch unterschiedliche Lokalisierungs- und Retentionssignale besitzen. Wie Brandizzi et al. (2002) zeigen konnten, ist bei einem Membranprotein mit einer Transmembrandomäne die Länge dieser membrandurchspannenden Domäne der entscheidende Faktor für einen Verbleib des Proteins in verschiedenen Endomembran-kompartimenten. Für einen zielgerichteten Transport über den späten Golgi-Apparat hinaus zum Tonoplasten, sind jedoch weitere unbekannt positive Signale notwendig. Ob diese Befunde ohne weiteres auf ein so komplexes Protein wie VHA-a mit mutmaßlich

acht Transmembran-Domänen zu übertragen ist, ist schwierig zu beurteilen. Jedoch könnte man in Analogie zu den Untereinheiten a der Hefe annehmen, dass diese positiven Lokalisierungssignale im Bereich des N-Terminus zu suchen sind.

In Pflanzen gibt es darüber hinaus zwei verschiedene Arten von Vakuolen. Die proteinspeichernden Vakuolen unterscheiden sich von den lytischen Vakuolen durch unterschiedliche Arten von Aquaporinen (Jauh und Rogers, 1999). Analog gibt es für diese beiden Vakuolentypen auch zwei unterschiedliche Arten des Transports für lösliche Proteine (Vitale und Raikhel, 1999). Wie Matsuoka et al., (1997) zeigen konnten, werden beide Transportwege durch die Inhibierung der V-ATPase gestört. Ob es für die V-ATPase auch Zieladressen für diese beiden unterschiedlichen Transportwege bzw. die verschiedenen Vakuolen gibt, ist unbekannt. Wie auch im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte (3.9.11) lokalisiert die V-ATPase auf dem Tonoplasten von beiden Vakuolentypen. **Abb. 4.5.1** fasst die aufgezeigten Möglichkeiten der Assemblierung und des Transportes der V-ATPasen zu den Vakuolen in Abhängigkeit von den drei Isoformen von VHA-a zusammen.

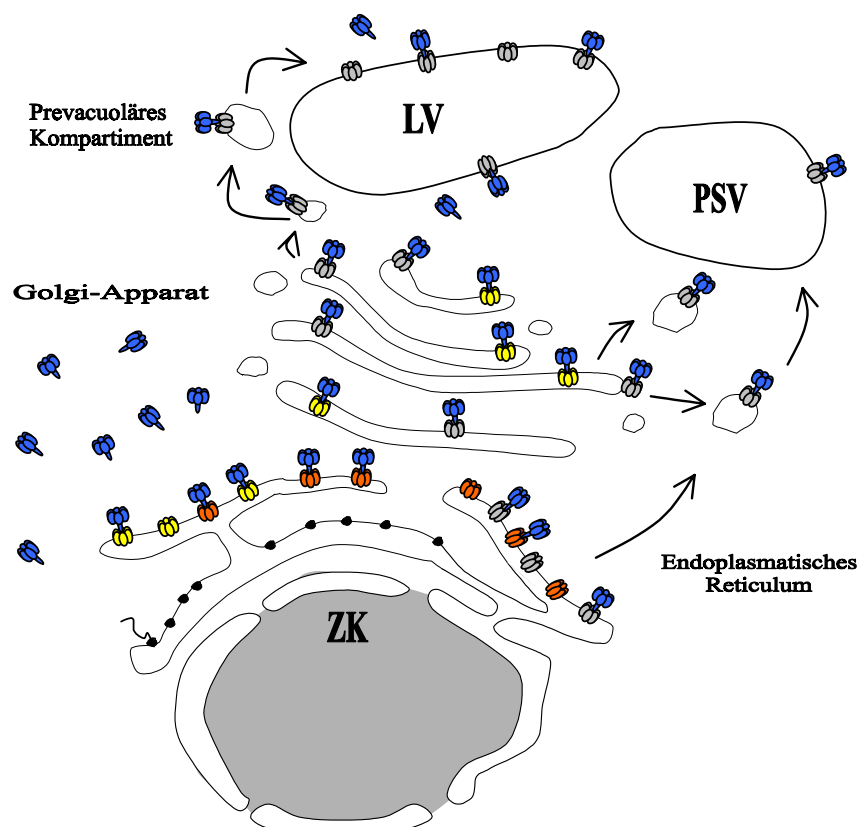


Abb. 4.5.1: Die Verteilung der V-ATPase auf den verschiedenen Kompartimenten des Transportweges zur Vakuole. Die verschiedenfarbig gezeichneten V_0 -Sektoren deuten die sich durch die jeweilige Isoform von VHA-a zu unterscheidenden V-ATPasen an. Diese unterschiedlichen V-ATPasen lokalisieren auf verschiedenen Kompartimenten. Die Pfeile deuten die bekannten Transportwege zur lytischen und zur proteinspeichernden Vakuole an. Abk. ZK: Zellkern, PSV: Protein speichernde Vakuole, LV: Lytische Vakuole.

5 Zusammenfassung

Die pflanzliche V-ATPase energetisiert in Pflanzen durch die ATP-verbrauchende Katalyse des Protonenflusses zahlreiche sekundär aktive Transportprozesse an Biomembranen. Der Multiproteinkomplex der V-ATPase besteht aus 12 Untereinheiten.

(1) In der vorliegenden Arbeit erfolgte erstmals die Klonierung der Vollängen der für die Untereinheiten A, B, G, H, a, d und e codierenden cDNA-Sequenzen der halotoleranten, fakultativen CAM-Pflanze *Mesembryanthemum crystallinum*. Zusammen mit den Sequenzen der Untereinheiten C, E, F und c ist damit erstmals der nahezu gesamte Satz an Untereinheiten-Sequenzen der funktionellen V-ATPase bei einer halophytischen Pflanze zugänglich. Durch Sequenzvergleiche mit den V-ATPase-Untereinheiten von *Arabidopsis thaliana* und *Saccharomyces cerevisiae* konnten die Untereinheiten einem Vergleich auf funktionaler Ebene zwischen Pflanzen und Hefe, sowie zwischen dem Glykophyten *A. thaliana* und dem Halophyten *M. crystallinum* durchgeführt werden. Die bereits früher abgeschlossene Sequenzierung des Gesamt-Genoms von *A. thaliana* erlaubte, die Isoformen verschiedener V-ATPase-Untereinheiten in die Analyse einzubeziehen.

(2) Der Sequenzvergleich erlaubte erste funktionale Rückschlüsse. So erwies sich, dass die Mechanismen die für der Hydrolyse des ATP und des Protonentransportes hoch konserviert verantwortlichen Aminosäuresequenzen der V-ATPase über die Arten hinweg hochkonserviert sind, soweit dies von den Aminosäuresequenzen her geschlossen werden kann. Wichtige Stellgrößen zur posttranslationalen Modulation der katalytischen Aktivität der V-ATPase sind der Redoxzustand der Zelle, das intrazelluläre ATP/ADP-Verhältniss und die Phosphorylierung der V-ATPase. Durch Sequenzvergleiche konnte gezeigt werden, dass in den pflanzlichen Untereinheiten A die Stellung der zur Redoxregulation wichtigen Cysteinreste konserviert ist. Die Untereinheit B der pflanzlichen V-ATPase könnte aufgrund der Charakteristika der Primärsequenz der Ort der Perzeption des ATP/ADP-Verhältnisses der Zelle und das Ziel von regulativen Protein-Phosphorylierungen sein.

Die in Pflanzen bisher noch nicht charakterisierte Untereinheit H zeigt ungeachtet relativ schwacher Homologie auf der Ebene der Aminosäuresequenz eine strukturelle Ähnlichkeit mit der Untereinheit H von Hefe. Aufgrund der über die verglichenen Arten konservierten Abfolge von Super Helix-bildenden „Armadillo-Repeats“ könnte sie als ein flexibles Bindeglied zwischen dem cytoplasmatisch orientierten V_1 -Sektor und dem membranständigen V_0 -Sektor wirken und dabei redox-modulierte Konformationsänderungen des V_1 -Sektors auf den V_0 -Sektor übertragen.

Auch die Untereinheit a wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals bei einer höheren Pflanze nachgewiesen und kloniert. Alle verglichenen Sequenzen der pflanzlichen Untereinheit a wiesen die in Hefe analysierten, zur Protonenkonduktion essentiell erforderlichen geladenen Aminosäuren auf. Der entsprechende Strukturbereich ist hochkonserviert. Dies stützt die bisher strittige Auffassung, dass die 95 kDa grosse Untereinheit a ein funktioneller Bestandteil der aktiven pflanzlichen V-ATPase ist.

(3) Mit cDNA-basierten Arrays wurden bei *M. crystallinum* stressbedingte Transkriptmengenänderungen der Untereinheiten im Vergleich zu den Transkriptspiegeln der tonoplastidären Pyrophosphatase und der Plasmamembran-ATPase untersucht. Es zeigte sich, dass in Reaktion auf eine sechsstündige Applikation fünf verschiedener Modalitäten von Stress die Mengen der V-ATPase-Untereinheiten-Transkripte sowohl organspezifisch als auch in Bezug auf den gegebenen Stress differenziell geregelt werden. Die stärksten Effekte auf die Expression der Untereinheiten zeigten sich bei Salzstress. Im Blatt, dem eigentlichen Speicherort der aufgenommenen Ionen, konnte eine starke Heraufregulation der Transkriptmengen bei den an der Katalyse und an der Protonenkonduktion beteiligten Untereinheiten gezeigt werden. Die Expressionsspiegel von Untereinheiten mit struktureller Funktion unterlagen im Blatt hingegen keiner Regulation. In der Wurzel wurden ausschließlich die Mengen der Transkripte der tonoplastidären Pyrophosphatasen und der Plasmamembran-ATPase heraufgeregelt. Die Behandlung mit Mannitol in einer im Vergleich zu den applizierten 400 mM NaCl isoosmotischen Konzentration hatte keinen Einfluss auf das Ausmaß der Expression von V-ATPase-Untereinheiten. Dies beweist, dass die gefundenen Regulationsmechanismen ionische und nicht osmotische Ursachen hatten. Kälte, Hitze und Starklicht wirkten sich vorwiegend negativ auf die in den Geweben auffindbaren Mengen an Transkripten der V-ATPase-Untereinheiten.

(4) Die Ergebnisse der Charakterisierung der Untereinheiten und der Mechanismus der Regulation der Transkriptmengen lassen erkennen, dass eine Reaktion auf Salzstress wohl überwiegend in einer vermehrten Expression von V-ATPase-Genen besteht. Die am stärksten positiv regulierten Untereinheiten verfügen über ein „Back-up“-System durch mehrere vorhandene Isogene deren Transkriptmengen bei Bedarf kurzfristig erhöht werden können.

Mittels Immunpräzipitation und eines CFP/ YFP basierendem FRET-Verfahren konnten im Falle der Untereinheiten A und B eine Interaktion auf Proteinebene nachgewiesen werden.

(5) Zur näheren Charakterisierung der Untereinheit a in Pflanzen wurde der cytoplasmatische N-Terminus heterolog exprimiert, aufgereinigt und zur Herstellung eines Antiserums verwendet. Die mutmassliche Volllänge der Untereinheit a mit einer apparenten Masse von 95

kDa konnte an pflanzlichen Endomembranen nur durch eine Erhöhung der Ionenstärke im Aufreinigungsmedium detektiert werden. Zwei mutmaßliche Degradationsprodukte fanden sich in Aufarbeitungen von Membran- und Cytoplasmafraktionen. Durch immunocytochemische Untersuchungen an Maiswurzelzellen konnte eine Lokalisation von VHA-A und -E am glatten endoplasmatischen Reticulum, am Golgi-Apparat und am Tonoplasten gezeigt werden. McVHA-a_{nterm}-Antiserum markierte hingegen ausschließlich Bereiche des rauhen und glatten endoplasmatischen Reticulums. Diese Ergebnisse belegen, dass wie in der Hefe auch in der pflanzlichen Zelle die einzelnen Isoformen der Untereinheit a in verschiedenen Kompartimenten des sekretorischen Wegs und des Tonoplasten lokalisiert sind.

6 Literatur

- Abrahams JP, Leslie AG, Lutter R, Walker JE (1994)** Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370: 594-5
- Adachi I, Arai H, Pimental R, Forgacs M (1990)** Proteolysis and orientation on reconstitution of the coated vesicle proton pump. *J Biol Chem* 265(2): 960-6
- Adams P, Nelson DE, Yamada S, Chmara W, Jensen RG, Bohnert HJ, Griffiths H (1998)** Growth and development of *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae). *New Phytol* 138 (2): 171-190
- Allen GJ, Chu SP, Schumacher K, Shimazaki CT, Vafeados D, Kemper A, Hawke SD, Tallman G, Tsien RY, Harper JF, Chory J, Schroeder JI (2000)** Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis* det3 mutant. *Science* 289 (5488): 2338-42
- Alwine JC, Kemp DJ, Parker BA, Reiser J, Renart J, Stark GR, Wahl GM (1979)** Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzoyloxymethyl paper. *Methods Enzymol* 68: 220-42
- Anraku Y, Hirata R, Wada Y, Ohya Y (1992)** Molecular genetics of the yeast vacuolar H(+)-ATPase. *J Exp Biol* 172: 67-81
- Athwal GS, Huber JL, Huber SC (1998a)** Biological significance of divalent metal ion binding to 14-3-3 proteins in relationship to nitrate reductase inactivation. *Plant Cell Physiol* 39(10): 1065-72
- Athwal GS, Huber JL, Huber SC (1998b)** Phosphorylated nitrate reductase and 14-3-3 proteins. Site of interaction, effects of ions, and evidence for an amp-binding site on 14-3-3 proteins. *Plant Physiol* 118(3): 1041-8
- Baldwin D, Crane V, Rice D (1999)** A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2(2): 96-103
- Barkla BJ, Pantoja O (1996)** Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Annu Rev Plant Phys* 47: 159-184
- Bauerle C, Ho MN, Lindorfer MA, Stevens TH (1993)** The *Saccharomyces cerevisiae* VMA6 gene encodes the 36-kDa subunit of the vacuolar H(+)-ATPase membrane sector. *J Biol Chem* 268(17): 12749-57
- Bauerle C, Magembe C, Briskin DP (1998)** Characterization of a red beet protein homologous to the essential 36-kilodalton subunit of the yeast V-type ATPase. *Plant Physiol* 117(3): 859-67
- Betz M, Dietz KJ (1991)** Immunological characterization of 2 dominant tonoplast polypeptides. *Plant Physiology* 97 (4): 1294-1301
- Birnboim HC, Doly J (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-23

- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987)** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* 8: 93-99
- Blumwald E, Poole RJ (1985)** Na⁺/H⁺ antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 78 (1): 163-167
- Boller T, Wiemken A (1986)** Dynamics of vacuolar compartmentation. *A Rev Plant Physiol:* 37137-164
- Bolte S, Schiene K, Dietz KJ (2000)** Characterization of a small GTP-binding protein of the rab 5 family in *Mesembryanthemum crystallinum* with increased level of expression during early salt stress. *Plant Mol Biol* 42(6): 923-36
- Brandizzi F, Frangne N, Marc-Martin S, Hawes C, Neuhaus JM, Paris N (2002)** The Destination for Single-Pass Membrane Proteins Is Influenced Markedly by the Length of the Hydrophobic Domain. *Plant Cell* 14(5): 1077-1092
- Chanson A, Taiz L (1985)** Evidence for an ATP-dependent proton pump on the golgi of corn coleoptiles. *Plant Phys* 78 (2): 232-240
- Charsky CM, Schumann NJ, Kane PM (2000)** Mutational analysis of subunit G (Vma10p) of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *J Biol Chem* 275(47):37232-9
- Chauhan S, Forsthoefel N, Ran Y, Quigley F, Nelson DE, Bohnert HJ (2000)** Na⁺/myo-inositol symporters and Na⁺/H⁺-antiport in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant J. Nov*;24(4): 511-22
- Chenchik A, Diachenko L, Moqadam F, Tarabykin V, Lukyanov S, Siebert PD (1996)** Full-length cDNA cloning and determination of mRNA 5' and 3' ends by amplification of adaptor-ligated cDNA. *Biotechniques* 21(3): 526-34
- Chung HJ, Sehnke PC, Ferl RJ (1999)** The 14-3-3 proteins: cellular regulators of plant metabolism. *Trends Plant Sci* 4(9): 367-371
- Churchill Ka, Holaway B, Sze H (1983)** Separation of 2 types of electrogenic H⁺-pumping ATPases from oat roots. *Plant Phys* 73 (4): 921-928
- Cohen A, Perzov N, Nelson H, Nelson N (1999)** A novel family of yeast chaperons involved in the distribution of V-ATPase and other membrane proteins. *J Biol Chem* 274(38): 26885-93
- Cooper AA, Stevens TH (1996)** Vps10p cycles between the late-Golgi and prevacuolar compartments in its function as the sorting receptor for multiple yeast vacuolar hydrolases. *J Cell Biol* 133(3):529-41
- Couchy I, Minic Z, Laporte J, Brown S, Satiat-Jeunemaitre B (1998)** Immunodetection of Rho-like plant proteins with Rac1 and Cdc42Hs antibodies. *J Exp Bot* 49 (327): 1647-1659
- Crofts AJ, Leborgne-Castel N, Hillmer S, Robinson DG, Phillipson B, Carlsson LE, Ashford DA, Denecke J (1999)** Saturation of the endoplasmic reticulum retention machinery reveals anterograde bulk flow. *Plant Cell (11)*:2233-48

- Davis SJ, Vierstra RD (1998)** Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol Biol* 36 (4): 521-528
- Depta H, Holstein Seh, Robinson Dg, Lutzelschwab M, Michalke W (1991)** Membranes markers in highly purified clathrin-coated vesicles from *Cucurbita* hypocotyls. *Planta* 183 (3): 434-442
- Dietz KJ, Arbinger B (1996)** cDNA sequence and expression of subunit E of the vacuolar H(+)-ATPase in the inducible Crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Biochim Biophys Acta* 1281(2):134-8
- Dietz KJ, Heber U, Mimura T (1998)** Modulation of the vacuolar H⁺-ATPase by adenylates as basis for the transient CO₂-dependent acidification of the leaf vacuole upon illumination. *Biochim Biophys Acta* 1373(1): 87-92
- Dietz KJ, Tavakoli N, Kluge C, Mimura T, Sharma SS, Harris GC, Chardonnens AN, Gollmack D (2001)** Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *J Exp Bot* 363: 1969-80
- Domgall I, Venzke D, Luttge U, Ratajczak R, Bottcher B (2002)** Three-dimensional Map of a Plant V-ATPase Based on Electron Microscopy. *J Biol Chem*: 277(15):13115-21
- dos Remedios CG, Miki M, Barden JA (1987)** Fluorescence resonance energy transfer measurements of distances in actin and myosin. A critical evaluation. *J Muscle Res Cell Motil* (2): 97-117
- Dröse S, Altendorf K (1997)** Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases *J Exp Biol* 200 (Pt 1):1-8
- Drozdowicz YM, Rea PA (2001)** Vacuolar H(+) pyrophosphatases: from the evolutionary backwaters into the mainstream. *Trends Plant Sci* 6(5): 206-11
- Dschida WJ, Bowman BJ (1995)** The vacuolar ATPase: sulfite stabilization and the mechanism of nitrate inactivation. *J Biol Chem* 270(4): 1557-63
- DuPont FM, Morrissey PJ (1992)** Subunit composition and Ca(2+)-ATPase activity of the vacuolar ATPase from barley roots. *Arch Biochem Biophys* 294(2): 341-6
- Feng Y, Forgac M (1992)** Cysteine 254 of the 73-kDa A subunit is responsible for inhibition of the coated vesicle (H⁺)-ATPase upon modification by sulfhydryl reagents. *J Biol Chem* 267(9): 5817-22
- Feng Y, Forgac M (1994)** Inhibition of vacuolar H(+) -ATPase by disulfide bond formation between cysteine 254 and cysteine 532 in subunit A. *J Biol Chem* 269(18): 13224-30
- Finbow ME, Harrison MA (1997)** The vacuolar H⁺-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *Biochem J* 324 (Pt 3): 697-712
- Fischer-Schliebs E, Ball E, Berndt E, Besemfelder-Butz E, Binzel ML, Drobny M, Muhlenhoff D, Muller ML, Rakowski K, Ratajczak R (1997)** Differential

immunological cross-reactions with antisera against the V-ATPase of *Kalanchoe daigremontiana* reveal structural differences of V-ATPase subunits of different plant species. *Biol Chem* 378(10): 1131-9

- Forgac M (1998)** Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *FEBS Lett* 440(3): 258-63
- Forgac M (1999)** Structure and properties of the clathrin-coated vesicle and yeast vacuolar V-ATPases. *J Bioenerg Biomembr* 31(1): 57-65
- Forgac M (2000)** Structure, mechanism and regulation of the clathrin-coated vesicle and yeast vacuolar H⁽⁺⁾-ATPases. *J Exp Biol* 203 Pt 1: 71-80
- Foyer CH, Noctor G (2000)** Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phyt* 146 (3): 359-388
- Frey RK, Randall SK (1998)** Initial steps in the assembly of the vacuole-type H⁺-ATPase. *Plant Physiol* 118(1): 137-47
- Futai M, Noumi T, Maeda M (1989)** ATP Synthase (H⁺-ATPase) - Results By Combined Biochemical And Molecular Biological Approaches. *Ann Rev Biochem* 58: 111-136
- Gadella TW Jr, van der Krogt GN, Bisseling T (1999)** GFP-based FRET microscopy in living plant cells. *Trends Plant Sci* 4(7): 287-291
- Garbarino JE, Hurkman WJ, Tanaka CK, Dupont FM (1991)** *invitro* and *invivo* phosphorylation of polypeptides in plasma-membrane and tonoplast-enriched fractions from barley roots. *Plant Physiology* 95 (4): 1219-1228
- Geelen DNV, Inze DG (2001)** A bright future for the bright yellow-2 cell culture. *Plant Phys* 127 (4): 1375-1379
- Gogarten JP, Fichmann J, Braun Y, Morgan L, Styles P, Taiz SL, DeLapp K, Taiz L (1992)** The use of antisense mRNA to inhibit the tonoplast H⁺ ATPase in carrot. *Plant Cell* 4(7): 851-64
- Gogarten JP, Starke T, Kibak H, Fishman J, Taiz L (1992a)** Evolution and isoforms of V-ATPase subunits. *J Exp Biol* 172: 137-47
- Golldack D, Dietz KJ (2001)** Salt-induced expression of the vacuolar H⁺-ATPase in the common ice plant is developmentally controlled and tissue specific. *Plant Physiol* 125(4): 1643-54
- Gomord V, Wee E, Faye L (1999)** Protein retention and localization in the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Biochimie* 81(6): 607-18
- Hanson MR, Kohler RH (2001)** GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants. *J Exp Bot* 52 (356): 529-539
- Harper JF, Surowy TK, Sussman MR (1989)** Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the plasma membrane proton pump (H⁺-ATPase) of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(4): 1234-8

- Hepler PK, Gunning BES (1998)** Confocal fluorescence microscopy of plant cells. *Protoplasma* 201 (3-4): 121-157
- Herman E and Larkins BA (1999)** Protein Storage Bodies and Vacuoles. *Plant Cell* 11: 601-614
- Herman EM, Lix, Su RT, Larsen P, Hsu H, Sze H (1994)** Vacuolar-type H⁺-ATPases that are associated with the ER and provacuoles of root tip cells. *Plant Physiology* 106: 1313-1324
- Hernando N, Bartkiewicz M, Collin-Osdoby P, Osdoby P, Baron R (1995)** Alternative splicing generates a second isoform of the catalytic A subunit of the vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(13): 6087-91
- Hirata R, Graham LA, Takatsuki A, Stevens TH, Anraku Y (1997)** VMA11 and VMA16 encode second and third proteolipid subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar membrane H⁺-ATPase. *J Biol Chem* 272(8): 4795-803
- Hirata R, Ohsumi Y, Nakano A, Kawasaki H, Suzuki K, Anraku Y (1990)** Molecular structure of a gene, VMA1, encoding the catalytic subunit of H⁽⁺⁾-translocating adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 265(12): 6726-33
- Hirschl D, Bayer P, Muller O (1996)** Secondary structure of an armadillo single repeat from the APC protein. *FEBS Lett* 383 (1-2): 31-36
- Ho MN, Hirata R, Umemoto N, Ohya Y, Takatsuki A, Stevens TH, Anraku Y (1993)** VMA13 encodes a 54-kDa vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase subunit required for activity but not assembly of the enzyme complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268(24): 18286-92
- Hoagland DR and Arnon Di (1938)** The water culture method for growing plants without soil. *University of Agricultural Experiment Station*: circular 347
- Hofte H, Chrispeels MJ (1992)** Protein sorting to the vacuolar membrane. *Plant Cell* (8): 995-1004
- Horsley D, Coleman J, Evans D, Crooks K, Peart J, Satiat-Jeuemaitr B, Haws C (1993)** A monoclonal-antibody, JIM-84, recognizes the golgi-apparatus and plasmamembrane in plant cells. *Journal of experimental botany* 44: 223-229 Suppl. S
- Howarth Cj, Ougham Hj (1993)** Tansley Review 51. Gene-Expression under temperature stress *New Phytol* 125 (1): 1-26
- Hunt IE, Bowman BJ (1997)** The intriguing evolution of the "b" and "G" subunits in F-type and V-type ATPases: isolation of the vma-10 gene from *Neurospora crassa*. *J Bioenerg Biomembr* (6): 533-40
- Jauh GY, Fischer AM, Grimes HD, Ryan CA Jr, Rogers JC (1998)** delta-Tonoplast intrinsic protein defines unique plant vacuole functions *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(22): 12995-9

- Jauh GY, Phillips TE, Rogers JC (1999)** Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *Plant Cell* (10): 1867-82
- Jiang L, Rogers JC (1998)** Integral membrane protein sorting to vacuoles in plant cells: evidence for two pathways. *J Cell Biol* 143(5): 1183-99
- Jiang L, Rogers JC (1999)** Functional analysis of a Golgi-localized Kex2p-like protease in tobacco suspension culture cells. *Plant J* (1): 23-32
- Junge W, Lill H, Engelbrecht S (1997)** ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics. *Trends Biochem Sci* (11): 420-3
- Kaestner KH, Randall SK, Sze H (1988)** N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-binding proteolipid of the vacuolar H⁺-ATPase from oat roots *J Biol Chem* 263(3): 1282-7
- Kane PM (2000)** Regulation of V-ATPases by reversible disassembly. *FEBS Lett* 469(2-3): 137-41
- Kane PM, Parra KJ (2000)** Assembly and regulation of the yeast vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase. *J Exp Biol* 203 Pt 1: 81-7
- Kane PM, Yamashiro CT, Stevens TH (1989)** Biochemical characterization of the yeast vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase. *J Biol Chem* 264(32):19236-44.
- Kawamura Y, Arakawa K, Maeshima M, Yoshida S (2000)** Tissue specificity of E subunit isoforms of plant vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase and existence of isotype enzymes. *J Biol Chem* 275(9): 6515-22
- Kawamura Y, Arakawa K, Maeshima M, Yoshida S (2001)** ATP analogue binding to the A subunit induces conformational changes in the E subunit that involves a disulfide bond formation in plant V-ATPase. *Eur J Biochem* 268(10): 2801-9
- Kawasaki-Nishi S, Bowers K, Nishi T, Forgac M, Stevens TH (2001)** The amino-terminal domain of the vacuolar proton-translocating ATPase a subunit controls targeting and in vivo dissociation, and the carboxyl-terminal domain affects coupling of proton transport and ATP hydrolysis. *J Biol Chem* 276(50): 47411-20
- Kawasaki-Nishi S, Nishi T, Forgac M (2001)** Arg-735 of the 100-kDa subunit a of the yeast V-ATPase is essential for proton translocation *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(22): 12397-402
- Khyse-Andersen J (1984)** Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Meth* 10: 203-209
- Kim W, Wan CY, Wilkins TA (1999)** Functional complementation of yeast vma1 delta cells by a plant subunit A homolog rescues the mutant phenotype and partially restores vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase activity. *Plant J* (5): 501-10

- Kirsch T, Paris N, Butler JM, Beevers L, Rogers JC (1994)** Purification and initial characterization of a potential plant vacuolar targeting receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(8): 3403-7.
- Klionsky DJ, Nelson H, Nelson N, Yaver DS (1992)** Mutations in the yeast vacuolar ATPase result in the mislocalization of vacuolar proteins. *J Exp Biol* 172: 83-92
- Kluge C, Gollmack D, Dietz KJ (1999)** Subunit D of the vacuolar H⁺-ATPase of *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta* 1419(1): 105-10
- Krisch R, Rakowski K, Ratajczak R (2000)** Processing of V-ATPase subunit B of *Mesembryanthemum crystallinum* L. is mediated in vitro by a protease and/or reactive oxygen species. *Biol Chem* 381(7): 583-92
- Laemmli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259): 680-5
- Lai SP, Randall SK, Sze H (1988)** Peripheral and integral subunits of the tonoplast H⁺-ATPase from oat roots. *J Biol Chem* 263(32): 16731-7
- Lai SP, Watson JC, Hansen JN, Sze H (1991)** Molecular cloning and sequencing of cDNAs encoding the proteolipid subunit of the vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase from a higher plant. *J Biol Chem* 266(24): 16078-84
- Landolt-Marticorena C, Williams KM, Correa J, Chen W, Manolson MF (2000)** Evidence that the NH₂ terminus of vph1p, an integral subunit of the V₀ sector of the yeast V-ATPase, interacts directly with the Vma1p and Vma13p subunits of the V₁ sector. *J Biol Chem* 275(20): 15449-57
- Lehr A, Kirsch M, Viereck R, Schiemann J, Rausch T (1999)** cDNA and genomic cloning of sugar beet V-type H⁺-ATPase subunit A and c isoforms: evidence for coordinate expression during plant development and coordinate induction in response to high salinity. *Plant Mol Biol* 39(3): 463-75
- Leng XH, Manolson MF, Forgac M (1998)** Function of the COOH-terminal domain of Vph1p in activity and assembly of the yeast V-ATPase *J Biol Chem* 273(12): 6717-23
- Leng XH, Manolson MF, Liu Q, Forgac M (1996)** Site-directed mutagenesis of the 100-kDa subunit (Vph1p) of the yeast vacuolar (H⁺)-ATPase. *J Biol Chem* 271(37): 22487-93
- Leng XH, Nishi T, Forgac M (1999)** Transmembrane topography of the 100-kDa a subunit (Vph1p) of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J Biol Chem* 274(21): 14655-61
- Li X, Su RT, Hsu HT, Sze H (1998)** The molecular chaperone calnexin associates with the vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase from oat seedlings. *Plant Cell* 10(1): 119-30
- Li X, Sze H (1999)** A 100 kDa polypeptide associates with the V₀ membrane sector but not with the active oat vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase, suggesting a role in assembly. *Plant J* 17(1): 19-30

- Liu J, Kane PM (1996)** Mutational analysis of the catalytic subunit of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *Biochemistry* 35(33): 10938-48
- Liu Q, Kane PM, Newman PR, Forgac M (1996, a)** Site-directed mutagenesis of the yeast V-ATPase B subunit (Vma2p). *J Biol Chem* 271(4): 2018-22
- Long Ar, Williams Le, Nelson Sj, Hall JI (1995)** Localization of membrane pyrophosphatase activity in *Ricinus communis* seedlings. *J Plant Phys* 146 (5-6): 629-638
- Löw R, Rockel B, Kirsch M, Ratajczak R, Hortensteiner S, Martinoia E, Lüttge U, Rausch T (1996)** Early salt stress effects on the differential expression of vacuolar H(+)-ATPase genes in roots and leaves of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol* 110(1): 259-65
- Lu YP, Li ZS, Drozdowicz YM, Hortensteiner S, Martinoia E, Rea PA (1998)** AtMRP2, an *Arabidopsis* ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with Atmrp1. *Plant Cell* (2): 267-82
- Ludwig J, Kerscher S, Brandt U, Pfeiffer K, Getlawi F, Apps DK, Schagger 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(18): 10939-47
- Lüttge U, Ratajczak R (1997)** The Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of the plant vacuolar ATPase. *Advances in Botanical Research* „The plant vacuole“ (eds. Leigh RA, Sanders D), Academic Press, Cambridge
- MacLeod KJ, Vasilyeva E, Baleja JD, Forgac M (1998)** Mutational analysis of the nucleotide binding sites of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J Biol Chem* 273(1): 150-6
- Maeshima M (2001)** Tonoplast Transporters: Organization and Function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 469-497
- Magnotta SM, Gogarten J (2002)** Multi site polyadenylation and transcriptional response to stress of a vacuolar type H⁺-ATPase subunit A gene in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 2(1):3
- Manolson MF, Proteau D, Preston RA, Stenbit A, Roberts BT, Hoyt MA, Preuss D, Mulholland J, Botstein D, Jones EW (1992)** The VPH1 gene encodes a 95-kDa integral membrane polypeptide required for in vivo assembly and activity of the yeast vacuolar H(+)-ATPase. *J Biol Chem* 267(20): 14294-303
- Manolson MF, Wu B, Proteau D, Taillon BE, Roberts BT, Hoyt MA, Jones EW (1994)** STV1 gene encodes functional homologue of 95-kDa yeast vacuolar H(+)-ATPase subunit Vph1p. *J Biol Chem* 269(19): 14064-74
- Mariaux JB, FischerSchliebs E, Lüttge U, Ratajczak R (1997)** Dynamics of activity and structure of the tonoplast vacuolar-type H⁺-ATPase in plants with differing CAM expression and in a C-3 plant under salt stress. *Protoplasma* 196 (3-4): 181-189

- Martinoia E, Massonneau A, Frangne N (2000)** Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants. *Plant Cell Physiol* 41(11): 1175-86
- Martiny-Baron G, Manolson MF, Poole RJ, Hecker D, Scherer GFE (1992)** Proton transport and phosphorylation of tonoplast polypeptides from zucchini are stimulated by the phospholipid platelet-activating-factor. *Plant Physiology* 99 (4): 1635-1641
- Marty F (1997)** The biogenesis of vacuoles: Insights from microscopy. *In Advances in Botanical Research* Vol 25: The plant vacuole, Leigh RA and Sanders D, eds (London, Academic Press), 1-42
- Marty F (1999)** Plant vacuoles. *Plant Cell* (4): 587-600
- Matsuoka K, Higuchi T, Maeshima (1997)** A vacuolar-type H⁺-ATPase in a nonvacuolar organelle is required for the sorting of soluble vacuolar protein precursors in tobacco cells. *Plant Cell* 9 (4): 533-546
- Matsuura-Endo C, Maeshima M, Yoshida S (1992)** Mechanism of the decline in vacuolar H⁺-ATPase activity in mung bean hypocotyls during chilling. *Plant Phys* 100 (2): 718-722
- Maurel C (1997)** Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 399-429
- Maurel C, Tacnet F, Guclu J, Guern J, Ripoche P (1997)** Purified vesicles of tobacco cell vacuolar and plasma membranes exhibit dramatically different water permeability and water channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(13):7103-7108
- Merzendorfer H, Huss M, Reineke S, Harvey WR, Schmid R, Wiczorek H (1999a)** Structural features of the insect V-ATPase: The membrane bound V₀ complex. *Zoology* 102 (S2): 69
- Merzendorfer H, Huss M, Schmid R, Harvey WR, Wiczorek H (1999)** A novel insect V-ATPase subunit M9.7 is glycosylated extensively. *J Biol Chem* 274(24): 17372-8
- Miller AJ, Cookson SJ, Smith SJ, Wells DM (2001)** The use of microelectrodes to investigate compartmentation and the transport of metabolized inorganic ions in plants. *J Exp Bot* 52(356): 541-9
- Moriyama Y, Nelson N (1989)** Cold inactivation of vacuolar proton-ATPases *J Biol Chem* 264(6): 3577-82
- Moseyko N, Feldman LJ (2001)** Expression of pH-sensitive green fluorescent protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* (5): 557-63
- Muller ML, Jensen M, Taiz L (1999)** The vacuolar H⁺-ATPase of lemon fruits is regulated by variable H⁺/ATP coupling and slip. *J Biol Chem* 274(16): 10706-16
- Muller V, Ruppert C, Lemker T (1999a)** Structure and function of the A1A0-ATPases from methanogenic Archaea. *J Bioenerg Biomembr* (1): 15-27

- Munnik T, Meijer HJ (2001)** Osmotic stress activates distinct lipid and MAPK signalling pathways in plants. *FEBS Lett* 498(2-3): 172-8
- Muntz K (1998)** Deposition of storage proteins. *Plant Mol Biol* 38(1-2): 77-99
- Nelson N (1992)** Structure and function of V-ATPases in endocytic and secretory organelles. *J Exp Biol* 172: 149-53
- Nelson N (1992, a)** The vacuolar H(+)-ATPase-one of the most fundamental ion pumps in nature. *J Exp Biol* 172: 19-27
- Nelson N, Harvey WR (1999)** Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. *Physiol Rev* 79(2): 361-85
- Nelson N, Taiz L (1989)** The evolution of H⁺-ATPases. *Trends Biochem Sci* (3): 113-6
- Netting AG (2002)** pH, abscisic acid and the integration of metabolism in plants under stressed and non-stressed conditions. II. Modifications in modes of metabolism induced by variation in the tension on the water column and by stress. *J Exp Bot.* (367): 151-73
- Nishi T, Forgac M (2002)** The vacuolar (H⁺)-ATPases-nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(2): 94-103
- Noumi T, Beltran C, Nelson H, Nelson N (1991)** Mutational analysis of yeast vacuolar H(+)-ATPase *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(5): 1938-42
- Oberbeck K, Drucker M, Robinson DG (1994)** V-Type ATPase and pyrophosphatase in endomembranes of maize roots. *J Exp Bot* 45 (271): 235-244
- Paris N, Rogers SW, Jiang L, Kirsch T, Beevers L, Phillips TE, Rogers JC (1997)** Molecular cloning and further characterization of a probable plant vacuolar sorting receptor. *Plant Physiol*: 115(1): 29-39
- Parra KJ, Keenan KL, Kane PM (2000)** The H subunit (Vma13p) of the yeast V-ATPase inhibits the ATPase activity of cytosolic V1 complexes *J Biol Chem* 275(28): 21761-7
- Peng SB (1995)** Nucleotide labeling and reconstitution of the recombinant 58-kDa subunit of the vacuolar proton-translocating ATPase. *J Biol Chem* 270(28): 16926-31
- Perin MS, Fried VA, Stone DK, Xie XS, Sudhof TC (1991)** Structure of the 116-kDa polypeptide of the clathrin-coated vesicle/synaptic vesicle proton pump. *J Biol Chem* 266(6): 3877-81
- Perzov N, Padler-Karavani V, Nelson H, Nelson N (2001)** Features of V-ATPases that distinguish them from F-ATPases. *FEBS Lett* 504(3): 223-8
- Peters C, Bayer MJ, Buhler S, Andersen JS, Mann M, Mayer A (2001)** Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature* 409(6820): 581-8

- Portillo F (2000)** Regulation of plasma membrane H(+)-ATPase in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta*. 1469(1): 31-42
- Powell B, Graham LA, Stevens TH (2000)** Molecular characterization of the yeast vacuolar H+-ATPase proton pore *J Biol Chem* 275(31): 23654-60
- Radermacher M, Ruiz T, Wieczorek H, Gruber G (2001)** The structure of the V(1)-ATPase determined by three-dimensional electron microscopy of single particles. *J Struct Biol* 135(1): 26-37
- Randall SK, Sze H (1986)** Properties of the partially purified tonoplast H+-pumping ATPase from oat roots. *J Biol Chem* 261(3): 1364-71
- Ratajczak R (2000)** Structure, function and regulation of the plant vacuolar H(+)-translocating ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1465(1-2): 17-36
- Ratajczak R, Richter J, Lüttge U (1994)** Adaptation of the tonoplast V-Type H+-ATPase of *Mesembryanthemum crystallinum* to Salt Stress, C-3-CAM Transition and Plant-Age. *Plant Cell Envir* 17 (10): 1101-1112
- Rea PA, Li Z-S, Lu Y-P, Drozdowicz YM and Martinoia E (1998)** From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 727-760
- Rea PA, Poole RJ (1993)** Vacuolar H(+)-Translocating Pyrophosphatase. *Annu Rev Plant Phys* 44: 157-180
- Richter ML, Gao F (1996)** The chloroplast ATP synthase: structural changes during catalysis. *J Bioenerg Biomembr* (5): 443-9
- Richter ML, Hein R, Huchzermeyer B (2000)** Important subunit interactions in the chloroplast ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 1458(2-3): 326-42
- Robinson DG, Haschke HP, Hinz G, Hoh B, Maeshima M, Marty F (1996)** Immunological detection of tonoplast polypeptides in the plasma membrane of pea cotyledons *Planta* 198 (1): 95-103
- Robinson DG, Hoppenrath M, Oberbeck K, Luykx P, Ratajczak R (1996)** Localization of pyrophosphatase and V-ATPase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bot Act* 111 (2): 108-122
- Rockel B, Ratajczak R, Becker A, Luttge U (1994)** Changed densities and diameters of intramembrane tonoplast particles of *Mesembryanthemum crystallinum* in correlation with NaCl-induced CAM. *J Plant Phys* 143 (3): 318-324
- Sagermann M, Stevens TH, Matthews BW (2001)** Crystal structure of the regulatory subunit H of the V-type ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(13): 7134-9
- Sanford JC, Klein TM, Wolf ED and Allen N (1987)** Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Part Sci Technol* 5: 27-37

- Saris N, Makarow M (1998)** Transient ER retention as stress response: conformational repair of heat-damaged proteins to secretion-competent structures. *J Cell Sci* 111: 1575-1582
- Schneider DL (1987)** The proton pump ATPase of lysosomes and related organelles of the vacuolar apparatus. *Biochim Biophys Acta* 895(1): 1-10
- Schumacher K, Vafeados D, McCarthy M, Sze H, Wilkins T, Chory J (1999)** The *Arabidopsis* det3 mutant reveals a central role for the vacuolar H(+)-ATPase in plant growth and development. *Genes Dev* 13(24): 3259-70
- Selvin PR (1995)** Fluorescence resonance energy transfer. *Methods Enzymol* 246: 300-34
- Serrano R (1996)** Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol* 165: 1-52
- Smardon AM, Tarsio M, Kane PM (2002)** The RAVE Complex Is Essential for Stable Assembly of the Yeast V-ATPase. *J Biol Chem* 277(16): 13831-9
- Southern EM (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98(3): 503-17
- Sze H, Schumacher K, Muller ML, Padmanaban S, Taiz L (2002)** A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H(+)-ATPase. *Trends Plant Sci* 7(4): 157-61
- Taiz L (1992)** The Plant Vacuole *J Exp Biol* 172: 113-122
- Tavakoli N, Eckerskorn C, Golldack D, Dietz KJ (1999)** Subunit C of the vacuolar H+-ATPase of *Hordeum vulgare*. *FEBS Lett* 456(1): 68-72
- Tavakoli N, Kluge C, Golldack D, Mimura T, Dietz KJ (2001)** Reversible redox control of plant vacuolar H+-ATPase activity is related to disulfide bridge formation in subunit E as well as subunit A. *Plant J* 28 (1): 51-9
- The Arabidopsis Initiative (2000)** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796 - 815
- Tsiantis MS, Bartholomew DM, Smith JA (1996)** Salt regulation of transcript levels for the c subunit of a leaf vacuolar H(+)-ATPase in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant J* 9(5): 729-36
- Tsien RY (1998)** The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67: 509-44
- Vitale A, Raikhel NV (1999)** What do proteins need to reach different vacuoles? *Trends Plant Sci* (4): 149-155
- Vogeli-Lange R, Wagner GJ (1990)** Subcellular-localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco-leaves- implication of a transport function for cadmium-binding peptides. *Plant Physiol* 92 (4): 1086-1093

- Wang SY, Moriyama Y, Mandel M, Hulmes JD, Pan YC, Danho W, Nelson H, Nelson N (1988)** Cloning of cDNA encoding a 32-kDa protein. An accessory polypeptide of the H⁺-ATPase from chromaffin granules. *J Biol Chem* 263(33): 17638-42
- Webster LC, Perez-Castineira JR, Atkins GL, Apps DK (1995)** Allosteric regulation of proton translocation by a vacuolar adenosinetriphosphatase *Eur J Biochem* 232(2): 586-95
- Wieczorek H, Gruber G, Harvey WR, Huss M, Merzendorfer H, Zeiske W (2000)** Structure and regulation of insect plasma membrane H⁽⁺⁾V-ATPase. *J Exp Biol* 203 Pt 1: 127-35
- Wilkins S, Forgac M (2001)** Three-dimensional structure of the vacuolar ATPase proton channel by electron microscopy *J Biol Chem* 276(47): 44064-8
- Wilkins S, Vasilyeva E, Forgac M (1999)** Structure of the vacuolar ATPase by electron microscopy. *J Biol Chem* 274(45): 31804-10
- Xu T, Vasilyeva E, Forgac M (1999)** Subunit interactions in the clathrin-coated vesicle vacuolar (H⁽⁺⁾)-ATPase complex. *J Biol Chem* 274(41): 28909-15
- Yoshida S, Hotsubo K, Kawamura Y, Murai M, Arakawa K, Takezawa D (1999)** Alterations of intracellular pH in response to low temperature stresses. *J Plant Res* 112 (1106): 225-236
- Zhang J, Feng Y, Forgac M (1994)** Proton conduction and bafilomycin binding by the V₀ domain of the coated vesicle V-ATPase *J Biol Chem* 269(38): 23518-23
- Zhang K, Wang ZQ, Gluck S (1992)** Identification and partial purification of a cytosolic activator of vacuolar H⁽⁺⁾-ATPases from mammalian kidney. *J Biol Chem* 267(14): 9701-5
- Zhigang A, Low R, Rausch T, Luttge U, Ratajczak R (1996)** The 32 kDa tonoplast polypeptide Di associated with the V-type H⁺-ATPase of *Mesembryanthemum crystallinum* L. in the CAM state: A proteolytically processed subunit B? *FEBS Lett* 389(3): 314-8
- Zocchi G (1985)** Phosphorylation-dephosphorylation of membrane-proteins controls the microsomal H⁺-ATPase activity of corn roots. *Plant Science* 40 (3): 153-159

I Anhang

1.1 Synthetische Oligonukleotidprimer und verwendete Antikörper

Für die RACE-PCR verwendete Primer

Gen	Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
McVHA-A	McVATP-A-f	CAG GTG GCA AAA TCA CCT A
McVHA-A	McVATP-A-r	CAC TAT CTG CAG GCA TTT CC
McVHA-B	McVATP-B-f	GTA CAC CAG TGC CCA GTT GCA TCA G
McVHA-B	McVATP-B-r	ATC CCT TGC CTG CTT GTA AGC
McVHA-G	McVATP-G-f	TGA GAA TGG AAG CAA GCA GAG C
McVHA-G	McVATP-G-r	CAA CAT TAG CAA CCT GGA GTC T
McVHA-H	McVATP-H-f	GGT TGT TCA GAA CTT GAA AGC
McVHA-H	McVATP-H-r	GCA AAC AGC AAG TGA CCT TGG
McVHA-a	McVATP-a-f	TTT GCT ACT GTT GTT GTG TTG
McVHA-a	McVATP-a-r	GAT ACA TGG CCT AGA ACA TCC
McVHA-d	McVATP-d-f	GAT GCA TCT CTC TGC TAC TG
McVHA-d	McVATP-d-r	CAG CTC CCT CAT ATT CTG AG
McVHA-e	McVATP-e-f	ATG GGA TTT TTA ATC ACA ACC
McVHA-e	McVATP-e-r	CGC ACT CAT TTA GGA TCG GGT T
RACE- spezifisch	AP1	CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC
RACE- spezifisch	AP2nested	ACT CAC TAT AGG GCT CGA GCG GC

Für den V-ATPase-Array zusätzlich verwendete Primer

Gen	Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
McVHA-C	VHA-C-f	GGC TTT GACTGT TGA ATG GAG
McVHA-C	VHA-C-r	GGT GGC AAC CCA TAT CTC AA
McVHA-D	VHA-D-f	TCC TAT CTC TCT TTC TCT CTT TGG C
McVHA-D	VHA-D-r	TTG TCA CCC AGC AAC ATA CTT TAC C
McVHA-E	MAE-1	GAG AAG GCC AAC GAG ATC
McVHA-E	MAE-2	GCA ACG CAA CAA GAC AGC
McVHA-F	VHA-A-F-f	GGA GTT CAC AGC AAG AGA GGA C
McVHA-F	VHA-A-F-r	TGG CTG ATT AGT ACA ACC GC
McVHA-c	McVATP-c-f	ATG TCA ACC GTC TTC AAT GGC
McVHA-c	McVATP-c-r	CTG CCC TTG ACT GTC CAG CTC G
PM-ATPase	McPMATP-f	ATG GCA ATT TGT GGG TTT GT
PM-ATPase	McPMATP-r	GAA CAC TCC AGC GAA ACC AT
PPase	McPPase1-f	GAA AAC AAC GAG GAG GGT GA
PPase	McPPase1-r	CCT TAA GAG GGT CAC CAA CG
PPase	McPPase2-f	GAA AAC AAC GAG GAG GGT GA
PPase	McPPase2-r	GTC CCA GAC CCT ACA AAC CA
Aktin	Ac5'	GGX ACT GGA ATG GTX AAG G
Aktin	Ac3	GTG ATC TCC TTG CTC ATA CG

Zur Klonierung verwendete Primer

Gen	Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
McVHA-A	A-5'-Topo	ATG CCG GCT GTT TAT GGA GAT
McVHA-A	A-3'-Topo	CTC GGG TTT CGT CAT GGG TTT
McVHA-B	B-5'-Topo	ATG GAA TAC AGA ACA GTC TCA
McVHA-B	B-3'-Topo	CAA CTG GGC ACT GGT GTA CAG
McVHA-a	VHA-anterm-5'	ATG CGA TCG GAG CCG ATG CAA
McVHA-a	VHA-anterm-3'	TTC ACC CAA CTC ATC GGT GG
McVHA-a	VHA-a-membpart-5'	CTT CCA AAG CCC TTT ATT ATG
McVHA-a	VHA-a-membpart-3'	TCA CTC ATG TCC ACC ATG TCA ATC
McVHA-e	VHA-e-5'	ATG GGA TTT TTA ATC ACA ACC
McVHA-e	VHA-e-3'	CGC ACT CAT TTA GGA TCG GGT T
McVHA-A	A-BamHI-f	AAA AGG ATC CAT GCC GGC TGT TTA TGG AGA T
McVHA-A	A-HindIII-r	AAA AAA GCT TCT CGG GTT TCG TCA TGG GTT T
McVHA-B	B-BamHI-f	AAA AGG ATC CAT GGA ATA CAG AAC AGT CTC A
McVHA-B	B-HindIII-f	AAA AAA GCT TCA ACT GGG CAC TGG TGT ACA G
McVHA-A	A-NcoI-r	AAA ACC ATG GAT GCC GGC TGT TTA TGG AGA T
McVHA-B	B-NcoI-r	AAA ACC ATG GAT GGA ATA CAG AAC AGT CTC A
McVHA-a	a-ges-BamHi-f	AAA AGG ATC CAT GCG ATC GGA GCC GAT GCA A
McVHA-a	a-ges-NcoI-r	AAA AACC ATG GCC TCT TCT TCT TCA CCA ATC GT
McVHA-c	c-ges-BamHI-f	AAA AGG ATC CAT GTC AAC CGT CTT CAA TGG
McVHA-c	c-ges-NcoI-r	AAA ACC ATG GCT GCC CTT GAC TGT CCA GCT CG
pRSGFP	SacI-GFP-r	GGA ATT CTA GAG AGC TCG CGG CCG CTT TTA

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Antikörper

Antikörper	Antigen	Nachweis
McVHA-a _{nterm}	Cytoplasmatischer N-Terminus von McVHA-a	(3.6.1)
VHA-A	VHA-A selektiv aufgereinigt	Fischer-Schliebs et al., 1997
VHA-D _i	Teilfragment von VHA-B, erkennt sowohl VHA-A als auch VHA-B	Zhigang et al., 1996
VHA-E	VHA-E aufgereinigt aus Tonoplast	Betz und Dietz, 1992
6 x His	6 fach Histidin-Epitop	Invitrogen, Holland
Calreticulin	Calreticulin (ER-Marker)	Crofts et al., 1999
Jim84	Golgi-Marker	Horsley et al., 1993
BP-80	BP-80; vakuolärer Sortierrezeptor	Paris et al., 1997
Gamma-TIP	Aquaporin vom Typ gamma, an der lysosomalen Vakuole	Jauh et al., 1999
Anti-Kaninchen-IgG-AP	Sek. Antikörper zur Detektion im Western-Blot	Sigma, Deissenhofen
Anti-Maus-IgG-POD	Sek. Antikörper, Western-Blot	Roche, Mannheim
Anti-Meerschweinchen-IgG-AP	Sek. Antikörper, Western-Blot	Sigma, Deissenhofen
Anti-Kaninchen-IgG-Cy3	Sek. Antikörper, Immuncytochemie	Sigma
Anti-Meerschweinchen-Cy5	Sek. Antikörper, Immuncytochemie	Sigma
Anti-Ratte-FITC	Sek. Antikörper, Immuncytochemie	Sigma

I.II Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Volumenbezogenes Massenprozent
% (w/w)	Massenprozent
6 x His	Sechsfacher Histidin-Anhang
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Akt	Aktin
AMPS	Ammoniumpersulfat
µg	mikrogramm
AP	Alkaline Phosphatase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CAM	Crassulaceen-Säurestoffwechsel
cDNA	„copy“-DNA oder „complementary“-DNA
CDTA	1,2-Cyclohexyldinitrilotetraessigsäure
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonat
CLSM	Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie
CSPD®	chemilumineszentes Substrat für die alkaline Phosphatase
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
Cy3	Cyanidin3
Cy5	Cyanidin5
DCCD	N, N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Dioxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Äquimolare Mischung aus den Desoxynukleotidtriphosphaten dATP, dGTP, dCTP und dTTP
DTAB	Dodecyltrimethylammoniumbromid
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β-Aminoethylether)-N'-N'-Tetraessigsäure
EM-Puffer	Elektronenmikroskopie Puffer
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EST	Expressed Sequence Tag
EtOH	Ethanol
F-ATPase	F ₀ /F ₁ -ATPase
F-ATPase	Chloroplastidäre oder Mitochondriale ATP-Synthase
FITC	Fluorescein-isothiocyanat bzw.
FRET	Förster-Resonanz-Energietransfer
FV	Fast vacuolar
g	Massenangabe in Gramm

GA	Golgi-Apparat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
Hepes	N-2-Hydroxylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin
InsP ₃	Inositol-triphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LCS	Leica Confocal Software
MBS-Puffer	MOPS-gepufferte Salzlösung
MeOH	Methanol
min	Minute
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	„messenger“-RNA
NBT	Nitroblautetrazoniumsalz
Ni-NTA	an Nitrilotriacetic gebundenes Nickel
nt	Nukleotid
OD ₅₉₀	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pfu	„plaque forming unit“, Anzahl biologisch aktiver Phagen
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(-ethansulfonsäure)
PM	Plasmamembran
PM-ATPase	Plasmamembran-ATPase
Poly(A)	Polyadenin
PP1	Tonoplastidäre Pyrophosphatase Isform 1
PP2	Tonoplastidäre Pyrophosphatase isoform 3
PPase	tonoplastidäre Pyrophosphatase
PP _i -ase	Diphosphatase
PPO	Diphenyloxzol
P-Typ	Plasmalemma-Typ
RACE	Rapid Amplification of cDNA-Ends
RAVE	Regulator of the (H ⁺)-ATPase of the vacuolar and endosomal membranes
RevT	Reverse Transkriptase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR mit zu cDNA umgeschriebener RNA als Matrize
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
sp.	Spezies
SV	slow vacuolar
Taq	DNA-Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

TTP	Thymin-5'-triphosphat
U	Enzymaktivität in $\mu\text{M}/\text{min}$ (= 16,67 nkat)
Ump	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Licht der Wellenlängen 3-400 nm, in dieser Arbeit 245 nm
V-ATPase	Vakuoläre H^+ -ATPase
VHA	Vakuoläre H^+ -ATPase
VTC	Vakuoläre Transport Chaperone
x g	Zentrifugalbeschleunigung ($9,81 \text{ m/s}^2$)

I.III Abbildungen

```

At4g34720 --MSTFSGDETAPFFGFLGAAAALVFSMGAAYGTAKSGVGVASMGVMRPELVMKSIVPV 58
At2g16510 --MSTFSGDETAPFFGFLGAAAALVFSMGAAYGTAKSGVGVASMGVMRPELVMKSIVPV 58
At4g38920 --MSTFSGDETAPFFGFLGAAAALVFSMGAAYGTAKSGVGVASMGVMRPELVMKSIVPV 58
At1g19910 -MASTFSGDETAPFFGFLGAAAALVFSMGAAYGTAKSGVGVASMGVMRPELVMKSIVPV 59
At1g75630 MASSGFSGDETAPFFGFLGAAAALVFSMGAAYGTAKSGVGVASMGVMRPELVMKSIVPV 60

At4g34720 VMAGVLGIYGLIIAVIIISTGINPKAKSYLFDGYAHLSSGLACGLAGLSAGMAIGIVGDA 118
At2g16510 VMAGVLGIYGLIIAVIIISTGINPKAKSYLFDGYAHLSSGLACGLAGLSAGMAIGIVGDA 118
At4g38920 VMAGVLGIYGLIIAVIIISTGINPKAKSYLFDGYAHLSSGLACGLAGLSAGMAIGIVGDA 118
At1g19910 VMAGVLGIYGLIIAVIIISTGINPKAKSYLFDGYAHLSSGLACGLAGLSAGMAIGIVGDA 119
At1g75630 VMAGVLGIYGLIIAVIIISTGINPKAKSYLFDGYAHLSSGLACGLAGLSAGMAIGIVGDA 120

At4g34720 GVRANAQQPKLFVGMILILIFAEALALYGLIVGIISSRAGQSRAE 164
At2g16510 GVRANAQQPKLFVGMILILIFAEALALYGLIVGIISSRAGQSRAE 164
At4g38920 GVRANAQQPKLFVGMILILIFAEALALYGLIVGIISSRAGQSRAE 164
At1g19910 GVRANAQQPKLFVGMILILIFAEALALYGLIVGIISSRAGQSRAE 165
At1g75630 GVRANAQQPKLFVGMILILIFAEALALYGLIVGIISSRAGQSRAE 166

```

Abb. A. 1: Vergleich aller Isoformen des Proteolipids von *A. thaliana*. Die Sequenzen mit der Zugangsnummer der Arabidopsis Datenbank wurden mit dem Programm ClustalW (EMBL, Hinxton verglichen)

```

At4g32530 MSGVVALGHASSWGAAALVRISPYTFSAIGIAISIGVSVLGAAWGIYITGSSSLIGAAIEAP 60
At2g25610 MSG-VAI-HASSWGAAALVRISPYTFSAIGIAISIGVSVLGAAWGIYITGSSSLIGAAIEAP 58

At4g32530 RITSKNLISVIFCEAVAIYGVIVAVIILQTKLESVPSSKMYDAESLRAGYAI FASGIIVGF 120
At2g25610 RITSKNLISVIFCEAVAIYGVIVAVIILQTKLESVPSSKMYDAESLRAGYAI FASGIIVGF 118

At4g32530 ANLVCGLCVGIIGSSCALSDAQNSTLFVKILVIEIFGSALGLFGVIVGIIIMSAQATWPTK 180
At2g25610 ANLVCGLCVGIIGSSCALSDAQNSTLFVKILVIEIFGSALGLFGVIVGIIIMSAQATWPT- 177

```

Abb. A.2: Vergleich der beiden Isoformen von *AtVHA-c'*. Die beiden Isoformen der Untereinheit *c'* des Proteolipids mit den Zugangsnummern der *Arabidopsis*-Datenbank wurden mit dem Programm ClustalW verglichen.

I. IV Eintragung der neu klonierten Sequenzen in die „Nucleotide Sequence Database“, EMBL (Hinxton)

Die im Rahmen dieser Arbeit neu klonierten cDNA-Sequenzen wurden unter folgenden AccNr. hinterlegt:

mcvha-A	AJ276326
mcvha-d	AJ439342
mcvha-a	AJ438978
mcvha-B	AJ438590
mcvha-G	AJ438591
mcvha-H	AJ438592
mcvha-e	AJ438879

Lebenslauf

Name Christoph Kluge
Geburtsdatum 18.6.1969
Geburtsort Darmstadt
Nationalität Deutsch

Schulbildung

1975- 1978 Grundschule Seeheim-Jugenheim
1978- 1980 Förderstufe Schuldorfs Bergstraße, Seeheim
1980- 1988 Gymnasiale Oberstufe Schuldorf Bergstraße, Seeheim
Mai 1988 Abiturprüfungen

Studium

1990- 1992 Studium der Lebensmitteltechnologie an der TU München, Weihenstephan
1992- 1998 Studium der Biologie an der Universität Würzburg
1992- 1994 Grundstudium
Okt. 1994 Vordiplom im den Fächern Botanik, Zoologie, Chemie und Physik
1994- 1997 Hauptstudium mit den Schwerpunkten Botanik, Genetik und Biochemie
Mai 1997 Mündliche Diplomprüfung in den Fächern Botanik (Schwerpunkt Pflanzenphysiologie), Genetik und Biochemie
Juli 1997- Juli 1998 Diplomarbeit am Julius von Sachs Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg Thema: „Klonierung und molekulare Charakterisierung der Untereinheit D der vakuolären H⁺-ATPase in *Arabidopsis thaliana*“, Betreuer Prof Dr. Karl-Josef Dietz
August 1998 Erhalt des Diploms
Seit August 1998 Promotion an der Universität Bielefeld am Lehrstuhl für Stoffwechselphysiologie und Biochemie der Pflanzen, Prof Dr. Karl-Josef Dietz
Mai- Juni 2000 Forschungsaufenthalt an der Himachal Pradesh University, Shimla, Indien
Oktober- November 2001 Forschungsaufenthalt am Insitute de sciences vegetale, CNRS, Gif sur Yvette, Frankreich

Liste der Veröffentlichungen:

- Belimov AA, Safronova VI, Sergeyeva TA, Egorova TN, Matveyeva VA, Tsyganov VE, Borisov AY, Tikhonovich IA Kluge C, Preisfeld A, Dietz KJ, Stepanok VV (2001)** Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Canadian Journal Of Microbiology* 47 (7): 642-652
- Dietz KJ, Tavakoli N, Kluge C, Mimura T, Sharma SS, Harris GC, Chardonnens AN, Golldack D (2001)** Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *J Exp Bot* 52 (363): 1969-1980
- Finkemeier I, Kluge C, Metwally A, Grotjohann N, Dietz KJ (2002)** Reprogramming of Cd-induced gene expression under nitrogen deficiency in *Hordeum vulgare*. *Plant Physiology*, submitted
- Kluge C, Golldack D, Dietz KJ (1999)** Subunit D of the vacuolar H⁺-ATPase of *Arabidopsis thaliana*. *BBA-Biomembranes* 1419 (1): 105-110
- Tavakoli N, Kluge C, Golldack D, Mimura T, Dietz KJ (2001)** Reversible redox control of plant vacuolar H⁺-ATPase activity is related to disulfide bridge formation in subunit E as well as subunit A. *Plant Journal* 28 (1): 51-59

Mitteilungen zu Tagungsbänden:

- Kluge C, Tavakoli N, Golldack D, Dietz KJ (2000)** Cloning and characterization of subunits of the vacuolar type ATPase in the halotolerant, facultative CAM-Plant *Mesembryanthemum crystallinum*. Mitteilungsband der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Jena, S. 58
- Kluge C, Golldack D, Dietz KJ (1998)** Molecular cloning of a cDNA encoding subunit D of the Vacuolar type H⁺-ATPase in *Arabidopsis thaliana*. Mitteilungsband der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Bremen, Supplement

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt habe und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle aus der Literatur ganz oder annähernd entnommene Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation weder vollständig noch teilweise einer anderen Fakultät mit dem Ziel vorgelegt worden ist, einen akademischen Titel zu erwerben.

Hiermit bewerbe ich mich erstmals um den Doktorgrad der Naturwissenschaften der Universität Bielefeld.

Bielefeld, den 14. 06. 2002

(Christoph Kluge)

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier ISO 9706

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mir beim Zustandekommen dieser Arbeit geholfen haben. Besonders möchte ich dabei:

-Prof Dr. Karl-Josef Dietz für die Betreuung der Arbeit und die Überlassung des Themas,

-Dr. Beatrice Saitiat-Jeunemaitre für die erfolgreiche Zeit am ISV,

-Dr. Uwe Kahmann für die mikroskopischen Aufnahmen,

-Dr. Magarete Baier, Dr. Andrea Kandlbinder und Dr. Frank Horling für das Korrekturlesen,

-den Leuten von W5 und speziell meiner Arbeitsgruppe für eine schöne Zeit und die kleinen und grossen Hilfen des Laboralltages,

-m. s. a. s. Susannes

-und meinen Eltern

danken.