

Aus dem Bereich Biophysik
Theoretische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Topologie und Relativbewegungen
stielbildender Untereinheiten der V_1 -ATPase
aus der Tabakswärmerraupe *Manduca*
sexta

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2004**

Vorgelegt von: Vincenzo Filippo Rizzo
geb. am 26. Mai 1977 in Homburg/Saar

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1 Zusammenfassung	6
1.1 Zusammenfassung	6
1.2 Abstract	7
2 Einleitung	9
2.1 Die vakuoläre ATPase	9
2.2 Die Tabakswärmerraupe <i>Manduca sexta</i>	11
2.3 Ablösung und Rückgliederung als Regulationsmechanismus der V-ATPase	13
2.4 Zielsetzung der Arbeit	15
3 Material und Methoden	16
3.1 Präparation der V ₁ ATPase aus <i>Manduca sexta</i>	16
3.2 Dissoziation von V ₁ zu Subkomplexen durch LDAO	19
3.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen an A ₃ B ₃ EG-Subkomplexen	19
3.4 Vernetzungen der V ₁ ATPase	26
3.4.1 Vernetzung der V ₁ ATPase mit CuCl ₂	26
3.4.2 Photoaffinitätsvernetzung durch photoaktivierbare Nukleotidanaloga	27
3.5 Proteolytischer Verdau mit Trypsin	28
3.6 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen	28
3.6.1 Messung der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz in V ₁ ATPase	28
3.6.2 Untersuchung mit Cumarinmaleimid	29
3.7 Bindung von Immunglobulinen an V ₁ ATPase	30
3.8 Affinitätschromatographische Reinigung von Untereinheit E	30
3.9 Gelelektrophorese	31
3.9.1 SDS-Gelelektrophorese	31
3.9.2 Native Gelelektrophorese	32
3.9.3 Coomassie-Färbung	32

Inhaltsverzeichnis

3.9.4 Silberfärbung	33
3.10 Elektrophoretischer Proteintransfer (<i>Western-Blot</i>)	33
3.11 Immunologischer Nachweis	34
3.12 Bestimmung der Proteinkonzentration	35
3.13 Bestimmung der V ₁ ATPase-Aktivität	35
4 Ergebnisse	36
4.1 Präparation der V ₁ ATPase aus <i>M. sexta</i>	36
4.2 Dissoziation von V ₁ zu Subkomplexen durch LDAO	37
4.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen an A ₃ B ₃ EG-Subkomplexen	39
4.4 Proteolytischer Verdau mit Trypsin	41
4.4.1 Proteolytische Spaltung der V ₁ ATPase	41
4.4.2 Tryptischer Verdau der Untereinheit E der V ₁ ATPase aus <i>S. cerevisiae</i>	42
4.5 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen	44
4.6 Vernetzungen der V ₁ ATPase	45
4.6.1 Vernetzung der V ₁ ATPase mit CuCl ₂	45
4.6.2 Vernetzung der V ₁ ATPase mit 8-DiN ₃ -DiB-AP ₄ A	52
4.7 Bindung von Immunglobulinen	54
5 Diskussion	57
5.1 Die vakuoläre ATPase	57
5.2 Struktur und Topologie der V ₁ ATPase aus <i>M. sexta</i>	58
5.3 Topologie der stielbildenden ATPase-Untereinheiten	60
5.4 Dynamik nukleotidabhängiger Bindungen der V ₁ ATPase	63
6 Literaturverzeichnis	66
7 eigene Publikationen	75
8 Dank	76
9 Lebenslauf	77
A Anhang	78
A.1 Ergebnisse der MALDI-Messungen	78

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ADP+P _i	Adenosin-5'-diphosphat und anorganisches Phosphat
AMP-PNP	Adenosin-5'-(β, γ-imido)triphosphat
8-DiN ₃ -DiB-AP ₄ A	P ¹ ,P ⁴ -Di-(3'-Biotinyl-8-azidoadenosin-5'-)- tetraphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Bromo-4-Chloroindoxylphosphat
CM	N-[4-[7-(dimethylamino)-4-methyl]-cumarin-3-yl]- maleimid
DMF	Dimethylformamid
DTSSP	3,3'-dithiobis[sulfosuccinylpropionat]
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid- Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
LDAO	Lauryldimethylaminoxid, N,N-dimethyldodecylamin- N-oxid
LDH	Laktatdehydrogenase
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionisation</i>
MENT	Mannitol, EDTA, NaCl, Tris
NADH	β-Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NBT	Nitroblau Tetrazolium
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SDS	Natriumdodecylsulfat

Abkürzungsverzeichnis

SPIDER	<i>System for Processing Image Data in Electronmicroscopy and Related fields</i>
TBSN	<i>Tris-buffered Saline and Azid</i>
TE	Tris, EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TWAIN	<i>Toolkit without an important name</i>
Tween	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
w/v	Verhältnis Gewicht pro Volumen
w/w	Verhältnis Gewicht pro Gewicht
YPD	Hefe, Pepton, Dextrose

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Durch Ablösen einzelner Untereinheiten mit Hilfe des Detergens Lauryldimethyloxid (LDAO) konnten aus der V_1 ATPase ($A_3:B_3:C:D:E:F:G_2:H_y$) aus *Manduca sexta* hydrolytisch aktive Subkomplexe gewonnen werden. Diese waren A_3B_3DEG (176 % Hydrolyseaktivität relativ zur V_1 ATPase), A_3B_3HEGF (53 %), A_3B_3EG (58 %) und A_3B_3DEGH (47 %). Der zur Hydrolyse minimal notwendige A_3B_3EG -Subkomplex wurde hinsichtlich der Lage der Stieluntereinheiten E und G elektronenmikroskopisch untersucht. Die Bildanalyse der mit Uranylacetat negativ kontrastierten A_3B_3EG -Moleküle zeigte die sechs hexagonal und alternierend angeordneten Untereinheiten A und B. Im Zentrum des Hexamers befand sich die Untereinheit E mit G. Der A_3B_3EG -Subkomplex wurde auch im Verhalten beim zeitaufgelösten proteolytischen Verdau mit der vollständigen V_1 ATPase aus *M. sexta* und der Untereinheit E aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* verglichen. Während die ungeschützte Untereinheit E aus *S. cerevisiae* innerhalb weniger Minuten gespalten wurde, verzögerte der partielle Schutz durch die katalytischen Untereinheiten A und B im A_3B_3EG -Subkomplex die Spaltung der Untereinheit E durch Trypsin. In der kompletten V_1 ATPase war die Untereinheit E durch die Stieluntereinheiten C, D, F, G und H von der Proteolyse abgeschirmt, so dass die Spaltung noch weiter protrahiert wurde. Der zur Topologiebestimmung genutzte Nulllängenvernetzer $CuCl_2$ führte zu den Vernetzungsprodukten A–B–E, A–B–D–E und D–E. Die Kreuzvernetzung mit dem photoaktivierbaren Nukleotidanalogen P^1, P^4 -Di-(3'-Biotinyl-8-azidoadenosin-5'-)-tetrphosphat (8-DiN₃-DiB-AP₄A) ergab die Produkte E–G, A–F(–G), A–B–E–G und D–E. Das mit beiden Kreuzvernetzern auftretende Produkt aus dem zentralen Kopplungselement E und der Stieluntereinheit D zeigte ihre räumliche Nähe zueinander. Bei der fluores-

zenzspektroskopischen Untersuchung der an die katalytische Untereinheit A der V_1 ATPase gebundenen Fluoreszenzsonde N-[4-[7-(dimethylamino)-4-methyl]-cumarin-3-yl]-maleimid (CM, Cumarinmaleimid) änderte sich die Sondenumgebung durch die Bindung von MgATP und MgADP bei einer Abnahme der Intensität um 20 % (ATP) bzw. 25 % (ADP) hin zum hydrophileren Milieu. Die Bindung von MgAMP-PNP und MgADP+ P_i bewirkte keine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums, die Intensität der Emission erhöhte sich um 10 % (ADP+ P_i) bzw. 25 % (AMP-PNP). Die Untersuchung der intrinsischen Fluoreszenz des in den Untereinheiten A, B, C und H enthaltenen Tryptophans ergab in Abhängigkeit von der Bindung eines Nukleotids eine Abnahme der Fluoreszenzintensität um 50 % in Anwesenheit von MgADP+ P_i bzw. 65 % (MgADP) und 72 % (MgATP). In Anwesenheit des nicht hydrolysierbaren Nukleotidanalogs MgAMP-PNP war die Abnahme um 77 % am stärksten. Dabei fand keine durch Verschiebung der Emissionsmaxima messbare Änderung der Umgebung der Tryptophane statt. Die Fluoreszenzspektroskopie verdeutlichte die Kopplung von der Nukleotidbindung am A_3B_3 -„Köpfchen“ der V_1 ATPase über die Stieluntereinheiten zum membrangebundenen V_O -Teil bis zu dem daraus resultierenden Transport von Ionen über die Membran.

1.2 Abstract

By detachment of single subunits of V_1 ATPase ($A_3:B_3:C:D:E:F:G_2:H_y$) from *Manduca sexta* with the detergent Lauryldimethyloxide (LDAO) hydrolytical active subcomplexes could be won. These were A_3B_3 DEG, A_3B_3 HEGF, A_3B_3 EG and A_3B_3 DEGH with a hydrolytic activity of 176 %, 53 %, 58 % and 47 % relative to the V_1 ATPase, respectively. The A_3B_3 EG-subcomplex, which was minimum necessary for hydrolysis, was examined through electron microscopy in regard to the location of the stalkforming subunits E and G. Image analysis of the uranyl-acetate negative stained A_3B_3 EG-molecule showed six hexagonal and alternating arranged subunits A and B. In the center of the hexamere subunits E and G were located. The A_3B_3 EG-subcomplex was also compared in its behavior of limited tryptic digestion to the complete V_1 ATPase from *M. sexta* and subunit E from the yeast *Saccharomyces*

cerevisiae. While the unprotected subunit E from *S. cerevisiae* was digested within few minutes, the partial protection by the catalytic subunits A and B delayed cleaving of the subunit E in the A_3B_3EG -subcomplex. Subunit E was shielded by the stalk-subunits C, D, F, G and H against proteolysis in the complete $V_1ATPase$, so digestion was further prolonged. In order to identify the topology of the $V_1ATPase$ the zero-length crosslinker $CuCl_2$ was used, resulting in the cross-linking formations A–B–E, A–B–D–E and D–E. Crosslinking with the photoaffinity label and nucleotide analogue P^1, P^4 -Di-(3'-Biotinyl-8-azidoadenosine-5'-)-tetraphosphate (8-DiN₃-DiB-AP₄A) caused the products E–G, A–F(–G), A–B–E–G and D–E. The product of the central coupling element E and the stalk subunit D, which appeared with both crosslinkers, showed their proximity to each other. During the fluorescence-spectroscopic investigation of the fluorescence probe N-[4-[7-(dimethylamino)-4-methyl]-coumarine-3-yl]-maleimide (CM, Coumarinmaleimide), which was bound to the catalytic subunit A of the $V_1ATPase$, the probe neighborhood changed by the addition of MgATP and MgADP with a reduction of the intensity of approx. 20% (ATP) resp. 25% (ADP) to a more hydrophilic environment. Binding of MgAMP-PNP and MgADP+P_i did not cause any shift of the fluorescence maximum, the intensity of the emission increased by 10% (ADP+P_i) resp. 25% (AMP-PNP). The examination of the intrinsic fluorescence of the tryptophanes contained in the subunits A, B, C and H resulted in a reduction of the fluorescence intensity depending on the binding of a nucleotide at approx. 50% in presence of MgADP+P_i resp. 65% (MgADP) and 72% (MgATP). In presence of the not hydrolyzable nucleotide analogue MgAMP-PNP the decrease was highest with 77%. No changes of the environment of the tryptophanes measurable by shift of the emission maxima took place. Fluorescence spectroscopy showed the coupling of the nucleotide binding site at the A_3B_3 -“headpiece“ of the $V_1ATPase$ via the stalk subunits to the membrane-bound V_O -part with the resulting transport of ions across the membrane.

2 Einleitung

2.1 Die vakuoläre ATPase

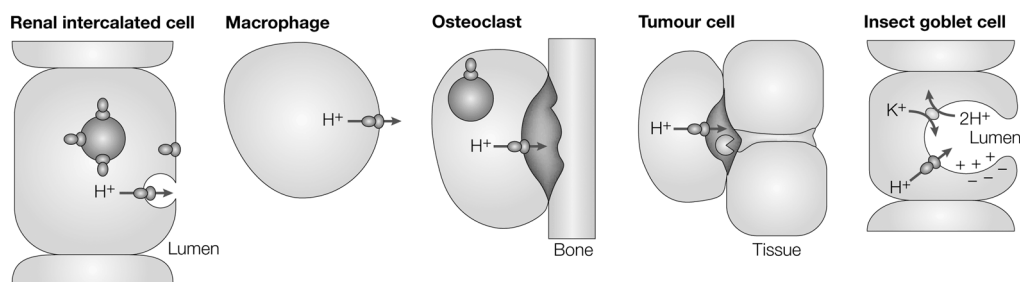


Abb. 2.1: Funktionen von Plasmamembran-V-ATPasen. V-ATPasen in Schaltzellen der Nieren säuern den Urin an. V-ATPasen in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten regeln das pH-Gleichgewicht im Zytoplasma. Die Knochenresorption von Osteoklasten benötigt die Ansäuerung der Knochenkontaktfläche. Tumorzellen können eine extrazelluläre Ansäuerung zur Steigerung der Aktivität abgesonderter lysosomaler Enzyme bei der Metastasenbildung nutzen. In Becherzellen erzeugt die V-ATPase ein positives Membranpotenzial, das die K^+ -Sekretion über einen H^+/K^+ -Antiporter antreibt. (aus NISHI UND FORGAC (2002)).

Überall, wo Protonen bewegt werden müssen, um eine saure Umgebung zu gewährleisten, wird dies durch die vakuoläre ATPase bewerkstelligt. Sie transportiert Protonen aus dem Zytoplasma in das Lumen einer Vakuole und nutzt dabei die Energie aus der ATP-Spaltung. Dadurch ist sie Teil einer Reihe von Mechanismen. Da kein Gegenion transportiert wird, wirkt der Protonentransport elektrogen und erzeugt ein elektrochemisches Potenzial ($\Delta\Psi$) über der Membran. Dieses Potenzial kann sekundär zum Transport anderer Ionen und Substrate durch die Membran von Organellen genutzt werden (FINBOW UND HARRISON, 1997). So ist die vakuoläre (H^+)-ATPase im proximalen Tubulus und im Sammelrohr der Niere, reguliert durch Aldosteron (WINTER ET AL., 2004), an der Rückresorption von Bikarbonat beteiligt (NAKHOUL UND HAMM, 2002), in Osteoklasten sorgt sie für einen sauren pH, um Knochensubstanz abbauen zu können (BLAIR ET AL., 1989), in der Epididymis und der Vas deferens ist

2 Einleitung

der durch die vakuoläre ATPase erzeugte saure pH nötig zur Reifung der Spermien (BRETON ET AL., 1996). Auch die Energie für die Aufnahme und Speicherung von Neurotransmittern in synaptischen Vesikeln wird durch sie bereitgestellt (NELSON, 1993). Selbst wenn beim Anblick erlesener Speisen das Wasser im Munde zusammenfließt, ist die vakuoläre ATPase der Speicheldrüsen dabei involviert (ROUSSA ET AL., 1998). Im weiteren Verlauf des Verdauungsprozesses sorgt die V-ATPase für die Aktivierung von Zymogenen wie Proinsulin zu Insulin im Pankreas (THEVENOD, 2002). Sie spielt aber auch eine Rolle bei krankhaften Zuständen. Im Magen ermöglicht sie dem Virulenzfaktor *VacA* des gramnegativen Keims *Helicobacter pylori* die Bildung saurer Vakuolen, die dieser zum Wachstum benötigt (MONTECUCCO UND RAPPUOLI, 2001). Ein weiteres Beispiel für die klinische Bedeutung ist die Blockierung der V-ATPase durch Pyocyanin, einem Exotoxin des vor allem bei an zystischer Fibrose erkrankten Patienten gefürchteten Keimes *Pseudomonas aeruginosa* (RAN ET AL., 2003). Diese Blockade führt zur Deaktivierung der alveolären Makrophagen, was die Eindämmung der Infektion weiter verzögert (BIDANI ET AL., 2000).

Der Name der V_1V_O -ATPase ist abgeleitet von der verwandten F-ATPase. Deren F_1 -Teil ist als sog. „Faktor 1“ der ATP-Synthase beschrieben worden (PENEFSKY ET AL., 1960). Die mitochondriale F-ATPase lässt sich durch das Antibiotikum Oligomycin hemmen, daher erhielt der membranständige Teil, an dem Oligomycin bindet, die Bezeichnung F_O (KAGAWA UND RACKER, 1966). Analog zu diesen Bezeichnungen erhielt der membranständige, für den Ionentransport verantwortliche Teil der vakuolären ATPase die Benennung V_O , der hydrophile Teil, an dem die ATP-Hydrolyse stattfindet, den Namen V_1 . Dieser hydrophile Teil mit den Nukleotidbindungsstellen besteht aus einem „Köpfchen“ mit den hexagonal angeordneten Untereinheiten A und B (RADERMACHER ET AL., 1999) und einem zentralen Stiel aus den Untereinheiten C, D, E, F, G und H (SVERGUN ET AL., 1998). Dieser Stiel stellt die Verbindung zum ionentranslozierenden membranständigen Teil dar.

In den letzten zehn Jahren haben sich verschiedene Modelle zur Topologie der vakuolären ATPase entwickelt. Einen Überblick gibt Abb. 2.2. Wie die Untereinheiten im Stiel zueinander angeordnet sind, wird aktuell noch diskutiert. Ein Augenmerk liegt dabei auf der Rolle der

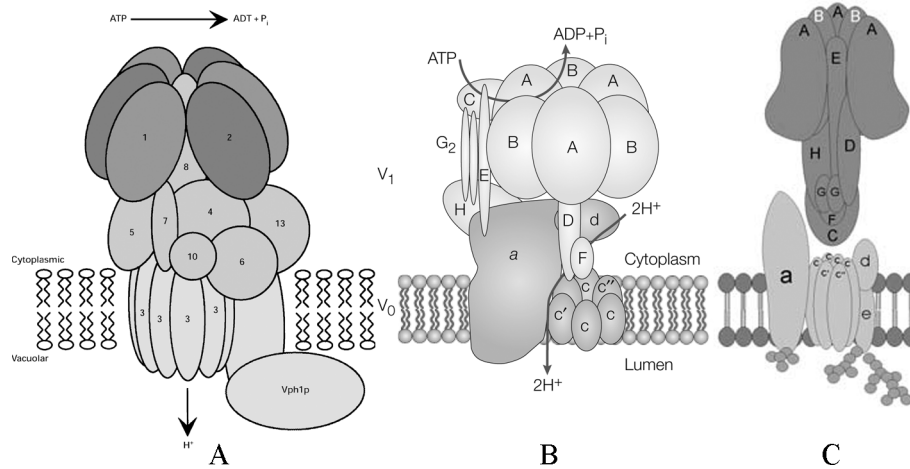


Abb. 2.2: Vergleich der Topologiemodelle der vakuolären ATPase. (A) FINBOW UND HARRISON (1997) postulieren D (8) und E (4) gemeinsam als stielbildende Untereinheiten mit D als zentralem Kopplungselement; (B) NISHI UND FORGAC (2002) sehen D als zentrales Kopplungselement und E als Grundgerüst für einen zweiten, peripheren Stiel als Stator; (C) in GRÜBER (2003) ist ein kompakter Stiel mit Untereinheit E als zentralem Kopplungselement beschrieben.

Untereinheiten D und E, die jeweils als zentral für die Kopplung des hydrophilen mit dem membranständigen Teil der V-ATPase gelten, ein weiterer auf den Untereinheiten C und H, für die es keine homologe Struktur in der F₁ATPase gibt.

2.2 Die Tabakschwärmerraupe *Manduca sexta*

Die grosse Menge an V-ATPase, die aus den epithelialen Plasmamembranen des Gastrointestinaltrakts der Tabakschwärmerraupe *Manduca sexta* gewonnen werden kann, macht diese zu einem idealen Lieferanten für dieses Enzym. Die Larve der *M. sexta* ernährt sich hauptsächlich von Tabakpflanzen, wobei ihr die pflanzlichen Alkaloide, darunter das Nikotin, keinen Schaden zufügen. Diese Eigenschaft machte sie vor Einführung chemischer Pflanzenschutzmittel zu einem gefürchteten Schädling in den Tabakanbauregionen des nordamerikanischen Kontinents, wo *M. sexta* beheimatet ist. Ein Manducaweibchen legt bis zu 200 Eier mit einem Durchmesser von jeweils einem Millimeter und einem Gewicht von einem Milligramm. Die geschlüpften Larven durchlaufen fünf Stadien und nehmen dabei innerhalb von drei Wochen um das zehntausendfache an Gewicht zu. Eine Larve im fünften Larvalstadium ist in der La-

2 Einleitung

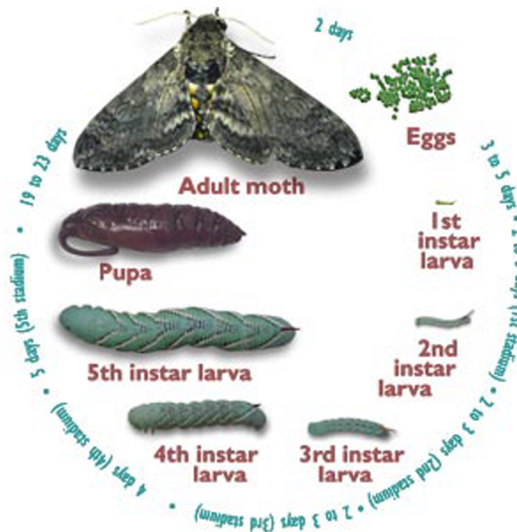


Abb. 2.3: Die Tabakswärmerraupe *Manduca sexta*. Lebenszyklus von *M. sexta* mit den Stadien Ei, den fünf larvalen Stadien, Puppe und adultes Tier (Bild von <http://www.manducaproject.com/>, University of Arizona).

ge, eine Tabakpflanze an einem Tag zu fressen. Am Ende dieses Stadiums graben sich die Manducalarven in die Erde ein und verpuppen sich. Nach der vollständigen Metamorphose entpuppt sich das adulte Tier mit einer Spannweite von bis zu zwölf Zentimetern. Es ernährt sich hauptsächlich vom Nektar des japanischen Geissblatts und der Petunie. Das Weibchen lockt das Männchen mit einem Pheromon aus einer Drüse an der Spitze ihres Abdomens an. Nach der Befruchtung beginnt sie mit der Eiablage, bevorzugt auf der Unterseite von Tabakblättern. Zur Gewinnung der vakuolären ATPase ist der Mitteldarm der Larve im fünften Larvalstadium am besten geeignet. Die Larve wird dazu vor der Präparation 14 Stunden auf Hunger gesetzt. Das Darmepithel muss in diesem Zustand keine Aminosäuren sekundär aktiv aufnehmen, es besteht also kein Bedarf an dem durch die V-ATPase bereitgestellten elektrochemischen Potenzial. Um diese Energie zu sparen, wird der V_1 -Teil von dem in der Membran verbleibenden V_O -Teil abgelöst und so der Energiebedarf um bis zu 85 % reduziert (MERZENDORFER ET AL., 1997). Dieser eigentlich der Ökonomie dienende Regulationsmechanismus erlaubt die hohe Ausbeute von bis zu 1 mg V_1 ATPase pro zehn Raupen.

2.3 Ablösung und Rückgliederung als Regulationsmechanismus der V-ATPase

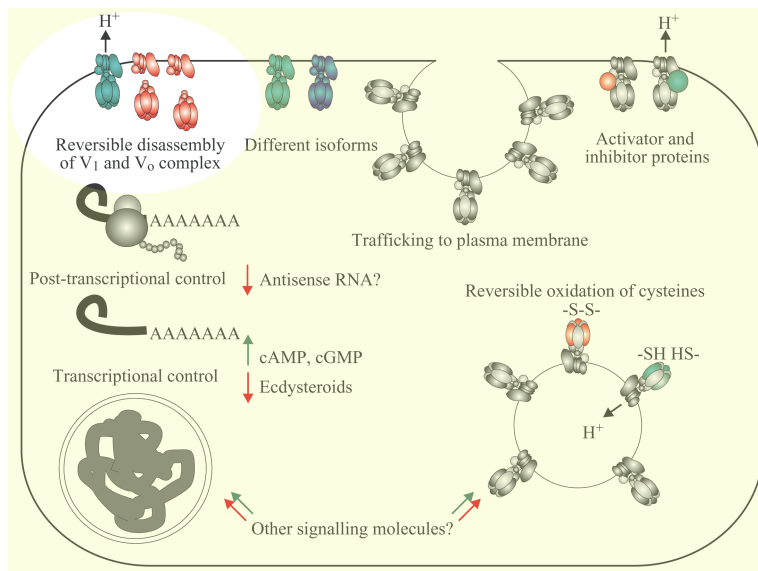


Abb. 2.4: Übersicht über verschiedene mögliche Regulationsmechanismen der vakuolären ATPase in Insekten. (aus WIECZOREK ET AL. (2000))

Die reversible Ablösung des V_1 -Teils vom V_0 -Teil ist eines von mehreren Regulationsmechanismen der V-ATPase bei Insekten (s. Abb. 2.4). Diese reversible Ablösung wurde nicht nur bei der V-ATPase der *M. sexta* beobachtet, sondern ist auch ein Regulationsmechanismus in der V-ATPase der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (KANE, 1995). Dort fand die Ablösung durch Entzug des Energielieferanten Glukose statt und wurde durch die erneute Zugabe von Glukose wieder rückgängig gemacht. Ähnliche Wirkung hatte auch eine Erhöhung der Salzkonzentration der Umgebung (s. Abb. 2.5, PERZOV ET AL. (2001)). Auch in Zellen des Immunsystems wird dieser Mechanismus verwendet. Unreife dendritische Zellen besitzen die Fähigkeit, unterschiedliche Antigene aufzunehmen und zu prozessieren. Es beginnt eine Reifung und die Sekretion von Chemokinen. Diese Transformation benötigt eine Erniedrigung des lysosomalen pHs. Der im Zytosol der unreifen dendritischen Zellen gelöste V_1 -Teil vereinigt sich wieder mit dem in der Lysosomenmembran verbliebenen V_0 -Teil (s. Abb. 2.6) und nimmt seine Arbeit als Protonenpumpe auf (TROMBETTA ET AL., 2003). Die reifenden

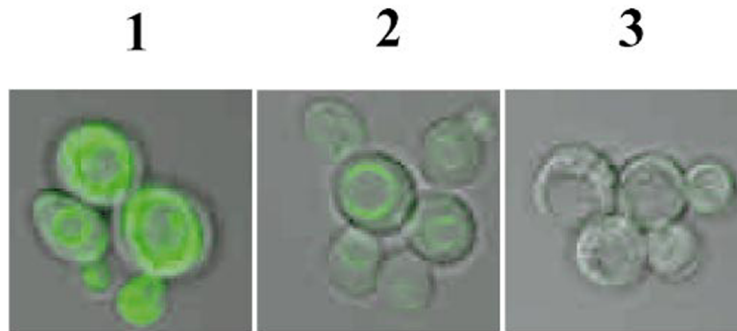


Abb. 2.5: Hefezellen markiert mit dem pH-Indikator LysoSensor Green DND-189 unter verschiedenen Umgebungsbedingungen. (1) Hefezellen auf YPD-Medium zeigen eine starke Fluoreszenz der Vakuolenmembran und damit eine starke Ansäuerung (2) Der gleiche Hefezellstamm auf YPD-Medium unter Zugabe von 0,8 mM NaCl verringert den Protonentransport in die Vakuole (3) Hefezellen, denen integrierende V_0 -Untereinheiten fehlen ($stv1\Delta/vph1\Delta$), zeigen keinerlei Protonenpumpenaktivität mehr (aus PERZOV ET AL. (2001)).

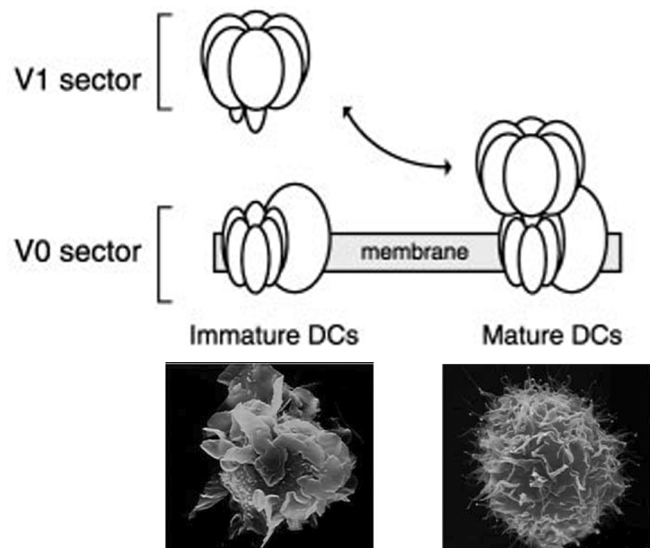


Abb. 2.6: Schema der Ablösung in dendritischen Zellen während ihrer Reifung von antigenaufnehmenden Zellen zu T-Zell-stimulierenden Zellen und damit einhergehende morphologische Änderungen. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen jeweils eine unreife und eine reife dendritische Zelle (Schema aus TROMBETTA ET AL. (2003), elektronenmikroskopische Aufnahmen von Walter Storkus und Robert Mailliard, University of Pittsburgh, School of Medicine).

dendritischen Zellen wandern in den regionären Lymphknoten und präsentieren den dort residierenden naiven T-Zellen die Antigene gemeinsam mit MHC-II-Molekülen und der zweite Abschnitt der spezifischen Immunabwehr beginnt.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war die strukturelle und funktionelle Charakterisierung des V_1 -Teils der vakuolären ATPase aus *Manduca sexta* auf biochemischer und biophysikalischer Ebene. Ein besonderes Augenmerk galt dabei der Rolle der Untereinheit E.

3 Material und Methoden

3.1 Präparation der V_1 ATPase aus *Manduca sexta*

Materialien und Reagenzien:

MENT-Puffer:	300 mM Mannitol 5 mM Na-EDTA 50 mM NaCl 17 mM Tris/HCl, pH 7,5
TE-Puffer:	16 mM Tris/HCl, pH 8,1 0,32 mM Na-EDTA
Puffer A:	20 mM Tris/HCl, pH 8,1 50 mM NaCl
Puffer B:	20 mM Tris/HCl, pH 8,1 1 M NaCl

0,5 M Pefabloc SC
gesättigte Ammoniumsulfatlösung
40 % Saccharose-Lösung
 β -Mercaptoethanol

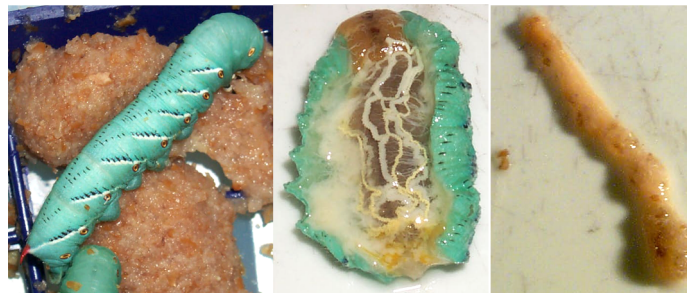


Abb. 3.1: *M. sexta* vor, während und nach der Präparation. Während der Präparation wurden möglichst alle Tracheen und Malpighi-Gefäße entfernt sowie der Darm von Kot befreit.

Die Präparation erfolgte nach GRÄF ET AL. (1996) mit Modifikationen aus RIZZO ET AL. (2003). Die Larven von *Manduca sexta* im fünften Larvalstadium wurden 14 Stunden vor Beginn der Präparation auf Nahrungskarenz gesetzt. Der Gastrointestinaltrakt wurde nach min-

3 Material und Methoden

destens 10-minütiger Kältenarkotisierung in einer Eisbox nach Dekapitation und Abtrennung des letzten Abdominalsegmentes durch einen dorso-medianen Zugang entnommen. Tracheen und Malpighi-Gefässe wurden entfernt (s. Abb. 3.1). Die Därme wurden sofort in mit 25 ml MENT-Puffer gefüllten und mit 150 μ l Proteaseinhibitor Pefabloc SC (biomol) versetzten Zentrifugenröhrchen überführt. Noch vorhandene Kotreste wurden durch dreifaches Spülen mit MENT-Puffer entfernt. Zum Schutz vor proteolytischem Verdau wurde vor jedem weiteren Schritt 100–150 μ l Pefabloc SC zugegeben. Die Därme wurden 50 sek homogenisiert (Ultra-Turrax, Janke&Kunkel) und anschliessend für 5 min bei 4°C mit 10 000 \times g zentrifugiert (Kühlzentrifuge: Kontron Hermle Centrikon H-401, Rotor: A8.24) Der Überstand wurde 25 min bei 4°C mit 185 000 \times g zentrifugiert (Ultrazentrifuge: Beckman L8 55-M, Rotor: 50.2 Ti). Dieser Überstand wurde in einem Vakuumfilter (Bottle Top Filter, Nalgene Labware, mit Nylonfilter Magna Supported Plain, Porengrösse 0,22 μ m) filtriert und 30 min mit gleichem Volumen Ammoniumsulfat unter Rühren auf Eis gefällt. Die Fällung wurde 5 min bei 4°C mit 11 000 \times g pelletiert (Kühlzentrifuge: Beckman J2-HS, Rotor: JA-20). Das Pellet wurde in 8 ml TE-Puffer resuspendiert.

	0 %	10 %	20 %	30 %	40 %
TE-Puffer	45 ml	18 ml	18 ml	9 ml	0 ml
40 % Saccharose	0 ml	6 ml	18 ml	27 ml	45 ml
5 M NaCl	450 μ l	240 μ l	360 μ l	360 μ l	450 μ l
Mercaptoethanol	31,5 μ l	16,2 μ l	21,6 μ l	21,6 μ l	31,5 μ l
Gesamtvolumen	45,48 ml	24,27 ml	36,39 ml	36,39 ml	45,48 ml

Tab. 3.1: Pipettierschema zur Herstellung eines Saccharose-Dichtegradienten.

Gradientenröhrchen (OptiSeal, Beckman) wurden mit einem diskontinuierlichen Gradienten mit 40, 30, 20 und 10 % Saccharose nach Tabelle 3.1 gefüllt und die Probe aufgetragen (s. Abb. 3.2). Die Endkonzentration an β -Mercaptoethanol betrug 9,6 mM, die Na⁺-Konzentration 50 mM. Die Gradienten wurden 90 min bei 4°C mit 200 000 \times g zentrifugiert (Ultrazentrifuge: Beckman L8 55-M, Vertikalrotor: VTi 50) und anschliessend mittels ei-

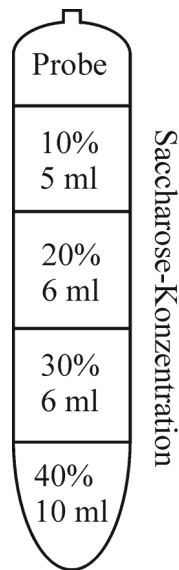


Abb. 3.2: Saccharosedichtegradient für zonale Dichtegradientenzentrifugation

ner Peristaltikpumpe fraktioniert. Die 20 %-Saccharose-Fraktion wurde nach Filtrieren (FP 30/0,2 CA-S, Schleicher&Schuell) mit Hilfe einer FPLC-Anlage (Controller LCC-501 Plus, 2× Pump P-500, UV-Controller UV-1, Optical Unit UV-1, Amersham Biosciences) aufgereinigt. Erst erfolgte eine Austauschchromatographie über eine Anionenaustauschsäule (1 ml MonoQ[®] HR 5/5, Amersham Biosciences). Die Flussrate betrug 1 ml/min, die Salzkonzentration wurde linear von 5 % Puffer B (entspricht 97,5 mM Na⁺) auf 25 % (entspricht 287,5 mM Na⁺) erhöht. Der zweite erhaltene Peak wurde gesammelt und mittels Mikrokonzentrationsröhrchen (Centricon 100, Ausschlussgrösse 100 kDa, amicon bioseparations) bei 1 000 × g konzentriert. Das Konzentrat wurde auf eine Sephacryl-Grössenausschlussäule S-300 HR (10/30, Pharmacia) gegeben und bei einer Flussrate von 0,5 ml/min und einer Konzentration an Puffer B von 10 % (entspricht 145 mM Na⁺) eluiert. Der erhaltene Peak wurde wieder in einem Centricon-Röhrchen auf ein Endvolumen zwischen 100 und 200 µl gebracht.

3.2 Dissoziation von V_1 zu Subkomplexen durch LDAO

Materialien und Reagenzien:

Puffer A: 20 mM Tris/HCl, pH 8,1
150 mM NaCl

β -Mercaptoethanol
Lauryldimethylaminoxid (LDAO)

Die Abspaltung von Subkomplexen von V_1 wurde durch Inkubation des Proteins in Puffer A in An- und Abwesenheit von 9,6 mM β -Mercaptoethanol und verschiedenen Konzentrationen an Lauryldimethylaminoxid (LDAO 30 % Solution, Calbiochem) induziert (RIZZO ET AL., 2003). Die Endkonzentrationen an LDAO wurden von 0,05–0,5 % variiert. Die Proben wurden für jeweils eine Stunde auf Eis geschüttelt und auf eine Sephacryl S-300 HR Grössenausschluss säule (10/30, Amersham Biosciences) aufgetragen. Bei einer Flussrate von 0,5 ml/min wurde das Protein in An- und Abwesenheit von β -Mercaptoethanol bzw. des Detergens LDAO aufgereinigt. Fraktionen, die Subkomplexe enthielten, wurden gesammelt und nach Equilibrierung der Säule mit Puffer A ohne LDAO ein zweites Mal auf die gleiche Säule gegeben. Zur Kontrolle wurden SDS-Gele nach 3.9.1 angefertigt.

3.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen an A_3B_3EG -Subkomplexen

Materialien und Reagenzien:

Puffer A 20 mM Tris/HCl, pH 8,1
150 mM NaCl

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erstellte freundlicherweise Dr. Michael Radermacher am Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt/Main. Zur Elektronenmikroskopie wurde nach 3.2 behandeltes Protein mit Puffer A auf 20–40 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt. Die Probe wurde auf 400 kohlebeschichtete Kupfer-Netze aufgebracht und mit Uranylacetat gefärbt (Negativkontrastierung). Die Aufnahmen wurden mit einem Philips CM 120 Elektronenmikroskop bei einer 58 300-fachen Vergrößerung mit niedriger Elektronendosis ($10 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$) erstellt. Ein Flachbett SCAI Mikrodensitometer (Zeiss) las die Negative mit einer Pixelgröße von 7 μm

ein. Die Bilder wurden auf eine endgültige Pixelgrösse von $21\ \mu\text{m}$ reduziert, entsprechend $3,6\ \text{\AA}$ im Massstab der Einzelprobe. Die weiteren Berechnungen wurden im Rahmen dieser Arbeit mit der Software *SPIDER* (FRANK ET AL., 1996) in der Version 5.0 mit Erweiterungen aus dieser Arbeitsgruppe durchgeführt (RIZZO ET AL., 2003).

Aus elf Aufnahmen wurden 2132 Einzelbilder ausgewählt (s. Abb. 3.3) und normalisiert. Das Auswahlkriterium für die Partikel war ein ausreichender Abstand zu benachbarten Partikeln, so dass sich keine Überschneidungen ergeben.

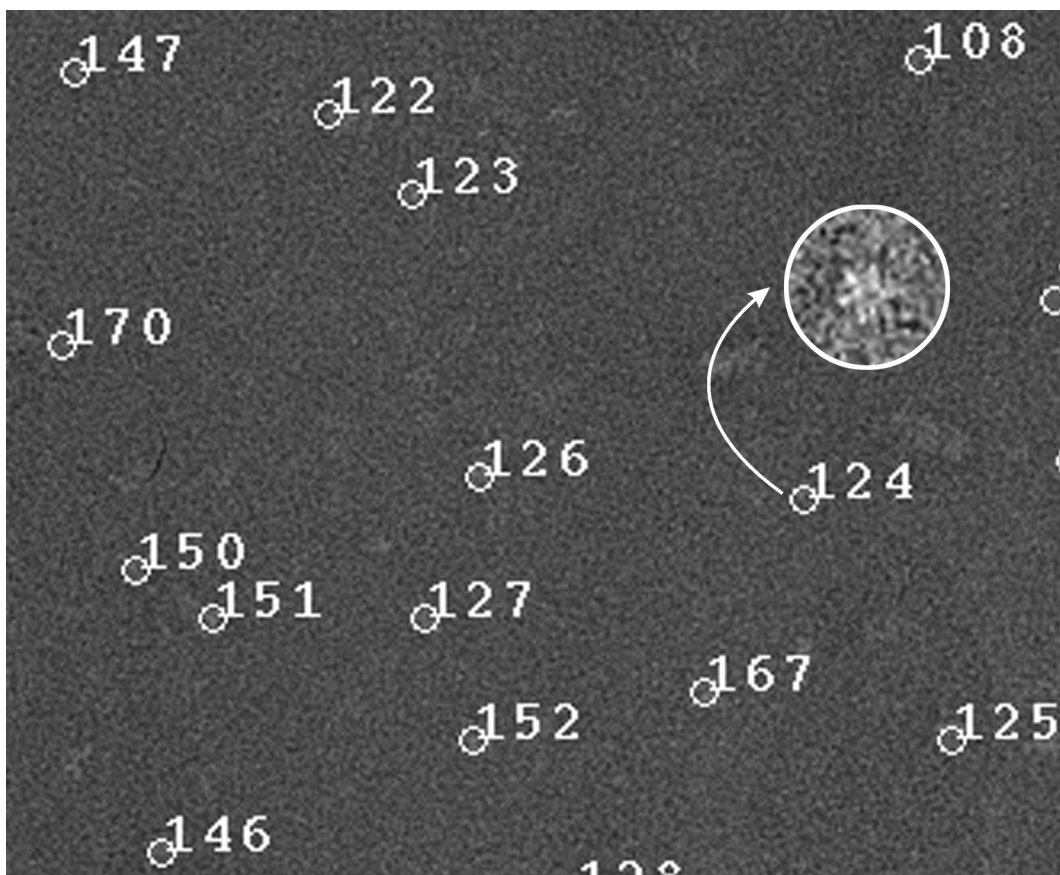


Abb. 3.3: Auswahl von Partikeln für die Bildanalyse mit der Software *SPIDER*. In elf Aufnahmen wurden insgesamt 2132 Partikel nach Sicht ausgewählt. Partikel 124 wurde zur Verdeutlichung herausvergrößert.

In einer Übersichtszusammenstellung wurden manuell Partikel aus der Auswahl herausgenommen, die sich zu nah am Bildrand befanden (s. Abb. 3.4).

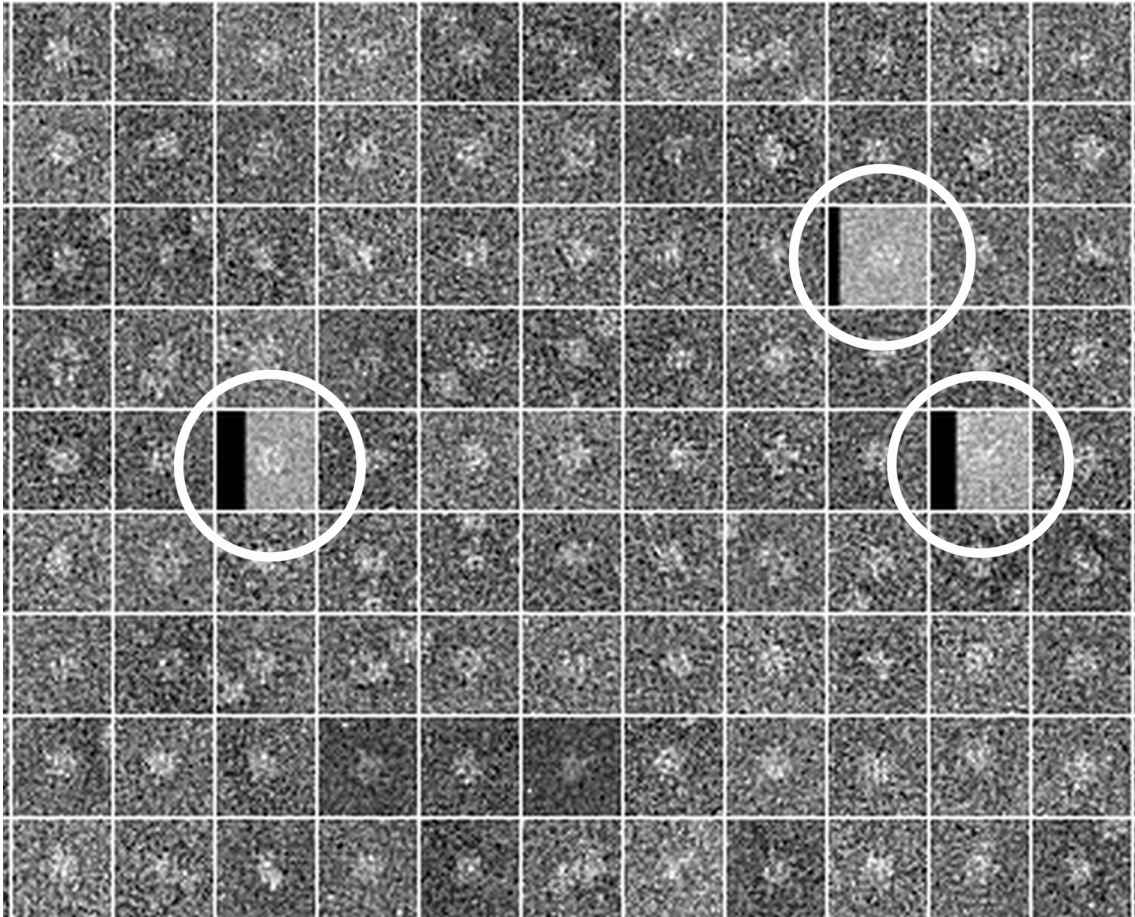


Abb. 3.4: Erstes Verwerfen randständiger Einzelpartikel. Partikel, die sich zu nahe am Bildrand befanden, wurden verworfen (eingekreist).

Partikelfreie Bildbereiche unterschiedlicher Helligkeit wurden zur Bestimmung eines Standardhintergrunds ausgewählt. Dieses Rauschen wurde vom Signal der Einzelbilder abgezogen und diese so normalisiert (s. Abb. 3.5).

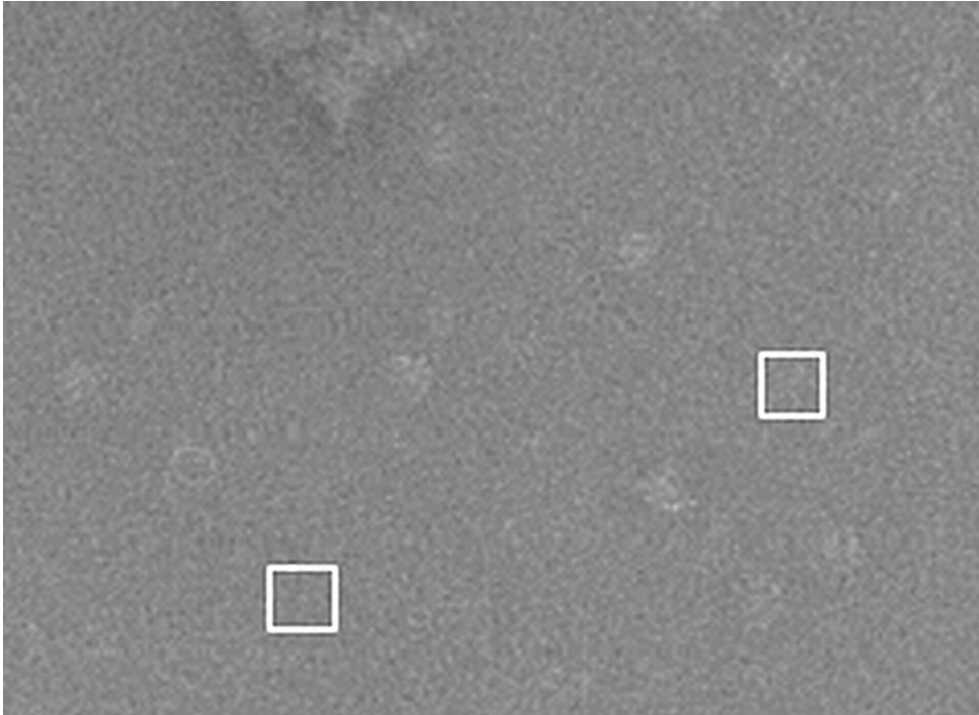


Abb. 3.5: Auswahl von partikelfreien Bereichen zur Normalisierung des Hintergrunds.

Durch Übereinanderlegen aller Einzelbilder wurde ein erstes Durchschnittsbild gewonnen. Anhand dessen wurde ein Radius von 28 Pixeln um die Bildmitte als Partikelradius festgelegt (s. Abb. 3.6).

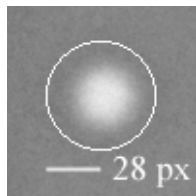


Abb. 3.6: Ziehen eines Radius von 28 Pixeln um das Zentrum des Partikels.

Die Partikel wurden so verschoben, dass die Partikelzentren in der Mitte des Bildausschnitts zu liegen kamen. Nach diesem Schritt wurden wieder die Bilder verworfen, die sich zu nahe am Bildrand befanden, so dass schliesslich 2080 Einzelbilder zur weiteren Verarbeitung übrig blieben (s. Abb. 3.7).

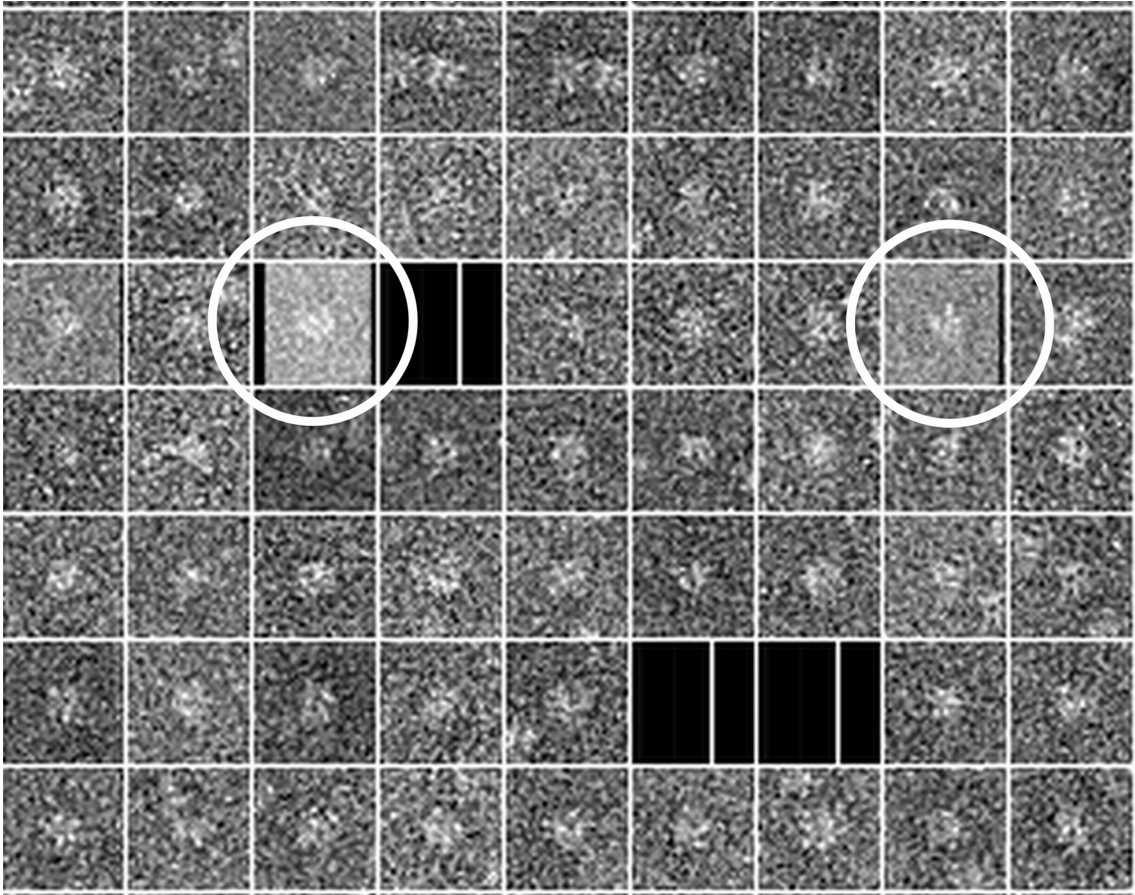


Abb. 3.7: Verwerfen ungeeigneter Einzelpartikel nach Zentrieren. Nach dem Zentrieren der Partikel wurden solche, die sich zu nahe am Bildrand befanden, verworfen (eingekreist). Schwarze Kästen markieren Einzelpartikel, die im ersten Durchgang (s. Abb. 3.4) verworfen wurden.

Mit einem mathematischen Transformationsverfahren nach RADON (1917) in der Implementierung von RADERMACHER (1988) wurde die Ausrichtung der einzelnen Partikel bestimmt (s. Abb. 3.8).

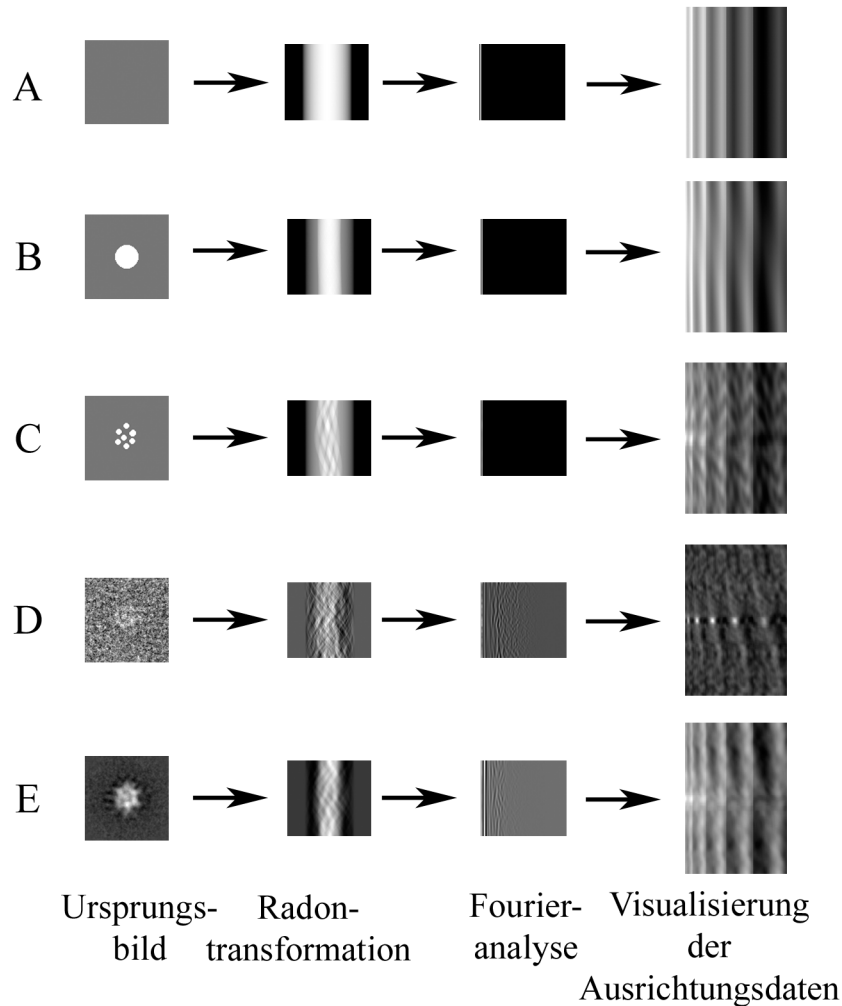


Abb. 3.8: Visualisierung der Fourier-Radon-Transformation. Jedes Einzelbild wurde nach dem Fourier-Radon-Verfahren analysiert. Erst wurde das Bild Radon-transformiert, das Ergebnis Fourier-analysiert. Anhand dieses Ergebnisses wurde dann die Ausrichtung des Partikels bestimmt. Zur Verdeutlichung wurde in A ein leerer Hintergrund, in B ein Kreis mit 28 Pixel Durchmesser und in C eine Figur mit 6 Kreisen und einem weiteren von der Mitte versetzten Kreis der gleichen Prozedur unterzogen. D zeigt ein Einzelpartikel, E ein Durchschnittsbild aus mehreren schon ausgerichteteten und klassifizierten Partikeln.

Mit den durch die Radontransformation erhaltenen Werten konnten die Einzelpartikel durch Drehen und Verschieben in der Ausrichtung angeglichen werden (s. Abb. 3.9).

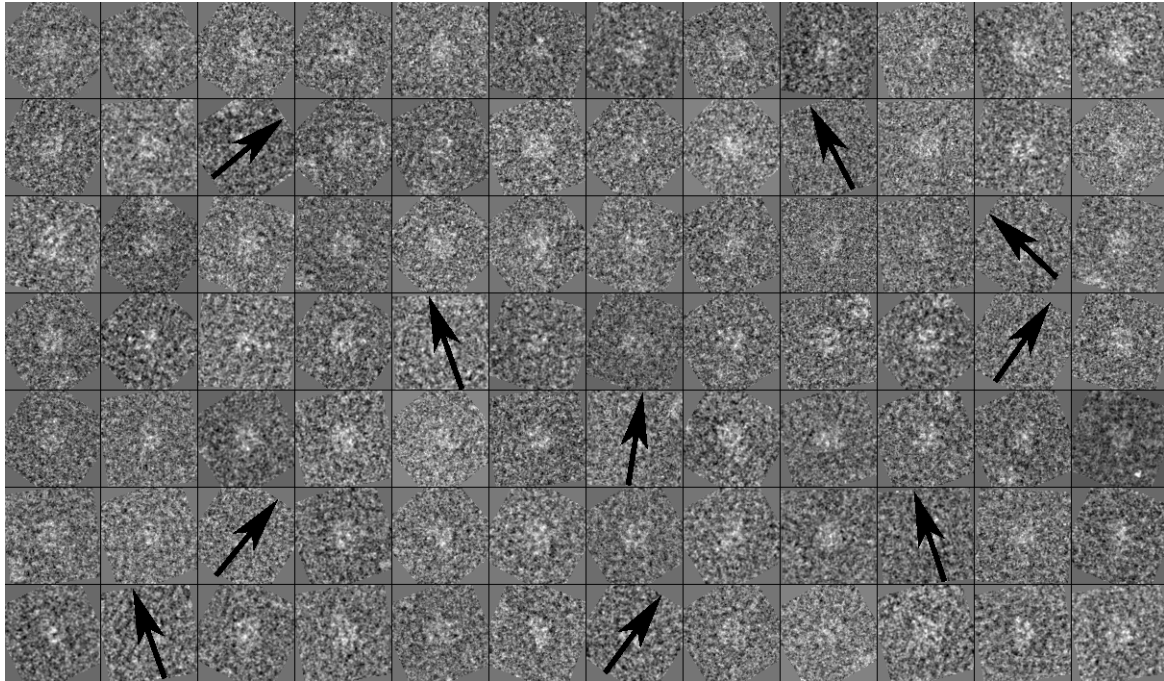


Abb. 3.9: Drehen und Verschieben der Einzelbilder nach der Fourier-Radon-Analyse. Nach der Fourier-Radon-Analyse wurden die Einzelbilder so gedreht, dass alle Partikel die gleiche Ausrichtung zeigen. Die Pfeile bezeichnen die ursprüngliche Ausrichtung ausgewählter Einzelpartikel.

Diese erste Ausrichtung war Basis für weitere referenzgestützte Ausrichtungen, die mit jedem Durchlauf die Ausrichtung und die Detailgenauigkeit der entstehenden Durchschnittsbilder verfeinern sollte (s. Abb. 3.10).

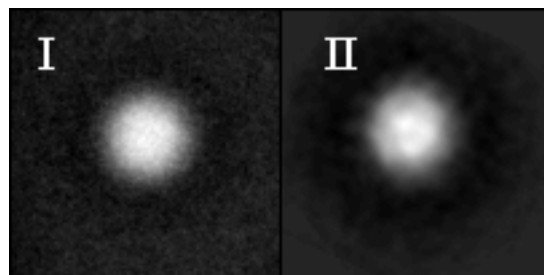


Abb. 3.10: Vergleich der Durchschnittsbilder vor (I) und nach (II) der ersten Ausrichtung. Nach der Ausrichtung zeichnen sich die ersten groben Strukturen ab.

Nach jedem Ausrichten wurde eine Korrespondenzanalyse durchgeführt und die Einzelbilder nach Didays' Methode des „verschobenen Zentrums“ (*la méthode des nuées dynamiques*) (DIDAY, 1971) in Klassen eingeteilt. In jedem Schritt wurden sechs Durchschnittsklassen erstellt und als Referenz für eine Multireferenzausrichtung herangezogen. Für jede Klassifikation durch Korrespondenzanalyse wurden 100 Iterationen durchgeführt. Alle Ausrichtungen basierten auf der Kreuzkorrelation zweidimensionaler Radontransformationen. Die Auflösung wurde mit einer Fourierreingkorrelation nach BÖTTCHER ET AL. (1997) bestimmt.

3.4 Vernetzungen der V_1 ATPase

3.4.1 Vernetzung der V_1 ATPase mit CuCl_2

Materialien und Reagenzien:

Puffer: 50 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 8,1
40 mM Nukleotide: AMP-PNP, ATP, ADP+ P_i oder ADP
40 mM MgCl_2
40 mM CuCl_2
EDTA
Methanol
1 M DTT

V_1 ATPase wurde in einer 300 kDa Spectra/Por Dialysemembran (Spectrum Laboratories) gegen 500 ml Puffer dialysiert. Nach Zugabe des Nukleotids und von MgCl_2 in einer Endkonzentration von jeweils 4 mM inkubierte V_1 ATPase auf Eis für 5 min auf der Wippe. Die Vernetzung startete durch Zugabe von 2 mM CuCl_2 und wurde nach 30 min durch EDTA in einer Endkonzentration von 10 mM gestoppt. Die Proben wurden anschliessend auf ein SDS-Gel nach 3.9.1 aufgetragen. Nach der Coomassie-Färbung (s. 3.9.3) wurden einzelne Gelspuren ausgeschnitten und in Röhrchen mit 50 ml Volumen (Greiner) gelegt, wo sie 120 min in 15 ml Puffer inkubierten, der zusätzlich 5 mM DTT und 0,2 % SDS enthielt. Zur weiteren Analyse der Vernetzungsprodukte wurde die Gelspur horizontal in das Trenngel eines zweiten SDS-Gels eingegossen. Der Auftragspuffer (5-fach Laemmli, s. 3.9.1) enthielt dabei zusätzlich 40 mM DTT. Eine weitere Versuchsreihe wurde in Anwesenheit von Methanol durchgeführt. Dabei wurde die V_1 ATPase mit dem jeweiligen Nukleotid und MgCl_2 mit Methanol in einer

Endkonzentration von 25 % auf Eis inkubiert. Die weitere Behandlung erfolgte analog zu den Versuchen ohne Methanol (COSKUN ET AL., 2004).

3.4.2 Photoaffinitätsvernetzung durch photoaktivierbare Nukleotidanaloga

Materialien und Reagenzien:

Puffer A:	150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 8,1
Inkubationspuffer:	Puffer A, mit NaOH auf pH 10,5 titriert
Puffer B:	3 × SDS-Probenauftragspuffer, Puffer A, 50 mM DTT
40 mM Nukleotide:	AMP-PNP, ATP oder ADP
2 mM MgCl ₂ oder CaCl ₂	
3,2 mM 8-DiN ₃ -DiB-AP ₄ A	
Methanol	

Das photoaktivierbare Nukleotidanaloga 8-DiN₃-DiB-AP₄A wurde freundlicherweise von Prof. Dr. H.-J. Schäfer vom Institut für Biochemie an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz zur Verfügung gestellt. 3 µl dialysierte V₁ATPase wurde mit 0,5 mM MgCl₂ und 25 % Methanol bzw. 0,5 mM CaCl₂ ohne Methanol und 5 mM Nukleotiden 5 min lang auf Eis inkubiert. Nach Zugabe der Photoaffinitätssonde 8-DiN₃-DiB-AP₄A in einer Endkonzentration von 0,5 mM wurden die Ansätze 30 min in einer Mikrotiterplatte mit einer UV-Quelle der Wellenlänge $\lambda=366$ nm (UV-Strahler N-6L, 1 W, Konrad Benda) in einem Abstand von 3 cm bestrahlt. Die Dunkelkontrolle wurde nicht bestrahlt. Die Proben wurden anschliessend auf ein SDS-Gel nach 3.9.1 aufgetragen. Ausgewählte Banden des SDS-Gels wurden ausgeschnitten und eine Stunde in je 1,5 ml Inkubationspuffer bei 37 °C inkubiert. Die Gelstücke wurden anschliessend in 20 µl Puffer B unter starkem Schütteln im Thermoschüttler bei 95 °C gekocht. Nach 10 min Zentrifugieren bei 12 100 × g (MiniSpin, Eppendorf) wurde der Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen, welches nach 3.9.4 silbergefärbt wurde.

3.5 Proteolytischer Verdau mit Trypsin

Materialien und Reagenzien:

Trypsinpuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5
150 mM NaCl
40 mM MgCl₂
40 mM AMP-PNP
8 mM Pefabloc SC
Methanol

Die zu spaltenden Proteine (V₁ATPase aus *M. sexta*) bzw. Untereinheiten (Untereinheit E der V₁ATPase aus *Saccharomyces cerevisiae*) wurden in Verhältnissen Protein:Trypsin von 400:1, 800:1 und 900:1 (w/w) bei 30°C inkubiert (GRÜBER ET AL., 2002). Zu definierten Zeitpunkten stoppte der Proteaseinhibitor Pefabloc SC in einer Endkonzentration von 8 mM die Reaktion. Der Verdau der V₁ATPase in Anwesenheit von Nukleotiden erfolgte unter Zugabe von MgCl₂ in einer Endkonzentration von 2 mM und dem jeweiligem Nukleotid in einer Endkonzentration von ebenfalls 2 mM. Das Ergebnis des Verdaus wurde in SDS-Gelen nach 3.9.1 kontrolliert. Weitere Versuche wurden in Anwesenheit von Methanol durchgeführt. Dabei inkubierten die untersuchten Proteine zusätzlich mit Methanol in einer Endkonzentration von 25 %.

3.6 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

3.6.1 Messung der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz in V₁ATPase

Materialien und Reagenzien:

Puffer: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5
Nukleotide: 40 mM AMP-PNP
40 mM ATP
40 mM ADP+P_i
40 mM ADP
40 mM MgCl₂
25 % Methanol

Die intrinsische Tryptophanfluoreszenz wurde mit einem *Varian Cary Eclipse* Fluoreszenzspektrophotometer gemessen. Vor der Messung inkubierte das mit Puffer auf einen Gehalt von

ca. 16 μg verdünnte Protein mit MgCl_2 und dem Nukleotid für 5 min in einer jeweiligen Endkonzentration von 2 mM auf Eis in Anwesenheit von 25 % Methanol. Gemessen wurde die Intensität der Emission der Wellenlängen von $\lambda=300\text{--}380$ nm bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda=280$ nm. Die Bandbreite der Anregungsstrahlung betrug wie die der Emissionsstrahlung 5 nm und die Verstärkung der Fotoverstärkerröhre (PMT) 900 V. Zur Auswertung wurde die *Cary Eclipse Scan Application* (Release Date 14/02/2001, SW Vers. 1.0.78) herangezogen (COSKUN ET AL., 2004).

3.6.2 Untersuchung mit Cumarinmaleimid

Materialien und Reagenzien:

Puffer:	20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5
Cumarinmaleimid (CM)	N-[4-[7-(dimethylamino)-4-methyl]cumarin-3-yl]maleimid
Nukleotide:	40 mM AMP-PNP
	40 mM ATP
	40 mM ADP+P _i
	40 mM ADP
	40 mM MgCl_2
	25 % Methanol

Die V_1ATPase inkubierte 10 min mit 50 μM Cumarinmaleimid (CM) bei 10°C (COSKUN ET AL., 2004). Zur Entfernung überschüssigen Cumarinmaleimids wurde die Probe in einer 300 kDa Spectra/Por Dialysemembran (Spectrum Laboratories) gegen 500 ml Puffer dialysiert. Der weitere Verlauf der Inkubation erfolgte wie in 3.6.1 beschrieben. Die Emission der CM-Fluoreszenz zwischen $\lambda=400\text{--}580$ nm wurde mit dem *Varian Cary Eclipse* Fluorimeter bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda=365$ nm gemessen. Die Bandbreite der Anregungsstrahlung betrug wie die der Emissionsstrahlung 5 nm.

3.7 Bindung von Immunglobulinen an V₁ATPase

Materialien und Reagenzien:

Antisera:	Anti-Vma4p (aus Hefe) vom Kaninchen Anti-Vma8p
Puffer A:	20 mM Tris/HCl, pH 8,1 50 mM NaCl
Puffer B:	20 mM Tris/HCl, pH 8,1 1 M NaCl
β -Mercaptoethanol	

Zur Ermittlung des optimalen Verhältnisses von Protein zu Immunglobulinen wurde eine Verdünnungsreihe mit den Antisera durchgeführt. Dazu wurde V₁ATPase in den Gewichtsverhältnissen 1:1, 1:2 und 1:3 mit den jeweiligen Antisera in Anwesenheit von 9,6 mM β -Mercaptoethanol für 3 Stunden unter Schütteln auf Eis inkubiert und danach auf ein natives Gel (s. 3.9.2) aufgetragen.

Für die weiteren Untersuchungen betrug das Verhältnis von Antikörpern zu Protein 2:1. Das Protein inkubierte mindestens 16 Stunden lang über Nacht mit dem jeweiligen Antiserum jeweils in Anwesenheit von 9,6 mM β -Mercaptoethanol und in Abwesenheit von β -Mercaptoethanol unter Schütteln bei 8°C im Kühlschrank. Die Proben wurden daraufhin auf eine Sephacryl S-300 HR Grössenausschlussäule (10/30, Amersham Biosciences) aufgetragen. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min und die Konzentration an Puffer B 10 % (entspricht 145 mM NaCl). Die einzelnen Peaks wurden gesammelt und jeweils nach dem Konzentrieren in Mikrokonzentrationsröhrchen (Centricon 100, Ausschlussgrösse 100 kDa, amicon bioseparations) auf ca. 50 μ l auf ein SDS-Gel (s. 3.9.1) aufgetragen.

3.8 Affinitätschromatographische Reinigung von Untereinheit E

Materialien und Reagenzien:

Ni-NTA-Säule	Nickel-NTA-Agarose, 3 ml Säulenvolumen
E-Puffer:	100 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 8,1, 0,1 % Tween
Imidazolpuffer:	E-Puffer, Imidazol
2,5 M Imidazol	
500 mM Pefabloc SC	

Die gesamte Reinigung der überexprimierten Untereinheit E erfolgte wie bei GRÜBER ET AL. (2002) beschrieben. Die Nickel-NTA-Säule (Ni-NTA-Agarose, Qiagen) wurde dreimal mit 5 ml E-Puffer gewaschen. Der Zellüberstand wurde zum Schutz vor proteolytischem Verdau mit Pefabloc versetzt und auf die Säule aufgetragen. Durch Zugabe von 6 ml 25 mM, 3 ml 50 mM, 3 ml 75 mM, 4,5 ml 100 mM, 3 ml 125 mM und 6 ml 200 mM Imidazol wurde ein Imidazolgradient aufgetragen und die Fraktionen aufgefangen. Die Säule wurde anschliessend zweimal mit 6 ml E-Puffer gewaschen. Zur Kontrolle wurde ein SDS-Gel nach 3.9.1 angefertigt.

3.9 Gelelektrophorese

3.9.1 SDS-Gelelektrophorese

Materialien und Reagenzien:

SDS-Gel:	40 % Acrylamidlösung 1 % Bisacrylamidlösung 2 M Tris/HCl, pH 8,7 250 mM Tris/HCl, pH 6,8 20 % SDS TEMED 10 % APS
Laemmli-Auftragspuffer:	25 mM Tris/HCl, 5 % Saccharose, 2 % SDS, 0,5 % Glycerol, 0,005 % Bromphenolblau, 2 % β -Mercaptoethanol
3 \times SDS Probenauftragspuffer:	New England Biolabs Blue Loading Buffer Pack
Laufpuffer für SDS-Gele:	25 mM Tris, pH > 8,3 200 mM Glycin 0,1 % SDS

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach LAEMMLI (1970) wurde in einer Bio-Rad Mini-Protean[®] 3 Cell Gelkammer durchgeführt. Die verwendeten Gele besaßen im Trenngel einen Acrylamidgehalt (T) von 17,5 %, einen Vernetzungsgrad (C) von 0,47 %, einen SDS-Gehalt von 0,1 % und 330 mM Tris-HCl (pH 8,7). In den Sammelgelen betrug das Verhältnis T:C 5,4 %:2,3 %, der Gehalt an SDS war 0,2 % und zusätzlich waren 125 mM Tris-HCl (pH 6,8) enthalten. Die Polymerisation in den Trenngelen wurde durch Zugabe von 0,05 % APS und 0,1 % TEMED und in den Sammelgelen durch 0,1 % APS und 0,13 % TEMED gestar-

tet. Die Proteinproben wurden mit $3 \times$ SDS Probenauftragspuffer (Blue Loading Buffer Pack, New England Biolabs) bzw. mit $5 \times$ Laemmli-Auftragspuffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im Laufpuffer bei 10–15 mA bis zum Durchlaufen des Sammelgels, danach wurde die Stromstärke auf 25–30 mA erhöht, bis die Lauffront die Gelbegrenzung erreichte. Gefärbt wurden die Gele wie in 3.9.3 beschrieben.

3.9.2 Native Gelelektrophorese

Materialien und Reagenzien:

Gradientengel:	Bio-Rad ReadyGel 4-15 % Tris/HCl, pH 8,8
Auftragspuffer für native Gele	25 mM Tris/HCl, 5 % Saccharose, 0,5 % Glycerol, 0,005 % Bromphenolblau, 2 % β -Mercaptoethanol
Laufpuffer für native Gele:	25 mM Tris, pH > 8,3 200 mM Glycin

Die nativen Gelelektrophoresen nach SCHÄGGER ET AL. (1994) wurden ebenfalls in einer Bio-Rad Mini-Protean[®] 3 Cell Gelkammer durchgeführt. Dazu wurden Gradientengele (Readygel 4–15 % Tris-HCl, Bio-Rad) mit einem %T von 4–15 % Acrylamid benutzt. Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen an Auftragspuffer versetzt. Nach der Elektrophorese mit 15 mA wurden die Gele nach 3.9.3 gefärbt.

3.9.3 Coomassie-Färbung

Materialien und Reagenzien:

Färbelösung:	40 % Methanol, 10 % Eisessig, 0,1 % Coomassie Brilliant-Blue G250
Entfärber I:	10 % Eisessig, 25 % Isopropanol
Entfärber II:	10 % Eisessig, 7,5 % Methanol

Die Gele wurden über Nacht mit der Färbelösung auf einer Wippe behandelt. Entfärbt wurde zunächst für mindestens 30 min in Entfärbelösung I und anschliessend für mindestens eine Stunde in Entfärbelösung II. Visualisiert und digitalisiert wurden die Gele mit einem Epson Perfection 2450 Flachbettscanner mit dem mitgelieferten *TWAIN*-Treiber Ver. 5.53g.

3.9.4 Silberfärbung

Materialien und Reagenzien:

Fixierer:	45 % Methanol, 10 % Essigsäure, 45 % H ₂ O
Farmer's Reducer:	30 mM K ₃ [Fe(CN) ₆] 32 mM Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O
Entwickler:	235 mM Na ₂ CO ₃ , 0,1 % Formaldehyd 2,5 % Na ₂ CO ₃ 10 % Essigsäure 0,1 % AgNO ₃

Die Silberfärbung erfolgte nach der modifizierten Methode von DAMERVAL ET AL. (1987). Die Gele wurden 15 min mit dem Fixierer entfärbt und fixiert. Nach zwei Minuten Behandlung mit 100 ml *Farmer's Reducer* wurde das Gel so lange mit H₂O gewaschen, bis keine Gelbfärbung mehr zu erkennen war. Danach wurde das Gel 15–30 min mit Silbernitrat inkubiert und für je 30 sek mit H₂O und Na₂CO₃ behandelt. Die Reduktion der Silberionen in 100 ml Entwickler wurde nach Erreichen der gewünschten Bandenintensität mit 10 % Essigsäure gestoppt.

3.10 Elektrophoretischer Proteintransfer (*Western-Blot*)

Materialien und Reagenzien:

Anodenpuffer I:	300 mM Tris, 20 % Methanol
Anodenpuffer II:	30 mM Tris, 20 % Methanol
Kathodenpuffer:	40 mM 6-Aminocapronsäure, 30 mM Tris, 20 % Methanol
Ponceau S-Färbelösung:	0,1 % Ponceau S, 5 % Essigsäure
Filterpapier:	Sigma Blotting Paper Electrophoresis Grade
Blotmembran:	Protran BA45 Nitrocellulose Transfermembrane, Schleicher&Schuell Porengröße 0,45 µm

Der elektrophoretische Proteintransfer nach TOWBIN ET AL. (1979) erfolgte im *Semi-Dry*-Verfahren nach KYHSE-ANDERSEN (1984) mit Hilfe eines *Semi-Dry*-Blotgeräts (V20-SDB, Roth). In der Reihenfolge vom Minus- zum Pluspol wurde wie folgt luftblasenfrei geschichtet:

- Zwei Filterpapiere in Kathodenpuffer getränkt
- SDS-Gel in Kathodenpuffer getränkt
- Zwei Nitrocellulose-Blotmembranen in Anodenpuffer II getränkt
- Zwei Filterpapiere in Anodenpuffer II getränkt
- Zwei Filterpapiere in Anodenpuffer I getränkt

Der Transfer wurde mit 1 mA/cm^2 durchgeführt. Zur Kontrolle des Transferergebnisses wurden die Blotmembranen mit 0,02 % Ponceau S-Färbelösung gefärbt.

3.11 Immunologischer Nachweis

Materialien und Reagenzien:

TBSN:	20 mM Tris/HCl, pH 7,5 500 mM NaCl 0,02 % NaN_3
TBSN-Tween:	TBSN mit 0,05 % Tween 20
Gelatine-Blockpuffer Tween:	TBSN-Tween mit 3 % (w/v) Gelatine
Gelatine-Verdünnungspuffer:	TBSN-Tween mit 1 % Gelatine
Reaktionspuffer:	50 mM Tris/HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 50 mM MgCl_2
NBT-Stammlösung A:	75 mg/ml NBT in 70 % DMF
BCIP-Stammlösung B:	50 mg/ml BCIP in reinem DMF
Substratlösung:	45 μl NBT-Stammlösung A 35 μl BCIP-Stammlösung B ad 10 ml Reaktionspuffer
primäre Antiseren:	vom Kaninchen
sekundäre Antiseren:	Anti-Kaninchen-IgG von der Ziege konjugiert mit alkalischer Phosphatase (Sigma)

Jede Spur wurde 60 min mit 1,5 ml Gelatine-Blockpuffer abgesättigt. Das primäre Antiserum wurde nach Tabelle 3.2 mit Gelatine-Verdünnungspuffer verdünnt. Nach Absaugen der Gelatine wurden 1,5 ml davon zu jeder Spur zugegeben und für 60 min auf der Wippe inkubiert. Zur vollständigen Entfernung der primären Antikörper wurde die Gelatine abgesaugt und dreimal für jeweils 5 min mit 1,5 ml TBSN-Tween gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde 1:10 000 mit Gelatine-Verdünnungspuffer verdünnt, davon wurden 1,5 ml zu der Spur gegeben. Nach weiteren 60 min wurde wieder dreimal für 5 min mit TBSN-Tween und ein weiteres mal mit Reaktionspuffer gewaschen. Die Färbung wurde mit 1,5 ml Substratlösung entwickelt und mit H_2O gestoppt, sobald die ersten Banden sichtbar wurden.

Antikörper	Verdünnung
Anti-Vma8p (Hefe)	1:1 000
Anti-Vma4p (Hefe)	1:2 000
Anti-Vma10p (Hefe)	1:2 500–1:750

Tab. 3.2: Verdünnungsfaktoren der Antiseren.

3.12 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit einem kommerziellen BC-Assay (BC Assay for Protein quantitation, Uptima-Interchim) nach der Methode von SMITH ET AL. (1985). Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde Rinderserumalbumin (BSA, Uptima-Interchim) als Eichstandard verwendet, die Extinktion wurde bei Raumtemperatur und einer Wellenlänge von 562 nm im Photometer (Ultrospec® 2100pro, Amersham Biosciences) gemessen.

3.13 Bestimmung der V₁ATPase-Aktivität

Materialien und Reagenzien:

- V₁ATPase-Assay: 25 mM Tris/HCl, pH 7,5
- 25 mM KCl
- 5 mM CaCl₂
- 5 mM KCN
- 2 mM Phosphoenolpyruvat
- 2 mM ATP
- 0,5 mM β-NADH
- 30 Units L-LDH (325 U/mg solid)
- 30 Units Pyruvatkinase (224 U/mg solid)

Die Ca²⁺-abhängige Hydrolyseaktivität des Enzyms wurde bei 37°C mittels eines ATP-regenerierenden V₁ATPase-Assays (LÖTSCHER ET AL., 1984) gemessen. Die Absorption wurde nach Zugabe der Probe zu dem Assay 7 min lang in Abständen von 2 sek bei 340 nm im Photometer (Ultrospec® 2100pro, Amersham Biosciences) detektiert.

4 Ergebnisse

4.1 Präparation der V_1 ATPase aus *M. sexta*

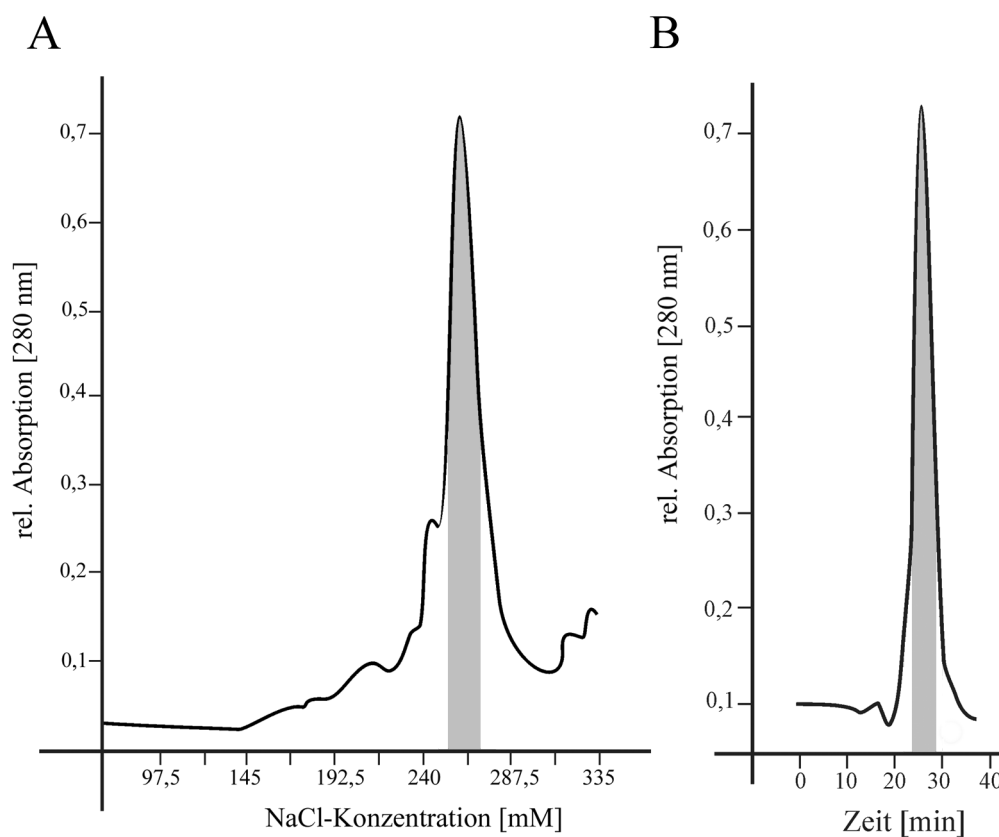


Abb. 4.1: Elutionsprofil der V_1 ATPase nach Ionenaustausch- und Grössenausschluss säule. Die V_1 ATPase eluierte in der Ionenaustausch säule MonoQ 5/5 bei einer Salzkonzentration von 250–280 mM. In der Grössenausschlusschromatographie mit einer Sephacryl-Säule HR 300 eluierte die V_1 ATPase zwischen 17 und 29 min. Die grauen Flächen markieren die zur weiteren Verarbeitung zusammengeführten Fraktionen.

Die V_1 ATPase eluierte bei einer Salzkonzentration von ca. 250 mM NaCl in der Ionenaustauschchromatographie (Abb. 4.1, Tafel A) und nach ca. 17 min in der Grössenausschlusschromatographie (Abb. 4.1, Tafel B).

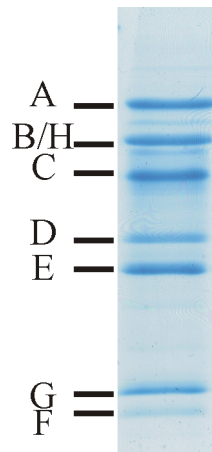


Abb. 4.2: SDS-Gel zur Kontrolle der V_1 -Präparation. Die präparierte V_1 ATPase enthält die Untereinheiten A, B, H, C, D, E, G und F.

Die Reinheit und Vollständigkeit des so erhaltenen Proteins konnte mit SDS-Gelen nach 3.9.1 überprüft werden. In der Coomassie-Lösung färbten sich Proteinbanden entsprechend den Untereinheiten A, B, H, C, D, E, G und F (s. Abb. 4.2).

4.2 Dissoziation von V_1 zu Subkomplexen durch LDAO

Das Ablösen von Subkomplexen aus dem Protein mit Detergenzien ermöglicht die Betrachtung der Zugänglichkeiten zu den Untereinheiten (LÖTSCHER ET AL., 1984). Mit dem zwitterionischen Detergens Lauryldimethylaminoxid (LDAO) gelang es, abhängig von der LDAO-Konzentration und dem Oxidationszustand des Proteins, Subkomplexe von diesem abzulösen. V_1 ATPase inkubierte mit 0,05% LDAO und 9,6 mM β -Mercaptoethanol und wurde danach auf eine Sephacryl S-300 HR-Säule aufgetragen. Bei dieser Grössenausschlusschromatographie war im Puffer ebenfalls 0,1% LDAO zugegen. Nach ca. 18 min eluierte ein hoher Peak, weitere kleinere Peaks nach 44 min. Die Fraktionen des Hauptpeaks wurden zusammengeführt und in Abwesenheit des Detergens auf die gleiche Säule aufgetragen. Das Protein eluierte ohne die Untereinheiten H, C und F (s. Abb. 4.3, Tafel A). Die Hydrolyseaktivität betrug 3 μ mol ATP/mg/min. Mit 0,1% LDAO und β -Mercaptoethanol behandelt ergab sich der Hauptpeak nach 24 min (s. Abb. 4.3, Tafel B). Das Protein enthielt im SDS-Gel die Untereinheiten A,

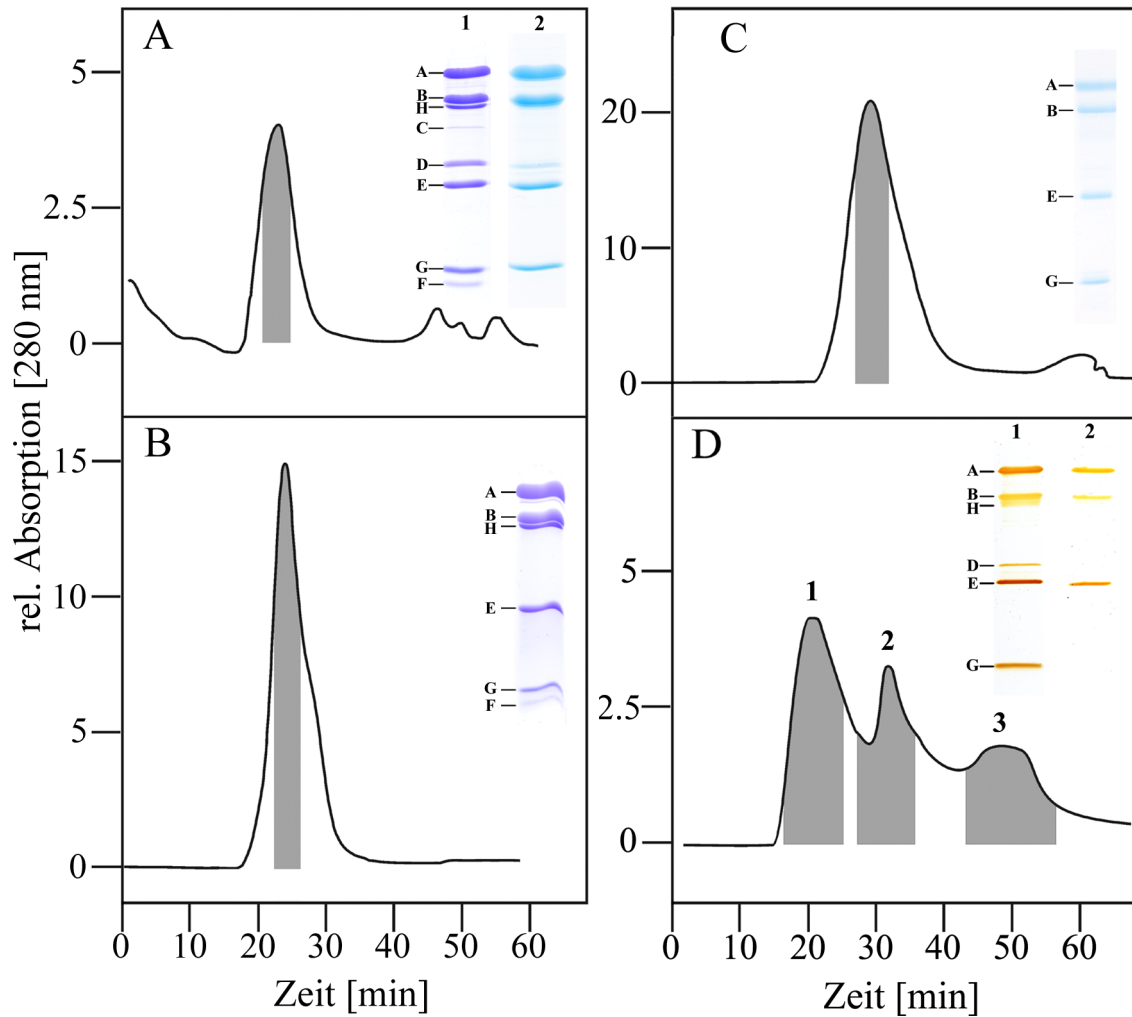


Abb. 4.3: Grössenausschlusschromatographie von V_1 -Subkomplexen. V_1 wurde mit 0,05% (A), 0,1% (B, C) und 0,5% (D) LDAO und in der Ab- (C) und Anwesenheit (A, B, D) von β -Mercaptoethanol behandelt und fraktioniert (A–C). Die grau unterlegten Fraktionen wurden jeweils wieder zur Entfernung des LDAOs aufgetragen. Tafel D zeigt ein Elutionsdiagramm nach diesem zweiten Schritt. Die detergensfreien Proben wurden mit SDS-PAGE und anschliessender Färbung kontrolliert und ihre ATP-Hydrolyseaktivität nach 3.13 gemessen. (Abb. aus RIZZO ET AL. (2003))

B, H, E, G und F mit einer Hydrolyseaktivität von $0,9 \mu\text{mol ATP/mg/min}$. Um die Abhängigkeit vom Oxidationsstatus zu ermitteln, wurde die $V_1\text{ATPase}$ mit $0,1\%$ LDAO, aber ohne das Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol inkubiert und wie vorher beschrieben weiter behandelt. Das Elutionsdiagramm in Abb. 4.3 Tafel C zeigt einen Hauptpeak nach 21 min und weitere Peaks nach 53 min. Im SDS-Gel des in Anwesenheit von β -Mercaptoethanol vom LDAO gereinigten Proteins sind die Untereinheiten A, B, E und G zu finden (s. Abb. 4.3, Tafel C), die Hydrolyseaktivität betrug $1 \mu\text{mol ATP/mg/min}$. Zur Betrachtung des inhibitorischen Effekts von LDAO in höheren Konzentrationen wurde $V_1\text{ATPase}$ mit $0,5\%$ LDAO und β -Mercaptoethanol inkubiert. Es eluierte im ersten Grössenausschlusschromatogramm als breiter Peak. Bei Entfernung des Detergens im zweiten Säulenschritt zeigten sich drei Peaks (s. Abb. 4.3, Tafel D). Der erste Peak enthielt einen V_1 -Komplex ohne die Untereinheiten C und F mit einer spezifischen Aktivität von $0,8 \mu\text{mol ATP/mg/min}$, der zweite Peak einen Komplex aus A, B und E, der keine Hydrolyseaktivität zeigte. Der dritte Peak enthielt nur Detergens.

4.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen an A_3B_3EG -Subkomplexen

In Abb. 4.4 sind Klassen ähnlicher Einzelpartikel zusammengefasst und nach ihrer Anzahl und ihrem Ähnlichkeitsgrad angeordnet. Je zentraler, desto grösser ist die Anzahl der in dieser Partikelklasse enthaltenen Einzelbilder, je grösser der Abstand zum Zentrum, desto grösser ist die Differenz des identischen Aussehens. Zu erkennen sind hexagonal angeordnete Partikel mit zentraler siebter Masse. Je weiter man in der Abbildung nach unten und links geht, desto mehr erscheint die zentrale siebte Masse stielförmig herausgezogen, hervorgerufen durch die zunehmende Neigung der Partikel.

Drei Durchschnittsbilder aus 501, 490 und 456 Einzelpartikeln in Abb. 4.5 zeigen ebenfalls sechs hexagonal angeordnete Massen mit einem Gesamtdurchmesser von ca. 115 \AA . Im Zentrum dieser Anordnung erkennt man eine weitere Masse. Durchschnittsbild II zeigt die zentrale Masse näher an einer der äusseren Massen.

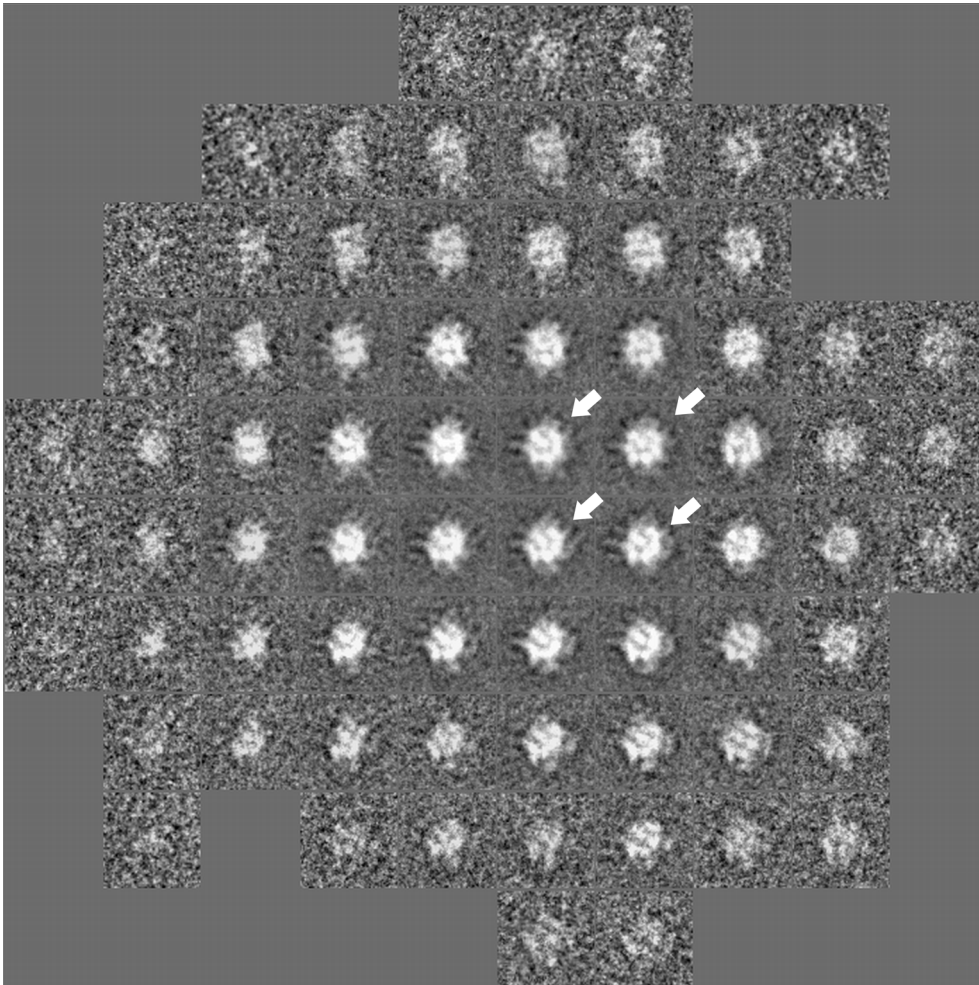


Abb. 4.4: Ergebnis der Korrespondenzanalyse von 2080 Einzelbildern. Die Tafel zeigt die Variationen innerhalb der Einzelpartikel. Je geringer der Abstand voneinander ist, desto ähnlicher sind sich die Bilder. Die hexagonalen Ansichten sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

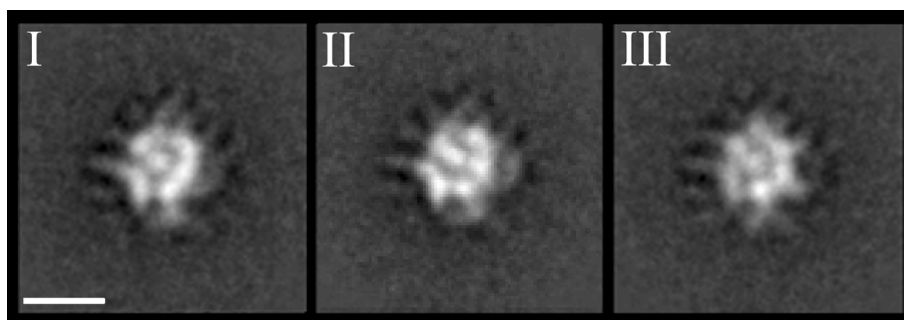


Abb. 4.5: Durchschnittsbilder des A_3B_3EG -Komplexes. Die Durchschnittsbilder I, II und III wurden aus 501, 490 und 456 Einzelpartikeln berechnet. Der Balken entspricht 10 nm.(Abbildung aus RIZZO ET AL. (2003))

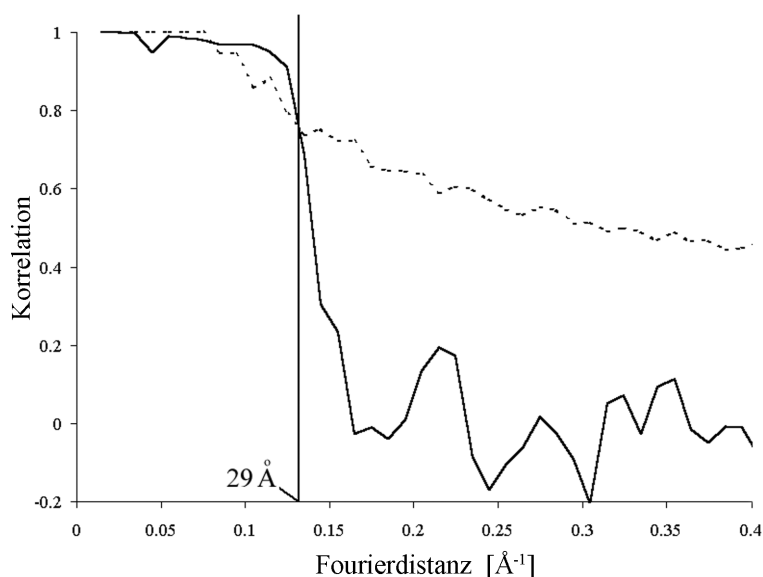


Abb. 4.6: Bestimmung der Auflösung mit Fourier-Ringkorrelation. Kurve der Fourier-Ringkorrelation (durchgezogene Linie) und Rauschverhältniskurve (gestrichelte Linie). (Abbildung aus RIZZO ET AL. (2003))

Die Auflösung der endgültigen Klassen wurde mit der Fourier-Ringkorrelation bei einer *cut-off*-Frequenz von fünffacher Rauschkorrelation ($FRC_5 = 5 \frac{1}{\sqrt{N}}$) ermittelt und betrug 29 Å (s. Abb. 4.6).

4.4 Proteolytischer Verdau mit Trypsin

4.4.1 Proteolytische Spaltung der V_1 ATPase

Die Spaltung eines Komplexes durch Trypsin ist einerseits abhängig von der Zugänglichkeit der Untereinheit im Gesamtprotein als auch von der grundsätzlichen Spaltbarkeit der Untereinheit. Das SDS-Gel der Trypsinisierung von V_1 ATPase (Abb. 4.7, Tafel A) zeigt den Verdau in zeitlicher Auflösung. Untereinheit A blieb praktisch unverdaut. Untereinheit B wurde unter Bildung von drei Produkten langsam gespalten. Untereinheit C war im ursprünglichen Protein nur sehr schwach vorhanden und deshalb im SDS-Gel nicht sichtbar. Untereinheit D wurde innerhalb der ersten fünf Minuten komplett unter Bildung von zwei Spaltprodukten gespalten, Untereinheit E blieb praktisch unverdaut. Nach 20 min war Untereinheit F nicht mehr im

Gel sichtbar, Untereinheit G wurde nur zu Anfang der Reaktion gespalten. Die Spaltprodukte wurden im Verlauf weiter gespalten.

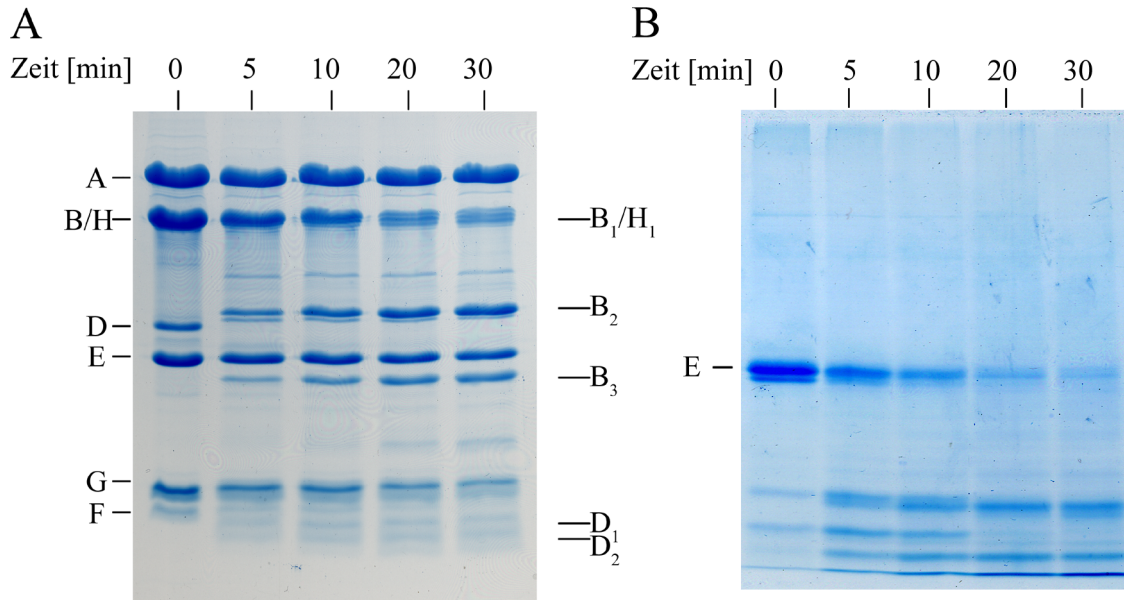


Abb. 4.7: Elektrophoretische Analyse des Trypsinverdau. V₁ATPase (Tafel A) und Untereinheit E (Tafel B) wurden mit Trypsin im Verhältnis 1:800 inkubiert. Gestoppt wurde die Proteolyse mit 8 mM Pefabloc SC.

4.4.2 Tryptischer Verdau der Untereinheit E der V₁ATPase aus *S. cerevisiae*

Zur Kontrolle der generellen Spaltbarkeit der Untereinheit E wurde diese rekombinant aus der VMA4-Region der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* hergestellt. Abb. 4.8 zeigt die chromatographische Reinigung.

Diese Untereinheit E wurde ebenfalls dem proteolytischen Verdau unterzogen (Abb. 4.7, Tafel B). Sie besitzt Arginin und Lysin in der gleichen Anzahl (DUJON ET AL., 1997) wie die Untereinheit E der V₁ATPase aus *M. sexta* (GRÄF ET AL., 1994). Die Untereinheit E ist schon innerhalb weniger Minuten deutlich sichtbar unter Bildung mehrerer Spaltprodukte durch das Trypsin gespalten worden.

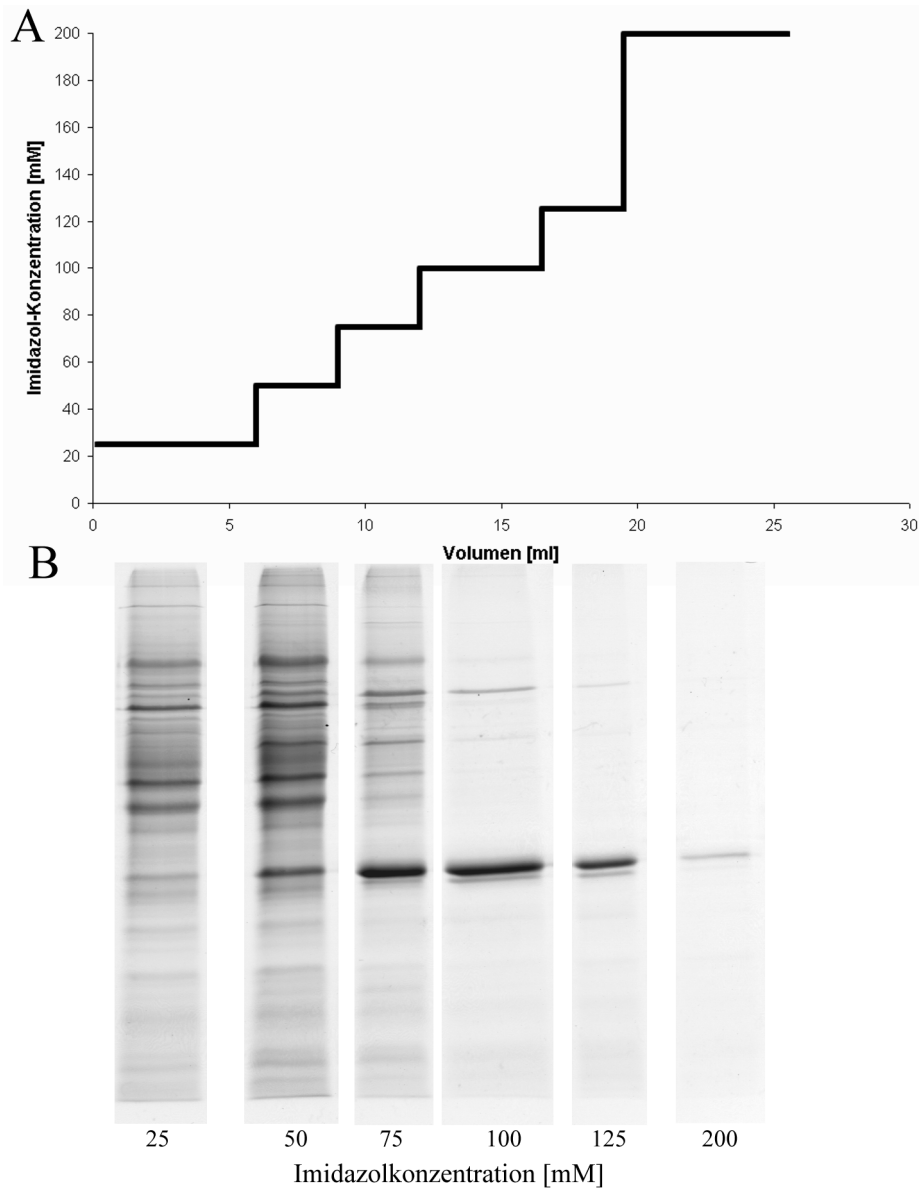


Abb. 4.8: Chromatographische Reinigung der Untereinheit E aus *S. cerevisiae*. Tafel A zeigt den Imidazol-Stufengradienten, der auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen wurde. Tafel B zeigt das SDS-Gel der aufgefangenen Fraktionen.

4.5 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Die Fluoreszenzspektroskopie vermag strukturelle und dynamische Änderungen von Biomolekülen zu zeigen. Sie hat sich auch als vielseitiges Instrument zur Beobachtung phosphat- und nukleotidabhängiger Konformationsänderungen von Enzymen erwiesen (DIVITA ET AL., 1991). Bei der Messung von V_1 ATPase mit der Fluoreszenzsonde Cumarinmaleimid nach 3.6.2 verschoben sich die Maxima der Emissionen in Anwesenheit von MgATP und MgADP um ca. 10 nm in Richtung höherer Wellenlängen (Rotverschiebung), wobei die Intensität der Fluoreszenz um ca. 20 % (ATP) bzw. 25 % (ADP) verringert war. Die Bindung von MgAMP-PNP und MgADP+ P_i erzeugte keine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums, die Intensität der Fluoreszenz erhöhte sich um 10 % (ADP+ P_i) bzw. 25 % (AMP-PNP) (s. Abb. 4.9).

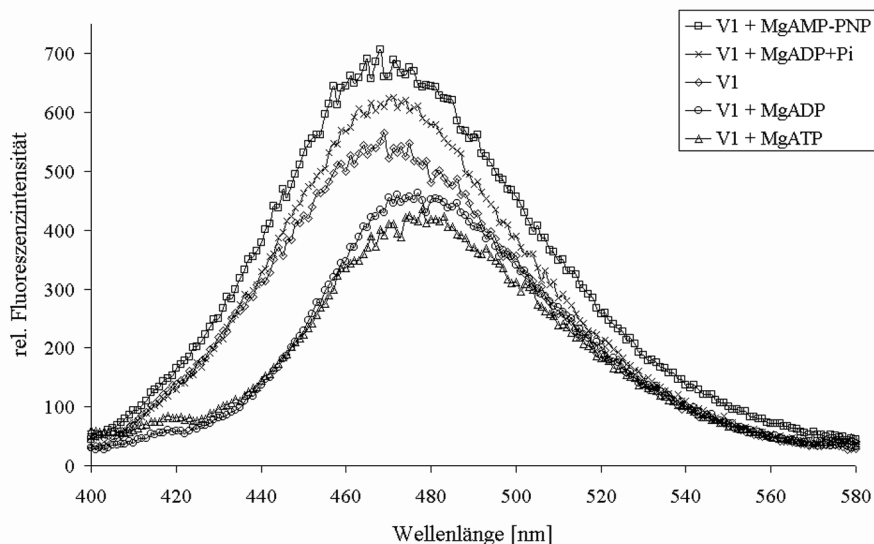


Abb. 4.9: Nukleotidabhängige Änderungen der Fluoreszenz mit Cumarinmaleimid als Fluoreszenzsonde. Die Fluoreszenzspektren wurden von 400–580 nm bei 10°C gemessen. Angeregt wurde mit einer Wellenlänge von 365 nm. (Abbildung aus COSKUN ET AL. (2004))

Die intrinsische Fluoreszenz wird hauptsächlich durch Tryptophan hervorgerufen. Davon sind sechs in Untereinheit A (GRÄF ET AL., 1992), eines in Untereinheit B (NOVAK ET AL., 1992), acht in Untereinheit C (MERZENDORFER ET AL., 2000) und sechs in Untereinheit H (MERZENDORFER ET AL., 2000) der V_1 ATPase enthalten. Abb. 4.10 zeigt die Abnahme

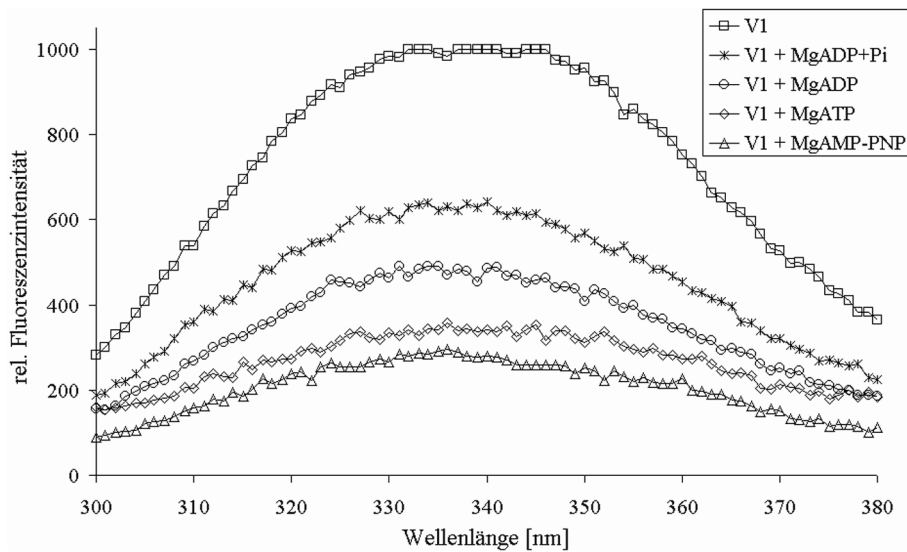


Abb. 4.10: Nukleotidabhängige Änderungen der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz. Die Fluoreszenzspektren wurden von 300–380 nm bei 4°C gemessen. Angeregt wurde mit einer Wellenlänge von 280 nm, verstärkt wurde mit 900 V; bei der Messung des V_1 ohne Nukleotidzugabe mit 700 V. Abbildung aus COSKUN ET AL. (2004)

der Fluoreszenz in Anwesenheit der Nukleotide in der Reihenfolge MgADP+ P_i (um 50 %), MgADP (um 65 %), MgATP (um 72 %) und dem nicht hydrolysierbaren MgAMP-PNP (um 77 %). Die Emissionsmaxima lagen bei allen Bedingungen im Bereich von 340 nm, es fand keine Verschiebung der Fluoreszenzspektren statt.

4.6 Vernetzungen der V_1 ATPase

4.6.1 Vernetzung der V_1 ATPase mit $CuCl_2$

Das Cu^{2+} -Ion kann zwischen den Thiolgruppen zweier Cysteine Disulfidbrücken ausbilden, wenn deren α -Atome einen Abstand von 4–9 Å haben (CREIGHTON, 1984). Diese Eigenschaft ermöglicht es, Lagebeziehungen zwischen den einzelnen Untereinheiten der V_1 ATPase in Abhängigkeit von der Anwesenheit unterschiedlicher Nukleotide zu untersuchen. Zunächst wurden die Änderungen des Vernetzungsverhaltens in Anwesenheit von Methanol, einem Inhibitor der V_1 ATPase aus *M. sexta*, untersucht.

4 Ergebnisse

Abb. 4.11 zeigt das SDS-Gel der Vernetzungsprodukte nach Inkubation mit Nukleotiden und 25 % Methanol in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen. Vernetzungsprodukte erschienen als zusätzliche Banden im Vergleich zu der mit DTT behandelten Spur. Im nukleotidfreien Zustand und bei der Bindung mit MgAMP-PNP entstanden Vernetzungsprodukte mit höheren Molekularmassen, bezeichnet als Banden I–IV. Die Intensität der zur Untereinheit B gehörigen Bande war im Vergleich zu den Spuren mit MgATP, MgADP+ P_i und MgADP schwächer. Bei allen untersuchten Nukleotidbindungen entstanden die als Bande V, VI und VII bezeichneten Vernetzungsprodukte.

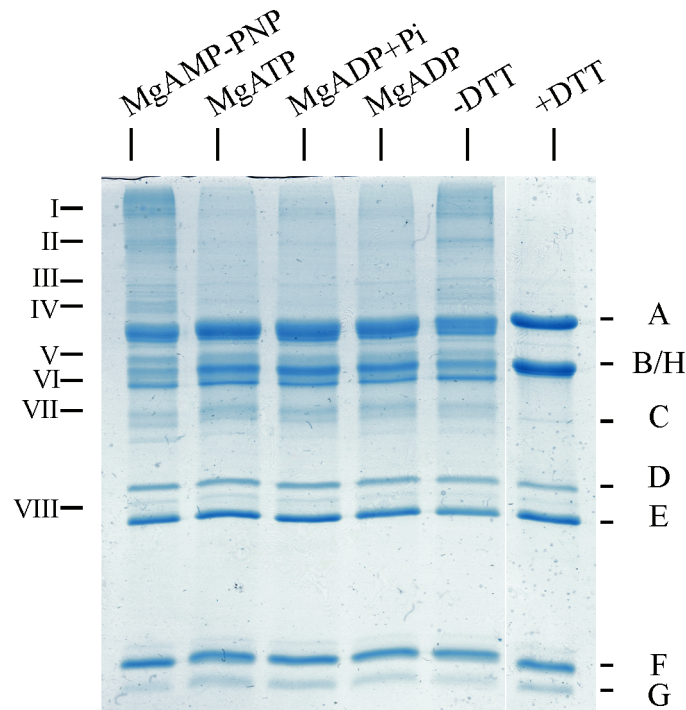


Abb. 4.11: Nukleotidabhängige Vernetzung durch $CuCl_2$ in Anwesenheit von 25 % Methanol und Mg^{2+} . Abhängig von der Bindung eines Nukleotids bilden sich unterschiedliche Vernetzungsprodukte. Die Inkubation erfolgte in Anwesenheit von 25 % Methanol. Als Standard ist mit 0,1 mM DTT behandeltes V_1 aufgetragen.

Abb. 4.12 zeigt im Vergleich dazu das SDS-Gel der Vernetzungsprodukte von methanolfreier V_1 ATPase. Unter diesen Bedingungen enthielten die nukleotidfreie Spur und die Spur des mit MgAMP-PNP inkubierten Proteins weniger höhermolekulargewichtige Vernetzungsprodukte als die vergleichbaren Spuren in Anwesenheit von Methanol in Abb. 4.11. Die Vernetzungsprodukte I–IV zeigten sich besonders in Anwesenheit von MgATP und etwas schwächer bei MgADP. Bei beiden Spuren besass die Bande der Untereinheit B eine geringere Intensität.

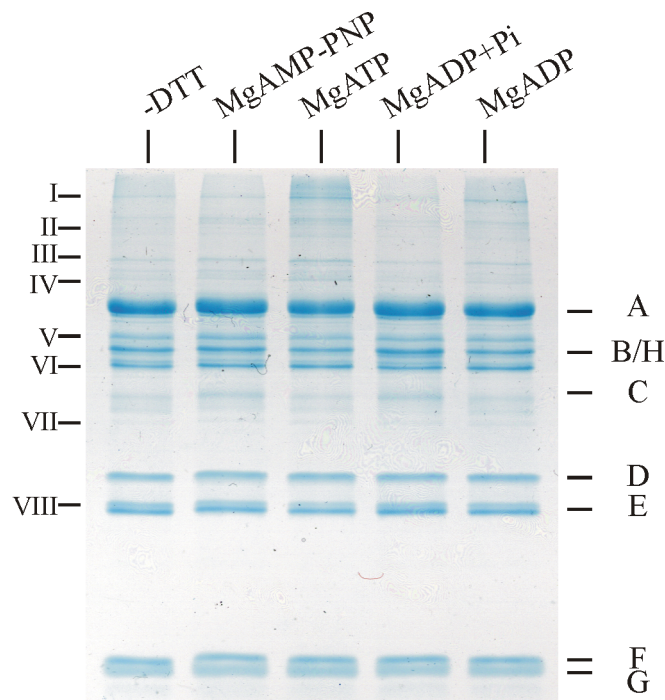


Abb. 4.12: Nukleotidabhängige Vernetzung durch CuCl_2 ohne Methanol in Anwesenheit von Mg^{2+} . Abhängig von der Bindung eines Nukleotids bilden sich unterschiedliche Vernetzungsprodukte.

Um die Zusammensetzung der Vernetzungsprodukte zu untersuchen, wurden die einzelnen Gelspuren wie in 3.4.1 beschrieben ausgeschnitten und mit DTT- und SDS-haltigem Puffer inkubiert. Dies bewirkte ein Aufbrechen der durch Cu^{2+} -Ionen entstandenen Disulfidbindungen. Die Gelspuren wurden in das Trenngel eines SDS-Gels eingegossen. So konnten die Vernetzungsprodukte in der zweiten Dimension aufgetrennt werden.

Abb. 4.13 zeigt das zweidimensionale Gel der V_1 ATPase ohne Zugabe von Nukleotiden.

4 Ergebnisse

Die Banden I–IV und VII konnten nicht weiter aufgelöst werden. Bande V bestand aus Untereinheit B. Bande VI enthielt Untereinheit H und Spuren der Untereinheiten D und E. Bande VIII wurde aufgetrennt in die Untereinheiten D und E, sowie ein weiteres Produkt (*) mit einem Molekulargewicht zwischen dem der Untereinheiten D und E, welches sich nicht auf-trennen liess.

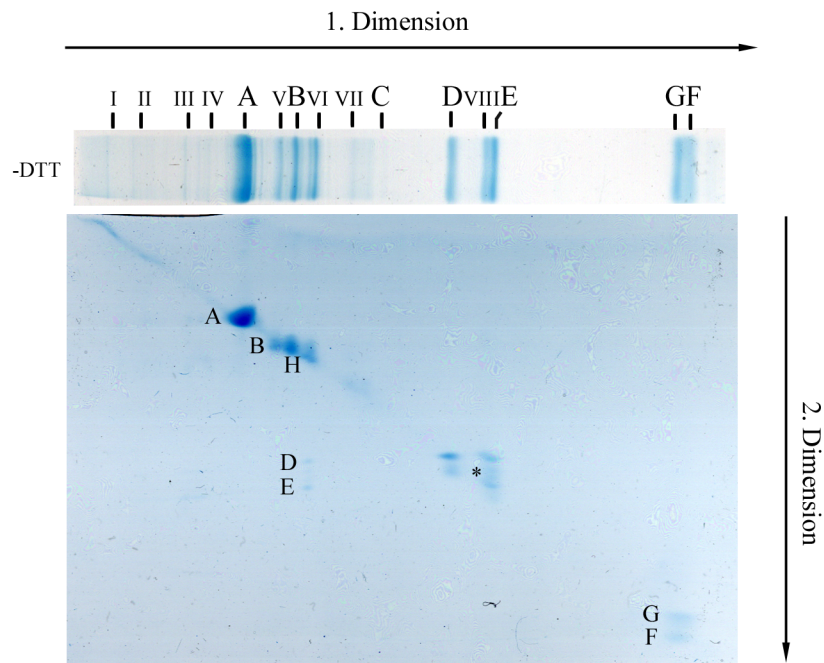


Abb. 4.13: Zweidimensionales SDS-Gel einer CuCl_2 -Vernetzung ohne Zugabe von Nukleotiden. Eine Spur eines SDS-Gels wurde horizontal in ein zweites SDS-Gel eingegossen. V_1 wurde mit 2 mM CuCl_2 in Anwesenheit von 4 mM MgCl_2 inkubiert, die Vernetzungsprodukte wurden im Gel mit DTT wieder aufgespalten und auf ein zweites SDS-Gel aufgetragen.

4 Ergebnisse

In Anwesenheit von MgADP behandelte V_1 ATPase zeigte ein ähnliches Bild (Abb. 4.14). In den Banden I–III war schwach Untereinheit A zu erkennen. Bande VI war stärker ausgeprägt als im nukleotidfreien Versuch (s. Abb. 4.13) und bestand aus den Untereinheiten B, H, D und E.

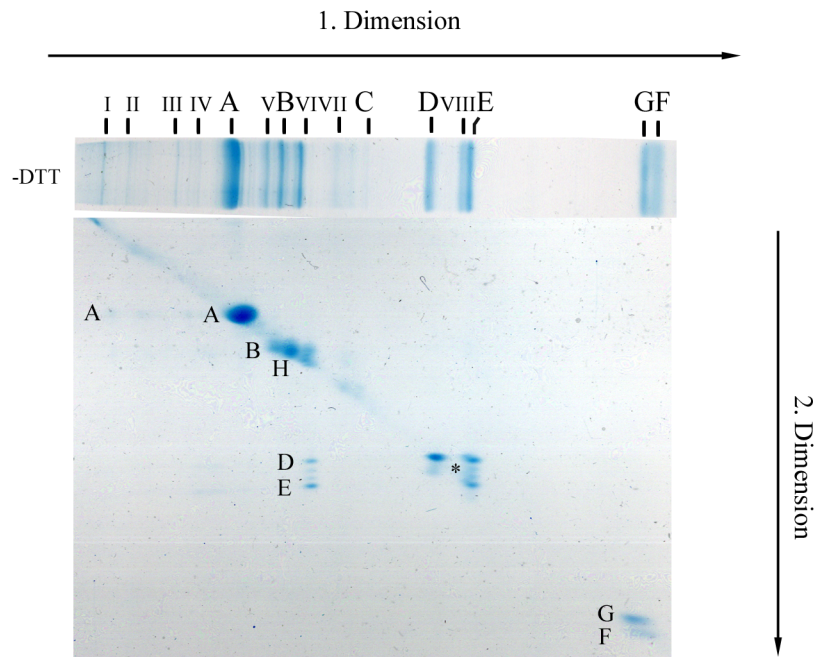


Abb. 4.14: Zweidimensionales SDS-Gel einer CuCl_2 -Vernetzung mit MgADP. Eine Spur eines SDS-Gels wurde horizontal in ein zweites SDS-Gel eingegossen. V_1 wurde mit 2 mM CuCl_2 in Anwesenheit von 4 mM ADP und 4 mM MgCl_2 inkubiert, die Vernetzungsprodukte wurden im Gel mit DTT wieder aufgespalten und auf ein zweites SDS-Gel aufgetragen.

4 Ergebnisse

Mit MgATP behandelte V_1 ATPase (s. Abb. 4.15) zeigte deutlich stärkere Vernetzungsprodukte. Dadurch liessen sich die Banden I, II und III in die Untereinheiten A und B auftrennen. Bande IV bestand aus den Untereinheiten A, B und E, Bande VII liess sich nicht weiter auf-trennen.

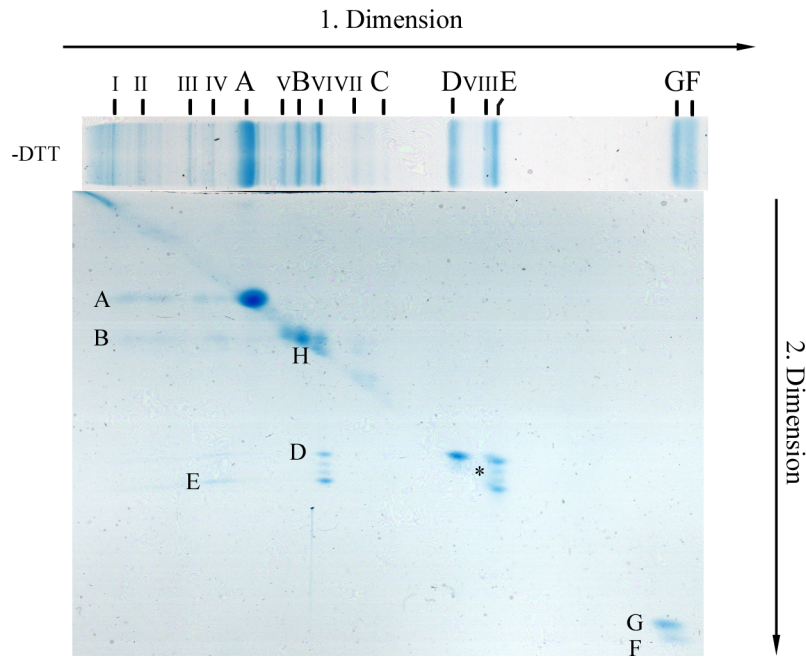


Abb. 4.15: Zweidimensionales SDS-Gel einer CuCl_2 -Vernetzung mit MgATP. Eine Spur eines SDS-Gels wurde horizontal in ein zweites SDS-Gel eingegossen. V_1 wurde mit 2 mM CuCl_2 in Anwesenheit von 4 mM ATP und 4 mM MgCl_2 inkubiert, die Vernetzungsprodukte wurden im Gel mit DTT wieder aufgespalten und auf ein zweites SDS-Gel aufgetragen.

4 Ergebnisse

Die Bindung des nicht hydrolysierbaren Nukleotidanalogs MgAMP-PNP führte zu dem Produkt VI, bestehend aus den Untereinheiten B, H, D und E und dem Produkt VII, bestehend aus den Untereinheiten D und E (s. Abb. 4.16).

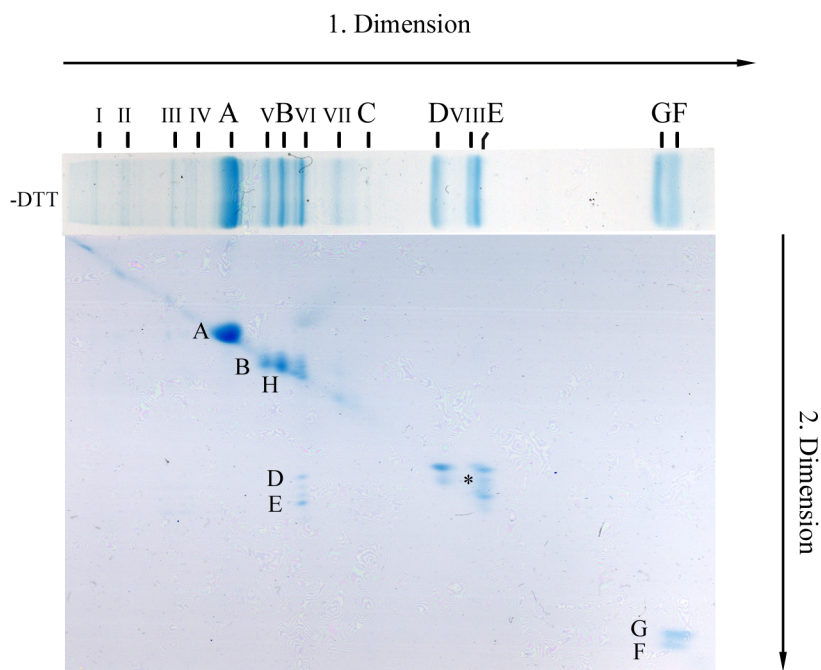


Abb. 4.16: Zweidimensionales SDS-Gel einer CuCl_2 -Vernetzung mit MgAMP-PNP. Eine Spur eines SDS-Gels wurde horizontal in ein zweites SDS-Gel eingegossen. V_1 wurde mit 2 mM CuCl_2 in Anwesenheit von 4 mM AMP-PNP und 4 mM MgCl_2 inkubiert, die Vernetzungsprodukte wurden im Gel mit DTT wieder aufgespalten und auf ein zweites SDS-Gel aufgetragen.

4 Ergebnisse

Die Bindung von MgADP in Anwesenheit von anorganischem Phosphat ergab die Vernetzungsprodukte VI, bestehend aus den Untereinheiten B, H, D und E, und VIII, bestehend aus den Untereinheiten D und E (s. Abb. 4.17).

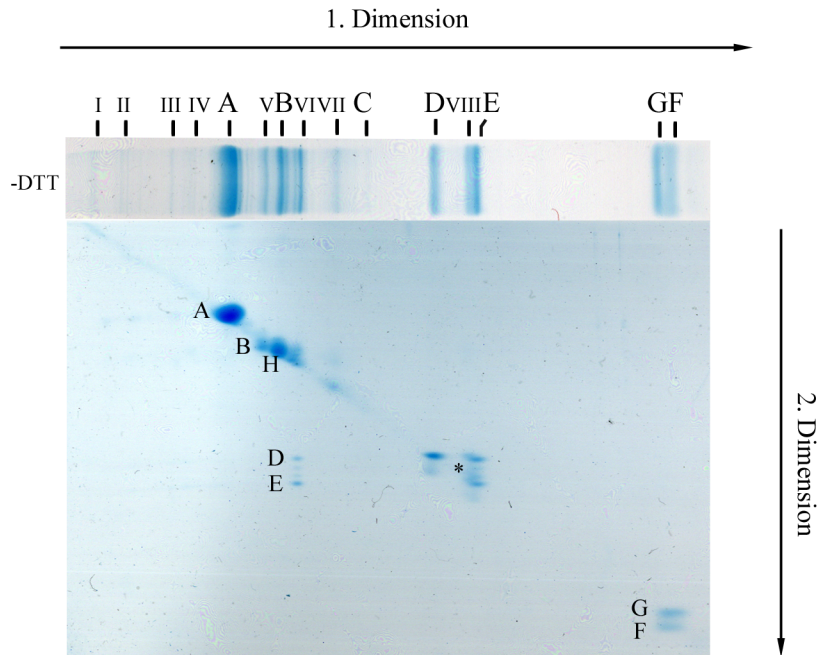


Abb. 4.17: Zweidimensionales SDS-Gel einer CuCl_2 -Vernetzung mit $\text{MgADP}+\text{P}_i$. Eine Spur eines SDS-Gels wurde horizontal in ein zweites SDS-Gel eingegossen. V_1 wurde mit 2 mM CuCl_2 in Anwesenheit von 4 mM $\text{ADP}+\text{P}_i$ und 4 mM MgCl_2 inkubiert, die Vernetzungsprodukte wurden im Gel mit DTT wieder aufgespalten und auf ein zweites SDS-Gel aufgetragen.

4.6.2 Vernetzung der V_1 ATPase mit 8-DiN₃-DiB-AP₄A

Die Bestrahlung der V_1 ATPase mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda=366$ nm in Anwesenheit von 8-DiN₃-DiB-AP₄A und Ca^{2+} nach dem in 3.4.2 beschriebenen Verfahren führte zur Bildung von Vernetzungsprodukten (s. Abb. 4.18). In der nicht bestrahlten Dunkelkontrolle (DK) fand keine Vernetzung statt. Die zugegebenen Nukleotide ATP, ADP und AMP-PNP konkurrierten mit dem Nukleotidanalogen 8-DiN₃-DiB-AP₄A um die Nukleotidbindungsstellen und fungierten so als Schutzstoffe. Ohne Zugabe von Schutznukleotiden, aber in Anwesenheit von 8-DiN₃-DiB-AP₄A entstanden mehrere Vernetzungsprodukte, bezeichnet als I–VII. Die In-

tensität der Banden der Untereinheiten A, B, D, E, G und F nahm ab. Unter Zugabe von CaAMP-PNP zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der nukleotidfreien Gelspur. Die Zugabe von CaATP bzw. CaADP führte im Vergleich dazu zu einer schwächeren Intensität der Banden der Vernetzungsprodukte bei gleichzeitig stärkerer Intensität der Banden der Untereinheiten.

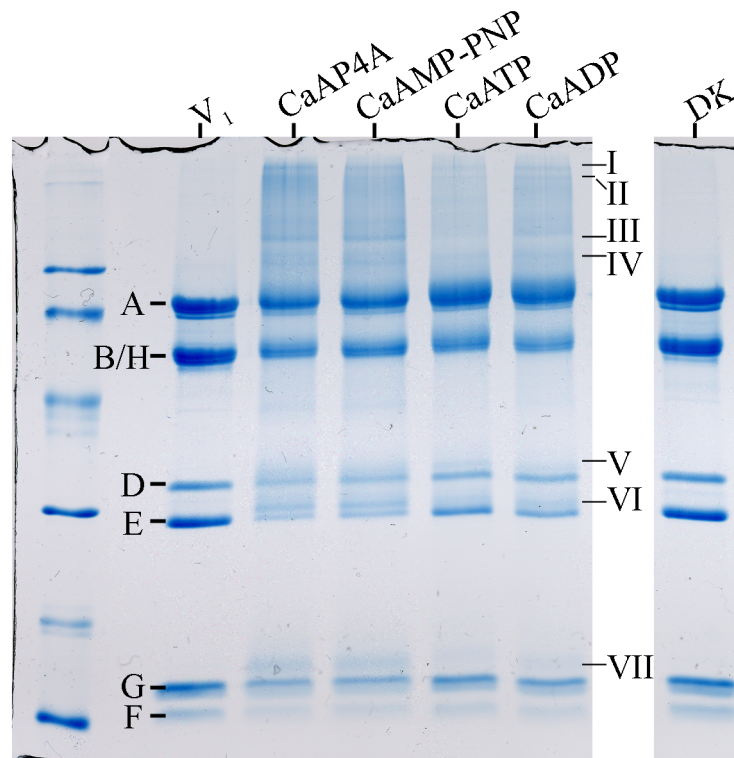


Abb. 4.18: SDS-Gel einer Vernetzung mit 8-DiN₃-DiB-AP₄A mit Nukleotiden als Schutzstoffe in Anwesenheit von Ca²⁺. V₁ATPase wurde mit 0,5 mM CaCl₂, 5 mM Nukleotiden und 0,5 mM 8-DiN₃-DiB-AP₄A inkubiert.

Der Versuch, die Vernetzungsprodukte durch Inkubation mit Tris-Puffer bei einem pH von 10,5 und anschliessendem Kochen mit DTT (s. 3.4.2) wieder aufzubrechen und in der zweiten Dimension auf ein SDS-Gel aufzutragen, führte zu keinem Ergebnis. Deshalb wurden die Banden I, III, IV, V, VI und VII ausgeschnitten und von Lucia Coskun dankenswerterweise mit dem MALDI-Verfahren analysiert (Daten siehe A.1). Eine Übereinstimmung der Peptidsequenzen (*coverage*) von mind. 30 % wurde als Ausschlusskriterium gewählt. Bande I bestand aus Oligomeren der Untereinheit A, Bande III setzte sich aus den Untereinheiten A, B, E und G zusammen, Bande IV aus A, F und G (s. A.1, Untereinheit G wurde mit 29,91 % *Coverage*

als grenzwertig noch aufgenommen), Bande V aus D und E und Bande VI aus E und G. Für die anderen Banden waren die MALDI-Daten nicht signifikant zuzuordnen.

4.7 Bindung von Immunglobulinen

Immunglobuline der Klasse G binden mit ihren zwei Antigenbindungsstellen an Epitope in Proteinstrukturen. Es wurde untersucht, ob polyklonale Antikörper gegen die Untereinheiten D beziehungsweise E der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (anti-Vma8p und anti-Vma4p) an die entsprechenden Untereinheiten der V_1 ATPase aus *M. sexta* binden. Dies sollte als vorbereitendes Experiment zur Untersuchung von Rotationen der Untereinheiten dienen (analog den Versuchen von IMAMURA ET AL. (2003)). An die Antikörper gegen die Untereinheiten sollten in einem zweiten Schritt biotinylierte Antikörper gegen den ersten Antikörper gerichtet werden. An diesen wäre ein streptavidinmarkiertes Kügelchen gebunden worden. Die ATP-getriebene Bewegung wäre mit einem Hellfeldmikroskop zeitaufgelöst aufgenommen worden.

Nach 3.7 mit Immunglobulinen gegen die Untereinheit D aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* behandelte V_1 ATPase eluierte in der Grössenaustauschchromatographie in drei Peaks. Peak 1 trennte sich im SDS-Gel (s. Abb. 4.19) in die Untereinheiten A, B, H, D, E, G und F, sowie eine Bande mit hohem Molekulargewicht (mit * markiert) auf. Die Gelspur für Peak II zeigte schwache Banden in Höhe der Untereinheiten B, E und G.

V_1 ATPase, welche mit gegen die Hefe-Untereinheit E gerichteten Antikörpern inkubiert wurde, eluierte in der Grössenaustauschchromatographie ebenfalls in drei Peaks (s. Abb. 4.20). In der anschliessenden SDS-Gelelektrophorese zeigte Peak I zusätzlich zu den Untereinheiten A, B, H, E, G und F auch eine Bande hohen Molekulargewichts (mit * bezeichnet). Peak II enthielt die Untereinheiten A, B, E und G, wobei die Intensität der Bande der Untereinheit B stärker war als die der anderen Untereinheiten, sowie eine Bande höheren Molekulargewichts (mit *' bezeichnet). In Peak III konnte kein Protein nachgewiesen werden.

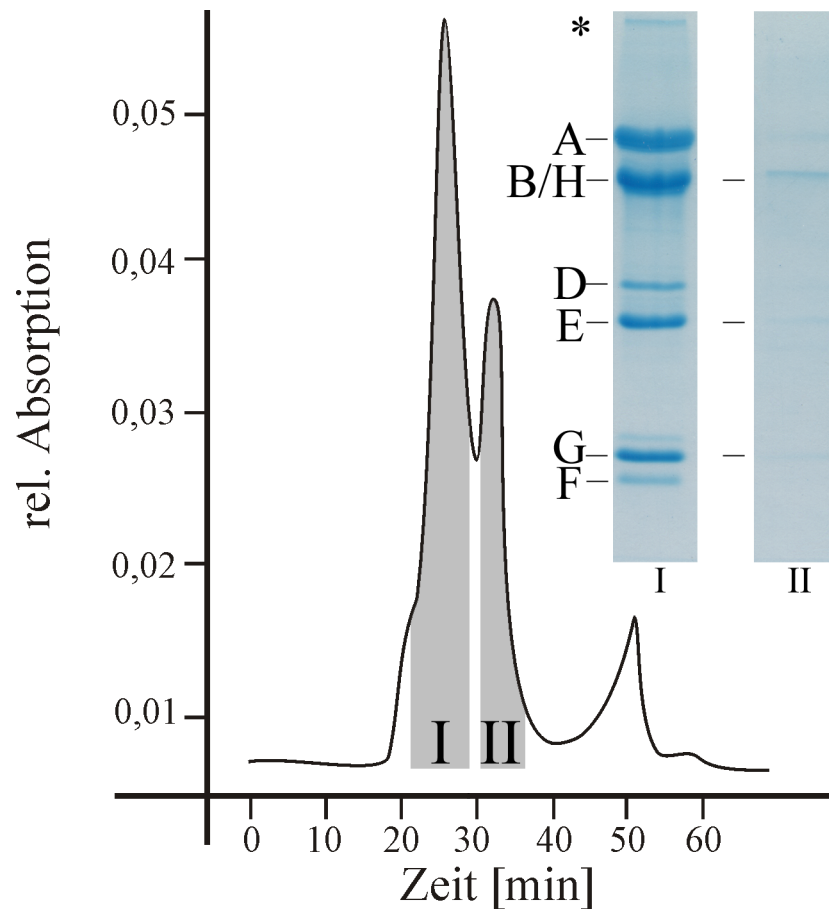


Abb. 4.19: Elutionsprofil und SDS-PAGE der V₁ATPase nach Inkubation mit Immunglobulinen gegen Vma8p in Abwesenheit von β -Mercaptoethanol. Die grau unterlegten Flächen bezeichnen die zur SDS-PAGE zusammengeführten Fraktionen.

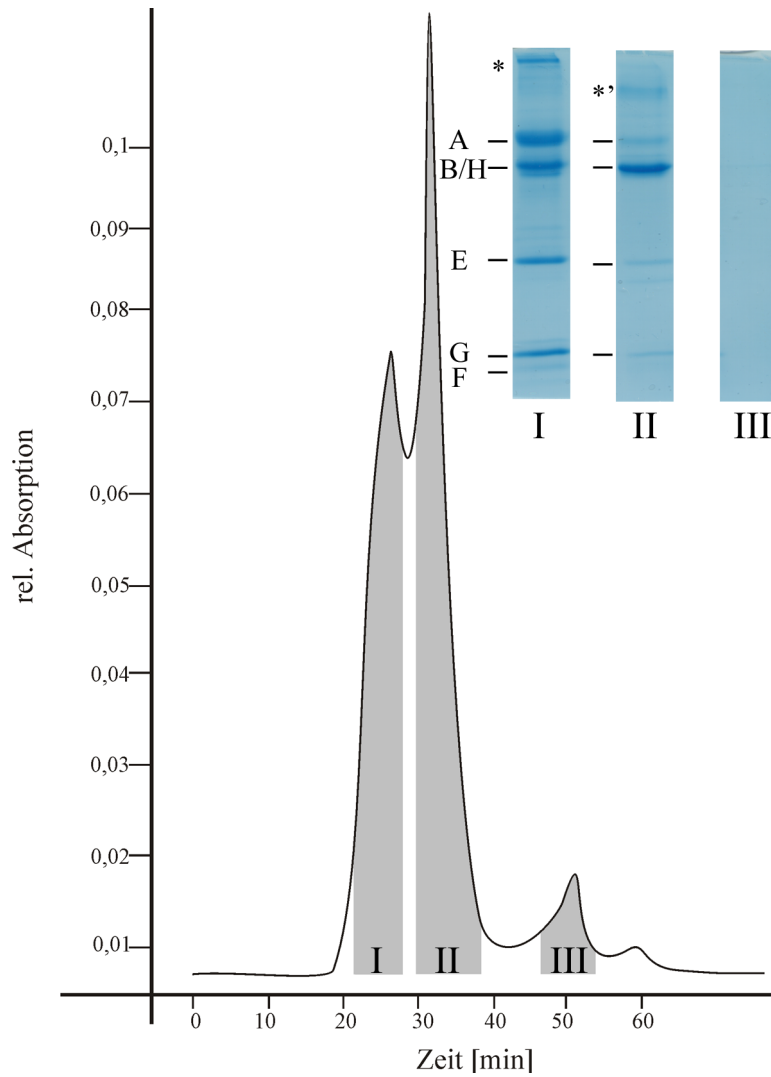


Abb. 4.20: Elutionsprofil und SDS-PAGE der V₁ATPase nach Inkubation mit Immunglobulinen gegen Vma4p in Abwesenheit von β -Mercaptoethanol. Die grau unterlegten Flächen bezeichnen die zur SDS-PAGE zusammengeführten Fraktionen.

5 Diskussion

5.1 Die vakuoläre ATPase

Die vakuoläre ATPase definiert eine ubiquitär auftretende Klasse von protonentranslozierenden Pumpen, die mittels der Hydrolyse von ATP einen sauren pH innerhalb von Vakuolen aufrechterhält (PERZOV ET AL., 2001). Die V-ATPase besteht dabei aus mindestens 13 unterschiedlichen Untereinheiten (A_3 , B_3 , C, D, E, F, G_2 , H_y , a, d, c, c', c''), die sich auf zwei Komponenten verteilen: einer membrangebundenen Domäne V_O , die den Ionenkanal enthält und einer extrinsischen Domäne V_1 , in der die ATP-Hydrolyse stattfindet (GRAHAM ET AL., 2000; BOWMAN UND BOWMAN, 2000). Die beiden grössten Untereinheiten A und B, die in einer Stöchiometrie von A_3 und B_3 vorhanden sind und die Nukleotidbindungsstellen enthalten, sind über einen sogenannten Stiel, bestehend aus den Untereinheiten C–H, mit dem membranständigen V_O -Teil verbunden (GRÜBER ET AL., 2001). Der Stiel vermittelt die Hydrolyse von ATP in V_1 mit dem Ionenfluss in V_O (NISHI UND FORGAC, 2002; MÜLLER UND GRÜBER, 2003; HIRATA ET AL., 2003; AVIEZER-HAGAI ET AL., 2003). Die V_1 ATPase der Tabakschwärmerraupe *Manduca sexta* kann sich als Teil eines *in vivo* Regulationsmechanismus vom V_O -Teil lösen (SUMNER ET AL., 1995). Sie besteht aus den acht Untereinheiten A, B, H, C, D, E, G und F mit den apparenten Molekulargewichten von jeweils 67, 56, 54, 40, 32, 28, 16 und 14 kDa (WIECZOREK ET AL., 2000).

Die Struktur der V_1V_O ATPase ist ähnlich der verwandten F_1F_O ATPase (BOWMAN UND BOWMAN, 1996). Ein Vergleich der V_1 ATPase (BOEKEMA ET AL., 1998; SVERGUN ET AL., 1998; RADERMACHER ET AL., 2001) mit der F_1 ATPase (GIBBONS ET AL., 2000) zeigt diese Ähnlichkeiten (siehe auch Abb. 5.1,A und D). Das „Köpfchen“ der V_1 ATPase mit den hexagonal angeordneten Untereinheiten A und B korrespondiert mit dem „Köpfchen“ aus den

Untereinheiten α und β der F_1 ATPase. Ebenso ist der Stiel der V_1 ATPase vergleichbar mit dem Stiel der F_1 ATPase, welche aus den Untereinheiten γ - ϵ gebildet wird.

Trotz aller Bemühungen ist die Lage der Untereinheiten in der V_1 ATPase zueinander noch nicht geklärt und deshalb Gegenstand der aktuellen Forschung.

5.2 Struktur und Topologie der V_1 ATPase aus *M. sexta*

Das zwitterionische Detergens Lauryldimethylaminoxid (LDAO) ist in verschiedenen Konzentrationen in der Lage, einzelne Untereinheiten der V_1 ATPase aus *M. sexta* herauszulösen (s. Kap. 4.2). Die Wahrscheinlichkeit abgelöst zu werden ist dabei für eine Untereinheit umso höher, je ungeschützter sie dem Detergens ausgesetzt ist. Die Messung der Hydrolyseaktivität gibt weiter Aufschluss über die Funktionsfähigkeit des verbleibenden Subkomplexes. So kann durch sukzessives Herauslösen von Untereinheiten ein Minimalgerüst von unbedingt notwendigen Untereinheiten herausgearbeitet werden. Bei einer LDAO-Konzentration von 0,05 % lösen sich die Untereinheiten H, C und F ab. Der verbleibende A_3B_3 DEG-Subkomplex besitzt mit 3 $\mu\text{mol ATP/mg/min}$ im Vergleich zu 1,7 $\mu\text{mol ATP/mg/min}$ der unbehandelten V_1 ATPase eine gesteigerte Hydrolyseaktivität. Eine Erhöhung der LDAO-Konzentration auf 0,1 % führt bei reduzierter V_1 ATPase zu einem Subkomplex aus A_3B_3 HEGF, während es im oxidierten Zustand bei gleicher Konzentration an LDAO zu einem kleineren Subkomplex aus den Untereinheiten A, B, E und G dissoziiert. Bei GRÜBER ET AL. (2000b) ist beschrieben, dass die Untereinheiten H und F in der reduzierten V_1 ATPase besser vor dem proteolytischen Verdau geschützt sind als im oxidierten Protein. Dies deckt sich mit dem hier beschriebenen Ergebnis der nur im oxidierten Zustand stattfindenden Ablösung dieser beiden Untereinheiten. Die entstandenen Subkomplexe A_3B_3 HEGF und A_3B_3 EG besitzen eine Hydrolyseaktivität von 0,9 bzw. 1,0 $\mu\text{mol ATP/mg/min}$, was einer Verringerung auf 53 % bzw. 58 % entspricht (s. Abb. 4.3). Eine weitere Erhöhung der LDAO-Konzentration auf 0,5 % führte zu zwei Subkomplexen, einem bestehend aus A_3B_3 DEGH mit einer Hydrolyserate von 0,8 $\mu\text{mol ATP/mg/min}$ und einem nicht mehr zur Hydrolyse fähigen Subkomplex aus A_2 BE. Obwohl

die Subkomplexe A_3B_3HEGF und A_3B_3EG die Untereinheit D nicht mehr enthalten, besitzen sie weiter die Fähigkeit zur ATP-Spaltung. Diese Beobachtung ist von besonderer Bedeutung, da diese Untereinheit bei NELSON ET AL. (1995) und XU UND FORGAC (2000) als essenziell für die Funktion der V_1 ATPase angesehen wird. Doch schon bei GRÄF ET AL. (1996) zeigt V_1 ATPase aus *M. sexta*, der die Untereinheiten C und D fehlen, eine Hydrolyseaktivität. Der zentralen Bedeutung der Untereinheit D hat auch XIE (1996) bei der V-ATPase Clathrin-bedeckter Vesikel aus Rinderhirnsubstanz widersprochen. Dazu wurde die V_1 ATPase mittels eines Mehrschrittverfahrens sukzessive von Untereinheiten befreit und die Hydrolyseaktivität der entstandenen Subkomplexe gemessen. Weiter wurden die Untereinheiten A, B, C, D und E rekombinant hergestellt und zu Subkomplexen rekonstituiert. Dabei identifizierte er die Untereinheiten A, B, C und E als minimale Voraussetzungen zur Ca^{2+} -abhängigen ATP-Hydrolyse. Die Anwesenheit von Untereinheit D war nicht notwendig für die Aktivität. Diese Widersprüche können mit den hier vorgelegten Ergebnissen bestätigt werden.

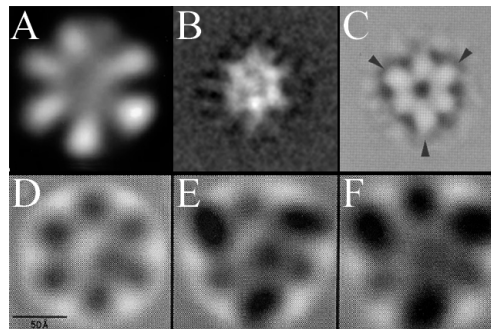


Abb. 5.1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von V_1 (A–C) und F_1 aus *E. coli* (D–F). (A): Durchschnittsbild aus 4765 Einzelpartikeln der V_1 ATPase aus *M. sexta* (RADERMACHER ET AL., 1999), (B): Durchschnittsbild aus 145 Einzelpartikeln des A_3B_3EG -Subkomplexes aus *M. sexta* (RIZZO ET AL., 2003), (C): Durchschnittsbild aus ca. 150 Einzelpartikeln der V_1 ATPase Clathrin-bedeckter Vesikel vom Rind nach präparationsbedingtem Verlust der Stieluntereinheiten (WILKENS, 2001), (D): Projektion von F_1 aus *E. coli*, (E): F_1 aus *E. coli* mit drei monoklonalen anti- α - F_{ab} -Antikörperfragmenten markiert, (F): F_1 aus *E. coli* markiert mit drei anti- α - und einer anti- ϵ - F_{ab} (GOGOL, 1994). Die Massstäbe der einzelnen Bilder sind nicht identisch.

Das zur Zeit am höchsten aufgelöste Strukturmodell der V_1 ATPase aus *M. sexta* ist eine dreidimensionale Rekonstruktion in einer Auflösung von 18 Å (RADERMACHER ET AL., 2001). Dieses Modell besteht aus einem „Köpfchen“ mit 130 Å Durchmesser, das sich aus jeweils drei Untereinheiten A und B zusammensetzt, und einem aus dem Zentrum des „Köpf-

chens“ herausragenden kompakten „Stiel“. Die hier in Abb. 4.5 und Abb. 5.1 gezeigten zweidimensionalen Durchschnittsbilder des A_3B_3EG -Subkomplexes aus *M. sexta* bilden ebenfalls diese hexagonale Anordnung von sechs Untereinheiten um einen aus dem Zentrum des Hexamers herausragenden Stiel ab. Nach Entfernen der stielbildenden Untereinheiten bleibt im Inneren des Hexamers ein masseloses Loch übrig (s. Abb. 5.1, C).

5.3 Topologie der stielbildenden ATPase-Untereinheiten

Die kontrollierte Proteolyse der V_1 ATPase bei GRÜBER ET AL. (2000a) zeigte die rasche Spaltung der Untereinheiten B und D, gefolgt von der Spaltung der Untereinheiten F, G, C und H, während die Untereinheit E, geschützt durch den Komplex des Stiels, unverdaut blieb. Durch die Behandlung von V_1 ATPase aus *M. sexta* mit LDAO konnte ein Subkomplex aus A_3B_3HEG gewonnen werden, der ebenfalls dem tryptischen Verdau unterzogen wurde (s. Kap. 4.4, GRÜBER ET AL. (2002)). Auch hier sind die Untereinheiten B und H die ersten, die gespalten werden und dadurch die stielbildenden Untereinheiten E und G der Proteolyse zugänglich machen. So beginnt die Spaltung der Untereinheit E in nennenswertem Ausmass im Anschluss an die beginnende Proteolyse der Untereinheit B nach zehn Minuten. Um zu klären, ob der langsame Verdau der Untereinheit E durch eine generell schlechte Spaltbarkeit dieses Proteins verursacht wird, wurde auch rekombinante Untereinheit E (Vma4p) aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* dem tryptischen Verdau ausgesetzt. Sie besitzt Arginin und Lysin in der gleichen Anzahl (DUJON ET AL., 1997) wie die Untereinheit E der V_1 ATPase aus *M. sexta* (GRÄF ET AL., 1994). Ohne den Schutz umgebender Untereinheiten ist die Untereinheit E nach fünf Minuten zu 75 % gespalten, nach 30 Minuten ist nur noch etwa 10 % der Untereinheit E vorhanden. Die Untereinheit E ist sowohl im A_3B_3HEG -Subkomplex durch die grossen Untereinheiten A und B als auch im kompletten V_1 -Komplex durch die sie umgebenden weiteren Stieluntereinheiten vor der Proteolyse geschützt. Darin zeigt sich ihre zentrale Lage im V_1 -Komplex.

Für die verwandte F_1 ATPase wurde gezeigt, dass sowohl $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Subkomplexe (FUTAI,

1977; KAGAWA ET AL., 1989; MIWA UND YOSHIDA, 1989), als auch Hybrid-F₁- $\alpha_3\beta_3\gamma$ -ATPase (BALD ET AL., 2001; DU ET AL., 2001) zur ATP-Hydrolyse fähig sind. Die Untereinheiten α , β und γ bilden so den minimal notwendigen Komplex zur Hydrolysefähigkeit. Zur Prüfung, ob ein analoger $\alpha_3\beta_3E$ -Hybridkomplex gebildet werden kann, wurden α - und β -Untereinheiten der F₁ATPase des thermophilen Bakteriums *Bacillus PS3* (TF₁) mit Hefe-Untereinheit E (Vma4p) inkubiert (GRÜBER ET AL., 2002). Nach Grössenausschlusschromatographie entstand ein Protein mit α , β und E in einer Stöchiometrie von $\alpha_3\beta_3E$ mit einer Hydrolyseaktivität von 31 $\mu\text{mol ATP/mg/min}$. Die komplette TF₁ besitzt zum Vergleich eine spezifische Aktivität von 55 $\mu\text{mol ATP/mg/min}$. Auch dieser Hybridkomplex wurde proteolytisch verdaut, um die Zugänglichkeiten der Untereinheit E in diesem Hybrid zu untersuchen. Die Spaltung verläuft langsamer als die der isolierten Untereinheit. Diese wird also auch im Hybridkomplex von den grossen Untereinheiten abgeschirmt.

Während des Verfassens dieser Dissertation wurde ein weiterer hydrolytisch aktiver Hybridkomplex bestehend aus $\alpha_3\beta_3$ aus *Bacillus PS3* und den Untereinheiten E und G der V₁ATPase aus *S. cerevisiae* mittels Elektronenmikroskopie charakterisiert (CHABAN ET AL., 2004). Die Hydrolyseaktivität dieses $\alpha_3\beta_3EG$ -Hybridkomplexes ist mit 29 $\mu\text{mol ATP/mg/min}$ nicht signifikant verschieden zu der des $\alpha_3\beta_3E$ -Komplexes. Damit ist die Untereinheit G nicht massgeblich an der Regulation der Hydrolyseaktivität beteiligt. Weiter konnten zwar $\alpha_3\beta_3EG$ -, aber keine $\alpha_3\beta_3G$ -Subkomplexe gebildet werden. Die Untereinheit G ist somit über die Untereinheit E an den Komplex angebunden.

Für weitere Untersuchungen der Lagebeziehung der stielbildenden Untereinheiten wurden Kreuzvernetzungsversuche mit der V₁ATPase aus *M. sexta* und dem Nulllängenkreuzvernetzer CuCl₂ durchgeführt (s. Kap. 4.6.1). Von Nukleotiden durch Dialyse gereinigte V₁ vernetzt mit CuCl₂ in fünf neu erscheinenden Banden und mehreren A-B-Komplexen hohen Molekulargewichtes im SDS-Gel. Die Produkte wurden als Untereinheiten D-E, B, A-B-E, A-B-D-E und A₂-B-E identifiziert. Die Bildung von A-B-Komplexen spiegelt die Nähe dieser Untereinheiten in der hexameren Struktur wider. Die enge Beziehung der Stieluntereinheit E zu den grossen Untereinheiten A und B wird durch die Bildung von A-B-

E- und A₂-B-E-Komplexen ausgedrückt. Die entstandenen Produkte A-B-D-E und D-E sind ein Hinweis auf die räumliche Nähe der beiden letztgenannten Untereinheiten zueinander. Ein homologes Kreuzvernetzungsprodukt aus D und E der V-ATPase aus Clathrinbedeckten Vesikeln wurde von XU ET AL. (1999) mit dem Kreuzvernetzer EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid-Hydrochlorid) gezeigt. Weiter wurde die Nachbarschaft der beiden Untereinheiten innerhalb der V-ATPase mit dem bifunktionellen Vernetzer DTSSP (3,3'-dithiobis[sulfosuccinylpropionat]) dargelegt (ADACHI ET AL., 1990).

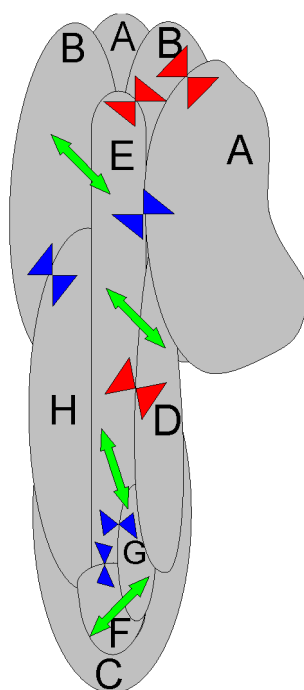


Abb. 5.2: Kreuzvernetzungsprodukte der Untereinheiten der V₁ATPase aus *Manduca sexta* und ihre mögliche Topologie. (nach MÜLLER UND GRÜBER (2003)) rot: Vernetzungsprodukte durch CuCl₂ in Anwesenheit von Ca²⁺(GRÜBER ET AL., 2000a), blau: Vernetzungsprodukte durch CuCl₂ in Anwesenheit von Mg²⁺(COSKUN ET AL., 2004), grün: Vernetzungsprodukte durch 8-DiN₃-DiB-AP₄A in Anwesenheit von Ca²⁺; der Übersichtlichkeit halber wurde jeweils eine Untereinheit A, B und G weggelassen.

Die Kreuzvernetzungsversuche wurden auch in Anwesenheit verschiedener Nukleotide und Nukleotidanaloga durchgeführt (s. Kap. 4.6.1). Der D-E-Komplex bildete sich vor allem in der Abwesenheit von Nukleotiden und bei Zugabe von MgADP+P_i, während dieser Komplex unter MgATP und MgAMP-PNP in geringerem Ausmass gebildet wurde. Änderungen der Konformation von E und eine Neuordnung dieser Untereinheit im V₁-Komplex wäh-

rend der Bindung von CaATP und CaADP sind bei GRÜBER ET AL. (2000a) beschrieben. In diesen Versuchen bildeten sich in der Anwesenheit von CaATP die Vernetzungsprodukte A–E–F und B–H, während die Zugabe von CaADP zu E–F- und E–G-Komplexen führte. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die V_1 ATPase aus *M. sexta* unterschiedliche Anordnungen ihrer Untereinheiten an den Tag legt, abhängig von Ca^{2+} -bewirkter ATPase-Aktivität oder methanolinduzierter Mg^{2+} -abhängiger Aktivität. Methanol besitzt die Eigenschaft, die Mg^{2+} -abhängige ATPase-Aktivität der F_1 ATPasen von Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien zu erhöhen (HICKS UND KRULWICH, 1986; SCHUSTER, 1979; FLORES ET AL., 1982; MCCARTY UND RACKER, 1968). Die native zytosolische V_1 ATPase von *M. sexta* zeigt ein anderes Aktivitätsverhalten. In der Abwesenheit von Methanol benötigt das Enzym Ca^{2+} -Ionen und wird von seinem Hydrolyseprodukt ADP gehemmt (*Feedbackhemmung*). Die Anwesenheit von Methanol ermöglicht die Nutzung von Mg^{2+} -Ionen und die V_1 ATPase wird nicht mehr durch ADP gehemmt, was zu einer Steigerung der Hydrolyseaktivität um 50-60 % führt. Methanol scheint eine Konformationsänderung in der V_1 ATPase zu bewirken, die zu Enzyemeigenschaften der V_1 ATPase ähnlich denen der V_1V_O ATPase führt (GRÄF ET AL., 1996). Die Bildung von D–E-Vernetzungsprodukten bestärkt die Ansicht eines einzelnen, kompakten Stiels in V_1 , wie es auch die dreidimensionalen Modelle der *M. sexta*- V_1 ATPase verdeutlichen (SVERGUN ET AL., 1998; RADERMACHER ET AL., 2001), und nicht, wie bei INOUE ET AL. (2003) postuliert, mehrere Stiele mit D als Rotor und E als Stator. Eine mögliche Anordnung der Untereinheiten der V_1 ATPase und ihrer Vernetzungsprodukte ist in Abb. 5.2 dargestellt, eine Übersicht der erhaltenen Kreuzvernetzungsprodukte findet sich in Tab. 5.1.

5.4 Dynamik nukleotidabhängiger Bindungen der V_1 ATPase

Die Bindung von Nukleotiden an die Untereinheit A der V_1 ATPase führt zu Konformationsänderungen in der Untereinheit E (GRÜBER ET AL., 2000a; KAWAMURA ET AL., 2001). Die Konformationsänderungen der V_1 ATPase während der verschiedenen Stadien der ATP-Spaltung wurden hier weiter mit der Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Die intrinsische

5 Diskussion

Kreuzvernetzer	anwesendes Ion	Vernetzungsprodukt
CuCl ₂	Mg ²⁺ (COSKUN ET AL., 2004)	A–B–D–E A–B–E D–E
CuCl ₂	Ca ²⁺ (GRÜBER ET AL., 2000a)	A–E–F B–H E–F E–G
8-DiN ₃ -DiB-AP ₄ A	Ca ²⁺	E–G D–E A–B–E–G A–F(–G)

Tab. 5.1: Kreuzvernetzungsprodukte der V₁ATPase

Fluoreszenz der in den Untereinheiten A, B, C und H enthaltenen Tryptophane nimmt bei der nukleotidgebundenen V₁ATPase relativ zu nukleotidfreier V₁ATPase ab (s. Abb. 4.10). Die Abnahme ist während der ATP-Bindung am stärksten und lässt im Verlauf der Spaltung und Freigabe der Spaltprodukte nach. Die Bindung des Fluoreszenzmarkers Cumarinmaleimid an die Untereinheit A der V₁ATPase erlaubt die Untersuchung der dort lokalisierten Nukleotidbindungsstelle. Veränderungen der Umgebung des Cumarinmaleimids führen zu Veränderungen seiner Fluoreszenz (s. Abb. 4.9). So führte die Bindung des nicht hydrolysierbaren Nukleotidanalogs MgAMP-PNP und die Bindung von MgADP+P_i zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität, bei letzterem schwächer ausgeprägt als bei ersterem. Die Bindung von MgATP führte wie die von MgADP zu einer Verringerung der Fluoreszenzintensität und einer Rotverschiebung um 9 nm. Das an die katalytische Untereinheit A gebundene Cumarinmaleimid befindet sich somit während der Spaltung von ATP zu ADP und anorganischem Phosphat in einer hydrophileren Umgebung als im nukleotidfreien Zustand.

Im Verlauf von ATP-Bindung, Hydrolyse und Freigabe von ADP und Phosphat ändert sich die Konformation der V₁ATPase. Die Ergebnisse der Kreuzvernetzungen (s. Kap. 4.6) können als Bewegungen der Untereinheiten während der Nukleotidbindung und -spaltung gedeutet werden. Eine mögliche Interpretation wäre folgende: Bei der ATP-Bindung rücken D und E auseinander, H und B nähern sich, E und A entfernen sich. Während der Spaltung in ADP und Phosphat nähern sich E und D wieder an, E und B nähern sich, E und A rücken zusammen,

B und H sind wieder voneinander entfernt. Bei der Freigabe der Spaltprodukte rücken D und E wieder zusammen, der Zyklus kann von Neuem beginnen (s. Abb. 5.2). Für die F-ATPase wurde gezeigt, dass die ATP-Hydrolyse im $\alpha_3\beta_3$ -Komplex eine Rotation der stielbildenden γ -Untereinheit antreibt, die das elektrochemische Potenzial an den membranständigen Teil weiterleitet (NOJI ET AL., 1997; YASUDA ET AL., 1998). Nimmt man an, dass die Untereinheit E der V_1 ATPase analog der γ -Untereinheit der F_1 ATPase ist und ebenfalls rotiert, so kann obige Interpretation der Kreuzvernetzungsversuche zu einem vereinfachten grafischem Modell der Bewegung der Untereinheit E führen (s. Abb. 5.3).

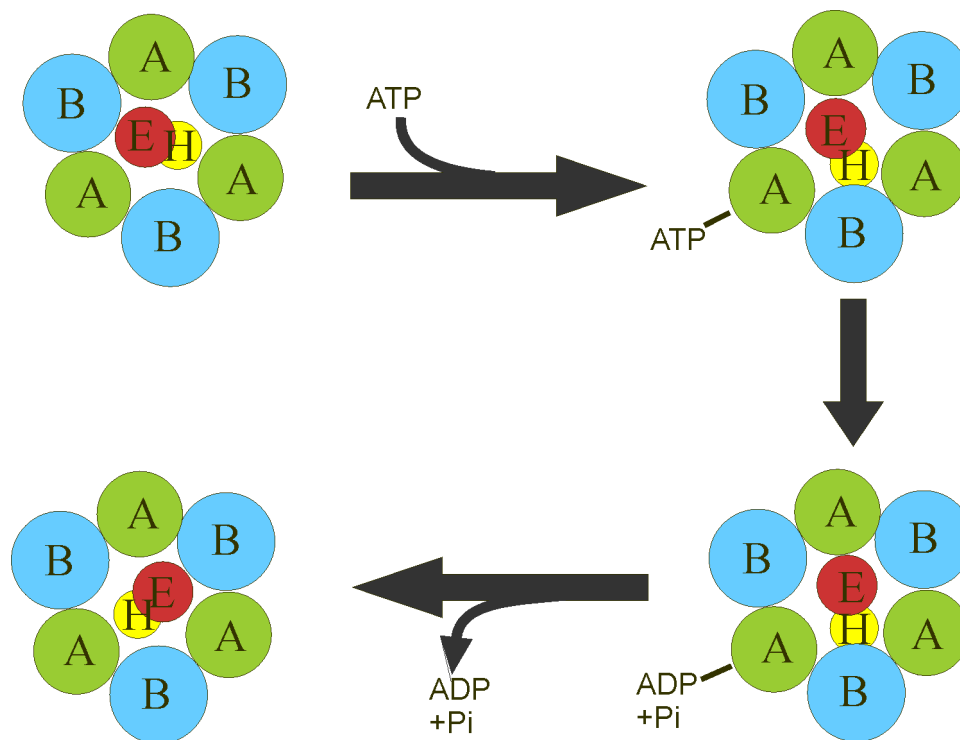


Abb. 5.3: Mögliches Modell der Bewegung der Untereinheit E in der V_1 ATPase. Aufgrund der Ergebnisse der Kreuzvernetzungsversuche ist dieses Modell mit besonderem Augenmerk auf die Bewegung der Untereinheit E entwickelt worden. Es entspricht einer Aufsicht auf das Hexamer der grossen Untereinheiten A und B mit dem zentralen Stiel bestehend aus der Untereinheit E und daran gebunden der Untereinheit H. Die weiteren Untereinheiten sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Im Verlauf der Nukleotidbindung und -spaltung erfährt die Untereinheit E Konformationsänderungen, die zu einer Drehung um 120° führt.

6 Literaturverzeichnis

1. 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):960–966
2. Aviezer-Hagai K, Padler-Karavani V, Nelson N (2003) Biochemical support for the V-ATPase rotary mechanism: antibody against HA-tagged Vma7p or Vma16p but not Vma10p inhibits activity. *J Exp Biol*, 206(Pt 18):3227–3237
3. Bald D, Noji H, Yoshida M, Hirono-Hara Y, Hisabori T (2001) Redox regulation of the rotation of F(1)-ATP synthase. *J Biol Chem*, 276(43):39505–39507
4. Bidani A, Reisner BS, Haque AK, Wen J, Helmer RE, Tuazon DM, Heming TA (2000) Bactericidal activity of alveolar macrophages is suppressed by V-ATPase inhibition. *Lung*, 178(2):91–104
5. Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S (1989) Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science*, 245(4920):855–857
6. Boekema EJ, Ubbink-Kok T, Lolkema JS, Brisson A, Konings WN (1998) Structure of V-type ATPase from *Clostridium fervidus* by electron microscopy. *Photosynthesis Research*, 57(3):267–273
7. Böttcher B, Wynne SA, Crowther RA (1997) Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature*, 386(6620):88–91
8. Bowman BJ, Bowman EJ, Mitochondrial and vacuolar ATPases. In: Brambl R, Marzluf GA (Hg.), *The Mycota, Biochemistry and Molecular Biology*, Springer, 1996, Bd. 3, 57–83

9. Bowman EJ, Bowman BJ (2000) Cellular role of the V-ATPase in *Neurospora crassa*: analysis of mutants resistant to concanamycin or lacking the catalytic subunit A. *J Exp Biol*, 203(1):97–106
10. Breton S, Smith PJ, Lui B, Brown D (1996) Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H⁺)-ATPase. *Nat Med*, 2(4):470–472
11. Chaban YL, Coskun U, Keegstra W, Oostergetel GT, Boekema EJ, Grüber G (2004) Structural characterization of an ATPase active F₁-V₁ -ATPase ($\alpha_3\beta_3EG$) hybrid complex. *J Biol Chem*, 279(46):47866–47870
12. Coskun Ü, Rizzo VF, Koch MHJ, Grüber G (2004) Ligand-Dependent Structural Changes in the V₁1ATPase from *Manduca sexta*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 36(3):249–256
13. Creighton TE (1984) Disulfide bond formation in proteins. *Methods Enzymol*, 107:305–329
14. Damerval C, le Guilloux M, Blaisonneau J, de Vienne D (1987) A simplification of Heukeshoven and Dernick's silver staining of proteins. *Electrophoresis*, 8:158–159
15. Diday E (1971) Une nouvelle méthode en classification automatique de formes: la méthode des nuées dynamiques. *Rev Stat Appl*, 19(2):19–34
16. Divita G, Pietro AD, Deleage G, Roux B, Gautheron DC (1991) Intrinsic tryptophan fluorescence of *Schizosaccharomyces pombe* mitochondrial F₁-ATPase. A powerful probe for phosphate and nucleotide interactions. *Biochemistry*, 30(13):3256–3262
17. Dujon B, Albermann K, Aldea M, Alexandraki D, Ansorge W, Arino J, Benes V, Bohn C, Bolotin-Fukuhara M, Bordonne R, Boyer J, Camasses A, Casamayor A, Casas C, Cheret G, Cziepluch C, Daignan-Fornier B, Dang DV, de Haan M, Delius H, Durand P, Fairhead C, Feldmann H, Gaillon L, Kleine K, (1997) The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XV. *Nature*, 387(6632 Suppl):98–102

18. Du Z, Tucker WC, Richter ML, Gromet-Elhanan Z (2001) Assembled F1-($\alpha\beta$) and Hybrid F1- $\alpha_3\beta_3\gamma$ -ATPases from *Rhodospirillum rubrum* α , wild type or mutant β , and chloroplast γ subunits. Demonstration of Mg²⁺-versus Ca²⁺-induced differences in catalytic site structure and function. *J Biol Chem*, 276(15):11517–11523
19. Finbow ME, Harrison MA (1997) The vacuolar H⁺-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *Biochem J*, 324 (Pt 3):697–712
20. Flores GO, Acosta A, Puyou AG (1982) Characteristics of adenylyl imidodiphosphate- and ADP-binding sites insoluble and particulate mitochondrial ATPase. Studies with methanol. *Biochim Biophys Acta*, 679(3):466–473
21. Frank J, Radermacher M, Penczek P, Zhu J, Li Y, Ladjadj M, Leith A (1996) SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J Struct Biol*, 116(1):190–199
22. Futai M (1977) Reconstitution of ATPase activity from the isolated alpha, beta, and gamma subunits of the coupling factor, F1, of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 79(4):1231–1237
23. Gibbons C, Montgomery MG, Leslie AG, Walker JE (2000) The structure of the central stalk in bovine F(1)-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat Struct Biol*, 7(11):1055–1061
24. Gogol EP (1994) Electron microscopy of the F1F0 ATP synthase: from structure to function. *Microsc Res Tech*, 27(4):294–306
25. Gräf R, Novak FJ, Harvey WR, Wiczorek H (1992) Cloning and sequencing of cDNA encoding the putative insect plasma membrane V-ATPase subunit A. *FEBS Lett*, 300(2):119–122
26. Gräf R, Harvey WR, Wiczorek H (1994) Cloning, sequencing and expression of cDNA encoding an insect V-ATPase subunit E. *Biochim Biophys Acta*, 1190(1):193–196

27. Gräf R, Harvey WR, Wiczorek H (1996) Purification and properties of a cytosolic V1-ATPase. *J Biol Chem*, 271(34):20908–20913
28. Graham LA, Powell B, Stevens TH (2000) Composition and assembly of the yeast vacuolar H(+)-ATPase complex. *J Exp Biol*, 203(1):61–70
29. Grüber G, Radermacher M, Ruiz T, Godovac-Zimmermann J, Canas B, Kleine-Kohlbrecher D, Huss M, Harvey WR, Wiczorek H (2000a) Three-dimensional structure and subunit topology of the V(1) ATPase from *Manduca sexta* midgut. *Biochemistry*, 39(29):8609–8616
30. Grüber G, Svergun DI, Godovac-Zimmermann J, Harvey WR, Wiczorek H, Koch MH (2000b) Evidence for major structural changes in the *Manduca sexta* midgut V1 ATPase due to redox modulation. A small angle X-ray scattering study. *J Biol Chem*, 275(39):30082–30087
31. Grüber G, Wiczorek H, Harvey WR, Müller V (2001) Structure-function relationships of A-, F- and V-ATPases. *J Exp Biol*, 204(Pt 15):2597–2605
32. Grüber G, Godovac-Zimmermann J, Link TA, Coskun Ü, Rizzo VF, Betz C, Bailer SM (2002) Expression, purification, and characterization of subunit E, an essential subunit of the vacuolar ATPase. *Biochem Biophys Res Commun*, 298(3):383–391
33. Grüber G (2003) Introduction: A close look at the vacuolar ATPase. *J Bioenerg Biomembr*, 35(4):277–280
34. Hicks DB, Krulwich TA (1986) The membrane ATPase of alkalophilic *Bacillus firmus* RAB is an F1-type ATPase. *J Biol Chem*, 261(27):12896–12902
35. Hirata T, Iwamoto-Kihara A, Sun-Wada GH, Okajima T, Wada Y, Futai M (2003) Subunit rotation of vacuolar-type proton pumping ATPase: relative rotation of the G and C subunits. *J Biol Chem*, 278(26):23714–23719

36. Imamura H, Nakano M, Noji H, Muneyuki E, Ohkuma S, Yoshida M, Yokoyama K (2003) Evidence for rotation of V1-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(5):2312–2315
37. Inoue T, Wilkens S, Forgac M (2003) Subunit structure, function, and arrangement in the yeast and coated vesicle V-ATPases. *J Bioenerg Biomembr*, 35(4):291–299
38. Kagawa Y, Racker E (1966) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. 8. Properties of a factor conferring oligomycin sensitivity on mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem*, 241(10):2461–2466
39. Kagawa Y, Ohta S, Otawara-Hamamoto Y (1989) $\alpha_3\beta_3$ complex of thermophilic ATP synthase. Catalysis without the γ -subunit. *FEBS Lett*, 249(1):67–69
40. Kane PM (1995) Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H(+)-ATPase in vivo. *J Biol Chem*, 270(28):17025–17032
41. 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):2801–2809
42. Kyhse-Andersen J (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Meth*, 10(3-4):203–209
43. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(259):680–685
44. Lötscher HR, de Jong C, Capaldi RA (1984) Interconversion of high and low adenosine-triphosphatase activity forms of *Escherichia coli* F1 by the detergent lauryldimethylamine oxide. *Biochemistry*, 23(18):4140–4143
45. McCarty RE, Racker E (1968) Partial resolution of the enzymes catalyzing photophosphorylation. Activation of adenosine triphosphatase and ^{32}P -labeled orthophosphate - adenosine triphosphate exchange in chloroplasts. *J Biol Chem*, 243(1):129–137

46. Merzendorfer H, Gräf R, Huss M, Harvey WR, Wieczorek H (1997) Regulation of proton-translocating V-ATPases. *J Exp Biol*, 200 (Pt 2):225–235
47. Merzendorfer H, Reineke S, Zhao XF, Jacobmeier B, Harvey WR, Wieczorek H (2000) The multigene family of the tobacco hornworm V-ATPase: novel subunits a, C, D, H, and putative isoforms. *Biochim Biophys Acta*, 1467(2):369–379
48. Miwa K, Yoshida M (1989) The $\alpha_3\beta_3$ complex, the catalytic core of F1-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(17):6484–6487
49. Montecucco C, Rappuoli R (2001) Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(6):457–466
50. Müller V, Grüber G (2003) ATP synthases: structure, function and evolution of unique energy converters. *Cell Mol Life Sci*, 60(3):474–494
51. Nakhoul NL, Hamm LL (2002) Vacuolar H(+)-ATPase in the kidney. *J Nephrol*, 15 Suppl 5:S22–S31
52. Nelson H, Mandiyan S, Nelson N (1995) A bovine cDNA and a yeast gene (VMA8) encoding the subunit D of the vacuolar H(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(2):497–501
53. Nelson N (1993) Presynaptic events involved in neurotransmission. *J Physiol Paris*, 87(3):171–178
54. Nishi T, Forgac M (2002) The vacuolar (H+)-ATPases—nature’s most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(2):94–103
55. Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinosita J (1997) Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature*, 386(6622):299–302
56. Novak FJ, Gräf R, Waring RB, Wolfersberger MG, Wieczorek H, Harvey WR (1992) Primary structure of V-ATPase subunit B from *Manduca sexta* midgut. *Biochim Biophys Acta*, 1132(1):67–71

57. Penefsky HS, Pullman ME, Datta A, Racker E (1960) Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation. II. Participation of a soluble adenosine triphosphatase in oxidative phosphorylation. *J Biol Chem*, 235(11):3330–3336
58. Perzov N, Padler-Karavani V, Nelson H, Nelson N (2001) Features of V-ATPases that distinguish them from F-ATPases. *FEBS Lett*, 504(3):223–228
59. Radermacher M, Ruiz T, Harvey WR, Wieczorek H, Grüber G (1999) Molecular architecture of *Manduca sexta* midgut V1 ATPase visualized by electron microscopy. *FEBS Lett*, 453(3):383–386
60. Radermacher M, Ruiz T, Wieczorek H, Grüber 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
61. Radermacher M (1988) Three-dimensional reconstruction of single particles from random and nonrandom tilt series. *J Electron Microsc Tech*, 9(4):359–394
62. Radon J (1917) Über die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte längs gewisser Mannigfaltigkeiten. *Ber Verh Sächs Akad Wiss Leipzig, Math-Nat*, 69:262–277
63. Ran H, Hassett DJ, Lau GW (2003) Human targets of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(24):14315–14320
64. Rizzo VF, Coskun Ü, Radermacher M, Ruiz T, Armbrüster A, Grüber G (2003) Resolution of the V1 ATPase from *Manduca sexta* into subcomplexes and visualization of an ATPase-active A3B3EG complex by electron microscopy. *J Biol Chem*, 278(1):270–275
65. Roussa E, Thevenod F, Sabolic I, Herak-Kramberger CM, Nastainczyk W, Bock R, Schulz I (1998) Immunolocalization of vacuolar-type H⁺-ATPase in rat submandibular gland and adaptive changes induced by acid-base disturbances. *J Histochem Cytochem*, 46(1):91–100

66. Schagger H, Cramer WA, von Jagow G (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem*, 217(2):220–230
67. Schuster SM (1979) Effect of organic solvents on the beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *Biochemistry*, 18(7):1162–1167
68. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150(1):76–85
69. Sumner JP, Dow JAT, Earley FGP, Klein U, Jäger D, Wieczorek H (1995) Regulation of Plasma Membrane V-ATPase Activity by Dissociation of Peripheral Subunits. *J Biol Chem*, 270(10):5649–5653
70. Svergun DI, Konrad S, Huss M, Koch MH, Wieczorek H, Altendorf K, Volkov VV, Grüber G (1998) Quaternary structure of V1 and F1 ATPase: significance of structural homologies and diversities. *Biochemistry*, 37(51):17659–17663
71. Thevenod F (2002) Ion channels in secretory granules of the pancreas and their role in exocytosis and release of secretory proteins. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283(3):C651–C672
72. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76(9):4350–4354
73. Trombetta ES, Ebersold M, Garrett W, Pypaert M, Mellman I (2003) Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science*, 299(5611):1400–1403

74. Wieczorek H, Grüber G, Harvey WR, Huss M, Merzendorfer H, Zeiske W (2000) Structure and regulation of insect plasma membrane H(+)-V-ATPase. *J Exp Biol*, 203(1):127–135
75. Wilkens S (2001) Structure of the vacuolar adenosine triphosphatases. *Cell Biochem Biophys*, 34(2):191–208
76. Winter C, Schulz N, Giebisch G, Geibel JP, Wagner CA (2004) Nongenomic stimulation of vacuolar H⁺-ATPases in intercalated renal tubule cells by aldosterone. *Proc Natl Acad Sci USA*
77. Xie XS (1996) Reconstitution of ATPase Activity from Individual Subunits of the Clathrin-coated Vesicle Proton Pump. The requirement and effect of three small subunits. *J Biol Chem*, 271(48):30980–30985
78. Xu T, Forgac M (2000) Subunit D (Vma8p) of the Yeast Vacuolar H⁺-ATPase Plays a Role in Coupling of Proton Transport and ATP Hydrolysis. *J Biol Chem*, 275(29):22075–22081
79. Xu T, Vasilyeva E, Forgac M (1999) Subunit Interactions in the Clathrin-coated Vesicle Vacuolar (H⁺)-ATPase Complex. *J Biol Chem*, 274(41):28909–28915
80. Yasuda R, Noji H, Kinosita J, Yoshida M (1998) F₁-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps. *Cell*, 93(7):1117–1124

7 eigene Publikationen

- 2002 Grüber G, Godovac-Zimmermann J, Link TA, Coskun Ü, **Rizzo VF**, Betz C, Bailer SM. Expression, purification, and characterization of subunit E, an essential subunit of the vacuolar ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 298(3):383–391
- 2003 **Rizzo VF**¹, Coskun Ü¹, Radermacher M, Ruiz T, Armbrüster A, Grüber G. Resolution of the V₁ATPase from *Manduca sexta* into subcomplexes and visualization of an ATPase-active A₃B₃EG complex by electron microscopy. *J Biol Chem* 278(1):270–275
- 2004 Coskun Ü¹, **Rizzo VF**¹, Koch MHJ, Godovac-Zimmermann J, Grüber G. Ligand-dependent structural changes in the V₁ATPase from *Manduca sexta*. *J Bioenerg Biomembr* 36(3):249–256

¹gleichwertig an der Publikation beteiligt

8 Dank

An erster Stelle danke ich Herrn PD Dr. Gerhard Grüber, dass er das Wagnis eingegangen ist, einen Medizinstudenten als Doktoranden anzunehmen und mir eine sehr gute Betreuung angedeihen liess;

unserer kleinen, aber sehr feinen Arbeitsgruppe: Ünal Coskun, der mir nicht nur die ersten Schritte im Labor gezeigt hat, sondern mir auch ein Freund geworden ist; Andrea Armbrüster, die immer wusste, in welchem Schrank ich das notwendige Material finde; Sandra Juliano, die liebevoll dafür sorgte, dass ich nicht in die Hypoglykämie fiel; Christina Hohn für ihre frechen Aufmunterungen; Lucia Coskun für die MALDI-Daten;

Prof. Michael Radermacher und Dr. Teresa Ruiz für den Einblick in die Elektronenmikroskopie und die schönen Aufnahmen des A_3B_3EG -Subkomplexes;

Dr. Schachtner von der Philipps-Universität Marburg und Prof. Trenczek von der Justus-Liebig-Universität Giessen für die Manduca-Eier;

Prof. Dr. H.-J. Schäfer vom Institut für Biochemie an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz für die photoaktivierbaren Nukleotidanaloga;

dem Institut für med. Biochemie unserer Fakultät für die Möglichkeit, viele Stunden in ihrem Keller die Ultrazentrifuge zu benutzen;

meinen Eltern und Freunden, die ich oft mit den Worten „ich bin noch im Labor“ verträsten musste: es hat sich gelohnt;

meinem Bruder Nico für die moralische Unterstützung auch über die Entfernung hinweg;

den Teilnehmern der Newsgroup de.comp.text.tex, die mit ihren Tipps halfen, diese Arbeit ansehnlich zu setzen, besonders Markus Koma für sein Paket koma-script;

und einem speziellen Freund, der kurz vor Abgabe der Arbeit aufgetaucht ist:



Viktor A.T. Pase

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Vincenzo Filippo Rizzo

Geb. am 26. 05. 1977 in Homburg

Ledig, italienische Staatsbürgerschaft

Schulbildung

1983–1987 Grundschule Homburg-Einöd

1987–06/1996 Staatl. Helmholtzgymnasium Zweibrücken, mit Abitur abgeschlossen

Studium

seit 10/1996 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes (UdS)

Herbst 2000 Ärztliche Vorprüfung

Herbst 2001 Erstes Staatsexamen

3. Juni 2005

A Anhang

A.1 Ergebnisse der MALDI-Messungen

Bande I

Peak Intensity	observed mass	calc. mass	Delta mass	position	miss-cleavages	artif.modification(s) ¹	peptide sequence
Subunit A							
2266	760,7	760,4	0,3	592-598	1		DGEAKIK
1591	774,7	774,4	0,4	394-400	0		CLGNPDR
1699	776,7	744,4	0,3	166-171	0	MSO: 166, 168	MLMPPR
11511	885,8	885,4	0,4	382-388	0	776,3793	LASFYER
5025	912,9	912,5	0,4	122-130	0		GVNVPSLAR
22392	1135,1	1134,6	0,5	468-476	0		NYPEFVPLR
1081	1208,1	1208,7	-0,6	164-173	2		HKMLMPPRAK
10508	1246,1	1245,6	0,5	543-552	0		NIISFYDMSR
13390	1317,3	1316,7	0,5	221-232	0		LPANHPLLTGQR
3154	1490,4	1489,7	0,6	131-142	0		EVDWEFNPLNVK
2063	1508,4	1491,8	0,6	201-212	0	MSO: 205	AQYTMLQVWPVR
3150	1533,5	1533,8	-0,3	109-121	0	1507,7726	DINELTQSIYIPK
1618	1581,4	1580,8	0,6	187-200	0		VTDVVLETEFDGEK
7179	1729,5	1728,8	0,7	599-613	0		ADFDQLLEDMSAAFR
5064	1782,6	1781,9	0,7	365-381	0		LAEMPADSGYPAYLGAR
941	1798,6	1781,9	0,7	365-381	0	MSO: 368	LAEMPADSGYPAYLGAR
2051	2210,1	2209,2	0,9	143-163	0	1797,8476	VGSHITGGDLYGIVHENTLVK
389	2693,5	2692,5	0,9	83-108	0		TGKPLSVELGPGILGSIFDGIQRPLK

Coverage 32,58%

¹MSO: Methioninsulfoxid, CysPAM: Propionamid-Cysteinbildung durch Acrylamid

Bande III

Peak Intensity	observed mass	calc. mass	Delta mass	position	miss-cleavages	artif.modification(s)	peptide sequence
Subunit A							
1238	760,483828	760,4199	0,0639281	592-598	1		DGEAKIK
1045	776,451639	744,3895	0,0723385	166-171	0	MSO: 166, 168	MLMPPR
14081	885,516642	885,4465	0,0701422	382-388	0		LASFYER
3508	912,597018	912,5261	0,070918	122-130	0		GVNVPSLAR
945	1000,5102	1000,4622	0,0480007	460-467	0		ALDDFYEK
27961	1134,67223	1134,5942	0,0780309	468-476	0		NYPEFVPLR
1080	1204,61387	1204,544	0,0698715	9-18	0		TIANEENEER
2123	1243,66199	1243,5809	0,0810925	35-45	0		MSGSAMVELVR
10442	1245,66146	1245,5932	0,0682614	543-552	0		NIISFYDMSR
20695	1316,8078	1316,7433	0,0644963	221-232	0		LPANHPLLTGQR
1769	1354,75684	1354,7001	0,0567362	174-186	0		GTVTYIAPAGNYK
20068	1361,80833	1361,7423	0,0660339	46-57	0		VGYNELVGEIIR
3826	1489,81041	1489,7321	0,0783147	131-142	0		EVDWFEPLNVK
9354	1491,85181	1491,7777	0,0741053	201-212	0		AQYTMLQVWPVR
2070	1515,86672	1515,7948	0,0719209	309-323	0		TALVANTSNMPVAAR
3124	1728,88458	1728,7897	0,0948801	599-613	0		ADFDQLLEDMSAAFR
1073	1737,8289	1737,7351	0,0937972	517-530	0		DDFLQQNSYSSYDR
5829	1781,94979	1781,8526	0,0971899	365-381	0		LAEMPADSGYPAYLGAR
1666	1797,95433	1781,8526	0,1067329	365-381	0	MSO: 368	LAEMPADSGYPAYLGAR
2172	2209,35641	2209,1611	0,1953118	143-163	0		VGSHITGGDLYGIVHENTLVK
216	2298,4218	2298,2438	0,1780044	479-498	1		VKEILQEEEDLSEIVQLVGK
1009	2679,49589	2679,3181	0,1777864	58-82	0		LEGDMATIQVYEETSGVTVGDPVLR
287	2770,5354	2771,3742	-0,838799	572-596	3		DAMGNVLYQLSSMKFKDPVKDGEAK
Coverage 46,19%							
Subunit B							
5365	862,513408	862,4417	0,0717083	21-27	0		DFISQPR
2554	910,587128	910,5105	0,0766275	13-20	0		EHVLAVSR
1095	963,606137	963,5509	0,0552374	51-58	0		FSEIVQLK
1427	1104,60947	1104,5354	0,0740744	104-113	0		TPVSEDMIGR
12795	1376,83627	1376,7572	0,0790714	479-490	0		IPASILAEFYPR
3072	1507,8493	1491,7777	0,0767028	201-212	0	MSO: 205	AQYTMLQVWPVR
1348	1520,87529	1520,7954	0,0798918	77-91	0		AVVQVFEGTSGIDAK
3030	1532,92872	1532,8583	0,0704226	478-490	1		RIPASILAEFYPR
8927	1582,97569	1582,8951	0,08059	371-384	0		QIYPPVNVLPVLSLR

1320	1676,98291	1676,9006	0,0823105	456-469	0	TVFESLDIGWQLLR
3777	1897,00298	1896,8836	0,1193836	306-321	0	GFPGYMYTDLATIYER
445	2336,39455	2336,2271	0,1674459	421-441	0	AVVGEEALTPDDLLEFLTK
392	2451,42659	2451,2258	0,2007874	147-168	0	IYPEEMIQTGISAIDVMNSIAR
1299	2463,48076	2463,2666	0,2141631	125-146	0	GPPILAEDFLDIQQQPINPWSR
371	2752,43544	2752,2705	0,164937	202-226	0	SVLDDHEDNFAIVFAAMGVNMETAR
Coverage 39,68%						
Subunit E						
1320	654,805954	655,3158	-0,509846	88-92	0	EDHVR
2498	656,754766	656,3977	0,3570661	102-107	0	LAEVPK
1530	677,514336	677,3729	0,1414358	213-218	0	NALFGR
1701	771,534582	771,4471	0,0874821	45-50	0	LVQQQR
2441	957,650606	957,5727	0,0779058	142-150	0	ALVESLLGR
1406	1453,67915	1452,7189	0,9602507	88-99	1	EDHVRNVLDEAR
3079	1535,98955	1535,9155	0,0740496	200-212	0	LELIAQQLLPEIR
686	1690,63707	1690,9122	-0,275135	142-156	1	ALVESLLGRAQQDYK
608	2695,59696	2696,5603	-0,963343	63-85	4	QVELQKKIQSSNMLNQRARKVLK
Coverage 35,84%						
Subunit G						
1260	785,752159	786,542	-0,789841	27-32	4	KRKAKR
1250	1259,63505	1259,659	-0,023955	67-78	1	EGVAAKIDAETR
247	2413,07078	2412,3285	0,74228	98-117	1	DVLNLVYDIKPELHINYRVV
Coverage 32,48%						

Bande IV

Peak Intensity	observed mass	calc. mass	Delta mass	position	miss-cleavages	artif.modification(s)	peptide sequence
Subunit A							
4794	745,4	745,4	0,0	354-359	0		WAEALR
2826	885,4	885,4	0,0	382-388	0		LASFYER
2957	887,5	887,5	0,0	565-571	0		VTWNVIR
6300	1134,6	1134,6	0,0	468-476	0		NYPEFVPLR
695	1243,6	1243,6	0,0	35-45	0		MSGSAMVELVR
3307	1245,6	1245,6	0,0	543-552	0		NIISFYDMSR

498	1287,7	1287,7	0,0	354-364	1			WAEALREISGR
3870	1316,7	1316,7	-0,1	221-232	0			LPANHPLLTGQR
567	1354,6	1354,7	-0,1	174-186	0			GTVTYIAPAGNYK
635	1466,8	1450,7	0,1	457-467	1	MSO: 458	1466,662	YMRALDDFYEK
955	1489,6	1489,7	-0,1	131-142	0			EVDWEFNPLNVK
3708	1491,7	1491,8	-0,1	201-212	0			AQYTMLQVWPVR
657	1507,7	1491,8	-0,1	201-212	0	MSO: 205	1507,7726	AQYTMLQVWPVR
675	1515,7	1515,8	-0,1	309-323	0			TALVANTSNPVAAR
1090	1580,7	1580,8	-0,1	187-200	0			VTDVVLETEFDGEK
1726	1728,7	1728,8	-0,1	599-613	0			ADFDQLLEDMSAAFR
1483	1737,8	1737,7	0,0	517-530	0			DDFLQQNSYSSYDR
3852	1781,8	1781,9	0,0	365-381	0			LAEMPADSGYPAYLGAR
1226	2071,1	2071,1	0,0	481-498	0			EILQEEEDLSEIVQLVGK
1020	2209,1	2209,2	0,0	143-163	0			VGSHITGGDLYGIVHENTLVK
711	2679,2	2679,3	-0,1	58-82	0			LEGDMATIQQVYEETSGVTVGDPVLR

Coverage 41,17%

Subunit F

655	1102,5	1086,5	0,0	37-45	0	MSO: 41	1102,535	HPNFMVVVDK
779	1393,7	1376,7	1,0	113-124	1	MSO: 116	1392,694	AKGMFNPEDLVR
635	1466,8	1395,6	0,1	46-57	0	CysPAM: 55	1466,6831	NTPVSEIECFK
2226	1517,6	1516,7	0,9	99-111	1			DHPYDASKDSILR

Coverage 37,10%

Subunit G

481	1120,5	1120,6	-0,1	49-56	2			QERERQFK
1327	1275,6	1274,7	0,9	87-97	1			MVQTQKEAVIK
704	1777,9	1760,9	1,0	57-72	2	MSO: 63	1776,8697	EFEAKHMGTRGVAAK

Coverage 29,91%

Bande V

Peak Intensity	observed mass	calc. mass	Delta mass	position	miss-cleavages	artif.modification(s)	peptide sequence
974	700,4	701,4	-1,0	127-133	0		GGQQLAK
1107	728,3	728,5	-0,1	90-95	1		AQIKIR

Subunit D

1017	729,4	730,4	-1,0	225-231	0			AAGQDLR
1039	743,4	743,3	0,0	197-201	0			EEFYR
1075	778,5	778,4	0,1	14-20	0			GAQMLMK
1356	793,5	793,4	0,1	137-143	0			NFQSAVK
1247	799,7	800,5	-0,8	21-28	1			GRLAGAQQ
10826	803,6	803,5	0,1	7-13	0			LAIFPSR
1820	1074,7	1074,6	0,1	5-13	1			DRLAIFPSR
12116	1260,8	1260,7	0,1	169-179	0			VNAIEHVIIPR
8492	1416,9	1416,8	0,1	168-179	1			RVNAIEHVIIPR
2716	1811,1	1810,9	0,2	74-89	0			FTTGDFNQVVLQNVTK
1745	2218,5	2218,3	0,2	144-163	0			LLVELASLQTSFVTLDEVIK
4777	2389,4	2389,2	0,2	183-201	1			TLAYIISELDELEREEFYR
1014	2452,4	2421,4	-1,0	14-36	5	MSO: 17, 19	2453,3955	GAQMLMKGRLAGAQQKGHLLKKK
1381	3001,6	3001,4	0,2	99-126	0			DNVAGVTLPIFESYQDGSPTYELAGLAR
Coverage 62,20%								

Subunit E

1533	656,7	656,4	0,3	102-107	0			LAEVPK
961	716,3	716,4	-0,1	136-141	1			VRQADK
986	770,6	771,4	-0,8	45-50	0			LVQQQR
1902	957,6	957,6	0,1	142-150	0			ALVESLLGR
542	1158,7	1158,6	0,0	213-222	1			NALFGRNPNR
1373	1399,9	1399,8	0,1	138-150	1			QADKALVESLLGR
1770	1536,0	1535,9	0,1	200-212	0			LELIAQQLPEIR
458	2677,8	2677,6	0,3	190-212	2			IKISNTLESRLELIAQQLPEIR
530	3607,9	3608,0	-0,1	159-191	5			IKKDVVLKIDNENFLPPDTCGGIELIAAKGRIK
Coverage 41,15%								

Bande VI

Peak Intensity	observed mass	calc. mass	Delta mass	position	miss-cleavages	artif.modification(s)	peptide sequence
Subunit E							
6420	957,9	957,6	0,3	142-150	0		ALVESLLGR
4609	1400,2	1399,8	0,4	138-150	1		QADKALVESLLGR
14870	1536,4	1535,9	0,4	200-212	0		LELIAQQLPEIR
523	1655,4	1655,0	0,5	136-150	2		VRQADKALVESLLGR

18080	2437,1	2436,4	0,7	192-212	1			ISNTLESRLIELIAQQLLPEIR
5043	2678,3	2677,6	0,7	190-212	2			IKISNTLESRLIELIAQQLLPEIR
467	2751,0	2734,5	0,5	70-92	4	MSO: 75	2750,5206	IQSSNMLNQARLKVLKVREDHVR
889	3424,3	3423,6	0,7	14-42	2			HMMAFIEQEANEKAEEDAKAEFEFNIEK

Coverage 39,82%

Subunit G

821	765,6	749,3	0,3	81-86	0	MSO: 84	765,3447	IDEMNK
469	1741,4	1725,9	-0,5	1-16	0	MSO: 1	1741,8901	MASQTHGIQQLLAAEK
1076	2083,8	2083,1	0,7	62-80	3			HMGTTREGVAAKIDAETRIK
593	2245,8	2246,2	-0,4	79-97	3			IKIDEMNKMVQTQKEAVIK
2895	2422,6	2391,2	-0,6	73-92	3	MSO: 84, 87	2423,2268	IDAETRIKIDEMNKMVQTQK

Coverage 44,45%