

**Elektrophysiologische Charakterisierung der vakuolären  
H<sup>+</sup>-ATPase von *Saccharomyces cerevisiae***

Zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften  
an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften  
der  
Universität Karlsruhe  
genehmigte  
DISSERTATION

von

**Carsten Kettner**

aus Bonn

1999

Tag der mündlichen Prüfung: 05. Mai 1999

Referent: PD. Dr. A. Bertl

Korreferent: PD Dr. G. Thiel



Berichte aus der Biologie

**Carsten Kettner**

**Elektrophysiologische Charakterisierung  
der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase  
von *Saccharomyces cerevisiae***

Shaker Verlag  
Aachen 1999

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

*Kettner, Carsten:*

Elektrophysiologische Charakterisierung der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase  
von *Saccharomyces cerevisiae* / Carsten Kettner.

- Als Ms. gedr. - Aachen : Shaker, 1999

(Berichte aus der Biologie)

Zugl.: Karlsruhe, Univ., Diss., 1999

ISBN 3-8265-6499-5

Copyright Shaker Verlag 1999

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen  
oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungs-  
anlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Als Manuskript gedruckt. Printed in Germany.

ISBN 3-8265-6499-5

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • eMail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)





## **Danksagung**

Diese Arbeit konnte nur durch die Unterstützung vieler Leute in meiner Umgebung entstehen. Ich möchte ihnen daher an dieser Stelle meinen herzlichen Dank aussprechen:

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. M. H. Weisenseel und PD. Dr. A. Bertl.

Prof. Weisenseel gestattete es mir in seiner Eigenschaft als Insitutsleiter des Botanischen Instituts I der Universität Karlsruhe, in seinem Institut die Experimente durchzuführen.

Mein Doktorvater Dr. Bertl überließ mir das Thema, stellte mir außerordentlich großzügig seine Arbeits- und Meßplätze zur Verfügung und stand mir jederzeit hilfreich mit Anregungen, Tips und Tricks zur Verfügung. Durch viele fachliche Diskussionen lernte ich wissenschaftlich zu denken und Bewertungen vorzunehmen und in vielen persönlichen Gesprächen erlangte ich häufig neue Motivation. Darüberhinaus sorgte er dafür, daß ich jederzeit in Lohn und Brot blieb.

Herrn Prof. Dr. G. Obermeyer (Universität Salzburg) und Herrn PD Dr. G. Thiel (Universität Göttingen) danke ich sehr für ihre Unterstützung. Ersterem für die Initialzündung zu dieser Arbeit und eine Reihe von Anregungen und letzterem für die Übernahme des Korreferates.

Antje, Uwe, Gabi, Carmen, Ulla und Simon danke ich für eine gute Arbeitsatmosphäre, durch die häufig der Ernst des Lebens verdrängt werden konnte, für entspannende Rauchpausen, für anregende wissenschaftliche Diskussionen bei gutem Essen und für hilfreiche Hinweise und Hilfen bei der Korrektur der Arbeit.

Meiner Frau danke ich für viel Geduld mit ihrem Ehemann, für viele aufbauende Worte und Ablenkungen sowie für das Korrekturlesen der Arbeit mit den Augen eines Laien.

Darüberhinaus danke ich meinen Eltern und Schwiegereltern für ihre aufmunternde Unterstützung und allen Freunden und Bekannten, die mich auf meinem Weg hilfreich begleitet haben.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> . . . . .	1
1.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> im mikroskopischen Bild . . . . .	1
1.2	Die Vakuole . . . . .	1
1.3	Funktionen der Vakuole . . . . .	1
1.4	Transportwege im Tonoplast . . . . .	2
1.5	Die V-ATPase erzeugt eine elektrische Spannung und einen Protonengradienten . . . . .	3
1.6	Die V-ATPase ist die einzige Protonenpumpe im Tonoplast von <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	3
1.7	Andere H <sup>+</sup> -ATPasen . . . . .	4
1.8	Die molekulare Struktur der V-ATPase von Pilzen . . . . .	5
1.9	V-ATPasen sind nicht nur auf Vakuolen beschränkt . . . . .	7
1.10	<i>S. cerevisiae</i> als Expressionssystem für heterologe, clonierte Gene . . . . .	7
1.11	Stand der Forschung: Elektrophysiologie des ATP-abhängigen Protonentransports am Tonoplast . . . . .	8
1.12	Ziel der Arbeit . . . . .	9
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> . . . . .	10
2.1	Versuchsobjekt . . . . .	10
2.2	Anzucht und Lagerung der Zellen . . . . .	10
2.3	Methoden zur Protoplasten-Präparation . . . . .	11
2.3.1.	Präparation der Protoplasten . . . . .	12
2.3.2	Isolierung der Vakuolen . . . . .	13
2.4	Elektrophysiologische Experimente . . . . .	14
2.4.1	Versuchsaufbau . . . . .	14
2.4.2	Herstellung der Glasmikroelektroden . . . . .	18
2.4.3	Durchführung der Experimente . . . . .	20
2.5	Datenanalyse . . . . .	23
2.5.1	Bestimmung der Membranoberfläche . . . . .	23
2.5.2	Bestimmung, Normierung und Darstellung des Ladungstransfers durch die V-ATPase . . . . .	24
2.5.3	Strom-Spannungscharakteristik der V-ATPase . . . . .	24
2.6	Die thermodynamische Abschätzung der Kopplungsrate . . . . .	26
2.7	Bestimmung von K <sub>ATP</sub> . . . . .	27

Anhang A:	Lösungen . . . . .	29
Anhang B:	Herkunft der Chemikalien . . . . .	31
Anhang C:	Kurzbeschreibung des Basic-Programmes "camg" . . . . .	31
Anhang D:	Freie Magnesiumkonzentrationen in Abhängigkeit von pH, EGTA und ATP . . . . .	32
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> . . . . .	<b>33</b>
3.1	Cytoplasmatisches Calcium aktiviert Kanäle im Tonoplast von <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	33
3.2	Cytosolisches ATP induziert einen Auswärtsstrom in isolierten Hefe-Vakuolen . . . . .	34
3.2.1	Sukzessive Verringerung der Strom-Amplitude durch alternierende ATP-Zugabe und -Entfernung . . . . .	36
3.2.2	Hemmung des ATP-abhängigen Stromes auch bei niedrigen KCl- Konzentrationen . . . . .	38
3.3	Hefe-Vakuolen zeigen keine Pyrophosphatase-Aktivität . . . . .	40
3.4	Der ATP-induzierte Strom wird von der V-ATPase generiert . . . . .	41
3.4.1	Die Strom-Spannungscharakteristik des Tonoplast . . . . .	41
3.4.2	Der ATP-induzierte Strom wird durch Bafilomycin A <sub>1</sub> irreversibel gehemmt . . . . .	43
3.5	Abhängigkeit der V-ATPase-Aktivität von physiologischen Faktoren . .	45
3.5.1	Der Pumpenstrom ist abhängig von MgATP . . . . .	45
3.5.2	Die pH-Abhängigkeit der V-ATPase . . . . .	47
3.5.3	Affinität der V-ATPase für MgATP . . . . .	50
3.5.4	Die Nukleotid-Spezifität der V-ATPase . . . . .	53
3.5.4.1	MgADP induziert keinen Auswärtsstrom . . . . .	53
3.5.4.2	Aktivierung der V-ATPase durch andere Nukleosid-Triphosphate . . . .	53
3.5.4.3	ATP- $\gamma$ -S ist kein Substrat der V-ATPase . . . . .	56
3.6	Die Kopplungsraten der V-ATPase in Abhängigkeit des pH-Gradienten	58
3.6.1	H <sup>+</sup> /ATP-Kopplung bei verschiedenen cytoplasmatischen pH . . . . .	59
3.6.2	H <sup>+</sup> /ATP-Kopplung bei verschiedenen vakuolären pH . . . . .	61
3.7	Ist die V-ATPase Kalium-abhängig? . . . . .	64
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>67</b>
4.1	Meßmethoden . . . . .	67
4.1.1	YVC1 in der Whole-vacuole-Ableitung . . . . .	68
4.1.2	Der Tonoplast von <i>S. cerevisiae</i> enthält keine H <sup>+</sup> -PPase . . . . .	69

---

4.2	Der ATP-abhängige Auswärtsstrom . . . . .	70
4.2.1	Abschätzung der Dichte der V-ATPasen im Tonoplast . . . . .	71
4.2.2	Was ist die Ursache für die transiente Natur des ATP-abhängigen Stromes? . . . . .	71
4.2.2	Was ist die Ursache für die transiente Natur des ATP-abhängigen Stromes? . . . . .	71
4.3	Zuordnung des ATP-abhängigen Stromes zur V-ATPase . . . . .	74
4.3.1	Die Strom-Spannungskennlinie der V-ATPase . . . . .	74
4.3.2	Bafilomycin hemmt die Aktivierung des ATP-abhängigen Stromes . . . . .	75
4.4	Enzymatische Eigenschaften der V-ATPase . . . . .	77
4.4.1	Die V-ATPase ist MgATP-abhängig . . . . .	77
4.4.2	pH-Optimum des ATP-abhängigen Stromes . . . . .	78
4.4.3	Die Affinität der V-ATPase für ATP . . . . .	79
4.4.4	Die Nukleotid-Spezifität des ATP-abhängigen Stromes . . . . .	81
4.4.5	Das nicht-hydrolysierbare ATP-Analagon ATP- $\gamma$ -S induziert keinen Strom . . . . .	82
4.5	H <sup>+</sup> /ATP-Kopplung der V-ATPase in Abhängigkeit des pH-Gradienten . . . . .	83
4.5.1	Begriffsabgrenzung "Kopplungsrate" und "Stöchiometrie" . . . . .	83
4.5.2	Die Kopplungsrate der V-ATPase von <i>S. cerevisiae</i> ist variabel und pH-abhängig . . . . .	83
4.5.3	Mögliche Ursachen für eine unvollständige Kopplung . . . . .	84
4.5.4	Unvollständige Kopplung der V-ATPase von <i>Beta vulgaris</i> . . . . .	85
4.5.5	Andere Vorschläge für die Ursachen der unvollständigen Kopplung . . . . .	85
4.5.6	Die physiologische Bedeutung der hohen Kopplungsraten . . . . .	86
4.5.7	Die V-ATPase generiert in der Nähe des Gleichgewichts kleinere Ströme . . . . .	87
4.6	Modulation des ATP-abhängigen Whole-vacuole-Stromes durch KCl? . . . . .	88
4.6.1	Keine Abhängigkeit der Kopplungsraten von Kalium . . . . .	88
4.6.2	Kalium moduliert die ATP-abhängigen Stromdichten . . . . .	88
4.6.3	Mögliche Ursachen für den Kalium-Effekt auf den ATP-induzierten Strom . . . . .	89
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung . . . . .</b>	<b>90</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis . . . . .</b>	<b>93</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Ampere, elektrischer Strom
Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
d. h.	das heißt
E	Gleichgewichtspotential
EGTA	Ethylenglycol-bis-( $\beta$ -aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
et al.	et alteri (und andere)
g	Gramm
G $\Omega$	Gigaohm (Widerstand von $10^9$ Ohm)
h	hora (Stunde)
Hz	Hertz
I	Strom
kHz	Kilohertz
M	Molar, Konzentration mol/l
mA	Milliampere, elektrischer Strom $10^{-3}$ A
mAm <sup>-2</sup>	Stromdichte, Milliampere pro Quadratmeter
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonisäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter ( $10^{-3}$ l)
mM	Millimolar ( $10^{-3}$ M)
ms	Millisekunde ( $10^{-3}$ s)
mV	Millivolt, elektrische Spannung $10^{-3}$ V
M $\Omega$	Megaohm (Widerstand von $10^6$ Ohm)
p. a.	pur analysis (zur Analyse)
pA	Picoampere, elektrischer Strom $10^{-12}$ A
pF	Picofarad, Kapazität $10^{-12}$ F
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonen-Konzentration
pK <sub>s</sub>	negativ dekadische Dissoziationskonstante
rpm	Umdrehungsgeschwindigkeit (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Tab.	Tabelle
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
V	Spannung
$\mu$ m	Mikrometer ( $10^{-6}$ m)