

Berichte aus der Biologie

Carsten Kettner

**Elektrophysiologische Charakterisierung
der vakuolären H⁺-ATPase
von *Saccharomyces cerevisiae***

Shaker Verlag
Aachen 1999

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Kettner, Carsten:

Elektrophysiologische Charakterisierung der vakuolären H⁺-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 • eMail: info@shaker.de

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden biophysikalische Eigenschaften der vakuolären Protonen-Adenosintriphosphatase (V-Typ H^+ -ATPase) im Tonoplast der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben. V-ATPasen finden sich ubiquitär in eukaryotischen Endomembranen und säuern deren Lumina durch den Import von Protonen, der durch cytosolisches ATP energetisiert wird, an.

Es wurde ein Meßsystem entwickelt, mit dem mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik in der Ganz-Vakuolen- (Whole-vacuole-) Konfiguration die elektrischen Eigenschaften der gesamten vakuolären Membran über längere Zeit kontrolliert und durch Änderungen der cytosolischen Badlösung gezielt beeinflusst werden können. In der Ausgangskonfiguration wurde eine symmetrische Standardlösung mit 150 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM EGTA, pH 7,5 mit Tris/MES als Bad- und Pipettenlösung verwendet. Die Membranspannung des Tonoplasten wurde auf 0 mV geklemmt und ein Baselinestrom um 0 pA abgeleitet.

Cytosolisches $CaCl_2$ (10 mM) aktivierte reversibel eine Kationenleitfähigkeit, die Calcium-Ionen in die Vakuole hineintransportierte. Diese Leitfähigkeit wurde bereits von Bertl & Slayman (1990) als calcium-aktivierter, calcium-permeabler Kationenkanal beschrieben und als YVC1 benannt. Dieser Kanal wurde hier im Meßsystem durch Ausschluß von Calcium im Bad durch EGTA inaktiviert, so daß die ATP-abhängigen Ströme nicht überlagert wurden.

Cytosolisches Pyrophosphat (0,5 mM) induzierte keinen H^+ -Pyrophosphatase-getriebenen Strom. Da auch Sequenzvergleiche im Hefegenom keine membranständige PPase vorhersagen, läßt sich die Existenz dieser Pumpe im Tonoplasten von *S. cerevisiae* ausschließen. Damit eignet sich dieses Meßsystem gut zur Expression pflanzlicher PPasen in Hefe-Vakuolen.

Cytosolisches Mg-ATP (5 mM) induzierte einen in die Vakuole gerichteten (Auswärtsstrom) transienten Strom mit einer maximalen Amplitude von 30 mAm^{-2} . Dieser Strom ging trotz fortgesetzter Perfusion mit ATP über den Zeitraum von 15 bis 20 min wieder auf die Baseline zurück. Auch abwechselnde ATP-Applikation und ATP-Entfernung aus der Badlösung reduzierten die Stromamplitude, sowohl unter Standardbedingungen (150 mM KCl) als auch in 15 mM KCl. Die hohe KCl-Konzentration hatte keinen chaotropen Effekt auf die V-ATPase, durch die V_1 - und V_0 -Domänen hätten dissoziieren können und das Enzym inaktiviert worden wäre. Die Inaktivierung des ATP-abhängigen Stromes wies daher

auf eine endogene Hemmung der V-ATPase möglicherweise durch ADP aus der ATP-Hydrolyse hin. Dieser Hinweis wird ferner dadurch unterstützt, daß ADP keinen Auswärtsstrom induzierte, aber das Maximum des nachfolgenden ATP-induzierten Stromes um ca. 50% sowie die Geschwindigkeit der Stromantwort erniedrigte.

Die Strom-Spannungskennlinien (I/V-Kennlinien) des Tonoplasten mit und ohne cytosolischem ATP zeigen eine Parallelverschiebung in negativere Spannungen in Anwesenheit von ATP und ähnliche Leitfähigkeiten um 1 Sm^2 . Die Differenz der Kennlinien verläuft annähernd parallel zur Spannungsachse. Die sehr niedrige Leitfähigkeit um 35 mSm^2 deutet daraufhin, daß der ATP-energetisierte Strom spannungsunabhängig generiert wurde. Die Inaktivierung des ATP-induzierten Stromes durch den hochspezifischen V-ATPase-Inhibitor Bafilomycin (Bowman et al., 1988) bei gleichzeitiger Anwesenheit von ATP sowie die Irreversibilität dieser Hemmung, weisen darauf hin, daß der ATP-induzierte Strom ausschließlich von der V-ATPase generiert wurde. Es kann ausgeschlossen werden, daß die ATP-induzierten Ströme von anderen ATP-abhängigen Transportsystemen, wie der vakuolären P-Typ Ca^{2+} -ATPase oder vakuolärer ABC-Transporter generiert wurden.

Der Pumpenstrom ist nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von MgCl_2 und ATP in der Badlösung induzierbar.

Das pH-Profil des Pumpenstroms ist eine linksschiefe Optimumskurve. Die maximale Aktivierung von $29,7 \text{ mAmm}^2$ zeigte der ATP-induzierte Strom bei pH 7,1. Bei alkalischen und sauren cytosolischen pH wurde der ATP-induzierte Strom stark reduziert.

Der Pumpenstrom weist Michaelis-Menten-Kinetik mit hoher Affinität zu ATP ($46 \mu\text{M MgATP}$) auf. Der Vergleich Nukleotid-induzierter Auswärtsströme zeigt, daß MgGTP und MgUTP einen Strom aktivierten, der lediglich 40% bzw. 10% des ATP-induzierten Stromes betrug. MgTTP löste überhaupt keinen meßbaren Nettostrom aus. Purinbasen scheinen damit gegenüber Pyrimidinbasen von der V-ATPase zur Energetisierung des Protonentransportes bevorzugt zu werden. Das nicht-hydrolysierbare ATP-Analogon ATP- γ -S induzierte keinen Nettostrom, was darauf hinweist, daß nicht die ATP-Bindung, sondern ATP-Hydrolyse und die aus der Hydrolyse freiwerdende Energie den Protonentransport antreibt.

Die vakuoläre H^+ -ATPase von *S. cerevisiae* weist eine variable und pH-abhängige Kopplung von ATP-Hydrolyse und Protonentransport auf. Demnach scheint die Kopplung unvollständig zu sein. In 5 mM ATP, 5 mM ADP und 10 mM P_i verschiebt sich die Umkehrspannung der Pumpe mit Ansäuerung des Cytosols (pH_{cyt} 8,5; 7,5; 6 und 5) bei

konstantem vakuolären pH ($\text{pH}_{\text{vak}} \approx 5$) von -20 auf -60 mV. Die Kopplungsrate steigt entsprechend von 2,5 auf 4,1 H^+/ATP . In physiologischem pH_{cyt} beträgt die Kopplungsrate 2 bis 3 H^+/ATP . Durch die Ansäuerung des vakuolären Lumens ($\text{pH}_{\text{vak}} \approx 7,5$; 6; 5; 4,1 und 3,1) bei konstantem cytosolischem pH ($\text{pH}_{\text{cyt}} \approx 7,5$) verschiebt sich die Umkehrspannung der Pumpe von ca. -40 mV auf -25 mV. Gleichzeitig sinkt die Kopplungsrate von 4,1 auf 2,3 H^+/ATP . In physiologischem pH_{vak} beträgt die Kopplungsrate ebenfalls 2 bis 3 H^+/ATP . Mit $\text{pH}_{\text{vak}} \approx 3,1$ dreht sich die ATP/ADP/ P_i -induzierte Stromrichtung um (Einwärtsstrom ins Cytoplasma) und die Umkehrspannung beträgt ca. +50 mV. Vermutlich läuft die Pumpe hier rückwärts als ATP-Synthase. Im Vergleich zu P-Typ H^+ -ATPasen im Plasmalemma von *N. crassa* (1 H^+/ATP und Membranspannungen bis zu -400 mV) zeigt die V-ATPase von *S. cerevisiae* hohe Kopplungsraten bei niedrigen Membranspannungen am Tonoplasten, so daß dieses Enzym zur Bildung eines hohen Protonengradienten geeignet ist, durch den H^+ -gekoppelte Cotransportsysteme angetrieben werden können.

Die symmetrische Senkung der Kaliumkonzentration von 150 mM auf 15 mM hatte weder auf die Umkehrspannung noch auf die Kopplungsrate der Pumpe einen signifikanten Einfluß. Die maximalen Ströme wurden jedoch um ca. 50% reduziert. Daraus läßt sich schließen, daß, ähnlich wie pflanzliche PPasen, die V-ATPase durch Kalium stimuliert werden kann.

Die Ergebnisse zeigen, daß das entwickelte Meßsystem volltauglich ist, die biophysikalischen Eigenschaften des aktiven Transportes über den Tonoplasten von *S. cerevisiae* zu untersuchen. Auch Transportsysteme ohne Kanaleigenschaften (z. B. Cotransporter) können mit diesem System untersucht werden. Die Ergebnisse zeigen überdies, daß die Hefe-Vakuole durch das Fehlen einer endogenen H^+ -PPase zum Studium heterolog exprimierter PPasen aus Pflanzen gut geeignet wäre.