

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

ISBN3-8265-6499-5

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

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit von C. Kettner wurden 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 wurden in ihrer Zusammensetzung symmetrische Standardlösungen in der Bad- und Pipettenlösung verwendet. Die Membranspannung wurde auf 0 mV geklemmt und ein Baselinestrom um 0 pA abgeleitet.

Cytosolisches Mg-ATP induziert einen in die Vakuole gerichteten (Auswärtsstrom) transienten Strom mit einer maximalen Amplitude von 30 mAm⁻². Die Inaktivierung des ATP-induzierten Stromes durch den hochspezifischen V-ATPase-Hemmstoff Bafilomycin bei gleichzeitiger Anwesenheit von ATP sowie die Irreversibilität dieser Hemmung weisen daraufhin, daß dieser Strom ausschließlich von der V-ATPase generiert wurde.

Die elektrophysiologischen Daten zeigen, daß die V-ATPase-Aktivität obligat von mit ATP assoziiertem Magnesium abhängig ist und eine maximale Aktivierung um pH 7 im Cytosol bei gleichzeitig hoher Affinität zu ATP mit einer K_M von 46 μ M aufweist. Der Vergleich Nukleotid-induzierter Auswärtsströme zeigt hohe Spezifität für ATP gegenüber GTP, UTP und TTP, während ADP und ATP- γ -S keine Netto-Ströme induzierten.

Durch die Analyse der Strom-Spannungskennlinien der V-ATPase bei verschiedenen cytosolischen und vakuolären pH wurde die Kopplungsrate als eine wesentliche biophysikalische Eigenschaft von ATPasen bestimmt. Die Kopplungsrate gibt die Anzahl transportierter Protonen pro hydrolysiertem Molekül ATP an. Die V-ATPase von *S. cerevisiae* weist pH-abhängige, variable und nicht-ganzzahlige Kopplungsraten im Bereich von 2,3 bis 4,1 H^+ /ATP auf, wobei die Kopplungsrate in physiologischem pH zwischen 2 und 3 H^+ /ATP liegt.

Die Ergebnisse zeigen, daß das entwickelte Meßsystem volltauglich ebenso zur Charakterisierung der biophysikalischen Eigenschaften des aktiven Transportes über den Tonoplasten von *S. cerevisiae* ist wie zur Untersuchung von Transportsystemen ohne Kanaleigenschaften (z.B. Cotransporter) ist.