

**Justus-Liebig-Universität Giessen**  
**Institut für Pflanzenernährung**  
**Prof. Dr. Sven Schubert**

Mechanismen zur Steigerung der Aktivität der H<sup>+</sup>-ATPase im  
Plasmalemma von Maiswurzeln

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Haushalts- und  
Ernährungswissenschaften**

**vorgelegt von**  
**Caroline Krämer**  
**Dipl. oec. troph.**

**Gießen, im März 2006**

Tag der Disputation: 08.06.2006

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Herr Prof. Nuppenau

1. Gutachter: Herr Prof. Schubert

2. Gutachter: Herr Prof. Wagner

Prüfer: Frau Prof. Schnell

Prüfer: Herr PD Dr. Yan

**Meinem Mann Oliver**



## Inhaltsverzeichnis

1	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1	Auswirkungen von H <sup>+</sup> -Stress auf das Pflanzenwachstum .....	1
1.2	Anpassung der Plasmalemma-H <sup>+</sup> -ATPase an H <sup>+</sup> -Stress .....	3
1.3	Zielsetzung .....	6
2	<b>Material und Methoden</b> .....	7
2.1	Anzucht der Pflanzen .....	7
2.2	Molekularbiologische Methoden .....	8
2.2.1	Isolation von Gesamt-RNA .....	8
2.2.2	RNA-Gelelektrophorese .....	9
2.2.3	Spektralphotometrische Bestimmung von RNA bzw. DNA.....	11
2.2.4	cDNA-Erststrangsynthese .....	11
2.2.5	Amplifikation der Plasmalemma-H <sup>+</sup> -ATPase mittels PCR.....	12
2.2.6	DNA-Gelelektrophorese.....	15
2.2.7	Extraktion von DNA aus Agarosegelen .....	16
2.2.8	Klonierung der aus der PCR erhaltenen DNA-Fragmente.....	17
2.2.8.1	Ligation .....	17
2.2.8.2	Transformation .....	17
2.2.8.3	Selektion erfolgreich transformierter Klone .....	19
2.2.9	Flüssigkultur von <i>E. coli</i> .....	20
2.2.10	Plasmidisolation .....	20
2.2.11	Sequenzierung des im Plasmid befindlichen DNA-Fragments.....	21
2.2.12	Untersuchung der Transkription der Plasmalemma-H <sup>+</sup> -ATPase .....	22
2.2.12.1	Isolation von mRNA .....	22
2.2.12.2	Real-Time-PCR.....	24
2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	26
2.3.1	Proteinextraktion .....	26
2.3.1.1	Extraktion von Gesamtprotein .....	26
2.3.1.2	Extraktion von Membranprotein .....	28
2.3.2	Protein-Quantifizierung.....	30
2.3.3	1-D-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	31

2.3.4	Anfärbung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine .....	34
2.3.4.1	Anfärbung der Proteine mittels Coomassie R-350 .....	34
2.3.4.2	Anfärbung der Proteine mittels Silbernitrat .....	34
2.3.5	Immundetektion der Plasmalemma-H <sup>+</sup> -ATPase .....	35
2.3.6	Immundetektion von phosphoryliertem Threonin .....	38
2.3.7	2-D-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	38
2.3.7.1	Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung .....	38
2.3.7.2	Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	40
2.3.8	Auswertung der 2-D-Gele .....	41
2.3.9	Immundetektion der Plasmalemma-H <sup>+</sup> -ATPase in 2-D-Gelen .....	41
2.4	Statistische Methoden .....	42
2.5	Verwendete Chemikalien .....	42
2.6	Online-Datenbanken und -Werkzeuge .....	45
3	<b>Ergebnisse</b> .....	47
3.1	Anpassung von Mais an H <sup>+</sup> -Stress .....	47
3.2	RNA-Ebene .....	48
3.2.1	Identifizierung von Isoformen der Plasmalemma-H <sup>+</sup> -ATPase .....	48
3.2.2	Relative Transkription von Isoformen der H <sup>+</sup> -ATPase .....	49
3.3	Proteinebene .....	52
3.3.1	Immundetektion der Plasmalemma-H <sup>+</sup> -ATPase .....	52
3.3.2	Posttranslationale Modifikation der Plasmalemma-H <sup>+</sup> -ATPase .....	58
3.3.3	Einfluss von H <sup>+</sup> -Stress auf das Proteinmuster der Zelle .....	61
3.3.4	Einfluss von H <sup>+</sup> -Stress auf das Proteinmuster der mikrosomalen Membranfraktion .....	65
3.3.5	Identifizierung von Membranproteinen .....	68
3.3.6	Immundetektion der Plasmalemma-H <sup>+</sup> -ATPase in 2-D-Gelen .....	70
4	<b>Diskussion</b> .....	72
4.1	Methodik der Identifizierung der Plasmalemma-H <sup>+</sup> -ATPase auf mRNA- und auf Proteinebene .....	72
4.1.1	Identifizierung der H <sup>+</sup> -ATPase auf mRNA-Ebene .....	72
4.1.2	Identifizierung der H <sup>+</sup> -ATPase auf Proteinebene .....	76

4.2	Mechanismen zur Steigerung der Aktivität der H <sup>+</sup> -ATPase im Plasmalemma von Maiswurzeln .....	85
4.2.1	Einfluss von H <sup>+</sup> -Stress auf das Wurzelwachstum und die Wurzelmorphologie von <i>Zea mays</i> cv. Blizzard .....	85
4.2.2	Anpassungsmechanismus der Plasmalemma-H <sup>+</sup> -ATPase von <i>Zea mays</i> cv. Blizzard an H <sup>+</sup> -Stress .....	86
4.2.2.1	Regulation auf der prätranslationalen Ebene .....	88
4.2.2.2	Regulation auf der translationalen und auf der posttranslationalen Ebene.....	92
4.2.2.3	Einfluss der Zell-Umgebung der Plasmalemma-H <sup>+</sup> -ATPase auf die Anpassung an H <sup>+</sup> -Stress .....	104
4.2.3	Schlussfolgerungen.....	109
5	<b>Zusammenfassung</b> .....	111
6	<b>Literatur</b> .....	113
	<b>Danksagung</b> .....	127
	<b>Lebenslauf</b> .....	129

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Effekte eines $H^+$ -Schocks bzw. einer Anpassung der Maispflanzen an einen pH-Wert von 3,5 auf das Wurzelwachstum im Verlaufe einer 19-tägigen Anzucht in Hydrokultur.....	47
Abb. 2:	Schematische Darstellung der in <i>Zea mays</i> cv. Blizzard identifizierten Isoformen der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase unter Kontroll- und unter $H^+$ -Stress-Bedingungen während der Pflanzenanzucht.....	49
Abb. 3:	Relative Transkription der Isoform <i>ZMATP C/T 2</i> der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase in <i>Zea mays</i> cv. Blizzard der Anzuchtvarianten Kontrolle und Anpassung an $H^+$ -Stress.....	50
Abb. 4:	Relative Transkription der Isoform <i>ZMATP C/T 3</i> der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase in <i>Zea mays</i> cv. Blizzard der Anzuchtvarianten Kontrolle und Anpassung an $H^+$ -Stress.....	51
Abb. 5:	Relative Transkription sämtlicher Isoformen der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase in <i>Zea mays</i> cv. Blizzard.....	51
Abb. 6:	Mittels 1-D-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennte Membranproteine von unter $H^+$ -Stress-Bedingungen (pH 3,5) und unter Kontrollbedingungen (pH 6) angezogenen Maispflanzen.....	52
Abb. 7:	Western Blot von aus Wurzeln isolierten Membranfraktionen der Anzuchtvarianten Kontrolle und Anpassung an $H^+$ -Stress.....	53
Abb. 8:	Prozentuale Bandenintensitäten der mittels Immundetektion visualisierten Menge an ATPase-Enzym in Wurzelzellen von Kontrolle und Behandlung. .....	54
Abb. 9:	Immundetektion des Dimers der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase.....	55
Abb. 10:	Immundetektion der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase unter variierenden reduzierenden und denaturierenden Bedingungen.....	57
Abb. 11:	Immundetektion des Phosphorylierungsstatus der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase. ....	59
Abb. 12:	Immundetektion des Phosphorylierungsstatus des Dimers der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase. ....	60

Abb. 13: Immundetektion des Phosphorylierungsstatus der Aminosäure Threonin von aus Wurzeln ( <i>Zea mays</i> cv. Blizzard) isolierten Membranproteinen der Anzuchtvarianten Kontrolle und Anpassung an H <sup>+</sup> -Stress. ....	61
Abb. 14: Mittels 2-D-Gelelektrophorese nach ihrem isoelektrischen Punkt und ihrer Größe aufgetrennte Gesamtproteinfraktion von unter H <sup>+</sup> -Stress-Bedingungen (pH 3,5) und unter Kontrollbedingungen (pH 6) angezogenen Maispflanzen. ....	62
Abb. 15: Übereinanderlagerung fusionierter Kontrollgele (pH 6; blau markiert) mit fusionierten Behandlungsgelen (pH 3,5; orange markiert).....	63
Abb. 16: Mittels 2-D-Gelelektrophorese nach ihrem isoelektrischen Punkt und ihrer Größe aufgetrennte Membranproteinfraktion von unter H <sup>+</sup> -Stress-Bedingungen (pH 3,5) und unter Kontrollbedingungen (pH 6) angezogenen Pflanzen.....	65
Abb. 17: Übereinanderlagerung fusionierter Kontrollgele (pH 6; blau markiert) mit fusionierten Behandlungsgelen (pH 3,5; orange markiert).....	66
Abb. 18: 2-D-gelelektrophoretisch aufgetrennte Membranproteinsuspension von unter H <sup>+</sup> -Stress angezogenen Maispflanzen. ....	68
Abb. 19: 2-D-Western Blot von aus Wurzeln isolierten Membranfraktionen der Anzuchtvarianten Kontrolle und Anpassung an H <sup>+</sup> -Stress. ....	71
Abb. 20: Western Blot von aus Wurzeln ( <i>Zea mays</i> cv. Oldham) isolierten Plasmamembransuspensionen der Anzuchtvarianten Kontrolle und Anpassung an H <sup>+</sup> -Stress.....	76
Abb. 21: Mittels 1-D-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (10% Acrylamid) nach ihrer Größe aufgetrennte Membranproteine von unter Kontrollbedingungen (pH 6) angezogenen Maispflanzen. ....	83
Abb. 22: Voraussage möglicher Phosphorylierungsstellen an Serinen und Threoninen in der Aminosäuresequenz der Plasmalemma-H <sup>+</sup> -ATPase Mha-2 von <i>Zea mays</i> .....	101

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammensetzung der voll konzentrierten Nährlösung.....	7
Tabelle 2:	Prozentuale Bandenintensitäten der mittels Immundetektion visualisierten Menge an ATPase-Molekül in den Wurzelzellen der Anzuchtvarianten Kontrolle und Anpassung an H <sup>+</sup> -Stress. ....	58
Tabelle 3:	Prozentuale Auflistung der unter H <sup>+</sup> -Stress differentiell regulierten Gesamtproteine in Bezug zur Kontrolle.....	64
Tabelle 4:	Prozentuale Auflistung der unter H <sup>+</sup> -Stress differentiell regulierten Membranproteine in Bezug zur Kontrolle.....	67
Tabelle 5:	Auflistung der mittels Maldi-TOF analysierten und unter H <sup>+</sup> -Stress differentiell gebildeten Proteinspots.....	69
Tabelle 6:	Auflistung der mittels Maldi-TOF analysierten und anzuchtindifferent gebildeten Proteinspots.....	69

## 1 Einleitung

### 1.1 Auswirkungen von $H^+$ -Stress auf das Pflanzenwachstum

Ein großer Anteil der weltweit landwirtschaftlich nutzbaren Fläche wird durch saure Böden repräsentiert (Kochian, 1995). Mit steigenden  $H^+$ -Aktivitäten im Boden steigt die Konzentration an austauschbarem Mangan und Aluminium, einhergehend mit einer verminderten Verfügbarkeit der Nährstoffe Ca, Mo, Mg und P (Adams, 1981). Erhöhte freie Al-, Mn- und  $H^+$ -Konzentrationen und eine verminderte Nährstoffverfügbarkeit bedingen indes eine Limitierung des Pflanzenwachstums. Welcher dieser Effekte auf die Pflanze wirkt, wird maßgeblich von der Lokalisierung und Verteilung der Wurzeln im Bodenprofil beeinflusst (Marschner, 1995). Das Ziel einer verbesserten Resistenz einer Kulturpflanze gegenüber sauren Standorten setzt eine Charakterisierung beteiligter physiologischer und molekularbiologischer Regulationsmechanismen voraus. Hierbei kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass jede Kulturpflanze gleichermaßen auf erhöhte freie Al-, Mn- und  $H^+$ -Konzentrationen sowie verminderte Nährstoffverfügbarkeit reagiert (Adams, 1981).

Es gibt zahlreiche Untersuchungen zur Aufklärung der Al-Resistenz in Kulturpflanzen (Kochian, 1995), wohingegen wenig über eine Anpassung pflanzlicher Zellen an hohe  $H^+$ -Aktivitäten bekannt ist. Yan et al. (1992) fanden heraus, dass ein Ansteigen der  $H^+$ -Aktivität im Wurzelmedium mit einer reduzierten Netto- $H^+$ -Abgabe und daraus resultierend mit einer reduzierten Wurzelwachstumsrate von Mais (*Zea mays* L.) und Ackerbohne (*Vicia faba* L.) einhergeht. Sie untermauerten die Hypothese, dass die Netto- $H^+$ -Abgabe den limitierenden Faktor für das Wurzelwachstum bei niedrigem pH-Wert in der Rhizosphäre darstellt (Schubert et al., 1990). Im allgemeinen resultiert die Protonenabgabe aus Pflanzenzellen aus der Aktivität der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase. Indem die  $H^+$ -ATPase als primär aktiver Transporter Protonen aus der

Pflanzenzelle herauspumpt, wird ein elektrochemischer Gradient über das Plasmalemma aufgebaut (Sze et al., 1999). Das durch den primär-aktiven Pumpvorgang geschaffene elektrochemische Membranpotential treibt Nährstoffaufnahme, Turgorbildung und Wachstum an. Darüber hinaus wird durch die Pump-Aktivität der  $H^+$ -ATPase eine Regulation des intrazellulären und eine Beeinflussung des extrazellulären pH-Wertes ermöglicht (Serrano, 1989). In einem Vergleich der Netto- $H^+$ -Abgabe und der Wachstumsrate der Wurzeln von Ackerbohne und Mais unter sauren Bedingungen zeigte Mais eine höhere Resistenz gegenüber erhöhten  $H^+$ -Aktivitäten im umgebenden Wurzelmedium als die Ackerbohne (Yan et al., 1992). Die Resistenz einer Pflanze gegenüber einer hohen  $H^+$ -Aktivität im Wurzelraum ist demzufolge mit ihrer Fähigkeit korreliert, Protonen aus den Wurzelzellen auch bei niedrigen pH-Werten im Medium abzuscheiden (Yan et al., 1992, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass weniger eine passive  $H^+$ -Permeabilität des Plasmalemmas, sondern vielmehr eine aktive  $H^+$ -Pumpaktivität für die erhöhte  $H^+$ -Resistenz der Maispflanze verantwortlich ist (Yan et al., 1998). Im Gegensatz zu dieser konstitutiven  $H^+$ -Resistenz der Maispflanze gegenüber einer abrupten Abnahme des pH-Wertes im umgebenden Medium, zeigt Mais eine adaptive Resistenz an eine schrittweise Erhöhung der  $H^+$ -Konzentration im umgebenden Wurzelmedium (Yan et al., 1998). In diesem Fall bleibt eine Reduktion des Wurzelwachstums aus und es findet sich kein signifikanter Unterschied in Wurzelfrischmasse, Wurzellänge und Anzahl der Seitenwurzeln zwischen an einen pH-Wert von 3,5 adaptierten Maispflanzen und bei einem pH-Wert von 6,0 angezogenen Kontrollpflanzen (Yan et al., 1998). Ferner konnten Yan et al. (1998) nachweisen, dass die schrittweise an hohe  $H^+$ -Aktivitäten angepassten Wurzelzellen eine im Vergleich zu den Kontrollpflanzen dreifach erhöhte Netto- $H^+$ -Abgabe zeigen. Diese  $H^+$ -Resistenz der an einen niedrigen pH-Wert angepassten Maiswurzeln kann auf eine Erhöhung der Aktivität der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase zurückgeführt werden.

## 1.2 Anpassung der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase an H<sup>+</sup>-Stress

Von der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase ist bekannt, dass sie auf eine Anzahl verschiedener Umweltfaktoren reagiert (Braun et al., 1986; Pinton et al., 1996; Santi et al., 1995; Schubert und Yan, 1997) und *in vivo* einer strikten Regulation unterliegt (Palmgren, 1991). Ein primäres Augenmerk ist nun darauf gerichtet, wie Pflanzen die H<sup>+</sup>-ATPase ihren Ansprüchen entsprechend regulieren. Yan et al. (1998) stellten eine um 20% erhöhte hydrolytische Aktivität der an H<sup>+</sup>-Stress-Bedingungen angepassten Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase im Vergleich zur Kontrolle fest. Darüber hinaus ließ sich eine Verschiebung des pH-Optimums von pH 6,2 – pH 6,4 der Kontrollwurzel-ATPase zu pH 6,2 der H<sup>+</sup>-gestressten ATPase feststellen. Vor allem aber die Pumpaktivität und die Pumpeffizienz der unter niedrigen pH-Bedingungen gebildeten H<sup>+</sup>-ATPase zeigten eine Steigerung um 42% und 35% im Vergleich zum Kontrollenzym. Eine unter H<sup>+</sup>-Stress-Bedingungen verstärkte Kopplung zwischen hydrolytischer ATP-Spaltung und dem Pumpen von Protonen deutet auf eine effizientere Ausnutzung der aus der ATP-Hydrolyse freigesetzten Energie hin. Die molekularen Mechanismen der Anpassung der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase an veränderte Umweltbedingungen sind bisher nicht vollständig aufgeklärt. Letztendlich kommen mehrere mögliche Mechanismen in Betracht: (a) Differentielle Transkription von Isoenzymen, (b) veränderte Syntheserate an Enzymmolekülen auf der Translationsebene, (c) posttranslationale Modifikation des exprimierten Enzyms und/oder (d) veränderte Genexpression regulatorischer Proteine (Frias et al., 1996; Palmgren, 1991). Die Säuretoleranz der Alge *Dunaliella acidophila* konnte zum Beispiel durch verstärkte Expression der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase auf mRNA- und Proteinebene erklärt werden (Weiss und Pick, 1996). Eine erhöhte Aktivierungsenergie der an pH 3,5 angepassten H<sup>+</sup>-ATPase deutet auf eine Reduktion der Umsatzrate an Substrat ATP durch das Enzym hin (Yan et al., 1998). Der signifikante Anstieg in der Gesamtaktivität der ATPase unter sauren

Bedingungen kann insofern durch eine erhöhte Anzahl an Enzymmolekül pro Membraneinheit erklärt werden.

Somit geht der qualitative Aspekt einer erhöhten Aktivierungsenergie mit einer quantitativen Anpassung des Enzyms einher. Die an  $H^+$ -Stress angepasste ATPase von Mais zeigt also neben dem quantitativen Merkmal einer erhöhten Enzymaktivität auch qualitative Unterschiede zu dem Enzym der bei pH 6,0 angezogenen Pflanzen. Hierzu zählen neben der erhöhten Aktivierungsenergie ein verändertes pH-Optimum der hydrolytischen Aktivität und ein erhöhter Wert für  $K_m$  (Yan et al., 1998). Aufgrund des erhöhten  $K_m$ -Wertes der an saure Bedingungen angepassten  $H^+$ -ATPase, welcher eine verminderte Affinität des Enzyms zu seinem Substrat ATP bedeutet, können eine differentielle Expression von Isoformen oder posttranslationale Modifikationen als verantwortliche Anpassungsmechanismen nicht ausgeschlossen werden.

Es gibt zahlreiche Isoformen der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase in pflanzlichen Zellen. Isoenzyme können in ihren funktionellen Eigenschaften variieren, welches eine differentielle Expression von Isoformen je nach dem Bedarf einer Pflanze bezüglich spezifischer katalytischer und kinetischer Charakteristika ermöglicht. Hierbei ist es denkbar, dass die Expression einer jeden Isoform in Bezug auf die Nachfrage und die Funktion einer jeden Zelle einer strikten Regulation unterliegt (Frias et al., 1996; Michelet und Boutry, 1995; Palmgren und Christensen, 1994; Sze, 1999). Unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen findet sich in Mais eine erhöhte Konzentration an ATP (Yan et al., 1992). Dies korreliert mit der unter diesen Bedingungen festgestellten verminderten Affinität der angepassten  $H^+$ -ATPase zu seinem Substrat. Eine erhöhte ATP-Konzentration *in vivo* (Yan et al., 1992, 1998) ermöglicht, dass effizientere Isoformen der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase unter Säurestress Protonen gegen einen stärkeren pH-Gradienten aus der Zelle hinauszupumpen vermögen.

Die Plasmalemma- $H^+$ -ATPase stellt ein Monomer von ca. 100 kDa dar. Die physiologisch aktive Form hingegen wird durch ein aus den Monomeren

gebildetes Dimer repräsentiert (Briskin und Reynolds-Niesman, 1989; Sze, 1999). Das Monomer der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase stellt mit seinen 10 Transmembrandomänen ein integrales Membranprotein dar. Ca. 20% der Masse dieses Enzyms sind im Plasmalemma anzutreffen. Weniger als 10% zeigen zur apoplasmatischen Seite, wohingegen sich der größte Anteil (70%) des Proteins auf vier Domänen im Cytosol verteilt (Michelet und Boutry, 1995; Palmgren und Harper, 1999). Bezüglich der vier cytosolischen Domänen konnte der N-terminalen Region der ATPase bisher keine spezifische Funktion zugesprochen werden. Das Vorhandensein einer kleinen cytosolischen Schleife hingegen wird als Voraussetzung für eine während der enzymatischen Reaktion stattfindende Konformationsänderung des Enzyms angesehen. Die große hydrophile Schleife, welche in das Cytosol hineinragt, enthält sowohl die ATP-bindende Region als auch einen, das Phosphorylradikal des ATP aufnehmenden, Aspartatrest.

Die C-terminale Region der  $H^+$ -ATPase übernimmt in Hefen und Pflanzen als sogenannte autoinhibitorische Domäne eine regulatorische Funktion (Morsomme und Boutry, 2000). Diese inhibitorische Struktur vermag entweder den Zugang des ATP oder der Protonen zur ATP-Bindungsstelle bzw. zur Ionenkanal-domäne sterisch zu blockieren oder die Kernstruktur des Enzyms in der Weise zu verändern, dass die Affinität zum Substrat ATP geschwächt bzw. die während der enzymatischen Reaktion stattfindende Konformationsänderung unterbunden wird (Palmgren und Harper, 1999). Posttranslationale Modifikationen der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase könnten Auswirkungen auf die autoinhibitorische Domäne des Enzyms nach sich ziehen. So wird diskutiert, dass eine Phosphorylierung der ATPase, entweder an der zentralen Schleife oder am C-Terminus des Moleküls, eine Konformationsänderung des Proteins, bedingt durch die eingebrachten negativen Ladungen, bewirkt. Diese Konformationsänderung könnte zu einer erhöhten oder verminderten Interaktion der am C-Terminus vorhandenen inhibitorischen Domäne mit der katalytischen

Region und somit zu einer veränderten Aktivität des Enzyms führen (De Nisi et al., 1999; Palmgren, 1991).

### 1.3 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Anpassungsmechanismus der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase an hohe  $H^+$ -Aktivitäten näher zu verstehen. Mehrere Gründe für Veränderungen der ATPase-Aktivität und der kinetischen Parameter des Enzyms unter sauren Bedingungen kommen hierbei in Betracht: (a) veränderte Transkription einer oder mehrerer Isoformen der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase, (b) veränderte Syntheserate des Enzyms auf der Translationsebene (c) posttranslationale Modifikation, (d) veränderte Genexpression regulatorischer Proteine. Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen stellte insofern die Beantwortung der Frage dar, auf welcher der vier genannten Ebenen die Aktivität der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase in Maiswurzeln unter  $H^+$ -Stress reguliert wird.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Anzucht der Pflanzen

Maissamen (*Zea mays* L. cv. Blizzard) wurden in 0,5 mM CaSO<sub>4</sub>-Lösung unter Luftzufuhr für 24 Stunden bei Raumtemperatur vorgequollen. Anschließend erfolgte das Vorkeimen der Samen zwischen zwei mit 0,5 mM CaSO<sub>4</sub>-Lösung getränkten Filterpapieren im Dunkeln bei 20 bis 25°C. Nach 4 d wurden die Keimlinge in Hydrokultur transferiert und unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer 19 d lang bei pH 6,0 und pH 3,5 angezogen. Die Lichtintensität betrug 500  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$  für eine Tagesdauer von 16 h. Die Temperatur betrug während der Lichtperiode 26°C und während der Dunkelperiode 18°C. Die relative Luftfeuchte lag bei 70%. Pro 18,0 l Nährlösung fassende Wanne wurden 11 Pflanzen über ein Plastikgitter in die zunächst  $\frac{1}{4}$  konzentrierte Nährlösung hineingehängt. Diese wurde am folgenden Tag auf die halbe und nach weiteren 2 d auf die volle Konzentration an Nährstoffen aufkonzentriert (Tab. 1).

Tabelle 1: Zusammensetzung der voll konzentrierten Nährlösung

<b>Makronährstoffe</b>	2,0 mM	N	als	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
	0,2 mM	P	als	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	4,0 mM	K	als	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	3,0 mM	Ca	als	CaCl <sub>2</sub>
	0,6 mM	Mg	als	MgSO <sub>4</sub>
	0,2 mM	Fe	als	Fe-EDTA
<b>Mikronährstoffe</b>	0,1 $\mu\text{M}$	B	als	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
	0,3 $\mu\text{M}$	Cu	als	CuSO <sub>4</sub>
	0,07 $\mu\text{M}$	Mo	als	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>
	0,5 $\mu\text{M}$	Zn	als	ZnSO <sub>4</sub>
	0,5 $\mu\text{M}$	Mn	als	MnSO <sub>4</sub>

Alle 3 d erfolgte ein vollständiger Nährlösungswechsel. Der pH-Wert der Nährlösung der unter Kontrollbedingungen angezogenen Pflanzen wurde mittels einer pH-Stat-Anlage (Schott) konstant auf pH 6,0 gehalten, indem bei pH-Abweichung mit 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gegentitriert wurde. Für eine Anpassung der Maiswurzeln an einen niedrigen pH-Wert wurde dieser in der Variante pH 3,5 sukzessiv mit einer Erhöhung von 50 µM H<sup>+</sup> pro Tag ab dem ersten Nährlösungswechsel eingestellt. Nach dem Erreichen des Ziel-pH-Wertes wurden die Pflanzen für weitere 4 d kultiviert. Zum Zeitpunkt der Ernte wurden die Wurzeln der Maispflanzen abgeschnitten, in bidestilliertem Wasser kurz gewaschen, trocken getupft und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde das Wurzelmaterial in einem eisgekühlten, mit Ethanol gereinigten Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver vermahlen. Die Lagerung des Probenmaterials erfolgte bei -80°C.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Isolation von Gesamt-RNA

Die Isolation von RNA erfolgte mit einigen Modifikationen nach der Methode von Cox und Goldberg (1988). 150 – 200 mg pulverisiertes Wurzelmaterial wurden mit 1 ml RNA-Lysepuffer versetzt.

Der **RNA-Lysepuffer** hatte folgende Zusammensetzung:

100 mM	Tris-HCl, pH 8,0
2%	Laurolyl-Sarkosyl
25 mM	EDTA, pH 8,0
25 mM	EGTA, pH 8,0
100 mM	β-Mercaptoethanol
1%	SDS
5 mM	DTT

Es erfolgte eine Homogenisation des Probenmaterials durch gründliches Mischen. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden zunächst 400 µl Phenol und nach Homogenisation 400 µl Chloroform hinzugegeben. Die nun denaturierten Proteine reichern sich zusammen mit Zellwandbestandteilen in der unteren Phenolphase und an der Grenzschicht an. Nach erneuter Homogenisation und zehnminütiger Zentrifugation bei 16 000 g und 4°C wurde der, die RNA enthaltende, Überstand erneut abgenommen und mit 400 µl Chloroform versetzt, um Phenol-Reste zu entfernen. Nach Zentrifugation bei 16 000 g und 4°C für 10 min wurde der abgenommene Überstand mit 0,1 Volumenanteilen Natriumacetat (pH 5,2) und 0,7 Volumenanteilen Isopropanol versetzt. Anschließend erfolgte eine Fällung der RNA über Nacht bei -20°C. Die gefällte RNA wurde durch zehnminütige Zentrifugation bei 16 000 g und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das RNA-haltige Pellet wurde zur Reinigung von Salz- und Phenolresten mit 500 µl eiskaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach kurzer Trocknung an der Luft erfolgte eine Resuspension des Pellets in mit 0,1% Diethylpyrocarbonat behandeltem bidestilliertem Wasser. Dies geschah unter zehnminütigem Schütteln bei 65°C. Nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurde die RNA bei -80°C gelagert.

### 2.2.2 RNA-Gelelektrophorese

Zur qualitativen Überprüfung der extrahierten Gesamt-RNA wurde diese mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Dies diente vor allem zur Überprüfung der Integrität der mRNA, welche den Ausgangspunkt weiterführender Untersuchungen darstellte.

Zunächst wurde ein 1% (w/v) Agarose-Gel gegossen, indem 0,3 g Agarose abgewogen und mit 28 ml 0,04 M Morpholinpropansulfonsäure-Puffer (MOPS, pH 7,0) in der Mikrowelle aufgeköcht wurde. Nach Schmelzen der Agarose und

Abkühlen auf 70°C erfolgte eine Zugabe von 1,5 ml 37% (v/v) Formaldehyd. Anschließend wurde das Gel luftblasenfrei in den vorbereiteten Gelschlitten gegossen. Nach dem Aushärten des Agarosegels konnte der Schlitten in die Gelkammer gesetzt und der Laufpuffer (MOPS, pH 7,0) eingefüllt werden.

Der **Morpholinpropansulfonsäure-Puffer (MOPS, pH 7,0)** hatte folgende Zusammensetzung:

0,04 M	Morpholinpropansulfonsäure
0,01 M	Natriumacetat
0,001 M	0,5 M EDTA

5 µg Gesamt-RNA wurden 1:2 mit RNA-Auftragspuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Proben in die Probenaschen des Agarosegels pipettiert. Durch Anlegen einer Spannung von 50 V wurde die gelelektrophoretische Trennung der Gesamt-RNA gestartet.

Der **RNA-Auftragspuffer** hatte folgende Zusammensetzung:

720 µl	Formamid
260 µl	Formaldehyd
50 µl	Ethidiumbromid (10 mg/ml)
80 µl	Bromphenolblau (gesättigt)
80 µl	Glycerol
80 µl	20x Morpholinpropansulfonsäure-Puffer

Nachdem die Bromphenolblaufront der Proben das Gel zu ca. 70% durchlaufen hatte, wurde der Gellauf gestoppt. Im RNA-Auftragspuffer enthaltenes Ethidiumbromid interkaliert mit RNA- bzw. DNA-Molekülen, woraufhin sich dessen Fluoreszenz erhöht. Diese Ethidiumbromid-Fluoreszenz der

verschiedenen RNA-Banden auf dem Gel wurde unter UV-Licht photographisch dokumentiert.

### 2.2.3 Spektralphotometrische Bestimmung von RNA bzw. DNA

Die quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren beruht auf der Messung der Extinktion bei ihrem Absorptionsmaximum von 260 nm. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz lässt sich aus der Extinktion eines Stoffes dessen Konzentration berechnen:  $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$ , wobei gilt:

E = Extinktion,

$\varepsilon$  = spezifischer Extinktionskoeffizient (RNA:  $40 \mu\text{l} \cdot \text{ng}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ; DNA:  $50 \mu\text{l} \cdot \text{ng}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ),

c = Konzentration in  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ,

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm).

Die Messung erfolgte mit einem Spektralphotometer (Cary 4, Varian) gegen 10 mM Tris (pH 7,3). Um Verunreinigungen an Proteinen mitbestimmen und somit eine Aussage über die Qualität der isolierten Gesamt-RNA machen zu können, wurde zusätzlich eine Absorptionsmessung bei 280 nm durchgeführt. Das Verhältnis von  $A_{260}/A_{280}$  liegt für reine DNA bei 1,8 und für reine RNA bei 2,0. Geringere Werte weisen auf Verunreinigungen hin (Nicholl, 1995).

### 2.2.4 cDNA-Erststrangsynthese

Die cDNA-Synthese erfolgt mit der, in der isolierten Gesamt-RNA enthaltenen, mRNA. Diese spiegelt die zum Zeitpunkt der Ernte stattgefundenene Genaktivität wider. Die mRNA unterscheidet sich von den anderen RNAs (rRNA, tRNA, snRNA, scRNA) durch das Vorhandensein eines Poly-A-Schwanzes am 3'-OH-Ende. Unter Verwendung eines Oligo-dT-Primers kann diese Sequenz genutzt

werden, um mittels Reverser Transkriptase eine der mRNA komplementäre DNA (cDNA) zu synthetisieren (Nicholl, 1995).

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem Kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Hierzu wurden zunächst 5 µg Gesamt-RNA, 1 µl 10 mM dNTP-Mix und 1 µl Oligo-dT-Primer (0,5 µg/l) mit DEPC-Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Nach kurzem Mischen und kurzer Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit erfolgte eine Inkubation des Ansatzes für 5 min bei 65°C, um Sekundärstrukturen der RNA zu entfernen. Anschließend wurde folgender Reaktionsmix zu dem RNA-Ansatz hinzugegeben:

2 µl 10x PCR-Puffer (pH 8,3)

4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>

2 µl 0,1 M DTT

1 µl RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor.

Nach kurzem Mischen und kurzer Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit erfolgte eine Inkubation des Ansatzes für 2 min bei 42°C. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 1 µl Superscript™ II Reverse Transcriptase (50 Units). Nach einer 50-minütigen Reaktionszeit bei 42°C wurde das Enzym durch Erhitzen des Ansatzes auf 70°C für 15 min denaturiert. Danach wurde 1 µl RNase H hinzugegeben, um während einer zehnminütigen Inkubation bei 37°C die RNA abzubauen. Die neu synthetisierte cDNA wurde aliquotiert bei –20°C eingefroren.

### 2.2.5 Amplifikation der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase mittels PCR

Ziel der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist zum einen, ein spezifisches Genprodukt, in dieser Arbeit die Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase, über seine Nachweisgrenze hinweg zu amplifizieren und, weiterführend, diese Sequenz mittels Klonierung und Sequenzierung zu identifizieren. Von dem zu

vermehrenden DNA-Fragment der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase müssen die flankierenden Grenzen bekannt sein. Gegen diese Sequenzen werden Oligonukleotide (Primer) als Startpunkte für die PCR synthetisiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden unter Zuhilfenahme von Vollängenklonen von *Zea mays*, die in der Genbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) zu finden sind, entworfen. Hierbei wurden sowohl isoformenspezifische, als auch unspezifische degenerierte Primer hergestellt.

Folgende **Primer** fanden bei der Polymerase-Kettenreaktion Anwendung:

sATPase\_unspez.4240 5`> AG (ACT) GT (AG) (AC) TT AT (AC) (AG) G  
(CT) G <3`

asATPase\_unspez.5326 5`> GC (CT) (GC) A (AGT) (CT) (AG) C (GT)  
(AT) A (GC) (AC) G GAT G <3`

---

sATPase\_spez.I 3461 5`> CCA AGC ACG ATG CCC GTA GC <3`

asATPase\_spez.I 4493 5`> CAT ACA GTT TAT AGG TCC AG <3`

---

sATPase\_spez.II 1676 5`> CAT GAC AGC GCT GAG ACA AD <3`

asATPase\_spez.II 2606 5`> CGA TAA GGG TGG CAA CAA GT <3`

---

sATPase\_spez.III 4216 5`> GTT CAT GGG CCT CTT GCC AC <3`

asATPase\_spez.III 5673 5`> GCA GAC ACC AGC AAG AAC CC <3`

Die Polymerase-Kettenreaktion besteht aus drei Schritten. Zunächst wird die cDNA bei 94°C denaturiert, damit im folgenden Schritt eine Anlagerung der Primer bei einer Temperatur von 40 - 60°C erfolgen kann. Anschließend kann das Enzym *Taq*-Polymerase die Primer bei 72°C verlängern und so einen neuen DNA-Strang synthetisieren. Durch eine Wiederholung der Zyklen wird das spezifische DNA-Fragment exponentiell amplifiziert.

Der **Reaktionsansatz** für die in dieser Arbeit durchgeführte Polymerase-Kettenreaktion setzte sich wie folgt zusammen:

1,70 µl	10x PCR-Puffer (inklusive MgCl <sub>2</sub> , 15 mM)
0,30 µl	dNTP (10 mM)
0,20 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (Biotherm)
14,25 µl	steriles H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
0,30 µl	Primerpaar (100 mM)
0,50 µl	cDNA

Die PCR wurde in einem Thermocycler (Biometra T-gradient) nach folgendem **Programm** durchgeführt:

1. Zyklus: Initiale Denaturierung, 2 min bei 94°C
2. - 32. Zyklus: Denaturierung 30 s bei 94°C  
Anlagerung der Primer 40 s bei 48 – 55°C  
Verlängerung der Primer 1 min bei 72°C
33. Zyklus: Auffüllen der DNA-Enden, 3 min bei 72°C

Im Versuchsverlauf wurde eine optimale Anlagerungstemperatur für jedes verwendete Primerpaar ermittelt.

Ist das erhaltene PCR-Produkt aufgrund unspezifischer Nebenprodukte verunreinigt, kann man dieses einer erneuten PCR (Re-PCR), unter Verwendung des gleichen Primerpaares, unterziehen. Somit erhält man neben einer Aufreinigung eine verstärkte Amplifikation des gewünschten PCR-Produktes.

Setzt man ein Primerpaar ein, welches innerhalb des Fragments, das in der vorangegangenen PCR entstanden ist, liegt, so kann zusätzlich zu einer Aufreinigung die Spezifität der Zielsequenz erhöht werden (Re-PCR mit nested Primern).

## 2.2.6 DNA-Gelelektrophorese

Das nach der Polymerase-Kettenreaktion erhaltene PCR-Produkt wurde einer elektrophoretischen Trennung in einem 1% (w/v) Agarosegel unterworfen. Für das 1% (w/v) Agarosegel wurde 1 g Agarose abgewogen und mit 1x TBE-Puffer auf 100 ml aufgefüllt. Nach Aufkochen in der Mikrowelle und Abkühlen auf 60°C wurden 5 µl Ethidiumbromidlösung (1% (w/v)) hinzugegeben. Im Anschluss wurde das Gel blasenfrei in einen vorbereiteten Gelgießstand gegossen und ein Gelkamm zum Formen der Taschen eingesetzt. Nach 30 min konnte das ausgehärtete Gel in eine Laufkammer überführt und mit 1x TBE-Puffer überschichtet werden. 8 - 10 µl der aufzutrennenden DNA wurden mit 4 µl XB-Auftragspuffer versetzt, gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Zur Bestimmung der Größen der nach der elektrophoretischen Trennung erhaltenen DNA-Fragmente fanden Größenstandards der Firma Invitrogen Verwendung. Diese DNA-Leitern bestehen aus DNA-Fragmenten, welche zueinander Abstände von 100 bp bzw. 500 bp aufweisen.

Bei einer Spannung von 120 V ließ man die, durch den XB-Auftragspuffer entstandene, Bromphenolblaufront bis in das untere Geldrittel laufen. Im Anschluss wurde die Ethidiumbromidfluoreszenz unter UV-Licht betrachtet und dokumentiert. Waren Banden in den erwarteten Größen vorhanden, so wurden diese aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt.

Der **1x TBE-Puffer** hatte folgende Zusammensetzung:

400 mM	Tris-Borat
10 mM	EDTA, pH 8,0
in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> lösen	

Der **XB-Auftragspuffer** hatte folgende Zusammensetzung:

0,25%	Bromphenolblau
0,25%	Xylencyanol
25%	Glycerol
in 1x TBE-Puffer	

Der **Marker** wurde wie folgt angesetzt:

10 µl	Marker (Invitrogen) 100 bp oder 500 bp
20 µl	XB-Auftragspuffer
70 µl	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

### 2.2.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion der DNA aus dem ausgeschnittenen Stück Agarose erfolgte unter Verwendung des NucleoTrap<sup>®</sup> Extraction Kit der Firma Macherey-Nagel. Zunächst wurde die Agarose mit 300 µl Puffer NT 1 und 6-8 µl Nucleotrap-Silicasuspension versetzt und 10 min bei 50°C im Intervallschüttler inkubiert. Die in Puffer NT 1 enthaltene hohe Konzentration an chaotropen Salzen entzieht der DNA die Hydrathülle, welches zu einer reversiblen Bindung der DNA an die Silicasuspension führt. Nach Zentrifugation bei 10 000 g wurde der Überstand verworfen und das DNA-haltige Pellet jeweils zweimal mit 500 µl Puffer NT 2 und Puffer NT 3 gewaschen. Im Anschluss wurde das aufgereinigte Pellet für 10 min an der Luft getrocknet und schließlich in 30 µl 10 mM Tris (pH 8,3) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dies führte zu einer Elution der DNA von der Silicasuspension. Nach kurzer Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C eingefroren.

## 2.2.8 Klonierung der aus der PCR erhaltenen DNA-Fragmente

Die Klonierung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System II der Firma Promega. Hierbei liegt die Insertionsstelle des Fragmentes auf dem Vektor innerhalb der kodierenden Region des  $\alpha$ -Peptids der  $\beta$ -Galactosidase. Inaktivierung des  $\alpha$ -Peptids durch erfolgreiche Ligation führt zu einer Identifizierung der rekombinanten Klone mittels Farbscreening auf entsprechenden Indikatorplatten (s. 2.2.8.3).

### 2.2.8.1 Ligation

Für die Ligation wurden 0,5  $\mu$ l pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor mit 2,5  $\mu$ l 2x Rapid Ligation Buffer, 1 – 2  $\mu$ l PCR-Produkt oder aus dem Gel eluierte DNA, 0,5  $\mu$ l T4 DNA Ligase und 1  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> miteinander vermischt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

### 2.2.8.2 Transformation

2  $\mu$ l des Ligationsansatzes wurden mit 50  $\mu$ l JM109 High Efficiency Competent Cells (Promega) vorsichtig vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitze-Schock-Behandlung der Zellen für 45 – 50 s bei 42°C, welche eine Aufnahme des Vektors zur Folge hatte. Nach 2 min auf Eis wurden 950  $\mu$ l SOC-Medium hinzugegeben und für 1,5 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Unter der Sterilbank erfolgte das Ausplattieren von 100  $\mu$ l Transformationskultur auf LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal-Agarplatten. Die Platten wurden über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Das **SOC-Medium** hatte folgende Zusammensetzung:

20 g Casein-Hydrolysat

5,0 g Hefe-Extrakt

100 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl

20 mM MgSO<sub>4</sub>

20 mM D-Glucose

in 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen, pH 7,3

Die **LB (Luria-Bertani)-Agarplatten** hatten folgende Zusammensetzung:

5,0 g Casein-Hydrolysat

5,0 g NaCl

2,5 g Hefe-Extrakt

9,0 g Agar-Agar

in 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen, pH 7,3

Zur Selektion erfolgreich transformierter Klone mussten zu dem autoklavierten und wieder auf 50°C abgekühlten LB-Agar-Medium folgende Substanzen hinzugegeben werden:

Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml

IPTG mit einer Endkonzentration von 0,5 mM

X-Gal mit einer Endkonzentration von 20 mg/ml

Anschließend wurden 30-35 ml Medium unter der Sterilbank in Petrischalen gegossen. Die Lagerung der Agarplatten erfolgte bei 4°C.

### 2.2.8.3 Selektion erfolgreich transformierter Klone

Durch die auf dem pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektor liegende Ampicillin-Resistenz können auf den Ampicillin-enthaltenden Agarplatten nur *E. coli* wachsen, welche dieses Plasmid erfolgreich aufgenommen haben. Der Nachweis der erfolgreichen Ligation des DNA-Fragmentes in den Vektor erfolgt über ein Farbscreening. Bei intaktem  $\beta$ -Galactosidase-Gen (*Lac Z*.) war die Ligation erfolglos und das Enzym katalysiert aus dem Substrat X-Gal, welches in den Agarplatten enthalten ist, ein blaues Produkt. Inaktivierung des  $\alpha$ -Peptids der  $\beta$ -Galactosidase durch erfolgreiche Ligation führt jedoch zu der Bildung von weißen Bakterienkolonien. Diese weißen Kolonien wurden selektiert und auf einer neuen LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal-Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Um die Größe der eingebauten DNA-Fragmente zu überprüfen, wurden weiße Bakterienkolonien mit einem sterilen Zahnstocher gepickt, ein Teil auf einer neuen LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal-Agarplatte ausgestrichen und der andere Teil am Boden eines PCR-Reaktionsgefäßes abgestrichen. Die Agarplatte wurde erneut über Nacht bei 37°C inkubiert.

Dem PCR-Reaktionsgefäß wurde folgender Reaktionsansatz hinzugegeben:

1 $\mu$ l	10 PCR-Puffer (inklusive 15 mM MgCl <sub>2</sub> )
0,1 $\mu$ l	M13 forward primer (100 mM)
0,1 $\mu$ l	M13 reverse primer (100 mM)
0,2 $\mu$ l	dNTP (10 mM)
8,5 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
0,1 $\mu$ l	<i>Taq</i> -Polymerase

Die verwendeten Primer M13 forward und M13 reverse binden spezifisch an die, die Insertionsstelle des DNA-Fragmentes, flankierenden Enden des pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vektors. Mittels eines Standard-PCR-Programmes mit einer Primer-Anlagerungstemperatur von 52°C werden PCR-Produkte mit der Größe des ligierten DNA-Fragmentes und den Primern des Vektors gebildet.

Das im Anschluss an die PCR erhaltene Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Ethidiumbromidfluoreszenz unter UV-Licht dokumentiert.

### 2.2.9 Flüssigkultur von *E. coli*

Zur stärkeren Vermehrung erfolgreich transformierter Bakterien wurden Flüssigkulturen angesetzt. Hierzu wurden selektierte Bakterienkolonien von den Agarplatten gepickt und jeweils mit 3 ml LB/Amp-Flüssigmedium versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation des Ansatzes über Nacht in einem Rotationsschüttler bei 37°C.

Das **LB/Amp-Flüssigmedium** hatte folgende Zusammensetzung:

10,0 g Casein-Hydrolysat

5,0 g Hefe-Extrakt

10,0 g NaCl

mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> auf 1000 ml auffüllen, pH 7,3

Das LB-Flüssigmedium wird aliquotiert mit Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) versetzt.

### 2.2.10 Plasmidisolation

Eine Plasmidisolation erfolgt aus erfolgreich transformierten Bakterien. Hierzu wurde das Nucleo Spin<sup>®</sup> Plasmid-Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Zunächst wurde eine Flüssigkultur wie unter 2.2.9 beschrieben angesetzt und am

darauffolgenden Tag in einem Eppendorfgesäß pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 250 µl Lösung A1 versetzt und resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Lösung A2 und 300 µl Lösung A3 und jeweils vorsichtigem Mischen erfolgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Dies führte zu einer Freisetzung der Plasmid-DNA und einer Fällung vorhandener Proteine. Eine Zentrifugation von 10 min bei 4°C und 11 000 g resultierte in einer Pelletierung von Proteinen und Zelltrümmern. Der Überstand wurde in ein Säulchen mit Silica-Matrix überführt. Diese bindet die freigesetzte Plasmid-DNA, wohingegen Proteine und weitere Metabolite durch die Membran hindurchgehen und nach Zentrifugation bei 11 000 g im Eluat wiederzufinden sind. Mehrere Waschschrirte mit 500 µl Lösung AW und 600 µl Lösung A4 führten zu einer Aufreinigung der gebundenen DNA. Anschließendes zweiminütiges Zentrifugieren bei 11 000 g bewirkte eine Trocknung des Säulchenmaterials. Darauffolgend wurde das Säulchen in ein 1,5 ml Eppendorfgesäß überführt und mit 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> kurz inkubiert. Eine anschließende Zentrifugation (11 000 g) eluierte die an der Silica-Matrix haftende Plasmid-DNA. Die isolierte Plasmid-DNA wurde im Folgenden photometrisch quantifiziert (s. 2.2.3) und anschließend für eine Sequenzierung vorbereitet.

### 2.2.11 Sequenzierung des im Plasmid befindlichen DNA-Fragments

Die Sequenzierung der isolierten DNA erfolgte am Institut für molekulare Mikrobiologie der JLU Gießen, mit dem Gerät ABI Prism 310 Genetic Analyzer. Die zu sequenzierenden DNA-Proben mussten auf eine Konzentration von 100 ng/µl verdünnt werden. Für die Sequenzierung fanden die vektor-spezifischen Primer M13 forward und M13 reverse Verwendung.

## 2.2.12 Untersuchung der Transkription der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase

### 2.2.12.1 Isolation von mRNA

Um die Transkription von Isoformen der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase unter Kontroll- und unter H<sup>+</sup>-Stress-Bedingungen zu untersuchen, musste zunächst aus der unter 2.2.1 isolierten Gesamt-RNA die mRNA extrahiert werden. Dies geschah unter Verwendung des Dynabeads<sup>®</sup> mRNA Purification Kits der Firma Dynal Biotech. Schlüsselkomponente des Kits sind superparamagnetische Oligo (dT)<sub>25</sub>-Kügelchen (Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub>), die an den Poly-A-Schwanz am 3'-OH-Ende der mRNA binden. Mittels eines Magneten erfolgt die Abtrennung der mRNA von der Gesamt-RNA.

Vor Beginn der eigentlichen mRNA-Isolation wurden zunächst 200 µl Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub> in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 30 s an einen Magneten gehalten. Nach Abnahme des Überstandes erfolgte ein Suspendieren der magnetischen Kügelchen in 100 µl Bindungspuffer. Im Anschluss erfolgte eine erneute Agglomeration der Kügelchen an einem Magneten, Abnahme des Überstandes und ein wiederholtes Lösen in 100 µl Bindungspuffer. In dieser Weise vorbereitete Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub> fanden im weiteren Verlauf der mRNA-Isolation ihre Anwendung.

Zunächst wurden 100 µg RNA mit DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> auf 100 µl aufgefüllt und für 2 min bei 65°C inkubiert, um Sekundärstrukturen zu zerstören. Nach kurzer Lagerung auf Eis erfolgte eine Zugabe der Gesamt-RNA zu den in Bindungspuffer gelösten 100 µl Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub>. Nach gründlichem Mischen für 3-5 min bei Raumtemperatur wurde das Eppendorfgefäß so lange an einen Magneten gehalten, bis ein klarer Überstand entstanden war. Dieser wurde verworfen und die pelletierte Probe wurde zweimal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation des Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub>/mRNA-Pellets mit 20 µl 10 mM Tris-

HCl (pH 7,5) bei 65 – 80°C für 2 min. Dies bewirkt eine Elution der mRNA von den Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub>. Platzierung des Eppendorfgefäßes an den Magneten resultierte in der Bildung eines mRNA-haltigen Überstandes. Dieser wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Im Anschluss an die mRNA-Isolation erfolgte eine Regeneration der Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub> durch mehrmaliges Waschen in je 200 µl 0,1 M NaOH bzw. Lagerungspuffer. Die isolierte mRNA wurde nach photometrischer Qualitätsüberprüfung (s. 2.2.3) im Weiteren einer cDNA-Erststrangsynthese, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, unterzogen.

Der **Bindungspuffer** hatte folgende Zusammensetzung:

20 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
1,0 mM	LiCl
2 mM	EDTA

Der **Waschpuffer** hatte folgende Zusammensetzung:

10 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
0,15 M	LiCl
1,0 mM	EDTA

Der **Lagerungspuffer** hatte folgende Zusammensetzung:

250 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
20 mM	EDTA
0,1%	Tween (v/v)
0,02%	NaN <sub>3</sub> (w/v)

### 2.2.12.2 Real-Time-PCR

Für die Real-Time-PCR fanden sowohl isoformenspezifische, als auch familienspezifische Primer gegen die Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase Verwendung. Als Grundlage für das Design der Primer dienten zum einen die in dieser Arbeit bei *Zea mays* L. cv. Blizzard gefundenen Isoformen der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase und zum anderen die in der Genbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) veröffentlichten Sequenzen der bisher bekannten Isoformen der H<sup>+</sup>-ATPase in Mais (*Mha 1 – 4*).

Folgende **Primer** fanden bei der Real-Time-PCR Anwendung:

sATPase_fam.spez. 2632	5`> CAG GAT CAA GGG TAT CGG CT <3`
asATPase_fam.spez. 2863	5`> GGC TGG AGC CCG TGC AGC GC <3`
sMha-4 551	5`> TCT GGC TCT ACA GCA TCG TG <3`
asMha-4 781	5`> CTT GTC GTG GAA CAG CGT GC <3`
sMha-1 2117	5`> TTT GGA AGT TTG ACT TCC CA <3`
asMha-1 2332	5`> AAG AAG TCG GTC TTG TAC GC <3`
sZMATP C/T2 233	5`> TGA G/TTC AAA CAC CTA C/TAA <3`
asZMATP C/T2 309	5`> TGT TTG TTG CAC AGG AAC <3`
sZMATP T3 3	5`> AAG CAC GAT GCC CGT AGC <3`
asZMATP T3 96	5`> ACT TGT TGC CAC CTT CCT C <3`

Die in dieser Arbeit durchgeführte Real-Time-PCR wurde unter Verwendung des ABsolute<sup>TM</sup> QPCR SYBR<sup>®</sup> Green Mix der Firma Abgene durchgeführt.

Der **Reaktionsansatz** für die PCR setzte sich wie folgt zusammen:

2,85 µl	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
5,00 µl	ABsolute <sup>TM</sup> QPCR SYBR <sup>®</sup> Green Mix
0,15 µl	Primer-Mix (100 µM)

Die cDNA wurde 1:30 verdünnt eingesetzt und es wurden vier technische Wiederholungen pro Primerpaar durchgeführt.

Die Real-Time-PCR wurde im Real-Time-Thermocycler Rotor-Gene 2000/3000 der Firma CORBETT-Research nach folgendem **Programm** durchgeführt:

1. Zyklus:            Initiale Denaturierung, 15 min bei 94°C
2. - 35. Zyklus:    Denaturierung 30 s bei 94°C  
                      Anlagerung der Primer 30 s bei 60°C (Aktin), 57°C (ATPase-Primer)  
                      Verlängerung der Primer 30 s bei 72°C  
                      Aufzeichnungsphase bei 72°C
36. Zyklus:         Schmelzpunktanalyse bei 72 – 99°C

Zur quantitativen Bestimmung der Transkription von Isoformen der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase unter Kontroll- und unter H<sup>+</sup>-Stress-Bedingungen wurde die Methode der relativen Quantifizierung angewandt. Dabei wird die Transkription zweier Gene miteinander verglichen, indem sie zueinander ins Verhältnis gesetzt werden. Neben dem zu untersuchenden Gen wird eine endogene Kontroll-RNA, ein sogenanntes Haushaltsgen, mit amplifiziert. Die Transkription des endogenen Kontroll-Gens soll gegenüber der unterschiedlichen Behandlung der Pflanzen indifferent sein.

In dieser Arbeit wurde Aktin als Haushaltsgen verwendet. Die Transkription aller untersuchten ATPase-Gene wurde auf die Transkription des Aktin-Gens bezogen, woraus sich die relative Transkription der interessierenden Gene ergab.

Eine Quantifizierung setzt das Vorhandensein einer Kalibrierreihe voraus, welche in dieser Arbeit durch eine Verdünnungsserie (1:20, 1:40, 1:80, 1:160) der eingesetzten cDNA erstellt wurde. Für jedes interessierende Gen, inklusive dem endogenen Kontroll-Gen, wurde jeweils eine eigene Kalibriergerade

erstellt. Nachdem jede Probe zweimal, zum einen auf das Haushaltsgen und zum anderen auf das interessierende Gen, analysiert wurde, wurden die automatisch durch die jeweilige Kalibriergerade berechneten relativen Werte zueinander ins Verhältnis gesetzt. Daraus ergaben sich die relativen Transkriptionen der zu untersuchenden Gene.

In die Auswertung der mittels Real-Time-PCR erhaltenen Daten flossen drei biologische Wiederholungen ein. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde die Transkription der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase bei einer der unter Kontrollbedingungen (pH 6,0) angezogenen Pflanzen auf einen Zahlenwert von 1 gesetzt. Die relativen Transkriptionen des Enzyms in den zwei verbleibenden biologischen Wiederholungen wurden darauf bezogen. Die erhaltenen Transkriptionswerte der unter H<sup>+</sup>-Stress (pH 3,5) transkribierten Gene wiederum wurden auf die jeweilige Kontrolle bezogen.

Alle in dieser Arbeit mittels Real-Time-PCR amplifizierten und quantifizierten Gen-Fragmente wurden auf ihre Sequenz hin überprüft und das entsprechende Gen mittels Datenbank-Analyse (NCBI) verifiziert.

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Proteinextraktion

#### 2.3.1.1 Extraktion von Gesamtprotein

Die Extraktion eines Großteils der Proteine aus dem unter flüssigem Stickstoff pulverisiertem Wurzelmaterial beruht auf einer TCA/Aceton-Fällung (Damerval et al., 1986), gefolgt von einer Solubilisierung der Proteine in 2-D-Gesamtprotein-Probenpuffer. Sehr hydrophobe Membranproteine entgehen dieser Isolationsmethode und bedürfen einer speziellen, den hydrophoben Eigenschaften dieser Proteine angepassten, Extraktion (s. Kap. 2.3.1.2).

200 mg gemörstertes Wurzelmaterial wurden zunächst mit 10% TCA/50 mM DTT in Aceton versetzt und durch gründliches Mischen homogenisiert.

Anschließend erfolgte eine Inkubation der Proben in einem eisgekühlten Ultraschallbad für 15 min. Nach Fällung der Proteine über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $14\,500\text{ g}$ . Das erhaltene Pellet wurde in eiskaltem Aceton/50 mM DTT resuspendiert und erneut für 10 min in einem eiskalten Ultraschallbad inkubiert. Auf eine einstündige Fällung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und 15-minütiger Zentrifugation bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $14\,500\text{ g}$  folgte ein erneuter Waschschrift des erhaltenen Pellets in eiskaltem Aceton/50 mM DTT. Das anschließend erhaltene Pellet wurde unter  $\text{N}_2$ -Belüftung getrocknet. Pro Anzuchtvariante wurden drei getrocknete Proben miteinander vereinigt, mit 1-1,5 ml 2-D-Gesamtprotein-Probenpuffer versetzt und gründlich gemischt. Die Solubilisierung der Proteine erfolgte in einem Schüttler für 2 h bei  $33^{\circ}\text{C}$ . Im Anschluss an eine 15minütige Inkubation der Proben im Ultraschallbad wurden sie einer erneuten Zentrifugation für 30 min, bei  $10^{\circ}\text{C}$  und  $\geq 14\,500\text{ g}$  unterworfen. Der Überstand wurde gesammelt und die Zentrifugation bei Bedarf noch einmal wiederholt, um die Ausbeute zu steigern. Nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurden die proteinhaltigen Überstände bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Der **2-D-Gesamtprotein-Probenpuffer** hatte folgende Zusammensetzung:

8 M	Harnstoff
2 M	Thioharnstoff
0,5%	IPG-Puffer (v/v, pH 3-10)
4%	CHAPS
30 mM	DTT
20 mM	Tris base, pH 8,8
5 mM	Pefabloc

### 2.3.1.2 Extraktion von Membranprotein

Auf eine Inkubation des pulverisierten Wurzelmaterials in einem von Schrattenholz (2001) übernommenen, jedoch abgewandelten Homogenisationspuffers erfolgte die Extraktion der Membranproteine mittels differentieller Zentrifugation.

Zunächst wurde 1 g gemörsertes Wurzelmaterial mit 5 ml eiskaltem Homogenisationspuffer und einigen gereinigten Glaskügelchen versetzt und so lange gemischt, bis homogene Suspensionen entstanden.

Der **Homogenisationspuffer** hatte folgende Zusammensetzung:

50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
10 mM	DTT
5 mM	Na-glycerophosphat
1 mM	Na-ortho-vanadat
50 mM	0,5 M EDTA, pH 8,0
250 mM	NaCl
5 mM	Pefabloc

Im Anschluss erfolgte eine Filtration der Suspensionslösungen durch eine Lage Zellstoff (Miracloth), um Zellwandfragmente, unvollständig gebrochene Gewebefragmente und größere Trümmer zu entfernen. Alle Arbeitsschritte außerhalb der Zentrifuge wurden auf Eis durchgeführt.

Die anschließende differentielle Zentrifugation gliederte sich in zwei Schritte. Zur Entfernung von Stärkekörnern, Nuklei und ungebrochenen Plastiden und Mitochondrien aus dem Filtrat wurde dieses zunächst einer zehnminütigen Zentrifugation bei 11 500 g und 0°C in der Ultrazentrifuge (Sorvall Ultra 80 & Combi plus von Du Pont; Swing out-Rotor AH 629, 36 ml) unterworfen. Der nach der Zentrifugation entstandenen Überstand wurde dekantiert und

anschließend bei 87 000 g und 0°C für 35 min nochmals zentrifugiert, um die Zellmembran von löslichen Proteinen zu trennen und somit aufzukonzentrieren. Das hieraus gewonnene Pellet enthielt nun alle Membranen der Wurzelzellen, mikrosomale Membranfraktion genannt. Dieses wurde anschließend in einem entsprechenden Volumen an 1-D- bzw. 2-D-Membranprotein-Probenpuffer gelöst.

Der **1-D-Membranprotein-Probenpuffer** hatte folgende Zusammensetzung:

10%	Glycerol
10%	SDS
0,2 M	DTT
125 mM	Tris-HCl, pH 7,4
5 mM	PMSF

Der **2-D-Membranprotein-Probenpuffer** hatte folgende Zusammensetzung:

7 M	Harnstoff
2 M	Thioharnstoff
0,5%	Triton X-100
20 mM	DTT
2%	ASB-14
5 mM	Pefabloc
20 mM	Tris base
2 %	IPG-Puffer

Im Anschluss an die Resuspendierung der nach der differentiellen Zentrifugation erhaltenen Pellets erfolgte eine zehnminütige Inkubation der Proben im Ultraschallbad. Zur Aufkonzentration der Membranproteine mit einer Größe über 30 kDa wurden die Proben auf Ultrafiltrationssäulchen (Vivaspin

500, Vivascience) geladen und mittels Zentrifugation auf ca. die Hälfte ihres Volumens reduziert.

Nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff erfolgte eine Lagerung der Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Bei Bedarf war es notwendig, die Membranproteine bis kurz vor dem Auftragen auf das eindimensionale SDS-Polyacrylamidgel in einem möglichst nativen, undenaturierten und unreduzierten Zustand zu halten. Zu diesem Zweck enthielt der anfangs eingesetzte Homogenisationspuffer eine fünffach geringere Menge an DTT. Das Lösen des nach der differentiellen Zentrifugation erhaltenen Pellets erfolgte in BTP-Puffer. Nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Proben sofort bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Der **BTP-Puffer** hatte folgende Zusammensetzung:

250 mM	Saccharose
3 mM	KCl
5 mM	BTP (mit MES auf pH 7,8)

### 2.3.2 Protein-Quantifizierung

Die Bestimmung der Proteinmenge in den Gesamtprotein- bzw. Membranproteinsuspensionen erfolgte unter Verwendung des Plus-One 2-D Quant Kits der Firma Amersham Biosciences. Die Methode basiert auf der spezifischen Bindung von Kupferionen an die Polypeptidkette der zu quantifizierenden Proteine. Im Reaktionsansatz befindliche ungebundene Kupferionen werden bei Zugabe eines Farbreagens komplexiert und photometrisch bei 480 nm nachgewiesen. Die gemessene Farbintensität ist indirekt proportional zur Proteinkonzentration der Probe.

Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurden je 0, 5, 10, 15, 20 und 25  $\mu\text{l}$  BSA-Stammlösung (2 mg/ml) in Eppendorfgefäße pipettiert, was Kalibrierlösungen mit Proteingehalten von 0 bis 50  $\mu\text{g}$  entsprach.

25  $\mu\text{l}$  der jeweiligen zu quantifizierenden Proteinsuspensionen wurden in Eppendorfgefäße pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Precipitant-Lösung zu Proben und Standards. Nach gründlichem Mischen und Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur wurden 500  $\mu\text{l}$  Co-Precipitant-Lösung in den Messansatz gegeben. Das Zusammenspiel beider Lösungen bewirkte eine Ausfällung der sich in Proben und Standards befindlichen Proteine. Nach gründlichem Mischen und fünfminütiger Zentrifugation bei 10 000 g erfolgte ein Lösen der erhaltenen Pellets in 400  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  und 100  $\mu\text{l}$  Kupferlösung. Im Anschluss wurde 1 ml Farbreagenz zur Bindung überschüssiger Kupferionen zugegeben. Nach 15 – 20 min fand die Messung der Absorption von Proben und Standards in Einwegküvetten (Schichtdicke 10 mm) am Spektralphotometer (Cary 4, Varian) bei 480 nm gegen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  als Referenz statt.

### 2.3.3 1-D-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der SDS-Gelelektrophorese werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Im 1-D-Membranprotein-Probenpuffer enthaltenes Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) bewirkt eine Maskierung der Eigenladung der Proteine, woraus eine negative Ladung proportional zur Größe der im elektrischen Feld aufzutrennenden Moleküle resultiert.

Die Größenauftrennung der Membranproteine erfolgte in 10%igen diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen.

Das **Sammelgel** hatte folgende Zusammensetzung:

1,25 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
0,625 ml	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4% SDS
0,5 ml	Acrylamidlösung
10 µl	10% APS (w/v)
10 µl	TEMED

Das **Trenngel** hatte folgende Zusammensetzung:

1,5 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
1,5 ml	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4% SDS
3 ml	Acrylamidlösung
50 µl	10% APS (w/v)
5 µl	TEMED

Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten (10 cm x 8 cm) gegossen, die in einem Gießstand fixiert waren. Nach Auspolymerisation der Acrylamidmonomere erfolgte die Überschichtung des Trenngels mit dem Sammelgel. Das Einsetzen eines Kammes in das noch flüssige Sammelgel bewirkte die Ausbildung von Probenaschen.

Vor dem Auftragen der Proben in die Taschen des Gels wurde dieses in eine, mit Laufpuffer gefüllte, vertikale Laufkammer (lfd Labortechnik) eingebaut. 1 – 8 µg des aufzutrennenden Membranproteins wurden mit 1-D-Membranprotein-Probenpuffer auf 30 µl Auftragsvolumen aufgefüllt und in die Taschen des vorbereiteten Gels pipettiert. Bei Verwendung der in BTP-Puffer gelösten Membransuspensionen wurden diese 1:2 mit 2x 1-D-Membranprotein-Probenpuffer versetzt (Proteinmenge: 2 µg; Gesamtauftragsvolumen: 30 µl) und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Maskierung der Eigenladungen der Proteine durch SDS zu erreichen. Um unterschiedliche Reduktionszustände

der aufzutrennenden Proteine zu erhalten, wurden die Proben mit 2x 1-D-Membranprotein-Probenpuffer mit variierenden Konzentrationen des Reduktionsmittels DTT (0 – 200 mM) und des Detergenzes Triton X-100 (5%) versehen.

Zur Bestimmung der nach der elektrophoretischen Trennung erhaltenen Protein-Moleküle, fanden Größenstandards der Firma Fermentas, Peqlab und Invitrogen Verwendung. Diese zum Teil vorgefärbten Standards decken Molekulargewichte von Proteinen in einem Bereich von 14 – 220 kDa ab.

Zur Visualisierung der, während der elektrophoretischen Trennung der Proteinmoleküle auftretenden, Lauffront enthielt jede aufgetragene Probe einige Tropfen des Farbstoffes Bromphenolblau. Bei einer Stromstärke von 25 mA ließ man die Bromphenolblaufront bis an das Ende des Gels laufen. Im Anschluss wurde es aus der Laufkammer ausgebaut, die Glasplatten entfernt und das Acrylamidgel für die Anfärbung der aufgetrennten Proteine über Nacht in Fixierlösung inkubiert.

Der **Laufpuffer** hatte folgende Zusammensetzung:

0,025 M	Tris base
0,192 M	Glycin
0,1%	SDS

Die **Fixierlösung** für eine Anfärbung der Proteine mittels des Farbstoffes Coomassie R-350 hatte folgende Zusammensetzung:

40%	Ethanol
10%	Essigsäure
50%	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

Die **Fixierlösung** für eine Anfärbung der Proteine mittels Silbernitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) hatte folgende Zusammensetzung:

50%	Ethanol
12%	Essigsäure
0,1 ml	37% Formaldehyd
mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf 40 ml auffüllen	

## 2.3.4 Anfärbung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine

### 2.3.4.1 Anfärbung der Proteine mittels Coomassie R-350

Die zur Anfärbung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteinmoleküle verwendete Lösung setzte sich aus 0,025% Coomassie R-350 in 10% Essigsäure zusammen. Nach Abschütten des Fixierers erfolgte eine zehninminütige Inkubation des Acrylamidgels in 90°C heißer Coomassie-Färbelösung. Eine Entfärbung des Hintergrundes wurde durch mehrmalige Waschungen des Gels in 10% Essigsäure bewirkt.

### 2.3.4.2 Anfärbung der Proteine mittels Silbernitrat

Nach Abschütten des Fixierers erfolgten drei 15-minütige Waschschriffe des Acrylamidgels in 50% Ethanol. Auf eine einminütige Vorbehandlung des Gels in 0,8 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung und drei Waschungen in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  folgte eine 20-minütige Inkubation des Acrylamidgels in der Imprägnierlösung.

Die **Imprägnierlösung** hatte folgende Zusammensetzung:

0,1 g	$\text{AgNO}_3$
37,5 $\mu\text{l}$	37% Formaldehyd
mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf 50 ml auffüllen	

Nach zweimaligem Waschen in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  wurde das Gel entwickelt.

Die **Entwicklerlösung** hatte folgende Zusammensetzung:

3,0 g	$\text{Na}_2\text{CO}_3$
24 $\mu\text{l}$	37% Formaldehyd
0,2 mg	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf 50 ml auffüllen	

Sobald Banden auf dem Gel erkennbar wurden, und diese eine gewisse Intensität erreicht hatten, erfolgte ein Abstoppen der Entwicklung mittels Essigsäure.

Nach Anfärbung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf dem Acrylamidgel mittels Coomassie R-350 bzw. mittels Silbernitrat erfolgte eine Dokumentation der Bandenmuster mittels eines Scanners der Firma Umax (Powerlook 112).

### 2.3.5 Immundetektion der Plasmalemma- $\text{H}^+$ -ATPase

Zur Identifizierung der Plasmalemma- $\text{H}^+$ -ATPase auf dem eindimensionalen Acrylamidgel mussten zunächst alle Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert werden. Nach 15-minütiger Inkubation von Gel und Membran in Blotpuffer erfolgte der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Membran in einer Nassblotkammer (ltf Labortechnik) nach folgenden Konditionen: 1 h bei einer Spannung von 110 V; über Nacht bei einer Spannung von 30 V bei Raumtemperatur. Nach dem Transfer unterlief die Membran mehreren Waschschritten in 1:2 verdünntem Blotpuffer. Im Anschluss erfolgte eine zweistündige Inkubation der PVDF-Membran in 5% Milchpulver in TBS-Puffer, um alle noch freien Bindungsstellen auf der Membran mit Protein abzusättigen. Zur Identifikation der Plasmalemma- $\text{H}^+$ -ATPase wurde der Blot

für 2 h in einer mit PBS-Puffer 1:3000 (v/v) verdünnten polyklonalen Antikörperlösung (Dr. Michael G. Palmgren, Royal Veterinary and Agricultural University, Kopenhagen) inkubiert (Raumtemperatur). Dieser Antikörper bindet spezifisch an den N-Terminus der pflanzlichen H<sup>+</sup>-ATPase (Aminosäuren 6 – 51 der Isoform AHA2 von *Arabidopsis thaliana*). Auf drei zehnminütige Waschschriffe in TBS-T-Puffer folgte eine weitere zweistündige Inkubation der Membran in einem 1:30000 (v/v) verdünnten sekundären Antikörper (alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG, Sigma). Im Anschluss erfolgten erneut mehrere Waschschriffe in TBS-T- bzw. in TBS-Puffer. Die Entwicklung des Western Blots erfolgte nach fünfminütiger Inkubation der Membran in alkalischem AP-Puffer. In der Entwicklerlösung enthaltenes Substrat (BCIP/NBT) für die an den zweiten Antikörper konjugierte alkalische Phosphatase resultierte in der Katalyse einer Farbreaktion an der Bindungsstelle des ersten Antikörpers auf der Membran. Eine Dokumentation des Western Blots erfolgte mittels eines Scanners der Firma Umax (Powerlook 112). Die Auswertung der nach der Farbreaktion entstandenen Bandenintensitäten erfolgte mit dem Programm TINA, Version 2.08. Es wurden drei biologische Wiederholungen durchgeführt. Die Bandenintensität der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase einer der drei biologischen Wiederholungen unter Kontrollbedingungen wurde gleich 100% gesetzt. Die Bandenintensitäten des Enzyms der zwei verbleibenden biologischen Wiederholungen wurden darauf bezogen. Die Bandenintensitäten der unter H<sup>+</sup>-Stress (pH 3,5) gebildeten H<sup>+</sup>-ATPase wiederum wurden auf die jeweilige Kontrolle bezogen.

Der **Blotpuffer** hatte folgende Zusammensetzung:

0,2 M                      Glycin  
mit 2 M Tris base auf pH 8,3 einstellen

Der **TBS-Puffer** hatte folgende Zusammensetzung:

1 mM	Tris-HCl, pH 8,0
15 mM	NaCl

Der **TBS-T-Puffer** hatte folgende Zusammensetzung:

0,1%	Tween 20 in TBS-Puffer
------	------------------------

Der **PBS-Puffer** hatte folgende Zusammensetzung:

0,14 M	NaCl
2,7 mM	KCl
1,8 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
20,3 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
pH 7,4 mit NaOH	

Der **AP-Puffer** hatte folgende Zusammensetzung:

100 mM	Tris-HCl, pH 9,5
100 mM	NaCl
5 mM	MgCl <sub>2</sub>

Die **Entwicklerlösung** hatte folgende Zusammensetzung:

66 µl	NBT-Stammlösung
32 µl	BCIP-Stammlösung
in 10 ml AP-Puffer	

Die **NBT-Stammlösung** hatte folgende Zusammensetzung:

100 mg	NBT
in 1,9 ml 70% (v/v) Dimethylformamid	

Die **BCIP-Stammlösung** hatte folgende Zusammensetzung:

100 mg            BCIP  
in 1,9 ml Dimethylformamid

### 2.3.6 Immundetektion von phosphoryliertem Threonin

Zur Identifizierung von phosphoryliertem Threonin wurde, wie unter Kapitel 2.3.5 beschrieben, ein Western Blot mit Membranproteinen durchgeführt. Die Inkubation der PVDF-Membran erfolgte in einer mit TBS 1:100 (v/v) verdünnten polyklonalen Antikörperlösung (Acris Antibodies). Dieser Antikörper bindet spezifisch an phosphorylierte Threonine zugänglicher Polypeptidketten. Die Inkubation des Blots im sekundären Antikörper erfolgte im 1:30000 (v/v) verdünnten, phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG der Firma Sigma. Die weitere Behandlung und Entwicklung des Blots fand wie unter Kapitel 2.3.5 beschrieben statt.

### 2.3.7 2-D-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

#### 2.3.7.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung wurde mit dem IPGphor-System (Amersham Biosciences), unter Verwendung von 11 cm langen IPG-Strips pH 3-10 (Amersham Biosciences), durchgeführt. Die aufzutragende Probenmenge betrug 150 µg in einem Probenvolumen von 200 µl. Der zweidimensionalen, gelelektrophoretischen Trennung wurde sowohl aus Maiswurzeln extrahiertes Gesamt- als auch Membranprotein unterworfen. Hierbei zeigte der 2-D-Membranprotein-Probenpuffer eine vom 2-D-Gesamtprotein-Probenpuffer abweichende Zusammensetzung (s. 2.3.1.1 und 2.3.1.2). Die auf die aufzutragende Probenmenge verdünnte und mit Bromphenolblau angefärbte Proteinprobe wurde in ein Keramik-Schiffchen pipettiert, an dessen Unterseite

an Anode und Kathode je eine Platinelektrode eingezogen war. Im Anschluss erfolgte die Positionierung des IPG-Strips, mit der sauren Seite an der Anode anliegend, in dem Keramik-Schiffchen. Zum Schutz vor Austrocknung und Auskristallisation wurde der IPG-Strip mit Paraffin überschichtet und mit einem Plastikdeckel abgedeckt. Im Anschluss wurden die in entsprechender Weise beladenen Keramik-Schiffchen auf den vorgegeben Kontaktbereich des IPGphor-Systems gesetzt. Die isoelektrische Fokussierung wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 11 h Rehydratisierung des Gels auf dem IPG-Strip bei einer Spannung von 20 V; Schritt 1 bei einer Spannung von 200 V für 1 h; Schritt 2 bei einer Spannung von 500 V für 1 h; Schritt 3 bei einer Spannung von 1000 V für 1 h; Schritt 4 bei einer Spannung von 4000 V für 2 h; Schritt 5 bei einer Spannung von 8000 V für 3 h. Die Temperatur betrug 20°C und die Stromstärke lag bei 50 µA pro IPG-Strip. Im Anschluss an die isoelektrische Fokussierung erfolgte ein Beladen der IPG-Strips mit SDS, indem sie für 10 min in Equilibrierungspuffer, welcher 1% (w/v) DTT enthielt, inkubiert wurden. Darauf folgend fand eine weitere Inkubation der IPG-Strips in Equilibrierungspuffer, an Stelle des DTT 4% (w/v) Iodacetamid enthaltend, statt. DTT spaltet als reduzierende Thiolverbindung Schwefelbrücken zwischen Cysteinen, wohingegen Iodacetamid kovalente Bindungen in den Proteinen löst und überschüssiges DTT verdrängt, wodurch eine Artefaktbildung vermindert wird.

Der **Equilibrierungspuffer** hatte folgende Zusammensetzung:

50 mM	Tris-HCl, pH 8,8
6 M	Harnstoff
30% (v/v)	Glycerol
2% (w/v)	SDS

### 2.3.7.2 Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Größenauftrennung der auf den IPG-Strips fokussierten und mit SDS beladenen Proteine erfolgte in 12,5%igen Acrylamidgelen.

Das **12,5% ige Polyacrylamidgel** hatte folgende Zusammensetzung:

16,6 ml	Acrylamidlösung
10,0 ml	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
12,72	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
400 µl	10% (w/v) SDS
200 µl	10% (w/v) APS
13,2 µl	TEMED

Die Gellösung wurde zwischen zwei Glasplatten (18 cm x 16 cm) gegossen, die in einem Gießstand fixiert waren. Nach vollständiger Auspolymerisation bei Raumtemperatur (über Nacht) erfolgte das Platzieren der fokussierten IPG-Strips auf je einem Acrylamidgel. Zur Molekulargewichtsbestimmung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteinmoleküle fanden Größenstandards der Firma Invitrogen (Benchmark Protein Ladder) Verwendung. 5 µl Standardgemisch, auf Filterpapierplättchen aufgetragen, wurden an der sauren Seite eines jeden Strips auf dem Acrylamidgel positioniert. Im Anschluss erfolgte eine Überschichtung von Strip und Markerplättchen mit 0,5% (w/v) Agarose, um deren Position auf dem Gel zu fixieren. Darüber hinaus bewirkte der in der Agrose enthaltene Farbstoff Bromphenolblau eine Identifizierung der während der elektrophoretischen Trennung entstehenden Lauffront der Proteine. Nach Aushärtung der Agarose wurden die Acrylamidgele in eine, mit Laufpuffer gefüllte, vertikale Laufkammer der Firma Hoefer eingebaut. Die zweite Dimension wurde unter einer konstanten Stromstärke von 35 mA pro Gel und einer Temperatur von 25°C durchgeführt. Nachdem die

Bromphenolblaufront das untere Ende des Acrylamidgels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt und die aus den Glasplatten ausgebauten Gele in Fixierlösung für die Anfärbung mit Coomassie R-350 (s. 2.3.3) inkubiert. Die Anfärbung der 2-D-gelelektrophoretisch aufgetrennten Gesamt- und Membranproteine fand wie unter Kapitel 2.3.4.1 beschrieben statt. Im Anschluss erfolgte die Dokumentation der 2-D-Gele mittels des Scanners Powerlook 112 der Firma Umax.

### 2.3.8 Auswertung der 2-D-Gele

Die Auswertung der mittels Coomassie R-350 angefärbten Membranprotein- und Gesamtprotein 2-D-Gele erfolgte mit dem Bildverarbeitungsprogramm Delta2D der Firma Decodon. Hierbei wurde das jeweilige Wurzel-Proteinmuster der bei pH 3,5 angezogenen Maispflanzen mit dem der bei pH 6,0 angezogenen Pflanzen verglichen. Pro Anzuchtvariante flossen drei biologische mit je zwei chemischen Wiederholungen in die Auswertung der erhaltenen 2-D-Gele ein. Durch Übereinanderlegen der jeweiligen Kontrollgele (pH 6,0) mit den Behandlungsgelen (pH 3,5) und Setzen spezifischer Filter konnten die unter  $H^+$ -Stress differentiell regulierten Proteine identifiziert werden.

### 2.3.9 Immundetektion der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase in 2-D-Gelen

Die Immundetektion der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase erfolgte mit 2-D-gelelektrophoretisch aufgetrennten Membranproteinsuspensionen beider Anzuchtvarianten. Hierbei fanden IPG-Strips in variierender Länge mit jeweils variierenden pH-Bereichen (Amersham Biosciences) Anwendung. Im Anschluss an die zweite Dimension wurden die Proteine mit einer Größe von ca. 120 – 70 kDa aus dem 2-D-Gel auf eine PVDF-Membran transferiert. Im Weiteren erfolgte die Behandlung des Western Blots wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben.

## 2.4 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Program SigmaStat der Firma Jandel Scientific. Signifikanzaussagen zwischen den beiden Anzuchtvarianten wurden unter Zuhilfenahme des t-Testes gemacht. Dabei galten Ergebnisse ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P \leq 5\%$  als signifikant voneinander verschieden.

## 2.5 Verwendete Chemikalien

Nachfolgend sind alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien inklusive ihrer Bezugsquelle aufgelistet.

Aceton	Roth
Acrylamid-Stammlösung	Roth
Agar Agar Kobe I	Serva
Agarose	Saekem FMC
Ammoniummolybdat $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	Riedel de Haen
Ampicillin	AppliChem
Anti-Rabbit (IgG-Alkalische Phosphatase Antikörper Konjugat)	Sigma
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	Fluka
ASB-14	Sigma
BCIP (Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat)	AppliChem
Bromphenolblau	Serva
Borsäure $(\text{H}_3\text{BO}_3)$	Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
BTP (1,3-Bis[tris(hydroxymethyl)methylamin]propan)	Sigma
Calciumchlorid $(\text{CaCl}_2)$	Merck
Calciumnitrat $(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2)$	Merck

---

Calciumsulfat (CaSO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O)	Merck
Casein Hydrolysat	Fluka
CHAPS (Cholamid-Propionsäure-Sulfonat)	Serva
Chloroform	Merck
Coomassie R-350	Amersham Biosciences
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth
D-Glucose	Fluka
DMF (Dimethylformamid)	Serva
dNTPs	Peqlab
DTT (Dithiothreitol)	Sigma
EDTA (Ethyldiamin-Tetraessigsäure)	Fluka
EGTA (Ethylen glykol-Tetraessigsäure)	Roth
Eisen-EDTA	Compo
Essigsäure	Merck/Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Merck
Formaldehyd	Roth
Formamid	Merck
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
Harnstoff	Serva
HCl (Salzsäure)	Merck
Hefe-Extrakt	Difco
Iodacetamid	Fluka
IPG-Puffer pH 3-10	Amersham Biosciences
IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid)	Roth
Isopropanol	Merck

Kaliumchlorid (KCl)	Riedel de Haen
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Kaliumsulfat (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Fluka
Kupfersulfat (CuSO <sub>4</sub> )	Merck
Laurolyl-Sarkosyl	Sigma
Lithiumchlorid (LiCl)	Roth
2-Mercaptoethanol	Serva
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Fluka
Mangansulfat (MnSO <sub>4</sub> )	Roth
MES (2-[N-Morpholin]ethansulfonsäure)	Serva
Milchpulver	Roth
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck
Natriumcarbonat (NaCO <sub>3</sub> )	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Natriumglycerophosphat	Merck
Natrium-Orthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma
Natriumthiosulfat (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Merck
NBT (Nitrotetrazolium Blau)	Appli Chem
Paraffin	Merck
Pefabloc (Proteaseinhibitor)	Roth
Phenol	Roth
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma
Nucleotid-Primer	Roth
D(+)-Saccharose	Merck
Salzsäure (HCl)	Merck

SDS (Sodium dodecyl sulfate)	Sigma
Silbernitrat (AgNO <sub>3</sub> )	Roth
TEMED (N,N,N',N',-Tetramethylethylenamino-methan)	Roth
Thioharnstoff	Merck
Trichloressigsäure (TCA)	Roth
Triton X-100	Sigma
Tris base (Tris-hydroxymethyl-aminomethan)	Sigma
Tween 20 (Polyoxyethylen-(20)-Sorbitanmomolaurat)	Sigma
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid)	Gibco
Xylencyanol	Fluka
Zinksulfat (ZnSO <sub>4</sub> )	Merck

## 2.6 Online-Datenbanken und -Werkzeuge

<b>Basic Local Alignment Search Tool</b> (BLAST) Homologiedatenbank des National Center für Biotechnology Information (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
<b>PubMed</b> Literatur-Datenbank – NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed</a>
<b>EMBL</b> European Bioinformatics Institute	<a href="http://www.ebi.ac.uk">http://www.ebi.ac.uk</a>
<b>ClustalW</b> Programm zum Vergleich von Nucleotidsequenzen	<a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw/">http://www.ebi.ac.uk/clustalw/</a>
<b>Expasy</b> Expert Protein Analysis System	<a href="http://www.expasy.ch/">http://www.expasy.ch/</a>
<b>Elektronische Zeitschriftenbibliothek der</b>	<a href="http://rzblx1.uni-regensburg.de/ezeit">http://rzblx1.uni-regensburg.de/ezeit</a>

Universität Gießen	
<b>MultAlin</b> Programm zum Vergleich von Nucleotidsequenzen	<a href="http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html">http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html</a>
<b>NetPhos 2.0</b> Vorhersage von Phosphorylierungs- stellen, Center for Biological Sequence Analysis	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/</a>
<b>P-Type ATPase database</b>	<a href="http://www.patbase.kvl.dk/">http://www.patbase.kvl.dk/</a>
<b>Swiss-Prot and TrEMBL</b> Proteindatenbank	<a href="http://www.expasy.org/sprot/">http://www.expasy.org/sprot/</a>
<b>The TIGR Maize Database</b>	<a href="http://maize.tigr.org/">http://maize.tigr.org/</a>

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Anpassung von Mais an $H^+$ -Stress

Eine abrupte Senkung des Nährlösungs-pH-Wertes 7 d nach Überführung der Mais-Keimlinge in Hydrokultur führte zu einer starken Reduktion des Wurzelwachstums gegenüber der Kontrolle (Abb. 1b). Eine allmähliche Absenkung des pH-Wertes auf pH 3,5 durch tägliche Gaben von  $50 \mu M H^+$  in einem Zeitraum von 8 d resultierte hingegen in einer Anpassung der Maispflanzen an entsprechende  $H^+$ -Stress-Bedingungen (Abb. 1c). Die an  $H^+$ -Stress angepassten Maispflanzen werden in der Arbeit als Behandlung bezeichnet.

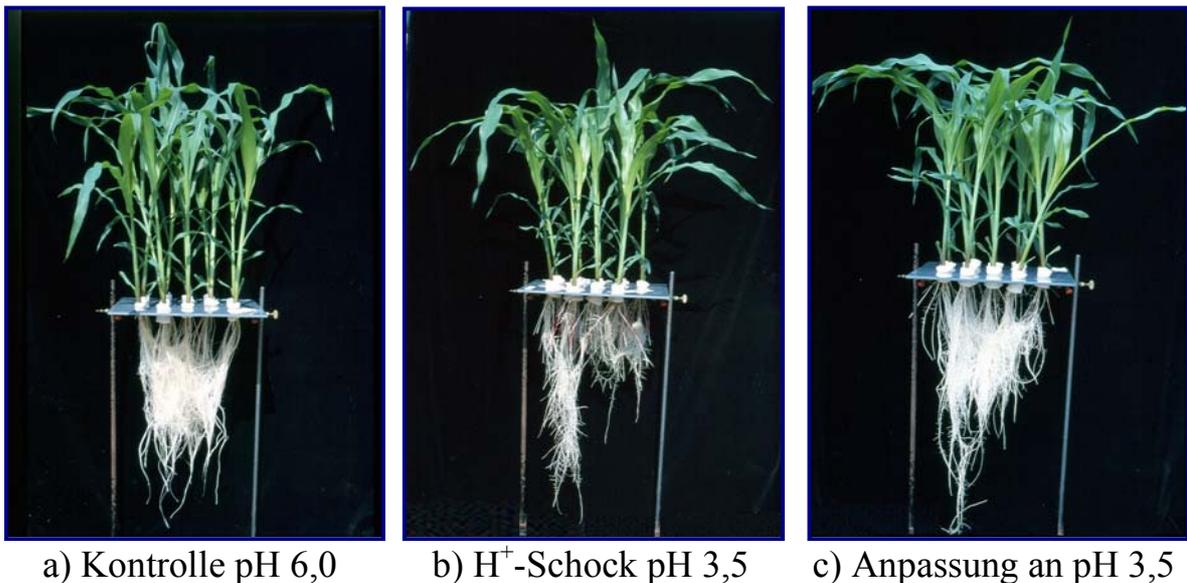


Abb. 1: Effekte eines  $H^+$ -Schocks bzw. einer Anpassung der Maispflanzen (cv. Blizzard) an einen pH-Wert von 3,5 auf das Wurzelwachstum im Verlaufe einer 19-tägigen Anzucht in Hydrokultur.

Wie aus Abbildung 1b) ersichtlich, ließen sich an den, im Vergleich zur Kontrolle länger und dicker ausgeprägten, Adventivwurzeln der  $H^+$ -Schock-

Pflanzen violette Verfärbungen im oberen Wurzelbereich feststellen. Die an pH 3,5 angepassten Maispflanzen der Sorte Blizzard zeigten keinen Unterschied in der Ausbildung der Seitenwurzeln im Vergleich zur Kontrolle. Die Adventivwurzeln hingegen waren stärker ausgeprägt als jene der Kontrollpflanzen, jedoch schwächer, als die der H<sup>+</sup>-Schock-Pflanzen. Auch hier ließen sich violette Verfärbungen im oberen Wurzelbereich der Adventivwurzeln feststellen.

## 3.2 RNA-Ebene

### 3.2.1 Identifizierung von Isoformen der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase

Die mittels Polymerase-Kettenreaktion gefundenen und amplifizierten Isoformen der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase aus *Zea mays* cv. Blizzard erhielten folgende Bezeichnung: *ZMATP C* bzw. *ZMATP T*. Hierbei steht *ZM* für die Pflanze *Zea mays*, *ATP* für das Enzym ATPase und die Buchstaben *C* (control) und *T* (treatment) stehen für die beiden Anzuchtvarianten Kontrolle und Anpassung an H<sup>+</sup>-Stress. In den unter Kontrollbedingungen (pH 6,0) angezogenen Maispflanzen konnten zwei (*ZMATP C1-2*) und in den unter H<sup>+</sup>-Stress-Bedingungen angezogenen Pflanzen konnten drei (*ZMATP T1-3*) Isoformen der H<sup>+</sup>-ATPase auf RNA-Ebene identifiziert werden (Abb. 2). Hierbei erhielten Isoformen, die sowohl in der Kontrollvariante als auch in der behandelten Variante identifiziert werden konnten, gleiche Nummerierungen.

Mittels PCR und anschließender Klonierung und Sequenzierung konnten nur Teilsequenzen der Isoformen der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase aus *Zea mays* cv. Blizzard identifiziert werden. Durch den Bezug auf einen in der Genbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) veröffentlichten mRNA-Volllängenklon, die in Mais vorkommende Isoform *Mha-2*, konnten die

Sequenzbereiche der in der Sorte Blizzard gefundenen Isoformen zueinander angeordnet werden (Abb. 2).

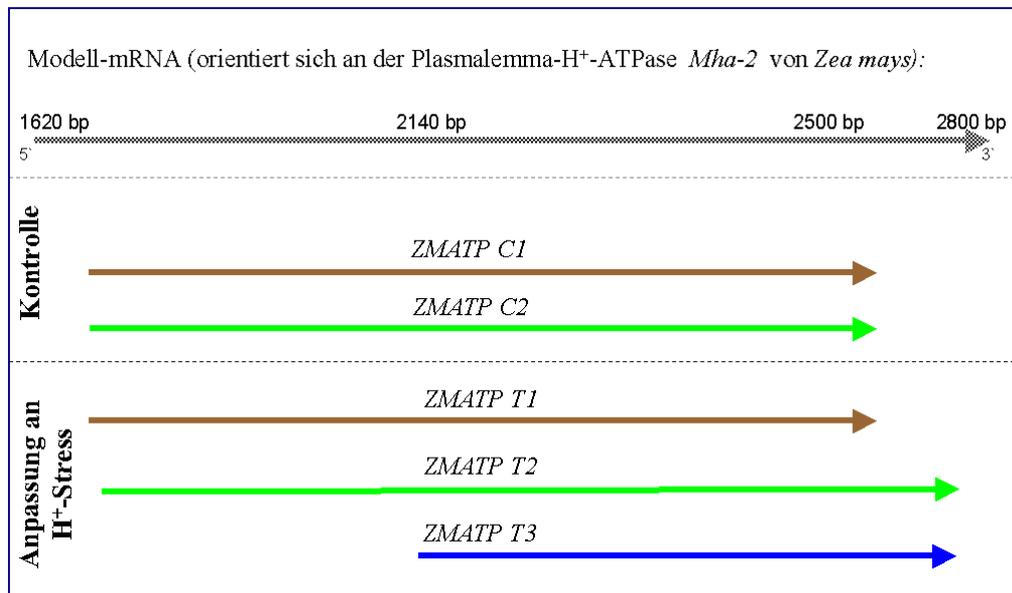


Abb. 2: Schematische Darstellung der in *Zea mays* cv. Blizzard identifizierten Isoformen der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase unter Kontroll- und unter H<sup>+</sup>-Stress-Bedingungen während der Pflanzenanzucht. Die erhaltenen Sequenzen sind zu der Isoform *Mha-2* (NCBI) von *Zea mays* in Bezug gesetzt.

Die beiden Isoformen *ZMATP C/T 1* und *ZMATP C/T 2* konnten mittels PCR im Plasmalemma beider Anzuchtvarianten detektiert werden, wohingegen die Isoform *ZMATP T3* nur in den an H<sup>+</sup>-Stress angepassten Wurzelzellen amplifiziert wurde. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei *ZMATP T3* um eine H<sup>+</sup>-Stress-spezifische Isoform handeln könnte.

### 3.2.2 Relative Transkription von Isoformen der H<sup>+</sup>-ATPase

Zur Untersuchung der Transkription von Isoformen der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase unter Kontroll- und unter H<sup>+</sup>-Stress-Bedingungen fanden sowohl isoformenspezifische Primer zu den in *Zea mays* cv. Blizzard gefundenen

Isoformen *ZMATP C/T 2* und *ZMATP C/T 3*, als auch ein für Mais familienspezifischer Primer gegen sämtliche Isoformen der  $H^+$ -ATPase (*Mha T/C*) Verwendung. Hierbei konnten nur die Isoformen *ZMATP C/T 2* und *ZMATP C/T 3* auf ihre Transkription in Kontrolle und Behandlung untersucht werden, da nur diese Isoformen in ihrer Basenabfolge deutlich voneinander und von der Isoform *ZMATP C/T 1* unterschiedliche Sequenzbereiche aufwiesen.

Unter Verwendung spezifischerer Primer gegen Isoformen der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase in Kontrolle und Behandlung, welche in vorangegangenen PCR-Versuchen identifiziert werden konnten, sollten erste Vermutungen bezüglich einer Transkription möglicher  $H^+$ -Stress-spezifischer Isoformen (*ZMATP T3*) überprüft werden.

Wie aus Abbildung 3 und 4 ersichtlich, stellen weder *ZMATP T2*, noch *ZMATP T3* Isoformen dar, die unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen einer signifikant verstärkten Transkription unterliegen. Die Vermutung, dass die Isoform *ZMATP T3* einer  $H^+$ -Stress-spezifischen Regulation unterliegen könnte, ließ sich durch diesen Versuch nicht bestätigen.

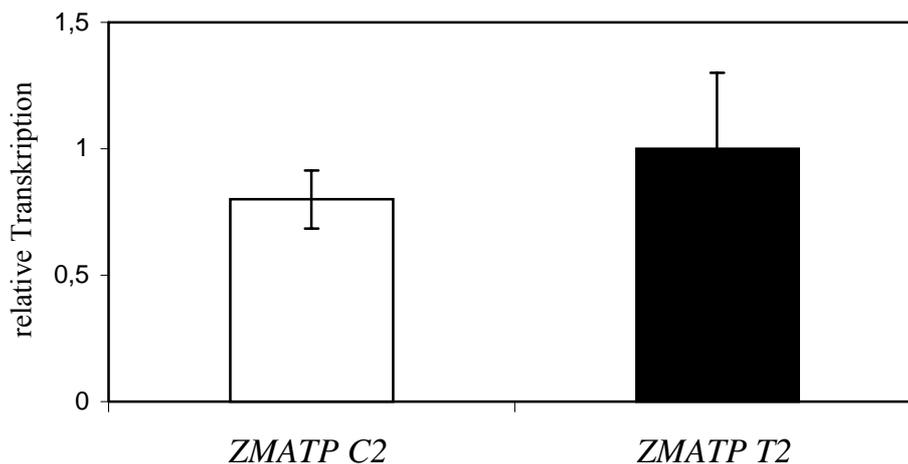


Abb. 3: Relative Transkription der Isoform *ZMATP C/T 2* der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase in *Zea mays* cv. Blizzard der Anzuchtvarianten Kontrolle und Anpassung an  $H^+$ -Stress bezogen auf das endogene Kontroll-Gen Aktin. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler über alle Messungen,  $n = 3$ .

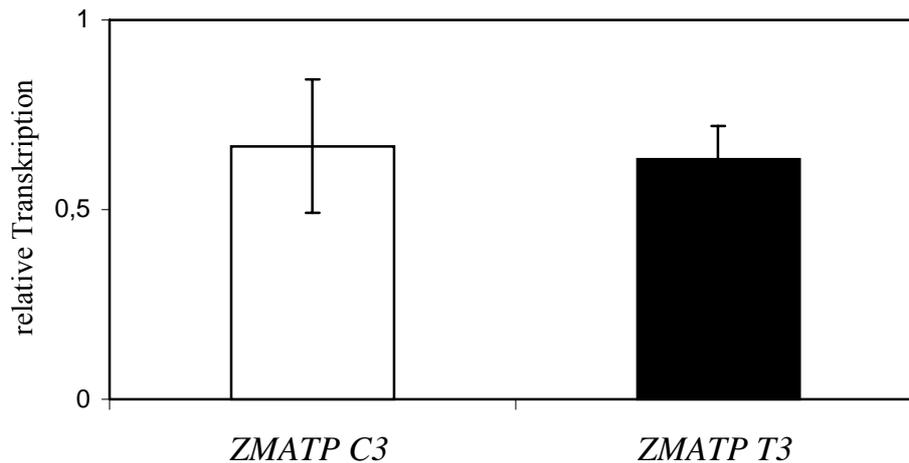


Abb. 4: Relative Transkription der Isoform *ZMATP C/T 3* der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase in *Zea mays* cv. Blizzard der Anzuchtvarianten Kontrolle und Anpassung an  $H^+$ -Stress bezogen auf das endogene Kontroll-Gen Aktin. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler über alle Messungen,  $n = 3$ .

Bei Untersuchung der Transkription sämtlicher Isoformen der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase unter Verwendung des familienspezifischen Primers zeigt sich ebenfalls kein signifikant erhöhter Wert bei dem unter  $H^+$ -Stress gebildetem Isoformen-Pool der  $H^+$ -ATPase (Abb. 5).

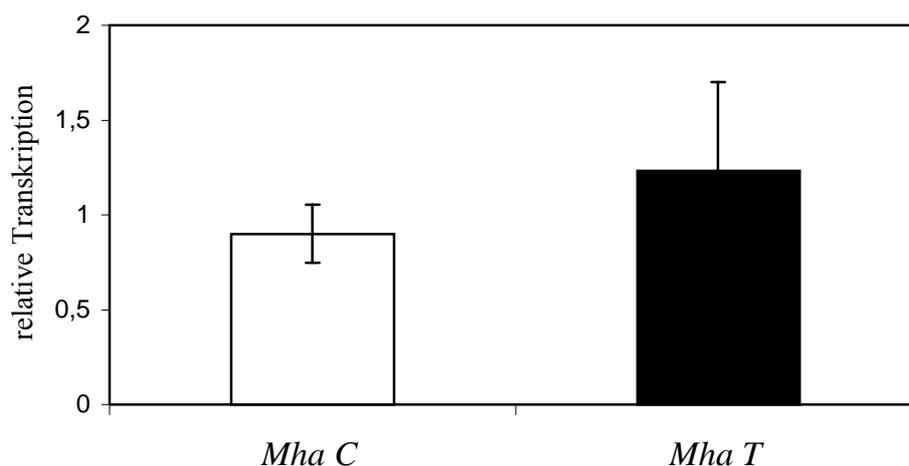


Abb. 5: Relative Transkription sämtlicher Isoformen der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase in *Zea mays* cv. Blizzard bezogen auf das endogene Kontroll-Gen Aktin. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler über alle Messungen,  $n = 3$ .

### 3.3 Proteinebene

#### 3.3.1 Immundetektion der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase

Die Menge an ATPase-Enzym im Plasmalemma von Kontroll- und H<sup>+</sup>-gestressten Maiswurzelzellen konnte mittels gelelektrophoretischer Größentrennung extrahierter Membranproteine und anschließender Immundetektion der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase bestimmt werden.

Bereits nach Auftrennung der Membranproteine in einem 10%igen Acrylamidgel und anschließender Anfärbung mit Silbernitrat ließ sich bei einer Größe von ca. 100 kDa eine distinkte Proteinbande identifizieren (Abb. 6). Die, in einem stark SDS- und DTT-haltigen Puffer, vorwiegend als Monomer vorliegende Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase weist ein Molekulargewicht in diesem Größenbereich auf (Palmgren, 2001).

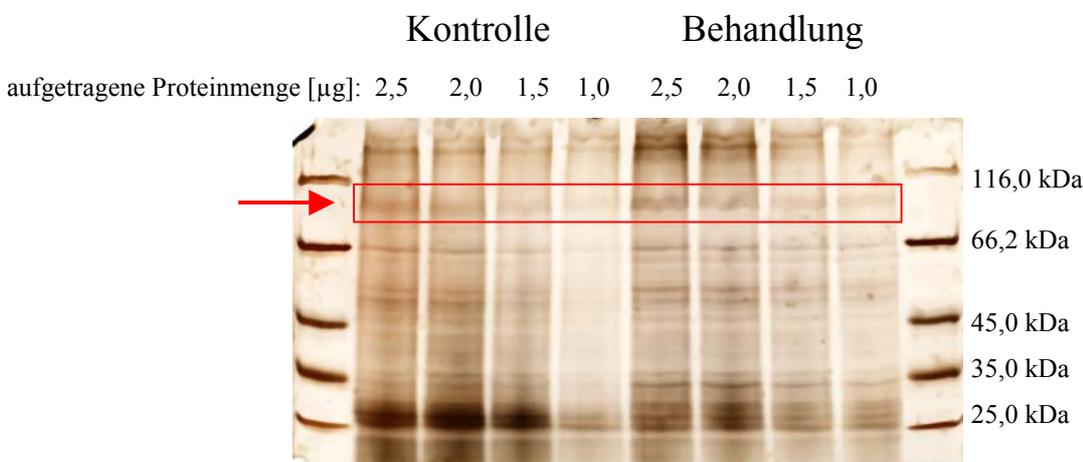


Abb. 6: Mittels 1-D-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennte Membranproteine von unter H<sup>+</sup>-Stress-Bedingungen (pH 3,5) und unter Kontrollbedingungen (pH 6,0) angezogenen Maispflanzen. Pro Anzuchtvariante wurden Proteinmengen von 1,0 bis 2,5 µg aufgetragen. Als Standard diente ein Proteinmarker der Firma Fermentas.

Rein visuell ließ sich in der Intensität der Proteinbande um 100 kDa bei dem Vergleich gleicher Proteinauftragsmengen zwischen den Anzuchtvarianten

Kontrolle und Anpassung an  $H^+$ -Stress kein Unterschied feststellen. Eine sensitivere und spezifischere Methode zur Identifizierung und Quantifizierung der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase im Membranproteingemisch stellt hingegen ihre Detektion mittels polyklonaler Antikörper dar (Abb.7).

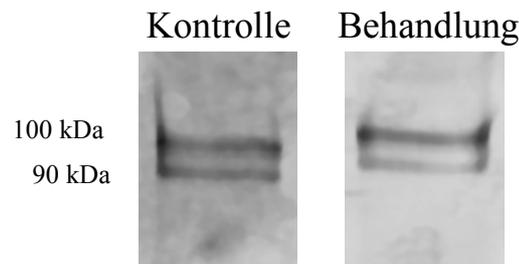
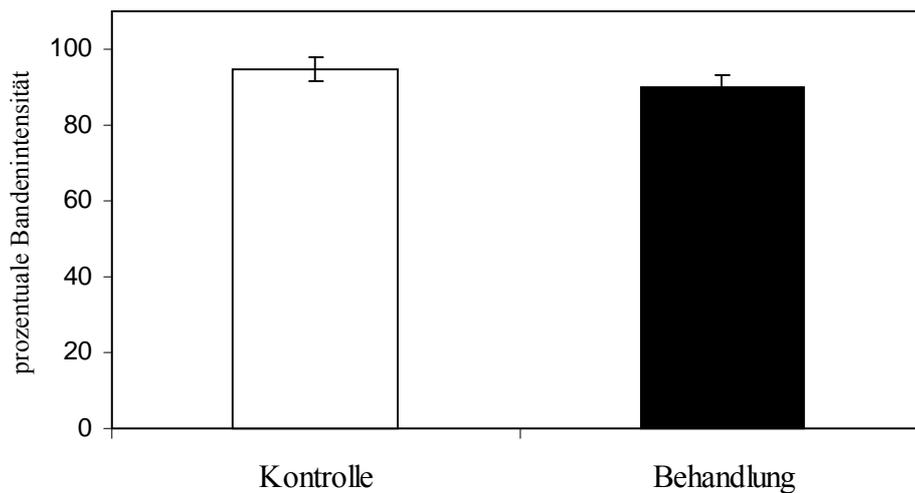


Abb. 7: Western Blot von aus Wurzeln isolierten Membranfraktionen der Anzuchtvarianten Kontrolle und Anpassung an  $H^+$ -Stress. Zur Immundetektion des ca. 100 kDa großen Monomers der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase fand ein polyklonaler Antikörper Verwendung. Die aufgetragene Proteinmenge betrug 2  $\mu$ g.

Die Immundetektion der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase resultierte in der Identifizierung zweier distinkter Banden pro Anzuchtvariante bei ca. 90 und ca. 100 kDa.

Abbildung 8 zeigt die prozentual ermittelten Intensitäten der ATPase-Banden von Kontroll- und  $H^+$ -gestressten Pflanzen. Diese spiegeln die Menge an gebildetem Enzymprotein wider. Abb. 8 a) verdeutlicht, dass die  $H^+$ -ATPase bei ca. 100 kDa keiner veränderten Proteinmenge unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen unterlegen ist. Demgegenüber steht die bei einem Molekulargewicht von 90 kDa identifizierte Bande (Abb. 8b), die unter Kontrollbedingungen eine um  $37\% \pm 0,8\%$  signifikant intensivere Proteinbande im Vergleich zur Behandlung aufweist.

a)



b)

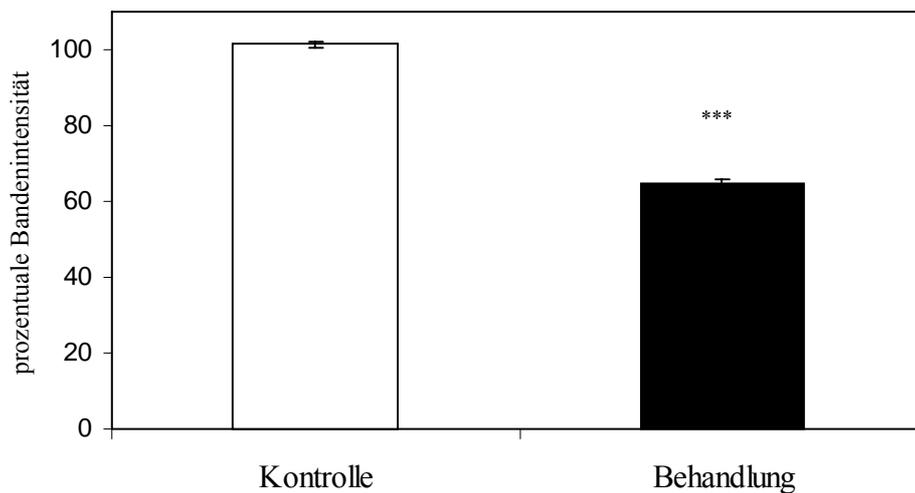


Abb. 8: Prozentuale Bandenintensitäten der mittels Immundetektion visualisierten Menge an ATPase-Enzym in Wurzelzellen von Kontrolle und Behandlung. Grafik a) bezieht sich auf die bei einer Molekülgröße von ca. 100 kDa und Grafik b) auf die bei einer Molekülgröße von ca. 90 kDa ermittelten Bandenintensitäten. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler über alle durchgeführten Western Blots,  $n = 3$ ; \* = signifikanter Unterschied,  $P \leq 0,1\%$ .

Nach Briskin und Reynolds-Niesman (1989) liegt die Plasmalemma- $H^+$ -ATPase unter physiologischen Bedingungen als Dimer mit einem Molekulargewicht von ca. 200 kDa vor. Dieses Dimer ließ sich, wie das Monomer, mittels

Immundetektion unter Verwendung des polyklonalen Antikörpers gegen den N-Terminus pflanzlicher  $H^+$ -ATPasen in der Membranproteinfraktion nachweisen und quantifizieren. Wie aus Abbildung 9 ersichtlich, weist das Dimer der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen eine intensivere Bande auf. Die Bandenintensität des an pH 3,5 angepassten Enzyms liegt signifikant um  $41\% \pm 4\%$  höher als die des unter Kontrollbedingungen untersuchten dimeren Proteins.

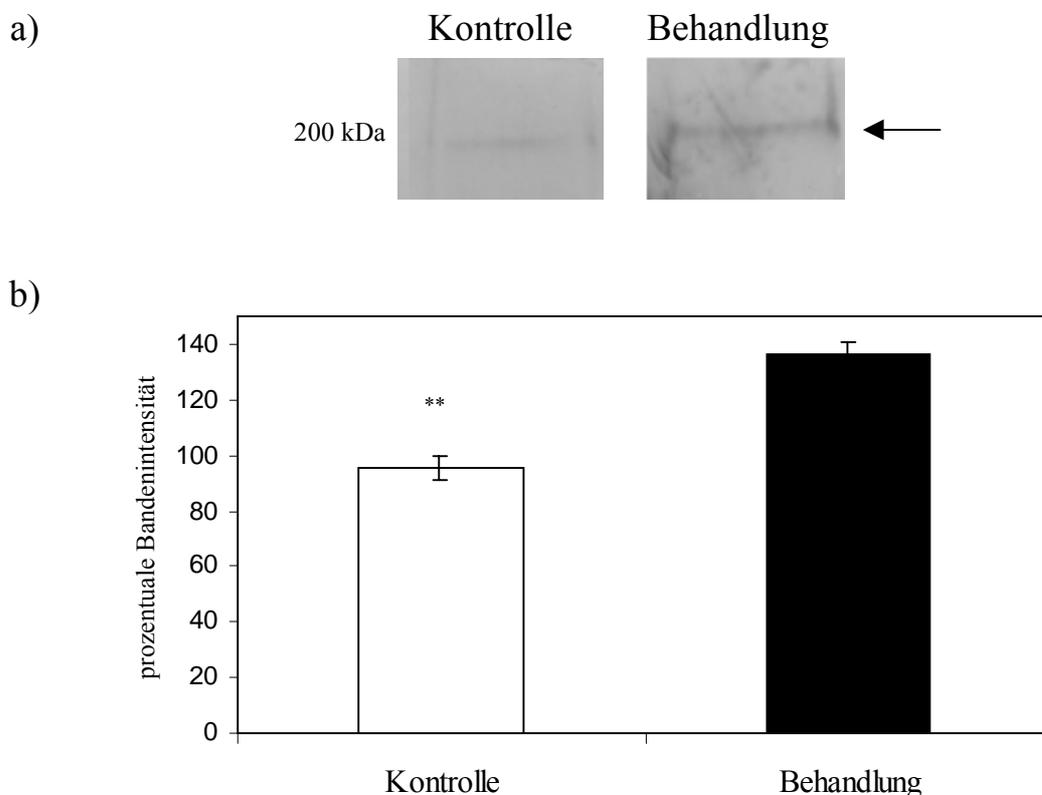


Abb. 9: Immundetektion des Dimers der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase. Zu a): Western Blot von aus Wurzeln isolierten Membranfraktionen der Anzuchtvarianten Kontrolle und Anpassung an  $H^+$ -Stress. Die aufgetragene Proteinmenge betrug 2  $\mu\text{g}$ . Zu b): Prozentuale Bandenintensitäten der mittels Immundetektion visualisierten Menge an ATPase-Dimer in Wurzelzellen von Kontrolle und Behandlung. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler über alle durchgeführten Western Blots,  $n = 3$ ; \* = signifikanter Unterschied,  $P \leq 1\%$ .

Proteindimere kommen durch die Bildung von intermolekularen Schwefelbrücken zustande. Diese können durch die Zugabe von Reduktionsmitteln zerstört werden. Die Membranproteinextraktion und die Lagerung der erhaltenen mikrosomalen Membranfraktionen beider Anzuchtvarianten erfolgte unter Verwendung reduktionsmittelhaltiger (10 bzw. 200 mM DTT) Puffer. Darüber hinaus enthielt der zum Lösen des nach der differentiellen Zentrifugation erhaltenen Membranpellets verwendete 1-D-Membranprotein-Probenpuffer das anionische Detergenz Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS), welches zu einer Denaturierung der extrahierten Proteine führte. Um mögliche Auswirkungen während der Membranproteinextraktion auf die quartäre Struktur der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase und somit eine unkontrollierte Bildung von ATPase-Monomer zu untersuchen, war es notwendig, extrahierte Membranproteine bis kurz vor ihrem Auftrag auf das eindimensionale SDS-Polyacrylamidgel in einem möglichst nativen, undenaturierten und unreduzierten Zustand zu halten. Zu diesem Zweck enthielt der anfangs zur Extraktion eingesetzte Homogenisationspuffer eine fünffach geringere Menge an DTT. Des Weiteren erfolgte ein Lösen des nach der differentiellen Zentrifugation erhaltenen Pellets in einem DTT- und SDS-freien Puffer. Eine halbe Stunde vor dem Auftrag der entsprechend isolierten Membranproteine der Anzuchtvarianten Kontrolle und Anpassung an  $H^+$ -Stress, wurden diese 1:2 mit 2x 1-D-Membranprotein-Probenpuffer versetzt. Zur Erhaltung unterschiedlicher Reduktionszustände der aufzutrennenden Proteine, enthielt dieser variierende Konzentrationen an Reduktionsmittel (DTT; 0 – 200 mM) und Detergenz (Triton X-100; 5%). Um eine vollständige Reduktion der extrahierten Membranproteine zu erreichen, wurde die 200 mM DTT und 5% Triton enthaltende Probe 5 min lang in einem Wasserbad gekocht.

Abbildung 10 zeigt das Ergebnis der nach der gelelektrophoretischen Proteintrennung durchgeführten Immundetektion der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase.

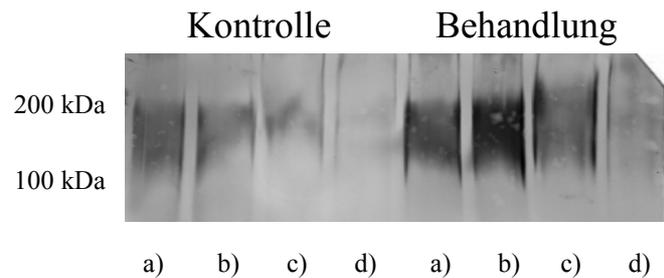


Abb. 10: Immundetektion der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase unter variierenden reduzierenden und denaturierenden Bedingungen. Die Behandlungen der Membransuspensionen der Anzuchtvarianten Kontrolle und Anpassung an  $H^+$ -Stress sahen folgendermaßen aus: a) 0 mM DTT, 0% Triton X-100; b) 20 mM DTT, 0% Triton X-100; c) 200 mM DTT, 0% Triton X-100; d) 200 mM DTT, 5% Triton X-100, fünfminütiges Kochen der Membransuspensionen. Die aufgetragene Proteinmenge betrug 2  $\mu$ g.

Auf dem Blot erkennt man eine dicke Bande, die sich über einen Molekulargewichtsbereich von ca. 200 kDa bis hin zu ca. 97 – 100 kDa erstreckt. Hierbei zeigen alle visualisierten Banden der unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen angezogenen Pflanzen eine intensivere Anfärbung als die der Kontrollpflanzen.

Mit zunehmender Behandlung der eingesetzten Membranproteinproben beider Anzuchtvarianten findet sich eine Abnahme in der Intensität der Banden. Diese Abnahme erstreckt sich über den gesamten Molekulargewichtsbereich von ca. 200 – 97 kDa.

Tabelle 2 zeigt die prozentualen Bandenintensitäten der mittels Immundetektion visualisierten Menge an ATPase-Molekül in den Wurzelzellen von Kontrolle und Behandlung unter variierenden reduzierenden und denaturierenden Bedingungen. Diese bestätigen eine Abnahme der Bandenintensitäten beider Anzuchtvarianten mit zunehmender Behandlung der eingesetzten Membranproteinproben. Hierbei ist bezogen auf die Behandlung der

Membransuspension eine verzögerte Abnahme der Bandenintensitäten in den an  $H^+$ -Stress angepassten Wurzelproben zu vermerken.

Tabelle 2: Prozentuale Bandenintensitäten der mittels Immundetektion visualisierten Menge an ATPase-Molekül in den Wurzelzellen der Anzuchtvarianten Kontrolle und Anpassung an  $H^+$ -Stress. Die jeweils von a) ermittelte Bandenintensität der mittels Immundetektion visualisierten Menge an ATPase-Molekül in Wurzelzellen von Kontrolle und Behandlung wurde gleich 100% gesetzt. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler über alle durchgeführten Western Blots,  $n = 2$ .

<b>Behandlung der Membransuspension</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>Behandlung</b>
a) 0 mM DTT, 0% Triton X-100	100%	100%
b) 20 mM DTT, 0% Triton X-100	76% $\pm$ 13%	102% $\pm$ 18%
c) 200 mM DTT, 0% Triton X-100	51% $\pm$ 10%	78% $\pm$ 11%
d) 200 mM DTT, 5% Triton X-100, Kochen der Membransuspension	26% $\pm$ 7%	37% $\pm$ 11%

### 3.3.2 Posttranslationale Modifikation der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase

Eine wichtige posttranslationale Modifikation der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase zur Regulation ihrer Aktivität stellt ihre durch Kinasen und Phosphatasen realisierte Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung dar. Die Immundetektion von phosphoryliertem Threonin an der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase beider Anzuchtvarianten sollte Einblick in den Einfluss posttranslatinaler Phosphorylierungen auf die Adaption von Mais an  $H^+$ -Stress bringen. Abbildung 11 zeigt den Phosphorylierungsstatus des Monomers der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase. Es besteht kein signifikanter Unterschied in der Intensität der mittels Immundetektion visualisierten Banden der unter Kontroll- und unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen angezogenen Maispflanzen.

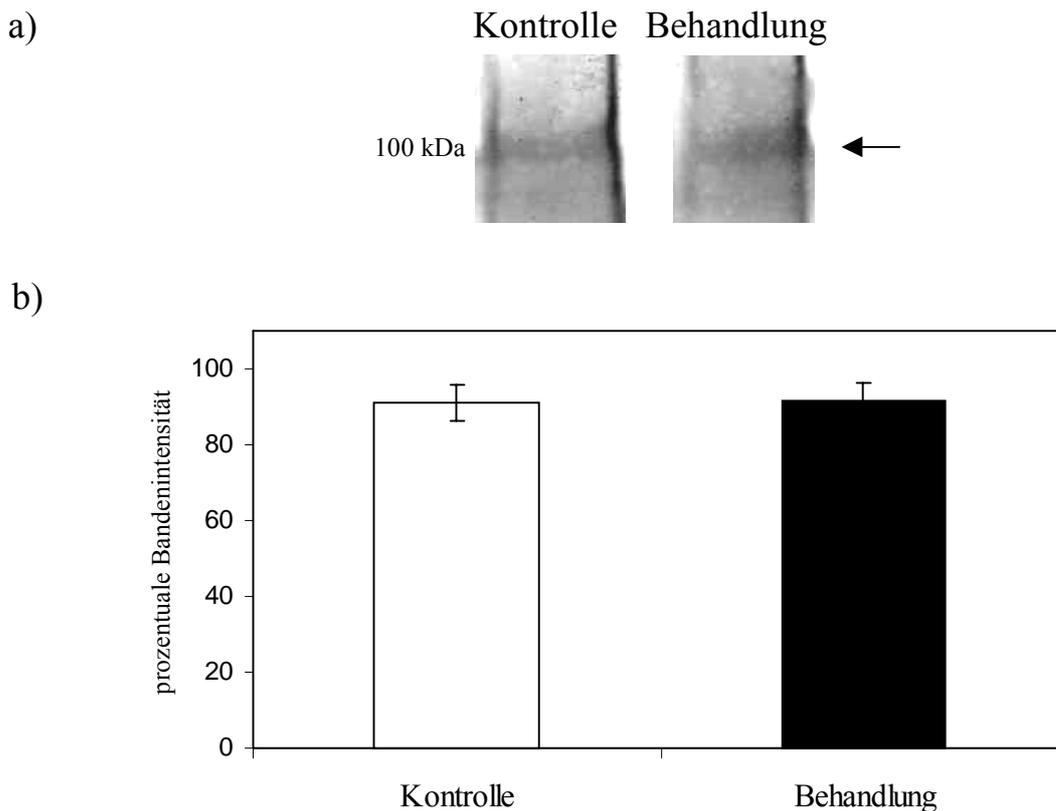


Abb. 11: Immundetektion des Phosphorylierungsstatus der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase. Zu a): Western Blot von aus Wurzeln isolierten Membranfraktionen beider Anzuchtvarianten. Die aufgetragene Proteinmenge betrug 8  $\mu$ g. Zu b): Prozentuale Bandenintensitäten des mittels Immundetektion visualisierten Phosphorylierungsstatus der  $H^+$ -ATPase in Wurzelzellen von Kontrolle und Behandlung. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler über alle durchgeführten Western Blots,  $n = 3$ .

Die Immundetektion des Phosphorylierungsstatus des Dimers der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase unter Kontroll- und unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen resultierte in der Visualisierung einer intensiver angefärbten Bande in der Membransuspension behandelter Pflanzen (Abb. 12a). Der Phosphorylierungsstatus des an pH 3,5 angepassten dimeren Enzyms liegt signifikant um 174%  $\pm$  16% höher als der des unter Kontrollbedingungen untersuchten Proteins (Abb. 12b).

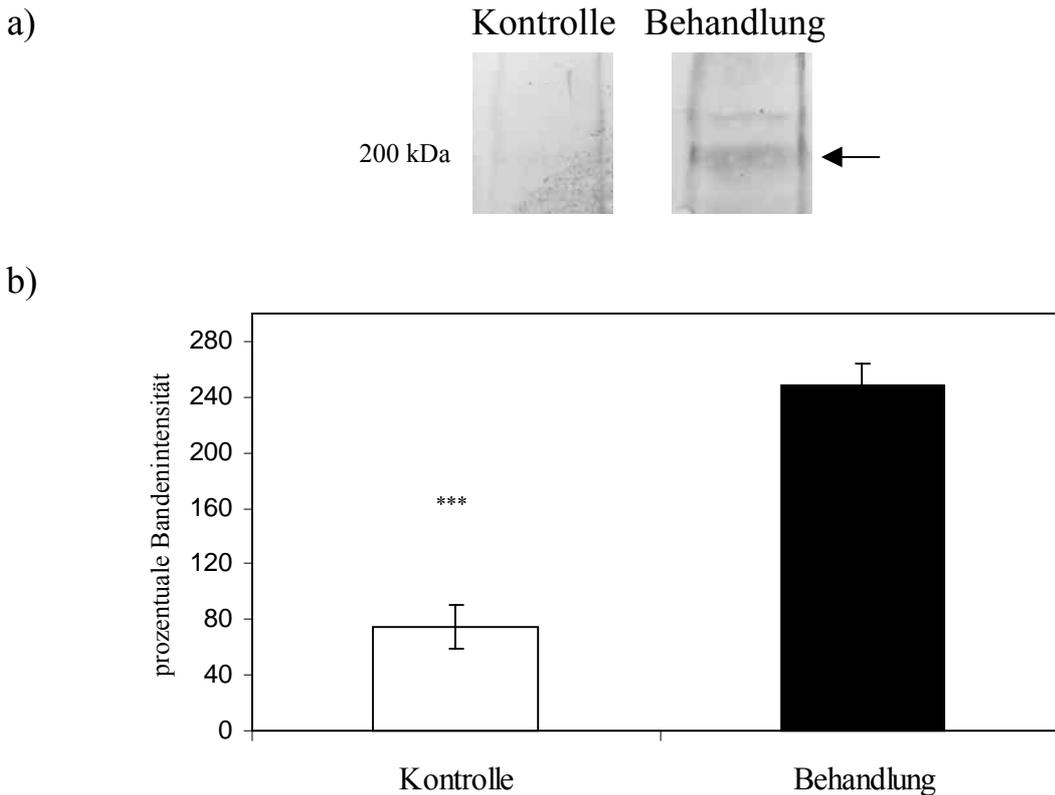


Abb. 12: Immundetektion des Phosphorylierungsstatus des Dimers der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase. Zu a): Western Blot von aus Wurzeln isolierten Membranfraktionen beider Anzuchtvarianten. Die aufgetragene Proteinmenge betrug  $8 \mu\text{g}$ . Zu b): Prozentuale Bandenintensitäten des mittels Immundetektion visualisierten Phosphorylierungsstatus des Dimers der  $H^+$ -ATPase in Wurzelzellen von Kontrolle und Behandlung. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler über alle durchgeführten Western Blots,  $n = 3$ ; \* = signifikanter Unterschied,  $P = 0,1\%$ .

Nicht nur eine Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase zur Regulation ihrer Aktivität ist denkbar, sondern ebenfalls eine kovalente Modifikation anderer, die Aktivität der  $H^+$ -ATPase beeinflussender, Proteine (Palmgren, 1991). Aus diesem Grund ist es sinnvoll, das gesamte Phosphorylierungsmuster des Threonins aller auf dem eindimensionalen SDS-Gel aufgetrennten Proteine zu untersuchen (Abb. 13).

Beim Vergleich des Phosphorylierungsmusters der Aminosäure Threonin der nach ihrer Größe aufgetrennten Membranproteine von Kontrolle und

Behandlung zeigten sich deutliche Unterschiede. Bei Größen von ca. 220 kDa, 120 kDa, und 80 kDa sind nur Banden in den unter  $H^+$ -Stress gebildeten und modifizierten Proteinen zu finden. Wohingegen bei ca. 75 kDa nur in der Kontrollvariante eine Phosphorylierung der betreffenden Proteine nachweisbar ist.

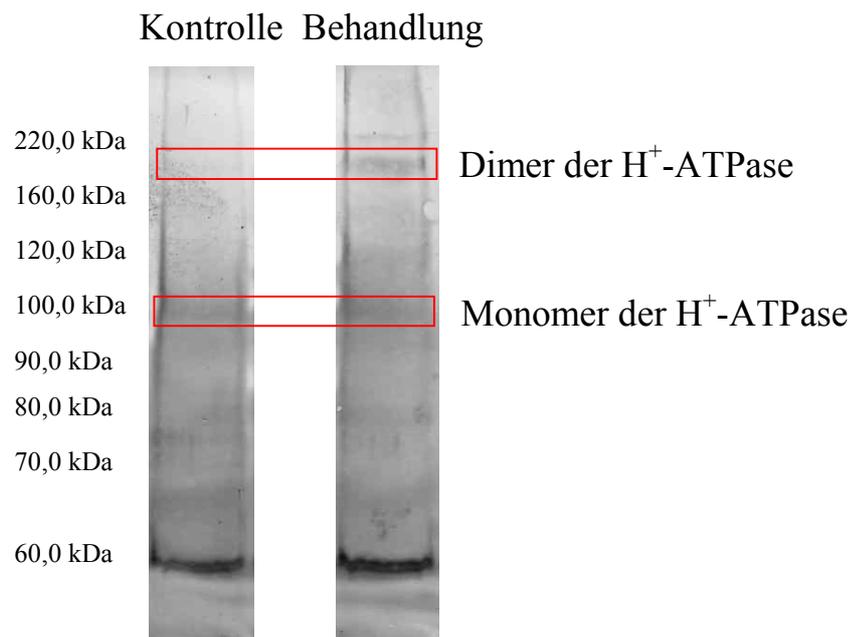


Abb. 13: Immundetektion des Phosphorylierungsstatus der Aminosäure Threonin von aus Wurzeln (*Zea mays* cv. Blizzard) isolierten Membranproteinen der Anzuchtvarianten Kontrolle und Anpassung an  $H^+$ -Stress. Die aufgetragene Proteinmenge betrug 8  $\mu$ g.

### 3.3.3 Einfluss von $H^+$ -Stress auf das Proteinmuster der Zelle

Zur Untersuchung des Einflusses von  $H^+$ -Stress auf das Gesamtproteinmuster von Maispflanzen wurde das aus Wurzeln extrahierte Gesamtprotein beider Anzuchtvarianten mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt und miteinander verglichen.

Die mittels Coomassie R-350 angefärbten Gesamtproteinspots liegen mit ihrem isoelektrischen Punkt in einem pH-Bereich von 5 – 8 (Abb. 14). Das

Molekulargewicht der Spots verteilt sich hauptsächlich auf einen Größenbereich von 20 – 100 kDa. Unterhalb einer Größe von 20 kDa hat sich die Spottedichte beider Anzuchtvarianten deutlich verringert.

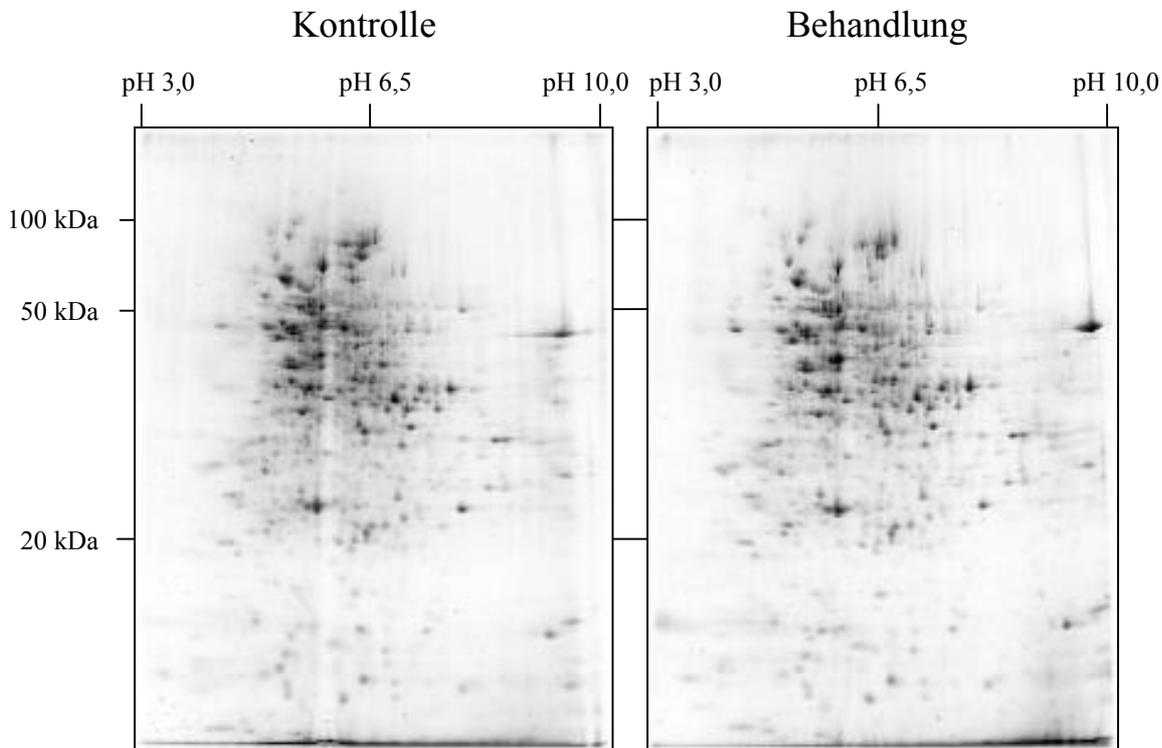


Abb. 14: Mittels 2-D-Gelelektrophorese nach ihrem isoelektrischen Punkt und ihrer Größe aufgetrennte Gesamtproteinfraktion von unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen (pH 3,5) und unter Kontrollbedingungen (pH 6,0) angezogenen Maispflanzen. Pro Gelvariante wurden Proteinmengen von 150  $\mu$ g aufgetragen.

Die Auswertung der 2-D-Gele des Gesamtproteins erfolgte mit dem Bildverarbeitungsprogramm Delta2D der Firma Decodon. Dieses Programm ist in der Lage, Proteinspots zu erkennen, zu quantifizieren und die Spots bezüglich ihrer Intensität auf dem Gel zu charakterisieren. Pro Anzuchtvariante flossen drei biologische mit je zwei chemischen Wiederholungen in die Auswertung der erhaltenen 2-D-Gele ein. Durch Übereinanderlegen der fusionierten Kontrollgele (pH 6,0) mit den fusionierten Behandlungsgelen (pH 3,5) und Setzen

spezifischer Filter konnten die unter  $H^+$ -Stress differentiell regulierten Proteine identifiziert werden (Abb. 15). Hierbei wurden diejenigen Proteinspots aus der Auswertung herausgenommen, die in den 2-D-Gelen beider Anzuchtvarianten bei gleichem isoelektrischem Punkt und gleichem Molekulargewicht in gleicher Intensität vorkamen.

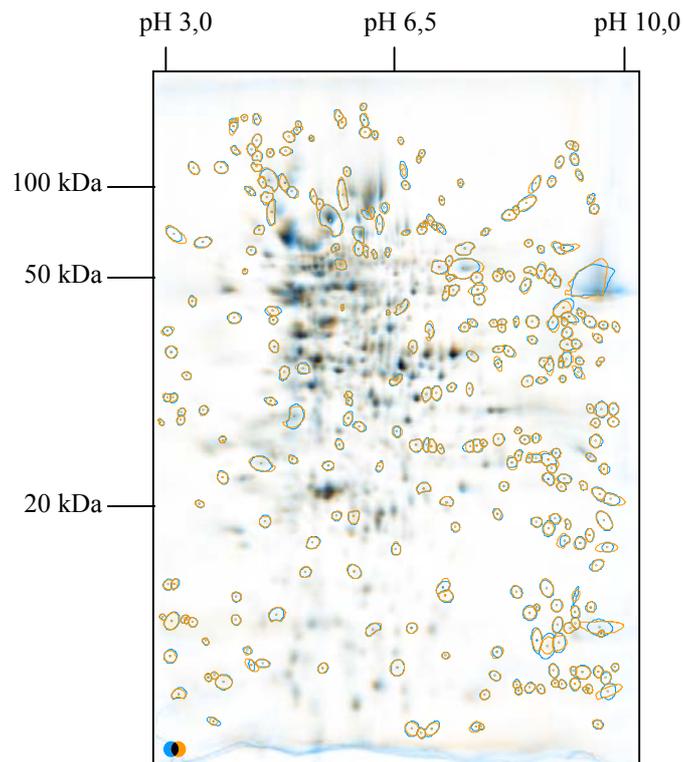


Abb. 15: Übereinanderlagerung fusionierter Kontrollgele (pH 6; blau markiert) mit fusionierten Behandlungsgelen (pH 3,5; orange markiert). Die unter  $H^+$ -Stress differentiell regulierten Proteine sind markiert.

Nach Quantifizierung der unter  $H^+$ -Stress differentiell regulierten Proteinspots lassen sich Aussagen über die Menge an neu erschienenen, verschwundenen und verstärkt bzw. vermindert identifizierten Proteine im Vergleich zur Kontrolle machen (Tab. 3). Hierbei berücksichtigte der gesetzte Filter nur jene Spots, die mindestens um die Hälfte vermindert wurden bzw. mindestens um das Doppelte verstärkt aufgetreten sind.

Die Gesamtanzahl der auf dem übereinandergelagerten Anzuchtvariantengel insgesamt detektierten Gesamtproteinspots liegt bei 800. Dieser Wert wurde für die Berechnungen prozentualer Veränderungen unter  $H^+$ -Stress als Bezugsbasis genommen.

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, führt eine Anzucht von Maispflanzen unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen zu einer Gesamtveränderung der Proteinspots von 38% im Vergleich zu den unter Kontrollbedingungen angezogenen Pflanzen. 63% der Proteine bleiben durch eine Pflanzenanzucht unter sauren Bedingungen unbeeinflusst. Hauptsächlich wirkt sich der  $H^+$ -Stress auf ein verstärktes bzw. vermindertes Auftreten von ebenfalls in den Kontrollpflanzen vorhandenen Proteinen aus. Jeweils 3% der Proteine unterliegen unter sauren Anzuchtbedingungen einer Neusynthese bzw. einer ausbleibenden Synthese.

Tabelle 3: Prozentuale Auflistung der unter  $H^+$ -Stress differentiell regulierten Gesamtproteine in Bezug zur Kontrolle. Die Summe detektierter Gesamtproteinspots liegt bei 800.

<b>Art der Veränderung</b>	<b>Gelvergleich</b>
	<b>Kontrolle / Behandlung</b>
Neu erschienen	3%
Verschwunden	3%
Verstärkt	18%
Vermindert	14%
<b>Gesamtveränderung</b>	<b>38%</b>

### 3.3.4 Einfluss von $H^+$ -Stress auf das Proteinmuster der mikrosomalen Membranfraktion

Das mittels 2-D-gelelektrophoretischer Trennung erhaltene Gesamtproteinmuster der Zelle zeigt eine unübersichtliche Anzahl detektierter Spots. Zum Herausfiltern interessanter Proteinspots bietet sich die Protein-Analyse subzellulärer Kompartimente an. Die Plasmamembran nimmt eine Schlüsselstellung in der Signaltransduktion der Zelle ein. Unter variierenden Anzuchtbedingungen von Pflanzen lassen sich demzufolge gravierende Veränderungen im Proteinmuster vermuten.

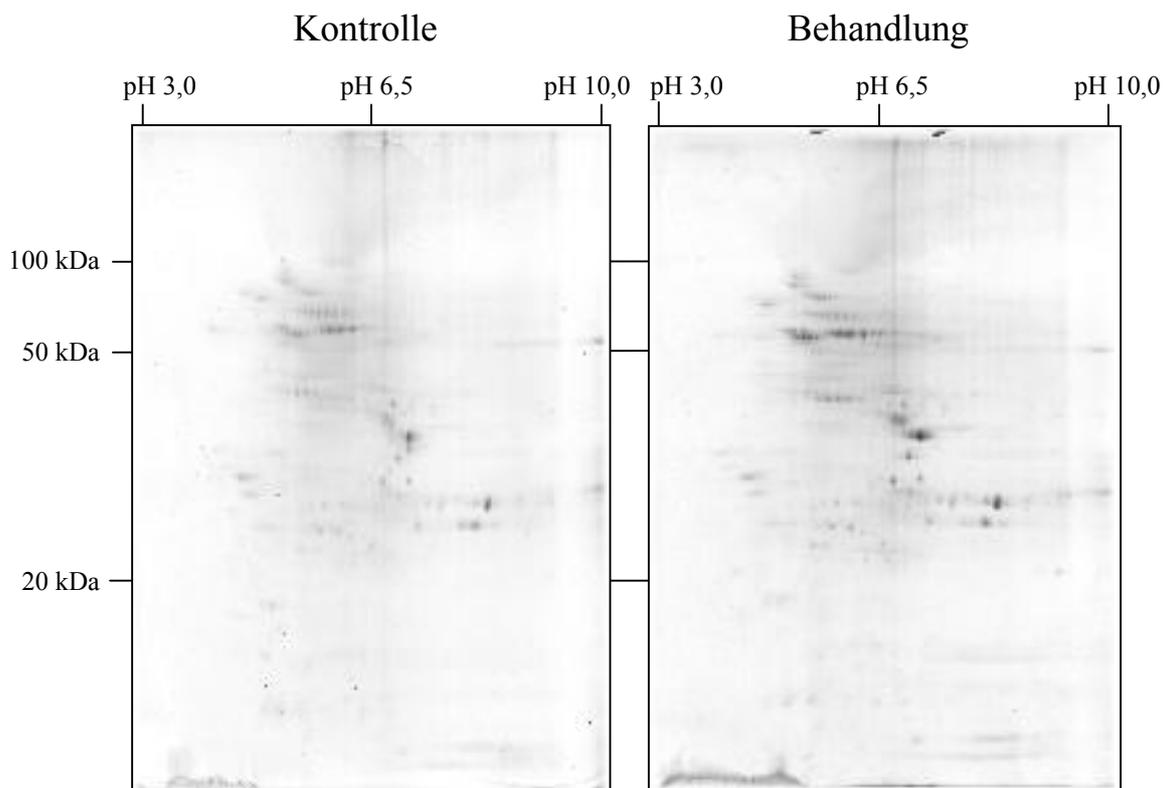


Abb. 16: Mittels 2-D-Gelelektrophorese nach ihrem isoelektrischen Punkt und ihrer Größe aufgetrennte Membranproteinfraction von unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen (pH 3,5) und unter Kontrollbedingungen (pH 6,0) angezogenen Pflanzen. Die aufgetragene Proteinmenge je Gel betrug 150  $\mu$ g.

Abbildung 16 zeigt das Proteinmuster der aus Maiswurzelzellen extrahierten mikrosomalen Membranfraktion von unter Kontroll- und unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen angezogenen Pflanzen. Die Membranproteinspots liegen mit ihrem isoelektrischen Punkt in einem pH-Bereich von 4,0 – 8,5. Das Molekulargewicht der Spots verteilt sich hauptsächlich auf einen Größenbereich von 25 – 90 kDa.

In die Auswertung der Membranprotein 2-D-Gele flossen pro Anzuchtvariante drei biologische mit je zwei chemischen Wiederholungen ein. Durch Übereinanderlegen der fusionierten Kontrollgele (pH 6,0) mit den fusionierten Behandlungsgelen (pH 3,5) und Setzen spezifischer Filter konnten, wie unter Kapitel 3.3.3 beschrieben, die unter  $H^+$ -Stress differentiell regulierten Proteine identifiziert werden (Abb. 17).

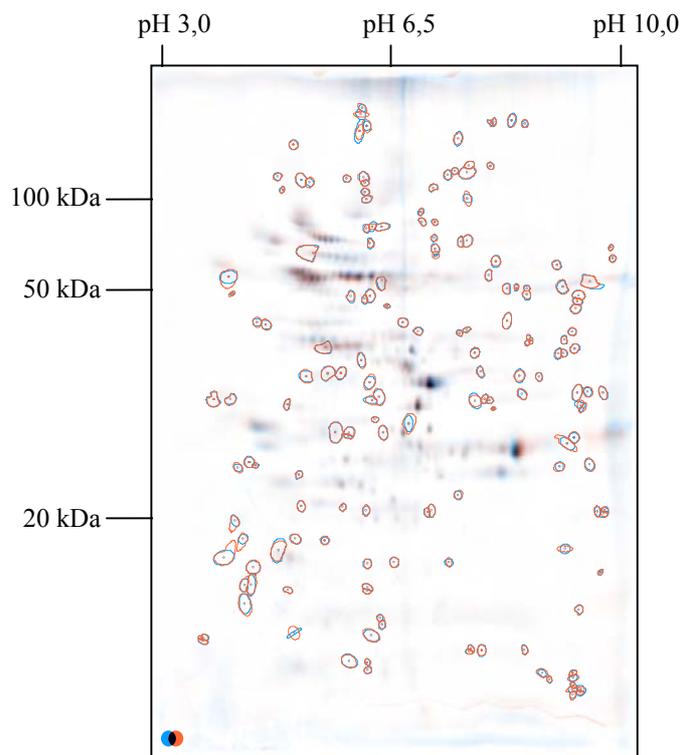


Abb. 17: Übereinanderlagerung fusionierter Kontrollgele (pH 6,0; blau markiert) mit fusionierten Behandlungsgelen (pH 3,5; orange markiert). Die unter  $H^+$ -Stress differentiell regulierten Proteine sind markiert.

Quantifizierung der unter  $H^+$ -Stress differentiell identifizierten Membranproteinspots ergaben die in Tabelle 4 angegebenen Werte.

Die Gesamtanzahl an Membranproteinspots auf dem übereinandergelagerten Anzuchtvariantengel liegt mit 451 detektierten Spots deutlich unter der Gesamtanzahl an detektierten Gesamtproteinspots. Trotz allem ergaben sich ähnliche prozentuale Veränderungen der unter  $H^+$ -Stress gebildeten Gesamt- und Membranproteine. Wie aus Tabelle 4 ersichtlich, führt eine Anzucht von Maispflanzen unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen zu einer Gesamtveränderung der Membranproteinspots von ca. einem Drittel im Vergleich zu den unter Kontrollbedingungen angezogenen Pflanzen. Zwei Drittel der Proteine bleiben durch eine Pflanzenanzucht unter sauren Bedingungen unbeeinflusst. Hauptsächlich bewirkt der  $H^+$ -Stress eine Erhöhung bzw. Reduktion von ebenfalls in den Kontrollpflanzen auftretenden Proteinen. Jeweils 2 – 3% der Membranproteine unterliegen unter sauren Anzuchtbedingungen einer Neusynthese bzw. einer ausbleibenden Synthese.

Tabelle 4: Prozentuale Auflistung der unter  $H^+$ -Stress differentiell regulierten Membranproteine in Bezug zur Kontrolle. Die Summe detektierter Membranproteinspots liegt bei 451.

<b>Art der Veränderung</b>	<b>Gelvergleich</b>
	<b>Kontrolle / Behandlung</b>
Neu erschienen	2%
Verschwunden	3%
Verstärkt	15%
Vermindert	16%
<b>Gesamtveränderung</b>	<b>36%</b>

### 3.3.5 Identifizierung von Membranproteinen

Zur Identifizierung einiger unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen gebildeter Membranproteine wurden entsprechende Proteinspots aus dem Behandlungsgel ausgeschnitten und mittels massenspektrometrischer Verfahren (Maldi-TOF) analysiert. Dabei wurden, zur Charakterisierung der isolierten mikrosomalen Membranfraktion, sowohl anzuchtindifferente als auch unter  $H^+$ -Stress differentiell regulierte Proteinspots untersucht. Diese Spotidentifizierung wurde vom Institut für Biochemie, Kliniken der Universität Köln, durchgeführt.

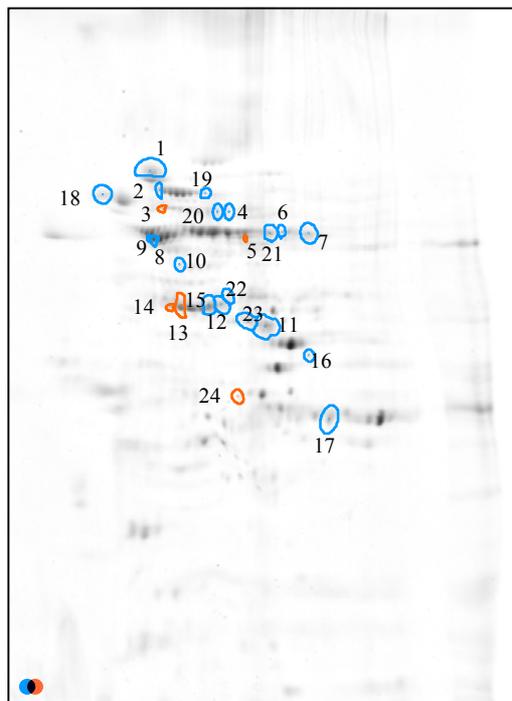


Abb. 18: 2-D-gelelektrophoretisch aufgetrennte Membranproteinsuspension von unter  $H^+$ -Stress angezogenen Maispflanzen. Hervorgehoben sind die mittels Maldi-TOF analysierten Proteinspots. Blau markierte Spots stellen anzuchtindifferente Proteine und orangefarben markierte Spots stellen unter  $H^+$ -Stress spezifisch regulierte Proteine dar.

Tabelle 5 und 6 zeigen die, zu den in Abbildung 18 markierten Proteinspots, massenspektrometrisch identifizierten Proteine. Hierbei sind in Tab. 5 nur die

unter H<sup>+</sup>-Stress differentiell identifizierten Proteine aufgelistet. Ein verstärktes bzw. vermindertes Auftreten entsprechender Proteine ist in der dritten Spalte vermerkt. Tab. 6 zeigt die durch die Pflanzenanzucht unbeeinflusst gebildeten Proteine im Behandlungsgel.

Tabelle 5: Auflistung der mittels Maldi-TOF analysierten und unter H<sup>+</sup>-Stress differentiell gebildeten Proteinspots.

<b>Spot-Nr.</b>	<b>Protein</b>	<b>Art der Veränderung</b>
3	chaperonin 60	verstärktes Auftreten
5	hypothetical protein	verstärktes Auftreten
13	glutamine synthetase root isozyme 5	verstärktes Auftreten
14	glutamine synthetase root isozyme 5	verstärktes Auftreten
24	prohibitin	verstärktes Auftreten

Tabelle 6: Auflistung der mittels Maldi-TOF analysierten und anzuchtindifferent gebildeten Proteinspots.

<b>Spot-Nr.</b>	<b>Protein</b>
1	luminal binding protein 2 precursor
2	V-ATPase A subunit
4	phox domain-containing protein-like
6	expressed protein
7	catalase isozyme 1
8	F1-ATP synthase, beta subunit
9	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor
10	eukaryotic initiation factor 4A
11	GTPase activating protein
12	glutamine synthetase
15	protein disulfide isomerase

16	annexin p35
17	voltage-dependent anion channel protein 1a
18	protein disulfide isomerase
19	unknown protein
20	chain b of the maize Zm-P60.1 beta-glucosidase
21	ribosomal protein
22	protein disulfide isomerase
23	maturase

### 3.3.6 Immundetektion der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase in 2-D-Gelen

Die Immundetektion der H<sup>+</sup>-ATPase in nach ihrer Größe aufgetrennten Membranproteinsuspensionen resultierte in der Visualisierung distinkter Banden. Eine zusätzliche Trennung der Membranproteine nach ihrem isoelektrischen Punkt bietet eine höhere Auflösung des aufzutrennenden Proteingemisches und somit die Möglichkeit, Isoformen oder posttranslationale Modifikationen der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase auf der Proteinebene zu identifizieren.

Der in Abbildung 19 dargestellte Western Blot stellt einen Ausschnitt der in einem pH-Bereich von 3-10 auf einer Länge von 18 cm aufgetrennten Membranproteine dar. Der pH-Gradient verläuft nicht linear über den gesamten IPG-Strip verteilt, sondern ist in einem Bereich von pH 4,5 – 6,5 gestreckt. Dies bringt den Vorteil, dass Proteine, die mit ihrem isoelektrischen Punkt in diesem pH-Bereich liegen, einer besseren isoelektrischen Auftrennung unterliegen. Die aus Kontrollwurzeln isolierte Membranfraktion zeigte in einem Größenbereich von ca. 90 – 100 kDa eine auf einen pH-Bereich von ca. 5,4 bis ca. 5,9 begrenzte Aufeinanderfolge von Spots. Die Membranfraktion der H<sup>+</sup>-gestressten Wurzeln lieferte ein Signal, welches sich über einen Größenbereich von ca. 85 –

120 kDa erstreckte. Hierbei wurde ein pH-Bereich von ca. 5,0 bis ca. 5,7 abgedeckt.

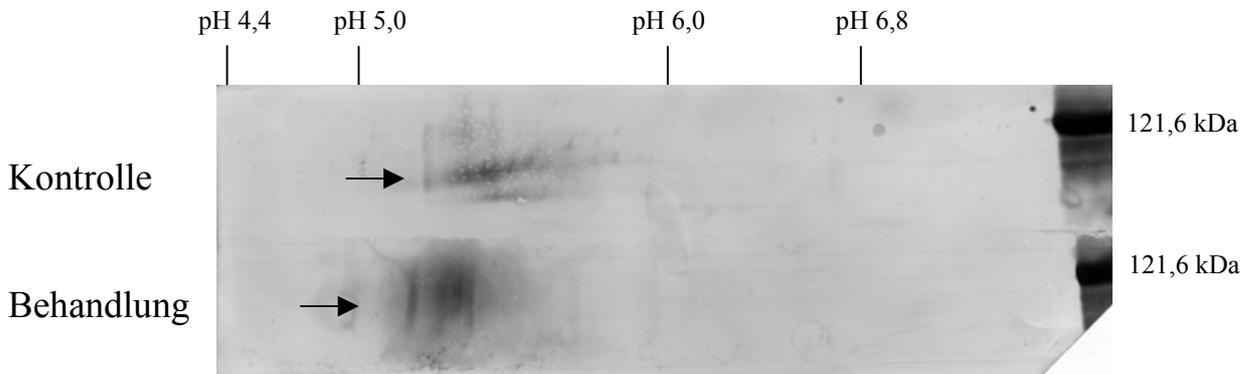


Abb. 19: 2-D-Western Blot von aus Wurzeln isolierten Membranfraktionen der Anzuchtvarianten Kontrolle und Anpassung an  $H^+$ -Stress. Zur Immundetektion des ca. 100 kDa großen Monomers der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase fand ein polyklonaler Antikörper Verwendung. Die aufgetragene Proteinmenge betrug 100  $\mu$ g. Für die isoelektrische Fokussierung fanden 18 cm lange nonlineare IPG-Strips pH 3-10 (Amersham Biosciences) Verwendung.

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodik der Identifizierung der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase auf mRNA- und auf Proteinebene

#### 4.1.1 Identifizierung der H<sup>+</sup>-ATPase auf mRNA-Ebene

Die Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase wird als P-Typ-ATPase klassifiziert, da sie während der katalytischen Reaktion ein phosphoryliertes Zwischenprodukt bildet (s. Kapitel 1.2) (Palmgren, 2001). Die Familie der P-Typ-ATPasen, welche für den aktiven Transport von geladenen Molekülen über Zellmembranen verantwortlich ist, lässt sich je nach Substratspezifität in fünf Untergruppen einteilen (Axelsen und Palmgren, 1998; Briskin und Poole, 1983; Lutsenko und Kaplan, 1995). Molekulare Untersuchungen ergaben, dass die zur Untergruppe IIIA gehörenden Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPasen in Pflanzen durch eine Multigenfamilie repräsentiert werden (Axelsen und Palmgren, 1998, 2001; Sussman, 1994). Diese lässt sich wiederum in fünf Unterfamilien, unabhängig von der Pflanzenart, untergliedern (Palmgren, 2001). Die Expression individueller Isoformen kann zell- bzw. gewebespezifisch erfolgen und von den Umweltbedingungen abhängen, die auf die Pflanze wirken (Michelet und Boutry, 1995; Moriau et al., 1999; Santi et al., 2003).

Bislang konnten fünf Isoformen der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase in *Zea mays* L. identifiziert werden: *Mha-1* (Jin und Bennetzen, 1994), *Mha-2* (Frias et al., 1996), *Mha-3*, *Mha-4* (Santi et al., 2003) und die Isoform mit der Accession-Nummer AF480431 (NCBI) (Kaplinski et al., 2002). Die in der Genbank veröffentlichten Isoformen *Mha-1* und *Mha-2* stellen DNA- bzw. mRNA-Vollängklone dar, wohingegen die Sequenzen der übrigen Isoformen bisher nur partiell identifiziert werden konnten. Während die ATPase-Isoform *Mha-1* nur schwach in Wurzeln und anderen Geweben exprimiert wurde (Jin und

Bennetzen, 1994), zeigte die Isoform *Mha-2* eine über sämtliche Gewebe verteilte Expression (Frias et al., 1996). Dem *Mha-2*-ATPase-Gen wurde die Eigenschaft der hauptexprimierten Isoform der Protonenpumpe in Mais zugesprochen (Frias et al., 1996).

Die in der Genbank nur als partielle Sequenzen vorliegenden Isoformen *Mha-3* und *Mha-4* reagierten nach Santi et al. (2003) auf eine während der Maisanzucht angebotene Nitraternahrung. Hierbei zeigten beide Isoformen eine in den Wurzeln verstärkte, jedoch voneinander abweichende, Genexpression als Antwort auf eine veränderte Ernährungssituation. Die in der Genbank veröffentlichte Isoform der  $H^+$ -ATPase mit der Accession-Nummer AF480431 stellt eine partielle Sequenz genomischer DNA dar und beinhaltet somit sämtliche bisher identifizierten Exons und Introns. Mais ist bisher noch nicht komplett durchsequenziert, weshalb sich weitere, eventuell  $H^+$ -Stress-spezifische, Isoformen der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase nur vermuten lassen. *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa*, beides Pflanzen, deren Genom durchsequenziert ist, weisen 11 bzw. 10 verschiedene Isoformen der  $H^+$ -ATPase auf (Baxter et al., 2003). Das Vorhandensein so vieler Isoformen kann durch die Tatsache erklärt werden, dass Pflanzen der Expression unterschiedlichster Qualitäten und Quantitäten an ATPase-Enzym in den unterschiedlichsten Geweben bedürfen (Baxter et al., 2003).

Zur Identifizierung von Isoformen der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase in *Zea mays* cv. Blizzard fanden sowohl den Isoformen *Mha-1*, *Mha-2* und der Isoform mit der Accession-Nummer AF480431 entsprechende spezifische, als auch unspezifische Primer Verwendung. Der Einsatz unspezifischer Primer sollte das Auffinden neuer, eventuell  $H^+$ -Stress spezifischer, Isoformen ermöglichen. Aber auch der Einsatz spezifischer Primer kann in der Identifizierung neuer oder anderer Isoformen resultieren (Santi et al., 2003). Hierbei binden die Primer an komplementäre Basenabfolgen, die im gesamten mRNA-Pool der Wurzeln vorkommen. Durch variierende PCR-Bedingungen (Temperatur,

Salzkonzentrationen der Puffer, etc.) und alternierende Kombinationen der eingesetzten Primer steigt die Wahrscheinlichkeit, die unter Kontroll- und H<sup>+</sup>-Stress-Bedingungen transkribierten Isoformen der ATPase zu amplifizieren. Trotz allem stellt diese Suche nach Isoformen ein Wahrscheinlichkeitsprinzip dar und gibt keine hundertprozentige Aussage über ein Nichtvorhandensein einer Sequenz in der jeweiligen untersuchten Probe. Der Vorteil der Identifizierung von Genprodukten mittels Polymerase-Kettenreaktion besteht in ihrer Sensitivität und Schnelligkeit. Selbst geringste Mengen an mRNA können innerhalb kürzester Zeit bis zur Nachweisgrenze amplifiziert werden. Von Nachteil ist, dass man nur Teilbereiche der gesuchten cDNA-Sequenz erhält und die Primer flankierenden Regionen ausgeschlossen werden (Appelhans und Manns, 1999).

Eine weitere Methode zur Identifizierung von Genprodukten in einer Probe stellt die Erstellung von cDNA-Genbanken dar. Hierbei wird die aus dem zu untersuchenden Gewebe isolierte mRNA in cDNA umgeschrieben und in das Genom eines Bakteriophagen kloniert. Als Folge erhält man eine Population an Phagen, deren cDNA-Menge sich proportional zur Menge an mRNA im Ausgangsmaterial verhält. Die erhaltene cDNA-Genbank kann nun schnell auf das Vorhandensein des gewünschten Genprodukts untersucht werden. Hierbei können mehrere, voneinander unabhängige cDNA-Klone isoliert werden (Appelhans und Manns, 1999). Der Nachteil von cDNA-Genbanken besteht in dem zeitlichen Aufwand und der Schwierigkeit ihrer Anlage. Darüber hinaus sollte sie idealerweise aus einer Folge überlappender DNA-Fragmente bestehen, in denen bestimmte Sequenzen keiner Über- oder Unterrepräsentation unterliegen (Nicholl, 1995). In dieser Arbeit wurde der Aufbau zweier cDNA-Genbanken, deren Ausgangsbasis die mRNA von Kontroll- und H<sup>+</sup>-gestressten Maiswurzeln darstellte, angestrebt. Dies scheiterte jedoch an der Instabilität der erhaltenen Klone.

Zur Untersuchung der Transkription von mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) identifizierten Isoformen der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase unter Kontroll- und unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen fand eine Weiterentwicklung der PCR, die Real-Time-PCR, Verwendung. Die Real-Time-PCR stellt die modernste Methode der Quantifizierung von Nucleinsäuren dar (Mühlhardt, 2002). In dieser Arbeit fanden neben isoformenspezifischen auch familienspezifische Primer Verwendung (s. Kapitel 2.2.12.2). Hierbei konnten nur die Isoformen *ZMATP C/T 2* und *ZMATP T3* auf ihre Transkription in Kontrolle und Behandlung untersucht werden, da nur diese Isoformen in ihrer Basenabfolge deutlich voneinander und von der Isoform *ZMATP C/T 1* unterschiedliche Sequenzbereiche aufwiesen. Bei der Verwendung familienspezifischer Primer, welche die Transkription der gesamten Multigenfamilie der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase abdecken sollten, darf nicht vernachlässigt werden, dass es keinen universellen familienspezifischen Primer geben kann. Die Spezifität jeder in *Zea mays* cv. Blizzard vorkommenden Isoform der Protonenpumpe zu dem familienspezifischen Primer ist variabel und liefert insofern nur eine grobe Abschätzung über die Transkription aller in der Pflanze vorkommenden Isoformen. Darüber hinaus sind bisher nur fünf Isoformen der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase in Mais identifiziert worden und insofern kann ein familienspezifischer Primer auch nur in Hinblick auf diese bekannten Isoformen hergestellt werden. Welche bislang unbekannten Isoformen der  $H^+$ -ATPase in Mais durch den Primer berücksichtigt bzw. außer Acht gelassen werden, kann nicht abgeschätzt werden. Aus diesem Grund sind Aussagen über eine Transkription des Isoformen-Pools der ATPase in Mais unter Berücksichtigung der oben angemerkteten Kritikpunkte zu verstehen.

#### 4.1.2 Identifizierung der H<sup>+</sup>-ATPase auf Proteinebene

Die Identifizierung der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase in Lupinenwurzeln mittels eindimensionaler Größenauftrennung von Plasmamembranproteinen und anschließender Immundetektion der Protonenpumpe konnten Yan et al. (2002) erfolgreich dokumentieren. Eine nach dieser Methode durchgeführte Plasmalemmaisolation von unter Kontroll- und unter H<sup>+</sup>-Stress-Bedingungen angezogenen Maispflanzen der Sorte Oldham und anschließender Immundetektion der H<sup>+</sup>-ATPase resultierte ebenfalls in einer erfolgreichen Identifizierung des Enzyms in den Plasmamembransuspensionen beider Anzuchtvarianten (Abb. 20).

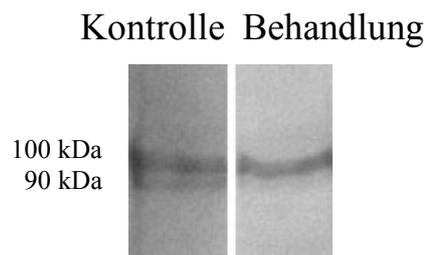


Abb. 20: Western Blot von aus Wurzeln (*Zea mays* cv. Oldham) isolierten Plasmamembransuspensionen der Anzuchtvarianten Kontrolle und Anpassung an H<sup>+</sup>-Stress. Zur Immundetektion des ca. 100 kDa großen Monomers der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase fand ein polyklonaler Antikörper Verwendung. Die aufgetragene Proteinmenge betrug 2 µg.

Zur Identifikation von Isoenzymen und posttranslationalen Modifikationen hingegen ist es notwendig, die Membranproteingemische beider Anzuchtvarianten einer höher auflösenden Separation, der 2-D-Gelelektrophorese, zu unterziehen. Neben der Trennung nach dem Molekulargewicht erfolgt in der ersten Dimension eine zusätzliche Auftrennung des Proteingemisches nach dem isoelektrischen Punkt, welcher sich aus der

Ladung der Proteine ergibt. Verschiedene Isoformen eines Enzyms können Unterschiede in Größe und isoelektrischem Punkt aufweisen. Posttranslationale Modifikationen, wie zum Beispiel Phosphorylierungen, hingegen haben weniger Auswirkungen auf das Molekulargewicht, sondern bedingen eher Ladungsveränderungen innerhalb des Proteinmoleküls (Mann und Jensen, 2003, O'Farrell, 1975).

Die kritischsten Punkte jeder Proteinanalyse werden durch, an die Fragestellung angepasste, Proteinextraktion und anschließende Probenaufarbeitung repräsentiert (Rose et al., 2004). Ziel der Proteinaufarbeitung für die 2-D-Gelelektrophorese stellt eine Überführung der nativen Proteine in einen für die isoelektrische Fokussierung geeigneten physikochemischen Zustand dar. Hierbei sollten die native Ladung der Proteine und ihr Molekulargewicht erhalten bleiben (Shaw und Riederer, 2003). Zur Untersuchung des Einflusses von H<sup>+</sup>-Stress auf das Gesamtproteinmuster von Maiswurzeln sollte die Proteinextraktion idealerweise alle in der Zelle befindlichen Proteine umfassen und die Bildung bzw. Anreicherung von Artefakten bzw. Nicht-Protein-Kontaminationen minimieren. Aufgrund der Komplexität des in sich sehr heterogenen Proteingemisches pflanzlicher und tierischer Zellen scheint es jedoch unmöglich, das gesamte Proteom zu erfassen (Rose et al., 2004). Allerdings sollte nicht vernachlässigt werden, dass zeitaufwändige und viele Schritte umfassende Proteinextraktionen zu verstärktem Proteinverlust führen können. Fast jede Änderung der physikalischen oder chemischen Umgebung von Proteinen birgt die Gefahr einer Variation der Proteinstabilität und – löslichkeit in sich und kann als Folge einen Verlust von Protein nach sich ziehen (Rose et al., 2004). Die Extraktion von Proteinen mittels TCA/Aceton-Fällung stellt eine gängige Isolationsmethode für einen Großteil der intrazellulären Proteine ohne zu hohen zeitlichen Aufwand dar. Durch die Fällung werden Proteinkonzentrationen erhöht und Kontaminationen entfernt (Damerval, 1986; Rabilloud, 1996; Rose et al., 2004). Einige Proteine jedoch entgehen dieser

Extraktionsmethode, so wie andere Extraktionsmethoden wiederum andere Proteine nicht berücksichtigen. Dieses Problem wird höchstwahrscheinlich aufgrund der Heterogenität und Komplexität intrazellulärer Proteine niemals hundertprozentig gelöst werden.

Im Anschluss an die Extraktion der Proteine erfolgte deren Solubilisierung in einem, für die isoelektrische Fokussierung geeigneten, 2-D-Gesamtprotein-Probenpuffer. Dieser bewirkt ein effektives Lösen, eine Denaturierung unter Beibehaltung der nativen Ladung, eine Reduktion und einen proteolytischen Schutz der Proteine (Shaw und Riederer, 2003). Die zweidimensionale Auftrennung der aus Maiswurzeln extrahierten Gesamtproteinfraktionen beider Anzuchtvarianten resultierte in der Erhaltung hoch auflösender, qualitativ hochwertiger 2-D-Gele. Das jeweils erhaltene Proteinnmuster deckte ein breites Spektrum unterschiedlich großer und unterschiedlich geladener Proteine ab (s. Kapitel 3.3.3).

Wie bereits erwähnt, entgehen einige Proteine der TCA/Aceton-Extraktion. Zhang et al. (2003) sprechen sogar von einer dramatischen Unterrepräsentation hydrophober Membranproteine in Gesamtproteinextrakten. Insbesondere die Wiederfindung integraler Membranproteine stellt aufgrund ihrer physikochemischen Heterogenität und ihrer Insolubilität im detergenzarmen 2-D-Probenpuffer ein Problem dar (Ephritikhine et al., 2004). Der limitierende Faktor wird hierbei durch die Erhaltung der Proteine in einem für die isoelektrische Fokussierung geeigneten physikochemischen Zustand bedingt. Insbesondere hydrophobe Proteine unterliegen unter solchen Bedingungen einer limitierten Löslichkeit, welches sich in einem nicht stattfindenden Übergang auf das Gel der ersten Dimension oder in einer Ausfällung der Proteine im Gel bemerkbar macht (Rabilloud, 2002; Shaw und Riederer, 2003). Die Identifikation der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase in 2-D-Gelen setzt insofern eine fraktionierte Extraktion von Membranproteinen voraus, die den Ansprüchen der

isoelektrischen Fokussierung und der Löslichkeit hydrophober Proteine in einem hydrophilen Lösungsmittel angepasst ist.

Die von Yan et al. (2002) vorgestellte Methode der Plasmalemmaisolation mittels eines Zwei-Phasen-Systems ist mit den für die eindimensionale Auftrennung von Proteinen benötigten Bedingungen kompatibel (s. Abb. 20), nicht hingegen mit den an die isoelektrische Fokussierung gestellten Ansprüchen. Darüber hinaus stellt die traditionelle Plasmalemmaisolation einen sehr zeitaufwändigen Prozess dar, der wiederum Inkompatibilitäten mit den an die 2-D-gelelektrophoretische Trennung gesetzten Ansprüchen birgt. Für eine effiziente Analyse des Proteoms der Plasmamembran fordern Zhang et al. (2003) Membranpräparationen mit geringster Anzahl an Kontaminationen und höchster Reproduzierbarkeit.

Ein methodisches Ziel dieser Arbeit stellte die Etablierung einer zeitsparenden Extraktion von Membranproteinen dar, welche sowohl mit den Anforderungen an eine eindimensionale, insbesondere aber auch mit den Anforderungen an eine zweidimensionale Separation eines Proteingemisches einhergeht. Auf eine Inkubation des pulverisierten Wurzelmaterials in einem nach Schrattenholz (2001) übernommenen, jedoch an die eigenen Extraktionsbedürfnisse angepassten Homogenisationspuffers, erfolgte die Isolation der Membranproteine mittels differentieller Zentrifugation. Hierbei orientierte sich die Proteinextraktion an dem Prinzip der Plasmalemmaisolation, wobei jedoch die zeitaufwändige Zwei-Phasen-Trennung zur Anreicherung der Plasmalemmafraktion weggelassen wurde. Die Immundetektion der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase in der erhaltenen mikrosomalen Membranfraktion resultierte in einem 1-D-Western Blot von ähnlicher Qualität, wie man ihn bisher nur von reinen Plasmalemmasuspensionen her kannte. Die aufzutragende Proteinmenge musste um einige Prozent erhöht werden. Der zum Lösen des nach der differentiellen Zentrifugation erhaltenen Pellets verwendete 1-D-

Membranprotein-Probenpuffer war bereits an die Bedürfnisse hydrophober, integraler Membranproteine angepasst, wie Yan et al. (2002) an Plasmalemmasuspensionen von Lupinenwurzeln zeigen konnten.

Der für die zweidimensionale Auftrennung von Gesamtprotein verwendete 2-D-Probenpuffer bedurfte einer Anpassung an die hydrophobe Natur der Membranproteine. Da hydrophobe Proteine aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften einer limitierten Löslichkeit in Probenpuffern unterliegen, besteht die Notwendigkeit, eine membranartige Umgebung unter Verwendung verschiedenster Detergenzien nachzuahmen (Santoni et al., 2000a; Shaw und Riederer, 2003). Das Vorhandensein von die Löslichkeit hydrophober Membranproteine erhöhendem Thioharnstoff (Rabilloud, 1998), in Kombination mit dem oft verwendeten zwitterionischen Sulfobetain-Detergenz CHAPS (Rabilloud et al., 1997; Shaw und Riederer, 2003) erwies sich für die Wiederfindung integraler Membranproteine als ineffektiv (Chevallet et al., 1998).

Die Verwendung des Amidsulfobetain-Detergenz ASB-14 hingegen erhöhte die Wiederfindung mehrerer integraler Membranproteine in 2-D-Gelen (Chevallet et al., 1998). Hierbei darf nicht vernachlässigt werden, dass die Effektivität des eingesetzten Detergenz auf den physikochemischen Eigenschaften des zu lösenden Proteins beruht und zwischen Proteinen variieren kann (Henningsen et al., 2002; Shaw und Riederer, 2003). Santoni et al. (2000b) zeigten, dass die Verwendung des Detergenz ASB-14 die höchste Wiederfindungsrate hydrophober Membranproteine ( $H^+$ -ATPase, PIP = plasma membrane intrinsic protein) in aufgereinigten Plasmalemmasuspensionen lieferte. Der Ersatz von CHAPS durch Triton X-100, unter gleichzeitiger Verwendung von Harnstoff und Thioharnstoff, resultierte ebenfalls in einer erhöhten Solubilisierungseffizienz hydrophober Membranproteine (Luche et al., 2003).

Unter Verwendung des speziell an hydrophobe Proteine angepassten 2-D-Membranprotein-Probenpuffers zeigten die erhaltenen Membranprotein-2-D-Gele von Kontroll- und H<sup>+</sup>-gestressten Pflanzen eine qualitativ hochwertige Auftrennung des jeweiligen Proteingemisches (s. Abb. 16). Leider lieferte die Identifizierung der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase mittels Immundetektion keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Der in Abbildung 19 dargestellte Western Blot zeigt keine exakte und einheitliche Auftrennung der ATPase-Moleküle. Wo man unter Kontrollbedingungen noch eine Aufeinanderfolge mehr oder weniger gleich großer Proteine mit voneinander abweichenden isoelektrischen Punkten vermuten kann, zeigt sich unter H<sup>+</sup>-gestressten Bedingungen ein dicker Schmier, welcher sich über ein Areal von ca. 30 kDa und 0,4 pH-Stufen verteilt. Ein weiterer Grund zur Infragestellung des dargestellten Blots stellt seine fehlende Reproduzierbarkeit dar. Die nach der Immundetektion erhaltenen Signale reichten von leerem Blot bis hin zu Schmier in einer der beiden Anzuchtvarianten.

Darüber hinaus liegen die theoretischen isoelektrischen Punkte aller in *Oryza sativa* detektierten Isoformen der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase in einem Bereich von pH 5,6 bis pH 6,7 und der isoelektrische Punkt der in Mais identifizierten H<sup>+</sup>-ATPase Mha-2 bei pH 7,27 und der Isoform Mha-1 bei pH 5,68. Diese, mittels des Programms „Compute pI/MW“ unter <http://www.expasy.ch/> ermittelten isoelektrischen Punkte der in der Datenbank veröffentlichten Isoformen der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase, überschneiden sich nur zum Teil mit den aus dem 2-D-Western Blot (Abb. 19) erhaltenen isoelektrischen Punkten der H<sup>+</sup>-ATPase in *Zea mays* cv. Blizzard.

Jedwede Veränderung der Bedingungen resultierte in keiner Verbesserung des vorangegangenen Ergebnisses. Veränderungen in den Versuchsbedingungen sahen wie folgt aus: (1) Verwendung von IPG-Strips in variierender Länge und in variierenden abzudeckenden pH-Bereichen zur Streckung der aufzutrennenden Moleküle, (2) Veränderung der aufzutragenden Proteinmenge,

(3) Erhöhung der Sensitivität der Detektion unter Ausnutzung von Chemilumineszenz. Der Grund für die Probleme bei der Immundetektion der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase scheint in ihrer limitierten Löslichkeit in dem für die isoelektrische Fokussierung benötigten 2-D-Probenpuffer zu liegen.

Abbildung 21 zeigt das erhaltene Proteinmuster zweier mittels eindimensionaler SDS-Gelelektrophorese aufgetrennter Membranproteinproben, welche in voneinander abweichenden Probenpuffern solubilisiert wurden. Die in Abbildung 21a aufgetrennten Membranproteine wurden nach der differentiellen Zentrifugation in 1-D-Membranprotein-Probenpuffer gelöst. Die in Abbildung 21b dargestellte Proteinprobe hingegen erfuhr eine Solubilisierung in 2-D-Membranprotein-Probenpuffer und wurde erst eine halbe Stunde vor dem Auftrag auf das eindimensionale SDS-Gel 1:2 mit 2x 1-D-Membranprotein-Probenpuffer versetzt, um eine Maskierung der Eigenladungen der Proteine mittels SDS zu erreichen. Wie aus Abbildung 21 hervorgeht, zeigen die beiden Membranproteinproben gleicher Herkunft abhängig von der Solubilisierung in unterschiedlichen Probenpuffern ein einander ähnelndes, jedoch in gewissen Bereichen voneinander abweichendes Proteinmuster. Dies äußert sich besonders im oberen Molekulargewichtsbereich der aufgetrennten Proteine. In Abbildung 21a lässt sich bei einer Größe von ca. 100 kDa eine distinkte Proteinbande ausmachen, welche in weiterführenden Untersuchungen als Plasmalemma- $H^+$ -ATPase identifiziert werden konnte (vgl. Kapitel 3.3.1 und Yan et al., 2002). Dem in Abbildung 21b dargestellten Proteinmuster hingegen fehlt in genau diesem Größenbereich eine entsprechende Bande. Diese Tatsache wiederum bestätigt den Verdacht einer limitierten Löslichkeit der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase im 2-D-Membranprotein-Probenpuffer.

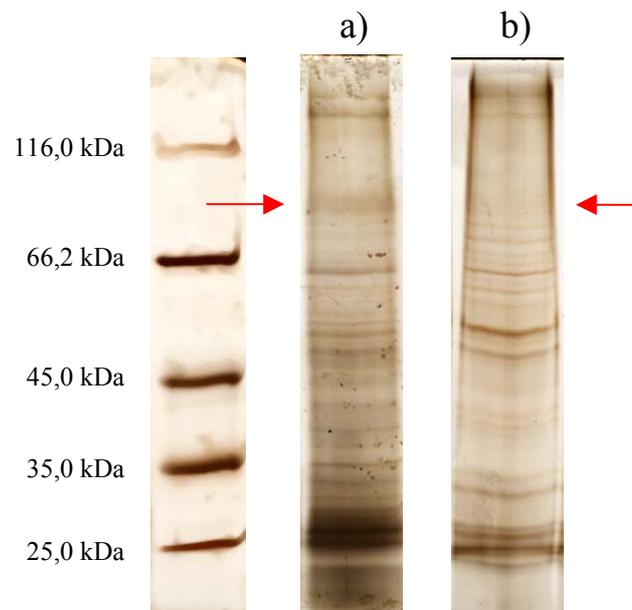


Abb. 21: Mittels 1-D-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (10% Acrylamid) nach ihrer Größe aufgetrennte Membranproteine von unter Kontrollbedingungen (pH 6) angezogenen Maispflanzen. Die Solubilisierung der mikrosomalen Membranfraktion erfolgte a) in 1-D-Membranprotein-Probenpuffer und b) in 2-D-Membranprotein-Probenpuffer. Die aufgetragene Proteinmenge pro Gel betrug 2  $\mu$ g. Als Standard diente ein Proteinmarker der Firma Fermentas.

Die Plasmalemma- $H^+$ -ATPase stellt mit ihren 10 Transmembrandomänen ein Membranprotein höchster Hydrophobizität dar. Trotz ausgewählten Detergenzieneinsatzes war es unmöglich, die  $H^+$ -ATPase in zweidimensional aufgetrennten Membranproteingemischen aus Maispflanzen reproduzierbar zu identifizieren. Santoni et al. (2000b) hingegen waren in der Lage, die ATPase in aufgereinigten Plasmalemmasuspensionen von *Arabidopsis thaliana* nach 2-D-gelelektrophoretischer Auftrennung wiederzufinden. Da der in dieser Arbeit verwendete 2-D-Membranprotein-Probenpuffer dem von Santoni et al. (2000b) beschriebenen ähnelte, kommen für die Frage nach dem Verbleib der  $H^+$ -ATPase aus Mais in 2-D-Gelen zwei Antworten in Betracht. Santoni et al. (2000b) wiesen das Enzym in aufgereinigten Plasmalemmasuspensionen nach,

wohingegen in dieser Arbeit mikrosomale Membranfraktionen verwendet wurden.

Eine von Mitochondrienmembran, Tonoplast etc. aufgereinigte Membransuspension scheint jedoch weniger den Grund für eine erhöhte Löslichkeit der im Plasmalemma eingebettet sitzenden  $H^+$ -ATPase darzustellen. Die Plasmamembran kann von anderen Membranen der mikrosomalen Membranfraktion unter Ausnutzung ihrer unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften isoliert werden (Sandelius und Morré, 1990). Die von Yan et al. (2002) angewandte Methode der Zwei-Phasen-Trennung bedient sich der unterschiedlichen Löslichkeit von Membranvesikeln variierender Herkunft in nicht miteinander mischbaren, wässrigen polymeren Phasen. Hierbei ist davon auszugehen, dass die Integrität der voneinander zu trennenden Membranfraktionen unbeeinflusst bleibt.

Ferner scheint der Unterschied in den verwendeten Pflanzenarten, dikotyle *Arabidopsis thaliana* und monokotyle *Zea mays*, zu liegen. Pflanzenartliche Unterschiede in der Membranumgebung hydrophober Proteine könnten insofern eine unterschiedliche Reaktion der zu lösenden Membranproteine auf eingesetzte Detergenzien bewirken. Darüber hinaus besteht häufig, trotz Wiederfindung eines integralen Membranproteins in einem 2-D-Gel, eine nicht zu vernachlässigende Unterrepräsentation der Menge des entsprechenden Proteins im Gel (Santoni et al., 2000a). Dies könnte den Grund einer mangelnden Reproduzierbarkeit des quantitativen Nachweises hydrophober Membranproteine darstellen. Aufgrund der erschwerten Löslichkeit integraler Membranproteine in entsprechenden Probenpuffern muss insofern jede quantitative Bestimmung dieser Proteine in 2-D-Gelen kritisch betrachtet werden.

## 4.2 Mechanismen zur Steigerung der Aktivität der H<sup>+</sup>-ATPase im Plasmalemma von Maiswurzeln

### 4.2.1 Einfluss von H<sup>+</sup>-Stress auf das Wurzelwachstum und die Wurzelmorphologie von *Zea mays* cv. Blizzard

Im Allgemeinen bedingen hohe H<sup>+</sup>-Aktivitäten im Wurzelmedium eine Limitierung des Pflanzenwachstums. Verschiedene Pflanzenarten reagieren in unterschiedlichem Maße auf den auf sie wirkenden abiotischen Stress (Yan et al., 1992). Mais zeigt eine erhöhte Resistenz gegenüber erhöhten H<sup>+</sup>-Aktivitäten im umgebenden Wurzelmedium. Hierbei muss jedoch eine konstitutive Resistenz der Maispflanze gegenüber einer abrupten Abnahme des pH-Wertes klar von einer adaptiven Resistenz an eine schrittweise Erhöhung der H<sup>+</sup>-Konzentration im umgebenden Wurzelmedium abgegrenzt werden. Wie aus Abbildung 1 (Kap. 3.1) ersichtlich, reagieren Maispflanzen auf eine abrupte Absenkung des Nährlösungs-pH-Wertes auf pH 3,5 mit einer starken Reduktion des Wurzelwachstums, einhergehend mit morphologischen Veränderungen an der Wurzel.

Eine Anpassung an einen pH-Wert von 3,5 im umgebenden Wurzelmedium hingegen zieht keine Konsequenzen auf das Wurzelwachstum der Maispflanzen nach sich. Auch Yan et al. (1998) konnten zeigen, dass sich kein signifikanter Unterschied in Wurzelfrischmasse, Wurzellänge und Anzahl der Seitenwurzeln zwischen an einen pH-Wert von 3,5 angepassten Maispflanzen und bei einem pH-Wert von 6,0 angezogenen Kontrollpflanzen findet. Lediglich bezüglich der Wurzelmorphologie beider Anzuchtvarianten konnten in dieser Arbeit Unterschiede festgestellt werden. Die an pH 3,5 angepassten Wurzeln zeigten stärker ausgeprägte Adventivwurzeln und wiesen im oberen Wurzelbereich violette Verfärbungen auf. Diese morphologischen Veränderungen können zum einen auf eine Anpassung an die niedrigen pH-Bedingungen, zum anderen aber auch auf eine Stressantwort an hohe H<sup>+</sup>-Aktivitäten im Wurzelmedium

hindeuten. Auf der Tatsache basierend, dass die einem  $H^+$ -Schock ausgesetzten Maispflanzen viel ausgeprägtere Veränderungen ihrer Wurzelmorphologie aufwiesen, kann wohl eher von einer Stressantwort an hohe  $H^+$ -Aktivitäten im die Wurzel umgebenden Medium ausgegangen werden. Diese veränderte Wurzelmorphologie scheint jedoch keinen Einfluss auf das Wurzelwachstum der an  $H^+$ -Stress angepassten Maispflanzen auszuüben.

Die Resistenz der an einen niedrigen pH-Wert angepassten Maiswurzeln konnte nach Yan et al. (1998) auf eine Erhöhung der Aktivität der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase zurückgeführt werden. Das unter  $H^+$ -Stress veränderte Enzym zeigte eine um 42% erhöhte Pump- und eine um 20% gesteigerte hydrolytische Aktivität. Darüber hinaus zeigten sich kinetische Veränderungen des angepassten Enzyms, welche sich in einer erhöhten Aktivierungsenergie und in einem erhöhten Wert für  $K_m$  äußerten.

Diese Veränderungen der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase vermögen eine Limitierung des Wurzelwachstums unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen zu unterbinden. Indem die  $H^+$ -ATPase unter niedrigen pH-Wert-Bedingungen im umgebenden Wurzelmedium verstärkt Protonen gegen einen erhöhten pH-Gradienten in den Apoplast pumpt und somit den Symplast vor Schädigungen durch die Protonen schützt, stellt sie einen Anpassungsmechanismus von Mais an hohe  $H^+$ -Aktivitäten dar.

#### 4.2.2 Anpassungsmechanismus der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase von *Zea mays* cv. Blizzard an $H^+$ -Stress

Aufgrund der physiologischen Bedeutung der  $H^+$ -ATPase für die Pflanze ist anzunehmen, dass das Enzym *in vivo* einer strikten Regulation durch biotische und abiotische Faktoren, wie Phytohormone, Pathogene, Licht und Umwelstress unterliegt. Demgegenüber steht die Tatsache, dass bisher nur wenig über die Mechanismen zur Regulation der Aktivität der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase in der

intakten Zelle bekannt ist. Eine Modulation der ATPase-Aktivität durch veränderte Umweltbedingungen wird durch Signaltransduktionswege reguliert (Palmgren, 1991). Ein durch Pflanzenhormone ausgelöster Signaltransduktionsweg kann eine Veränderung verschiedenster regulatorisch wirkender Proteine nach sich ziehen, welches wiederum Auswirkungen auf die Aktivität der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase zur Folge haben kann. So ist eine direkte Wirkung des Pflanzenhormons Auxin auf die Plasmalemma-ATPase bekannt (Frias et al., 1996; Hager et al., 1991).

Der Einfluss veränderter Umweltbedingungen und damit einhergehender Signaltransduktionswege wiederum bewirkt die Etablierung quantitativer und/oder qualitativer Anpassungsmechanismen der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase. Eine quantitative Anpassung zeigt sich in einer erhöhten  $H^+$ -ATPase-Enzymkonzentration im Plasmalemma. Eine erhöhte Menge an ATPase-Molekül pro Membraneinheit kann auf eine verstärkte Transkriptionsrate  $H^+$ -ATPase-codierender Gene (Transkriptionsebene), auf eine vermehrte Synthese an Enzymprotein (Translationsebene) oder auf eine verminderte Degradationsrate an ATPase-mRNA und/oder -Protein zurückzuführen sein (Yan et al., 2002). Eine qualitative Anpassung hingegen kann sich in einer differentiellen Expression von Isoenzymen oder in posttranslationalen Modifikationen am ATPase-Molekül äußern. Die sich am C-Terminus der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase befindliche, autoinhibitorische Domäne übernimmt eine regulatorische Funktion der Enzymaktivität. Modifikation dieser Domäne durch Bindung verschiedenster Effektormoleküle, Phosphorylierungen, partielle Hydrolyse oder alternatives Spleißen auf der mRNA-Ebene können als Mechanismen zur Regulation der Aktivität der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase in Betracht gezogen werden (Palmgren, 1991).

Quantitative und qualitative Anpassungsmechanismen können sowohl auf der prätranslationalen, auf der translationalen als auch auf der posttranslationalen Ebene wirken. Ziel dieser Arbeit stellte die Identifizierung möglicher

Anpassungsmechanismen der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase an  $H^+$ -Stress unter Berücksichtigung der oben genannten Ebenen dar. Im Folgenden wird zunächst auf mögliche Regulationsmechanismen auf der prätranslationalen und im Anschluss auf der translationalen und posttranslationalen Ebene eingegangen.

#### 4.2.2.1 Regulation auf der prätranslationalen Ebene

Genklonierung und Sequenzanalysen haben gezeigt, dass die Plasmalemma- $H^+$ -ATPase in Pflanzen durch eine Multigenfamilie repräsentiert wird (Sussman 1994). Hierbei zeigen individuelle Isoformen ein gewebe- und entwicklungsspezifisches Expressionsmuster, mit voneinander abweichenden biochemischen und regulatorischen Eigenschaften (Arango et al., 2003; Dambly und Boutry, 2001; Moriau et al., 1999; Palmgren, 2001; Palmgren und Christensen, 1994). Insofern würde sich eine prätranslationale Regulation in einer an die Umweltbedürfnisse einer Pflanze angepassten, differentiellen Expression von Isoformen bezüglich ihrer katalytischen und kinetischen Charakteristika äußern.

Die an  $H^+$ -Stress angepasste Plasmalemma- $H^+$ -ATPase zeigte in vorhergehenden Versuchen neben dem quantitativen Merkmal einer erhöhten Enzymaktivität auch qualitative Unterschiede zu dem Enzym der bei pH 6,0 angezogenen Pflanzen (Yan et al., 1998). Hierzu zählten ein verändertes pH-Optimum des angepassten Enzyms, eine erhöhte Aktivierungsenergie und ein erhöhter Wert für  $K_m$ . Ein möglicher Adaptionsmechanismus der  $H^+$ -ATPase an  $H^+$ -Stress könnte insofern durch eine differentielle Expression von ATPase-Isoformen unter den unterschiedlichen Umweltbedingungen zu erklären sein. In einer transgenen *Arabidopsis thaliana*-Linie wurde erstmals ein genetischer Beweis für die Bedeutung der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase in der cytoplasmatischen pH-Homöostase von Pflanzen erbracht (Young et al., 1998). Hierbei wurde spezifisch im Phloem eine Isoform mit verändertem C-Terminus

exprimiert, welches sich in einer verstärkten  $H^+$ -Resistenz der Pflanzen äußerte. Schon Morsomme et al. (1998) konnten in transgener Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) nachweisen, dass Punktmutationen innerhalb des ATPase-Gens *pma2* von *Nicotiana plumbaginifolia* in einer Modifikation der Struktur und der Konformation des Enzyms und somit in einer erhöhten  $H^+$ -Pumpaktivität unter sauren Bedingungen resultierten.

Die gewebespezifische Expression verschiedener ATPase-Gene spricht dafür, dass die transkriptionale Regulation einen wichtigen Anpassungsmechanismus der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase an variierende Umweltbedingungen darstellt (Michelet und Boutry, 1995). Insofern ist es wichtig,  $H^+$ -gestresste Maispflanzen auf eine differentielle Transkription von Isoformen der ATPase in der Wurzel zu untersuchen. In den unter Kontrollbedingungen angezogenen Pflanzen ließen sich zwei Isoformen des Enzyms identifizieren. Diese erhielten die Namen *ZMATP C1* und *ZMATP C2*. Die nach der Sequenzierung beider Isoformen erhaltenen Teilsequenzen wurden miteinander verglichen und es zeigte sich, dass die Isoform *ZMATP C2* innerhalb ihrer Nucleotidsequenz eine 75 Basen lange Nucleotidabfolge beinhaltet, welcher in der Isoform *ZMATP C1* nicht vorkam. Insofern könnte die Isoform *ZMATP C2* ein Produkt alternativen Spleißens darstellen, welches zu multiplen Isoformen eines Proteins, ausgehend von nur einem Gen, führt (Breitbart et al., 1987). Beispielsweise beinhaltet die Isoform *Mha-1* aus *Zea mays* 19 Introns, welches eine Prozessierung des primären Transkripts des  $H^+$ -ATPase-Gens notwendig macht. Während dieser Prozessierung der mRNA müssen nicht nur Introns, es können auch Exons entfernt werden. Beinflusst das alternative Spleißens das Leseraster der mRNA durch Veränderung von Codons, so äußert sich diese Form der prätranslationalen Regulation in der Synthese einer veränderten Polypeptidkette (Palmgren, 1991).

Die in den Kontrollpflanzen vorkommenden Isoformen *ZMATP C1* und *ZMATP C2* konnten auch in den Wurzeln  $H^+$ -gestresster Pflanzen identifiziert werden

und erhielten daher die Namen *ZMATP T1* und *ZMATP T2*. Hinweis auf eine differentielle Transkription  $H^+$ -Stress-spezifischer Isoformen bot die Detektion der Isoform *ZMATP T3*, welche mittels Polymerase-Kettenreaktion nur in den an saure Bedingungen angepassten Maiswurzeln identifiziert werden konnte. Trotz des Nichtauffindens der Isoform *ZMATP T3* mittels PCR in den Wurzeln der Kontrollpflanzen darf nicht von einer alleinig unter  $H^+$ -Stress transkribierten Isoform gesprochen werden, denn wie in Kapitel 4.1.1 erläutert, stellt die Suche nach Isoformen mittels Polymerase-Kettenreaktion ein Wahrscheinlichkeitsprinzip dar, welches keine hundertprozentige Aussage über ein Nichtvorhandensein einer Sequenz in der jeweilig untersuchten Probe gibt.

Die in *Zea mays* cv. Blizzard identifizierten Isoformen konnten einigen der in der Genbank des NCBI veröffentlichten Isoformen von Mais zugeordnet werden. Hierbei zeigte die Isoform *ZMATP C/T 1* eine hohe Homologie zur Isoform *Mha-2* und die Isoform *ZMATP T3* eine starke Übereinstimmung mit der Isoform *Mha-3*. Die Isoform *ZMATP C/T 2* konnte der Isoform mit der Accession-Nummer AF480431 zugeordnet werden. Die Wiederfindung der bereits in Maispflanzen unter anderen Umweltbedingungen identifizierten Isoform *Mha-3* (= *ZMATP T3*) in  $H^+$ -gestressten Maiswurzeln der Sorte Blizzard schließt eine spezifisch unter  $H^+$ -Stress stattfindende Transkription dieser Isoform aus (Santi et al. 2003). Ferner argumentieren Santi et al. (2003), dass die Isoformen *Mha-2* und *Mha-3* identisch seien und eventuelle Unterschiede in den veröffentlichten Sequenzen auf Sequenzierungsfehlern beruhen würden. Diese Hypothese ist jedoch fraglich, da von der Isoform *Mha-3* nur ein Teilbereich der Sequenz und kein mRNA-Vollängenklon zur Verfügung steht.

Yan et al. (1998) erhielten nach Messung der  $H^+$ -ATPase-Aktivität im Plasmalemma beider Anzuchtvarianten unter Einsatz variierender Substratkonzentrationen gleichmäßig verlaufende, einander ähnelnde, Sättigungskurven, welche einer typischen Michaelis-Menten-Kinetik entsprachen. Aus der Tatsache der gleichmäßig verlaufenden Kurven kann man

schließen, dass die gemessenen Aktivitäten der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase beider Anzuchtvarianten nicht das Resultat eines Systems von Enzymen überlappender Funktionen darstellen (Müller, 2000). Aus diesem Grund kann auf die Expression von untereinander sehr ähnlichen Isoenzymen in beiden Varianten geschlossen werden.

Daher könnte die Anpassung der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase an  $H^+$ -Stress durch eine mengenmäßige Variation der Transkription der jeweiligen Isoenzyme hervorgerufen worden sein. Keine der untersuchten Isoformen der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase unterlag jedoch unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen einer verstärkten Transkription. Auch die anfangs als  $H^+$ -Stress-spezifisch vermutete Isoform *ZMATP T3* konnte schließlich in den Wurzeln beider Anzuchtvarianten unter Verwendung spezifischerer Primer (vgl. Kap. 3.2.2) mit gleicher Transkriptionsrate detektiert werden. Zusätzlich zu den Isoformen *ZMATP C/T 2* (= Isoform mit der Accession-Nummer AF480431) und *ZMATP C/T 3* (= *Mha-3*) wurden auch die Transkriptionsraten der Isoformen *Mha-1* und *Mha-4* untersucht. Diese beiden Isoenzyme konnten jedoch weder in den Wurzeln der Kontroll-, noch in den Wurzeln der  $H^+$ -gestressten Pflanzen detektiert werden. Dies scheint für die Isoform *Mha-1* auch nicht ungewöhnlich, da dieses Isoenzym nach Jin und Bennetzen (1994) nur einer schwachen Expression in Wurzeln und anderen Geweben unterliegt. Insofern scheint sie für eine Adaption von Mais an  $H^+$ -Stress eher bedeutungslos zu sein.

Bei Untersuchung der Transkription sämtlicher Isoformen der Plasmalemma- $H^+$ -ATPas in *Zea mays* cv. Blizzard unter Verwendung eines familienspezifischen Primers zeigte sich ebenfalls kein signifikant erhöhter Wert bei dem unter  $H^+$ -Stress gebildetem Isoformen-Pool der  $H^+$ -ATPase. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass weitere, bisher unbekannte Isoformen der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase in Mais dem familienspezifischen Primer entgangen sein könnten (vgl. Kap. 4.1.1). Aus den bisherigen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die prätranslationale Ebene keinen Einfluss auf

die Anpassung der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase an  $H^+$ -Stress zu haben scheint. Da jedoch bisher keine systematische Analyse der Transkription aller ATPase-Gene in *Zea mays* vorliegt, ist es nicht möglich, den Einfluss einer differentiellen Transkription von Isoformen des Enzyms auf die Anpassung von Mais an  $H^+$ -Stress endgültig zu negieren.

#### 4.2.2.2 Regulation auf der translationalen und auf der posttranslationalen Ebene

Regulationen auf der translationalen und auf der posttranslationalen Ebene zeigen ihre Wirkung im gebildeten Enzymprotein. Eine quantitative Anpassung der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase an  $H^+$ -Stress würde sich insofern in einer veränderten Bildung an ATPase-Molekülen pro Membraneinheit äußern. Die Immundetektion des  $H^+$ -ATPase-Proteins resultierte in der Identifizierung zweier distinkter Monomer-Banden pro Anzuchtvariante (Abb. 7). Während sich bei der 100 kDa-Bande kein Unterschied in der Menge zwischen Kontrolle und Behandlung feststellen ließ, zeigte das bei ca. 90 kDa visualisierte Protein eine 37%ige Erhöhung seiner Menge in der Membransuspension der Kontrollpflanzen (Abb. 8). Dieses Ergebnis steht in Diskrepanz zu der unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen erhöhten Aktivität der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase. Darüber hinaus stellt sich die Frage nach der Herkunft des 90 kDa großen ATPase-Proteins.

Die Molekulargewichte aller in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) veröffentlichten Isoformen von *Oryza sativa* reichen von ca. 106 bis ca. 94 kDa, wobei jedoch nur wenige Isoformen dem geringeren Molekulargewichtsbereich zuzuordnen sind. Insofern könnte die bei ca. 90 kDa detektierte Bande einer oder einigen wenigen Isoformen der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase zuzuordnen sein, die sich in ihrem Molekulargewicht deutlich vom Durchschnitt der anderen Isoenzyme abheben. Aufgrund der unter

H<sup>+</sup>-Stress erhöhten Aktivität der H<sup>+</sup>-ATPase müssten die unter Kontrollbedingungen verstärkt gebildeten Isoformen des Enzyms kleineren Molekulargewichtes eine verringerte hydrolytische Effizienz aufweisen. In dieser Arbeit konnte auf der transkriptionalen Ebene keine differentielle Transkription von Isoformen nachgewiesen werden. Der endgültige Beweis einer Nichtexistenz weiterer, bisher unbekannter Isoenzyme der ATPase in Mais der Sorte Blizzard ist jedoch nicht gegeben. Als weitere mögliche Gründe für die erhöhte Menge an 90 kDa großem ATPase-Protein in der Membransuspension der Kontrollpflanzen kommen eine erhöhte Syntheserate des Proteins auf der Translationsbene und/oder ein verminderter Abbau des Enzyms unter Kontrollbedingungen in Betracht. Viele H<sup>+</sup>-ATPase-Transkripte weisen vor dem für die Initiation der Translation benötigten Codon AUG eine 5′untranslatierte Region mit einem aufwärts gerichteten, 3-13 Codon langen offenen Leseraster (uORF = upstream open reading frame) auf (Arango et al., 2003; Michelet et al., 1994). Diese Region ist länger, als bisher für pflanzliche Transkripte bekannt (Joshi, 1987). Untersuchungen an den 5′untranslatierten Regionen der ATPase-Isoformen *pma1* und *pma3* von *Nicotiana glumbaginifolia* zeigten, dass durch diese Struktur eine ca. zweifache Variation der Translationseffizienz hervorgerufen werden kann (Michelet et al., 1994; Lukaszewicz et al., 1998). Insofern kann angenommen werden, dass die Reinitiation der Translation unter regulatorischer Kontrolle steht (Arango et al., 2003). Sollte diese zusätzlich isoformenspezifisch verlaufen und eine Abhängigkeit von variierenden Umweltbedingungen zeigen, so könnte dieser Aspekt eine Erklärung für die unter Kontrollbedingungen erhöhte Menge an synthetisiertem 90 kDa großem ATPase-Molekül bieten. H<sup>+</sup>-Stress würde demnach eine Herunterregulation der Syntheserate dieses ineffizienteren Isoenzym der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase bewirken.

Eine weitere Hypothese für das Vorkommen kleinerer ATPase-Moleküle stellt eine posttranslationale Modifikation im Sinne einer proteolytischen Entfernung

6 bis 10 kDa großer Peptidbereiche dar. Hierbei wird jedoch in den meisten Fällen eine Aktivierung des entsprechenden Enzyms hervorgerufen. Insbesondere Enzyme, welche eine autoinhibitorische Domäne in regulatorischer Funktion beinhalten, stellen Kandidaten für eine proteolytische Modifikation zur Steigerung ihrer Aktivität dar (Palmgren, 1991). Palmgren et al. (1990a) zeigten, dass eine proteolytische Entfernung des C-Terminus der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase von Haferwurzeln durch Trypsin in einer Aktivierung des Enzyms resultierte. Hierbei wird davon ausgegangen, dass durch Aufhebung der inhibitorischen Interaktionen am C-Terminus die ATP-bindende und die Protonen-transportierende Region des Moleküls in eine aktive Konformation überwechseln können (Portillo, 2000). Bisher gibt es jedoch keinen Beweis für die Existenz einer endogenen Protease, welche das Enzym von seiner autoinhibitorischen Domäne befreien könnte (Palmgren, 1991). Darüber hinaus würde das um 37% verstärkte Vorkommen einer mittels Proteolyse aktivierten  $H^+$ -ATPase in den Kontrollpflanzen keine Erklärung für die unter  $H^+$ -Stress gemessene erhöhte Aktivität des Enzyms liefern. Vielmehr würde eine proteolytische Modifikation der ATPase an anderer Stelle, unter Reduktion ihrer enzymatischen Aktivität, eher eine Erklärung für das verminderte Vorkommen des 90 kDa großen Enzyms unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen erklären.

Die minimal funktionierende Einheit der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase wird durch ihr Monomer repräsentiert. Unter physiologischen Bedingungen hingegen liegt das Enzym vorwiegend als Dimer mit einem Molekulargewicht von ca. 200 kDa vor (Briskin und Reynolds-Niesmann, 1989; Jahn et al., 2001). Ebenso wie beim Monomer der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase ist bei der Immundetektion des Dimers des Enzyms eine Visualisierung zweier distinkter Dimer-Banden pro Anzuchtvariante zu erwarten. Zum Einen bei einer Größe von ca. 200 kDa, welche sich aus zwei 100 kDa großen Monomeren ergibt und zum Anderen bei einer Größe von ca. 180 kDa, entsprechend dem bei 90 kDa identifizierten

ATPase-Monomer. Wie in Abb. 9 ersichtlich, resultierte die Visualisierung des Dimers der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase in *Zea Mays* cv. Blizzard lediglich in der Identifizierung einer Bande bei ca. 200 kDa.

Bei der Elektrophorese im SDS-Polyacrylamidgel besteht über bestimmte Bereiche eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molekulargewichte der aufzutrennenden Proteine und den Wanderungstrecken der SDS-Polypeptid-Micellen (Lottspeich und Zorbas, 1998). Bei Gelen mit konstanten Acrylamidkonzentrationen, wie es in diesem Versuch der Fall war, erstreckt sich diese Linearität nur über einen limitierten Bereich. Insofern ist davon auszugehen, dass die ATPase-Monomere von 100 kDa und 90 kDa gelelektrophoretisch voneinander aufgetrennt werden konnten, eine Trennung der 200 kDa und 180 kDa großen ATPase-Dimere jedoch aufgrund einer geringeren Mobilität der Proteine im Acrylamidgel unterblieb.

Die Immundetektion des Dimers der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase zeigte unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen eine um 41% erhöhte Menge an Enzymmolekül im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 9). Das Dimer der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase stellt im Membranverband die physiologisch aktivste Form dar (Briskin und Reynolds-Niesmann, 1989; Jahn et al., 2001). Der Beweis für eine fehlende Existenz des ATPase-Monomers im nativen Plasmalemma steht jedoch noch aus. Insofern könnte man sich als Regulationsmechanismus eine sogenannte Monomer-Dimerisation der  $H^+$ -ATPase, abhängig von den auf die Pflanze wirkenden Umweltbedingungen, vorstellen (Palmgren, 1991). Hierbei kann eine veränderte Aktivität des Enzyms durch eine Variation in der Menge an gebildetem ATPase-Monomer und Dimer hervorgerufen werden. Die Aktivität der Plasmalemma  $Ca^{2+}$ -ATPase zum Beispiel wird durch Selbstassoziation der einzelnen Enzymmoleküle in Oligomeren stimuliert (Kosk-Kosicka und Bzdega, 1988). Eine unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen erhöhte Dimerbildung der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase könnte insofern den Grund für die von Yan et al. (1998) gemessene erhöhte Pump- und hydrolytische Aktivität der an saure

Bedingungen angepassten ATPase darstellen. Auch die sich aus der unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen erhöhten Dimerbildung der ATPase ergebenden strukturellen Veränderungen des Gesamt-Enzym-Pools im Vergleich zur Kontrolle bieten eine Erklärung für die kinetischen Veränderungen (Yan et al., 1998) der an hohe  $H^+$ -Aktivitäten angepassten ATPase. Eine Monomer-Dimerisation als Regulationsmechanismus könnte eine weitere Erklärung für das um 37% verminderte Vorkommen des 90 kDa großen  $H^+$ -ATPase-Monomers in den  $H^+$ -gestressten Pflanzen liefern.

Die Immundetektion des Dimers der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase unter Kontroll- und unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen warf die Frage möglicher Auswirkungen der Membranproteinextraktion auf die quartäre Struktur des Enzyms und somit einer artifiziellen Bildung von ATPase-Monomer auf. Im Falle einer Artefaktbildung während der Proteinisolation wäre keine Vergleichbarkeit in der Menge an gebildetem ATPase-Dimer und Monomer zwischen Kontrolle und Behandlung mehr gegeben. Proteindimere kommen durch die Bildung von intermolekularen Schwefelbrücken zustande und können durch die Zugabe von Reduktionsmitteln und Detergenz zerstört werden (Lottspeich und Zorbas, 1998). Zur Überprüfung des Einflusses von in Homogenisationspuffer und Probenpuffer enthaltenem Reduktionsmittel DTT und proteindenaturierendem Detergenz SDS wurden extrahierte Membranproteine bis kurz vor ihrem Auftrag auf das eindimensionale Polyacrylamidgel in einem möglichst nativen, undenaturierten und unreduzierten Zustand gehalten. Eine rein native Auftrennung der Membranproteingemische beider Anzuchtvarianten zur Überprüfung der Menge an gebildetem ATPase-Dimer ist aufgrund der Hydrophobizität der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase nicht möglich. Daher mussten die Membranproteine zur effektiven Größenauftrennung eine halbe Stunde vor ihrem Auftrag auf das Acrylamidgel mit SDS-enthaltendem Probenpuffer versetzt werden.

Zur Erhaltung unterschiedlicher Reduktionszustände der aufzutrennenden Proteine, erfuhren diese variierende Behandlungen kurz vor dem Start der

elektrophoretischen Trennung (vgl. Kap. 3.3.1). Mit zunehmend reduzierender und denaturierender Behandlung der eingesetzten Membranproteinproben beider Anzuchtvarianten zeigte sich eine Abnahme in der Intensität der sich über einen Molekulargewichtsbereich von ca. 200 kDa bis ca. 97-100 kDa erstreckenden Proteinbanden (Abb. 10). Während das Monomer die minimal funktionierende Einheit der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase repräsentiert, ist davon auszugehen, dass das Dimer unter nativen Bedingungen die dominantere Erscheinungsform des Enzyms darstellt (Briskin und Reynolds-Niesmann, 1989; Jahn et al., 2001; Palmgren, 1991). Die unsaubere Trennung des ATPase-Monomers vom ATPase-Dimer während der elektrophoretischen Größentrennung der Membranproteine beider Anzuchtvarianten könnte daran liegen, dass die Proteine bis kurz vor ihrem Auftrag auf das Acrylamidgel in ihrem nativen Zustand vorlagen. Eine ungleichmäßige Beladung der hydrophoben Proteine mit SDS könnte zu einer Behinderung der Größenauftrennung durch Ionenbewegungseffekte, resultierend aus einer inkompletten Maskierung der Eigenladungen der Proteine, führen. Es ist bekannt, dass Proteine mit einem isoelektrischen Punkt über pH 6,8 in einem SDS-freien Medium bei einer, entsprechend der in dieser Arbeit durchgeführten, diskontinuierlichen Gelelektrophorese in Richtung Kathode, d.h. in die entgegengesetzte Laufrichtung, migrieren und somit aus dem Gel herauswandern (Westermeier, 2001). Die hauptexprimierte Isoform der Protonenpumpe in Mais wird durch das *Mha-2-ATPase*-Gen, in *Zea Mays* L. cv. Blizzard als *ZMATP C/T1* bezeichnet, repräsentiert (Frias et al., 1996). Das monomere Protein dieses Isoenzym weist einen isoelektrischen Punkt von pH 7,27 auf (<http://www.expasy.ch/>). Insofern wäre denkbar, dass in Folge einer inkompletten Maskierung der Eigenladungen der Proteine und der daraus resultierenden Migration von ATPase-Monomeren in Richtung Kathode die Ausbildung einer distinkten Bande in der Größe des ATPase-Monomers mit zunehmender Behandlung der eingesetzten Membranproteinproben unterbunden war. Daher wäre aufgrund des hohen

Einsatzes an Reduktionsmittel bis hin zu der Verwendung von gekochter Membransuspension kaum ATPase-Dimer mehr in den Proteinproben anzutreffen, aber auch die eindeutige Identifizierung des ATPase-Monomers wäre behindert.

Leichte Verschiebungen der vermeintlichen Größe der aufzutrennenden Proteine können auf die teilweise fehlende bzw. ebenfalls zu kurze Inkubation der Proteinproben mit dem Reduktionsmittel DTT zurückzuführen sein. Unter diesen Bedingungen sind die Proteine trotz Zugabe von SDS nicht völlig entfaltet und eine exakte Bestimmung des Molekulargewichtes der aufzutrennenden Proteine ist nicht möglich (Westermeier, 2001).

Es ist davon auszugehen, dass die Membranproteinextraktion keine unkontrollierte Monomerbildung des ATPase-Moleküls hervorruft und somit die Vergleichbarkeit der Membranproteinproben beider Anzuchtvarianten gewährleistet ist. Dies kann durch die Tatsache bestätigt werden, dass mit zunehmender Behandlung der eingesetzten Membranproteinproben beider Anzuchtvarianten eine ähnlich starke Abnahme der Bandenintensität zu vermerken war (Tab. 2). Die Bandenintensität der visualisierten Menge an ATPase-Molekül in den Wurzelzellen der Kontrollpflanzen nimmt mit zunehmender Behandlung der Membranproteinproben um ca. 25% gleichmäßig ab. In den an  $H^+$ -Stress angepassten Pflanzen ist eine verzögerte Abnahme der Bandenintensitäten mit zunehmender Behandlung der Proteinproben zu vermerken. Hier ist erst nach stärkerer Behandlung der Membransuspension mit dem Reduktionsmittel DTT eine 24%ige Abnahme der Bandenintensität feststellbar. Kochen der Membransuspension hingegen resultiert in einer drastischen Abnahme der visualisierten Bandenintensität um zusätzliche 41%.

Durch die Behandlung der Membranproteinproben mit Reduktionsmittel erhöht man zwar die Menge an ATPase-Monomer in den Pflanzenproben, doch es ist davon auszugehen, dass das Verhältnis der ursprünglich vorhandenen Menge an Monomer bzw. Dimer zwischen Kontrolle und Behandlung in unseren

Versuchen bestehen blieb. Die verzögerte Abnahme der Bandenintensitäten in den an  $H^+$ -Stress angepassten Wurzelproben mit zunehmender Behandlung der Membransuspensionen spiegelt deutlich die erhöhte Menge an dimeren ATPase-Molekülen im Vergleich zur Kontrolle wider.

Die unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen gemessene erhöhte Pump- und hydrolytische Aktivität der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase lässt sich mittels quantitativer Anpassungsmechanismen der  $H^+$ -ATPase an saure Umweltbedingungen erklären. Die verminderte Affinität des Enzyms zu seinem Substrat ATP, das reduzierte pH-Optimum, eine verstärkte Kopplung von ATP-Hydrolyse und dem Pumpen der Protonen unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen, sowie eine erhöhte Aktivierungsenergie der  $H^+$ -ATPase, sprechen neben einer quantitativen auch für eine qualitative Anpassung des Enzyms an  $H^+$ -Stress. Hierfür kommen posttranslationale Modifikationen am ATPase-Molekül in Betracht. Die Phosphorylierung von Proteinen stellt eine weit verbreitete, reversible posttranslationale Modifikation in Eukaryonten dar (Palmgren, 1991). Hierbei kommen für die Anpassung der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase an  $H^+$ -Stress zwei mögliche Regulationsmechanismen in Frage: Entweder das Enzym selbst unterliegt einer Phosphorylierung bzw. einer Dephosphorylierung oder es findet eine Modifikation die Aktivität der  $H^+$ -ATPase beeinflussender regulatorischer Proteine statt. Eine Kinase-vermittelte Phosphorylierung der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase an Serin- und Threonin-Resten wurde von Schaller und Sussman (1988) als plausibler Mechanismus zur Regulation der Aktivität des Enzyms postuliert. Die Autoren konnten demonstrieren, dass Änderungen der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration und ein Abfall des pH-Wertes von 7,2 auf 6,2 potentielle Modulatoren der Kinase-vermittelten Phosphorylierung der  $H^+$ -ATPase darstellen. Eine Blaulicht-induzierte Aktivierung der ATPase in *Vicia faba* konnte auf eine Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten am C-Terminus der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase zurückgeführt werden (Kinoshita und Shimazaki, 1999). Olsson et al. (1998) waren in der Lage, eine

Phosphorylierung des Threonin-948 am C-terminalen Ende der ATPase aus *Spinacia oleracea* nachzuweisen. Hierbei resultierte die Bindung eines 14-3-3-Proteins in einem Schutz vor erneuter Dephosphorylierung der Aminosäure. 14-3-3 Proteine binden an eine große Anzahl eukaryontischer Proteine. Dabei geht man davon aus, dass sie als Modulatoren von Enzym-Aktivitäten agieren. Es konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung der Bindungsstelle(n) am Enzym zu einer erhöhten Affinität des 14-3-3-Proteins führt (Finnie et al., 1999; Palmgren et al., 1998). Die Bindung eines 14-3-3-Proteins an das äußerste Ende des C-Terminus der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase resultiert in einer Verschiebung der dort befindlichen autoinhibitorischen Domäne und somit in einer Aktivierung des Enzyms (Baunsgaard et al., 1998; Maudoux et al., 2000; Portillo, 2000; Svennelid et al., 1999).

Im Gegensatz zu einer Aktivierung der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase konnten De Nisi et al. (1999) eine Verminderung der Aktivität des Enzyms in Maiswurzeln nach vorheriger, Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Phosphorylierung nachweisen. An welcher Stelle des Polypeptids diese negative Kontrolle der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität eingreift, ist jedoch nicht untersucht worden. De Nisi et al. (1999) stellten die Hypothese auf, dass eine Phosphorylierung des Enzyms, entweder an der zentralen Schleife oder am C-Terminus des Moleküls, eine Konformationsänderung, bedingt durch die eingebrachten negativen Ladungen, bewirkt. Diese Konformationsänderung könnte zu einer erhöhten Interaktion der autoinhibitorischen Domäne mit der katalytischen Region und somit zu einer verminderten Aktivität des Enzyms führen.

Aufgrund der Auswirkungen von Phosphorylierungen auf die Aktivität der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase erschien es sinnvoll, diesen Mechanismus der Regulation des Enzyms in Kontroll- und H<sup>+</sup>-gestressten Pflanzen zu untersuchen. In Abb. 22 findet sich eine Veranschaulichung möglicher Phosphorylierungsstellen in der Aminosäuresequenz der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase-Isoform Mha-2 aus *Zea Mays*. Berücksichtigt wurden hierbei Serin- und

Threonin-Reste, welche bereits von Schaller und Sussmann (1988) als Angriffspunkte für Proteinkinasen an der Polypeptidkette der  $H^+$ -ATPase identifiziert wurden.

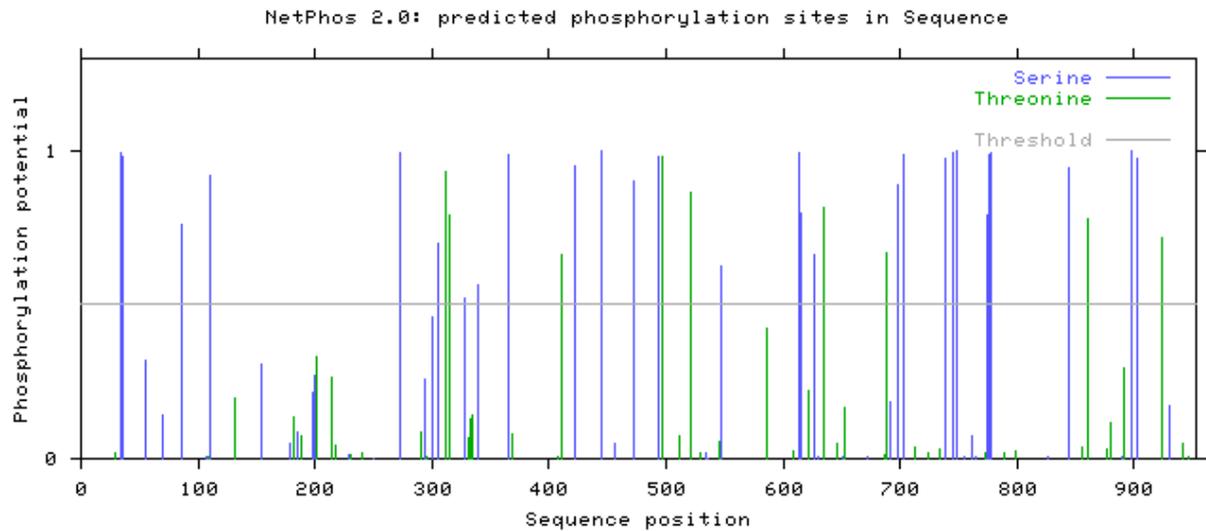


Abb. 22: Voraussage möglicher Phosphorylierungsstellen an Serinen und Threoninen in der Aminosäuresequenz der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase Mha-2 von *Zea mays*.

Insgesamt ergaben sich 56 Serin- und 47 Threoninreste, die mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit Substrate potentieller Kinasen darstellen können. Die Phosphorylierung des, in der spezifischen Aminosäuresequenz Tyr-Thr<sub>947</sub>-Val (*Arabidopsis thaliana*) am extremen C-terminalen Ende der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase vorkommenden, Threonins bewirkt eine 14-3-3-Protein-vermittelte Aktivitätssteigerung des Enzyms (Baunsgaard et al., 1998; Fuglsang et al., 1999; Maudoux et al., 2000; Svannelid et al., 1999). Insofern stellt sich die Frage nach Unterschieden im Phosphorylierungsstatus dieses Motivs unter variierenden Umweltbedingungen.

Es ist bekannt, dass die Isoformen PMA2 und PMA4 der  $H^+$ -ATPase aus *Nicotiana plumbaginifolia* eine voneinander abweichende Phosphorylierungsneigung an dem oben dargestellten Aminosäuremotiv

aufweisen, was sich in stark variierenden katalytischen Aktivitäten beider Isoenzyme äußert (Dambly und Boutry, 2001). Da Änderungen der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und des cytosolischen pH-Wertes potentielle Modulatoren der Kinase-vermittelten Phosphorylierung der  $\text{H}^+$ -ATPase darstellen (Schaller und Sussman, 1988), ist neben einer differentiellen Expression phosphorylierungssensitiver Isoenzyme auch eine durch  $\text{H}^+$ -Stress bedingte Änderung regulatorischer Faktoren möglich. Insofern bot es sich an, den Phosphorylierungsstatus des Threonins in der Polypeptidkette der Plasmalemma- $\text{H}^+$ -ATPase gestresster und ungestresster Pflanzen zu untersuchen.

Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Intensität des Phosphorylierungsstatus des Monomers der Plasmalemma-ATPase der unter Kontroll- und unter  $\text{H}^+$ -Stress-Bedingungen angezogenen Maispflanzen (Abb. 11). Bei Betrachtung des Phosphorylierungsstatus des Dimers der ATPase hingegen fand sich eine 174%ige Erhöhung in der Phosphorylierung der an  $\text{H}^+$ -Stress angepassten Plasmalemma- $\text{H}^+$ -ATPase (Abb. 12). Dies deutet auf eine Beteiligung mindestens einer posttranslationalen Modifikation des Polypeptids am Anpassungsmechanismus der Plasmalemma- $\text{H}^+$ -ATPase an  $\text{H}^+$ -Stress hin. Das Dimer der an saure Bedingungen angepassten  $\text{H}^+$ -ATPase weist zusammengenommen neben einer 41%igen Erhöhung seiner Menge eine 174%ige Erhöhung seines Phosphorylierungsstatus am Threonin auf. Insofern beruht die unter  $\text{H}^+$ -Stress-Bedingungen detektierte erhöhte Bandenintensität phosphorylierter Threonine am dimeren ATPase-Molekül nicht allein auf der erhöhten Menge an dimeren ATPase-Enzym, sondern spiegelt eine tatsächliche Erhöhung des Phosphorylierungsstatus der an  $\text{H}^+$ -Stress adaptierten Plasmalemma- $\text{H}^+$ -ATPase wider.

Aufgrund der unter  $\text{H}^+$ -Stress-Bedingungen erhöhten Aktivität an Plasmalemma- $\text{H}^+$ -ATPase (Yan et al., 1998) ist anzunehmen, dass das dimere Enzym durch erhöhte Phosphorylierung am Threonin einer katalytischen Aktivitätssteigerung

unterliegt. Hierbei ist nicht bekannt, welches Threonin in der Polypeptidkette der ATPase aufgrund kovalenter Modifikation zur Veränderung des Enzyms beiträgt und inwiefern sich diese Veränderung auf das Gesamtmolekül auswirkt. Für eine Beteiligung des C-Terminus spricht, dass eine *in vitro* durchgeführte proteolytische Entfernung der autoinhibitorischen Domäne in einer aktivierten Form der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase mit erhöhtem  $V_{\max}$  und einer effizienteren Kopplung zwischen ATP-Hydrolyse und dem Pumpen der Protonen resultiert. Gegen einen alleinigen Einfluss des C-Terminus auf die Anpassung der ATPase an H<sup>+</sup>-Stress spricht ein nach proteolytischer Entfernung der autoinhibitorischen Domäne gemessener erniedrigter  $K_m$ -Wert und eine Verschiebung des pH-Optimums des Enzyms in den alkalischen Bereich (Palmgren et al., 1990a, 1991; Johansson et al., 1993; Rasi-Caldogno et al., 1993; Lanfermeijer und Prins, 1994; Yan et al., 1998).

Nicht nur eine Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung der Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase zur Regulation ihrer Aktivität ist denkbar, sondern ebenfalls eine kovalente Modifikation anderer, die Aktivität der H<sup>+</sup>-ATPase beeinflussender, Proteine (Palmgren, 1991). Bei Untersuchung des Phosphorylierungsmusters des Threonins aller nach ihrer Größe aufgetrennten Membranproteine von Kontrolle und Behandlung zeigten sich deutliche Unterschiede (Abb. 13). Eine Anpassung an H<sup>+</sup>-Stress im Sinne posttranslationaler Phosphorylierungen beschränkt sich nicht nur auf die Plasmalemma-H<sup>+</sup>-ATPase, sondern hat breite Auswirkungen auf den Phosphorylierungsstatus anderer, eventuell regulatorisch wirkender Membranproteine.

#### 4.2.2.3 Einfluss der Zell-Umgebung der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase auf die Anpassung an $H^+$ -Stress

Neben Regulationsmöglichkeiten der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase auf der prätranslationalen, translationalen und auf der posttranslationalen Ebene, reagiert das Enzym auch auf Veränderungen seiner Lipid-Umgebung (Kasamo, 2003). Yan et al. (1998) konnten im Plasmalemma  $H^+$ -gestresster Maispflanzen zwar keine Veränderung des Verhältnisses „Phospholipide zu Protein“ und „Phospholipide zu Gesamtlipide“ feststellen, die Möglichkeit einer Veränderung individueller Phospholipide und Fettsäuren unter sauren Bedingungen bleibt jedoch bestehen. Es ist denkbar, dass als Folge einer direkten Enzym-Lipid-Wechselwirkung eine Modifikation der ATPase hervorgerufen wird (Cooke und Burden, 1990). Die Aktivität der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase kann durch Lysophosphatidylcholin, dem Produkt aus der hydrolytischen Spaltung von Phospholipiden unter Einwirkung des Enzyms Phospholipase  $A_2$ , stimuliert werden. Aber auch von sauren Phospholipiden ist bekannt, dass sie eine Aktivitätssteigerung der  $H^+$ -ATPase hervorrufen.

Das Pflanzenhormon Auxin scheint sowohl die Phospholipase  $A_2$  zu aktivieren, als auch schnelle Veränderungen von Metaboliten saurer Phospholipide hervorzurufen (Palmgren, 1991, Palmgren et al., 1988; Palmgren und Sommarin, 1989). Palmgren (1991) spekuliert, dass der Effekt von Lysophospholipiden auf die Plasmalemma- $H^+$ -ATPase entweder direkt am Enzym oder über die Vermittlung regulatorischer Proteine, zum Beispiel Proteinkinasen, vonstatten geht.

Abgesehen von der Wirkung auf die Phospholipase  $A_2$  greift Auxin in weitere Mechanismen der ATPase-Regulation ein. Neben einer Stimulation der Genexpression der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase in Koleoptilen von Mais, ist bekannt, dass Auxin zusätzlich einen verstärkten Membranfluss vom endoplasmatischen Retikulum zum Plasmalemma (Frias et al., 1996; Hager et

al., 1991) bewirken kann. Beide Mechanismen resultieren in einer erhöhten Kapazität der Zelle, Protonen in den Apoplast zu pumpen. Andere Arbeitsgruppen wiederum konnten eine Hemmung der, durch die ATPase verursachten Protonenabgabe aus Maiswurzeln mittels Auxin demonstrieren (Lüthen und Böttger 1993; Büntemeyer et al., 1998). Dieser Diskrepanz nachgehend fand man heraus, dass Wachstum und Entwicklung in Wurzeln, im Verhältnis zum Spross, von geringen Auxinkonzentrationen abhängen, wohingegen hohe Hormonkonzentrationen inhibitorische Effekte ausüben (Müller et al., 1998). Dies kann daran liegen, dass Wurzeln im Vergleich zum Spross eine höhere Sensitivität zu Auxin besitzen (Kim et al. 1997).

Eine Variation der Transkription der  $H^+$ -ATPase in  $H^+$ -gestressten Pflanzenwurzeln konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Auch eine Veränderung des sekretorischen Pfades liefert keine Erklärung für die unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen erhöhte Dimerbildung der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase, inklusive einer verstärkten Phosphorylierung des dimeren Enzymmoleküls.

Eine weitere Möglichkeit zur Regulation der Aktivität der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen könnte in einer weiteren, posttranslationalen Wirkung des Auxin auf das Enzym bestehen. So konnten Kim et al. (2001) in Reis nachweisen, dass das Auxin-bindende Protein ABP<sub>57</sub> an das Phytohormon bindet und dadurch *in vitro* eine Aktivierung der  $H^+$ -ATPase bewirkt. Inwiefern solch ein Regulationsmechanismus an der Anpassung der ATPase von Mais an  $H^+$ -Stress beteiligt ist, unterliegt reiner Spekulation.

Der Einfluss des Pflanzenhormons Auxin auf prätranslationale und posttranslationale Regulationsmechanismen der  $H^+$ -ATPase, inklusive des möglichen Zusammenwirkens regulatorischer Proteine lässt einen komplexen Signaltransduktionsmechanismus in der Anpassung der ATPase an  $H^+$ -Stress vermuten.

Aus diesem Grund erschien es sinnvoll, das Gesamt- und das Membranproteinmuster von unter Kontrollbedingungen und unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen angezogenen Maiswurzeln zu vergleichen. Eine Anzucht von Maispflanzen unter  $H^+$ -Stress führte zu einer 38%igen Veränderung im Gesamtproteinmuster im Vergleich zu den unter Kontrollbedingungen angezogenen Pflanzen (Tab. 3). Dies verdeutlicht einen extremen Einfluss veränderter Umweltbedingungen auf den Gesamtmetabolismus der Pflanze. Hauptsächlich zeigte sich unter  $H^+$ -Stress eine verstärkte bzw. verminderte Bildung von ebenfalls in den Kontrollpflanzen synthetisierten Proteinen. Nur knapp 3% der Proteine unterlagen unter sauren Anzuchtbedingungen einer Neusynthese bzw. einer ausbleibenden Synthese (Tab. 3). Es ist anzunehmen, dass eher verstärkt bzw. neu synthetisierte Proteine einen Einfluss auf die Aktivitätssteigerung der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase unter  $H^+$ -Stress haben. Andererseits könnte man aber auch annehmen, dass durch eine verminderte bzw. ausbleibende Bildung an Proteinen unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen ein eventuell von ihnen ausgehender inhibitorischer Effekt auf die Aktivität der  $H^+$ -ATPase reduziert wird.

Insgesamt gesehen ist die Masse veränderter Proteine zu groß, um genaue Aussagen machen zu können. Aus diesem Grund bietet sich die Analyse subzellulärer Proteinfractionen an. Durch Einschränkung der Menge der auf dem 2-D-Gel detektierten Proteine wird die Übersichtlichkeit und die Auflösung aufzutrennender Proteine erhöht (Everberg et al., 2004). Die Auftrennung und Identifikation von Membranproteinen soll einen zusätzlichen Einblick in die spezifische Funktion von Membranen, insbesondere der Plasmamembran, am Anpassungsmechanismus der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase an  $H^+$ -Stress liefern. Die Plasmamembran stellt die Grenze zwischen dem hoch organisierten und viele Enzyme beinhaltenden Cytosol und der enzymarmen und weniger organisierten Zellwand dar. Jegliche Veränderung und molekulare Bewegung zwischen Cytosol und Zellwand wird am Plasmalemma registriert und kann in

einer Modifikation des gesamten oder Teilen des Systems resultieren (Gilroy und Trewavas, 1990). Aus diesem Grund nehmen Membranproteine eine wichtige Stellung im Signaltransduktionsmechanismus der Zelle ein (Santoni et al., 2000).

Beim Vergleich der Proteinmuster der aus Maiswurzelzellen extrahierten mikrosomalen Membranfraktion von unter Kontroll- und unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen angezogenen Pflanzen ergab sich wiederum eine Gesamtveränderung von über 30% (36%) (Tab. 4). Die erhaltenen Proteinmuster zeigten jedoch eine höhere Auflösung und eine Verminderung in der Gesamtanzahl detektierter Proteine.  $H^+$ -Stress führte auch in der Membranfraktion zu einer unkontrollierten Veränderung von einem Drittel der Proteine. Insofern erscheint es unmöglich, einen spezifischen Anpassungsmechanismus der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase an  $H^+$ -Stress herauszufiltern. Aufgrund der Unterrepräsentation integraler, hydrophober Membranproteine in 2-D-Gelen wird höchstwahrscheinlich der größte Teil der detektierten Spots peripherer Membranproteine entsprechen. Diese wiederum sind eher dazu befähigt, aufgrund ihrer Stellung in der Membran einen Einfluss auf Signaltransduktionswege auszuüben.

Daher erschien es sinnvoll, unter  $H^+$ -Stress differentiell regulierte Proteinspots im Gel zu identifizieren. Die zusätzlich zur Charakterisierung der isolierten mikrosomalen Membranfraktion identifizierten, anzuchtindifferenten Proteine repräsentieren Membranproteine verschiedenster intrazellulärer Kompartimente, wie Chloroplast, Mitochondrium, Vakuole, Plasmalemma und endoplasmatisches Retikulum (Tab. 6). Darüber hinaus ist von einem Großteil dieser Proteine bekannt, dass sie in Pflanzenentwicklung und regulatorische Abläufe eingreifende Mediatoren darstellen. Aufgrund des erhöhten Vorkommens regulatorisch wirkender Proteine in der mikrosomalen Membranfraktion erscheint es einleuchtend, dass nicht alle, sondern nur spezifische Proteine unter  $H^+$ -Stress verstärkt synthetisiert werden.

Zu den unter sauren Bedingungen vermehrt gebildeten Proteinen gehören unter anderem das Chaperonin 60, Prohibitin und die Glutamin-Synthetase. Chaperone spielen eine wichtige Rolle beim Transport, der Translokation, der Faltung und der Oligomerisierung von Proteinen (Agashe und Hartl, 2000). Unter Stressbedingungen findet eine verstärkte Synthese von Chaperonen in der Zelle statt (Mogk et al., 2001). Ein unter  $H^+$ -Stress erhöhtes Vorkommen des Chaperonin 60 könnte eine Erklärung für das verstärkte Vorkommen an ATPase-Dimer in den an saure Bedingungen adaptierten Maispflanzen liefern. Aufgrund der erhöhten Anfälligkeit des dimeren Moleküls für Phosphorylierungen am Threonin und einer eventuell daraus resultierenden erhöhten Aktivität des Enzyms, ist die Pflanze verstärkt in der Lage, Protonen gegen einen immer höher werdenden Gradienten in den Apoplast zu pumpen. Prohibitine stellen Proteine dar, welche einen negativen Einfluss auf Zellproliferation und Kontrolle des Zellzyklus ausüben (Nadimpalli et al., 2000). Aufgrund dessen könnte man vermuten, dass die vermehrte Bildung dieses Proteins unter sauren Bedingungen eine Stressantwort der Pflanze an die hohe Protonenaktivität im umgebenden Medium darstellen könnte. Wie schon in Kap. 4.2.1 erwähnt zeigten die an pH 3,5 adaptierten Pflanzen keine Reduktion ihres Wurzelwachstums im Vergleich zur Kontrolle, aber es bestanden deutliche Unterschiede in der Wurzelmorphologie beider Anzuchtvarianten. Die unter  $H^+$ -Schock angezogenen Maispflanzen zeigten hingegen sowohl eine Limitierung ihres Wurzelwachstums, als auch eine deutlich veränderte Wurzelmorphologie im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Prohibitine und in ihrer Funktion ähnliche Proteine könnten einen Einfluss auf diese veränderte Wurzelgenese unter sauren Bedingungen haben. Hierbei ist davon auszugehen, dass ihre Aktivität in den Wurzeln  $H^+$ -geschockter Pflanzen höher ist, als in den Wurzeln der an  $H^+$ -Stress angepassten Pflanzen. Die an hohe  $H^+$ -Aktivitäten angepassten Pflanzen vermögen aufgrund der erhöhten Aktivität der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase eine Limitierung ihres Wurzelwachstums zu verhindern, jedoch nicht

eine allgemeine Antwort der Wurzelmorphologie auf den Stress zu unterbinden. Eine solche plastische Reaktion des Stoffwechsel an die veränderten Umweltbedingungen der Maispflanzen wird ebenfalls durch die unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen vermehrt gebildete Glutamin-Synthetase repräsentiert. Das in die Ammoniumfixierung (Heldt, 2003) eingreifende Enzym lässt auf keinen Zusammenhang im Anpassungsmechanismus der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase an hohe  $H^+$ -Aktivitäten vermuten. Dies verdeutlicht, dass neben den in den Signaltransduktionsmechanismus der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase eingreifenden Stoffwechselveränderungen unter  $H^+$ -Stress auch allgemeine Reaktionen der Maispflanzen auf die veränderten Umweltbedingungen erfolgen.

#### 4.2.3 Schlussfolgerungen

Eine Anpassung von Mais (*Zea mays* cv. Blizzard) an hohe  $H^+$ -Aktivitäten im umgebenden Wurzelmedium zieht keine Konsequenzen für das Wurzelwachstum der Maispflanzen nach sich. Lediglich bezüglich der Wurzelmorphologie konnten Unterschiede zwischen Kontrolle und an einen pH-Wert von 3,5 angepassten Maispflanzen festgestellt werden.  $H^+$ -Stress führt sowohl bei der Gesamt- als auch bei der Membranproteinfraction angepasster Pflanzen zu einer Veränderung von einem Drittel der Proteine. Dies verdeutlicht einen extremen Einfluss veränderter Umweltbedingungen auf den Gesamtmetabolismus der Pflanze.

Die von Yan et al. (1998) gemessene erhöhte Aktivität der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase vermag hierbei eine Limitierung des Wurzelwachstums unter  $H^+$ -Stress-Bedingungen zu unterbinden. Indem die  $H^+$ -ATPase unter niedrigen pH-Wert-Bedingungen im umgebenden Wurzelmedium verstärkt Protonen gegen einen erhöhten pH-Gradienten in den Apoplast pumpt, stellt sie einen effektiven Anpassungsmechanismus von Mais an hohe  $H^+$ -Aktivitäten dar. Die prätranslationale Ebene scheint nach den in dieser Arbeit durchgeführten

Untersuchungen keinen signifikanten Einfluss auf die Anpassung der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase an  $H^+$ -Stress zu haben. Auf der translationalen und posttranslationalen Ebene hingegen finden sich deutliche Hinweise auf die Proteinmenge und die Proteinmorphologie betreffende Anpassungsmechanismen des Enzyms. Die physiologisch aktivste Form der  $H^+$ -ATPase wird durch ihr Dimer repräsentiert. Das Monomer stellt die minimal funktionierende Einheit des Enzyms dar. Es konnten Unterschiede in der Menge an gebildetem ATPase-Monomer und Dimer zwischen  $H^+$ -gestresstem Mais und Kontrollpflanzen festgestellt werden. Hierbei zeigte sich ein verstärktes Vorkommen eines, im Vergleich zum Durchschnitt kleineren, 90 kDa großen ATPase-Monomers in den Kontrollpflanzen. Die Herkunft dieses (Iso)enzym ist spekulativ, doch es ist davon auszugehen, dass dieses Protein aufgrund der unter  $H^+$ -Stress erhöhten Aktivität der  $H^+$ -ATPase eine verringerte hydrolytische Effizienz aufweist. Unterschiede in der Menge an gebildetem, 100 kDa großem ATPase-Monomer zwischen Kontrolle und Behandlung konnten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Darüber hinaus bestand kein signifikanter Unterschied in der Intensität des Phosphorylierungsstatus am Threonin des Monomers der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase zwischen beiden Anzuchtvarianten. Vielmehr scheint ein unter  $H^+$ -Stress verstärktes Vorkommen an ATPase-Dimer, eventuell hervorgerufen durch eine erhöhte, Chaperon-vermittelte Dimerisation des Enzym-Monomers, inklusive einer Erhöhung des Phosphorylierungsstatus am Threonin, die Ursache für die Aktivitätssteigerung und die veränderte Kinetik der  $H^+$ -ATPase darzustellen. Darüber hinaus beschränkt sich die Anpassung der Maispflanzen an  $H^+$ -Stress im Sinne posttranslationaler Phosphorylierungen nicht nur auf die Plasmalemma- $H^+$ -ATPase, sondern hat breite Auswirkungen auf den Phosphorylierungsstatus anderer, eventuell regulatorisch wirkender Membranproteine. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse lassen insofern einen komplexen Signaltransduktionsmechanismus in der Anpassung der ATPase an  $H^+$ -Stress vermuten.

## 5 Zusammenfassung

Mais ist in der Lage, sich an hohe  $H^+$ -Aktivitäten im Wurzelmedium durch eine verstärkte Aktivität der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase anzupassen. Worauf die Veränderungen der  $H^+$ -ATPase beruhen, stellte den Untersuchungsaspekt der vorliegenden Arbeit dar. In Frage kommen eine veränderte Transkription einer bzw. mehrerer Isoformen, eine veränderte Syntheserate des Enzyms auf der Translationsebene, eine posttranslationale Modifikation oder auch eine veränderte Genexpression von regulatorischen Proteinen.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde Mais (*Zea mays* L. cv. Blizzard) für knapp 3 Wochen unter kontrollierten Bedingungen bei pH 6,0 und pH 3,5 in Hydrokultur herangezogen. Auf die Ernte der Wurzeln folgten RNA- bzw. Proteinextraktionen.

Die schrittweise an den niedrigen pH-Wert angepassten Maispflanzen zeigten keine Limitierung ihres Wurzelwachstums im Vergleich zur Kontrolle. Lediglich bezüglich der Wurzelmorphologie konnten Unterschiede festgestellt werden, was als eine Stressantwort an hohe  $H^+$ -Aktivitäten im Wurzelmedium gewertet wurde.

Folgende Aussagen zum Anpassungsmechanismus der  $H^+$ -ATPase an  $H^+$ -Stress können gemacht werden:

- 1) Eine veränderte Transkription einer oder mehrerer Isoformen der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase scheint keinen Einfluss auf die Anpassung des Enzyms an niedrige pH-Wert-Bedingungen im umgebenden Wurzelmedium zu haben.
- 2) Ein unter  $H^+$ -Stress verstärktes Vorkommen an ATPase-Dimer auf der Proteinebene, inklusive einer Erhöhung des Phosphorylierungsstatus am Threonin, dürfte die Ursache für die Aktivitätssteigerung und die kinetischen Veränderungen der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase unter sauren Bedingungen darstellen.

- 3)  $H^+$ -Stress führte sowohl in der Gesamtprotein- als auch in der Membranproteinfraktion von Maiswurzeln zu einer Veränderung von ca. einem Drittel der Proteine. Dies verdeutlicht einen extremen Einfluss veränderter Umweltbedingungen auf den Gesamtmetabolismus der Pflanze. Neben einer allgemeinen, plastischen Reaktion des Metabolismus auf hohe  $H^+$ -Aktivitäten im umgebenden Wurzelmedium lässt sich jedoch auch die Beteiligung regulatorisch wirkender Proteine am Anpassungsmechanismus der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase an  $H^+$ -Stress vermuten.

## 6 Literatur

Adams F (1981): Nutritional imbalances and constraints to plant growth on acid soils. *J. Plant Nutr.* 4: 81-87

Agashe VR, Hartl F-U (2000): Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 11: 15-25

Arango M, Gévaudant F, Oufattole M, Boutry M (2003): The plasma membrane proton pump ATPase: The significance of gene subfamilies. *Planta* 216: 355-365

Appelhans H, Manns A (1999): Klonierung von cDNA (cDNA-Genbank). In: *Gentechnische Methoden* (Gassen HG, Schrimpf G). Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, 153-190

Axelsen KB, Palmgren MG (1998): Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* 46: 84-101

Axelsen KB, Palmgren MG (2001): Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 126: 696-706

Baunsgaard L, Fuglsang AT, Jahn T, Korthout HAAJ, de Boer AH, Palmgren MG (1998): The 14-3-3 proteins associate with the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase to generate a fusicoccin binding complex and a fusicoccin responsive system. *Plant J.* 13: 661-671

Baxter I, Tchieu J, Sussman MR, Boutry M, Palmgren MG, Gribskov M, Harper J, Axelsen KB (2003): Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol.* 132: 618-628

Braun Y, Hassidim M, Lerner HR, Reinhold L (1986): Studies on H<sup>+</sup>-translocating ATPases in plants of varying resistance to salinity. *Plant Physiol.* 81: 1050-1056

Breitbart RE, Andreadis A, Nadal-Ginard B (1987): Alternative splicing: A ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 467-95

Briskin DP, Poole RJ (1983): Plasma membrane ATPase of red beet forms a phosphorylated intermediate. *Plant Physiol.* 71: 507-512

Briskin DP, Reynolds-Niesman I (1989): Change in target molecular size of the red beet plasma membrane ATPase during solubilization and reconstitution. *Plant Physiol.* 90: 394-397

Büntemeyer K, Lüthen H, Böttger M (1998): Auxin-induced changes in cell wall extensibility of maize roots. *Planta* 204: 515-519

Chevallet M, Santoni V, Poinas A, Rouquié D, Fuchs A, Kieffer S, Rossignol M, Lunardi J, Garin J, Rabilloud T (1998): New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 19: 1901-1909

Cooke DT, Burden RS (1990): Lipid modulation of plasma membrane-bound ATPases. *Physiol. Plant.* 78: 153-159

Cox KH, Goldberg RB (1988): Isolation of total RNA. In: Shaw, CH (Hrsg.). *Plant Mol. Biol.*, pp. 2-8

Dambly S, Boutry M (2001): The two major plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases display different regulatory properties. *J. Biol. Chem.* 276: 7017-7022

Damerval C, de Vienne D, Zivy M, Thiellement H (1986): Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 7: 52-54

De Nisi P, Dell'Orto M, Pirovano L, Zocchi G (1999): Calcium-dependent phosphorylation regulates the plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity of maize (*Zea mays* L.) roots. *Planta* 209: 187-194

Ephritikhine G, Ferro M, Rolland N (2004): Plant membrane proteomics. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 943-962

Everberg H, Sivars U, Emanuelsson C, Persson C, Englund A-K, Haneskog L, Lipniunas P, Jörntén-Karlsson M, Tjerneld F (2004): Protein pre-fractionation in detergent-polymer aqueous two-phase systems for facilitated proteomic studies of membrane proteins. *J. Chroma.* 1029: 113-124

Finnie C, Borch J, Collige DB (1999): 14-3-3 proteins: Eukaryotic regulatory proteins with many functions. *Plant. Mol. Biol.* 40: 545-554

Frias I, Caldeira MT, Pérez-Castiñeira JR, Navarro-Aviño JP, Culiañez-Maciá FA, Kuppinger O, Stransky H, Pagés M, Hager A, Serrano R (1996): A major isoform of the maize plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: Characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell* 8: 1533-1544

Fuglsang AD, Visconti S, Drumm K, Jahn T, Stensballe A, Mattei B, Jensen ON, Aducci P, Palmgren MG (1999): Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr<sup>946</sup>-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr<sup>947</sup>. *J. Biol. Chem.* 274: 36774-36780

Gilroy S, Trewavas A (1990): Signal sensing and signal transduction across the plasma membrane. In: *The Plant Plasma Membrane* (C Larsson, IM Møller, eds.). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 203-232

Hager A, Debus G, Edel HG, Stransky H, Serrano R (1991): Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Planta* 185:527-537

Heldt HW (2003): *Pflanzenbiochemie*. 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin

Henningsen R, Gale BL, Straub KM, DeNagel DC (2002): Application of zwitterionic detergents to the solubilization of integral membrane proteins for two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2: 1479-1488

Jahn T, Dietrich J, Andersen B, Leidvik B, Otter C, Briving C, Kühlbrandt W, Palmgren MG (2001): Large scale expression, purification and 2D crystallization of recombinant plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Mol. Biol.* 309: 465-476

Jin YK, Bennetzen JL (1994): Integration and non random mutation of a plasma membrane proton ATPase gene fragment within the BS1 retroelement of maize. *Plant Cell* 6: 1177-1186

Johansson F, Sommarin M, Larsson C (1993): Fusicoccin activates the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by a mechanism involving the C-terminal inhibitory domain. *Plant Cell* 5: 321-327

Joshi CP (1987): An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucleic Acids Res.* 15: 6643-6653

Kasamo K (2003): Regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity by the membrane environment. *J. Plant Res.* 116: 517-523

Kaplinski NJ, Braun DM, Penterman J, Goff SA, Freeling M (2002): Utility and distribution of conserved noncoding sequences in the grasses. *PNAS* 99: 6147-6151

Kim D, Kim YS, Jung J (1997): Involvement of soluble proteinous factors in auxin-induced modulation of P-type ATPase in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *FEBS Lett.* 409: 273-276

Kim Y-S, Min J-K, Kim D, Jung J (2001): A soluble auxin-binding protein, ABP<sub>57</sub>. *J. Biol. Chem.* 276: 10730-10736

Kinoshita T, Shimazaki K (1999): Blue light activates the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *EMBO J.* 20: 5548-5558

Kochian LV (1995): Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 237-260

Kosk-Kosicka D, Bzdega T (1988): Activation of the erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by either self-association or interaction with calmodulin. *J. Biol. Chem.* 263: 18184-18189

Lanfermeijer FC, Prins HBA (1994): Modulation of  $\text{H}^{+}$ -ATPase activity by fusicoccin in plasma membrane vesicles from oat (*Avena sativa* L.) roots. *Plant Physiol.* 104: 1277-1285

Lottspeich F, Zorbas H (1998): *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin

Luche S, Santoni V, Rabilloud T (2003): Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane proteins solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 3: 249-253

Lukaszewicz M, Jérrouville B, Boutry M (1998): Signs of translational regulation within the transcript leader of a plant plasma membrane  $\text{H}^{+}$ -ATPase gene. *Plant J.* 14: 413-423

Lüthen H, Böttger M (1993): The role of protons in the auxin-induced root growth inhibition – A critical reexamination. *Bot. Acta* 106: 58-63

Lutsenko S, Kaplan JH (1995): Organization of P-type ATPases: Significance of structural diversity. *Biochem.* 34: 15607-15613

Mann M, Jensen ON (2003): Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotech.* 21: 255-261

Marschner H (1995): Mineral Nutrition of Higher Plants, 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press, San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo

Maudoux O, Batoko H, Oecking C, Gevaert K, Vandekerckhove J, Boutry M, Morsomme P (2000): A plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase expressed in yeast is activated by phosphorylation at its penultimate residue and binding of 14-3-3 regulatory proteins in the absence of fusicoccin. *J. Biol. Chem* 275: 17762-17770

Michelet B, Boutry M (1995): The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: a highly regulated enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiol* 108: 1-6

Michelet B, Lukaszewicz M, Dupriez V, Boutry M (1994): A plant plasma membrane proton-ATPase gene is regulated by development and environment and shows signs of a translational regulation. *Plant Cell* 6: 1375-1389

Mogk A, Mayer MP, Deuerling E (2001): Molekulare Chaperone und ihr biotechnologisches Potential. *Biologie in unserer Zeit* 3: 182-192

Moriau L, Michelet B, Bogaerts P, Lambert L, Michel A, Oufattole M, Boutry M (1999): Expression analysis of two gene subfamilies encoding the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Nicotiana plumbaginifolia* reveals the major transport functions of this enzyme. *Plant J.* 19: 31-41

Morsomme P, Boutry M (2000): The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 1-16

Morsomme P, Dambly S, Maudoux O, Boutry M (1998): Single point mutations distributed in 10 soluble and membrane regions of the *Nicotiana plumbaginifolia* plasma membrane PMA2 H<sup>+</sup>-ATPase activate the enzyme and modify the structure of the C-terminal region. *J. Biol. Chem.* 273: 34837-34842

Mühlhardt C (2002): *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin

Müller A, Hillebrand H, Weiler EW (1998): Indole-3-acetic acid is synthesized from L-tryptophan in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 206: 362-369

Müller C (2000): *Physiologische Untersuchung zum Adaptionsmechanismus der Weißlupine an Phosphatmangel. Diplomarbeit Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Giessen*

Nadimpalli R, Yalpani N, Johal GS, Simmons CR (2000): Prohibitins, stomatins, and plant disease response genes compose a protein superfamily that controls cell proliferation, ion channel regulation, and death. *J. Biol. Chem.* 22: 29579-29586

Nicholl DST (1995): *Gentechnische Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford.

O'Farrell P (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021

Olsson A, Svannelid F, Ek B, Sommarin M, Larsson C (1998): A phosphothreonine residue at the C-terminal end of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase is protected by fusicoccin-induced 14-3-3 binding. *Plant Physiol.* 118: 551-555

Palmgren MG (1991): Regulation of plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity. *Physiol. Plant.* 83: 314-323

Palmgren MG (2001): Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases: Powerhouses for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 817-845

Palmgren MG, Christensen G (1994): Functional comparisons between plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isoforms expressed in yeast. *J. Biol. Chem.* 269: 3027-3033

Palmgren MG, Harper J (1999): Pumping with plant P-type ATPases. *J. Exp. Bot.* 50: 883-893

Palmgren MG, Larsson C, Sommarin M (1990a): Proteolytic activation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by removal of a terminal segment. *J. Biol. Chem.* 265 [23]: 13423-13426

Palmgren MG, Sommarin M (1989): Lysophosphatidylcholine stimulates ATP dependent proton accumulation in isolated oat root plasma membrane vesicles. *Plant Physiol.* 90: 1009-1014

Palmgren MG, Sommarin M, Serrano R, Larsson C (1991): Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* 266: 20470-20475

Palmgren MG, Sommarin M, Ulvskov P, Jørgensen PL (1988): Modulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from oat roots by lysophosphatidylcholine, free fatty acids and phospholipase A<sub>2</sub>. *Physiol. Plant.* 74: 11-19

Palmgren MG, Thoe Fuglsang A, Jahn T (1998): Deciphering the role of 14-3-3 proteins. *Exp. Biol. Online* 3:4

Pinton R, Poles A, Cesco S, Varanini Z (1996): Changes in plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity during aeration of maize roots. *J. Plant Physiol.* 147: 511-515

Portillo F (2000): Regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1469: 31-42

Rabilloud T (1996): Solubilization of proteins für electrophoretic analyses. *Electrophoresis* 17: 813-829

Rabilloud T (1998): Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 19: 758-760

Rabilloud T (2002): Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* 2: 3-10

Rabilloud T, Adessi C, Giraudel A, Lunardi J (1997): Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 18: 307-316

Rasi-Caldogno F, Pugliarello MC, Olivari C, De Michelis MI (1993): Controlled proteolysis mimics the effects of fusaric acid on the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol.* 103: 391-398

Rose JKC, Bashir S, Giovannoni JJ, Jahn MM, Saravanan RS (2004): Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant J.* 39: 715-733

Sandelius AS, Morré DJ (1990): Plasma membrane isolation. In: *The Plant Plasma Membrane* (C Larsson, IM Møller, eds.). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 44-75

Santi S, Locci G, Monte R, Pinton R, Varanini Z (2003): Induction of nitrate uptake in maize roots: expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isoforms. *J. Exp. Bot.* 54: 1851-1864

Santi S, Locci G, Pinton R, Cesco S, Varanini Z (1995): Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in maize roots induced for NO<sub>3</sub>-uptake. *Plant Physiol.* 109: 1277-1283

Santoni V, Kieffer S, Desclaux D, Masson F, Rabilloud T (2000b): Membrane proteomics: Use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties. *Electrophoresis* 21: 3329-3344

Santoni V, Molloy M, Rabilloud T (2000a): Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible? *Electrophoresis* 21: 1054-1070

Schrattenholz, A (2001): Methoden der Proteomforschung. Molekulare Analyse der Proteinexpression. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin

Schaller GE, Sussman MR (1988): Phosphorylation of the plasma membrane  $H^+$ -ATPase of oat roots by a calcium-stimulated protein kinase. *Planta* 173: 509-518

Schubert S, Schubert E, Mengel K (1990): Effect of low pH of the root medium on proton release, growth, and nutrient uptake of field beans (*Vicia faba*). *Plant Soil* 124: 239-244

Schubert S, Yan F (1997): Nitrate and ammonium nutrition of plants: Effects on acid/base balance and adaptation of root cell plasmalemma  $H^+$ -ATPase. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.* 160: 275-281

Serrano R (1989): Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 61-94

Shaw MM, Riederer BM (2003): Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 3: 1408-1417

Sondergaard TE, Schulz A, Palmgren MG (2004): Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane  $H^+$ -ATPase. *Plant Physiol.* 136: 2475-2482

Sussman MR (1994): Molecular analysis of proteins in the plant plasma membrane. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 211-234

Svennelid F, Olsson A, Piotrowski M, Rosenquist M, Ottman C, Larsson C, Oecking C, Sommarin M (1999): Phosphorylation of Thr-948 at the C-terminus of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase creates a binding site for the regulatory 14-3-3 Protein. *Plant Cell* 11: 2379-2391

Sze H, Li X, Palmgren MG (1999): Energization of plant cell membranes by H<sup>+</sup>-pumping ATPases: Regulation and biosynthesis. *Plant Cell* 11: 677-689

Weiss M, Pick U (1996): Primary structure and effect of pH on the expression of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from *Dunaliella acidophila* and *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* 112: 1693-1702

Westermeier R (2001): *Electrophoresis in Practice*. Third Edition. Wiley-VCH Verlag GmbH Weinheim

Yan F, Feuerle R, Schäffer S, Fortmeier H, Schubert S (1998): Adaptation of active proton pumping and plasmalemma ATPase activity of corn roots to low root medium pH. *Plant Physiol.* 117: 311-319

Yan F, Schubert S, Mengel K (1992): Effect of low root medium pH on net proton release, root respiration, and root growth of corn (*Zea mays* L.) and broad bean (*Vicia faba* L.). *Plant Physiol.* 99: 415-421

Yan F, Zhu Y, Müller C, Zörb C, Schubert S (2002): Adaptation of H<sup>+</sup>-pumping and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. *Plant Physiol.* 129: 50-63

Young JC, DeWitt ND, Sussman MR (1998): A transgene encoding a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase that confers acid resistance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Genetics* 149: 501-507

Zhang W, Zhou G, Zhao Y, White MA, Zhao Y (2003): Affinity enrichment of plasma membrane for proteomics analysis. *Electrophoresis* 24: 2855-2863

## **Danksagung**

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Sven Schubert für die Überlassung des Themas, die Betreuung und Unterstützung und die stete Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion bedanken.

Herrn Prof. Dr. Gottfried Wagner gilt mein Dank für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Dr. Joachim Wiese danke ich für die vielen Hilfestellungen experimenteller Natur, Ratschläge, Anregungen, stete Diskussionsbereitschaft und die kritische Durchsicht meines Manuskripts.

Bei Herrn Dr. Feng Yan bedanke ich mich für die vielen hilfreichen Ratschläge und Anregungen und die jederzeit gewährte Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Christian Zörb danke ich für seine Ratschläge, Anregungen und seine jederzeit gewährte Bereitschaft zur Erörterung fachlicher und experimenteller Problemstellungen.

Herrn Prof. Dr. Karl Hermann Mühling danke ich für die guten Ratschläge und die Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau Tina Volk bin ich durch ihre tatkräftige und zuverlässige Unterstützung im Labor, das angenehme Arbeitsklima, ihre stete Diskussionsbereitschaft zu Problemen fachlicher und privater Natur, ihre guten Ratschläge und ihre Hilfe am Computer zu großem Dank verpflichtet.

Bei Frau Christa Lein möchte ich mich ganz herzlich für ihre Hilfe im Labor, das stets offene Ohr bei Problemen experimenteller oder privater Natur und das angenehme Laborklima bedanken.

Frau Verena Lichtenfels danke ich für die Unterstützung der Laborarbeit bei der Amplifikation der Plasmalemma- $H^+$ -ATPase mittels PCR.

Bei Frau Dr. Heike Wiese bedanke ich mich für ihre Unterstützung, ihre stetige Hilfsbereitschaft und ihr offenes Ohr in fachlichen und privaten Dingen.

Bei Herrn Dr. Edgar Peiter möchte ich mich ganz herzlich für die Organisation des Maissaatgutes der Sorte Blizzard bedanken.

Frau Dipl.-Biol. Sandra Karl danke ich für hilfreiche Tipps und Erläuterungen im Labor und das angenehme Klima während unserer gemeinsamen Bürozeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Pflanzenernährung in Gießen danke ich für die ständige Diskussionsbereitschaft, das angenehme Arbeitsklima und die stets freundliche Unterstützung bei Problemen jeglicher Art.

Ein großes Danke auch an meine Eltern, meine Geschwister, meinen Schwager und meine Nichte für die jederzeit dargebrachte Unterstützung, Hilfe und Aufmunterung.

Ein riesengroßes Dankeschön gilt meinem Mann Oliver für die zu jeder Tages- und Nachtzeit gewährte Diskussionsbereitschaft. Weiterhin vielen herzlichen Dank für die kritische Durchsicht des Manuskripts dieser Arbeit und die Aufmunterung und moralische Unterstützung in Zeiten, in denen es mal nicht so geklappt hat, wie ich wollte.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Caroline Krämer, geb. Müller  
Geburtsdatum: 04.11.1976 in Frankfurt / Main  
Familienstand: verheiratet

### Schulbildung

1983 – 1987 Besuch der Friedrich-Ebert-Grundschule / Schöneck  
1987 – 1989 Besuch der John-F.-Kennedy-Schule (Förderstufe) / Bad  
Vilbel  
1989 – 1996 Besuch des Georg-Büchner-Gymnasiums / Bad Vilbel

### Studium

1996 – 2001 Studium der Ökotoxikologie an der Justus-Liebig-Universität  
Giessen  
seit 01.05.2001 Promotion am Institut für Pflanzenernährung der Justus-  
Liebig-Universität Giessen.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Ort, Datum

Unterschrift: .....

Caroline Krämer