

Universität Potsdam
Institut für Biochemie und Biologie
Arbeitsgruppe Zoophysologie

Regulation der vakuolären H⁺-ATPase durch reversible Proteinphosphorylierung

- Dissertation -

zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin „Zoophysologie“

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von

Martin Voß

Potsdam, im Mai 2008

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen
Bedingungen 2.0 Deutschland

Um die Lizenz anzusehen, gehen Sie bitte zu:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.0/de/>

Elektronisch veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2008/1961/>

urn:nbn:de:kobv:517-opus-19617

[<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-19617>]

Zusammenfassung

Die vakuoläre Protonen-ATPase, kurz V-ATPase, ist ein multimerer Enzymkomplex, der in fast jeder eukaryotischen Zelle zu finden ist und den aktiven elektrogenen Transport von Protonen über Membranen katalysiert. Die Aktivität der V-ATPase ist essentiell für eine Vielzahl physiologischer Prozesse. Ein grundlegender Mechanismus zur Regulation der V-ATPase-Aktivität ist die reversible Dissoziation des Holoenzym in den integralen V_O -Komplex, der als Protonenkanal dient, und den cytosolischen V_1 -Komplex, der ATP hydrolysiert und somit den Protonentransport energetisiert. Die Untereinheit C, die im dissoziierten Zustand der V-ATPase als einzige Untereinheit isoliert im Cytoplasma vorliegt, scheint bei der Bildung des aktiven Holoenzym eine Schlüsselrolle zu übernehmen. In den Speicheldrüsen der Schmeißfliege *Calliphora vicina* ist die V-ATPase an der Speichelsekretion beteiligt. In den sekretorischen Zellen wird die Bildung des V-ATPase-Holoenzym in der apikalen Plasmamembran durch das Neurohormon Serotonin (5-HT) stimuliert. Der Effekt von 5-HT auf die V-ATPase wird intrazellulär durch die Proteinkinase A (PKA) vermittelt und hält nur für die Dauer der Stimulierung an.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Phosphoproteinfärbungen und 2D-Elektrophorese nachgewiesen, dass infolge einer Stimulierung der Drüsenzellen mit 5-HT die Untereinheit C der V-ATPase durch die PKA reversibel phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung geht einher mit einer Umverteilung der Untereinheit C aus dem Cytoplasma zur apikalen Plasmamembran und der Bildung des aktiven Holoenzym. Immuncytochemische Untersuchungen zeigten, dass die katalytische Untereinheit der PKA ebenfalls umverteilt wird und in stimulierten Zellen im Bereich der apikalen Plasmamembran konzentriert vorliegt. Um herauszufinden welche Proteinphosphatase der PKA entgegenwirkt, wurden luminale pH-Messungen durchgeführt und der Effekt von spezifischen Proteinphosphatase-Inhibitoren und veresterten Komplexbildnern zweiwertiger Kationen auf die V-ATPase-Aktivität untersucht. Diese Messungen führten zu der Schlussfolgerung, dass eine Proteinphosphatase des Typs 2C an der Inaktivierung der V-ATPase beteiligt ist. Mit weiteren Phosphoproteinfärbungen konnte gezeigt werden, dass die Dephosphorylierung der Untereinheit C ebenfalls durch eine Proteinphosphatase 2C katalysiert wird und dies vermutlich die Dissoziation des V_O - und V_1 -Komplexes begünstigt. Darüber hinaus konnte durch luminale pH-Messungen und ergänzende biochemische Untersuchungen eine Calcineurin-vermittelte Modulation des cAMP/PKA-Signalweges durch den parallel aktivierten IP_3/Ca^{2+} -Signalweg und damit einhergehend eine Beeinflussung der V-ATPase-Aktivität durch den $[Ca^{2+}]$ -Spiegel nachgewiesen werden.

Abstract

The vacuolar-type H⁺-ATPase (V-ATPase) is a multimeric enzyme that can be found in nearly every eukaryotic cell. It catalyses the active electrogenic transport of protons across membranes and is essential for a multitude of physiological processes. A fundamental mechanism to regulate V-ATPase activity is the reversible dissociation of the holoenzyme into an integral proton conducting V_O-complex and a cytosolic V₁-complex that hydrolyses ATP and thus energises proton translocation. Subunit C occurs isolated in the cytoplasm upon dissociation of the V-ATPase complexes and seems to be critical for the formation of active holoenzymes. In the salivary glands of the blowfly *Calliphora vicina* the V-ATPase is involved in fluid secretion. In secretory cells, formation of the V-ATPase holoenzyme is stimulated by the hormone serotonin (5-HT). The effect of 5-HT on V-ATPase activity is mediated by protein kinase A (PKA) and persists for the duration of the 5-HT stimulus.

In this study, it was shown by phosphoprotein stainings and two-dimensional electrophoresis that subunit C of the V-ATPase becomes phosphorylated by PKA upon exposure of blowfly salivary glands to 5-HT. Parallel to the phosphorylation event, subunit C translocates from the cytoplasm to the apical plasma membrane for the assembly of active V-ATPase holoenzymes. Using immunofluorescence staining, it could be shown that PKA catalytic subunit translocates as well to the apical membrane upon 5-HT stimulation. To examine which protein phosphatase counteracts PKA, luminal pH-measurements were carried out. Based on the results with protein phosphatase inhibitors and esterified chelating agents of bivalent cations, it may be concluded that a protein phosphatase 2C is involved in the process leading to V-ATPase inactivation. Phosphoprotein stainings revealed that dephosphorylation of subunit C is likewise catalysed by a protein phosphatase 2C. Therefore the dephosphorylation of subunit C seems to promote dissociation of V_O- and V₁-complexes. Finally, luminal pH-measurements and supplemental biochemical experiments revealed a Ca²⁺/calcineurin-mediated modulation of the cAMP/PKA signalling cascade and an influence of intracellular calcium on the V-ATPase activity.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die physiologische Bedeutung der V-ATPase	1
1.2 Die Struktur und Funktionsweise der V-ATPase	4
1.3 Die Regulation der V-ATPase-Aktivität	7
1.4 Die V-ATPase in den Speicheldrüsen von <i>Calliphora vicina</i>	11
1.5 Die Zielstellung dieser Arbeit	14
2. Material	
2.1 Lösungen und Puffer	15
2.2 Versuchstiere und Präparation	17
2.3 Verwendete Antikörper	18
2.4 Bezugsquellen von Chemikalien.....	19
3. Methoden	
3.1 Mikrofluorometrische Messungen	20
3.2 Biochemische und zellbiologische Methoden	
3.2.1 PKA-Assay.....	21
3.2.2 <i>Pelleting Assay</i>	22
3.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	22
3.2.4 Isoelektrische Fokussierung.....	23
3.2.5 Phosphoprotein-Färbung	24
3.2.6 Coomassie-Färbung	24
3.2.7 <i>Western Blotting</i>	24
3.2.8 cAMP-Immunoassay.....	25
3.2.9 Herstellung von Gefrierschnitten.....	25
3.2.10 Immuncytochemie	25
3.3 Molekularbiologische Methoden	
3.3.1 mRNA-Isolierung und cDNA-Synthese	26
3.3.2 PCR mit degenerierten Primern.....	26
3.3.3 Agarosegelelektrophorese	27
3.3.4 DNA-Elution aus Agarosegelen	27
3.3.5 Ligation	28
3.3.6 Transformation kompetenter Zellen	28
3.3.7 Isolierung von Plasmid-DNA	28

4. Ergebnisse	
4.1 Die PKA-vermittelte Assemblierung und Aktivierung der V-ATPase	
4.1.1 Die Stimulus-induzierte Umverteilung der V-ATPase und der PKA	29
4.1.2 Die cAMP-vermittelte Assemblierung der V-ATPase	30
4.1.3 Die cAMP-vermittelte Aktivierung der V-ATPase	31
4.2 Die PKA-abhängige Phosphorylierung der V-ATPase	
4.2.1 Proteinphosphorylierungen in den <i>Calliphora</i> -Speicheldrüsen	35
4.2.2 Die Phosphorylierung der Untereinheit C	37
4.3 Die Proteinphosphatasen in <i>Calliphora</i>-Speicheldrüsen	
4.3.1 Die Regulation der V-ATPase durch Proteinphosphatasen	42
4.3.2 Die Dephosphorylierung der V-ATPase	48
4.3.3 Die Proteinphosphatase 2C in <i>Calliphora</i> -Speicheldrüsen	54
4.3.4 Die Funktion der Proteinphosphatase 2B in <i>Calliphora</i> -Speicheldrüsen	58
5. Diskussion	68
5.1 Die Steuerung der V-ATPase-Aktivität durch eine reversible Phosphorylierung der Untereinheit C	69
5.2 Die Funktion der phosphorylierten Untereinheit C	71
5.3 Räumliche Organisation der PKA-vermittelten Aktivierung der V-ATPase in <i>Calliphora</i> -Speicheldrüsen	75
5.4 Die Bedeutung des cAMP/PKA-Signalweges zur Regulation der V-ATPase in anderen Systemen	77
5.5 Die Dephosphorylierung der Untereinheit C durch eine Proteinphosphatase 2C	78
5.6 Die Verknüpfung der PKA-vermittelten V-ATPase-Aktivierung mit dem IP ₃ /Ca ²⁺ -Signalweg	83
5.7 Die möglichen Zielproteine der Proteinphosphatase 2B	86
5.8 Ausblick	89
6. Literaturverzeichnis	90
7. Anhang	
7.1 Abkürzungsverzeichnis	103
7.2 Immunocytochemie mit passender Farbgebung für Dyschromatopsie	105
7.3 Erstellung der degenerierten <i>Primer</i>	106
7.4 Sequenzen der PCR-Fragmente mit PP2C-Homologien	111
Lebenslauf	112
Publikationen	113
Erklärung über die Eigenständigkeit der Arbeit	114

1. Einleitung

In einem Organismus sind fast alle zellulären Prozesse vom pH-Wert der umgebenden Lösung abhängig. Beispielsweise laufen zahlreiche enzymatische Reaktionen unter Beteiligung von H^+ -Ionen ab. Weiterhin enthalten sowohl Enzyme als auch viele Substrate ionisierbare Gruppen mit charakteristischen pK_a -Werten. Der pH-Wert bestimmt somit die Löslichkeit, die Bindungseigenschaften und sogar die Struktur dieser Moleküle. Die Konzentration der H^+ -Ionen im Cytoplasma, in den intrazellulären Kompartimenten sowie in der extrazellulären Flüssigkeit multizellulärer Organismen erfordert daher eine genaue Regulierung. Eine Zelle muss in der Lage sein, den pH-Wert eines bestimmten Milieus konstant zu halten beziehungsweise den jeweiligen Erfordernissen anzupassen. An der Membran von aneinander grenzenden Kompartimenten kommt es dabei zu erheblichen Unterschieden in der Konzentration der H^+ -Ionen. Diese pH-Gradienten sind essentiell für den Stofftransport einer Zelle. Ein Protein, das wesentlich zum Aufbau von pH-Gradienten beiträgt, ist die V-Typ H^+ -ATPase (V-ATPase). Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen die Mechanismen zur Kontrolle der V-ATPase-Aktivität aufzuklären.

1.1 Die physiologische Bedeutung der V-ATPase

Die V-ATPase ist ein ubiquitäres Enzym, das in nahezu jeder eukaryotischen Zelle zu finden ist und die Energie aus der Hydrolyse von ATP für den aktiven elektrogenen Transport von Protonen über biologische Membranen nutzt (*Review*: Finbow & Harrison, 1997). Durch die Aktivität der V-ATPase wird ein elektrochemischer Protonengradient geschaffen, der zahlreiche sekundär-aktive Protonen-abhängige Sym- und Antiporter sowie Kanal-vermittelte Transportsysteme energetisiert (Harvey & Wieczorek, 1997).

Erste Hinweise auf das Vorkommen einer ATP-abhängigen Protonen-Pumpe lieferten Arbeiten am bovinen Nebennierenmark, in dessen endokrinen Zellen der Transport von Catecholaminen in sekretorische Granula von der V-ATPase abhängig ist (Kirschner, 1962; Bashford *et al.*, 1975). Nachfolgend wurde die V-ATPase vor allem in mikrosomalen Vesikeln und Vakuolen von Pilzen und Pflanzen nachgewiesen (*Review*: Beyenbach & Wieczorek, 2006). Ausgehend von diesen Arbeiten wurde die neu entdeckte Protonen-Pumpe als vakuoläre (V-Typ) Protonen-ATPase (Pedersen & Carafoli, 1987), kurz V-ATPase, klassifiziert (Nelson, 1989).

Kennzeichnend für die V-ATPase ist die enorme Vielfalt physiologischer Prozesse, die an ihre Aktivität gekoppelt sind. So ist die Ansäuerung der Vakuole in Pflanzen und Pilzen für

den Abbau von Makromolekülen sowie die Aufnahme von Ionen, Aminosäuren, Speicher- und Abwehrstoffen erforderlich (Klionsky *et al.*, 1990; Taiz, 1992). Bei Protozoen werden kontraktile Vakuolen, die Grundlage für eine funktionierende Osmoregulation sind, ebenfalls durch die V-ATPase energetisiert (Klionsky *et al.*, 1990; Taiz, 1992; Fok *et al.*, 1995). In allen eukaryotischen Organismen ist das saure Milieu in Endo- und Lysosomen, im Golgi-Apparat und in sekretorischen Vesikeln für den Transport, die Modifizierung, die Aktivierung und die Sekretion von Proteinen notwendig (Mellman *et al.*, 1986; Mellman, 1992; Johnson *et al.*, 1993; Schoonderwoert *et al.*, 2000). Sowohl in endokrinen Drüsen als auch in Nervenzellen hängt die Aufnahme von biogenen Aminen und Neurotransmittern in sekretorische beziehungsweise synaptische Vesikel von der V-ATPase-Aktivität ab (Kanner *et al.*, 1980; Cidon & Sihra, 1989; Cidon *et al.*, 1991; *Review*: Parsons, 2000). Die Aufnahme der Amine in die Vesikel kann dabei aufgrund des Protonengradienten erfolgen oder durch das entstehende Membranpotential angetrieben werden (*Review*: Moriyama *et al.*, 1992).

Die V-ATPase ist nicht nur in Endomembransystemen aktiv. Bei bestimmten Zellen ist sie auch in der Plasmamembran lokalisiert und trägt hier zu Zell-spezifischen Funktionen bei. In der Niere von Säugetieren ist die V-ATPase im Bereich des proximalen und distalen Tubulus sowie des Sammelrohrs in der Apikalmembran der Schaltzellen lokalisiert und an der Regulation des Säure-Base-Haushaltes beteiligt (*Review*: Wagner *et al.*, 2004). Die V-ATPase-abhängige Ansäuerung des Lumens der Nebenhoden im Reproduktionstrakt von männlichen Säugetieren und Insekten schafft ein geeignetes Milieu für die Reifung und Speicherung von Samenzellen (Brown *et al.*, 1992; Breton *et al.*, 1996; Bebas *et al.*, 2002; *Reviews*: Brown *et al.*, 1997; Da Silva *et al.*, 2007). Osteoklasten, die für den Abbau der Knochensubstanz verantwortlich sind, besitzen eine teilweise stark gefaltete Plasmamembran, die mit V-ATPase-Molekülen angereichert ist. Protonen werden in den umgebenden Extrazellulärraum transportiert und durch das entstehende Membranpotential folgen Cl⁻-Ionen nach. Durch die sezernierte Salzsäure wird die Knochenmatrix aufgelöst und kann von den Osteoklasten resorbiert werden (Blair *et al.*, 1989; *Review*: Xu *et al.*, 2007). Weitere Beispiele für Zellen mit einer Plasmamembran-lokalisierten V-ATPase sind Makrophagen (Swallow *et al.*, 1990), Gangzellen von ekkrinen Schweißdrüsen (Granger *et al.*, 2002) und mikrovaskuläre Endothelzellen, die während der Angiogenese einer sehr sauren extrazellulären Flüssigkeit ausgesetzt sind (Rojas *et al.*, 2006).

Neben ihrer Bedeutung hinsichtlich pH-Regulation und Protonensekretion übernimmt die V-ATPase in zahlreichen Epithelien die Aufgabe der Na⁺/K⁺-ATPase und generiert über die Plasmamembran das Membranpotential, welches die sekundär-aktiven Transportprozesse

antreibt (*Reviews*: Wieczorek *et al.*, 1999; Beyenbach & Wieczorek, 2006). Diese Funktion der V-ATPase wurde erstmals im Mitteldarmepithel der Larven des Tabakswärmers *Manduca sexta* charakterisiert (Wieczorek *et al.*, 1991). Die V-ATPase tritt hier in sehr hoher Konzentration in der Apikalmembran von Becherzellen auf. Der Transport von H^+ -Ionen aus den Zellen erzeugt ein Membranpotential, das den aktiven elektrogenen Transport von K^+ -Ionen über einen $K^+/2H^+$ -Austauscher in das Lumen des Mitteldarms antreibt. Das K^+ -Potential und der K^+ -Konzentrationsgradient werden für die Aufnahme von Aminosäuren in die angrenzenden Säulenzellen genutzt. Weitere Epithelien, bei denen der Ionentransport auf dem V-ATPase-abhängigen Membranpotential beruht, sind die Speicheldrüsen von Insekten (Zimmermann *et al.*, 2003), die Malpighischen Gefäße Blut-saugender Insekten (*Reviews*: Madrell & O'Donnell, 1992; Beyenbach, 2001), die Haut von Amphibien sowie das Kiemenepithel von Krebsen und Fischen (*Reviews*: Ehrenfeld & Klein, 1997; Ehrenfeld, 1998; Kirschner, 2004).

Bei der Vielfalt der zellulären Funktionen, die von der V-ATPase abhängig sind, ist es naheliegend, dass dieses Protein auch eine pathophysiologische Bedeutung besitzt. So können genetische Defekte zu einem Ausfall der V-ATPase in der Niere führen und somit eine renale Azidose auslösen, die ernste Konsequenzen für den pH- und Ionenhaushalt des Körpers nach sich zieht (Karet *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000). Bei der Marmorknochenkrankheit, im medizinischen Jargon als Osteopetrosis bezeichnet, ist der Knochenabbau gestört und führt zu multiplen Krankheitserscheinungen wie Blutarmut und Hypokalzämie. Diese vererbte Krankheit beruht ebenfalls auf Mutationen in V-ATPase-Genen (Li *et al.*, 1999; Frattini *et al.*, 2000). Neben den genetischen Defekten und den daraus resultierenden Dysfunktionen kann die volle Funktionsfähigkeit der V-ATPase allerdings auch notwendig sein, um das Auftreten und die Entwicklung bestimmter Krankheiten zu ermöglichen. So ist die Ansäuerung von endosomalen Kompartimenten für einige Viren und mikrobielle Toxine notwendig, um eine Zielzelle zu infizieren beziehungsweise sich in dieser zu vermehren (Perez & Carrasco, 1994; Prchla *et al.*, 1994; Guinea & Carrasco, 1995; Martinez *et al.*, 1996; Abrami *et al.*, 2004). In metastasierenden Tumorzellen wird die V-ATPase ebenfalls in der Plasmamembran exprimiert und ist an der Regulation des cytoplasmatischen pH-Wertes beteiligt (Sennoune *et al.*, 2004). Zudem scheint die Sekretion und Aktivierung von Cathepsinen, die das umgebende gesunde Gewebe zerstören, ein saures extrazelluläres Milieu zu erfordern. Der Transport von H^+ -Ionen in den Extrazellularraum durch die V-ATPase unterstützt somit die Ausbreitung der Tumorzellen. Die V-ATPase erlangt daher zunehmende Bedeutung in der Erforschung von Krebserkrankungen beziehungsweise deren Therapie.

1.2 Die Struktur und Funktionsweise der V-ATPase

In allen eukaryotischen Organismen ist die V-ATPase prinzipiell gleich aufgebaut. Es ist ein heteromultimeres Enzym, das sich aus einem integralen V_0 -Komplex und einem peripheren cytosolischen V_1 -Komplex zusammensetzt (Abb. 1.1; *Reviews*: Ratajczak, 2000; Wieczorek *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2003; Kane, 2006; Xu *et al.*, 2007). Die Bezeichnung der Komplexe orientiert sich an der F-ATPase (ATP-Synthase), die sowohl strukturell als auch funktionell mit der V-ATPase verwandt ist und ebenfalls aus einem F_0 - und F_1 -Komplex besteht. Der F_1 -Komplex wurde als „erster“ entscheidender Faktor der oxidativen Phosphorylierung identifiziert und der Index in F_0 -Komplex steht für dessen Empfindlichkeit gegenüber dem Antibiotikum „Oligomycin“ (Nelson & Cox, 2001).

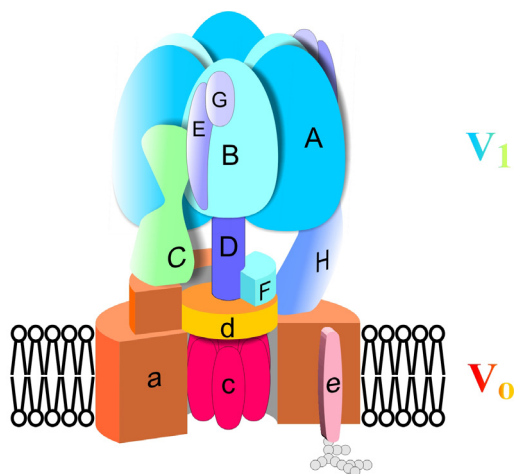


Abbildung 1.1: Strukturschema der V-ATPase

Der periphere V_1 -Komplex enthält acht verschiedene Untereinheiten, die alphabetisch mit A bis H bezeichnet werden und in der Stöchiometrie $A_3B_3C_1D_1E_2F_1G_2H_{1-2}$ (~ 650 kDa) auftreten. Die Untereinheiten A (66-70 kDa) und B (54-60 kDa) bilden in einer alternierenden Anordnung die hexamere „Kopf“-Domäne (~ 400 kDa). An den Grenzbereichen zwischen einer A- und einer B-Untereinheit befinden sich die ATP-Bindungsstellen. Die katalytische Aktivität zur Hydrolyse des ATP liegt dabei auf der Seite der Untereinheit A. Die Untereinheit B übernimmt bei der ATP-Bindung anscheinend eine modulatorische Funktion. Die Untereinheit D (29-36 kDa) ist teilweise zwischen den Untereinheiten der „Kopf“-Domäne lokalisiert und bildet zusammen mit der Untereinheit F (14 kDa) die zentrale „Stiel“-Domäne, die mit dem V_0 -Komplex interagiert. Eine weitere Verbindung zwischen dem V_0 - und V_1 -Komplex wird durch mindestens zwei periphere „Stiel“-Domänen hergestellt. Die peripheren „Stiel“-Domänen bestehen aus den Untereinheiten E (26-33 kDa) und G (12-16 kDa), die an der äußeren Oberfläche der B-Untereinheiten ansetzen und durch die

Untereinheit C (40-44 kDa) oder Untereinheit H (50-55 kDa) mit dem V_O -Komplex beziehungsweise der zentralen „Stiel“-Domäne verbunden werden.

Der integrale V_O -Komplex kann bis zu sechs verschiedene Untereinheiten enthalten, die als a, c, c', c'', e und d bezeichnet werden. In Hefe beträgt die Stöchiometrie der Untereinheiten im V_O -Komplex $a_1c_{4-5}c'_1c''_1e_1d_1$ (~ 250 kDa). Die Untereinheit c' kommt in höheren Eukaryoten nicht vor. Die Untereinheit a (95-110 kDa) enthält acht bis neun transmembrane Helices und im N-terminalen Bereich eine hydrophile Domäne, die cytoplasmatisch lokalisiert ist und mit den Untereinheiten C und H vom V_1 -Komplex interagiert. Die Untereinheiten c (16-17 kDa), c' (17 kDa) und c'' (18-23 kDa) sind sehr hydrophob und werden auch als Proteolipide bezeichnet. Die Proteolipide enthalten vier (c, c') beziehungsweise fünf transmembrane Helices (c'') und sind ringförmig angeordnet. Der Proteolipid-Ring und die Untereinheit a transportieren die H^+ -Ionen über die Membran. Die Untereinheit d (36-42 kDa) befindet sich oberhalb des Proteolipid-Ringes und stellt durch die Interaktion mit den Untereinheiten D und F eine Verbindung zur zentralen „Stiel“-Domäne her. Die Untereinheit e (8-9 kDa) ist ebenfalls in die Membran eingebettet und grenzt an die Untereinheit a. Für die Untereinheit e aus *Manduca sexta* wurde eine starke Protein-Glykosylierung (Σ 20 kDa) nachgewiesen (Merzendorfer *et al.*, 1999). Welche Funktion diese Untereinheit im V_O -Komplex beziehungsweise im Zusammenhang mit dem Holoenzym übernimmt, ist noch nicht bekannt. An der Bildung der eukaryotischen V-ATPase sind somit bis zu 14 verschiedene Proteine beteiligt. Das Holoenzym setzt sich aus 23 bis 25 Untereinheiten zusammen und hat eine Molekularmasse von etwa 900 kDa. Für viele Untereinheiten wurden Isoformen nachgewiesen, die für die Regulation und subzelluläre Verteilung der V-ATPase von Bedeutung sein können (Tab. 1.1).

Die katalytische Hydrolyse von ATP wird über einen Rotationsmechanismus mit dem Transport von H^+ -Ionen gekoppelt. Während der Katalyse dient die zentrale „Stiel“-Domäne als eine Art Rotor, der die Energie aus der ATP-Hydrolyse in der „Kopf“-Domäne in eine Rotation des Proteolipid-Ringes überträgt (Imamura *et al.*, 2003; Hirata *et al.*, 2003; Yokoyama *et al.*, 2003). Die peripheren „Stiel“-Domänen übernehmen die Aufgabe eines Stators und stabilisieren die „Kopf“-Domäne relativ zu den Untereinheiten a und e (Arata *et al.*, 2002a/b; Wilkens *et al.*, 2004; Inoue & Forgac, 2005).

Basierend auf der Funktionsweise der F-ATPase wurde für den Ablauf des Protonentransports durch die V-ATPase ein hypothetisches Modell erstellt (Reviews: Beyenbach & Wieczorek, 2006; Forgac, 2007). Die Untereinheit a bildet zwei wässrige „Halb“-Kanäle, die vom Cytoplasma beziehungsweise vom extrazellulären/luminalen Raum in die Membran

hineinragen, diese aber nicht vollständig durchspannen. Über diese „Halb“-Kanäle haben H^+ -Ionen Zugang zum Proteolipid-Ring. Die Transmembran-Helix 4 der Untereinheiten c und c' beziehungsweise die Transmembran-Helix 5 der Untereinheit c'' enthalten jeweils einen einzelnen Glutamat-Rest, der reversibel protoniert werden kann. Bei einer Rotation des Proteolipid-Ringes passieren die Glutamat-Reste den cytoplasmatischen „Halb“-Kanal, binden ein H^+ -Ion und bleiben bei fortschreitender Rotation aufgrund der nachfolgenden hydrophoben Umgebung in der Membran protoniert. Nach einer Rotation um fast 360° wird der extrazelluläre/luminale „Halb“-Kanal erreicht. Die Interaktion des protonierten Glutamat-Restes mit einem Arginin-Rest in der Transmembran-Helix 7 der Untereinheit a führt zum Abspalten des H^+ -Ions. Weitere geladene Reste im extrazellulären/luminalen „Halb“-Kanal leiten die H^+ -Ionen aus diesem heraus. Der Transport von zwei H^+ -Ionen pro hydrolysiertes ATP-Molekül entspricht der strukturellen Stöchiometrie von sechs Bindungsstellen für H^+ -Ionen im Proteolipid-Ring und drei ATP-Bindungsstellen in der „Kopf“-Domäne des V_1 -Komplexes (Tomashek & Brusilow, 2000).

Tabelle 1.1: Zusammenfassung der V-ATPase-Untereinheiten. Angegeben ist die Untereinheit (UE) mit der jeweiligen Molekularmasse (MW), der Funktion im Holoenzym und der Anzahl der bekannten Isoformen in *Saccharomyces cerevisiae* (S. c.), *Arabidopsis thaliana* (A. t.), *Paramecium tetraurelia* (P. t.), *Drosophila melanogaster* (D. m.) und *Mus musculus* (M. m.). Erstellt nach Smith *et al.*, 2003; Allen *et al.*, 2005; Wassmer *et al.*, 2007; Forgac, 2007.

UE	MW	Funktion	Isoformen				
			S. c.	A. t.	P. t.	D. m.	M. m.
V₁							
A	66-70	ATP-Hydrolyse, Stator, Regulation	1	1	4	3	1
B	54-60	ATP-Bindung, Stator	1	3	4	1	2
C	40-44	Stator, Regulation	1	1	1	1	2
D	29-36	Rotation	1	1	1	3	1
E	26-33	Stator	1	3	4	1	2
F	14	Rotation	1	1	2	2	1
G	12-16	Stator	1	3	(-) [‡]	1	3
H	50-55	Stator, Regulation	1	1	4	1	1
V₀							
a	95-110	H^+ -Transport	2	3	17	5	4
c	16-17	H^+ -Transport, Rotation	1	5	6	5	1
c'	17		1	-	-	-	-
c''	18-23		1	2	-	2	1
d	36-42	Rotor	1	2	3	1	2
e	8-9 (20)*	unbekannt	1	2	2	4	1

* glykolysierte Form, ‡ Sequenz nur gering konserviert

1.3 Die Regulation der V-ATPase-Aktivität

Aufgrund der essentiellen Bedeutung der V-ATPase für die Funktions- und Lebensfähigkeit einer Zelle muss die V-ATPase-Aktivität strikt reguliert werden. Zudem kann die V-ATPase einen wesentlichen Anteil am zellulären ATP-Verbrauch haben. Für eine Zelle ist es daher ökonomisch, die Aktivität der V-ATPase den jeweiligen Erfordernissen anzupassen. Beispielsweise verbraucht die V-ATPase im Mitteldarm der Larve von *Manduca sexta* während der Fressphase etwa 10% des im gesamten Organismus vorkommenden ATP (Dow, 1984). Während der Häutung findet keine Nahrungsaufnahme statt und die V-ATPase-Aktivität wird in dieser Zeit um bis zu 85% reduziert (Sumner *et al.*, 1995). Ein weiteres Beispiel sind die Speicheldrüsen der Schmeißfliege *Calliphora vicina*, in denen die V-ATPase an der Flüssigkeitssekretion beteiligt ist und dabei in den sekretorischen Zellen den überwiegenden Anteil des verfügbaren ATP verbraucht. Sind die Zellen jedoch sekretorisch inaktiv, wird der V-ATPase-abhängige ATP-Verbrauch um etwa 50% reduziert (Zimmermann *et al.*, 2003).

Die Untersuchungen der V-ATPase lieferten Hinweise auf sehr vielfältige Regulationsmechanismen. So wird in den Larven von *Manduca sexta* die Genexpression bestimmter V-ATPase-Untereinheiten hormonell kontrolliert (Merzendorfer *et al.*, 1997a; Reineke *et al.*, 2002). In Pflanzen kann die Expression von V-ATPase-Genen durch externe Einflüsse reguliert werden und wird vermutlich durch Phytohormone vermittelt (Review: Ratajczak, 2000). Weiterhin kann die Translationsrate von V-ATPase-Untereinheiten durch die Stabilität der mRNA und durch *Antisense*-RNA gesteuert werden (Merzendorfer *et al.*, 1997a/b; Wang *et al.*, 2002). In den neutrophilen Blutkörperchen, in Zellen der Säugerniere und der Harnblase von Amphibien sowie in den Epidymis-Zellen des Reproduktionstraktes männlicher Säugetiere ist eine weitere Variante der V-ATPase-Regulation zu finden. In diesen Zellen wird durch die Endo- und Exocytose V-ATPase-haltiger Vesikel die Menge der V-ATPase in der Plasmamembran verändert und somit der Protonentransport kontrolliert (Gluck *et al.*, 1982; Al-Awqati *et al.*, 1983; Nanda *et al.*, 1996; Review: Brown & Breton, 2000). Für die V-ATPase aus Pilzen, Pflanzen und Säugetieren wurde nachgewiesen, dass die Änderung des Redoxzustandes von Cystein-Resten in der Untereinheit A und die damit einhergehenden Ausbildung von Disulfidbrücken zu einer Hemmung der V-ATPase-Aktivität führt (Hager & Lanz, 1989; Yamanishi & Kasamo, 1992; Feng & Forgac, 1992a/b; Taiz *et al.*, 1994; Dschida & Bowman, 1995; Oluwatosin & Kane, 1997). Die Aktivität beziehungsweise die Effizienz der Kopplung zwischen ATP-Hydrolyse und Protonentransport kann auch durch

Anionen und das Membranpotential beeinflusst werden (Wang & Sze, 1985; Arai *et al.*, 1989; Kibak *et al.*, 1993).

Ein weiterer Mechanismus für die Regulation der V-ATPase-Aktivität ist die reversible Dissoziation des Holoenzym in den V_0 - und V_1 -Komplex. Bei diesem Prozess löst sich der periphere V_1 -Komplex vom membranständigen V_0 -Komplex ab und es kommt zu einer Inaktivierung der Protonen-Pumpe (Abb. 1.2). Im dissoziierten Zustand ist der V_0 -Komplex undurchlässig für H^+ -Ionen und der cytoplasmatisch vorliegende V_1 -Komplex zeigt keine ATPase-Aktivität (Beltran & Nelson, 1992; Zhang *et al.*, 1992; Gräf *et al.*, 1996).

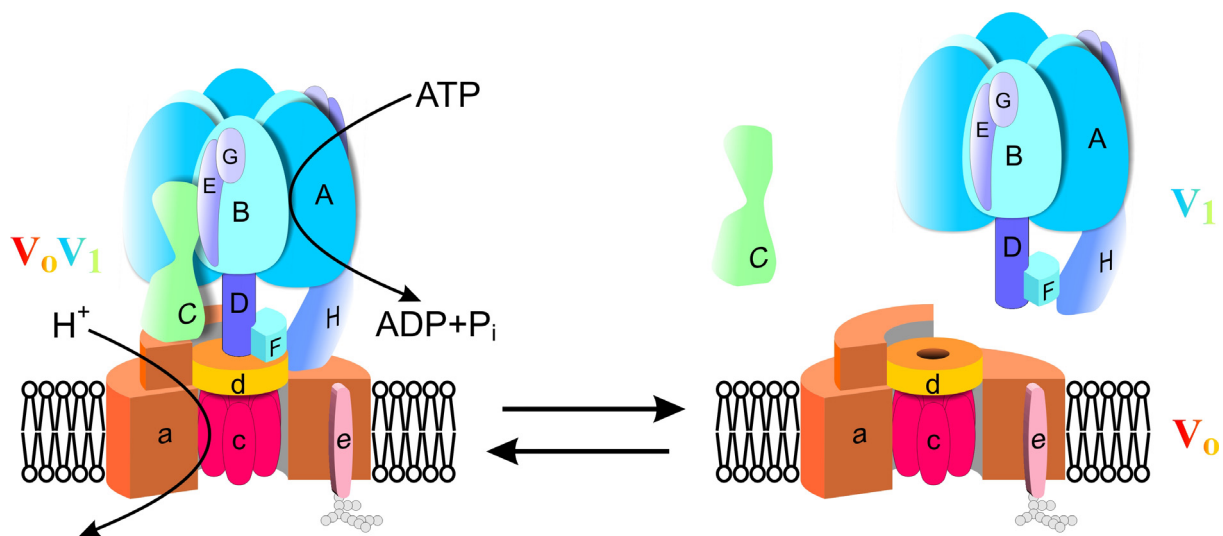


Abbildung 1.2: Die reversible Dissoziation der V-ATPase. Im aktiven Zustand wird die Hydrolyse von ATP mit dem Transport von Protonen gekoppelt. Im dissoziierten Zustand ist der V_1 -Komplex katalytisch inaktiv und der V_0 -Komplex ist undurchlässig für Protonen. Bei der reversiblen Dissoziation löst sich die Untereinheit C vom V_1 -Komplex ab.

Erste Hinweise auf eine reversible Dissoziation lieferten Arbeiten am isolierten Enzym, dessen Inkubation bei Temperaturen um 0°C oder Behandlung mit chaotropen Salzen offenbar zu einer Trennung der Komplexe führt (Moriyama & Nelson, 1989; Adachi *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1992). Die physiologische Relevanz dieser Art der Regulation wurde erstmals bei der Larve von *Manduca sexta* nachgewiesen, in deren Mitteldarm die reversible Dissoziation der V-ATPase-Komplexe während der Hunger- und Häutungsphasen auftritt (Sumner *et al.*, 1995). Ein weiteres Beispiel für die reversible Dissoziation der V-ATPase bei Insekten sind die Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*. In diesem System wird für die Dauer der Speichelsekretion die Bildung des aktiven Holoenzym aus dem V_0 - und V_1 -Komplex durch das Hormon Serotonin stimuliert (Zimmermann *et al.*, 2003; Rein *et al.*, 2006). In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* erfolgt die reversible Dissoziation der V-ATPase bei einem Mangel von Glucose und läuft innerhalb weniger Minuten ab (Kane, 1995). Eine

Veränderung im Assemblierungsstatus in Abhängigkeit von der Glucose-Verfügbarkeit tritt auch in der Säugerzelllinie LLC-PK1 des Nierenepithels auf (Sautin *et al.*, 2005). Das Auftreten dieser Art der V-ATPase-Regulation in solch unterschiedlichen Zelltypen beziehungsweise Organismen impliziert, dass es sich bei der reversiblen Dissoziation um eine allgemeine Eigenschaft der V-ATPase handelt.

Die reversible Dissoziation der V-ATPase in Abhängigkeit von der Glucose-Verfügbarkeit wurde vor allem in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. In der Hefe erfolgen die Dissoziation und die Assoziation der Komplexe unabhängig voneinander und die beiden Prozesse werden durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt. So sind am Dissoziationsprozess Mikrotubuli beteiligt, wohingegen die Reassoziaton unter Beteiligung des RAVE-Komplexes abläuft (Xu & Forgac, 2001; Seol *et al.*, 2001). Der RAVE-Komplex (*Regulator of the H⁺-ATPase of vacuolar and endosomal membranes*) ist ein heterotrimeres Protein, das den V₁-Komplex im Cytosol bindet und auch an dessen Assemblierung aus neu synthetisierten Untereinheiten mitwirkt (Smardon *et al.*, 2002).

Wie die Änderung in der Glucose-Verfügbarkeit an die beteiligten Protein-Komplexe vermittelt wird, ist bisher nicht eindeutig geklärt. An diesem Prozess sind jedoch keine Signalwege beteiligt, die üblicherweise durch einen Nährstoffmangel aktiviert werden (Kane, 2006). Es ist bekannt, dass die Untereinheit A vom V₁-Komplex und Isoformen der Untereinheit a vom V_O-Komplex einen Einfluss auf den Dissoziationsprozess haben und möglicherweise Glucose direkt binden (Kawasaki-Nishi *et al.*, 2001; Shao *et al.*, 2003; Shao & Forgac, 2004; Forgac, 2007). Für einige V-ATPase-Untereinheiten wurde die Wechselwirkung mit Enzymen aus der Glykolyse nachgewiesen. Die Glucose-Verfügbarkeit kann somit auch indirekt vermittelt werden (Lu *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2007). So können die V-ATPase-Untereinheiten B, E und a an das Enzym Aldolase binden (Lu *et al.*, 2004) und für die Untereinheit a wurde weiterhin eine Interaktion mit der Phosphofruktokinase-1 nachgewiesen (Su *et al.*, 2003). Die reversible Dissoziation der V-ATPase und die damit einhergehende Verminderung im zellulären ATP-Verbrauch können auch direkt durch die Konzentration von ADP im Cytosol beeinflusst werden (Huss & Wiczorek, 2007). Eine Abhängigkeit der Aktivität vom zellulären ATP/ADP-Verhältnis wurde bei der V-ATPase aus Säugetieren, Pflanzen, Hefe und Insekten beobachtet (Moriyama & Nelson, 1987; David & Baron, 1994; Dietz *et al.*, 1998; Kettner *et al.*, 2003; Huss & Wiczorek, 2007).

Hinsichtlich der Regulation der V-ATPase-Aktivität durch die reversible Dissoziation ist möglicherweise die Untereinheit C ein entscheidender Faktor. Die Untereinheit C wird strukturell als Teil vom V₁-Komplex angesehen. In der assemblierten V-ATPase interagiert

dieses Protein mit den Untereinheiten E, G und a und stabilisiert somit die Verknüpfung zwischen dem V_0 - und V_1 -Komplex (Inoue & Forgac, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Bei einer Dissoziation der Komplexe löst sich die Untereinheit C jedoch ab und liegt dann unabhängig von den übrigen V-ATPase-Komponenten in der Zelle vor (Kane, 1995; Gräf *et al.*, 1996). Die isolierte, cytoplasmatische Lokalisierung der Untereinheit C impliziert eine Sonderstellung hinsichtlich der V-ATPase-Regulation.

Eine weiteres Merkmal der Untereinheit C ist die Bindung an Aktin (Vitavska *et al.*, 2003). Für die Interaktion mit Aktin-Filamenten kann die Untereinheit C sowohl Bestandteil des V-ATPase-Holoenzym sein als auch isoliert im Cytoplasma vorliegen. Die Wechselwirkung der Untereinheit C in der assemblierten V-ATPase mit dem Aktin-Cytoskeletts kann dazu beitragen den V_1 -Komplex bei einer Rotation der zentralen „Stiel“-Domäne und des Proteolipid-Ringes zu stabilisieren (Beyenbach & Wieczorek, 2006; Drory & Nelson, 2006). An dieser Wechselwirkung ist möglicherweise auch die Untereinheit B beteiligt, die ebenfalls mit Aktin-Filamenten interagieren kann (Holliday *et al.*, 2000). Die dissoziierte, cytoplasmatisch vorliegende Untereinheit C ist zudem in der Lage monomeres Aktin zu binden und Aktin-Filamente zu vernetzen (Vitavska *et al.*, 2005). Dementsprechend wird auch eine Funktion der Untereinheit C bei der Organisation und der Regulation des Aktin-Cytoskeletts diskutiert.

Es wurde bereits erläutert, dass das zelluläre ATP/ADP-Verhältnis einen Einfluss auf die Aktivität der V-ATPase haben kann und die Untereinheit C besitzt diesbezüglich eine weitere, möglicherweise relevante Eigenschaft. Für die rekombinante Untereinheit C aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana* wurde die Bindung von Adenin-Nukleotiden und damit einhergehende Veränderungen in der Proteinstruktur nachgewiesen (Armbrüster *et al.*, 2005). Die Untereinheit C bindet dabei ADP mit einer höheren Affinität als ATP und wäre somit ein Sensor für das zelluläre ADP/ATP-Verhältnis. Diese Bindungseigenschaften werden dahingehend interpretiert, dass bei einer zu geringen ATP-Konzentration in der Zelle die strukturellen Veränderungen in der Untereinheit C aufgrund der ADP-Bindung zu einer Dissoziation der V-ATPase führen (Armbrüster *et al.*, 2005).

Die physiologische Relevanz einer Interaktion der Untereinheit C mit Aktin oder Adenin-Nukleotiden ist allerdings noch nicht konkret nachgewiesen. Es gibt bis *dato* auch keinerlei Hinweise, ob die Untereinheit C das Ziel für intrazelluläre Signalwege ist, durch die der Assemblierungsstatus und die Aktivität der V-ATPase gesteuert werden kann.

1.4 Die V-ATPase in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*

Die Speicheldrüsen der Fliege *Calliphora vicina* sind nunmehr seit fast vierzig Jahren ein etabliertes Modell für die Untersuchungen physiologischer Fragestellungen in sekretorisch aktiven Epithelien. Aufgrund ihrer morphologischen und physiologischen Eigenschaften sind sie ein ideales Modellsystem zur Untersuchung der Mechanismen, die zu einer Aktivierung der V-ATPase führen. Die nachfolgende Beschreibung der Morphologie und die Erläuterung der bekannten Transportmechanismen und zugehörigen Signalwege soll dies verdeutlichen.

Die *Calliphora*-Speicheldrüsen sind blind endende, paarige Tubuli, die ausgehend vom Abdomen durch den gesamten Thorax bis in den Kopf ziehen (Abb. 1.3 A). Im Kopfbereich vereinigen sich die Tubuli zu einem gemeinsamen Ausführgang und münden in den Hypopharynx. Der abdominale Abschnitt der Drüsen besteht aus einem einschichtigen Epithel gleichartig differenzierter Zellen, die ein Lumen umschließen (Abb. 1.3 B/C). Diese Zellen sind sekretorisch aktiv und bilden den KCl-reichen Primärspeichel (Berridge *et al.*, 1976). Die Oberfläche der Apikalmembran der sekretorischen Zellen wird durch Einfaltungen, die so genannten Canaliculi, stark vergrößert (Abb. 1.3 D/E). Die Canaliculi erstrecken sich weit in Richtung des basalen Zellpols und weisen einen Saum abgeflachter Mikrovilli auf, die als Micropliquae bezeichnet werden und die Oberfläche nochmals vergrößern (Oschman & Berridge, 1970). Die Micropliquae sind dicht gepackt mit V-ATPase-Molekülen (Zimmermann *et al.*, 2003).

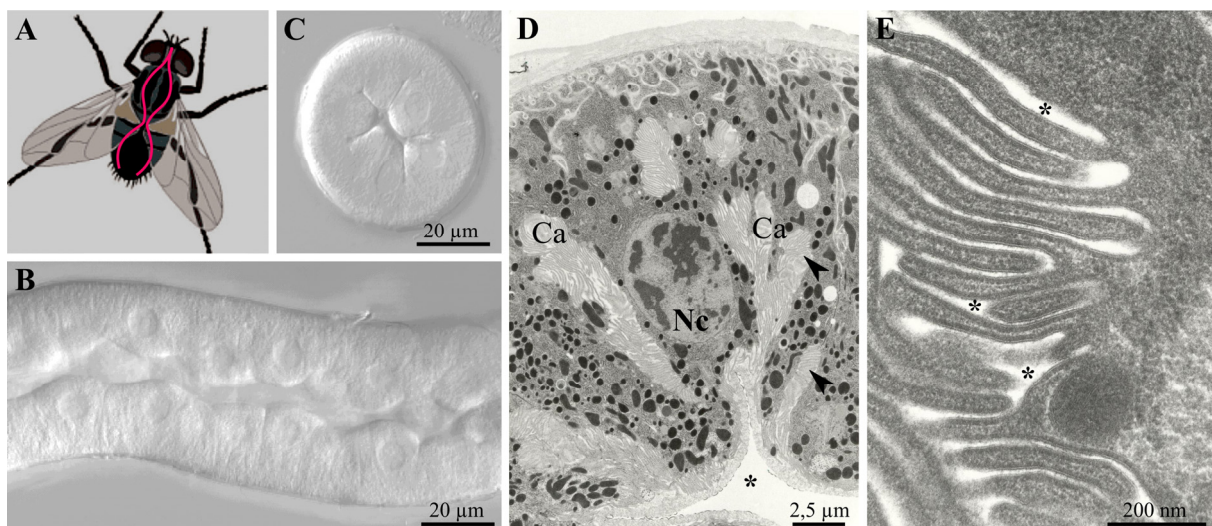


Abbildung 1.3: Die Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*. (A) Lage der paarigen Drüsen im intakten Tier. (B) Längsschnitt und (C) Querschnitt des Drüsenepithels im differentiellen Interferenzkontrast. (D) Elektronenmikroskopische Aufnahme einer sekretorischen Zelle; gekennzeichnet sind die Canaliculi (Ca), der Zellkern (Nc), das Drüsenlumen (Sternchen) und die Micropliquae (Pfeilspitze). (E) Elektronenmikroskopisches Bild der Micropliquae; das Drüsenlumen bildet in diesen Bereichen nur schmale Zwischenräume. Erstellt nach Zimmermann, 2000; Zimmermann *et al.*, 2003.

Die Aktivität der sekretorischen Zellen wird durch das Neurohormon Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) kontrolliert (Berridge & Patel, 1968). Es gibt keine direkte Innervation der Speicheldrüsen und das 5-HT wird vermutlich von neurosekretorischen Zellen eines Thorakalganglions in die Hämolymphe abgegeben (Oschman & Berridge, 1970; Duve *et al.*, 1988). In der basolateralen Membran der sekretorischen Zellen befinden sich zwei unterschiedliche Typen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, die 5-HT extrazellulär binden (Berridge, 1981; Berridge & Heslop, 1981). Im Folgenden werden diese Rezeptoren als 5-HT_{IP₃}- beziehungsweise 5-HT_{cAMP}-Rezeptor bezeichnet. Eine Stimulierung mit 5-HT induziert über diese Rezeptoren zwei parallel ablaufende Signalkaskaden (Abb. 1.4).

Die Bindung von 5-HT an den 5-HT_{IP₃}-Rezeptor führt zum Ablauf der Phosphoinositid-Kaskade. Bei dieser Signalkaskade wird über ein G-Protein die membranständige Phospholipase C aktiviert, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Inositoltrisphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) spaltet (Fain & Berridge, 1979). Die Bindung von IP₃ an die IP₃-Rezeptoren in der Membran vom endoplasmatischen Retikulum führt zu einer Freisetzung von Ca²⁺-Ionen (Zimmermann & Walz, 1997). Die Zunahme der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration führt schließlich zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit von Cl⁻-Kanälen in der Basal- und Apikalmembran (Berridge *et al.*, 1976). Über den 5-HT_{cAMP}-Rezeptor wird mittels cAMP der Assemblierungsstatus und die Aktivität der V-ATPase gesteuert (Dames *et al.*, 2006). Die Bindung von 5-HT an diesen Rezeptor führt über ein G-Protein zur Stimulierung einer Adenylatzyklase und somit zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Die Wirkung des cAMP auf die V-ATPase wird durch die Proteinkinase A (PKA) vermittelt (Rein *et al.*, 2008).

In sekretorisch inaktiven Zellen sind der V₁-Komplex und die Untereinheit C gleichmäßig im gesamten Cytoplasma verteilt, während der V₀-Komplex in den Microplacae lokalisiert ist. Das 5-HT induziert innerhalb von Minuten eine Umverteilung der cytoplasmatischen V-ATPase-Komponenten in die Microplacae, wo es zu einer Assemblierung und Aktivierung des Holoenzym kommt (Zimmermann *et al.*, 2003; Dames *et al.*, 2006). Der Transport von H⁺-Ionen über die Apikalmembran führt zu einer sehr schnellen luminalen Ansäuerung (Rein *et al.*, 2006). Der elektrochemische Protonengradient über die Apikalmembran energetisiert den Transport von K⁺-Ionen und Cl⁻-Ionen in das Lumen der Speicheldrüsen. Der K⁺-Transport erfolgt über einen putativen K⁺/nH⁺-Austauscher und der transzelluläre Cl⁻-Transport durch die Ca²⁺-abhängigen Cl⁻-Kanäle (Zimmermann *et al.*, 2003; Rein *et al.*, 2006). Wasser folgt dem Ionentransport passiv nach.

Der abdominale Abschnitt der Speicheldrüsen kann einfach und schnell isoliert werden und bleibt über Stunden in physiologischer Salzlösung funktionsfähig. Mit diesem Präparat steht dem Experimentator ein intaktes Kleinorgan zur Verfügung, das sowohl physiologischen als auch biochemischen Methoden zugänglich ist. Bei der Erforschung der V-ATPase liegen die Vorteile von diesem Modellsystem in der hormonellen Steuerung der sekretorischen Aktivität. Durch die Applikation von 5-HT kann innerhalb weniger Minuten der Assemblierungsstatus der V-ATPase gezielt verändert werden und macht die beteiligten zellulären Regulationsmechanismen experimentell zugänglich. Die Bedeutung der an diesem System gewonnenen Ergebnisse liegt vor allem in dem ubiquitären Vorkommen der V-ATPase. Außerdem sind die beteiligten Signalkaskaden im Zusammenhang mit einer Vielzahl weiterer zellulärer Mechanismen in nahezu jeder eukaryotischen Zelle zu finden.

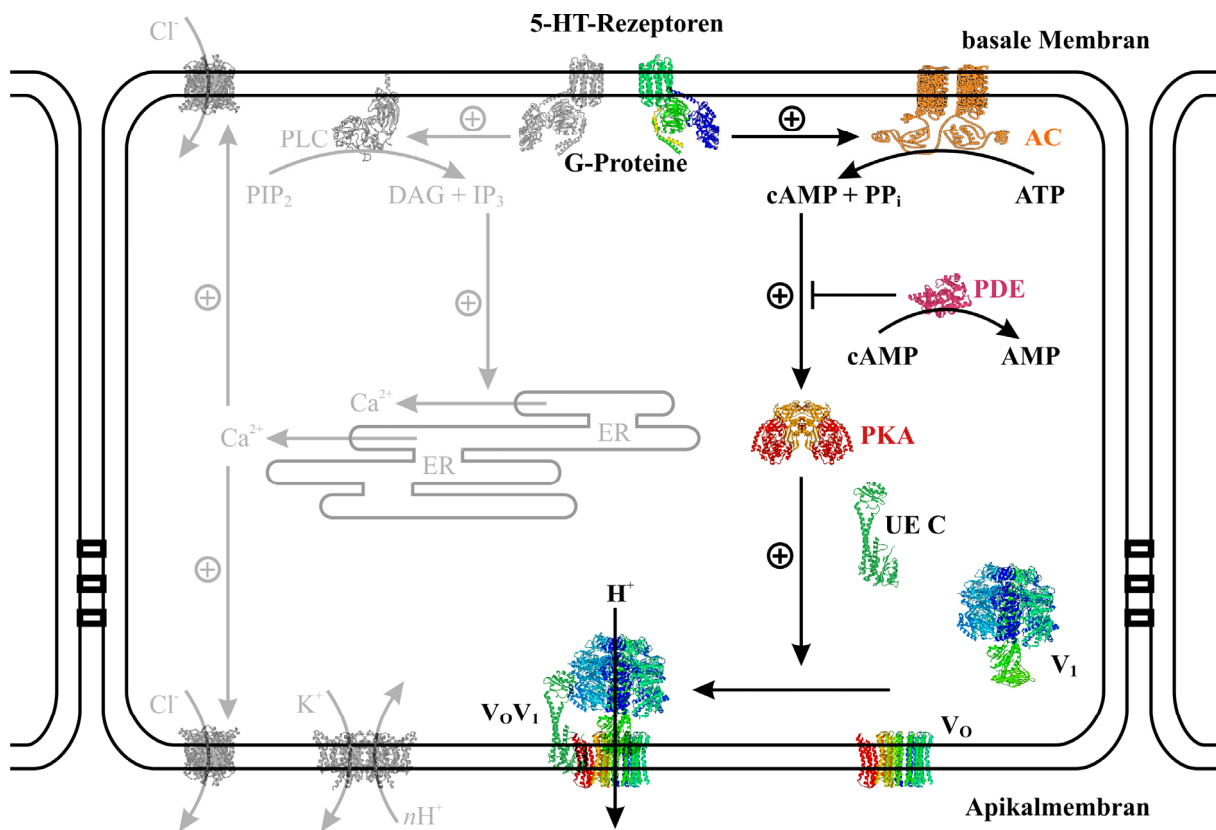


Abbildung 1.4: Schematische Zusammenfassung der Signalkaskaden in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*. Dargestellt sind die bekannten Mechanismen, die in den sekretorischen Zellen durch 5-HT aktiviert werden und an der Speichelsekretion beteiligt sind. Farblich hervorgehoben ist der cAMP-Weg, der zu einer Assemblierung und Aktivierung der V-ATPase in der Apikalmembran führt. Die gekennzeichneten Proteine sind die Adenylatzyklase (AC), Phosphodiesterase (PDE), Proteinkinase A (PKA), V-ATPase-Untereinheit C (UE C) und Phospholipase C (PLC).

1.5 Die Zielstellung dieser Arbeit

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung einer Phosphorylierung der V-ATPase durch die PKA in den sekretorischen Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen. Die Beteiligung der PKA an der Bildung des aktiven V-ATPase-Holoenzym wurde in vorangegangenen Untersuchungen nachgewiesen und folglich muss es ein Protein geben, dessen Phosphorylierungsstatus die reversible Dissoziation beeinflusst. In erster Linie sollte überprüft werden, ob eine Phosphorylierung der V-ATPase-Untereinheit C durch die PKA stattfindet. Die zentrale Funktion der Untereinheit C besteht offenbar in der Verknüpfung des membranständigen V_O - und des katalytischen V_1 -Komplexes. Es wäre daher naheliegend, dass die Steuerung der reversiblen Dissoziation der V-ATPase über die Untereinheit C vermittelt wird. Eine wesentliche Grundlage für diese Hypothese lieferten Ergebnisse von Olga Vitavska (Universität Osnabrück, AG Wiczorek), die in ihrer Promotionsarbeit mittels *Overlay-Blot* eine Interaktion zwischen einer rekombinanten Untereinheit C aus *Manduca sexta* und der katalytischen Untereinheit der Rinder-PKA feststellen konnte. Autoradiografische Experimente bestätigten, dass die rekombinante Untereinheit C ein potentielles Substrat für die PKA ist und phosphoryliert werden kann.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung der Proteinphosphatasen, die der Aktivität der PKA entgegenwirken und somit zu einer Inaktivierung der V-ATPase führen. Die Untersuchung der beteiligten Proteinphosphatasen sollte zunächst pharmakologisch anhand einer physiologischen Messmethode erfolgen und nachfolgend durch biochemische Experimente ergänzt werden. Das Verständnis der entsprechenden Mechanismen und der biologischen Funktion dieser Wechselwirkung ist hinsichtlich der Regulation der V-ATPase in sekretorisch aktiven Epithelien von großem Interesse.

2. Material

2.1 Lösungen und Puffer

Calliphora-Ringer: 128 mM NaCl, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 2,7 mM Na-Glutamat; 2,7 mM Maleinsäure, 10 mM D-Glucose, 10 mM TRIS, pH 7,2

Denaturierungspuffer: 5% SDS, 10% Mercaptoethanol, 10% Glycerol, 25‰ Bromphenolblau, 250 mM TRIS-HCl, pH 6,8
(5x-konzentriert)

PKA-Assay

PKA-Puffer: 200 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 2% Triton X-100, 40 mM TRIS-HCl, pH 7,8
(2x-konzentriert)

Pelleting Assay

Extraktionspuffer: 70 mM Saccharose, 50 mM KCl, 10 mM DTT, 2% Protease-Inhibitor-Cocktail, 50 mM TRIS-HCl, pH 7,5

SDS-PAGE

Kammerpuffer: 192 mM Glycin, 0,1% SDS, 25 mM TRIS

Sammelgelmonomerlösung: 15% Rotiphorese Gel30, 0,2% SDS, 375 mM TRIS, 0,125% TEMED, 0,07% APS, pH 8,8

Trenngelmonomerlösung: 33,3% bzw. 46,7% Rotiphorese Gel30, 0,2% SDS, 125 mM TRIS, 0,125% TEMED, 0,07% APS, pH 6,8

Isoelektrische Fokussierung

Anodenpuffer: 10 mM H₃PO₄

Kathodenpuffer: 100 mM NaOH

Iodacetamid-Lösung: 20% (w/v) Iodacetamid in H₂O

IEF-Probenpuffer: 10 M Harnstoff, 2% Triton X-100 (bzw. CHAPS), 2% Servalyt 3/10, 2,5‰ Bromphenolblau

Gelmonomerlösung: 8 M Harnstoff, 2% Triton X-100 (bzw. CHAPS), 2% Servalyt 3/10, 16,6% Rotiphorese Gel30, 0,2% TEMED, 0,02% APS

Überschichtungspuffer: 4 M Harnstoff, 0,2% Servalyt 5/8, 0,8% Servalyt 3/10

Äquilibriumspuffer: 2,3% SDS, 10% Glycerol (w/v), 1,25% Bromphenolblau, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8

ProQ Diamond-Färbung

Fixierlösung: 50% Methanol, 10% Essigsäure

Natriumacetat-Lösung: 1 M Na-Acetat, pH 4,0

ProQ-Entfärber-Lösung: 20% Acetonitril, 5% Natriumacetat-Lösung

Coomassie-Färbung

Coomassie-Lösung: 0,1% Coomassie Brilliant-Blau R-250, 50% Methanol, 10% Essigsäure

Entfärber-Lösung: 10% Methanol, 7% Essigsäure

Western Blotting

Anodenpuffer 1: 20% Methanol, 300 mM TRIS, pH 10,4

Anodenpuffer 2: 20% Methanol, 25 mM TRIS, pH 10,4

Kathodenpuffer: 20% Methanol, 40 mM 6-Aminocapronsäure, pH 7,6

Tween-Puffer: 0,1% Tween 20, 150 mM NaCl, 10 mM TRIS, pH 7,5

Blockierlösung: 5% Trockenmilch in Tween-Puffer

Harnstoff-Lösung: 2 M Harnstoff, 100 mM Glycin, 1% Triton X-100

Immuncytochemie

200 mM Phosphatpuffer: 130 mM K_2HPO_4 , 70 mM KH_2PO_4 , pH 7,0

Fixierlösung: 3% *para*-Formaldehyd, 1 mM DTSP in 0,1 M Phosphatpuffer

10% Sucrose-Lösung: 10% Sucrose in 100 mM Phosphatpuffer

25% Sucrose-Lösung: 25% Sucrose in 100 mM Phosphatpuffer

PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 , pH 7,4

NH_4Cl -Lösung: 50 mM NH_4Cl in PBS

SDS-Lösung: 1% SDS in PBS

Blockierlösung: 5% Trockenmilch, 1% NGS; 0,8% BSA; 0,1% Triton X-100 in PBS

Mowiol: 33,3% Glycerol (v/v), 16,7% Mowiol 4-88, 2% (w/v) n-Propyl-Galat (w/v) in PBS

Molekularbiologie

TAE-Puffer: (50x-konzentriert)	1,5 M TRIS, 60 mM EDTA, 5,71% (v/v) Essigsäure
TE-Puffer:	1 mM EDTA, 10 mM TRIS, pH 8,0
Gelladepuffer: (5x-konzentriert)	30% (v/v) Glycerol, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylen- cyanol

2.2 Versuchstiere und Präparation

Für die Versuche wurden Schmeißfliegen der Art *Calliphora vicina* verwendet. Die Fliegen stammten aus der hauseigenen Zucht und wurden bei einer konstanten Temperatur von 25°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% in einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden herangezogen. Als Futter diente Vollkornbrot, Zwieback, ein Nährbrei (modifiziert nach Tachibana & Numata, 2001) und Wasser. Der Nährbrei bestand zu gleichen Teilen aus Maisgrieß, Trockenmilch, getrockneter Hefe sowie Weizenkeimen; die trockenen Bestandteile wurden in Wasser gelöst, aufgekocht und bis zum Abkühlen auf Raumtemperatur quellen gelassen. Gelagert wurde der Nährbrei bei -20°C. Fliegen, die für die Eiablage verwendet wurden, erhielten Nektar (Neopoll Vitalstoff-Reizfutter), ein Zucker-Malz-Gemisch und Wasser. Für die Abnahme der Eier und Aufzucht der Larven wurden Schweineherzen verwendet.

Alle Experimente wurden mit dem abdominalen Abschnitt der Speicheldrüsen durchgeführt. Das Abdomen der Fliegen wurde abgeschnitten, in eine Petrischale mit *Calliphora*-Ringer überführt und mit einer Insektennadel fixiert. Die Speicheldrüsen wurden mit einer Pinzette aus dem Abdomen herausgezogen und in einem Blockschälchen mit *Calliphora*-Ringer gesammelt.

2.3 Verwendete Antikörper

Tabelle 2.3.1: Primäre Antikörper

Antigen	Typ/Herkunft	Verdünnung		Bezugsquelle
		Immuncytochemie	Western Blotting	
<i>Manduca</i> V-ATPase UE a	polyklonal/ Meerschweinchen	—	1:20000	H. Wiczorek (Merzendorfer <i>et al.</i> , 1997b; Merzendorfer <i>et al.</i> , 2000)
<i>Manduca</i> V-ATPase UE d	polyklonal/ Meerschweinchen	1:1000	1:20000	
<i>Manduca</i> V-ATPase UE C	polyklonal/ Meerschweinchen	1:1000	1:20000	
<i>Bos</i> V-ATPase UE A	polyklonal/ Kaninchen	—	1:5000	I. Schulz (Roussa <i>et al.</i> , 1998)
<i>Culex</i> V-ATPase UE B	polyklonal/ Kaninchen	1:1000	—	M. Phillipova (Phillipova <i>et al.</i> , 1998)
<i>Drosophila</i> PKA-C	polyklonal/ Kaninchen	1:400	—	D. Kalderon (Skoulakis <i>et al.</i> , 1993)
<i>Bos</i> Calcineurin UE β	polyklonal/ Maus	1:1000	1:5000	Sigma-Aldrich
<i>Gallus</i> Aktin	monoklonal/ Maus (Klon C4)	1:200	—	ICN Biomedicals
β -Tubulin	monoklonal/ Maus (Klon E7)	—	1:2000	Developmental Studies Hybridoma Bank
GABA	polyklonal/ Meerschweinchen	—	—	Biotrend

Tabelle 2.3.2: Sekundäre Antikörper

Antigen	Herkunft/ Kopplung	Verdünnung Immuncytochemie	Verdünnung Western Blotting	Bezugsquelle
Meer- schweinchen-IgG	Esel/Cy3	1:200		Jackson- Immuno- Research
Maus-IgG	Ziege/Cy3	1:400		
Kaninchen-IgG	Ziege/Cy3	1:200		
Meer- schweinchen-IgG	Esel/HRP		1:10000	
Maus-IgG	Ziege/HRP		1:20000	
Kaninchen-IgG	Ziege/HRP		1:20000	

2.4 Bezugsquellen von Chemikalien

Alexis:	Cyclosporin A [Cat. No. 380-002], FK506 [Cat. No. 380-008], H-89 [Cat. No. 270-017]
BioLog:	8-CPT-cAMP [Cat. No. C 010], cBIMPS [Cat. No. D 014]
Calbiochem:	Okadainsäure [Cat. No. 495609], Tautomycin [Cat. No. 580550],
Fluka:	6-Aminocaprinsäure, DMSO
FluoProbes:	EDTA-AM [Cat. No. FP-M1152B]
Hoechst:	Mowiol 4-88
Invitrogen:	AlexaFluor-488 Phalloidin, HAF, <i>ProQ Diamond Gel Stain</i> , TRIZol LS-Reagenz
Merck:	Calciumchlorid-Dihydrat, di-Natriumhydrogenphosphat, Kalium-di-Hydrogenphosphat, Natriumglutamat-Monohydrat, Natriumacetat, Magnesiumchlorid-Heptahydrat, <i>para</i> -Formaldehyd [37%], SDS
Molecular Biosciences:	DTSP
Roth:	2-Methylbutan, Aceton, Acetonitril, Butanol, Carbenicillin, D-Glucose, D-Saccharose, EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat, Essigsäure, Ethanol, Glycerol, Glycin, Harnstoff, IPTG, Kalilauge [1 M], Kaliumchlorid, di-Kaliumhydrogenphosphat, LB-Agar, LB-Medium, Methanol, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Natronlauge [1 M], <i>ortho</i> -Phosphorsäure [85%], Roti-Load 1, Rotiphorese Gel30, Salzsäure [1 M], Salzsäure [32%], TRIS, TRIS-HCl, X-Gal
Serva:	ATP, Bromphenolblau, CHAPS, Coomassie Brilliant-Blau R-250, DTT, Iodacetamid, Mercaptoethanol, Ponceau S, Servalyt 5/8, Servalyt 3/10, TCA, TEMED, Triton X-100, Tween 20
Sigma-Aldrich:	5-HT [Cat. No. H7752], BAPTA [Cat. No. A4926], BAPTA-AM [Cat. No. 11696], BSA, DEPC, ECL-Entwicklerlösung, ECL-Fixierlösung, Hochmolekularmarker, NGS, Maleinsäure, Poly-L-Lysin, Protease-Inhibitor-Cocktail [Cat. No. P8340], Xylen-cyanol
Tocris:	Cinanserin [Cat. No. 0460]
Vector Laboratories:	Vectabond

3. Methoden

3.1 Mikrofluorometrische Messungen

Für die mikrofluorometrischen Messungen wurde ein Zeiss Axiovert 135 Mikroskop (Objektiv Zeiss Neofluar x 20, n.A. 0,75) benutzt. Als Lichtquelle diente eine 75 W Xenon-Kurzbogenlampe (Ushio, ms-scientific Chromatographie-Handel GmbH) und das monochromatische Anregungslicht wurde durch ein *Visichrom High Speed Polychromator System* (Visitron Systems) ausgewählt.

Für die Messung von pH-Änderungen im Lumen isolierter Speicheldrüsen wurde der Fluoreszenzfarbstoff 5-N-Hexadecanoyl-Aminofluorescein (HAF) verwendet, dessen Absorptionsspektrum vom pH-Wert der umgebenden Lösung abhängig ist. HAF ist ein Fluorescein-Derivat mit einer langen aliphatischen Seitenkette. Befindet sich das Molekül in freier Lösung, umschließt der aliphatische Rest die fluorophore Gruppe und die Fluoreszenz wird unterdrückt. Bei Kontakt mit einer Zelloberfläche lagert sich die Seitenkette in die Lipiddoppelschicht ein und verankert den Farbstoff auf der extrazellulären Seite der Membran. Die Fluoreszenz wird nun nicht mehr unterdrückt und es können oberflächennah pH-Änderungen gemessen werden. HAF besitzt einen isosbestischen Punkt bei einer Anregung mit 455 nm. Bei einer Abnahme des pH-Wertes der Umgebung kommt es bei der Anregung mit einer Wellenlänge kleiner 455 nm zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität, während diese bei einer Anregung mit einer Wellenlänge größer 455 nm abnimmt. Das Emissionsmaximum liegt unabhängig von der Anregungswellenlänge bei 510 nm. Bei einer dualen Anregung mit Wellenlängen größer und kleiner 455 nm kann aus den Werten der Fluoreszenzintensität ein Quotient F_1/F_2 gebildet werden, der als Messgröße unabhängig von der Farbstoffkonzentration ist.

Das HAF wurde als 20 mM Stammlösung in DMSO angesetzt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Am Versuchstag wurde ein Aliquot der Stammlösung mit *Calliphora*-Ringer auf 30 µM verdünnt, 15 min in ein Ultraschallbad (Sonorex TK 52 H, Bandelin Electronic) gestellt und anschließend filtriert (Spritzenfilter aus PVDF, Porengröße 0,22 µm, Roth). Eine Mikropipette wurde mit der 30 µM HAF-Lösung befüllt und mit einem 3D-Mikromanipulator (Narishige Scientific Instrument Lab.) in das offene Ende einer, auf Vectabond-beschichteten Deckgläschen (24 x 60 mm) fixierten Speicheldrüse eingeführt. Die Farbstofflösung wurde unter Druck (10 bis 20 psi; Pneumatic Picopump PV820, World Precision Instruments) in das Lumen der Speicheldrüsen injiziert. Eine kleine Perfusionswanne wurde mittels Vaseline auf das Deckgläschen geheftet. Die Perfusion mit *Calliphora*-Ringer beziehungsweise den darin

gelösten pharmakologische Substanzen erfolgte mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 ml/min (BVP Schlauchpumpe, ISMATEC).

Der Farbstoff wurde aufeinander folgend mit 470 nm (Belichtungszeit 2 ms) und 410 nm (Belichtungszeit 4 ms) angeregt. Die Anregungswellenlängen wurden über einen 495-nm-Strahlteiler auf das Präparat gelenkt. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde über den 495-nm-Strahlteiler und einen 515-565 nm-Bandpassfilter vom Anregungslicht getrennt. Die Aufnahme der Bildpaare für 470 nm und 410 nm erfolgte mit einer gekühlten CCD-Kamera (TE/CCD-512EFT, Princeton Instrumens Corp.). Die Fluoreszenzintensität wurde in Graustufen kodiert und bei den jeweiligen Bildern wurden 16 Bildpunkte zusammengefasst (*Binning* 4x4) und die Intensität gemittelt. Aus den jeweiligen Bildpunkten der Bildpaare für 470 nm und 410 nm wurde der Quotient F_{470}/F_{410} gebildet. Die Bildpaare wurden alle 15 s aufgenommen. Die Steuerung des Polychromators, der CCD-Kamera und die Berechnung des Quotienten F_{470}/F_{410} wurde mit dem Programm „MetaFluor“ (Version 4.6r7 Meta Imaging Series, Universal Imaging Corp.) durchgeführt. Für die Auswertung der Daten wurde das Programm „Sigma Plot“ (Version 9.0, Jandel Scientific) verwendet.

3.2 Biochemische und zellbiologische Methoden

3.2.1 PKA-Assay

Der PKA-Assay umfasst Experimente, bei denen mit einem Zellysats aus *Calliphora*-Speicheldrüsen gearbeitet wurde, um die PKA-abhängigen Phosphorylierungen untersuchen zu können. Die Verwendung eines Zellysats ermöglichte eine einfache Kontrolle des Einflusses von Inhibitoren und bestimmter Ionen. Weiterhin waren diese Experimente einfach zu reproduzieren. Für einen PKA-Assay wurden die Drüsen in 2x-konzentrierten und mit Protease-Inhibitor-Cocktail versetztem PKA-Puffer (2 μ l pro Drüse) in einem Eppendorfreaktionsgefäß mit einem Mikrohomogenisator auf Eis homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 19900 RZB für 30 min bei 4°C (Biofuge 15R, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und aliquotiert. Die Aliquots wurden 1:1 mit einer Lösung versetzt, die 10 mM ATP, Protease-Inhibitor-Cocktail und gegebenenfalls eine Testsubstanz enthielt. Die Proben wurden bei 37°C (*Thermomixer comfort*, Eppendorf) inkubiert, anschließend mit $\frac{1}{3}$ Volumen 5x-konzentriertem Denaturierungspuffer versetzt, für 5 min auf 70°C erhitzt und danach auf Eis abgekühlt. Nach einer Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurde eine Phosphoproteinfärbung der SDS-Gele durchgeführt.

3.2.2 *Pelleting Assay*

Durch *Pelleting Assays* wurden die Cytosol- und Membran-Fraktion eines Zellaufschlusses durch Ultrazentrifugation voneinander getrennt und die Verteilung eines bestimmten Proteins zwischen diesen Fraktionen analysiert. Die membranständigen Proteine werden pelletiert und die cytosolischen Proteine verbleiben im Überstand. In einem Ansatz wurden 15 *Calliphora*-Speicheldrüsen in 60 µl Extraktionspuffer mit einem Mikrohomogenisator in einem Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml) auf Eis homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 30 min bei 4°C und mit 150000 RZB (Optima TL Ultrazentrifuge, Beckman) zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 40 µl abgenommen, mit 10 µl 5x-konzentriertem Denaturierungspuffer versetzt und für 5 min auf 70°C erhitzt. Der restliche Überstand wurde verworfen, das Pellet dreimal mit 100 µl Extraktionspuffer gewaschen und mit 62,5 µl 1x-konzentriertem Denaturierungspuffer versetzt. Das Zentrifugenröhrchen wurde für 30 Sekunden in ein Ultraschallbad (Sonorex TK 52 H, Bandelin Electronic) gestellt, um die pelletierten Proteine vollständig zu resuspendieren. Die wurde Probe anschließend ebenfalls für 5 min auf 70°C erhitzt.

Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels *Western Blotting* analysiert. Um die relative Menge eines bestimmten Proteins in der Membran- und Cytosol-Fraktion zu bestimmen, wurden die auf Fotofilm dokumentierte Immundetektion mit einem Scanner digitalisiert und mit dem Programm „MetaMorph“ (Universal Imaging Corp.) densitometrisch ausgewertet. Bei der quantitativen Auswertung wurde davon ausgegangen, dass die Intensität der Immundetektion von der Menge des detektierten Proteins abhängig ist. Die Summe der Intensitäten der Immundetektion aus einer Membran- und der entsprechenden Cytosol-Fraktion stellte 100% des vorhandenen Proteins dar.

3.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen wurde mit dem System Mini-Protean von BIO-RAD durchgeführt. Die aufzutragenden Proben wurden mit $\frac{1}{5}$ Volumen 5x-konzentriertem Denaturierungspuffer versetzt, für 5 min auf 70°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Bei einem Aufschluss von *Calliphora*-Speicheldrüsen direkt im Denaturierungspuffer wurden große Zellfragmente vor dem Erhitzen durch Zentrifugation mit 19900 RZB für 30 min (Biofuge 15R, Heraeus) entfernt.

Die Elektrophorese wurde mit einer konstanten Spannung von 60 V für das Sammelgel (4,6% T/2,6% C) und 160 V für das Trenngel (14,4% T/2,6% C) durchgeführt.

3.2.4 Isoelektrische Fokussierung

Für die isoelektrische Fokussierung wurden die *Calliphora*-Speicheldrüsen in 1x-konzentrierten und mit Protease-Inhibitor-Cocktail versetztem PKA-Puffer (2 µl pro Drüse) auf Eis homogenisiert. Das Zelllysate wurde für 30 min bei 4°C und mit 20000 RZB zentrifugiert (Biofuge 15R, Heraeus). Der Überstand wurde mit Denaturierungspuffer versetzt, um in der Probe eine SDS-Konzentration von 1–1,4% zu erhalten. Der Ansatz wurde für 5 min auf 70°C erhitzt und danach auf Eis abgekühlt. Um Cystein-Reste zu alkylieren wurde $\frac{1}{2}$ Volumen einer 20%igen Iodacetamid-Lösung zugegeben und für 45 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit IEF-Probenpuffer soweit verdünnt, dass die SDS-Konzentration unter 0,24% lag.

Die isoelektrische Fokussierung wurde mit dem System Mini-Protean 2D von BIO-RAD durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte hierbei in selbstgegossenen Kapillargelen mit einem Durchmesser von 1 mm und einer Länge von 7,5 cm. Die Gelmonomerlösung (5,1% T/2,5% C) enthielt Ampholyte für einen pH-Bereich von 3 bis 10. Vor der Zugabe von TEMED und APS wurde die Gelmonomerlösung für 15 min in einem Ultraschallbad (Sonorex TK 52 H, Bandelin Electronic) entgast. Der Anoden- und Kathodenpuffer wurde für mindestens eine Stunde mittels Ultraschall entgast. Vor der Probenauftragung wurde eine Vorfokussierung mit stufenweiser Erhöhung der Spannung durchgeführt: 10 min 200 V, 15 min 300 V und 15 min 400 V. Nach der Vorfokussierung wurde der Anoden- und Kathodenpuffer erneuert. Die Kapillargele waren seitens der Kathode jeweils mit einem Probenreservoir verbunden, in das zuerst die Probe und anschließend der Überschichtungspuffer pipettiert wurde. Für die isoelektrische Fokussierung der Proteine wurde folgendes Spannungsprofil angewendet: 15 min 500 V, 210 min 750 V und 60 min 1000 V. Die Kapillargele wurden bis zur weiteren Verwendung in den Glaskapillaren belassen und bei –20°C aufbewahrt.

Für die Auftrennung in der zweiten Dimension wurde ebenfalls das System Mini-Protean benutzt. Die Kapillargele wurden mit einer 5-ml-Spritze, die mit Äquibrierlösung befüllt war, aus den Glaskapillaren herausgepresst und für 5 min in einem Schälchen mit Äquibrierlösung leicht geschwenkt. Nach der Äquibrierphase wurden die Kapillargele sofort auf ein 1,5 mm dickes SDS-Polyacrylamidgel gelegt, mit einem zweiten Kapillargel, das keine Probe enthielt, überlagert und die Elektrophoresekammer mit Kammerpuffer befüllt. Die Elektrophorese wurde mit einer konstanten Spannung von 70 V für das Sammelgel (4,6% T/2,6% C) und 140 V für das Trenngel (10,26% T/2,6% C) durchgeführt.

3.2.5 Phosphoprotein-Färbung

Für den Nachweis phosphorylierter Proteine in einem SDS-Gel wurde der Fluoreszenzfarbstoff *ProQ Diamond* verwendet. Das SDS-Gel wurde nach der Elektrophorese für 2 x 30 min in 100 ml Fixierlösung gelegt. Anschließend wurde das Gel 4 x 10 min mit jeweils 300 ml bidestilliertem Wasser gewaschen. Die sich anschließende Färbung mit *ProQ Diamond* dauerte 75 min. Um die Hintergrundfärbung zu entfernen, wurden die Gele für 3 x 30 min mit 300 ml *ProQ*-Entfärber-Lösung behandelt und dann nochmals 3 x 5 min mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Alle Schritte wurden auf einem Wippschüttler durchgeführt. Um ein Ausbleichen des Farbstoffes zu vermeiden, wurde die Box mit dem Gel ab der Behandlung mit *ProQ Diamond* mit einer lichtundurchlässigen Abdeckung versehen. Die Dokumentation der Fluoreszenzmarkierung wurde mit der Gel Doc 2000 von BIO-RAD durchgeführt. Die Auswertung der Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit dem Programm „MetaMorph“ (Universal Imaging Corp.).

3.2.6 Coomassie-Färbung

Die SDS-Gele wurden nach der Elektrophorese in Coomassie-Lösung überführt und für mindestens 30 min auf einem Wippschüttler geschwenkt. Anschließend wurden die Gele mit Entfärber-Lösung behandelt, um die Hintergrundfärbung zu reduzieren.

3.2.7 Western Blotting

Das *Western Blotting* wurde im *Semidry*-Verfahren mit einem diskontinuierlichen Puffersystem unter Verwendung der Trans-Blot SD Cell von BIORAD durchgeführt. Auf der Seite der Anode wurden sechs Lagen in Anodenpuffer 1 und drei Lagen in Anodenpuffer 2 getränktes Elektrodenpapier (GE Healthcare) angeordnet. Es folgte die PVDF-Membran (Millipore), die zuvor 1 min in 100% Methanol und 5 min in Anodenlösung 2 äquilibriert wurde. Auf die PVDF-Membran wurden das SDS-Gel und schließlich neun in Kathodenpuffer getränktes Elektrodenpapier gelegt. Der Proteintransfer erfolgte für 90 min bei 54 mA pro Gel. Nach dem Proteintransfer wurde die PVDF-Membran für 5 min mit Ponceau S gefärbt, dann mit bidestilliertem Wasser gewaschen und schließlich bei 60°C getrocknet.

Für die Immundetektion eines Proteins wurde die PVDF-Membran nach folgendem Schema behandelt: 30 min Blockierlösung, kurzes Spülen mit Tween-Puffer, 3 h Inkubation mit dem primären Antikörper verdünnt in Tween-Puffer, 3 x 5 min Waschen mit Tween-Puffer, 4 min

Harnstofflösung, 5 min Waschen mit Tween-Puffer, 1 h Inkubation mit dem sekundären, HRP-gekoppelten Antikörper verdünnt in Tween-Puffer, 3 x 5 min Waschen mit Tween-Puffer, kurzes Spülen mit bidestilliertem Wasser, 5 min Inkubation mit der ECL-Lösung *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce). Die Chemilumineszenz des ECL-Produkts wurde mittels Kodak-Fotofilm dokumentiert.

3.2.8 cAMP-Immunoassay

Für die Bestimmung der cAMP-Konzentration in *Calliphora*-Speicheldrüsen wurde der *cAMP Direct Immunoassay Kit* von Biovision (Cat. No. K371-100) verwendet. Die Versuchsdurchführung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Für jeden Versuchsansatz wurden 11 Drüsen in 22 µl 0,1 M HCl mit 5% TCA auf Eis homogenisiert, 2 min in einem Ultraschallbad (Sonorex TK 52 H, Bandelin Electronic) behandelt und anschließend für 10 min mit 19900 RZB bei 4°C (Biofuge 15R, Heraeus) zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 20 µl für den cAMP-Assay weiterverwendet. In jedem Versuch wurde eine Eichreihe erstellt und mit allen Proben eine Doppelbestimmung durchgeführt.

3.2.9 Herstellung von Gefrierschnitten

Für die Herstellung von Gefrierschnitten wurden 20 bis 30 *Calliphora*-Speicheldrüsen für eine Stunde bei Raumtemperatur in Fixierlösung inkubiert und anschließend 3 x 10 min mit PBS gewaschen. Es folgte eine Entwässerung des Gewebes durch Inkubation mit 10%iger Sucrose-Lösung für 1 h auf Eis und dann mit 25%iger Sucrose-Lösung über Nacht bei 4°C. Die Drüsen wurden mit einem Tropfen *Tissue-Tek* Einbettungsmedium (Sakura Finetek) in ein Stück gekochte Leber eingebettet und in 2-Methylbutan eingefroren, das mit flüssigem Stickstoff auf -160°C abgekühlt wurde. Die gefrorenen Präparate wurden bei -80°C gelagert. An einem Gefriermikrotom (Kryostat HM 500 OM, MICROM) wurden 8 µm dicke Gewebsschnitte angefertigt und auf poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern aufgenommen. Die luftgetrockneten Präparate wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

3.2.10 Immuncytochemie

Für eine immuncytochemische Markierung wurden die Gefrierschnitte nach folgendem Schema behandelt: 5 min NH₄Cl-Lösung, 3 min SDS-Lösung, 5 min Waschen mit PBS, 15 min Inkubation mit Blockierlösung, 3 h Inkubation mit primärem Antikörper in Blockierlösung, 3 x 5 min Waschen mit PBS, 1 h Inkubation mit sekundärem Antikörper in

PBS, 3 x 5 min Waschen mit PBS. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Schnitte kurz in bidestilliertes Wasser getaucht, mit einem Papiertuch trocken getupft und in Mowiol eingedeckelt. Die Analyse der Immunfluoreszenz erfolgte mit einem Konfokalmikroskop LSM 510 der Firma Carl Zeiss.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 mRNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die *Calliphora*-Speicheldrüsen wurden nach der Präparation in ein Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml, 10 Drüsen pro Gefäß) überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Durchführung der RNA-Isolierung bei -80°C gelagert. Für die Durchführung einer RNA-Isolierung wurden insgesamt 50 Drüsen verwendet.

Um in einem ersten Schritt die Gesamt-RNA aus dem Gewebe zu isolieren, wurde das TRIzol LS-Reagenz (Cat. No. 15596-026, Invitrogen) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Für die Aufreinigung der mRNA wurde der *Micro-Fast-Track 2.0 Kit* (Cat. No. K1520-02, Invitrogen) benutzt. Die Konzentration der Gesamt-RNA, und nachfolgend der mRNA, wurde mit dem Spektralphotometer *GenQuant 1300* (GE Healthcare) bestimmt.

Mit der isolierten mRNA wurde gegebenenfalls ein DNA-Verdau durchgeführt, um möglicherweise vorhandene Reste der genomischen DNA zu entfernen. Hierfür wurde die mRNA in einer Konzentration von $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ für 30 min bei 37°C mit $0,2 \text{ U DNase I}$ (Cat. No. AM2222, Ambion) in DNase-I-Puffer (Cat. No. AM8170G, Ambion) behandelt. Die DNase wurde anschließend durch Zugabe von DNase-Inaktivierungs-Reagenz (*RNAqueous-4PCR Kit*, Cat. No. AM1914, Ambion) und einer zweiminütigen Inkubation bei Raumtemperatur inaktiviert. Die DNase wurde bei diesem Arbeitsschritt an eine Trägermatrix gebunden und konnte durch Zentrifugation für 2 min bei 10000 RZB (Biofuge pico, Heraeus) abgetrennt werden. Der Überstand mit der mRNA in einer Konzentration von $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bis zur cDNA-Synthese bei -80°C aufbewahrt.

Für die Synthese von cDNA aus der erhaltenen mRNA wurde das *Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Cat. No. 11904-018, Invitrogen) benutzt. Bei der cDNA-Synthese wurde die mRNA in einer Konzentration von $0,05 - 0,08 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingesetzt.

3.3.2 PCR mit degenerierten *Primern*

Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde ein $50\text{-}\mu\text{l}$ -Reaktionsansatz mit folgenden Komponenten vorbereitet: $1/10$ Volumen $10\times$ -konzentrierter Reaktionspuffer (Cat. No. E2500,

Roboklon), 2 µl cDNA, je 200 µM der vier dNTPs (Cat. No. 20-2010, Peqlab), je 200 nM der Vorwärts- und Rückwärts-*Primer* (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin) und 2,5 U Taq-DNA-Polymerase (Cat. No. E2500, Roboklon). Die Menge der verwendeten cDNA entspricht den Empfehlungen des Herstellers vom cDNA-Synthese-System (Invitrogen). Die PCR wurde in einem Thermozykler der Firma Biometra (T3-Thermocycler) durchgeführt und verlief nach folgendem Temperaturprogramm: 1 x 150 s 94°C, 35 x (40 s 94°C, 40 s 40 – 60°C, 20 s 72°C), 1 x 10 min 72°C, Abkühlen auf 4°C. Die Temperatur für die Anlagerung der *Primer*-Oligonukleotide wurde entsprechend dem G/C-Gehalt angepasst und nach der empirischen Formel „2 + 4 Regel“ (A/T-Paar = 2°C, G/C-Paar = 4°C) berechnet (Lion & Haas, 1990). Die Produkte der PCR wurden elektrophoretisch aufgetrennt und gegebenenfalls für eine nachfolgende Ligation eluiert.

3.3.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA wurde mit dem System *HE 33 mini submarine electrophoresis unit* von Amersham Biosciences durchgeführt. Es wurden Gele mit 1% Agarose und 0,1% Ethidiumbromid in 1x-konzentrierten TAE-Puffer verwendet. Die aufzutragenden Proben wurden mit $\frac{1}{5}$ Volumen 5x-konzentriertem Gelladepuffer versetzt. Als Größenstandard wurde eine 100-bp-Leiter (New England Biolabs) verwendet. Die Elektrophorese wurde mit einer konstanten Spannung von 80 V durchgeführt. Die Gele wurden anschließend mit dem *GelSystem 8Entry* von Biostep dokumentiert.

3.3.4 DNA-Elution aus Agarosegelen

DNA wurde unter Verwendung eines Molekularsiebes durch Zentrifugation aus einem Stück Agarosegel eluiert. Für die Zusammensetzung des Molekularsiebes wurde ein Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml) mittig quer durchtrennt und der Boden der unteren Hälfte mit einer heißen Nadel durchstoßen. Das entstandene etwa 1 mm große Loch wurde mit silanisierter Glaswolle (Serva) bedeckt. Dieses improvisierte Molekularsieb wurde in ein zweites intaktes Eppendorfreaktionsgefäß gesteckt. Die Bande mit der zu eluierenden DNA wurde auf einem UV-Illuminator aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in das Molekularsieb überführt und für 2 min mit 3700 RZB (Biofuge pico, Heraeus) zentrifugiert. Um die DNA auszufällen, wurde das entstandene Eluat (100 bis 140 µl) mit $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung sowie 2,5 Volumen 100%igem Ethanol versetzt und für mindestens 60 min bei –20°C aufbewahrt. Der Ansatz wurde nun für 5 min mit 12800 RZB zentrifugiert.

Der entstandene Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und der Ansatz nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet in 7 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Die DNA-Fragmente wurden für die Ligation mit einem Vektor-System weiterverwendet.

3.3.5 Ligation

Aufgereinigte DNA-Fragmente wurden durch Ligation in den pGEM-T Vektor eingefügt. Das pGEM-T Vektor System (Cat. No. A3600, Promega) wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

3.3.6 Transformation kompetenter Zellen

Für die Klonierung des pGEM-T Vektors wurden *Escherichia coli* (Stamm JM 109, Stratagene) verwendet. Es wurden 200 µl transformationskompetente Bakterien mit 20 µl Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock mit einer Temperatur von 42°C für 40 s. Anschließend wurde der Ansatz für 2 min auf Eis gekühlt, durch 900 µl LB-Medium ergänzt und für 45 min bei 37°C inkubiert (*Thermomixer comfort*, Eppendorf). Die Bakterien wurden daraufhin durch Zentrifugation mit 3700 RZB für 2 min (Biofuge pico, Heraeus) pelletiert und in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Die Bakterien wurden auf einer LB-Agar-Platte ausplattiert, die mit Carbenicillin (100 µg/ml), X-Gal (80 µg/ml) und IPTG (0,5 mM) versetzt war. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

3.3.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Vermehrung transformierter Bakterien wurde eine einzelne Bakterien-Kolonie in 5 ml Carbenicillin-haltiges LB-Medium übertragen und über Nacht in einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Für die Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA wurde der *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I* (Cat. No. 12-6942, Peqlab) verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit DEPC-Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Der DNA-Gehalt wurde mit dem Spektralphotometer *GenQuant 1300* (GE Healthcare) bestimmt. Mit der isolierten Plasmid-DNA wurde unter Verwendung des Restriktionsenzym *BstZ1* (Cat. No. R6881, Promega) ein Kontrollverdau durchgeführt, um die Größe des inserierten DNA-Fragmentes zu überprüfen. Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde von der Firma GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Die PKA-vermittelte Assemblierung und Aktivierung der V-ATPase

4.1.1 Die Stimulus-induzierte Umverteilung der V-ATPase und der PKA

Ein Vergleich zwischen der Verteilung der V-ATPase-Untereinheit C in unstimulierten, also sekretorisch inaktiven, und 5-HT-stimulierten Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen sollte zunächst einen Eindruck von der reversiblen Dissoziation der V-ATPase in diesem System vermitteln. In diesem Zusammenhang wurde auch die Verteilung der katalytischen Untereinheit der PKA überprüft um Hinweise für eine direkte Interaktion mit der V-ATPase zu erhalten. Die Kreuzreaktivität der verwendeten Antiseren mit den orthologen *Calliphora*-Proteinen wurde bereits in früheren Arbeiten nachgewiesen (Schmidt, 2006; Voss, 2006).

In der Abbildung 4.1 sind konfokalmikroskopische Aufnahmen einer immunocytochemischen Markierung von Aktin, der V-ATPase-Untereinheit C und der katalytischen Untereinheit der PKA (PKA-C) dargestellt. Die Markierung von Aktin verdeutlicht die Organisation der Apikalmembran mit tiefen Einfaltungen in Form von Canaliculi (Abb. 4.1 A/E). Das Aktin-Cytoskelett stabilisiert die Microplacae, die als blattartige Ausstülpungen der Plasmamembran eine starke Vergrößerung der Oberfläche bewirken (Zimmermann *et al.*, 2003).

Die Markierung für die Untereinheit C war in unstimulierten Zellen im gesamten Cytoplasma gleichmäßig verteilt (Abb. 4.1 B). In Präparaten von Drüsen, die für fünf Minuten mit 30 nM 5-HT stimuliert wurden, war die Immunoreaktivität der Untereinheit C nicht mehr im Cytoplasma sondern fast ausschließlich an der Apikalmembran lokalisiert. Die Lage der konzentrierten Immunoreaktivität der Untereinheit C im Bereich der Microplacae wird aus der Kolo-kalisierung mit der Aktin-Markierung ersichtlich (Abb. 4.1 F/H).

Für die PKA-C konnte eine ähnliche, aber weniger stark ausgeprägte Veränderung im Markierungsmuster beobachtet werden. In den unstimulierten Drüsenzellen befand sich die Immunoreaktivität der PKA-C bei runden und ellipsoiden Strukturen mit einer Größe von ein bis zwei Mikrometern, die vermutlich Teil des intrazellulären Membransystems sind und im basalen Bereich der Zelle angereichert vorliegen (Abb. 4.1 C). Zudem wurde die PKA-C im Bereich der Einfaltungen der basalen Membran markiert. Eine schwach ausgeprägte Immunoreaktivität war gleichmäßig im gesamten Cytoplasma verteilt. Bei 5-HT-behandelten Drüsen hingegen war die Markierung der PKA-C vorrangig an der Apikalmembran konzentriert und kolo-kalisierte hier mit den Markierungen von Aktin und der Untereinheit C (Abb. 4.1 G/H). Die Markierung der PKA-C im basalen Zellbereich, im Cytoplasma und an den

cytoplasmatischen Strukturen konnte auch in 5-HT-behandelten Drüsen beobachtet werden, war hier jedoch schwächer ausgeprägt.

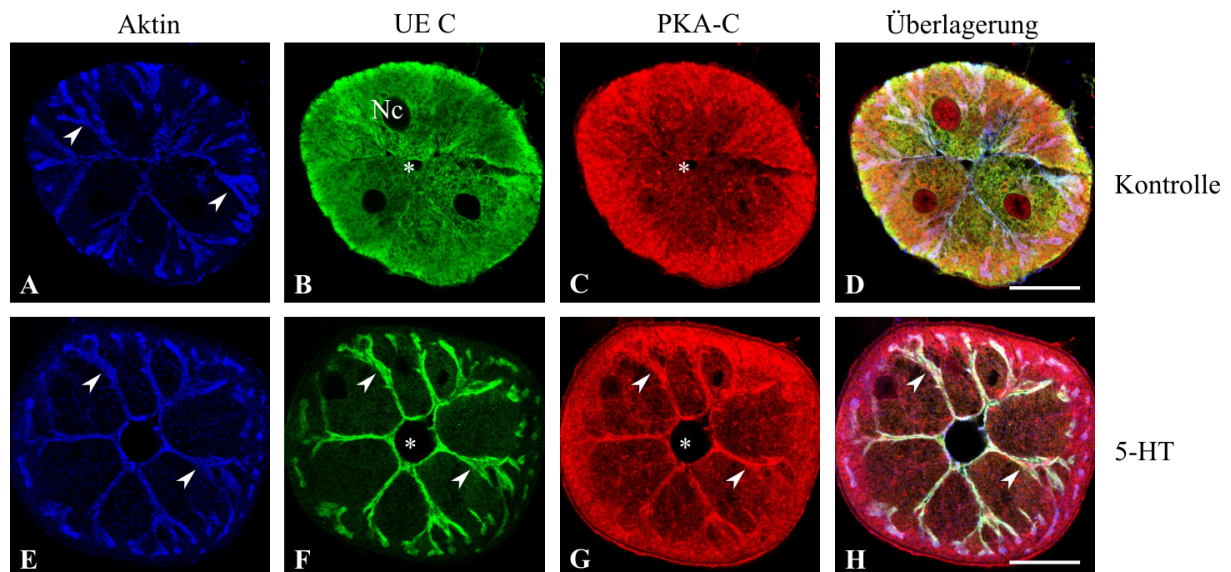


Abbildung 4.1: Verteilung der V-ATPase-Untereinheit C und der katalytischen Untereinheit der PKA in *Calliphora*-Speicheldrüsen. Dargestellt sind confokalmikroskopische Aufnahmen von Drüsen-Querschnitten, die immuncytochemisch markiert wurden. Es wurden Antikörper gegen Aktin (blau, A/E), die Untereinheit C (UE C, grün, B/F) und die katalytische Untereinheit der PKA (PKA-C, rot, C/G) verwendet. Die Aktin-Markierung verdeutlicht die Lage der Apikalmembran (A/E). In den Kontrollen sind die UE C und die PKA-C im gesamten Cytoplasma verteilt (B/C/D), die Stimulierung mit 30 nM 5-HT für 5 min führt zu einer Umverteilung dieser Proteine zur Apikalmembran (F/G/H). Gekennzeichnet sind ein Zellkern (Nc), das Drüsenlumen (Sternchen) und die Canaliculi (Pfeilspitzen). Balken: 20 µm. Mit Rücksicht auf eine mögliche Dyschromatopsie des Betrachters ist die Abbildung im Anhang 7.2 mit einer anderen Farbgebung dargestellt.

Die Stimulierung der *Calliphora*-Speicheldrüsen mit 5-HT führt über den cAMP/PKA-Weg zu einer Assemblierung und Aktivierung der V-ATPase (Dames *et al.*, 2006; Rein *et al.*, 2008). Es ist davon auszugehen, dass in diesem Zusammenhang die drastische Umverteilung der Untereinheit C aus dem Cytoplasma zur Apikalmembran erfolgt und die konzentrierte Lokalisierung im Bereich der Microplicae für die Bildung des aktiven V-ATPase-Holoenzym erforderlich ist. Da auch ein wesentlicher Anteil der PKA-C bei einer 5-HT-Stimulierung zur Apikalmembran umverteilt wird, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass sich das Substrat für die PKA im Bereich der Apikalmembran befindet.

4.1.2 Die cAMP-vermittelte Assemblierung der V-ATPase

Einen Beleg für den Einfluss der PKA auf die Stimulus-induzierte Assemblierung der V-ATPase in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina* lieferten bereits immuncytochemische Untersuchungen von Rein *et al.* (2008). Um die Beteiligung der PKA an der reversiblen Assemblierung der V-ATPase zu untermauern, wurde die subzelluläre Verteilung der V-

ATPase in unstimulierten und cBIMPS-behandelten *Calliphora*-Speicheldrüsen durch einen *Pelleting-Assay* analysiert. cBIMPS ist ein membrangängiges cAMP-Analogon, das selektiv die PKA aktiviert (Dostmann *et al.*, 1990).

In den Proben unstimulierter Drüsen wurden 97% der Untereinheit d vom V_0 -Komplex, aber nur 33% der Untereinheit A vom V_1 -Komplex in der Membran-Fraktion detektiert (Abb. 4.2). Bei einer Behandlung der Drüsen mit 100 μ M cBIMPS stieg der relative Anteil der Untereinheit A in der Membran-Fraktion signifikant an und betrug in diesen Proben etwa 65% der Gesamtmenge des Proteins. Die Verteilung der Untereinheit d war nicht beeinflusst.

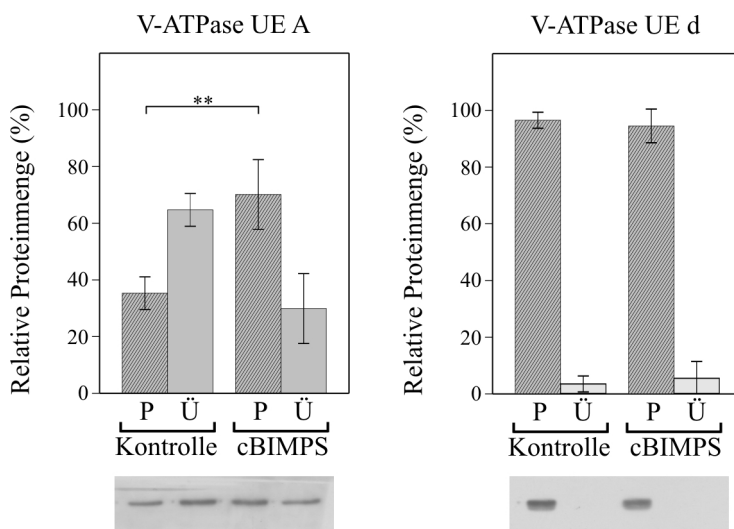


Abbildung 4.2: PKA-vermittelte Assemblierung der V-ATPase.

Mit *Calliphora*-Speicheldrüsen wurden *Pelleting Assays* durchgeführt und die Verteilung der V-ATPase-Untereinheiten (UE) A und d zwischen der Membran- (P) und Cytosol-Fraktion (Ü) ermittelt. Bei einer Behandlung der Drüsen mit 100 μ M cBIMPS für 10 min ist die relative Menge der UE A in der Membran-Fraktion im Vergleich zu unstimulierten Drüsen (Kontrolle) signifikant erhöht. Die Verteilung der UE d weist keinen signifikanten Unterschied auf (gepaarter t-Test, $n = 8$, $**P < 0,005$). Die jeweils unter den Grafen dargestellten *Western Blots* sind repräsentative Originaldaten.

Die Zunahme des relativen Anteils der Untereinheit A in der Membran-Fraktion, infolge einer Behandlung der Drüsen mit cBIMPS, impliziert die Umverteilung des V_1 -Komplexes aus dem Cytoplasma zur Plasmamembran und die Assoziation mit dem membranständigen V_0 -Komplex. Da für die Versuche ein PKA-selektives cAMP-Analogon verwendet wurde, kann zudem die Aussage getroffen werden, dass dieser Prozess durch die PKA vermittelt wird.

4.1.3 Die cAMP-vermittelte Aktivierung der V-ATPase

Die Stimulierung der *Calliphora*-Speicheldrüsen mit 5-HT führt zu einer luminalen Ansäuerung, die aus einer Aktivität der V-ATPase in der Apikalmembran resultiert (Rein *et al.*, 2006). Die von Rein *et al.* etablierte mikrofluorometrische Messung des luminalen pH mit dem pH-empfindlichen Fluoreszenzfarbstoff HAF ermöglichte die direkte und zeitlich hoch aufgelöste Beobachtung der V-ATPase-Aktivität.

Die Stimulierung der Drüsen mit einer sättigenden 5-HT-Konzentration führte zu einer schnell einsetzenden luminalen Ansäuerung (Abb. 4.3). Nach dem Ausspülen des 5-HT kehrte der

luminale pH wieder auf den Ruhewert zurück. Die pH-Änderungen bei der Ansäuerung und der Alkalisierung verliefen mit einer ähnlichen Kinetik. Messungen mit Mikroelektroden haben ergeben, dass im Lumen sekretorischer Drüsen der pH-Wert $7,4 \pm 0,2$ beträgt und bei der Stimulierung mit einer sättigenden 5-HT-Konzentration um etwa 0,4 pH-Einheiten abfällt (Rein *et al.*, 2006).

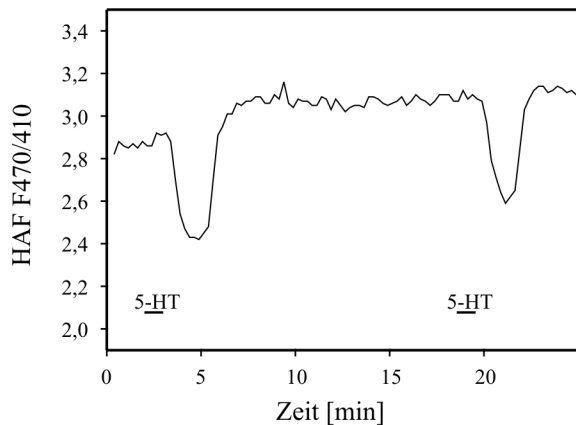


Abbildung 4.3: 5-HT-induzierte luminale Ansäuerung in *Calliphora*-Speicheldrüsen.

Der pH-Wert im Lumen einer Speicheldrüse wurde mikrofluorometrisch mit dem pH-sensitiven Farbstoff HAF gemessen. Die Zugabe von 30 nM 5-HT führt zu einer Abnahme in $F_{470/F410}$. Die Verringerung des Quotienten $F_{470/F410}$ repräsentiert eine luminale Ansäuerung, die auf die Aktivität der V-ATPase zurückzuführen ist.

Einen weiteren Beleg für den Zusammenhang zwischen der Aktivität der PKA und einer Aktivierung der V-ATPase lieferten HAF-Messungen unter Verwendung des 5-HT-Antagonisten Cinanserin. Berridge und Heslop zeigten durch cAMP-Messungen in den *Calliphora*-Speicheldrüsen, dass 10 μ M Cinanserin den 5-HT-abhängigen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration unterdrückt. Der IP_3 -Weg hingegen wird erst ab 100 μ M Cinanserin beeinflusst (Berridge & Heslop, 1981).

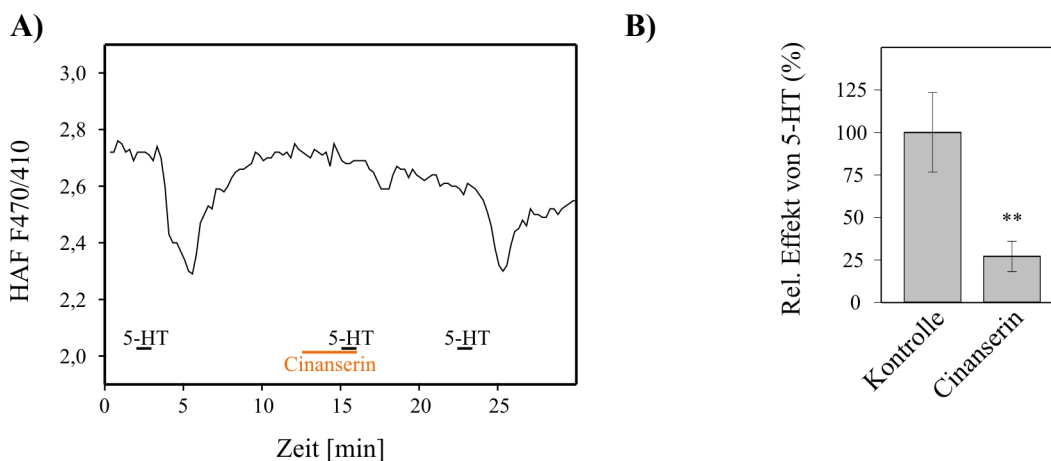


Abbildung 4.4: Unterdrückung der 5-HT-induzierten luminalen Ansäuerung durch den 5-HT-Antagonisten Cinanserin. (A) Die Speicheldrüse wurde für 1 min mit 30 nM 5-HT stimuliert (Kontrollstimulus) und vor einer weiteren 5-HT-Stimulierung mit 10 μ M Cinanserin inkubiert. Cinanserin unterdrückt die 5-HT-induzierte luminale Ansäuerung weitgehend; nach dem Auswaschen von Cinanserin kann mit 5-HT wieder eine stärkere Ansäuerung ausgelöst werden. (B) Statistische Auswertung der Wirkung von Cinanserin auf die 5-HT-induzierte luminale Ansäuerung. Im Vergleich zum Kontrollstimulus (= 100%) ist die 5-HT-induzierte pH-Änderung durch Cinanserin signifikant reduziert (gepaarter t-Test, $n = 6$, $**P < 0,005$).

In den HAF-Messungen führte eine Inkubation der Drüsen mit 10 μM Cinanserin zu einer starken Verringerung der 5-HT-induzierten luminalen Ansäuerung (Abb. 4.4). Der Effekt von Cinanserin war reversibel und nach dem Auswaschen der Substanz konnte mit 5-HT wieder eine stärkere Ansäuerung ausgelöst werden.

Um die Resultate von Berridge und Heslop zu verifizieren, wurde die cAMP-Konzentration in unstimulierten, 5-HT-stimulierten und Cinanserin-behandelten Drüsen mit einem cAMP-*Immunoassay* bestimmt. Die absoluten Werte der Konzentrationsbestimmungen mit dem cAMP-*Immunoassay* waren sehr variabel (Abb. 4.5). Die auftretenden Differenzen in den Konzentrationen unterschiedlich behandelter Proben konnten aber gut reproduziert werden. Im Durchschnitt betrug die cAMP-Konzentration im unstimulierten Zustand 228 fmol/Drüse. Bei einer 5-HT-Stimulierung wurde die cAMP-Konzentration um etwa 80% ($\pm 91\%$) erhöht und lag dann bei 412 fmol/Drüse. Bei einer Behandlung mit 10 μM Cinanserin stieg die cAMP-Konzentration hingegen nur um 33% ($\pm 62\%$) auf 305 fmol/Drüse an.

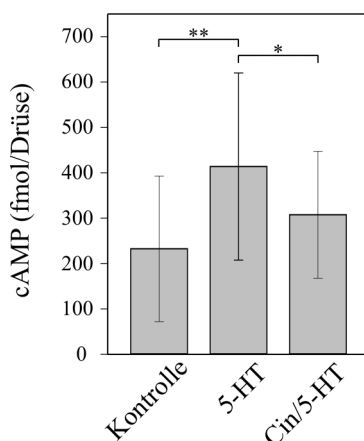


Abbildung 4.5: 5-HT-induzierte Erhöhung der cAMP-Konzentration in *Calliphora*-Speicheldrüsen.

Mit einem kompetitiven *Immunoassay* wurde die cAMP-Konzentration in den Speicheldrüsen bestimmt. Im Vergleich zum unstimulierten Zustand (Kontrolle) ist nach einer Behandlung mit 30 nM 5-HT für 5 min die cAMP-Konzentration um 80% erhöht.

Bei einer Vorinkubation mit 10 μM Cinanserin (Cin) für 10 min ist der 5-HT-abhängige [cAMP]-Anstieg signifikant reduziert (gepaarter t-Test, $n = 8$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$).

Die bisherigen Ergebnisse stehen in Einklang mit der Arbeit von Dames *et al.* (2008), in der nachgewiesen wurde, dass auch durch eine Inkubation der *Calliphora*-Speicheldrüsen mit cAMP die Aktivierung der V-ATPase ausgelöst werden kann. In der vorliegenden Arbeit sollten ebenfalls Experimente mit cAMP durchgeführt werden. Da cAMP jedoch schlecht membrangängig ist und durch unspezifische Phosphodiesterasen schnell hydrolysiert werden kann, wurde das cAMP-Analogon 8-CPT-cAMP verwendet. Ebenso wie cBIMPS ist auch 8-CPT-cAMP in der Lage die PKA zu aktivieren (Dostmann *et al.*, 1990). Des Weiteren ist 8-CPT-cAMP resistent gegen eine Vielzahl von Phosphodiesterasen und besitzt eine hohe Membrangängigkeit (Sandberg *et al.*, 1991).

Um zu verdeutlichen, dass 8-CPT-cAMP die V-ATPase in *Calliphora*-Speicheldrüsen aktiviert, wurde in HAF-Messungen die Wirkung dieser Substanz charakterisiert (Abb. 4.6).

Die Applikation von 50 μM 8-CPT-cAMP für eine Minute löste eine luminalen Ansäuerung aus, die in ihrem maximalen Betrag durchschnittlich 83% ($\pm 25\%$) der vorangegangenen Kontrollstimulierung mit 30 nM 5-HT entsprach (Abb. 4.6). Bei 100 μM 8-CPT-cAMP entsprach der Betrag der luminalen Ansäuerung 130% ($\pm 36\%$) der Kontrollstimulierung. Bei längeren Inkubationszeiten konnten noch größere Beträge der Ansäuerung erreicht werden, allerdings war die Wirkung des 8-CPT-cAMP dann sehr schlecht reversibel (Ergebnisse nicht abgebildet).

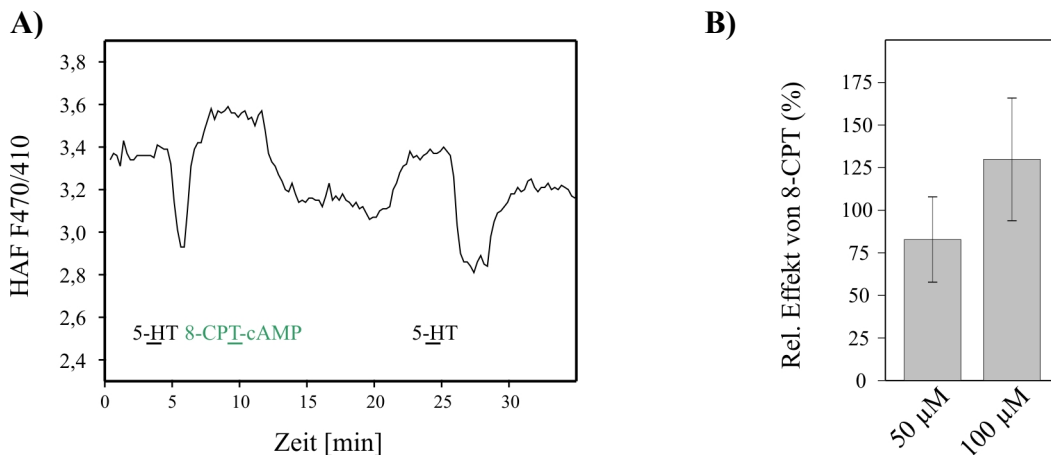


Abbildung 4.6: 8-CPT-cAMP-induzierte, V-ATPase-vermittelte luminalen Ansäuerung.

(A) Die Speicheldrüse wurde mit 30 nM 5-HT (Kontrollstimulus) und nachfolgend für 1 min mit 50 μM 8-CPT-cAMP behandelt; das membrangängige cAMP-Analogon 8-CPT-cAMP löst eine luminalen Ansäuerung aus, die im Vergleich zu 5-HT jedoch länger andauert. (B) Auswertung der Wirkung von 50 μM und 100 μM 8-CPT-cAMP auf den luminalen pH-Wert; die 8-CPT-cAMP-induzierte Ansäuerung wurde auf den Kontrollstimulus (= 100%) normiert (n = 6).

4.2 Die PKA-abhängige Phosphorylierung der V-ATPase

4.2.1 Proteinphosphorylierungen in den *Calliphora*-Speicheldrüsen

Um den Zusammenhang zwischen der Aktivität der PKA und der reversiblen Dissoziation der V-ATPase in *Calliphora*-Speicheldrüsen aufzuklären, war es erforderlich die Stimulus-induzierten, PKA-abhängigen Phosphorylierungen zu untersuchen.

Zum Nachweis von Proteinphosphorylierungen wurde das Reagenz *ProQ Diamond* verwendet. Es handelt sich dabei um einen Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch an phosphorylierte Serin-, Threonin- und Tyrosin-Reste bindet. Mit *ProQ Diamond* werden nach einer SDS-PAGE die phosphorylierten Proteine direkt im Polyacrylamidgel nachgewiesen. Diese Nachweismethode für Proteinphosphorylierungen stellt somit eine einfache Alternative zu der sonst üblichen radioaktiven Markierung dar. Im Gegensatz zur Autoradiographie, die nur auf speziell eingerichtete Labore mit besonderen Schutzmaßnahmen beschränkt ist, kann *ProQ Diamond* in jedem biochemischen Labor verwendet werden.

Da infolge einer Stimulierung der *Calliphora*-Speicheldrüsen mit 5-HT, cAMP oder einem cAMP-Analogon die PKA in den Zellen aktiv wird, war davon auszugehen, dass bei einer Analyse der Proteine eine Stimulus-abhängige Änderung im Phosphorylierungsmuster auftritt. Der Vergleich von unstimulierten Kontroll-Drüsen und 5-HT- beziehungsweise 8-CPT-cAMP-stimulierten Drüsen ergab jedoch keine offensichtlichen Unterschiede im Muster der *ProQ Diamond*-Färbungen (Abb. 4.7). Dieses Experiment lieferte dennoch einen Eindruck vom Ausmaß der Proteinphosphorylierungen und der Spezifität der Nachweismethode. Über den gesamten erfassten Massenbereich traten Banden phosphorylierter Proteine auf. Bei einem Vergleich der Phosphoprotein-Färbung mit der Coomassie-Färbung war auffällig, dass die besonders intensiven Phosphorylierungssignale vor allem von Proteinen ausgingen, die in vergleichsweise geringen Mengen vorkamen.

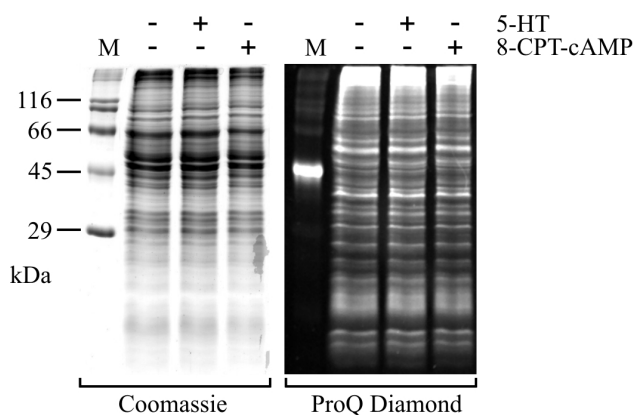


Abbildung 4.7: Proteinphosphorylierungen in *Calliphora*-Speicheldrüsen.

Isolierte Speicheldrüsen wurden 5 min ohne (-) bzw. mit (+) 30 nM 5-HT oder 100 μ M 8-CPT-cAMP inkubiert und anschließend für die SDS-PAGE vorbereitet. Nach der Proteintrennung wurden phosphorylierte Proteine mit *ProQ Diamond* gefärbt (rechts) und dokumentiert; es folgte eine Coomassie-Färbung zum Nachweis des Gesamtproteins (links). Der Massenstandard (M) enthält ein phosphoryliertes Protein bei 45 kDa (Ovalbumin). Es gibt zwischen den Proben keine auffälligen Unterschiede in der Phosphoprotein-Markierung.

Die Übereinstimmung der Phosphorylierungsmuster in den verschiedenen Proben ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die PKA-abhängigen Phosphorylierungen nur für kurze Zeit bestehen und die entsprechenden Proteinphosphatasen konstitutiv aktiv sind oder ebenfalls Stimulus-abhängig aktiviert werden.

Hinsichtlich der Phosphoprotein-Färbungen wurde der Massenbereich der Untereinheit C (42 kDa) mit besonderem Interesse untersucht und es konnte in allen Proben ein schwaches Phosphorylierungssignal bei 42 kDa beobachtet werden. In einzelnen Experimenten gab es in Abhängigkeit von 8-CPT-cAMP eine schwache Zunahme dieses Signals. Die Reproduzierbarkeit dieses Ergebnisses war jedoch schlecht (Ergebnisse nicht abgebildet). Um die experimentellen Bedingungen genauer kontrollieren zu können und die Reproduzierbarkeit der Experimente zu verbessern, wurde die Untersuchung der PKA-abhängigen Phosphorylierungen unter Verwendung von Zelllysaten fortgeführt. In diesen Experimenten, nachfolgend als *PKA-Assay* bezeichnet, wurde die PKA im Zelllysate mittels 8-CPT-cAMP aktiviert. In der Abbildung 4.8 ist ein Polyacrylamidgel mit den Proteinen aus einem *PKA-Assay* dargestellt. Das Muster der *ProQ Diamond*-Färbungen stimmte mit dem vorherigen Versuch überein und die Intensitätsverteilung war ebenfalls sehr ähnlich (siehe Abb. 4.7). Unter den verwendeten Puffer-Bedingungen war allerdings in den 8-CPT-cAMP-behandelten Proben im Massenbereich von 42 kDa ein wesentlich intensiveres Phosphorylierungssignal zu sehen als in den Kontroll-Ansätzen ohne das cAMP-Analogon. Für dieses Signal gab es bezüglich der Molekularmasse eine sehr gute Übereinstimmung mit der Untereinheit C. Außerdem erfolgte eine schwache Zunahme der Phosphorylierungssignale bei 47 und 48 kDa.

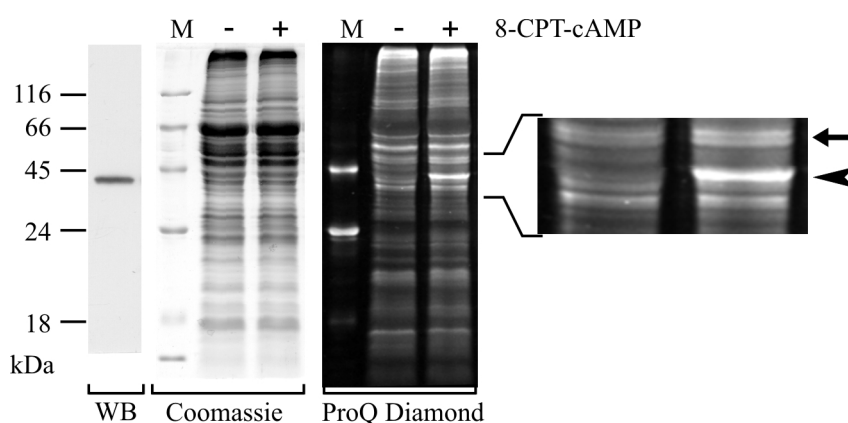


Abbildung 4.8: PKA-abhängige Proteinphosphorylierung in einem Zelllysate von *Calliphora*-Speicheldrüsen. Aliquots eines Zelllysates von *Calliphora*-Speicheldrüsen wurden ohne (-) bzw. mit (+) 50 μ M 8-CPT-cAMP für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Färbung mit *ProQ Diamond* zeigt eine starke Zunahme des Phosphorylierungssignals bei 42 kDa in der 8-CPT-cAMP-behandelten Probe (siehe Pfeilspitze). Eine schwache Zunahme der Signalintensität ist auch bei 47 und 48 kDa zu beobachten (Pfeil). Ein *Western Blot* (WB) der V-ATPase-Untereinheit C dient als Referenz für die Lage dieses Proteins im SDS-Gel. Der Massenstandard (M) enthält zwei phosphorylierte Proteine bei 24 kDa (β -Casein) und 45 kDa (Ovalbumin).

Mit diesem Versuchsansatz war es somit möglich eine Zunahme im Phosphorylierungsgrad einiger Proteine in Abhängigkeit von 8-CPT-cAMP zu erreichen. Das intensive 8-CPT-cAMP-abhängige Phosphorylierungssignals im Bereich der Molekularmasse der Untereinheit C war ein Indiz für die Phosphorylierung dieses Proteins durch die PKA.

4.2.2 Die Phosphorylierung der Untereinheit C

Um zu überprüfen, ob das Phosphorylierungssignal bei 42 kDa die Untereinheit C repräsentierte, war eine spezifische Nachweismethode erforderlich. Ein experimenteller Ansatz basierte auf der Blockierung einer möglichen Interaktion zwischen der Untereinheit C und der PKA im *PKA-Assay*. Die Blockierung der Interaktion sollte durch die Bindung von Antikörpern an die Untereinheit C erreicht werden. Daher wurde ein Ansatz im *PKA-Assay* vor der Zugabe von 8-CPT-cAMP mit einem polyklonalen Antiserum gegen die Untereinheit C inkubiert. Die Kreuzreaktivität dieses Antiserums mit dem orthologen *Calliphora*-Protein wird in den Abbildungen 4.8 und 4.9 anhand von *Western Blots* gezeigt.

Das Ergebnis dieser Immunblockierung ist in Abbildung 4.9 dargestellt. Im Vergleich mit dem unstimulierten Ansatz verursachte die Inkubation mit 8-CPT-cAMP eine starke Zunahme des Phosphorylierungssignals bei 42 kDa. In dem 8-CPT-cAMP-behandelten Ansatz mit dem Antiserum gegen die Untereinheit C war diese Signalzunahme hingegen weitgehend unterdrückt.

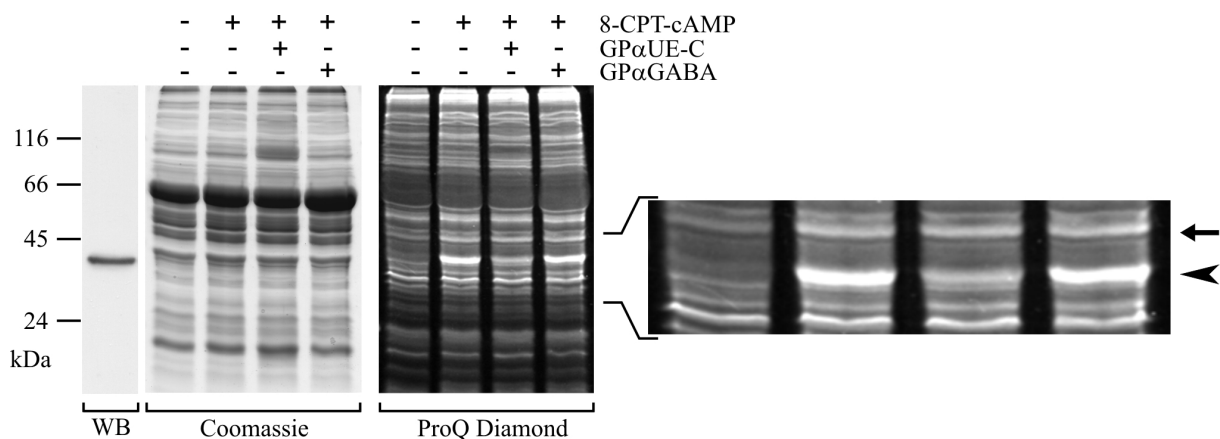


Abbildung 4.9: PKA-abhängige Proteinphosphorylierung der V-ATPase-Untereinheit C.

Aliquots eines Zelllysats von *Calliphora*-Speicheldrüsen wurden vor der Inkubation mit 50 μ M 8-CPT-cAMP ohne (-) bzw. mit (+) einem polyklonalen Antiserum gegen die V-ATPase-Untereinheit C (GPαUE-C) inkubiert. In den Ansätzen mit GPαUE-C ist das Phosphorylierungssignal bei 42 kDa (Pfeilspitze) deutlich weniger intensiv als in den Ansätzen ohne das Antiserum. Das Signal der Proteinbande oberhalb 42 kDa (Pfeil) wurde durch das Antiserum nicht vermindert. In einem weiteren 8-CPT-cAMP-behandelten Ansatz, der mit einem Antiserum gegen GABA (GPαGABA) vorinkubiert wurde, ist die Intensität des Signals bei 42 kDa nicht vermindert. Ein *Western Blot* (WB) der Untereinheit C dient als Referenz für die Lage dieses Proteins im Gel.

Die Phosphorylierungssignale bei 47 und 48 kDa wurden durch das Antiserum nicht beeinflusst und wiesen eine ähnliche Intensität auf wie die entsprechenden Signale in dem 8-CPT-cAMP-behandelten Ansatz ohne das Antiserum. Dies ist als ein Indiz für die Spezifität dieser Nachweismethode anzusehen. Als zusätzliche Kontrolle für die Spezifität der Immunoblockierung wurde ein weiterer Ansatz mit einem Antiserum gegen γ -Aminobuttersäure (GABA) vorinkubiert und mit 8-CPT-cAMP versetzt. Die jeweiligen Intensitäten der Phosphorylierungssignale bei 42, 47 und 48 kDa waren in diesem Fall nicht vermindert.

Um die bisherigen Resultate zu überprüfen und eine Modifizierung der Untereinheit C in den intakten Zellen zu analysieren, wurde die 2D-Elektrophorese als alternative Methode herangezogen. Im Fall einer Modifizierung sollte sich der isoelektrische Punkt des Proteins verändern und in der *Western Blot*-Analyse der 2D-Elektrophorese wären dann mehrere Immunosignale beziehungsweise eine Verschiebung des Immunosignals im Vergleich zum unmodifizierten Protein zu erwarten. Charakteristisch für Phosphorylierungen ist eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes in den sauren pH-Bereich (Morandell *et al.*, 2006). Die Abbildung 4.10 zeigt die *Western Blot*-Analysen der Proben, die mittels 2D-Elektrophorese aufgetrennt wurden. Um den Verbrauch des Antiserums gegen die Untereinheit C gering zu halten, wurde für die Immundetektion nur der Massenbereich von 40 bis 46 kDa verwendet.

Bei der Analyse der Proteine aus unstimulierten Drüsen wurde das Immunosignal der Untereinheit C im Massenbereich von 42 kDa detektiert (Abb. 4.10 A). Das Signal reichte vom Auftragungspunkt bei pH 10 bis zu einem etwas geringeren pH-Wert. Dieses gestreckte Signal resultierte wahrscheinlich von Protein-Molekülen, die zum einen nach dem Eintritt in das Gel präzipitiert sind und zum anderen an ihrem putativen isoelektrischen Punkt, der im alkalischen pH-Bereich liegt, fokussiert wurden. Die berechneten isoelektrischen Punkte (IP) der Untereinheit C aus *Manduca sexta* (IP = 8,32), *Drosophila melanogaster* (IP = 7,81) und *Aedes aegypti* (IP = 8,44) wurden als Vergleichswerte herangezogen. Der isoelektrische Punkt der Untereinheit C aus *Calliphora vicina* hat einen Wert von etwa 9,0 und ist damit etwas alkalischer als der Wert für das orthologe Protein aus *Aedes*. In den Proben unstimulierter Drüsen erschien in Richtung der Anode noch ein weiteres, aber sehr schwaches Immunosignal. Dieses zweite Signal konnte nicht mehr detektiert werden, wenn die Drüsen mit dem spezifischen PKA-Inhibitor H-89 (Chijiwa *et al.*, 1990) inkubiert wurden.

Eine Stimulierung der Drüsen mit 8-CPT-cAMP führte zu einer Zunahme des zweiten Immunosignals und zu dem Auftreten eines zusätzlichen Signals bei einem noch kleineren pH-Wert (Abb. 4.10 B). Ein ähnliches Ergebnis ergab sich bei einer Stimulierung der Drüsen

mit dem natürlichen Agonisten 5-HT. Allerdings war die Intensität des letzten Signals im Fall der 5-HT-Stimulierung geringer als in den 8-CPT-cAMP-behandelten Proben (Abb. 4.10 C). Bei einer Vorinkubation mit H-89 konnte sowohl bei 5-HT- als auch bei 8-CPT-cAMP-stimulierten Drüsen dieses Immunosignal nicht mehr nachgewiesen werden.

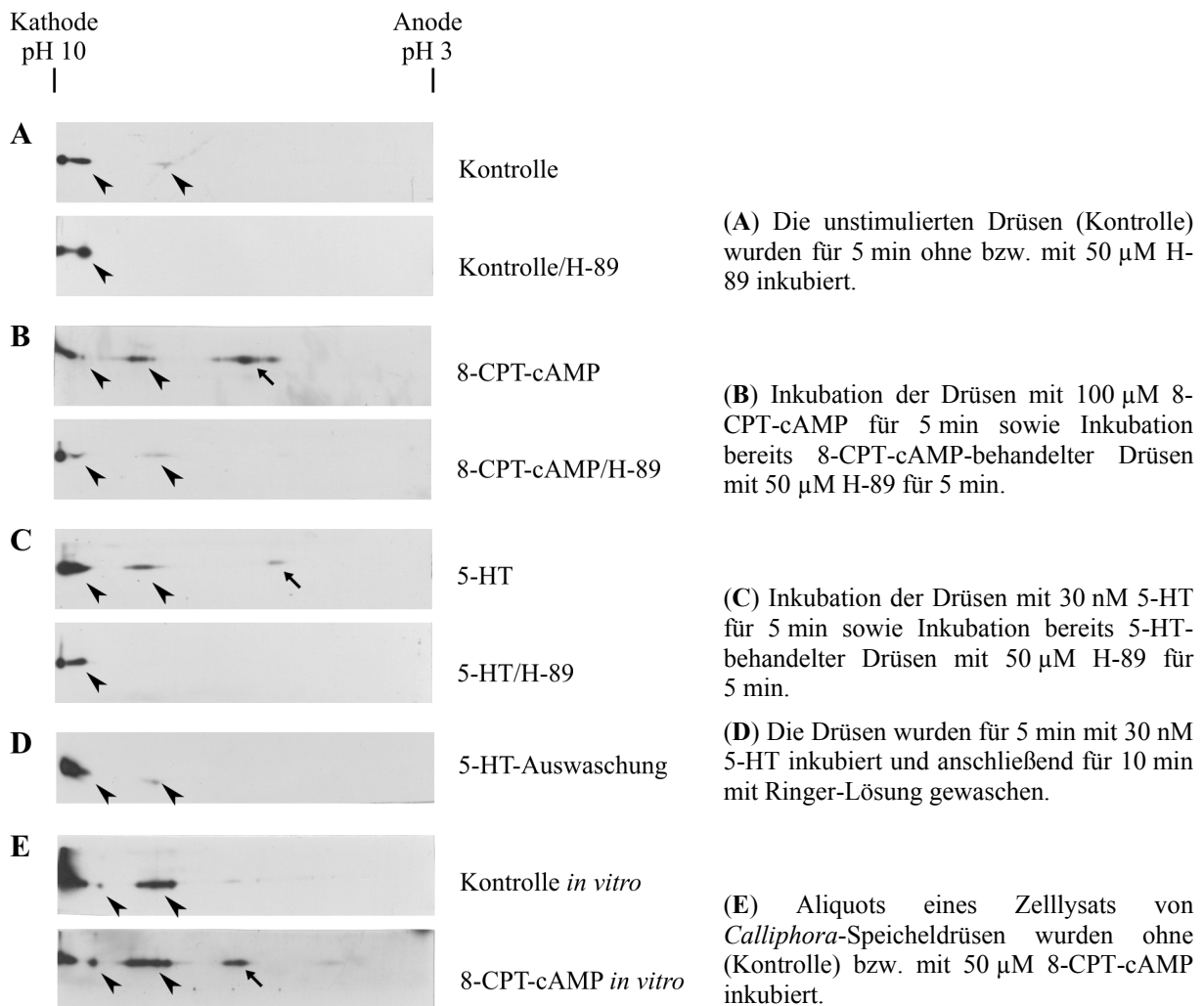


Abbildung 4.10: Nachweis der phosphorylierten Untereinheit C mittels 2D-Elektrophorese.

(A-D) Isolierte Speicheldrüsen wurden mit 5-HT, 8-CPT-cAMP und H-89 inkubiert, anschließend homogenisiert und für die 2D-Elektrophorese vorbereitet. Mittels *Western Blotting* wurde in dem Molekularmassenbereich zwischen 40 und 46 kDa die Untereinheit C nachgewiesen. (E) Mit den Proben eines PKA-Assays wurde ebenfalls eine 2D-Elektrophorese durchgeführt. Aufgetrennte Proteine sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet und Pfeile markieren 5-HT- bzw. 8-CPT-cAMP-abhängige Signale.

Das Waschen von 5-HT-stimulierten Drüsen mit Ringer-Lösung führte zu einem ähnlichen Muster in der Immundetektion wie bei unstimulierten Drüsen (Abb. 4.10 D). In diesen Proben wurden ebenfalls nur das erste, sehr intensive Signal im stark alkalischen pH-Bereich und das nachfolgende, intensitätsschwache Signal detektiert. Dadurch wird deutlich, dass die 5-HT-induzierten Phosphorylierung der Untereinheit C reversibel ist und dieses Protein nur für einige Minuten in der modifizierten Form vorliegt.

In den PKA-*Assays* führte die Behandlung mit 8-CPT-cAMP zu einem sehr intensiven Phosphorylierungssignal im Massenbereich von 42 kDa (siehe Abb. 4.8/4.9). Um zu bestätigen, dass dieses Signal auf die phosphorylierte Untereinheit C zurückzuführen ist, wurden auch Proben aus PKA-*Assays* der 2D-Elektrophorese unterzogen (Abb. 4.10 E).

Die Analyse der Kontroll-Ansätze ohne 8-CPT-cAMP ergab insgesamt drei Immunosignale. Das erste, sehr intensive Immunosignal lag am Auftragspunkt bei pH 10 und entsprach hinsichtlich der Position dem präzipitierten Protein der vorherigen Proben. Das zweite, wesentlich schwächere Signal erschien bei einem leicht saureren pH-Wert. Die Lage dieses zweiten Signals stimmte annähernd mit dem Ende des gestreckten Immunosignals aus den vorangegangenen Experimenten überein. Das dritte Signal war wieder sehr intensiv und wurde weiter in Richtung der Anode detektiert.

Die Analyse vom 8-CPT-cAMP-behandelten Ansatz aus dem PKA-*Assay* ergab insgesamt vier getrennte Immunosignale der Untereinheit C. Die ersten drei Signale, ausgehend von der Kathode, entsprachen in ihrer jeweiligen Position den Signalen aus den unstimulierten Kontroll-Ansätzen. In den 8-CPT-cAMP-behandelten Proben war die Intensität der Immunoreaktivität des präzipitierten Proteins etwas schwächer und bei dem zweiten und dritten Signal stärker ausgeprägt als bei den Kontrollen. Das vierte Signal wurde in dem pH-Bereich detektiert, in dem auch das zusätzliche, 5-HT- beziehungsweise 8-CPT-abhängige Signal in den Proben stimulierter Drüsen lag (siehe Abb. 4.10 B/C).

Bei der Analyse der 2D-Elektrophorese entsprachen die Proben der PKA-*Assays* hinsichtlich des Musters der Immunmarkierung den Proteinproben aus Drüsen, die im intakten Zustand behandelt wurden. Bezüglich der Modifizierung der Untereinheit C in Abhängigkeit von 8-CPT-cAMP führte der Versuchsansatz mit dem Zelllysatz zu einem ähnlichen Ergebnis wie die Behandlung der intakten Drüsen.

Es wurde aber in Betracht gezogen, dass in den Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen die Menge der Untereinheit C aufgrund einer Stimulus-abhängigen Proteinsynthese anstieg und daraus die zusätzlichen Immunosignale bei der *Western Blot*-Analyse der 2D-Elektrophorese resultierten. Deshalb wurde die relative Menge der vorhandenen Untereinheit C in den Zellen unstimulierter und 5-HT-stimulierter Drüsen mittels *Western Blotting* bestimmt. Für eine Normierung wurde als interner Standard β -Tubulin herangezogen.

Die densitometrische Auswertung der *Western Blot*-Analysen ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den relativen Mengen der Untereinheit C in unstimulierten und 5-HT-stimulierten Drüsenzellen.

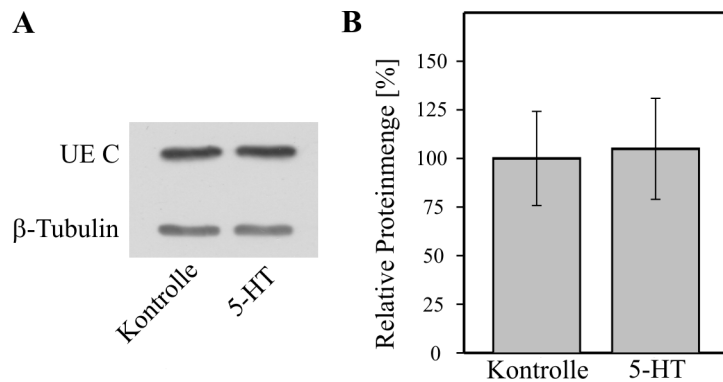


Abbildung 4.11: Relative Menge der Untereinheit C vor und nach einer 5-HT-Stimulierung. (A) *Western Blot*-Analyse von Proteinen aus *Calliphora*-Speicheldrüsen mit Antiseren gegen die Untereinheit C (UE C) und β -Tubulin. (B) Die *Western Blot*-Analysen wurden densitometrisch ausgewertet, um die Proteinmengen der Untereinheit C in unstimulierten (Kontrolle) und 5-HT-stimulierten Drüsen zu bestimmen. β -Tubulin diente als interner Standard. Die statistische Analyse ergab keinen signifikanten Unterschied (t-Test, $n = 8$).

Die Ergebnisse der 2D-Elektrophorese bestätigen die PKA-Assays und belegen, dass in den Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen eine 5-HT-Stimulierung, begleitet von einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, zu einer reversiblen und PKA-abhängigen Phosphorylierung der Untereinheit C führt. Das Auftreten mehrerer Stimulus-abhängiger Immunosignale bei der *Western Blot*-Analyse der 2D-Elektrophorese deutet darauf hin, dass die Untereinheit C mehr als eine Phosphorylierungsstelle besitzt.

4.3 Die Proteinphosphatasen in *Calliphora*-Speicheldrüsen

4.3.1 Die Regulation der V-ATPase durch Proteinphosphatasen

Die Proteinphosphatasen, die für die Dephosphorylierung von Proteinen erforderlich sind, haben für die Regulation zellulärer Prozesse eine ebenso große Bedeutung wie die Proteinkinasen und die Wirkung dieser Enzyme kann nicht getrennt voneinander betrachtet werden (Shacter *et al.*, 1984; Hunter, 1995). In den *Calliphora*-Speicheldrüsen wird nur für die Dauer einer 5-HT-Stimulierung die Aktivität der V-ATPase durch die PKA gesteigert (Dames *et al.*, 2006; Rein *et al.*, 2006; Rein *et al.*, 2008). Es ist daher davon auszugehen, dass die PKA-abhängigen Phosphorylierungen nur für diese Zeit bestehen. Dies führte zu der Annahme, dass eine Proteinphosphatase bereits während oder am Ende einer Stimulierung diese Phosphorylierungen wieder entfernt und somit die V-ATPase inaktiviert wird.

Die PKA überträgt Phosphatgruppen auf Serin- und Threonin-Reste (*Reviews*: Rubin & Rosen, 1975; Edelman & Blumenthal, 1987). Die Proteinphosphatasen (PP), die Phosphatgruppen von diesen Aminosäureresten entfernen, werden traditionell vier Subtypen zugeordnet: PP1, PP2A, PP2B und PP2C. Diese Proteinphosphatasen können anhand der Empfindlichkeit gegenüber spezifischen Inhibitoren und der Abhängigkeit von zweiwertigen Kationen unterschieden werden. In den nachfolgenden Experimenten wurden die Substanzen Okadainsäure und Tautomycin für die Hemmung von PP1 und PP2A verwendet (Bialojan & Takai, 1988; MacKintosh & Klumpp, 1990). Die Ca^{2+} -abhängigen Proteinphosphatasen vom Typ 2B wurden mittels FK-506 und Cyclosporin A gehemmt (Liu *et al.*, 1991). Für die Proteinphosphatasen vom Typ 2C sind bisher keine spezifischen Inhibitoren bekannt und für die Identifizierung mittels physiologischer oder biochemischer Methoden konnte nur die Mg^{2+} -Abhängigkeit herangezogen werden (Cohen & Cohen, 1989; Shepbeck *et al.*, 1997; Klumpp *et al.*, 2006; Rogers *et al.*, 2006).

Die Untersuchung der jeweiligen Proteinphosphatasen wurde zunächst anhand von luminalen pH-Messungen mittels HAF durchgeführt. Da davon auszugehen ist, dass eine Dephosphorylierung die V-ATPase inaktiviert, würde eine Hemmung der beteiligten Proteinphosphatasen zu einer größeren und länger anhaltenden 5-HT-induzierten luminalen Ansäuerung führen. Weiterhin ist in Betracht zu ziehen, dass die Behandlung der unstimulierten Drüsen mit einem wirksamen Hemmstoff eine Steigerung der V-ATPase-Grundaktivität auslöst.

In der Abbildung 4.12 sind die Experimente mit Okadainsäure und Tautomycin zusammengefasst. Die Drüsen wurden für 10 bis 12 Minuten mit 250 nM des jeweiligen

Inhibitoren vorinkubiert. Anschließend wurde 5-HT zusammen mit dem jeweils verwendeten Inhibitor appliziert. Die verwendeten Konzentrationen liegen um den Faktor 100 über den IC_{50} -Werten dieser Inhibitoren (Review: Shepeck *et al.*, 1997). Okadainsäure und Tautomycin hatten jedoch keinen sichtbaren Effekt auf die luminalen pH-Änderungen bei einer 5-HT-Stimulierung. Die Stimulierung in Gegenwart von Okadainsäure beziehungsweise Tautomycin bewirkte hinsichtlich des Betrags der luminalen Ansäuerung etwa die gleiche Änderung wie die vorangegangene Kontrollstimulierung. (Abb. 4.12 A/B/D).

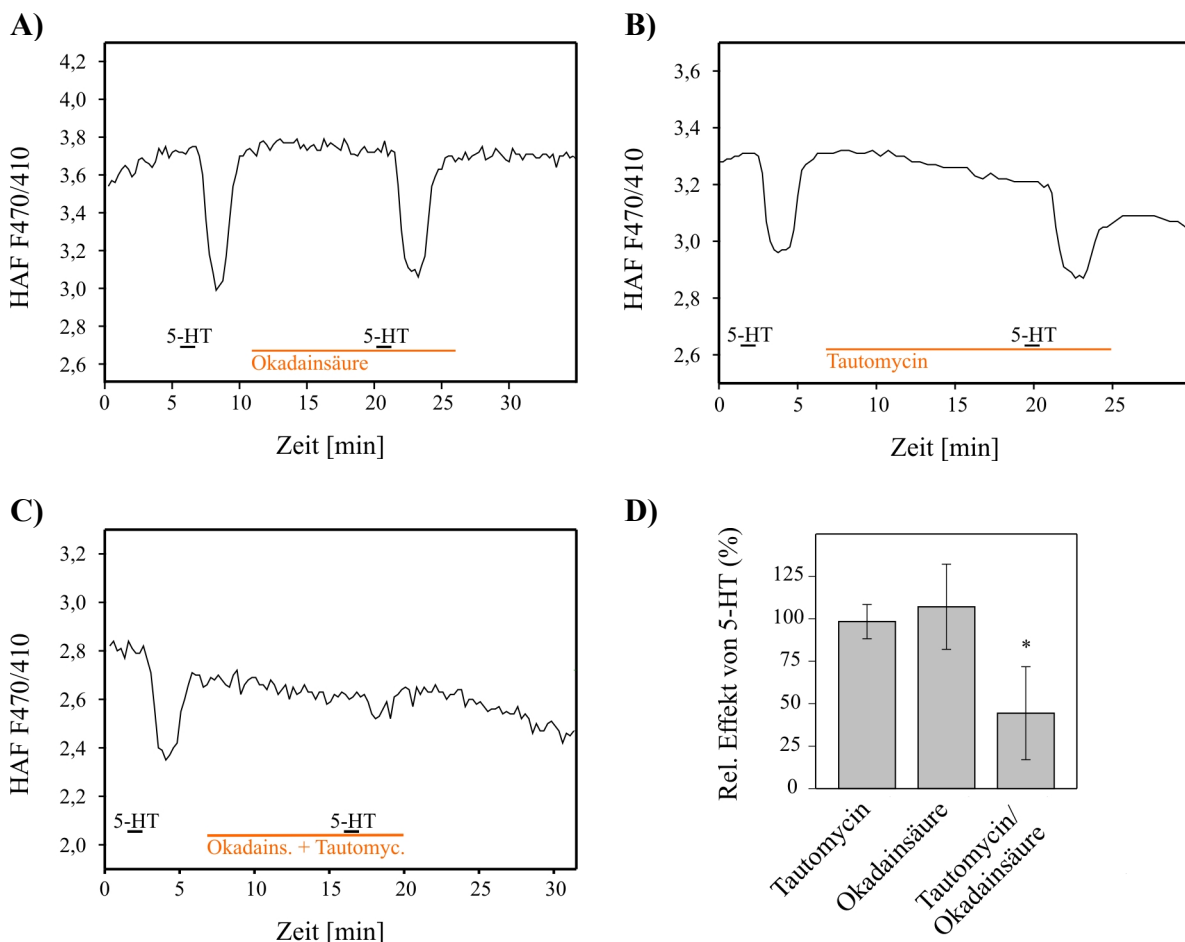


Abbildung 4.12: Effekt von Okadainsäure und Tautomycin auf die Aktivität der V-ATPase.

(A-C) Die Speicheldrüse wurde mit 30 nM 5-HT stimuliert (Kontrollstimulus) und vor einer weiteren 5-HT-Stimulierung mit (A) 250 nM Okadainsäure, (B) 250 nM Tautomycin oder (C) gleichzeitig mit jeweils 100 nM Okadainsäure und Tautomycin inkubiert. (D) Statistische Auswertung der Wirkung von Okadainsäure und Tautomycin auf die 5-HT-induzierte luminalen Ansäuerung. Im Vergleich zum Kontrollstimulus (= 100%) ist die 5-HT-induzierte pH-Änderung nur bei einer gleichzeitigen Applikation beider Substanzen signifikant reduziert (gepaarter t-Test, $n = 6$, $*P < 0,05$).

In weiteren Experimenten wurden die Drüsen gleichzeitig mit 100 nM Okadainsäure und 100 nM Tautomycin behandelt. Die gleichzeitige Inkubation mit beiden Inhibitoren führte zu einer signifikanten Verringerung der 5-HT-induzierten Ansäuerung (Abb. 4.12 C/D).

Um den Effekt von Okadainsäure und Tautomycin auf die Aktivität der V-ATPase genauer zu beurteilen, wurde die zeitliche Dauer der 5-HT-induzierten luminalen Ansäuerung vor und nach einer Behandlung mit dem jeweiligen Inhibitor bestimmt.

Bei einer Stimulierung der Drüsen mit 30 nM 5-HT für 45 Sekunden betrug der zeitliche Abstand zwischen der halbmaximalen Ansäuerung und der halbmaximalen Alkalisierung einer 5-HT-induzierten luminalen Ansäuerung durchschnittlich 1,7 Minuten. Durch Okadainsäure beziehungsweise Tautomycin wurde die Dauer der luminalen Ansäuerung nicht signifikant verändert (Abb. 4.13).

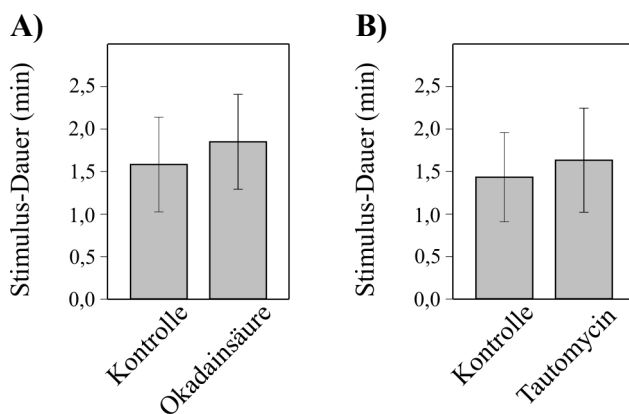


Abbildung 4.13: Effekt von Okadainsäure und Tautomycin auf die Dauer der 5-HT-Stimulierung. Anhand von HAF-Messungen wurde die Dauer von 5-HT-Stimulierungen analysiert. Als Messgröße wurde der zeitliche Abstand zwischen halbmaximaler Ansäuerung und halbmaximaler Alkalisierung der luminalen pH-Änderung festgelegt (siehe Abb. 4.12 A/B). (A/B) Die Speicheldrüsen wurde mit 30 nM 5-HT stimuliert (Kontrolle) und vor einer weiteren 5-HT-Stimulierung mit (A) 250 nM Okadainsäure oder (B) 250 nM Tautomycin inkubiert. Die Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied (gepaarter t-Test, n = 6).

Für die Hemmung der Proteinphosphatasen vom Typ 2B wurden die Drüsen mit 10 μ M FK-506 beziehungsweise 20 μ M Cyclosporin A inkubiert. Im Gegensatz zu den Inhibitoren der Proteinphosphatasen vom Typ 1 und 2A sind für FK-506 und Cyclosporin A keine IC_{50} -Werte publiziert. Die verwendeten Konzentrationen orientierten sich an der Arbeit von Kuromi *et al.* (1997), in der die Untersuchung dieser Proteine in *Drosophila* durchgeführt wurde.

Eine Behandlung der Drüsen mit FK-506 beziehungsweise Cyclosporin A führte in beiden Fällen zu einer starken Verringerung in der 5-HT-induzierten luminalen Ansäuerung (Abb. 4.14 A-C). Bei den verwendeten Konzentrationen war Cyclosporin A der effektivere Inhibitor und reduzierte den relativen Betrag der 5-HT-induzierten luminalen Ansäuerung durchschnittlich auf 2,5% (\pm 29%) der Kontrollstimulierung. Bei FK-506 betrug dieser Betrag durchschnittlich noch 44% (\pm 13%).

Die Wirkung von Cyclosporin A wurde ausführlicher charakterisiert. So war der Effekt dieses Inhibitors nicht reversibel. Auch nach längerem Auswaschen der Substanz konnte keine luminalen Ansäuerung mit 5-HT ausgelöst werden (Abb. 4.14 B). Weiterhin trat der Effekt von Cyclosporin A sehr schnell ein. Die Applikation von Cyclosporin A sofort nach einer kurzen 5-HT-Stimulierung blockierte bereits die weitere Zunahme der einsetzenden Ansäuerung und führte zur Wiederherstellung des pH-Ruhewertes (Abb. 4.14 D).

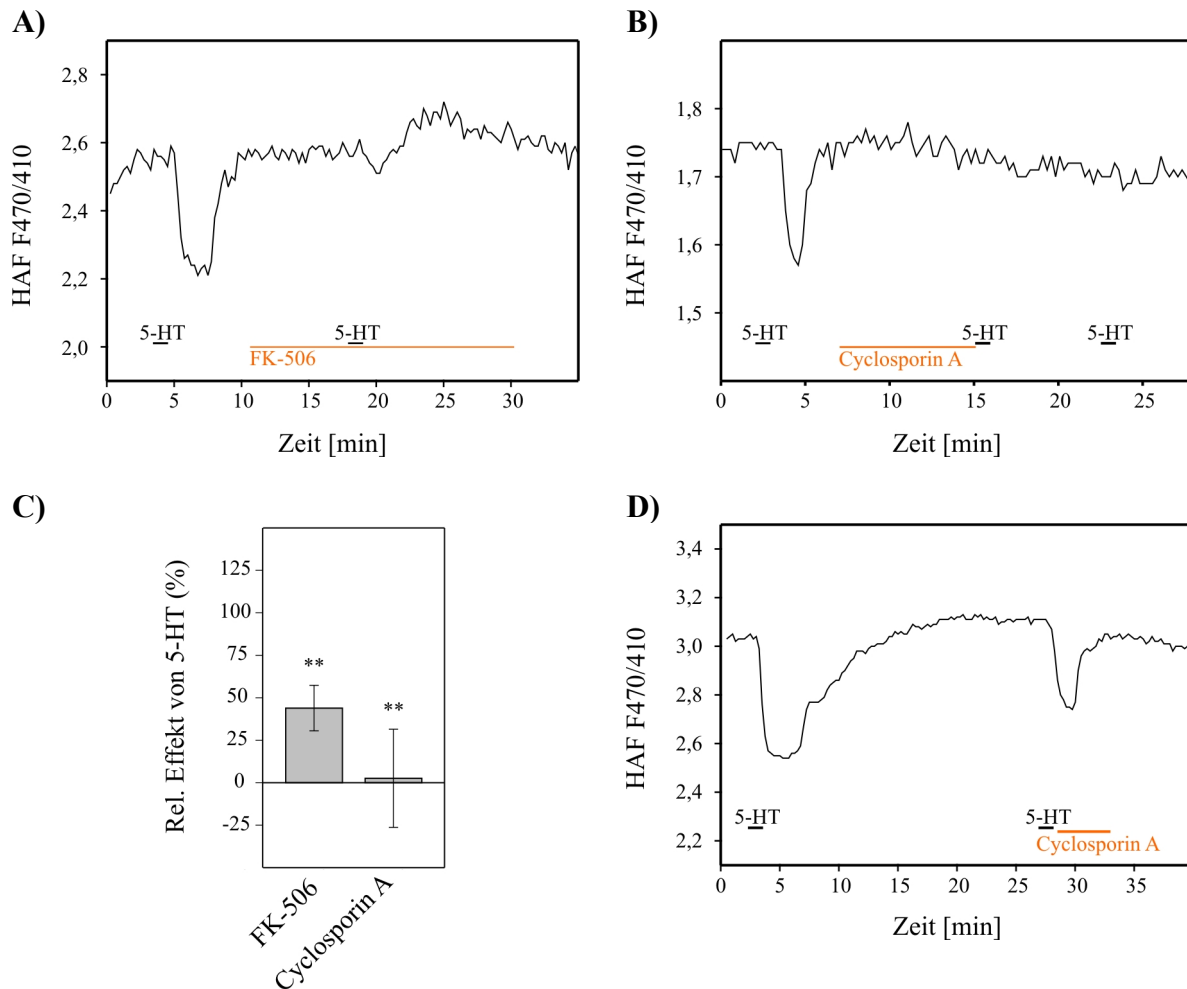


Abbildung 4.14: Effekt von FK-506 und Cyclosporin A auf die Aktivität der V-ATPase.

(A-C) Die Speicheldrüse wurde mit 30 nM 5-HT stimuliert (Kontrollstimulus) und vor einer weiteren 5-HT-Stimulierung mit (A) 10 μ M FK-506 oder (B) 20 μ M Cyclosporin A inkubiert. (C) Statistische Auswertung der Wirkung von FK-506 und Cyclosporin A auf die 5-HT-induzierte luminalen Ansäuerung. Im Vergleich zum Kontrollstimulus (= 100%) ist die 5-HT-induzierte pH-Änderung bei beiden Substanzen signifikant reduziert (gepaarter t-Test, n = 6, **P < 0,005). (D) Die Applikation von Cyclosporin A kurz nach einer 5-HT-Stimulierung reduziert bereits die einsetzende luminalen Ansäuerung.

Da die Phosphatasen 2B von Ca^{2+} -Ionen abhängig sind, sollte auch der Einfluss der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf die Aktivität der V-ATPase untersucht werden. Um die Ca^{2+} -Konzentration in den Drüsenzellen zu verringern, wurde ein Ester des Ca^{2+} -spezifischen Chelators BAPTA (BAPTA-AM) verwendet. Die Inkubation der Drüsen mit 50 μ M BAPTA-AM für 10 bis 15 min hatte aber keinen Einfluss auf die 5-HT-induzierte luminalen Ansäuerung (Abb. 4.15 A/D).

Es wurde in Betracht gezogen, dass eine Verringerung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch BAPTA-AM zu einem Ca^{2+} -Einstrom aus der extrazellulären Lösung führt. Daher erfolgte in weiteren Messungen die Inkubation mit BAPTA-AM in einer Ca^{2+} -freien Ringer-Lösung. Zuvor wurde aber der Einfluss einer Ca^{2+} -freien Ringer-Lösung auf

den luminalen pH-Wert und die 5-HT-induzierte luminalen Ansäuerung überprüft. Die Drüsen wurden mit der Ca^{2+} -freien Ringer-Lösung gespült und wiederholt mit 30 nM 5-HT stimuliert (Abb. 4.15 B). Der luminalen pH-Wert im Ruhezustand wurde durch die Ca^{2+} -freie Ringer-Lösung nicht beeinflusst und die pH-Änderung bei der ersten 5-HT-Stimulierung unter diesen Bedingungen entsprach in ihrem Betrag der vorangegangenen Kontrollstimulierung (Abb. 4.15 D). Mit jeder weiteren 5-HT-Stimulierung unter Ca^{2+} -freien Bedingungen wurde der Betrag der luminalen Ansäuerung stetig kleiner (Abb. 4.15 B). Allerdings konnte bereits eine Minuten nach dem Einspülen der normalen Ringer-Lösung wieder eine starke Ansäuerung ausgelöst werden, die in ihrem Betrag der Kontrollstimulierung entsprach, aber länger andauerte.

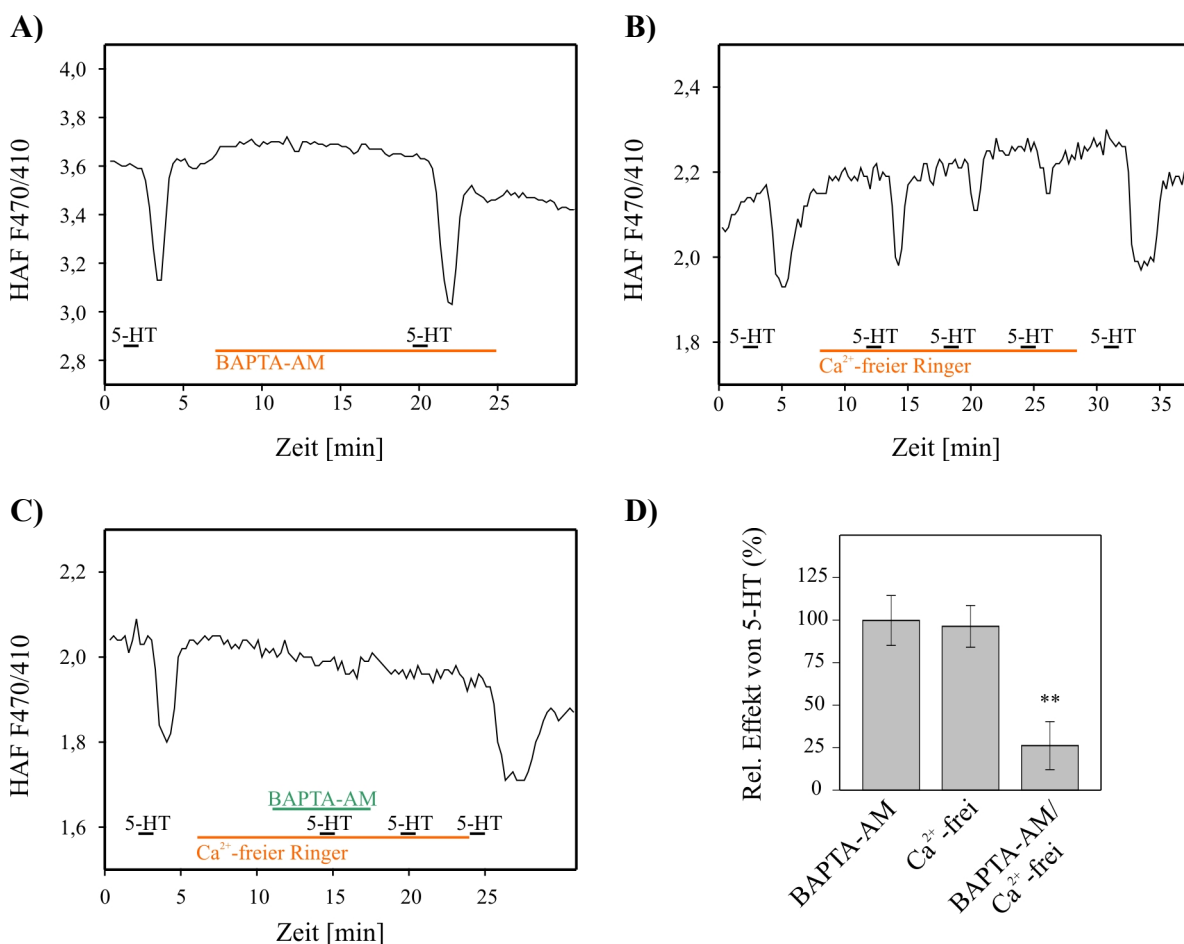


Abbildung 4.15: Einfluss von Ca^{2+} -Ionen auf die Aktivität der V-ATPase.

(A) Die Speicheldrüse wurde mit 30 nM 5-HT stimuliert (Kontrollstimulus) und vor einer weiteren 5-HT-Stimulierung mit 50 μM BAPTA-AM inkubiert. (B) Spülen mit Ca^{2+} -freier Ringer-Lösung und Stimulierung mit 30 nM 5-HT. Die Amplituden der Ansäuerung werden bei aufeinander folgenden 5-HT-Stimulierungen stetig kleiner. (C) Bei einer Inkubation mit 50 μM BAPTA-AM in Ca^{2+} -freier Ringer-Lösung wird die 5-HT-induzierte Ansäuerung fast vollständig unterdrückt. (D) Statistische Auswertung der Wirkung von BAPTA-AM, der Ca^{2+} -freien Ringer-Lösung und BAPTA-AM in Ca^{2+} -freier Ringer-Lösung auf die 5-HT-induzierte luminalen Ansäuerung. Im Vergleich zum Kontrollstimulus (= 100%) ist die 5-HT-induzierte pH-Änderung nur bei einer Inkubation mit BAPTA-AM in Ca^{2+} -freier Ringer-Lösung signifikant reduziert (gepaarter t-Test, $n = 6$, $**P < 0,005$). Für die Auswertung der Messkurven aus Experiment (B) wurde nur die erste Stimulierung nach dem Kontrollstimulus herangezogen.

Eine Inkubation der Drüsen mit BAPTA-AM in Ca^{2+} -freier Ringer-Lösung führte schließlich zu einer fast vollständigen Unterdrückung der luminalen Ansäuerung bei der ersten 5-HT-Stimulierung unter diesen Bedingungen (Abb. 4.15 C/D). Sofort nach dem Einspülen einer Ca^{2+} -haltigen Ringer-Lösung konnte wieder eine vollständige Ansäuerung ausgelöst werden, die ebenfalls länger andauerte als die Kontrollstimulierung.

Um den Einfluss einer Proteinphosphatase vom Typ 2C auf die V-ATPase-Aktivität in *Calliphora*-Speicheldrüsen zu untersuchen, wurde mit einem Ester des Chelators EDTA (EDTA-AM) die intrazelluläre Mg^{2+} -Konzentration verringert. Um den Effekt von EDTA-AM auf die Grundaktivität der V-ATPase zu testen, wurden die Drüsen im unstimulierten Zustand mit 500 μM des Chelators inkubiert (Abb. 4.16 A). Kurz nach dem Einspülen der EDTA-AM-haltigen Lösung kam es zu einer langsam einsetzenden luminalen Ansäuerung. Nach dem Ausspülen von EDTA-AM wurde der luminal pH-Wert wieder alkalischer und kehrte zum Ruhezustand zurück. Dabei verlief die Alkalisierung schneller als die EDTA-AM-abhängige Ansäuerung.

Eine Stimulierung mit 30 nM 5-HT zusammen mit 250 μM EDTA-AM resultierte in einer luminalen Ansäuerung deren Betrag 155% der vorangegangene Kontrollstimulierung entsprach (Abb. 4.16 B). Die anschließende Alkalisierung verlief langsamer als bei der Kontrollstimulierung. Der luminal pH-Wert war nach Beendigung der 5-HT-induzierten Ansäuerung saurer als vor der Behandlung mit EDTA-AM.

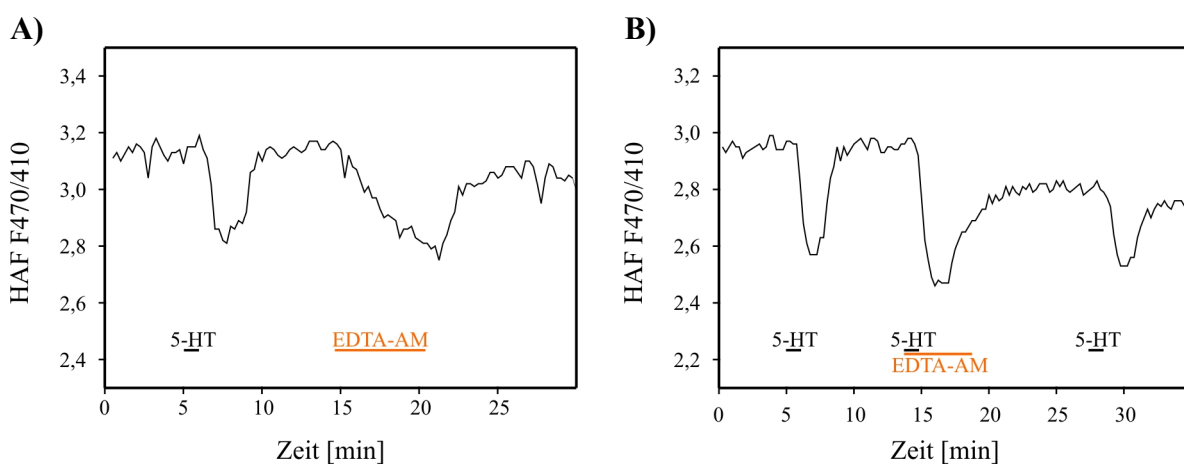


Abbildung 4.16: Einfluss von Mg^{2+} -Ionen auf die Grundaktivität der V-ATPase.

(A) Inkubation der Speicheldrüse mit 500 μM EDTA-AM. Es kommt zu einem langsamen Abfall des luminalen pH-Wertes, der nach Absetzen des EDTA-AM wieder alkalischer wird. (B) Nach einer Kontrollstimulierung wurde eine zweite Stimulierung mit 30 nM 5-HT in Gegenwart von 250 μM EDTA-AM durchgeführt.

Als im Verlauf der vorliegenden Arbeit die HAF-Messungen durchgeführt wurden, konnte das EDTA-AM nicht mehr kommerziell erworben werden. Daher konnten nur drei Messungen mit 500 μM EDTA-AM sowie zwei Messungen mit 5-HT und 250 μM EDTA-

AM durchgeführt werden. Aufgrund der geringen Anzahl an Messungen liegt keine statistische Auswertung vor, aber die erhaltenen Messkurven zeigten ähnliche Resultate unter den jeweiligen Bedingungen.

Unter Berücksichtigung der Effekte der Ca^{2+} -freien Bedingungen auf die 5-HT-induzierte luminalen Ansäuerung ist davon auszugehen, dass die verstärkte beziehungsweise einsetzende Ansäuerung bei einer Applikation von EDTA-AM auf der Bindung von Mg^{2+} -Ionen beruhte. Dies ist ein Indiz für die Beteiligung einer Proteinphosphatase 2C an der Inaktivierung der V-ATPase in *Calliphora*-Speicheldrüsen.

Da bei einer Behandlung mit Okadainsäure oder Tautomycin kein Effekt auf die 5-HT-Antwort beobachtet wurde, ist anzunehmen, dass die Phosphatasen 1 und 2A nicht unmittelbar an der Regulation der PKA-abhängigen V-ATPase-Aktivität beteiligt sind. Die Abnahme der luminalen Ansäuerung bei einer gleichzeitigen Inkubation mit beiden Inhibitoren ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Blockierung beider Phosphatase-Typen zu einer umfassenden Beeinträchtigung der zellulären Funktionen führt und die V-ATPase-Aktivität indirekt betroffen ist.

Die schnelle Blockierung der 5-HT-induzierten luminalen Ansäuerung durch FK-506 und Cyclosporin A deutet an, dass eine Proteinphosphatase 2B nicht zur Inaktivierung der V-ATPase, sondern für die Aufrechterhaltung der PKA-abhängigen V-ATPase-Aktivität notwendig ist. Die Verringerung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führte bei einer Stimulierung mit 5-HT ebenfalls zu einer verminderten luminalen Ansäuerung. Dieser Befund unterstützt die Ergebnisse der Versuche mit FK-506 und Cyclosporin A. Die Aktivität der V-ATPase wird offenbar nicht nur durch den cAMP-Weg, sondern auch durch den parallel ablaufenden $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -Weg unter Beteiligung einer Proteinphosphatase 2B reguliert. Die Bearbeitung dieser Fragestellung wird im Abschnitt 4.3.4 ausführlicher dargelegt.

4.3.2 Die Dephosphorylierung der V-ATPase

Mit der Immunoblockierung konnte nachgewiesen werden, dass in den *ProQ Diamond*-gefärbten SDS-Gelen das 8-CPT-cAMP-abhängige Phosphorylierungssignal bei 42 kDa die Untereinheit C der V-ATPase repräsentiert (siehe Abschnitt 4.2.2). Die qualitative Analyse dieses Phosphorylierungssignals sollte auch für die Überprüfung der Resultate aus den HAF-Messungen herangezogen werden. Nachfolgend soll kurz erläutert werden, wie die *ProQ Diamond*-gefärbten SDS-Gele ausgewertet wurden.

Für die Auswertung der Fluoreszenzmarkierung im SDS-Gel wurde das Programm „MetaMorph“ (Universal Imaging) verwendet. Die Fluoreszenzintensitäten wurden als

Graustufen mit Werten 0 bis 255 dargestellt (Abb. 17 A). Die Intensität der Bande bei 42 kDa wurde über die Breite der Laufbahn gemittelt und konnte aus dem resultierenden Intensitätsprofil dieser Bahn entnommen werden (Abb. 17 B).

Um die *ProQ Diamond*-Färbungen verschiedener Gele besser vergleichen zu können und Schwankungen in den aufgetragenen Proteilmengen auszugleichen, wurde als interner Standard eine weitere Bande vermessen, deren Signalintensität in unterschiedlich behandelten Proben gleich blieb. In allen ausgewerteten Gelen wurde die gleiche Referenzbande verwendet. Die Hintergrundintensität wurde von den Werten der vermessenen Banden subtrahiert und der Wert der 42-kDa-Bande auf den Wert der Referenzbande normiert.

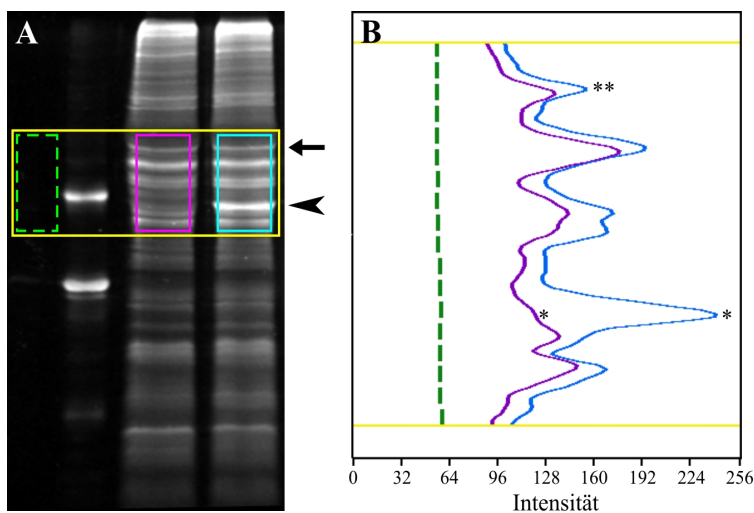


Abbildung 17: Statistische Analyse der *ProQ Diamond*-gefärbten SDS-Gele. (A) *ProQ Diamond*-gefärbtes SDS-Gel; die Fluoreszenzintensitäten sind in Graustufen dargestellt (schwarz = 0, weiß = 255). Gekennzeichnet sind die 42-kDa-Bande (Pfeilspitze) und die Referenzbande (Pfeil). (B) Intensitätsprofile der in (A) farblich markierten Bereiche. Die Hintergrundintensität wird durch die gestrichelte, grüne Linie repräsentiert. Gekennzeichnet sind das Signal der 42-kDa-Bande (*) und das Signal der Referenzbande (**).

Die Wirkung der Proteinphosphatase-Inhibitoren auf das Phosphorylierungssignal bei 42 kDa wurde zunächst im PKA-*Assay* untersucht. Dabei wurden die Inhibitoren in den gleichen Konzentrationen wie bei den HAF-Messungen eingesetzt und sowohl in Ansätzen mit 50 μ M 8-CPT-cAMP zur Aktivierung der PKA als auch ohne das cAMP-Analogon getestet. Als Vergleich enthielt jeder Versuch auch Kontrollansätze ohne Inhibitor. In der Abbildung 4.18 sind die Experimente mit Okadainsäure und Tautomycin (Abb. 4.18 A) sowie FK-506 und Cyclosporin A (Abb. 4.18 B) zusammengefasst. Wie in den HAF-Messungen wurden Okadainsäure und Tautomycin sowohl einzeln als auch in Kombination miteinander getestet. In allen Proben, die mit 8-CPT-cAMP versetzt wurden, konnte eine geringe Intensitätszunahme des Phosphorylierungssignals bei 42 kDa beobachtet werden. Ein Vergleich der unstimulierten beziehungsweise 8-CPT-cAMP-stimulierten Kontrollansätze mit den entsprechenden Inhibitor-behandelten Proben ergab jedoch für keine der verwendeten Substanzen einen signifikanten Unterschied in den jeweiligen Intensitäten dieses Signals.

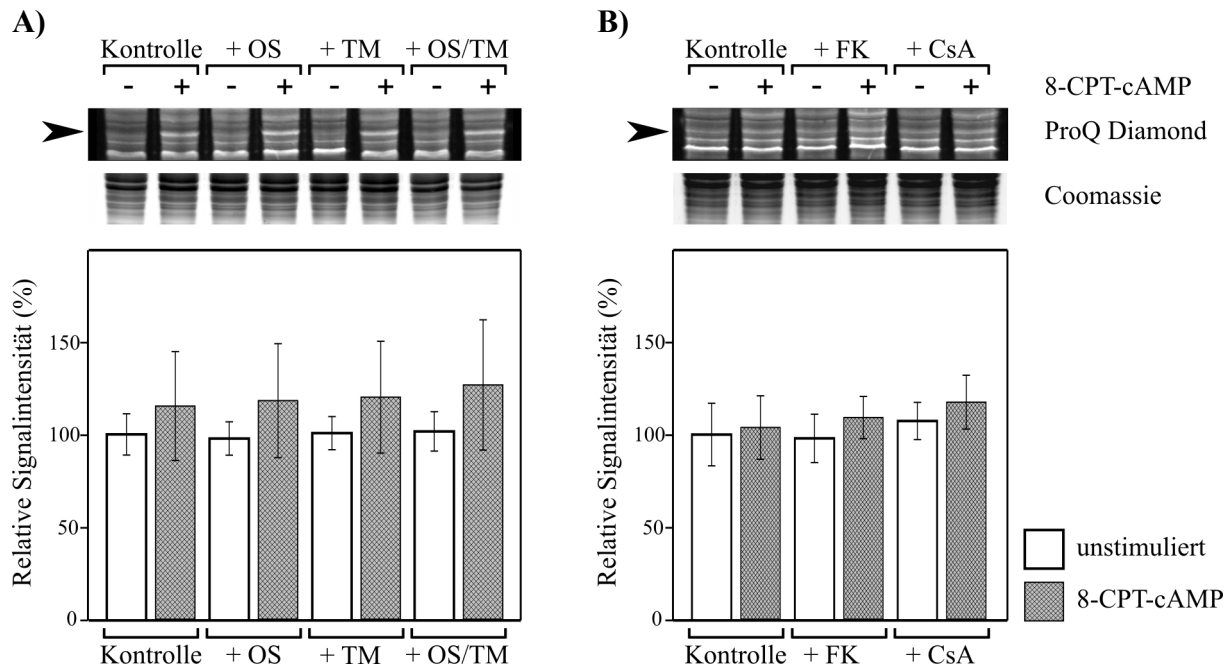


Abbildung 4.18: Effekte von Proteinphosphatase-Inhibitoren auf das Phosphorylierungssignal bei 42 kDa im PKA-Assay. Aliquots eines Zellysates aus *Calliphora*-Speicheldrüsen wurden mit Proteinphosphatase-Inhibitoren versetzt und mit (+) bzw. ohne (-) 50 μM 8-CPT-cAMP für 30 min bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne Inhibitor. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel mit *ProQ Diamond* und nachfolgend mit Coomassie gefärbt. Die Fluoreszenzmarkierung bei 42 kDa (Pfeilspitze) wurde wie in Text beschrieben ausgewertet. **(A)** Inkubation mit 250 nM Okadainsäure (OS), 250 nM Tautomycin (TM) oder 100 nM beider Inhibitoren. **(B)** Inkubation mit 10 μM FK-506 (FK) oder 20 μM Cyclosporin A (CsA). 8-CPT-cAMP führt in allen Ansätzen zu einem leichten Anstieg der Intensität des Phosphorylierungssignals bei 42 kDa. Im Vergleich mit den jeweiligen Kontrollen führt keiner der verwendeten Inhibitoren zu einem signifikanten Unterschied in der Intensität des Signals (gepaarter t-Test, $n = 6$).

Die Abhängigkeit der Proteinphosphatasen vom Typ 2B und 2C von Ca^{2+} - beziehungsweise Mg^{2+} -Ionen wurde auch im PKA-Assay genutzt um eine Beteiligung dieser Phosphatasen zu testen. Daher wurde der Puffer des PKA-Assay durch 50 μM CaCl_2 ergänzt oder auftretende Ca^{2+} -Verunreinigungen durch 10 mM BAPTA entfernt. Bei der Untersuchung der Proteinphosphatasen 2C wurde die Mg^{2+} -Konzentration von 10 mM auf 15 mM erhöht beziehungsweise durch die Zugabe von 5 mM EDTA verringert.

Ebenso wie in den Ansätzen mit der ursprünglichen Puffer-Zusammensetzung war auch in den CaCl_2 - und BAPTA-haltigen Proben die Intensität des Signals bei 42 kDa durch 8-CPT-cAMP leicht erhöht (Abb. 4.19 A). Die Variation der Ca^{2+} -Konzentration führte allerdings weder in unstimulierten noch in 8-CPT-cAMP-behandelten Proben zu einem signifikanten Unterschied hinsichtlich der Intensität dieses Phosphorylierungssignals.

Die Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration ergab ebenfalls keine Änderungen in den Signalintensitäten (Abb. 4.19 B). In den 8-CPT-cAMP-behandelten Proben mit EDTA konnte jedoch eine signifikante Intensitätssteigerung des Phosphorylierungssignals bei 42 kDa

beobachtet werden. Dieser Befund deutete darauf hin, dass durch eine Verringerung der freien Mg^{2+} -Konzentration die Dephosphorylierung dieses Proteins vermindert wird.

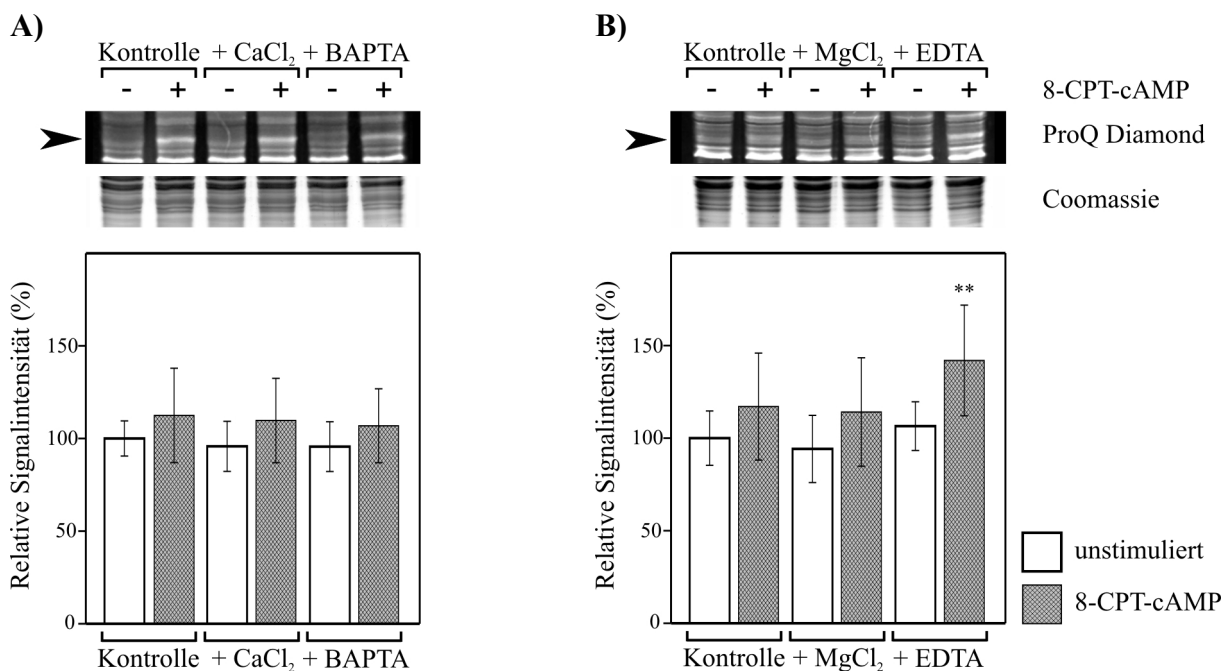


Abbildung 4.19: Effekte von zweiwertigen Kationen auf das Phosphorylierungssignal bei 42 kDa im PKA-Assay. (A) Aliquots eines Zelllysates wurden mit 50 μ M $CaCl_2$ oder 10 mM BAPTA versetzt und mit (+) bzw. ohne (-) 50 μ M 8-CPT-cAMP für 30 min bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne $CaCl_2$ bzw. BAPTA. Im Vergleich mit den jeweiligen Kontrollen führt die Zugabe von $CaCl_2$ bzw. BAPTA zu keinen signifikanten Unterschieden in der Intensität des Phosphorylierungssignals bei 42 kDa (gepaarter t-Test, $n = 6$). (B) Aliquots eines Zelllysates enthielten 10 mM $MgCl_2$ (Kontrolle), 15 mM $MgCl_2$ oder 10 mM $MgCl_2$ mit 5 mM EDTA und wurden mit (+) bzw. ohne (-) 50 μ M 8-CPT-cAMP für 30 min bei 37°C inkubiert. Im Vergleich zur 8-CPT-cAMP-Kontrolle ist das Signal bei 42 kDa in dem Ansatz mit EDTA und 8-CPT-cAMP signifikant erhöht (gepaarter t-Test, $n = 6$, $**P < 0,01$).

Um eine mögliche Beteiligung der jeweiligen Proteinphosphatasen an der Dephosphorylierung der Untereinheit C in den intakten Zellen zu überprüfen, wurden die kompletten Drüsen mit den Proteinphosphatase-Inhibitoren behandelt und die *ProQ Diamond*-Färbung des phosphorylierten Proteins bei 42 kDa ausgewertet. In einem vorangegangenen Experiment wurde bereits gezeigt, dass die Stimulierung der intakten Drüsen mit 5-HT oder 8-CPT-cAMP keine deutliche Steigerung der Intensität des Phosphorylierungssignals im Massenbereich der Untereinheit C bewirkte (siehe Abb. 4.7). Daher beschränkte sich die Inkubation mit den Inhibitoren auf Drüsen, die auch mit 5-HT beziehungsweise 8-CPT-cAMP stimuliert wurden. Als Kontrolle dienten Drüsen im unstimulierten Zustand.

Eine Behandlung der intakten Drüsen mit Okadainsäure, Tautomycin, FK-506 oder Cyclosporin A resultierte in keiner deutlichen Veränderung des Phosphorylierungssignals bei 42 kDa nach einer Stimulierung für 5 min mit 30 nM 5-HT oder 100 μ M 8-CPT-cAMP (Abb.

4.20). Diese Übereinstimmung mit den Ergebnissen der PKA-*Assays* lässt darauf schließen, dass die Proteinphosphatasen 1, 2A und 2B nicht für die Dephosphorylierung der Unter-einheit C verantwortlich sind.

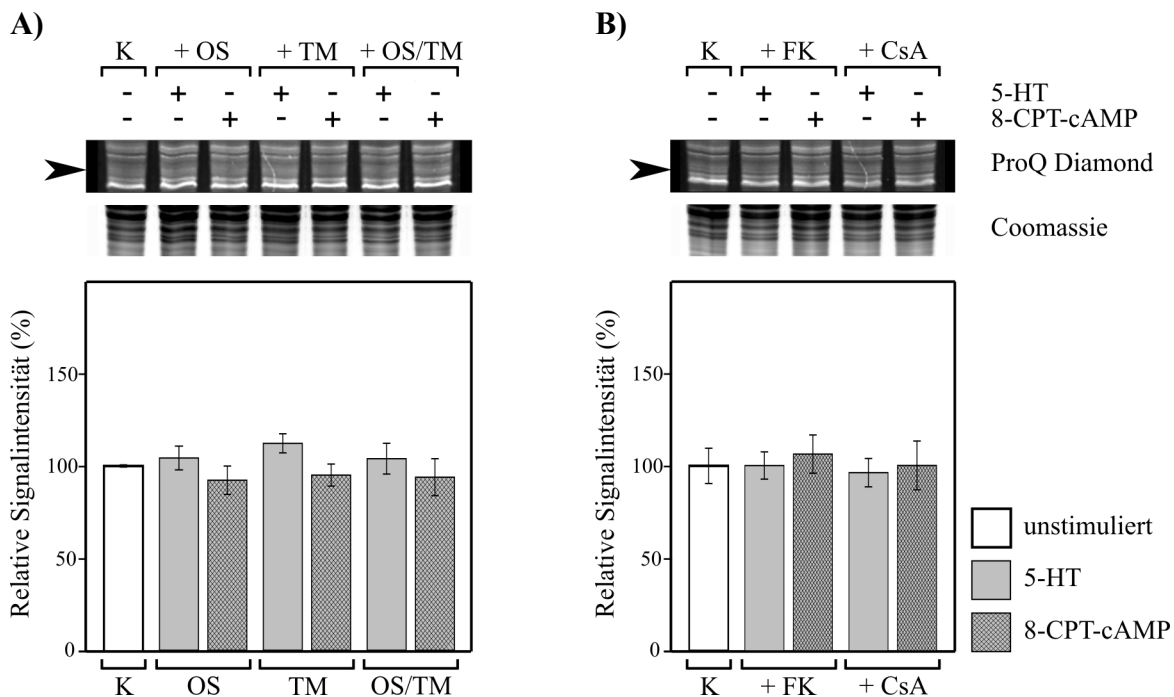


Abbildung 4.20: Effekte von Proteinphosphatase-Inhibitoren auf das Phosphorylierungssignal bei 42 kDa in intakten *Calliphora*-Speicheldrüsen. Drüsen wurden für 10 min mit Proteinphosphatase-Inhibitoren inkubiert und anschließend für 5 min mit 100 μ M 8-CPT-cAMP oder 30 nM 5-HT in Gegenwart des jeweiligen Inhibitors stimuliert. Als Kontrolle dienten Drüsen, die nicht mit den Inhibitoren, 8-CPT-cAMP oder 5-HT behandelt wurden. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel mit *ProQ Diamond* und anschließend mit Coomassie gefärbt. Die Fluoreszenzmarkierung bei 42 kDa (Pfeilspitze) wurde qualitativ ausgewertet. **(A)** Inkubation mit 250 nM Okadainsäure (OS), 250 nM Tautomycin (TM) oder 100 nM beider Inhibitoren. **(B)** Inkubation mit 10 μ M FK-506 (FK) oder 20 μ M Cyclosporin A (CsA). Ein Vergleich mit der Kontrolle ergibt für die stimulierten, Inhibitor-behandelten Proben keine signifikanten Unterschiede für das Phosphorylierungssignal bei 42 kDa (gepaarter t-Test, $n = 4$).

Der Einfluss zweiwertiger Kationen auf die Proteinphosphorylierung wurde auch an intakten Drüsen getestet. Mittels HAF-Messungen konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivität der V-ATPase in *Calliphora*-Speicheldrüsen durch Ca^{2+} -Ionen beeinflusst wird. Die Drüsen wurden daher mit Ca^{2+} -freier Ringer-Lösung gewaschen und auch unter diesen Bedingungen stimuliert. Außerdem erfolgte die Stimulierung in einer Ca^{2+} -freien Ringer-Lösung, die 50 μ M BAPTA-AM enthielt. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde die Wirkung der Ca^{2+} -freien Bedingungen auch bei unstimulierten Drüsen betrachtet.

Die Behandlung der Drüsen mit Ca^{2+} -freier Ringer-Lösung beziehungsweise die Verringerung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch BAPTA führte in keinem Versuchsansatz zu einer Änderung der Intensität des untersuchten Phosphorylierungssignals (Abb. 4.21 A).

Um die Beteiligung einer Proteinphosphatase 2C an der Dephosphorylierung des Proteins bei 42 kDa in den intakten Zellen zu überprüfen, wurde für 10 min eine Inkubation mit 500 μM EDTA-AM durchgeführt und der Effekt in unstimulierten und stimulierten Drüsen analysiert.

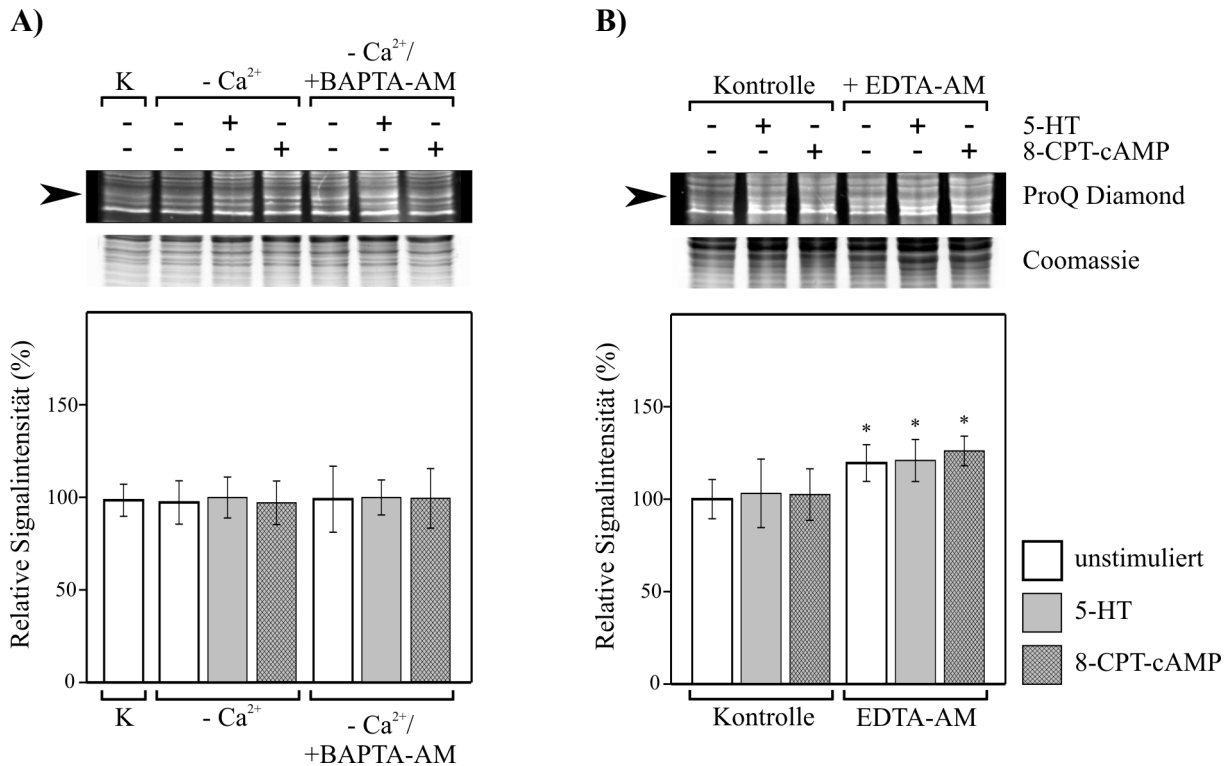


Abbildung 4.21: Effekte von zweiwertigen Kationen auf das Phosphorylierungssignal bei 42 kDa in intakten *Calliphora*-Speicheldrüsen. (A) Drüsen wurden mit Ca^{2+} -freier Ringer-Lösung gewaschen und dann für 5 min ohne (-) bzw. mit (+) 100 μM 8-CPT-cAMP oder 30 nM 5-HT inkubiert; zudem wurden Drüsen in Ca^{2+} -freier Ringer-Lösung in Gegenwart von 50 μM BAPTA-AM ohne bzw. mit 8-CPT-cAMP oder 5-HT behandelt. Als Kontrolle dienten unstimulierte Drüsen in Ca^{2+} -haltiger Ringer-Lösung. Im Vergleich mit der Kontrolle ergibt die Inkubation unter Ca^{2+} -freien Bedingungen keine signifikanten Unterschiede für das Signal bei 42 kDa (gepaarter t-Test, $n = 4$). (B) Inkubation für 10 min mit 500 μM EDTA-AM und weitere 5 min ohne (-) bzw. mit (+) 100 μM 8-CPT-cAMP oder 30 nM 5-HT. Als Kontrolle dienten Drüsen, die nicht mit EDTA-AM behandelt wurden. Sowohl in den unstimulierten als auch 8-CPT-cAMP- oder 5-HT-stimulierten Drüsen ist die Intensität des Signals bei 42 kDa signifikant erhöht (gepaarter t-Test, $n = 4$, $*P = 0,05$).

Sowohl in den unstimulierten als auch 5-HT- oder 8-CPT-cAMP-stimulierten Drüsen führte EDTA-AM zu einer signifikanten Steigerung der Intensität des Phosphorylierungssignals bei 42 kDa (Abb. 4.21 B). Da die Konzentration der Ca^{2+} -Ionen die Intensität dieses Phosphorylierungssignals nicht beeinflusste, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass der beobachtete Effekt des intrazellulär freigesetzten EDTA auf der Bindung von Mg^{2+} -Ionen beruhte. Zusammen mit den Beobachtungen aus den HAF-Messungen führten diese Befunde zu der Schlussfolgerung, dass eine Proteinphosphatase 2C die Untereinheit C dephosphoryliert und dadurch die V-ATPase inaktiviert.

4.3.3 Die Proteinphosphatase 2C in *Calliphora*-Speicheldrüsen

Um die mögliche Beteiligung der Proteinphosphatase 2C an der V-ATPase-Regulation zu untermauern, sollte die Expression dieser Phosphatase in *Calliphora*-Speicheldrüsen nachgewiesen werden. Die Proteinphosphatasen des Typs 2C sind monomere Enzyme, die Mg^{2+} -Ionen für ihre Aktivität benötigen. Es ist allerdings nichts darüber bekannt, wie die Aktivität, die subzelluläre Lokalisierung und die Substrat-Spezifität reguliert werden. Es gibt auch keine konkreten Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung in Insekten. In Pflanzen und Vertebraten sind diese Phosphatasen vor allem an der Regulation von Stress-aktivierten Signalkaskaden und des Zellzyklus beteiligt (Review: Rodriguez, 1998; Meskiene *et al.* 2003; Stern *et al.*, 2007).

Für den Nachweis der Proteinphosphatase 2C wurde mRNA aus *Calliphora*-Speicheldrüsen isoliert und mit der daraus synthetisierten cDNA eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Die Sequenzierung der amplifizierten Fragmente sollte Auskunft über die exprimierten Proteine geben. Weil für *Calliphora vicina* keine Sequenzinformationen für die Proteinphosphatasen 2C bekannt waren, erfolgte die PCR mit degenerierten *Primern*. Dabei handelt es sich um ein Gemisch verschiedener *Primer*, die mit ihren Sequenzen mehrere mögliche Basen-Triplets abdecken und gegebenenfalls das unspezifische Adenin-Derivat Inosin enthalten.

Die Grundlage für den Entwurf der degenerierten *Primer* waren die Aminosäuresequenzen der im *Drosophila*-Genom identifizierten Proteinphosphatasen vom Typ 2C (Morrison *et al.*, 2000). Diese Proteine gehören zur Genfamilie PPM (Proteinphosphatasen, Mg^{2+} -abhängig), die in *D. melanogaster* 11 Mitglieder umfasst (Tab. 4.1). Um diese Proteine nachfolgend voneinander zu unterscheiden, werden sie mit der Identifizierungsnummer (CG-Nummer) des jeweiligen Gens von *D. melanogaster* in der *Drosophila*-Genom-Datenbank bezeichnet.

Tabelle 4.1: Proteinphosphatasen vom Typ 2C aus *Drosophila*. Angegeben ist die jeweilige CG-Nummer (*Curated Gene Number*) sowie die Anzahl der Aminosäurereste im Polypeptid (AS) und die Molekularmasse (MW). Die abgeleitete Aminosäuresequenz wurde der NCBI-Datenbank entnommen. Die Molekularmassen wurden mit dem Programm ProtParam (www.expasy.ch) berechnet.

	CG-Nummer	AS/MW [kDa]			CG-Nummer	AS/MW [kDa]
1)	7115	524/58		7)	1906	368-374/41-42
2)	10376	428/44		8)	2984	1427/154
3)	10493	954/107		9)	12151	475/53,5
4)	12169	352/38,5		10)	17598	651/73
5)	17746	371/41		11)	10417	662/72
6)	6036	371/42				

Ein Vergleich zwischen den Proteinphosphatasen 2C aus *Drosophila* hinsichtlich der Polypeptidlänge beziehungsweise Molekularmasse deutete darauf hin, dass dieses Enzym in der Primärstruktur sehr variabel ist (siehe Tab. 4.1). Das kleinste Protein aus dieser Familie besteht aus 352 Aminosäureresten mit einer kalkulierten Molekularmasse von 38,5 kDa (CG12169). Das größte Protein hingegen setzt sich aus 1427 Aminosäureresten zusammen und hat eine Molekularmasse von 154 kDa (CG2984).

Die große Variabilität dieses Proteinphosphatase-Typs wurde durch Vergleiche der Aminosäuresequenzen bestätigt. In der Tabelle 4.2 sind die Ergebnisse dieser Sequenzvergleiche in Form einer Matrix zusammengefasst. Die angegebenen Werte liegen zwischen Null (= 0%) und Eins (= 100%) und drücken aus wie groß der Anteil identischer Aminosäurereste zwischen jeweils zwei verglichenen Sequenzen ist. Die größte Übereinstimmung lag bei 58,4% und wurde zwischen den Proteinen mit der Bezeichnung CG12169 und CG17746 ermittelt. Die kleinste Übereinstimmung gab es mit 2,1% zwischen CG10376 und CG2984. In den meisten Fällen lag die Sequenzidentität unter 10%.

Tabelle 4.2: Matrix der Sequenzübereinstimmung zwischen den Proteinphosphatasen 2C aus *Drosophila*. Zur Bedeutung der Werte: 1 = 100% identisch, 0 = 0% identisch; zum Vergleich: Übereinstimmung zwischen der Proteinphosphatase 2C CG7115 und *Drosophila*-Calmodulin = 0,053. Für die Erstellung der Matrix wurde das Programm BioEdit verwendet (Hall, 1999).

CG	7115	10376	10493	12169	17746	6036	1906	2984	12151	17598	10417
7115	—	0,095	0,046	0,111	0,105	0,084	0,097	0,042	0,071	0,072	0,070
10376	0,095	—	0,033	0,087	0,075	0,058	0,061	0,021	0,068	0,045	0,038
10493	0,046	0,033	—	0,036	0,042	0,039	0,036	0,058	0,039	0,047	0,030
12169	0,111	0,087	0,036	—	0,584	0,280	0,298	0,059	0,110	0,098	0,216
17746	0,105	0,075	0,042	0,584	—	0,290	0,290	0,056	0,115	0,104	0,206
6036	0,084	0,058	0,039	0,280	0,290	—	0,518	0,067	0,100	0,101	0,163
1906	0,097	0,061	0,036	0,298	0,290	0,518	—	0,064	0,109	0,098	0,169
2984	0,042	0,021	0,058	0,059	0,056	0,067	0,064	—	0,034	0,045	0,046
12151	0,071	0,068	0,039	0,110	0,115	0,100	0,109	0,034	—	0,085	0,075
17598	0,072	0,045	0,047	0,098	0,104	0,101	0,098	0,045	0,085	—	0,067
10417	0,070	0,038	0,030	0,216	0,206	0,163	0,169	0,046	0,075	0,067	—

Wie durch die Vergleiche der Aminosäuresequenzen deutlich wurde, sind diese Proteinphosphatasen sehr gering konserviert. Für die Amplifizierung von Sequenzabschnitten der cDNA durch PCR konnten deshalb keine *Primer* entworfen werden, die mit allen potenziellen Zielsequenzen kompatibel waren. Um den Nachweis der Proteinphosphatase 2C in *Calliphora*-Speicheldrüsen dennoch möglichst ökonomisch durchzuführen, wurden die degenerierten *Primer* zunächst für eine Gruppe von fünf, relativ eng verwandten Mitgliedern der PPM-Familie entworfen. Es handelte sich dabei um die Proteinphosphatasen CG12169, CG17746, CG6036, CG1906 und CG10417. Wie der Tabelle 4.2 zu entnehmen ist, weisen

diese Proteinphosphatasen untereinander wesentlich größere Sequenzübereinstimmungen auf als mit den übrigen Proteinen der PPM-Familie. In einem Dendrogramm zur phylogenetischen Verwandtschaft werden diese fünf Proteinphosphatasen vom Typ 2C ebenfalls zusammen gruppiert (nicht abgebildet).

Für jedes dieser fünf Proteine wurden die Aminosäuresequenzen mit der jeweils höchsten Übereinstimmung in den Organismen *Drosophila pseudoobscura*, *Aedis aegypti*, *Apis mellifera*, *Anopheles gambiae* und *Tribolium castaneum* in der NCBI-Datenbank mittels BLAST-Analysen identifiziert. Alle ermittelten Sequenzen wurden erneut miteinander verglichen und für Bereiche mit hohen Übereinstimmungen die degenerierten Nukleotidsequenzen der *Primer* erstellt. Der multiple Sequenzvergleich, die *Primer*-Sequenzen und die *Primer*-Kombinationen sind im Anhang 7.3 aufgeführt.

Aufgrund der unterschiedlichen Gesamtlängen der Polypeptide wurde beim multiplen Sequenzvergleich bei einigen Sequenzen eine große Lücke eingefügt. Deshalb konnten bei der PCR für jede *Primer*-Kombination zwei unterschiedliche Fragmentgrößen erwartet werden. Die drei verwendeten *Primer*-Kombinationen ergaben Fragmente mit einer Größe von ~ 609 bzw. ~ 1443 bp, ~ 99 bzw. ~ 105 bp und ~ 519 bzw. ~ 1359 bp.

Die PCR wurde mit der cDNA aus *Calliphora*-Speicheldrüsen sowie mit der cDNA aus *Drosophila*-Köpfen als Vergleich durchgeführt. Als Kontrolle einer erfolgreichen cDNA-Synthese wurde auch das Fragment einer bekannten Nukleotidsequenz des Proteins EPAC aus *Calliphora*-Speicheldrüsen mit spezifischen *Primern* amplifiziert (Rein *et al.*, 2008). In der Abbildung 4.22 A sind die im Agarose-Gel aufgetrennten PCR-Produkten dargestellt.

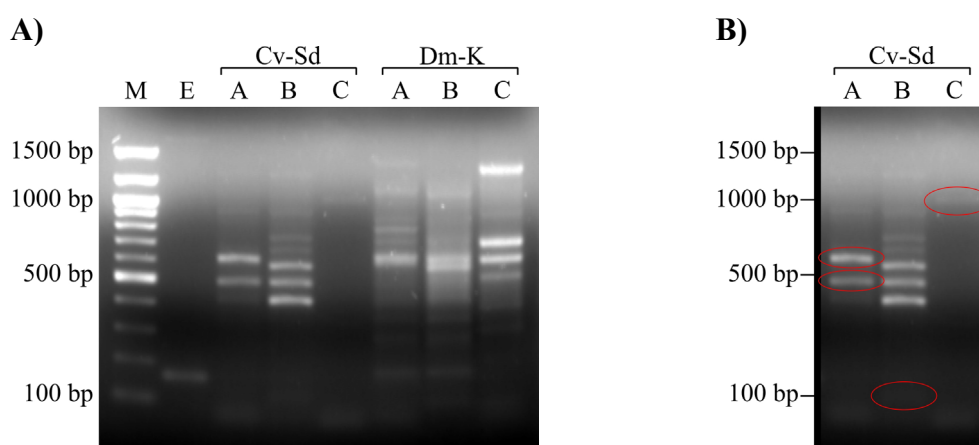


Abb. 4.22: PCR mit degenerierten *Primern* zur Amplifizierung von cDNA-Fragmenten der Proteinphosphatase 2C. (A) Aus *Calliphora*-Speicheldrüsen (Cv-Sd) und *Drosophila*-Köpfen (Dm-K) wurde mRNA isoliert und die daraus synthetisierte cDNA als Matrize für eine PCR eingesetzt. M: 100-bp-Leiter, E: Nachweis von EPAC mit spezifischen *Primern* (Fragmentgröße = 163 bp), A/B/C: unterschiedliche *Primer*-Paare kombiniert aus zwei Vorwärts- und zwei Rückwärts-*Primern*. Die erwarteten Fragmentgrößen sind ~609/1443 bp für A, ~99/105 bp für B und ~519/1359 bp für C. (B) Ausschnitt aus Abbildung A. Markiert sind die PCR-Fragmente, die weitergehend untersucht wurden.

Das EPAC-Fragment lag erwartungsgemäß bei 163 bp. Die PCR mit den degenerierten *Primern* lieferte zahlreiche Produkte, die zwischen den Ansätzen mit *Calliphora*- und *Drosophila*-cDNA in nur sehr geringem Maße übereinstimmten.

Aus den Ansätzen mit der *Calliphora*-cDNA wurden Fragmente mit einer Größe von 100 bp, 500 bp, 600 bp und 1000 bp für eine Klonierung ausgewählt (Abb. 4.22 B). Die klonierten PCR-Fragmente wurden sequenziert und die Nukleotidsequenzen mit allen Leserahmen in die entsprechenden Aminosäuresequenzen übersetzt. Mit den Aminosäuresequenzen wurde in der NCBI-Datenbank eine Suche nach homologen Proteinen durchgeführt. Für das 500-bp- und 1000-bp-Fragment wurden keine Homologien zu einer Proteinphosphatase 2C gefunden. Allerdings zeigten Klone vom 100-bp- und 600-bp-Fragment signifikante Sequenzhomologien zu Proteinphosphatasen vom Typ 2C aus anderen Insekten. Die Nukleotidsequenzen dieser Fragmente sind im Anhang 7.4 aufgeführt.

Sowohl für das 100-bp- als auch 600-bp-Fragment gab es die größten Übereinstimmungen mit Proteinen aus *Drosophila*, *Aedes*, *Anopheles* und *Culex* (Tab. 4.3/4.4). Das im 100-bp-Fragment kodierte Polypeptid konnte der Proteinphosphatase 2C mit der CG-Nummer 17746 in *D. melanogaster* zugeordnet werden (Abb. 4.23). Das Protein im 600-bp-Fragment war homolog zu der Proteinphosphatase 2C mit der CG-Nummer 1906 (Abb. 4.24). Da die Amplifizierung dieser Fragmente auf der mRNA aus *Calliphora*-Speicheldrüsen basierte, sind diese Sequenzübereinstimmungen ein starkes Indiz dafür, dass die orthologen Proteinphosphatasen vom Typ 2C in diesem Gewebe exprimiert werden.

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der Proteine mit Homologien zum 100-bp-Fragment. Aufgeführt sind die ersten fünf Ergebnisse einer BLAST-Analyse mit dem Peptid kodiert im 100-bp-Fragment.

Organismus	Protein-Bezeichnung	identische Reste	ähnliche Reste	Sequenzlücken
<i>Culex pipiens</i>	Phosphatase 2C alpha	24/26 (92%)	26/26 (100%)	0/26 (0%)
<i>Aedes aegypti</i>	Proteinphosphatase 2C	24/26 (92%)	26/26 (100%)	0/26 (0%)
<i>Drosophila melanogaster</i>	CG17746-PA, isoform A CG17746-PB, isoform B	24/26 (92%)	25/26 (96%)	0/26 (0%)
<i>Drosophila pseudoobscura</i>	GA14642-PA	24/26 (92%)	25/26 (96%)	0/26 (0%)
<i>Anopheles gambiae</i>	AGAP002266-PA	24/24 (100%)	24/24 (100%)	0/24 (0%)

100-bp-Fragment 1 INMEDSHTHILSLPDDPGTSFFAVYD 26
CG17746 34 INMEDSHTHILSLPDDPGAAFFAVYD 59

Abbildung 4.23: Sequenzvergleich zwischen dem Polypeptid kodiert im 100-bp-Fragment und CG17746 (Proteinphosphatase 2C, *D. melanogaster*). Identische Aminosäurereste sind schwarz hinterlegt; konservativ ausgetauschte Reste sind grau hinterlegt.

Tabelle 4.4: Zusammenfassung der Proteine mit Homologien zum 600-bp-Fragment. Aufgeführt sind die ersten fünf Ergebnisse einer BLAST-Analyse mit dem Peptid kodiert im 600-bp-Fragment.

Organismus	Protein-Bezeichnung	identische Reste	ähnliche Reste	Sequenzlücken
<i>Drosophila pseudoobscura</i>	GA15122-PA	171/196 (87%)	178/196 (90%)	1/196 (0%)
<i>Drosophila melanogaster</i>	CG1906-PA, isoform A CG1906-PB, isoform B CG1906-PC, isoform C CG1906-PD, isoform D CG1906-PE, isoform E	166/195 (85%)	174/195 (89%)	0/195 (0%)
<i>Aedes aegypti</i>	Proteinphosphatase 2C	142/196 (72%)	161/196 (82%)	1/196 (0%)
<i>Culex pipiens</i>	Phosphatase 2C beta	139/196 (70%)	161/196 (82%)	1/196 (0%)
<i>Anopheles gambiae</i>	AGAP008149-PA	134/196 (68%)	157/196 (80%)	1/196 (0%)

600-bp-Fragment	2	EMEDAYYACTGLGESLNDWSFFAVFDGHAGCKVSEHCAKHLNLSIVNTPE	51
CG1906	35	EMEDAYYARAGLGDALFDWSFFAVFDGHAGCKVSEHCAKHLLESIISTEE	84
600-bp-Fragment	52	FQSGDHVKGIRTGFLHIDEEMRRLPELNLNAGKCGGTTAVCAVSPQTQMY	101
CG1906	85	FIGGDHVKGIRTGFLRIDEVMRELPEFTRESEKCGGTTAVCAVGLTQVY	134
600-bp-Fragment	102	IANCGDSRAVLCRQGTVPVFATQDHKPVLEVEKERIYNAGGSVMIKRVNGT	151
CG1906	135	IANCGDSRAVLCRQGVVPVFATQDHKPIILPEVEKERIYNAGGSVMIKRVNGT	184
600-bp-Fragment	152	LAVSRALGDYDFKNVKEKGQCEQLVSPEPEIFCQGRQDIDEFLVL	196
CG1906	185	LAVSRALGDYDFKNVKEKGQCEQLVSPEPEIFCQSRQDSDEFVLV	228

Abbildung 4.24: Sequenzvergleich zwischen dem Polypeptid kodiert im 600-bp-Fragment und CG1906 (Proteinphosphatase 2C, *D. melanogaster*). Identische Aminosäurereste sind schwarz hinterlegt; konservativ ausgetauschte Reste sind grau hinterlegt.

4.3.4 Die Funktion der Proteinphosphatase 2B in *Calliphora*-Speicheldrüsen

In den HAF-Messungen führten FK-506 und Cyclosporin A zu einer schnell einsetzenden Blockierung der 5-HT-induzierten luminalen Ansäuerung. Dieser Befund lässt vermuten, dass eine Ca^{2+} -abhängige Proteinphosphatase für die Aufrechterhaltung der V-ATPase-Aktivität während einer 5-HT-Stimulierung in *Calliphora*-Speicheldrüsen erforderlich ist. Die Proteinphosphatase vom Typ 2B sollte daher in den Drüsenzellen nachgewiesen und die zelluläre Funktion genauer charakterisiert werden.

Für diese Untersuchungen sollte ein kommerziell erworbener Antikörper gegen die Ca^{2+} -bindende Untereinheit β verwendet werden. Für die Entwicklung des monoklonalen Antikörpers wurde als Antigen das vollständige Polypeptid der Untereinheit β vom Rind (*Bos taurus*) verwendet. Daher wurde im Vorfeld überprüft, in welchem Umfang die Aminosäure-

sequenz der Untereinheit β konserviert ist, um die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzreaktion des Antikörpers abschätzen zu können. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der Untereinheit β von *Bos taurus* und *Drosophila melanogaster* zeigte, dass die orthologen Proteine von diesen Vertretern der Säugetiere und Insekten zu 86% identisch sind (Abb. 4.25). In Anbetracht der hohen Konservierung dieses Proteins war von einer Kreuzreaktivität des Antikörpers mit der Untereinheit β von *Calliphora vicina* auszugehen.

PP2B- β B. t.	1	MGNEASYPLEMCSHFDADEIKRLGKRFFKKLDLDNSGSLSVVEEFMSLPELQ	50
PP2B- β D. m.	1	MGNETSLPMDMCSNFDADAIRRLGKRFRKLDLDNSGALSIDEFMSLPELQ	50
PP2B- β B. t.	51	QNPLVQRVIDIFDIDGNGEVDFKEFIEGVSQFSVKGDKEQKLRFAFRIYD	100
PP2B- β D. m.	51	QNPLVQRVIDIFDADGNGEVDFKEFIQGVSQFSVRGDKLSKLRFAFRIYD	100
PP2B- β B. t.	101	MDKDGYSINGELFQVLKMMVGNLKDQTQLQQIVDKTIINADKDGGRISF	150
PP2B- β D. m.	101	MDNDGYSINGELFQVLKMMVGNLKDQTQLQQIVDKTICFADKDEDGKISF	150
PP2B- β B. t.	151	EEFCAVVGGLDIHKKMVVDV	170
PP2B- β D. m.	151	DEFCSVVGNTDIHKKMVVDV	170

Abbildung 4.25: Aminosäuresequenzvergleich der Untereinheit β der Proteinphosphatase 2B (PP2B- β) von *Bos taurus* (B.t., alpha-Isoform 1) und *Drosophila melanogaster* (D.m.). Identische Aminosäurereste sind schwarz hinterlegt; konservativ ausgetauschte Reste sind grau hinterlegt.

Der Nachweis des Proteins erfolgte zunächst mittels *Western Blotting* (Abb. 4.26). Bei der Analyse eines Zellaufschlusses von *Calliphora*-Speicheldrüsen wurde eine Bande im Massenbereich von 18 kDa entsprechend dem Molekulargewicht der Untereinheit β detektiert. Erfolgte der Zellaufschluss in einem EGTA-haltigen Denaturierungspuffer, wurde die Untereinheit β bei 20 kDa markiert. Diese scheinbar erhöhte Molekularmasse in Abhängigkeit von EGTA beruht auf einer Bindung des Komplexbildners am Protein und ist charakteristisch für die Untereinheit β der Proteinphosphatase 2B (Klee *et al.*, 1979).

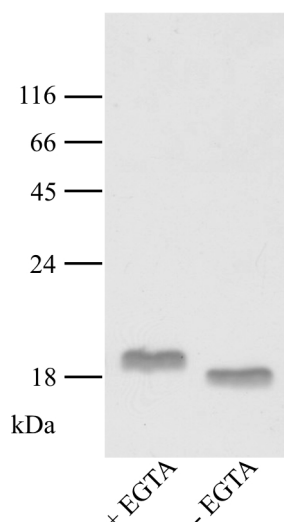


Abbildung 4.26: Nachweis der Proteinphosphatase 2B in *Calliphora*-Speicheldrüsen.

Western Blot-Analyse von Proteinen aus *Calliphora*-Speicheldrüsen mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Calcineurin-Untereinheit β . Der Zellaufschluss erfolgte mit (+) und ohne (-) EGTA im Puffer. Die Antikörper markieren jeweils eine Proteinbande mit einer apparenten Molekularmasse von 20 bzw. 18 kDa.

Der Proteinnachweis durch *Western Blotting* zeigte, dass die Proteinphosphatase 2B in den Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen exprimiert wird. Der verwendete monoklonale Antikörper kreuzreagierte sehr spezifisch mit dem orthologen Protein aus *Calliphora vicina* und konnte für die nachfolgende immunocytochemische Untersuchung eingesetzt werden.

In der Abbildung 4.27 sind konfokalmikroskopische Aufnahmen einer immunocytochemischen Markierung von Aktin und der PP2B-Untereinheit β in den Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen dargestellt. Die Immunoreaktivität der Untereinheit β war mit Ausnahme des Zellkerns im gesamten Cytoplasma gleichmäßig verteilt (Abb. 4.27 A). Im Bereich der Apikalmembran gab es keine Anreicherung der Immunoreaktivität der Untereinheit β (Abb. 4.27 C). Die Markierung von Aktin diente zur Verdeutlichung der Lage der gefalteten Apikalmembran (Abb. 4.27 B/C). Dieses immunocytochemische Markierungsmuster lässt darauf schließen, dass die zelluläre Funktion der Proteinphosphatase 2B in den Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen mit keiner spezialisierten räumlichen Verteilung verknüpft ist. Zwischen den Präparaten von unstimulierten und 5-HT-stimulierten Drüsen gab es keine erkennbaren Unterschiede im Markierungsmuster der Untereinheit β (nicht abgebildet). Die Verteilung der Proteinphosphatase 2B wird demnach nicht Stimulus-abhängig verändert.

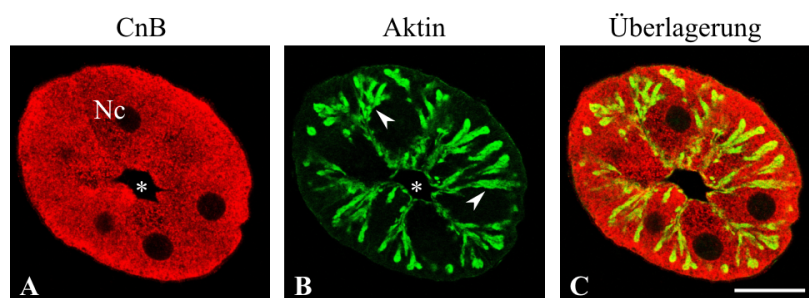


Abbildung 4.27: Verteilung der Proteinphosphatase 2B in den *Calliphora*-Speicheldrüsen.

Dargestellt sind konfokalmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten unstimulierter Drüsen. Die Schnitte wurden immunocytochemisch mit Antikörpern gegen die PP2B-Untereinheit β (PP2B- β , rot, A) und Aktin (blau, B) markiert. Die Markierung der Untereinheit β ist gleichmäßig im gesamten Cytoplasma verteilt. Die Aktin-Markierung verdeutlicht die Lage der Apikalmembran. Gekennzeichnet sind ein Zellkern (Nc), das Drüsenlumen (Sternchen) und die Canaliculi (Pfeilspitzen). Balken: 20 μm . Unter Berücksichtigung einer möglichen Dyschromatopsie des Betrachters ist die Abbildung im Anhang 7.2 mit einer anderen Farbgebung dargestellt.

Die Untersuchung der Proteinphosphatasen durch HAF-Messungen führte zu der Hypothese, dass neben dem cAMP-Weg auch der $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -Weg unter Beteiligung einer Proteinphosphatase 2B an der Regulation der V-ATPase in *Calliphora*-Speicheldrüsen beteiligt ist (siehe Abschnitt 4.3.1). Um diese Hypothese zu testen, wurden *Pelleting Assays* durchgeführt und der Effekt von Cyclosporin A auf die subzelluläre Verteilung der V-ATPase analysiert. Neben der Untereinheit C wurde die Untereinheit A als Marker für den V_1 -Komplex und die Untereinheit a als Marker für den V_0 -Komplex herangezogen (Abb. 4.28).

Im unstimulierten Zustand der Drüsen war die Untereinheit C zu jeweils etwa 50% ($\pm 10\%$) in der Membran- und Cytosol-Fraktion verteilt. Von der Untereinheit A wurde nur ein geringer Anteil und die Untereinheit a fast ausschließlich in der Membran-Fraktion detektiert. Eine Behandlung der unstimulierten Drüsen mit 20 μM Cyclosporin A für 5 min hatte keinen Effekt auf die Verteilung dieser Proteine.

Die Stimulierung mit 30 nM 5-HT für 5 min führte zu einer starken Umverteilung der Untereinheiten C und A in die Membran-Fraktion. Die Vorinkubation mit Cyclosporin A führte zu einer signifikanten Verringerung dieser 5-HT-induzierten Umverteilung. So reduzierte Cyclosporin A den Anteil der Untereinheit C in der Membran-Fraktion von 91% ($\pm 7\%$) auf 63% ($\pm 13\%$). Die Verteilung der Untereinheit a war auch in 5-HT-stimulierten Drüsen durch die Behandlung mit Cyclosporin A nicht beeinflusst.

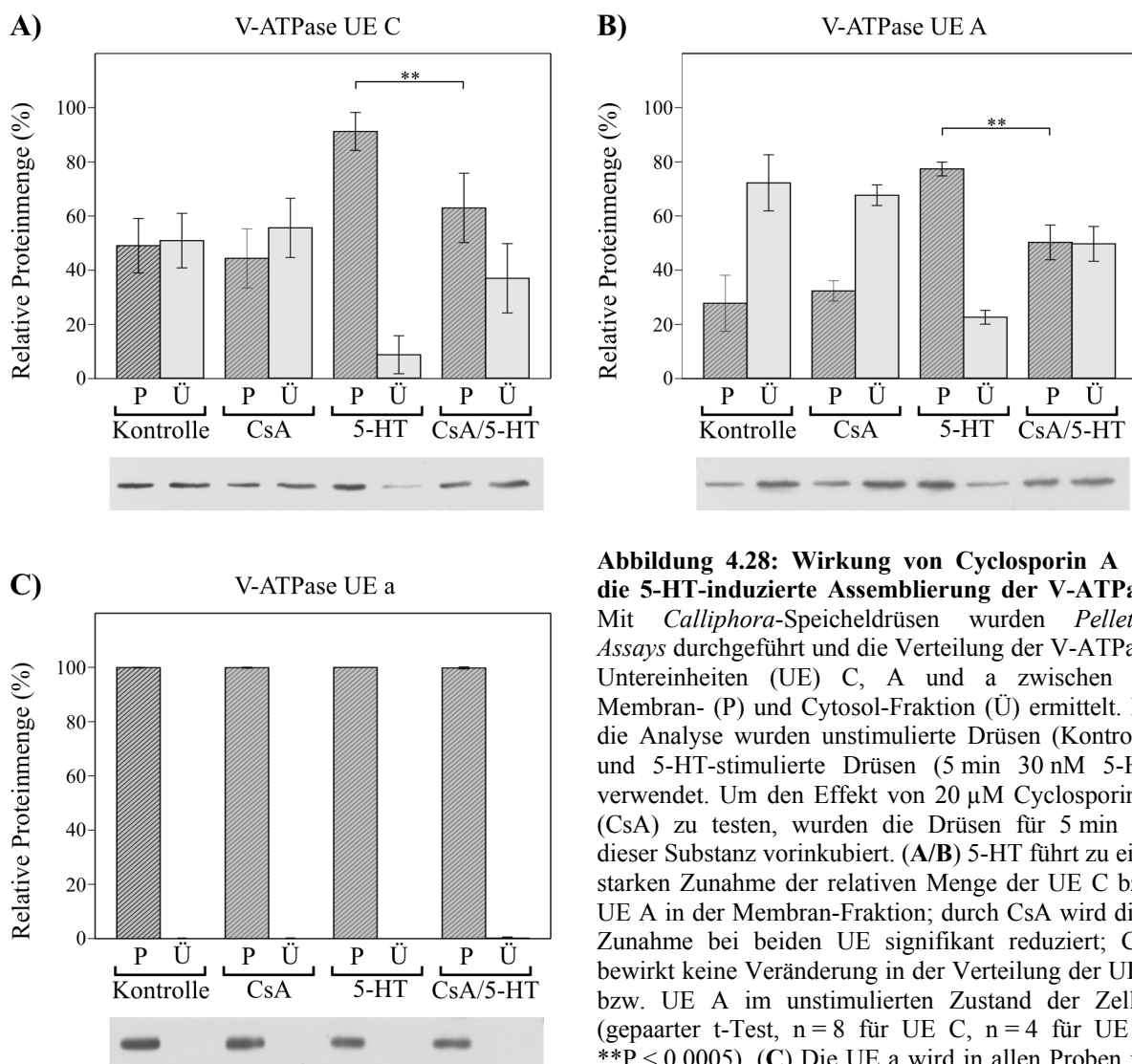


Abbildung 4.28: Wirkung von Cyclosporin A auf die 5-HT-induzierte Assemblierung der V-ATPase.

Mit *Calliphora*-Speicheldrüsen wurden *Pelleting Assays* durchgeführt und die Verteilung der V-ATPase-Untereinheiten (UE) C, A und a zwischen der Membran- (P) und Cytosol-Fraktion (Ü) ermittelt. Für die Analyse wurden unstimulierte Drüsen (Kontrolle) und 5-HT-stimulierte Drüsen (5 min 30 nM 5-HT) verwendet. Um den Effekt von 20 μM Cyclosporin A (CsA) zu testen, wurden die Drüsen für 5 min mit dieser Substanz vorinkubiert. (A/B) 5-HT führt zu einer starken Zunahme der relativen Menge der UE C bzw. UE A in der Membran-Fraktion; durch CsA wird diese Zunahme bei beiden UE signifikant reduziert; CsA bewirkt keine Veränderung in der Verteilung der UE C bzw. UE A im unstimulierten Zustand der Zellen. (gepaarter t-Test, $n=8$ für UE C, $n=4$ für UE A, $**P < 0,0005$). (C) Die UE a wird in allen Proben fast ausschließlich in der Membran-Fraktion detektiert ($n=4$). Die dargestellten *Western Blots* sind repräsentative Originaldaten.

Die Ergebnisse der *Pelleting Assays* wurden durch die immunocytochemische Markierung von V-ATPase-Untereinheiten in den Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen überprüft. In der Abbildung 4.29 sind konfokalmikroskopische Aufnahmen einer immunocytochemischen Markierung von Aktin sowie den Untereinheiten C, B und d zusammengefasst. In den Präparaten von unstimulierten Drüsen waren die Markierungen für die Untereinheiten C und B gleichmäßig im gesamten Cytoplasma verteilt (Abb. 4.29 A/B). Die Untereinheit d war fast ausschließlich im Bereich der Apikalmembran lokalisiert wie ein Vergleich mit der Aktin-Markierung verdeutlichte (Abb. 4.29 C). Zudem war ein geringer Anteil der Untereinheit d in Form vesikulärer Strukturen im Cytoplasma zu finden. In den 5-HT-stimulierten Drüsen war die Immunreaktivität der Untereinheiten C und B ebenfalls stark an der Apikalmembran konzentriert (Abb. 4.29 D/E). Eine Vorinkubation von 5-HT-stimulierten Drüsen mit Cyclosporin A führte dazu, dass in der immunocytochemischen Markierung die Immunreaktivitäten der Untereinheiten C und B vorrangig im Cytoplasma verteilt waren. Der Anteil der Immunreaktivität der Untereinheit C beziehungsweise B im Bereich der Apikalmembran war durch die Behandlung mit Cyclosporin A gegenüber den 5-HT-stimulierten Proben ohne Cyclosporin A deutlich reduziert (Abb. 4.29 G/H). Die Verteilung der Untereinheit d wurde durch Cyclosporin A nicht beeinflusst (Abb. 4.29 I).

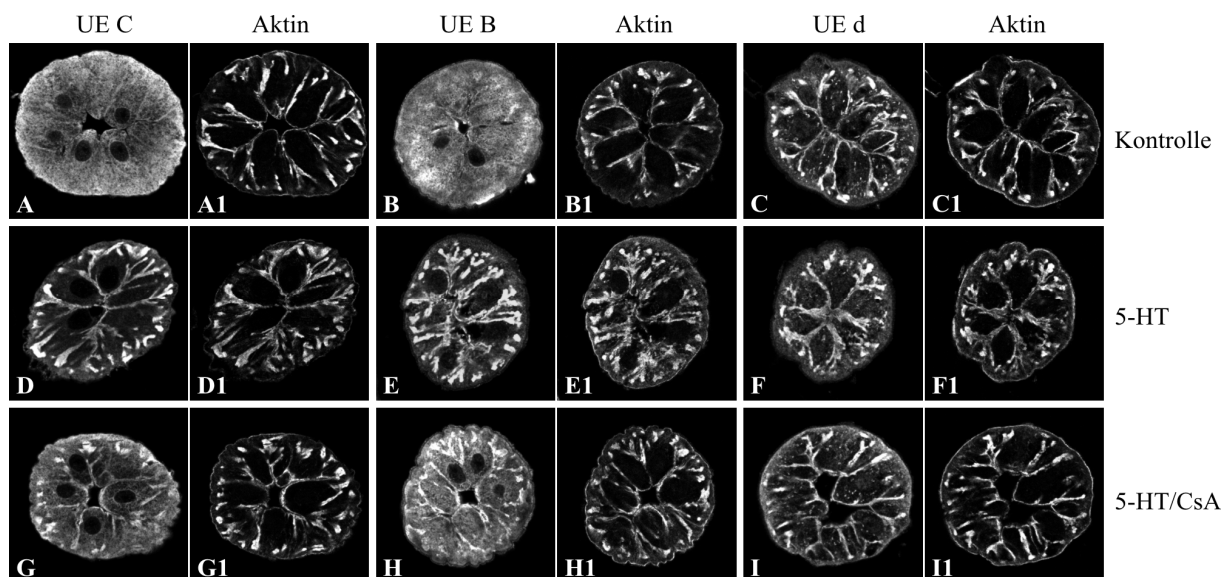


Abbildung 4.29: Wirkung von Cyclosporin A auf die Stimulus-induzierte Umverteilung der V-ATPase in *Calliphora*-Speicheldrüsen. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigen Drüsen-Querschnitte, die immunocytochemisch mit Antikörpern gegen die V-ATPase-Untereinheiten C (UE C, A/D/G), B (UE B, B/E/H) und d (UE d, C/F/I) sowie Aktin (A1–I1) markiert wurden. In unbehandelten Drüsen (Kontrolle) sind die Markierungen der UE C und B gleichmäßig im gesamten Cytoplasma verteilt (A/B) und die Markierung der UE d tritt vorrangig im Bereich der Apikalmembran, aber punktuell auch im Cytoplasma auf (C). Nach einer Stimulierung der Drüsen mit 30 nM 5-HT für 5 min sind die Markierungen für alle UE fast vollständig im Bereich der Apikalmembran lokalisiert (D/E/F). Bei einer 5-HT-Stimulierung nach einer Vorinkubation mit 20 μ M Cyclosporin A für 5 min (5-HT/CsA) sind die Markierungen der UE C und B hauptsächlich im Cytoplasma und nur teilweise in den apikalen Einfaltungen lokalisiert (G/H). Die Markierung der UE d ist auch in den Cyclosporin-behandelten Drüsen vorrangig im Bereich der Apikalmembran zu finden (I).

Durch die immunocytochemische Lokalisierung und die Analyse der subzellulären Verteilung der V-ATPase-Untereinheiten konnte nachgewiesen werden, dass die Proteinphosphatase 2B die Umverteilung der cytoplasmatischen V-ATPase-Komponenten und die Assemblierung des Holoenzym beeinflusst. Es galt zu klären, ob die Proteinphosphatase 2B im Zusammenhang mit der Aktivierung der V-ATPase eine Funktion parallel zum cAMP-Weg erfüllt oder die Entstehung beziehungsweise die Vermittlung des cAMP-Signals beeinflusst.

Weitere *Pelleting Assays* mit 8-CPT-cAMP-stimulierten Drüsen sollten Hinweise liefern, ob die Funktion der Proteinphosphatase 2B mit dem cAMP-Signalweg assoziiert ist und welche Zielproteine durch eine Dephosphorylierung in ihrer Aktivität beeinflusst werden könnten.

In den Proben 8-CPT-cAMP-stimulierter Drüsen wurden jeweils ca. 90% der Untereinheit C ($\pm 10\%$) und A ($\pm 5\%$) in der Membran-Fraktion detektiert (Abb. 4.30 A/B). Die Untereinheit a lag zu 100% in der Membran-Fraktion vor (Abb. 4.30 C). Durch die Behandlung der Drüsen mit Cyclosporin A wurde die Verteilung dieser Proteine zwischen der Membran- und Cytosol-Fraktion nicht signifikant reduziert. Die 8-CPT-cAMP-induzierte Assemblierung der V-ATPase wird durch eine Hemmung der Proteinphosphatase 2B offenbar nicht beeinflusst.

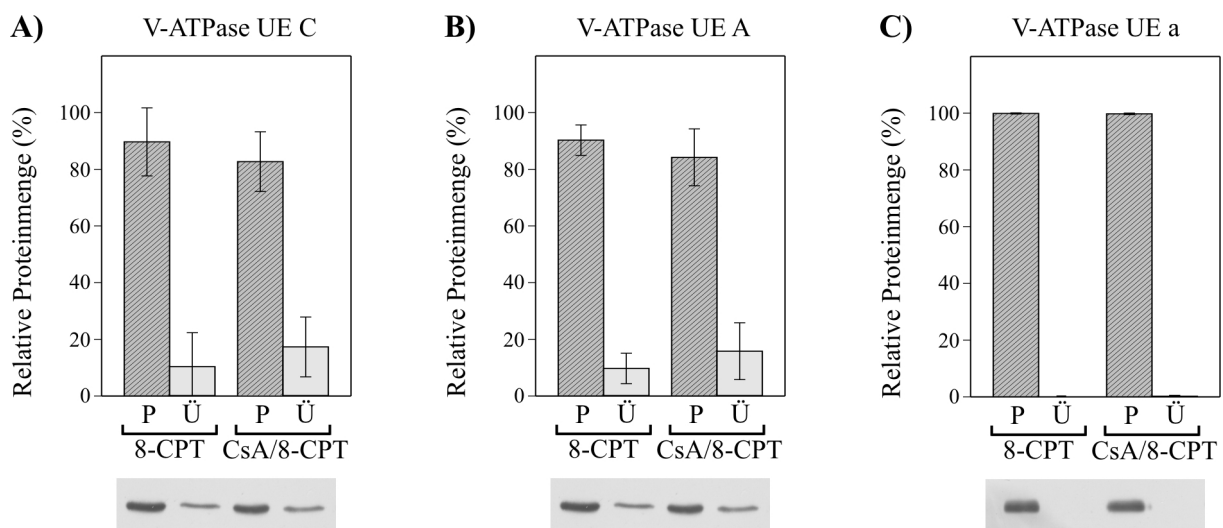


Abbildung 4.30: Effekt von Cyclosporin A auf die 8-CPT-cAMP-induzierte Assemblierung der V-ATPase. Mit *Calliphora*-Speicheldrüsen wurden *Pelleting Assays* durchgeführt und die Verteilung der V-ATPase-Untereinheiten (UE) C, A und a zwischen der Membran- (P) und Cytosol-Fraktion (Ü) ermittelt. Die Drüsen wurden für 5 min ohne bzw. mit 20 μM Cyclosporin A (CsA) inkubiert und weitere 5 min mit 100 μM 8-CPT-cAMP (8-CPT) stimuliert. (A/B) Die starke Zunahme der relativen Menge der UE C bzw. UE A in der Membran-Fraktion infolge einer 8-CPT-cAMP-Stimulierung wird durch CsA nicht signifikant reduziert (gepaarter t-Test, $n = 8$ für UE C, $n = 4$ für UE A). (C) Die UE a wird in beiden Proben fast ausschließlich in der Membran-Fraktion detektiert (gepaarter t-Test, $n = 4$). Die dargestellten *Western Blots* sind repräsentative Originaldaten.

Durch HAF-Messungen sollte überprüft werden, ob 8-CPT-cAMP auch in Cyclosporin-behandelten Drüsen eine Aktivierung der V-ATPase auslöst. In der Abbildung 4.31 sind eine repräsentative HAF-Messung sowie die statistische Auswertung dieser Experimente

dargestellt. 8-CPT-cAMP führte auch in Cyclosporin-behandelten Drüsen zu einer starken luminalen Ansäuerung. Eine Inkubation der Drüsen mit Cyclosporin A hatte keine Verringerung der 8-CPT-cAMP-induzierten luminalen Ansäuerung zur Folge.

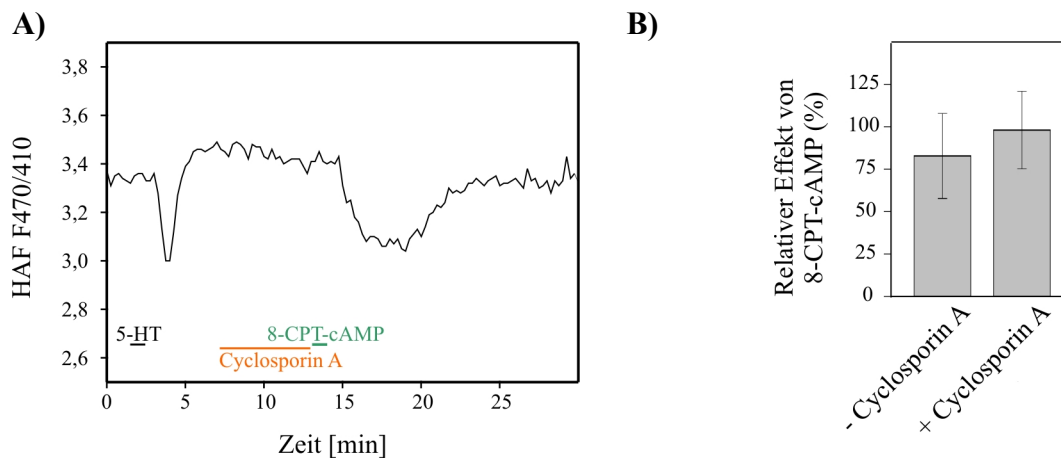


Abbildung 4.31: 8-CPT-cAMP-induzierte luminaler Ansäuerung in Gegenwart von Cyclosporin A.

(A) Die Speicheldrüse wurden mit 30 nM 5-HT stimuliert (Kontrollstimulus) und vor einer Stimulierung mit 50 μ M 8-CPT-cAMP mit 20 μ M Cyclosporin A vorinkubiert. Die Stimulierung mit 8-CPT-cAMP wurde nicht in Gegenwart von Cyclosporin A durchgeführt, da Messungen mit 5-HT bereits gezeigt haben, dass die Wirkung dieses Inhibitors nach dem Ausspülen anhält (siehe Abb. 4.13). (B) Statistische Auswertung der Wirkung von 50 μ M 8-CPT-cAMP auf den luminalen pH-Wert der Drüsen mit (+) und ohne (-) Cyclosporin A; die 8-CPT-cAMP-induzierte Ansäuerung wurde auf den Kontrollstimulus (= 100%) normiert (n = 6).

Ausgehend von den Resultaten der *Pelleting Assays* und HAF-Messungen mit dem cAMP-Analogon 8-CPT-cAMP wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die Funktion der Proteinphosphatase 2B hinsichtlich der V-ATPase-Regulation vor dem 5-HT-induzierten Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration liegt. Die Proteinphosphatase 2B würde demzufolge einen Einfluss auf die Entstehung einer erhöhten cAMP-Konzentration ausüben. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde mit einem cAMP-Immunoassay die cAMP-Konzentration in Cyclosporin-behandelten Drüsen bestimmt.

Die Drüsen wurden für 5 min mit 20 μ M Cyclosporin A inkubiert, anschließend für 5 min mit 30 nM 5-HT stimuliert und nach der Stimulierungsphase für den cAMP-Immunoassay vorbereitet. Die Auswertung der Ergebnisse dieser cAMP-Immunoassays zeigte, dass die Behandlung mit Cyclosporin A zu einer signifikanten Verringerung des 5-HT-abhängigen [cAMP]-Anstiegs führte (Abb. 4.32). Demzufolge ist die Proteinphosphatase 2B in den Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen an der Regulation der 5-HT-induzierten cAMP-Synthese beteiligt.

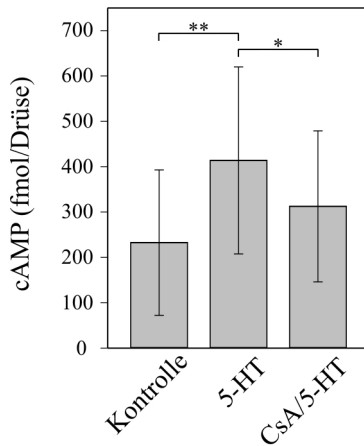


Abbildung 4.32: Effekt von Cyclosporin A auf die 5-HT-abhängige cAMP-Konzentration in *Calliphora*-Speicheldrüsen.

Im Vergleich zum unstimulierten Zustand (Kontrolle) ist nach einer Behandlung mit 30 nM 5-HT für 5 min die cAMP-Konzentration um 80% erhöht. Bei einer Vorinkubation mit 20 μ M Cyclosporin A für 5 min und einer 5-HT-Stimulierung in Gegenwart von Cyclosporin A steigt die cAMP-Konzentration nur um 35%. (gepaarter t-Test, n = 8, *P < 0,05, **P < 0,001).

Diese Bestimmung der cAMP-Konzentration wurde parallel zu den Cinaserin-Versuchen aus Abschnitt 4.1.3 durchgeführt und die hier als Vergleich herangezogenen Proben unstimulierter und 5-HT-stimulierte Drüsen sind mit den bereits beschriebenen Ergebnissen identisch (siehe Abb. 4.5).

Mittels HAF-Messungen konnte gezeigt werden, dass die 5-HT-induzierte luminale Ansäuerung durch eine Inkubation mit Cyclosporin A beziehungsweise FK-506 oder durch eine Verringerung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration unterdrückt wird (siehe Abb. 4.14/15). Folglich ist für die Aktivierung der V-ATPase die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von Bedeutung. Es stellte sich die Frage, ob die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ebenfalls einen Effekt auf den luminalen pH-Wert hat.

Um eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu erreichen, wurde mittels Cyclopiazonsäure spezifisch die Ca^{2+} -Pumpe vom SERCA-Typ im endoplasmatischen Retikulum blockiert. Diese Ca^{2+} -Pumpe trägt wesentlich dazu bei, die Ca^{2+} -Konzentration im Cytoplasma niedrig zu halten (Nelson & Cox, 2001). Mit den Drüsen wurde zuerst eine Kontrollstimulierung mit 30 nM 5-HT durchgeführt und anschließend erfolgte die Inkubation mit 10 μ M Cyclopiazonsäure für sieben Minuten. Vier bis fünf Minuten nach Einspülen von Cyclopiazonsäure setzte eine starke luminale Ansäuerung ein (Abb. 4.33 A/E). Um zu überprüfen ob diese Ansäuerung durch den cAMP/PKA-Weg vermittelt wird, erfolgte in weiteren Messungen die Behandlung mit Cyclopiazonsäure in Gegenwart des PKA-Inhibitors H-89. Bei einer gleichzeitigen Inkubation mit beiden Inhibitoren setzte die Cyclopiazonsäure-induzierte luminale Ansäuerung langsamer ein und war in ihrem Betrag reduziert (Abb. 4.33 B/E). Bei einer Behandlung mit Cyclopiazonsäure in Ca^{2+} -freier Ringer-Lösung war nur eine sehr geringe Ansäuerung oder sogar eine schwache Alkalisierung zu beobachten. Kurz nach dem Einspülen der Ca^{2+} -haltigen Ringer-Lösung setzte eine transiente luminale Ansäuerung ein (Abb. 4.33 C/E). Eine Inkubation mit 20 μ M Cyclosporin A für sieben Minuten vor der Behandlung mit Cyclopiazonsäure führte zu einer vollständigen Unterdrückung der Cyclopiazonsäure-induzierte luminale Ansäuerung und es setzte eine transiente Alkalisierung ein (Abb. 4.33 D/E).

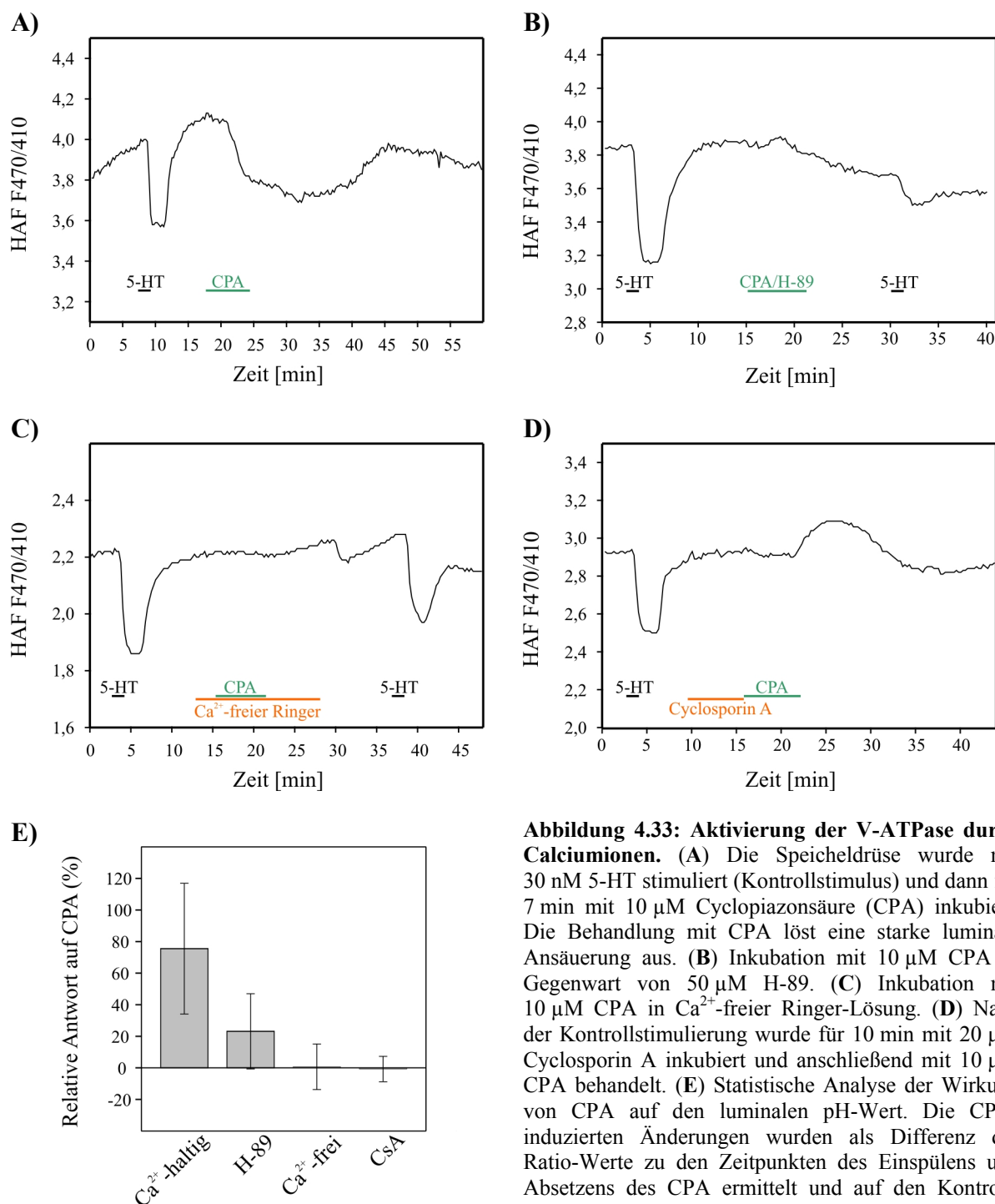


Abbildung 4.33: Aktivierung der V-ATPase durch Calciumionen. (A) Die Speicheldrüse wurde mit 30 nM 5-HT stimuliert (Kontrollstimulus) und dann für 7 min mit 10 μ M Cyclopiazonsäure (CPA) inkubiert. Die Behandlung mit CPA löst eine starke luminalen Ansäuerung aus. (B) Inkubation mit 10 μ M CPA in Gegenwart von 50 μ M H-89. (C) Inkubation mit 10 μ M CPA in Ca²⁺-freier Ringer-Lösung. (D) Nach der Kontrollstimulierung wurde für 10 min mit 20 μ M Cyclosporin A inkubiert und anschließend mit 10 μ M CPA behandelt. (E) Statistische Analyse der Wirkung von CPA auf den luminalen pH-Wert. Die CPA-induzierten Änderungen wurden als Differenz der Ratio-Werte zu den Zeitpunkten des Einspülens und Absetzens des CPA ermittelt und auf den Kontrollstimulus (= 100%) normiert. Die CPA-induzierte luminalen Ansäuerung ist in Gegenwart von H-89, Ca²⁺-freier Ringer-Lösung oder Cyclosporin A (CsA) weitgehend unterdrückt (n = 4).

Diese Messungen belegen, dass bereits die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration zu einer PKA-vermittelten Aktivierung der V-ATPase führt. Die Unterdrückung der Cyclopiazonsäure-induzierten luminalen Ansäuerung durch das Spülen mit Ca²⁺-freier Ringer-Lösung könnte darauf zurückzuführen sein, dass ein Einstrom von Ca²⁺-Ionen aus der extrazellulären Lösung für den Aktivierungsprozess der V-ATPase erforderlich ist. Weiterhin

kann in Betracht gezogen werden, dass unter diesen Bedingungen die Ca^{2+} -Ionen, die aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt werden, über Kanäle in der Plasmamembran aus der Zelle herausströmen und der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration dann unzureichend ist um die Aktivierung der V-ATPase auszulösen.

Die vollständige Unterdrückung der Cyclopiazonsäure-induzierten luminalen Ansäuerung durch Cyclosporin A deutet darauf hin, dass das Ca^{2+} -Signal nur durch die Aktivität der Proteinphosphatase 2B auf den cAMP-Weg vermittelt wird. Diese Messungen bestätigen somit, dass der $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -Weg über den cAMP/PKA-Weg an der Regulation der V-ATPase beteiligt ist. Eine weitere Charakterisierung der wechselseitigen Regulation dieser Signalwege geht weit über die Zielstellungen der vorliegenden Arbeit hinaus. Die durchgeführten HAF-Messungen sollen daher als Vorversuche für eine ausführlichere Untersuchung dienen.

5. Diskussion

Die V-Typ H^+ -ATPase ist evolutionär eng verwandt mit der F-ATPase, die in Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten zu finden ist und die ATP-Synthese katalysiert (Gogarten *et al.*, 1989). Die Strukturen der Holoenzyme der V- und F-ATPase sind charakterisiert durch einen cytoplasmatischen, ATP-bindenden Komplex und einen membranständigen, Protonen-transportierenden Komplex (Review: Nelson & Harvey, 1999). Sowohl die ATP-bindenden Untereinheiten als auch die Untereinheiten des Proteolipid-Ringes weisen zwischen V- und F-ATPase große Homologien auf. Die bereits länger und intensiver untersuchte F-ATPase kann daher Hinweise auf die Funktion der entsprechend homologen Untereinheiten in der V-ATPase liefern. Allerdings ist die V-ATPase aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen hinsichtlich der Regulation wesentlich komplexer. Bei der Aufklärung von Aspekten der Regulation ist es daher naheliegend diejenigen Untereinheiten zu betrachten, für die es keine homologen Äquivalente in beiden ATPasen gibt. Eine Komponente, die nur in der V-ATPase auftritt, ist die Untereinheit C (Nelson *et al.*, 1990). Infolgedessen ist anzunehmen, dass die Untereinheit C zu Eigenschaften beiträgt, die typisch für die V-ATPase sind.

Charakteristisch für die V-ATPase ist die reversible Dissoziation als ein Mechanismus zur Regulation der katalytischen Aktivität. Die Untereinheit C ist aufgrund der Interaktionen mit den Untereinheiten E, G und a ein geeigneter Kandidat um die Verknüpfung zwischen dem V_0 - und V_1 -Komplex und somit den Assemblierungsstatus zu kontrollieren (Curtis *et al.*, 2002; Inoue & Forgacs, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Unterstützt wird diese Annahme durch den Befund, dass im dissoziierten Zustand der Komplexe die Untereinheit C von den übrigen V-ATPase-Komponenten isoliert im Cytoplasma vorliegt (Kane 1995; Parra *et al.*, 2000; Vitavska *et al.*, 2005).

Die reversible Dissoziation der V-ATPase ist ein weit verbreiteter Regulationsmechanismus und wurde in Insekten, Pilzen und Säugetieren nachgewiesen (Sumner *et al.*, 1995; Kane, 1995; Trombetta *et al.*, 2003; Sautin *et al.*, 2005). Dennoch ist bisher über die intrazellulären Signalwege, die diesen Prozess steuern, nur sehr wenig bekannt. Gut charakterisiert wurde die Regulation der reversiblen Dissoziation in den Speicheldrüsen der Schmeißfliege *Calliphora vicina*. In diesem System wird das extrazelluläre Signal zur Aktivierung der V-ATPase intrazellulär durch den cAMP/PKA-Signalweg vermittelt (Dames *et al.*, 2006; Rein *et al.*, 2008). Mit der Identifizierung der Untereinheit C als Zielprotein der PKA *in vivo* liefert die vorliegende Arbeit einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung der V-ATPase-Regulation.

5.1 Die Steuerung der V-ATPase-Aktivität durch eine reversible Phosphorylierung der Untereinheit C

Die Modifizierung eines Proteins durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung beeinflusst dessen strukturelle und enzymatische Eigenschaften. Die polare Ladung einer Phosphatgruppe kann im modifizierten Protein eine Konformationsänderung bewirken oder Bindungsstellen für die Interaktion mit anderen Bindungspartnern modifizieren (*Reviews*: Holzer & Duntze, 1971; Rubin & Rosen, 1975). Die Proteinkinase-katalysierte kovalente Modifizierung von Proteinen ist ein grundlegender Mechanismus in zellulären Systemen um auf interne und externe Stimuli zu reagieren und sich schnell den jeweiligen Anforderungen anzupassen.

In den Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen tragen Proteinphosphorylierungen dazu bei, innerhalb weniger Minuten nach einer Stimulierung mit dem Neurohormon 5-HT die Speichelsekretion zu vermitteln. Die extrazelluläre Bindung von 5-HT an G-Proteingekoppelte Rezeptoren in der basolateralen Plasmamembran führt zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration (Heslop & Berridge, 1980; Berridge & Heslop, 1981; vorliegende Arbeit). Die daraus resultierende Aktivierung der PKA bewirkt über Phosphorylierungsreaktionen die Assemblierung und Aktivierung der V-ATPase in der Apikalmembran (Zimmermann *et al.*, 2003; Dames *et al.*, 2006; Rein *et al.*, 2008). Der Protonentransport durch die V-ATPase energetisiert schließlich die Bildung des KCl-reichen Primärspeichels.

Bereits zu Beginn dieser Arbeit bestand die Annahme, dass in *Calliphora*-Speicheldrüsen die Aktivität der V-ATPase durch den Phosphorylierungsstatus der Untereinheit C kontrolliert wird. Diese Hypothese wurde im Wesentlichen dadurch unterstützt, dass die Phosphorylierbarkeit durch die PKA für die rekombinante Form des orthologen Proteins von *Manduca sexta* nachgewiesen wurde (Vitavska, 2005). Für die Aufklärung der PKA-abhängigen Phosphorylierung der Untereinheit C in *Calliphora*-Speicheldrüsen wurde zunächst der Fluoreszenzfarbstoff *ProQ Diamond*, ein Reagenz zur Markierung phosphorylierter Proteine in Polyacrylamidgelen, verwendet. In der Tat konnte in Zelllysaten, die mit 8-CPT-cAMP inkubiert wurden, mittels *ProQ Diamond* ein sehr intensives Phosphorylierungssignal im Massenbereich der Untereinheit C nachgewiesen werden. Der spezifische Nachweis einer Phosphorylierung der Untereinheit C gelang durch die Antikörper-vermittelte Blockierung der Interaktion mit der PKA. Mit der 2D-Elektrophorese wurde die Schlussfolgerung aus den Ergebnissen der *ProQ Diamond*-Experimente bestätigt und die Phosphorylierung der Untereinheit C in den intakten Zellen bewiesen.

Die Analyse der 2D-Elektrophorese ergab, dass in unstimulierten Drüsenzellen der Anteil der phosphorylierten Untereinheit C nur sehr gering ist. Unter diesen Bedingungen ist auch nur ein geringer Anteil der V-ATPase zum funktionsfähigen Holoenzym assembliert und aktiv (Zimmermann *et al.*, 2003; Dames *et al.*, 2006; Rein *et al.*, 2006). Infolge einer Stimulierung mit einer sättigenden 5-HT-Konzentration (Berridge & Prince, 1971) oder dem cAMP-Analogon 8-CPT-cAMP (Rein *et al.*, 2006) wird ein größerer Anteil der vorhandenen Untereinheit C durch die PKA phosphoryliert. Parallel zu diesen Phosphorylierungsreaktionen kommt es während einer Stimulierung zu einer Umverteilung der cytoplasmatischen V-ATPase-Komponenten zur Apikalmembran. Diese Umverteilung geht einher mit der Bildung des V-ATPase-Holoenzym und einer V-ATPase-abhängigen Ansäuerung im Drüsenlumen. Sowohl die Phosphorylierung der Untereinheit C als auch die Umverteilung und Aktivierung der V-ATPase werden durch den PKA-Inhibitor H-89 blockiert beziehungsweise durch PKA-kompatible cAMP-Analoga ausgelöst (Rein *et al.*, 2008). Daher kann angenommen werden, dass in den Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen die Phosphorylierung der Untereinheit C ein essentieller Schritt bei der Reassoziierung des V_0 - und V_1 -Komplexes der V-ATPase in der Apikalmembran ist (Abb. 5.1).

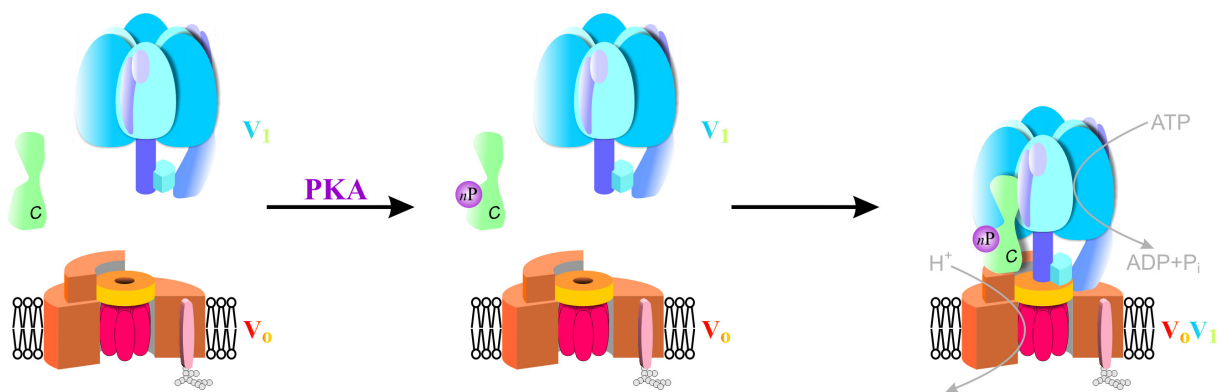


Abbildung 5.1: Modell zum Ablauf der PKA-vermittelten Reassoziierung und Aktivierung der V-ATPase. In den sekretorisch inaktiven Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen sind die Untereinheit C und der V_1 -Komplex vom membranständigen V_0 -Komplex getrennt und die V-ATPase ist inaktiv. Die 5-HT-induzierte Aktivierung der PKA führt zur Phosphorylierung der Untereinheit C. Im phosphorylierten Zustand begünstigt die Untereinheit C die Assoziierung des V_1 - und V_0 -Komplexes und es wird das aktive Holoenzym gebildet.

Es wäre von Interesse zu klären, an welchen Positionen die Untereinheit C phosphoryliert wird und welche Veränderungen diese Modifizierungen im Protein bewirken beziehungsweise welche Konsequenzen für die Interaktion mit anderen Proteinen daraus resultieren. Aus den Ergebnissen der 2D-Elektrophorese ist ersichtlich, dass die Phosphorylierung der Untereinheit C offenbar ein mehrstufiger Prozess ist. So wurden bei der *Blot*-Analyse der Proben von 5-HT- beziehungsweise 8-CPT-cAMP-stimulierten Drüsen insgesamt drei

Immunosignale der Untereinheit C detektiert. Eine Behandlung mit dem PKA-Inhibitor H-89 führte dazu, dass zwei dieser Signale nicht mehr auftraten beziehungsweise in der Intensität stark verringert waren. Dies lässt darauf schließen, dass die Untereinheit C in einem einfach- als auch mehrfach-phosphorylierten Zustand vorliegen kann.

Im Zusammenhang mit der reversiblen Dissoziation der V-ATPase ist davon auszugehen, dass die Untereinheit C an Positionen phosphoryliert wird, die für die Verknüpfung von V_O - und V_I -Komplex von Bedeutung sind. Die mehrfache Phosphorylierung kann einerseits dahingehend interpretiert werden, dass sowohl die Bindung der Untereinheit C an den V_I -Komplex als auch die Wechselwirkung mit dem V_O -Komplex entsprechende Änderungen der jeweiligen Bindungseigenschaften erfordern. Andererseits könnten auch mehrere Phosphorylierungen notwendig sein, um die Bindung der Untereinheit C an einen der beiden Komplexe zu gewährleisten und die einfach phosphorylierte Form stellt nur einen Zwischenschritt dar. Weiterhin kann in Betracht gezogen werden, dass es hinsichtlich der Ausprägung der Assoziation beider Komplexe qualitative Unterschiede in Abhängigkeit von der Phosphorylierungsstufe gibt.

Hinweise auf die ungefähren Positionen der Phosphorylierungen liefert eine Arbeit in der die Phosphorylierbarkeit der Untereinheit C aus *Arabidopsis* untersucht wurde (Hong-Hermesdorf *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurde beschrieben, dass die rekombinante Untereinheit C aus *Arabidopsis thaliana* durch eine Proteinkinase vom Typ WNK (*with no lysine*) ebenfalls mehrfach phosphoryliert werden kann. In der WNK-abhängig phosphorylierten Untereinheit C konnten zwar die konkreten Positionen der phosphorylierten Aminosäurereste nicht bestimmt werden, aber es gelang die Phosphorylierungsstellen auf Peptidabschnitte zu beschränken. Ein Vergleich dieser Peptidabschnitte mit der Aminosäuresequenz sowie der Röntgenkristallstruktur der Untereinheit C aus *Saccharomyces cerevisiae* (Drory *et al.*, 2004) ergab, dass alle Phosphorylierungsstellen in den globulären Proteindomänen liegen, die mit dem V_O - und V_I -Komplex in Wechselwirkung treten (Hong-Hermesdorf *et al.*, 2006; Inoue & Forgac, 2005; Zhang *et al.*, 2006).

5.2 Die Funktion der phosphorylierten Untereinheit C

Die reversible Phosphorylierung der Untereinheit C geht einher mit der reversiblen Assoziation der V-ATPase in *Calliphora*-Speicheldrüsen. Es stellt sich natürlich die Frage, welche konkrete Funktion die Phosphorylierung hinsichtlich der Bildung des V-ATPase-Holoenzym erfüllt und wie lange der phosphorylierte Zustand der Untereinheit C anhält.

In den Proben der PKA-*Assays* führte die Behandlung mit 8-CPT-cAMP zu einer starken Intensitätszunahme der *ProQ Diamond*-Markierung im Massenbereich der Untereinheit C. In keinem anderen Massenbereich trat eine vergleichbare Intensitätszunahme in Abhängigkeit von 8-CPT-cAMP auf und das Phosphorylierungssignal im Massenbereich der Untereinheit C war daher sehr dominant. Durch die Antikörper-vermittelte Blockierung der Interaktion zwischen der Untereinheit C und der PKA konnte die Entstehung des Signals bei 42 kDa weitestgehend unterdrückt werden und folglich ist diese *ProQ Diamond*-Markierung vorrangig auf die phosphorylierte Untereinheit C zurückzuführen. Die Ergebnisse der *ProQ Diamond*-Markierung weisen auch darauf hin, dass unter diesen Bedingungen weitere Untereinheiten der V-ATPase bei einer Stimulierung mit 8-CPT-cAMP nur in geringem Maße oder überhaupt nicht phosphoryliert werden.

In den Proben von Drüsen, die im intakten Zustand mit 5-HT oder 8-CPT-cAMP stimuliert wurden, konnte allerdings in den *ProQ Diamond*-gefärbten Protein-Gelen keine auffällige Intensitätszunahme im Massenbereich der Untereinheit C beobachtet werden. Auch die statistische Auswertung dieses Phosphorylierungssignals ergab keine signifikanten Unterschiede. Mit der 2D-Elektrophorese war es allerdings möglich in 5-HT-beziehungsweise 8-CPT-cAMP-stimulierten Drüsenzellen eine Zunahme der phosphorylierten Untereinheit C nachzuweisen. Dies lässt darauf schließen, dass die quantitativen Unterschiede zwischen dephosphorylierter und phosphorylierter Untereinheit C in den intakten, stimulierten Zellen nur sehr gering sind.

Von Heslop & Berridge durchgeführte cAMP-Messungen belegen, dass die cAMP-Konzentration in den Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen für die Dauer einer 5-HT-Stimulierung erhöht ist (Heslop & Berridge, 1980). Demzufolge hält auch die Aktivität der PKA während der gesamten Stimulierungsphase an und die Untereinheit C sollte fortlaufend phosphoryliert werden. Einen Beleg für die anhaltende PKA-Aktivität lieferten HAF-Messungen bei denen die PKA erst fünf Minuten nach Einsetzen der 5-HT-induzierten Ansäuerung mittels H-89 gehemmt wurde. Die Behandlung mit H-89 löste die Rückkehr zum Ruhe-pH aus, obwohl weiterhin mit 5-HT stimuliert wurde (Rein *et al.*, 2008). Da es trotz der anhaltenden PKA-Aktivität zu keiner starken Anreicherung der phosphorylierten Untereinheit C kommt, ist es naheliegend anzunehmen, dass Proteinphosphatasen bereits während der Stimulierungsphase der PKA entgegenwirken. Der Erhalt der Phosphorylierung der Untereinheit C im PKA-*Assay* kann einerseits darauf beruhen, dass die Zusammensetzung des verwendeten Puffers die Aktivität der involvierten Proteinphosphatase verringerte. Andererseits ist in Betracht zu ziehen, dass in den intakten Zellen die effektive

Dephosphorylierung der Untereinheit C durch eine räumliche Organisation mit der entsprechenden Proteinphosphatase unterstützt wird. In einem Zellysat geht diese Organisation natürlich verloren.

Obwohl es keine großen quantitativen Unterschiede zwischen dephosphorylierter und phosphorylierter Untereinheit C in stimulierten Drüsenzellen gibt, ist die Aktivierung der V-ATPase gewährleistet. Darüber hinaus zeigen immunocytochemische Untersuchungen und Analysen der subzellulären Verteilung, dass während einer 5-HT-Stimulierung der überwiegende Anteil der Untereinheit C und des V_1 -Komplexes an der apikalen Plasmamembran lokalisiert und mit dem V_O -Komplex assoziiert ist (Zimmermann *et al.*, 2003; Dames *et al.*, 2006; Rein *et al.*, 2008). Demnach scheint das V-ATPase-Holoenzym unabhängig vom Phosphorylierungsstatus der Untereinheit C für einen gewissen Zeitraum erhalten zu bleiben.

Versuche mit der V-ATPase aus *Manduca sexta* und einer rekombinanten Untereinheit C weisen ebenfalls darauf hin, dass die Phosphorylierung für die Aufrechterhaltung des V-ATPase-Holoenzym keine absolute Notwendigkeit darstellt (Voss *et al.*, 2007). So enthält das aufgereinigte V-ATPase-Holoenzym aus *Manduca sexta* die Untereinheit C nur im dephosphorylierten Zustand. Weiterhin resultiert eine Inkubation des Holoenzym mit der katalytischen Untereinheit einer PKA auch in keiner Phosphorylierung der Untereinheit C. Die Phosphorylierungsreaktion ist erst dann möglich, wenn die Untereinheit C frei in Lösung vorliegt oder Teil des V_1 -Komplexes ist. Darüber hinaus wird außer der Untereinheit C keine weitere Untereinheit des V_1 -Komplexes phosphoryliert. Diese Experimente weisen nochmals darauf hin, dass die Phosphorylierung der Untereinheit C der Auslöser für die Assoziation der V-ATPase-Komplexe ist, aber das Holoenzym auch ohne phosphorylierte Untereinheit C bestehen kann.

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der Erkenntnisse aus den Experimenten mit der V-ATPase aus *Manduca sexta* lässt sich das Modell zum Ablauf der V-ATPase-Regulation in den Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen weiter ausbauen (Abb. 5.2). Die Funktion der PKA-abhängigen Phosphorylierung der Untereinheit C besteht primär darin, die Reassoziations des V_O - und V_1 -Komplexes einzuleiten beziehungsweise zu unterstützen. Da es aber dennoch zu keiner Anreicherung phosphorylierter Untereinheit C kommt, wird diese anscheinend als Teil des Holoenzym dephosphoryliert. Es ist aber nicht auszuschließen, dass auch Dephosphorylierungsreaktionen stattfinden, wenn die Untereinheit C noch frei im Cytoplasma vorliegt oder nur Teil des V_1 -Komplexes ist.

Auch bei einer Dephosphorylierung der Untereinheit C als Teil des Holoenzym bleiben die V-ATPase-Komplexe assoziiert und die V-ATPase aktiv. Es ist aber anzunehmen, dass die Untereinheit C im dephosphorylierten Zustand die Dissoziation der V-ATPase-Komplexe zumindest begünstigt. Aus den HAF-Messungen ist ersichtlich, dass die Inaktivierung sehr schnell einsetzt und innerhalb weniger Minuten abgeschlossen ist. Die Inaktivierung der V-ATPase beinhaltet wahrscheinlich einen weiteren, noch unbekanntem Faktor.

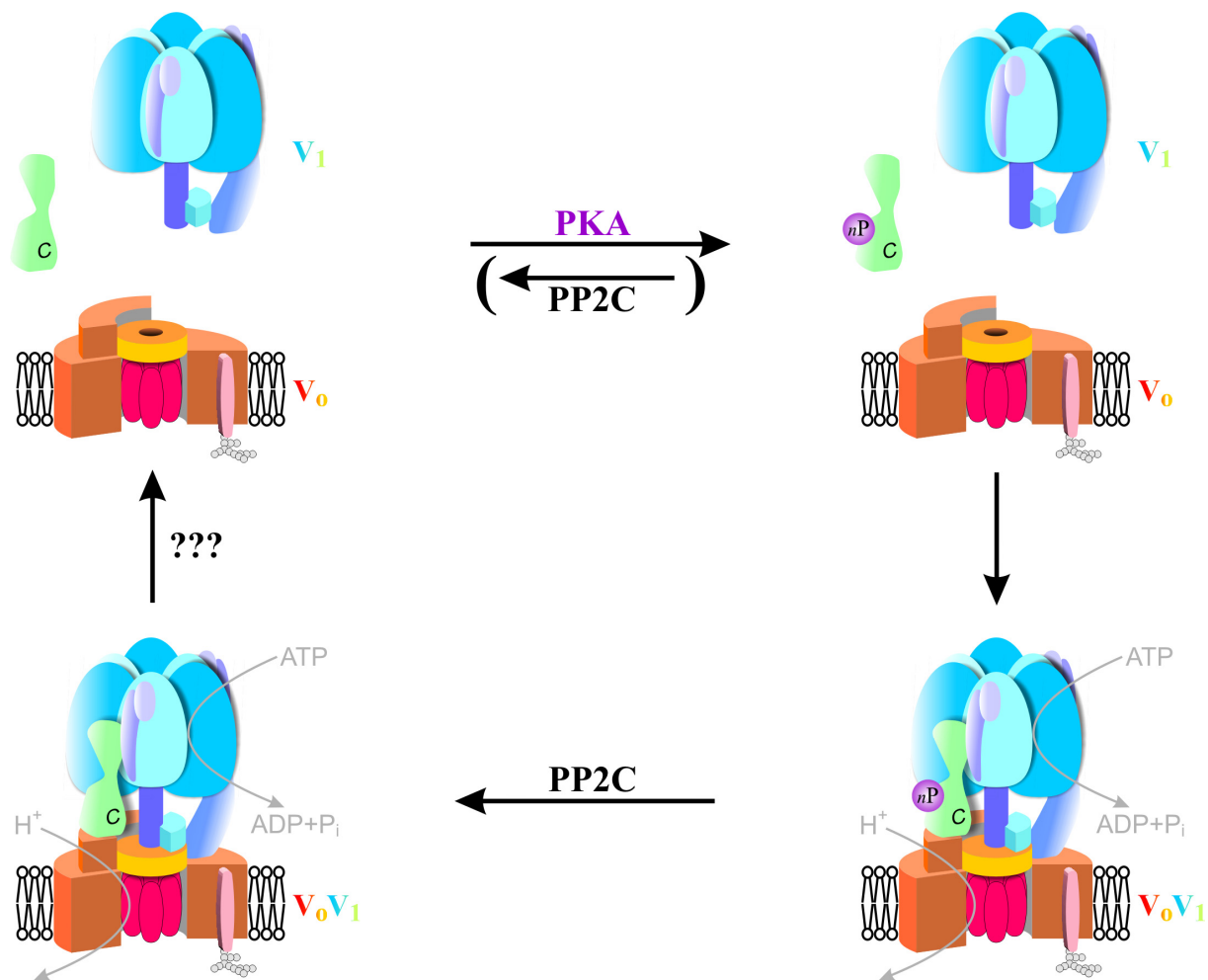


Abbildung 5.2: Modell zur Regulation der reversiblen Dissoziation der V-ATPase in den Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen. In den sekretorischen Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen führt die 5-HT-induzierte Aktivierung der PKA zu einer Phosphorylierung der Untereinheit C, die im phosphorylierten Zustand die Assoziation des V₁- und V₀-Komplexes begünstigt und somit die Bildung des aktiven V-ATPase-Holoenzym einleitet. Der PKA entgegengerichtet wirkt eine Proteinphosphatase 2C, die im Abschnitt 5.5 ausführlich erläutert wird. Durch eine Dephosphorylierung der Untereinheit C wird die Dissoziation des V₁- und V₀-Komplexes zwar nicht unmittelbar ausgelöst, aber zumindest begünstigt. Ein weiteres, noch unbekanntes Signal (???) beschleunigt die Dissoziation und somit die Inaktivierung der V-ATPase.

5.3 Räumliche Organisation der PKA-vermittelten Aktivierung der V-ATPase in *Calliphora*-Speicheldrüsen

Die PKA ist ein essentieller Vermittler in vielen cAMP-abhängigen Signalwegen und wird durch die Bindung von cAMP aktiviert. Im inaktiven Zustand setzt sich das PKA-Holoenzym aus zwei regulatorischen cAMP-bindenden Untereinheiten (PKA-R) und zwei katalytischen Untereinheiten (PKA-C) zusammen (Review: Taylor *et al.*, 1990). Die Bindung von zwei cAMP-Molekülen an jede regulatorische Untereinheit führt zur Dissoziation des PKA-Holoenzym in ein PKA-R-Dimer und zwei freie PKA-C-Untereinheiten. Die freigesetzten PKA-C-Untereinheiten sind enzymatisch aktiv und phosphorylieren zahlreiche Proteine wie Enzyme, Ionenkanäle und Komponenten des Cytoskeletts (Beebe, 1994; Francis & Corbin, 1994). Darüber hinaus kann die PKA-C in den Zellkern wandern und durch eine Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren die Genexpression regulieren (Meinkoth *et al.*, 1990).

Die PKA ist oft inhomogen im Cytoplasma verteilt und kann durch die Bindung an Ankerproteine (AKAPs: *A kinase anchoring proteins*) in bestimmten Bereichen der Zelle konzentriert vorliegen (Corbin *et al.*, 1977; Review: Taskén *et al.*, 2004). AKAPs umfassen eine ganze Gruppe von Proteinen, die PKA-R binden können und somit das PKA-Holoenzym im Bereich bestimmter Zellkompartimente wie ER, Mitochondrien, Zellkern oder Domänen der Plasmamembran festhalten (Review: Feliciello *et al.*, 2001). Dadurch tritt die PKA in hohen Konzentrationen in der Nähe der Zielproteine auf und die Wahrscheinlichkeit für eine Interaktion sowie die Geschwindigkeit und Spezifität der Signalübertragung werden erhöht.

In den Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen gibt es ebenfalls Anzeichen für eine räumliche Organisation in der Verteilung der PKA. In den unstimulierten Drüsenzellen ist die PKA hauptsächlich an runden und ellipsoiden Strukturen im Bereich der basolateralen Plasmamembran lokalisiert. Diese Strukturen sind wahrscheinlich Teil eines intrazellulären Membransystems und es ist anzunehmen, dass die Bindung der PKA über AKAPs vermittelt wird.

Es ist davon auszugehen, dass die G-Protein-gekoppelten 5-HT-Rezeptoren und die G-Protein-abhängigen Adenylatzyklen ebenfalls in der stark gefalteten basolateralen Plasmamembran lokalisiert sind. Aus physiologischen Messungen ist ersichtlich, dass die 5-HT-stimulierte Aktivität dieser Zellen sehr schnell einsetzt. Die Konzentrierung der PKA in diesem Bereich der Zelle könnte dazu beitragen, dass der 5-HT-induzierte Anstieg in der cAMP-Konzentration effizient in eine Aktivierung der PKA-C-Untereinheiten umgesetzt wird.

Die 5-HT-induzierte PKA-Aktivität führt zu einer Phosphorylierung der Untereinheit C. Im dissoziierten Zustand der V-ATPase-Komplexe liegt die Untereinheit C isoliert im Cytoplasma vor (Kane 1995; Parra *et al.*, 2000; Vitavska *et al.*, 2005). Daher wird wahrscheinlich bei einer PKA-vermittelten Aktivierung der V-ATPase vorrangig die frei vorliegende Untereinheit C phosphoryliert, die dann im phosphorylierten Zustand an den V_1 -Komplex bindet. Zusammen mit dem V_1 -Komplex wird die Untereinheit C aus dem Cytoplasma zur Apikalmembran umverteilt.

Die starke Konzentrierung der Untereinheit C und des V_1 -Komplexes an der Apikalmembran steigert die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion mit dem membranständigen V_0 -Komplex. Ein bemerkenswerter Aspekt ist in diesem Zusammenhang die parallel ablaufende Umverteilung der PKA-C-Untereinheiten, die nach einer 5-HT-Stimulierung ebenfalls an der Apikalmembran angereichert vorliegen. Die Anreicherung der PKA-C-Untereinheiten im Bereich der Apikalmembran könnte durch die Interaktion mit dem Substrat, also der Untereinheit C, gewährleistet sein. Die Apikalmembran ist stark vergrößert und dicht gepackt mit V-ATPase-Molekülen (Zimmermann *et al.*, 2003). Die enorme Anzahl an V-ATPase-Molekülen und die damit assoziierte Untereinheit C könnte einen großen Anteil freier PKA-C festhalten. Unabhängig von der Untereinheit C könnten auch andere apikal lokalisierte Proteine mit der PKA-C interagieren. Beispielsweise wurde in Säugerzellkulturen ein Protein identifiziert, das PKA-C-Untereinheiten im Zellkern bindet und dort zurückhalten kann (Sastri *et al.*, 2005).

Die apikale Lokalisierung der PKA-C trägt wahrscheinlich dazu bei, die Phosphorylierungsreaktionen und die damit einhergehenden Reassoziationen der V_0 - und V_1 -Komplexe zu beschleunigen und die Aufrechterhaltung assemblierter V-ATPase-Holoenzyme für die Dauer einer 5-HT-Stimulierung zu unterstützen.

Im Abschnitt 5.2 wurde bereits erläutert, dass während einer Stimulierung der Drüsenzellen Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Untereinheit C parallel ablaufen. In Anbetracht der apikalen Lokalisierung der PKA ist zu prüfen, ob auch die involvierte Proteinphosphatase mit dem Substrat aus dem Cytoplasma zur Apikalmembran umverteilt wird oder bereits im unstimulierten Zustand der Zellen apikal lokalisiert ist.

5.4 Die Bedeutung des cAMP/PKA-Signalweges zur Regulation der V-ATPase in anderen Systemen

Die vorliegende Arbeit lieferte erstmals den Nachweis der Phosphorylierung der Untereinheit C durch die PKA in einem intakten Organ. Es ist anzunehmen, dass die Eigenschaften dieses Proteins auch in anderen Systemen durch Proteinkinasen moduliert werden können. Zumindest konnte mit der WNK-Kinase die rekombinante Untereinheit C aus *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans* und *Manduca sexta* phosphoryliert werden (Hong-Hermesdorf *et al.*, 2006).

Die Beteiligung des cAMP-Signalweges an der Regulation der V-ATPase scheint recht verbreitet zu sein und ist unter Einbeziehung anderer Mechanismen als der reversiblen Dissoziation auch in anderen tierischen Zellen zu finden. Beispielsweise verursacht Interleukin 1 in Makrophagen von Mäusen einen Anstieg der V-ATPase-Aktivität in der Plasmamembran unter Beteiligung der PKA als auch der PKC. Die erhöhte V-ATPase-Aktivität tritt aber erst nach einigen Stunden auf und ist auf die gesteigerte Expression von V-ATPase-Untereinheiten zurückzuführen (Brisseau *et al.*, 1996). In den Zellen der Malpighischen Gefäßen von *Drosophila* ist die V-ATPase an der Flüssigkeitssekretion beteiligt und wird ebenfalls in ihrer Aktivität durch cAMP stimuliert (O'Donnell *et al.*, 1996; Coast *et al.*, 2001). Eine cAMP-abhängige Erhöhung der V-ATPase-Aktivität wurde auch im Kiemenepithel der Krabbe *Eriocheir sinensis* nachgewiesen (Onken *et al.*, 2000). In den Hellen Zellen des Nebenhodens männlicher Ratten wird die Aktivität der V-ATPase in der Plasmamembran durch die Endo- und Exocytose V-ATPase-haltiger Vesikel reguliert. Die Integration dieser Vesikel wird durch eine Alkalisierung des luminalen pH-Wertes induziert und ebenfalls durch den cAMP/PKA-Signalweg vermittelt (Pastor-Soler *et al.*, 2003; Pastor-Soler *et al.*, 2007). Die Zielproteine der PKA sind in diesem System aber noch nicht identifiziert.

Unabhängig von der genauen Art der Regulation ist bei einem multimeren Proteinkomplex wie der V-ATPase in Betracht zu ziehen, dass auch andere Untereinheiten phosphoryliert werden. Diesbezüglich gab es den ersten Hinweis für die Untereinheit B der V-ATPase in Clathrin-umhüllten Vesikeln, die aus dem Rindergehirn isoliert wurden. Die Untereinheit B konnte offenbar durch die Untereinheit AP50 des Clathrin-Assemblierungs-Proteins AP-2 phosphoryliert werden (Myers & Forgac, 1993). Ob diese Phosphorylierung physiologisch von Bedeutung ist, wurde jedoch nicht weiterverfolgt. Mit der bereits erwähnten WNK-Kinase aus *Arabidopsis* war es weiterhin möglich die Untereinheiten A, G und B oder H aus

Manduca sexta als Teil des isolierten V_1 -Komplexes zu phosphorylieren (Hong-Hermesdorf *et al.*, 2006).

Obwohl die Regulation der V-ATPase mittels reversibler Dissoziation des V_0 - und V_1 -Komplexes weit verbreitet ist, muss es sich bei der Phosphorylierbarkeit um keine generelle Eigenschaft der Untereinheit C handeln. Die auftretenden Unterschiede in den Aminosäuresequenzen der Untereinheit C aus verschiedenen Organismen können mit Besonderheiten in den funktionellen und regulatorischen Eigenschaften zusammenhängen. Bei einer Kenntnis der phosphorylierten Positionen in der Untereinheit C aus *Manduca* beziehungsweise *Calliphora* wäre es anhand von Sequenzvergleichen möglich, die potentielle PKA-abhängige Phosphorylierung der orthologen Proteine aus anderen Arten gut abschätzen zu können.

Weiterhin kann durch das Auftreten von Isoformen die Regulation der V-ATPase in den verschiedenen Geweben eines Organismus ganz unterschiedlich ablaufen. So wurden zumindest für die Untereinheit C aus der Maus zwei Isoformen nachgewiesen. Die Isoform C1 wird ubiquitär exprimiert, wohingegen die Expression der Isoform C2 auf Zellen in der Lunge und der Niere beschränkt ist (Sun-Wada *et al.*, 2003b). Zusätzlich gibt es noch von der Isoform C2 zwei alternative *Splice*-Varianten, die wiederum nur in bestimmten renalen beziehungsweise alveolaren Zelltypen vorkommen (Sun-Wada *et al.*, 2003a).

5.5 Die Dephosphorylierung der Untereinheit C durch eine Proteinphosphatase 2C

In einem eukaryotischen Organismus werden etwa ein Drittel aller Proteine durch die Phosphorylierungen von Serin-, Threonin- und Tyrosin-Resten reguliert (Nelson & Cox, 2001). Viele Proteinphosphorylierungen sind reversibel beziehungsweise treten transient auf. Die Dephosphorylierungsreaktionen erfordern Proteinphosphatasen mit entsprechender Funktions- und Substrat-spezifischer Aktivität.

Es gibt weit mehr Gene für Proteinkinasen als für Proteinphosphatasen. So enthält das Genom von *Drosophila* 236 Proteinkinase-, aber nur 93 Proteinphosphatase-Gene (Adams *et al.*, 2000). Das Verhältnis der verschiedenen Typen von Kinasen zu Phosphatasen, die spezifisch für Serin- und Threonin-Reste sind, beträgt in *Drosophila* etwa 6:1 (Morrison *et al.*, 2000).

Die traditionelle Klassifizierung für Serin-/Threonin-spezifische Proteinphosphatasen unterscheidet vier Gruppen (Ingebritsen & Cohen, 1983; Ingebritsen *et al.*, 1983; *Review*: Cohen & Cohen, 1989). Typ-1 Proteinphosphatasen (PP1) dephosphorylieren spezifisch die Untereinheit β der Phosphorylase-Kinase und werden durch die Hitze-stabilen Proteine Inhibitor-1 und Inhibitor-2 in ihrer Aktivität gehemmt. Typ-2 Proteinphosphatasen

(PP2A/2B/2C) dephosphorylieren vorrangig die Untereinheit α der Phosphorylase-Kinase und sind unempfindlich gegenüber Inhibitor-1 und -2. Eine weitere Unterteilung der Typ-2 Proteinphosphatasen basiert auf ihrer Abhängigkeit von zweiwertigen Kationen. Der Typ PP2A benötigt keine zweiwertigen Kationen für die Aktivität, wohingegen der Typ PP2B auf Ca^{2+} -Ionen und der Typ PP2C auf Mg^{2+} -Ionen angewiesen ist.

Es wurden mittlerweile weitere Proteinphosphatasen entdeckt, die in einigen Eigenschaften von den klassischen vier Gruppen abweichen. Die traditionelle Klassifizierung findet dennoch Anwendung, da die zusätzlichen Proteinphosphatase-Typen hinsichtlich Verbreitung und Funktionen wesentlich eingeschränkter sind. Weiterhin deuten Sequenzhomologien darauf hin, dass eine enge evolutionäre Verwandtschaft mit den Typen PP1, PP2A und PP2B besteht. Für eine vollständige Übersicht und bessere Einordnung der vorliegenden Arbeit sind in der Tabelle 5.1 die bekannten Serin-/Threonin-spezifischen Proteinphosphatasen aus *Drosophila* zusammengefasst.

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Serin-/Threonin-spezifischen Proteinphosphatasen aus *Drosophila*. Die angegebenen Funktionen der jeweiligen Proteinphosphatase-Typen und die zugehörigen Literaturverweise sind nicht auf *Drosophila* beschränkt und beziehen sich auch auf die jeweils homologen Proteinphosphatasen aus anderen eukaryotischen Organismen.

Subtyp	Bekannte Funktionen	Literatur
PP1	- beteiligt an Meiose, Apoptose, Proteinsynthese, Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts - Regulation von Rezeptoren, Ionenkanälen und Ionenpumpen	Hubbard & Cohen 1993 (<i>Review</i>) Cohen, 2002 (<i>Review</i>) Ceulemans & Bollen, 2003 (<i>Review</i>)
PP2A	- beteiligt an Transkription und Translation, Zellzyklus, Zelldifferenzierung und Signaltransduktion	Cohen, 1989 (<i>Review</i>) Zolnierowicz, 2000 (<i>Review</i>) Janssens & Goris, 2001 (<i>Review</i>)
PP2B	- beteiligt an Apoptose, Genregulation, Chemotaxis, Endo- und Exocytose, Signaltransduktion - Vermittlung von Immunantworten - Regulation von Ionenkanälen	Klee <i>et al.</i> , 1998 (<i>Review</i>) Rusnak & Mertz, 2000 (<i>Review</i>)
PP4	- beteiligt an der Organisation von Centrosomen und der Chromatin-Struktur	Helps <i>et al.</i> , 1998 Cohen <i>et al.</i> , 2005 (<i>Review</i>)
PP5	- Genregulation	Andreeva & Kutuzov, 1999 (<i>Review</i>) Brown <i>et al.</i> , 2000
PPV	- Genregulation	Mann <i>et al.</i> , 1993
<i>rdgC</i>	- Dephosphorylierung von Rhodopsin	Steele <i>et al.</i> , 1992 Andreeva & Kutuzov, 1999 (<i>Review</i>) Lee & Montell, 2001
PP2C	- beteiligt an Apoptose, Zellzyklus, Metabolismus, Zelldifferenzierung - Regulation von Stress-aktivierten Signalkaskaden	Rodriguez, 1998 (<i>Review</i>) Meskiene <i>et al.</i> 2003 Baril & Therrien, 2006 Klumpp <i>et al.</i> , 2006 (<i>Review</i>) Tamura <i>et al.</i> , 2006 (<i>Review</i>)

Alle Phosphatasen können den Gen-Familien PPP (Phosphoproteinphosphatasen) und PPM (Proteinphosphatasen, Mg^{2+} -abhängig) zugeordnet werden (Cohen, 1994). In *Drosophila* umfasst die Gen-Familie PPP insgesamt 17 Mitglieder, die sich auf sieben Subtypen aufteilen:

PP1 (8 Mitglieder), PP2A, PP2B (3 Mitglieder), PP4 (2 Mitglieder), PP5, PPV und *rdgC* (Morrison *et al.*, 2000). Die Gen-Familie PPM wird nur durch den Subtyp PP2C repräsentiert und umfasst 11 Mitglieder (Morrison *et al.*, 2000). Fast alle Phosphatasen sind ubiquitär verbreitet. Die PP1-Mitglieder PPY und PPN werden nur Testis-spezifisch exprimiert (Armstrong *et al.*, 1995; Armstrong *et al.*, 1998). Der Subtyp *rdgC* (*retinal degeneration C*) ist auf die Retina und die Pilzkörper im Gehirn beschränkt (Steele *et al.*, 1992). Die Subtypen PP5 und PPV treten vorrangig während der Embryonalentwicklung auf (Mann *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 2000).

Im Vorfeld der Untersuchungen der V-ATPase-Regulation durch reversible Proteinphosphorylierung in *Calliphora*-Speicheldrüsen bestand die Annahme, dass die aus *Drosophila* bekannten Serin- und Threonin-spezifischen Proteinphosphatasen auch in *Calliphora vicina* auftreten. Die Beteiligung der Proteinphosphatasen des Typs PP4, PP5, PPV und *rdgC* an der V-ATPase-Regulation konnte jedoch aufgrund der Zellkern-bezogenen Funktionen und der Gewebs-spezifischen Expression weitestgehend ausgeschlossen werden. Die Untersuchungen konzentrierten sich daher auf die Typen PP1, 2A, 2B und 2C.

Mittels Okadainsäure, Tautomycin, Cyclosporin A und FK-506 konnten die Proteinphosphatasen 1, 2A und 2B gezielt inhibiert werden. Aufgrund der Verwendung von Okadainsäure wurden die Proteinphosphatasen 4, 5 und V dennoch berücksichtigt. Durch diese Substanz werden neben den Proteinphosphatase-Typen PP1 und PP2A auch PP4, PP5 und PPV spezifisch und effektiv gehemmt (Bialojan & Takai, 1988; Brewis *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1994; Prickett & Brautigan, 2006). Der einzige ubiquitär vorkommende Proteinphosphatase-Typ für den keine inhibierenden oder stimulierenden Substanzen zur Verfügung stehen ist PP2C. Die Mg^{2+} -Abhängigkeit und die Unempfindlichkeit gegenüber Proteinphosphatase-Inhibitoren sind die einzigen Kriterien, die herangezogen werden können, um mittels physiologischer und biochemischer Methoden die Beteiligung einer Proteinphosphatase 2C an einem bestimmten zellulären Prozess nachzuweisen (Cohen, 1989; Cohen *et al.*, 1989; Klumpp *et al.*, 2006).

In *Calliphora*-Speicheldrüsen wird die PKA-abhängige Aktivität der V-ATPase nur für die Dauer der 5-HT-Stimulierung gesteigert (Dames *et al.*, 2006; Rein *et al.*, 2006; Rein *et al.*, 2008). Wie bereits im Abschnitt 5.2 erläutert wurde, ist die Proteinphosphatase, die der PKA entgegenwirkt, bereits während einer 5-HT-Stimulierung aktiv. Deshalb ist davon auszugehen, dass eine Hemmung der verantwortlichen Proteinphosphatasen zu einer länger anhaltenden 5-HT-induzierten V-ATPase-Aktivität führt und somit die luminale Ansäuerung verstärkt beziehungsweise verlängert wird. In den HAF-Messungen hatte aber keiner der

verwendeten Inhibitoren eine derartige Wirkung. Durch die Behandlung mit Cyclosporin A und FK-506 sowie die gleichzeitige Inkubation mit Okadainsäure und Tautomycin wurde die luminale Ansäuerung sogar stark verringert. Ausgehend von diesen Beobachtungen kann eine Beteiligung aller übrigen Proteinphosphatase-Typen mit Ausnahme der Proteinphosphatase 2C an der Inaktivierung der V-ATPase ausgeschlossen werden.

Die große Schwierigkeit bei der Untersuchung der Proteinphosphatasen 2C besteht darin, dass es nicht möglich ist, dieses Enzym gezielt mit pharmakologischen Substanzen zu beeinflussen. Die Arbeiten über diese Phosphatase befassen sich daher vorrangig mit genetisch zugänglichen Systemen sowie isolierten Proteinen, die *in vitro* charakterisiert werden. Die vorliegende Arbeit bildet dahingehend eine Ausnahme, dass die Proteinphosphatasen 2C mittels einer physiologischen Messmethode in einem intakten System mit der natürlichen Expression dieses Proteins untersucht wurde. Dabei wurde als Kriterium für die Beteiligung einer Proteinphosphatase 2C an der Regulation der V-ATPase-Aktivität neben der Unempfindlichkeit gegenüber Proteinphosphatase-Inhibitoren auch die Abhängigkeit der Phosphatase-Aktivität von einer hohen intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration ausgenutzt.

Die Verringerung der freien intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration wurde durch die Verwendung eines veresterten Komplexbildners für Mg^{2+} -Ionen erreicht. Dieser experimentelle Ansatz beinhaltet natürlich auch Nachteile. Mg^{2+} -Ionen sind für die Funktionsfähigkeit einer Zelle essentiell (Reviews: Saris *et al.*, 2000; Wolf & Trapani, 2008). Es ist davon auszugehen, dass unter den Bedingungen einer stark verringerten freien Mg^{2+} -Konzentration, diese Funktionsfähigkeit nicht lange aufrechterhalten werden kann. Bei den Messungen der pH-Änderungen im Lumen der *Calliphora*-Speicheldrüsen war diese Vorgehensweise anwendbar, weil die Prozesse, die an der Regulation der V-ATPase in den Drüsenzellen beteiligt sind, sehr schnell ablaufen. Ein weiterer Vorteil war die sehr rasche Freisetzung des Komplexbildners aus der veresterten Form durch unspezifische Esterasen. Der Effekt einer verringerten freien, intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration auf die V-ATPase-Aktivität beziehungsweise die davon abhängige luminale pH-Änderung setzte daher unmittelbar nach der Applikation des Komplexbildners ein. Wie sich zeigte, hatte die zu erwartende Beeinträchtigung anderer zellulärer Funktionen zu diesem Zeitpunkt noch keine Auswirkung auf die Aktivität der V-ATPase und trat offenbar erst später auf.

Die Verringerung der intrazellulär frei vorliegenden Mg^{2+} -Ionen resultierte in einer Verstärkung der 5-HT-induzierten luminalen Ansäuerung und einer Verzögerung der Rückkehr zum Ruhe-pH. Diese Mg^{2+} -Abhängigkeit kann neben dem Kriterium der Unempfindlichkeit gegenüber Proteinphosphatase-Inhibitoren als Beleg für die Beteiligung

einer Proteinphosphatase 2C an der Inaktivierung der V-ATPase in *Calliphora*-Speicheldrüsen angeführt werden.

Das Einsetzen einer luminalen Ansäuerung bei einer Verringerung der intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration und der damit einhergehenden Hemmung der Proteinphosphatase 2C ist auf die Grundaktivität der V-ATPase zurückzuführen. Eine Arbeit von Rein *et al.* belegt, dass auch im unstimulierten Zustand der Drüsenzellen ein gewisser Anteil der V-ATPase aktiv ist und ein Protonentransport in das Drüsenlumen erfolgt (Rein *et al.*, 2006). Die Analyse der subzellulären Verteilung der V-ATPase mittels *Pelleting Assays* verweist ebenfalls auf das Vorkommen des assemblierten V-ATPase-Holoenzym in unstimulierten Zellen (Zimmermann *et al.*, 2003; Dames *et al.*, 2006). Bei einer Hemmung der Aktivität der Proteinphosphatase 2C aufgrund der verringerten freien Mg^{2+} -Konzentration überwiegt der Mechanismus zur Aktivierung der V-ATPase und es kommt zu einer verstärkten luminalen Ansäuerung.

Bei den Phosphoprotein-Analysen mittels *ProQ Diamond* war für das Phosphorylierungssignal der Untereinheit C ebenfalls eine Mg^{2+} -Abhängigkeit und Unempfindlichkeit gegenüber den Proteinphosphatase-Inhibitoren gegeben. Folglich wird die Dephosphorylierung der Untereinheit C ebenfalls durch eine Proteinphosphatase 2C katalysiert. Diese Phosphoprotein-Analysen stehen im Einklang mit den physiologischen Messungen unter Verwendung des veresterten Komplexbildners für Mg^{2+} -Ionen.

Die Analyse der 2D-Elektrophorese ergab, dass wenige Minuten nach Beendigung der 5-HT-Stimulierung die Untereinheit C nicht mehr im phosphorylierten Zustand vorliegt. Demnach ist die Phosphorylierung der Untereinheit C ebenso wie die Aktivität der V-ATPase und die apikale Lokalisierung der cytoplasmatischen V-ATPase-Komponenten auf die Dauer der 5-HT-Stimulierung begrenzt. Daher kann angenommen werden, dass die Dephosphorylierung der Untereinheit C durch eine Proteinphosphatase 2C einer Dissoziation des V-ATPase-Holoenzym in den V_0 - und V_1 -Komplex vorausgeht und die Inaktivierung der V-ATPase begünstigt.

Die Proteinphosphatasen 2C sind wahrscheinlich konstitutiv aktiv. Im Gegensatz zu den übrigen Proteinphosphatase-Typen ist über die Regulation der Proteinphosphatasen 2C nur sehr wenig bekannt. Eine Steuerung der Phosphatase-Aktivität auf der Grundlage der Mg^{2+} -Abhängigkeit kann weitestgehend ausgeschlossen werden (Ingebritsen *et al.*, 1983; Cohen, 1989). Die freie Mg^{2+} -Konzentration kann je nach Zelltyp 0,2 mM bis 3,5 mM betragen und auftretende Konzentrationsänderungen sind nur sehr gering (*Review*: Romani & Scarpa, 1992). Zumindest für die Isoformen PP2C α und PP2C β aus dem Rind wurde eine

physiologisch relevante Stimulierung der Phosphatase-Aktivität durch freie, mehrfach ungesättigte Fettsäuren nachgewiesen (Klumpp *et al.*, 1998). Die Stimulierung von PP2C α und PP2C β durch Fettsäuren induziert in einigen Zelltypen, beispielsweise Neuronen und Endothelzellen, die Apoptose (Review: Klumpp *et al.*, 2006).

Aufgrund der unzureichenden Möglichkeit einer pharmakologischen Identifizierung der Proteinphosphatasen 2C mit spezifischen Inhibitoren wurde die Expression dieses Proteins in den Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen überprüft. Mittels RT-PCR konnten zwei Nukleotid-Fragmente amplifiziert werden, die Sequenzhomologien zu verschiedenen Proteinphosphatasen des Typs 2C in *Drosophila* aufwiesen.

5.6 Die Verknüpfung der PKA-vermittelten V-ATPase-Aktivierung mit dem IP₃/Ca²⁺-Signalweg

In den sekretorischen Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen kann der Effekt von 5-HT auf die Aktivität der V-ATPase auch durch eine künstliche Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration imitiert werden (Dames *et al.*, 2006). Die Behandlung der Drüsen mit PKA-spezifischen cAMP-Analoga führt zu einer Umverteilung der Untereinheit C und des V₁-Komplexes aus dem Cytoplasma zur Apikalmembran und löst den Protonentransport in das Drüsenlumen aus (Rein *et al.*, 2008). Folglich ist für den komplexen Vorgang der V-ATPase-Aktivierung die Aktivität der PKA absolut notwendig und hinreichend. Es ist aber nicht auszuschließen, dass andere Signalwege den cAMP/PKA-Signalweg beeinflussen und somit die Aktivität der V-ATPase modifizieren.

Bei einer Stimulierung mit 5-HT wird neben der cAMP-Synthese auch ein IP₃-vermittelter Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ausgelöst (Fain & Berridge, 1979; Heslop & Berridge, 1980; Berridge & Heslop, 1981; Berridge *et al.*, 1983; Litosch *et al.*, 1985). Bei ihren Untersuchungen zu den Mechanismen der Signalübertragung in diesen Zellen stellten Heslop und Berridge fest, dass für eine 5-HT-induzierte Steigerung der cAMP-Konzentration auch eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration notwendig ist (Heslop & Berridge, 1980). Dieser Befund impliziert, dass in den sekretorischen Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen alle Zielproteine des cAMP/PKA-Signalweges auch vom IP₃-Signalweg beeinflusst werden.

Die Ergebnisse der HAF-Messungen unter Ca²⁺-freien Bedingungen verdeutlichen, dass die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration für eine 5-HT-induzierte Aktivierung der V-ATPase ein essentieller Parameter ist. Bereits das Spülen der Drüsen mit einer Ca²⁺-freien Ringer-Lösung verursacht bei wiederholten 5-HT-Stimulierungen eine stetige Abnahme des Betrags der 5-

HT-induzierten luminalen Ansäuerung. Demnach wird unter diesen Bedingungen die V-ATPase in geringerem Maße aktiviert. Offenbar strömen bei jeder 5-HT-Stimulierung Ca^{2+} -Ionen, die Stimulus-abhängig aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden, über die Plasmamembran in die Ca^{2+} -freie Badlösung. Dadurch wird die Menge an Ca^{2+} -Ionen, die wieder in die Speicher aufgenommen wird, verringert und bei einer nachfolgenden 5-HT-Stimulierung ist die Ca^{2+} -abhängige Steigerung der cAMP-Konzentration reduziert. Es genügt jedoch, den Ca^{2+} -Gehalt badseitig zu erhöhen, um in Drüsenzelle mit einer verringerten freien Ca^{2+} -Konzentration wieder eine starke 5-HT-induzierte und PKA-vermittelte Aktivierung der V-ATPase auszulösen. Die Aufnahme der Ca^{2+} -Ionen erfolgt wahrscheinlich über die basolaterale Plasmamembran und tritt auch bei einer 5-HT-Stimulierung unter Kontrollbedingungen auf (Prince *et al.*, 1972). Demnach könnte sowohl eine Ca^{2+} -Freisetzung aus den intrazellulären Speichern als auch ein Ca^{2+} -Einstrom aus der extrazellulären Lösung erforderlich sein um den cAMP/PKA-Signalweg zu beeinflussen.

Die Ca^{2+} -Abhängigkeit der V-ATPase-Aktivierung scheint der Aussage zu widersprechen, dass die Aktivität der PKA für diesen Prozess hinreichend ist. Um aufzuklären in welcher Hinsicht die Ca^{2+} -Ionen den cAMP/PKA-Signalweg beziehungsweise die V-ATPase beeinflussen, wurde der Effekt einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf die V-ATPase-Aktivität untersucht. Es stellte sich heraus, dass in Speicheldrüsen, die im unstimulierten Zustand vorliegen, schon durch die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum eine luminale Ansäuerung induziert wird. Diese luminale Ansäuerung konnte durch eine Behandlung der Drüsen mit H-89 verringert werden und wird demnach durch die PKA vermittelt. Anscheinend wird mindestens eine Komponente des cAMP/PKA-Signalweges durch die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration dahingehend beeinflusst, dass daraus eine erhebliche Steigerung der V-ATPase-Grundaktivität resultiert.

Unabhängig davon, durch welchen Mechanismus die Ca^{2+} -Freisetzung zu einer Aktivierung der V-ATPase führt, scheint dieser Befund zunächst einen Widerspruch zu den Experimenten mit dem 5-HT-Antagonisten Cinanserin darzustellen. In Anlehnung an eine Arbeit von Berridge und Heslop (1981) wurde Cinanserin verwendet um den 5-HT-Rezeptor, der an den cAMP/PKA-Signalweg gekoppelt ist, zu blockieren und somit den 5-HT-abhängigen Anstieg der cAMP-Konzentration zu unterdrücken. Die Substanz wurde dabei in einer Konzentration eingesetzt, durch die der 5-HT-Rezeptor, der an den $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg anknüpft, bei einer Stimulierung mit 30 nM 5-HT nicht beeinträchtigt wird (Berridge & Heslop, 1981). Bei einer 5-HT-Stimulierung der Drüsenzellen in Gegenwart von Cinanserin sollte also der IP_3 -vermittelte Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration gewährleistet sein, und wie bereits

dargelegt, kann dadurch bereits eine luminal Ansäuerung induziert werden. Eine Behandlung mit Cinanserin reduzierte zwar, wie schon von Heslop und Berridge gezeigt den 5-HT-abhängigen Anstieg der cAMP-Konzentration, aber auch den Betrag der 5-HT-induzierten luminalen Ansäuerung. Um diesen Widerspruch aufzuheben bieten sich mindestens zwei mögliche Erklärungen an. Zum einen kann in Frage gestellt werden, dass Cinanserin bei den verwendeten Konzentrationen spezifisch den cAMP/PKA-Signalweg blockiert. Unter der Annahme, dass die Ca^{2+} -Freisetzung eine Voraussetzung für den 5-HT-abhängigen Anstieg der cAMP-Konzentration ist, kann bereits ein geringer Effekt des Cinanserins auf den $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg in einer starken Beeinträchtigung des cAMP/PKA-Signalweges resultieren. Zum anderen sind bei einer 5-HT-Stimulierung der Zellen die Ca^{2+} -Signale zeitlich und räumlich organisiert (Zimmermann & Walz, 1997/1999; Fechner, 2008). Demnach könnten zwischen der künstlich hervorgerufenen Ca^{2+} -Freisetzung, die auf der Blockierung der Ca^{2+} -Pumpe beruht, und der zeitlich und räumlich organisierten Ca^{2+} -Freisetzung während einer 5-HT-Stimulierung hinsichtlich der jeweiligen Effekte der Ca^{2+} -Signale auf den [cAMP]-Anstieg qualitative Unterschiede bestehen.

Das Ca^{2+} -Signal wird offenbar nur durch die Aktivität einer Proteinphosphatase 2B an den cAMP/PKA-Signalweg vermittelt. Denn sowohl die 5-HT- als auch die Ca^{2+} -induzierte Aktivität der V-ATPase kann durch eine Hemmung der Proteinphosphatase 2B vollständig unterdrückt werden. Also erfolgen in den Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen im Zusammenhang mit der 5-HT-induzierten Speichelsekretion weitere Phosphorylierungsreaktionen, die dazu beitragen die ablaufenden Signalwege zu regulieren. Welche Zielproteine für diese Proteinphosphatase in Frage kommen, soll im nächsten Abschnitt erläutert werden.

5.7 Die möglichen Zielproteine der Proteinphosphatase 2B

Die Proteinphosphatase 2B ist eine Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Serin-/Threonin-Phosphatase (Reviews: Klee *et al.*, 1998; Rusnak & Mertz, 2000). Diese Phosphatasen werden in neuronalem Gewebe besonders stark exprimiert und gehören dort zu den wichtigsten Interaktionspartnern für Calmodulin. Daher wird die Proteinphosphatase 2B auch üblicherweise als Calcineurin bezeichnet. Calcineurin spielt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Ca^{2+} -Signalen und ist beteiligt an Prozessen wie Apoptose, Regulation der Genexpression, Endo- und Exocytose, Regulation von Ionenkanälen, Chemotaxis und Vermittlung von Immunantworten. Diese Proteinphosphatase ist ein Heterodimer aus einer Calmodulin-bindenden, katalytischen Untereinheit A (58-64 kDa) und einer Ca^{2+} -bindenden, regulatorischen Untereinheit B (19 ka). Bei einer Ca^{2+} -Konzentration kleiner als $0,1 \mu\text{M}$ ist

das Enzym inaktiv. Die Aktivierung durch Ca^{2+} und Calmodulin unterstützt die Koordination der Phosphatase-Aktivität mit den Aktivitäten vieler anderer Enzyme wie beispielsweise Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinasen.

Im Zusammenhang mit der Aktivierung der V-ATPase in den Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen ist die Funktion von Calcineurin vermutlich an die 5-HT-induzierte Steigerung der cAMP-Konzentration im cAMP/PKA-Signalweg gekoppelt. Wie der cAMP-*Immunoassay* zeigte, führt die Hemmung dieser Phosphatase zu einer Verringerung des 5-HT-abhängigen [cAMP]-Anstiegs. Bei einer Hemmung von Calcineurin ist daher auch die 5-HT-induzierte Umverteilung der cytoplasmatischen V-ATPase-Komponenten und folglich die Bildung des aktiven V-ATPase-Holoenzym beeinträchtigt. Allerdings ist eine Aktivierung der V-ATPase unter diesen Bedingungen möglich, wenn für die Stimulierung der Drüsenzellen ein cAMP-Analogon verwendet wird. Dies ist ein weiterer Beleg dafür, dass Calcineurin den Anstieg der cAMP-Konzentration beeinflusst. Calcineurin könnte demnach die cAMP-Synthese stimulieren oder hemmend auf den cAMP-Abbau wirken.

Eine Potenzierung der cAMP-Produktion unter Beteiligung des Calcineurins wurde auch in Säugerzellen beschrieben. So wird in kultivierten Zellen der Rinder-Nebenniere die Adrenocorticotropin-stimulierte cAMP-Produktion durch ein Angiotensin-II-induziertes und Calcineurin-vermitteltes Ca^{2+} -Signal verstärkt (Baukal *et al.*, 1994). Auf ähnliche Weise wird in den Zellen der Gallengänge aus der Ratten-Leber die Sekretin-stimulierte cAMP-Produktion durch die Wirkung von Acetylcholin erhöht (Alvaro *et al.*, 1997).

Bei einer 5-HT-Stimulierung der Drüsenzellen führt die Bindung von 5-HT an den G-Proteingekoppelten Rezeptor zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase und es kommt zu einem [cAMP]-Anstieg (Heslop & Berridge, 1980; Berridge & Heslop, 1981). Eine Phosphodiesterase, die noch nicht näher charakterisiert ist, hydrolysiert das cAMP und reduziert dadurch die intrazelluläre cAMP-Konzentration (Heslop & Berridge, 1980). Unter Berücksichtigung der Beobachtung, dass in unstimulierten Drüsenzellen die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration zu einer PKA-vermittelten Aktivierung der V-ATPase führte, können der Rezeptor und das G-Protein als Zielproteine des Calcineurins weitestgehend ausgeschlossen werden. Demnach erfolgt die Vermittlung des Ca^{2+} -Signals an den cAMP/PKA-Signalweg durch eine reversible Phosphorylierung der Adenylatzyklase oder der Phosphodiesterase.

Im Fall der Adenylatzyklase müsste durch eine Dephosphorylierung die cAMP-Synthese gesteigert beziehungsweise angeregt werden. Dies wurde erstmals für die Adenylatzyklase in den Hauptzellen des Magens von Meerschweinchen nachgewiesen (Raufman *et al.*, 1996). In diesen Zellen kann die Calcineurin-vermittelte Potenzierung der cAMP-Produktion durch

cholinerge Agonisten und regulatorische Peptide induziert werden. Ähnlich wie in den Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen genügt die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, um diesen Effekt zu bewirken. In Neuronen des Mäuse-Gehirn wurde ebenfalls eine Calcineurin-aktivierte Adenylatzyklase nachgewiesen (Chan *et al.*, 2005). Allerdings ist bei diesem Beispiel noch nicht eindeutig geklärt, ob die Dephosphorylierung die Adenylatzyklase direkt betrifft oder der Effekt durch ein weiteres Protein vermittelt wird.

Unter der Annahme, dass Calcineurin die beteiligten Phosphodiesterasen reguliert, müsste die Dephosphorylierung durch Calcineurin eine hemmende Wirkung auf die cAMP-Hydrolyse ausüben. Für die Dauer einer 5-HT-Stimulierung wäre die Aktivität der Phosphodiesterase reduziert und der [cAMP]-Anstieg begünstigt. Bei einer Hemmung des Calcineurins würde die cAMP-Hydrolyse möglicherweise schneller erfolgen als die cAMP-Synthese und die PKA-vermittelte Aktivierung der V-ATPase ist nicht gewährleistet.

Der Einfluss von Phosphodiesterasen auf den 5-HT-abhängigen [cAMP]-Anstieg in den Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen wurde schon von Heslop und Berridge untersucht (Heslop & Berridge, 1980). So führte die Hemmung der Phosphodiesterasen zu einer erheblichen Steigerung des 5-HT-abhängigen [cAMP]-Anstiegs. Folglich sind die Phosphodiesterasen während der Stimulierungsphase aktiv und werden entweder gar nicht oder nur in geringem Maße Ca^{2+} -abhängig gehemmt. Weiterhin resultierte die Behandlung unstimulierter Drüsen mit einem Phosphodiesterase-Inhibitor in keiner wesentlichen Erhöhung der cAMP-Konzentration. Weitere Ergebnisse aus dieser Arbeit von Heslop und Berridge weisen sogar darauf hin, dass bei einer 5-HT-Stimulierung eine Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der Phosphodiesterasen erfolgt.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Heslop und Berridge ist davon auszugehen, dass bei einer 5-HT-Stimulierung das Ca^{2+} -Signal über eine Calcineurin-abhängige Dephosphorylierung der Adenylatzyklase an den cAMP/PKA-Signalweg vermittelt wird.

In der Abbildung 5.4 sind die Signalkaskaden und bekannten Regulationsmechanismen, die in den Zellen der *Calliphora*-Speicheldrüsen zu einer Aktivierung der V-ATPase führen, in einem Schema zusammengefasst. Es ist aber in Betracht zu ziehen, dass die Mechanismen zur wechselseitigen Regulation der Signalwege noch weitaus komplexer sind und weitere Interaktionen zwischen den beteiligten Proteinen auftreten.

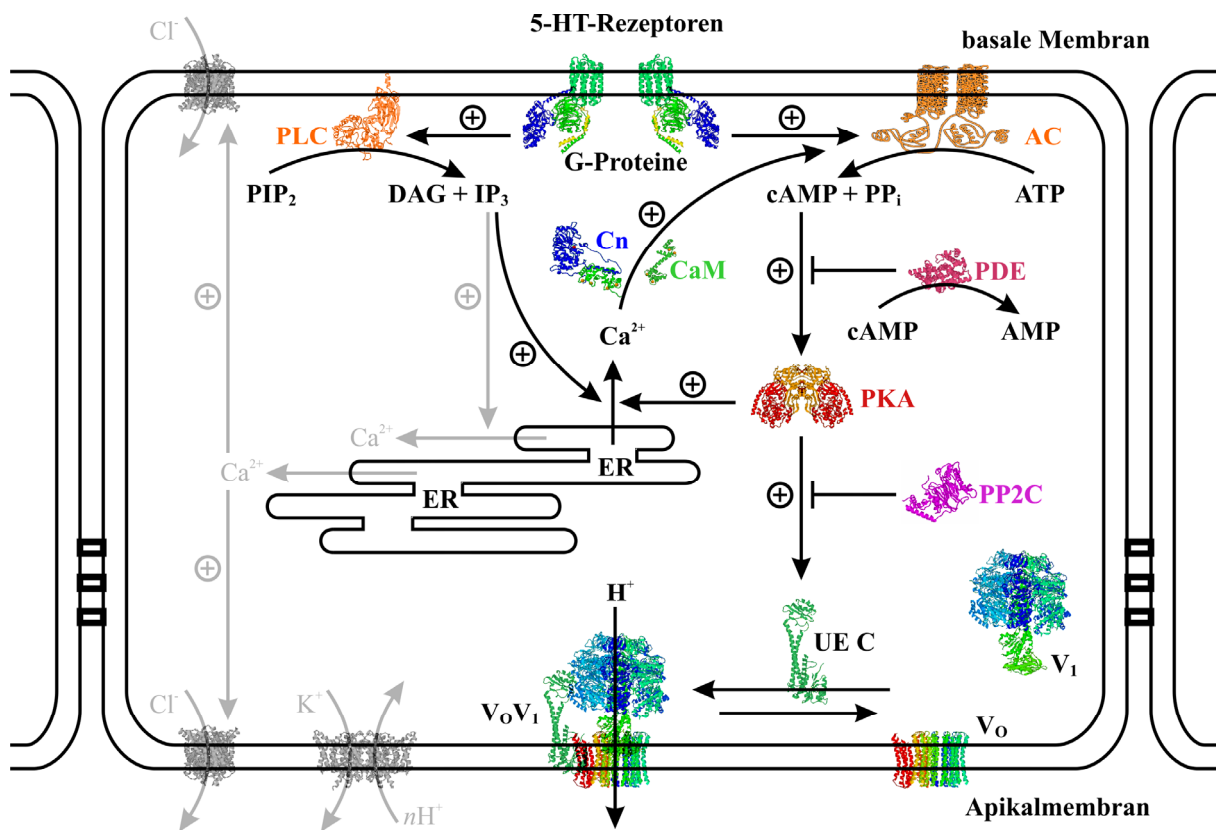


Abbildung 5.4: Schematische Zusammenfassung der Signalkaskaden in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*. Dargestellt sind die bisher bekannten Mechanismen, die 5-HT-abhängig aktiviert werden und an der Speichelsekretion beteiligt sind. Farblich hervorgehoben sind die Signalwege, die zur Assemblierung und Aktivierung der V-ATPase in der Apikalmembran beitragen. Die gekennzeichneten Proteine sind die Phospholipase C (PLC), Adenylatzyklase (AC), Calcineurin (Cn), Calmodulin (CaM), Phosphodiesterasen (PDE), Proteinkinase A (PKA), Proteinphosphatase 2C (PP2C) und V-ATPase-Untereinheit C (UE C).

5.8 Ausblick

Mit dem Nachweis der Phosphorylierung der Untereinheit C durch die PKA wurde ein Schlüsselschritt zur Stimulus-induzierten Aktivierung der V-ATPase in *Calliphora*-Speicheldrüsen aufgeklärt. Um abschätzen zu können, ob diese Eigenschaft der Untereinheit C auch in anderen Organismen relevant ist, wäre es notwendig die Untereinheit C aus *Calliphora* zu sequenzieren und die phosphorylierten Positionen zu identifizieren. Die Isolierung von größeren Mengen eines bestimmten Proteins aus *Calliphora*-Speicheldrüsen ist aber schwer umzusetzen, da es sich um ein sehr kleines Organ handelt. Es empfiehlt sich daher mittels RT-PCR die Nukleotidsequenz der Untereinheit C zu ermitteln und davon die Aminosäuresequenz abzuleiten. Gegebenenfalls könnten mit einem rekombinanten Protein die

Phosphorylierungsreaktionen *in vitro* durchgeführt und die phosphorylierten Positionen über analytische Methoden wie der Massenspektrometrie bestimmt werden.

Die reversible Phosphorylierung der Untereinheit C ist Voraussetzung für die Aktivierung der V-ATPase. Der Prozess der Inaktivierung beinhaltet aber anscheinend weitere Faktoren. Dabei könnte es sich um regulatorische Proteine handeln, deren Identifizierung notwendig ist, um die Regulation der V-ATPase in *Calliphora*-Speicheldrüsen umfassend aufzuklären. Aktivator- und Inhibitor-Proteine der V-ATPase wurden aus der Rinder-Niere isoliert (Zhang *et al.*, 1992a/b). Allerdings wurde nie aufgeklärt, in welchem physiologischen Zusammenhang diese Proteine *in vivo* von Bedeutung sein könnten.

Die Dephosphorylierung der Untereinheit C durch eine Proteinphosphatase 2C scheint jedoch die Dissoziation der V-ATPase zu begünstigen. Es wäre von Interesse aufzuklären, ob die Verteilung der involvierten Proteinphosphatase räumlich organisiert ist und ob für dieses Protein ebenfalls eine Stimulus-abhängige Umverteilung zur Apikalmembran stattfindet. Weiterhin ist noch unklar, wie viele Isoformen in *Calliphora*-Speicheldrüsen insgesamt exprimiert werden und welche Isoform an der Regulation der V-ATPase beteiligt ist.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit deutlich, dass die V-ATPase nicht nur über den cAMP-/PKA-Signalweg reguliert wird, sondern auch von den Ca^{2+} -Signalen beeinflusst wird. Um den Einfluss der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf die Aktivität der V-ATPase zu verifizieren, sind neben HAF-Messungen auch biochemische und zellbiologische Untersuchungen notwendig. Zudem sollten die Effekte der Signalwege mit weiteren Serotonin-Agonisten und Antagonisten charakterisiert werden. Die wechselseitige Regulation der $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ - und cAMP/PKA-Signalwege ist ein Aspekt, der unabhängig von der Regulation der V-ATPase auch im Zusammenhang mit anderen physiologischen Prozessen von Bedeutung sein kann.

6. Literaturverzeichnis

- Abrami L., Lindsay M., Parton R.G., Leppla S.H. & van der Goot F.G. (2004)** Membrane insertion of anthrax protective antigen and cytoplasmic delivery of lethal factor occur at different stages of the endocytic pathway. *J. Cell Biol.* 166: 645 – 651.
- Adachi I., Puopolo K., Marquez-Sterling N., Araig H. & Forgac M. (1990)** Dissociation, cross-linking, and glycosylation of the coated vesicle proton pump. *J. Biol. Chem.* 265: 967 – 973.
- Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., Scherer S.E. et al. (2000)** The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185 – 2195.
- Al-Awqati Q., Gluck S., Reeves W. & Cannon C. (1983)** Regulation of proton transport in urinary epithelia. *J. Exp. Biol.* 106: 135 – 145.
- Allen K.A., Du J., Davies S.A. & Dow J.A.T. (2005)** Genome-wide survey of V-ATPase genes in *Drosophila* reveals a conserved renal phenotype for lethal alleles. *Physiol. Genomics* 22: 128 – 138.
- Alvaro D., Alpini G., Jezequel A.M., Bassotti C., Francia C., Fraioli F., Romeo R., Marucci L., Le Sage G., Glaser S.S. & Benedetti A. (1997)** Role and mechanisms of action of acetylcholine in the regulation of rat cholangiocyte secretory functions. *J. Clin. Invest.* 100: 1349 – 1362.
- Andreeva A.V. & Kutuzov M.A. (1999)** RdgC/PP5-related phosphatases: novel components in signal transduction. *Cell. Signal.* 11: 555 – 562.
- Arai H., Pink S. & Forgac M. (1989)** Interaction of anions and ATP with the coated vesicle proton pump. *Biochemistry* 28: 3075 – 3082.
- Arata Y., Baleja J.D. & Forgac M. (2002a)** Cysteine-directed cross-linking to subunit B suggests that subunit E forms part of the peripheral stalk of the vacuolar H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 277: 3357 – 3363.
- Arata Y., Baleja J.D. & Forgac M. (2002b)** Localization of subunits D, E, and G in the yeast V-ATPase complex using cysteine-mediated cross-linking to subunit B. *Biochemistry* 41: 11301 – 11307.
- Armbrüster A., Hohn C., Hermesdorf A., Schumacher K., Börsch M. & Grüber G. (2005)** Evidence for major structural changes in subunit C of the vacuolar ATPase due to nucleotide binding. *FEBS Lett.* 579: 1961 – 1967.
- Baril C. & Therrien M. (2006)** Alphabet, a Ser/Thr phosphatase of the protein phosphatase 2C family, negatively regulates RAS/MAPK signaling in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 294: 232 – 245.
- Bashford C.L., Casey R.P., Radda G.K. & Ritchie G.A. (1975)** The effect of uncouplers on catecholamine incorporation by vesicles of chromaffin granules. *Biochem. J.* 148: 153 – 155.
- Baukal A.J., Hunyady L., Catt K.J. & Balla T. (1994)** Evidence for participation of calcineurin in potentiation of agonist-stimulated cyclicAMP formation by the calcium-mobilizing hormone, angiotensin II. *J. Biol. Chem.* 269: 24546 – 24549.
- Bebas P., Cymborowski B. & Giebultowicz J.M. (2002)** Circadian rhythm of acidification in insect *vas deferens* regulated by rhythmic expression of vacuolar H⁺-ATPase. *J. Exp. Biol.* 205: 37 – 44.
- Beebe S.J. (1994)** The cAMP-dependent protein kinases and cAMP signal transduction. *Semin. Cancer Biol.* 5: 285 – 294.

- Beltran C. & Nelson N. (1992)** The membrane sector of vacuolar H(+)-ATPase by itself is impermeable to protons. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 607: 41 – 47.
- Berridge M.J. (1981)** Electrophysiological evidence for the existence of separate receptor mechanisms mediating the action of 5-hydroxytryptamine. *Mol. Cell. Endocrinol.* 23: 91 – 104.
- Berridge M.J., Dawson R.M.C., Downes C.P., Heslop J.P. & Irvine R.F. (1983)** Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem. J.* 212: 473 – 482.
- Berridge M.J. & Heslop J.P. (1981)** Separate 5-Hydroxytryptamine receptors on the salivary gland of the blowfly are linked to the generation of either cyclic adenosine 3',5'-monophosphate or calcium signals. *Br. J. Pharmac.* 73: 729 – 738.
- Berridge M.J., Lindley B.D. & Prince W.T. (1976)** Studies of the mechanism of fluid secretion by isolated salivary glands of *Calliphora*. *J. Exp. Biol.* 64: 311 – 322.
- Berridge M.J. & Patel N.G. (1968)** Insect salivary glands: stimulation of fluid secretion by 5-hydroxytryptamine and adenosine-3',5'-monophosphate. *Science* 162: 462 – 463.
- Berridge M.J. & Prince W.T. (1971)** The electrical response of isolated salivary glands during stimulation with 5-hydroxytryptamine and cyclic AMP. *Philos. Trans. R. Soc. London B. Biol. Sci.* 262: 111 – 120.
- Beyenbach K.W. (2001)** Energizing epithelial transport with the vacuolar H⁺-ATPase. *News Physiol. Sci.* 16: 145 – 151.
- Beyenbach K.W. & Wiczorek H. (2006)** The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J. Exp. Biol.* 209: 577 – 589.
- Bialojan C. & Takai A. (1988)** Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. *Biochem. J.* 256: 283 – 290.
- Blair H.C., Teitelbaum S.L., Ghiselli R. & Gluck S. (1989)** Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 245: 855-857.
- Breton S., Smith P., Lui B. & Brown D. (1996)** Acidification of male reproductive tract by a proton-pumping H⁺ATPase. *Nature Medicine* 2: 470 – 472.
- Brisseau G.F., Grinstein S., Hackam D.J., Nordström T., Manolson M.F., Khine A.A. & Rotstein O.D. (1996)** Interleukin-1 increases vacuolar-type H⁺-ATPase activity in murine peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* 271: 2005 – 2011.
- Brown D. & Breton S. (2000)** H⁺V-ATPase-dependent luminal acidification in the kidney collecting duct and the epidymis/vas deferens: vesicle recycling and transcytotic pathways. *J. Exp. Biol.* 203: 137 – 145.
- Brown L., Borthwick E.B., Cohen P.T.W. (2000)** *Drosophila* protein phosphatase 5 is encoded by a single gene that is most highly expressed during embryonic development. *Biochim. Biophys. Acta* 1492: 470 – 476.
- Brown D., Lui B., Gluck S. & Sabolic I. (1992)** A plasma membrane proton ATPase in specialized cells of rat epidymis. *Am. J. Physiol.* 263: C913 – C916.
- Brown D., Smith P.J., Breton S. (1997)** Role of V-ATPase-rich cells in acidification of the male reproductive tract. *J. Exp. Biol.* 200: 257 – 262.

- Ceulemans H. & Bollen M. (2003)** Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol. Rev.* 84: 1 – 39.
- Chan G.C., Tonegawa S. & Storm D.R. (2005)** Hippocampal neurons express a calcineurin-activated adenylyl cyclase. *J. Neurosci.* 25: 9913 – 9918.
- Chijiwa T., Mishima A., Hagiwara M., Sano M., Hayash K., Inoue T., Naito K., Toshiokall T. & Hidakall H. (1990)** Inhibition of Forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-soquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* 265: 5267 – 5272.
- Cidon S. & Sihra T.S. (1989)** Characterization of a H⁺-ATPase in rat brain synaptic vesicles. Coupling to L-glutamate transport. *J. Biol. Chem.* 264: 8281 – 8288.
- Cidon S., Tamir H., Nunez E.A. & Gershon M.D. (1991)** ATP-dependent uptake of 5-hydroxytryptamine by secretory granules isolated from thyroid parafollicular cells. *J. Biol. Chem.* 266: 4392 – 4400.
- Coast G.M., Webster S.G., Schegg K.M., Tobe S.S. & Schooley D.A. (2001)** The *Drosophila melanogaster* homologue of an insect calcitonin-like diuretic peptide stimulates V-ATPase activity in fruit fly Malpighian tubules. *J. Exp. Biol.* 204: 1795 – 1804.
- Cohen P.T.W. (2002)** Protein phosphatase 1 – targeted in many directions. *J. Cell Sci.* 115: 241 – 256.
- Cohen P. & Cohen P.T.W. (1989)** Protein phosphatases come of age. *J. Biol. Chem.* 264: 21435 – 21438.
- Cohen P.T.W., Philp A. & Vázquez-Martin C. (2005)** Protein phosphatase 4 – from obscurity to vital functions. *FEBS Lett.* 579: 3278 – 3286.
- Corbin J.D., Sugden P.H., Lincoln T.M. & Keely S.L. (1977)** Compartmentalization of adenosine 3':5'-monophosphate and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase in heart tissue. *J. Biol. Chem.* 252: 3854 – 3861.
- Curtis K.K., Francis S.A., Oluwatosin Y. & Kane P.M. (2002)** Mutational analysis of the subunit C (Vma5p) of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 277: 8979 – 8988.
- Dames P., Zimmermann B., Schmidt R., Rein J., Voss M., Schewe B., Walz B. & Baumann O. (2006)** cAMP regulates plasma membrane vacuolar-type H⁺-ATPase assembly and activity in blowfly salivary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 3926 – 3931.
- Da Silva N., Shum W.W. & Breton S. (2007)** Regulation of vacuolar proton pumping ATPase-dependent luminal acidification in the epididymis. *Asian J. Androl.* 9: 476 – 482.
- David P. & Baron R. (1994)** The catalytic cycle of the vacuolar H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 269: 30158 – 30163.
- Dietz K., Heber U. & Mimura T. (1998)** Modulation of the vacuolar H⁺-ATPase by adenylates as basis for the transient CO₂-dependent acidification of the leaf vacuole upon illumination. *Biochim. Biophys. Acta* 1373: 87 – 92.
- Dostmann W.R.G., Taylor S.S., Genieser H., Jastorff B., Døskeland S.O. & Øgreid D. (1990)** Probing the cyclic nucleotide binding sites of cAMP-dependent protein kinase I and II with analogs of adenosine 3',5'-cyclic phosphorothioates. *J. Biol. Chem.* 265: 10484 – 10491.

- Dow J.A.T. (1984)** Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport. *Am. J. Physiol.* 246: 633 – 636.
- Drory O. & Nelson N. (2006)** Structural and functional features of yeast V-ATPase subunit C. *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 297 – 303.
- Dschida W.J.A. & Bowman B.J. (1995)** The vacuolar ATPase: sulfite stabilization and the mechanism of nitrate inactivation. *J. Biol. Chem.* 270: 1557 – 1563.
- Duve H., Thorpe A. & Nässel D.R. (1988)** Light- and electron-microscopic immuno-cytochemistry of peptidergic neurons innervating thoracico-abdominal neurohaemal areas in the blowfly. *Cell Tissue Res.* 253: 583 – 595.
- Edelman A.M. & Blumenthal D.K. (1987)** Protein serine/threonine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 567 – 613.
- Ehrenfeld J. (1998)** Active proton and urea transport by amphibian skin. *Comp. Biochem. Physiol.* 119: 35 – 45.
- Ehrenfeld J. & Klein U. (1997)** The key role of the H⁺ V-ATPase in acid-base balance and Na⁺ transport processes in frog skin. *J. Exp. Biol.* 200: 247 – 256.
- Fain J.N. & Berridge M.J. (1979)** Relationship between hormonal activation of phosphatidylinositol hydrolysis, fluid secretion and calcium flux in the blowfly salivary gland. *Biochem. J.* 178: 45 – 58.
- Fechner L. (2008)** Einfluss des cAMP-Signalwegs auf das zeitliche und räumliche Muster der intrazellulären Ca²⁺-Signale in den Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*. Diplomarbeit, Universität Potsdam.
- Feliciello A., Gottesman M.E. & Avvedimento E.V. (2001)** The biological functions of A-Kinase Anchor Proteins. *J. Mol. Biol.* 308: 99 – 114.
- Feng Y. & Forgac M. (1992a)** Cysteine 254 of the 73-kDa A subunit is responsible for inhibition of the coated vesicle (H⁺)-ATPase upon modification by sulfhydryl reagents. *J. Biol. Chem.* 267: 5817 – 58122.
- Feng Y. & Forgac M. (1992b)** A novel mechanism for regulation of vacuolar acidification. *J. Biol. Chem.* 267:19769 – 19772.
- Filippova M., Ross L.S. & Gill S.S. (1998)** Cloning of the V-ATPase B subunit cDNA from *Culex quinquefasciatus* and expression of the B and C subunits in mosquitoes. *Insect Mol. Biol.* 7: 223 – 232.
- Finbow M.E. & Harrison M.A. (1997)** The vacuolar H⁺-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *Biochem. J.* 324: 697 – 712.
- Fok A.K., Aihara M.S., Ishida M., Nolte K.V., Steck T.L. & Allen R.D. (1995)** The pegs on the decorated tubules of the contractile vacuole complex of *Paramecium* are proton pumps. *J. Cell. Sci.* 108: 3163 – 70.
- Forgac M. (2007)** Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 917 – 929.
- Francis S.H. & Corbin J.D. (1994)** Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu. Rev. Physiol.* 56: 237 – 272.

- Frattini A., Orchard P.J., Sobacchi C., Giliani S., Abinun M., Mattsson J.P., Keeling D.J., Andersson A., Wallbrand P., Zecca L., Notarangelo L.D., Vezzoni P. & Villa A. (2000)** Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nat. Gen.* 25: 343 – 346.
- Gluck S., Cannon C. & Al-Awqati Q. (1982)** Exocytosis regulates urinary acidification in turtle bladder by rapid insertion of H⁺ pumps into the luminal membrane. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 79: 4327 – 4331.
- Gogarten J.P., Kibak H., Dittrich P., Taiz L., Bowman E.J., Bowman B.J., Manolson M.F., Poole R.J., Date T., Oshima T., Konishi J., Denda K. & Yoshida M. (1989)** Evolution of the vacuolar H⁺-ATPase: implications for the origin of eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6661 – 6665.
- Gräf R., Harvey W.R. & Wiczorek H. (1996)** Purification and properties of a cytosolic V₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* 271: 20908 – 20913.
- Granger D., Marsolais M., Burry J. & Laprade R. (2002)** V-type H⁺-ATPase in the human eccrine sweat duct: immunolocalization and functional demonstration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282: C1454 – C1460.
- Guinea R. & Carrasco L. (1995)** Requirement for vacuolar proton-ATPase activity during entry of influenza virus into cells. *J. Virol.* 69: 2306 – 2312.
- Hager A. & Lanz C. (1989)** Essential sulfhydryl groups in the catalytic center of the tonoplast H⁺-ATPase from coleoptiles of *Zea mays* L. as demonstrated by the biotin-streptavidin-peroxidase system. *Planta* 180: 116 – 122.
- Hall T.A. (1999)** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95 – 98.
- Harvey W.R. & Wiczorek H. (1997)** Animal plasma membrane energization by chemiosmotic H⁺ V-ATPase. *J. Exp. Biol.* 200: 203 – 216.
- Helps N.R., Brewis N.D., Lineruth K., Davis T., Kaiser K. & Cohen P.T.W. (1998)** Protein phosphatase 4 is an essential enzyme required for organisation of microtubules at centrosomes in *Drosophila* embryos. *J. Cell Sci.* 111: 1331 – 1340.
- Heslop J.P. & Berridge M.J. (1980)** Changes in cyclic AMP and cyclic GMP concentrations during the action of 5-hydroxytryptamine on an insect salivary gland. *Biochem. J.* 192: 247 – 255.
- Hirata T., Iwamoto-Kihara A., Sun-Wada G., Okajima T., Wada Y. & Futai M. (2003)** Subunit rotation of vacuolar-type proton pumping ATPase. *J. Biol. Chem.* 278: 23714 – 23719.
- Holliday L.S., Lu M., Lee B.S., Nelson R.D., Solivan S., Zhang L. & Gluck S.L. (2000)** The amino-terminal domain of the B subunit of vacuolar H⁺-ATPase contains a filamentous actin binding site. *J. Biol. Chem.* 275: 32331 – 32337.
- Holzer H. & Duntze W. (1971)** Metabolic Regulation by chemical modification of enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 40: 345 – 374.
- Hong-Hermesdorf A., Brück A., Grüber A., Grüber G. & Schumacher K. (2006)** A WNK kinase binds and phosphorylates V-ATPase subunit C. *FEBS Lett.* 580: 932 – 939.
- Hubbard M.J. & Cohen P. (1993)** On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends. Biochem. Sci.* 18: 172 – 177.

- Hunter T. (1995)** Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225 – 236.
- Huss M. & Wieczorek H. (2007)** Influence of ATP and ADP on dissociation of the V-ATPase into its V_1 and V_0 complexes. *FEBS Lett.* 581: 5566 – 5572.
- Imamura H., Nakano M., Noji H., Muneyuki E., Ohkuma S., Yoshida M. & Yokoyama K. (2003)** Evidence for rotation of V_1 -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 2312 – 2315.
- Ingebritsen T.S. & Cohen P. (1983)** The protein phosphatases involved in cellular regulation: 1. Classification and substrate specificities. *Eur. J. Biochem.* 132: 255 – 261.
- Ingebritsen T.S., Stewart A.A. & Cohen P. (1983)** 6. Measurement of type-1 and type-2 protein phosphatases in extracts of mammalian tissues; an assessment of their physiological roles. *Eur. J. Biochem.* 132: 297 – 307.
- Inoue T. & Forgac M. (2005)** Cysteine-mediated cross-linking indicates that subunit C of the V-ATPase is in close proximity to subunits E and G of the V_1 domain and subunit a of the V_0 domain. *J. Biol. Chem.* 280: 27896 – 27903.
- Inoue T., Wilkens S. & Forgac M. (2003)** Subunit structure, function, and arrangement in the yeast and coated vesicle V-ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35: 291 – 299.
- Janssens V. & Goris J. (2001)** Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J.* 353: 417 – 439.
- Johnson L.S., Dunn K.W., Pytowski B. & McGraw T.E. (1993)** Endosome Acidification and receptor trafficking: bafilomycin A_1 slows receptor externalization by a mechanism involving the receptor's internalization motif. *Mol. Biol. Cell* 4: 1251 – 1266.
- Kane P.M. (1995)** Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H^+ -ATPase in vivo. *J. Biol. Chem.* 270: 17025 – 17032.
- Kane P.M. (2006)** The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H^+ -ATPase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 177 – 191.
- Kanner B.I., Sharon I., Maron R. & Schuldiner S. (1980)** Electrogenic transport of biogenic amines in chromaffin granule membrane vesicles. *FEBS Lett.* 111: 83 – 86.
- Karet F.E., Finberg K.E., Nelson R.D., Nayir A., Mocan H., Sanjad S.A., Rodriguez-Soriano J., et al. (1999)** Mutations in the gene encoding B1 subunit of H^+ -ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nat. Gen.* 21: 84 – 90.
- Kawasaki-Nishi S., Nishi T. & Forgac M. (2001)** Yeast V-ATPase complexes containing different isoforms of the 100-kDa a-subunit differ in coupling efficiency and *in vivo* dissociation. *J. Biol. Chem.* 276: 17941 – 17948.
- Kettner C., Obermeyer G. & Bertla A. (2003)** Inhibition of the yeast V-type ATPase by cytosolic ADP. *FEBS Lett.* 535: 119 – 124.
- Kibak H., Van Eeckhout D., Cutler T., Taiz S.L. & Taiz L. (1993)** Sulfite both stimulates and inhibits the yeast vacuolar H^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 268: 23325 – 23333.
- Kirschner L.B. (2004)** The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J. Exp. Biol.* 207: 1439 – 1452.

- Kirschner N. (1962)** Uptake of catecholamines by a particular fraction of the adrenal medulla. *J. Biol. Chem.* 237: 2311 – 2317.
- Klee C.B., Crouch T.H. & Krinks M.H. (1979)** Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 6270 – 6273.
- Klee C.B., Ren H. & Wang X. (1998)** Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J. Biol. Chem.* 273: 13367 – 13370.
- Klionsky D.J., Herman P.K. & Emr S.D. (1990)** The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 54: 266 – 292.
- Klumpp S., Selke D. & Hermesmeier J. (1998)** Protein phosphatase type 2C active at physiological Mg^{2+} : stimulation by unsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* 437: 229 – 232.
- Klumpp S., Thissen M.C. & Krieglstein J. (2006)** Protein phosphatases types 2C α and 2C β in apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* 34: 1370 – 1375.
- Kuromi H., Yoshihara M. & Kidokoro Y. (1997)** An inhibitory role of calcineurin in endocytosis of synaptic vesicles at nerve terminals of *Drosophila* larvae. *Neurosci. Res.* 27: 101 – 113.
- Lee S. & Montell C. (2001)** Regulation of the rhodopsin protein phosphatase, RDGC, through interaction with calmodulin. *Neuron* 32: 1097 – 1106.
- Li Y., Chen W., Liang Y., Li E. & Stashenko P. (1999)** Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. *Nat. Gen.* 23: 447 – 451.
- Litosch I., Wallis C. & Fain J.N. (1985)** 5-Hydroxytryptamine stimulates inositol phosphate production in a cell-free system from blowfly salivary glands. *J. Biol. Chem.* 260: 5464 – 5471.
- Liu J., Farmer J.D., Lane W.S., Friedman J., Weissman I. & Schreiber S.L. (1991)** Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66: 907 – 615.
- Lu M., Ammar D., Ives H., Albrecht F. & Gluck S. (2007)** Physical interaction between aldolase and vacuolar H^+ -ATPase is essential for the assembly and activity of the proton pump. *J. Biol. Chem.* 282: 24495 – 24503.
- Lu M., Holliday L.S., Zhang L., Dunn W.A. Jr. & Gluck S.L. (2001)** Interaction between aldolase and vacuolar H^+ -ATPase: evidence for direct coupling of glycolysis to the ATP-hydrolyzing proton pump. *J. Biol. Chem.* 276: 30407 – 30413.
- Lu M., Sautin Y.Y., Holliday L.S. & Gluck S.L. (2004)** The glycolytic enzyme aldolase mediates assembly, expression and activity of V-ATPase. *J. Biol. Chem.* 279: 8732 – 8739.
- MacKintosh C. & Klumpp S. (1990)** Tautomycin from the bacterium *Streptomyces verticillatus*: another potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A. *FEBS* 277: 137 – 140.
- Madrell S.H. & O'Donnell M.J. (1992)** Insect malpighian tubules: V-ATPase in ion and fluid transport. *J. Exp. Biol.* 172: 417 – 429.
- Mann D.J., Dombradi V. & Patricia T.W. Cohen P.T.W. (1993)** *Drosophila* protein phosphatase V functionally complements a SIT4 mutant in *Saccharomyces cerevisiae* and its amino-terminal region can confer this complementation to a heterologous phosphatase catalytic domain. *EMBO J.* 12: 4833 – 4842.

- Martínez C.G., Guinea R., Benavente J. & Carrasco L. (1996)** The entry of reovirus into L cells is dependent on vacuolar proton-ATPase activity. *J. Virol.* 70: 576 – 579.
- Meinkoth J.L., Ji Y., Taylor S.S. & Feramisco J.R. (1990)** Dynamics of the distribution of cyclic AMP-dependent protein kinase in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9595 – 9599.
- Mellman I. (1992)** The importance of being acid: the role of acidification in intracellular membrane trafficking. *J. Exp. Biol.* 172: 39 – 45.
- Mellman I., Fuchs R. & Helenius A. (1986)** Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 663 – 700.
- Merzendorfer H., Gräf R., Huss M., Harvey W.R. & Wieczorek H. (1997a)** Regulation of proton-translocating V-ATPase. *J. Exp. Biol.* 200: 225 – 235.
- Merzendorfer H., Harvey W.R. & Wieczorek H. (1997b)** Sense and antisense RNA for the membrane associated 40 kDa subunit M40 of the insect V-ATPase. *FEBS Lett.* 411: 239 – 244.
- Merzendorfer H., Huss M., Schmid R., Harvey W.R. & Wieczorek H. (1999)** A novel insect V-ATPase subunit M9.7 is glycosylated extensively. *J. Biol. Chem.* 274: 17372 – 17378.
- Merzendorfer H., Reineke S., Zhao X., Jacobmeier B., Harvey W.R. & Wieczorek H. (2000)** The multigene family of the tobacco hornworm V-ATPase: novel subunits a, C, D, H, and putative isoforms. *Biochim. Biophys. Acta* 25: 369 – 379.
- Meskiene I., Baudouin E., Schweighofer A., Liwosz A., Jonak C., Rodriguez P.L., Jelinek H. & Hirt H. (2003)** Stress-induced protein phosphatase 2C is a negative regulator of a mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 278: 18945 – 18952.
- Morandell S., Stasyk T., Grosstessner-Hain K., Roitinger E., Mechtler K., Bonn G.K. & Huber L.A. (2006)** Phosphoproteomics strategies for the functional analysis of signal transduction. *Proteomics* 6: 4047 – 4056.
- Moriyama Y., Maeda M. & Futai M. (1992)** The role of V-ATPase in neuronal and endocrine systems. *J. Exp. Biol.* 172: 171 – 178.
- Moriyama Y. & Nelson N. (1987)** Nucleotide binding sites and chemical modification of the chromaffin granule proton ATPase. *J. Biol. Chem.* 262: 14723 – 14729.
- Moriyama Y. & Nelson N. (1989)** Cold inactivation of vacuolar proton-ATPase. *J. Biol. Chem.* 265: 3577 – 3582.
- Morrison D.K., Murakami M.S. & Cleghon V. (2000)** Protein kinases and phosphatases in the *Drosophila* Genome. *J. Cell Biol.* 150: F57 – F62.
- Myers M. & Forgac M. (1993)** The coated vesicle vacuolar (H⁺)-ATPase associates with and is phosphorylated by the 50-kDa polypeptide of the clathrin assembly protein AP-2. *J. Biol. Chem.* 268: 9184 – 9186.
- Nanda A., Brumell J.H., Nordström T., Kjeldsen L., Sengeløv H., Borregaard N., Rotstein O.D. & Grinstein S. (1996)** Activation of proton pumping in human neutrophils occurs by exocytosis of vesicles bearing vacuolar-type H⁺-ATPases. *J. Biol. Chem.* 271: 15963 – 15970.
- Nelson N. (1989)** Structure, molecular genetics, and evolution of vacuolar H⁺-ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21: 553 – 571.

- Nelson D. & Cox M. (2001)** Lehninger Biochemie. *Springer-Verlag*, 3. Auflage.
- Nelson N. & Harvey W.R. (1999)** Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetri-phosphatases. *Physiol. Rev.* 79: 361 – 385.
- Nelson H., Mandiyan S., Noumi T., Moriyama Y., Miedel M.C. & Nelson N. (1990)** Molecular cloning of cDNA encoding the C subunit of H⁺-ATPase from bovine chromaffin granules. *J. Biol. Chem.* 265: 20390 – 20393.
- O'Donnell M.J., Dow J.A.T., Huesmann G.R., Tublitz N.J. & Maddrell S.H.P. (1996)** Separate control of anion and cation transport in Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 199: 1163 – 1175.
- Oluwatosin Y.E. & Kane P.M. (1997)** Mutations in the *CYS4* gene provide evidence for regulation of the yeast vacuolar H⁺-ATPase by oxidation and reduction in vivo. *J. Biol. Chem.* 272: 28149 – 28157.
- Onken H., Schöbel A., Kraft J. & Putzenlechner M. (2000)** Active NaCl absorption across split lamellae of posterior gills of the Chinese crab *Eriocheir senensis*: stimulation by eyestalk extract. *J. Exp. Biol.* 203: 1373 – 1381.
- Oschman J.L. & Berridge M.J. (1970)** Structural and functional aspects of salivary fluid secretion in *Calliphora*. *Tissue and Cell* 2: 281 – 310.
- Parra K.J., Keenan K.L. & Kane P.M. (2000)** The H subunit (Vma13p) of the yeast V-ATPase inhibits the ATPase activity of cytosolic V₁ complexes. *J. Biol. Chem.* 275: 21761 – 21767.
- Parsons S.M. (2000)** Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. *FASEB J.* 14: 2423 – 2434.
- Pastor-Soler N.M., Beaulieu V., Litvin T.N., Da Silva N., Chen Y., Brown D., Buck J., Levin L.R. & Breton S. (2003)** Bicarbonate-regulated adenylyl cyclase (sAC) is a sensor that regulates pH-dependent V-ATPase recycling. *J. Biol. Chem.* 278: 49523 – 49529.
- Pastor-Soler N.M., Hallows K.R., Smolak C., Gong F., Brown D. & Breton S. (2007)** Alkaline pH- and cAMP-induced V-ATPase membrane accumulation is mediated by protein kinase A in epididymal clear cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 294: C488 – C494.
- Pedersen P.A. & Carafoli E. (1987)** Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties and significance to cell function. *Trends. Biochem. Sci.* 12: 146 – 150.
- Pérez L. & Carrasco L. (1994)** Involvement of the vacuolar H⁺-ATPase in animal virus entry. *J. Gen. Virol.* 75: 2595 – 2606.
- Prchla E., Kuechler E., Blaas D. & Fuchs R. (1994)** Uncoating of human rhinovirus serotype 2 from late endosomes. *J. Virol.* 68: 3713-3723.
- Prince W.T., Berridge M.J. & Rasmussen H. (1972)** Role of calcium and adenosine-3':5'-cyclic monophosphate in controlling fly salivary gland secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 553 – 557.
- Ratajczak R. (2000)** Structure, function and regulation of the plant vacuolar H(+)-translocating ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 17 – 36.
- Raufman J., Lin J. & Raffaniello R.D. (1996)** Calcineurin mediates calcium-induced potentiation of adenylyl cyclase activity in dispersed chief cells from Guinea pig stomach. *J. Biol. Chem.* 271: 19877 – 19882.

- Rein J., Voss M., Blenau W., Walz B. & Baumann O. (2008)** Hormone-induced assembly and activation of V-ATPase in blowfly salivary glands is mediated by protein kinase A. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 294: C56 – C65.
- Rein J., Zimmermann B., Hille C., Lang I., Walz B. & Baumann O. (2006)** Fluorescence measurements of serotonin-induced V-ATPase-dependent pH changes at the luminal surface in salivary glands of the blowfly *Calliphora vicina*. *J. Exp. Biol.* 209: 1716 – 1724.
- Reineke S., Wiczorek H. & Merzendorfer H. (2002)** Expression of *Manduca sexta* V-ATPase genes mvB, mvG and mvd is regulated by ecdysteroids. *J. Exp. Biol.* 205: 1059 – 1067.
- Rodriguez P.L. (1998)** Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. *Plant Mol. Biol.* 38: 919 – 927.
- Rogers P., Beuscher A.E., Flajolet M., McAvoy T., Nairn A.C., Olsen A.J. & Greengard P. (2006)** Discovery of protein phosphatase 2C inhibitors by virtual screening. *J. Med. Chem.* 49: 1658 – 1667.
- Rojas J.D., Sennoune S.R., Maiti D., Bakunts K., Reuveni M., Sanka S.C., Martínez G.M., Seftor E.A., Meininger C.J., Wu G., Wesson D.E., Hendrix M.J. & Martínez-Zaguilán R. (2006)** Vacuolar-type H⁺-ATPases at the plasma membrane regulate pH and cell migration in microvascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291: H1147 – H1157.
- Romani A. & Scarpa A. (1992)** Regulation of cell magnesium. *Arch. Biochem. Biophys.* 298: 1 – 12.
- Roussa E., Thévenod F., Sabolic I., Herak-Kramberger C.M., Nastainczyk W., Bock R. & Schulz I. (1998)** Immunolocalization of vacuolar-type H⁺-ATPase in rat submandibular gland and adaptive changes induced by acid-base disturbances. *J. Histochem. Cytochem.* 46: 91 – 100.
- Rubin C.S. & Rosen O.M. (1975)** Protein phosphorylation. *Ann. Rev. Biochem.* 44: 831 – 887.
- Rusnak F. & Mertz P. (2000)** Calcineurin: form and function. *Physiol. Rev.* 80: 1483 – 1521.
- Sandberg M., Butt E., Nolte C., Fischer L., Halbrügge M., Beltman J., Jahnsen T., Genieser H., Jastorff B. & Walter U. (1991)** Characterization of Sp-5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole-3',5'-monophosphorothioate (Sp-5,6-DCI-cBIMPS) as a potent and specific activator of cyclic-AMP-dependent protein kinase in cell extracts and intact cells. *Biochem. J.* 279: 521 – 527.
- Sastri M., Barraclough D.M., Carmichael P.T. & Taylor S.S. (2005)** A-kinase-interacting protein localizes protein kinase A in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 349 – 354.
- Sautin Y.Y., Lu M., Gaugler A., Zhang L. & Gluck S.L. (2005)** Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated effects of glucose on vacuolar H⁺-ATPase assembly, translocation, and acidification of intracellular compartments in renal epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 25: 575 – 589.
- Schmidt R. (2006)** Signalwege und Steuermechanismen in den Speicheldrüsen von Dipteren. Dissertation, Universität Potsdam.
- Schoonderwoert V.T., Holthuis J.C., Tanaka S., Tooze S.A. & Martens G.J. (2000)** Inhibition of the vacuolar H⁺-ATPase perturbs the transport, sorting, processing and release of regulated secretory proteins. *Eur. J. Biochem.* 267: 5646 – 5654.
- Sennoune S.R., Bakunts K., Martínez G.M., Chua-Tuan J.L., Kebir Y., Attaya M.N. & Martínez-Zaguilán R. (2004)** Vacuolar H⁺-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. *Am. J. Physiol.* 268: C1443 – C1452.

- Seol J.H., Shevchenko A. & Deshaies R.J. (2001)** Skp1 forms multiple protein complexes, including RAVE, a regulator of V-ATPase assembly. *Nat. Cell Biol.* 3: 384 – 391.
- Shacter E., Chock P.B. & Stadtman E.R. (1984)** Regulation through phosphorylation/dephosphorylation cascade systems. *J. Biol. Chem.* 259: 12252 – 12259.
- Shao E. & Forgac M. (2004)** Involvement of the nonhomologous region of subunit A of the yeast V-ATPase in coupling and in vivo dissociation. *J. Biol. Chem.* 279: 48663 – 48670.
- Shao E., Nishi T., Kawasaki-Nishi S. & Forgac M. (2003)** Mutational analysis of the non-homologous region of subunit A of the yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* 278: 12985 – 12991.
- Sheppeck J.E., Gauss C. & Chamberlin A.R. (1997)** Inhibition of the Ser-Thr phosphatases PP1 and PP2A by naturally occurring toxins. *Bioorg. Med. Chem.* 5: 1739 – 1750.
- Skoulakis E.M.C., Kalderon D. & Davis R.L. (1993)** Preferential expression in mushroom bodies of the catalytic subunit of protein kinase A and its role in learning and memory. *Neuron* 11: 197 – 208.
- Smardon A.M., Tarsio M. & Kane P.M. (2002)** The RAVE complex is essential for stable assembly of the yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* 277: 13831 – 13839.
- Smith A.N., Lovering R.C., Futai M., Takeda J., Brown D. & Karet F.E. (2003)** Revised nomenclature for mammalian vacuolar-type H⁺-ATPase subunit genes. *Mol. Cell* 12: 801 – 803.
- Smith A.N., Skaug J., Choate K.A., Nayir A., Bakkaloglu A., Ozen S., Hulton S.A., Sanjad S.A., Al-Sabban E.A., Lifton R.P., Scherer S.W. & Karet F.E. (2000)** Mutations in ATP6N1B, encoding a new kidney vacuolar proton pump 116-kD subunit, cause recessive distal renal tubular acidosis with preserved hearing. *Nat. Gen.* 26: 71 – 75.
- Steele F.R., Washburn T., Rieger R. & O'Tousa J.E. (1992)** *Drosophila* retinal degeneration C (*rdgC*) encodes a novel Serine/Threonine protein phosphatase. *Cell* 69: 669 – 676.
- Stern A., Privman E., Rasis M., Lavi S. & Pupko T. (2007)** Evolution of the metazoan protein phosphatase 2C superfamily. *J. Mol. Evol.* 64: 61 – 70.
- Su Y., Zhou A., Al-Lamki R.S. & Karet F.E. (2003)** The α -subunit of the V-type H⁺-ATPase interacts with phosphofructokinase-1 in humans. *J. Biol. Chem.* 278: 20013 – 20018.
- Sumner J.P., Dow J.A.T., Earley F.G., Klein U., Jäger D., Wiczorek H. (1995)** Regulation of plasma membrane V-ATPase activity by dissociation of peripheral subunits. *J. Biol. Chem.* 270: 5649 – 5653.
- Sun-Wada G., Murata Y., Namba M., Yamamoto A., Wada Y. & Futai M. (2003b)** Mouse proton pump ATPase C subunit isoforms (C2-a and C2-b) specifically expressed in kidney and lung. *J. Biol. Chem.* 278: 44843 – 44851.
- Sun-Wada G., Yoshimizu T., Imai-Senga Y., Wada Y. & Futai M. (2003a)** Diversity of mouse proton-translocating ATPase: presence of multiple isoforms of the C, d and G subunits. *Gene* 302: 147 – 153.
- Swallow C.J., Grinstein S. & Rotstein O.D. (1990)** A vacuolar type H(+)-ATPase regulates cytoplasmic pH in murine macrophages. *J. Biol. Chem.* 265: 7645 – 7654.
- Tachibana S. & Numata N. (2001)** An artificial diet for blow fly larvae, *Lucilia sericata*. *Appl. Entomol. Zool.* 36: 521 – 523.

- Taiz L. (1992)** The plant vacuole. *J. Exp. Biol.* 172: 113 – 122.
- Taiz L., Nelson H., Maggert K., Morgan L., Yatabe B., Taiz S.L., Rubinstein B. & Nelson N. (1994)** Functional analysis of conserved cysteine residues in the catalytic subunit of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1194: 329 – 334.
- Tamura S., Toriumi S., Saito J., Awano K., Kudo T. & Kobayashi T. (2006)** PP2C family members play key roles in regulation of cell survival and apoptosis. *Cancer Sci.* 97: 563 – 567.
- Taskén K. & Aandahl E.M. (2004)** Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol. Rev.* 84: 137 – 167.
- Taylor S.S., Buechler J.A. & Yonemoto W. (1990)** cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 971 – 1005.
- Tomashek J.J. & Brusilow W.S.A. (2000)** Stoichiometry of energy coupling by proton-translocating ATPases: a history of variability. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32: 493 – 500.
- Trombetta E.S., Ebersold M., Garrett W., Pypaert M. & Mellman I. (2003)** Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* 299: 1400 – 1403.
- Vitavska O. (2005)** Wechselwirkungen der V-ATPase von *Manduca sexta* mit dem Aktin-Zytoskelett. Dissertation, Universität Osnabrück.
- Vitavska O., Merzendorfer H. & Wiczorek H. (2005)** The V-ATPase subunit C binds to polymeric F-actin as well as to monomeric G-actin and induces cross-linking of actin filaments. *J. Biol. Chem.* 280: 1070 – 1076.
- Vitavska O., Wiczorek H. & Merzendorfer H. (2003)** A novel role for subunit C in mediating binding of the H⁺-V-ATPase to the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 278: 18499 – 18505.
- Voss M. (2006)** Untersuchungen zu den Eigenschaften der Untereinheit C der vakuolären H⁺-ATPase in Speicheldrüsen von *Calliphora vicina*. Diplomarbeit, Universität Potsdam.
- Voss M., Vitavska O., Walz B., Wiczorek H. & Baumann O. (2007)** Stimulus-induced phosphorylation of vacuolar H⁺-ATPase by protein kinase A. *J. Biol. Chem.* 282: 33735 – 33742.
- Wagner C.A., Finberg K.E., Breton S., Marshansky V., Brown D. & Geibel J.P. (2004)** Renal vacuolar H⁺-ATPase. *Physiol. Rev.* 84: 1263 – 1314.
- Wang S., Krits I., Bai S. & Lee B.S. (2002)** Regulation of Enhanced Vacuolar H⁺-ATPase Expression in Macrophages. *J. Biol. Chem.* 277: 8827 – 8834.
- Wang Y. & Sze H. (1985)** Similarities and differences between the tonoplast-type and the mitochondrial H⁺-ATPases of oat roots. *J. Biol. Chem.* 260: 10434 – 10443.
- Ward J.M., Reinders A., Hsu H. & Sze H. (1992)** Dissociation and reassembly of the vacuolar H⁺-ATPase complex from oat roots. *Plant Physiol.* 99: 161 – 169.
- Wassmer T., Sehring I.M., Kissmehl R. & Plattner H. (2007)** The V-ATPase in *Paramecium*: functional specialization by multiple gene isoforms. *Pflugers Arch.*
- Wiczorek H., Brown D., Grinstein S., Ehrenfeld J., Harvey W.R. (1999)** Animal plasma membrane energization by proton-motive V-ATPases. *BioEssays* 21: 637 – 648.

- Wieczorek H., Grüber G., Harvey W.R., Huss M., Merzendorfer H. & Zeiske W. (2000)** Structure and regulation of insect plasma membrane H⁺ V-ATPase. *J. Exp. Biol.* 203: 127 – 135.
- Wieczorek H., Putzenlechner M., Zeiske W. & Klein U. (1991)** A vacuolar-type proton pump energizes K⁺/H⁺ antiport in an animal plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 266: 15340 – 15347.
- Wilkens S., Inoue T. & Forgac M. (2004)** Three-dimensional structure of the vacuolar ATPase. *J. Biol. Chem.* 279: 41942 – 41949.
- Wolf F.I. & Trapani V. (2008)** Cell (patho)physiology of magnesium. *Clin. Sci.* 114: 27 – 35.
- Xu J., Cheng T., Feng H.T., Pavlos N.J. & Zheng M.H. (2007)** Structure and function of V-ATPases in osteoclasts: potential therapeutic targets for the treatment of osteolysis. *Histol. Histopathol.* 22: 443 – 454.
- Xu T. & Forgac M. (2001)** Microtubules are involved in glucose-dependent dissociation of the yeast vacuolar [H⁺]-ATPase in vivo. *J. Biol. Chem.* 276: 24855 – 24861.
- Yamanishi H. & Kasamo K. (1992)** Binding of 7-Chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole to an essential cysteine residue(s) in the tonoplast H⁺-ATPase from mung bean (*Vigna radiate* L.) Hypocotyls. *Plant Physiol.* 99: 652 – 658.
- Yokoyama K., Nakano M., Imamura H., Yoshida M. & Tamakoshi M. (2003)** Rotation of the proteolipid ring in the V-ATPase. *J. Biol. Chem.* 278: 24255 – 24258.
- Zhang Z., Inoue T., Gorgac M. & Wilkens S. (2006)** Localization of subunit C (Vma5p) in the yeast vacuolar ATPase by immuno electron microscopy. *FEBS Lett.* 580: 2006 – 2010.
- Zhang J., Myerst M. & Forgac M. (1992)** Characterization of the V₀ domain of the coated vesicle (H⁺)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 267: 9773 – 9778.
- Zhang K., Wang Z. & Gluck S. (1992a)** Identification and partial purification of a cytosolic activator of vacuolar H⁺-ATPases from mammalian kidney. *J. Biol. Chem.* 267: 9701 – 9705.
- Zhang K., Wang Z. & Gluck S. (1992b)** A cytosolic inhibitor of vacuolar H⁺-ATPases from mammalian kidney. *J. Biol. Chem.* 267: 14539 – 14542.
- Zimmermann B. (2000)** Subcellular organization of agonist-evoked Ca²⁺ waves in the blowfly salivary gland. *Cell Calcium* 27: 297 – 307.
- Zimmermann B., Dames P., Walz B. & Baumann O. (2003)** Distribution and serotonin-induced activation of vacuolar-type H⁺-ATPase in the salivary glands of the blowfly *Calliphora vicina*. *J. Exp. Biol.* 206: 1867 – 1876.
- Zimmermann B. & Walz B. (1997)** Serotonin-induced intercellular calcium waves in salivary glands of the blowfly *Calliphora erythrocephala*. *J. Physiol.* 500: 17 – 28.
- Zolnierowicz S. (2000)** Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochem. Pharmacol.* 60: 1225 – 1235.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
8-CPT-cAMP	8-(4-Chlorphenylthio)-zyklisches Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
AM	Acetoxymethylester
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethan- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> (Rinder-Serumalbumin)
bp	Basenpaar
C	Vernetzungsgrad
cAMP	zyklisches 3', 5'-Adenosinmonophosphat
cBIMPS	5, 6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol- 3', 5'- zyklisches Monophosphorothioat, Sp-Isomer
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
Cy3	Indocarbocyanin
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTSP	Dithio-bis-succimidylpropionat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i> (Verstärkte Chemilumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
GDP	Guanindiphosphat
G-Protein	Guanin-Nukleotid-bindendes Protein
H-89	N[2((p-Bromocinamyl)amino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide
HAF	5-N-Hexadecanoyl-Aminofluorescein
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Merrettich-Peroxidase)
IEF	Isoelektrische Fokussierung

IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
IPTG	Isopropyl-Thio-D-Galaktopyranosid
LB	<i>lysogeny broth</i> (Lysogenie-Brühe)
n.A.	Numerische Appertur
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>Normal goat serum</i> (Normales Ziegenserum)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
psi	<i>pound per square inch</i> (≈ 69 mbar)
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
T	Totalacrylamidkonzentration
TAE	<i>TRIS – Acetic acid – EDTA</i> (TRIS-Essigsäure-EDTA)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i> (Trichloressigsäure)
TE	TRIS – EDTA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRIS-HCl	TRIS-Hydrochlorid
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Triton X-100	Octoxinol-9
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	Units (1 U = 1 μ mol/min)
UE	Untereinheit
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

7.2 Immuncytochemie mit passender Farbgebung für Dyschromatopsie

Abbildung 4.1

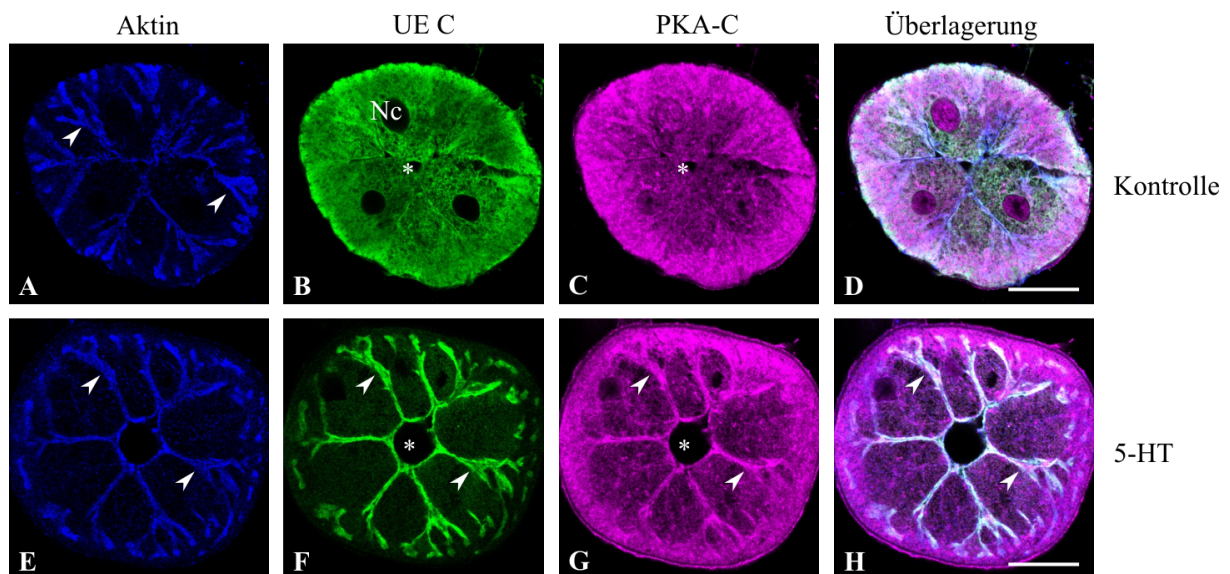


Abbildung 4.1: Verteilung der V-ATPase-Untereinheit C (UE C) und der katalytischen Untereinheit der PKA (PKA-C) in *Calliphora*-Speicheldrüsen. Dargestellt sind konfokalmikroskopische Aufnahmen von Drüsen-Querschnitten, die immuncytochemisch markiert wurden. Es wurden Antikörper gegen Aktin (blau, A/E), die Untereinheit C (grün, B/F) und die katalytische Untereinheit der PKA (PKA-C, rot, C/G) verwendet. Die Aktin-Markierung verdeutlicht die Lage der Apikalmembran (A/E). In den Kontrollen sind die Untereinheit C und die PKA-C im gesamten Cytoplasma verteilt (B/C/D), die Stimulierung mit 30 nM 5-HT für 5 min führt zu einer Umverteilung dieser Proteine zur Apikalmembran (F/G/H). Gekennzeichnet sind ein Zellkern (Nc), das Drüsenlumen (Sternchen) und die Canaliculi (Pfeilspitzen). Balken: 20 µm.

Abbildung 4.27

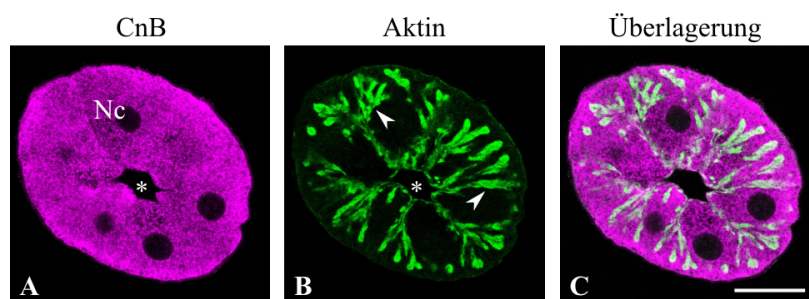


Abbildung 4.27: Verteilung der Proteinphosphatase 2B in den *Calliphora*-Speicheldrüsen.

Dargestellt sind konfokalmikroskopische Aufnahmen von Drüsen-Querschnitten, die immuncytochemisch mit Antikörpern gegen die PP2B-Untereinheit β (PP2B- β , rot, A) und Aktin (blau, B) markiert wurden. Die Markierung der Untereinheit β ist gleichmäßig im gesamten Cytoplasma verteilt. Die Aktin-Markierung verdeutlicht die Lage der Apikalmembran. Gekennzeichnet sind ein Zellkern (Nc), das Drüsenlumen (Sternchen) und die Canaliculi (Pfeilspitzen). Balken: 20 µm.

7.3 Erstellung der degenerierten *Primer*

Abbildung 7.1: Entwurf der degenerierten *Primer* für die PCR zum Nachweis der Proteinphosphatase 2C. Dargestellt ist ein multipler Aminosäuresequenzenvergleich der Proteinphosphatasen **CG12169**, **CG17746**, **CG6036**, **CG1906** und **CG10417** aus *Drosophila melanogaster* sowie der entsprechenden Proteine (falls vorhanden) in den Organismen *Drosophila pseudoobscura* (D.p.), *Aedes aegypti* (A.a.), *Apis mellifera* (A.m.), *Anopheles gambiae* (A.g.) und *Tribolium castaneum* (T.c.). Schwarz hinterlegte Reste sind in mindestens 50% der verglichenen Sequenzen identisch. Grau hinterlegte Reste sind konservativ ausgetauscht. Eingefügte Lücken (-) dienen der Optimierung des Vergleichs. Die mit **F1**, **F2**, **R1** und **R2** gekennzeichneten Abschnitte sind Bereiche, für die Nukleotidsequenzen für degenerierte *Primer* erstellt wurden. In den Tabellen 8.1 und 8.2 sind die *Primer*-Sequenzen beziehungsweise *Primer*-Kombinationen zusammengefasst.

		10		20		30		40		50		
							F1 ⇒				
D.m.	CG12169	1	----	MGQTLSEPVTTTKDTACCANASYRVGSSCMQGWVRVDMEDAH	THILSL	46						
D.p.		1	----	MGQTLSEPVTAKESSYQNSVFRVGGSSCMQGWRI	NMEDSH	46						
A.a.		1	----	MGQTLSEPEPETSKEAFAFCNDYKVGSSCMQGWRI	HMEDSH	46						
T.c.		1	----	MGQTLSEPVTAKN	TACCONANFQVGGSSCMQGWRI	NMEDSH	46					
A.m.		1	----	MGQTLSEPVTAKNLACCRNSNYRVGSSCMQGWRI	KMEDCH	46						
A.g.		1	----	MGQSLSEPEPETSQSAFCNDYKVGSSCMQGWR	MHMEDSH	46						
D.m.	CG17746	1	----	MGQTLSEPVTAKE	SAYCQNAAYRVGSSCMQGWRI	NMEDSH	46					
D.p.		1	----	MGQTLSEPVTAKESSYQNSVFRVGGSSCMQGWRI	NMEDSH	46						
A.a.		1	----	MGQTLSEPEPETSKEAFAFCNDYKVGSSCMQGWRI	HMEDSH	46						
A.g.		1	----	MGQSLSEPEPETSQSAFCNDYKVGSSCMQGWR	MHMEDSH	46						
A.m.		1	----	MGQTLSEPVTAKNLACCRNSNYRVGSSCMQGWRI	KMEDCH	46						
T.c.		1	----	MGQTLSEPVTAKN	TACCONANFQVGGSSCMQGWRI	NMEDSH	46					
D.m.	CG6036	1	MGHKMGGFLEKPE	TEKQAQEGHGNGLRYCVSSMQGWRL	EMEDSH	50						
D.p.		1	----	MGGFLDKPKTAKHNDHGE	GNKLLFGVSSMQGWR	CEMEDAY	46					
T.c.		1	----	MGAFLDKPKTDKFQECGEGNGLRYGVA	SMQGW	RVEMEDAH	46					
D.m.	CG1906	1	----	MGGFLDKPKTAKHNDHGE	GNKLLFGVSSMQGWR	SEMEDAY	46					
D.p.		1	----	MGGFLDKPKTAKHNDHGE	GNKLLFGVSSMQGWR	CEMEDAY	46					
A.a.		1	----	MGAFLDKPKTAKHNEHGE	GNLRYGVSMQGWR	CEMEDAH	46					
A.g.		1	-PRTMGAFLDKPKTAKHNEHGE	GNLRYGVSMQGWR	CEMEDAH	46						
T.c.		1	----	MGAFLDKPKTDKFQECGEGNGLRYGVA	SMQGW	RVEMEDAH	46					
D.m.	CG10417	1	----	MGAYLSHPKTDKTDQFNELLAVGASSMQGWR	NSQEDAH	46						
A.g.		1	----	MGAYLSEPLTTKDSDESNEFLASGSSMQGWR	ISQEDAH	46						
A.m.		1	----	MGAYLSEPIITKKVSSDEVGKNVAFGASSMQGWR	ISQEDAH	46						
A.a.		1	----	-----	-----	1						
T.c.		1	----	MGSYLSEPA	TEKESTDDTNGKLT	YGASSMQGWR	MTQEDAH	46				
				F1 ⇒								
		60		70		80		90		100		
											
D.m.	CG12169	47	PDDP-QAAFFAVYDGHGGASVAKYAGKHLH	KFFITKRPEY	RDNSIE	VALKK	95					
D.p.		47	PDDP-GAAFFAVYDGHGGATVAQYAGKHLH	KFFVTKRPEY	NDNDIER	ALQQ	95					
A.a.		47	PDDP-GTAFFAVYDGHGGANIAQYAGKHLH	KFFVTKRPEY	GED-VKQ	ALQR	94					
T.c.		47	PDDP-EAAFFAVYDGHGGSKI	SEYAGKHLH	KFFITNREY	KNGQIEEGLKQ	95					
A.m.		47	PDDP-GTAFFAVYDGHGGAAMAQYAGKHLH	HEYITKRSEY	KAGNI	IQAIQQ	95					
A.g.		47	PDDP-GTSFFAVYDGHGGAQVAEYAGKHLH	KYVTRRPEY	GND-VKH	ALQQ	94					
D.m.	CG17746	47	PDDP-GAAFFAVYDGHGGATVAQYAGKHLH	KYVTKRPEY	NDN-IE	QALQQ	94					
D.p.		47	PDDP-GAAFFAVYDGHGGATVAQYAGKHLH	KFFVTKRPEY	NDNDIER	ALQQ	95					
A.a.		47	PDDP-GTAFFAVYDGHGGANIAQYAGKHLH	KFFVTKRPEY	GED-VKQ	ALQR	94					
A.g.		47	PDDP-GTSFFAVYDGHGGAQVAEYAGKHLH	KYVTRRPEY	GND-VKH	ALQQ	94					
A.m.		47	PDDP-GTAFFAVYDGHGGAAMAQYAGKHLH	HEYITKRSEY	KAGNI	IQAIQQ	95					
T.c.		47	PDDP-EAAFFAVYDGHGGSKI	SEYAGKHLH	KFFITNREY	KNGQIEEGLKQ	95					
D.m.	CG6036	51	KDPFATWSYFAVFDGHAGSQISLHCAEHL	MSTILESES	SFSKH	YEAGIRE	100					
D.p.		47	DNALNDWSFFAVFDGHAGCKVSEHCAKHL	LDSIVHTDE	FISGDH	VKGIRT	96					
T.c.		47	GDALKDWSYFAVFDGHAGAKVSAHCAEHL	LDAIMQTE	EFOK-DVM	KGIHN	95					
D.m.	CG1906	47	GDALPDWSFFAVFDGHAGCKVSEHCAKHL	LESTIISTEE	FIGGDH	VKGIRT	96					
D.p.		47	DNALNDWSFFAVFDGHAGCKVSEHCAKHL	LDSIVHTDE	FISGDH	VKGIRT	96					
A.a.		47	GEGLDDWNYFAVFDGHAGHKVADHCAK	NLLQSI	IVRTQEE	SNNDIT	96					

A.g.	50	GDSLDDWNYFAVFDGHAGDNVAKHCAANLLQRTIITTTTEFGNNDITKGIHT	99
T.c.	47	GDALKDWSYFAVFDGHAGAKVSAHCAEHLIDATMQTEEFQK-DVMKGIHN	95
D.m. CG10417	47	DNN---TSFFAVYDGHGGAEVAQYCADKLPHFLLKNLETYKNGQFEVALKE	93
A.g.	47	DDQ---CSFFAVYDGHGGAEVAQYCSLHLPTFLKTVEAYGRKEFEKALKE	93
A.m.	47	DEN---VSLFAVYDGHGGHEVATYCANLPDFTKQTDAYKKGDIRQALID	93
A.a.	1	-----	1
T.c.	47	DED---TSFFAVYDGHGGQEVAAQYCSDKLPDFTKNTPEYKEGNIEEALVS	93
		110 120 130 140 150	
		
D.m. CG12169	96	AFLDFDREMLQN-----	107
D.p.	96	GFLDIDYEMLHN-----	107
A.a.	95	GFLDIDEAMLND-----	106
T.c.	96	AFLEIDRVMLLED-----	107
A.m.	96	GFELEDRAMQND-----	107
A.g.	95	GFLDLDEAMLNN-----	106
D.m. CG17746	95	GFLDIDYVMLRN-----	106
D.p.	96	GFLDIDYEMLHN-----	107
A.a.	95	GFLDIDEAMLND-----	106
A.g.	95	GFLDLDEAMLNN-----	106
A.m.	96	GFELEDRAMQND-----	107
T.c.	96	AFLEIDRVMLLED-----	107
D.m. CG6036	101	GFLQLDEDMRKL-----	112
D.p.	97	GFLRIDEVMRDLP-----	109
T.c.	96	GFELEDNKMRSPL-----	108
D.m. CG1906	97	GFLRIDEVMRELP-----	109
D.p.	97	GFLRIDEVMRDLP-----	109
A.a.	97	GFLKIDETMRDIP-----	109
A.g.	100	GFLQLDESMRAIP-----	112
T.c.	96	GFELEDNKMRSPL-----	108
D.m. CG10417	94	AFLGFDKTLLDPSIVSILKILAG---EHNFDVAEADDYEEEDLAEIQEE	139
A.g.	94	AFLGFDATLLQEKVIEELKVLSDKTNGEDEADEEVEEEEDDNDVEDLCKE	143
A.m.	94	AFLGFDATLEKSEVVVSILKELAG-TSTSDKKKEELNESDEEENVNLCME	142
A.a.	1	-----	1
T.c.	94	GFLRFDALIIATPEVVEELRKIAD-----DKDENESDEEENVNNLVYEE	135
		160 170 180 190 200	
		
D.m. CG12169	107	-----	107
D.p.	107	-----	107
A.a.	106	-----	106
T.c.	107	-----	107
A.m.	107	-----	107
A.g.	106	-----	106
D.m. CG17746	106	-----	106
D.p.	107	-----	107
A.a.	106	-----	106
A.g.	106	-----	106
A.m.	107	-----	107
T.c.	107	-----	107
D.m. CG6036	112	-----	112
D.p.	109	-----	109
T.c.	108	-----	108
D.m. CG1906	109	-----	109
D.p.	109	-----	109
A.a.	109	-----	109
A.g.	112	-----	112
T.c.	108	-----	108
D.m. CG10417	140	SNLPLNEVLEKYKGLPQK---KDLDLKSSDHKENFKMRSPPYFRGRRAAAL	186
A.g.	144	AVMPLNEVLQKYRKDTKPGAEKNQRVAAIKEGSCSKPVSPYLKGRRAAA	193
A.m.	143	ATMPLEEVI AKYQSESNP----NVKNEKCNKRVC--ASPYLRRRGKEK	186
A.a.	1	-----	1
T.c.	136	AAMPIEQVIEKYTS-----NLSNPAVKS-LKRDIKSPFLTAKTDSDP	176

		210	220	230	240	250	
						
D.m.	CG12169	107	-----				107
D.p.		107	-----				107
A.a.		106	-----				106
T.c.		107	-----				107
A.m.		107	-----				107
A.g.		106	-----				106
D.m.	CG17746	106	-----				106
D.p.		107	-----				107
A.a.		106	-----				106
A.g.		106	-----				106
A.m.		107	-----				107
T.c.		107	-----				107
D.m.	CG6036	112	-----				112
D.p.		109	-----				109
T.c.		108	-----				108
D.m.	CG1906	109	-----				109
D.p.		109	-----				109
A.a.		109	-----				109
A.g.		112	-----				112
T.c.		108	-----				108
D.m.	CG10417	187	AAEATNKAVMDPSAKPDGSSTSAAAAAAAAALSADGVANSRNPNSVVN----				232
A.g.		194	SAVERVKEATPQPEPSSSSSSSSSAGKVSPGKSEPVADGGEVAAAAGSKKAE				243
A.m.		186	-----ASSSSSGAGCSSSSSSSWNTNETDVSSS-----				213
A.a.		1	-----				1
T.c.		176	-----TVGTSSAGSCSSSTS-----				191

		260	270	280	290	300	
						
D.m.	CG12169	107	-----				107
D.p.		107	-----				107
A.a.		106	-----				106
T.c.		107	-----				107
A.m.		107	-----				107
A.g.		106	-----				106
D.m.	CG17746	106	-----				106
D.p.		107	-----				107
A.a.		106	-----				106
A.g.		106	-----				106
A.m.		107	-----				107
T.c.		107	-----				107
D.m.	CG6036	112	-----				112
D.p.		109	-----				109
T.c.		108	-----				108
D.m.	CG1906	109	-----				109
D.p.		109	-----				109
A.a.		109	-----				109
A.g.		112	-----				112
T.c.		108	-----				108
D.m.	CG10417	233	PMAGADSNTTTSINDLSTKNAALKDDSVNDQNEGSNGTDFKHTLVSSSNK				282
A.g.		244	QSDEISDTAGNVAAGKSTDAEAPGKDNCAPDSSSSDGSKQQASKLNGDLG				293
A.m.		213	-SQPCGSTLSSTMERKESECPGNNEAEQVLDSTTSNGNAHASTPVG-STA				261
A.a.		1	-----				1
T.c.		191	--QGGDGVSSSEAGLKDELPPQNGEIAPSDSEAQAKSDVTSSSTPVENG				239

		310	320	330	340	350	
						
D.m.	CG12169	107	-----				107
D.p.		107	-----				107
A.a.		106	-----				106
T.c.		107	-----				107
A.m.		107	-----				107

A.g.	106	-----	106
D.m. CG17746	106	-----	106
D.p.	107	-----	107
A.a.	106	-----	106
A.g.	106	-----	106
A.m.	107	-----	107
T.c.	107	-----	107
D.m. CG6036	112	-----	112
D.p.	109	-----	109
T.c.	108	-----	108
D.m. CG1906	109	-----	109
D.p.	109	-----	109
A.a.	109	-----	109
A.g.	112	-----	112
T.c.	108	-----	108
D.m. CG10417	283	KL FATGSNDMTELNQSSKNEFTNSSTSKEFERNINSSQDDEFTDDDADYE	332
A.g.	294	KVGSSGAVSSSSSAKPSPKNGPPPADVSMDDTDDDDDDDES DSDEEF	343
A.m.	262	DVETTKSADMPDSSSEDVNKEVTPGKITSIESNANEVEINGAESKQIGDA	311
A.a.	1	-----	1
T.c.	240	TPSKKGK GKAVIKPEPVKTPNTNRPKRTAQQLYKNWLNCGEEESDS SDEE	289

		360	370	380	390	400	
						
D.m. CG12169	107	-----	G	-----	-----	-----	108
D.p.	107	-----	E	-----	-----	-----	108
A.a.	106	-----	E	-----	-----	-----	107
T.c.	107	-----	E	-----	-----	-----	108
A.m.	107	-----	A	-----	-----	-----	108
A.g.	106	-----	E	-----	-----	-----	107
D.m. CG17746	106	-----	K	-----	-----	-----	107
D.p.	107	-----	E	-----	-----	-----	108
A.a.	106	-----	E	-----	-----	-----	107
A.g.	106	-----	E	-----	-----	-----	107
A.m.	107	-----	A	-----	-----	-----	108
T.c.	107	-----	E	-----	-----	-----	108
D.m. CG6036	112	-----	-----	-----	-----	-----	112
D.p.	109	-----	-----	-----	-----	-----	109
T.c.	108	-----	-----	-----	-----	-----	108
D.m. CG1906	109	-----	-----	-----	-----	-----	109
D.p.	109	-----	-----	-----	-----	-----	109
A.a.	109	-----	-----	-----	-----	-----	109
A.g.	112	-----	-----	-----	-----	-----	112
T.c.	108	-----	-----	-----	-----	-----	108
D.m. CG10417	333	ENDNVKSPDTSSAESSDCT---ENDDDGDEDEGNEDSDEEETDDEDQMAND					378
A.g.	344	PHAEPPADDTSSSTDEGEED---AEEGSAEEEEEEEPDEYADMGEYINEEDA					390
A.m.	312	DSSKGGDNVSSKIDIDEDE---SDE---DEDEEDEDGDGNIDDDDDDDDS					355
A.a.	1	-----	-----	-----	-----	-----	1
T.c.	290	DQTFEGPNEESSEDENEGVNIAIDAEGSEEEESSEEEEEEEDEDEEDDDSD					339

		410	420	430	440	450	
						
D.m. CG12169	108	----SLDEQT---	AGCTAIVVLI	RERRR	LYCANAGDSRAI	ACISGMVHALS	151
D.p.	108	----SWGDMQ---	AGSTAVVVLV	KDSKLYCANAGDSRAI	ACVNGQLEILS		151
A.a.	107	----SLKEQM---	AGSTAVAVMV	KNDRLYCANAGDSRAI	ACINGKLDVLS		150
T.c.	108	----SLRNEQ---	SGSTAVTII	IKNGTLYCANV	GDSRAVASIGGKAEPLS		151
A.m.	108	----TLKDEQ---	AGTTVIALLI	KDNVLYSANAGDSRAV	ASINGNAIPLS		151
A.g.	107	----ALREQM---	SGSTAVVVL	IKDNRLYCANAGDSRAI	ACVDGRLDVLS		150
D.m. CG17746	107	----TCGDQM---	AGSTAVVVLV	KDNKLYCANAGDSRAI	ACVNGQLEVLS		150
D.p.	108	----SWGDMQ---	AGSTAVVVLV	KDSKLYCANAGDSRAI	ACVNGQLEILS		151
A.a.	107	----SLKEQM---	AGSTAVAVMV	KNDRLYCANAGDSRAI	ACINGKLDVLS		150
A.g.	107	----ALREQM---	SGSTAVVVL	IKDNRLYCANAGDSRAI	ACVDGRLDVLS		150
A.m.	108	----TLKDEQ---	AGTTVIALLI	KDNVLYSANAGDSRAV	ASINGNAIPLS		151
T.c.	108	----SLRNEQ---	SGSTAVTII	IKNGTLYCANV	GDSRAVASIGGKAEPLS		151

D.m.	CG6036	112	-----YHDQQGGSTALICVFVSPDKIYLVNCGDSRAVL	SRNGAAVIST	154
D.p.		109	----EFTKDS-KCGGT	TAVCAFVSSTQVYIANCGDSRAVLCRQGVVFAT	154
T.c.		108	----EMTSGEDKSG-TTAVCAFVSPRLIYVANCGDSRAVLCRGGSPVFTT		153
D.m.	CG1906	109	----EFTRESEKCGGT	TAVCAFVGLTQVYIANCGDSRAVLCRQGVVFAT	155
D.p.		109	----EFTKDS-KCGGT	TAVCAFVSSTQVYIANCGDSRAVLCRQGVVFAT	154
A.a.		109	----ELASGADKSG-TTAVCAFISSQNIYIANCGDSRAILCRNCAPIFST		154
A.g.		112	----ELASGLDKSG-TTAVCAFISGQHLYIANCGDSRAVLCQNAQPIFTT		157
T.c.		108	----EMTSGEDKSG-TTAVCAFVSPRLIYVANCGDSRAVLCRGGSPVFTT		153
D.m.	CG10417	379	NFCANMIEEPGKDSGCTAVVCLLQGRDLYVANAGDSRCVLSRSGQAIEMS		428
A.g.		391	AFMKTITDEPGKDSGCTAVVALLHGKDLVANAGDSRCVVCRNGKALEMS		440
A.m.		356	ESLMMDTTEEPGYDSGCTAVVAILKDNELYVANAGDSRCVLCRDGQAIELS		405
A.a.		1	--MNNITDEPGKDSGCTAVVALLHDKELFVANAGDSRCVVCRNGKALEMS		48
T.c.		340	ADVRTFKKEEPPGSDSGCTAVVALLKGNQLYVANAGDSRCIVCRNGKPIEMS		389

			460	470	480	490	500	
							
D.m.	CG12169	152	VDHKPNDAKE	SKRIMASGGWVEFN	-RVNGNLALSRA	LDGDFIYKKNLLKTP		200
D.p.		152	MDHKPNNEGESKR	IEEGGWVEFN	-RVNGNLALSRA	LDGDFVFKR-ANKKP		199
A.a.		151	FDHKPNNASELER	IKRAGGYVEYN	-RVNGYLALSRA	LDGDFSLKRN	SDKLA	199
T.c.		152	NDHKPNNKEEYDR	IVAAGGFVDYN	-RVNGNLALSRA	LDGDFIFKRNEDK	PQ	200
A.m.		152	RDHKPTLKDERER	IEAAGGWVEFN	-RVNGQLAL	TRALGDFMFKRNERK	SP	200
A.g.		151	FDHKPTNEKERER	ISSAGGYVEYN	-RVNGYLALSRA	LDGDFGLKRNKQ	IEA	199
D.m.	CG17746	151	LDHKPNEAESKR	IQGGWVEFN	-RVNGNLALSRA	LDGYVFKH-ENKKP		198
D.p.		152	MDHKPNNEGESKR	IEEGGWVEFN	-RVNGNLALSRA	LDGDFVFKR-ANKKP		199
A.a.		151	FDHKPNNASELER	IKRAGGYVEYN	-RVNGYLALSRA	LDGDFSLKRN	SDKLA	199
A.g.		151	FDHKPTNEKERER	ISSAGGYVEYN	-RVNGYLALSRA	LDGDFGLKRNKQ	IEA	199
A.m.		152	RDHKPTLKDERER	IEAAGGWVEFN	-RVNGQLAL	TRALGDFMFKRNERK	SP	200
T.c.		152	NDHKPNNKEEYDR	IVAAGGFVDYN	-RVNGNLALSRA	LDGDFIFKRNEDK	PQ	200
D.m.	CG6036	155	IDHKPFSPKEQER	IQNAGGSVMIK	-RVNGTLAVSRA	LDGYDFKNDGSKSE		203
D.p.		155	QDHKPILPEEKER	IHNAGGSVMIK	-RVNGTLAVSRA	LDGYDFKNVKEK	GQ	203
T.c.		154	QDHKPGLPSE	RERIVKAGGNVMIQ	-RVNGSLAVSRA	LDGYEYKNVEGR	GP	202
D.m.	CG1906	156	QDHKPILPEEKER	IYNAGGSVMIK	-RVNGTLAVSRA	LDGYDFKNVKEK	GQ	204
D.p.		155	QDHKPILPEEKER	IHNAGGSVMIK	-RVNGTLAVSRA	LDGYDFKNVKEK	GQ	203
A.a.		155	QDHKPILPGEKQ	RIQNAGGSVMIQ	-RVNGSLAVSRA	LDGYDFKNAKEL	GQ	203
A.g.		158	QDHKPILPGEKER	IQNAGGSVMVQ	-RVNGSLAVSRA	LDGYDYKKNVANL	GQ	206
T.c.		154	QDHKPGLPSE	RERIVKAGGNVMIQ	-RVNGSLAVSRA	LDGYEYKNVEGR	GP	202
D.m.	CG10417	429	IDHKPEDDEEASR	IIKAGGRVTL	DGRVNGGLNLSRA	LDGHAYKTNVTL	PA	478
A.g.		441	FDHKPEDTVEYQ	RIEKAGGRVTL	DGRVNGGLNLSRA	LDGHGYKMNKSL	PA	490
A.m.		406	LDHKPEDEPEMER	IVKAGGKVTAD	GRVNGGLNLSRA	LDGHAYKONADL	PP	455
A.a.		49	IDHKPEDQVEFER	IQKAGGRVTL	DGRVNGGLNLSRA	LDGHGYKMNK	KVRE	98
T.c.		390	IDHKPEDKPERKR	IQKAGGEVTWE	GRVNGGLNLSRA	LDGHAYKONKNL	SD	439

			510	520	← R1	540	550		
								
D.m.	CG12169	201	EEQIVTAYPDVEVL	DLTIED-LEFVILACDGI	WDVMSNFEV	COFVHKRIR	D	249	
D.p.		200	EDQIVTAYPDVETR	KIMED-WEFIVLACDGI	WDVMSNAEVL	EFCTRTRIGM		248	
A.a.		200	EEQVVTAYPDVEERE	VTED-FEFVVIACDGI	WDVLPQS	SVLEFVMNEIAQ		248	
T.c.		201	EEQIVTAYPEVQSYE	ITPE-WEFVVVACDGI	WDVMSNEE	VVSEVTRIAS		249	
A.m.		201	QEQIVTAFPEVQAFQ	ITIED-WEFVVLACDGI	WDVMTSNE	VVNEIRTRLVQ		249	
A.g.		200	KEQMVTA	YPDVEEREVSEG-WDFLVIACDGI	WDVLPSSQAVLE	BFVQEEIAQ		248	
D.m.	CG17746	199	EDQIVTAFPDVETR	KIMDD-WEFIVLACDGI	WDVMSNAEVL	EFCTRTRIGM		247	
D.p.		200	EDQIVTAYPDVETR	KIMED-WEFIVLACDGI	WDVMSNAEVL	EFCTRTRIGM		248	
A.a.		200	EEQVVTAYPDVEERE	VTED-FEFVVIACDGI	WDVLPQS	SVLEFVMNEIAQ		248	
A.g.		200	KEQMVTA	YPDVEEREVSEG-WDFLVIACDGI	WDVLPSSQAVLE	BFVQEEIAQ		248	
A.m.		201	QEQIVTAFPEVQAFQ	ITIED-WEFVVLACDGI	WDVMTSNE	VVNEIRTRLVQ		249	
T.c.		201	EEQIVTAYPEVQSYE	ITPE-WEFVVVACDGI	WDVMSNEE	VVSEVTRIAS		249	
D.m.	CG6036	204	VDQMVSP	EPDIIVCNRS-EHDEFIVVACDGI	WDVMTSSE	VCEFI	RSRLLV	252	
D.p.		204	CEQLVSPEPEIF	CQSRQ-DTDEFLVLACDGI	WDVMTNED	VCSFI	HSRLKV	252	
T.c.		203	CEQLVSPEPEIF	VDRDDKEDEFLVLACDGI	WDVMSNED	LCQYI	HNRLLV	252	
D.m.	CG1906	205	CEQLVSPEPEIF	CQSRQ-DSDEFLVLACDGI	WDVMSNED	VCSFI	HSRMRV	253	
D.p.		204	CEQLVSPEPEIF	CQSRQ-DTDEFLVLACDGI	WDVMTNED	VCSFI	HSRLKV	252	
A.a.		204	CEQLVSPEPEIF	CQDRD-PAD	DEFLVLACDGI	WDVMSNANL	COFVHSR	MQI	252

A.g.	207	CEQLVSPEPEIFCRDRE-PADEFVLVACDGVWDVMSNEELCOEIVHNRLIEV	255
T.c.	203	CEQLVSPEPEIFVRRDRDDKEDEFVLVACDGIWDVMSNEDLCQYIHNRLLV	252
D.m. CG10417	479	EEQMISALPDIKKLIITPE-DEFMVLACDGIWNYMSSEEVVEFVRCRLKD	527
A.g	491	EEQMISALPDIKIKITVGPE-DEFMVLACDGIWNFMTSEQVVFVQERINK	539
A.m.	456	QEQMISALPDVRRHITIEPERDEFMVLACDGIWNFMSSQDVVFIRARLTQ	505
A.a.	99	EEQMISALPDIKKITIEPE-DEFMVLACDGIWNFMTSDDVVEFVQERLAD	147
T.c.	440	REQMITALPDIKTLTINPEEDEFMFLACDGIWNAMSNEKVVAFIRPRLQD	489

Tabelle 7.1: Auflistung der verwendeten degenerierten *Primer* für die PCR zum Nachweis der Proteinphosphatase 2C. (F1/2) Vorwärts-*Primer*, (R1/2) Rückwärts-*Primer*.

<i>Primer</i>	Aminosäure-Sequenz	<i>Primer</i> -Sequenz
F1	MQGWR	5'-ATGCARGGITGGMG-3'
R2	DGH(G/A)G	5'-CCISCRTGICCRTC-3'
F2	DGH(G/A)G	5'-GAYGGICAYGSIGG-3'
R1	ACDG(I/V)W	5'-CCAIAIICCRTCRCAIGC-3'

Tabelle 7.2: Auflistung der verwendeten *Primer*-Kombinationen und die jeweils erwarteten *Fragmentlängen*. Aufgrund von Sequenzunterschieden zwischen den verglichenen Proteinen ergeben sich jeweils zwei erwartete *Fragmentlängen* (siehe Abb. 8.1).

<i>Primer</i> -Kombination	erwartete <i>Fragmentlänge</i>
A	~ 609 bzw. 1443 bp
B	~ 99 bzw. 105 bp
C	~ 519 bzw. 1359 bp

7.4 Sequenzen der PCR-Fragmente mit PP2C-Homologien

Nukleotidsequenz des 600-bp-Fragments

```

CGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCCGCGGGATTATGCAGGGCTG
GGGTGTGAAATGGAAGATGCTTACTATGCATGCACTGGTCTCGGGCAAAGTCTAAATGACTGGTCATTTTTTTC
TGTCTTCGATGGTCATGCCGGCTGTAAAGTATCAGAGCATTGTGCCAAGCATCTGTTAAATAGTATTGTCAACAC
ACCAGAGTTCAGAGCGGCGATCATGTAAAAGGCATACGCACCGGTTTCTGCATATTGACGAAGAGATGCGCAG
GCTGCCCGAGCTCAACTTAAATGCTGGGAAATGCGGTGGCACCACAGCCGTCTGTGCATTCGTTTCTCCCACCCA
GATGTATATAGCAAATTGTGGCGATTTCGCGTGCAGTTTTGTGTGCGCAAAGGCACCCCGGTCTTGGCACTCAAGA
TCACAAGCCCGTGTACCCTGGAAAAGGAACGTATTTGTAATGCCGGCGGCAGTGTGCATGATCAAACGTGTCAA
TGGCACTCTGGCGGTTTCAAGAGCTTTGGGCGATTACGATTTTAAAAATGTCAAAGAAAAGGACAATGTGAACA
ATTGGTTTCGCCAGAGCCGAAATATTCTGTCAAGGTCGTCAGGACACTGATGAGTTTCTCGTTTTAGCCTGCGA
CGGCATCTGGAATCACTAGTGCGGCCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACCGGTTGGATGCATAG
    
```

F1 ⇒

⇐ R1

Nukleotidsequenz des 100-bp-Fragments

```

CGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCCGCGGGATTATGCATAGACG
GCAAAAACGAGGTGCCGGGATCATCGGGCAACGACAGTATATGTGTGTGAGAGTCTTCCATATTTATGGCCAC
CCCTGCATTAATCACTAGTGCGGCCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACCGGTTGGATGCATAGCT
    
```

⇐ F2

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Martin Voß
 Geburtsdatum und -ort: 08.09.1981 in Altdöbern
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

1988 – 1994 IV. Grundschule Großräschen
 1994 – 2001 Friedrich-Hoffmann-Gymnasium Großräschen
 Abschluss: Abitur (1,4)

Hochschulausbildung

Okt. 2001 – Juli 2006 Studium an der Universität Potsdam
 Studiengang Diplombiochemie
 Okt. 2003 Vordiplom (1,2)
 Nov. 2005 – Mai 2006 Diplomarbeit an der Universität Potsdam im Labor
 von Prof. Dr. Walz
 Juli 2006 Abschluss als Diplombiochemiker
 mit Auszeichnung (1,1)
 Seit Juli 2006 Promotionsstudium an der Universität Potsdam
 Doktorarbeit im Labor von Prof. Dr. Walz
 Assoziiertes Mitglied des Graduiertenkollegs 837
 „Functional Insect Science“

Publikationen

Dames P., Zimmermann B., Schmidt R., Rein J., Voss M., Schewe B., Walz B. & Baumann O. (2006.) cAMP regulates plasma membrane vacuolar-type H⁺-ATPase in blowfly salivary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 3926 – 3931

Voss M., Vitavska O., Walz B., Wiczorek H. & Baumann O. (2007) Stimulus-induced Phosphorylation of Vacuolar H⁺-ATPase by Protein Kinase A. *J. Biol. Chem.* 282: 33735 – 33742

Rein J., Voss M., Walz B. & Baumann O. (2008) Hormone-induced assembly and activation of V-ATPase in blowfly salivary glands is mediated by protein kinase A. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 294: C56 – C65

Voss M., Schmidt R., Walz B. & Baumann O. Stimulus-induced translocation of protein kinase A catalytic subunit to the apical membrane in blowfly salivary glands. (Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht)

Voss M., Walz B. & Baumann O. Deactivation of vacuolar H⁺-ATPase by protein phosphatase 2C. (Manuskript in Vorbereitung)

Voss M., Walz B. & Baumann O. Calcium/Calcineurin-induced potentiation of the cAMP signaling pathway in blowfly salivary glands. (Manuskript in Vorbereitung)

Konferenzbeiträge

Voss M., Vitavska O., Walz B., Wiczorek H. & Baumann O. (2007) Stimulus-induced Phosphorylation of Vacuolar H⁺-ATPase by Protein Kinase A. *32nd FEBS Congress: Molecular Machines* (Wien, Österreich), Poster B4-30.

**Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten
wissenschaftlichen Leistung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig ohne fremde Hilfe verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Diese Arbeit wurde bisher weder innerhalb noch außerhalb Deutschlands einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Potsdam, 08.05.2008 Martin Voß