

**Studien zur Expression und Lokalisation von  
P-Typ ATPasen aus *Dunaliella bioculata***

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

**vorgelegt von  
Sandra Schönberg  
aus Witzenhausen**

**Göttingen 2001**

**D 7**

**Referent: Prof. Dr. Gerhard Thiel**

**Korreferent: PD Giselbert Hinz**

**Tag der mündlichen Prüfung: 3.5.2001**

*Zur Erinnerung an meinen Vater*

## Abkürzungen

Grundsätzlich werden die international üblichen Abkürzungen der SI-Einheiten verwendet. Aminosäuren und Nukleotide werden im Einbuchstabencode dargestellt.

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bp	Basenpaare
cDNA	<i>copy</i> DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid 5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetra-Essigsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Erdbeschleunigung
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (Grün Fluoreszierendes Protein)
h	Stunde
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molarität
m	milli-
μ	mikro-
min	Minute
mol	Mol
mRNA	<i>messenger</i> RNA
n	nano-
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PM	Plasmamembran
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SER	Sarkoendoplasmatisches Retikulum

SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borat/EDTA
TE	Tris-HCl/EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> , Enzymeinheit
Upm	Umdrehung pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	x-fache Erdbeschleunigung

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1	Transportsysteme in biologischen Membranen	8
1.2	P-Typ ATPasen	8
1.3	Protonen-ATPasen	9
1.4	Calcium-ATPasen	10
1.4.1	Lokalisation pflanzlicher Ca <sup>2+</sup> -ATPasen	11
1.5	Signalsequenzen und topogene Signale	13
1.6	Translationsinitiationsstelle	16
1.7	Das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) als Reportergergen	16
1.8	Zwei P-Typ ATPasen aus <i>Dunaliella bioculata</i>	18
1.9	Zielsetzung	19
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1	Material	20
2.1.1	Organismen und Plasmide	20
2.1.1.1	<i>Escherichia coli</i>	20
2.1.1.2	COS-7-Zellen	20
2.1.1.3	HeLa-Zellen	20
2.1.1.4	Tabak	20
2.1.1.5	cDNA der Calcium- und Protonen-ATPase	21
2.1.1.6	Grün Fluoreszierendes Protein (GFP)	21
2.1.1.6.1	pEGFP-N1	21
2.1.1.6.2	HBT-L	22
2.1.2	Oligonukleotide	23
2.1.3	Chemikalien, Enzyme und Reaktionssysteme	24
2.1.4	Mikroskopie	24
2.1.4.1	Fluoreszenzmikroskopie	24
2.1.4.2	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	24
2.1.5	Software	25
2.2	Methoden	25
2.2.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	25
2.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> mit Calciumchlorid	26
2.2.3	Plasmidisolierung	26
2.2.4	Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	28
2.2.4.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	28
2.2.4.2	Schleudersäulen-Chromatographie	28
2.2.4.3	Alkoholische Fällung von DNA	28
2.2.5	Konzentrationsbestimmung	29
2.2.6	Enzymatische Fragmentierung von DNA	29

2.2.7	Gelelektrophorese	29
2.2.8	Ligation von DNA-Fragmenten	30
2.2.9	Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
2.2.9.1	Amplifikation von Fragmenten aus cDNA	31
2.2.9.2	Sequenzierung	31
2.2.10	Kultivierung von HeLa-Zellen	33
2.2.11	Bestimmung der Zellzahl	33
2.2.12	Anzucht auf Objektträgern	34
2.2.13	Liposomentransfektion von HeLa-Zellen	34
2.2.14	Morphologische Präparate	35
2.2.15	Kernfärbung mit H33342	36
2.2.16	Kultivierung von COS-7-Zellen	36
2.2.17	Liposomentransfektion von COS-7-Zellen	36
2.2.18	Fixierung von COS-7-Zellen	37
2.2.19	Axenische Kulturen von Tabakpflanzen	37
2.2.20	Präparation von Tabak-Protoplasten	37
2.2.21	Elektroporation von Tabak-Protoplasten	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
3.1	Klonierungsstrategie für die Expression von ATPase-GFP-Fusionsvektoren in Tabak-Protoplasten	41
3.1.1	Analyse der Translationsstartsignale der H <sup>+</sup> - und Ca <sup>2+</sup> -ATPase aus <i>Dunaliella bioculata</i>	42
3.1.2	Konstruktion von ATPase-sGFP-S65T-Fusionsvektoren für die Transfektion von Tabak-Protoplasten	45
3.2	Expression von ATPase-GFP-Fusionsproteinen in Tabak-Protoplasten	47
3.2.1	Cytoplasmatische und nukleare Lokalisation von sGFP-S65T in Tabak-Protoplasten	48
3.2.2	Negativkontrollen	51
3.2.3	Fehlende Expression der ATPase-sGFP-S65T-Fusionsproteine in Tabak-Protoplasten	52
3.3	Konstruktion der ATPase-EGFP-Fusionsvektoren für die Expression in HeLa- und COS-7-Zellen	53
3.4	Expression der ATPase-EGFP-Fusionsgene in HeLa-Zellen	56
3.4.1	Positiv- und Negativkontrolle: Expression von EGFP in HeLa-Zellen	56
3.4.2	Expression von M2-Ca <sup>2+</sup> -EGFP und M3-Ca <sup>2+</sup> -EGFP in HeLa-Zellen	57
3.4.3	Expression von M1-H <sup>+</sup> -TAG-EGFP in HeLa-Zellen	59
3.5	Expression der ATPase-EGFP-Fusionsproteine in COS-7-Zellen	59
3.5.1	Cytoplasmatische und nukleare Lokalisation von EGFP in COS-7-Zellen	60
3.5.2	Ca <sup>2+</sup> -ATPase-EGFP-Fusionsproteine in COS-7-Zellen	61

3.5.3	Lokalisation der Fusionsproteine M1-H <sup>+</sup> -EGFP und M2-H <sup>+</sup> -EGFP im ER von COS-7-Zellen	64
3.5.4	Quantitative Bestimmung der Fluoreszenzverteilung und Expressionsrate von EGFP und der Fusionsproteine in COS-7-Zellen	65
3.5.5	Kozak-Mutante in COS-7-Zellen	67
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>70</b>
4.1	Expression der ATPase-GFP-Chimären in Tabak-Protoplasten	70
4.1.1	Konstruktion der Fusionsvektoren	71
4.1.2	Unterbindung der Translation	71
4.1.3	Aggregation der ATPase-GFP-Fusionsproteine	72
4.1.4	Proteinabbau	73
4.2	Expression der ATPase-GFP-Fusionsproteine in tierischen Expressionssystemen	74
4.2.1	Natives GFP in heterologen Expressionssystemen	74
4.2.2	ER-Lokalisation der H <sup>+</sup> - und Ca <sup>2+</sup> -ATPase-GFP-Fusionsproteine in COS-7-Zellen	75
4.2.3	Signalsequenzen/Signalsequenzbereiche für ER-Insertion	75
4.2.4	Lokalisation oder Retention im ER tierischer Zellen	77
4.2.4.1	Topogene Signale für ER-Retention der Ca <sup>2+</sup> -ATPase-GFP-Fusionsproteine	78
4.2.4.2	Retention der H <sup>+</sup> -ATPase-GFP-Fusionsproteine im ER	80
4.2.4.3	Qualitätskontrolle im ER	80
4.2.4.4	Zusätzliche Signale	81
4.3	Translationsstartcodons der Fusionsproteine	83
4.3.1	Steigerung der Proteinsynthese mit Verkürzung der N-Termini der H <sup>+</sup> - und Ca <sup>2+</sup> -ATPase	84
4.3.2	Übertragbarkeit der Ergebnisse auf <i>Dunaliella bioculata</i>	85
4.3.3	Steigerung der Proteinsynthese in COS-7-Zellen durch Mutation in der Kozak Consensus-Sequenz	86
4.3.4	Reinitiation am Startcodon des EGFP	87
4.4	Weiterführende Experimente	89
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>92</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Transportsysteme in biologischen Membranen

Bei Transportvorgängen über Zellmembranen lassen sich aktive und passive Prozesse unterscheiden. Passiver Transport erfolgt immer entlang eines Gradienten, der vom Konzentrationsverhältnis des Stoffes zwischen beiden Membranseiten und bei geladenen Teilchen (z. B. Ionen) zusätzlich von der elektrischen Potentialdifferenz abhängt. Er erfolgt durch Ionenkanäle, die kleinere polare Moleküle im geöffneten Zustand hindurch diffundieren lassen oder durch Carrier, die die Diffusion von Teilchen begünstigen.

Aktive Prozesse können auch entgegen einem solchen Gradienten transportieren. Die dazu benötigte Energie kann durch die Spaltung energiereicher Verbindungen wie z. B. ATP gewonnen werden.

Die kontrollierte Verteilung von Ionen im Intra- und Extrazellularraum ist essentiell für viele physiologische Prozesse in Organismen, wie pH-Homöostase,  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Signaltransduktion, Wachstum, Zellvolumen-Regulation, Aufbau und Aufrechterhaltung des Membranpotentials sowie der Ausbildung von Aktionspotentialen.

## 1.2 P-Typ ATPasen

Adenosintriphosphatasen (ATPasen) stellen die größte Gruppe aktiver Transportsysteme in Zellen dar. Die Hydrolyse von ATP setzt Energie frei, die dafür verwendet wird, Ionen gegen einen Konzentrationsgradienten über Membranen zu transportieren (PEDERSEN & CARAFOLI 1987).

Eine klassische Einteilung von PEDERSEN & CARAFOLI (1987) unterscheidet F-Typ, V-Typ und P-Typ ATPasen. Während F-Typ und V-Typ ATPasen fast ausschließlich Protonen transportieren, befördern die verschiedenen Vertreter der P-Typ ATPasen eine Vielzahl von Kationen.

Die Klasse der P-Typ ATPasen unterscheidet sich von anderen ATPasen fundamental in Struktur und Reaktionsmechanismus. Durch Übertragung der  $\gamma$ -Phosphatgruppe des hydrolysierten ATP auf einen spezifischen Aspartylrest im aktiven Zentrum der Enzyme entsteht ein Acylphosphatintermediat, dem die P-Typ ATPasen ihren Namen verdanken. Die durch diese Phosphorylierung bedingte Konformationsänderung ermöglicht es dem Enzym, das Kation auf der anderen Seite der Membran freizusetzen. Diese funktionalen Fähigkeiten sind in der Aminosäureabfolge einer jeden P-Typ ATPase festgelegt und spiegeln sich in konservierten Aminosäuremotiven wider (AXELSEN & PALMGREN 1997, GREEN & MAC LENNAN 1989). Übereinstimmende Vorhersagen zur Protein-Sekundärstruktur eukaryontischer P-Typ ATPasen (SERRANO *et al.* 1990, WACH *et al.* 1992) und die Übereinstimmung mit elektronenkristallographi-

schen Daten einer H<sup>+</sup>-ATPase und Ca<sup>2+</sup>-ATPase aus *Neurospora crassa* zeigen, daß das Protein aus zwei hydrophoben Domänen und zehn Transmembransegmenten aufgebaut ist (AUER *et al.* 1998, ZHANG *et al.* 1998).

P-Typ ATPasen werden nach ihrer Substratspezifität und phylogenetischen Verwandtschaft in fünf Gruppen eingeteilt: Typ I ATPasen umfassen die Schwermetallpumpen, Typ II ATPasen die Ca<sup>2+</sup>-, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- und H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasen, Typ III ATPasen H<sup>+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-ATPasen, Typ IV ATPasen die Phospholipidpumpen und die Typ V ATPasen setzen sich aus ATPasen ohne definierte Substratspezifität zusammen (AXELSEN & PALMGREN 1997).

Während die P-Typ Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- und H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase sich aus einer  $\alpha$ -Untereinheit und glycosylierten  $\beta$ -Untereinheiten zusammensetzt, bestehen die Typ IIA und IIB Ca<sup>2+</sup>-ATPasen sowie die Typ III H<sup>+</sup>-ATPasen aus nur einem einzigen Polypeptid.

### 1.3 Protonen-ATPasen

Die P-Typ H<sup>+</sup>-ATPase ist die primäre Ionenpumpe der Plasmamembran von Pilzen und Pflanzen (PORTILLO 2000). Die Schlüsselfunktion der H<sup>+</sup>-ATPase ist die Erzeugung eines elektrochemischen Protonen-Gradienten über der Membran (SZE 1985, KASEI & MUTO 1990). Dieser wird, analog zum Natriumgradienten in tierischen Zellen, durch energetische Kopplung zur Aufnahme (Cotransport) von Zuckern und Aminosäuren oder zur Abgabe (Antiport) von Ca<sup>2+</sup> und Na<sup>+</sup> genutzt. H<sup>+</sup>-ATPase ist für die intrazelluläre pH-Regulation und die Aktivierung der meisten Ionen- und Metabolit-Transporte durch die Plasmamembran verantwortlich.

Das Enzym besteht aus einem einzelnen Polypeptid von 100 – 105 kDa und transportiert Protonen mit einer 1:1 Stöchiometrie zu hydrolysiertem ATP (PALMGREN & AXELSEN 1998).

Die H<sup>+</sup>-ATPase höherer Pflanzen wird von einer Multigenfamilie kodiert. 11 H<sup>+</sup>-ATPase Gene wurden im Genom von *Arabidopsis* identifiziert, 7 in Tomate und 9 in Tabak (MORSOMME & BOUTRY 2000, OUFATTOLE *et al.* 2000). Auf Grund ihrer Sequenz-Identität werden die Gene der H<sup>+</sup>-ATPase in zwei Subfamilien klassifiziert. Die zwei Subfamilien repräsentieren die am stärksten exprimierten Gene der H<sup>+</sup>-ATPase in Pflanzen.

Unterschiede in gewebespezifischer Expression (DE WITT *et al.* 1996, HARPER *et al.* 1994), asymmetrischer Verteilung innerhalb der Zelle (DE WITT & SUSSMAN 1995, JAHN *et al.* 1998) und den katalytischen Eigenschaften (MORIAU *et al.* 1999) der einzelnen Isoformen sind gefunden worden. Bis zu drei Isoformen der H<sup>+</sup>-ATPase mit verschiedener Kinetik können in einer Zelle nebeneinander vorkommen (MORIAU *et al.* 1999, LUO *et al.* 1999). Die physiologische Relevanz dieses Phänomens ist bis jetzt ungeklärt (PORTILLO 2000).

Zusätzlich zur gewebe- bzw. entwicklungsspezifischen Expression erfolgt die transkriptionale Kontrolle der pflanzlichen H<sup>+</sup>-ATPase vermutlich durch eine Vielzahl von Umweltfaktoren.

So führen der Anstieg von Glucose in der Zelle (RAO *et al.* 1993, VANEMA *et al.* 1995, GHISLAIN *et al.* 1992), osmotischer Stress (CURTI *et al.* 1993, BARBAKOV *et al.* 2000), niedrige pH-Werte (SUROWY & BOYER 1991), Dunkelheit (HARMS *et al.* 1994) und verschiedene Hormone (FRIAS *et al.* 1996) zu erhöhter Expression und verstärkter katalytischer Aktivität des Enzyms.

Neben der transkriptionalen Kontrolle des Enzyms wird von LUKASZEWICZ (1998) eine translationale Regulation der ATPase vermutet. So besitzen die meisten pflanzlichen H<sup>+</sup>-ATPasen einen ungewöhnlich langen 5'-untranslatierten Bereich (Leader-Sequenz), der einen kurzen offenen Leserahmen (5 – 13 Codons) enthält. Die Analyse der Leader-Sequenz mit dem  $\beta$ -Galactosidase-Gen als Reporter zeigte, daß sie die Aktivierung der Translation durch den Mechanismus translationaler Reinitiation beeinflusst.

Die funktionale Diversität der H<sup>+</sup>-ATPase wirft die Frage auf, ob die verschiedenen Isoformen neben gewebespezifischen Expressionsmustern auch unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen in der Zelle besitzen könnten. Die Lokalisation der Vielzahl verschiedener Isoformen der H<sup>+</sup>-ATPasen aus *Arabidopsis*, Tabak und Tomate wird zwar auf Grund von Sequenzhomologien zu bereits molekularbiologisch charakterisierten H<sup>+</sup>-ATPasen in der Plasmamembran vermutet, wurde aber immunocytologisch oder mit Reportergenen in nur wenigen Fällen belegt (DE WITT *et al.* 1996, MORIAU *et al.* 1999). Dagegen wurden zwei H<sup>+</sup>-ATPasen aus der marinen Goldalge *Heterosigma akashiwo*, die größte Ähnlichkeiten zu P-Typ H<sup>+</sup>-ATPasen höherer Pflanzen und Protozoen zeigen, immunocytologisch in intrazellulären Membranen nachgewiesen (WADE *et al.* 1994). Es kann daher nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden, daß P-Typ H<sup>+</sup>-ATPasen auch in anderen Membranen vorkommen.

## 1.4 Calcium-ATPasen

Ca<sup>2+</sup>-Ionen sind in allen Eukaryonten wichtige sekundäre Botenstoffe (*second messenger*) (BERRIDGE 1995, CLAPHAM 1995, SANDERS *et al.* 1999). Sie spielen eine elementare Rolle bei Signaltransduktions-Vorgängen, der Kontrolle und Genexpression vieler Proteine und scheinen auch einen Einfluß auf die Protein-Prozessierung im sekretorischen Stoffwechsel zu haben (GILL *et al.* 1996, SANDERS *et al.* 1999).

Voraussetzung für diese Funktionen ist eine niedrige Konzentration an freien Ca<sup>2+</sup>-Ionen im Cytosol der Zelle. In Pflanzen wird der Influx der Ca<sup>2+</sup>-Ionen ins Cytoplasma über Kanäle aus intrazellulären Speichern geleitet, wie dem Endomembransystem und der Vakuole. Die Wiederherstellung einer niedrigen Calciumkonzentration im Cytosol geschieht durch biochemische Pufferung und intrazelluläre Sequestrie-

rung in ER, Golgi, Mitochondrien, Chloroplasten und Vakuole, sowie durch den Export von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gegen die elektrochemische Potentialdifferenz über die Plasmamembran (SANDERS *et al.* 1999).

Da die Konzentration an freien Ionen in den Organellen wesentlich höher ist als im Cytoplasma, sind für den Efflux der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Cytosol energieabhängige Transportsysteme die Voraussetzung (SANDERS *et al.* 1999). Neben den  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiportern im Tonoplasten, die geringe Affinität zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen besitzen (HIRSCHI *et al.* 1996), spielen die hochaffinen P-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen der Plasmamembran und des Endomembransystems eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase (KREIMER *et al.* 1985, JOHNSON *et al.* 1995, SANTELLA & CARAFOLI 1997).

### 1.4.1 Lokalisation pflanzlicher $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen

Die pflanzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen werden aufgrund ihrer Proteinsequenz-Identitäten in zwei Untergruppen gegliedert (AXELSEN & PALMGREN 1998; EVANS & WILLIAMS 1998, SANDERS *et al.* 1999, GEISLER *et al.* 2000):

#### 1. Typ IIA $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen

Sie sind den tierischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen des Sarkoplasmatischen und Endoplasmatischen Retikulums ähnlich und lassen sich durch Calmodulin nicht stimulieren (ER-Typ-Homologe).

#### 2. Typ IIB $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen

Ähneln den tierischen durch Calmodulin stimulierbaren plasmamembranständigen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen (PM-Typ-Homologe).

Allerdings entsprechen nicht alle pflanzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-Homologe diesen Kriterien (BUSH *et al.* 1995, BONZA *et al.* 1998, EWANS & WILLIAMS 1998). So kommen pflanzliche Typ IIA  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen nicht ausschließlich im Endoplasmatischen Retikulum vor. Ein Beispiel ist LCA aus *Lycopersicon esculentum* (WIMMERS *et al.* 1992). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase wurde durch Immunodektion in Membranfraktionen sowohl in der Plasmamembran als auch im Tonoplasten lokalisiert und besitzt in den verschiedenen Membranen unterschiedliche Molekularmassen, die vermutlich durch alternatives Spleißen bedingt sind (FERROL & BENNETT 1996). Auch ECA/ACA3 aus *Arabidopsis* ist trotz sequenztypischer Merkmale für ER-ständige  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen, nicht im ER nachweisbar (HONG *et al.* 1999, LIANG *et al.* 1997).

Den pflanzlichen Typ IIB  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen wurden aufgrund von biochemischen Merkmalen eine Lokalisation in der Plasmamembran zugesprochen (CARAFOLI 1991). So wurde die Stimulierbarkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase durch Calmodulin als Indiz einer Plasmamembranlokalisation gewertet. Obwohl pflanzliche Calmodulin-stimulierbare

Ca<sup>2+</sup>-ATPasen in ihrer Proteinsequenz große Ähnlichkeiten zu tierischen Plasmamembran-ATPasen besitzen, sind, mit zwei Ausnahmen, alle klonierten pflanzlichen Typ IIB ATPasen in Endomembranen lokalisiert worden (ASKERLUND 1996, MALMSTROM *et al.* 1997, HWANG *et al.* 1997, HONG *et al.* 1999).

Die Isoform ACA1p der Ca<sup>2+</sup>-ATPasen ACA1 aus *Arabidopsis* (HUANG *et al.* 1993, HARPER *et al.* 1998) wurde mit Hilfe von Membranfraktionierung und Immundetektion mit dem polyklonalen Antikörper anti-AC1 in der inneren Hüllmembran von Plastiden gefunden (HUANG *et al.* 1993). Die Lokalisation der Isoformen BCA1p aus *Brassica oleracea* wird aufgrund von Sequenzvergleichen mit einer vakuolären ATPase in der Vakuolen-Membran vermutet (MALMSTROM *et al.* 1997). ACA2p, der Isoform von ACA2, wurde zuerst mittels Immunodetektion in Membranfraktionen eine Lokalisation im ER zugeschrieben, die durch C-terminale Fusion des Proteins mit GFP optisch bestätigt werden konnte (HARPER *et al.* 1998, HONG *et al.* 1999). Die ersten klonierten plasmamembranständigen Ca<sup>2+</sup>-ATPasen sind die Isoformen At-ACA8 aus *Arabidopsis* (BONZA *et al.* 2000) und SCA1 aus der Sojabohne (CHUNG *et al.* 2000). Auch sie besitzen wie alle bisher klonierten pflanzlichen Typ IIB Ca<sup>2+</sup>-ATPasen, im Gegensatz zu tierischen Plasmamembran-Ca<sup>2+</sup>-ATPasen, eine Calmodulin-Bindungsstelle am N- und nicht am C-Terminus (MALMSTROM *et al.* 1997, HARPER *et al.* 1998, BONZA *et al.* 2000).

Calmodulin-stimulierbare pflanzliche Ca<sup>2+</sup>-ATPasen der Endomembranen und der Plasmamembran haben ähnliche biochemische Merkmale und lassen sich nur schwer voneinander unterscheiden (ASKERLUND & SOMMARIN 1996, ASKERLUND 1996, HWANG *et al.* 1998). Als biochemische Unterscheidungsmerkmale werden mittlerweile auch das Molekulargewicht der ATPasen und die Hemmbarkeit durch Fluorecizin-Derivate herangezogen (BONZA *et al.* 1998). Plasmamembranständige Ca<sup>2+</sup>-ATPasen haben ein höheres Molekulargewicht als die der Endomembranen (THOMSON *et al.* 1993, ASKERLUND & SOMMARIN 1996, ASKERLUND 1996, HWANG *et al.* 1998) und lassen sich durch Fluorecizin-Derivate schneller hemmen (THOMSON *et al.* 1993, BUSH & WANG 1995, ASKERLUND & SOMMARIN 1996).

Pflanzliche Typ IIA und Typ IIB Ca<sup>2+</sup>-ATPasen können gleichzeitig nebeneinander im selben Membransystem auftreten (EVANS & WILLIAMS 1998, GEISLER *et al.* 2000, HONG *et al.* 1999, SANDERS *et al.* 1999). Diese Verteilung steht im Gegensatz zu tierischen Zellen, in denen Typ IIA und Typ IIB Ca<sup>2+</sup>-ATPasen entweder im Endomembransystem oder der Plasmamembran gefunden wurden (BRANDT & VANAMAN 1998). Es ist zur Zeit noch unklar, welche Rolle unterschiedlich regulierbare Ca<sup>2+</sup>-ATPasen in derselben Membran haben. Für das ER werden funktional getrennte Domänen mit räumlich und funktional verschiedenen Ca<sup>2+</sup>-Speichern vermutet (GOLOVINA & BLAUSTEIN 1997).

## 1.5 Signalsequenzen und topogene Signale

In eukaryontischen Zellen hat sich ein komplexes Proteintransport- und Sekretionssystem entwickelt. Der größte Teil des Intermediärstoffwechsels sowie die für Wachstum und Fortbestand der Zelle erforderliche Proteinsynthese findet im Cytosol statt. Die Proteinsynthese der meisten Exportproteine und ebenso die der meisten Membranproteine erfolgt dagegen am Endoplasmatischen Retikulum. Alle Proteine der eukaryontischen Zelle, die über den sekretorischen Transportweg an ihren Bestimmungsort gebracht werden, müssen zunächst durch die Membran des ER transportiert oder, im Falle von integralen Membranproteinen, in diese inseriert werden. Anschließend können sie durch Transportvesikel in die verschiedenen Kompartimente des exocytotischen Transportweges, der Plasmamembran oder in den extrazellulären Raum gelangen.

Signalsequenzen nehmen eine Schlüsselrolle in der Zielsteuerung (*Targeting*) und der Membraninsertion von sekretorischen- und Membranproteinen in das ER ein (MARTOGLIO & DOBBERSTEIN 1998).

Signalsequenzen befinden sich im allgemeinen am N-Terminus der zu transportierenden Proteine (Präproteine) und haben eine Länge von 15 – 50 Aminosäuren (VON HEIJNE 1986). Sie werden meistens noch während der Membranpassage auf der *trans*-Seite der ER-Membran durch eine membrangebundene Signalpeptidase abgespalten (MARTOGLIO & DOBBERSTEIN 1998). Jedoch sind mittlerweile auch C-terminale Signalsequenzen bekannt (KATAY *et al.* 1995).

Obwohl die Primärstruktur der Signalsequenzen nicht konserviert ist, können drei charakteristische Bereiche unterschieden werden: ein positiv geladener N-Terminus (N-Region), ein 7 – 16 Aminosäuren langer zentraler hydrophober Bereich (H-Bereich) und eine polare C-terminale Region (C-Bereich), die die Signalpeptidaseschnittstelle definiert. Die Gesamthydrophobizität ist für die Funktion einer Signalsequenz von entscheidender Bedeutung (CHOU & KENDALL 1990, VON HEIJNE 1985).

Bei Membranproteinen, die meist keine Signalsequenzen besitzen, übernimmt gewöhnlich der Bereich der ersten Transmembrandomäne die Funktion einer Signalsequenz (KLEINIG & SITTE 1999). Diese sogenannten Signalbereiche sind Oberflächenstrukturen, die sich durch Faltung eines Proteins ausbilden und für das entsprechende Protein charakteristisch sind. Sie unterscheiden sich von Signalsequenzen vor allem durch einen längeren hydrophoben Bereich (20 – 30 Aminosäuren) und das Fehlen einer Signalpeptidaseschnittstelle. Offensichtlich sind die Komponenten der Transportmaschinerie in der Lage, hydrophobe Signalsequenzen variabler Länge und Aminosäurezusammensetzung zu erkennen. Wie dieses Prinzip in der Zelle realisiert wird, ist bisher nur ansatzweise bekannt (ZHENG & GIERASCH 1996).

Signalsequenzen besitzen multiple Funktionen und enthalten spezifische Informationen, um die unterschiedlichen Funktionen des *Targeting* und der Membraninsertion sowie ihre Aufgaben nach Entfernen vom eigentlichen Protein auszuführen. Sie können zwischen den verschiedenen Transportwegen in das ER auswählen, vermitteln die Translokation des N- oder C-Terminus eines Proteins durch die Membran und sind für die Lokalisation eines Proteins in der Membran, im Lumen oder im Cytoplasma verantwortlich.

Der durch die Signalsequenz initiierte Transportprozeß ins ER kann cotranslational oder posttranslational erfolgen. Signalsequenzen bringen Proteine entweder zu dem co- oder zu dem posttranslationalen Translokationsapparat in der Membran. Beim cotranslationalen Mechanismus gelangen die Proteine während des Syntheseprozesses an den membrangebundenen Ribosomen durch die Membran. Dagegen werden Proteine beim posttranslationalen Prozeß erst nach ihrer Fertigstellung im Cytosol zur Membran gebracht. Studien, in denen die Signalsequenzen von Proteinen ausgetauscht wurden, zeigten, daß allein die Signalsequenzen darüber entscheiden, welcher Weg gewählt wird (FELDHEIM & SCHEKMAN 1994, NG *et al.* 1996). Cotranslational transportierte Proteine besitzen offensichtlich hydrophobere Signalsequenzen als posttranslationale Transportsubstanzen.

Unklarheit besteht zudem darüber, wie die Proteine aus dem ER zu den verschiedenen Endomembranen dirigiert werden und ob diesbezügliche Erkenntnisse aus Hefen und Säugetierzellen auf Pflanzen übertragbar sind (GEISLER *et al.* 2000). Die zu transportierenden Proteine enthalten *per se* keine Transportsignale. Bekannt sind von ER-residenten Membranproteinen topogene Sequenzen, die für die Zurückhaltung dieser Proteine im ER verantwortlich sind. Diese topogenen Signale sind bestimmte Sequenzmotive oder Strukturen, die den Bestimmungsort in der Zelle festlegen. Solche Signale ermöglichen das richtige Adressieren der Proteine an ihrem Entstehungsort an freien oder membrangebundenen Ribosomen in Richtung Bestimmungsort, häufig auch das Zurückhalten am Bestimmungsort. Einige dieser topogenen Signale sind bekannt. So ist die H/KDEL-Sequenz in tierischen und pflanzlichen Zellen die Rückhaltesequenz für lösliche Proteine im ER.

Signal	Bedeutung
Signalsequenz	15 – 30 AS lang, mit positiver N-, hydrophober H- und unspezifischer C-Region; zum Transfer in das ER
K/H/RDEL, K/H/RDEL, H/DDEL-Sequenz	Zurückhaltung löslicher Proteine im ER-Lumen tierischer, pflanzlicher und Hefe-Zellen
NLS	Ein oder mehrere Cluster basischer AS. Transport in den Zellkern
R/KILL	Vermutlich Rückhaltesignale für Membranproteine im ER
KXXXX-, XXRR-Sequenz	Rückhaltesignale für Membranproteine im ER

**Tab. 1: Beispiele topogener Signale für Transport und Kompartimentierung von Proteinen**

Bei tierischen Typ IIA  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen wurden zwei verschiedene ER-Targeting- bzw. Retentionssignale entdeckt, die für die ER-Assoziation dieser Proteine verantwortlich sein könnten (JACKSON *et al.* 1990, MAGYAR 1990). Das tierische C-terminale ER-Retentionssignal der Typ I Proteine mit der Consensus-Sequenz (K/X)(K/X)KXX-Stop findet sich auch in den pflanzlichen Typ IIA Isoformen ECA1 und ECA2 von *Arabidopsis* und in LCA aus Tomate wieder, ist aber nicht bei der OsCA-ATPase aus Reis und ECA3 aus *Arabidopsis* vorhanden (GEISLER *et al.* 2000).

Das Motiv KXXXX scheint trotzdem ein konserviertes ER-Retentionssignal phylogenetisch unterschiedlicher Organismen zu sein, da es sowohl in Hefe (TOWNSLEY & PELHAM 1994) als auch in Pflanzen und Tieren vorkommt und als solches erkannt wird (HONG *et al.* 1999).

Das im ersten Transmembransegment tierischer  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen lokalisierte Motiv R/KILL wird als weitere Signalsequenz für die Zurückhaltung der Proteine im ER/SER diskutiert (MAGYAR 1990, EVANS & WILLIAMS 1998). Es kommt in tierischen Typ IIA aber nicht IIB  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen vor und ist auch in den meisten pflanzlichen Homologen im ersten Transmembransegment konserviert, wie ein multiples Alignment von GEISLER *et al.* (2000) zeigte.

Immunofluoreszenzuntersuchungen mit rekombinanten tierischen Chimären aus Typ IIA  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen und einer plasmamembranständigen Typ IIB  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase zeigten, daß innerhalb des ersten Transmembransegmentes der SER-ATPase Signalsequenzen für eine ER-Retention vorhanden sind und auch die ersten beiden Transmembransegmente der plasmamembranständigen ATPase ein Targeting zur Plasmamembran vermittelten (FOLETTI *et al.* 1995).



## 1.6 Translationsinitiationsstelle

Vergleiche der Basensequenzen in nächster Umgebung tatsächlicher Startcodons lassen bei Eukaryonten in der Regel Rückschlüsse auf das als Translationsstartcodon genutzte ATG zu (KOZAK 1987, LÜTCKE *et al.* 1987).

In eukaryontischen Systemen gibt es im Gegensatz zu prokaryontischen keine purinreichen Sequenzen auf der 5'-Seite der mRNA, um zwischen Start- und internen AUG-Codons zu unterscheiden. Eukaryonten benutzen meistens das am nächsten zum 5'-Ende der mRNA liegende AUG als Startstelle. Die 40S-Untereinheit der Ribosomen lagert sich vermutlich an die CAP-Struktur am 5'-Ende eukaryotischer mRNAs an und sucht nach einem AUG-Codon, indem es sich schrittweise in 3'-Richtung bewegt. Mehrere Initiationsfaktoren sind notwendig, damit sich die 60S-Untereinheit mit dem Komplex aus Initiator-tRNA, mRNA und 40S-Untereinheit zu einem 80S-Initiationskomplex verbindet. Dabei ist weitgehend unbekannt, welchen genauen Einfluß die um das Startcodon befindlichen Basen haben, da nicht immer das erste AUG-Codon auf der mRNA als Startsignal fungiert. Dennoch wurden durch Vergleiche zahlreicher, hauptsächlich tierischer Transkripte statistisch signifikante Ungleichverteilungen bestimmter Basen in nächster Umgebung tatsächlicher Startcodons gefunden (KOZAK 1987, KOZAK 1996). Diese Gewichtung wurde in ähnlicher Form von LÜTCKE *et al.* (1987) für pflanzliche Transkripte ermittelt. Während bei tierischen Transkripten die vier Basen CACC vor dem Methionin und die Base G an Position +4 relativ zum A des AUG nach dem Startcodon für eine effektive Initiation der Translation entscheidend sind, wird für pflanzliche Transkripte den Basen G und C an Position +4 und +5 regulatorische Funktionen in der Translationsinitiationseffizienz zugeschrieben (LÜTCKE *et al.* 1987).

## 1.7 Das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) als Reportergergen

Die Probleme der subzellulären Lokalisationsbestimmung können durch den Einsatz von Immunfluoreszenztechniken oder rekombinanten Reportergergen gelöst werden, die sich durch einfache biochemische oder histochemische Methoden nachweisen lassen. Reportergergene, wie  $\beta$ -Galactosidase (LacZ) (HELMER *et al.* 1984, TERRI *et al.* 1989),  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) (JEFFERSON 1987, JEFFERSON *et al.* 1987), Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) (SEED & SHEEN 1988) und Luziferase (LUC) (GALLIE *et al.* 1989, MILLER *et al.* 1992, OW *et al.* 1986) benötigen jedoch exogene Substrate, Co-Faktoren oder Antikörper, um nachgewiesen werden zu können. Eine Alternative zu diesen Reportergergen ist das Grün Fluoreszierende Protein – GFP. Es stammt aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria*, deren Fähigkeit zur Biolumineszenz erstmals 1962 beschrieben wurde (SHIMOMURA *et al.* 1964). Für die Bio-

lumineszenz ist unter anderem das 26,9 kDa schwere Grün Fluoreszierende Protein verantwortlich (PRASHER *et al.* 1992). Das eigentliche Fluorophor des GFP bildet sich autokatalytisch aus der Tripeptidsequenz Ser<sup>65</sup>-Tyr<sup>66</sup>-Gly<sup>67</sup> innerhalb der 238 Aminosäuren umfassenden Polypeptidkette und benötigt keine exogenen Substrate oder Co-Faktoren (CHALFIE *et al.* 1994, HEIM & TSIEN 1996, PRASHER *et al.* 1992). Der Wildtyp des GFP besitzt zwei ausgeprägte Anregungsmaxima bei 396 nm und 475 nm, welche zur Emission derselben Wellenlänge von 508 nm führen. Die Entwicklung von GFP-Varianten mit veränderten Anregungs- und Emissionsspektren durch Mutagenese im Bereich der chromophoren Gruppe und Codonoptimierung für unterschiedliche Expressionssysteme führte zu signifikanten Steigerungen der Translationshäufigkeit und Fluoreszenzintensität des Proteins (DELAGRAVE *et al.* 1995; EHRIG *et al.* 1995; HEIM *et al.* 1994; HEIM *et al.* 1995; SIEMERING *et al.* 1996). GFP-Varianten, deren Anregungsmaxima in den längerwelligen Bereich verschoben sind (*red shifted GFP*), sind ideal für standardisierte Argon Laser Anregung (DELAGRAVE *et al.* 1995).

Die Verwendungsmöglichkeiten des GFP als Reporter gen sind vielseitig. Da die Fähigkeit zur Fluoreszenz nach N- oder C-terminaler Fusion mit anderen Proteinen nicht beeinflusst wird und die Eigenschaften des fusionierten Fremdproteins auch in heterologen Systemen erhalten bleiben, (CHALFIE *et al.* 1994, GU *et al.* 1997, HEINLEIN *et al.* 1995, WANG & HAZELRIGG 1994) kann es für *in vivo* Studien über Genexpression, Protein-Transport, Protein-Protein-Interaktionen und die Lokalisation einzelner Proteine in lebenden Zellen eingesetzt werden (KAETHER & GERDES 1995). Der Gebrauch von GFP-Reportergenen mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen macht eine simultane Lokalisation verschiedener Proteine in einer Zelle möglich.

In Pflanzen wurde Wildtyp-GFP mit Hilfe des Kartoffel-Virus-X-Expressionssystemes (BAULCOMBE *et al.* 1995) oder des Tabak-Mosaik-Virus (HEINLEIN *et al.* 1995) zur Expression gebracht. Der Einsatz von rekombinanten GFP-Proteinen in Chloroplasten (KÖHLER *et al.* 1997a), Mitochondrien (KÖHLER *et al.* 1997b), Strukturen des Cytoskeletts (HEINLEIN *et al.* 1995) und des Zellkerns (GREBENOK *et al.* 1997) haben dabei neue Einblicke in verschiedene zelluläre Prozesse von Pflanzen ermöglicht. In diesen Experimenten wurde GFP als virale mRNA in großen Mengen exprimiert und konnte im Mikroskop lokalisiert werden. Jedoch konnte wenig oder gar keine grüne Fluoreszenz nach Transfektion in isolierten Zellen und ganzen Pflanzen von *Arabidopsis*, Tabak- und Gersteprotoplasten eruiert werden (HASELOFF *et al.* 1995, HU & CHENG 1995, REICHEL *et al.* 1996, SHEEN *et al.* 1995). Erst durch Auffinden und Beseitigen eines kryptischen Introns innerhalb der GFP-Sequenz, das große Ähnlichkeit zu pflanzlichen Introns zeigte (HASELOFF *et al.* 1997) und einer Optimierung der Codon-Gewichtung (CHIU *et al.* 1996, PANG *et al.* 1996, REICHEL *et al.* 1996), konnten erhöhte Expressionsraten, eine verbesserte Proteinfaltung während des post-translationalen Reifungsprozesses (CORMACK *et al.* 1996, CRAMERI *et al.*

1996) und eine verstärkte subzelluläre Fluoreszenz in transfizierten Pflanzen erreicht werden (HASELOFF & SIEMERING 1998).

## 1.8 Zwei P-Typ ATPasen aus *Dunaliella bioculata*

Aus der einzelligen, zellwandlosen und extrem salztoleranten Grünalge *Dunaliella bioculata* wurden molekularbiologisch bisher zwei putative P-Typ ATPasen charakterisiert, eine Ca<sup>2+</sup>-ATPase und eine H<sup>+</sup>-ATPase.

DBCA1 (*Dunaliella bioculata* Calcium ATPase 1) ist eine putative Ca<sup>2+</sup>-ATPase (RASCHKE 1996, RASCHKE & WOLF 1996), DBPMA1 (*Dunaliella bioculata* Plasmamembran ATPase 1) eine putative H<sup>+</sup>-ATPase (WOLF 1993, WOLF *et al.* 1995).

Die Gesamtlänge der cDNA-Sequenz von DBCA1 umfaßt 3692 bp. Das längste offene Leseraster kodiert für ein Protein aus 1111 Aminosäuren mit einer kalkulierten Molekülmasse von 114 kDa. Das erste Startcodon im richtigen Leseraster befindet sich an Position 48 – 50. Weitere ATG-Tripletts sind an Position 96 – 98 und 117 – 119 zu finden. Die Primärstruktur von DBCA1 weist alle Aminosäurereste auf, die für den Calcium-Transport (S)ER-ständiger Enzyme essentiell sind. So wurde DBCA1 wegen ihrer Ähnlichkeit zu Calcium-translozierenden ATPasen aus dem (S)ER tierischer Organismen (70 % Ähnlichkeit, 54 % Identität) (RASCHKE 1996) in der Klasse der P-Typ ATPasen eingeordnet. Auch AXELSEN & PALMGREN (1997) ordneten DBCA1 den P-Typ IIA ATPasen zu. Aufgrund von *Southernblot*-Analysen wird vermutet, daß im Genom von *Dunaliella bioculata* weitere Isoformen der Ca<sup>2+</sup>-ATPase vorkommen (RASCHKE 1996).

Die Peptidsequenz der H<sup>+</sup>-ATPase DBPMA1 weist 17 definierte Regionen auf, die charakteristisch für Protonen-translozierende ATPasen sind (SERRANO 1988, GREEN 1989, SERRANO 1989, WACH *et al.* 1992) und anderen P-Typ ATPasen dagegen fehlen (WACH *et al.* 1992). Die Gesamtlänge der cDNA umfaßt 4678 bp. Das längste offene Leseraster der Nukleinsäuresequenz kodiert für ein Polypeptid aus 1131 Aminosäuren mit einer kalkulierten Molekülmasse von 123 kDa. Zwei ATG-Tripletts befinden sich im längsten offenen Leserahmen der Nukleinsäuresequenz, die als Translationsstart interpretiert werden könnten. Sequenzvergleiche zeigten, daß das Protein Ähnlichkeit zu H<sup>+</sup>-ATPasen aus höheren Pflanzen hat (58 – 61 % Ähnlichkeit, 47 % Identität) (WOLF 1994) und zur Primärstruktur der plasmamembranständigen H<sup>+</sup>-ATPase aus *Dunaliella acidophila* (WEISS & PICK 1996) 78 % Identität und 87 % Ähnlichkeit aufweist. Von AXELSEN & PALMGREN (1997) wurde DBPMA1 den Typ IIIA ATPasen zugeordnet. *Southernblot*-Analysen mit genomischer DNA aus *Dunaliella bioculata* zeigten, daß das Gen von DBPMA1 (*pma1*) in einfacher Kopie vorliegt und keine weiteren Isoformen besitzt (WOLF 1993, WOLF *et al.* 1995).

## 1.9 Zielsetzung

Immunocytologische Nachweise der subzellulären Lokalisation der beiden ATPasen DBCA1 und DBPMA1 aus *Dunaliella bioculata* wurden bisher nicht durchgeführt. Die Ergebnisse von GEISLER *et al.* (2000), HONG *et al.* (1999), SANDERS *et al.* (1999) und WADA *et al.* (1994) zeigen jedoch, daß Rückschlüsse auf die Lokalisation von P-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{H}^{+}$ -ATPasen in Pflanzen aufgrund ihrer biochemischen Merkmale und Sequenzhomologien nicht uneingeschränkt gezogen werden können. GFP stellt ein geeignetes Markerprotein zur subzellulären Lokalisationsbestimmung von ATPasen dar. Die Expression rekombinanter Proteine hat den Vorteil, daß GFP direkt sichtbare Fluoreszenz zeigt, *in vivo* Beobachtungen ermöglicht und dazu keine exogenen Substrate oder Co-Faktoren benötigt. Gegenüber immunocytologischen und Membranfraktions-Analysen, bei denen Kreuzreaktionen zwischen Antikörpern und anderen Isoformen nicht ausgeschlossen werden können, liefern ATPase-GFP-Chimäre Isoformen-spezifische Informationen. Überdies lassen sich bei der GFP-Markierung Fehlinterpretationen vermeiden, die auf unsaubere Trennung der pflanzlichen Membransysteme bei der Fraktionierung im Gradienten beruhen.

Ziel der Arbeit war, die subzelluläre Lokalisation der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase DBCA1 und  $\text{H}^{+}$ -ATPase DBPMA1 aus *Dunaliella bioculata* fluoreszenzoptisch zu bestimmen. In der Vergangenheit war beobachtet worden, daß heterologe Expression aktiver  $\text{H}^{+}$ -ATPasen in pflanzlichen Systemen zum Tod der Zelle oder zu stark retardiertem Wachstum führten (MORSOMME & BOUTRY 2000). Um dieses Problem zu umgehen, sollte für die Lokalisationsstudien keine aktiven ATPasen, sondern nur Teilbereiche von ihnen verwendet werden. Bisher ist wenig über die Sequenz-Informationen bekannt, die für die subzelluläre Verteilung (Sortierung) von ATPasen und den dazugehörigen zellulären Sortierapparat entscheidend sind. Dennoch haben Immunofluoreszenzuntersuchungen rekombinanter Chimären aus tierischen Typ IIA und IIB  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen gezeigt, daß Signalsequenzen innerhalb der ersten Transmembransegmente der ATPasen, für eine ER-Retention vorhanden sind und auch das *Targeting* zur Plasmamembran durch N-terminale Sequenzbereiche der plasmamembranständigen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase bestimmt werden kann (FOLETTI *et al.* 1995). Dementsprechend sollte in der vorliegenden Arbeit versucht werden, die Lokalisation der ATPasen über GFP markierte N-terminale Transmembransegmente in heterologen Expressionssystemen zu bestimmen. Da beide ATPasen über mehrere potentielle Startcodons verfügen, sollte das Fluoreszenzsignal ferner genutzt werden, die Translationseffizienz von Konstrukten mit verkürztem N-Terminus zu verfolgen, um so die eigentliche Translationsinitiationsstelle zu identifizieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Organismen und Plasmide

##### 2.1.1.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

Zur Transformation und Vermehrung von Plasmiden wurden die Derivate des *E. coli* K12 Stammes DH5 $\alpha$ F' (HANAHAN 1985) und XL1-Blue (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) mit folgenden Eigenschaften eingesetzt:

DH5 $\alpha$ F': *supE44*, *F'* $\Phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)  
*U169*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(*r<sub>K</sub>-m<sub>K+</sub>*)

XL1-Blue: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*,  
[*F'**proAB*, *lacI<sup>q</sup>* *Z* $\Delta$ M15, Tn10 (*tet<sup>r</sup>*)]

##### 2.1.1.2 COS-7-Zellen

Als heterologes Versuchssystem zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der ATPase Expression und Lokalisation dienten konfluent gewachsene COS-7-Zellen. Bei COS-7-Zellen handelt es sich um eine von der Affennieren-Zelllinie CV1 abgeleitete Linie, die durch Behandlung der Zellen mit einer Mutante des Affenvirus SV40 entstanden ist. Die Zellen wurden freundlicherweise von der Abteilung Molekulare Zellbiologie (Prof. Gruss) des Max-Planck-Institutes für Biophysikalische Chemie in Göttingen zur Verfügung gestellt.

##### 2.1.1.3 HeLa-Zellen

Als weiteres heterologes Versuchssystem wurden adhärent wachsende HeLa-Zellen verwendet. Es handelt sich dabei um Zellen der von GEY *et al.* (1952) etablierten Kultur eines menschlichen Zervix-Karzinoms epitheler Herkunft.

Die Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig) (Nr. DSM ACC 57) bezogen.

Optimale Wachstumsbedingungen waren gegeben, wenn die HeLa-Zellmenge zu Beginn ihrer Kultivierung 0,5 – 1,0 x 10<sup>5</sup> Zellen pro ml Kulturmedium bei 37° C in einem 5 %-CO<sub>2</sub>-Milieu betrug.

##### 2.1.1.4 Tabak

Sterile Takapflanzen wurden aus Samen von *Nicotiana tabacum* L. cv Samsun NN gezogen. Zur Gewinnung von Tabak-Protoplasten wurden 10 – 12 Wochen alte Pflanzen verwendet (2.2.19).

### 2.1.1.5 cDNA der Calcium- und Protonen-ATPase

Die cDNA der Calcium-ATPase DBCA1 aus *Dunaliella bioculata* (RASCHKE & WOLF 1996, RASCHKE 1996) wurde von Dr. B.C. Raschke zur Verfügung gestellt. Die vollständige Sequenz ist in der Sequenz-Datenbank des National Center of Biotechnology (NCBI; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) unter der Zugangsnummer X93592 aufgeführt.

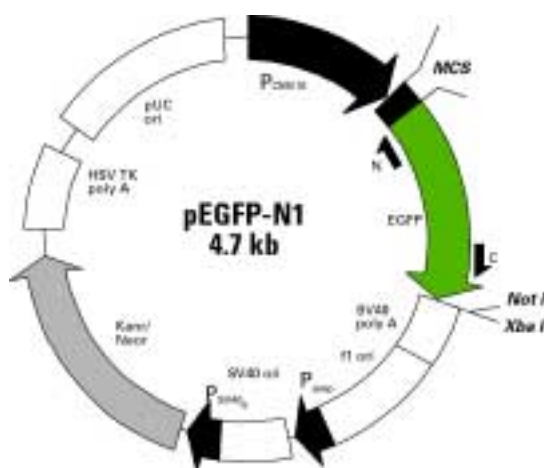
Die cDNA der Protonen-ATPase DBPMA1 aus *Dunaliella bioculata* (WOLF *et al.* 1995, WOLF 1993) stellte Dr. A.H. Wolf zur Verfügung. Die vollständige Sequenz ist in der NCBI Sequenz-Datenbank unter der Zugangsnummer X73901 gespeichert.

### 2.1.1.6 Grün Fluoreszierendes Protein (GFP)

#### 2.1.1.6.1 pEGFP-N1

Als visueller Marker der Genexpression und Proteinlokalisierung in HeLa- und COS-7-Zellen diene der pEGFP-N1 N-terminale Protein-Fusions-Vektor (Clontech, Palo Alto, USA; GenBank Zugangsnummer U55762). pEGFP-N1 ist eine „red shifted“ Variante des Wildtyp-GFP, mit stärkerer Fluoreszenzintensität und verbesserter Expression in Säugetierzellen. Der Vektor kodiert für die GFPmut1-Variante (CORMACK *et al.* 1996), die den doppelten Aminosäureaustausch Phe<sup>64</sup> zu Leu und Ser<sup>65</sup> zu Thr enthält. Das Anregungsmaximum liegt bei 488 nm, das Emissionsmaximum bei 507 nm. Die kodierende Sequenz des EGFP-Gens enthält mehr als 190 stille Basensubstitutionen zur Angleichung an die menschliche Codon-Präferenz (HAAS *et al.* 1996). Zur Verbesserung der Translationseffizienz in eukaryontischen Zellen befindet sich vor der kodierenden EGFP-Sequenz eine Kozak Consensus-Sequenz. Eine multiple Klonierungsstelle (MCS) befindet sich zwischen dem CMV-Promotor ( $P_{CMVIE}$ ), der die konstitutive Expression in Säugetierzellen kontrolliert, und den EGFP-codierenden Sequenzen. Ein SV40-Polyadenylierungssignal nach der EGFP-Sequenz sorgt für eine Prozessierung des 3'-Endes der EGFP-mRNA.

pEGFP-N1 enthält außerdem das Kanamycinresistenzgen aus Tn5, das das Wachstum transformierter Wirtszellen auf Selektivagar zulässt.



**Abb. 1: Vereinfachte Genkarte des pEGFP-N1 N-terminalen Protein-Fusions-Vektor**

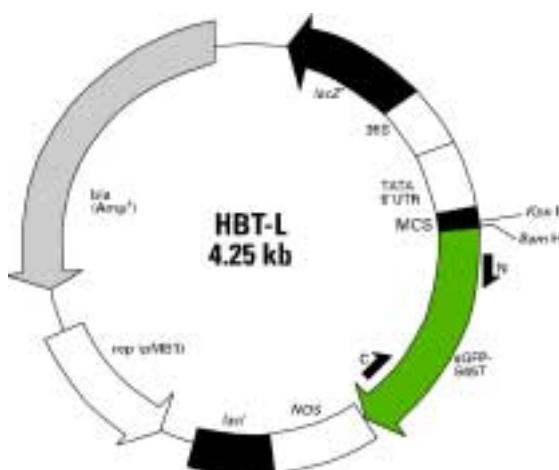
pEGFP eignet sich zur Konstruktion von EGFP-Fusionsgenen. Fremdgene können über die MCS am N-Terminus der EGFP-Sequenz inseriert werden und müssen ein Startcodon zur Expression als EGFP-Fusionsprotein enthalten.

### 2.1.1.6.2 HBT-L

Als Expressionsvektor zur Lokalisationsbestimmung rekombinanter ATPase-GFP-Proteine in Tabak-Protoplasten diente der binäre Vektor HBT-L. Er wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Gatz (Albrecht-von-Haller-Institut der Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt. Grundlage des HBT-L ist der Klonierungsvektor pUC18. Er enthält zwischen den Schnittstellen *EcoR* I und *Hind* III das HBT-sGFP-S65T-NOS-Fragment.

sGFP-S65T ist eine GFP-Mutante mit einer für menschliche Gene optimierten Codon-Präferenz, die in Pflanzenzellen gute Expressionsergebnisse zeigt, da die bevorzugte Codon-Präferenz zwischen menschlichen Genen und denen höherer Pflanzen oftmals ähnlich ist (HAAS *et al.* 1996, WADA *et al.* 1991). Diese Mutante führt zu einer 20-fach höheren Proteinexpression und einem verstärkten Fluoreszenzsignal im Vergleich zum Wildtyp-GFP (SHEEN *et al.* 1995). Zahlreiche Restriktionsschnittstellen und ein potentiell kryptisches Intron (HASELOFF *et al.* 1997) wurden eliminiert. Die Substitution von Ser<sup>65</sup> zu Thr im Chromophor des sGFP-S65T führt zu einer Unterdrückung der Absorption bei 395 nm und zu einem Absorptionsmaximum bei 488 nm (CUBITT *et al.* 1995, HEIM *et al.* 1995) sowie zu einer schnelleren Bildung des Chromophors. Das Emissionsmaximum liegt bei 510 nm. Die Expression des GFP erfolgt unter der Kontrolle des chimären Promotors HBT (SHEEN 1993, SHEEN *et al.* 1995). Er besteht aus den ersten 400 bp des 35S-Promotors und der TATA-Box sowie der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) aus dem Maisgen C4PPDK. Der 5'-UTR enthält einen universellen Transkriptions-Verstärker, der die Promotor-Aktivität um ein 10- bis 80-faches steigert. Am 3'-Ende des sGFP-S65T ist der NOS-Transkriptions-terminus aus *Agrobacterium tumefaciens* angefügt.

Durch zusätzliche Insertion der MCS des Klonierungsvektors pBluescript II SK(+) in den HBT-L-Vektor unmittelbar vor die sGFP-S65T-Sequenz, sind N-terminale Fusionen mit sGFP-S65T über die Schnittstellen *Bam* HI und *Kpn* I möglich. HBT-L enthält außerdem ein Ampicillinresistenzgen, das das Wachstum transformierter Bakterien auf Selektivagar ermöglicht.



**Abb. 2: Vereinfachte Genkarte des Klonierungsvektors HBT-L**

Fremdgene können über die zusätzlich eingefügte MCS am N-Terminus der sGFP-S65T-Sequenz inseriert werden und müssen ein Startcodon zur Expression als sGFP-S65T-Fusionsgen enthalten.

### 2.1.2 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden für Polymerasekettenreaktion (PCR) und Sequenzierung von DNA-Fragmenten eingesetzt.

Sie wurden über die Firmen Naps (Göttingen), Roth (Karlsruhe) und Clontech (Palo Alto, USA) bezogen.

Oligonukleotide	Sequenz (5' → 3')
DCA-M1	GGT <u>CTCGAGCACCA</u> <b>TGG</b> TGAGCCACGCTTCATCAGG
DCA-M2	GGT <u>CTCGAGCACCA</u> <b>TGG</b> TGTACCTGGGCCTTGGAAT
DCA-M3	GGT <u>CTCGAGCACCA</u> <b>TGC</b> AGGACGCCTACTCCAGTG
rDCAC1	GGAATCAGCTGCAGCTGGCCAT
DBH-M1	GGT <u>CTCGAGCACCA</u> <b>TGG</b> CGGACATCAAGGAAGGA
DBH-M2	GGT <u>CTCGAGCACCA</u> <b>TGAT</b> CAAGGAGCCCCTCACA
rDBH	GCAGCTCGAGTCACAATGGCACCATCTCGCA
rDBH2	GTC <u>ACTGCAGCACA</u> ATGGCACCATCTCGCA
DBCAT-M1	TGATGGT <u>ACCCTTGGA</u> <b>ATGG</b> TGAGC
DBCAT-M2	TGATGGT <u>ACCCTTGGA</u> <b>ATGG</b> TGTACCTG
DBCAT-M3	TGATGGT <u>ACCCTTGGA</u> <b>ATGC</b> AGGACGCC
rDBCAT	AGTCGGATCCATTCGGGAGCACTGTGGC
DBHT-M1	TGACGGT <u>ACCGCAACA</u> <b>TGG</b> CGGACATC
DBHT -M2	TGACGGT <u>ACCGGTGGACA</u> <b>TGAT</b> CAAGGAG
rDBHT	TGACGGATCCATCTCGCACGACCAT

**Tab. 2: Primer für die Amplifikation des N-Terminus und der ersten beiden Transmembransegmente aus der cDNA der Ca<sup>2+</sup>-ATPase DBCA1 und der H<sup>+</sup>-ATPase DBPMA1 aus *Dunaliella bioculata***

Die **Startcodons** sind durch Fettdruck hervorgehoben, die *Kozak Consensus-Sequenz* kursiv dargestellt und die Schnittstellen sind unterstrichen.

Oligonukleotide	Sequenz (5' → 3')
rGFP	TTACGTCGCCGTCCAGCTCGAC
rLGYMW	CCACATGTATCCAAGGGA
rQQARI	TTGATGCGGGCCTGCTGC
HBT-L-f	CAGGCGCGGGCGGTACGTAGTA

**Tab. 3: Primer für die Sequenzierung der rekombinanten pEGFP-N1 und HBT-L-Vektoren**



### 2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Reaktionssysteme

Chemikalien und Reaktionssysteme wurden über die Firmen Biomol (Ilvesheim), Bio-Rad (München), Boehringer (Mannheim), DIFCO-Laboratories (Detroit, USA), Gibco BRL (Eggenstein), Invitrogen (San Diego, USA), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich GmbH (München) bezogen.

Wenn nicht anders angegeben, wurden bei der Verwendung von Reaktionssystemen stets die Angaben des Herstellers befolgt.

Für Restriktionsanalysen wurden Restriktionsendonukleasen der Hersteller Boehringer (Mannheim), Eurogentec (Seraing, Belgien), MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), Pharmacia (Freiburg) verwendet.

### 2.1.4 Mikroskopie

#### 2.1.4.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die visuelle Überprüfung von Genexpression und Proteinlokalisierung des fluoreszierenden Genmarkers GFP wurde mit einem Olympus BH-2 Mikroskop, bestückt mit den Filterblöcken BH2-DMV und BH2-DMBV, durchgeführt. Für Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskopie wurden zusätzlich ein vertikaler Auflicht-Fluoreszenz-Kondensator (BH-2-RFA), fluoreszenzfreie UV-Objektive mit 10-, 40- und 100-facher Vergrößerung und eine 100 W Quecksilberdampfampe verwendet.

Für die Mikrofotografie war am Fototubus eine Automatik-Kleinbildkamera mit Hand-schaltgerät (Olympus, PM-10AK) angebracht. Als Filmmaterial dienten 200, 400 und 800 ASA Diafilme der Firmen Kodak und Revue.

#### 2.1.4.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Konfokale Aufnahmen von GFP-transfizierten COS-7-Zellen und Tabak-Protoplasten wurden mit dem inversen konfokalen Laser Scanning Mikroskop LSM 410 invert (Zeiss, Göttingen) gemacht. Es besteht als Grundeinheit aus dem Mikroskop Axiovert 135 M, das Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskopie ermöglicht. Angegliedert sind die Einrichtungen für die konfokale Mikroskopie, die Steuerung des Gerätes, ein PC und die digitale Bildverarbeitung.

Die GFP-Expression wurde bei inverser Fluoreszenzmikroskopie mit dem FITC-Filter-satz (Extinktionsfilter 470 – 490 nm, Dichroider Spiegel 510 nm, Emissionsfilter 510 – 540 nm) untersucht. Bei konfokaler Mikroskopie erfolgte die Anregung mit einem externen Argon-Ionen Laser bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Das Emissionslicht wurde durch einen 510 – 520 nm Bandpassfilter gefiltert. Die digitale Bildverarbeitung erfolgte mit dem Programm LSM Version 3.95 (Zeiss, Göttingen).

Die Nutzung des konfokalen Fluoreszenzmikroskopes wurde freundlicherweise von der Abteilung Membranbiophysik am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen ermöglicht.

### 2.1.5 Software

#### Für DNA-Analyse:

ABI PRISM™ Sequencing Analysis 3.0 (PE Applied Biosystems)  
Mac Vector and AssemblyLign (IBI)

#### Für Bildanalyse und -bearbeitung:

NIH Image 1.61  
Adobe Photoshop 5.0  
LSM Version 3.95 (Zeiss)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Stammkulturen von *Escherichia coli* (*E. coli*) wurden als Glycerinsuspension (40 %) bei -70° C gelagert und bei Bedarf auf Agarplatten ausgestrichen (1,5 % Agar in NZY-Medium).

NZY-Medium: 1,0 % (w/v) NZ-Amine  
0,5 % (w/v) Hefeextrakt  
5,0 % (w/v) NaCl

Übernachtskulturen von *E. coli* wurden in autoklavierten 10 ml Reagenzgläsern mit Aluminiumkappen gezogen. Dazu wurden in der Regel 2 ml NZY-Medium bei Bedarf mit Ampicillin (75 mg/ml) oder Kanamycin (30 mg/ml) versetzt und mit einer einzelnen Bakterienkolonie von einer Agarplatte beimpft. Die Kulturen wurden 12 – 14 h bei 37° C und 250 Upm in einem Schüttelinkubator (GFL 3032) gezogen.

### 2.2.2 Transformation von *E. coli* mit Calciumchlorid

Für Standard-Transformationen wurden *E. coli* Zellen mit Calciumchlorid für die Aufnahme von Plasmid-DNA kompetent gemacht (COHEN *et al.* 1972, Protokoll nach SAMBROOK *et al.* 1989).

Zur Transformation wurden bis zu 10 µl Plasmid-DNA mit einem Volumen von 200 µl kompetenten Zellen vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach kurzem Erhitzen (90 s) auf 42° C wurde die Suspension anschließend auf Eis gekühlt und die Zellen zur Expression der Antibiotikaresistenz mit 800 µl NZY-Medium 30 min bei 37° C geschüttelt. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch kurze Zentrifugation im unteren Bereich des Reaktionsgefäßes konzentriert, vom Großteil des Mediums befreit und auf Selektivagar ausplattiert.

### 2.2.3 Plasmidisolierung

Plasmidisolierung wurde sowohl im präparativen als auch im analytischen Maßstab durchgeführt. Sie erfolgte nach der Methode von BIRNBOIM & DOLY (1979).

Zur Analyse von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien wurden Übernachtskulturen angezogen. Jeweils 1,5 ml der Kultur wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 10 s bei 12.000 g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde dekantiert und das Reaktionsgefäß zum Abtropfen 5 min kopfüber auf Fließpapier gestellt. Das Zellpellet wurde in 100 µl TE-Puffer mit RNase A (P1-Puffer) suspendiert und mit 200 µl alkalischer SDS-Lösung (P2-Puffer) versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden 150 µl eiskalte Kaliumacetatlösung (P3-Puffer) zugegeben und das Gemisch 10 min auf Eis inkubiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 12.000 g wurde das Zentrifugat mit der Plasmid-DNA und den löslichen Proteinen einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterworfen (2.2.4.1). Die DNA wurde mit Natriumacetat und Ethanol 30 min gefällt (2.2.4.3) und anschließend bei 12.000 g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Ethanol im Heizblock bei 50° C abgedampft. Das DNA-Pellet wurde in 20 – 50 µl autoklaviertem HPLC-Wasser gelöst und zur weiteren Verarbeitung bei -20° C gelagert.

Zur präparativen Plasmidisolierung wurden 200 ml steriles NZY-Medium mit einem Antibiotikum versetzt und mit 2 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden Klons beimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37° C im Schüttelinkubator bei 250 Upm angezogen. Die Bakterien wurden 15 min bei 2.500 g (4.000 Upm, GSA-Rotor, SORVALL RC-5B) pelletiert und anschließend in 10 ml P1-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 10 ml P2-Puffer vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 ml P3-Puffer hinzugegeben, das Gemisch vorsichtig geschwenkt und 20 min auf Eis inkubiert. Das Pelletieren der Zelltrümmer erfolgte durch Zentrifugation für 30 min bei 13.000 g (10.000 Upm, HB-4 Rotor, Sorvall

RC-5B). Zur Reinigung der DNA wurde der Überstand auf eine Einweg-Anionenaustauschersäule (Qiagen-tip 500, Qiagen) gegeben, die zuvor mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert worden war. Die Säule mit gebundener DNA wurde zweimal mit je 30 ml QC-Puffer gewaschen, und die DNA durch Erhöhung der NaCl- Konzentration in einer Stufe mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Die eluierte DNA wurde mit 0,7 Vol Isopropanol bei RT gefällt und das Präzipitat durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 13.000 g (10.000 Upm, HB-4-Rotor, SORVALL RC-5B) 30 min pelletiert. Die DNA wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, bei 50° C kurz getrocknet und in 500 µl Wasser aufgenommen.

Die isolierten und aufgereinigten Plasmide wurden mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen geschnitten (2.2.6), um neue DNA-Fragmente in das Plasmid zu ligieren, oder bereits eingeführte Fragmente mit Hilfe der Gelelektrophorese (2.2.7) auf ihre Größe hin zu überprüfen.

P1-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0  
10 mM EDTA  
0,1 % (w/v) RNase A

P2-Puffer: 200 mM NaOH  
1,0 % (w/v) SDS

P3-Puffer: 3,0 M KOAc/HOAc, pH 5,5

QBT-Puffer: 750 mM NaCl  
50 mM MOPS, pH 7,0  
15 % (v/v) Ethanol  
0,15 % (v/v) Triton-X-100

QC-Puffer: 1,0 M NaCl  
50 mM MOPS, pH 7,0  
15 % (v/v) Ethanol

QF-Puffer: 1,2 M NaCl  
50 mM MOPS, pH 8,0  
15 % (v/v) Ethanol

## 2.2.4 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

Folgende Methoden wurden bei der Isolation von Plasmid-DNA und zur Reinigung von PCR- und Restriktionsfragmenten eingesetzt.

### 2.2.4.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Phenol-Chloroform-Extraktion wurde bei allen DNA-Präparationen außer der Plasmid-isolation mit dem QIAfilter Plasmid Midi/Maxi Kit eingesetzt, um Proteine und andere organische Komponenten aus der Lösung zu entfernen.

Wassergesättigtes Phenol (P) wurde mit dem Antioxidationsmittel Hydroxychinolin versetzt und mit Tris-Base auf pH 8,0 eingestellt. Chloroform wurde im Verhältnis 24:1 mit Isoamylalkohol (I) versetzt, um Schaumbildung bei der Phasentrennung zu vermeiden. Die Extraktion erfolgte durch einmaliges Ausschütteln der DNA-Lösung mit dem gleichen Volumenanteil einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung im Verhältnis 25:24:1.

Eine Durchmischung von organischer und wässriger Phase wurde durch Schütteln erreicht, die Trennung durch 2-minütige Zentrifugation bei 11.000 g beschleunigt. Nach der Zentrifugation wurde die wässrige Phase abgenommen und durch alkoholische Fällung von Phenolresten befreit (2.2.4.3).

### 2.2.4.2 Schleudersäulen-Chromatographie

Alternativ zur Fällung wurden kleine Volumina von DNA-Suspensionen (50 – 100 µl) über Sephacryl Schleudersäulen (S-200, S-300, S-400, Pharmacia, Freiburg) gereinigt. Diese Methode wurde zum Pufferwechsel, zum Entfernen von Nukleotiden und *Primern* nach der PCR und zur Beseitigung von Phenolresten nach der Phenol-Chloroform-Extraktion eingesetzt.

### 2.2.4.3 Alkoholische Fällung von DNA

DNA wurde zur Abscheidung von Proteinen und/oder niedermolekularen Substanzen aus wässrigen Lösungen mit Hilfe von Salz/Alkohol Kombinationen ausgefällt. Die DNA wurde dazu durch Zugabe von 2,5 Vol 98 %-igem Ethanol und 0,1 Vol 3 M Natriumacetat pH 5,3 mindestens 20 min bei -20° C gefällt und anschließend 30 min bei 13.000 g (10.000 Upm, HB4 Rotor, Sorvall RC-5B) zentrifugiert. Bei geringem Probenvolumen wurde eine Eppendorf Zentrifuge (5415 C, Eppendorf) bei 12.000 g eingesetzt. Alle Zentrifugationen fanden bei einer Temperatur von 4° C statt. Das erhaltene Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und erneut für 15 min bei gleicher g-Zahl wie zuvor zentrifugiert, um die DNA am Boden des Reaktionsgefäßes zu sammeln. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Ethanol bei 50° C kurz abgedampft. Die DNA wurde in einer geeigneten Menge auto-

klaviertem HPLC-Wasser durch kurzes Erwärmen auf 50° C resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20° C gelagert.

### 2.2.5 Konzentrationsbestimmung

Konzentrationen von wässrigen DNA-Lösungen wurden photometrisch anhand der Absorption bei 260 nm mit einem Gene Quant II Photometer (Pharmacia, Freiburg) ermittelt. Dabei wurde eine optische Dichte ( $OD_{260}$ ) von 1 einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA gleichgesetzt (Schichtdicke der Küvette 1 cm). Die Reinheit der Nukleinsäuren wurde durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm abgeschätzt (WARBURG & CHRISTIAN 1942). Ein Verhältnis von >1,8 für DNA-Lösungen wurde als Indiz für geringe Verunreinigungen durch Proteine gewertet (SAMBROOK *et al.* 1989).

### 2.2.6 Enzymatische Fragmentierung von DNA

Für die Restriktionsanalyse wurden Restriktionsendonukleasen und Puffer verschiedener Hersteller einzeln und in Kombination eingesetzt. Standard-Spaltungen von Plasmid-DNA wurden mit 10 Einheiten (Units) des Enzyms pro µg DNA durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug bei 37° C eine bis mehrere Stunden. Vor der Weiterverarbeitung der geschnittenen DNA wurden die Enzyme für 10 min bei 60° C inaktiviert. Die Ergebnisse wurden durch Gelelektrophorese (2.2.7) kontrolliert.

### 2.2.7 Gelelektrophorese

Analytische Gelelektrophoresen von Aliquots der Versuchsansätze wurden routinemäßig zur Erfolgskontrolle eingesetzt. Die Trennung der DNA erfolgte nach Größe der Fragmente im elektrischen Feld.

Zur analytischen Gelelektrophorese wurden 0,8 – 2,0 %-ige Agarosegele in TBE-Puffer verwendet. Die Agarose wurde in TBE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlung auf ca. 50° C in Elektrophoresekammern (Eigenbau K. Unger, Albrecht-von-Haller-Institut, Universität Göttingen) gegossen.

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die DNA-Proben mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt.

Probenpuffer:	180 mM	Tris-Base
	180 mM	Borsäure
	5 mM	EDTA
	40,0 % (w/v)	Saccharose
	0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,25 % (w/v)	Xylencyanol FF

TBE-Puffer:	90 mM	Tris-Base
	90 mM	Borsäure
	2,5 mM	EDTA

Die elektrophoretische Trennung der DNA-Fragmente erfolgte für 1 – 2 h bei einer Feldstärke von 5 V/cm. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgröße und zur Abschätzung der Konzentration wurden DNA-Längenstandards mit Fragmenten definierter Größe und bekannter Konzentration aufgetragen. Neben kommerziell erhältlichen DNA-Längenstandards wurden selbsterstellte Plasmid-Standards von A.H. Wolf und M. Giersberg eingesetzt (Längen in bp).

A-Standard: 6.991, 5.086, 3.992, 2.999, 2.357, 1.652, 1.389, 1.077, 516

M-Standard: 710, 498, 404, 367, 242, 190, 147, 118, 110, 67, 57

Zur Detektion separierter DNA-Fragmente wurde eine Ethidiumbromid-Behandlung durchgeführt (SHARP *et al.* 1973). Die Agarosegele wurden für 15 min in ein Wasserbad mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gelegt und anschließend gewässert. Die Trennung der DNA-Fragmente wurde auf einem UV-Leuchttisch (LKB 2011 MACP Transillumin, Pharmacia, Freiburg) kontrolliert sowie gegebenenfalls mittels einer Polaroidkamera (Polaroid DS-34 Direct Screen Instant Camera) mit Rotfilter fotografiert.

### 2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Rekombinante Plasmide wurden durch Verknüpfung (Ligation) von Vektor-DNA und Fremd-DNA mit T4-DNA-Ligase (Pharmacia, Freiburg; Gibco BRL, Eggenstein) hergestellt.

Um Fragmente mit kohäsiven Enden zu erzeugen, wurden PCR-Produkt und Vektor-DNA jeweils mit zwei Restriktionsendonukleasen geschnitten (2.2.6). Die Reinigung

der Ansätze erfolgte durch Phenol-Chloroform-Extraktion (2.2.4.1) und Sephacryl S-200 Schleudersäulen (2.2.4.2). Für die Ligation wurden Fremd-DNA und Vektor-DNA im Verhältnis von 2:1 (v/v) eingesetzt. Die Ligationsansätze wurden entweder 4 h bei 10° C oder 2 h bei 16° C inkubiert.

### 2.2.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR (nach SAIKI *et al.* 1988) wurde zur Amplifikation genomischer DNA und zur DNA-Sequenzierung eingesetzt. Die Methode beruht auf dem Prinzip zyklischer Wiederholungen von Denaturierung der *template*-DNA, Anlagerung sequenzspezifischer *Primer* und Synthese einer komplementären DNA-Kopie durch die thermostabile *Taq*-Polymerase. Bei Durchführung mehrere Zyklen kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der Zielsequenz.

#### 2.2.9.1 Amplifikation von Fragmenten aus cDNA

Die Reaktionsansätze enthielten eine *Primer*-Konzentration von 1 µM, je 200 µM Desoxyribonukleotide (dNTP) und 10 ng *template*-DNA. Die Ansätze hatten ein Volumen von 100 µl und wurden nach Zugabe aller Reagenzien mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und kurz zentrifugiert. Die thermostabile *Taq*-DNA-Polymerase (Gibco BRL, Eggenstein) wurde erst nach einem anfänglichen Denaturierungsschritt durch die Ölschicht hindurch zum Reaktionsgemisch pipettiert.

PCR-Protokoll für die Amplifikation der ATPase-Fragmente:

Zyklus A (1x)	5 min	95° C (Denaturierung)
Zyklus B (25x)	60 s	98° C (Denaturierung)
	60 s	50° C ( <i>Primer</i> -Anlagerung)
	90 s	72° C (Polymerisierung)
Zyklus C (1x)	10 min	72° C (Polymerisierung)

#### 2.2.9.2 Sequenzierung

Bei der Didesoxy-Sequenzierungsmethode (nach SANGER *et al.* 1977) werden *Primer* eingesetzt, die an der DNA-Matrize eine Einzelstrangsynthese initiieren. Die Synthese findet unter Verwendung von vier Desoxynukleotiden statt, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Durch Zusatz von Didesoxynukleotiden



werden Kettenabbrüche erzeugt, so daß DNA-Fragmente unterschiedlicher Längen entstehen. Die DNA-Fragmente wurden mit einer automatischen Sequenzieranlage (ABI PRISM™ 310, Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt) elektrophoretisch aufgetrennt, wobei die Fluoreszenzsignale durch einen Laserstrahl induziert und dem computergesteuerten Auswertungsprogramm ABI PRISM™ Sequencing Analysis 3.0 übermittelt wurden.

Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde das ABI PRISM™ dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit und das DYEnamic ET Cycle Sequencing Kit (beide Kits von Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt) eingesetzt. Die verwendeten Didesoxynukleotide sind mit fluoreszierenden dRhodamin-Farbstoffen gekoppelt. Für die Reaktion wurden 200 – 500 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Die *Primer*-Konzentrationen betragen 2 – 5 pmol. Das Reaktionsvolumen wurde auf die Hälfte, der Reaktionsmix auf ein Viertel des im Herstellerprotokoll angegebenen Volumens reduziert.

Standard-PCR-Protokoll für ABI PRISM™ dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit:

1 min 96° C (Denaturierung)  
30 s 50° C (*Primer*-Anlagerung)  
4 min 60° C (Polymerisierung)  
25 Zyklen

Standard-PCR-Protokoll für DYEnamic ET Cycle Sequencing Kit:

10 s 96° C (Denaturierung)  
5 s 50° C (*Primer*-Anlagerung)  
4 min 60° C (Polymerisierung)  
25 Zyklen

Die Aufreinigung der Sequenzierungsansätze erfolgte durch alkoholische Fällung. Bei Verwendung des ABI PRISM™ dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits wurde der Reaktionsansatz mit 37 µl 70 %-igem Ethanol/0,5 mM MgCl<sub>2</sub> für 15 min bei RT präzipitiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 12.000 g (14.000 Upm Eppendorf-Tischzentrifuge, 5415C) und RT wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei 90° C für 1 min im Heizblock getrocknet.

Sequenzierungsreaktionen mit dem DYEnamic ET Cycle Sequencing Kit durchgeführt, wurden durch alkoholische Fällung mit Natriumacetat/EDTA-Puffer aufgereinigt.

Natrium-Acetat/EDTA-Puffer:	1,5 M	Natriumacetat
	250 mM	EDTA

Die Pellets wurden in 17 µl TSR (Template Suppression Reagent, Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt) resuspendiert. Zum Denaturieren wurden die Proben für 2 min auf 95° C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt. Bis zur Elektrophorese wurden sie auf Eis aufbewahrt.

### 2.2.10 Kultivierung von HeLa-Zellen

Die Anzucht der HeLa-Zellen erfolgte nach den Anweisungen des Lieferanten (DSM GmbH, Braunschweig) in MEM-Medium (Gibco BRL, Eggenstein) bei 37° C in einem 5 %-CO<sub>2</sub>-Milieu.

MEM-Medium:	MEM-Medium versetzt mit	
	10 µg/ml	Na-Pyruvat
	50 µg/ml	Penicillin
	50 µg/ml	Streptomycin
	10 % (w/v)	fötale Kälberserum (FKS) (Biochrom, Berlin)

Die Weiterzüchtung bereits aktiver Kulturen erfolgte in MEM- oder RPMI 1640-Medium (Biochrom KG, Berlin). Die Teilung des Zellgutes erfolgte alle drei Tage unter Zugabe frischen Mediums.

Nach Stabilisierung der Zellen in RPMI 1640-Medium (Biochrom KG, Berlin) wurden Monolayerkulturen in 250 ml Kulturflaschen angelegt und diese bei 37° C und 5 %-CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Medium wurde jeden dritten Tag gewechselt und die Zellen passagiert, sobald sie auf dem Kulturflaschenböden konfluente Zellschichten bildeten. Dazu wurden neue Kulturflaschen mit 1 – 2 x 10<sup>5</sup> Zellen in 15 ml Medium ange-setzt.

### 2.2.11 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der Trypan-Blau-Exklusionstest angewendet (HOSKINS *et al.* 1956). Trypan-Blau färbt defekte und durchlässige Zellen, intakte und somit teilungsfähige Zellen bleiben hell. Die Ermittlung der Lebend-Zellzahl erfolgte mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. 200 µl Zellsuspension wurden mit

200 µl steril filtrierter Farblösung vermischt, mit einer Pasteurpipette auf die Zählkammer gegeben und ausgezählt.

Trypan-Blau-Lösung:     150 mM     NaCl  
                           0,3 % (w/v) Trypan-Blau (Merk, Darmstadt)

### 2.2.12 Anzucht auf Objektträgern

Zur Transfektion wurden die HeLa-Zellen auf Objektträgern bis zu einer Konfluenz von 60 – 80 % angezchtet. Zur Anzucht der Zellen auf Objektträgern wurden Flexiperm-Slides (Heraeus-Biotechnologie, Hanau) in Kombination mit Objektträgern verwendet. Das Flexiperm-Slide bildet die Wände, der Objektträger den Boden eines Blocks von acht Gewebekulturkammern mit je 300 µl Fassungsvermögen. Objektträger und Flexiperm-Slides wurden für 1 h in 75 %-igem Alkohol desinfiziert und anschließend getrocknet. Die Flexiperm-Slides wurden unter Druck auf die Objektträger gepreßt, so daß pro Objektträger acht Kammern entstanden. In jede Kammer wurde 100 µl verdünntes ECM-Gel (Sigma, Deisenhofen) gegeben. Das Gel trocknete 30 min und wurde dann mit 300 µl HBSS-Puffer (Gibco BRL, Eggenstein) gewaschen. Am Tag vor der Transfektion (2.2.13) wurde jede Kammer mit 300 µl Zellsuspension ( $4 \times 10^5$  Zellen) der Monolayerkultur befüllt und über Nacht bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert.

### 2.2.13 Liposomentransfektion von HeLa-Zellen

Die Transfektion von HeLa-Zellen mit rekombinanter Plasmid-DNA erfolgte mittels Liposomentransfektion (RUYSSCHAERT *et al.* 1994). Das verwendete Clonfectin-Transfektionsreagenz (Clontech, USA) ist ein amphiphiles Lipid, dessen kationischer Anteil mit der Plasmid-DNA interagiert und hydrophobe Komplexe bildet. Der Clonfectin/DNA-Komplex assoziiert mit der Zelloberfläche und ermöglicht so den Transfer der DNA durch Endocytose in die Zelle. Am Tag der Transfektion wurde die Liposomenlösung frisch angesetzt. 90 µl HBS-Puffer wurden auf 55° C erhitzt und tropfenweise zur Clonfectin-Stammlösung gegeben (Endkonzentration 1 µg/µl). Die Lösung wurde geschüttelt und auf Eis gekühlt. Für jeden Transfektionsansatz von 2 ml wurde eine Plasmid- (Lösung A) und eine Clonfectin-Lösung (Lösung B) hergestellt:

Lösung A:     4 µg Plasmid-DNA  
              100 µl serumfreies Medium

Lösung B:        4 µg Clonfectin (1 µg/µl in HEPES-NaCl-Puffer, pH 7,4)  
                   100 µl serumfreies Medium

Lösungen A und B wurden vermischt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde pro Ansatz 1,8 ml serumfreies Medium zugegeben. Das Medium der Übernachtskulturen wurde entfernt, die Transfektionslösung wurde auf die HeLa-Zellen pipettiert und diese für 4 h bei 37° C und 5 %-CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach 4 h wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen, frisches Kulturmedium dazugegeben und erneut unter den gleichen Bedingungen wie oben angegeben inkubiert. Nach 24 – 48 h wurden Zellen mit transienter Genexpression mittels Fluoreszenzmikroskopie selektiert.

HBS-Puffer:        150 mM    NaCl  
                       20 mM    HEPES

---

pH 7,3; autoklaviert

Kulturmedium:    RPMI 1640-Medium (Biochrom KG, Berlin) versetzt mit  
                           2 mM    L-Glutamin  
                           10 µg/ml Na-Pyruvat  
                           2 mg/ml NaHCO<sub>3</sub>  
                           0,35 µl/ml β-Mercaptoethanol  
                           100 µg/ml Penicillin  
                           50 µg/ml Streptomycin

PBS-Puffer:        10 mM    Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                           1,8 mM    KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                           137 mM    NaCl  
                           2,7 mM    KCl

---

pH 7,2; steril filtriert

### 2.2.14 Morphologische Präparate

Zur Herstellung einer Fixierlösung wurde Paraformaldehyd 3,7 %-ig in PBS-Puffer unter Rühren auf 60° C erhitzt und der pH auf 7,4 eingestellt. Objektträger mit HeLa-Zellen wurden für 10 min in die Lösung getaucht und anschließend dreimal

mit PBS-Puffer gewaschen. Je nach Verwendungszweck wurde eventuell noch eine Kernfärbung (2.2.15) durchgeführt. Abschließend wurde mit Wachs ein Deckglas auf dem Objektträger fixiert.

### 2.2.15 Kernfärbung mit H33342

Der Hoechst-Farbstoff H33342 interkaliert mit der DNA im Kern lebender Zellen. Die Zellkerne lebender Zellen fluoreszieren dadurch nach Anregung mit 460 nm blau (PREISLER 1987). Die H33342-Stammlösung wurde 1:1000 mit PBS verdünnt und auf Zellen gegeben, die zuvor vom Medium befreit wurden. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen bei einer Wellenlänge von 460 nm im Fluoreszenzmikroskop untersucht und ausgewertet.

### 2.2.16 Kultivierung von COS-7-Zellen

Zur Vorbereitung der Transfektion wurden COS-7-Zellen auf einer 10 cm Kulturschale ausplattiert und im Brutschrank bei 37° C in einem 5 %-CO<sub>2</sub>-Milieu kultiviert. Sobald sich eine konfluente Zellschicht gebildet hatte, wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und durch Behandlung mit Trypsin vom Kulturschalenboden abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in ein Einweg-Polypropylenreagenzröhrchen überführt und 30 min bei 800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 30 ml Kulturmedium resuspendiert. Jeweils 2 ml Zellsuspension wurde auf 3,5 cm Kulturschalen verteilt und im Brutschrank bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % angezchtet.

Kulturmedium:	DMEM High Glucose (Gibco BRL, Eggenstein), versetzt mit
	10 % (w/v) FKS (Biochrom, Berlin)
	2 mM L-Glutamin
	100 mg/l Penicillin
	100 mg/l Streptomycin

### 2.2.17 Liposomentransfektion von COS-7-Zellen

Die Transfektion von COS-7-Zellen mit rekombinanter Plasmid-DNA erfolgte wie bei HeLa-Zellen mittels Liposomentransfektion (2.2.13). Jeder Transfektionsansatz enthielt 5 µg Plasmid-DNA.

Für Transfektionsansätze von je 1 ml wurden eine Plasmid- (Lösung A) und eine Lipofectamin-Lösung (Lösung B) hergestellt.

Lösung A:                    5 µg Plasmid-DNA  
                                  ad 100 µl mit serumfreiem Medium aufgefüllt

Lösung B:                    6 µl Lipofectamin (Gibco BRL, Eggenstein)  
                                  94 µl serumfreies Medium

Serumfreies Medium: DMEM High Glucose versetzt mit  
                                  2 mM L-Glutamin

Lösungen A und B wurden vermischt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 800 µl serumfreies Medium hinzugefügt.

Vor der Transfektion der COS-7-Zellen wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit serumfreiem Medium gewaschen und anschließend der Lipofectamin-DNA-Mix auf die Zellen pipettiert. Die Inkubation erfolgte 5 – 6 h bei 37° C in 5 %-igem CO<sub>2</sub>-Milieu. Anschließend wurde jedem Transfektionsansatz 1 ml Kulturmedium versetzt mit 20 % FKS zugegeben. Am nächsten Morgen erfolgte ein Wechsel in Standard-Kulturmedium.

Vor Überprüfung der Genexpression unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen auf sterile, Gelatine-beschichteten Objektträger übertragen.

### 2.2.18 Fixierung von COS-7-Zellen

Die mit Zellen behafteten Objektträger wurden zur Fixierung mehrmals mit Methanol gespült und mit Eukitt (Novoglas, Bern) eingedeckt.

### 2.2.19 Axenische Kulturen von Tabakpflanzen

Axenische Kulturen wurden aus Tabaksamen der Sorte *Nicotiana tabacum* L. cv Samsun NN angezogen. Als Anzuchtgefäß dienten autoklavierte Einweckgläser (Weck, Wehr), die mit 120 – 200 ml Murashige & Skoog Nährmedium gefüllt wurden. Zur Desinfektion der Samen wurden diese für 20 min in 10 %-iger Natriumhypochloridlösung, die zum Abbau der Oberflächenspannung mit einem Tropfen Tween 20 Detergenz versetzt wurde, leicht geschwenkt und anschließend fünfmal mit sterilem

Wasser gewaschen. Pro Einweckglas wurde je ein Samen auf das Nährmedium gelegt und die Deckel mit Parafilm verschlossen. Alle Schritte wurden steril durchgeführt. Die Anzucht erfolgte im Klimaschrank (I-36LLVL, Percival Scientific, Perry, Iowa, USA) bei einem Licht/Dunkel Rhythmus mit Temperaturveränderungen von 16 h bei 24,1° C und 8 h bei 21° C.

Murashige & Skoog Nährmedium:

100 ml	Lösung I
100 µl	Lösung II
1 ml	Lösung III
1 ml	Kinetin
1 ml	Thiamin
1 ml	2,4 D
1 ml	IAA/NAA
100 mg	MES
100 mg	myo-Inositol
1 g	Casein (enzymatisch hydrolysiert)
30 g	Saccarose
8 g	Agar

---

ad 1.000 ml H<sub>2</sub>O-Bidest, pH 5,4; autoklaviert

Murashige & Skoog Basismedium (Lösung I):

200 mM	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
0,1 mM	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
30 mM	CaCl <sub>2</sub>
1 mM	EDTA
1 mM	FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O
15 mM	MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O
1 mM	MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O
190 mM	KNO <sub>3</sub>
12,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,53 mM	ZnSO <sub>4</sub>

Cobalt/Kupfer-Lösung (Lösung II):

1 mM	CoCl <sub>2</sub>
1 mM	CuSO <sub>4</sub>

Molybdän/Jod-Lösung (Lösung III):

1 mM	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>
5 mM	KJ

### 2.2.20 Präparation von Tabak-Protoplasten

Die Blätter von drei in axenischer Kultur gewachsenen 10 – 12 Wochen alten Tabakpflanzen wurden auf der Unterseite mit einem Skalpell in Abständen von 1 – 2 mm eingeritzt und die Mittelrippen entfernt. Die so behandelten Blätter wurden mit der Blattunterseite nach unten in Petrischalen mit 7 ml Enzymlösung gelegt und über Nacht im Dunkeln bei 24,1° C inkubiert. Macerozyme verdauen dabei die Mittellamellen, Cellulasen entfernen die Zellwände und die Protoplasten werden freigesetzt.

Am nächsten Morgen wurden die Petrischalen leicht geschwenkt, um die Protoplasten aus den Zellfragmenten zu lösen. Nach 30-minütiger Inkubation wurde die Protoplastensuspension anschließend über ein 125 µm-Sieb gegeben. Das Sieb wurde mit Elektroporationspuffer nachgespült und die erhaltene Protoplastensuspension in 50 ml Einweg-Polypropylenröhrchen für 20 min bei 64 g im Vollausschwingrotor (#2252M, Megafuge 1.OR, Heraeus Instruments, Hanau) bei RT und ausgeschalteter Rotorbremse zentrifugiert. Lebende Protoplasten sammelten sich an der Lösungsoberfläche, tote mit den Zelltrümmern am Boden des Polypropylenröhrchens. Mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (Cyclo I, Roth, Karlsruhe) wurden Pellet und Lösung vorsichtig abgesaugt. Die lebenden Protoplasten wurden in 40 ml Elektroporationspuffer aufgenommen und 15 min bei 115 g unter den oben beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Pellet und Lösung wurden erneut abgesaugt und die Protoplasten in 25 ml Elektroporationspuffer aufgenommen. Nach dem letzten Aufreinigungsschritt (115 g, 5 min) wurden die Protoplasten erneut in Elektroporationspuffer aufgenommen. Alle Präparationsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Protoplastenzahl wurde mit einer Jessen-Zählkammer bestimmt.

Enzymlösung :	0,4 % (w/v) Cellulase (Onozuka R10, Tokio, Japan)
	0,2 % (w/v) Macerozyme

---

in TEX-Puffer gelöst, 30 min gerührt und 5 min zum Entfernen unlöslicher Partikel bei 2500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde steril filtriert.

TEX-Puffer:	Gamborg's B-5 Basis Salz Mix für 1 l (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) versetzt mit
	2,5 mM MES
	6,7 mM CaCl <sub>2</sub>
	3,1 mM NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
	0,4 M Saccharose

---

pH 5,7; steril filtriert



Elektroporationspuffer:	0,4 M	Saccharose
	10 mM	HEPES
	80 mM	KCl
	5,4 mM	CaCl <sub>2</sub>

---

pH 7,2; steril filtriert

### 2.2.21 Elektroporation von Tabak-Protoplasten

Die Transfektion von Vektor-DNA in Tabak-Protoplasten erfolgte durch Elektroporation. 500 µl der Protoplastenlösung ( $2 - 5 \times 10^6$  Protoplasten/ml) wurden in sterilen Einweg-Elektrodenküvetten (0,4 cm Elektrodenabstand, Bio-Rad, München) mit 30 – 100 µg Vektor-DNA (in 100 µl Elektroporationspuffer) gemischt und 5 min bei RT bis zur Transfektion inkubiert. Zur Elektroporation wurde eine Gerätekombination der Firma Biorad, bestehend aus Pulsgenerator (Gene Pulser II) und parallel geschaltetem Puls kontrollgerät (Puls Controller) benutzt. Die Elektroporation erfolgte bei 925 µF und 160 V. Nach dem Strompuls wurden die Protoplasten 30 min bei RT inkubiert und anschließend in 2 ml TEX-Puffer überführt. Die mikroskopische Analyse der Genexpression erfolgte 24 und 48 h nach Transfektion. Bis dahin wurden die Protoplasten bei 24,1° C im Dunkeln inkubiert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Klonierungsstrategie für die Expression von ATPase-GFP-Fusionsvektoren in Tabak-Protoplasten

Ausgangspunkt der Arbeit bildeten die beiden Plasmide pDL20/14 und pDL10. pDL20/14 enthielt cDNA des Aminoterminus des Proteins DBCA1, eine aus *Dunaliella bioculata* isolierte putative Ca<sup>2+</sup>-ATPase (RASCHKE & WOLF 1996). Plasmid pDL10 kodiert für den Aminoterminus der aus *Dunaliella bioculata* isolierten putativen H<sup>+</sup>-ATPase DBPMA1 (WOLF 1993, WOLF *et al.* 1995).

Zur *in vivo* Lokalisation der ATPasen DBCA1 und DBPMA1 in heterologen Expressionssystemen bietet sich die Fusion mit dem Reportergen GFP an. Bei N-terminaler Fusion des GFP mit den beiden ATPasen wird das Startcodon der ATPase als Translationsstart des Fusionsgens benutzt. Daher werden von der Expression der ATPase-GFP-Fusionsproteine Hinweise über die subzelluläre Lokalisation von DBCA1 und DBPMA1 erhofft. Ferner können durch diese Strategie die tatsächlich genutzten Startcodons und N-terminale Signalsequenzen analysiert werden.

Welche Sequenzbereiche der ATPasen für ihre subzelluläre Lokalisation verantwortlich sind, ist weitestgehend unbekannt. Immunofluoreszenzuntersuchungen mit tierischen rekombinanten Chimären einer Ca<sup>2+</sup>-ATPase aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SER) und einer Ca<sup>2+</sup>-ATPase der Plasmamembran (PM) haben jedoch gezeigt, daß die Zielsteuerungssignale der SER-ständigen Ca<sup>2+</sup>-ATPasen durch Aminosäuresequenzen im ersten Transmembransegment festgelegt sind und auch die plasmamembranständige Ca<sup>2+</sup>-ATPase rSERCA1 N-terminale Signalsequenzbereiche besitzen könnte (FOLETTI *et al.* 1995).

Aufgrund der Ergebnisse von FOLETTI *et al.* (1995) wurde angenommen, daß am N-Terminus gelegene Sequenzbereiche, einschließlich der ersten beiden Transmembransegmente von DBCA1 und DBPMA1, für das *Targeting* von ATPase-Reporterprotein-Chimären ausreichen.

Die Lokalisation der H<sup>+</sup>-ATPase in der Plasmamembran kann aufgrund von 78 % Identität und 87 % Ähnlichkeit zur Primärstruktur der plasmamembranständigen H<sup>+</sup>-ATPase aus *Dunaliella acidophila* als gesichert angesehen werden. Daher kann die subzelluläre Lokalisation der N-terminal GFP-markierten Sequenzbereiche als interner Standard zur Interpretation der Lokalisation der Ca<sup>2+</sup>-ATPase-GFP-Chimären angesehen werden.

Die Transfektion von *Dunaliella* ist trotz ausführlicher Versuchsreihen in unserem Labor bis jetzt nicht gelungen (B. EBERT, persönliche Mitteilung). Daher dienten in der vorliegenden Arbeit Tabak-Protoplasten als pflanzliches Expressionssystem. Als Expressionsvektor wurde HBT-L verwendet (Abb. 2). Er enthält eine für pflanzliche Systeme optimierte GFP-Sequenz mit verstärktem Fluoreszenzsignal bei 510 nm

(CHIU *et al.* 1996, HAAS *et al.* 1996). Die GFP-Variante sGFP-S65T bietet darüber hinaus den Vorteil, ein in den längerwelligen Lichtbereich verschobenes Anregungsmaximum zu haben. Photochemische Schäden des zu untersuchenden Pflanzenmaterials werden so vermindert bzw. vermieden und die starke Autofluoreszenz des Pflanzenmaterials unter UV-Licht-Anregung wird minimiert. Fusionen am N-Terminus des sGFP-S65T ermöglichten Expressionsstudien der Fusionsproteine unter Berücksichtigung möglicher ATPase-Translationsstartcodons. Die Expression der Fusionsproteine fand unter Kontrolle des starken HBT-Promotors statt (SHEEN 1993).

### 3.1.1 Analyse der Translationsstartsignale der H<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-ATPase aus *Dunaliella bioculata*

Mehrere ATG-Tripletts, die als Translationsstart interpretiert werden könnten, befinden sich im jeweils längsten offenen Leserahmen der Nukleinsäuresequenz der Ca<sup>2+</sup>- und H<sup>+</sup>-ATPase aus *Dunaliella bioculata*.

Im 5'-Bereich des Ca<sup>2+</sup>-ATPase-Gens liegen drei mögliche Startcodons. Das erste ATG befindet sich an Position 48 – 50, weitere Methionin-kodierende Basentripletts sind an Position 96 – 98 und 117 – 119 lokalisiert (Abb. 3). Die H<sup>+</sup>-ATPase DBPMA1 enthält im 5'-Bereich an Position 23 – 25 und 72 – 74 jeweils ein ATG (Abb. 4).

AAAAATCAAATAAACATCATGTTTAGGGGAACCTTGGAA <b>ATG</b> GTGAGCCACG	60
M V S H	4
CTTCATCAGGAAGGCCTTCCTCAAGGGACACTGGA <b>ATG</b> GTGTACCTGGGCCTTGGAA <b>ATGC</b>	120
A S S G R P S S R D T G M V Y L G L G M	24
AGGACGCCTACTCCAGTGAAGTCCAGGAGGTGGCTGCTTCTATCATGTGGATTTGGACA	180
Q D A Y S S E V Q E V A A F Y H V D L D	44
GGGGCTTTCTGACAGGGATGTGCAGCAGGCCCGCATCAAGTATGGCAGAAACCAGATGG	240
R G L S D R D V Q Q A R I K Y G R N Q M	64
AGGCTGAGCAGAGTACACCTCTGTGGAAGCTAATTTTGAAGCAGTTTGATGATCTTCTTG	300
E A E Q S T P L W K L I L K Q F D D <u>L L</u>	84
TCAAGATCTTGCTGGGGCAGCCATCGTGGACTTCATAATTGCGATAAGTGAGGGGGAGA	360
<u>V K I L L G A A I V D F I I A I S E G E</u>	104
GCATTCAGAGTGGATTGATAGAGCCCATGGTCATCCTGTTGATTTTGGTGGCAAACGCCA	420
S I Q S <u>G L I E P M V I L L I L V A N A</u>	124
CTGTGGGGTAGTCACGGAGCGCAACGCTGAGAAAGCCATAGAGCAGTTAAAATCTTATG	480
<u>T V G V V T E R N A E K A I E Q L K S Y</u>	144
AGGCAGATGATGCCACAGTGCTCCGGAATGGCCAGCTGCAGCTGATTCATCTGCTGACA	540
E A D D A T V L R N G Q L Q L I P S A D	164
TCGTACCGGGGATATCGTAGAGCTTGCAAGTGGGCAACAAGGTACCTGCGGATACCAGGG	600
I V P G D I V E L A V G N K V P A D T j R	184

#### Abb. 3: Aminoterminaler Nuklein- und Aminosäuresequenz von DBCA1

Die Nukleotidsequenz des Klons pDL20/14 ist in 5' → 3' Orientierung angegeben. Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz ist darunter abgebildet. Die beiden Transmembransegmente sind unterstrichen. Die drei als mögliche Startcodons in Frage kommenden **ATG**-Tripletts sind durch Fettdruck hervorgehoben.



Für die Ca<sup>2+</sup>-ATPase DBCA1 ergab ein Sequenzvergleich der Basen in unmittelbarer Umgebung der drei ATG-Triplets am N-Terminus mit den tierischen und pflanzlichen Consensus-Sequenzen keine Hinweise auf das als Startcodon genutzte ATG. So sind die Basensequenzen vor dem jeweiligen ATG bei allen drei identisch, zeigen aber zu den Consensus-Sequenzen keine oder nur geringe Übereinstimmungen. Nur bei dem ersten und zweiten an Position 48 – 50 und 96 – 98 gelegenen ATG-Triplets zeigte sich nach dem jeweiligen ATG mit der für pflanzliche Transkripte ermittelten Consensus-Sequenz in der Base Guanin eine Übereinstimmung (Tab. 5).

Position	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6
M1 (Position 48 – 50)	T	G	G	<u>A</u>	<b>A</b>	<b>T</b>	<u>G</u>	<u>G</u>	T	G
M2 (Position 96 – 98)	T	G	G	<u>A</u>	<b>A</b>	<b>T</b>	<u>G</u>	<u>G</u>	T	G
M3 (Position 117 – 119)	T	G	G	<u>A</u>	<b>A</b>	<b>T</b>	<u>G</u>	C	T	G
Pflanzliche Consensus-Sequenz	A	A	C	A	A	T	G	G	C	
Tierische Consensus-Sequenz	C	A	C	C	A	T	G			

**Tab. 5: Umgebung der Translationsstartcodons von dca1**

Die Bezeichnung der Nukleinsäuresequenz von DBCA1 ist dca1. Übereinstimmungen der Basen in unmittelbarer Umgebung der am Aminoterminal befindlichen drei ATG-Triplets mit dem pflanzlichen Consensus sind unterstrichen, Übereinstimmungen mit dem **tierischen Consensus** sind durch Fettdruck gekennzeichnet.

Da die unmittelbare Nähe der ATG-Triplets keine Ähnlichkeiten zu Consensus-Sequenzen zeigte, die Aufschluß über den Translationsstart hätten geben können, wurden Aminosäuresequenzvergleiche mit Typ IIA Ca<sup>2+</sup>-ATPasen des ER (Abb. 5) und verschiedenen tierischen Ca<sup>2+</sup>-ATPasen des (S)ER (RASCHKE 1996) im Hinblick auf das Translationsstartcodon durchgeführt.

Die Konservierung bestimmter Aminosäuresequenzen ist ein typisches Merkmal von P-Typ ATPasen. Sechs Aminosäuresequenzen lassen sich definieren, die in allen eukaryontischen P-Typ ATPasen vollständig konserviert sind und an nahezu identischen Positionen in der Aminosäureabfolge vorkommen (GREEN 1989, SERRANO 1989).

Im parallelen Mehrfachabgleich zeigte sich, daß die Anzahl an Aminosäuren zwischen dem ersten Methionin und den konservierten Bereichen der ersten und zweiten Transmembrandomäne bei sechs der acht tierischen und pflanzlichen Typ IIA ATPasen nahezu identisch ist.

Bei fünf der sieben ATPasen stimmte die Position ihres Startcodons mit dem an Position 24 befindlichen Methionin von DBCA1 genau überein. Ab dieser Position an zeigt DBCA1 größte Ähnlichkeiten zu anderen Typ IIA ATPasen, denen im Vergleich zu DBCA1 ein verlängerter N-Terminus fehlt.

Eine Ausnahme bildet ACA3 aus *Arabidopsis thaliana*, dessen Startcodon mit dem

an Position 1 liegenden Methionin von DBCA1 zwar übereinstimmt, aber wenig Sequenzhomologien zu den anderen Typ IIA Ca<sup>2+</sup>-ATPasen in den N-terminalen Aminosäuren aufweist.

Aufgrund der Aminosäuresequenzvergleiche läßt sich das an Position 24 befindliche Methionin von DBCA1 als Translationsstartcodon favorisieren.

(1)	<b>M</b> VSHASSGRPSSRDT <b>G</b> MVYLGL <b>G</b> MQDAYSSSEVQEVAAFYHVDLDRGLSDRDVQQARIKYG	60
(2)	<b>M</b> ENASSKDIQYVADFYRVDLNQLTNADANQARLIHG	60
(3)	<b>M</b> GKGSSEDLVKKESLNSTPVNSDTFFAWAKDVAECEEHFVVSREKGLSSDEVLRKHQIYGL	60
(4)	<b>M</b> EVKRFGRSSEEVLNIGVNETGLSIDTVKCRKERYGL	60
(5)	<b>M</b> EKPFPAWSWSVDQCLKEYQVKLEKGLSTYEVDKRRERYG	60
(6)	MENAHTKSPAECCLSYFGVNEHTGLSPDQFKKNLDFKFG	60
(7)	<b>M</b> EQAHTKTTEECLAYFGVNENTGLSLDQVKKNFDFKFG	60
(8)	<b>M</b> EDGHSKTVEQSLNFFFGTDPERGLTLDQIKANQKKG	60
(1)	RNQMEEQSTPLWKLILKQFDDLLVKILLGAAIVDFIIAI-SEGESI---QSGLIEPMVI	120
(2)	NNEIAADPGTPLWKLILKLLVLLVKILIVAAIVDLVIS-FAEGGIG---LSAVIEPGVI	120
(3)	NELEKPEGTSIFKLLILEQFNDTLVRILLAAAVISFVLAFDFGDEGGEMGITAFVEPLVI	120
(4)	NNELFFEEGKTVRSVLVEQFHDILVKILLNAAYISFVLAYIEEGEAGFTAYVEPIVIFLI	120
(5)	LNELEKEKGPLWRLVLEQFDDTLVKILLGAAVIFSVLAVVNOQDETGESGFEAYVEPLVI	120
(6)	YNELPAEEGKSIWDLIVEQFEDLLVRILLLAACISFVLAWFEEGEEETITAFVEPFVILLI	120
(7)	PNELPAEEGKSLWELVAEQFEDLLVRILLLAIIISFVLAWFEEGEEETVTAFVEPFVILLI	120
(8)	PNELPTEEGKSIWQLVLEQFDDLLVKILLLAIIISFVLALFEEHEETFTAFVEPLVILLI	120

### Abb. 5: Vergleich der Primärstrukturen pflanzlicher und tierischer Ca<sup>2+</sup>-ATPasen des (S)ERs

Der parallele Mehrfachabgleich setzt sich aus den N-terminalen Aminosäuresequenzen verschiedener Typ IIA Ca<sup>2+</sup>-ATPasen unterschiedlicher Organismen zusammen. (1) *Dunaliella bioculata* DBCA1 (X73901), (2) *Acetabularia acetabulum* AACA1 (RASCHKE 1996), (3) *Arabidopsis thaliana* ACA3 (U93845), (4) *Oryza sativa* (U82966), (5) *Lycopersicon esculentum* (M96324), (6) *Makaira nigricans* (U65228), (7) *Rana esculenta* SERCa1 (X63009), (8) *Drosophila melanogaster* (P22700). Die **Methionine** sind durch Fettdruck hervorgehoben, die ersten beiden **Transmembransegmente** sind grau unterlegt. Unter den in Klammern angegebenen Zugangsnummern sind die vollständigen Aminosäuresequenzen der Klone in der Datenbank des NCBI aufgeführt.

#### 3.1.2 Konstruktion von ATPase-sGFP-S65T-Fusionsvektoren für die Transfektion von Tabak-Protoplasten

Bei der H<sup>+</sup>-ATPase konnte das erste an Position 23 – 25 befindliche ATG (Position 1 in der Aminosäuresequenz von DBPMA1) aufgrund der Homologie seiner umgebenden Basen zur tierischen Consensus-Sequenz als Startcodon favorisiert werden (Tab. 4).

Bei dem Aminosäure-Sequenzvergleiche von DBCA1 mit verschiedenen Typ IIA Ca<sup>2+</sup>-ATPasen im Hinblick auf das Translationsstartcodon (Abb. 5) wurde angenommen, daß das Methionin an Position 24 (Position 117 – 119 in der Nukleinsäure-

sequenz von pma1) als Startcodons fungiert. Wie bereits erwähnt, werden Signalsequenzen bzw. Signalsequenzbereiche für das Protein-*Targeting* am N-Terminus einschließlich der ersten beiden Transmembransegmente der beiden ATPasen vermutet. Die genauen *Targeting*-Motive und ihre Lokalisation in der Aminosäuresequenz sind unbekannt.

Da sich zwischen den Position 48 und 117 der Ca<sup>2+</sup>-ATPase und Position 23 und 78 der H<sup>+</sup>-ATPase keine weiteren Stopcodons in der Nukleotidsequenz befinden, konnte nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden, daß die Translation in *Dunaliella bioculata* doch am jeweils ersten bzw. zweiten ATG beginnt.

Es sollte sicher gestellt werden, daß alle Sequenzbereiche, die für das Protein-*Targeting*, zwischen dem ersten und zweiten ATG bei DBPMA1 bzw. ersten und dritten ATG von DBCA1 liegen könnten, berücksichtigt werden. Daher wurden mit PCR aus dem cDNA-Klon pDL20/14 der Ca<sup>2+</sup>-ATPase drei, aus dem Klon pDL10 der H<sup>+</sup>-ATPase zwei Genfragmente mit unterschiedlich langen N-Termini amplifiziert.

Mit den *Primern* DBCAT-M1, DBCAT-M2, DBCAT-M3 und dem reversen *Primer* rDBCAT wurden aus dem cDNA-Klon pDL20/14 der Ca<sup>2+</sup>-ATPase aus *Dunaliella bioculata* die drei Fragmente M1-Ca<sup>2+</sup>-T, M2-Ca<sup>2+</sup>-T und M3-Ca<sup>2+</sup>-T amplifiziert. Sie hatten eine Länge von 487, 438 und 416 bp. Vor den jeweiligen Startcodons wurde der Basenkontext bezüglich der für höhere Pflanzen postulierten Consensus-Sequenz (LÜTCKE *et al.* 1987) nicht optimiert. Die natürliche Umgebung bis zur Base -6 relativ zum A des ATG der Nukleinsäuresequenz von DBCA1 wurde beibehalten. Mit den *Primern* DBHT-M1, DBHT-M2 und dem reversen *Primer* rDBHT wurden aus dem cDNA-Klon pDL10 der H<sup>+</sup>-ATPase von *Dunaliella bioculata* zwei DNA-Fragmente amplifiziert und mit M1-H<sup>+</sup>-T und M2-H<sup>+</sup>-T bezeichnet. Sie hatten eine Länge von 475 und 429 bp. Auch bei diesen Fragmenten wurde auf eine zusätzliche Anpassung der Consensus-Sequenz um das jeweils erste AGT verzichtet und die natürliche Basenumgebung der beiden ATG-Motive bis zur Base -6 beibehalten.

Die in den Reaktionen verwendeten *Primer* waren mit Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *Bam* HI und *Kpn* I ausgestattet. Die fünf PCR-Fragmente und der Expressionsvektor HBT-L wurden mit *Bam* HI und *Kpn* I geschnitten und ihre überhängenden komplementären Enden durch eine Ligationsreaktion miteinander verknüpft. Die so konstruierten Plasmide wurden nach ihren PCR-Fragmenten M1-Ca<sup>2+</sup>-T-sGFP-S65T, M2-Ca<sup>2+</sup>-T-sGFP-S65T, M3-Ca<sup>2+</sup>-T-sGFP-S65T, M1-H<sup>+</sup>-T-sGFP-S65T und M2-H<sup>+</sup>-T-sGFP-S65T benannt.

M1-Ca <sup>2+</sup> -T-Fragment	kodierte für den N-Terminus der Ca <sup>2+</sup> -ATPase, beginnend am ersten ATG, einschließlich der ersten beiden Transmembransegmente. Es wurde mit den <i>Primern</i> DBCAT-M1 und rDBCAT-C1 amplifiziert und hatte eine Länge von 487 bp.
---------------------------------	--

M2-Ca <sup>2+</sup> -T-Fragment	kodierte für den bis zum zweiten ATG verkürzten N-Terminus von DBCA1, einschließlich der ersten beiden Transmembransegmente. M2-Ca <sup>2+</sup> wurde mit den <i>Primern</i> DBCAT-M2 und rDBCAT-C1 amplifiziert und hatte eine Länge von 438 bp.
M3-Ca <sup>2+</sup> -T-Fragment	kodierte für den bis zum dritten ATG verkürzten N-Terminus von DBCA1, einschließlich der ersten beiden Transmembransegmente. Es wurde mit den <i>Primern</i> DBCAT-M3 und rDBCAT-C1 amplifiziert und hatte eine Länge von 416 bp.
M1-H <sup>+</sup> -T-Fragment	kodierte für den kompletten N-Terminus und die ersten beiden Transmembransegmente von DBPMA1, beginnend am ersten ATG. Es wurde mit den <i>Primern</i> DBHT-M1 und rDBHT amplifiziert und hatte eine Länge von 475 bp.
M2-H <sup>+</sup> -T-Fragment	kodierte für den bis zum zweiten ATG verkürzten N-Terminus von DBPMA1, einschließlich der ersten beiden Transmembransegmente, und wurde mit den <i>Primern</i> DBHT-M2 und rDBHT amplifiziert. Es hatte eine Länge von 429 bp.

### 3.2 Expression von ATPase-GFP-Fusionsproteinen in Tabak-Protoplasten

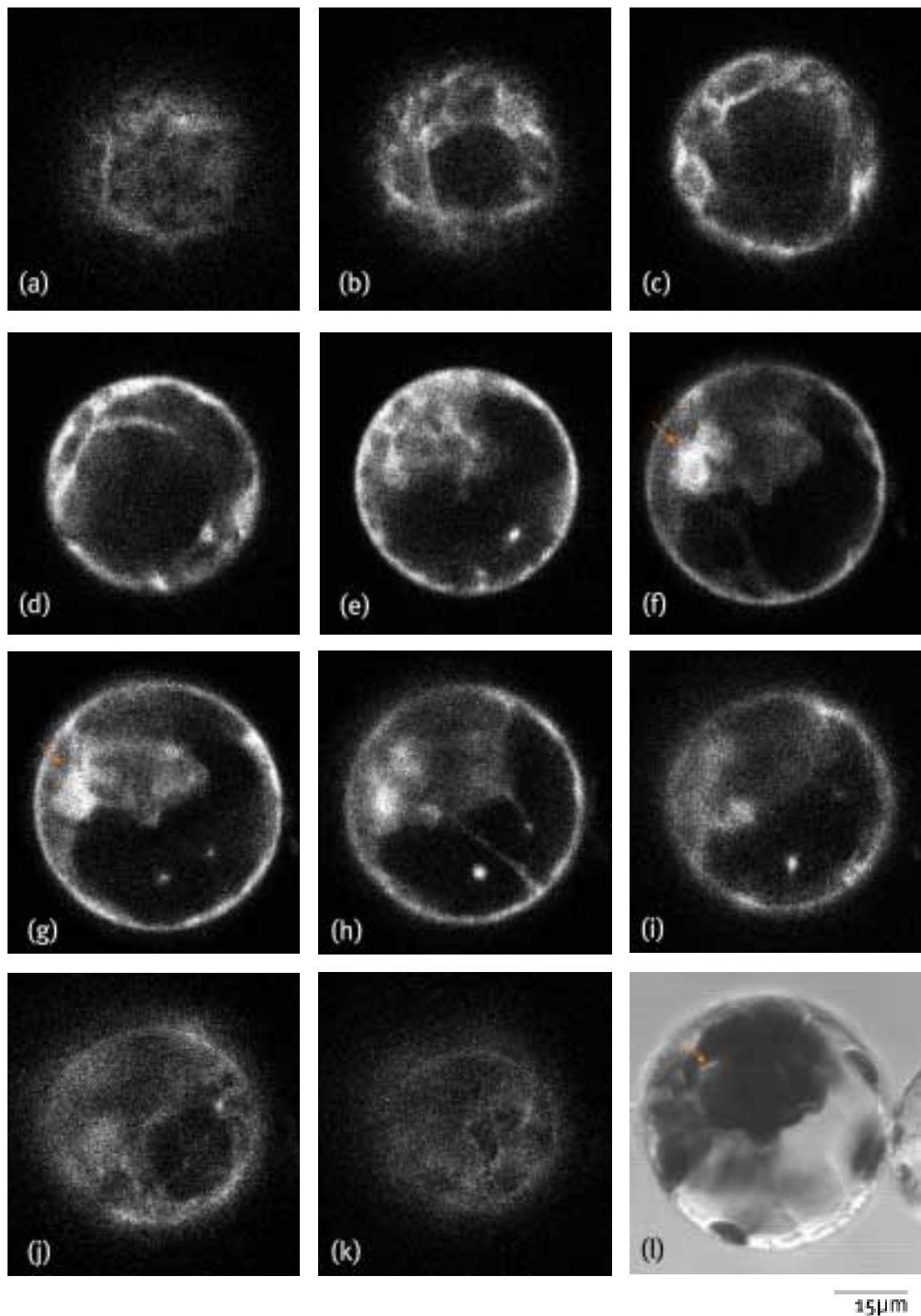
Die Transfektion der Tabak-Protoplasten fand mittels Elektroporation statt. Pro Ansatz wurden  $1 - 3 \times 10^6$  Protoplasten mit 30 – 150 µg Plasmid-DNA transfiziert. Als Positivkontrolle wurde der Vektor HBT-L verwendet, der unter Kontrolle des chimären HBT-Promotors natives sGFP-S65T exprimiert. Als Negativkontrolle dienten nicht-transfizierte Protoplasten und solche, die mit 100 µl Elektroporationspuffer ohne Plasmid-DNA elektroporiert wurden.



### 3.2.1 Cytoplasmatische und nukleare Lokalisation von sGFP-S65T in Tabak-Protoplasten

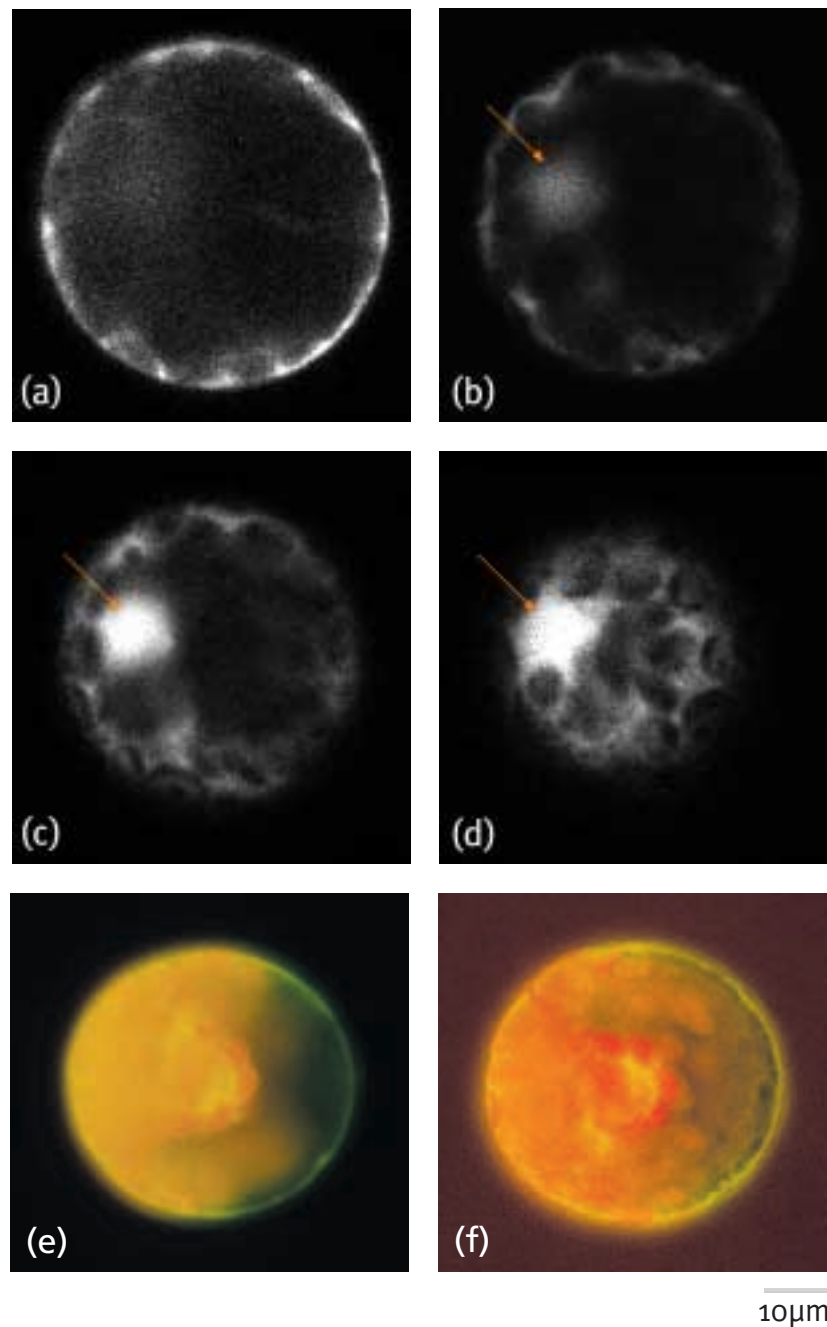
24 h nach Transfektion des Vektors HBT-L als Positivkontrolle wurden die Protoplasten in 0,1 mm dünnen Microslids (Camlab, Cambridge, England) im Weitfeld-Fluoreszenz- und konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) betrachtet. Eine Expression des sGFP-S65T unter Kontrolle des chimären Promotors HBT-L konnte in nur fünf Prozent aller lebenden Protoplasten beobachtet werden (Abb. 6 und 7). Die von SHEEN *et al.* (1995) bei Verwendung des gleichen Vektors erhaltene Transfektionsrate von 50 % in Mais-Protoplasten und mehr als 80 % in Tabak-Protoplasten (CHIU *et al.* 1996) wurde auch durch längere Inkubationszeiten von 48 bis 60 h und einer Erhöhung der pro Transfektionsansatz eingesetzten Plasmidmenge auf bis zu 150 µg nicht erreicht.

Mit nativem sGFP-S65T transfizierte Protoplasten zeigten eine starke gelb-grünliche Fluoreszenz (Abb. 7), die sich von der Fluoreszenz nicht-transfizierter Protoplasten deutlich unterschied (Abb. 8). Das gesamte Cytoplasma fluoreszierte und bis auf den Zellkern ließen sich keine weiteren fluoreszierenden Zellorganellen identifizieren. Die Vakuolen zeigten im CLSM keine Emission im Lichtwellenbereich von 510 – 520 nm. In Pflanzen exprimiertes natives GFP ohne Signalsequenzen befand sich außerhalb aller durch Membranen abgeschlossener Kompartimente. Dies wurde auch von HASELOFF *et al.* (1997), GREBENOK *et al.* (1997) und KÖHLER *et al.* (1997) beobachtet. Abb. 7 b, c und d zeigen aber auch, daß eine scharfe Abgrenzung gegen das umgebende Außenmedium nicht vorhanden war. Eine Akkumulation des nativen sGFP-S65T in der Plasmamembran konnte somit ausgeschlossen werden.



**Abb. 6: Optische Schnittserie eines mit HBT-L transfizierten Tabak-Mesophyll-  
Protoplasten**

Die CLSM-Aufnahmen wurden in Abständen von 4  $\mu\text{m}$  durch den 45  $\mu\text{m}$  großen Protoplasten erstellt. Auf den fluoreszierenden Zellkern in (f), (g) und (h) wird durch Pfeile hingewiesen. (l) zeigt dieselbe Bildebene wie (g) im Durchlicht aufgenommen.



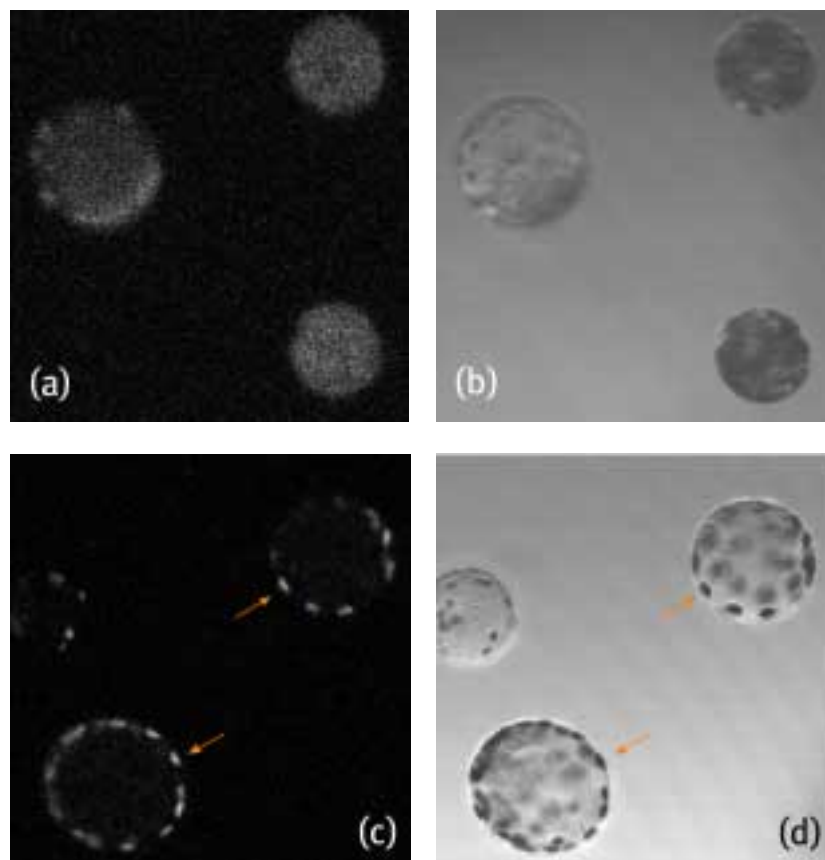
**Abb. 7: Ausschnitte eines mit HBT-L transfizierten Tabak-Protoplasten**

CLSM-Aufnahme durch das Zentrum eines mit HBT-L transfizierten Mesophyll-Protoplasten. Im Gegensatz zu Abb. 6 sind hier die Aussparungen nicht-fluoreszierender Zellorganellen deutlich erkennbar. (a) Im Cytoplasma des Protoplasten hat eine Akkumulation des GFP stattgefunden. In den Bildebenen (b) und (c), 5 und 15 µm von der Aufnahme (a) entfernt, wird der fluoreszierende Zellkern (siehe Pfeil) und die unregelmäßige Struktur des Cytoplasmas erkennbar. Die im Zentrum des Protoplasten befindliche Zentralvakuole ist im Vergleich zum fluoreszierenden Cytoplasma dunkel (a), (b), (c) und am äußeren Protoplastenrand (d) so gut wie nicht mehr ersichtlich. (e) Weitfeld-Fluoreszenz-mikroskopaufnahme eines transfizierten Protoplasten. Anregung mit 480 nm und Beobachtung mit Longpassfilter 510 nm, (f) zusätzlich mit Durchlicht. Die gelbe Fluoreszenz ist bedingt durch die Überlagerung der roten Autofluoreszenz der Chloroplasten und der grünen Fluoreszenz des GFP.

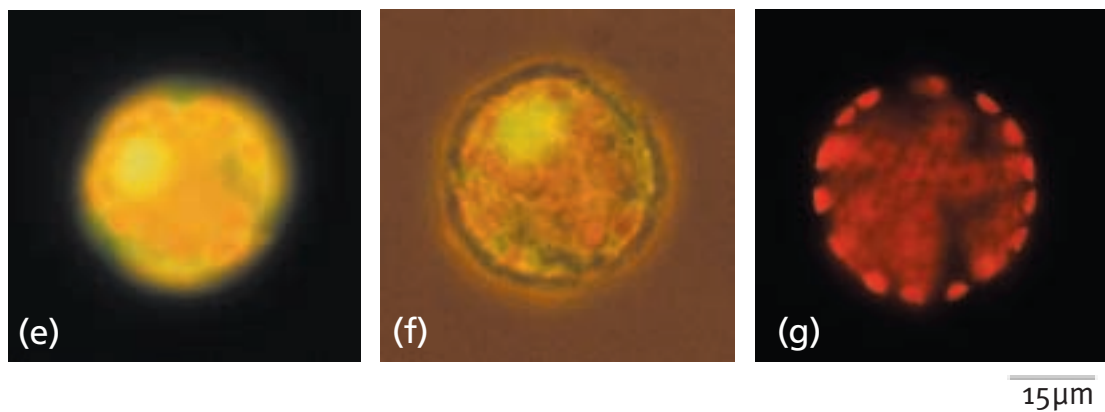
### 3.2.2 Negativkontrollen

Die Negativkontrollen wurden genauso wie die mit Plasmid-DNA elektroporierten Protoplasten behandelt und nach Inkubationszeiten von 24 h und 48 h unter dem Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop und CLSM untersucht. Nicht-elektroporierte Protoplasten wurden nach 24-stündiger Inkubationszeit im Mikroskop betrachtet. Es zeigte sich, daß zwischen nicht-elektroporierten und ohne Plasmid-DNA elektroporierten Protoplasten keine Unterschiede in den Fluoreszenzeigenschaften auftraten. Lediglich der Anteil an Zelltrümmern war nach Elektroporation höher. Bei einigen Protoplasten beider Kontrollen zeigte sich im inversen Fluoreszenzmikroskop mit dem FITC-Filtersatz eine schwache diffuse gelblich-grüne Eigenfluoreszenz, die auch im CLSM auszumachen war (Abb. 8 a, b). In vielen Protoplasten trat außerdem nach Anregung mit 488 nm eine Emission der Chloroplasten im gleichen Emissionsspektrum, wie das des sGFP-S56T auf. Diese Emission konnte auch bei Verwendung eines 510 – 520 nm Bandpassfilters nicht eliminiert werden (Abb. 8 c, d). Tote Protoplasten zeigten vermutlich auf Grund von Abbauprodukten im Fluoreszenzmikroskop bei Beobachtung mit dem FITC-Filtersatz eine grünliche Fluoreszenz, die auch im CLSM auszumachen war (Abb. 8 e, f).

Durchlichtaufnahmen bestätigten, daß es sich bei den gelb-grünlich leuchtenden Negativkontrollen um lebende Protoplasten handelte.



30 μm



### Abb. 8: Negativkontrollen

(a) Autofluoreszenz nicht-transfizierter Protoplasten im CLSM und (b) im Durchlicht. (c) Chloroplastenfluoreszenz (siehe Pfeile) lebender Protoplasten im konfokalen Fluoreszenzmikroskop und (d) im Durchlicht. (e) Autofluoreszenz toter Protoplasten, (f) im Durchlicht. (g) Weitfeld-fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nicht-transfizierter Protoplasten. Anregung mit 480 nm, Beobachtung mit Longpassfilter 510 nm.

### 3.2.3 Fehlende Expression der ATPase-sGFP-S65T-Fusionsproteine in Tabak-Protoplasten

Die fünf rekombinanten Vektoren M1-Ca<sup>2+</sup>-T-sGFP-S65T, M2-Ca<sup>2+</sup>-T-sGFP-S65T, M3-Ca<sup>2+</sup>-T-sGFP-S65T, M1-H<sup>+</sup>-T-sGFP-S65T und M2-H<sup>+</sup>-T-sGFP-S65T wurden durch Elektroporation in Tabak-Protoplasten eingeschleust. Es war bei Betrachtung im Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop und im CLSM nach 24-, 48- und 60-stündiger Inkubation bei 24° C im Dunkeln unter Kontrolle des chimären HBT-Promotors, keine Expression der fünf Fusionsproteine in Tabak-Protoplasten festzustellen.

Jedes Plasmid wurde mehrere Male mit je zwei Kontrollansätzen in Tabak-Protoplasten transfiziert. Bei den Positivkontrollen war jedesmal eine Expression des nativen sGFP-S65T festzustellen. Eine Erhöhung der pro Transfektionsansatz eingesetzten Plasmidmenge auf bis zu 150 μg, die Inkubation der Protoplasten im Hellen und die Verwendung unterschiedlich alter Tabakpflanzen zur Protoplastengewinnung führte zu keinen anderen Ergebnissen.

### 3.3 Konstruktion der ATPase-EGFP-Fusionsvektoren für die Expression in HeLa- und COS-7-Zellen

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase aus *Dunaliella bioculata* zeigt starke Homologien zu tierischen ATPasen des (Sarko-)Endoplasmatischen Retikulums auf (54 % Identität, 70 % Ähnlichkeit, dagegen zu pflanzlichen Typ IIA ATPasen 44 % Identität und 57 % Ähnlichkeit). Aufgrund der fehlenden Expression in Tabak-Protoplasten und einer Codon-Präferenz, die der vieler tierischer Gene ähnlich ist, wurde für beide ATPasen im zweiten Schritt eine heterologe Expression in tierischen Systemen gewählt.

Für die Transfektion der ATPase-GFP-Fusionsvektoren waren tierspezifische Änderungen bei der Plasmidkonstruktion notwendig. Ausgangsmaterial zur Klonierung rekombinanter GFP Fusionsvektoren war der Vektor pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, USA) und die cDNA Klone pDL10 der  $\text{H}^+$ -ATPase DBPMA1 und pDL20/14 der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase DBCA1 aus *Dunaliella bioculata*. pEGFP-N1 enthält ein für tierische Expressionssysteme optimiertes GFP. Es unterscheidet sich vom Wildtyp-GFP durch die Angleichung der Codons an die tierische Codon-Präferenz und eine verstärkte Fluoreszenzintensität durch Substitution von Phe<sup>64</sup> zu Leu und Ser<sup>65</sup> zu Thr im Chromophor (CLONTECH 1996). Die Expression der rekombinanten Fusionsproteine fand unter Kontrolle des CMV-Promotors statt.

Um eine effizientere Transkription und Translation der pflanzlichen ATPase-Fusionsgene in heterologen tierischen Systemen zu gewährleisten, wurde der Bereich des Translationsstartcodons des Fusionsgenes der tierischen Consensus-Sequenz angepasst (KOZAK 1987, KOZAK 1996). Die ATPase-Fragmente wurden wie folgt amplifiziert:

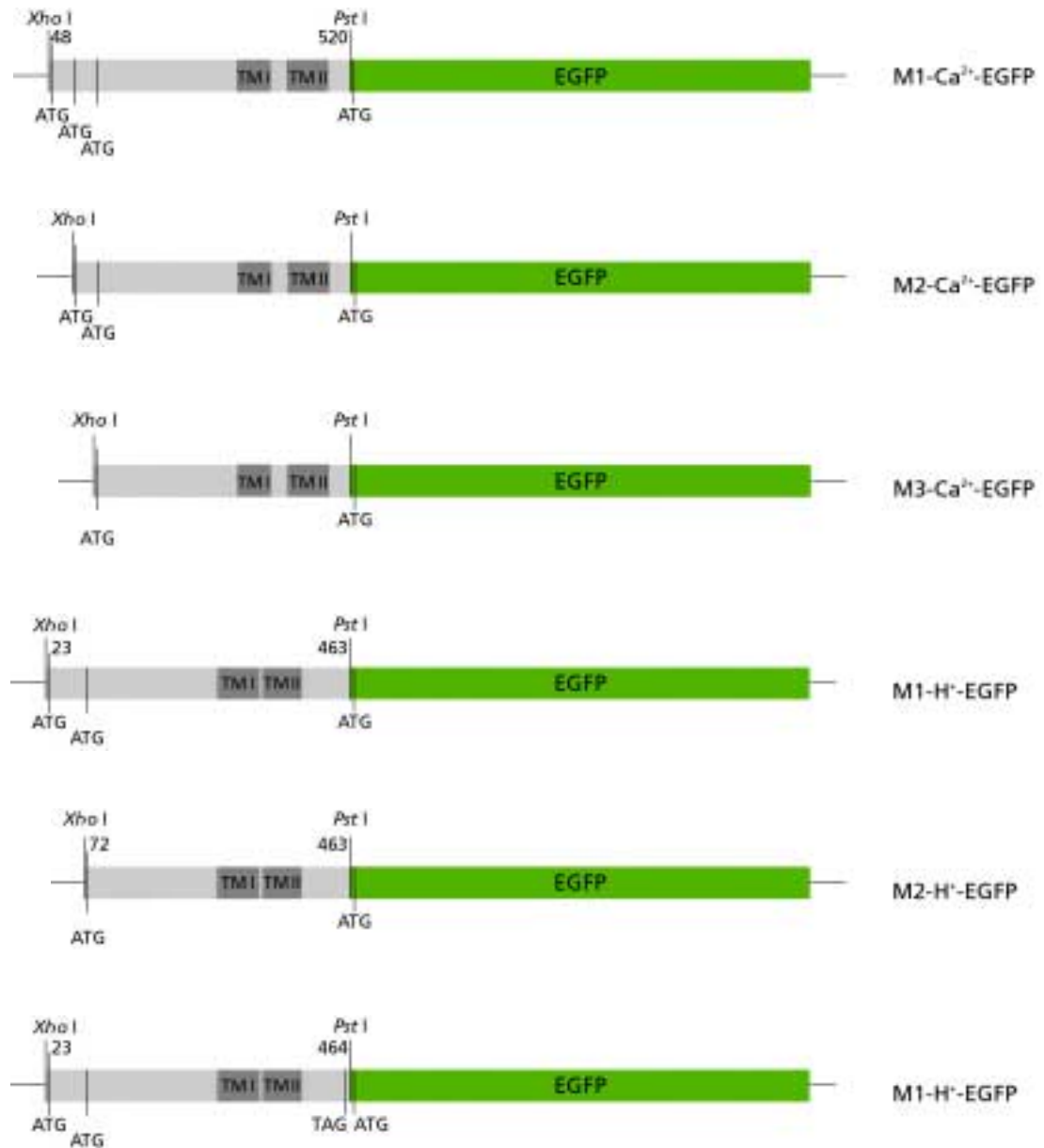
- |                                |  |
|--------------------------------|--|
| M1- $\text{Ca}^{2+}$ -Fragment | kodierte für den N-Terminus der $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, beginnend am ersten ATG, einschließlich der ersten beiden Transmembransegmente. Es wurde mit den <i>Primern</i> DCA-M1 und rDCAC1 amplifiziert und hatte eine Länge von 472 bp.        |
| M2- $\text{Ca}^{2+}$ -Fragment | kodierte für den bis zum zweiten ATG verkürzten N-Terminus von DBCA1, einschließlich der ersten beiden Transmembransegmente. M2- $\text{Ca}^{2+}$ wurde mit den <i>Primern</i> DCA-M2 und rDCAC1 amplifizierten und hatte eine Länge von 424 bp. |

M3-Ca <sup>2+</sup> -Fragment	kodierte für den bis zum dritten ATG verkürzten N-Terminus von DBCA1, einschließlich der ersten beiden Transmembransegmente. Es wurde mit den <i>Primern</i> DCA-M3 und rDCAC1 amplifiziert und hatte eine Länge von 403 bp.
M1-H <sup>+</sup> -Fragment	kodierte für den kompletten N-Terminus von DBPMA1, beginnend am ersten ATG einschließlich der ersten beiden Transmembransegmente. Es wurde mit den <i>Primern</i> DBH-M1 und rDBH2 amplifiziert und hatte eine Länge von 440 bp.
M2-H <sup>+</sup> -Fragment	kodierte für den bis zum zweiten ATG verkürzten N-Terminus von DBPMA1 einschließlich der ersten beiden Transmembransegmente und wurde mit den <i>Primern</i> DBH-M2 und rDBH2 amplifiziert. Es hatte eine Länge von 397 bp.
M1-H <sup>+</sup> -TAG-Fragment	kodierte für das gleiche Fragment wie M1-H <sup>+</sup> mit dem Unterschied, daß sich vor der Schnittstelle <i>Xho</i> I im Leserahmen das Stopcodon TAG befand. Es hatte eine Länge von 441 bp und wurde über die <i>Primer</i> DBH-M1 und rDBH amplifiziert.

Die in den Reaktionen verwendeten *Primer* waren mit *Xho* I und *Pst* I Schnittstellen ausgestattet. Die Basen um das jeweils erste Startcodon des Transkriptes waren der tierischen Consensus-Sequenz (KOZAK 1987a) angepaßt.

Die ATPase Fragmente und der Vektor pEGFP-N1 wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Pst* I und *Xho* I geschnitten, aufgereinigt und ihre überhängenden komplementären Enden durch eine Ligationsreaktion miteinander verknüpft. Die korrekte Sequenz der Klone wurden durch DNA-Sequenzanalysen bestätigt. Bei der Klonierung der Fusionsvektoren wurde darauf geachtet, daß die Genfragmente im richtigen Leserahmen miteinander verbunden wurden, um eine durchgehende Translation der Fusionsgene zu ermöglichen. In vielen Fällen wurden Basendeletionen innerhalb der amplifizierten ATPase-Fragmente festgestellt. Klone ohne Mutationen wurden im präparativen Maßstab isoliert, aufgereinigt und für die Transfektion von HeLa- und COS-7-Zellen verwendet.

Die rekombinanten Fusionsvektoren wurden entsprechend ihrer ATPase-Fragmenten M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP, M2-Ca<sup>2+</sup>-EGFP, M3-Ca<sup>2+</sup>-EGFP, M1-H<sup>+</sup>-EGFP, M2-H<sup>+</sup>-EGFP und M1-H<sup>+</sup>-TAG-GFP benannt (Abb. 9).



### Abb. 9: Konstruktion der rekombinanten EGFP-Fusionsvektoren

Die EGFP-Sequenz ist grün, die ATPase-Sequenzen grau dargestellt. Die Bereiche der beiden Transmembransegmente sind dunkelgrau gezeichnet und mit TM I und TM II gekennzeichnet. Die ATPase-Fragmente wurden in die Multiple Klonierungsstelle des pEGFP-N1 Vektors kloniert. Die Zahlen verweisen auf die Position der Nukleinsäure von DBCA1 und DBPMA1.



### 3.4 Expression der ATPase-EGFP-Fusionsgene in HeLa-Zellen

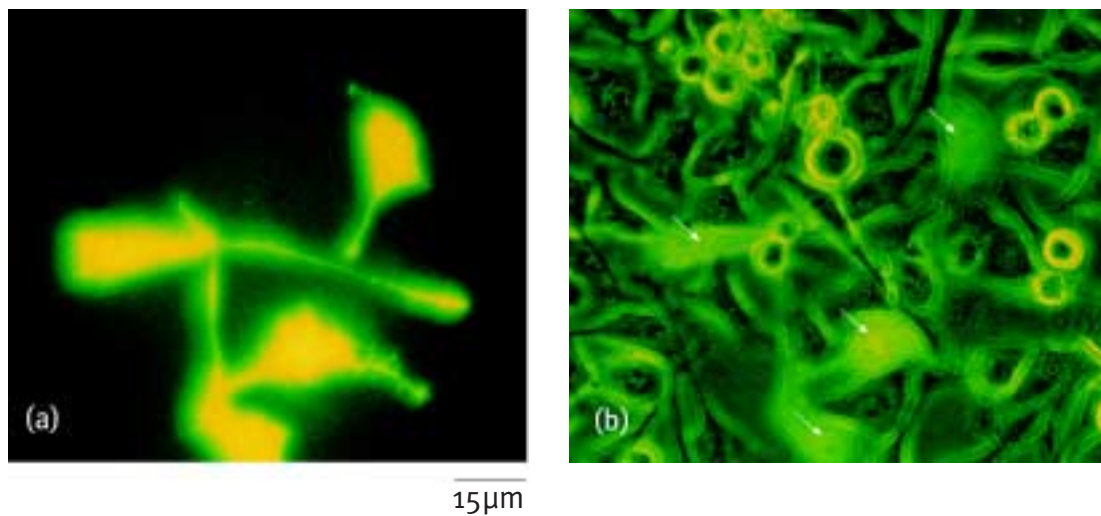
Die ersten klonierten Fusionsvektoren M2-Ca<sup>2+</sup>-EGFP und M3-Ca<sup>2+</sup>-EGFP wurden mittels Liposomentransfektion in adhärenzte HeLa-Zellen eingeschleust. Mit diesen ersten Versuchen sollte überprüft werden, ob pflanzliche ATPase-GFP-Chimären in tierischen Expressionssystemen translatiert werden und eine subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine erkennbar ist.

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde der Vektor pEGFP-N1 als Positivkontrolle verwendet. Als Negativkontrolle dienten Transfektionsansätze ohne DNA. Die Positivkontrollen ergaben sehr geringe Transfektionsraten. Um größere Transfektionsraten zu erzielen, wurden verschiedene Versuchsansätze durchgeführt, die im Bezug auf DNA-Konzentration, Liposomenkonzentration, Verhältnis von DNA zu Liposomen und Zellzahl variierten. Die höchste Transfektionsrate von 3 – 5 % wurde bei einer Mischung von Liposomen und Plasmid-DNA im Verhältnis 1:1 erzielt. Verlängerte Inkubationszeiten von 48 h führten zwar zu einer 1,5-fach höheren Transfektionsrate, typische subzelluläre Lokalisationsmuster konnten aber aufgrund einer Überexpression der Proteine nicht mehr erkannt werden. Um zu zeigen, daß die Ergebnisse reproduzierbar sind, wurden die Versuche von jedem Plasmid sechsmal mit je zwei Kontrollen wiederholt.

#### 3.4.1 Positiv- und Negativkontrolle: Expression von EGFP in HeLa-Zellen

Da das für die Kultivierung der HeLa-Zellen verwendete RPMI-Kulturmedium eine sehr hohe Eigenfluoreszenz aufweist, wurden alle HeLa-Zellen vor der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung in 1x PBS-Puffer aufgenommen.

Transfizierte HeLa-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion im Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop auf Expression des nativen EGFP untersucht. Eine Expression des nativen EGFP unter Kontrolle des CMV-Promotors konnte unter Verwendung eines FITC-Filtersatzes festgestellt werden (Abb. 10). Die Fluoreszenz war nicht kompartimentspezifisch und trat auch im Zellkern auf. Eine deutliche Abgrenzung der Zellen gegenüber dem Außenmedium war erkennbar. Ohne DNA transfizierte Negativkontrollen zeigten unter dem Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop bei Verwendung des FITC-Filtersatzes keine Autofluoreszenz.



### Abb. 10: Expression des EGFP in HeLa-Zellen

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Transfektion mit pEGFP-N1. (a) In transfizierten Zellen ist eine starke, nicht differenzierbare Fluoreszenz des gesamten Zellinhaltes zu sehen. Anregung und Beobachtung erfolgten mit einem FITC-Filtersatz. (b) Die Fluoreszenz der transfizierten Zellen war so stark, das sie auch unter Durchlicht, gekoppelt mit FITC-Anregung, erkennbar waren (siehe Pfeile). Ein Vergleich von (a) und (b) zeigt, daß untransfizierte Zellen mit FITC-Anregung keine Autofluoreszenz besitzen und nur im Durchlicht erkennbar waren.

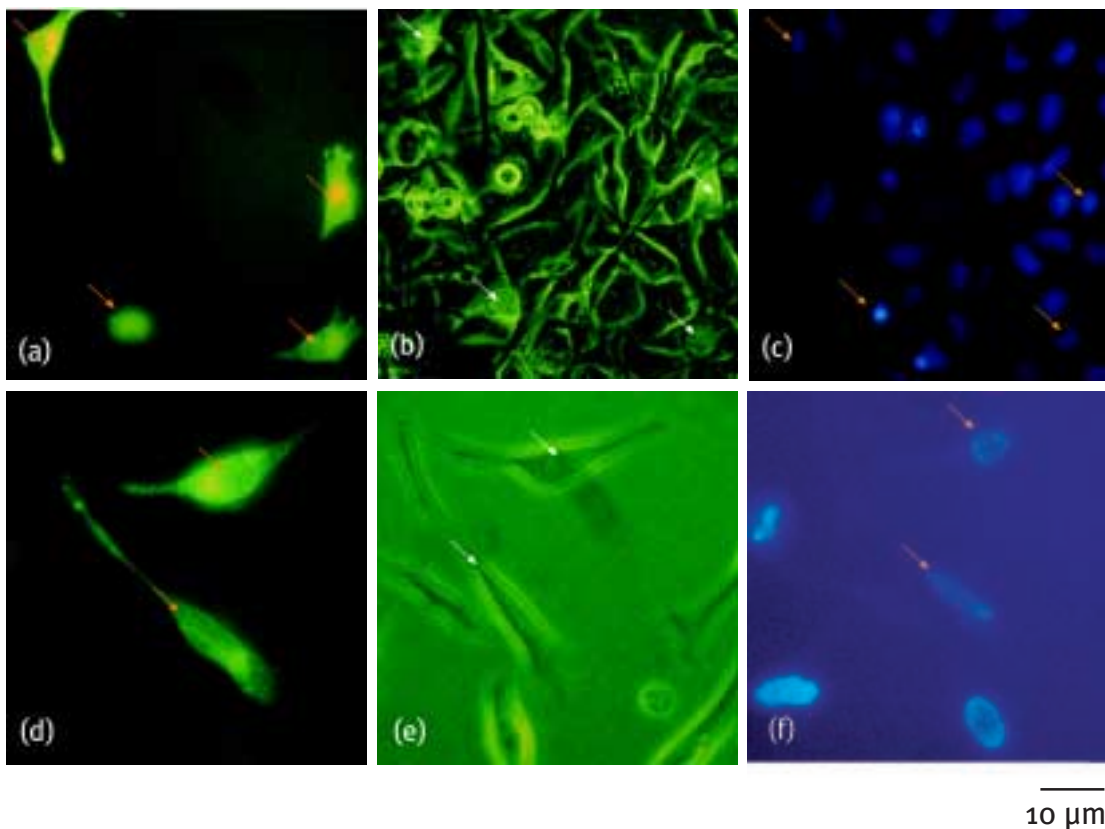
### 3.4.2 Expression von M2-Ca<sup>2+</sup>-EGFP und M3-Ca<sup>2+</sup>-EGFP in HeLa-Zellen

Nach Transfektion von M2-Ca<sup>2+</sup>-EGFP und M3-Ca<sup>2+</sup>-EGFP in HeLa-Zellen zeigte sich gegenüber der Positivkontrolle ein deutlich anderes Bild (Abb. 11). Die Fluoreszenzintensität beider Fusionsproteine war im Vergleich zum EGFP wesentlich geringer, was auf eine schwächere Expression der Fusionsproteine gegenüber dem nativen EGFP hinweisen könnte. Der Zellkern fluoresziert wesentlich schwächer, wodurch seine Lage innerhalb der Zelle im Gegensatz zur Positivkontrolle erkennbar war. Die Plasmide M2-Ca<sup>2+</sup>-EGFP und M3-Ca<sup>2+</sup>-EGFP zeigten die gleiche geringe Transfektionsrate wie die Positivkontrolle. Nach Kernfärbung dieser Zellen mit dem Lebendfarbstoff H33342 wurde deutlich, daß die Fluoreszenz beider Fusionsproteine verstärkt in perinukleären Bereichen und schwächer auch in Zellstrukturen auftrat, die das gesamte Cytoplasma durchziehen (Abb. 11). Die Zellgrenzen erschienen gegenüber dem Außenmedium diffuser als nach Expression des nativen EGFP.

Da die ATPase-GFP-Fusionsproteine ein anderes Expressionsmuster innerhalb der HeLa-Zellen zeigten als das native GFP, wurde die kompartimentspezifische Lokalisation der Fusionsproteine vermutlich durch die N-terminalen ATPase-Genbereiche bestimmt. Das Fluoreszenzmuster beider Fusionsproteine in HeLa-Zellen deutet auf eine ER-Lokalisation hin. Vergleiche mit pEYEP-ER und pECFP-ER (GFP-Varianten mit *Targeting*-Signalen in das ER) transfizierten HeLa-Zellen bestätigten diese Annahme

(Clontech-Homepage, [www.clontech.com](http://www.clontech.com)). Durch die starke Fluoreszenz im kernnahen Bereich kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß eine Akkumulation der Fusionsproteine auch in anderen Zellorganellen, wie dem Golgi-Apparat stattgefunden hat.

Beide ATPase-EGFP-Konstrukte wurden exprimiert, zeigten ein anderes Fluoreszenzmuster als das native EGFP und ließen keine deutlichen Unterschiede in der Fluoreszenzintensität erkennen. Eine Aussage darüber, ob das ATG an Position 96 – 98 oder 117 – 119 der Nukleinsäuresequenz von DBCA1 als tatsächliches Startcodon in *Dunaliella bioculata* fungiert, ließ sich nicht machen.

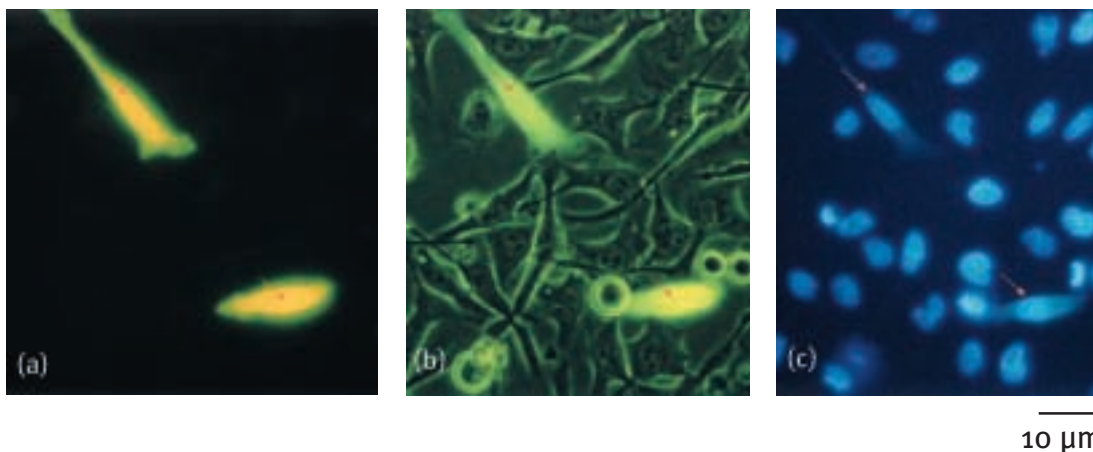


#### Abb. 11: Expression von M2-Ca<sup>2+</sup>-EGFP und M3-Ca<sup>2+</sup>-EGFP in HeLa-Zellen

Weitfeldfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen 24 h nach Transfektion mit M2-Ca<sup>2+</sup>-EGFP (a), (b) und M3-Ca<sup>2+</sup>-EGFP (d), (e) sowie Zellkernfärbung der transfizierten HeLa-Zellen mit H33342 (c), (f). Anregung und Beobachtung erfolgten bei (a), (b), (d) und (e) mit dem FITC-Filterersatz bei (b) und (e) zusätzlich mit Durchlicht. Nach Zellkernfärbung wurden die Zellen mit 365 nm angeregt. (a) und (d) zeigen, daß nicht das gesamte Cytoplasma, sondern nur Teilbereiche und verstärkt perinukleäre Strukturen leuchten. Vergleiche zwischen (c) und (f) machen dies deutlich. Orangefarbene Pfeile deuten auf die Zellkerne, weiße auf die im Durchlicht fluoreszierenden Zellen hin.

### 3.4.3 Expression von M1-H<sup>+</sup>-TAG-EGFP in HeLa-Zellen

Mit den *Primern* DBH-M1 und rDBH wurde das ATPase-Fragment M1-H<sup>+</sup>-TAG amplifiziert und mit dem Vektor pEGFP-N1 ligiert. Nach der Ligation der beiden Genfragmente bildeten diese durch Insertion eines Nukleotides keinen durchgängigen Leserahmen zueinander. Dadurch befand sich zwischen den Nukleinsäuresequenzen von DBPMA1 und EGFP ein Stopcodon (Abb. 9). Eine durchgehende Translation des Fusionsgens war somit nicht gewährleistet. Nach Transfektion in HeLa-Zellen konnte beobachtet werden, daß wider Erwarten das GFP sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern fluoreszierte (Abb. 11). Das translatierte Protein zeigte das gleiche Fluoreszenzmuster wie natives EGFP (Abb. 10, Abb. 12) und wurde genauso stark exprimiert. Es ist daher anzunehmen, daß bei N-terminaler Fusion mit EGFP das Startcodon der EGFP-Sequenz auch weiterhin als Translationsstart erkannt wird.



#### Abb. 12: Lokalisation von M1-H<sup>+</sup>-TAG-EGFP im Cytoplasma und Zellkern

24 h nach Transfektion konnte im Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop mit dem FITC-Filtersatz eine Lokalisation des Proteins im Cytoplasma und dem Zellkern von HeLa-Zellen verzeichnet werden (a). Abbildung (b) wie (a), nur zusätzlich mit Durchlicht aufgenommen. (c) Zellkernfärbung mit H3334 nach Anregung mit 365 nm. Die Pfeile zeigen die grün fluoreszierenden Zellkerne.

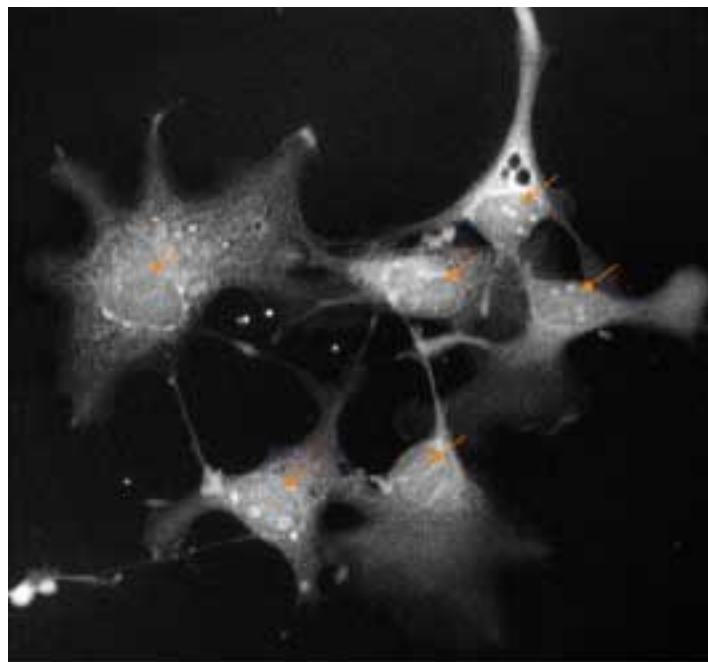
### 3.5 Expression der ATPase-EGFP-Fusionsproteine in COS-7-Zellen

Weiterführende Experimente wurden in COS-7-Zellen durchgeführt, da bei Kontrolltransfektionen mit pEGFP-N1 in diesem Zellsystem Transfektionsraten von bis zu 30 % erzielt wurden. In HeLa-Zellen lag diese nur bei drei bis fünf Prozent. Um statistische Schwankungen zu minimieren, wurden alle Versuche viermal mit je zwei Kontrollen wiederholt. In allen Wiederholungsversuchen zeigten sich die gleichen Ergebnisse.

### 3.5.1 Cytoplasmatische und nukleäre Lokalisation von EGFP in COS-7-Zellen

Als Positivkontrolle dienten mit nativem EGFP transfizierte Zellen, als Negativkontrolle nicht-transfizierte COS-7-Zellen. Die Aufnahmen am Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop erbrachten wenig Aufschluß über die genaue subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine. Zur Verbesserung der räumlichen Auflösung wurden die Zellen daher sowohl im Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop als auch im konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) betrachtet.

Die Transfektion erfolgte wie bei den HeLa-Zellen durch Liposomentransfektion. Pro Transfektionsansatz wurden 5 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Nach 24-stündiger Inkubation konnte eine starke Expression des GFP in COS-7-Zellen unter Kontrolle des CMV-Promotors im CLSM festgestellt werden. Wie schon in HeLa-Zellen beobachtet (Abb. 10), trat die Fluoreszenz verstärkt im Cytoplasma, dem perinukleären Bereich und dem Zellkern auf (Abb. 13). Eine deutliche Abgrenzung der Zellen gegenüber dem Außenmedium war erkennbar. Nicht-transfizierte Zellen zeigten bei 488 nm Laseranregung keine Emission im permissiven Spektrum des 510 – 520 nm Bandpassfilters.



10µm

**Abb. 13: Cytoplasmatische und nukleäre Lokalisation des EGFP**

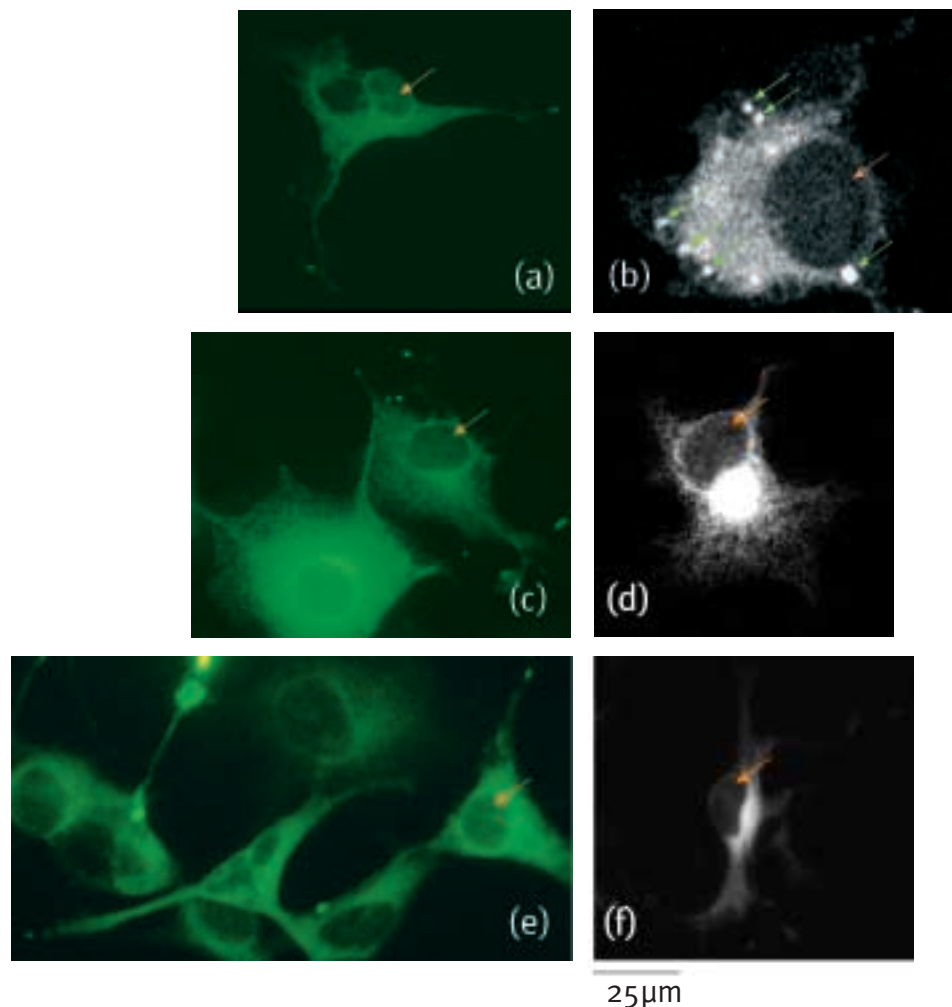
CLSM-Aufnahmen von COS-7-Zellen nach Transfektion mit pEGFP-N1. Es fluoreszierten Cytoplasma, Zellkern und perinukleäre Strukturen. Die Pfeile zeigen die Zellkerne. Anregung und Beobachtung erfolgte bei allen weiteren CLSM-Aufnahmen, sofern nicht anderes angegeben, mit 488 nm und einem 510 – 520 nm Bandpassfilter.

### 3.5.2 Ca<sup>2+</sup>-ATPase-EGFP-Fusionsproteine in COS-7 Zellen

Die drei rekombinanten Vektoren M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP, M2-Ca<sup>2+</sup>-EGFP, M3-Ca<sup>2+</sup>-EGFP wurden ebenfalls mittels Liposomentransfektion in COS-7-Zellen eingeschleust. 24 h nach der Transfektion wurde eine Expression aller drei Fusionsproteine unter Kontrolle des CMV-Promotors in COS-7-Zellen festgestellt. Während mit EGFP Transfektionsraten von 30 % erreicht wurden, lagen sie bei den ATPase-Fusionsvektoren nur bei durchschnittlich 10 %.

Im Fluoreszenzmikroskop sah man eine verstärkte Fluoreszenz bei allen drei Fusionsproteinen in netzartigen Strukturen innerhalb des Cytoplasmas und im perinukleären Bereich (Abb. 14). Die Fluoreszenz im Zellkern war im Vergleich zu den mit pEGFP-N1 transfizierten Zellen geringer.

Konfokale Untersuchungen erbrachten weitere Details zur subzellulären Verteilung der Proteine. Während im Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop ein Auffinden der Fusionsproteine im Zellkern nicht eindeutig ausgeschlossen werden konnte (Abb. 14 a, c, e), machten konfokale Betrachtungen deutlich, daß keine Kernfluoreszenz vorhanden war. Die Konzentrierung des Fluoreszenzsignals im kernnahen ER-Bereich und der Kernmembran sowie die Ausdehnung netzartiger Strukturen bis zur Peripherie der Zelle ohne definierte Zellgrenzen, sind ein typisches Fluoreszenzmuster für Proteine des Endoplasmatischen Retikulums (FOLETTI *et al.* 1995). Durch die starke Fluoreszenz im kernnahen Bereich der COS-7-Zellen konnte auch bei konfokaler Betrachtung eine Akkumulation der Fusionsproteine in anderen kernnahen Zellorganellen, besonders dem Golgi-Apparat, nicht ausgeschlossen werden. Da bei diesen Konstrukten keine Fluoreszenz im Cytoplasma und dem Zellkern erkennbar war, die auf Expression des nativen EGFP schließen läßt, ist anzunehmen, daß bei durchgehender Translation der Fusionsgene das ATG des EGFP nicht als zusätzlicher Translationsstart fungiert.

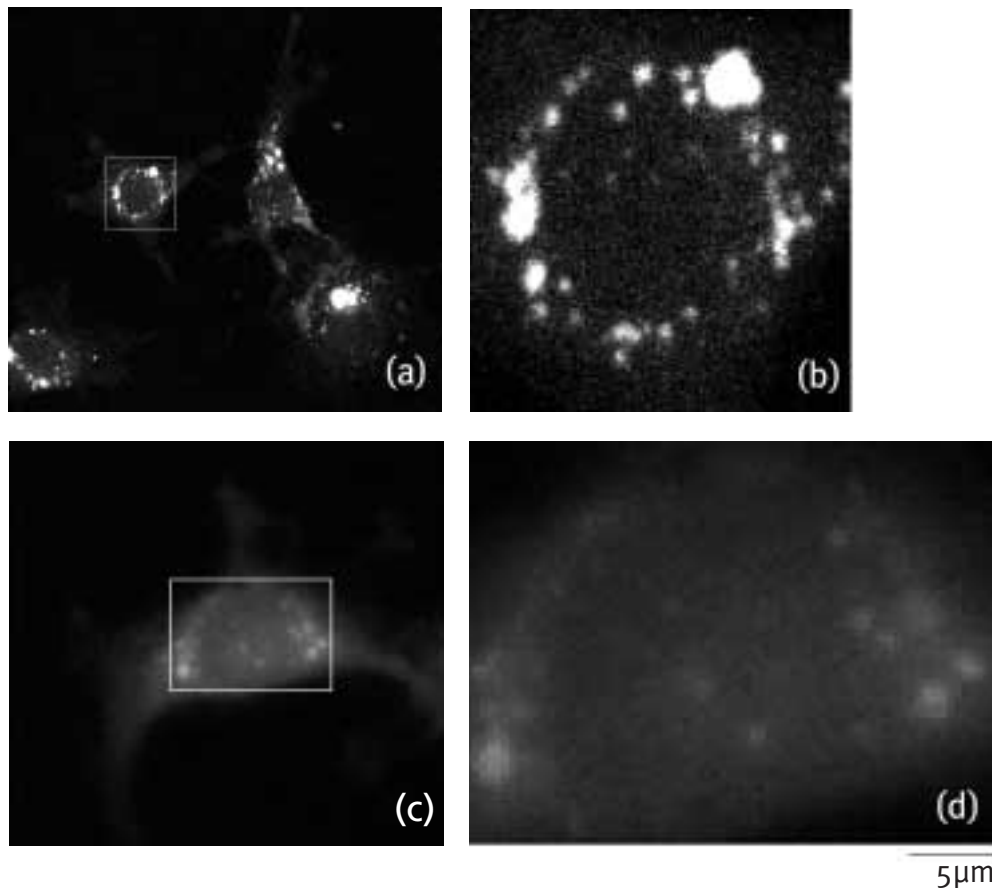


**Abb. 14: Lokalisation der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-EGFP-Fusionsproteine in COS-7 Zellen**

24 h nach Liposomentransfektion der rekombinanten Fusionsvektoren M1- $\text{Ca}^{2+}$ -EGFP (a), (b), M2- $\text{Ca}^{2+}$ -EGFP (c), (d), M3- $\text{Ca}^{2+}$ -EGFP (e), (f) konnte unter dem Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop (a), (c), (e) und CLSM (b), (d), (f) eine Expression der EGFP-Fusionsproteine festgestellt werden. Die Aufnahmen zeigen, daß die netzartigen Strukturen des ER fluoreszieren. Verstärkte Fluoreszenz tritt zudem im perinukleären Bereich auf. Grüne Pfeile zeigen auf Proteinakkumulationen, die nach Transfektion mit M1- $\text{Ca}^{2+}$ -EGFP auftraten (b). Anregung und Beobachtung der EGFP-Fusionsproteine erfolgte im Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop mit dem FITC-Filtersatz. Orangefarbene Pfeile zeigen auf die Zellkerne.

Im CLSM konnte in 5 – 20 % aller COS-7-Zellen, in denen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-EGFP-Fusionsproteinen exprimiert wurden, größere Ansammlungen fluoreszierender punktförmiger Strukturen (Abb. 15) beobachtet werden. Diese zeigten das gleiche Anregungs- und Emissionsspektrum wie GFP und waren im Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop nicht erkennbar. Es ist anzunehmen, daß es sich bei diesen Strukturen um akkumulierte Fusionsproteine handelt. Während die Summe der COS-7-Zellen mit fluoreszierenden Partikeln nach Expression von M3- $\text{Ca}^{2+}$ -EGFP nur bei 5 % lag und die Anzahl der Partikel innerhalb der Zellen gering war, konnte nach Expression von M1- $\text{Ca}^{2+}$ -EGFP und

M2-Ca<sup>2+</sup>-EGFP in 20 % der transfizierten Zellen ein verstärktes Auftreten von punktförmigen Strukturen beobachtet werden (Abb. 15). So war bei den 20 % mit M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP transfizierten Zellen fast das gesamte exprimierte Protein in Proteinakkumulationen um den Zellkern abgelagert (Abb. 15 a, b). Bei M2-Ca<sup>2+</sup>-EGFP fluoreszierten hingegen neben den hauptsächlich perinukleären Proteinakkumulationen auch noch subzelluläre Strukturen (Abb. 14 c, d).



**Abb. 15: Proteinakkumulation bei M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP und M2-Ca<sup>2+</sup>-EGFP im Cytoplasma von COS-7-Zellen**

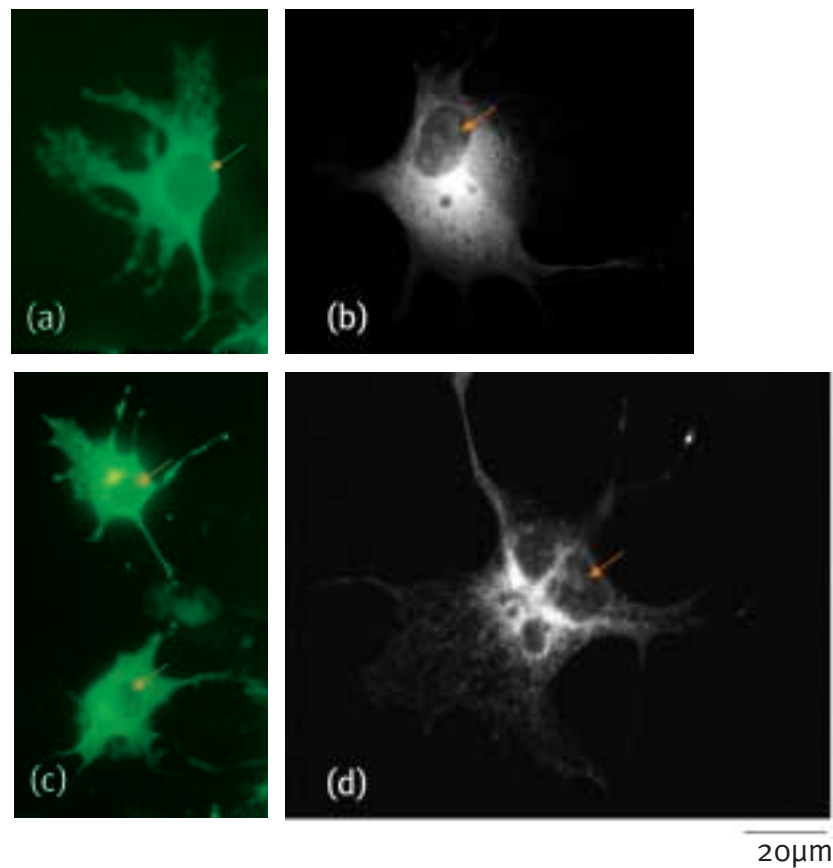
CLSM-Aufnahme von mit M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP und M2-Ca<sup>2+</sup>-EGFP transfizierten COS-7-Zellen mit punktförmigen Strukturen. Während das Fusionsprotein M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP bei diesen Zellen fast ausschließlich in Proteinakkumulationen vorkam (a), (b) fluoreszierten nach Expression von M2-Ca<sup>2+</sup>-EGFP sowohl Proteinakkumulationen als auch subzelluläre Strukturen (c), (d). (b) und (d) zeigen vergrößerte Ausschnitte der Zellkerne mit verstärktem Vorkommen der Proteinakkumulationen in perinukleären Strukturen von (a) und (c).



### 3.5.3 Lokalisation der Fusionsproteine M1-H<sup>+</sup>-EGFP und M2-H<sup>+</sup>-EGFP im ER von COS-7-Zellen

Zur Lokalisationsbestimmung der H<sup>+</sup>-ATPase wurden die Vektoren M1-H<sup>+</sup>-EGFP und M2-H<sup>+</sup>-EGFP ebenfalls in COS-7-Zellen transfiziert. Sie enthielten als Fusionsgene den N-Terminus und die ersten beiden Transmembransegmente der vermutlich plasmamembranständigen H<sup>+</sup>-ATPase aus *Dunaliella bioculata*, verknüpft mit dem Reportergen EGFP.

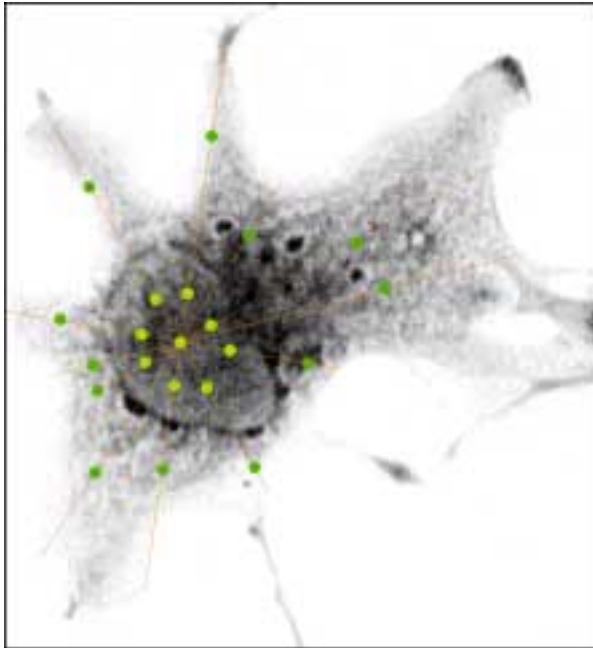
24 h nach Liposomentransfektion der Fusionsvektoren wurde bei beiden Konstrukten unter Kontrolle des CMV-Promotors eine Expression festgestellt. Während die Lokalisation der Fusionsproteine nach Betrachtung im Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop nicht eindeutig zu bestimmen war (Abb. 16 a, c), legten auch bei diesen Konstrukten erst CLSM Aufnahmen nähere Einzelheiten über die Proteinverteilung in den Zellen offen. Wie nach Expression der Ca<sup>2+</sup>-ATPase-EGFP-Fusionsproteine, trat die Fluoreszenz verstärkt in perinukleären Bereichen sowie in netzartigen Strukturen auf, die bis in die Peripherie der Zelle reichten. Dieses typische Fluoreszenzmuster zeigte, daß sich beide Fusionsproteine im Endoplasmatischen Retikulum befanden. Eine Lokalisation in der Plasmamembran der COS-7-Zellen konnte nicht festgestellt werden. Die Fluoreszenz im Zellkern war wie nach Expression der Ca<sup>2+</sup>-ATPase-EGFP-Fusionsproteine sehr gering. Unterschiede in der Translationseffizienz beider Konstrukte im Hinblick auf die Translationsstartcodons wurden optisch nicht festgestellt. Proteinakkumulationen wie nach Expression der Fusionsproteine M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP, M2-Ca<sup>2+</sup>-EGFP und M3-Ca<sup>2+</sup>-EGFP in COS-7-Zellen (Abb. 15) wurden nicht beobachtet.



**Abb. 16: Lokalisation von M1-H<sup>+</sup>-EGFP und M2-H<sup>+</sup>-EGFP im ER von COS-7-Zellen**  
 24 h nach Liposomentransfektion der rekombinanten Expressionsvektoren M1-H<sup>+</sup>-EGFP (a), (b) und M2-H<sup>+</sup>-EGFP (c), (d) konnte die Lokalisation von beiden Fusionsproteinen im ER ausgemacht werden. Eine Proteinlokalisierung im Zellkern konnte im Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop nicht (a), (c), aber im CLSM ausgeschlossen werden (b), (c). Zellkerne sind durch orange Pfeile gekennzeichnet. Die Aufnahmen mit dem Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop erfolgten mit einem FITC-Filtersatz.

#### 3.5.4 Quantitative Bestimmung der Fluoreszenzverteilung und Expressionsrate von EGFP und der Fusionsproteine in COS-7-Zellen

Für eine Quantifizierung der Proteinverteilung und Expressionsrate der transfizierten Zellen wurden Intensitätsmessungen an den digitalen CLSM-Bilddaten durchgeführt. Jedes angeregte GFP-Molekül sendet eine bestimmte Lichtquantenmenge (0,72 – 0,85) aus (STEIPE & SKERRA 1997). Werden alle zu untersuchenden Zellen mit der gleichen Wellenlänge angeregt, besteht somit zwischen der Proteinmenge und der Lichtintensität eine lineare Korrelation. Die Stichprobe für jedes Fusionsprotein bestand aus je 10 COS-7-Zellen der verschiedenen Wiederholungsversuche. Die Intensitätsmessungen der Fluoreszenzverteilung im Cytoplasma und im Zellkern wurde für alle Zellen nach einem definierten Schema durchgeführt (Abb. 17).



**Abb. 17:**  
**Schema der Meßpunkteverteilung**

Vom Mittelpunkt des Zellkerns ausgehend wurden 12 Geraden durch die Zelle bis zur Plasmamembran gelegt. Die Intensität im Zellkern (hellgrüne Punkte) wurde an 9 Meßpunkten bestimmt. Acht Meßpunkte lagen auf den Linien jeweils in der Mitte zwischen Kernmittelpunkt und Kernmembran, einer lag im Mittelpunkt. Die Fluoreszenzintensität im Cytoplasma (dunkelgrüne Punkte) wurde an 12 Punkten bestimmt, die jeweils auf der Hälfte der Geraden zwischen Kernmembran und Plasmamembran lagen. Die Bestimmung erfolgte mit dem Programm NIH-Image 1.61.

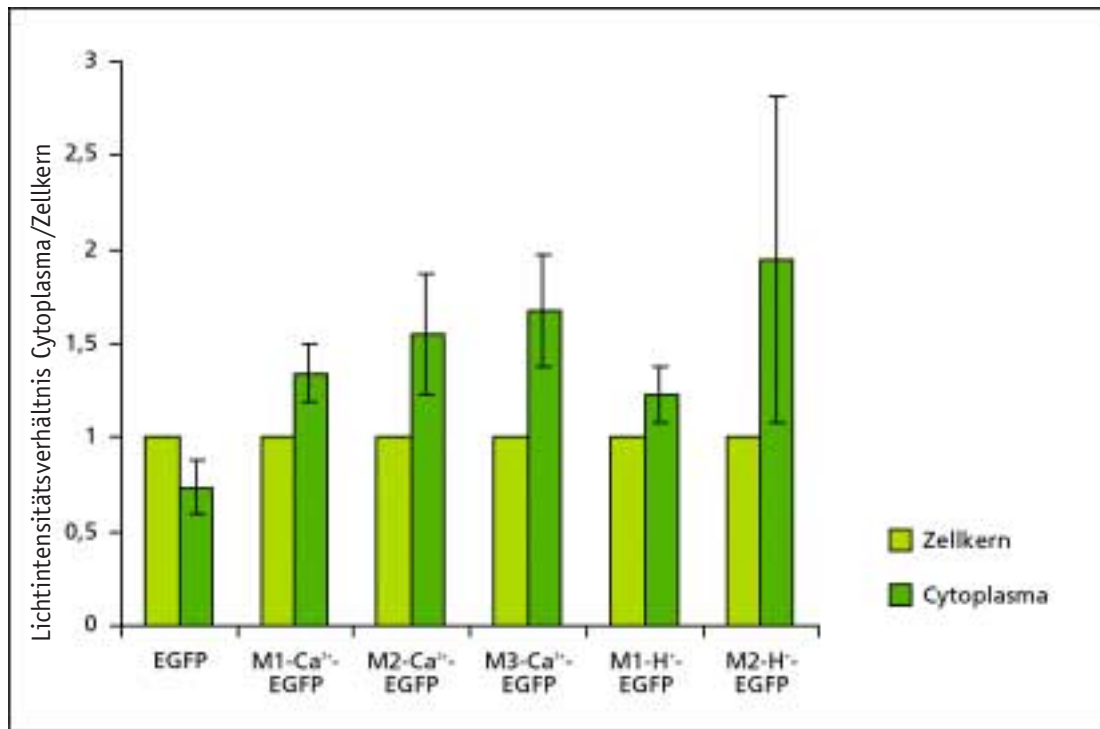
Aus den Meßwerten für Zellkern und Cytoplasma wurden für jede Zelle die Mittelwerte berechnet. Um Intensitätsunterschiede aufzudecken, die auf eine Ungleichverteilung des GFP zwischen Zellkern und Cytoplasma schließen lassen, wurden die Mittelwerte von Cytoplasma und Zellkern ins Verhältnis gesetzt. Damit wurden gleichzeitig die unterschiedlichen Helligkeitsintensitäten und Kontrasteinstellungen der verschiedenen CLSM-Aufnahmen standardisiert. Von allen Werten einer Stichprobe wurden Mittelwert und Standardabweichung ermittelt (Abb. 18).

Es zeigte sich, daß das Intensitätsverhältnis Cytoplasma/Zellkern bei Expression des EGFP in COS-7-Zellen  $<1$  war. Das native EGFP ist somit sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma lokalisiert.

Anders bei der Expression der Fusionsproteine: Die Intensität der exprimierten Proteine war im Cytoplasma wesentlich größer als im Zellkern und die gemessenen Werte der Intensität des Zellkerns waren oft mit denen des Außenmediums identisch. Daraus kann geschlossen werden, daß keine oder nur eine sehr geringe Akkumulation der Fusionsproteine im Zellkern stattgefunden hat.

Bei den Proteinen M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP, M2-Ca<sup>2+</sup>-EGFP und M3-Ca<sup>2+</sup>-EGFP nahm mit Verkürzung des N-Terminus die relative Fluoreszenz im Cytoplasma zu. So war bei M3-Ca<sup>2+</sup>-EGFP eine 25 % höhere Expressionsrate gegenüber M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP festzustellen. Von M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP zu M2-Ca<sup>2+</sup>-EGFP nahm sie um 18 % zu. Die Zunahme der Expressionsrate zeigte sich auch bei M1-H<sup>+</sup>-EGFP und M2-H<sup>+</sup>-EGFP. Hier lagen die Unterschiede zwischen beiden Fusionsproteinen bei 40 %, bei jedoch sehr hoher Standardabweichung.

Aus dem Versuch einer quantitativen Auswertung der Expressionsdaten läßt sich daher annehmen, daß die Startcodons an Position 96 – 98 und 117 – 119 der Nukleinsäuresequenzen von DBCA1 und an Position 72 – 74 von DBPMA1, scheinbar bessere Translationsinitiationsstellen darstellen, als das jeweils erste ATG am N-Terminus in 5' → 3'-Richtung.



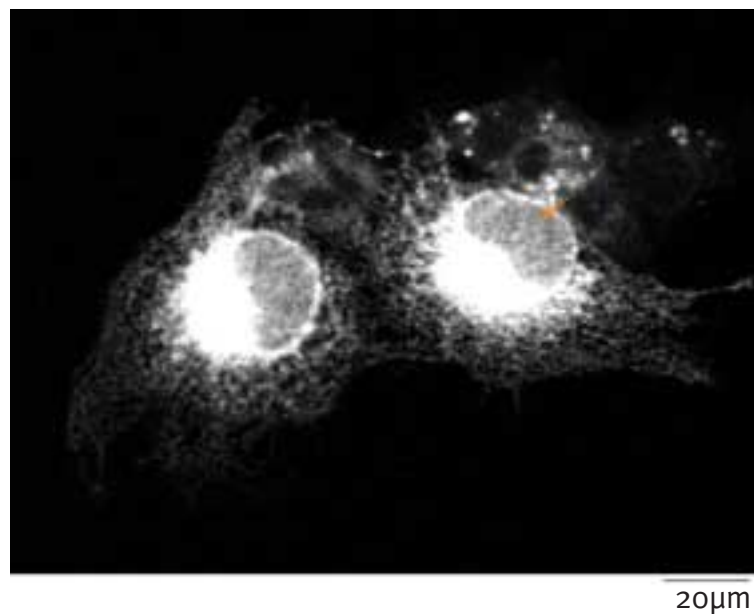
**Abb. 18: Statistische Verteilung der kompartimentspezifischen Fluoreszenzintensität in COS-7-Zellen**

In einer Stichprobe von jeweils 10 transfizierten COS-7-Zellen wurde jeweils der Mittelwert des Lichtintensitätsverhältnisses Cytoplasma/Zellkern (dunkelgrün) errechnet und gegen den auf 1 normierten Wert für die Intensität des Zellkerns (hellgrün) aufgetragen. Die Standardabweichungen der errechneten Mittelwerte sind durch Meßbalken gekennzeichnet.

### 3.5.5 Kozak-Mutante in COS-7-Zellen

Eines der sequenzierten rekombinanten M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP Plasmide enthielt eine Punktmutation in der Consensus-Sequenz. Anstelle der durch *Primer* zusätzlich vor dem jeweils ersten ATG der Fusionsgene angefügten und auf Säugetierzellen abgestimmten Consensus-Sequenz CACC trat bei diesem Plasmid die Sequenzabfolge CCCC auf. Diese Mutante wurde benutzt, um den möglichen Einfluß der tierischen Consensus-Sequenz auf die Translationseffizienz abzuschätzen.

Dieser Klon wurde wie die anderen Fusionsvektoren mittels Liposomentransfektion in COS-7-Zellen transfiziert. Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen im konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht. Sie zeigten das gleiche Fluoreszenzmuster wie das der Fusionsproteine M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP, M2-Ca<sup>2+</sup>-EGFP und M3-Ca<sup>2+</sup>-EGFP. Die netzartigen Strukturen des ER waren deutlich erkennbar. Im Gegensatz zu M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP war eine starke Akkumulation der Fusionsproteine in Einschlusskörpern bei veränderter Consensus-Sequenz nicht feststellbar. Auffällig war jedoch die starke Lichtemission des Fusionsproteins, vor allem in den perinukleären Bereichen, was auf eine erhöhte Translation des Proteins deuten könnte (Abb. 19).

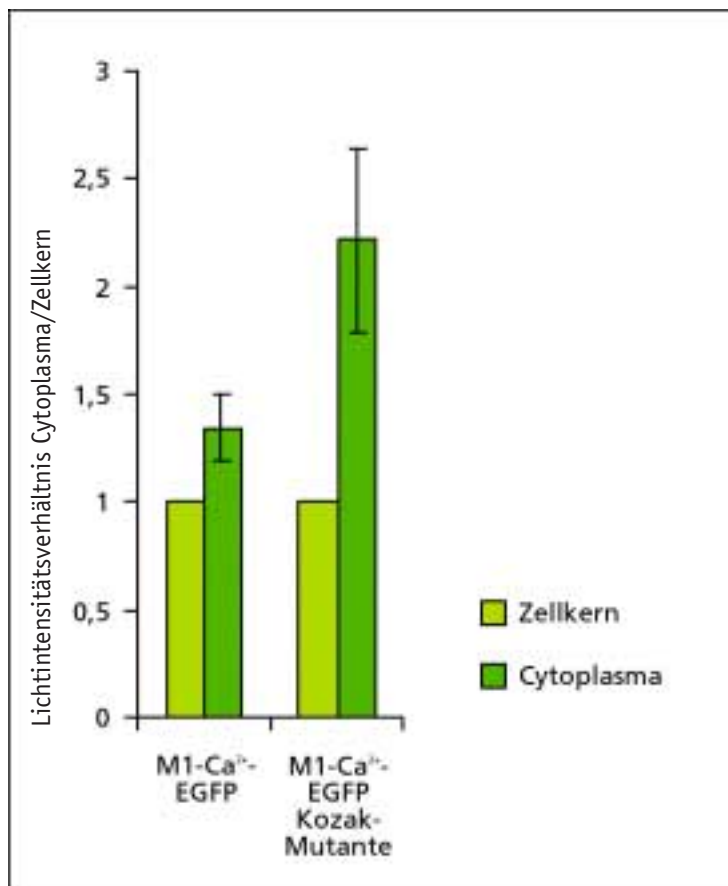


**Abb. 19: M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP mit veränderter Kozak Consensus-Sequenz**

CLSM-Aufnahme 24 h nach Transfektion. Auf den Zellkern wird durch den Pfeil verwiesen. Anregung mit 488 nm, Beobachtung mit 510 – 520 nm Bandpassfilter.

Die Quantifizierung der mit dieser Mutante transfizierten COS-7-Zellen erfolgte nach demselben Schema, wie in Kapitel 3.5.4 beschrieben. Um Unterschiede in der Translationseffizienz aufzudecken, wurden die errechneten Werte für die M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP-Kozak-Mutante denen von M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP gegenübergestellt (Abb. 20).

Der Vergleich beider Fusionsproteine zeigt eine um 60 % gestiegene relative Lichtintensität im Cytoplasma von M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP-Kozak-Mutante transfizierten COS-7-Zellen. Die Steigerung der Translationseffizienz ist vermutlich auf den veränderten Translationsinitiationsbereich zurückzuführen.



**Abb. 20: Statistische Verteilung der kompartimentspezifischen Fluoreszenzintensität von M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP und M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP-Kozak-Mutante**

Die Werte zur Berechnung der Intensitätsverteilung wurden nach dem gleichen Schema ermittelt wie in Abb. 17 beschrieben und wie in 3.5.4 beschrieben errechnet. Der Unterschied in der Expressionsrate der beiden Fusionsgene M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP und M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP-Kozak-Mutante beträgt 60 %.

## 4. Diskussion

Ziel der Arbeit war, die subzelluläre Lokalisation der beiden P-Typ ATPasen DBCA1 und DBPMA1 aus der Grünalge *Dunaliella bioculata* fluoreszenzoptisch zu bestimmen. Dabei sollte untersucht werden, ob N-terminale Sequenzbereiche der ATPasen ausreichen, das Protein-Targeting der ATPasen zu vermitteln.

Bisher wurde aufgrund von Sequenzvergleichen mit molekularbiologisch und immunocytologisch charakterisierten P-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen für DBCA1 eine Lokalisation in der Membran des ER angenommen. Die Lokalisation von DBPMA1 in der Plasmamembran gilt aufgrund der großen Sequenzhomologie zur plasmamembranständigen  $\text{H}^+$ -ATPase aus *Dunaliella acidophila* als gesichert. So kann die Expression der  $\text{H}^+$ -ATPase-GFP-Fusionsproteine als interner Standard zur Kontrolle der Versuchseffizienz gewertet werden.

Die ersten beiden Transmembransegmente der beiden ATPasen wurden mit GFP markiert und ihre lokale Expression in heterologen Expressionssystemen untersucht. Während nach Transfektion von Tabak-Protoplasten keine Expression der Fusionsproteine sichtbar war, waren in tierischen Zellen sowohl die  $\text{H}^+$ - als auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-GFP-Fusionsproteine im ER lokalisiert.

### 4.1 Expression der ATPase-GFP-Fusionsproteine in Tabak-Protoplasten

*Dunaliella bioculata* gehört zu den halophilen einzelligen Grünalgen. Aus ihr wurden die beiden P-Typ ATPasen DBCA1 und DBPMA1 molekularbiologisch charakterisiert (RASCHKE 1996, WOLF 1993).

Ausführliche Versuche, *Dunaliella* als pflanzliches Expressionssystem in unserem Labor zu etablieren, scheiterten (B. EBERT, persönliche Mitteilung). Die Versuche zur Lokalisation der ATPasen wurden daher in Tabak-Protoplasten, einem etablierten pflanzlichen Expressionssystem, durchgeführt.

Während nach Transfektion der Tabak-Protoplasten mit nativen sGFP-S65T unter Kontrolle des chimären HBT-Promotors eine Expression sichtbar war, konnte unter Kontrolle des gleichen Promotors bei keinem der  $\text{H}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -sGFP-S65T-Fusionsproteine eine Expression in Tabak-Protoplasten festgestellt werden. Die Gründe für eine fehlende Fluoreszenz können vielfältig sein. Als mögliche Ursachen für die fehlende Fluoreszenz werden diskutiert:

- Konstruktion der Fusionsvektoren
- Unterbindung Translations aufgrund unterschiedlicher Codon-Präferenzen
- Aggregation der Fusionsproteine
- Proteinabbau durch Fehlfaltung der Fusionsproteine

### 4.1.1 Konstruktion der Fusionsvektoren

Die Verwendung des Reporterproteins GFP in tierischen Zellen und höheren Pflanzen wurde anfangs durch ineffiziente Expression, geringe Fluoreszenz und eine langsame Chromophor-Bildung limitiert (CORMACK *et al.* 1996, Heim *et al.* 1994, HASELOFF & AMOS 1995; HU & CHENG 1995; REICHEL *et al.* 1996; SHEEN *et al.* 1995).

Die Verwendung universeller Transkriptions- und Translationsverstärker in Verbindung mit starken Promotoren und eine Anpassung der GFP-Sequenz (CHIU *et al.* 1996; PANG *et al.* 1996; REICHEL *et al.* 1996) an die Codon-Präferenz pflanzlicher und tierischer Systeme führt in der Regel zu höheren Expressionsraten (SHEEN *et al.* 1995, GALBRAITH *et al.* 1995, HASELOFF & SIEMERING 1998).

Das in der vorliegenden Arbeit für die Transfektion in Tabak eingesetzte sGFP-S65T stellte bereits eine optimierte GFP-Variante dar. sGFP-S65T ist eine GFP-Variante mit einer für menschliche Gene optimierten Codon-Präferenz, die in Pflanzenzellen gute Expressionsergebnisse zeigte (CHIU *et al.* 1996, SHEEN *et al.* 1995). Ein potentielles kryptisches pflanzliches Intron (HASELOFF *et al.* 1997), das zum Spleißen der mRNA in Pflanzen führte, wurde durch Basenaustausch eliminiert.

Transfektionsraten von mehr als 80 % wurden nach PEG-Transfektion des sGFP-S65T unter Kontrolle des starken HBT-Promotors in Tabak-Protoplasten erreicht (CHIU *et al.* 1996).

Da die Positivkontrollen eine Expression des sGFP-S65T unter Kontrolle des HBT-Promotors zeigten, ist auszuschließen, daß die fehlende Expression der ATPase-GFP-Fusionsproteine in Tabak-Protoplasten im Zusammenhang mit einem zu schwachen Promotor und einer nicht optimalen GFP-Variante steht.

### 4.1.2 Unterbindung der Translation

Bereits auf der Ebene der Translation könnte die Proteinsynthese der Fusionsproteine unterbunden worden sein. Die Effektivität der Translation in heterologen Expressionssystemen hängt unter anderem stark von der Codon-Präferenz (*codon bias*) ab (CHIAPELLO *et al.* 1998, BATARD *et al.* 2000). Es gibt Hinweise, daß geringfügige Abweichungen in der Codon Präferenz bei heterologer Expression von Genen zu Leserasterverschiebungen, Fehlablesungen und verfrühter Termination der Translation führen können (KANE 1995, KURLAND & GALLANT 1996).

Für kerncodierte Gene aus *Dunaliella* (LAROUCHE *et al.* 1990) und anderen einzelligen Grünalgen (SIFLOW *et al.* 1985, GOLDSCHMIDT-CLERMONT & RAHIRE 1986, IMBAULT *et al.* 1988, LONG *et al.* 1989, WOLF *et al.* 1993) ist eine Präferenz für Tripletts zu beobachten, die in der dritten Position ein C oder G besitzen. Diese Präferenz zeigen auch die beiden ATPase-Gene von DBPMA1 (WOLF 1993) und DBCA1. In Hefen und dikotylen Pflanzen wie Tabak werden bevorzugt Codons verwendet, die an dritter Stelle mit T enden. Auch besitzen die Nukleinsäure-Sequenzen aus Tabak in der Regel einen geringeren GC-Gehalt als die aus Grünalgen.



BATARD *et al.* (2000) haben nach Expression von P450 Enzymen, die einen hohen GC-Gehalt aufweisen, zwar die Transkription des Gens, nicht aber das Protein in Tabak und Hefe nachweisen können. Erst nach Anpassung der Codon-Präferenz an dikotyle Pflanzen im 5'-Bereich der Gene, konnte ein deutlicher Anstieg der Proteinsynthese in Tabak und Hefe beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die ATPase-GFP-Fusionsgene unter Beibehaltung des natürlichen Basenkontext der möglichen Startcodons der ATPasen in Tabak-Protoplasten transfiziert. *Dunaliella* zeigt weder bei DBCA1 noch bei DBPMA1 in den Basen in unmittelbarer Nähe der möglichen ATG-Triplets eine Übereinstimmung mit der für Pflanzen postulierten Consensus-Sequenz (LÜTCKE 1987). Das läßt auch vermuten, daß Grünalgen möglicherweise eine andere Consensus-Sequenz besitzen als höhere Pflanzen.

Unterschiede in der Codon-Präferenz von Tabak und *Dunaliella* und ein nicht optimaler Basenkontext der Translationsinitiationsstartstelle könnten daher eine Erklärung für die fehlende Expression der ATPase-GFP-Fusionsproteine in Tabak-Protoplasten sein.

### 4.1.3 Aggregation der ATPase-GFP-Fusionsproteine

Die Bildung nicht-fluoreszierender Einschußkörper durch Aggregation der Fusionsproteine in Tabak-Protoplasten kann als weiterer Grund für eine fehlende Fluoreszenz der Fusionsproteine in Frage kommen. Einschußkörper sind intrazelluläre, unlösliche Protein-Aggregationen aus biologisch inaktiven und wahrscheinlich nicht korrekt gefalteten Proteinen. Sie werden bei der Expression von rekombinanten Proteinen in heterologen Systemen häufig beobachtet und werden auch bei GFP-Chimären als Grund für eine geringe Fluoreszenzintensität bis zur vollständigen Unterbindung der Fluoreszenz angeführt (HEIM 1994, CRAMERI *et al.* 1996). SIEMERING *et al.* (1996) haben für GFP auch eine temperaturabhängige Faltung des Apoproteins analysiert, die dazu führt, daß der größte Teil des GFP bei einer Inkubationstemperatur von 37° C als nicht fluoreszierendes Protein in unlöslichen Zellfraktionen zu finden ist. Die Unterbindung der Fluoreszenz durch Fehlfaltungen der Apoproteine bei hohen Inkubationstemperaturen (SIEMERING *et al.* 1996) kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da die Inkubationstemperaturen der Tabak-Protoplasten nicht über 25° C lag.

Über 10.000 Moleküle GFP-S65T oder EGFP sind erforderlich, um GFP in Laser Scanning Mikroskop (CLSM) zu detektieren (PATTERSON *et al.* 1997). Das Chromophor ist kovalent mit dem GFP verbunden. Die Tripeptidsequenz des Chromophors wird durch Zyklisierung und Oxidation durch eine post-translationale Modifikation innerhalb der Polypeptidkette geformt (CUBITT *et al.* 1995, HEIM *et al.* 1994, ORMO *et al.* 1996, PRASHER 1995). Eine nicht ausreichende Molekülmenge richtig gefalteter grün fluoreszierender (Fusions-)Proteine kann daher als Ursache für eine nicht sichtbare

Expression der ATPase-GFP-Fusionsproteine im Mikroskop in Frage kommen. Die Bildung des reversiblen, autokatalytischen Chromophors und damit dessen Lichtemission wird unterbunden, wenn die Zyklisierung nicht vor der Aggregation erfolgt. Besonders transient exprimiertes Membran-assoziiertes GFP begünstigt die Multimerisation der Fusionsproteine (CUBITT *et al.* 1995; DE ANGELIS *et al.* 1998). Es ist daher möglich, daß die Fusionsgene zwar translatiert wurden, die Expression aber fluoreszenzoptisch nicht nachgewiesen werden konnte, da eine Coagulation von Membranproteinen oder Fehlfaltungen der ATPase-GFP-Fusionsproteine zu einer Aggregation führten.

#### 4.1.4 Proteinabbau

Fehlende Fluoreszenz nach Transfektion der jeweils ersten beiden GFP-markierten Transmembransegmente in Tabak-Protoplasten kann jedoch auch durch einen Abbau der Fusionsproteine bedingt sein.

Die erste klonierte plasmamembranständige  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase *At-ACA8* (BONZA *et al.* 2000) wurde GFP-markiert und in *Arabidopsis* stabil exprimiert. Obwohl die transgenen Pflanzen auf Ampicillin selektierbar waren, konnte die Expression der GFP-markierten ATPase weder fluoreszenzmikroskopisch noch immunocytoologisch nachgewiesen werden (C. OLIVARI, persönliche Mitteilung).

PLEMPER *et al.* (1998) zeigten in Hefe, daß der plasmamembranständige ABC-Transporter Pdr5, der nach Mutation in die ER-Membran inseriert wird, vermutlich mit Hilfe eines Translokons aus der Membran extrahiert wird und anschließend im cytoplasmatischen Ubiquitin-Proteasomen-System abgebaut wird. Ebenso der  $\text{Cl}^-$ -Translokator CFTR der Epithelien; der Verlust des Phenylalanins in Position 508 der Polypeptidkette unterbindet die korrekte Faltung des Proteins im ER und führt dazu, daß kein CFTR in der Plasmamembran erscheint. Statt dessen wird es über den ER-assoziierten Proteasomenweg abgebaut (BROWN *et al.* 1996, QU *et al.* 1997).

Neben dem regulierten Abbau von Zellproteinen findet in Proteasomen unter anderem der Abbau fehlgefalteter Polypeptide statt. Proteasomen sind die zentralen Enzyme des nicht-lysosomalen Proteinabbaus in Zellen höherer Organismen. Der Abbauprozess über das Ubiquitin-Proteasomen-System ist in Tieren, Pflanzen und Hefen konserviert (VOGES *et al.* 1999). Es ist daher nicht auszuschließen, daß in den verwendeten Fusionsproteinen Fehlfaltungen durch fehlende C-terminale Sequenzbereiche der ATPasen oder durch die Fusion mit GFP eingetreten sind. Ein Abbau der membranständigen Fusionsproteine über den ATP-abhängigen Ubiquitin-Konjugat-Weg ist daher nicht ausgeschlossen.

## 4.2 Expression der ATPase-GFP-Fusionsproteine in tierischen Expressionssystemen

Wie bereits erwähnt, besitzen einzellige Grünalgen im Gegensatz zu dikotylen Pflanzen einen hohen GC-Gehalt und eine auf G und C endende Codon-Präferenz in der dritten Position. Diese Codon-Präferenz wird auch bei vielen Säugetiergenen beobachtet (SUEOKA & KAWANISHI 2000).

Die Ca<sup>2+</sup>-ATPase DBCA1 aus *Dunaliella bioculata* zeigt starke Homologien zu tierischen P-Typ ATPasen des (Sarko-)Endoplasmatischen Retikulums (54 % Identität, 70 % Ähnlichkeit, dagegen zu pflanzlichen Typ IIA ATPasen 44 % Identität und 57 % Ähnlichkeit).

Die Möglichkeit, ATPasen aus *Dunaliella* in tierischen Expressionssystemen zu untersuchen, sollte daher in weiterführenden Versuchen abgeschätzt werden.

Erste Expressionsversuche in HeLa-Zellen verliefen positiv: In der subzellulären Lokalisation waren deutliche Unterschiede zwischen nativem GFP und den Fusionsproteinen erkennbar.

Aufgrund sehr geringer Expressionsraten sowohl des nativen GFP als auch der Fusionsproteine in HeLa-Zellen wurden detailliertere Untersuchungen an COS-7-Zellen durchgeführt, in denen höhere Transfektionsraten erzielt werden konnten.

### 4.2.1 Natives GFP in heterologen Expressionssystemen

Die Transfektion von nativem pEGFP-N1 in HeLa- und in COS-7-Zellen sowie sGFP-S65T in Tabak-Protoplasten führte in allen drei Expressionssystemen zu einer gleichmäßigen Expression des GFP mit Lokalisation im Cytoplasma, verstärkt im perinukleären Bereich und im Nukleoplasma.

Das gleiche Fluoreszenzmuster konnte auch bei anderen Expressionsversuchen mit nativem GFP in HeLa-Zellen (CHATTERJEE & STOCHAJ 1996), COS-7-Zellen (SIMONOVA *et al.* 1999) sowie auch in pflanzlichen Zellsystemen wie Tabak (CHIU *et al.* 1996), Zwiebelepidermiszellen (SCOTT *et al.* 1999) und Wurzelzellen von *Arabidopsis* (HASELOFF *et al.* 1997) beobachtet werden. Die Proteinlokalisierung des nativen GFP (26,9 kDa) im Zellkern transfizierter Zellen und Protoplasten ist auf passive bidirektionale Diffusion durch den Kernporenkomplex zurückzuführen. Die Ausschlußgröße des Kernporenkomplexes liegt bei 40 – 60 kDa (GREBENOK *et al.* 1997, STOCHAJ & SILVER 1992, VON ARNIM *et al.* 1998). Proteine, die größer als die Ausschlußgröße des Kernporenkomplexes sind, werden mit Hilfe eines energieabhängigen Transportprozesses über die Kernmembran in den Zellkern aufgenommen. Dieser Import benötigt spezielle Kernlokalisierungssignale (GÖRLICH 1997), die im GFP-Gen nicht vorhanden sind (VON ARNIM *et al.* 1998).

Das Fluoreszenzmuster nach Expression der ATPase-GFP-Fusionsproteine unterschied sich deutlich von dem des nativen GFP. Das Protein-*Targeting* der Fusionsproteine muß daher durch die N-terminalen Sequenzbereiche, einschließlich der ersten beiden Transmembransegmente beider ATPasen, bedingt sein.

#### 4.2.2 ER-Lokalisation der H<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-ATPase-GFP-Fusionsproteine in COS-7-Zellen

Während bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der transfizierten HeLa-Zellen die genaue Lokalisation der Fusionsproteine nicht bestimmt werden konnte, zeigten Aufnahmen von transfizierten COS-7-Zellen mit konfokaler Laser Scanning Mikroskopie nähere Details der subzellulären Fluoreszenzverteilung. So war nach Expression von M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP, M2-Ca<sup>2+</sup>-EGFP, M3-Ca<sup>2+</sup>-EGFP, M1-H<sup>+</sup>-EGFP und M2-H<sup>+</sup>-EGFP die Fluoreszenz der ATPase-GFP-Fusionsproteine verstärkt im perinukleären Bereich und in netzartigen Strukturen innerhalb der Zellen sichtbar. Vergleichbare Fluoreszenzmuster mit gesicherter ER-Lokalisation zeigten sich in COS-1-Zellen nach Immunfluoreszenzmarkierung mit dem monoklonalen Antikörpern Y/1F4, der gegen die phosphorylierende Domäne der SERCA1a gerichtet war (CARAFOLI *et al.* 1996) sowie einem Konstrukt, bestehend aus dem ER *Targeting*-Signal von  $\alpha_1$ -Antitrypsin, GFP und dem ER-*retrieval*-Signal KDEL, das in COS-7-Zellen exprimiert wurde (VAN GOETHEM *et al.* 1998).

Die Expression der Ca<sup>2+</sup>-ATPase-EGFP-Fusionsproteine und der H<sup>+</sup>-ATPase-EGFP-Fusionsproteine zeigte somit in COS-7-Zellen ein ER-typisches Fluoreszenzmuster. Jedoch kann auch eine zusätzliche Lokalisation der Fusionsproteine in kernnahen Zellorganellen, besonders dem Golgi-Apparat, durch die starke Fluoreszenz im kernnahen ER-Bereich nicht ausgeschlossen werden.

#### 4.2.3 Signalsequenzen/Signalsequenzbereiche für ER-Insertion

Das *Targeting* von ATPasen in das Membransystem des ER findet über den cotranslationalen Transportweg statt (KLEINIG & SITTE 1999). N-terminale Sequenzbereiche der hier verwendeten ATPasen, einschließlich der ersten beiden Transmembransegmente, waren ausreichend, die Translokation ins ER zu vermitteln.

Die für die Insertion ins ER notwendigen Signalsequenzen/Signalsequenzbereiche müssen auf der mRNA der Ca<sup>2+</sup>- und H<sup>+</sup>-ATPase in den N-terminalen Sequenzbereichen lokalisiert sein, da C-terminale Sequenzabschnitte in den ATPase-GFP-Fusionsproteinen fehlten.

Die sukzessive Verkürzung der N-Termini der beider hier untersuchten ATPase Sequenzen hatte auf die Translokation der Fusionsproteine ins tierische ER keinen

Einfluß. Weder konnten fehlende noch cytoplasmatische Fluoreszenz bei einem der ATPase-GFP-Fusionsproteinen mit verkürztem N-Terminus beobachtet werden. Dies läßt darauf schließen, daß die ersten 17 Aminosäuren des N-Terminus von DBPMA1 und die ersten 24 Aminosäuren von DBCA1 keine essentiellen Bestandteile möglicher Signalsequenzen oder Sequenzbereiche für eine ER-Insertion sind. Andere Aminosäure-Sequenzbereiche, die eine Translokation ins ER einleiten, müssen daher in den N-terminalen Sequenzbereichen, einschließlich der ersten beiden Transmembrandomänen von DBPMA1 und DBCA1, vorhanden sein.

Dieses Ergebnis steht bei DBPMA1 in Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß die ersten beiden Transmembransegmente der H<sup>+</sup>-ATPase aus *Neurospora* Membraninsertion ins ER vermitteln können (LIN & ADDISON 1995). Anzunehmen ist, daß der ER-Eintritt durch die ersten beiden Transmembransegmente vermittelt werden kann. Diese hydrophoben Bereiche ermöglichen Proteinen unter anderem translokaseunabhängig, in die ER-Membran zu inserieren (HARTMANN *et al.* 1994, WANG *et al.* 1997).

Den einzigen Hinweis, daß Unterschiede bei der ER-Translokation der verschiedenen naszierenden Ca<sup>2+</sup>-GFP-Fusionsproteine vorhanden sein könnten und M3-Ca<sup>2+</sup>-EGFP begünstigt ins ER inseriert, lieferte das verstärkte Auftreten von fluoreszierenden punktförmigen Proteinansammlungen in COS-7-Zellen. Während diese Partikel bei M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP in 20 % der transienten Zellen und dort verstärkt auftraten, waren sie bei M3-Ca<sup>2+</sup>-EGFP nur bei 5 % aller transfizierten Zellen und dort in geringerer Anzahl feststellbar. Es war daher anzunehmen, daß das *Targeting* der Ribosomen mit dem naszierenden Polypeptid zum ER und die Translokation ins ER suboptimal verläuft bzw. nicht stattfindet je länger der N-Terminus der Ca<sup>2+</sup>-ATPase ist. Ein Teil der Fusionsproteine hätte somit im Cytoplasma und nicht am ER synthetisiert werden können, wo sie, aufgrund der Tendenz integraler Membranproteine zur Polymerisation, aggregieren. Gegen diese Hypothese, daß ein Teil der Fusionsproteine im Cytoplasma synthetisiert wurde, spricht jedoch, daß die fluoreszierenden Proteinansammlungen nicht in allen transfizierten Zellen, sondern nur in 5 – 20 % beobachtet wurden und in den restlichen Zellen nur sehr vereinzelt auftraten. Nach Expression der H<sup>+</sup>-GFP-Fusionsproteine waren sie nicht vorhanden.

SIMONOVA *et al.* (1999) beobachteten nach Expression des GFP-markierten N-Terminus (N-terminale cytoplasmatische und hydrophobe membrandurchspannende Domäne) des integralen Membranproteins Neutral-Endopeptidase aus Kaninchen wider deren Erwartungen nur eine sehr geringe Proteinmenge an der Zelloberfläche. Statt dessen war das Fusionsprotein im Golgi-Apparat und in punktförmigen fluoreszierenden Strukturen erkennbar. SIMONOVA *et al.* (1999) führen diese fluoreszierenden Strukturen auf die Tendenz GFP-markierter-Membranproteine zur Polymerisation und Bildung von Nanoclustern zurück.

Große Mengen an transient exprimierten Membran-assoziiertem GFP können eine vorteilhafte Umgebung zur Multimerisation der Fusionsproteine darstellen (CUBITT *et al.* 1995, DE ANGELIS *et al.* 1998).

In der vorliegenden Arbeit nahm die Anzahl fluoreszierender punktförmiger Proteinansammlungen mit Verkürzung des N-Terminus der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ab. Es ist daher für die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase anzunehmen, daß ein langer N-Terminus eine Multimerisation begünstigt.

#### 4.2.4 Lokalisation oder Retention im ER tierischer Zellen

Die Aminosäuresequenz von DBPMA1 weist 17 Positionen auf, die charakteristisch für Protonen-translozierende P-Typ ATPasen sind (WOLF 1993). Die ersten an der Plasmamembran immunocytologisch nachgewiesenen P-Typ  $\text{H}^+$ -ATPasen waren die Isoformen AHA2 und AHA3 aus *Arabidopsis* (DE WITT *et al.* 1996). Mittlerweile wurden mehrere Isoformen unter anderem durch Verwendung des Reportergens GUS an der Plasmamembran lokalisiert (MORIAU *et al.* 1999). Die einzigen bisher bekannten Ausnahmen sind HAA13 und HAA1 aus der marinen Goldalge *Heterosigma akashiwo*. Durch Antikörper wurde ihre Lokalisation in intrazellulären Membranen der Alge bestimmt (WADA *et al.* 1994). Ein Sequenzvergleich von DBPMA1 zu dem ATPasen-Fragment HAA1 aus *Heterosigma akashiwo* zeigte nur eine 36 %-ige Identität und eine 48 %-ige Ähnlichkeit.

Große Identität zeigt DBPMA1 dagegen zur  $\text{H}^+$ -ATPase aus *Dunaliella acidophila*. Das Protein aus *Dunaliella acidophila* wurde aus der Plasmamembran aufgereinigt und die Aminosäuresequenz ansequenziert. Mit den gewonnenen Sequenzdaten wurden Primer erstellt und aus der genomischen DNA von *Dunaliella acidophila* wurde die plasmamembranständige  $\text{H}^+$ -ATPase amplifiziert (WEISS & PICK 1996).

Die Lokalisation der  $\text{H}^+$ -ATPase DBPMA1 aus *Dunaliella bioculata* an der Plasmamembran kann aufgrund der Sequenzidentität von 78 % und einer Ähnlichkeit von 87 % zur Primärstrukturen der plasmamembranständigen  $\text{H}^+$ -ATPase aus *Dunaliella acidophila* und der phylogenetischen Verwandtschaft beider Algen, als gesichert angesehen werden.

Die Primärstruktur von DBCA1 zeigt größte Ähnlichkeiten zu P-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen des (S)ERs tierischer Organismen (RASCHKE & WOLF 1996). Eine Calmodulin-Bindungsstelle wurden nicht gefunden. Die kalkulierte Molekülmasse der ATPase von 114 kDa ist nur geringfügig geringer als die Molekülmasse bisher klonierter Typ IIA  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen (115 – 116 kDa) aus Pflanzenzellen (GEISLER *et al.* 2000).

Die Lokalisation der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-GFP-Fusionsproteine im ER von HeLa- und COS-7-Zellen könnte die durch Sequenzhomologien vermutete ER-Lokalisation von DBCA1 bestätigen.

Die Interpretation dieser Ergebnisse wird jedoch durch die ausschließliche Lokalisation der H<sup>+</sup>-ATPase-GFP-Fusionsproteine im ER tierischer Zellen in Frage gestellt. So reichten zwar die ersten beiden Transmembransegmente der H<sup>+</sup>-ATPase für eine ER-Insertion aus, nicht aber für das *Targeting* der Fusionsproteine zur Plasmamembran.

#### 4.2.4.1 Topogene Signale für ER-Retention der Ca<sup>2+</sup>-ATPase-GFP-Fusionsproteine

Die Strukturen, die für das subzelluläre *Targeting* von ATPasen und deren Zurückhaltung im ER verantwortlich sind, sind noch weitestgehend unbekannt (GEISLER *et al.* 2000). Daß die Insertion ins tierische ER durch N-terminale Sequenzbereiche der ATPasen vermittelt wird, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden.

Die Lokalisation der Fusionsproteine M1-H<sup>+</sup>-EGFP und M2-H<sup>+</sup>-EGFP im ER anstelle der Plasmamembran von COS-7-Zellen wirft aber die Frage auf, ob die Lokalisation der Ca<sup>2+</sup>-ATPase-GFP-Fusionsproteine die Lokalisation von DBCA1 im ER bestätigen kann.

Für eine ER-Lokalisation der Ca<sup>2+</sup>-ATPase-GFP-Fusionsproteine spricht das Aminosäuremotiv KILL im ersten Transmembransegment der Ca<sup>2+</sup>-ATPase DBCA1.

Das R/KILL Motiv ist auch im ersten Transmembransegment der SER Ca<sup>2+</sup>-ATPasen von *Drosophila* lokalisiert und wird als topogenes Signal für eine ER-Retention diskutiert (MAGYAR & VARADI 1990, EVANS & WILLIAMS 1998). Es kommt auch bei T-Zellen Antigen Rezeptoren aus dem ER vor und ist bei einer Vielzahl tierischer Ca<sup>2+</sup>-ATPasen des (S)ERs konserviert. In tierischen Typ IIB Ca<sup>2+</sup>-ATPasen tritt es dagegen nicht auf. Ein *Multiple Alignment* von GEISLER *et al.* (2000) zeigte, daß das R/KILL-Motiv auch bei den meisten pflanzlichen Typ IIA Ca<sup>2+</sup>-ATPasen im ersten Transmembransegment konserviert ist. So ist es unter anderem in den Aminosäuresequenzen der pflanzlichen Ca<sup>2+</sup>-ATPasen aus *Acetabularia acetabulum*, *Orzya sativa*, einigen Isoformen aus *Arabidopsis* und *Lycopersicon esculentum* zu finden.

Die Expression chimärer SERCA1a/PMCA3-ATPasen zeigte, daß die ersten zwei Drittel der ATPase zur Determinierung der ER-Lokalisation ausreichend sind (BLACK *et al.* 1998).

Immunofluoreszenzuntersuchungen mit rekombinanten Chimären aus einer tierischen SER (rSERCA1) und einer PM Ca<sup>2+</sup>-ATPase (hPMCA4CI) grenzten diese Bereiche weiter ein und konnten zeigen, daß die Zielsteuerungssignale der SER-ständigen Ca<sup>2+</sup>-ATPase in das ER von COS-7-Zellen, durch Aminosäuresequenzen am N-Terminus (einschließlich des ersten Transmembransegmentes) festgelegt sind (FOLETTI *et al.* 1995).

Neben dem R/KILL Motiv im ersten Transmembransegment werden für integrale Membranproteine auch noch C-terminale Sequenzbereiche für eine ER-Retention diskutiert (JACKSON *et al.* 1990, SHIN *et al.* 1991, EVANS & WILLIAMS 1998, GEISLER

*et al.* 2000). In tierischen Zellen enthalten viele ER-residente Membranproteine C-terminale Retentionssignale mit dem Consensus (K/X)(K/X)KXX-Stop (JACKSON *et al.* 1993). Die Lysin-reichen Motive KKXX oder KKKXX treten zwar bei Tomate und *Arabidopsis* auf, kommen aber bei der Ca<sup>2+</sup>-ATPase aus *Dunaliella* nur in abgewandelter Form als KLK-Motiv vor. Bei der tierischen SERCa1p aus Huhn sind sie gar nicht vorhanden (KARIN & SETTLE 1992).

Neben den bis jetzt bekannten C- und N-terminalen topogenen Signalen für eine ER-Retention müssen aber noch andere Faktoren oder Sequenzen eine Rolle spielen. So ist die Ca<sup>2+</sup>-ATPase Isoform ACA2p aus *Arabidopsis* im ER lokalisiert, hat aber weder ein bekanntes ER-Retentions-Motiv am C-Terminus noch eine konservierte erste Transmembrandomäne (HONG *et al.* 1999).

Eine Chimäre, die aus dem N-Terminus mit den ersten beiden Transmembransegmenten der hPMCA4CI und dem Rest der rSERCA1 bestand, zeigte eine Lokalisation sowohl in der Plasmamembran als auch im ER. Dies könnte bedeuten, daß die SER Ca<sup>2+</sup>-ATPase zusätzlich zu den am N-Terminus lokalisierten Signalen weitere topogene Signale besitzt, die für eine Retention im ER verantwortlich sind. Da sich aber auch bei der SER Ca<sup>2+</sup>-ATPase am Ende des C-Terminus keine typischen lysinreichen ER-Retentions-Signale befanden, könnte angenommen werden, daß noch andere Regionen des Proteins in den ER-Retentionsprozess involviert sind. GUERINI *et al.* (1998) dagegen schließen mit Chimären ATPase-Konstrukten aus PMCA1 und SERCA1 die Transmembrandomänen-vermittelte Lokalisation im ER aus und konnten belegen, daß in den ersten 28 Aminosäuren der SERCA1 des Menschen ein ER-Retentions-signal lokalisiert ist.

FOLETTI *et al.* (1995), GUERINI *et al.* (1998) und auch BLACK *et al.* (1998) belegten, daß N-terminale Sequenzbereiche für eine Translokation von Ca<sup>2+</sup>-ATPasen ins ER und auch für deren dortige Retention ausreichen. Das in DBCA1 im ersten Transmembransegment vorkommende und als Retentionssignal postulierte R/KILL Motiv stellt ein universelles, organismenübergreifendes Aminosäure-Motiv für die Zurückhaltung von Membranproteinen im ER dar. Obgleich GUERINI *et al.* (1998) zeigten, daß das R/KILL-Motiv nicht notwendigerweise Einfluß auf die ER-Retention hat, sondern N-terminale Aminosäuren die Zurückhaltung vermitteln, ist anzunehmen, daß die N-terminalen Aminosäuresequenzen von DBCA1, einschließlich der ersten beiden Transmembransegmente, das *Targeting* der ATPase-Fusionsproteine ins ER und ihre dortige Lokalisation bedingen.



#### 4.2.4.2 Retention der H<sup>+</sup>-ATPase-GFP-Fusionsproteine im ER

Die Lokalisation der H<sup>+</sup>-ATPase-GFP-Fusionsproteine im ER tierischer Zellen zeigte, daß es weitere Faktoren für eine Zurückhaltung der ATPase-GFP-Fusionsproteine im ER geben muß, die eine Retention beeinflussen und das *Targeting* zur Plasmamembran unterbinden können.

Die H<sup>+</sup>-ATPase-GFP-Fusionsgene wurden unter Kontrolle des starken CMV-Promotors in *multicopy* Plasmiden zur Expression gebracht. Die daraus resultierende Überexpression der Fusionsproteine kann dazu führen, daß ein Großteil der Proteine im ER verbleibt und nicht zur Plasmamembran gelangt. Chimäre Konstrukte von PMCA3 und SERCA1a zeigten aber bei Überexpression in COS-7-Zellen sowohl eine ER- als auch eine Plasmamembran-Lokalisation (BLACK *et al.* 1998). Die Expression der H<sup>+</sup>-ATPase in COS-7-Zellen zeigte dagegen keine Plasmamembran-Lokalisation. Die Fluoreszenz der in COS-7-Zellen exprimierten Fusionsproteine grenzte sich nicht gegen das Außenmedium ab. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß kein *Targeting* der H<sup>+</sup>-ATPase-GFP-Chimären zur Plasmamembran stattgefunden hat und die Ursachen nicht in einer Überexpression der Fusionsproteine lagen.

#### 4.2.4.3 Qualitätskontrolle im ER

Die selektive Zurückhaltung und Degradation falsch gefalteter oder mutierter Proteine im ER könnte eine weitere Erklärung für die ER-Lokalisation der ATPase-GFP-Fusionsproteine sein.

Das Endoplasmatische Retikulum ist der Eingang der Membranproteine in den Sekretorischen Transportweg. Im ER beginnt die Prozessierung der entstehenden Proteine. Außerdem findet hier eine Qualitätskontrolle der fertigen Proteine statt (PLEMPER & WOLF 1999). Fehlfaltete und nicht richtig assemblierte Proteine können durch Chaperone erkannt werden (KOPITO 1997) und verbleiben im ER, bevor sie zum größten Teil durch Ubiquitynylierung in Proteasomen abgebaut werden. Bei Plasmamembran Ca<sup>2+</sup>-ATPasen konnte dies nach Verkürzung des C-Terminus (ZVARITCH *et al.* 1995) und Punktmutationen an Aminosäuren, die vermutlich die Pore für Calcium bilden (GUERINI *et al.* 1996), festgestellt werden.

Gegen die generelle Retention fehlgefalteter Proteine sprechen jedoch die Versuche von HEIM *et al.* (1992) und ZVARITCH *et al.* 1995 (FOLETTI *et al.* 1995), die N-terminal verkürzte (die ersten beiden Transmembransegmente fehlten) und inaktive Formen einer PM-Ca<sup>2+</sup>-ATPase nach Expression in COS-7-Zellen und Sf9-Zellen an der Plasmamembran vorfanden.

Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß die Retention der ATPase-GFP-Chimären im ER auf Fehlfaltung der Fusionsproteine beruht. Zwar konnten FOLETTI *et al.* (1995), GUERINI *et al.* (1998) und BLACK *et al.* (1998) an ATPase-Chimären zeigen, daß die ersten beiden Transmembransegmente der plasmamembranständigen

Ca<sup>2+</sup>-ATPase ein *Targeting* zur Plasmamembran vermitteln, jedoch setzten sich in deren Versuchen die rekombinanten ATPase-Chimären aus Membranstruktur-ähnlichen ATPasen zusammen.

Eventuelle Fehlfaltungen der in der Arbeit verwendeten Fusionsproteine können durch den Einfluß des GFP oder aber durch fehlende Aminosäuresequenzen der ATPasen bedingt sein. Gegen eine GFP-bedingte Fehlfaltung der Fusionsproteine spricht jedoch, daß die mit GFP markierte SERCA1a durch die Fusion mit GFP die Fähigkeiten zum Calciumtransport nicht verloren hatte (VAN GOETHEM *et al.* 1998) und auch die GFP-markierte Ca<sup>2+</sup>-ATPase SCA1 aus Soja nach heterologer Expression in BY-2 Zellen an der Plasmamembran lokalisiert war (CHUNG *et al.* 2000).

#### 4.2.4.4 Zusätzliche Signale

In der Arbeit sollte geklärt werden, ob N-terminale GFP-markierte Sequenzbereiche der ATPasen ausreichen, die subzelluläre Lokalisation der ATPase in heterologen Expressionssystemen zu bestimmen. Die Lokalisation der H<sup>+</sup>-ATPase-GFP-Fusionsproteine im ER von COS-7-Zellen wirft daher auch die Frage auf, ob in den fehlenden Aminosäuresequenzen der ATPasen weitere Informationen codiert sind, die den Transport zur Plasmamembran bewirken oder für eine Retention im ER sorgen.

Zum *Targeting* der PMCA3/SERCA1a Chimäre an die Plasmamembran in COS-7-Zellen reichten die ersten beiden Transmembrandomänen von PMCA3 aus (BLACK *et al.* 1998). Auch FOLETTI *et al.* (1995) konnten mit PMCA/SERCA-Chimären in COS-7-Zellen zeigen, daß die ersten beiden Transmembransegmente von PMCA aus dem Menschen, den Transport der Chimären an die Plasmamembran bedingen. ZVARITCH *et al.* (1995) konnten dagegen durch Mutageneseversuche an plasmamembranständigen Ca<sup>2+</sup>-ATPasen zeigen, daß sich am C-Terminus in unmittelbarer Nähe der CaM-Bindungsstelle ein ER-Retentions-Signal befindet, das im vollständigen Protein nicht zum tragen kommt, jedoch bei verkürztem C-Terminus zur Retention und zum Abbau des Proteins im ER führt. Die Verkürzung des C-Terminus der plasmamembranständigen Ca<sup>2+</sup>-ATPase führt dazu, daß die ATPase durch Calmodulin nicht mehr regulierbar ist. Es ist daher zu vermuten, daß es sich bei der Zurückhaltung von verkürzten ATPasen im ER um einen Schutzmechanismus handelt, der die Zelle vor unkontrollierbaren und nicht vorhersehbaren Eigenschaften der in ihrer Struktur veränderten ATPasen schützt. Dieses Retentionssignal führt nicht zur Zurückhaltung andere Proteine, wenn es ihnen an den C-Terminus angehängt wurde. Es ist auch in anderen P-Typ ATPasen nicht vorhanden, sondern scheint spezifisch für Ca<sup>2+</sup>-ATPasen der Plasmamembran zu sein.

Inwieweit solche ER-Retentionssignale auch bei H<sup>+</sup>-ATPasen vorhanden sind, ist nicht bekannt. Jedoch konnte bei Verkürzung des N-Terminus der H<sup>+</sup>-ATPasen aus Hefe, eine Retention im Endomembransystem von Hefen beobachtet werden (VILLALBA *et al.* 1992).

Die heterologe Expression individueller pflanzlicher H<sup>+</sup>-ATPasen in Hefe zeigte, daß die Isoformen AHA1, AHA2 und AHA3 aus *Arabidopsis thaliana* in den internen Hefemembranen akkumulierten (VILLALBA *et al.* 1992, PALMGREN & CHRISTENSEN 1993, PALMGREN & CHRISTENSEN 1994), während die Expression der Isoformen PMA2 und PMA4 aus Tabak zu einer plasmamembranständigen Lokalisation führte (LUO *et al.* 1999, DE KERCHOVE D'EXAERDE *et al.* 1995). Daß die ER-Retention nicht durch Fehlfaltung bedingt war, zeigt die Tatsache, daß alle heterolog in Hefe exprimierten Isoformen biochemisch aktiv waren (LUO *et al.* 1999).

Diese Ergebnisse machen deutlich, daß es neben der Zurückhaltung fehlgefalteter, inaktiver und unregulierbarer ATPasen noch andere Mechanismen geben muß, die eine Retention im ER bewirken. Neben der Fehlfaltung von Proteinen werden auch andere Einflüsse der intrazellulären Prozessierung, wie die Phosphorylierung und Glykosylierung für Fehler des intrazellulären *Targetings* und einer Retention im ER vermutet (BROWN & BRETON 2000).

Alle bisher bekannten Signalsequenzen für die ER-Insertion sind ähnlich strukturiert und an Proteinen untereinander austauschbar (VON HEIJNE 1985). Das zum Erkennungsmechanismus zugehörige SPR (*signal recognition particle*) kommt in allen Organismen vor (HARTMANN *et al.* 1994). Der Prozeß der Insertion in das ER scheint daher ein konservierter Mechanismus aller Organismen zu sein. So konnte auch in der Arbeit gezeigt werden, daß die Translokation pflanzlicher ATPasen in das ER tierischer Zellen erfolgt.

Über die Weiterleitung der Proteine über das ER zu ihren Bestimmungsorten in der Zelle gibt es bei Hefe und tierischen Systemen zahlreiche Erkenntnisse. Der Vesikeltransport- und der Sortiermechanismus in Pflanzenzellen ist dagegen noch weitestgehend unbekannt (ROBINSON *et al.* 1998). Die Retention pflanzlicher und biochemisch aktiver H<sup>+</sup>-ATPasen im ER von Hefen (VILLALBA *et al.* 1992, PALMGREN & CHRISTENSEN 1993, PALMGREN & CHRISTENSEN 1994) sind Hinweise, daß sich Sortierungs-Signale und -Mechanismen in verschiedenen Organismen unterscheiden können.

Es kann daher nicht abschließend geklärt werden, ob die Retention der H<sup>+</sup>-ATPase-GFP-Fusionsproteine im ER tierischer Zellen auf die Zurückhaltung fehlgefalteter Proteine zurückzuführen ist oder ob strukturelle Einflüsse des reifen Proteins den Transport zur Plasmamembran beeinflussen. Auch Retentionssignale oder Unterschiede in den Sortierungsmerkmalen zwischen pflanzlichen und tierischen integralen Membranproteinen, die den Eintritt in den Sekretorischen Transportweg verhindern, können als Grund für eine ER-Retention der Fusionsproteine nicht ausgeschlossen werden.

### 4.3 Translationsstartcodons der Fusionsproteine

Im richtigen Leserahmen der Nukleinsäuresequenz von DBCA1 und DBPMA1 befinden sich am jeweiligen N-Terminus mehrere ATG-Triplets, die theoretisch als Translationsstart fungieren könnten.

Durch sukzessive Verkürzung der N-Termini bis zum jeweils nächsten ATG in 5' → 3'-Richtung sollte nach dem Ausschlußprinzip Informationen über die Lokalisation möglicher Signalsequenzen/Signalsequenzbereiche und tatsächlich genutzter Startcodons erhalten werden.

Es zeigte sich, daß alle Fusionsproteine exprimiert und ins ER inseriert wurden. Während die Länge des N-Terminus keinen Einfluß auf die Insertion ins ER hatte, führte jedoch die gezielte Verkürzung der Fusionsproteine sowohl bei der H<sup>+</sup>- als auch bei der Ca<sup>2+</sup>-ATPase zu einem deutlichen Anstieg der Proteinsynthese.

Die Translation von Proteinen wird primär durch die Initiation kontrolliert (GRAY & WICKENS 1998).

Bei Eukaryoten bindet ein Initiationsfaktor, das CAP-bindende Protein eIF4E, an die 5'-CAP-Struktur und fördert die Bildung eines Komplexes zwischen mRNA und der 40S-Untereinheit der Ribosomen. Die 40S-Untereinheit wandert dann an der mRNA entlang. Nach dem „Scanning Modell“ findet die Translationsinitiation der meisten Gene am ersten AUG in 5' → 3'-Richtung statt. Dort wird die 60S-Untereinheit des Ribosomens angefügt, und es resultiert ein 80S-Initiationskomplex, der für die Elongation bereit ist. Die Initiation wird dabei durch die Consensus-Sequenz um das Startcodon (KOZAK 1987a, LÜTCKE 1987) positiv begünstigt.

Es kommt aber auch vor, daß die Translation nicht am ersten AUG beginnt, sondern die Translationinitiation erst am zweiten oder dritten in 3'-Richtung gelegenen AUG-Triplett stattfindet. Der von KOZAK (1989) als „Leaky scanning Modell“ bezeichnete Mechanismus, der die Ribosomen veranlaßt, potentielle Startcodons zu ignorieren, ist nicht genau bekannt. Begünstigt wird er durch eine nicht optimale Consensus-Sequenz um das erste Startcodon, nahe aufeinanderfolgende AUG-Triplets, ein Stopcodon nach dem AUG im selben Leseraster und ein darauffolgendes AUG sowie einen nicht ausreichenden Basenabstand zwischen CAP-Struktur und AUG (KOZAK 1995).

Diskutiert wird auch der Prozeß einer Reinitiation der Ribosomen. Nach Translation eines kurzen offenen Leserahmens (sORF) im 5'-UTR kann am Startcodon im eigentlichen offenen Leserahmen (ORF) die Translation erneut beginnen (RYABOVA & HOHN 2000). Die sORF der meist längeren 5'-UTRs haben dabei regulatorische Funktionen auf die Translation. Eine Reinitiation von Ribosomen wurde für viele virale mRNAs, aber auch bei pflanzlichen (FUTTERER & HOHN 1996) und tierischen Genen (KOZAK 1991), die für eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und Tumor-Suppressoren kodieren, beobachtet. Auch für die pflanzliche plasma-

membranständige H<sup>+</sup>-ATPase PMA3 aus Tabak wurde ein langer 5'-UTR mit kurzem offenen Leserahmen und regulierender Wirkung beschrieben (LUKASZEWICZ *et al.* 1998). Der genaue Mechanismus, der die Ribosomen zur Reinitiation bewegt, ist bis jetzt nicht bekannt. Von Hefe weiß man, daß der Transfer der Ribosomen durch Phosphorylierung der Aminosäure Ser<sup>51</sup> des Faktors eIF2a kontrolliert wird, der die Initiation der tRNA aktiviert (YUDKOVSKY *et al.* 2000). Je länger jedoch der sORF, desto ineffizienter wird die Translation reguliert. Die Reinitiation steigt mit wachsender Distanz zwischen dem sORF und dem eigentlichen ORF (KOZAK 1989, HINNEBUSH 1997) und beträgt bei einer Länge von 79 Nukleotiden nahezu 100 % (KOZAK 1987b).

### 4.3.1 Steigerung der Proteinsynthese mit Verkürzung der N-Termini der H<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-ATPase

In der Annahme, daß die Translation der ATPase-GFP-Fusionsgene dem normalen „Scanning Modell“ folgt, wurde zur Translations-Optimierung der pflanzlichen ATPase-GFP-Fusionsproteine in tierischen Expressionssystemen, das jeweils erste ATG jedes Fusionsgens der tierischen Kozak Consensus-Sequenz angepaßt. Es wurden damit auch identische Voraussetzungen für die Translation der verschiedenen Fusionsgene geschaffen.

Während im konfokalen Laser Scanning Mikroskop keine Unterschiede in der Intensität und Lokalisation der verschiedenen Konstrukte zu beobachten waren, zeigte sich bei der quantitativen Bestimmung der Expressionsrate, daß die Proteinsynthese der ATPase-GFP-Fusionsproteine M2-H<sup>+</sup>-EGFP und M3-Ca<sup>2+</sup>-EGFP in COS-7-Zellen am höchsten war. Dies deutet darauf hin, daß die ATG-Triplets an Position 117 – 119 der Nukleinsäuresequenz von DBCA1 und Position 72 – 74 von DBPMA1 die effektiveren Translationsstartstellen für die Proteinsynthese der beiden ATPasen in tierischen Zellen darstellen.

Für DBCA1 stimmt dieses Ergebnis mit der durch Sequenzvergleiche mit anderen Typ IIA Ca<sup>2+</sup>-ATPasen gewonnenen Annahme überein, daß nicht das erste ATG im offenen Leseraster das eigentliche Translationsstartcodon darstellt, sondern das dritte ATG an Position 117 – 119 (3.1.1). Bei der H<sup>+</sup>-ATPase DBPMA1 wurde hingegen das erste ATG an Position 23 – 25 aufgrund der Übereinstimmung mit der tierischen Consensus-Sequenz als Startcodon favorisiert. Die unterschiedlich starke Proteinsynthese von M1-H<sup>+</sup>-EGFP und M2-H<sup>+</sup>-EGFP weist jedoch auf das zweite Startcodon an Position 72 – 74 als tatsächliches Startcodon hin.

Der dem tierischen Kozak Consensus angepaßte Basenkontext um das jeweils erste ATG-Triplett der Fusionsgene, hätte theoretisch bei allen Fusionsproteinen eine ideale Translationsinitiationsstartstelle darstellen müssen. Davon ausgehend, daß daher

bei allen Fusionsgenen das jeweils erste optimierte Startcodon als Translationsstart benutzt würde, hätte die Proteinsynthese der drei Fusionsproteine der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sowie der beiden Fusionsproteine der  $\text{H}^+$ -ATPase annähernd gleich stark sein müssen. Da aber deutliche Unterschiede in der Expressionsrate der einzelnen Fusionsgene vorhanden waren, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Translationsinitiation aller Fusionsgene doch nicht am jeweils ersten AUG-Codon der mRNA beginnt, sondern in tierischen Systemen am zweiten AUG an Position 72 – 74 von DBPMA1 und am dritten AUG an Position 117 – 119 bei DBCA1 einsetzt.

Eine mögliche Erklärung für die Initiation der Ribosomen an in 3'-Richtung gelegenen nachfolgenden AUG-Tripletts liefert das bereits erwähnte „Leaky scanning Modell“ (KOZAK 1989). Diesem Mechanismus entsprechend, wäre die Steigerung der Proteinsynthese von M1- $\text{H}^+$ -EGFP zu M2- $\text{H}^+$ -EGFP bzw. M1- $\text{Ca}^{2+}$ -EGFP zu M3- $\text{Ca}^{2+}$ -EGFP auf die optimierte Translationsinitiationsstelle an Position 117 – 119 bei M3- $\text{Ca}^{2+}$ -EGFP und Position 72 – 74 bei M2- $\text{H}^+$ -EGFP zurückzuführen. Diese Translationsstartstellen werden eventuell auch in den anderen Fusionsgenen benutzt, wo aber das ATG an Position 72 – 74 bei DBPMA1 und Position 117 – 119 bei DBCA1 keinen optimierten Basenkontext für die Translationsinitiation besitzt. Daher könnte die Expressionsrate der anderen Fusionsproteine gegenüber M3- $\text{Ca}^{2+}$ -EGFP und M2- $\text{Ca}^{2+}$ -EGFP geringer sein.

Die Steigerung der Proteinsynthese mit Verkürzung des N-Terminus beider ATPasen zeigt, daß ein an den tierischen Kozak Consensus angepaßter Basenkontext um das Startcodon, die Translationsinitiation nicht alleine beeinflußt, sondern auch andere Translationsinitiations-Mechanismen bei der Erkennung der Startcodons eine Rolle spielen müssen.

### 4.3.2 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf *Dunaliella bioculata*

Inwieweit diese in tierischen Zellen beobachteten Ergebnisse auf *Dunaliella bioculata* übertragbar sind, ist nicht eindeutig zu klären. Zu wenig Gene sind aus Algen charakterisiert, um für deren Translationsstart eine Consensus-Sequenz ableiten zu können bzw. eine Übereinstimmung mit den für tierische und pflanzliche Systeme postulierten Consensus-Sequenzen eindeutig festzustellen.

Bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase aus *Dunaliella bioculata* zeigt keines der drei ATG-Tripletts eine Übereinstimmung mit der für pflanzliche Gene bestimmten Consensus-Sequenz (3.1.1, Tab. 5), aber alle drei ATG-Tripletts stehen in einem fast identischen Basenkontext. Bei der  $\text{H}^+$ -ATPase ist eine Übereinstimmung mit dem tierischen, nicht aber mit der pflanzlichen Consensus-Sequenz bei einem ATG-Triplett vorhanden.

Bei tierischen mRNAs, deren Nukleotide in unmittelbarer Nähe des ersten ATG nicht mit der von KOZAK postulierten Consensus-Sequenz in den beiden wichtigen Basen

an Position -3 und +4 übereinstimmt, wurde beobachtet, daß die Initiation der Translation am nächsten ATG in 3'-Richtung beginnen kann (KOZAK 1995, 1996) oder zwei Proteine von einer mRNA synthetisiert werden können (KOZAK 1996). Ein Beispiel hierfür lieferten OSSIPPOW *et al.* (1993). Von denselben mRNAs des Leucin-Zipper Proteins C/EBP und dem Transkriptionsaktivierungsprotein LAP, mit jeweils mehreren ATG-Tripletts im offenen Leseraster, wurden zwei Proteine mit unterschiedlich langem N-Terminus synthetisiert, wenn keines der Startcodons sich im optimalen von KOZAK (1987a) beschriebenen Basenkontext befand.

Die pflanzlichen P-Typ H<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-ATPasen werden durch Multigenfamilien kodiert, von deren Isoformen manche auch in Spleißvarianten auftreten (CARAFOLI & GUERINI 1993, MORSOMME & BOUTRY 2000, PORTILLO 2000, GEISLER *et al.* 2000, OUFATTOLE *et al.* 2000).

Es konnte gezeigt werden, daß zahlreiche Isoformen in höheren Pflanzen entwicklungs- und gewebespezifisch exprimiert werden (DE WITT & SUSSMAN 1995, GEISLER *et al.* 2000, EVANS & WILLIAMS 1998). So sind z. B. aus Tomate die beiden Isoformen LCA1A und LCA1B mit 100 %-iger Sequenzidentität aber unterschiedlich langen 5'-UTRs identifiziert worden (SZE *et al.* 2000). Die Bedeutung zweier mRNAs, hervorgerufen durch unterschiedliche Translationsinitiation, ist bis jetzt nicht klar. Die Beteiligung individueller Isoformen an funktionell und biochemisch unterschiedlichen physiologischen Funktionen in der Pflanze werden daher vermutet (GEISLER *et al.* 2000). Vor diesem Hintergrund ist nicht auszuschließen, daß von der mRNA der Ca<sup>2+</sup>-ATPase und H<sup>+</sup>-ATPase Isoformen mit unterschiedlich langen N-Termini synthetisiert werden.

Auffällig ist bei der Ca<sup>2+</sup>-ATPase aus *Dunaliella bioculata*, daß die Codons vor den drei potentiellen Startcodons, im Gegensatz zur H<sup>+</sup>-ATPase, zu den Codons gehören, die ansonsten im Gen der Ca<sup>2+</sup>-ATPase seltener genutzt werden. BATARD *et al.* (2000) zeigten, daß neben der Consensus-Sequenz auch Codons vor dem Startcodon, die im *codon usage* des Organismus eher selten genutzt werden, die Effizienz der Translation in Hefen und Pflanzen beeinflussen können. Das Auftreten mehrerer Startcodons mit einem nahezu identischen Basenkontext könnte daher auch auf Translationsebene regulatorische Funktionen auf die Expressionsrate des Proteins ausüben.

### 4.3.3 Steigerung der Proteinsynthese in COS-7-Zellen durch Mutation in der Kozak Consensus-Sequenz

Das Ignorieren von potentiellen Startcodons und die Initiation an folgenden AUG-Tripletts in 3'-Richtung wird oft mit suboptimalen Consensus-Sequenzen für die Translationsinitiation in Verbindung gebracht.

Daß die für tierische Zellen ermittelte Kozak Consensus-Sequenz keinen idealen

Basenkontext für die Translationsinitiation der Fusionsgene in COS-7-Zellen darstellen muß, zeigte die M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP-Kozak-Mutante.

Der optimale Basenkontext für die Initiation der Translation in tierischen Systemen wurde von KOZAK (1986, 1987, 1991, 1996) mit GCCACCATGG ermittelt. Dabei zeigten sich in Mutageneseversuchen (KOZAK 1996, CAO & GEBALLE 1995, PORTIS *et al.* 1994), daß die zwei Nukleotide G an Position +4 und A an Position -3 relativ zum A des ATG den stärksten Einfluß auf die Translationsinitiation haben.

In der durch Punktmutation entstandenen M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP-Kozak-Mutante wurde die Consensus-Sequenz durch die Nukleotidabfolge GCCCCATGG kodiert, und enthielt somit einen Basenaustausch an der für die Translationsinitiation-Effizienz in tierischen Systemen als wichtig erachteten Position -3 von der Purin-Base Adenin zur Pyrimidin-Base Cytosin. Das in COS-7-Zellen exprimierte Fusionsprotein zeigte im Vergleich zu M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP, deren Consensus-Sequenz genau mit der von KOZAK (1986, 1987, 1991, 1996) ermittelten Consensus-Sequenz GCACCATGG übereinstimmte, eine bis zu 60 % gestiegene Expressionsrate. Eine um 150 – 350 % gesteigerte Proteinproduktion einer an der Plasmamembran sitzenden Ca<sup>2+</sup>-ATPase aus Erythrocyten (hPMCA4) in COS-1-Zellen konnte auch nach Veränderung der Consensus-Sequenz nach A/G-N-N-ATG-G festgestellt werden (ADAMO 1992). Diese Veränderung entspricht jedoch dem in der Mehrzahl tierischer mRNAs vorkommenden festen Kontext der Startcodons RNNATGG (R kodiert für Purine) (KOZAK 1996). Von KOZAK (1996) wurden die Consensus-Sequenzen RNNATGY oder YNNATGG (Y kodiert für Pyrimidin) als ausreichender, aber nicht optimaler Kontext für die Translationsinitiation gewertet. Es zeigte sich aber anhand der sich nur durch die Consensus-Sequenz unterscheidenden Fusionsproteine M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP und M1-Ca<sup>2+</sup>-EGFP-Kozak-Mutante, daß die Punktmutation von A nach C an Position -3 in der Consensus-Sequenz zu einer deutlichen Steigerung der Proteinsynthese führte.

Die Nukleotidabfolge GCCCCATGG scheint daher einen besseren Kontext für die Translationseffizienz des M1-H<sup>+</sup>-ATPase-GFP-Fusionsproteins in COS-7-Zellen darzustellen als der für tierische Zellen von KOZAK (1986, 1987a, 1991, 1996) postulierte.

#### 4.3.4 Reinitiation am Startcodon des EGFP

Die Mutante M1-H<sup>+</sup>-TAG-EGFP unterschied sich von M1-H<sup>+</sup>-EGFP durch ein Stopcodon zwischen den für die ATPase und der EGFP kodierenden Sequenzen und einer Verschiebung des Leserahmens der EGFP kodierenden Nukleinsäuresequenz um eine Base. Während das Fusionsprotein M1-H<sup>+</sup>-EGFP eine Lokalisation im ER von COS-7- und HeLa-Zellen besaß, war nach Expression von M1-H<sup>+</sup>-TAG-EGFP in HeLa-Zellen trotz des Stopcodons das typische Fluoreszenzmuster des nativen EGFP sichtbar. Zu erwarten war, daß das Stopcodon den Translationsvorgang nach Ablesen der



ATPase-Sequenzen terminiert und keine Fluoreszenz in den HeLa-Zellen auftritt. Entgegen diesen Erwartungen wurde das native EGFP synthetisiert. Mögliche Gründe für die Translation des nativen EGFP werden im folgenden diskutiert.

Die Translation des nativen EGFP dieser Mutante M1-H<sup>+</sup>-TAG-EGFP könnte zum einen nach dem beschriebenen „Leaky Scanning-Modell“ verlaufen.

Im Fall des vorliegenden Konstruktes würde dies bedeuten, daß das erste ATG an Position 23 – 25 im offenen Leserahmen trotz angepaßter Consensus-Sequenz und das zweite ATG an Position 72 – 74 keine optimale Translationsinitiationstelle in tierischen Systemen sind. Daher läßt sich vermuten, daß ein Teil der Ribosomen das 508 bzw. 480 Nukleotide in 3'-Richtung liegende ATG des EGFP, mit seinem dem tierischen Consensus angepaßten Basenkontext, als Translationsstart benutzt.

Da die Expression der Fusionsproteine M1-H<sup>+</sup>-EGFP und M2-H<sup>+</sup>-EGFP aber keine sichtbare Fluoreszenz des nativen EGFP im Zellkern und Cytoplasma zeigte, kann davon ausgegangen werden, daß die Expression des nativen EGFP nicht diesem Modell folgte. Die Expression des nativen EGFP muß daher auf einen Translationsmechanismus zurückzuführen sein, der durch das Stopcodon oder die Verschiebung des Leserahmens der EGFP-Sequenz des Konstruktes M1-H<sup>+</sup>-TAG-EGFP bedingt ist.

Eine mögliche Erklärung liefert der Prozeß der Reinitiation der Ribosomen. Wie bereits erwähnt, kann nach Translation eines kurzen offenen Leserahmens (sORF) des 5'-UTR am Startcodon des eigentlichen offenen Leserahmens (ORF), die Translation erneut beginnen (RYABOVA & HAHN 2000).

An Position 458 – 460 der Nukleinsäuresequenz von DBPMA1 und 30 Nukleotide vor dem Stopcodon befindet sich ein weiteres ATG-Triplett. Das ATG-Triplett besitzt eine Basenumgebung, die mit der tierischen Consensus-Sequenz starke Homologien aufweist und sich nur in der Base G an Position –3 relativ zum A des ATG an Position 458 unterscheidet. Diese Nukleotidsequenz könnte möglicherweise als sORF erkannt werden. Die Reinitiation der Translation könnte 49 Nukleotide in 3'-Richtung am Startcodon der EGFP-Sequenz erfolgen und zur Translation des nativen EGFP führen.

## 4.4 Weiterführende Experimente

In der vorliegenden Arbeit konnte die durch Sequenzanalysen angenommene Lokalisation von DBCA1 und DBPMA1 mit den in der Arbeit verwendeten Versuchsansätzen nicht eindeutig bestätigt werden.

Die ersten beiden mit GFP-markierten Transmembransegmente beider ATPasen zeigten in tierischen Expressionssystemen eine ER-Lokalisation, wohingegen die Fusionsproteine in Tabak nicht detektiert werden konnten. Folgt man der Annahme, daß die beiden N-terminalen Membransegmente für ein erfolgreiches Protein-Targeting nicht ausreichen, wäre es interessant, das gesamte Protein von DBCA1 und DBPMA1 mit GFP zu markieren und die Expression sowie die Lokalisation in tierischen und pflanzlichen Zellen zu bestimmen. Durch immunocytologische Untersuchungen mit Antikörpern gegen das Reportergen GFP könnte auch bei geringer Expressionsrate die Lokalisation der Fusionsproteine nachgewiesen werden.

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist nicht auszuschließen, daß die Lokalisation der beiden ATPasen im ER tierischer Zellen auf Fehlfaltungen der Proteine zurückzuführen ist. Um eine solche Retention im ER auf Grund von Fehlfaltungen weitgehend auszuschließen, könnten zum Auffinden möglicher Signalsequenzbereiche ATPase-Chimären verschiedener Sequenzlängen von DBCA1 mit einer plasmamembranständigen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, GFP-markiert, in heterologen Expressionssystemen untersucht werden.

Die sukzessive Verkürzung der N-Termini der ATPasen erbrachte keine eindeutigen Hinweise auf den eigentlichen Translationsstart. Die Mutation einzelner Startcodons unter Beibehaltung des gesamten N-Terminus könnte daher weitere Hinweise auf tatsächlich genutzte Startcodons und einen möglichen Einfluß auf die Translationsregulation liefern.

## 5 Zusammenfassung

P-Typ ATPasen werden in Pflanzenzellen durch Multigenfamilien kodiert. Die Isoformen zeigen gewebe- und entwicklungspezifische Expressionsmuster. Um Isoformenspezifische Informationen zu erhalten, ist es daher wichtig, die Lokalisation der verschiedenen ATPasen nachzuweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob N-terminale Sequenzbereiche ausreichen, das subzelluläre *Targeting* von P-Typ ATPasen zu vermitteln.

Ausgangsmaterial waren die putative H<sup>+</sup>-ATPase DBPMA1 und die putative Ca<sup>2+</sup>-ATPase DBCA1 aus *Dunaliella bioculata*. Bei beiden ATPasen befinden sich im längsten offenen Leserahmen mehrere ATG-Triplets, die als potentielle Translationsstartpunkte in Frage kommen könnten.

N-terminale ATPase-Bereiche, einschließlich der ersten beiden Transmembransegmente, wurden unter Berücksichtigung möglicher Translationsinitiationsstellen und dort befindlicher Signalsequenzbereiche kloniert, mit GFP markiert und zunächst heterolog in Tabak-Protoplasten exprimiert. Während die Positivkontrollen zu einer Expression des nativen GFP in Tabak-Protoplasten führten, wurde nach Transfektion der ATPase-GFP-Fusionsgene keine Expression der Fusionsproteine beobachtet. Dagegen konnte nach Transfektion tierischer Zellen (HeLa- und COS-7-Zellen) eine Expression der Fusionsproteine im Weitfeld- und konfokalen Laser Scanning Mikroskop festgestellt werden. Sowohl die Ca<sup>2+</sup>-ATPase-GFP-Fusionsproteine als auch die H<sup>+</sup>-ATPase-GFP-Fusionsproteine waren in tierischen Expressionssystemen im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, während die Plasmamembran nicht markiert war.

Demnach ist der N-terminale Sequenzbereich, einschließlich der ersten beiden Transmembransegmente beider P-Typ-ATPasen ausreichend, die Translokation ins ER tierischer Zellen einzuleiten. Eine Verkürzung der ATPasen bis zu den am weitesten in 3'-Richtung gelegenen ATG-Triplets, hatte auf die Translokation ins ER keinen Einfluß.

Während die Translokation der Fusionsproteine ins ER von der Länge des N-Terminus unabhängig war, führte die gezielte Verkürzung der Fusionsproteine bis zum jeweils nächsten ATG-Triplett in 3'-Richtung zu einer deutlich ansteigenden Proteinsynthese sowohl der Ca<sup>2+</sup>- als auch der H<sup>+</sup>-ATPase-GFP-Fusionsproteine. Es wird daher angenommen, daß nicht die ersten ATG-Triplets im jeweils längsten offenen Leserahmen beider ATPasen als Translationsstartstelle genutzt werden, sondern die Translation an folgenden in 3'-Richtung liegenden ATG-Triplets einsetzt. Dies läßt den Einfluß mehrerer potentieller Startcodons auf eine Translationsregulation der ATPasen vermuten.

Während bei allen Fusionsgenen das jeweils erste Startcodon bezüglich der Kozak Consensus-Sequenz (KOZAK 1987a) zur Translations-Optimierung in tierischen Expressionssystemen angepaßt wurde, zeigte sich in COS-7-Zellen bei einem von der

tierischen Kozak Consensus-Sequenz abweichenden Basenkontext der Basenabfolge GCCCCATGG ein Anstieg der Proteinsynthese um 60 %.

Eine ER-Lokalisation der Ca<sup>2+</sup>-ATPase DBCA1 wird aufgrund von Sequenzhomologien zu molekularbiologisch und immunocytologisch charakterisierten Ca<sup>2+</sup>-ATPasen des (S)ERs vermutet. Isoliert betrachtet, würde die Detektion der Ca<sup>2+</sup>-ATPase-GFP-Fusionsproteine im ER diese Vermutung bestätigen. Diese Interpretation wird jedoch durch die ausschließliche Detektion der H<sup>+</sup>-ATPase-GFP-Fusionsproteine im ER tierischer Zellen in Frage gestellt. Denn die Lokalisation von DBPMA1 muß aufgrund von 78 % Identität und 87 % Ähnlichkeit zu der definitiv plasmamembranständigen H<sup>+</sup>-ATPase aus der nahe verwandten Alge *Dunaliella acidophila* als Protein der Plasmamembran angenommen werden. Insgesamt bleibt daher offen, ob die ersten beiden Transmembransegmente der H<sup>+</sup>-ATPase für ein Protein-Targeting zur Plasmamembran ausreichen oder ob beide ATPasen möglicherweise wegen Fehlfaltung der Proteine im ER zurückgehalten worden sind.

## 6 Literaturverzeichnis

- AARONSON, L.R.; HAGER, K.M.; DAVENPORT, J.W.; MANDALA, S.M.; CHANG, A.; SPEICHER, D.W. & SLAYMAN, C.W. (1988). Biosynthesis of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **263**: 14552-14558
- ADAMO, H.P.; VERMA, A.K.; SANDERS, M.A.; SALISBURY, J.L.; WIEBEN, E.D. & PENNISTON, J.T. (1992). Overexpression of the erythrocyte plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump in COS-1 cells. *Biochem. J.* **285**: 791-797
- ASKERLUND, P. (1996). Modulation of an intracellular calmodulin-stimulated Ca<sup>2+</sup>-pumping ATPase in califlower by trypsin. *Plant Physiol.* **110**: 913-922
- ASKERLUND, P. (1997). Calmodulin-stimulated Ca<sup>2+</sup>-ATPases in the vacuolar and plasma membranes in cauliflower. *Plant Physiol.* **114**: 999-1007
- ASKERLUND, P. & SOMMARIN, M. (1996). Calcium efflux transporters in higher plants. In Smallwood, M.; Knox, J.P. & Bowles, D.J. eds; *Membranes: Specialized functions in plants*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp 281-299
- AUER, M.; SCARBOROUGH, G.A. & KUHLBRANDT, W. (1998). Three-dimensional map of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in the open conformation. *Nature* **392**: 840-843
- AXELSEN, K.B. & PALMGREN, M.G. (1997). Evolution of substrate specificities in the P-Type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* **46**: 84-101
- BARBKOV, A.V.; CHELYSHEVE, V.V.; KLYCHNIKOV, O.I.; ZORINYANZ, S.E.; TROFIKOVA, M.S. & DE BOER, A.H. (2000). Involvement of 14-3-3 proteins in the osmotic regulation of H<sup>+</sup>-ATPase in plant plasma membranes. *Planta* **211**: 446-448
- BATARD, Y.; HEHN, A.; NEDELKINA, S.; SCHALK, M.; PALLETT, K.; SCHALLER, H. & WERCK-REICHHART, D. (2000). Increasing expression of P450 and P450-reductase proteins from monocots in heterologous systems. *Arch. Biochem. Biophys.* **379**: 161-169
- BAULCOMBE, D.; CHAPMAN, S. & SANTA CRUZ, S. (1995). Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant Journal* **7**: 1045-1053
- BAUR, M.; MEYER, A.J.; LÜTZELSCHWAB, M. & MICHALALKE, W. (1996). Distribution of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and polar current patterns in leaves and stems of *Elodea canadensis*. *Bot. Acta* **109**: 382-387

- BEILBY, M.J. (1989). Electrophysiology of giant Algal cells. *Meth. Enzymol.* **174**: 403-443
- BEGGAH, A.T.; BÉGUIN, P.; BAMBERG, K.; SACHS, G. & GEERING, K. (1999).  $\beta$ -subunit assembly is essential for the correct packing and the stable membrane insertion of the H-, K-ATPase  $\alpha$ -subunit. *J. Biol. Chem.* **274**: 8217-8223
- BERRIDGE, M.J. (1995). Calcium signalling and cell proliferation. *Bioessays* **17**: 491-500
- BIRNBOIM, H. & DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res.* **7**: 1512-1523
- BLACK, J.P.J.; CHAD, J.E.; LEE, A.G. & EAST, J.M. (1998). Identification of endoplasmic reticulum targeting signals using SERCA/PMCA chimeras. *Biochem. Soc. Trans.* **26**: 299
- BLOBEL, G. & DOBBERSTEIN, B. (1975). Transfer to proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J. Cell Biol.* **67**: 852-862
- BOEVINK, P.; SANTA CRUZ, S.; HAWAS, C.; HARRIS, N. & OPARKA, K.J. (1996). Virus-mediated delivery of the green fluorescent protein to the endoplasmic reticulum of plant cells. *Plant Journal* **10**: 935-941
- BONZA, C.; CARNELLI, A.; DE MICHELIS, M.I. & RASI-CALDOGNO, F. (1998). Purification of the Plasma Membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from Radish Seedlings by Calmodulin-Agarose Affinity Chromatography. *Plant Physiol.* **116**: 845-851
- BONZA, M.C.; MORANDINI, P.; LUONI, L.; GEISLER, M.; PALMGREN, M.G. & DE MICHELIS, M.I. (2000). At-ACA8 encodes a plasma membrane-localized calcium-ATPase of *Arabidopsis* with a calmodulin-binding domain at the N terminus. *Plant Physiol.* **123**: 1495-1506
- BRANDT, P.C. & VANAMAN, T.C. (1998). Calmodulin and ion flux regulation. In L. Van Eldik, D.M. Watterson, eds, *Calmodulin and Signal Transduction*. Academic Press, San Diego, pp. 397-471
- BROCK, R.; HAMELERS, I.H.L. & JOVIN, T.M. (1999). Comparison of fixation protocols for adherent cultured cells applied to a GFP fusion protein of the epidermal growth factor receptor. *Cytometry* **35**: 353-362

- BROCK, R.; VÀMOSI, G.; VEREB, G. & JOVIN, T.M. (1999). Rapid characterization of green fluorescent protein fusion proteins on the molecular and cellular level by fluorescence correlation microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 10123-10128
- BROWN, D. & BRETON, S. (2000). Sortin proteins to their target membranes. *Kidney Int.* **57**: 816-824
- BROWN, C.R.; HONG-BROWN, L.Q.; BIWERSI, J.; VERKMAN, A.S. & WELCH, W.J. (1996). Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress Chaperones* **1**: 117-125
- BUSH, D.S. & WANG, T. (1995). Diversity of calcium-efflux transporters in wheat aleurone cells. *Planta* **197**: 397-400
- CARAFOLI, E. (1991). Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol. Rev.* **71**: 129-153
- CARAFOLI, E. & GUERINI, D. (1993). Molecular and cellular biology of plasma membrane calcium ATPase. *Trend in Cardiovasc. Med.* **3**: 177-184
- CARAFOLI, E. (1997). Plasma membrane calcium pump: structure, function and relationships. *Basic Res. Cardiol.* **1**: 59-61
- CARAFOLI, E.; GARCIA-MARTIN, E. & GUERINI, D. (1996). The plasma membrane calcium pump: recent development and future perspectives. *Experientia* **52**: 1091-1100
- CAO, J. & GEBALLE, A.P. (1995). Translational inhibition by a human cytomegalovirus upstream open reading frame despite inefficient utilization of its AUG codon. *J Virol.* **69**: 1030-1036
- CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W.W. & PRASHER, D. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805
- CHANG, A. & SLAYMAN, C.W. (1991). Maturation of the yeast plasma membrane [H<sup>+</sup>]ATPase involves phosphorylation during intracellular transport. *J. Cell Biol.* **115**: 289-295
- CHANG, A.; ROSE, M.D. & SLAYMAN, C.W. (1993). Folding and intracellular transport of the yeast plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase: effects of mutations in KAR2 and SEC65. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5808-5812

- CHAPMAN, S.; KAVANAGH, T. & BAULCOMBE, D. (1992). Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant Journal* **2**: 549-557
- CHATTERJEE, S. & STOCHAJ, U. (1996). Monitoring nuclear transport in HeLa Cells using the green fluorescent protein. *BioTechniques Euro Edition* **21**: 62-63
- CHIAPELLO, H.; LISACEK, F.; CABOCHE, M. & HENAUT, A. (1998). Codon usage and gene function are related in sequences of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **209**: 1-38
- CHIU, W.; NIWA, Y.; ZENG, W.; HIRANO, T.; HIROKAZU, K. & SHEEN, J. (1996). Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr. Biol.* **6**: 325-330
- CHOU, M.M. & KENDALL, D.A. (1990). Polymeric sequences reveal a functional interrelationship between hydrophobicity and length of signal peptides. *J. Biol. Chem.* **265**: 2873-2880
- CHUNG, W.S.; LEE, S.H.; KIM, J.C.; HEO, W.D.; KIM, M.C.; PARK, C.Y.; PARK, H.C.; LIM, C.O.; KIM, W.B.; HARPER, J.F. & CHO, M.J. (2000). Identification of a calmodulin-regulated soybean Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SCA1) that is located in the plasma membrane. *Plant Cell* **12**: 1393-1408
- CLAPHAM D.E. (1995). Intracellular calcium. Replenishing the stores. *Nature* **375**: 634-635
- CLONTECH (1996). Product Protocol: Living Colors™ GFP Application Notes (PT2040-1)
- CODY, C.W.; PRASHER, D.C.; WESTLER, W.M.; PENDERGAST, F.G. & WARD, W.W. (1993). Chemical structure of the hexapeptide chromophore of *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry* **32**: 1212-1218
- COHEN, S.N.; CHANG, A.C.Y. & HSU, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 2110-2116
- CORMACK, B.P.; VALDIVIA, R.H. & FALKOW, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33-38
- CORTAS, N.; ELSTEIN, D.; MARKOWITZ, D. & EDELMAN, I.S. (1991). Anomalous mobilities of Na,K-ATPase alpha subunit isoforms in SDS-PAGE: identification by N-terminal sequencing. *Biochim. Biophys. Acta* **1070**: 223-228



- CRAMERI, A.; WHITEHORN, E.A.; TATE, E. & STEMMER, W.P. (1996). Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat. Biotechnol.* **14**: 315-319
- CUBITT, A.B.; HEIM, R.; ADAMS, S.R.; BOYD, A.E.; GROSS, L.A. & TSIEN, R.Y. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem.* **20**: 448-455
- DE ANGELIS, D.A.; MIESENBOCK, G.; ZEMELMAN, B.V. & ROTHMAN, J.E. (1998). PRIM: proximity imaging of green fluorescent protein-tagged polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 12312-12316
- DE KERCHOVE D'EXAERDE, A.; SUPPLY, P.; DUFOUR, J.P.; BOGAERTS, P.; THINES, D.; GOFFEAU, A. & BOUTRY, M. (1995). Functional complementation of a null mutation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by a plant H<sup>+</sup>-ATPase gene. *J. Biol. Chem.* **270**: 23828-23837
- DE WITT, N.D. & SUSSMAN, M.R. (1995). Immunocytological localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump (H<sup>+</sup>-ATPase) in phloem companion cells. *Plant Cell* **7**: 2053-2067
- DE WITT, N.D.; HONG, B.; SUSMANN, M.R. & HARPER, J.F. (1996). Targeting of two Arabidopsis H<sup>+</sup>-ATPase Isoforms to the plasma membrane. *Plant Physiol.* **112**: 833-844
- DELAGRAVE, S.; HAWTIN, R.E.; SILVA, C.M.; YANG, M.M. & YUVAN, D.C. (1995). Redshifted excitation mutants of the green fluorescent protein. *Biotechnology* **13**: 151-154
- EHRIG, T.; O'KANE, D.J. & PEDERGAST, F.G. (1995). Green-Fluorescent protein mutants with altered fluorescence excitation spectra. *FEBS Letters* **367**: 163-166
- ELLENBERG, J.; SIGGIA, E.D.; MOREIRA, J.E.; SMITH, C.L.; PRESLEY, F.; WORMAN, H.J. & LIPPINCOTT-SCWARTZ, J. (1997). Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J. Cell Biol.* **138**: 1193-1206
- EVANS, D.E. & WILLIAMS, L.E. (1998). P-type calcium ATPases in higher plants – biochemical, molecular and functional properties. *Biochim. Biophys. Acta* **1376**: 1-25

- FELDHEIM, D. & SCHEKMAN, R. (1994). Sec72p contributes to the selective recognition of signal peptides by the secretory polypeptide translocation complex. *J. Cell Biol.* **126**: 935-943
- FERROL, N. & BENNETT A.B. (1996). A single gene may encode differentially localized Ca<sup>2+</sup>-ATPases in tomato. *Plant Cell* **8**: 1159-1169
- FOLETTI, D.; GUERINI, D. & CARAFOLI, E. (1995). Subcellular targeting of the endoplasmic reticulum and plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pumps: a study using recombinant chimeras. *FASEB J.* **8**: 670-680
- FRIAS, I.; CALDEIRA, M.T.; PEREZ-CASTINEIRA, J.R.; NAVARRO-AVINO, J.P.; CULIANEZ-MACIA, F.A.; KUPPINGER, O.; STRANSKY, H.; PAGES, M.; HAGER, A. & SERRANO, R. (1996). A major isoform of the maize plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell* **8**: 1533-1544
- FUTTERER, J. & HOHN, T. (1996). Translation in plants – rules and exceptions. *Plant Mol. Biol.* **32**: 159-189
- FUTTERER, J. & HOHN, T. (1992). Role of an upstream open reading frame in the translation of polycistronic mRNAs in plant cells. *Nucleic Acids Res.* **20**: 3851-3857
- GALBRAITH, D.W.; LAMBERT, G.M.; GREBENOK, R.J. & SHEEN, J. (1995). Flow cytometry analysis of transgene expression in higher plants: green-fluorescent protein. *Meth. Cell Biol.* **50**: 3-14
- GALLIE, D.R.; LUCAS, W.J. & WALBOT, V. (1989). Visualizing mRNA expression in plant protoplasts: factors influencing efficient mRNA uptake and translation. *Plant Cell* **1**: 301-311
- GAUT, J.R. & HENDERSHOT, L.M. (1993). The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**: 589-595
- GEISLER, M.; AXELSEN, K.B.; HARPER, J.F. & PALMGREN, M.G. (2000). Molecular aspects of higher plant P-type Ca<sup>2+</sup> ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**: 52-78
- GEY, G.; COFFMANN, W.D. & KUBICEK, M.T. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**: 264-265

- GILL, D.L.; WALDRON, R.T.; RYS-SIKORA, K.E.; UFRET-VINCENY, C.A.; GRABER, M.N.; FAVRE, C.J. & ALFONSO, A. (1996). Calcium pools, calcium entry, and cell growth. *Biosci. Rep.* **16**: 139-157
- GHISLAIN, M.; DE SADELEER, M. & GOFFEAU, A. (1992). Altered plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from the Dio-9-resistant pma1-2 mutant of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.* **209**: 275-279
- GÖRLICH, D. & MATTAJ, I.W. (1996). Nucleocytoplasmic transport. *Science* **271**: 1513-1518
- GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M. & RAHIRE, M. (1986). Sequence, evolution and differential expression of the two genes encoding variant small subunits of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Mol. Biol.* **191**: 421-432
- GOLOVINA, V.A. & BLAUSTEIN, M.P. (1997). Spatially and functionally distinct Ca<sup>2+</sup> stores in sarcoplasmic and endoplasmic reticulum. *Science* **275**: 1643-1648
- GÖRLICH, D. (1997). Nuclear protein import. *Curr. Opinion Cell Biol.* **9**: 412-419
- GRAY, N.K. & WICKENS, M. (1998). Control of translation initiation in animals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**: 399-458
- GREBENOK, R.J.; PIERSON, E.; LAMBERT, G.M.; GONG, F.-H.; ALFONSO, C.L.; HALDEMAN-CAHILL, R.; CARRINGTON, J.C. & GALBRAITH, D.W. (1997). Green-fluorescent protein fusions for efficient characterization of nuclear targeting. *Plant J.* **11**: 573-586
- GREEN, N.M. (1989). ATP-driven cation pumps: alignment of sequences. *Biochem. Soc. Trans.* **17**: 970-972
- GREEN, N.M. & MAC LENNAN, D.H. (1989). ATP driven ion pumps: an evolutionary mosaic. *Biochem. Soc. Trans.* **17**: 819-822
- GU, X. & VERMA, D.P.S. (1997). Dynamics of phragmoplastin in living cells during cell plate formation and uncoupling of cell elongation from the plane of cell division. *Plant Cell* **9**: 157-169
- GUERINI, D. & CARAFOLI, E. (1996). The targeting of the plasma membrane calcium pump in the cell. *Biosci. Rep.* **16**: 129-137

- GUERINI, D.; FOLETTI, D.; VELLANI, F. & CARAFOLI, E. (1996). Mutation of conserved residues in transmembrane domains 4, 6 and 8 causes loss of Ca<sup>2+</sup> transport by the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump. *Biochemistry* **35**: 3290-3296
- GUERINI, D.; CARCIA-MARTIN, E.; ZECCA, A.; GUIDI, F. & CARAFOLI, E. (1998). The calcium pump of the plasma membrane: membrane targeting, calcium binding sites, tissue-specific isoform expression. *Acta Physiol. Scand.* **163**, Suppl. **643**: 265-273
- HAAS, J.; PARK, E.-C. & SEED, B. (1996). Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr. Biol.* **6**: 315-324
- HANAHAHAN, D.J. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. In: DNA cloning. (D.M. Glover, eds) pp. 109-135, IRL Press, Oxford
- HARPER, J.F.; MANNEY, L. & SUSSMAN, M.R. (1994). The plasma membrane H(+)-ATPase gene family in *Arabidopsis*: genomic sequence of AHA10 which is expressed primarily in developing seeds. *Mol. Gen. Genet.* **244**: 572-587
- HARPER, J.F.; HONG, B.; HWANG, I.; GUO, H.Q.; STODDARD, R.; HUANG, J.F.; PALMGREN, M.G. & SZE, H. (1998). A novel calmodulin-regulated Ca<sup>2+</sup>-ATPase (ACA2) from *Arabidopsis* with an N-terminal autoinhibitory domain. *J. Biol. Chem.* **273**: 1099-1106
- HARTMANN, E.; SOMMER, T.; PREHN, S.; GÖRLICH, D.; JENTSCH, S. & RAPOPORT, T.A. (1994). Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* **367**: 654-657
- HASELOFF, J. & AMOS, B. (1995). GFP in plants. *Trends Genet.* **11**: 328-329
- HASELOFF, J. & SIEMERING, K.R. (1998). The Uses of GFP in Plants. In: Green Fluorescent Protein: Strategies, Applications and Protocols. (Chalfie, M. & Kain, S., eds), Wiley, pp. 191-220
- HASELOFF, J.; SIEMERING, K.R.; PRASHER, D.C. & HODGE, S. (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 2122-2127
- HEIM, R.; IWATA, T.; ZVARITCH, E.; ADAMO, H.P.; RUTISHAUSER, B.; STREHLER, E.E.; GUERINI, D. & CARAFOLI, E. (1992). Expression, purification, and properties of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump and of its N-terminally truncated 105 kDa fragment. *J. Biol. Chem.* **267**: 24476-24484

- HEIM, R.; PRASHER, D.C. & TSIEN, R.Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 12501-12504
- HEIM, R.; CUBITT, A.B. & TSIEN, R.Y. (1995). Improved green fluorescence.  
*Nature* **373**: 663-664
- HEIM, R. & TSIEN, R.Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer.  
*Curr. Biol.* **6**: 178-182
- HEINLEIN, M.; EPEL, B.; PADGETT, H.S. & BEACHY, R.N. (1995). Interaction of tobaccovirus movement proteins with the plant cytoskeleton.  
*Science* **270**: 1983-1985
- HELMER, G.; CASADABAN, M.; BEVAN, M.; KAYES, L. & CHILTON, M.-D. (1984). A new chimeric gene as a marker for plant transformation: the expression of *Escherichia coli* b-galactosidase in sunflower and tobacco cells.  
*BioTechnology* **2**: 520-527
- HIRSCHI, K.D.; ZHEN, R.G.; CUNNINGHAM, K.W.; REA, P.A. & FINK, G.R. (1996). CAX1, an H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporter from *Arabidopsis*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 8782-8786
- HONG, B.A.; ICHIDA, S.; WANG, Y.; GENS, J.S.; PICKARD, B.G. & HARPER, J.F. (1999). Identification of a calmodulin-regulated calcium ATPase in the ER.  
*Plant Physiol.* **119**: 1165-1176
- HOSKINS, J.M.; MEYNELL, G.G. & SANDERS, F.K. (1956). A comparison of methods for estimating the viable count of a suspension of tumour cells.  
*Exp. Cell Res.* **11**: 297-305
- HU, W. & CHENG, C.-L. (1995). Expression of *Aequorea* green fluorescent protein in plant cells. *FEBS Letters* **369**: 331-334
- HUANG, C.-H.; BECKELMAN, T.; FRANKLIN, A.E. & HOFFMANN, N.E. (1993). Characterization of a gene encoding a Ca<sup>2+</sup>-ATPase-like protein in the plastid envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 10066-10070
- IMBAULT, P.; WITTEMER, C.; JAHANNINGMEIER, U.; JACOBS, J.D. & HOWELL, S.H. (1988). Structure of the *Chlamydomonas reinhardtii* *cab II-1* gene encoding a chlorophyll *a/b*-binding protein. *Gene* **73**: 397-407

- INOUE, S. & TSUJI, D.F.I. (1994). Evidence for redox forms of the Aequorea green fluorescent protein in plant cells. *FEBS Letters* **351**: 211-214
- JACKSON, M.R.; NILSSON, T. & PETERSON, P.A. (1990). Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **9**: 3153-3162
- JACKSON, M.R.; NILSSON, T. & PETERSON, P.A. (1993). Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **121**: 317-333
- JAHN, T.; BALUSKA, F.; MICHALKE, W.; HARPER, J.F. & VOLKMANN, D. (1998). Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in the root apex: Evidence for strong expression in xylem parenchyma and asymmetric localization within cortical and epidermal cells. *Physiol. Plant.* **104**: 311-316
- JEFFERSON, R.A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**: 387-405
- JEFFERSON, R.A.; KAVANAGH, T.A. & BEVAN, M.W. (1987). GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**: 3901-3907
- JOHNSON, C.H.; KNIGHT, M.R.; KONDO, T.; MASSON, P.; SEDBROOK, J.; HALEY, A. & TREWAVAS, A. (1995). Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. *Science* **269**: 1863-1865
- KAETHER, C. & GERDES, H.H. (1995). Visualization of protein transport along the secretory pathway using green fluorescence protein. *FEBS Letters* **369**: 267-271
- KANE, J.F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**: 494-500
- KANE, J.F. & HARTLEY, D.L. (1988). Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* **6**: 95-101
- KARIN, N.J. & SETTLE, V.J. (1992). The sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, SERCA1a, contains endoplasmic reticulum targeting information. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**: 219-227
- KASEI, M. & MUTO, S. (1990). Ca<sup>2+</sup> pump and Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in plasma membrane vesicles isolated by aqueous Two-phase partitioning from corn leaves. *J. Membrane Biol.* **114**: 133-142

- KLEINIG, H & SITTE, P. (1999). Zellbiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm
- KÖHLER, R.H.; CAO, J.; ZIPFEL, W.R.; WEBB, W.W. & HANSON, M.R. (1997a). Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids. *Science* **276**: 2039-2042
- KÖHLER, R.H.; ZIPFEL, W.R.; WEBB, W.W. & HANSON, M.R. (1997b). The green fluorescent protein as a marker to visualize plant mitochondria *in vivo*. *Plant J.* **11**: 613-621
- KOPITO, K.R. (1997). ER quality control: The cytoplasmic connection. *Cell* **88**: 427-430
- KOZAK, M. (1987a). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucl Acids Res.* **15**: 8135-8148
- KOZAK, M. (1987b). Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes. *Mol. Cell Biol.* **10**: 3438-3445
- KOZAK, M. (1989). The scanning model for translation: An update. *J. Cell Biol.* **108**: 229-241
- KOZAK, M. (1990). Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 8301-8305
- KOZAK, M. (1991). An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell Biol.* **115**: 887-903
- KOZAK, M. (1995). Adherence to the first-AUG rule when a second AUG follows closely upon the first. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 7134
- KOZAK, M. (1996). Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mammalian Genom* **7**: 563-574
- KREIMER, G.; MELKONIAN, M. & LATZKO, K. (1985). An electrogenic uniport mediates light-dependent Ca<sup>2+</sup> influx into intact spinach chloroplasts. *FEBS Letters* **180**: 253-258
- KURLAND, C. & GALLANT, J. (1996). Errors of heterologous protein expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**: 489-493

- KUTAY, U.; AHNERT-HILGER, G.; HARTMANN, E.; WIEDENMANN, B. & RAPOPORT, T.A. (1995). Transport route for synaptobrevin via a novel pathway of insertion into the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J.* **14**: 217-223
- LAROCHE, J.; BENNETT, J. & FALKOWSKI, P.G. (1990). Characterization of a cDNA encoding for the 28.5-kDa LHCII apoprotein from the unicellular marine chlorophyte, *Dunaliella tertiolecta*. *Gene* **95**: 165-171
- LEFFEL, S.M.; MABON, S.A. & STEWART, C.N., Jr. (1997). Applications of green fluorescent protein in plants. *Biotechniques* **23**: 912-918
- LIANG, F.; CUNNINGHAM, K.W.; HARPER, J.F. & SZE, H. (1997). ECA1 complements yeast mutants defective in Ca<sup>2+</sup> pumps and encodes an endoplasmic reticulum-type Ca<sup>2+</sup>-ATPase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 8579-8584
- LIM, C.R.; KIMATA, Y.; OKO, M.; NOMAGUCHI, K. & KOHNO, K. (1995). Thermosensitivity of green fluorescent protein fluorescence utilized to reveal noval nuclear-like compartments in a mutant nucleoporin NSP1. *J. Biochem.* **118**: 13-17
- LIN, J. & ADDISON, R. (1995). A novel integration signal that is composed of two transmembrane segments is required to integrate the *Neurospora plasma* membrane H<sup>+</sup>-ATPase into microsomes. *J. Biol. Chem.* **270**: 6935-6941
- LUKASZEWICZ, M.; JEROUVILLE, B. & BOUTRY, M. (1998). Signs of translational regulation within the transcript leader of a plant plasma membrane H(+)-ATPase gene. *Plant J.* **14**: 413-423
- LONG, Z.W.; WANG, S.Y. & NELSON, N. (1989). Cloning and nucleotide sequence analysis of genes coding for the major chlorophyll-binding protein of the moss *Physcomitrella patens* and the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Gene* **76**: 299-312
- LUO, H.; MORSOMME, P. & BOUTRY, M. (1999). The two major types of plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases show different enzymatic properties and confer differential pH sensitivity of yeast growth. *Plant Physiol.* **119**: 627-634
- LÜTCKE, H.A.; CHOW, K.C.; MICKEL, F.S.; MOSS, K.A.; KERN, H.F. & SCHEELER, G.A. (1987). Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO J.* **6**: 43-48



- MARTOGLIO, B. & DOBBERSTEIN, B. (1998). Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends in Cell Biology* **8**: 410-415
- MAGYAR, A. & VARANDI, A. (1990). Molecular cloning and chromosomal localization of a sarco/endoplasmic reticulum-type Ca<sup>2+</sup>-ATPase of *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**: 872-877
- MALMSTRÖM, S.; ASKERLUND, P. & PALMGREN, M.G. (1997). A calmodulin-stimulated Ca<sup>2+</sup>-ATPase from plant vacuolar membranes with a putative regulatory domain at its N-terminus. *FEBS Letters* **400**: 324-328
- MARTIN, P.E.M.; STEGGLES, J.; WILSON, C.; AHMAD, S. & EVANS, W.H. (2000). Targeting motifs and functional parameters governing the assembly of connexins into gap junctions. *Biochem. J.* **349**: 281-287
- MILLAR, A.J.; SHORT, S.R.; HIRATSUKA, K.; CHUA, N.-H. & KAY, S.A. (1992). Firefly luciferase as a reporter of regulated gene expression in higher plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* **10**: 324-337
- MONIAKIS, J.; COUKELL, M.B. & FORER, A. (1995). Molecular cloning of an intracellular P-type ATPase from *Dictyostelium* that is up-regulated in calcium-adapted cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 28276-28281
- MORIAU, L.; MICHELET, B.; BOGAERTS, P.; LAMBERT, L.; MICHEL, A.; OUFATTOLE, M. & BOUTRY, M. (1999). Expression analysis of two gene subfamilies encoding the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Nicotiana plumbaginifolia* reveals the major transport functions of this enzyme. *Plant J.* **19**: 31-41
- MORSOMME, P. & BOUTRY, M. (2000). The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, funktion and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**: 1-16
- MOSTOV, K.E.; DEFOOR, P.; FLEISCHER, S. & BLOBEL, G. (1981). Co-translational membrane integration of calcium pump protein without signal sequence cleavage. *Nature* **292**: 87-88
- NAGY, J.I. & MALIGA, P. (1976). Callus Induction and Plant Regeneration from Mesophyll Protoplasts of *Nicotiana sylvestris*. *Z. Pflanzenphysiol.* **78**: 453-455
- NG, D.T.; BROWN, J.D. & WALTER, P. (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J. Cell Biol.* **134**: 269-278

- NIEDZ, R.P.; SUSSMAN, M.R. & SATTERLEE, J.S. (1995). Green fluorescent protein: an *in vivo* reporter of plant gene expression. *Plant Cell Rep.* **14**: 403-406
- OHTA, T.; NOGUCHI, S.; NAKANISHI, M.; MUTOH, Y.; HIRATA, H.; KAGAWA, Y. & KAWAMURA, M. (1991). The amino acid sequence of the fluorescein-labeled peptides of electric ray and brine shrimp (Na, K)-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **130**: 221-228
- OPARKA, K.J.; BOEVINK, P. & SANTA-CRUZ, S. (1996). Studying the movement of plant viruses using green fluorescent protein. *Trends Plant Sci.* **1**: 412-418
- ORMO, M.; CUBITT, A.B.; KALLIO, K.; GROSS, L.A.; TSIEN, R.Y. & REMINGTON, J. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**: 1392-1395
- OSSIPOW, V.; DESCOMES, P. & SCHIBLER, U. (1993). CCAAT / enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8219-8223
- OUFATTOLE, M.; ARANGO, M. & BOUTRY, M. (2000). Identification and expression of three new *Nicotiana plumbaginifolia* genes which encode isoforms of the plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase, and one of which is induced by mechanical stress. *Planta* **210**: 751-752
- OW, D.W.; WOOD, K.V.; DELUCA, M.; DE WET, J.R.; HELINSKI, D.R. & HOWELL, S.H. (1986). Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* **234**: 856-859
- PALMGREN, M.G. & AXELSEN, K.B. (1998). Evolution of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* **1365**: 37-45
- PALMGREN, M.G. & CHRISTENSEN, G. (1993). Complementation *in situ* of the yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene *pma1* by an H<sup>+</sup>-ATPase gene from a heterologous species. *FEBS Letters* **317**: 216-222
- PALMGREN, M.G. & CHRISTENSEN, G. (1994). Functional comparisons between plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isoforms expressed in yeast. *J. Biol. Chem.* **269**: 3027-3033
- PANG, S.; DEBOER, D.L.; WAN, Y.; YE, G.; LAYTON, J.G.; NEHER, M.K.; ARMSTRONG, C.L.; FRY, J.E.; HINCHEE, M.A.W. & FROMM, M.E. (1996). An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plant. *Plant Physiol.* **112**: 893-900

- PATTERSON, G.H.; KNOBEL, S.M.; SHARIF, W.D.; KAIN, S.R. & PISTON, D.W. (1997). Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys. J.* **73**: 2782-2790
- PEDERSEN, P.L. & CARAFOLI, E. (1987). Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties and significance to cell function. *Trends Biochem. Sci.* **12**: 146-150
- PLEMPER, R.K.; EGNER, R.; KUCHLER, K. & WOLF, D.H. (1998). Endoplasmic reticulum degradation of a mutated ATP-binding cassette transporter Pdr5 proceeds in a concerted action of Sec61 and the proteasome. *J. Biol. Chem.* **273**: 32848-32856
- PLEMPER, R.K. & WOLF, D.H. (1999). Endoplasmic reticulum degradation. Reverse protein transport and its end to the proteasome. *Mol. Biol. Rep.* **26**: 125-130
- PORTILLO, F. (2000). Regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1469**: 31-42
- PORTIS, J.L.; SPANGRUDE, G. & MCATEE, F.J. (1994). Identification of a sequence in the unique 5' open reading frame of the gene encoding glycosylated Gag which influences the incubation period of neurodegenerative disease induced by a murine retrovirus. *J Virol.* **68**: 3879-3887
- PRASHER, D.C. (1995). Using GFP to see the light. *Trends Genet.* **11**: 320-323
- PRASHER, D.C.; ECKENRODE, V.K.; WARD, W.W.; PRENDERGRAST, F.G & CORMINER, M.J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene* **111**: 229-233
- PREISLER, H.D. (1978). Alteration of binding of the supervital dye Hoechst 33342 to human leukemic cells by adriamycin. *Cancer Treatment Reports* **62**: 1393-1396
- QU, B.H.; STRICKLAND, E. & THOMAS, P.J. (1997). Cystic fibrosis: A disease of altered protein folding. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**: 483-490
- RAO, R.; DRUMMOND-BARBOSA, D. & SLAYMAN, CW. (1993). Transcriptional regulation by glucose of the yeast PMA1 gene encoding the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Yeast* **9**: 1075-1084
- RAPOPORT, T.A.; JUNGNICHEL, B. & KUTAY, U. (1996). Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 271-303

- RASCHKE, B.C. (1996). Molekulare Charakterisierung von Ca<sup>2+</sup>-ATPasen aus einzelligen Grünalgen. Dissertation, Math.-Nat. Fachbereich der Universität Göttingen.
- RASCHKE, B.C. & WOLF, A.H. (1996). Molecular cloning of a P-type Ca<sup>2+</sup>-ATPase from the halotolerant alga *Dunaliella bioculata*. *Planta* **200**: 78-84
- RASI-CALDOGNO, F.; CARNELLI, A. & DE MICHAELIS, M.I. (1992). Identification of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase and its autoinhibitory domain. *Plant Physiol.* **108**: 105-113
- REICHEL, C.; MATHUR, J.; ECKES, P.; LANGENKEMPER, K.; KONCZ, C.; SCHELL, J.; REISS, B. & MAAS, C. (1996). Enhanced green fluorescence by expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5888-5893
- ROBINSON, D.G.; HINZ, G. & HOLSTEIN, S.E. (1998). The molecular characterization of transport vesicles. *Plant Mol. Biol.* **38**: 49-76
- RUYSSCHAERT, J.-M.; EL QUAHABI, A.; WILLEAUME, V.; HUEZ, G.; FUKS, R.; VANDENBRADEN, M. & DI STEFANO, P. (1994). A novel cationic amphiphile for transfection of mammalian cells. *Biophys. Res. Commun.* **203**: 1622-1628
- RYABOVA, L.A. & HOHN, T. (2000). Ribosome shunting in the cauliflower mosaic virus 35S RNA leader is a special case of reinitiation of translation functioning in plant and animal systems. *Genes Dev.* **14**: 817-829
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B. & EHRlich, HA. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Handbook. Cold Spring Harbor N.Y.: Cold spring Harbor Laboratory Press.
- SANDERS, D.; BROWNLEE, C. & HARPER J.F. (1999). Communicating with calcium. *Plant Cell* **11**: 691-706
- SANGER, F.; NICKLEIN, S. & COULSON, A.R. (1977). DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467

- SANSEBASTIANO DI, G.-P.; PARIS, N.; MARC-MARTIN, S. & NEUHAUS, J.-M. (1998). Specific accumulation of GFP in a non-acidic vacuolar compartment via a C-terminal propeptide-mediated sorting pathway. *Plant Journal* **15**: 449-457
- SANTELLA, L. & CARAFOLI, E. (1997). Calcium signaling in the cell nucleus. *FASEB J.* **11**: 1091-1109
- SCOTT, A.; WYATT, S.; TSOU, P.L.; ROBERTSON, D. & STRÖMGREN, A. (1999). Model system for plant cell biology: GFP imaging in living onion epidermal cells. *BioTechniques* **26**: 1125-1132
- SEED, B. & SHEEN, J.-Y. (1988). A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acetyltransferase activity. *Gene* **67**: 271-277
- SERRANO, R. (1988). Structure and function of plasma membrane ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochim. Biophys. Acta* **947**: 1-28
- SERRANO, R. (1989). Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 61-94
- SERRANO, R. & PORTILLO, F. (1990). Catalytic and regulatory sites of yeast plasma membrane H(+)-ATPase studied by directed mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1018**: 195-199
- SHARP, P.A.; SUDGEN, B. & SAMBROOK, J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **12**: 3055-3060
- SHEEN, J. (1993). Protein phosphatase activity is required for light-inducible gene expression in maize. *EMBO J.* **12**: 3497-3505
- SHEEN, J.; HWANG, S.; NIWA, Y.; KOBAYASHI, H. & GALBAITH, D.W. (1995). Green fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant Journal* **8**: 777-784
- SHIN, J.; DUNBRACK, R.L.; LEE, S. & STROMINGER, J.L. (1991). Signals for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum studied with CD4 truncation mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 1918-1922
- SHINE, J. & DALGARNO, L. (1974). The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 1342-1346

- SHULL, G.E. (2000). Gene knockout studies of Ca<sup>2+</sup>-transporting ATPases. *Eur. J. Biochem.* **267**: 5284-5290
- SIEMERING, K.R.; GOLBIK, R.; SEVER, R. & HASELOFF, J. (1996). Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr. Biol.* **6**: 1653-1663
- SIFLOW, C.D.; CHRISHOLM, R.L.; CONNER, T.W. & RANEEM, L.P.W. (1985). The two alpha-tubulin genes of *Chlamydomonas reinhardtii* code for slightly different proteins. *Mol. Cell Biol.* **5**: 2389-2398
- SIMONOVA, M.; WEISSLEDER, R.; SERGEYEV, N.; VILISSOVA, N. & BOGDANOV, A. (1999). Targeting of green fluorescent protein expression to the cell surface. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **171**: 890-897
- SMAHEL, M.; HAMANN, A. & GRADMANN, D. (1990). The prime plasmalemma ATPase of the halophilic alga *Dunaliella bioculata*: purification and characterization. *Planta* **181**: 496-504
- STEIPE, B. & SKERRA, A. (1997). Das grün fluoreszierende Protein. *Biospektrum* **1**: 22-30
- STOCHAJ, U. & SILVER, P. (1992). Nucleocytoplasmic traffic of proteins. *Eur. J. Cell Biol.* **59**: 1-11
- SUEOKA, N. & KAWANISHI, Y. (2000). DNA G+C content of the third codon position and codon usage biases of human genes. *Gene* **261**: 53-62
- SZE, H. (1985). H-Translocating ATPases: Advances using membrane vesicles. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**: 175-208
- SZE, H.; LIANG, F. & HARPER, I. (2000). Diversity and Regulation of plant Ca<sup>2+</sup> pumps: Insights from expression in yeast. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 433-462
- TERRI, T.H.; LEHVÄSHAIHO, H.; FRANCK, M.; HEINO, U.P.; PALVA, E.T.; VAN MONTAGU, M. & HERRERA-ESTRELLA, L. (1989). Gene fusions to *lacZ* reveal new expression patterns of chimeric genes in transgenic plants. *EMBO J.* **8**: 343-350
- THOMSON, L.J.; XING, T.; HALL, J.L. & WILLIAMS, L.E. (1993). Investigation of the calcium-transporting ATPases at the endoplasmatic reticulum and plasma membrane of the red beet (*Beta vulgaris*). *Plant Physiol.* **102**: 553-564

- TOOMRE, D.; KELLER, P.; WHITE, J.; OLIVO, J.-C. & SIMONS, K. (1999). Dual-color visualization of *trans*-Golgi network to plasma membrane traffic along microtubules in living cells. *J. Cell Sci.* **112**: 21-33
- TOWNSLEY, F.M. & PELHAM, H.R. (1994). The KKXX signal mediates retrieval of membrane proteins from the Golgi to the ER in yeast. *Eur. J. Cell Biol.* **64**: 211-216
- VAN GOETHEM, I.D.A.; ADAMS, P.; CHAD, J.E.; MATHER, A.M.; GRIFFITHS, B.; LEE, A.G. & EAST, J.M. (1998). Localization of endoplasmic reticulum in living cells using green fluorescent protein chimeras. *Biochem. Soc. Trans.* **26**: 298
- VENEMA, K. & PALMGREN, M.G. (1995). Metabolic modulation of transport coupling ratio in yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* **270**: 19659-19667
- VILLALBA, J.M.; PALMGREN, M.G.; BERBERIAN, G.E.; FERGUSON, C. & SERRANO R. (1992). Functional expression of plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in yeast endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **267**: 12341-12349
- VOGES, D.; ZWICKL, P. & BAUMEISTER, W. (1999). The 26S Proteasome: A molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 1015-1068
- VON ARNIM, A.G.; DENG, X.-W. & STACEY, M.G. (1998). Cloning vectors for expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. *Gene* **221**: 35-43
- VON HEIJNE, G. (1985). Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* **184**: 99-105
- VON HEIJNE, G. (1986). Towards a comparative anatomy of N-terminal topogenic protein sequences. *J. Mol. Biol.* **189**: 239-242
- WACH, A.; SCHLESSER, A. & GOFFEAU, A. (1992). An alignment of 17 deduced protein sequences from plant, fungi, and ciliate H<sup>+</sup>-ATPase genes. *J. Bioenerg. Biomem.* **24**: 309-317
- WADA, K.; WADA, Y.; DOI, H.; ISHIBASHI, F.; GOJOBORI, T. & IKEMURA, T. (1991). Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data. *Nuc. Acid. Res.* **19**: 1981-1986

- WADA, M.; SHONO, M.; URAYAMA, O.; SATOH, S.; HARA, Y.; IKAWA, Y. & FUJII, T. (1994). Molecular cloning of P-typ ATPases on intracellular membranes of the marine alga *Heterosigma akashiwo*. *Plant Mol. Biol.* **26**: 699-708
- WANG, C.; CHEN, M.; HAN, E. & ZHANG, J.-T. (1997). Role of ribosomes in reinitiation of membrane insertion of internal transmembrane segments in a polytopic membrane protein. *Biochemistry* **36**: 11437-11443
- WANG, I.; RATTERMAN, D.M. & SZE, H. (1997). Distinction between endoplasmic reticulum-type and plasma membrane-type Ca<sup>2+</sup> pumps. *Plant Physiol.* **113**: 535-548
- WANG, S. & HAZELRIGG, T. (1994). Implications for *bcd* mRNA localization from spatial distribution of *exu* protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* **369**: 400-403
- WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. (1942). Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Enolase. *Biochemische Zeitschrift* **310**: 384-421
- WEBB, C.D.; DECATUR, A.; TELEMANN, A. & LOSICK, R. (1995). Use of green fluorescent protein for visualization of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**: 5906-5911
- WEISS, M. & PICK, U. (1996). Primary structure and effect of pH on the expression of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from *Dunaliella acidophila* and *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* **112**: 1693-702
- WIMMERS, L.E.; EWING, N.N. & BENNETT, A.B. (1992). Higher plant Ca<sup>2+</sup>-ATPase: primary structure and regulation of mRNA abundance by salt. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 9205-9209
- WOLF, A.H. (1993). Primärstruktur von P-Typ ATPasen halophiler Algen. Dissertation, Math.-Nat. Fachbereich der Universität Göttingen.
- WOLF, A.H.; SLAYMAN, C.W. & GRADMANN, D. (1995). Primary structure of the plasma membrane H (+) -ATPase from the holotolerant alga *Dunaliella bioculata*. *Plant Mol. Biol.* **28**: 657-666
- WOLF, A.H.; KIRSCH, M. & WIESSNER, W. (1993). Nucleotide sequence of a cDNA encoding ribosomal protein L27 from *Chlamydomonas stellata*. *Plant Physiol.* **101**: 1123



- YUDKOVSKY, N.; RANISH, J.A. & HAHN, S. (2000). A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature* **408**: 225-229
- ZHANG, P.; TOYOSHIMA, C.; YOKENURA, K.; GREEN, N.M. & STOKES, D.L. (1998). Structure of the calcium pump from sarcoplasmic reticulum at 8-Å resolution. *Nature* **392**: 835-839
- ZHENG, N. & GIERASCH L.M. (1996). Signal sequences: the same yet different. *Cell* **86**: 849-852
- ZVARITCH, E.; VELLANI, F.; GUERINI, D. & CARAFOLI, E. (1995). A signal for endoplasmic reticulum retention located at the carboxyl terminus of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoform 4Cl. *J. Biol. Chem.* **270**: 2679-2688
- ZYLKA, M.J. & SCHNAPP, B.J. (1996). Optimized Filter Set and Viewing Conditions for the S65T Mutant of GFP in Living Cells. *BioTechniques Euro Edition* **21**: 220-226

- ... Hanna Bork
- ... Barbara Ebert
- ... Sabine Geisendorf
- ... Dietrich Gradmann
- ... Giselbert Hinz
- ... Ulrike Homann
- ... Susanne Holstein und ihrer Arbeitsgruppe
- ... Wolfgang Jahn
- ... Elke Onken
- ... Steffi Riemann
- ... Rudi Schmitt
- ... Bärbel Schönberg
- ... Gerhard Thiel
- ... Alexandra Thiele
- ... Andreas Wolf
  
- ... meiner Familie und Johann Janssen

**Danke**

# Lebenslauf

Name Sandra Schönberg  
Geburtsdatum 7. April 1971 in Witzenhausen  
Staatsangehörigkeit deutsch

## Schulbildung

1977 – 1981 Besuch der Ernst-Reuter Schule in Eichenberg  
1981 – 1987 Besuch der Gesamtschule Witzenhausen  
1987 – 1990 Besuch des Rhenanus-Gymnasiums  
in Bad Sooden-Allendorf

## Studium

1990 – 1991 Studium der Sozialwissenschaften  
an der Georg-August-Universität zu Göttingen  
1991 – 1997 Studium der Biologie  
an der Georg-August-Universität zu Göttingen  
1. November 1993 Vordiplom im Fach Biologie  
1996 – 1997 Diplomarbeit am Albrecht-von-Haller-Institut  
für Pflanzenwissenschaften der  
Georg-August-Universität zu Göttingen  
11. März 1997 Diplom im Fach Biologie  
1997 – 2001 Dissertation am Albrecht-von-Haller-Institut  
für Pflanzenwissenschaften der  
Georg-August-Universität zu Göttingen