

**Untersuchung der funktionellen Interaktionen von
SNARE-Proteinen des frühen sekretorischen Transportweges
mittels komplementärer Substitutionen
in der '0'-Ebene der SNARE-Domäne**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Carmen T. Graf
aus München

Februar 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Jahn

2. Gutachter: Prof. Dr. Volker Haucke

Disputation am 10.04.2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Intrazellulärer vesikulärer Transport in eukaryotischen Zellen.....	1
1.2	Transport zwischen Endoplasmatischem Retikulum und Golgi Apparat.....	3
1.2.1	Anterograder Transport zwischen dem Endoplasmatischem Retikulum und dem Golgi Apparat.....	3
1.2.2	Retrograder ER-Golgi Transport.....	7
1.3	Intra-Golgi Transport.....	10
1.4	„Tethering“/“Docking“ und Fusion von Vesikeln.....	12
1.5	Proteine der intrazellulären Fusionsmaschinerien.....	13
1.5.1	SNAREs.....	13
1.5.1.1	Allgemeine strukturelle Merkmale von SNAREs.....	13
1.5.1.2	Der SNARE-Zyklus.....	16
1.5.1.3	Die SNARE-Hypothese.....	17
1.5.1.4	SNARE-Proteine.....	19
1.5.2	„Tethering“-Faktoren.....	21
1.5.3	Sec1p/Munc-18-Proteine.....	25
1.5.4	Ypt/Rab-Proteine.....	28
1.6	Zielsetzung und Konzept dieser Arbeit.....	32
2	Material und Methoden.....	33
2.1	Material.....	33
2.1.1	Geräte.....	33
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	33
2.1.3	Chemikalien.....	34
2.1.4	Medienzusätze.....	34
2.1.5	Antikörper.....	34
2.1.6	Enzyme und Kits.....	35
2.1.7	Bakterienstämme.....	36
2.1.8	Hefestämme.....	36
2.1.9	Plasmide.....	38
2.1.10	Oligonukleotide.....	39
2.2	Methoden.....	42
2.2.1	Kulturbedingungen für <i>Escherichia coli</i>	42
2.2.1.1	Nährmedium für <i>E. coli</i>	42
2.2.1.2	Anzucht von <i>E. coli</i> -Kulturen.....	42
2.2.2	Kulturbedingungen für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
2.2.2.1	Nährmedium für <i>S. cerevisiae</i>	42
2.2.2.2	Anzucht von <i>S. cerevisiae</i> -Kulturen.....	44
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	44
2.3.1	Präparation von DNA.....	44

Inhaltsverzeichnis

2.3.2	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	45
2.3.3	Enzymatische Behandlung von DNA.....	45
2.3.3.1	Behandlung von linearisierter DNA mit alkalischer Phosphatase.....	46
2.3.3.2	Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden.....	46
2.3.3.3	Ligation von doppelsträngigen DNA-Fragmenten.....	47
2.3.4	Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	47
2.3.5	Isolierung von DNA aus präparativen Agarosegelen.....	48
2.3.6	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	48
2.3.6.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	48
2.3.6.2	Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> -Zellen.....	49
2.3.7	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	49
2.3.7.1	Transformation mittels Hitzeschock-Methode.....	49
2.3.7.1	Transformation mittels Elektroporation.....	49
2.3.8	Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion.....	50
2.3.9	Zielgerichtete Mutagenese mittels Quick-Change-PCR.....	51
2.4	Hefegenetik.....	52
2.4.1	Chemische Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	52
2.4.1.1	Klassische Transformation von Hefezellen.....	52
2.4.1.2	Chemische Transformation mit Träger-DNA.....	53
2.4.2	Elektroporation von <i>S. cerevisiae</i>	54
2.4.3	Plasmidisolierung aus <i>S. cerevisiae</i>	55
2.4.4	Präparation genomischer DNA aus Hefezellen.....	55
2.4.5	Kreuzung von Hefezellen.....	56
2.4.6	Sporulation von Hefezellen.....	56
2.4.7	Analyse von Hefetetraden.....	57
2.4.8	Nachweis von sezerniertem α -Faktor durch den Halo-Test.....	57
2.4.9	Bestimmung des Wachstums von Hefezellen auf Agarplatten.....	57
2.4.10	Austausch von Plasmiden mittels 5'-FOA.....	58
2.5	Biochemische Methoden.....	58
2.5.1	Alkalischer Aufschluß von Hefezellen.....	58
2.5.2	Zellaufschluß mit Glasperlen.....	59
2.5.3	Messung der Proteinkonzentration.....	59
2.5.4	Trennung von Proteinen mittels SDS-PAGE.....	59
2.5.5	Anfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue.....	61
2.5.6	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen.....	61
2.5.7	Färbung von Proteinen auf Nitrozellulose-Filtern mit Ponceau S.....	62
2.5.8	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Filtern.....	62
2.6	Zellbiologische Methoden.....	63
2.6.1	Immunofluoreszenz von Hefezellen.....	63
2.6.2	Analyse der Glycosylierung und Sekretion von Invertase durch Aktivitätsfärbung.....	64
2.6.3	Analyse der Kar2p-Sekretion von Hefezellen.....	66
2.6.3.1	Filtertest.....	66

Inhaltsverzeichnis

2.6.3.2	Aceton-Präzipitation sezernierter Proteine.....	66
2.6.4	Immunpräzipitation von radioaktiv markierten Proteinen aus Zellextrakten.....	67
2.6.5	Elektronenmikroskopie.....	69
3	Ergebnisse.....	70
3.1	Der Phänotyp von <i>sec22</i> '0'-Ebene-Mutationen kann durch Co-Expression komplementärer R-Versionen von <i>Bet1p</i> oder <i>Sed5p</i> supprimiert werden.....	71
3.1.1	Die zusätzliche Expression von komplementärem <i>bet1R</i> oder <i>sed5R</i> supprimiert den Wachstumsdefekt von <i>sec22Q</i> -Hefezellen.....	73
3.1.2	<i>sec22Q</i> -Hefezellen zeigen eine Störung des anterograden Transportes, die durch zusätzliche Expression von <i>bet1R</i> oder <i>sed5R</i> aufgehoben werden kann.....	75
3.1.3	<i>bet1R</i> und <i>sed5R</i> haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Sekretion von <i>Kar2p</i> in <i>sec22Q</i> -Hefezellen.....	76
3.1.4	Nur die zusätzliche Expression von <i>bet1R</i> kann den Wachstumsphänotyp der <i>sec22-3</i> Mutation vollständig aufheben.....	79
3.2	Verschiedene 2R:2Q Stöchiometrien in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes.....	82
3.2.1	Die Einführung eines zweiten Arginins in Position <i>Qa</i> oder <i>Qc</i> führt zu lebensfähigen Hefezellen.....	83
3.2.1.1	Zwei Arginine in gegenüberliegenden Positionen werden toleriert, wenn diese sich in der <i>Qa</i> - und <i>Qc</i> -Position befinden.....	87
3.2.2	Je nach der Position des zweiten Arginins werden unterschiedliche Phänotypen erhalten.....	89
3.2.3	Erhöhung der Rotationssymmetrie durch zusätzliches <i>bet1Q</i> zeigt nur geringe Auswirkungen auf die Temperatursensitivität.....	94
3.3	Verschiebung des Arginins an eine der drei Q-Positionen der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes bei gleichzeitiger Erhaltung der 1R:3Q Stöchiometrie.....	96
3.3.1	Verlegung des Arginins in die <i>Qc</i> -Position führt zu Hefezellen mit wildtyp-ähnlichem Phänotyp.....	97
3.3.2	Verschiebung des Arginins in die <i>Qb</i> -Position führt zu temperatursensitiven Hefezellen, die Transportdefekte aufweisen.....	100
3.3.3	Verlegung des Arginins in die <i>Qa</i> -Position führt zu Hefezellen mit Wachstums- und Transportdefekten.....	102
3.4	<i>Ykt6p</i> - ein Interaktionspartner von <i>Sed5p</i>.....	107
3.4.1	Die zusätzliche Expression von <i>ykt6Q</i> verbessert das Wachstum von Hefezellen, die <i>sed5R</i> als alleinige Version von <i>SED5</i> exprimieren.....	107
3.4.2	Zusätzliches <i>ykt6Q</i> beeinflusst den Transport von <i>CPY</i> in den einzelnen <i>sed5R</i> -Mutanten unterschiedlich.....	109
3.4.3	Die Zellmorphologie von <i>sed5R</i> -mutanten Hefezellen wird durch die zusätzliche Expression von <i>ykt6Q</i> deutlich beeinflusst.....	111

3.5.	Substituiert Ykt6p die <i>SEC22</i>-Deletion auch in Anwesenheit der <i>sed5R</i>-Mutation?.....	114
3.5.1	Ein Arginin in der Qa-Position des ER-Golgi SNARE-Komplexes führt, bei gleichzeitiger Deletion von <i>SEC22</i> , zu Hefezellen mit einem Defekt im ER-Golgi Transport.....	114
3.5.2	Die zusätzliche Expression von <i>ykt6Q</i> verbessert das Wachstum von <i>sed5R/sec22Δ</i> -Hefezellen und mildert den Transportdefekt.....	116
3.6	Tabellarische Übersicht der Ergebnisse.....	121
4	Diskussion.....	125
4.1	Evolutionäre Konservierung der SNAREs.....	125
4.2	Punktmutationen in der ‘0’-Ebene.....	128
4.2.1	Mutationen in der Qa-Position.....	128
4.2.2	Mutationen in der Qb-Position.....	129
4.2.3	Mutationen in der Qc-Position.....	131
4.2.4	Mutationen in der R-Position.....	132
4.2.5	Mutationen in anderen Aminosäureebenen.....	133
4.3	Spezifität und Promiskuität von SNAREs.....	134
4.4	Assembly und Disassembly von SNARE-Komplexen.....	136
4.5	Asymmetrische Verteilung von SNARE-Proteinen.....	139
5	Verwendete Abkürzungen.....	141
6	Literaturverzeichnis.....	143
7	Anhang.....	162