

4 Diskussion

Einzelne SNARE-Proteine können *in vivo* an unterschiedlichen SNARE-Komplexen beteiligt sein, was die eindeutige Zuordnung dieser „multifunktionalen“ SNAREs zu einem bestimmten intrazellulären Transportabschnitt erschwert. Ziel dieser Arbeit war es, funktionelle Interaktionen von SNARE-Proteinen, *in vivo* in der Bäckerhefe zu bestimmen. Am Beispiel des am anterograden Transportes vom ER zum Golgi-Apparats beteiligten SNARE-Komplexes wurden die Auswirkungen von reziproken Substitutionen in der stark konservierten '0'-Ebene der entsprechenden SNAREs untersucht. Dieser Komplex enthält zwei „multifunktionale“ SNAREs, Sec22p, das zusätzlich im retrograden Golgi-ER Transport funktioniert, sowie Sed5p, das auch im Transport innerhalb des Golgi und von Endosomen zum Golgi eine Rolle spielt. Die Aminosäurereste innerhalb der '0'-Ebene eignen sich für diese Untersuchung besonders gut, da Röntgenstrukturanalysen zeigten, daß in der '0'-Ebene immer drei Glutamin- und ein Arginin-Rest miteinander wechselwirken. Der systematische Austausch von Glutamin gegen Arginin bzw. umgekehrt in allen am ER-Golgi SNARE-Komplex beteiligten SNARE-Proteinen zeigte, daß sich diese Mutagenese-Strategie sehr gut eignet, um funktionell interagierende SNARE-Proteine einander zu zuordnen und das Zusammenspiel einzelner multifunktionaler SNAREs mit unterschiedlichen SNARE-Partnern *in vivo* aufzuzeigen. Entgegen der ursprünglichen Annahme einer Rotationssymmetrie innerhalb der '0'-Ebene von SNARE-Komplexen belegen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch, daß die vier Positionen im ER-Golgi SNARE-Komplex nicht äquivalent sind. Sowohl bei einer Verschiebung des Arginins an eine der drei Q-Positionen, als auch bei Erzeugung von Hefemutanten mit zwei Argininen ergaben sich, in Abhängigkeit der mutierten Positionen innerhalb der '0'-Ebene, unterschiedliche Phänotypen.

4.1 Evolutionäre Konservierung der SNAREs

Charakteristisches Merkmal aller SNAREs ist das SNARE-Motiv, welches aus einer Reihe konservierter „heptad-repeats“ besteht. Man nimmt an, daß sich diese α -helices bildenden Domänen von SNAREs aus einem gemeinsamen Vorfahren entwickelt haben (Weimbs *et al.*, 1998).

SNARE-Komplexe bestehen aus vier umeinander gewundenen, parallelen α -Helices, die über 16 Aminosäure-Schichten im Inneren des Bündels miteinander assoziiert sind. Jede der vier Helices steuert jeweils eine Aminosäureseitenkette innerhalb jeder dieser konservierten

Schichten bei. Die meisten dieser Schichten sind aus ähnlich großen, unpolaren Aminosäureresten aufgebaut, doch zeigen manche einem asymmetrischen Aufbau, bei dem große Seitenketten mit kleinen interagieren. In der Mitte dieser Schichtenstruktur befindet sich eine asymmetrische Schicht, die '0'-Ebene, die sich von den übrigen Schichten besonders abhebt. Zum einen interagieren hier polare, hydrophile Seitenketten miteinander, zum anderen wird diese ionische Schicht von zwei benachbarten hydrophoben Schichten abgeschirmt.

Die Aminosäuren dieser zentralen Schicht zeigen die höchste Konservierung innerhalb der Primärsequenz des SNARE-Motivs, was der Anlass war, eine neue Unterteilung der SNARE-Proteine in R- und Q-SNAREs vorzuschlagen (Fasshauer *et al.*, 1998b).

Vergleicht man Qa-, Qb und Qc-SNAREs, dann findet man, dass die '0'-Ebene bei den Qa-SNAREs/Syntaxinen am höchsten konserviert ist. Phylogenetische Untersuchungen von Syntaxinen aus evolutionär sehr weit auseinanderliegenden Spezies, zeigten eine Konservierung des zentralen Glutamins in allen untersuchten Syntaxinen bis hinunter zu *Giardia intestinalis*, einem sehr einfachen Protisten (Dacks und Doolittle, 2002; Fasshauer *et al.*, 1998b). Ausnahmen finden sich lediglich bei Plasmodien-Arten, die an dieser Position an Stelle eines Glutamins ein Arginin enthalten. Jedoch sind die Interaktionspartner dieser Syntaxine bisher unbekannt (Dirk Fasshauer; Hans Dieter Schmitt, persönliche Mitteilungen). Interessanterweise ist das Isoleucin der +2 Ebene in den meisten Syntaxinen ebenfalls konserviert (Dacks und Doolittle, 2002). In Syntaxin 1A ist diese Aminosäure, zusammen mit zwei weiteren Aminosäuren, für die Bindung von nSec1/Munc18 wichtig (Misura *et al.*, 2000). Auch in der Bäckerhefe ist das Isoleucin in der +2 Ebene in fast allen Syntaxinen konserviert. Einzig Ufe1p, das Syntaxin des Golgi-ER Transportes, enthält hier ein Methionin. Im Unterschied zu den übrigen Hefe-Syntaxinen ist das an der Vakuolenfusion beteiligte Syntaxin Vam3p bisher nur in *S. cerevisiae*, sowie in der nahe verwandten *C. albicans* bekannt. Obwohl die Interaktionspartner von Vam3p konserviert sind, sind Orthologe dieses Syntaxins bisher weder in anderen Pilzen, noch in Säugerzellen identifiziert worden. Da Vam3p auch in der phylogenetisch sehr alten Hefe *S. pombe* fehlt, könnte es ein auf die Vakuolenfusion spezialisiertes SNARE von Saccharomyceten darstellen, das sich durch Genduplikation und Sequenzvariation entwickelt hat (Gupta und Heath, 2002).

Die größte Variabilität hinsichtlich der zentralen Aminosäure des SNARE-Motifs findet sich in den Qc-SNAREs. In *S. cerevisiae* enthalten drei der sieben bekannten Qc-SNAREs an Stelle eines Glutamins eine andere Aminosäure. Bet1p, das Qc-SNARE des ER-Golgi SNARE-Komplexes enthält an dieser Position ein kleines Serin. Auch Bet1-Homologe anderer Pilze enthalten meist eine andere Aminosäure in der '0'-Ebene (Gupta und Heath,

2002), wengleich in Säugern Bet1 ein Glutamin zu finden ist. Die Qc-SNAREs des Golgi-ER bzw. des *intra*-Golgi SNARE-Komplexes, Use1p und Sft1p, enthalten in der '0'-Ebene jeweils ein Aspartat. Sft1p-Homologe aus anderen Pilzen enthalten ebenfalls kein Glutamin in der '0'-Ebene (Gupta und Heath, 2002). Auch in *A. thaliana* (Tai und Banfield, 2001) wurden Homologe dieses Qc-SNAREs identifiziert, dennoch ist in Säugerzellen bisher kein Sft1 bekannt. Ähnlich wie im Falle von Vam3p (siehe oben), wurde in Säugerzellen bisher kein homologes Protein zu dem vakuolären Hefe-SNARE Vam7p identifiziert, obwohl dieses SNARE, einschließlich seiner Phosphatidylinositol-3-phosphat bindenden PX-Domäne und der fehlenden Transmembrandomäne, in allen Pilzen konserviert ist (Dirk Fasshauer, persönliche Mitteilung).

R-SNAREs werden aufgrund ihrer N-terminalen Domänen in zwei Untergruppen unterteilt. Während Brevine eine kurze, variable N-terminale Domäne enthalten, zeichnen sich Longine durch eine konservierte ca. 130 Aminosäuren lange profilin-ähnliche Domäne aus (Filippini *et al.*, 2001), die eine regulatorische Funktion besitzt (Rossi *et al.*, 2004a). Im Unterschied zu Brevinen, sind die Longine in allen Eukaryoten konserviert. Zu den Longinen zählen TI-VAMP, sowie Sec22 und Ykt6. Ykt6p und seine Homologen sind besonders hoch konserviert und enthalten alle keine Transmembrandomäne.

Die Aminosäureseitenketten an der Außenfläche der coiled-coil Strukturen von SNAREs geben die örtliche Ladung dieser Struktur vor und können nicht nur die Bildung von SNARE-Komplexen sondern auch die Bindung regulatorischer Faktoren an SNARE-Komplexe modulieren. Auf der Grundlage alternierender Aminosäuremuster auf der Oberfläche der coiled-coil Domäne der SNAREs wurden R-SNAREs in zwei neue Untergruppen aufgeteilt (Rossi *et al.*, 2004b). Die RG-SNAREs bilden die größere der beiden Gruppen und umfassen alle Longine, sowie fast alle Hefe-R-SNAREs sowie die nicht neuronalen Brevine in Säugerzellen. Es wurde vorgeschlagen, daß die RG-SNAREs mehr an grundlegenden Transportschritten beteiligt sind, während die kleinere Gruppe der RD-SNAREs auf schnelle Fusionsprozesse spezialisiert ist.

4.2 Punktmutationen in der '0'-Ebene

4.2.1 Mutationen in der Qa-Position

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Q/R-Substitutionen in beide am Transportabschnitt ER-Golgi beteiligten Qa-SNAREs eingeführt. Sowohl die *sed5R*-, als auch *ufe1R*-Mutation führten *in vivo* zu starken Wachstumsdefekten bereits bei 32 °C. Im Fall der *sed5R*-Mutation konnte der erhaltene Phänotyp durch komplementäre R/Q-Mutation des entsprechenden R-SNAREs supprimiert werden, doch mußten dazu gleichzeitig zwei verschiedene R-SNAREs mutiert werden. *SED5* ist in zwei SNARE-Komplexen beteiligt (Parlati *et al.*, 2002; Sacher *et al.*, 1997; Tsui *et al.*, 2001), weshalb nur die komplementären Q-Mutationen von *SEC22* und *YKT6* zusammen den *sed5R*-Phänotyp vollständig supprimieren konnten. Die Einführung einer Q-Punktmutation in der '0'-Ebene von nur einem dieser beiden R-SNAREs führte zu einer partiellen Suppression, in der nur einer der beiden betroffenen Transportschritte, ER-Golgi oder *intra*-Golgi, wiederhergestellt wurde. Dies wurde anhand des Transportes der vakuolären Protease CPY gezeigt.

Von den bisher in Hefe beschriebenen Q/R-Austauschen in der '0'-Ebene von Qa-SNAREs führte jede dieser Substitutionen *in vivo* zu Defekten im jeweiligen Transportschritt. Ein Q/R-Austausch in Sso2p, dem an der Exozytose beteiligten Qa-SNARE, führte zu einem starken Wachstumsdefekt bei höheren Temperaturen, sowie zu Sekretionsdefekten, die bereits bei Raumtemperatur (25 °C) auftraten. Diese Defekte ließen sich durch Einführung einer komplementären R/Q-Substitution im entsprechenden Synaptobrevin-Homologen Snc2p supprimieren (Katz und Brennwald, 2000; Ossig *et al.*, 2000). Um funktionelle Redundanzen der Genpaare *SSO1/2* und *SNC1/2* auszuschließen, wurden in diesen Mutationsuntersuchungen Hefestämme verwendet, die genomische Deletionen von *SSO1* und *SNC1* enthielten. Auch ein Q/R-Austausch im vakuolären Qa-SNARE Vam3p führte zu einer drastischen Reduzierung der Vakuolenfusion *in vitro* (Wang *et al.*, 2001). Hinsichtlich der Morphologie der Vakuolen bzw. der Komplexbildung an sich wurden jedoch keine oder nur geringe Unterschiede zum Wildtyp beobachtet. *In vitro* Untersuchungen mit rekombinanten neuronalen SNAREs zeigten, daß ein Q/R-Austausch in der Qa-Position zur Bildung von SNARE-Komplexen führte, deren Stabilität meist mit Wildtyp-Komplexen vergleichbar ist, die jedoch starke Defekte bei der Dissoziation des Komplexes durch die ATPase NSF zeigten (Scales *et al.*, 2001). Punktmutationen, die nicht zu einem Ladungsaustausch führten, wie Q/E oder Q/N, führten dagegen nicht zu einer Blockierung der Komplexdissoziation.

Im Unterschied zur *sed5R*-Mutation konnte die negative Wirkung der den retrograden Transport vom Golgi zum ER betreffenden *ufe1R*-Mutation durch das entsprechende *sec22Q* nicht kompensiert werden. Im Gegenteil, der Wachstumsdefekt wurde durch Einführung von *sec22Q* sogar etwas verstärkt. Diese Beobachtungen veranlassten uns zu der Annahme, daß der *ufe1R*-bedingte Phänotyp vielleicht durch Expression der Q-Variante eines der anderen R-SNAREs supprimiert werden könne. Daher wurde in *ufe1R*-Hefezellen plasmid-kodiertes *SNC2*, *snc2Q*, *YKT6* oder *ykt6Q* koexprimiert (nicht gezeigt). Lediglich die zusätzliche Expression von *YKT6* führte zu einer partiellen Suppression des Wachstumsdefektes.

Man nimmt an, daß *SEC22* sowohl im anterograden, als auch im retrograden Transport zwischen ER und Golgi das beteiligte R-SNARE darstellt (Burri *et al.*, 2003; Dilcher *et al.*, 2003; Liu und Barlowe, 2002). Jedoch kann derzeit nicht vollständig ausgeschlossen werden, ob nicht ein anderes R-SNARE am retrograden Transportschritt beteiligt ist. Andererseits interagiert Ufe1p mit dem „Dsl1p“-Komplex (Kraynack *et al.*, 2005). Dsl1p, eine der Komponenten des „Dsl1p“-Komplexes, enthält ein verkürztes putatives R-SNARE-Motiv am C-Terminus. Dieses könnte am ER in einem SNARE-Akzeptorkomplex, bestehend aus Ufe1p, Sec20p und Use1p, die Position des R-SNAREs einnehmen. Im Falle der *ufe1R*-Mutation würde sich dann eine Situation ergeben, in welcher sich ebenfalls zwei Arginine in der R- und Qa-Position befinden, was den beobachteten Phänotyp der *ufe1R*-Mutation erklären könnte (s. auch 4.5). Obwohl wir die Beobachtungen mit den *ufe1R*-Mutanten derzeit nicht erklären können, sind die Daten doch in sich schlüssig. So führen Q/R-Substitutionen in der '0'-Ebene eines Qa-SNAREs im Allgemeinen zu einer starken Beeinträchtigung des entsprechenden Transportschrittes. Dieser Defekt kann in einigen Fällen durch Co-Expression der komplementären Q-Mutation im entsprechenden R-SNARE supprimiert werden. Daher scheinen die R- und Qa-Positionen innerhalb des SNARE Komplexes sowohl strukturell, als auch funktionell äquivalent zu sein und sind damit sehr gut geeignet, um durch funktionelle Interaktionen SNARE-Proteine einem bestimmten SNARE-Komplex zuzuordnen.

4.2.2 Mutationen in der Qb-Position

Im Gegensatz hierzu sind die Qb- und R-, bzw. Qb- und Qa-Positionen funktionell nicht äquivalent. Hefezellen, die *bos1R* anstelle des endogenen *BOS1* exprimierten waren nicht lebensfähig. In dieser Hinsicht entspricht dieses Ergebnis demjenigen im Falle des exozytotischen Komplexes, bei dem eine Q/R-Substitution in der N-terminalen SNARE-Domäne von *SEC9* ebenfalls zu keinen lebensfähigen Zellen führte (Katz und Brennwald, 2000). Im Unterschied zum exozytotischen SNARE-Komplex jedoch führte die Co-

Expression von *sec22Q*, als alleinige Version dieses Gens oder zusätzlich zu endogenem *SEC22*, zu Hefezellen, die Wachstums- und Transportdefekte aufweisen. Auch *in vitro* resultierte aus der Rotation des Arginins an die Qb-Position ein etwas instabilerer neuronaler SNARE-Komplex (Scales *et al.*, 2001). Somit wären zwei SNARE-Komplexe beschrieben, in denen zwei Arginine in der R- und Qb-Position zu nicht lebensfähigen Zellen führen. Diese Beobachtungen würden die Vermutung nahelegen, daß zwei sich gegenüberliegende Arginine *in vivo* meist nicht toleriert werden. In der Literatur ist allerdings eine Mutante beschrieben, die *YKT6* als R-SNARE und *vti1R* als Qb-SNARE enthält und zwar lebensfähig ist, jedoch Transportdefekte aufweist (Dilcher *et al.*, 2001). *In vitro* lassen sich rekombinante neuronale SNARE-Komplexe mit zwei gegenüberliegenden Argininen in der R- und Qb-Position bilden (Scales *et al.*, 2001) (Kathrin Wiederhold, pers. Mitteilung}. Die Stabilität dieser mutierten Komplexe unterscheidet sich kaum vom normalen 1R:3Q Komplex (Kathrin Wiederhold, pers. Mitteilung}. Daher wurde am Beispiel des ER-Golgi SNARE-Komplexes untersucht, ob innerhalb der '0'-Ebene zwei Arginine in gegenüberliegenden Positionen generell nicht toleriert werden. Hierzu wurde ein Hefestamm generiert, dessen ER-Golgi SNARE-Komplex zwei Arginine in der Qa- und Qc-Position enthält. Im Unterschied zur Kombination der R-/Qb-Positionen resultierte die Qa-/Qc-Kombination zweier Arginine in lebensfähigen Hefezellen mit Wachstums- und Transportdefekten. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es sehr unwahrscheinlich, daß sterische oder elektrostatische Abstoßungen zwischen den Aminosäuren allein den SNARE-Komplex insgesamt so stark destabilisieren, daß dies *in vivo* zu einem letalen Phänotyp führt. Überraschenderweise wurde in PC12-Zellen deren SNAP-25 eine oder zwei Q/R-Punktmutation enthielt, der exozytotische SNARE-Komplex also zwei oder sogar drei Arginine enthielt, keine reduzierte Gesamtsekretion beobachtet (Graham *et al.*, 2001).

Die beobachtete Unverträglichkeit zweier Arginine in R- und Qb-Position könnte auch eine Charakteristik von SNARE-Komplexen der sekretorischen Transportroute sein, während sie in SNARE-Komplexen anderer Routen weniger drastische Auswirkungen haben. Die beobachteten Phänotypen der *bos1R*-Mutation weisen auf funktionelle Unterschiede der R- und Qb-Position, deren Ursache derzeit unklar ist. Möglicherweise werden die funktionalen Unterschiede beider Positionen durch Interaktionen mit weiteren SNARE-Effektoren bedingt

4.2.3 Mutationen in der Qc-Position

Innerhalb der drei Q-Positionen, sind die Qc-SNAREs hinsichtlich ihrer zentralen Aminosäure am wenigsten konserviert. Besonders innerhalb der Pilze sind viele Qc-SNAREs bekannt, die in der '0'-Ebene anstatt des Glutamins eine andere Aminosäure (meist Aspartat) enthalten. Hefe Bet1p enthält an Stelle eines Glutamins ein Serin in der '0'-Ebene. Die S/R-Substitution in *BET1* zeigte keinen augenfälligen Phänotypen und führte damit zu dem überraschenden Ergebnis, daß im ER-Golgi SNARE-Komplex zwei Arginine in dieser R-/Qc-Kombination besser toleriert werden als eine „4Q“ (1S + 3Q) Konfiguration. *In vitro* führten Q/A- und Q/I-Substitutionen, jedoch nicht Q/R-Substitutionen, in der C-terminalen Helix von SNAP-25 zu einer reduzierten Stabilität des Komplexes (Chen *et al.*, 1999; Scales *et al.*, 2001). Obwohl die Modellierung zweier Arginine in der R- und Qc-Position, ähnlich wie in der Kombination R und Qa (Ossig *et al.*, 2000), eine starke Destabilisierung des Komplexes vorausberechnete, konnte dies *in vivo* nicht bestätigt werden. Dies legt die Vermutung nahe, daß das sehr kleine Serin generell zu schwächeren Interaktionen mit den anderen Seitenketten führt, weshalb Substitutionen an dieser Position phänotypisch nicht so ins Gewicht fallen. In der Tat führte die zusätzliche Anwesenheit von Bet1pQ bei manchen R:Q-Kombinationen zu einer geringfügigen Verbesserung des Wachstumsdefektes, jedoch wurde in keinem Fall ein deutlicher Suppressionseffekt in den jeweiligen Hefezellen beobachtet. Im SNARE-Komplex des retrograden Transportschrittes vom Golgi zum ER befindet sich in der Qc-Position ebenfalls ein SNARE, das in der '0'-Ebene kein Glutamin aufweist. Use1p enthält hier ein Aspartat und damit eine ähnlich große Aminosäure (Burri *et al.*, 2003; Dilcher *et al.*, 2003). *USE1* ist ein essentielles Gen, und es existiert eine Mutante, die einen ausgeprägten Wachstumsdefekt zeigte. Ein Austausch des Aspartats gegen Glycin *in vivo* zu keinem Wachstumsdefekt (Dilcher *et al.*, 2003). Im Unterschied zu *bet1R* jedoch bedingte die *use1D168G*-Mutation Defekte im Transport von CPY und Invertase. Q/R-Substitutionen in der Qc-Position des exozytotischen SNARE-Komplexes führten zu temperatursensitiven Hefezellen, deren Phänotyp durch Co-Expression von zusätzlichem *snc1R* vollständig supprimiert werden konnte (Katz und Brennwald, 2000).

Diese Beobachtungen bekräftigen die Ansicht, daß die Qc-Position strukturelle Unterschiede besser vertragen kann als andere Positionen.

4.2.4 Mutationen in der R-Position

SNARE-Komplexe rekombinanter, neuronaler SNAREs, deren Synaptobrevin ein Glutamin oder Alanin in der '0'-Ebene enthielt, zeigten *in vitro* eine, im Vergleich zum Wildtyp, etwas erniedrigte Stabilität und Dissoziation durch NSF (Scales *et al.*, 2001). In Säugerzellen wurde kürzlich gezeigt, daß ein Arginin/Prolin-Austausch in Synaptobrevin, die Bildung des SNARE-Komplexes nicht beeinträchtigt, die Stabilität des Komplexes jedoch *in vitro* deutlich reduziert (Martinez-Arca *et al.*, 2004). Dies ist nicht besonders überraschend, da Prolin in der Regel einen Knick in α -Helices herbeiführt, was die gesamte Helix deformiert. Weiterhin wurde gezeigt, daß SybR56P *in vivo* korrekt zur Plasmamembran transportiert wurde, dort jedoch festsaß, da die Dissoziation dieser SNARE-Komplex durch NSTF/ α -SNAP blockiert war (Martinez-Arca *et al.*, 2004). In *S. cerevisiae* führten Punktmutationen der zentralen Aminosäure von R-SNAREs zu einer Reihe unterschiedlicher Phänotypen. Während im exozytotischen SNARE-Komplex aus einer „4Q“-Stöchiometrie resultierende Defekte nur durch Einführung zusätzlicher Mutationen in anderen Aminosäureschichten aufgedeckt werden konnten (Ossig *et al.*, 2000), zeigte der ER-Golgi-SNARE-Komplex stärkere Defekte *in vivo*. Sowohl *sec22Q*, als auch *sec22-3* (R157G) führen zu Wachstumsdefekten und einer Blockierung des anterograden Transportes bei höheren Temperaturen. Ein sehr drastischer Phänotyp wurde beobachtet, als die R/Q-Substitution in Ykt6p vorgenommen wurde, dem einzigen essentiellen R-SNARE in Hefe. Nur bei Co-Expression von *ykt6Q* und endogenem *YKT6* konnten lebensfähige Hefezellen erhalten werden (Dilcher *et al.*, 2001). Sec22p ist am anterograden und retrograden Transport zwischen ER und Golgi beteiligt. Hingegen nimmt man von *YKT6* an, daß es an mindestens drei verschiedenen SNARE-Komplexen beteiligt ist. Da beide SNAREs in mehreren SNARE-Komplexen enthalten sind, wird sich eine Punktmutationen in der '0'-Ebene beider SNAREs auf alle betroffenen Transportschritte auswirken. Dies könnte die unterschiedliche Schwere der beobachteten Defekte bei *sec22Q* bzw. *ykt6Q* im Vergleich zu *snc2Q* erklären, gleichzeitig erschwert es deutlich die eindeutige Interpretation der beobachteten Phänotypen.

Im Gegensatz zu *YKT6* führt eine Deletion von *SEC22* oder *SNC1/2* zu lebensfähigen Zellen, deren Wachstum allerdings eingeschränkt ist. Kürzlich wurde gezeigt, daß in *sec22Δ*-Hefezellen die Expression von *YKT6*, dem einzigen essentiellen R-SNARE in Hefe, hochreguliert ist und Sec22p durch Ykt6p substituiert wird (Liu und Barlowe, 2002). In *sec22Δ/sed5R*-Hefezellen konnte *ykt6Q* jedoch nicht den durch *sed5R*-bedingten Defekt supprimieren und *sec22Q* vollständig ersetzen. Hierfür wären verschiedene Gründe möglich. Das Expressionsniveau von *ykt6Q* könnte nicht ausreichend hoch sein, um beide *sed5R*-

Komplexe zu komplementieren, oder aber endogenes *YKT6* wird bevorzugt in die jeweiligen SNARE-Komplexe eingebaut.

4.2.5 Mutationen in anderen Aminosäureebenen

Eine Vielzahl von Mutationen in weiteren Ebenen des 4-Helixbündels wurde in Mutantenscreens isoliert. Die meisten dieser Mutationen führten zu einer Blockierung des jeweiligen Transportschrittes (Banfield *et al.*, 1995; Dilcher *et al.*, 2001; Dilcher *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 1997; Littleton *et al.*, 1998; Sacher *et al.*, 1997; Saifee *et al.*, 1998; Stone *et al.*, 1997).

Eine Reihe von Mutationen in diesen inneren Schichten sind auch in den SNAREs des Transportabschnitts zwischen ER und Golgi bekannt. Die *sed5-1* Mutation ist ein R/G-Austausch in der -8 Ebene (R255G), *bet1-1* eine L/F-substitution (L72F) in -4, *ufe1-1* S282N in der -2 Ebene und *sec20-1* L234S in der -1 Ebene der SNARE-Domäne. Die Mutationen *sec9-7* (L627H) (Brennwald *et al.*, 1994; Rossi *et al.*, 1997) und *bos1-1* (L190S) befinden sich in der +1 Ebene dieser beiden Qc- bzw. Qb-SNAREs. *In vivo* führt *bos1-1* zu temperatursensitiven Hefezellen mit Transportdefekten und beeinträchtigt *in vitro* die Stabilität des ER-Golgi SNARE-Komplex (Cao *et al.*, 1998; Spang und Schekman, 1998). Diese hydrophilen Punktmutationen destabilisieren die Interaktionen des hydrophoben Leuzinzipfers in der +1 Ebene.

In *C.elegans* sind Punktmutationen innerhalb der +4, +5 und +6 Ebene beschrieben worden. Diese Mutationen beeinträchtigen die synaptische Transmission *in vivo*, weshalb diese Tiere lethargisch wirken und Auffälligkeiten in ihrem Bewegungsapparat zeigen. Die Kombination zweier Mutationen in benachbarten Ebenen führte zu einer Verstärkung der beobachteten Defekte (Saifee *et al.*, 1998). In *Drosophila* wurde eine Punktmutation in der +7 Ebene von Syntaxin1A beschrieben, die einen drastischen Phänotyp bedingt. Diese Mutation zeichnet sich *in vivo* durch eine temperaturabhängige Blockierung der synaptischen Transmission sowie durch sehr geringe Mengen des entsprechenden SNARE-Komplexes aus. *In vitro* wurde eine stark erniedrigte Bindung an Synaptobrevin beobachtet (Littleton *et al.*, 1998).

Meist zeigen Punktmutationen in N-terminalen Aminosäureschichten schwächere Effekte als in C-terminalen Ebenen. So führten *in vitro* Substitutionen in N-terminalen Bereichen des SNARE-Motivs von SNAP-25 zu einer langsameren Dissoziation des SNARE-Komplexes, zeigten *in vivo* jedoch keine Effekte. I/A bzw. M/A-Substitutionen in der +4 bzw. +5-Ebene von SNAP-25 hingegen, zeigten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* negative Effekte. *In vitro* zeigte die +5-Mutation eine biphasische Aufschmelzung des rekombinanten SNARE-

Komplexes. *In vivo* verhalten sich beide dominant negativ und blockieren die Exozytose in PC-12 Zellen sogar vor einem Wildtyp-Hintergrund.

Diese Beobachtungen weisen darauf, daß ein korrektes Packen dieser inneren Aminosäureschichten für die Funktionalität von SNARE-Komplexen sehr wichtig ist.

4. 3 Spezifität und Promiskuität von SNAREs

Damit in Zellen die Subkompartimentalisierung aufrecht erhalten werden kann, müssen intrazelluläre Transportprozesse sehr genau reguliert sein. Wie sich die Spezifität im Einzelnen aufbaut ist derzeit nicht völlig klar.

Vor der Identifizierung von SNARE-Komplexen galten Ypt/Rab-GTPasen als Regulatoren des vesikulären Transportes. Mit der Formulierung der SNARE-Hypothese (Rothman, 1994) jedoch, wurde diese Funktion SNARE-Proteinen zugeschrieben. Dies stützte sich auf Beobachtungen in der Bäckerhefe. Die Überexpression der SNAREs *SEC22* und *BET1* konnte den Funktionsverlust der essentiellen GTPase *YPT1* kompensieren (Dascher *et al.*, 1991). Die Bildung des SNARE-Komplexes wurde als die Kernmaschinerie der Membranfusion angesehen, die einerseits die Membranfusion vermittelt, gleichzeitig aber auch sicherstellt, daß Vesikel nur mit dem richtigen Kompartiment fusionieren. Man nahm an, daß die Spezifität der Reaktionen direkt im Muster der SNARE-Interaktionen kodiert ist (Søgaard *et al.*, 1994; Söllner *et al.*, 1993a). Im Prinzip könnte die gegenseitige Erkennung passender SNAREs Transportreaktionen die nötige Spezifität verleihen, doch stellen Untersuchungen mit rekombinanten SNAREs diese Annahme in Frage. *In vitro* zeigen die neuronalen SNARE-Domänen eine deutliche Promiskuität hinsichtlich ihrer SNARE-Interaktionspartner (Fasshauer *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). Synaptobrevin konnte durch Endobrevin und andere R-SNAREs ersetzt werden. Ebenso ließen sich H3-Syntaxin1a und SNAP-25 durch homologe SNARE-Domänen austauschen. Die gebildeten chimären Komplexe waren meist ähnlich stabil wie der neuronale Komplex (Fasshauer *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die Spezifität der Membranfusion nicht allein durch Interaktionen von SNARE-Domänen bedingt ist. Dennoch könnten SNAREs eine höhere Spezifität vermitteln, als diese Ergebnisse annehmen lassen, denn für diese biochemischen Untersuchungen wurden ausschließlich die löslichen SNARE-Motive verwendet. Die meisten SNAREs enthalten eine Transmembrandomäne und eine N-terminale regulatorische Domäne, die beide zur Spezifität beitragen. Ein *in vitro* System, das die Wechselwirkung von SNAREs in ihrem membrangebundenem Zustand misst, ist die Liposomenfusion, bei der aufgereinigte

SNAREs in Liposomen rekonstituiert werden. In der Gruppe von J. Rothman wurde eine Reihe unterschiedlicher Hefe-SNAREs in Liposomen rekonstituiert und die Liposomenfusion untersucht (Fukuda *et al.*, 2000; McNew *et al.*, 2000; Parlati *et al.*, 2000; Paumet *et al.*, 2001; Paumet *et al.*, 2004). Die Fusionsreaktionen zeigten eine sehr hohe Spezifität. Fusion wurde nur beobachtet, wenn zu einander passende SNAREs in einer bestimmten 1:3 Kombination zwischen beiden Populationen verteilt waren. Folgende Kombinationen bildeten fusogene SNARE-Komplexe: Pep12p/Tlg1p/Vti1p + Snc2p (Snc1p), jedoch wurde hier der endosomale t-SNARE-Komplex präassembliert (Paumet *et al.*, 2004), Tlg2p/Tlg1p/Vti1p + Snc2p (Snc1p) (Paumet *et al.*, 2001), Vam3p/Vam7p/Vti1p + Nyv1p (McNew *et al.*, 2000), Sso1p/Sec9p + Snc1p (Snc2p) (Fukuda *et al.*, 2000). Bei Rekonstitution der ER-Golgi Hefe-SNAREs in Liposomen war nur die Kombination von Sec22p/Sed5p/Bos1p auf den einen Vesikeln und Bet1p in der zweiten Vesikelpopulation fusogen (Parlati *et al.*, 2000). Hingegen führte die Fusion von Liposomen mit endosomalen SNARE-Proteinen aus Säugerzellen, sowie die Fusion aufgereinigter Endosomen zu unterschiedlichen Ergebnissen (Brandhorst, 2005; Zwilling, 2005) (Silvio Rizzoli, persönliche Mitteilung). Die Liposomenfusion zeigte eine deutlich größere Variationsbreite hinsichtlich der Zusammensetzung beider Liposomenpopulationen. Zum einen wurde Fusion bei unterschiedlichen 1:3 Verteilungen der endosomalen SNAREs beobachtet. Zum anderen führte die Verteilung der endosomalen SNAREs auf beide Liposomenpopulationen in einem 2:2 Verhältnis ebenfalls zur Fusion, wengleich diese Reaktion langsamer ablief. Die Fusion aufgereinigter Endosomen hingegen zeigt eine deutliche Spezifität und eine viel schnellere Reaktionskinetik als die Liposomenfusion. Diese Unterschiede zwischen Liposomen und Endosomenfusion zeigen, daß in einem *in vitro* Modellsystem wie den rekonstituierten Liposomen, SNARE-SNARE Interaktionen durchaus ausreichend sind, um Membranfusionen voranzutreiben, doch sind *in vivo* wahrscheinlich weitere bestimmende Faktoren vorhanden.

Obwohl SNAREs meist zwischen zwei Kompartimenten zirkulieren wurde SNARE-Spezifität auch *in vivo* beobachtet. Die Relokalisation von normalerweise plasmamembran-ständigem Syntaxin1a an die ER-Membran führte zur Fehllokalisierung der passenden, endogenen V-SNAREs TI-VAMP und Cellubrevin an das ER, nicht jedoch von endogenem Endobrevin. (Martinez-Arca *et al.*, 2003). In einer anderen Untersuchung wurde gezeigt, daß die Norephedrinsekretion in permeabilisierten PC12-Zellen spezifisch durch die löslichen H3-Domänen der Syntaxine1 und 4 oder durch lösliches VAMP2 und 4 inhibiert, sowie durch spezifische SNAP25-Homologe wiederhergestellt wird (Scales *et al.*, 2000).

Von den 24 in der Bäckerhefe bekannten SNAREs wird mindestens sechs SNAREs eine Beteiligung an mehr als einem Transportschritt zugeschrieben. Eines dieser multifunktionalen SNARE-Proteine ist Ykt6p. Es enthält keine Transmembrandomäne, ist jedoch über einen Farnesyl- und einen Palmitoylrest stabil mit der Membran verankert (Dietrich *et al.*, 2005; McNew *et al.*, 1997). Da es sowohl membrangebunden, als auch zytosolisch vorkommt ist es sehr flexibel und könnte deshalb bei Bedarf andere R-SNAREs, zumindest partiell, substituieren. Zwei der am ER-Golgi SNARE-Komplex beteiligten Proteine sind in weiteren Transportschritten beteiligt. Sec22p ist am retrograden Transport vom Golgi zum ER beteiligt, wohingegen Sed5p an einem *intra*-Golgi Transportschritt beteiligt ist (Parlati *et al.*, 2002; Tsui *et al.*, 2001). Daher wird sich eine Q/R-Substitution in Sed5p auf beide Transportschritte auswirken. Dieses konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. In der Tat werden beide Transportschritte separat durch komplementäres *sec22Q* bzw. *ykt6Q* wiederhergestellt. Dies geht sowohl aus der Untersuchung des CPY-Transportes, als auch, und hier besonders deutlich, den elektronenmikroskopischen Untersuchungen hervor. Dies belegt ebenfalls, daß Q/R-R/Q Substitutionen im R- und Qa-SNARE eines SNARE-Komplexes eine sehr gut geeignete Methode darstellen, um funktionelle Interaktionen zweier SNAREs zu kartieren und die entsprechenden Trafficking-Schritte zu unterscheiden.

Das Ypt/Rab-regulierte „Tethering“ von Vesikeln an die Zielmembran (Cao *et al.*, 1998; Wickner und Haas, 2000) stellt eine zusätzliche Kontrollstufe in Transportprozessen dar und trägt zur Spezifität der SNARE-SNARE Interaktionen bei. Ein Zusammenspiel von Ypts, „Tethering“-Faktoren und SNAREs in einer „Wenn, wenn, dann“-Weise wäre ein vorstellbarer Regulationsmechanismus intrazellulärer Fusionsprozesse, der auch Promiskuität von SNAREs erlaubt.

4.4 Assembly und Disassembly von SNARE-Komplexen

In freien SNAREs sind die einzelnen SNARE-Motive weitgehend unstrukturiert. Erst die Bildung des SNARE-Komplexes induziert die helicale Sekundärstruktur und kann deshalb als eine Faltungsreaktion angesehen werden. *In vitro* zeigen Aufbau und Dissoziation von SNARE-Komplexen eine deutliche Hystereseschleife (Fasshauer *et al.*, 2002). Daher wurde vorgeschlagen, daß die Assemblierung und Dissoziation von SNARE-Komplexen auf unterschiedliche Art erfolgen und von einander unabhängige kontrollierte Prozesse darstellen. Die Hystereseschleife deutet auch auf ein Faltungsintermediat hin, das im Falle des neuronalen SNARE-Komplexes aus Syntaxin und SNAP-25 bestehen könnte. Vergleicht man

den neuronalen und endosomalen SNARE-Komplex hinsichtlich Bildung und Dissoziationstemperatur, so zeigen sich Unterschiede. Der endosomale SNARE-Komplex schmilzt und faltet sich bei niedrigeren Temperaturen als der neuronale. Auch die Bildung des endosomalen Komplexes verläuft langsamer (Fasshauer *et al.*, 2002). Gefalteter und ungefalteter Zustand des SNARE-Komplexes sind durch eine hohe Energiebarriere voneinander getrennt. Dementsprechend sind auch die Kinetiken der Bildung und des Disassembly des Komplexes *in vitro* langsam. Die langsame Bildung von SNARE-Komplexen *in vitro* läßt sich mit ihrer biologischen Funktion nur schwer vereinbaren, insbesondere mit der Exozytose in Synapsen, die ein sehr schneller Prozesse ist. Auf der anderen Seite können Interaktionen mit Effektorproteinen *in vivo* die Bildung von SNARE-Komplexen deutlich beeinflussen. *In vivo* könnte die hohe Energiebarriere einen Mechanismus darstellen, um versehentliche Fusionsreaktionen auszuschließen (Fasshauer *et al.*, 2002). Mutationen der inneren Aminosäureschichten des SNARE-Komplexes zeigen, daß ein korrektes Packen dieser Schichten für die Funktion des SNARE-Komplexes wichtig ist. Mutationen der '0'-Ebene oder anderer Schichten, führten zu deutlichen Phänotypen. Dabei zeigen Mutationen in Ebenen des C-terminalen Bereiches der SNARE-Domäne meist zu stärkere Effekte. Die '0'-Ebene könnte dabei eine besondere Bedeutung haben. Zum einen sind die Interaktionen zwischen den Aminosäureresten dieser Ebene nicht hydrophober Natur sondern Wasserstoffbrückenbindungen, die deutlich stärker sind. Zum anderen ist diese Ebene durch zwei hydrophobe Ebenen abgeschirmt und könnte daher eine Art Kontrollpunkt darstellen, ab dem eine Korrektur nicht richtig gepackter Schichten nicht mehr funktioniert. Ein Beispiel wie die Energiebarriere *in vivo* überwunden werden könnte zeigt die Vakuolenfusion. Der HOPS-Komplex besteht aus sechs Untereinheiten und enthält sowohl einen Ypt-Effektor (Vps39p/Vam6p), als auch ein SM-Protein (Vps33p), also zwei Hauptregulatoren der Funktion von SNARE-Proteinen.. Ypts/Rabs regulieren in einer GTP-abhängigen Weise über Assoziationen mit weiteren Effektor-Proteinen die Zusammenlagerung des SNARE-Komplexes, jedoch ist der genaue Mechanismus bisher unklar. Es wurde postuliert, daß Ypt/Rab-Proteine und ihre Effektoren bzw. Effektor Komplexe die Bildung kognater SNARE-Komplexe katalysieren (Shorter *et al.*, 2002; Sogaard *et al.*, 1994). Die GTPase Ypt7p reguliert das Zusammenfügen ungepaarter SNAREs untereinander als auch mit dem HOPS-Komplex, wodurch ein HOPS-SNARE-Komplex gebildet wird. HOPS interagiert spezifisch mit GTP-Ypt7p und kann den Nukleotidaustausch in Ypt7p stimulieren (Seals *et al.*, 2000; Wurmser *et al.*, 2000). Vps33p ist ein SM-Protein könnte die Assoziation des HOPS-Komplexes mit vakuolären SNAREs regulieren. Kürzlich

wurde gezeigt, daß vakuoläre SNARE-Proteine *in vitro* entweder an den HOPS-Komplex oder an Sec17p binden, jedoch nicht an beide gleichzeitig (Collins *et al.*, 2005). Damit schließen sich die Interaktionen von SNARE-Proteinen mit Sec17p/a-SNAP und HOPS gegenseitig aus. Nach der Membranfusion kommt es zum Auseinanderfallen des SNARE-Komplexes durch die Interaktion mit Sec17p/a-SNAP und Sec18p/NSF. *In vitro* wurde gezeigt, daß Ypt7p und HOPS während der SNARE-Komplexbildung wirken, diese Wirkung von Sec17p unabhängig ist und der HOPS-Komplex an SNAREs assoziiert bleibt, obwohl diese Assoziation dann vielleicht nicht weiter benötigt wird. In dieser Untersuchung wurde vorgeschlagen, daß Sec17p und HOPS an die SNARE-Domäne von Vam3p binden und sich die einzelnen Wechselwirkungen gegenseitig ausschließen. Sec17p kann HOPS vom SNARE-Komplex verdrängen.

Sec17p enthält 14 α -Helices und bildet zwei große Domänen, eine N-terminale verdrehte Fläche mit einer konkaven Form und ein C-terminales globuläres Bündel (Rice und Brunger, 1999). Die Krümmung der konkaven Domäne paßt genau zur konvexen Oberfläche des SNARE-Komplexes. Ein Rand der verdrehten Fläche steht etwas hervor und könnte daher in die kleinen Furchen zwischen den SNARE-Helices passen (Rice und Brunger, 1999). Bei einer Konformationsänderung, induziert durch die Hydrolyse von GTP durch NSF, könnte sich dieser hervorstehende Bereich von Sec17p in die Furche zwischen zwei SNARE-Helices hineinzwängen und den SNARE-Komplex dann auseinander reißen. Aufgrund der zu einander passenden Formen, der Verteilung der Ladung auf der Oberfläche des konkaven Bereiches und der Sequenz wurde vorgeschlagen, daß Sec17p mit seiner konkaven Fläche an den SNARE-Komplex bindet. Kürzlich wurde gezeigt, daß Sec17p in der Tat mit seiner konkaven Domäne an den SNARE-Komplex in der Region der '0'-Ebene bindet. In dieser Domäne von Sec17p wirkten sich Punktmutationen, die die Ladung dieser Domäne verändern stark negativ auf die Bindung des SNARE-Komplexes aus. Auch die Dissoziation des Komplexes durch NSF war davon betroffen. (Marz *et al.*, 2003). Punktmutationen, wie z. B. ein Q/R-Austausch, in der '0'-Ebene von SNARE-Proteinen führen zur Destabilisierung dieser Aminosäureschicht im SNARE-Komplex. Dadurch könnte die Bindung von Sec17p an den SNARE-Komplex per se beeinträchtigt werden oder aber die Struktur des vier-Helix Bündels könnte in einer Weise deformiert werden, daß sich Sec17p nicht mehr richtig in die Furche zwischen zwei SNARE-Helices zwängen könnte. Beide Möglichkeiten würden zu einer defekten Dissoziation des SNARE-Komplexes führen.

4. 5 Asymmetrische Verteilung von SNARE-Proteinen

Das SNARE-Modell besagt, daß jede der beiden fusionierenden Membranen mindestens ein SNARE mit einer Transmembrandomäne enthalten muß. Im an der Exozytose synaptischer Vesikel beteiligten SNARE-Komplex bilden die SNAREs Syntaxin1a und SNAP-25 an der Plasmamembran einen Akzeptorkomplex aus drei Q-Helices in den sich das R-SNARE VAMP2 einfügen kann. Eine analoge Aufteilung zeigt auch der exozytotische SNARE-Komplex in Hefe. An der Plasmamembran bilden die SNAREs Sso1/2p und Sec9p den Akzeptorkomplex, der mit der SNARE-Domäne von Snc1/2p auf dem Vesikel interagieren kann (Fiebig *et al.*, 1999; Nicholson *et al.*, 1998). Bei der homotypischen Vakuolenfusion sind die SNAREs homogen in beiden Membranen verteilt (Ungermann *et al.*, 1998a), obgleich die Liposomenfusion *in vitro* nur eine fusogene 1:3 Kombination ergab (McNew *et al.*, 2000). Auch für den ER-Golgi SNARE Komplex fusionierten *in vitro* Vesikel nur dann, wenn Sed5p/Bos1p/Sec22p in der einen Population und Bet1p in der anderen Population enthalten war (Parlati *et al.*, 2000). Eine andere Funktions-Verteilung der SNAREs hingegen zeigte der aus ER-Vesikeln und Golgi-Membranen rekonstituierte ER-Golgi Transport. Cao und Barlowe (2000) zeigten, daß Vesikel die mutierte Versionen von Bet1p oder Bos1p enthielten nicht mit Wildtyp-Akzeptormembranen fusionierten, während mutiertes Sed5p auf Vesikeln keine Inhibierung führte. Da in beiden Assays der Transport aus nativen Hefemembranen rekonstituiert wird, reflektiert diese Konstellation eher die *in vivo* Situation. Sec22p kann auf beiden Membranen einen fusogenen SNARE-Komplex eingehen (Liu und Barlowe, 2002). Damit wäre im Fall des ER-Golgi SNARE-Komplexes sowohl eine 2:2, als auch eine 1:3 Verteilung der Partner-SNAREs zwischen beiden Membranen möglich. Jedoch ist unklar ob *in vivo* beide Kombinationen zur Fusion von ER-Vesikeln mit Golgi-Membranen führen. Sec22p könnte somit sowohl v-, als auch t-SNARE sein. Diese Vorstellung geht zumindest mit der Annahme konform, daß Sec22p das v-SNARE im retrograden Golgi-ER SNARE-Komplex darstellt. In diesem Fall könnte es mit einem aus Use1p, Sec20p und Ufe1p bestehenden Akzeptorkomplex am ER interagieren. Kraynack *et al.* (2005) haben gezeigt, daß im retrograden Transport vom Golgi zum ER der der „Dsl1p“-Komplex mit den SNAREs Use1p, Sec20p und Ufe1p interagiert. Obwohl diese drei SNAREs in allen Immunpräzipitationen erhalten wurden, wurde Sec22p nie präzipitiert. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß der C-Terminus von Dsl1p, der ein verkürztes putatives R-SNARE-Motif enthält, in diesem Akzeptorkomplex die Position der R-Helix als Platzhalter einnimmt. Beim Ankommen eines Vesikels, das Sec22p enthält, könnte dann ein Austausch beider R-Helices erfolgen. Ein Arginin in der '0'-Ebene eines der drei Q-SNAREs, z. B. in

Ufe1p, könnte diesen „SNARE-Dsl1p“-Komplex in einer Weise deformieren oder destabilisieren, daß Sec22p die R-Helix von Dsl1p nicht mehr verdrängen könnte.