

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden funktionelle Interaktionen von SNARE-Proteinen *in vivo* untersucht. Dies erfolgte am Beispiel des ER-Golgi SNARE-Komplexes, der mit *SED5* und *SEC22* zwei SNAREs enthält, die in weiteren SNARE-Komplexen involviert sind. Zudem ist eines dieser beiden Gene (*SEC22*) in *S. cerevisiae* nicht essentiell.

In der Hefe sind mehrere solcher „multifunktionalen“ SNAREs bekannt, die, jeweils mit unterschiedlichen SNARE-Partnern, an verschiedenen Fusionsschritten beteiligt sind. Dies erschwert die eindeutige Zuordnung einzelner SNARE-Proteine zu einem bestimmten Transportabschnitt, und zu damit einem spezifischen SNARE-Komplex. Alle SNARE-Komplexe enthalten als besonderes strukturelles Merkmal eine polare '0'-Ebene, die sich in der Regel aus einer Arginin- und drei Glutaminseitenketten zusammensetzt und sich deshalb für Mutagenese-Untersuchungen hervorragend eignet. Daher lag der Schwerpunkt dieser Arbeit in der detaillierten Untersuchung, ob und in wie weit die Einführung rotationssymmetrischer Substitutionen in der '0'-Ebene des SNARE-Komplexes geeignet ist, um funktionell interagierende SNAREs zu kartieren.

Dazu wurden Arg→Gln bzw. Gln→Arg Substitutionen in die '0'-Ebene der einzelnen ER-Golgi SNAREs eingeführt und Hefestämme mit verschiedenen R:Q Verhältnissen in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes erzeugt. Diese unterschiedlichen Mutanten wurden eingehend charakterisiert.

Gegenstand des ersten Abschnitts bilden mutierte Hefezellen, deren R-SNARE *SEC22* kein Arg in der '0'-Ebene enthält. Im zweiten Abschnitt des Ergebnisteils werden verschiedene Hefemutanten behandelt, die in unterschiedlichen Kombinationen zwei Arginine in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes enthalten. Der dritte Teil beinhaltet Hefemutanten, die eine normale „1R:3Q“ Stöchiometrie in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes enthalten, das Arginin jedoch an eine der drei Q-Positionen verschoben ist. Hieran folgt ein Abschnitt über *YKT6*, einem R-SNARE, das in einem anderen SNARE-Komplex mit *SED5* interagiert. Der fünfte Teil befasst sich mit Hefemutanten, die ein Arginin in der Qa-Position des ER-Golgi SNARE-Komplexes enthalten, jedoch kein *SEC22*. Den Abschluss dieses Kapitels bildet eine tabellarische Übersicht der Ergebnisse.

3.1 Der Phänotyp von *sec22* '0'-Ebene Mutationen kann durch Co-Expression komplementärer R-Versionen von *Bet1p* oder *Sed5p* supprimiert werden

Das SNARE-Protein *Sec22p* ist am vesikel-vermittelten Transport zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi Apparat beteiligt. Im anterograden Transportschritt interagiert es mit den drei Partner-SNAREs *Sed5p*, *Bos1p* und *Bet1p* (Sacher *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1997). Weiterhin ist *Sec22p* auch am Transport vom Golgi zurück zum ER beteiligt und interagiert hier mit dem Syntaxin-Homologen *Ufe1p*, sowie mit *Sec20p* und *Use1p* (Burri *et al.*, 2003; Dilcher *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 1997).

Da der ER-Golgi SNARE-Komplex mit *Sec22p* und *Sed5p* zwei SNAREs enthält, die in mehr als einem SNARE-Komplex involviert sind und zu Beginn dieser Arbeit der am retrograden Transport zum ER beteiligte Komplex nur unzureichend charakterisiert war, befasst sich diese Arbeit vorwiegend mit den SNARE-Proteinen des am anterograden Transportes vom ER zum Golgi beteiligten SNARE-Komplexes.

Eine strukturelle Besonderheit aller SNARE-Komplexe ist die im Zentrum gelegene, ionisch aufgebaute '0'-Ebene. Bis auf wenige Ausnahmen setzt sich diese zentrale Schicht aus einer Arginin- und drei Glutaminseitenketten zusammen und führte zu einer verfeinerten Einteilung der SNARE Proteine in R-, Qa-, Qb-, Qc-SNAREs, je nach der Position, die sie innerhalb des Vier-Helix-Bündels einnehmen. Der ER-Golgi SNARE Komplex der Bäckerhefe weist innerhalb seiner '0'-Ebene eine Besonderheit auf. In der Qc-Position befindet sich an Stelle eines Glutamins ein Serin. Somit wird die '0'-Ebene des ER-Golgi Komplexes aus Arginin 157 des *Sec22p* (R), Glutamin 283 des *Sed5p* (Qa), Glutamin 186 des *Bos1p* (Qb) und Serin 86 des *Bet1p* (Qc) gebildet. Auch in weiteren Hefen und Pilzen findet sich in der Qc-Position eine andere Aminosäure (Gupta und Heath, 2002).

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Beobachtung, dass neben der *sec22-3* Mutante, die in der '0'-Ebene ein Glycin enthält (Novick *et al.*, 1980; Sacher *et al.*, 1997), auch die *sec22R157Q* Mutation (nachfolgend mit *sec22Q* bezeichnet), die ein Glutamin einbringt, zu einem Wachstumsdefekt führt. Dies war insofern bemerkenswert, als Untersuchungen des exozytotischen Hefe-SNARE-Komplexes gezeigt hatten, dass vier Glutamine in der '0'-Ebene funktional sind. Eine R/Q Substitution in *Snc2p*, dem Synaptobrevin-Homologen, ergab mutante Hefezellen mit vier Glutaminen, die sowohl in ihrem Wachstums- und Sekretionsverhalten, als auch in ihrer Morphologie kaum von Wildtyp-Hefezellen zu unterscheiden waren. Erst die Kombination mit weiteren Mutationen führte zur Ausprägung eines Phänotyps (Katz und Brennwald, 2000; Ossig *et al.*, 2000).

Hingegen führte in Ykt6p, dem einzigen essentiellen R-SNARE in *S. cerevisiae*, eine R/Q Substitution in der '0'-Ebene zu einem drastischen, dominanten Phänotyp (Dilcher *et al.*, 2001).

Hieraus ergab sich die Frage, ob eine Wiederherstellung der „1R:3Q“ Stöchiometrie in der '0'-Ebene des ER-Golgi Komplexes den beobachteten '4 Q' Phänotyp dieses SNARE-Komplexes supprimieren kann.

Da in der Bäckerhefe die '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes in ihrer Zusammensetzung von der allgemeinen Regel abweicht, wurde in dieser Arbeit zunächst überprüft, ob das Serin in Bet1p funktionell durch Glutamin substituiert werden kann. Dazu wurde in Position 86 dieses SNAREs ein Glutamin mittels gerichteter Mutagenese eingeführt. Plasmidcodiertes *bet1S86Q* (fortan als *bet1Q* bezeichnet) wurde in einen diploiden heterozygoten *BET1*-Deletionsstamm (Y21396, Euroscarf) transformiert und nach Sporulation geeigneter Transformanden die resultierenden Tetraden analysiert.

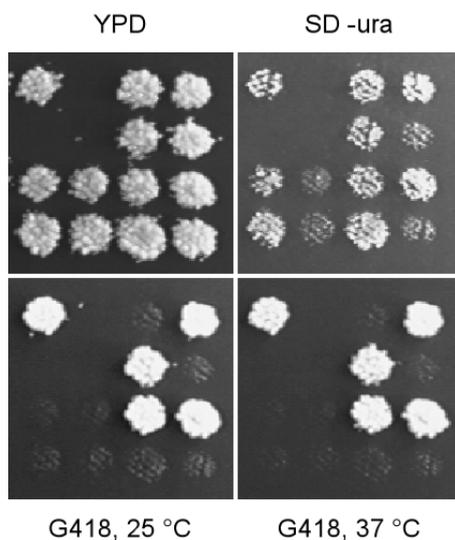


Abb. 10: *bet1Q* kann *bet1Δ* komplementieren. *bet1::KanMX4 / BET1, ura3Δ0 / ura3Δ0* heterozygote diploide Hefezellen wurden mit einem für *URA3* und *bet1S86Q* (pCG39) kodierenden Plasmid transformiert. Nach Sporulation und Tetradenanalyse wurden die ausgelegten Sporen auf YPD-Agarplatten bei 25 °C inkubiert. Die Tetradenplatten wurden auf Agarplatten aus Selektivmedium ohne Uracil sowie G418-enthaltende YPD-Agarplatten umgestempelt und diese für zwei bis drei Tage bei 25 °C bzw. 37 °C inkubiert.

Von 51 dissektierten Tetraden wurden eine Tetrade mit einer lebensfähigen Spore, je 13 Tetraden mit zwei bzw. drei und 24 Tetraden mit vier lebensfähigen Sporen erhalten (Abb. 10). Alle Sporen, die die genomische *BET1*-Deletion (G418-Resistenz) und das *bet1S86Q*-Plasmid (URA+) enthielten, wuchsen auch bei 37 °C. *bet1Q* kann daher *BET1* funktional komplementieren.

3.1.1 Die zusätzliche Expression von komplementärem *bet1R* oder *sed5R* supprimiert den Wachstumsdefekt von *sec22Q*-Hefezellen

Ob und in wie weit die Einführung eines Arginins an einer der drei Q-Positionen den Phänotyp der *sec22Q* Mutante aufheben kann, wurde anhand des Wachstumsverhaltens eines haploiden *sec22Δ* Hefestammes (Y15177, Euroscarf) untersucht, der *sec22Q* unter der Kontrolle des endogenen Promoters von einem Zentromerplasmid exprimiert. Komplementäre Q/R Substitutionen der '0'-Ebene wurden mittels „Quick-Change site directed mutagenesis PCR“ (s. 2.3.9) in *SED5*, *BOS1* und *BET1* eingeführt, sowie in *UFE1*, dessen Genprodukt am Rückwärtstransport zum ER beteiligt ist. Die generierten R-Versionen der verschiedenen SNAREs wurden in low-copy Vektoren der Serie pRS31X (Sikorski und Hieter, 1989) unter Verwendung der jeweiligen endogenen Promotoren subkloniert und in *sec22Q* Hefezellen transformiert. Hierdurch wurden Hefezellen erzeugt, die das jeweilige SNARE-Gen in zwei Versionen enthalten; im Genom als Wildtyp-Gen und plasmidkodiert als R-Mutation. Aufgrund der Besonderheit des Serins in Bet1p wurde auch die *bet1Q* Mutation, ebenfalls als low-copy Plasmid unter dem endogenen Promoter, in *sec22Q* Zellen exprimiert. Das Wachstumsverhalten geeigneter Transformanden wurde in Flüssigkultur bei 25 und 37 °C unter Verwendung geeigneten Selektivmediums untersucht (Abb. 11). Um mögliche multicopy-Effekte auszuschließen wurde daneben auch das Wachstumsverhalten von *sec22Q* Hefezellen untersucht, die jeweils eine zweite plasmidkodierte Wildtyp-Kopie der einzelnen SNAREs enthielten. Diese Kombinationen mit einer zweiten Wildtyp-Version der verschiedenen Partner-SNAREs beeinflussten das Wachstum der *sec22Q* Mutante bei den untersuchten Temperaturen kaum und wurden daher in den Wachstumsdiagrammen nicht dargestellt.

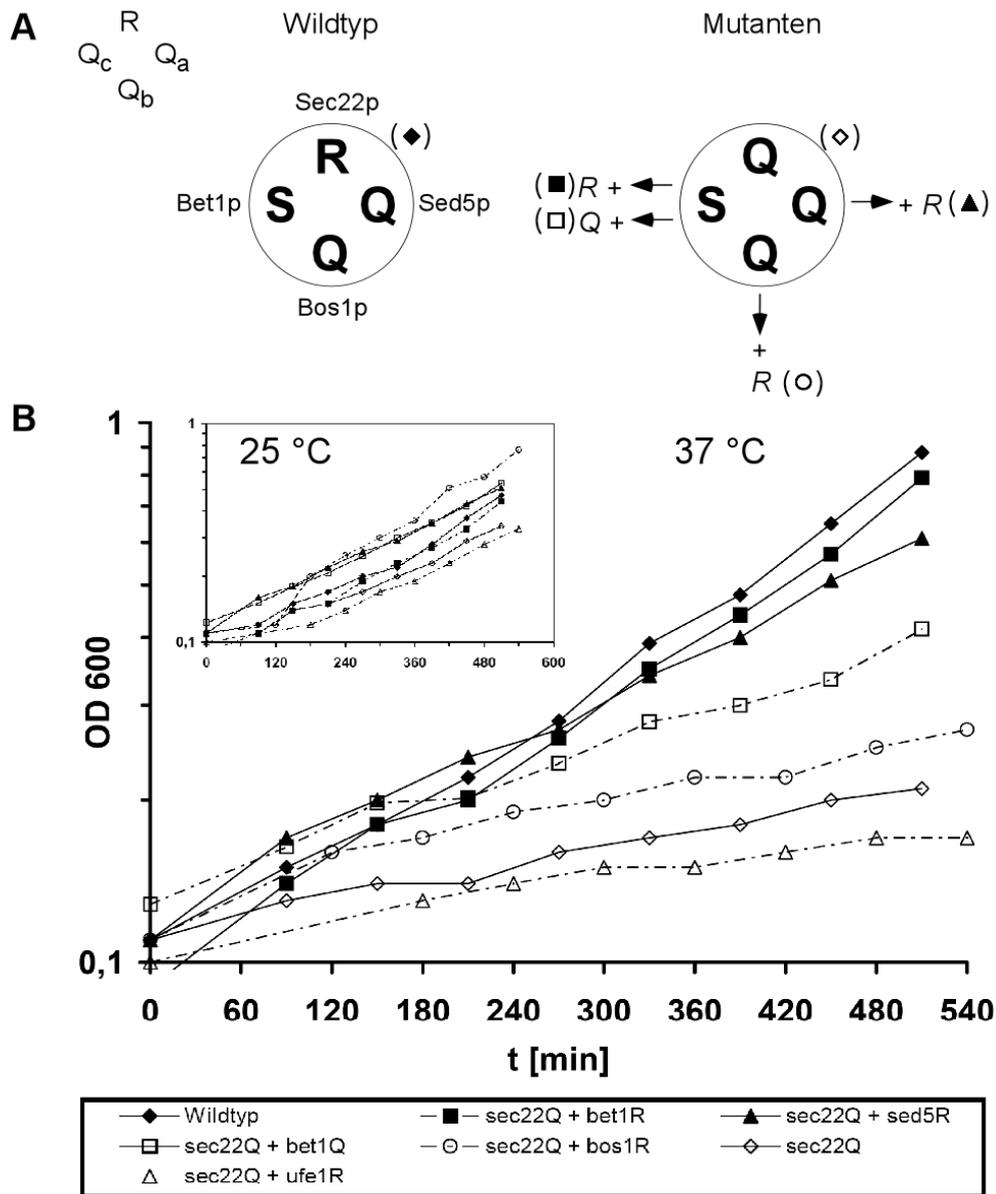


Abb. 11: Wachstumsverhalten von *sec22Q* '0'-Ebene mutanten Hefezellen. (A) Schematische Darstellung der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes im Wildtyp und in den untersuchten *sec22Q* mutanten Hefezellen. Die Skizze gibt die Anordnung der beteiligten Aminosäureseitenketten dieser Schicht wieder. In der Bäckerhefe enthält dieser SNARE-Komplex ein Serin in der Qc-Position. (B) Wachstumskurven der analysierten *sec22Q* Mutanten bei 37 °C und 25 °C (Insert). Haploide *sec22Δ* Hefezellen (Stamm Y15177, *sec22::KanMX4*, Euroscarf) wurden mit folgenden Plasmidkombinationen transformiert: pUA8-*SEC22*/pRS316 (gefüllte Rauten), pUA4-*sec22Q*/pRS316 (offene Rauten), pUA4-*sec22Q*/pCG27-*bet1R* (gefüllte Quadrate), pUA4-*sec22Q*/pCG39-*bet1Q* (offene Quadrate), pUA4-*sec22Q*/pCG32-*sed5R* (gefüllte Dreiecke), pUA4-*sec22Q*/pCG69-*bos1R* (offene Kreise) und pUA4-*sec22Q*/pCG5-*ufe1R* (offene Dreiecke). Das Wachstum in Flüssigkultur wurde unter Verwendung geeigneten Selektivmediums durch Bestimmung der Zelldichte (OD₆₀₀) untersucht. Die einzelnen Messwerte repräsentieren jeweils den Mittelwert aus drei unabhängigen Ansätzen.

Zwei der fünf getesteten Kombinationen führten zu einer Verbesserung des Wachstums bei 37°C. Sowohl die *bet1S86R*- (im Folgenden mit *bet1R* bezeichnet), als auch die *sed5Q283R*-

Mutante (nachfolgend *sed5R* genannt) konnten das Wachstumverhalten auf Wildtyp-Niveau anheben, wenngleich die letztere Mutation etwas schwächer supprimierte (s. auch Kap. 3.3.1 und 3.3.3). Die identifizierten low-copy Suppressoren *bet1R* und *sed5R* supprimierten auch den Wachstumsdefekt der *bet1-1* bzw. der *sed5-1* Mutation (Daten nicht gezeigt). Die beobachtete Suppression des Wachstumsdefektes der *sec22Q*-Mutante durch *bet1R* ist allelspezifisch. Die entsprechende *bet1Q*-Mutation verbesserte zwar die Zellwachstumsrate von *sec22Q*-Hefezellen, jedoch wurde das Wachstum nicht auf Wildtyp-Niveau angehoben. Die Kombination *sec22Q/bos1Q186R* (im Folgenden *bos1R* genannt) verhielt sich nahezu wie die „4Q“ Mutante, wohingegen *sec22Q/ufe1Q289R* (fortan *ufe1R* bezeichnet) das Wachstum sogar geringfügig verschlechterte. Dies ist insofern bemerkenswert, als *sed5R*, die R-Version des Syntaxin-Homologen im anterograden Transportschritt, den *sec22Q*-Wachstumsdefekt supprimiert, während die R-Version von *UFE1*, dem Syntaxin-Homologen des Rückwärtstransportes vom Golgi zum ER, den Wachstumsdefekt von *sec22Q* sogar verstärkt.

3.1.2 *sec22Q*-Hefezellen zeigen eine Störung des anterograden Transportes, die durch zusätzliche Expression von *bet1R* oder *sed5R* aufgehoben werden kann

Um die beiden Suppressionsmutanten genauer zu charakterisieren, wurde der Transport des vakuolären Proteins CPY (Carboxypeptidase Y) in *pulse-chase* Experimenten analysiert. Das CPY-Zymogen wird, nach der Synthese im Zytosol und anschließender Translokation, im Lumen des ER glykosyliert. Es entsteht die p1-Form (*precursor form*; 67 kDa). Während CPY den Golgi-Apparat passiert, wird es weiter glykosyliert und kann auf dieser Stufe als p2-Form (69 kDa) nachgewiesen werden. Nach Erreichen der Vakuole wird das Propeptid abgespalten und die aktive, reife Form der Protease ist detektierbar (m-Form, *mature*; 61 kDa) (Stevens *et al.*, 1982). Die Reifung der Protease CPY wurde im *sec22Q*-Stamm (Y15177 + pUA4-*sec22Q*), der mit den verschiedenen low-copy Plasmiden für Bet1p oder Sed5p transformiert worden war, bei der restriktiven Temperatur von 37 °C untersucht (Abb. 12).

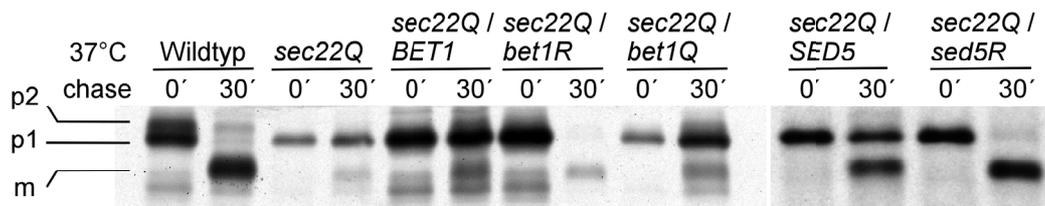


Abb. 12: Transport von CPY (Carboxypeptidase Y) in *sec22Q* exprimierenden Hefezellen. Die Prozessierung von CPY bei der restriktiven Temperatur von 37 °C wurde in *sec22Q*-Zellen (Stamm Y15177 + pUA4-*sec22Q*) analysiert, die mit einem der folgenden Plasmiden transformiert worden waren: pRS316 (leerer Vektor), pCG36-*BET1*, pCG27-*bet1R*, pCG39-*bet1Q*, pCG34-*SED5* oder pCG32-*sed5R*. Als Wildtyp-Kontrolle diente der mit den Plasmiden pUA8-*SEC22* und pRS316 (leerer Vektor) transformierte *sec22Δ*-Stamm (Y15177).

Die Ergebnisse der Untersuchung des CPY-Transportes in verschiedenen *sec22Q*-Hefezellen bestärken zusätzlich die Daten aus den Wachstumskurven. Wie erwartet wiesen *SEC22*-Hefezellen Wildtyp-Verhalten auf. Nach 30 minütiger Inkubation war nur die vakuoläre Form von CPY detektierbar. In *sec22Q*-Hefezellen hingegen war nach der chase-Zeit nur die p1-Form von CPY nachweisbar. Dies belegt, dass in *sec22Q*-Zellen der anterograde Transport auf der Stufe des ER-Golgi-Schrittes blockiert ist. Im Falle der Kombinationen *sec22Q/bet1R* und *sec22Q/sed5R* wurde in den entsprechenden Hefezellen jeweils die reife Form von CPY detektiert (s. a. Kap. 3.3.1 und 3.3.3). Damit führten beide Kombinationen, die den Wachstumsphänotyp von *sec22Q* supprimieren auch zur vollständigen Aufhebung des beobachteten „4Q“-Transportdefektes. In den Kombinationen *sec22Q/BET1* und *sec22Q/SED5* waren sowohl die p1- (ER), als auch die m-Form (vakuoläre Form) von CPY nachweisbar. Diese beiden Kombinationen bewirkten daher eine partielle Wiederherstellung des Transportes zur Vakuole, was sich auf die zwei bis maximal vierfache Überexpression der Wildtyp-Versionen zurückführen lässt. Auch dieser Ansatz hebt die Allelspezifität der *bet1R* Mutation hervor, da, im Gegensatz zu *sec22Q/bet1R*, die Kombination *sec22Q/bet1Q* zu keiner Aufhebung des Transportdefektes führte.

3.1.3 *bet1R* und *sed5R* haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Sekretion von Kar2p in *sec22Q*-Hefezellen

Das SNARE-Protein Sec22p ist, neben seiner Rolle im anterograden Transport, auch am Transport vom Golgi zurück zum ER beteiligt (Lewis *et al.*, 1997; Semenza *et al.*, 1990; Spang und Schekman, 1998). Daher wurden in *sec22Q*-Hefezellen die Auswirkungen der beiden Suppressoren *sed5R* und *bet1R* auf den retrograden Transport untersucht.

Als Marker-Protein für den Transportschritt vom Golgi zum ER wurde das lösliche ER-Protein Kar2p verwendet. Dieses Protein zirkuliert zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat. Unter Gleichgewichtsbedingungen ist es im ER lokalisiert.

Um die Auswirkung der Arginin-Mutante von Sed5p auf den retrograden Transport in *sec22Q*-Hefezellen zu analysieren wurde die Sortierung des Kar2p in einer Immunfluoreszenz Analyse mit affinitätsgereinigtem anti-Kar2p Antikörper untersucht (Abb. 13).

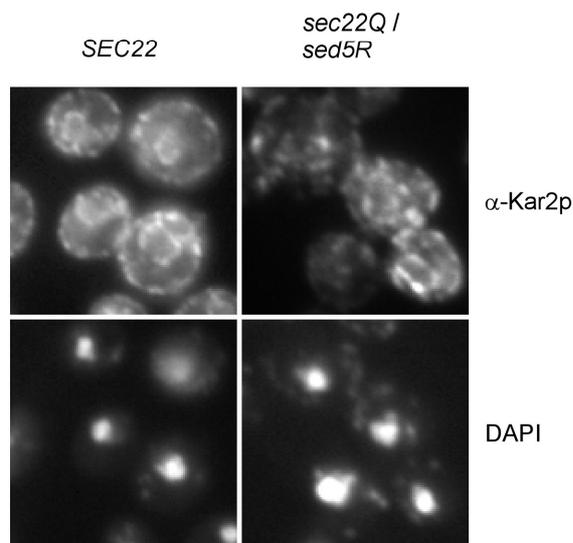


Abb. 13: Lokalisation von Kar2p in *SEC22* und *sec22Q* / *sed5R* exprimierenden Hefezellen. Logarithmisch in geeignetem Selektivmedium wachsende Wildtyp- (*sec22Δ* + pUA8-*SEC22*) und *sec22Q*/*sed5R* Hefezellen (*sec22Δ* + pUA4-*sec22Q* + pCG32-*sed5R*) wurden verdünnt und für zwei Generationszeiten (bis zu einer $OD_{600} = 1$) in frischem YPD-Medium bei 25 °C inkubiert. Die Immunfluoreszenz-Analyse erfolgte an fixierten Zellen unter Verwendung von affinitätsgereinigtem polyklonalem anti-Kar2p Antikörper. Zusätzlich wurde eine DAPI-Färbung zur Anfärbung des Zellkernes

In Wildtyp Hefezellen wurden durch den anti-Kar2p Antikörper die Kernperipherie, sowie Bereiche in der Nähe der Plasmamembran angefärbt. In Hefezellen ist dies die charakteristische ER-Färbung, in der nukleäre und kortikale ER-Membranen sichtbar werden (Rose *et al.*, 1989). Im Vergleich zu Wildtyp-Hefezellen ist die Färbung in *sec22Q*/*sed5R* Hefezellen nicht eindeutig. Zwar werden auch hier Bereiche in der Nähe des Zellkerns und der Plasmamembran angefärbt, doch entspricht dies nicht vollständig der charakteristischen ER-Färbung und auch keiner Golgi-Färbung.

Deshalb wurde zur Untersuchung des retrograden Transportes in *sec22Q*-Hefezellen eine weitere Eigenschaft des Proteins Kar2p ausgenutzt. Unter normalen Bedingungen zirkuliert dieses lösliche ER-Protein Kar2p zwischen dem ER und dem Golgi. Ist der Transport zurück zum ER gestört, wird das Protein sezerniert (Semenza *et al.*, 1990).

Ebenso wie die in der Literatur beschriebene *sec22-3* Mutation (*sec22R157G*) sekretierte auch die *sec22Q* Mutation Kar2p (Abb. 14). Die zusätzliche Expression von *BET1* oder *bet1Q* reduzierte die Menge an sekretiertem Kar2p, doch zeigte nur die Kombination von *sec22Q* mit *bet1R* eine Aufhebung des Sekretionsdefektes (Abb. 14 A; s. a. Kap. 3.3.1). Da Bet1p im SNARE-Komplex des anterograden ER-Golgi Transports involviert ist, handelt es sich bei der Verbesserung des retrograden Transportes um einen indirekten Effekt. Im Unterschied zu

bet1R zeigte *sed5R* keine positive Auswirkung auf diesen Transportbereich. Bei *sec22Q/sed5R* exprimierenden Hefezellen ist weiterhin sezerniertes Kar2p detektierbar (Abb. 14 B, s. a. Kap. 3.3.3). Auch die Kombination *sec22Q/ufe1R* wurde untersucht. Sie sekretierte sogar etwas mehr Kar2p als die *sed5R*-Mutante. Wie bereits unter Kap. 3.1.1 in dieser Arbeit angeführt, ist dies insofern beachtenswert, weil *SED5* und *UFE1* beide Syntaxin-Homologe sind, die mit *SEC22* interagieren. *UFE1* wechselwirkt mit *SEC22* sowohl auf genetischer, als auch auf Proteinebene (Lewis *et al.*, 1997). Eine komplementäre Q-R Punktmutation in *UFE1* sollte die durch *sec22Q* gestörte Stöchiometrie in der '0'-Ebene des am retrograden Transport beteiligten SNARE-Komplexes wiederherstellen, und somit auch dessen Funktionalität.

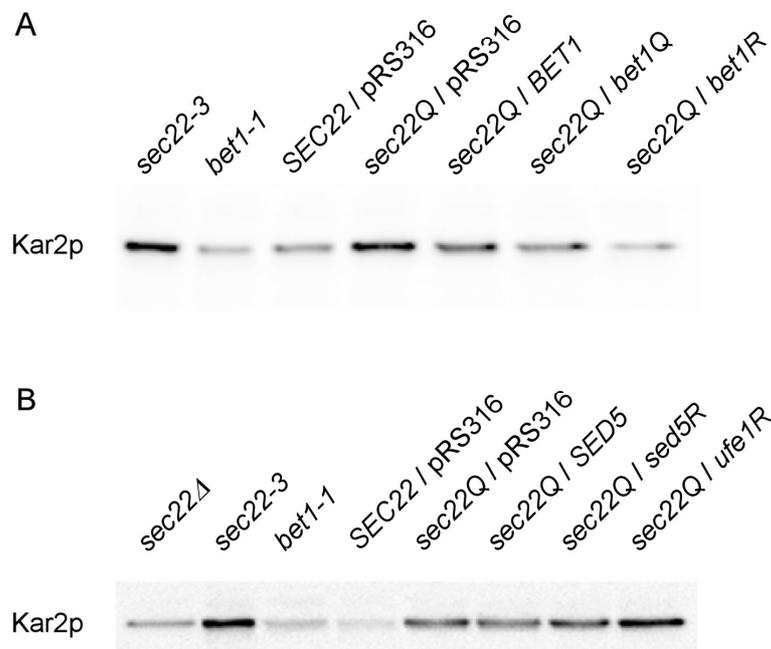


Abb. 14: Sekretionsverhalten von *sec22Q*-Hefezellen. (A) Wie *sec22-3*-Hefezellen, zeigen auch *sec22Q*-Hefezellen eine Sekretion von Kar2p. Nur *sec22Q*-Hefezellen, die zusätzlich *bet1R* exprimieren, sezernieren kein Kar2p. (B) Die Kombinationen *sec22Q/sed5R* und *sec22Q/ufe1R* zeigen eine deutliche Kar2p-Sekretion.

Über Nacht in Selektivmedien gewachsene Kulturen folgender Hefezellen wurden in frischem YPD-Medium verdünnt und bei 25 °C bis zu einer $OD_{600} = 1$ angezogen: Wildtyp Hefezellen (*sec22Δ* + pUA8-*SEC22*); *sec22-3* (RSY280); *bet1-1* (NSY77); *sec22Q*-Hefezellen, die zusätzlich plasmidkodiertes *BET1* (pCG36), *bet1R* (pCG27), *bet1Q* (pCG39), *SED5* (pCG34), *sed5R* (pCG32) oder *ufe1R* (pCG5) exprimieren. *Sec22-3* wurde als Positivkontrolle für die Sekretion von Kar2p verwendet, *bet1-1* als Negativkontrolle. Durch Zentrifugation wurden die Zellen vom Überstand abgetrennt und die in das Medium sezernierten Proteine durch Zugabe von drei Volumeneinheiten kaltem Aceton präzipitiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse untersucht. Als primärer Antikörper wurde polyklonales anti-Kar2p Antiserum verwendet.

3.1.4 Nur die zusätzliche Expression von *bet1R* kann den Wachstumsphänotyp der *sec22-3* Mutation vollständig aufheben

Der beobachtete Phänotyp der *sec22Q* Mutante gleicht dem von *sec22-3*, einer anderen '0'-Ebene Mutation in *SEC22*. In *sec22-3* befindet sich an Position 157 ein Glycin an Stelle eines Arginins (Kaiser und Schekman, 1990; Sacher *et al.*, 1997). Während Glutamin aufgrund seiner polaren funktionellen Gruppe immer noch eine Wasserstoffbrücken-Bindung zu den benachbarten Glutaminseitenketten ausbilden kann und von der Größe her mit Arginin vergleichbar ist, ist Glycin eine sterisch nicht anspruchsvolle Aminosäure. Die *sec22-3* Mutation zeigt einen Wachstumsdefekt bei Temperaturen von mehr als 30 °C und eine Blockierung des Transportes von CPY zwischen ER und Golgi (Andag *et al.*, 2001; Kaiser und Schekman, 1990). Sie akkumuliert 50 nm Vesikel bei der restriktiven Temperatur von 34 °C und sezerniert große Mengen des löslichen ER-Proteins Kar2p (Kaiser und Schekman, 1990; Lewis *et al.*, 1997; Novick *et al.*, 1980; Semenza *et al.*, 1990). Da es sich sowohl bei *sec22Q*, als auch bei *sec22-3* um Punktmutationen in der '0'-Ebene handelt und in beiden Fällen das positiv geladene Arginin durch eine andere Aminosäure ersetzt ist, stellte sich die Frage, ob die gefundenen *sec22Q*-Suppressoren *bet1R* und *sed5R* auch den Phänotyp von *sec22-3* supprimieren können.

Um dies zu ermitteln wurden die Auswirkungen der verschiedenen komplementären R-Mutationen auf das Wachstum und die Sekretion des *sec22-3* Stammes untersucht.

Als erstes wurde das Wachstumsverhalten analysiert. Dazu wurden *sec22-3* Hefezellen mit low-copy Plasmiden transformiert, die entweder für eine weitere Wildtyp Kopie von *BET1*, *BOS1*, *SED5* und *UFE1*, oder für die entsprechenden R-Versionen dieser Partner-SNAREs von *SEC22* kodieren. Zur Kontrolle wurde der *sec22-3* Stamm mit leerem pRS316-Plasmid sowie mit einem für *bet1Q*-kodierenden low-copy Plasmid transformiert. Auf Agarplatten aus Vollmedium (YPD) und Selektivmedium wurde das Wachstum der einzelnen Kombinationen bei verschiedenen Temperaturen analysiert (Abb. 15).

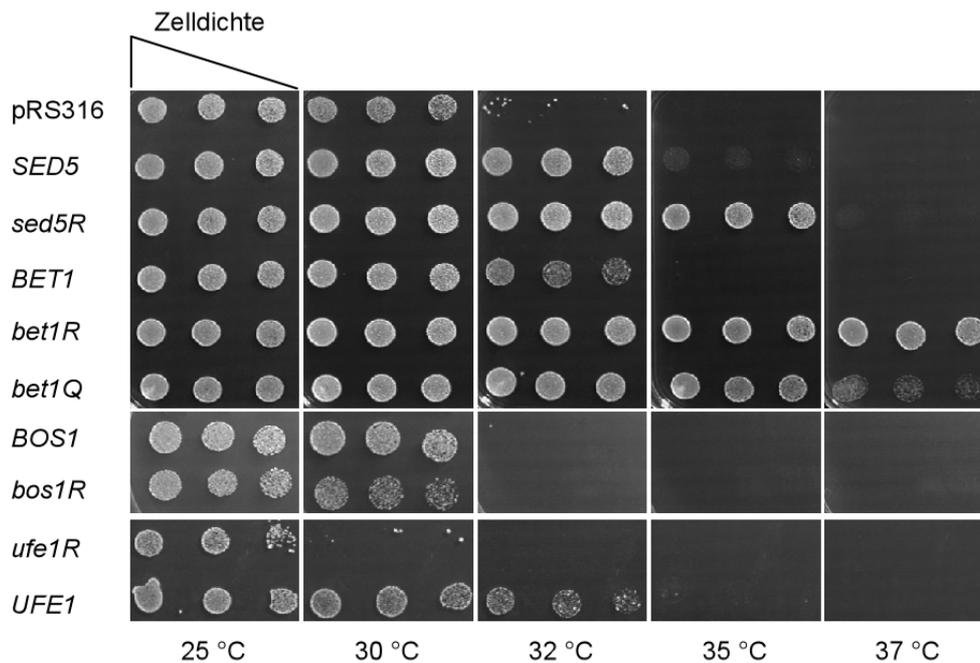


Abb. 15: Wachstumscharakteristika verschiedener *sec22-3* mutanter Hefezellen. Das Wachstumsverhalten von *sec22-3* Hefezellen, die zusätzlich eine wildtyp- bzw. R- oder Q-Version der verschiedenen Partner-SNAREs exprimieren, wurde auf YPD-Agarplatten bei fünf unterschiedlichen Temperaturen untersucht. Die Agarplatten wurden 48 h bei den unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. *sec22-3* Zellen (RSY280) wurden mit je einem der folgenden Plasmide transformiert: pRS316 (leerer Vektor), pCG34-*SED5*, pCG32-*sed5R*, pCG36-*BET1*, pCG27-*bet1R*, pCG39-*bet1Q*, pUA37-*BOS1*, pCG161-*bos1R*, pTN75-*UFE1*, pCG5-*ufe1R*.

In Analogie zu *sec22Q*-Hefezellen, führte die *bet1R* Mutation auch bei *sec22-3* Hefezellen zur vollen Aufhebung der Temperatursensitivität und zu Zellwachstum bei 37 °C (Abb. 15; 5. Reihe). Dieser Effekt ist allelspezifisch. Bei 37°C supprimierte allein *bet1R* den Wachstumsdefekt der *sec22-3* Hefezellen, wenngleich bei niedrigeren Temperaturen auch die *bet1Q*-Mutation das Wachstum der *sec22-3* Hefezellen verbesserte (Abb. 15; 5. und 6. Reihe). Dies lässt sich zum einen dadurch erklären, dass die Einführung weniger zusätzlicher Kopien von *BET1* per se zu einer leichten Verbesserung des Zellwachstums führt, was bei 32 °C sichtbar ist (Abb. 15; 4. Reihe: schwacher multi-copy Effekt). Zum anderen lässt sich die Auswirkung der *bet1Q* Mutante durch sterische Effekte erklären. Die sterisch anspruchsvollere Glutamin-Seitenkette in *bet1Q* kann die '0'-Ebene des SNARE Komplexes, in dem *sec22-3* enthalten ist, besser stabilisieren als das kleine Serin des wildtyp Bet1p. Die zusätzliche Expression von *sed5R* hat auch in *sec22-3* Hefezellen einen positiven Effekt auf das Zellwachstum (Abb. 15; 3. Reihe), wenngleich es dieses nur bis zu einer Temperatur von 35 °C wiederherstellen kann. Auch hier ist jedoch ein schwacher multi-copy Suppressionseffekt durch Einführung einer zusätzlichen Kopie von *SED5* sichtbar (Abb. 15; 2. Reihe).

Wie schon bei der *sec22Q*-Mutation zeigte die zusätzliche Einführung von *bos1R* keinen positiven Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *sec22-3* Hefezellen, sondern führte sogar zu einer leichten Verschlechterung des Zellwachstums (Abb. 15; 8. Reihe).

Die Kombination der *sec22-3* Mutation mit *ufe1R* dagegen führte zu einer deutlichen Verstärkung des Wachstumsdefektes (Abb. 15; 9. Reihe). Bereits eine Temperatur von 30°C wirkte sich auf das Wachstum dieser Hefezellen restriktiv aus.

Diejenigen Mutationen in den Partner-SNAREs, die auf das Wachstumsverhalten von *sec22-3* einen dominanten Effekt gezeigt hatten (*bet1R*, *bet1Q*, *sed5R*, *ufe1R*), wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf den Rückwärtstransport untersucht. Da *sec22-3* große Menge des löslichen ER-Proteins Kar2p sezerniert (Lewis *et al.*, 1997; Semenza *et al.*, 1990), wurde in den verschiedenen Mutanten die Sekretion dieses Proteins bei der permissiven Temperatur von 25 °C analysiert (Abb. 16). Wiederum führten beide *Bet1p*-Mutanten zu einer Verbesserung des Sekretionsdefektes. Während *bet1Q* die Sekretion von Kar2p deutlich reduzierten konnte, bewirkte nur *bet1R* eine vollständige Aufhebung des Defektes auf Wildtyp-Niveau. Sowohl *sed5R*, als auch *ufe1R* mutante Zellen sezernierten weiterhin Kar2p.

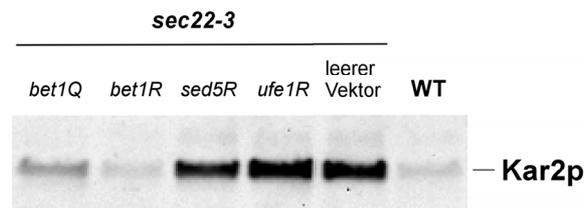


Abb. 16: Sekretion von Kar2p in *sec22-3* Mutanten. Das Sekretionsverhalten von *sec22-3* Zellen (RSY280), die zusätzlich leeren Vektor (pRS316), pCG27-*bet1R*, pCG39-*bet1Q*, pCG32-*sed5R* oder pCG5-*ufe1R* enthalten, wurde bei permissiver Temperatur untersucht. In Selektivmedium logarithmisch wachsende Wildtyp- (BY4742) und die verschiedenen mutanten *sec22-3* Zellen wurden in frischem YPD-Medium verdünnt und bei 25 °C bis zu einer $OD_{600} = 1$ inkubiert. Durch Zentrifugation wurden die Hefezellen abgeerntet und die in das Medium sezernierten Proteine durch Zugabe von drei Volumeneinheiten kaltem Aceton präzipitiert. Mittels SDS-PAGE und Western-Blot, unter Verwendung eines polyklonalen anti-Kar2p Antikörpers, wurden die Proteine anschließend untersucht.

3.2 Verschiedene 2R:2Q Stöchiometrien in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes

Der folgende Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Frage, welche Effekte zwei Arginine in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes auf das Wachstum und den intrazellulären Transport von Hefezellen haben und ob auch die relative Position der beiden Arginine zu einander den Phänotyp beeinflusst.

In vitro Studien mit rekombinanten neuronalen SNARE-Proteinen zeigten, daß einige Komplex-Variationen mit mehr als einem Arginin in der '0'-Ebene durch die ATPase NSF und ihren Co-Faktor α -SNAP nicht mehr vollständig in die einzelnen SNARE-Monomere zerlegt werden. Die thermische Stabilität dieser Komplexe hingegen ist meist nur geringfügig beeinträchtigt (Scales *et al.*, 2001).

In vivo resultierte die Einführung zusätzlicher Arginine in der '0'-Ebene von SNARE-Komplexen in sehr unterschiedlichen Phänotypen. So hatten zum Beispiel in PC12 Zellen mehr als ein Arginin in der '0'-Ebene des exozytotischen Komplexes nur einen geringen Einfluß auf die Sekretion (Graham *et al.*, 2001), wohingegen in der Bäckerhefe zwei Arginine in der '0'-Ebene von SNARE-Komplexen teilweise einen sehr drastischen Phänotyp bedingten.

Ein zweites Arginin in der Qa-Position führte zu Hefezellen mit einem deutlichen Phänotyp. Im Falle des exozytotischen SNARE-Komplex verursachte die *sso2Q228R*-Mutation Wachstums- und Sekretionsdefekte, sowie eine Akkumulation intrazellulärer Vesikel (Ossig *et al.*, 2000). Die Expression des vakuolären SNAREs *vam3Q224R* dagegen führte zu einer stark erniedrigten Vakuolenfusion *in vitro*, zeigte jedoch morphologisch nur eine geringe Abweichung dieser Organellen von Wildtyp-Hefezellen (Wang *et al.*, 2001).

Ein zweites Arginin in der Qb-Position führte zu sehr unterschiedlichen Phänotypen. Im exozytotischen SNARE-Komplex war diese 2R:2Q Kombination letal, während in einem SNARE-Komplex, der am retrograden Transport zum *cis*-Golgi beteiligt ist, lebensfähige Zellen mit Transportdefekten erhalten wurden (Dilcher *et al.*, 2001; Katz und Brennwald, 2000).

Die Einführung eines zweiten Arginins in der Qc-Position des exozytotischen SNARE-Komplexes führte zu temperatursensitiven Hefezellen und verhielt sich auch in Wildtyp-Hefezellen dominant (Katz und Brennwald, 2000).

Diese sehr große Variationsbreite an Phänotypen demonstriert, daß die Zusammensetzung der '0'-Ebene für die Funktionalität des SNARE-Komplexes von maßgebender Bedeutung ist. Anhand des ER-Golgi SNARE-Komplexes, eines SNARE-Komplexes des frühen

Sekretionsweges, der mit Sec22p und Sed5p zwei „mehrfunktionale“ SNARE-Proteine enthält, sollten die Auswirkungen eines zweiten Arginins in der ‘0’-Ebene *in vivo* systematisch untersucht werden.

3.2.1 Die Einführung eines zweiten Arginins in Position Qa oder Qc führt zu lebensfähigen Hefezellen

Zunächst stellte sich die generelle Frage, ob in der ‘0’-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes ein zweites Arginin an jeder der drei entsprechenden Q-Positionen toleriert wird. Dazu sollten mutante Hefezellen erzeugt werden, deren ER-Golgi SNARE-Komplex neben dem Arginin an Position 157 in Sec22p ein weiteres Arginin an einer der drei komplementären Q-Positionen enthält. Im Falle einer 2R:2Q Stöchiometrie, in der das zweite Arginin die Qa-Position belegt, wurde neben *SED5*, das am anterograden Transport vom ER zum Golgi beteiligt ist, auch *UFE1* analysiert, das Syntaxin-Homologe des am retrograden Transportes involvierten SNARE-Komplexes.

Die Gene *SED5*, *UFE1*, *BET1* und *BOS1* sind alle essentiell. Daher wurden die einzelnen plasmidkodierte Arginin-Versionen dieser Gene in entsprechende diploide heterozygote Deletionsstämme transformiert. Geeignete Transformanten wurden anschließend einer Tetradenanalyse unterzogen. Hierdurch wurden Hefezellen erzeugt, die die jeweilige R-Mutation vor einer genomischen Deletion des entsprechenden Wildtyp-Gens exprimieren, gleichzeitig aber endogenes Sec22p enthalten.

Zuerst wurde ein zweites Arginin in die Qa-Position der ‘0’-Ebene eingeführt und die Lebensfähigkeit der mutanten Hefezellen untersucht. Von 50 analysierten Tetraden wurden im Falle der *sed5R*-Mutation 12 Tetraden mit jeweils vier lebensfähigen Sporen erhalten (Abb. 17 A, linker Teil; Tab. 3). Je zwei der vier Sporen enthielten die Marker für die genomische Deletion von *SED5* (G418-Resistenz) und für das *sed5R*-Plasmid (URA+) (⊗_{URA}). Für *ufe1R* wurden von 36 ausgelegten Tetraden acht Tetraden mit je vier lebensfähigen Sporen erhalten. Wiederum enthielten jeweils zwei der vier Sporen die entsprechenden Selektionsmarker für die gewünschte R-Mutation (⊗_{URA}) (Abb. 17 A, rechter Teil; Tab. 3). Somit führte die Einführung eines zweiten Arginins in die Qa-Position der ‘0’-Ebene sowohl im SNARE-Komplex des anterograden, als auch des retrograden Transportes zwischen ER und Golgi zu lebensfähigen Zellen.

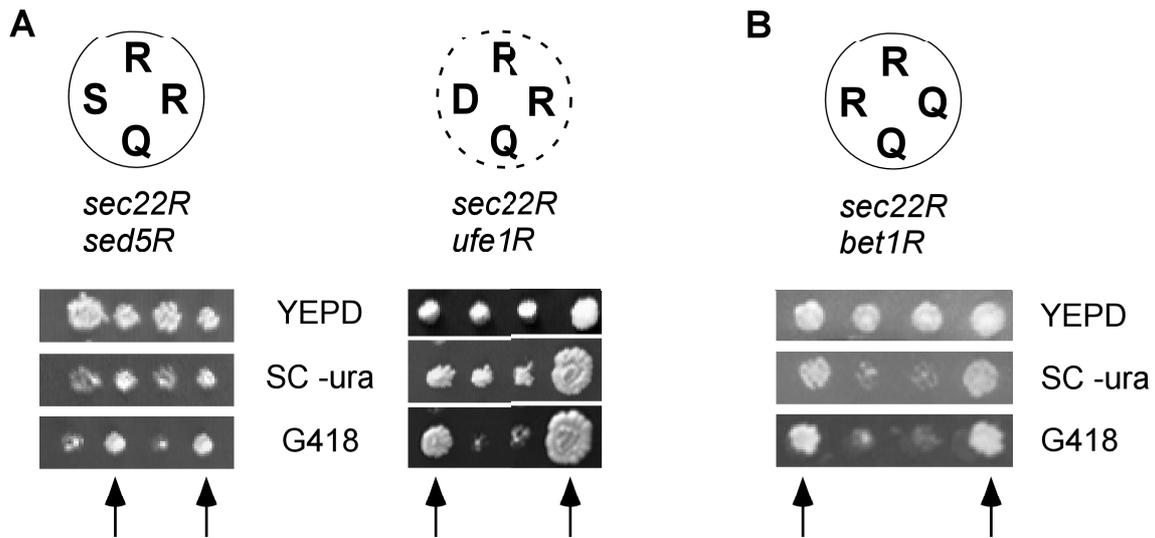


Abb. 17: Einführung eines weiteren Arginines in Position Qa oder Qc führt zu lebensfähigen Hefezellen mit einer 2R:2Q Stöchiometrie in der '0'-Ebene. (A) Ein zweites Arginin in der Qa Position wird sowohl im SNARE-Komplex des anterograden, wie auch des retrograden Transportes zwischen ER und Golgi toleriert. Die Abbildung zeigt repräsentativ je eine Tetrade für die Kombination von *SEC22* mit *sed5R* (linker Teil) und mit *ufe1R* (rechts), der mutanten Version des Syntaxin-Homologen des retrograden Komplexes. Diejenigen Sporen die ein 2R:2Q Verhältnis in der '0'-Ebene enthalten sind G418 resistent und Uracil-prototroph (Pfeile). Die diploiden heterozygoten Deletionsstämme Y21581 (Mat *a/α ura3Δ0/ura3Δ0*; *SED5/sed5::KanMX4*) und Y21851 (Mat *a/α ura3Δ0/ura3Δ0*; *UFE1/ufe1::KanMX4*) wurden mit den Plasmiden pCG32-*sed5R* bzw. pCG5-*ufe1R* transformiert. Nach der Sporulation geeigneter Transformanden wurde einer Tetradenanalyse durchgeführt. Die Genotypen der auf YPD-Agarplatten ausgekeimten Sporen wurden durch Replikaplattierung auf SC-ura- und auf G418-enthaltende YPD-Agarplatten bestimmt. Alle Agarplatten wurden bei 25°C inkubiert. **(B)** Ein zweites Arginin in der Qc-Position des ER-Golgi SNARE-Komplexes führt ebenfalls zu lebensfähigen Zellen. Eine Tetrade mit vier ausgekeimten Sporen ist dargestellt. Zwei der Sporen enthalten sowohl die Deletion von *BET1* (G418 resistent), als auch die plasmidkodierte *bet1R*-Version (URA+) (Pfeile). Diploide Hefezellen in denen eines der beiden *BET1*-Allele durch die *KanMX4*-Kassette ersetzt ist (Stamm: Y21396 ; Mat *a/α ura3Δ0/ura3Δ0*; *BET1/bet1::KanMX4*) wurden mit dem Plasmid pCG27-*bet1R* transformiert. Geeignete Transformanden wurden zum Sporulieren gebracht und die Sporen der resultierenden Tetraden einzeln auf YPD-Agarplatten ausgelegt. Die ausgekeimten Sporen wurden zur Bestimmung des Genotyps auf SC-ura- und auf G418-enthaltende YPD-Agarplatten umgestempelt und die jeweiligen Agarplatten bei 25°C inkubiert.

Ebenfalls lebensfähige mutante Hefezellen wurden erhalten, wenn das zweite Arginin in die korrespondierende Qc-Position der '0'-Ebene (*bet1R*) eingeführt wurde (89). Von 41 untersuchten Tetraden, keimten bei 11 Tetraden alle vier Sporen aus, von denen wiederum jeweils zwei das *bet1R*-Plasmid (URA+) und die genomische *BET1*-Deletion enthielten (G418 Resistenz) (Abb. 17 B und Tab. 3).

Im Gegensatz zu den Positionen Qa und Qc, wurden keine mutanten Hefezellen mit einer 2R:2Q Stöchiometrie erhalten, die ein zweites Arginin in der Qb-Position der '0'-Ebene

(*bos1R*) tragen (⊗)(Abb. 18 A, links; Tab. 3). Von 27 analysierten Tetraden wurde keine einzige Tetrade mit vier oder drei lebensfähigen Sporen erhalten. Alle ausgekeimten Sporen waren G418 sensitiv, enthielten also keine *BOS1*-Deletion im Genom. Durch zusätzliche Expression von plasmidkodiertem *sec22Q* jedoch konnten lebensfähige *bos1R*-mutante Hefezellen erzeugt werden (⊗)(Abb.18 A, rechts; Tab. 3). Hierbei wurde, von 34 ausgelegten Tetraden, lediglich eine Tetrade mit vier lebensfähigen Sporen erhalten. Der hier beobachtete Phänotyp gleicht dem des exozytotischen SNARE-Komplexes. Auch dort ist eine 2R:2Q Stochiometrie mit dem zweiten Arginin in der Qb-Position letal (Katz und Brennwald, 2000). Im Unterschied zum ER-Golgi und exozytotischen SNARE-Komplex, wird im SNARE-Komplex, der am retrograden Transport zum *cis*-Golgi beteiligt ist, ein zusätzliches Arginin in der Qb-Position toleriert, jedoch zeigen diese Hefezellen Transportdefekte (Dilcher *et al.*, 2001).

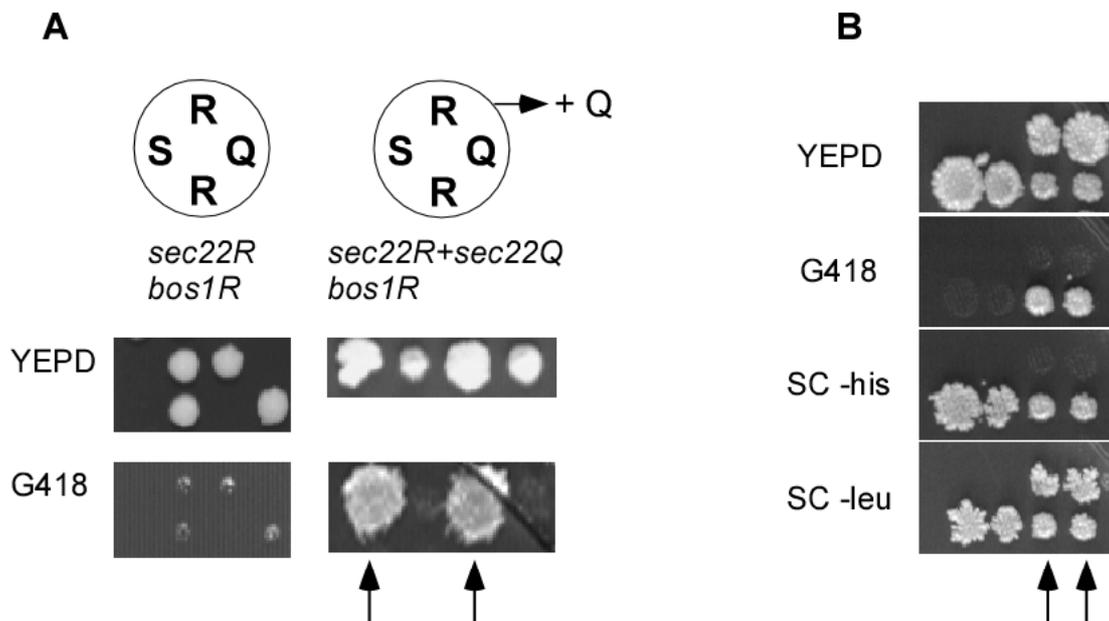


Abb. 18: Hefezellen mit einer 2R:2Q Stöchiometrie in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes, deren zweites Arginin von der Qb-Position beigesteuert wird, sind ohne zusätzliches *sec22Q* nicht lebensfähig. (A) Linker Teil der Abbildung: Ein 2R:2Q Verhältnis mit einem zweiten Arginin in der Qb-Position des ER-Golgi SNARE-Komplexes ist letal. Repräsentativ sind zwei der analysierten Tetraden dargestellt. Bei allen Tetraden wurden ausschließlich lebensfähige Wildtyp-Sporen (G418 sensitiv) erhalten. Rechter Teil: Die Koexpression von *bos1R* mit *sec22Q* hingegen führt zu lebensfähigen Hefezellen mit einem Arginin in der Qb-Position. Von 34 analysierten Tetraden wurde nur eine Tetrade mit vier lebensfähigen Sporen erhalten. Zwei dieser vier Sporen enthielten die Deletion des genomischen *BOS1*-Allels (G418-Resistenz) und die beiden plasmidischen Versionen von *bos1R* (LEU+) und *sec22Q* (HIS+). Diploide Hefezellen in denen eines der beiden *BOS1*-Allele durch die *KanMX4*-Kassette ersetzt ist (Stamm: Y22689; Mat a/α *leu2Δ0/leu2Δ0*; *his3Δ1/his3Δ1 BOS1/bos1::KanMX4*) wurden mit Plasmid pCG8-*bos1R*(LEU2) transformiert bzw. mit den Plasmiden pCG8-*bos1R*(LEU2) und pUA4-*sec22Q*(HIS3) kotransformiert. Geeignete Transformanden wurden zum Sporulieren gebracht und die Sporen der resultierenden Tetraden einzeln auf YPD-Agarplatten ausgelegt. Zur Kontrolle des Genotyps wurden die Tetraden auf SC-leu und G418-

enthaltende YPD-Agarplatten bzw. zusätzlich auf SC-his Agarplatten übergestempelt und bei 25°C inkubiert. **(B)** Mutante Hefezellen, die *bos1R* als einzige Version des Qb-SNAREs exprimieren, benötigen gleichzeitig *sec22Q*. Dabei ist unerheblich ob endogen *sec22-3* (Glycin in der Qa-Position) oder *SEC22* (Arginin in der Qa-Position) vorhanden ist. Von 14 ausgelegten Tetraden wurde nur eine Tetrade mit vier lebensfähigen Sporen erhalten. Jeweils eine der beiden Sporen mit der genomischen *BOS1*-Deletion (G418 resistent; Pfeile) enthält endogen entweder *SEC22* oder *sec22-3*. Hingegen enthalten alle vier Sporen beide Plasmide, also *bos1R* (*LEU+*) und *sec22Q* (*HIS+*).

Die Ergebnisse der *bos1R*-Mutanten zeigen, dass im ER-Golgi SNARE-Komplex zwei Arginine in gegenüberliegenden Positionen nicht toleriert werden. Die beobachtete Letalität könnte eine strukturelle Folge der sich gegenseitig sterisch stark hindernden Argininseitenketten sein. In diesem Falle sollte es möglich sein mutante Hefezellen zu erhalten, die in der Qb-Position nach wie vor ein Arginin tragen, während in der R-Position das Arginin durch eine kleine Aminosäureseitenkette substituiert ist. Diese Hefezellen sollten nicht mehr auf die Co-Expression von *sec22Q* angewiesen sein. Um die Hypothese zu überprüfen wurden mutante Hefezellen erzeugt, deren '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes in der Qb-Position ein Arginin aus *bos1R* und in der R-Position ein Glycin aus *sec22-3*, sowie zusätzlich ein Glutamin aus plasmidkodiertem *sec22Q*, enthalten. Anschließend wurden diese Hefezellen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, das *sec22Q*-Plasmid verlieren zu können.

Hierzu wurde der haploide Stamm YCG9 (MATa *bos1::KanMX4* + pCG8-*bos1R* + pUA4-*sec22Q*) mit *sec22-3* Hefezellen gekreuzt. Die erhaltenen diploiden Hefezellen wurden zum Sporulieren gebracht und nachfolgend einer Tetradenanalyse unterzogen. Von 14 untersuchten Tetraden wurde nur eine Tetrade mit vier lebensfähigen Sporen erhalten, während bei 12 Tetraden jeweils nur zwei Sporen auskeimten, die Wildtyp-*BOS1* enthielten. Die erhaltene vollständige Tetrade entsprach dem Tetratyp (Abb. 18 B und Tab. 3). Beide Sporen die *bos1R* als alleinige Version von *BOS1* exprimierten, enthielten endogen entweder *sec22-3(G)* oder *SEC22(R)* ( (Abb. 18 B, Pfeile markieren die *bos1R*-Hefezellen). Darüber hinaus enthielten diese Sporen auch das *sec22Q*-Plasmid (*HIS+*) und konnten es, im Unterschied zu *BOS1*-Zellen, nicht verlieren (Abb. 18 B, Kolonien auf SC-his Medium haben glatte Ränder). Wildtyp *BOS1*-Zellen hingegen konnten sowohl das *sec22Q*-, als auch das *bos1R*-Plasmid verlieren. Bei diesen Hefezellen bildeten auf SC-his als auch auf SC-leu Agarplatten innerhalb der Kolonie Sektoren, die auxotroph für Leucin oder Histidin geworden waren (Abb. 18 B, Kolonien auf Selektivmedium haben ausgefrante Ränder).

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes ein Arginin in der Qb-Position gleichzeitig das Vorhandensein eines Glutamins in der gegenüberliegenden R-Position erfordert.

Mutation	n	Ausgekeimte Sporen je Tetrade			
		4	3	2	1
<i>sed5R</i>	50	12	4	33	1
<i>ufe1R</i>	36	8	11	15	2
<i>bos1R</i>	27	0	0	26	1
<i>bos1R + sec22Q</i>	34	1	5	27	1
<i>bos1R + sec22Q x sec22-3</i>	14	1	0	12	1
<i>bet1R</i>	41	11	7	21	2

Tabelle 3: Tetradenanalysen zur Erzeugung von Hefezellen mit verschiedenen 2R:2Q Stöchiometrien in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes. n:= Anzahl der ausgelegten Tetraden je Kombination

3.2.1.1 Zwei Arginine in gegenüberliegenden Positionen werden toleriert, wenn diese sich in der Qa- und Qc-Position befinden

Da die Einführung eines zweiten Arginines in der Qb-Position sowohl im ER-Golgi, als auch im exozytotischen SNARE-Komplex zu nicht lebensfähigen Zellen führt, ließ dies vermuten, daß zwei Arginine in gegenüberliegenden Positionen nicht toleriert werden. Um dies zu überprüfen sollten Hefezellen erzeugt werden, die in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes je ein Arginin in der Qa- und in der Qc-Position enthalten, während sie in der korrespondierenden Position des Synaptobrevins ein Glutamin tragen (Ⓢ). Dazu wurde der uracil-auxotrophe Hefestamm YCG84, der plasmidkodiertes *bet1R* sowie *sec22Q* (*HIS3*-Marker, CEN6-Plasmid), und *SED5* (*URA3*-low copy Plasmid) als einzige Versionen dieser Gene exprimiert, mit einem Zentromerplasmid für *sed5R* (*LYS2*-Marker) transformiert. Zur Selektion von Hefezellen mit je einem Arginin in der Qa- und der Qc-Position, die das *SED5*-kodierende *URA3*-Plasmid verloren haben, wurden geeignete Transformanden auf Agarplatten ausgestrichen, die 5'-FOA (5'-Fluoroorotatsäure) und Uracil enthalten.

5'-Fluoroorotatsäure ist ein Fluor-Analogon der Orotatsäure, einem natürlichen Intermediat der Uracil-Biosynthese. Orotatsäure wird von der Orotidin-5'-phosphat Decarboxylase, dem *URA3*-Genprodukt, in Uracil umgewandelt. Uracil-prototrophe Hefezellen wandeln 5'-FOA in das stark toxische 5-Fluorouracil um, das zum Zelltod führt, während uracil-auxotrophe Hefezellen auf die externe Zufuhr von Uracil angewiesen sind und somit auf Fluoroorotathaltigem Medium wachsen können. Mit dieser Methode kann man auf den Verlust eines *URA3*-Plasmides selektieren.

Der Stamm YCG84 ist auf *SED5* angewiesen, das auf einem *URA3*-Plasmid kodiert ist. Daher konnten diese Hefezellen, wie erwartet, nicht auf 5'-FOA haltigen Agarplatten wachsen, wenn sie zusätzlich lediglich leeren pRS317(*LYS2*)-Vektor enthielten (Abb. 19). Waren diese YCG84 Hefezellen jedoch mit einem *sed5R*-enthaltenden pRS317-Vektor transformiert worden, sollten sie nicht mehr auf die Wildtyp-Version des *SED5*-Allels angewiesen sein. Wenn zwei Arginine in gegenüberliegenden Positionen toleriert werden, sollten diese Hefezellen, zumindest unter Anwendung chemischen Selektionsdruckes durch 5'-FOA, das für *SED5* kodierende *URA3*-Plasmid verlieren können, Tatsächlich konnten die Hefezellen wieder *ura3*-auxotroph werden und daher auf 5'-FOA Agarplatten wachsen (Abb. 19).

Dieses Ergebnis zeigt, daß in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes zwei Arginine in gegenüber liegenden Positionen nur dann toleriert werden, wenn sich diese in der Qa- und Qc-Position befinden (⊗). Gleichzeitig schränkt es rein sterische Gründe für den beobachteten letalen Phänotyp, im Falle einer 2R:2Q Stöchiometrie mit dem zweiten Arginin in der Qb-Position, deutlich ein, und läßt vielmehr andere Ursachen für diesen drastischen Phänotypen vermuten.

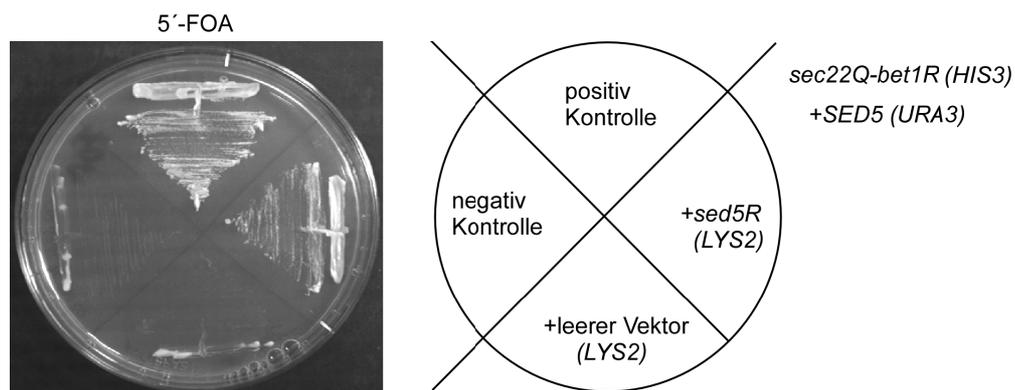


Abb. 19: Im ER-Golgi SNARE-Komplex werden zwei sich in den Positionen Qa und Qc gegenüberstehende Arginine toleriert (⊗). Hefezellen, die *sed5R* und *bet1R* als alleinige Versionen dieser beiden SNAREs enthalten, wurden durch Plasmid-Shuffling mittels 5'-FOA erhalten. Der Stamm YCG84, der auf einem Plasmid *bet1R* und *sec22Q* (*HIS3*), und auf einem weiteren Plasmid *SED5* (*URA3*) als einzige Versionen dieser Gene exprimiert, wurde mit pCG32-*sed5R*(*LYS2*) transformiert. Geeignete Transformanten wurden auf Agarplatten mit 5'-FOA (5'-Fluoroorotatsäure) ausgestrichen, die zusätzlich Uracil (20 mg/l) enthalten. Zur Kontrolle der in den verschiedenen Plasmiden verwendeten Selektionsmarker wurden von den auf 5'-FOA gewachsenen Hefezellen mehrere Einzelkolonien auf YPD-Agarplatten umgestrichen und später auf geeignete Agarplatten aus Selektivmedium replikaplatziert. Der Stamm YCG84 (*bet1::KanMX4 sec22::LEU2 sed5::KanMX4 + pCG64-bet1Rsec22Q + pCG34-SED5*) wurde durch Kreuzung der Stämme YCG2 (*sed5::KanMX4 sec22::LEU2 + pCG34-SED5*) und YCG8 (*bet1::KanMX4 sec22::LEU2 + pCG64-bet1Rsec22Q*) mit nachfolgender Tetradenanalyse der erzeugten diploiden Hefezellen erhalten. Als positive Kontrolle diente der *sec22-3* Hefestamm RSY280, welcher mit leerem pRS316(*URA3*)-Vektor transformiert worden war. Als Negativkontrolle wurde Stamm YCG7 (*bet1::KanMX4 + pCG36-pRS316BET1*) verwendet.

3.2.2 Je nach der Position des zweiten Arginins werden unterschiedliche Phänotypen erhalten

Die erzeugten Hefestämme mit einer 2R:2Q Stöchiometrie in der '0'-Ebene des SNARE-Komplexes wurden hinsichtlich ihres Wachstums- und Transportverhaltens eingehender charakterisiert.

Das Wachstum der unterschiedlichen 2R-Mutanten wurde anhand von Tropfentests auf YPD-Agarplatten bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Vier der analysierten Hefestämme mit zwei Argininen waren in unterschiedlichem Maße temperatursensitiv (Q_a^{R} , Q_b^{R} , Q_c^{R} , R_a^{R}), hingegen zeigte die fünfte 2R-Mutante (R_b^{R}) lediglich ein geringfügig verlangsamtes Wachstum im Vergleich zu Wildtyp-Hefezellen (Abb. 20).

Alle 2R:2Q Kombinationen, in denen eines der beiden Arginine die Qa-Position belegt (Q_a^{R} , Q_b^{R} , Q_c^{R}), führten zu einem Wachstumsdefekt. Hierbei war die Temperatursensitivität am stärksten bei denjenigen Hefestämmen ausgeprägt, die *sed5R* enthielten (Q_a^{R} , Q_b^{R}) (Abb. 20, 3. und 5. Reihe von oben).

Die *sed5R*-Mutation wurde in zwei unterschiedlichen Kombinationen untersucht. In der einen Variante befinden sich die beiden Arginine in der '0'-Ebene des ER-Golgi Komplexes nebeneinander (Q_a^{R} ; Qa- und R-Position), in der anderen stehen sie sich gegenüber (R_a^{R} ; Qa- und Qc-Position). Beide Kombination führten zu Hefezellen, die Wachstumsdefekte bereits bei 30 °C zeigten. Bei beiden Mutanten muß jedoch berücksichtigt werden, daß *SED5* in mehr als einem SNARE-Komplex beteiligt ist. Daher wirkt sich die *sed5R*-Mutation auf alle Sed5p-enthaltenden SNARE-Komplexe aus. Der beobachtete Phänotyp kann somit nicht eindeutig einem nichtfunktionalem ER-Golgi SNARE-Komplex zugeordnet werden. In einem späteren Abschnitt der vorliegenden Arbeit wird die Multifunktionalität von Sed5p eingehender untersucht (s. Kap 3.4).

Im Unterschied zu *sed5R* zeigten *ufe1R*-Hefezellen (Q_a^{R}), deren Arginine sich in der Qa- und R-Position des Golgi-ER SNARE-Komplexes befinden, eine geringere Temperatursensitivität. Diese *ufe1R*-Mutante wuchs bis zu einer Temperatur von 35 °C (Abb. 20, 6. Verdünnungsreihe von oben).

Damit verhalten sich zwei Arginine in der R- und Qa-Position der beiden frühen SNARE-Komplexe ähnlich wie im exozytotischen SNARE-Komplex (Ossig *et al.*, 2000). In allen drei Komplexen führt diese Anordnung zweier Arginine zu temperatursensitiven Hefezellen.

Im ER-Golgi SNARE-Komplex führte die lebensfähige Kombination, in der das zweite Arginin die Qb-Position besetzt (Q_b^{R}), ebenfalls zu temperatursensitiven Hefezellen. *bos1R*-Hefezellen, die zusätzlich zu endogenem Sec22p(R) die *sec22Q*-Mutation enthielten, zeigten

einen Wachstumsdefekt bei Temperaturen über 35 °C (Abb. 20, 4. Reihe). Anders als im ER-Golgi Komplex, führt die entsprechende R-/Q-Kombination im exozytotischen SNARE-Komplex zu lebensfähigen Zellen, die nicht temperatursensitiv sind (Katz und Brennwald, 2000).

Im Unterschied zur Kombination zweier Arginine in der R-Position und der Qa- bzw. Qb-Position, zeigten Hefezellen, die zwei Arginine in der R- und Qc-Position enthielten ($\text{R}_{\text{Qc}}^{\text{R}}$), keine Temperatursensitivität. Die *bet1R*-Mutante wuchs selbst bei einer Temperatur 37 °C, wengleich schlechter als Wildtyp-Hefezellen (Abb. 20, 2. Reihe). Der ER-Golgi SNARE-Komplex unterscheidet sich damit auch in dieser Kombination zweier Arginine vom exozytotischen SNARE-Komplex, der im analogen Fall zu temperatursensitiven Hefezellen führt (Katz und Brennwald, 2000).

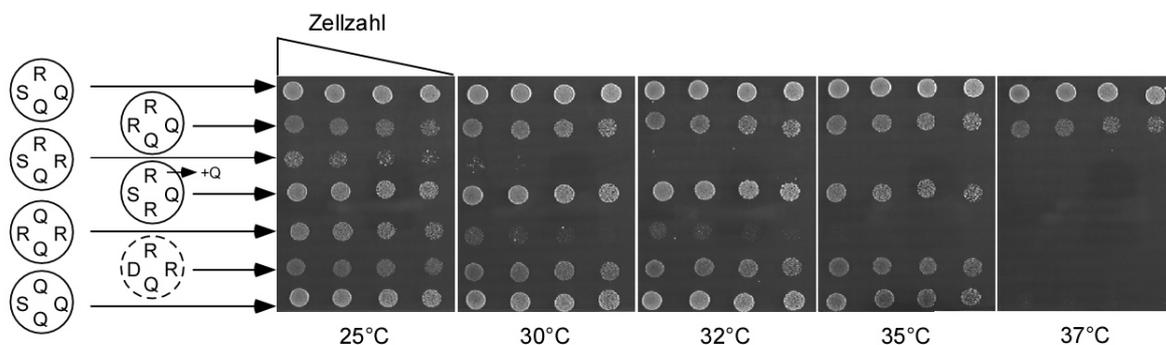


Abb. 20: Wachstumsverhalten mutanter Hefestämme mit zwei Argininen in der '0'-Ebene des ER-Golgi bzw. des Golgi-ER SNARE-Komplexes. Von den untersuchten 2R-Kombinationen ist die Temperatursensitivität am Stärksten in denjenigen Hefemutanten ausgeprägt, die *sed5R* enthalten. Die einzelnen Stämme wurden über Nacht in geeignetem Selektivmedium bei 25 °C angezogen und auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt. Diese Ausgangsverdünnung wurde 1:2 fach weiter verdünnt. Von jeder Verdünnung wurden je 10 µl auf YPD-Agarplatten aufgetragen.

Verwendete Hefestämme: BY4742 ($\text{R}_{\text{Q}}^{\text{R}}$); YCG76 (MATa *bet1::KanMX4* + pCG27-*bet1R*) ($\text{R}_{\text{Qc}}^{\text{R}}$); YCG15 (MATα *sed5::KanMX4* + pCG32-*sed5R*) ($\text{R}_{\text{Qc}}^{\text{R}}$); YCG9 (MATa *bos1::KanMX4* + pCG8-*bos1R* + pUA4-*sec22Q*) ($\text{R}_{\text{Qc}}^{\text{R}}$); YCG103 (MATa *sed5::KanMX4 bet1::KanMX4 sec22::LEU2* + pCG163-*sed5R* + pCG64-*bet1R-sec22Q*) ($\text{R}_{\text{Qc}}^{\text{R}}$); YCG80 (MATα *ufe1::KanMX4* + pCG5-*ufe1R*) ($\text{R}_{\text{Qc}}^{\text{R}}$); *sec22Q* (Y15177 + pUA4-*sec22Q*) ($\text{R}_{\text{Qc}}^{\text{R}}$).

Um die Effekte der verschiedenen 2R-Kombinationen auf den anterograden ER-Golgi Transport genauer zu charakterisieren, wurde die Prozessierung des vakuolären Proteins CPY (Carboxypeptidase Y) in *pulse-chase* Experimenten bei 37 °C analysiert (Abb. 21).

Die drei Kombinationen ($\text{R}_{\text{Qa}}^{\text{R}}$, $\text{R}_{\text{Qb}}^{\text{R}}$, $\text{R}_{\text{Qc}}^{\text{R}}$), in denen eines der beiden Arginine die Qa-Position besetzt, führten zu Hefezellen mit deutlichen Unterschieden in ihrem Transportverhalten. In beiden mutanten Hefestämmen, die *sed5R* entweder in Kombination mit Sec22p(R) ($\text{R}_{\text{Qa}}^{\text{R}}$) oder mit *bet1R/sec22Q* ($\text{R}_{\text{Qb}}^{\text{R}}$) exprimierten, war nach einer chase-Zeit von 30 min das CPY-Protein

ausschließlich in der p1-Form (ER-Form) nachweisbar. Dies deutet auf einen zwischen dem ER und *cis*-Golgi blockierten anterograden Transport.

Im Unterschied zu diesen beiden Hefestämmen zeigte die 2R-Mutante mit *ufe1R* (R_{98}^{R}) eine partiell defekte Prozessierung von CPY. Ein Teil des metabolisch markierten CPYs wurde als m-Form (reife Form) detektiert, hatte also die Vakuole erreicht; wenngleich auch hier der größte Teil des Proteins in der p1-Form akkumulierte. *UFE1* wirkt im retrograden Transport vom Golgi zum ER und hat deshalb auf den anterograden Schritt keinen unmittelbaren Einfluß. Die *ufe1R*-Mutation führt primär zu einer Störung des retrograden Transportes, die sich jedoch wiederum auch auf den Vorwärtstransport auswirkt. Daher handelt es sich bei dem beobachteten Defekt um einen indirekten Effekt, der auf einen gestörten Transport vom Golgi zum ER hinweist.

Die 2R-Mutante mit dem zweiten Arginin in der Qb-Position ($\text{R}_{100}^{\text{R}}$), also die Kombination von *bos1R* mit *SEC22* und zusätzlichem *sec22Q*, zeigte ebenfalls einen Transportdefekt. Nach der chase-Zeit von 30 min akkumulierte die Protease in der p1-Form, was eine vollständige Blockierung des anterograden ER-Golgi Transportes von CPY widerspiegelt (Abb. 21).

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen 2R:2Q-Kombinationen führte die Kombination zweier Arginine in der R- und Qc-Position ($\text{R}_{100}^{\text{R}}$) der '0'-Ebene lediglich zu einem verlangsamten Transport von CPY (Abb. 21). In der *bet1R*-Mutante lag der Großteil des CPY-Proteins nach 30 min in der reifen Form vor und hatte daher die Vakuole erreicht. Nur ein geringer Anteil des Proteins war weiterhin als p1-Form detektierbar.

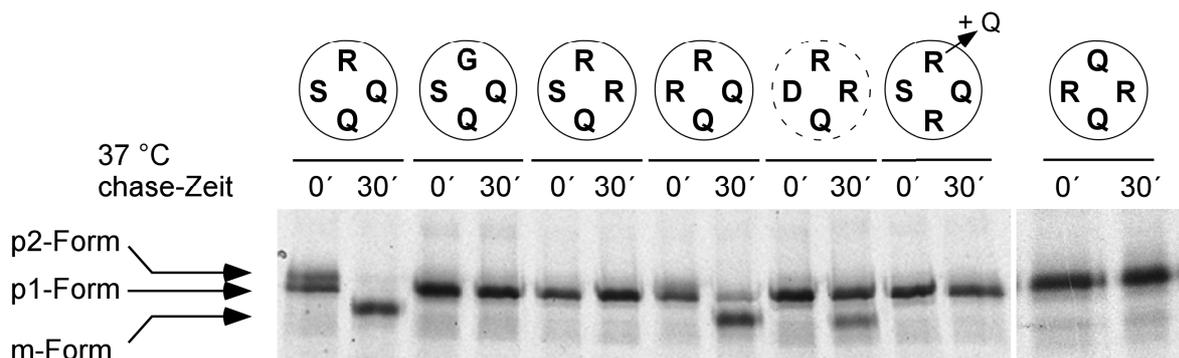


Abb. 21: Transport von CPY (Carboxypeptidase Y) in Hefemutanten mit zwei Argininen in der '0'-Ebene des ER-Golgi bzw. Golgi-ER SNARE-Komplexes. Die Prozessierung von CPY bei der restriktiven Temperatur von 37 °C wurde in folgenden Hefestämmen analysiert: BY4742 (R_{98}^{R}); YCG76 (MATa *bet1::KanMX4* + pCG27-*bet1R*) ($\text{R}_{100}^{\text{R}}$); YCG15 (MATa *sed5::KanMX4* + pCG32-*sed5R*) (R_{98}^{R}); YCG9 (MATa *bos1::KanMX4* + pCG8-*bos1R* + pUA4-*sec22Q*) ($\text{R}_{100}^{\text{R}}$); YCG103 (MATa *sed5::KanMX4 bet1::KanMX4 sec22::LEU2* + pCG163-*sed5R* + pCG64-*bet1R-sec22Q*) ($\text{R}_{100}^{\text{R}}$); YCG80 (MATa *ufe1::KanMX4* + pCG5-*ufe1R*) (R_{98}^{R}); *sec22Q* (Y15177 + pUA4-*sec22Q*) ($\text{R}_{100}^{\text{R}}$).

Zusätzlich zur Prozessierung von CPY wurde der Transport von Invertase untersucht. Dabei wurden die Transportdefekte bestätigt. Die Sekretion periplasmatischer Invertase in Wildtyp- und mutierten-Hefezellen wurde nach Inkubation bei restriktiver Temperatur in Bezug auf mögliche Glykosylierungsdefekte untersucht. In induzierten Hefezellen kann man drei Formen von Invertase unterscheiden: (1) die konstitutiv gebildete, unglykosylierte zytoplasmatische Form (60 kDa), (2) eine ER-glykosylierte Form (80-86 kDa) und (3) die Golgi-glykosylierte Form (100 - 150 kDa), die schließlich sezerniert wird (Stevens *et al.*, 1982).

Die Glykosylierung der Invertase in Wildtyp- und mutanten Hefezellen wurde bei permissiver und bei restriktiver Temperatur verglichen. In Wildtyp-Hefezellen (R^{Q}) war sowohl bei 25 °C, als auch bei 37 °C nur Golgi-glykosylierte Invertase zu sehen (Abb. 22, Spuren 1 und 2 von links). Im Gegensatz hierzu zeigten *sec22-3* Hefezellen (R^{Q}), wie erwartet bei 37 °C die ER-glykosylierte Form und bei 25 °C die sekretierte Form der Invertase (Abb. 22, Spuren 3 und 4). In diesen Hefezellen ist bei restriktiver Temperatur der Transport zwischen ER und Golgi blockiert (Novick *et al.*, 1980).

Alle Kombinationen zweier Arginine, in denen eines davon in der Qa-Position enthalten ist (R^{Q} , R^{R} , R^{Q}), zeigten bei der restriktiven Temperatur vorwiegend die ER-glykosylierte Invertase (Abb. 22, Spuren 6, 12 und 14 von links). Dies weist darauf hin, daß der Transport vom ER zum Golgi-Apparat gestört ist. Im Falle der beiden *sed5R*-Mutanten handelt es sich um einen direkten Effekt dieser R-Mutation auf den anterograden Transport, während es sich bei *ufe1R*, das am SNARE-Komplex des retrograden Transportes beteiligt ist, um eine indirekte Folge handelt, die auf einen defekten Transport zum ER schließen läßt. Bei permissiver Temperatur war in diesen 2R-Mutanten (R^{R} , R^{R} , R^{R}) die sekretierte, Golgi-glykosylierte Form der Invertase nachweisbar, die jedoch im Vergleich zu Wildtyp-Hefezellen etwas weniger glykosyliert erschien (Abb. 22, Spuren 5, 11 und 13 von links).

Hefezellen die *bos1R* in Kombination mit *SEC22(R)* und *sec22Q* exprimieren (R^{Q}), also zwei Arginine in der R- und Qb-Position enthalten, zeigten bei 25 °C nur die sekretierte Form der Invertase. Bei 37 °C war insgesamt nur sehr wenig Invertase nachweisbar, die in der ER-glykosylierten Form vorlag (Abb. 22, Spuren 7 und 8). Dies zeigt, daß in der *bos1R*-Mutante ebenfalls der ER-Golgi-Transport blockiert ist.

Wie erwartet, war in *bet1R*-Hefezellen (R^{Q}), die beide Arginine in der R- und Qc-Position enthalten, bei beiden Temperaturen nur die sekretierte Form der Invertase nachweisbar (Abb. 22, Spuren 9 und 10).

Zusammenfassend weisen die aus der Invertaseglykosylierung und dem Transport von CPY erhaltenen Ergebnisse der 2R-Mutanten darauf, daß die Anwesenheit von zwei Argininen in der '0'-Ebene den anterograden Transport zum Golgi blockiert, wenn sich eines der beiden Arginine entweder in der Qa-Position (R_{60}^{Q} , R_{60}^{R} , R_{60}^{S}) der im Transportabschnitt zwischen ER und Golgi beteiligten SNARE-Komplexe oder in der Qb-Position (R_{60}^{Q}) des ER-Golgi SNARE-Komplexes befindet.

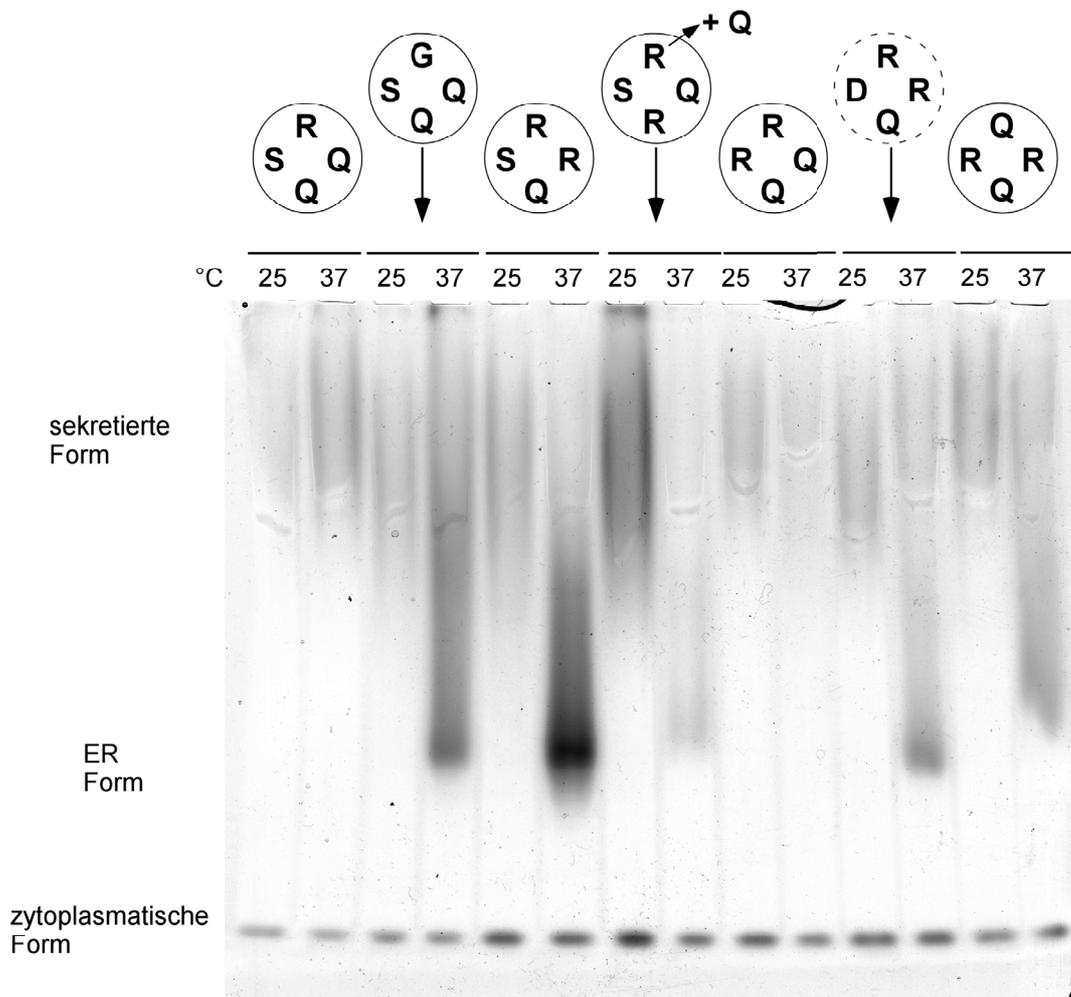


Abb. 22: Invertaseglykosylierung in mutanten Hefezellen mit zwei Argininen in der '0'-Ebene. Mit Ausnahme der Kombination zweier Arginine in der R- und Qc-Position, führen alle anderen untersuchten Kombinationen zweier Arginine zu Hefezellen mit Defekten in der Glykosylierung von Invertase. Zur Induktion der Invertasesekretion wurden die verschiedenen Hefestämme im Wasserbad 1 h bei 37 °C inkubiert. Bei der Probenaufbereitung wurden die Fraktionen der sekretierten und intrazellulären Invertase vereinigt. Die Proteinextrakte wurden mittels PAGE unter nichtdenaturierenden Bedingungen aufgetrennt und die Invertase durch Aktivitätsfärbung nachgewiesen. Alle Proben enthielten vergleichbare Mengen zytoplasmatischer Invertase. Stämme: BY4742 (R_{60}^{S}); YCG76 ($\text{MATa } bet1::KanMX4 + pCG27-bet1R$) (R_{60}^{G}); YCG15 ($\text{MATa } sed5::KanMX4 + pCG32-sed5R$) (R_{60}^{S}); YCG9 ($\text{MATa } bos1::KanMX4 + pCG8-bos1R + pUA4-sec22Q$) (R_{60}^{S}); YCG103 ($\text{MATa } sed5::KanMX4 bet1::KanMX4 sec22::LEU2 + pCG163-sed5R + pCG64-bet1R-sec22Q$) (R_{60}^{S}); YCG80 ($\text{MATa } ufe1::KanMX4 + pCG5-ufe1R$) (R_{60}^{S}); $sec22Q$ (Y15177 + pUA4-sec22Q) (R_{60}^{Q}).

3.2.3 Erhöhung der Rotationssymmetrie durch zusätzliches *bet1Q* zeigt nur geringe Auswirkungen auf die Temperatursensitivität

Im Vergleich zum exozytotischen und anderen SNARE-Komplexen in der Hefe ist im ER-Golgi SNARE-Komplex die Rotationssymmetrie in der '0'-Ebene aufgrund des Serins von Bet1p erniedrigt. Zwei der vier erzeugten 2R-Kombinationen in der '0'-Ebene enthalten *BET1*, also ein Serin in der Qc-Position (S_{69}^{R} , $\text{S}_{69}^{\text{RQ}}$). Da beide Mutanten temperatursensitiv sind, sollte untersucht werden, inwieweit sich ein zusätzliches Glutamin in der Qc-Position auf das Wachstum dieser Stämme auswirkt. Hierzu wurden die Stämme YCG74 (S_{69}^{R} ; *sed5R-LEU2*) und YCG9 ($\text{S}_{69}^{\text{RQ}}$; *bos1R-LEU2 + sec22Q-HIS3*) mit einem low-copy Plasmid transformiert, das für *bet1Q* (*URA3*, endogener Promoter) kodiert. Anschließend wurde das Wachstumsverhalten geeigneter Transformanden mittels Tropfentests auf YPD-Agarplatten bei verschiedenen Temperaturen untersucht.

Die zusätzliche Expression von leerem Vektor oder einer weiteren Wildtyp-Kopie von *BET1* hatte keinen positiven Einfluß auf das Wachstum der untersuchten Mutanten bei Temperaturen über 30 °C bzw. 35 °C (Abb. 23). In der *sed5R*-Mutante erhöhte zusätzliches *bet1Q* die Wachstumstemperatur auf 32 °C (Abb. 23 A). Obwohl die zusätzliche Expression von *bet1Q* eine Erhöhung der Rotationssymmetrie in der '0'-Ebene bewirkt, führte sie in *bos1R*-mutanten Hefezellen zu keiner Verbesserung des Wachstums (Abb. 23 B).

Die niedrigere Rotationssymmetrie innerhalb der '0'-Ebene dieser beiden mutanten SNARE-Komplexe beeinflusst das Wachstumsverhalten der entsprechenden Hefezellen nur in geringem Maße.

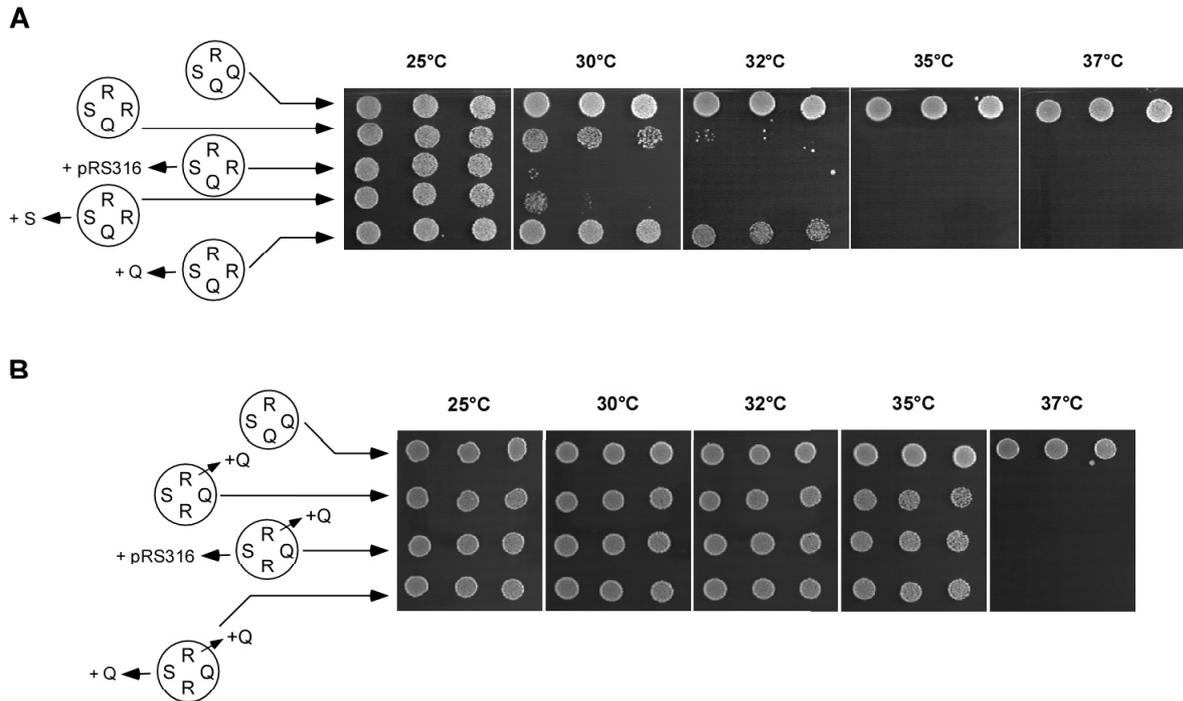


Abb. 23: Die Erhöhung der Rotationssymmetrie in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes durch zusätzliche Expression von *bet1Q* beeinflusst den Wachstumsphänotyp geringfügig. (A) Die Co-Expression von plasmidkodiertem *bet1Q* verbesserte das Wachstum der *sed5R*-Mutante ($\begin{matrix} \text{R} \\ \text{S} \\ \text{Q} \end{matrix} \text{R}$) geringfügig. In diesen *sed5R*-Hefezellen, die zusätzlich *bet1Q* exprimierten, war die Wachstumstemperatur im Vergleich zu nichttransformierten Hefezellen um 2 °C auf 32 °C erhöht. (B) Im Fall der *bos1R*-Mutante ($\begin{matrix} \text{R} \\ \text{S} \\ \text{Q} \end{matrix} \text{R}$) wurde bei nicht-transformierten und transformierten Hefezellen kein Unterschied hinsichtlich der Wachstumstemperatur beobachtet. Die Stämme YCG74 (*sed5::KanMX4 sed5R-LEU2*) und YCG9 (*bos1::KanMX4 pCG8-bos1R (LEU2) + pUA4-sec22Q (HIS3)*) wurden mit dem Plasmid pCG39-*bet1Q(URA3)* transformiert. Parallel dazu wurden beide Stämme mit pCG36-*BET1* oder mit leerem pRS316 transformiert, im mögliche multi-copy Effekte auszuschließen. Für die Tropfentests wurden geeignete Transformanten über Nacht in Selektivmedium angezogen und anschließend auf eine $OD_{600}/ml = 0,1$ verdünnt. Diese Zellsuspensionen wurden weitere vier Mal in einem Verhältnis von 1:2 verdünnt. Je 10 μl der einzelnen Verdünnungen wurden auf YPD-Agarplatten getropft und die Platten 60 h (*sed5R*) bzw. 65 h (*bos1R*) bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. In der Abbildung sind jeweils drei Verdünnungen dargestellt.

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

Im exozytotischen SNARE-Komplex können Defekte, die aus dem Vorhandensein zweier Arginine resultieren, durch Einführung einer komplementären Q-Punktmutation im beteiligten R-SNARE aufgehoben werden (Katz und Brennwald, 2000; Ossig *et al.*, 2000). Obwohl die entsprechenden rotationssymmetrischen R-/Q-Substitutionen nicht für alle drei Q-Positionen in einem genomischen Deletionshintergrund durchgeführt wurden, deuten diese Ergebnisse darauf, dass im exozytotischen SNARE-Komplex alle drei Q-Positionen funktionell äquivalent sind (Katz und Brennwald, 2000; Ossig *et al.*, 2000).

Jedoch finden sich in der Literatur ebenso Hinweise für funktionale Unterschiede der drei Q-Positionen. *In vitro* Studien zeigen, dass in der Qa-Position die Substitution des Glutamins durch eine andere Aminosäure zu Defekten im Disassembly des neuronalen SNARE-Komplexes führt (Scales *et al.*, 2001). Des Weiteren führt im *intra*-Golgi SNARE-Komplex der Bäckerhefe eine R-/Q-Substitution im R-SNARE Ykt6p selbst bei gleichzeitiger komplementärer Q-/R-Substitution im beteiligten Qb-SNARE zu keinen lebensfähigen Zellen (Dilcher *et al.*, 2001). Da Ykt6p ein außergewöhnliches SNARE-Protein ist, stellt diese Beobachtung möglicherweise eine Besonderheit dar (s. auch Kap. 3.4). Darüber hinaus unterstützen die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten 2R:2Q Mutanten (Kap. 3.2) die Vermutung, dass im ER-Golgi SNARE-Komplex die drei Q-Positionen funktionell verschieden sind.

Aufgrund der im exozytotischen SNARE-Komplex gemachten Beobachtungen, sowie der hohen Symmetrie der '0'-Ebene von SNARE-Komplexen allgemein, stellten wir dennoch die Hypothese auf, dass in kognaten SNARE-Komplexen alle Q-Positionen äquivalent sind. Innerhalb eines natürlich vorkommenden SNARE-Komplexes ließe sich dann, bei gleichzeitiger Einhaltung der 1R:3Q Stöchiometrie, das Arginin an jede der drei Q-Positionen verschieben, ohne Verlust der Funktionalität des Komplexes. Dadurch ließen sich insbesondere multifunktionale SNAREs einem bestimmten Transportabschnitt eindeutig zuordnen.

Mittels rotationssymmetrischer R-/Q-Substitutionen sollte die mögliche Äquivalenz der drei Q-Positionen in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes systematisch untersucht werden. Im Unterschied zu Kap. 3.1 dieser Arbeit wurden nun mutante Hefestämme erzeugt, die in Kombination mit *sec22Q* ausschließlich die mutierten Versionen der Gene *BET1*, *BOS1* oder *SED5* exprimieren.

3.3.1 Verlegung des Arginins in die Qc-Position führt zu Hefezellen mit wildtyp-ähnlichem Phänotyp

Die *bet1R*-Mutation supprimiert den Phänotyp der *sec22Q*-Mutante (Kap. 3.1). In diesen Versuchen war *bet1R* zusätzlich zur genomischen Wildtyp-Version von *BET1* in den Hefezellen vorhanden. Dennoch führt die Kombination von *bet1R* mit endogenem Sec22p(R) zu Hefezellen (R^{Qc}) mit einem ausgesprochen milden Phänotyp, obwohl sich hierdurch in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes eine Konstellation ergibt, in der sich zwei Arginine nebeneinander befinden (Kap. 3.2), wenngleich sich im exozytotischen SNARE-Komplex zwei benachbarte Argininseitenketten destabilisierend auf die '0'-Ebene auswirken (Ossig *et al.*, 2000). Die Beobachtungen mit *bet1R* sprechen für ein rezessives Verhalten dieser Mutation und lassen vermuten, dass die erhaltene Suppression von *sec22Q* (Kap. 3.1) auf einem synergetischen Effekt von *bet1R* und genomischem *BET1* beruht.

Um die Äquivalenz der R- und Qc-Positionen zu überprüfen, wurde die Kombination von *bet1R* und *sec22Q* nun in einem Hefestamm untersucht, der beide mutierten Gene von einem Zentromerplasmid exprimiert und zugleich im Genom die Deletionen beider Wildtyp-Allele enthält (R^{Qc}).

In einem diploiden heterozygoten *BET1/bet1Δ*-Deletionsstamm wurde *SEC22* mittels homologer Rekombination durch die *LEU2*-Kassette ersetzt. Hierzu wurde die *LEU2*-Kassette aus dem Vektor pRS315 durch PCR amplifiziert und das erhaltene lineare 2 kb DNA-Produkt, dessen flankierende Bereiche homologe Sequenzen zu 41 bps vor dem ATG in *SEC22* und zu 42 bps nach dem STOP-Kodon enthielten, in den Hefestamm Y21396 (*BET1/bet1::KanMX4*) transformiert. In einem zweiten Transformationsschritt wurden die diploiden Hefezellen mit einem für *BET1*-kodierenden low-copy Plasmid (*URA3*) transformiert. Nach Sporulierung und Tetradenanalyse wurden Zellen mit dem entsprechenden Selektionsmarkern isoliert (YCG7; *URA*⁺, *LEU*⁺, G418⁺). Der Genotyp dieser Hefezellen wurde durch PCR überprüft. Für die rotationssymmetrischen R-/Q-Substitutionen wurde dieser haploide *bet1Δ/sec22Δ*-Stamm mit einem Zentromerplasmid transformiert, welches beide mutierten Gene unter der Kontrolle ihrer endogenen Promotoren enthält. Anschließend wurde mittels 5'-FOA auf Hefezellen selektiert, die ausschließlich *bet1R/sec22Q* exprimieren (R^{Qc} ; Stamm YCG8). Der so erzeugte *bet1R/sec22Q*-Hefestamm (R^{Qc}) wurde in Bezug auf Wachstum und intrazellulärem Transport eingehender charakterisiert.

In Tropfentests auf Agarplatten aus Selektivmedium zeigte die Verschiebung des Arginins von der R- in die Qc-Position keinen Einfluß auf das Wachstumsverhalten der Hefezellen.

bet1R/sec22Q-Hefen (R^{Q}) wuchsen, im Unterschied zu *sec22Q*-Hefezellen, selbst bei einer Temperatur von 37 °C gut (Abb.24 A).

Um die Auswirkungen dieser reziproken Q-/R-Substitution in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes auf den intrazellulären Transport zu untersuchen, wurde zunächst die Reifung des vakuolären Proteins CPY verfolgt. Hierzu wurden pulse-chase Experimente mit [³⁵S] Methionin durchgeführt (Abb. 24 B). In Wildtyp-Hefezellen (R^{R}) liegt die Protease CPY nach einer Inkubationszeit von 30 min. vollständig in der reifen Form vor. In *sec22Q*-Hefezellen (Q^{Q}) jedoch ist, nach einer Chase-Zeit von 30 min, das CPY-Protein nach wie vor in der p1-Form (ER-Form) vorhanden, wie es für einen defekten Transport vom ER zum *cis*-Golgi erwartet wird. Im Unterschied dazu, führte die Kombination der *sec22Q*-Mutation mit der *bet1R*-Punktmutation zu Hefezellen (R^{Q}), in denen die Prozessierung von CPY der in Wildtyp-Hefezellen entsprach (Abb. 24 B, rechts außen). Dies zeigt, dass der anterograde Transport in dieser Mutante normal ist. Hieraus ergibt sich außerdem, dass die in Kap. 3.1 beobachtete Suppressoreigenschaft von *bet1R* nicht auf einem synergetischen Effekt mit *BET1* beruht.

Der retrograde Transport in *bet1R/sec22Q*-Hefezellen (R^{Q}) wurde anhand der Kar2p Sekretion untersucht. Das Versetzen des Arginins in die Qc-Position des ER-Golgi Komplexes führte zu einer deutlichen Reduzierung der Menge an sekretiertem Kar2p. In *bet1R/sec22Q*-Hefezellen (R^{Q}) wurden, ähnlich wie in Wildtyp-Hefezellen (R^{R}), nur sehr geringe Mengen an sekretiertem Kar2p in Westernblots detektiert (Abb. 24 C, links). Um zu überprüfen, ob die schwache Kar2p-Bande eine Folge lysierter Zellen ist, wurden die Präzipitate aus dem Überstand auf Hexokinase getestet. Hexokinase ist ein intrazellulär abundantes Glykolyse-Enzym, das nur durch Zellyse in den extrazellulären Raum gelangt. Da keine Hexokinase detektiert werden konnte (Abb.24 C, rechter Abbildungsteil), sind die geringen Mengen an sekretiertem Kar2p als Folge eines gestörten retrograden Transportes anzusehen.

Im ER-Golgi SNARE-Komplex führt die Verlegung des Arginins an die Qc-Position (R^{Q}) zu Hefezellen mit Wildtyp-ähnlichen Eigenschaften bezüglich Wachstum und Transport. Diese Ergebnisse bestätigen einerseits die Interaktion von *BET1* und *SEC22*, andererseits belegen sie eine funktionelle Äquivalenz der R- und Qc-Position im ER-Golgi SNARE-Komplex.

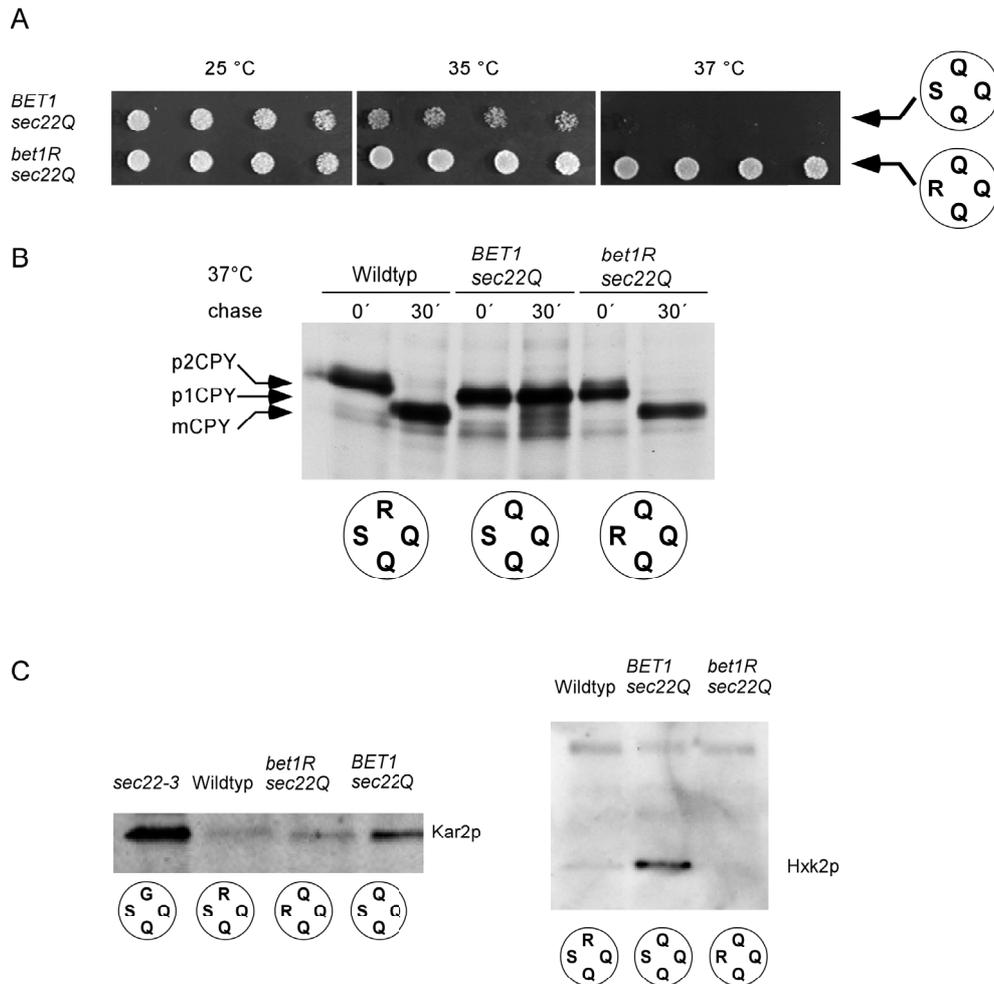


Abb. 24: Wachstum und Transport sind in *bet1R/sec22Q* mutanten Hefezellen normal.

(A) *bet1R/sec22Q*-Hefezellen (S⁺Q⁺) sind nicht temperatursensitiv. Das Wachstum auf SD-his Agarplatten ist abgebildet. (B) Die Prozessierung von CPY ist in *bet1R/sec22Q*-Hefezellen ähnlich wie in Wildtyp-Hefezellen. (C) *bet1R/sec22Q*-Hefezellen sekretieren nur geringe Mengen an Kar2p (links). Aus dem Medium von *bet1R/sec22Q*-Hefezellen konnte keine Hexokinase detektiert werden (rechts). Stämme: BY4742, (S⁺Q⁺); YCG8 (MATa *bet1::KanMX4 sec22::LEU2* + pCG64-*bet1Rsec22Q*) (S⁺Q⁺); *sec22Q* (Y15177 + pUA4-*sec22Q*) (S⁺Q⁺); *sec22-3* (RSY280) (S⁺Q⁺).

3.3.2 Verschiebung des Arginins in die Qb-Position führt zu temperatursensitiven Hefezellen, die Transportdefekte aufweisen

Obwohl die *bos1R*-Mutation den Wachstumsdefekt von *sec22Q*-Hefen nicht supprimieren kann (Kap. 3.1), führt sie in Kombination mit endogenem *SEC22* zu einem drastischen Phänotyp: Diese Hefezellen waren auf das Vorhandensein von *sec22Q* angewiesen um überhaupt lebensfähig zu sein (☉☉; Kap. 3.2).

Um die Frage nach der funktionellen Wertigkeit der drei Q-Positionen innerhalb eines SNARE-Komplexes eingehender zu beantworten, wurden Hefezellen einer 1R:3Q Stöchiometrie charakterisiert, bei der das R an die Qb-Position verlegt ist.

Zur Erzeugung mutanter Hefezellen, in deren ER-Golgi SNARE-Komplex das Arginin die Qb-Position einnimmt, wurden die Stämme YCG9 (*bos1::KanMX4*, pCG8-*bos1R* + pUA4-*sec22Q*) und Y15177 (*sec22::KanMX4*) miteinander gekreuzt. Die erhaltenen diploiden Hefezellen wurden zum Sporulieren gebracht und mittels Tetradenanalyse haploide Zellen des gewünschten Genotyps isoliert.

Das Wachstum von haploiden *bos1R/sec22Q*-Hefezellen (☉☉; Stamm YCG38) wurde bei verschiedenen Temperaturen anhand von Tropfentests auf YPD-Agarplatten untersucht.

Im Unterschied zur Qc-Position (☉☉) führte ein Arginin in der Qb-Position (☉☉) zu mutanten Hefezellen mit ausgeprägtem Wachstumsphänotyp. Die Hefezellen waren temperatursensitiv und wuchsen bei 37 °C nicht mehr (Abb. 25 A). Das Wachstumsverhalten dieser Mutante bestätigt jedoch die in Kap. 3.2 gemachten Beobachtungen, dass ein Arginin in der Qb-Position des ER-Golgi SNARE-Komplexes zu markanten Auswirkungen führt. Selbst bei niedrigeren Temperaturen war das Wachstum der *bos1R/sec22Q*-Mutante (☉☉) schlechter als das von *sec22Q*-Hefezellen (☉☉), also von Hefezellen, die in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes gar kein Arginin enthalten.

Der Effekt eines Arginins in der Qb-Position des ER-Golgi SNARE-Komplexes auf den intrazellulären Transport wurde anhand des Transportes von CPY untersucht. Pulse-chase Experimente zeigten, dass in *bos1R/sec22Q*-Hefezellen (☉☉) die Prozessierung des Proteins CPY nach 30 min teilweise inhibiert war (Abb. 25 B). Lediglich ein Teil der Protease war nach der chase Zeit als reife Form detektierbar, wo hingegen der Großteil in der p1-Form verblieben war. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Transport vom ER zum Golgi in *bos1R/sec22Q*-mutanten Hefezellen (☉☉) massiv gestört ist.

Entgegen unserer ursprünglichen Erwartung weisen die aus der Verlagerung des Arginins an die Qb-Position erhaltenen Daten darauf hin, dass die drei Q-Positionen im ER-Golgi Komplex strukturell verschieden sind.

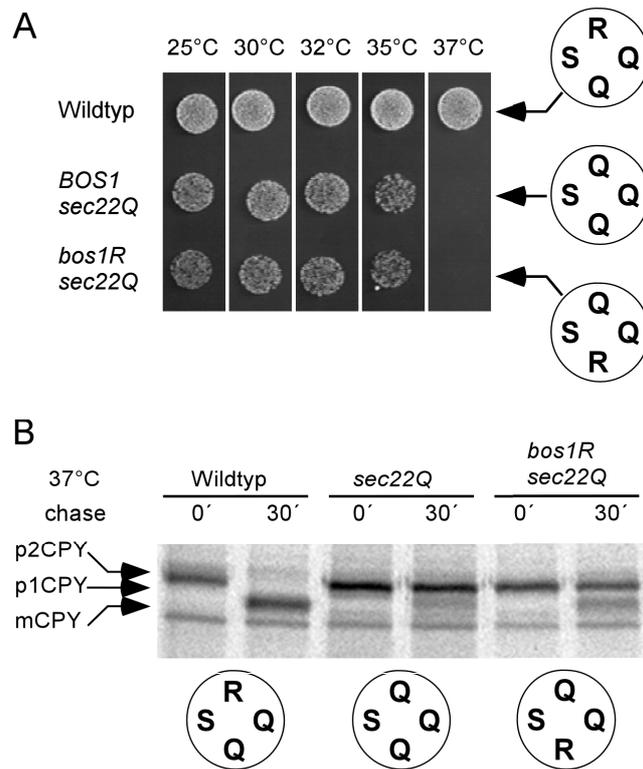


Abb. 25: Die Verschiebung des Arginins in die Qb-Position führt zu mutanten Hefezellen mit Wachstums- und Transportdefekten. (A) *bos1R/sec22Q*-Hefezellen sind temperatursensitiv und wachsen selbst bei niedrigen Temperaturen schlechter als *sec22Q*-Zellen. Die einzelnen Stämme über Nacht in geeignetem Selektivmedium bei 25 °C angezogen und auf eine OD_{600} von 0,1 eingestellt. Diese Ausgangsverdünnung wurde 1:2 fach weiterverdünnt. Es wurden je 10 μ l von jeder Verdünnung auf YPD-Agarplatten aufgetragen. **(B)** Die Prozessierung von CPY wurde bei der restriktiven Temperatur von 37 °C analysiert. Es wurden folgende Stämme verwendet: Wildtyp (BY4742) $\text{S}^{\text{R}}_{\text{Q}}$; *sec22Q* (Y15177 + pUA4-*sec22Q*) $\text{S}^{\text{Q}}_{\text{Q}}$; YCG38 (MAT α *bos1::KanMX4 sec22::KanMX4* + pCG8-*bos1R* + pUA4-*sec22Q*) $\text{S}^{\text{R}}_{\text{Q}}$.

3.3.3 Verlegung des Arginins in die Qa-Position führt zu Hefezellen mit Wachstums- und Transportdefekten

sed5R wurde, neben *bet1R*, als Suppressor der *sec22Q*-Mutante isoliert (Kap. 3.1). Im Gegensatz zu *bet1R* jedoch führt, die Kombination der *sed5R*-Mutation mit einem weiteren Arginin in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes zu Hefezellen mit einem ausgeprägten Wachstums- und Transportphänotyp (Kap. 3.2). Der hierbei beobachtete Phänotyp kann nicht eindeutig einem ER-Golgi Defekt zugeordnet werden, sondern scheint vielmehr durch mehrere Defekte bedingt zu sein. Dies ist erwartet, da *SED5* im ER-Golgi und im *intra*-Golgi SNARE-Komplex beteiligt ist.

Die Charakterisierung von Hefezellen, in denen das Arginin an die Qa-Position des ER-Golgi SNARE-Komplexes verschoben ist ($\textcircled{\text{R}}^{\text{Qa}}$), ermöglicht einerseits die systematische Untersuchung der funktionellen Wertigkeit der drei Q-Positionen am Beispiel des ER-Golgi SNARE-Komplexes. Zum anderen kann anhand dieser mutanten Hefezellen geprüft werden, ob die durch *sed5R* erhaltene Suppression der *sec22Q*-Mutante (Kap. 3.1) auf einem synergetischen Effekt mit *SED5* basiert. Da in der *sed5R/sec22Q*-Mutante ($\textcircled{\text{R}}^{\text{Qa}}$) die normale 1R:3Q Stöchiometrie in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes vorliegt, sollte die Untersuchung dieser Mutante außerdem zu einem eingehenderen Verständnis der beobachteten Effekte bei *sed5R*-Mutanten mit einer 2R:2Q Stöchiometrie im ER-Golgi SNARE-Komplex ($\textcircled{\text{R}}^{\text{R}}$, $\textcircled{\text{R}}^{\text{Q}}$) führen (Kap. 3.2).

sed5R/sec22Q-mutante Hefezellen ($\textcircled{\text{R}}^{\text{Qa}}$) wurden analog zu *bet1R/sec22Q*-Hefezellen erzeugt. Zuerst wurde in dem diploiden heterozygoten Deletionsstamm Y21581 (*SED5/sed5::KanMX4*) *SEC22* durch die *LEU2*-Kassette ersetzt und die diploiden Hefezellen mit einem *SED5*-Zentromerplasmid (*URA3*) transformiert. Zur Einführung der rotationssymmetrischen R-/Q-Substitutionen wurden die durch Tetradenanalyse erhaltenen haploiden Zellen des gewünschten Genotyps mit einem low-copy Plasmid transformiert, das *sed5R* und *sec22Q* jeweils unter der Kontrolle ihrer endogenen Promotoren enthält. Anschließend wurde mittels 5'-FOA auf Hefezellen selektiert, die ausschließlich *sed5R/sec22Q* exprimieren ($\textcircled{\text{R}}^{\text{Qa}}$; Stamm YCG3). Diese Hefezellen wurden eingehender charakterisiert.

Die Verschiebung des Arginins an die Qa-Position des ER-Golgi SNARE-Komplexes führte zu Hefezellen mit einem Wachstumsdefekt (Abb. 26 A). In Tropfentests wuchsen *sed5R/sec22Q*-Hefezellen ($\textcircled{\text{R}}^{\text{Qa}}$) auf YPD-Agarplatten nur bis zu einer Temperatur von 32 °C. Wider Erwarten ist diese Mutante damit stärker temperatursensitiv als *sec22Q*-Hefezellen ($\textcircled{\text{R}}^{\text{Q}}$), die gar kein Arginin in der '0'-Ebene enthalten. Dennoch führte die Wiederherstellung

der normalen Stöchiometrie in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes in der *sed5R/sec22Q*-Mutante (R^2Q^2) zu einer Verbesserung des Wachstums im Vergleich zu *sed5R*-mutanten Hefezellen mit einer 2R:2Q Stöchiometrie (R^2R^2 , R^2Q^2 ; siehe Kap. 3.2). Der beobachtete Wachstumsdefekt von *sed5R/sec22Q*-Hefezellen (R^2Q^2) basiert auf der Störung des zweiten Sed5p-enthaltenden SNARE-Komplexes. Hierauf wird im nachfolgenden Kapitel ausführlich eingegangen (Kap. 3.4).

Der anterograde Transport in *sed5R/sec22Q*-Hefezellen (R^2Q^2) wurde anhand der CPY-Prozessierung untersucht. In *sec22Δ*-Hefezellen (R^2R^2) liegt bei 30 °C und 32 °C das meiste CPY in der reifen Form vor, der Transport zur Vakuole ist verlangsamt (Abb. 26 B; Mitte im oberen Panel). Selbst bei 37 °C konnte in diesen Hefezellen ein Teil von CPY in der reifen Form detektiert werden. Im Unterschied hierzu akkumulierte CPY in *sed5R/sec22Q*-Hefezellen (R^2Q^2), bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C und einer chase-Dauer von 30 min, vorwiegend in der p2-Form (Abb. 26 B; rechts). Zusätzlich war auch eine beachtliche Menge des Proteins in der p1-Form vorhanden und nur ein geringer Teil in die reife Form umgewandelt worden. Bei 32 °C und 37 °C hingegen war hauptsächlich die p1-Form und nur in sehr geringen Mengen die p2-Form zu sehen. Diese Ergebnisse zeigen, dass in *sed5R/sec22Q*-Hefezellen (R^2Q^2) der *intra*-Golgi Transport defekt ist.

Um die Auswirkungen eines im ER-Golgi SNARE-Komplex an die Qa-Position verschobenen Arginins (R^2Q^2) auf den retrograden Transport zurück zum ER zu analysieren wurde die Sekretion des löslichen ER-Proteins Kar2p untersucht (Abb. 26 C). Wie *sec22-3* und *sec22Q*-Hefezellen (Lewis *et al.*, 1997; Semenza *et al.*, 1990) (Kap. 3.1) sekretieren auch *sec22Δ*-Hefezellen (R^2R^2) das lösliche Protein Kar2p bei permissiver Temperatur. *sed5R/sec22Q*-Hefezellen (R^2Q^2) sekretieren ebenfalls Kar2p (Abb. 26 C), obwohl durch die reziproken R/Q-Substitutionen eine normale 1R:3Q Stöchiometrie in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes wiederhergestellt ist. Aufgrund der *sec22Q*-Mutation jedoch, enthält der SNARE-Komplex des retrograden Transportes zurück zum ER kein Arginin in der '0'-Ebene und könnte den beobachteten Defekt bedingen. Da die *sed5R*-Mutation gleichzeitig zu einem *intra*-Golgi SNARE-Komplex mit zwei Argininen führt, könnte es sich bei dem Sekretionsdefekt der *sed5R/sec22Q*-Hefezellen (R^2Q^2) auch um einen komplexeren Effekt handeln, der aus einer Kombination eines defekten retrograden Golgi-ER Transportes (*sec22Q*) und eines defekten *intra*-Golgi Transportes (*sed5R*) resultiert.

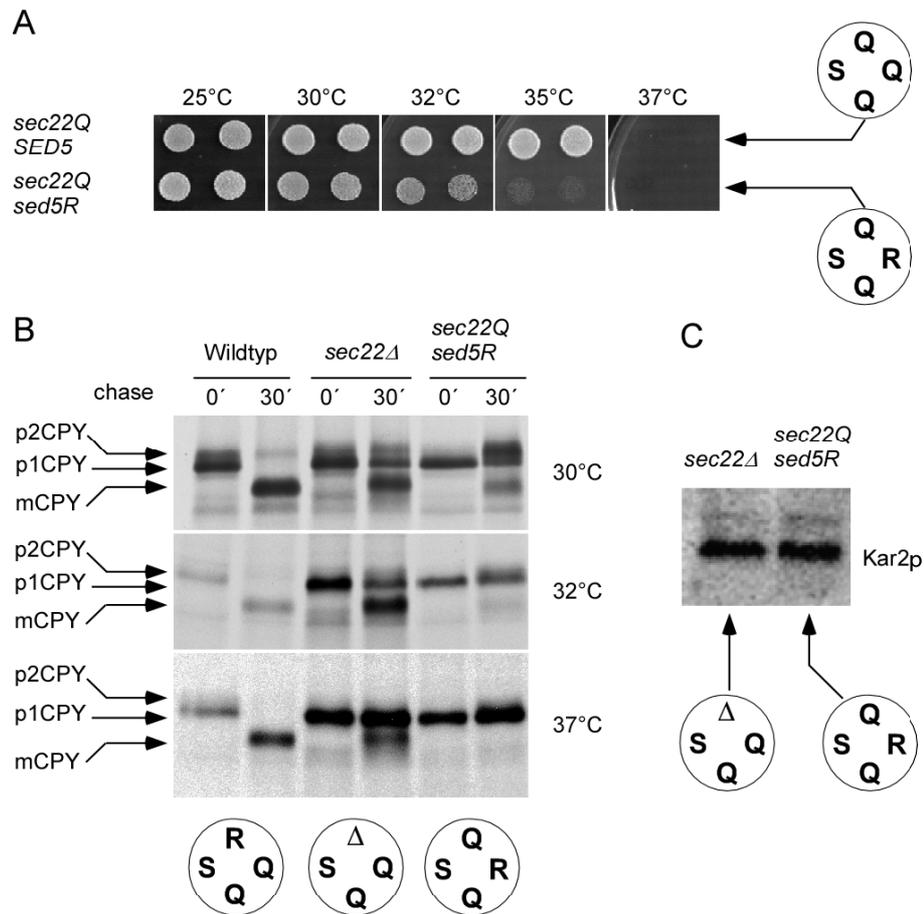


Abb. 26: *sed5R/sec22Q* Hefezellen zeigen Wachstums- und Transportdefekte. (A) *sed5R/sec22Q*-Hefezellen (S Q Q) sind temperatursensitiv. Die verwendeten Hefestämme wurden über Nacht bei 25 °C in geeignetem Selektivmedium angezogen und auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt. Diese Ausgangsverdünnung wurde 1:2 fach weiterverdünnt. Je 10 µl von jeder Verdünnung wurden auf YPD-Agarplatten aufgetragen. (B) In *sed5R/sec22Q*-Hefezellen (S Q R) akkumuliert CPY bei 30 °C vorwiegend in der p2-(Golgi) Form, bei höheren Temperaturen überwiegend in der p1-Form. (C) *sed5R/sec22Q*-Hefezellen (S Q R) sekretieren Kar2p. In Selektivmedium gewachsene über Nacht Kulturen wurden in frischem YPD-Medium verdünnt und bei 25 °C bis zu einer OD₆₀₀=1 angezogen. Durch Zentrifugation wurden Zellen und Medium getrennt und die sekretierten Proteine aus dem Medium durch Zugabe von eiskaltem Aceton gefällt. Polyklonales anti-Kar2p Antiserum wurde zur Immunoblot-Analyse verwendet. Stämme: BY4742, (S Q R); YCG3 (MATα *sed5::KanMX4 sec22::LEU2* + pCG62-*sed5R/sec22Q*) (S Q R); *sec22Δ* (Y15177) (S Q Δ).

Als alternative Methode um den retrograden Transport zum ER zu untersuchen wurde die Lokalisation von Emp47p in Wildtyp- und *sed5R/sec22Q*-Hefezellen (S Q R) verglichen.

Emp47p ist ein Transmembranprotein mit einem C-terminalen Dilysin-Motif, das zwischen dem ER und Golgi zirkuliert. In Wildtyp-Zellen ist es im *cis*-Golgi lokalisiert. Bei einer Störung des Transportes vom ER zum Golgi akkumuliert Emp47p im ER. Ist dagegen der retrograde Transport gestört wird Emp47p langsam zur Vakuole fehlsortiert (Schröder *et al.*, 1995).

Die Lokalisation von Emp47p wurde bei permissiver Temperatur (25 °C) untersucht (Abb. 27). In Wildtyp-Hefezellen (♁♂) wurden durch die immunozytochemische Anfärbung von Emp47p punktförmige Strukturen markiert, die der Golgi-Struktur in der Bäckerhefe entsprechen (Franzussoff *et al.*, 1991; Redding *et al.*, 1991). In *sed5R/sec22Q*-Hefezellen (♁♂) sind diese punktförmigen Strukturen gar nicht zu sehen oder deutlich schwächer ausgeprägt (Abb. 27). Wir führen dies auf einen Abbau des Proteins und einen verlangsamten Transport des Proteins zur Vakuole zurück. Da die Immunfluoreszenz an *sed5R/sec22Q*-Hefezellen (♁♂) durchgeführt wurde, die nicht proteasedefizient sind, wurde erwartungsgemäß kein Emp47p in der Vakuole detektiert.

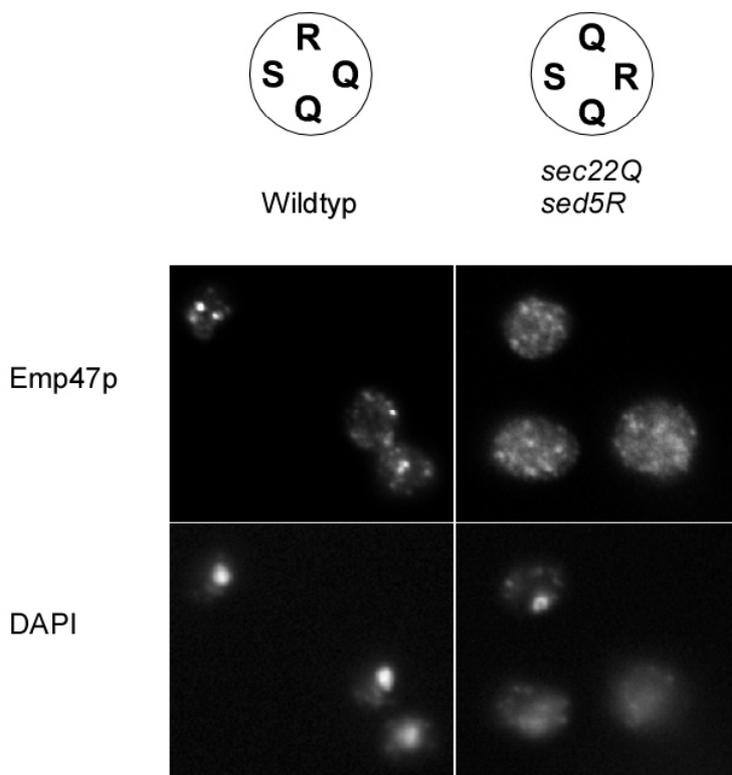


Abb. 27: Lokalisation von Emp47p in *sed5R/sec22Q*-Hefezellen. Die Immunoanfärbung von Emp47p zeigte in *sed5R/sec22Q*-Zellen (♁♂), im Unterschied zu Wildtyp-Zellen keine punktförmige Färbung, die in Hefetypischerweise bei einer Golgi-Lokalisation erhalten wird. Verwendete Hefestämme: BY4742, ♁♂; YCG3 ($MAT\alpha$ *sed5::KanMX4 sec22::LEU2* + pCG62-*sed5R / sec22Q*) (♁♂).

Sed5p ist in zwei SNARE-Komplexen beteiligt: dem ER-Golgi und einem *intra*-Golgi SNARE-Komplex (Parlati *et al.*, 2002; Sacher *et al.*, 1997; Tsui *et al.*, 2001). In *sed5R/sec22Q*-Hefezellen ist durch die beiden komplementären Punktmutationen das normale 1R:3Q Verhältnis in der '0'-Ebene des ER-Golgi Komplexes wiederhergestellt, das Arginin jedoch an die Qa-Position verschoben. Gleichzeitig liegt aufgrund der *sed5R*-Mutation im *intra*-Golgi SNARE-Komplex eine 2R-Stöchiometrie vor. Insbesondere die Ergebnisse der pulse-chase Experimente weisen darauf, dass der Phänotyp der *sed5R/sec22Q*-Mutante (♁♂) vorwiegend auf einem Transportdefekt innerhalb des Golgi-Apparates basiert (s. Abb. 26 B). Daher scheint es nahe liegend, die beobachteten Wachstums- und Transportdefekte einem

nichtfunktionalen *intra*-Golgi SNARE-Komplex zuzuordnen, wo hingegen der ER-Golgi Transport normal ist. Um dies genauer zu überprüfen, wurde untersucht, ob eine kompensatorische Glutamin-Substitution in Ykt6p, dem R-SNARE und Sed5p-Partner des *intra*-Golgi SNARE-Komplexes, die beobachteten Defekte supprimieren kann. Die Ergebnisse sind im nachfolgenden Kapitel 3.4 dargestellt.

3.4 Ykt6p – ein Interaktionspartner von Sed5p

Sowohl im ER-Golgi SNARE-Komplex, als auch im exozytotischen SNARE-Komplex führte eine 2R:2Q Stöchiometrie, in der eines der beiden Arginine in der Qa-Position enthalten ist, zu Hefezellen mit einem ausgeprägten Wachstumsphänotyp. Die Einführung einer komplementären Q-Substitution in der '0'-Ebene des Synaptobrevin-Homologen führte im Falle des ER-Golgi SNARE-Komplex zu einer deutlichen Milderung des Phänotyps (Kap. 3.3.3) und im exozytotischen Komplex zu wildtyp-ähnlichem Verhalten (Ossig *et al.*, 2000). Da *SED5* sowohl im ER-Golgi, als auch in einem *intra*-Golgi SNARE-Komplex involviert ist, stellte sich die Frage, ob diese Beobachtung auch auf den zweiten SNARE-Komplex, an dem Sed5p beteiligt ist, zutrifft. Um diese Frage zu beantworten wurden die Hefestämme YCG15 ($\text{S}_{\text{ER}}^{\text{R}}$; *sed5::KanMX4* pCG32-*sed5R*), YCG103 ($\text{R}_{\text{ER}}^{\text{Q}}$; *sec22::LEU2* *sed5::KanMX4* *bet1::KanMX4* pCG163-*sed5R* pCG64-*sec22Q*-*bet1R*) und YCG3 ($\text{S}_{\text{ER}}^{\text{R}}$; *sec22::LEU2* *sed5::KanMX4* pCG62-*sec22Q*-*sed5R*) mit Zentromerplasmiden transformiert, die *ykt6R165Q* (im Folgenden mit *ykt6Q* bezeichnet) unter der Kontrolle des endogenen Promoters enthalten.

3.4.1 Die zusätzliche Expression von *ykt6Q* verbessert das Wachstum von Hefezellen, die *sed5R* als alleinige Version von *SED5* exprimieren

Sed5p interagiert mit Ykt6p in einem *intra*-Golgi SNARE-Komplex (Dilcher *et al.*, 2001; McNew *et al.*, 1997). Daher sollte in *sed5R*-enthaltenden Hefezellen ($\text{S}_{\text{ER}}^{\text{R}}$, $\text{R}_{\text{ER}}^{\text{Q}}$, $\text{S}_{\text{ER}}^{\text{R}}$) eine zusätzliche Expression von *ykt6Q* die normale 1R:3Q Stöchiometrie in diesem Komplex wiederherstellen, jedoch keinen Einfluß auf den ER-Golgi SNARE-Komplex ausüben.

Anhand von Tropfentests wurde das Wachstum der einzelnen *sed5R*-Hefestämme, die zusätzlich plasmidkodiertes *ykt6Q* exprimieren, auf YPD-Agarplatten bei verschiedenen Temperaturen untersucht (Abb. 28).

Beide *sed5R*-Hefestämme mit zwei Argininen in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes ($\text{S}_{\text{ER}}^{\text{R}}$, $\text{R}_{\text{ER}}^{\text{Q}}$), enthalten jeweils einen weiteren defekten SNARE-Komplex (*intra*-Golgi) mit einer 2R:2Q Stöchiometrie. Die zusätzliche Expression von *ykt6Q* führte in beiden Mutanten zu einer deutlichen Verbesserung des Wachstums (Abb. 28 A und B). Im Unterschied zu *sed5R*-Hefezellen ($\text{S}_{\text{ER}}^{\text{R}}$, $\text{R}_{\text{ER}}^{\text{Q}}$), die entweder mit leerem Vektor oder einem für *YKT6* kodierenden Plasmid transformiert worden waren, wuchsen beide *sed5R*-Hefestämme ($\text{S}_{\text{ER}}^{\text{R}}$, $\text{R}_{\text{ER}}^{\text{Q}}$) die *ykt6Q* exprimierten bis zu einer Temperatur von 35 °C. Der trotz der Expression von *ykt6Q* beobachtete Wachstumsdefekt bei Temperaturen über 35 °C läßt sich darauf zurückführen, dass sich die Co-Expression von *ykt6Q* nur auf den *intra*-Golgi SNARE-

Komplex auswirkt, nicht auf den ER-Golgi Komplex. In *sed5R/sec22Q*-Hefezellen ($\textcircled{\text{SR}}$) führte die Co-Expression von *ykt6Q* zu einem wildtyp-ähnlichen Wachstumsphänotyp. Diese Zellen zeigten bei 37 °C normales Wachstum (Abb. 28 C). Das Arginin ist in diesen Hefezellen zwar an die Qa-Position des ER-Golgi SNARE-Komplexes verschoben, die normale Stöchiometrie innerhalb der '0'-Ebene jedoch erhalten. Hingegen enthält die '0'-Ebene des zweiten Sed5p-enthaltenden SNARE-Komplexes aufgrund der *sed5R*-Mutation zwei Arginine. Durch das zusätzliche *ykt6Q* ist nun auch im *intra*-Golgi SNARE-Komplex das normale Verhältnis in der '0'-Ebene wiederhergestellt, wodurch kein Wachstumsdefekt mehr auftritt.

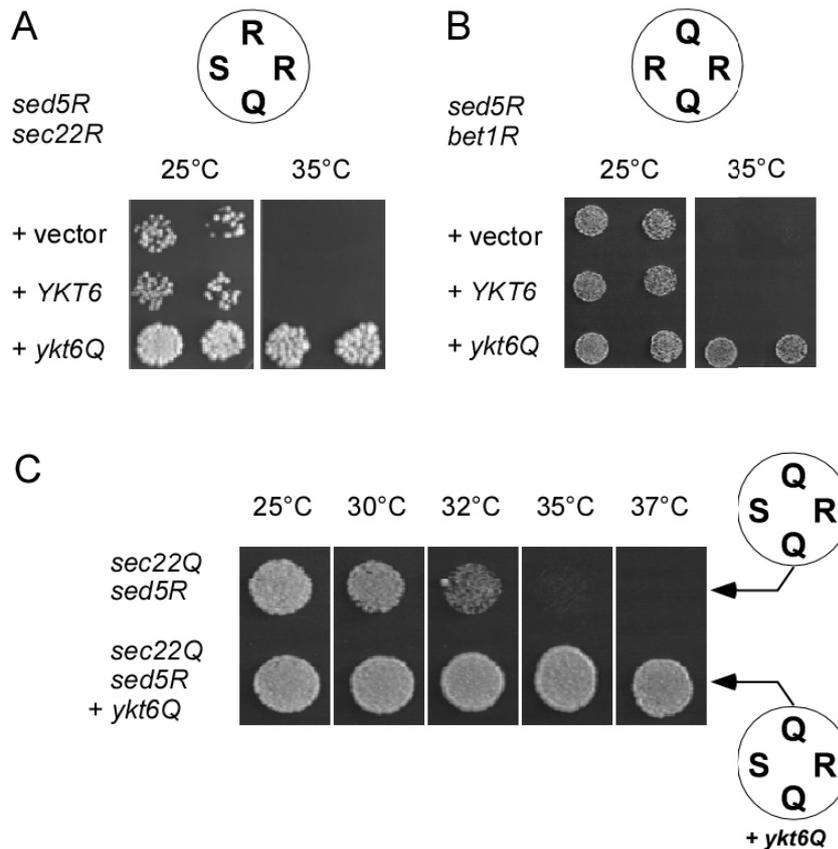


Abb. 28: Zusätzliche Expression von plasmid-kodiertem *ykt6Q* verbessert das Wachstum von *sed5R*-Hefezellen. (A) und (B) Die Co-Expression von *ykt6Q* verbessert das Wachstum von *sed5R*-Hefezellen ($\textcircled{\text{SR}}$, $\textcircled{\text{QR}}$), die zwei Arginine in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes enthalten. Die Expression von *YKT6* oder leerem Vektor hingegen konnte den Wachstumsdefekt der *sed5R*-Hefezellen nicht mildern. (C) Co-Expression von *ykt6Q* supprimiert den Wachstumsdefekt von *sed5R/sec22Q*-Hefezellen ($\textcircled{\text{SR}}$). Das Wachstum dieser Hefezellen ist vergleichbar mit Wildtyp-Hefezellen. Verwendete Stämme: YCG15 (MAT α *sed5::KanMX4* + pCG32-*sed5R*) $\textcircled{\text{SR}}$; YCG103 (MAT α *sed5::KanMX4 bet1::KanMX4 sec22::KanMX4* + pCG163-*sed5R* + pCG64-*bet1R-sec22Q*) $\textcircled{\text{QR}}$; YCG3 (MAT α *sed5::KanMX4 sec22::KanMX4* + pCG62-*sed5R/sec22Q*) $\textcircled{\text{SR}}$; YCG3 + pCG60-*ykt6Q* (MAT α *sed5::KanMX4 sec22::KanMX4* + pCG62-*sed5R/sec22Q*) $\textcircled{\text{SR}}$.

3.4.2 Zusätzliches *ykt6Q* beeinflusst den Transport von CPY in den einzelnen *sed5R*-Mutanten unterschiedlich

Obwohl die Co-Expression von *ykt6Q* in allen drei untersuchten *sed5R*-Mutanten (S_{68}^{R} , R_{68}^{Q} , S_{68}^{Q}) zur Verbesserung des Zellwachstums führte, sollten sich in Bezug auf den intrazellulären Transport unterschiedliche Phänotypen ergeben, je nachdem welche Stöchiometrie innerhalb des ER-Golgi SNARE-Komplexes vorliegt.

Um diese Annahme zu überprüfen wurde der anterograde Transport in den Hefemutanten anhand der CPY-Prozessierung untersucht.

Entsprechend unseren Erwartungen, zeigten beide *sed5R*-Mutanten (S_{68}^{R} , R_{68}^{Q}), die in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes zwei Arginine enthalten, auch bei Expression von *ykt6Q* eine Blockierung des anterograden ER-Golgi Transportes (Abb. 29 A). Ebenso wie in *sec22-3* Hefezellen (S_{68}^{Q}), akkumulierte in den Hefestämmen (S_{68}^{R} , R_{68}^{Q}), die zwei Arginine in der Qa- und R- bzw. in der Qa- und Qc-Position des ER-Golgi SNARE-Komplexes enthalten, CPY in der p1-Form (ER-Form), was auf einen zwischen dem ER und dem Golgi blockierten Transport zurückzuführen ist. Auch bei gleichzeitiger Expression von *ykt6Q* war das CPY-Protein in beiden *sed5R*-Hefestämmen (S_{68}^{R} , R_{68}^{Q}) ausschließlich in der p1-Form nachweisbar. Obwohl *ykt6Q* das Wachstum in diesen beiden Mutanten verbesserte (Kap. 3.4.1), war der intrazelluläre Transport zwischen ER und Golgi weiterhin gestört. Diese Beobachtungen stimmen mit unserer Annahme überein, daß *ykt6Q* sich nur auf eine Störung im *intra*-Golgi SNARE-Komplex positiv auswirkt, einen defekten ER-Golgi SNARE-Komplex jedoch unberührt läßt.

In *sed5R/sec22Q*-Hefezellen (S_{68}^{Q}) akkumulierte die Protease CPY bei 30 °C vorwiegend in der p2-Form, was auf einen Defekt im Golgi-Transport schließen läßt. Wurde die Prozessierung bei höheren Temperaturen untersucht, war CPY hauptsächlich in der p1-Form nachweisbar (Abb. 29 B und Kap. 3.3). Die Co-Expression von *ykt6Q* führte in diesen Hefezellen (S_{68}^{Q}) bei allen Temperaturen zu einer Verbesserung des Transportes von CPY. Bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C war nach 30 min. das CPY-Protein fast ausschließlich in der vakuolären Form zu sehen (Abb. 29 B; unteres Paneel rechts). Bei 32 °C und 30 °C konnten auch die p1- und p2-Form detektiert werden, doch lag der Großteil des Proteins in der reifen Form vor (Abb. 29 B; mittleres und oberes Paneel). Diese Ergebnisse belegen, daß in *sed5R/sec22Q*-Hefezellen (S_{68}^{Q}) der *intra*-Golgi Transport gestört ist und dieser Transportdefekt durch *ykt6Q* aufgehoben werden kann.

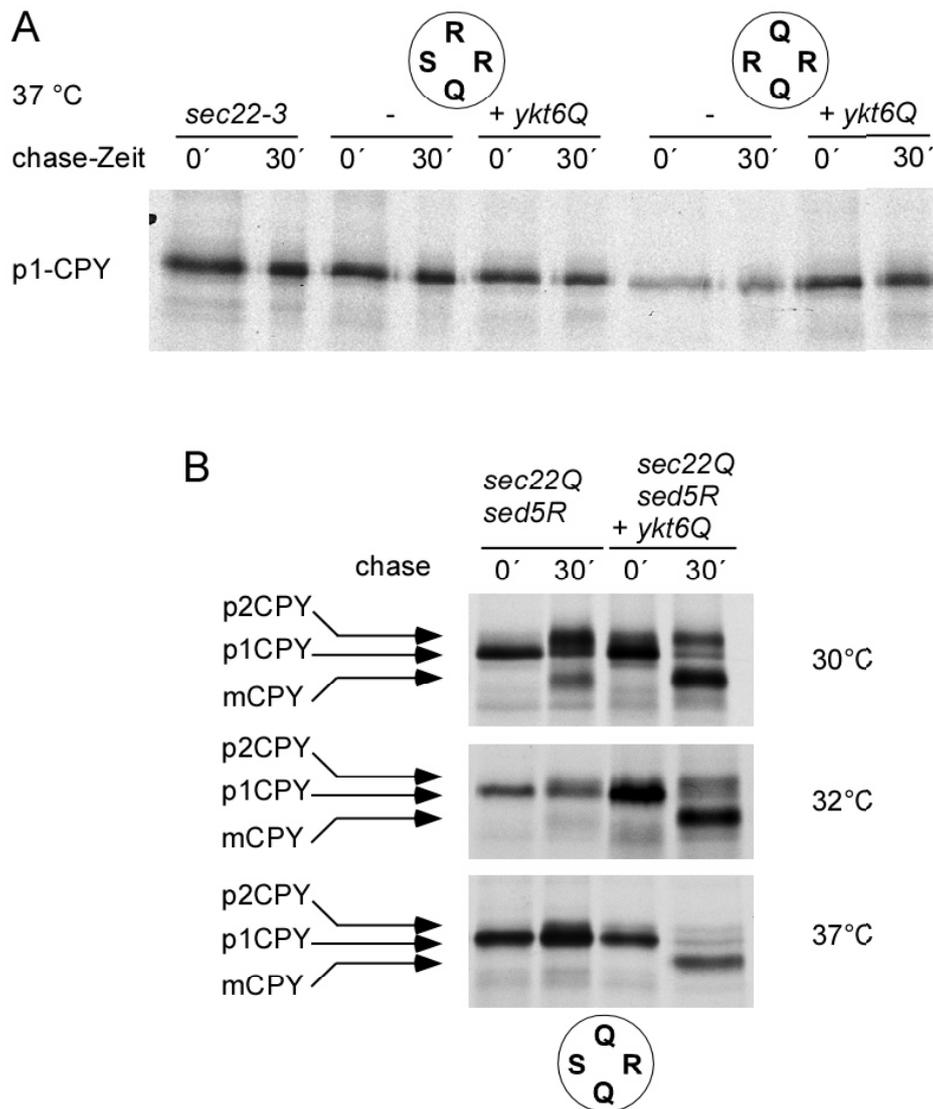


Abb. 29: Transport von CPY (Carboxypeptidase Y) in *sed5R*-Hefezellen, die *ykt6Q* coexprimieren. (A) *sed5R*-Hefezellen mit zwei Argininen in der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes (\textcircled{S} , \textcircled{R}) zeigen eine Blockierung des ER-Golgi Transportes von CPY, der auch durch zusätzliche Expression von *ykt6Q* nicht aufgehoben wird. (B) In *sed5R/sec22Q*-Hefezellen (\textcircled{S}) hebt die zusätzliche Expression von plasmidkodiertem *ykt6Q* den Transportdefekt auf. Die Prozessierung von CPY bei der restriktiven Temperatur von 37 °C (bzw. bei 30 °C und 32 °C) wurde in folgenden Hefestämmen analysiert: *sec22-3* (\textcircled{S}); YCG15 ($\text{MAT}\alpha$ *sed5::KanMX4* + pCG32-*sed5R*) (\textcircled{S}); YCG103 ($\text{MAT}\alpha$ *sed5::KanMX4 bet1::KanMX4 sec22::LEU2* + pCG163-*sed5R* + pCG64-*bet1R-sec22Q*) (\textcircled{S}); YCG3 ($\text{MAT}\alpha$ *sed5::KanMX4 sec22::LEU2* + pCG62-*sed5R/sec22Q*) (\textcircled{S}); YCG3 + pCG60-*ykt6Q* ($\text{MAT}\alpha$ *sed5::KanMX4 sec22::LEU2* + pCG62-*sed5R/sec22Q*) (\textcircled{S}).

3.4.3 Die Zellmorphologie von *sed5R*-mutanten Hefezellen wird durch die zusätzliche Expression von *ykt6Q* deutlich beeinflusst

Sed5p wurde in zwei SNARE-Komplexen isoliert (Parlati *et al.*, 2002; Sacher *et al.*, 1997; Tsui *et al.*, 2001). Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *sed5R*-Mutanten zeigen ebenfalls eine Funktion von Sed5p in zwei unterschiedlichen SNARE-Komplexen an (Kap. 3.2 und 3.3.3). *sed5R/SEC22(R)*-Hefezellen (Ⓢ) enthalten zwei SNARE-Komplexe, in denen jeweils zwei Arginine in der R- und Qa-Position benachbart vorliegen. Die Ergebnisse der Tropfentests und pulse-chase Experimente lassen darauf schließen (Abbildungen 28 A/B und 29 A und Kap. 3.2), dass die zusätzliche Expression von *ykt6Q* die defekte Stöchiometrie des *intra*-Golgi Komplexes repariert und keinen Einfluß auf den ER-Golgi Komplex hat. In *sed5R/sec22Q*-Hefezellen (Ⓢ) ist durch die beiden komplementären Punktmutationen ein normales 1R:3Q Verhältnis in der '0'-Ebene des ER-Golgi Komplexes wiederhergestellt, das Arginin jedoch an die Qa-Position verschoben. Gleichzeitig liegt in diesen Hefezellen, aufgrund der *sed5R*-Mutation, eine 2R-Stöchiometrie im *intra*-Golgi SNARE-Komplex vor. Die Ergebnisse der pulse-chase Experimente weisen darauf (Kap. 3.3.3; Abb. 26 B), dass der Phänotyp der *sed5R/sec22Q*-Mutante (Ⓢ) vorwiegend auf einem Transportdefekt innerhalb des Golgi-Apparates basiert und durch Co-Expression von *ykt6Q* aufgehoben werden kann (s. Abb. 29 B).

Um eingehender zu bestätigen, dass Sed5p tatsächlich an zwei verschiedenen Transportabschnitten beteiligt ist, in welchen es einmal mit Sec22p und das andere mal mit Ykt6p interagiert, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen verschiedener *sed5R*-Mutanten durchgeführt. Die untersuchten Hefestämme (Ⓢ, Ⓢ) exprimierten die *sed5R*-Mutation als einzige Version von *SED5*.

Damit die intrazellulären strukturellen Veränderungen der einzelnen *sed5R*-Mutanten in der elektronenmikroskopischen Untersuchung deutlicher hervortreten, wurden die Hefezellen vor der Fixierung eine Stunde bei restriktiver Temperatur inkubiert.

In *sed5R/SEC22(R)*-Hefezellen (Ⓢ) waren eine Vielzahl fragmentierter Vakuolen und eine Akkumulation intrazellulärer Membranen sichtbar (Abb. 30 A). Dieses Erscheinungsbild erinnert an elektronenmikroskopische Aufnahmen von Hefezellen in welchen *SED5* überexprimiert ist (Hardwick und Pelham, 1992). War hingegen *ykt6Q* vorhanden, zeigte sich ein deutlich anderes Erscheinungsbild. Nun waren sehr viele intrazelluläre Membraneinstülpungen zu erkennen. (Abb. 30 B). Diese Einstülpungen gleichen proliferierten ER-Membranen, wie sie auch in Zellen, in denen die Expression von *SED5*

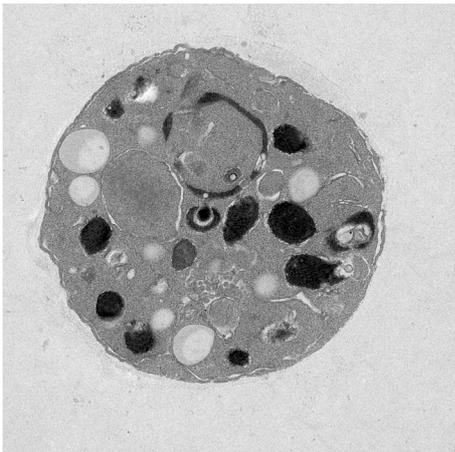
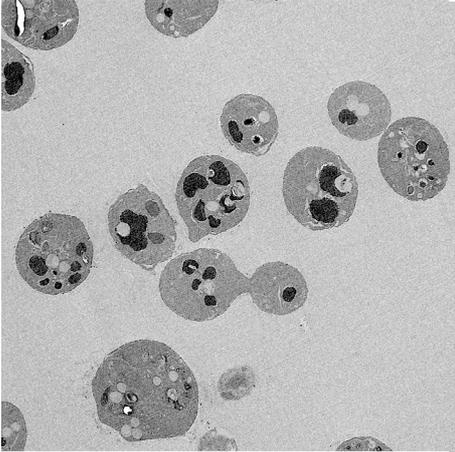
abgeschaltet ist, beobachtet wurden (Hardwick und Pelham, 1992). Fragmentierte Vakuolen waren nicht mehr zu sehen.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *sed5R/sec22Q*-Zellen ($\text{\textcircled{SR}}$) zeigten eine starke Akkumulation fragmentierter Vakuolen und intrazellulärer Membranstrukturen, die an Golgi-Cisternen von Säugerzellen erinnern (Abb. 30 C). Im Unterschied zu *sed5R*-Hefezellen ($\text{\textcircled{SR}}$), die sowohl im ER-Golgi, als auch im *intra*-Golgi SNARE-Komplex jeweils zwei Arginine in der '0'-Ebene enthalten, waren in der *sed5R/sec22Q*-Doppelmutante ($\text{\textcircled{SR}}$) keine länglichen, an proliferiertes ER erinnernde Membraneinstülpungen zu sehen. Dies weist darauf, dass in diesen mutanten Hefezellen kein ausgeprägter Defekt im Transportabschnitt vom ER zum Golgi vorliegt. Bei Co-Expression von *ykt6Q* waren in *sed5R/sec22Q*-Zellen ($\text{\textcircled{SR}}$) weder fragmentierte Vakuolen, noch akkumulierte Membranstrukturen erkennbar (Abb. 30 D). Die Zellen waren morphologisch vergleichbar mit Wildtyp-Hefezellen.

Zusammen mit den Ergebnissen der pulse-chase Experimente belegen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der *sed5R/sec22Q*-Mutante ($\text{\textcircled{SR}}$), dass der Phänotyp dieser Hefezellen auf einer Störung in einem späteren Bereich des sekretorischen Weges beruht, sehr wahrscheinlich auf der Stufe des Golgi-Apparates.

Abb. 30 (s. nächste Seite): Morphologie von Hefemutanten, die *sed5R* enthalten. (A) und (B) *sed5R*-Hefezellen ($\text{\textcircled{SR}}$), die zwei Arginine in der R- und Qa-Position der '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes enthalten. (A) Die Kombination von *sed5R* mit *SEC22(R)* führt zu einer Vielzahl fragmentierter Vakuolen, sowie zu einer Akkumulation intrazellulärer Membranen (B) In diesen Zellen wurde *ykt6Q* zusätzlich exprimiert. Hier sind intrazelluläre Membranen, die an proliferiertes ER erinnern stark akkumuliert. (C) und (D) *sed5R/sec22Q*-Hefezellen ($\text{\textcircled{SR}}$). (C) In *sed5R/sec22Q*-Hefezellen ist das Arginin im ER-Golgi SNARE-Komplex an die Qa-Position verschoben. Diese Hefezellen zeigen eine Vielzahl fragmentierter Vakuolen und intrazelluläre Membranstrukturen, die an Golgi-Strukturen in Säugerzellen erinnern. (D) Die zusätzliche Expression von *ykt6Q* führte zu einer wildtyp-ähnlichen Morphologie. Linke Spalte: Übersichtsbild, Maßstabsbalken: 4000 nm. Rechte Spalte: Vergrößerte Darstellung jeweils einer Hefezelle, Maßstabsbalken: 1000 nm. Die Stämme YCG15 ($\text{\textcircled{SR}}$; *sed5::KanMX4 pCG32-sed5R*) und YCG3 ($\text{\textcircled{SR}}$; *sed5::KanMX4 sec22::LEU2 pCG62-sed5R-sec22Q*) wurden über Nacht bei 25 °C in YPD-Flüssigmedium vermehrt und vor der Fixierung 1 h bei 30 °C (YCG15) bzw. 37 °C (YCG3) inkubiert (s. Kap. 2.6.5 Material und Methoden).

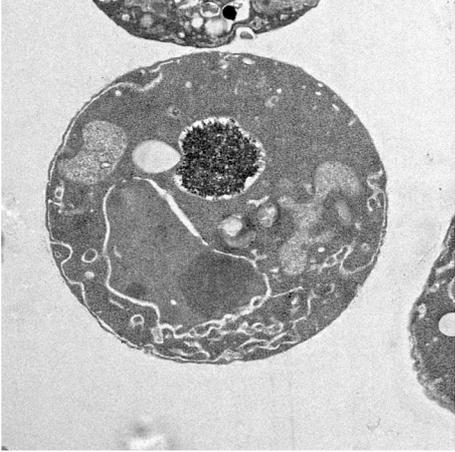
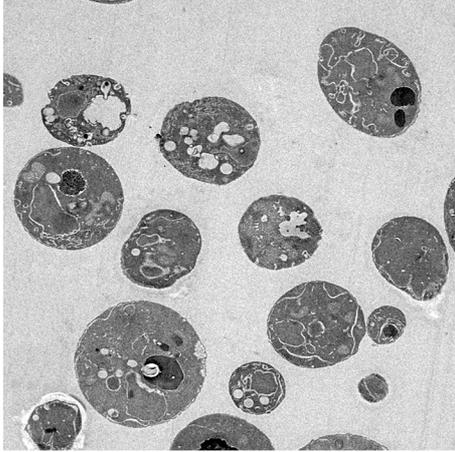
A



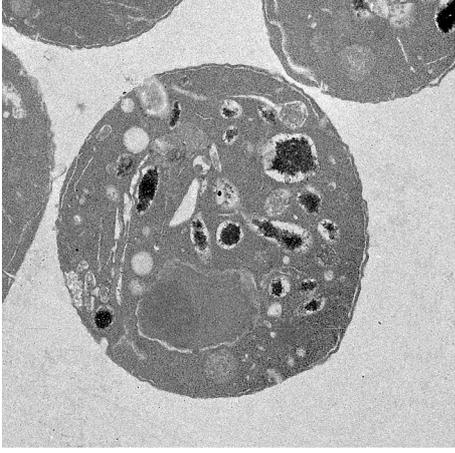
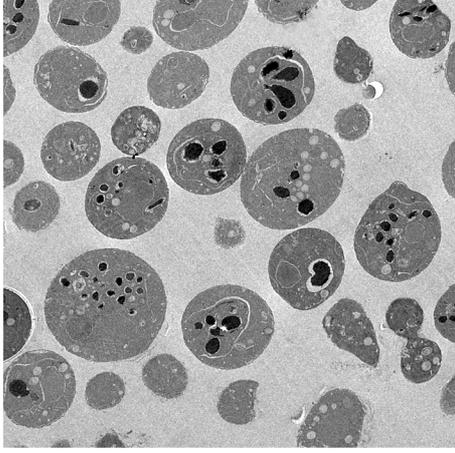
B



+ *ykt6(Q)*



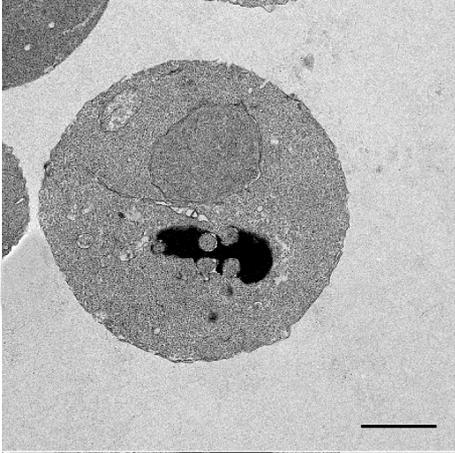
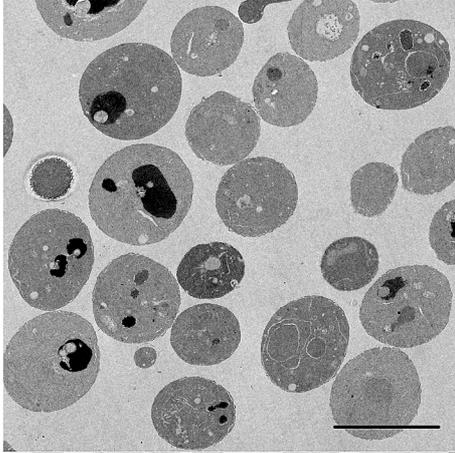
C



D



+ *ykt6(Q)*



3.5 Substituiert Ykt6p die *SEC22*-Deletion auch in Anwesenheit der *sed5R*-Mutation?

Sec22p, das R-SNARE des ER-Golgi SNARE-Komplexes ist in der Bäckerhefe nicht essentiell (Dascher *et al.*, 1991) und wird in *sec22Δ*-Hefezellen durch Ykt6p funktionell ersetzt (Liu und Barlowe, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit ergab sich deshalb die Frage, welche Auswirkungen ein Arginin in der Qa-Position des ER-Golgi SNARE-Komplexes auf Hefezellen hat, die kein *SEC22* enthalten.

3.5.1 Ein Arginin in der Qa-Position des ER-Golgi SNARE-Komplexes führt, bei gleichzeitiger Deletion von *SEC22*, zu Hefezellen mit einem Defekt im ER-Golgi Transport

Bereits die *sed5R*-Mutation alleine führte zu Hefezellen mit einem ausgeprägten Wachstums- und Transportdefekt (s. Kap. 3.2). Deshalb wurde zunächst geprüft, ob eine Kombination der *sed5R*-Mutation mit der Deletion von *SEC22* überhaupt zu lebensfähigen Zellen führt.

Hierzu wurde der uracil-auxotrophe Hefestamm YCG2 (*sec22::LEU2 sed5::KanMX4*), der plasmidkodiertes *SED5* (*URA3*-Marker, CEN6-Plasmid) als einzige Version dieses Gens exprimiert, mit einem Zentromerplasmid für *sed5R* (*LYS2*-Marker) transformiert. Zur Selektion von Hefezellen, die in der Qa-Position des ER-Golgi SNARE-Komplexes ein Arginin und zugleich die *SEC22*-Deletion enthalten, wurden geeignete Transformanden auf 5'-FOA Agarplatten ausgestrichen und bei 25 °C inkubiert. In Anwesenheit dieser Chemikalie können nur uracil-auxotrophe Hefezellen wachsen, uracil-prototrophe Hefezellen dagegen wandeln 5'-FOA in das toxische Flourouracil um und sterben (s. Kap. 2.4.10).

Wie Abb. 31 A zeigt, konnten mutante Hefezellen erhalten werden, welche die *sed5R*-Mutation zusammen mit der genomischen Deletion des *SEC22*-Allels enthalten (YCG2_1; ). War der Hefestamm YCG2 dagegen mit leerem Vektor an Stelle des *sed5R*-Plasmids transformiert worden, konnten die Hefezellen nicht auf 5'-FOA-haltigen Agarplatten wachsen. Sie waren auf das für *SED5*-kodierende *URA3*-Plasmid angewiesen.

Das Wachstumsverhalten der isolierten *sed5R/sec22Δ*-Zellen () wurde mittels Tropfentests auf YPD-Agarplatten untersucht (Abb. 31, B). Im Gegensatz zu den temperatursensitiven *sec22Δ*-Hefezellen () wuchsen *sed5R/sec22Δ*-Zellen () bei 37 °C, wenngleich deutlich schlechter als Wildtyp-Zellen (Abb. 31 B). Dies war überraschend, da sich *sed5R/sec22Δ*-Zellen () damit hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens deutlich von anderen *sed5R*-exprimierenden Hefezellen unterschieden. Hefezellen (, ) welche die *sed5R*-

Punktmutation zusammen mit *SEC22(R)* oder mit *sec22Q* exprimieren, waren temperatursensitiv (s. Kap. 3.2 und 3.3.3).

Der intrazelluläre Transport in *sed5R/sec22Δ*-Hefezellen (④^{A}) wurde in pulse-chase Experimenten anhand der Prozessierung von CPY bei 37 °C untersucht (Abb. 31, C). Bei dieser Temperatur war in *sed5R/sec22Δ*-Zellen (④^{A}) nach einer chase-Zeit von 30 min das CPY-Protein ausschließlich in der p1-Form nachweisbar (Abb. 30 C, 4. Spur). Dies zeigt, dass der ER-Golgi Transport blockiert ist. Damit unterscheidet sich diese Mutante (④^{A}) von *sec22Δ*-Hefezellen (④^{B}), in denen der intrazelluläre Transport lediglich verlangsamt ist (s. Kap. 3.3.3). Bei gleichen Versuchsbedingungen zeigten *sec22Δ*-Zellen (④^{B}) zwar ebenfalls eine Akkumulation des CPY-Proteins in der p1-Form, jedoch enthielten sie einen Teil des Proteins auch in der reifen Form (zum Vergleich siehe Kap.3.3.3, Abb. 26 B).

Liu und Barlowe (Liu und Barlowe, 2002) haben gezeigt, dass bei einer Deletion von *SEC22* das endogene Expressionsniveau von *YKT6* erhöht ist und das R-SNARE Ykt6p das fehlende Sec22p funktionell ersetzt. Dennoch ist diese Substitution nicht optimal, da *sec22Δ*-Hefezellen (④^{B}) ein verlangsamtes Wachstum zeigen (Dascher *et al.*, 1991) und der *in vitro* Transport (Liu und Barlowe, 2002), sowie die Prozessierung von CPY verlangsamt sind (Kap.3.3.3, Abb. 26 B).

Obwohl *sed5R/sec22Δ*-Hefezellen (④^{A}) nicht temperatursensitiv sind, ist in dieser Mutante der intrazelluläre Transport im Bereich zwischen dem ER und dem Golgi gestört. Wir nehmen an, dass auch in *sed5R/sec22Δ*-Hefezellen (④^{A}), endogenes Ykt6p das nicht vorhandene Sec22p ersetzt. Dadurch sind im ER-Golgi SNARE-Komplex dieser Hefezellen aufgrund der *sed5R*-Punktmutation zwei Arginine in der R- und Qa-Position enthalten, woraus der beobachtete Transportdefekt resultiert.

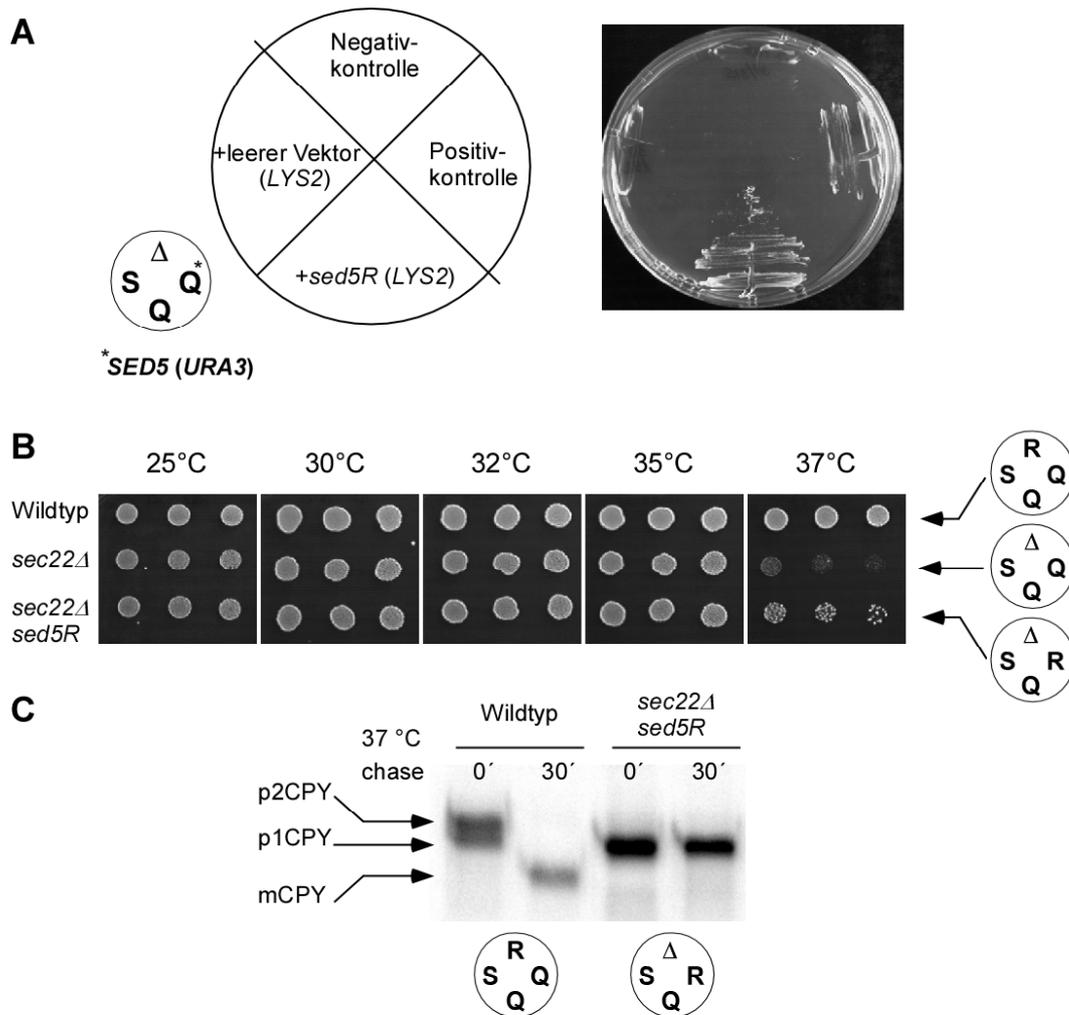


Abb. 31: Auch in Abwesenheit von *SEC22* führt die *sed5R*-Mutation zu lebensfähigen Hefezellen mit einem Defekt im ER-Golgi Transport. (A) Die *sed5R*-Mutation führt auch bei gleichzeitiger Deletion von *SEC22* zu lebensfähigen Hefezellen (⊕). **(B)** *sed5R/sec22Δ*-Zellen (⊕) wachsen bei 37 °C deutlich schlechter als wildtyp Zellen. **(C)** *sed5R/sec22Δ*-Zellen (⊕) akkumulieren die Protease CPY in der p1-Form und zeigen damit eine Blockierung im ER-Golgi Transport. Verwendete Hefestämme: Wildtyp (BY4742) (⊕); *sec22Δ* (Y15177) (⊕); YCG2_1 (MATα *his3ΔI leu2Δ0 ura3Δ0 sec22::LEU2 sed5::KanMX4* + pCG163-*sed5R*) (⊕).

3.5.2 Die zusätzliche Expression von *ykt6Q* verbessert das Wachstum von *sed5R/sec22Δ*-Hefezellen und mildert den Transportdefekt

Die zusätzliche Expression von *ykt6Q* verbesserte das Wachstum in Hefezellen, die *sed5R* zusammen mit *SEC22(R)* (⊕) oder mit *sec22Q* (⊕) enthalten (Kap. 3.4). Deshalb wurde auch eine mögliche Suppression des *sed5R/sec22Δ*-Phänotypen durch *ykt6Q* untersucht.

Hierzu wurde der haploide Hefestamm YCG2_1 mit Zentromerplasmiden transformiert, die entweder für *YKT6* oder *ykt6Q* kodieren und das Wachstum der einzelnen Mutanten mittels Tropfentests auf YPD-Agarplatten bei verschiedenen Temperaturen verglichen (Abb. 32).

Ebenso wie *sed5R/sec22Δ*-Hefezellen (⊕_{SR}) waren auch diejenigen Mutanten, die plasmidkodiertes *YKT6* in der Wildtyp- oder Q-Version enthielten, nicht temperatursensitiv (Abb 32, 5. und 6.Reihe).

Die zusätzliche Expression von *ykt6Q* führte in *sed5R/sec22Δ*-Hefezellen (⊕_{SR}), wie bereits in den zuvor untersuchten *sed5R*-Mutanten, zu einer Verbesserung des Zellwachstums (Abb. 32, Reihe 6 und 3). Diese Zellen wuchsen ähnlich wie *sed5R/sec22Q*-Hefezellen (⊕_{SR}) die zusätzlich *ykt6Q* enthalten und einen Wildtyp-ähnlichen Phänotyp zeigen (s. Kap. 3.4) (Abb. 32, unterste Verdünnungsreihe). Dagegen zeigte die Expression von *YKT6* keinen deutlich positiven Effekt auf das Wachstum der *sed5R/sec22Δ*-Hefezellen (Abb. 32, Reihe 5). Dies belegt, dass die beobachtete Suppression des Wachstumsdefekts durch *ykt6Q* allelspezifisch ist und keinen multi-copy Effekt durch Erhöhung des Expressionsniveaus von *YKT6* darstellt. Vergleicht man in Abb. 32 die Reihen drei und vier, ist deutlich zu sehen, dass Hefezellen mit der Kombination *sed5R/sec22Q* (⊕_{SR}) wesentlich schlechter wachsen als *sed5R/sec22Δ*-Hefezellen (⊕_{SR}). Diese Unterschiede führen wir darauf zurück, dass in *sed5R/sec22Q*-Hefezellen (⊕_{SR}) zwar eine normale 1R:3Q Stöchiometrie im ER-Golgi SNARE-Komplex vorliegt, jedoch der *intra*-Golgi Komplex zwei Arginine (*sed5R*) und der Golgi-ER SNARE-Komplex kein Arginin (*sec22Q*) enthalten. Dies führt in den Hefezellen zur Störung zweier Transportschritte, die in derselben Richtung wirken, und damit zu einer Verstärkung des Wachstumsdefektes.

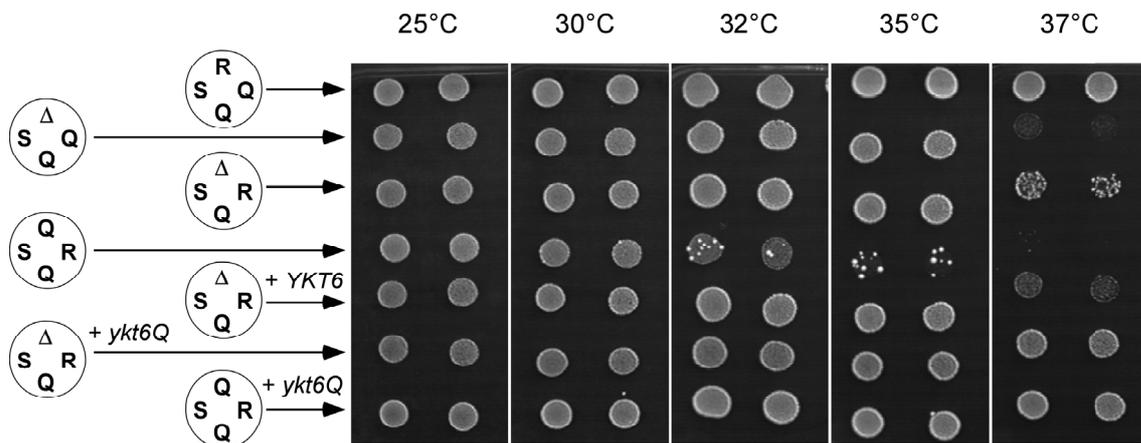


Abb. 32: Die zusätzlich Expression von plasmidkodiertem *ykt6Q* verbessert das Wachstum von *sed5R/sec22Δ*-Hefezellen (⊕_{SR}). Das Wachstum von *sed5R/sec22Δ*-Hefezellen (⊕_{SR}) die zusätzlich *ykt6Q* exprimieren ist vergleichbar mit *sed5R/sec22Q*-Zellen (⊕_{SR}), die ebenfalls *ykt6Q* co-exprimieren und mit Wildtyp-Hefezellen (⊕). Expression von *YKT6* hingegen konnte den Wachstumsdefekt von *sed5R/sec22Δ*-Hefezellen (⊕_{SR}) nicht aufheben. Verwendete Hefestämme: Wildtyp (BY4742) ⊕; *sec22Δ* (Y15177) ⊕_R; YCG2_1 (MAT α *his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 sec22::LEU2 sed5::KanMX4* + pCG163-*sed5R*) ⊕_Q; YCG3 (MAT α *his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 sec22::LEU2 sed5::KanMX4* + pCG62-*sed5R-sec22Q*) ⊕_{SR}.

Der anterograde Transport in *sed5R/sec22Δ*-Hefezellen ($\textcircled{\text{SR}}$) wurde mittels zweier verschiedener Ansätze untersucht: In pulse-chase Experimenten wurde die Prozessierung von CPY verfolgt. Mögliche Glykosylierungsdefekte wurden anhand des Invertasetests untersucht.

Die Reifung der vakuolären Protease CPY wurde bei einer Temperatur von 37 °C analysiert (Abb. 33). In *sed5R/sec22Δ*-Zellen ($\textcircled{\text{SR}}$) war nach 30 min chase-Zeit das CPY-Protein ausschließlich in der p1-Form detektierbar (Abb. 33, 4. Spur). In diesen Zellen ist der ER-Golgi Transport gestört (s. Kap. 3.5.1). Hingegen konnte in *sed5R/sec22Δ*-Hefezellen ($\textcircled{\text{SRQ}}$), die zusätzlich plasmidkodiertes *ykt6Q* enthielten, das CPY-Protein nach 30 min sowohl in der p1- als auch in der reifen Form nachgewiesen werden (Abb. 33, Spur 6). Daher ist in diesen Hefezellen, wie in *sec22Δ*-Hefezellen ($\textcircled{\text{SR}}$), der anterograde Transport verlangsamt. Bei zusätzlicher Expression von *YKT6* akkumulierte CPY überwiegend in der p1-Form (ER) und war nur in geringem Maße in der m-Form nachweisbar (Abb. 33, 8. Spur). Obwohl in diesem Experiment ein positiver Effekt durch eine schwache Überexpression von *YKT6* sichtbar wird, bekräftigt es die Allelspezifität der *ykt6Q*-Mutation.

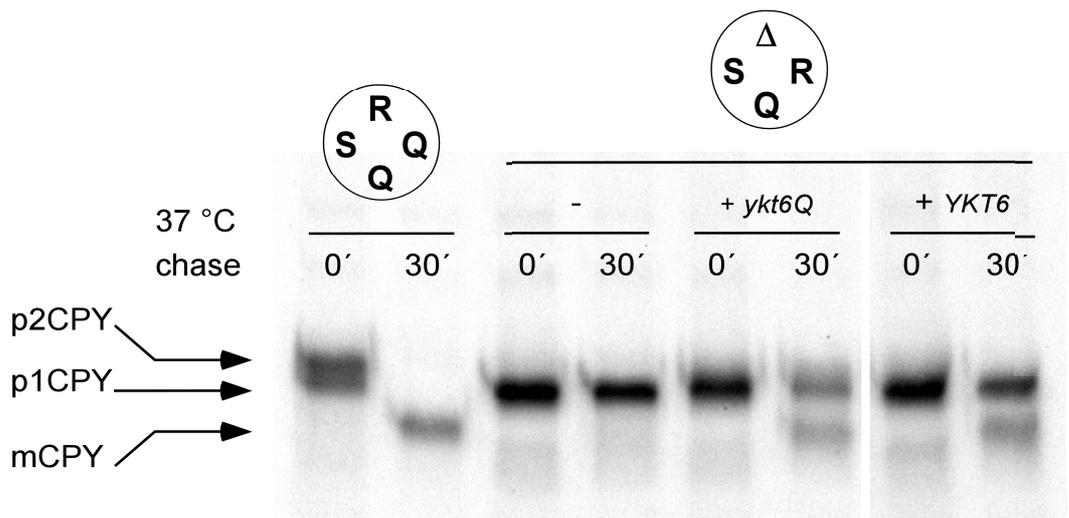


Abb. 33: Der Transportdefekt in *sed5R/sec22Δ*-Hefezellen ($\textcircled{\text{SR}}$) kann durch *ykt6Q* oder *YKT6* gemildert werden. Der anterograde Transport in *sed5R/sec22Δ*-Hefezellen ($\textcircled{\text{SR}}$) ist bei 37 °C blockiert. Die zusätzliche Expression von *ykt6Q* oder *YKT6* kann den Transportdefekt zum Teil aufheben. Folgende Hefestämme wurden verwendet: Wildtyp (BY4742) ($\textcircled{\text{SR}}$); YCG2_1 (MAT α *his3Δ/leu2Δ0 ura3Δ0 sec22::LEU2 sed5::KanMX4* + pCG163-*sed5R*) ($\textcircled{\text{SR}}$).

Die Glykosylierung der Invertase wurde bei 25 °C und 37 °C in Wildtyp- und mutierten Hefezellen verglichen (Abb. 34). Bei beiden Temperaturen war in Wildtyp-Hefezellen (Ⓔ[Ⓓ]) nur Golgi-glykosylierte Invertase zu sehen (Abb. 34, Spuren 1 und 2 von links). Im Gegensatz zum Wildtyp zeigten *sec22Δ*-Zellen (Ⓔ[Ⓐ]) bereits bei permissiver Temperatur die ER-glykosylierte Form von Invertase (Abb. 34, 3. Spur von links). Desweiteren war auch die Golgi-glykosylierte Form sichtbar, die im Vergleich zu Wildtyp-Zellen niedriger glykosyliert war. Bei restriktiver Temperatur war hauptsächlich die sekretierte Form zu sehen (Abb. 34, Spur 4). Alle untersuchten Mutanten, die in der Qa-Position des ER-Golgi Komplexes ein Arginin enthielten (Ⓔ[Ⓐ], Ⓔ[Ⓒ]), zeigten bei der restriktiven Temperatur vorwiegend die ER-glykosylierte oder hypoglykosylierte Invertase (Abb. 34). Bei 25 °C war in *sed5R/sec22Q*-Hefezellen (Ⓔ[Ⓓ]), vergleichbar wie in Wildtyp-Zellen (Ⓔ[Ⓓ]), nur die sekretierte Form zu sehen. Jedoch war diese bei zusätzlicher Expression von *ykt6Q*, niedriger glykosyliert (Abb. 34, Spuren 5 und 7). Bei restriktiver Temperatur hingegen, wurde in *sed5R/sec22Q*-Hefezellen eine Form von Invertase sichtbar, die geringfügig stärker glykosyliert ist als die ER-Form. Diese Form war bei gleichzeitiger Expression von *ykt6Q* nicht so stark zu sehen, wenngleich auch hier die Invertase in einer hypoglykosylierten Form vorhanden war (Abb. 34, Spuren 6 und 8), was wir auf die gleichzeitige Anwesenheit von genomischem wildtyp-*YKT6* zurückführen. Wie bei *sec22Δ*-Zellen (Ⓔ[Ⓐ]) war in den Mutanten (Ⓔ[Ⓒ]), die *sec22Δ* in Kombination mit *sed5R* enthielten, schon bei permissiver Temperatur Invertase in der ER-glykosylierten Form sichtbar. Wir führen dies auf einen verlangsamten ER-Golgi Transport zurück. Zusätzlich war, mit Ausnahme der Mutante die *ykt6Q* exprimiert, die sekretierte Form geringer glykosyliert als in Wildtyp-Hefezellen (Abb. 34, Spuren 9,11 und 13). Hypoglykosylierte Invertase wurde mit einem Defekt im Golgi-Apparat in Zusammenhang gebracht (Yang *et al.*, 1998). Bei restriktiver Temperatur wurden klare Unterschiede deutlich. Während die Kombination *sed5R/sec22Δ* (Ⓔ[Ⓒ]) hauptsächlich die ER-glykosylierte Form und in einem geringeren Ausmaß niederglykosylierte Invertase aufwies, war bei Co-Expression von *ykt6Q* die ER-Form nicht eindeutig sichtbar, dafür aber eine deutlich hypoglykosylierte Form von Invertase. Bei zusätzlicher Expression von *YKT6* waren ER- und hypoglykosylierte Invertase nachweisbar. Die hypoglykosylierten Formen der Invertase deuten darauf, dass auch in diesen *sed5R/sec22Δ*-Mutanten (Ⓔ[Ⓒ]) im *intra*-Golgi Transport eine Störung vorliegt.

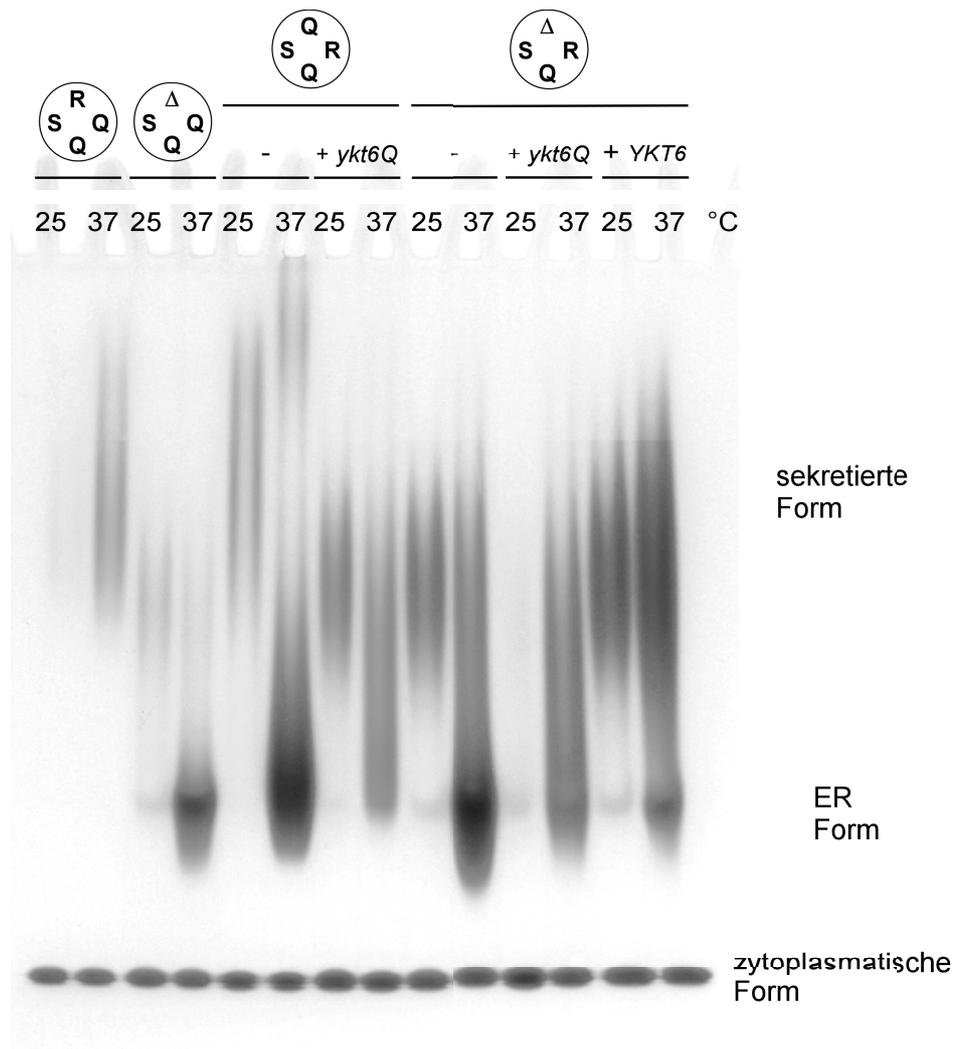


Abb. 34: *sed5R*-Hefezellen zeigen Glykosylierungsdefekte. Die meisten der untersuchten Hefestämme enthielten bei höherer Temperatur Invertase in der ER-Form, sowie in einer hypoglykosylierten Form. Verwendete Hefestämme: Wildtyp (BY4742) [Ⓢ]; *sec22Δ* (Y15177) [Ⓢ]; YCG2_1 (MAT α *his3ΔI leu2Δ0 ura3Δ0 sec22::LEU2 sed5::KanMX4* + pCG163-*sed5R*) [Ⓢ]; YCG3 (MAT α *his3ΔI leu2Δ0 ura3Δ0 sec22::LEU2 sed5::KanMX4* + pCG62-*sed5R-sec22Q*) [Ⓢ].

3.6 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse.

In der nachfolgenden Tabelle 4 sind die verschiedenen ‘0’-Ebene-Mutationen und die Phänotypen der unterschiedlichen Hefemutanten dargestellt.

Tabelle 4 (s. S. 122 ff.): Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse.

Wachstum: + = Wachstum bei 37 °C; +/- = ganz schwaches Wachstum bei 37 °C; ts = temperatursensitiv. *CPY*: p1-Form = ER-Form; p2-Form = Golgi-Form; m-Form = reife, vakuoläre-Form. *Sekretion von Kar2p*: + = Sekretion; (+) = geringe Sekretion; - = keine Sekretion. *Invertase*: ER-Form = ER-glykosylierte Invertase (80-86 kDa); sekretierte Form = Golgi-glykosylierte Invertase (100-150 kDa). Die Glykosylierung von Invertase wurde bei 25 °C und 37 °C untersucht. Wenn nicht anders angegeben, wurde die jeweilige Form von Invertase bei beiden Versuchstemperaturen beobachtet. *Immunofluoreszenz (IF)*: Das jeweils untersuchte Protein (Kar2p oder Emp47p) ist angegeben.

Aminosäuren der '0' Ebene ER- Golgi- ER	Zusätzlich exprimierte SNAREs ER-Golgi Golgi-ER andere	Wachstum	CPY	Sekretion (Kar2p; Invertase)	Immunofluoreszenz (IF) / Elektronenmikroskopie (EM)
		+ ts (>35°C)	m-Form -	Kar2p: - -	IF: Kar2p: ER-Färbung Emp47p: Punktförmige Strukturen, typ. für Golgi -
„4 Q“					
	+ Q _a : Q→R + Q _b : Q→R + Q _c : S→R + Q _a : Q→R	ts (>35°C) + ts (>35°C) + ts (>35°C) ts (>32°C)	p1-Form m-Form - m-Form - p1-Form	Kar2p: + Kar2p: (+) (wenig) - Kar2p: - Kar2p: + Kar2p: + Invertase: ER-Form (37°C) Kar2p: + - Kar2p: - Kar2p: +	- IF: Kar2p: nicht vollständig ER, nicht vollständig Golgi - - - - - - - - -
	+ Q _a : Q→R + Q _b : Q→R + Q _c : S→R + Q _a : Q→R	ts (>35°C) + ts (>30°C)	- - - -	- - Kar2p: - Kar2p: +	- - - -

Aminosäuren der '0' Ebene ER- Golgi- Golgi ER	Zusätzlich exprimierte SNAREs ER-Golgi Golgi-ER andere	Wachstum	CPY	Sekretion (Kar2p; Invertase)	Immunofluoreszenz (IF) / Elektronenmikroskopie (EM)
2R:2Q					
		ts (>30°C)	p1-Form	Invertase: ER-Form (37°C)	EM: Fragmentierte Vakuolen; Akkumulation intrazellulärer Membranen (ER-Membranen)
	+ <i>ykt6Q</i>	ts (>35°C) letal	p1-Form -	- -	EM: Akkumulation intrazellulärer ER-Membranen -
	+ R: R→Q	ts (>35°C) +	p1-Form m- + p1- Form	Invertase: ER- Form + hypoglykosylierte Form Invertase: sekretierte Form, wie wildtyp	-
		ts (>30°C)	p1-Form	Invertase: ER-Form	-
	+ <i>ykt6Q</i>	ts (>35°C)	p1-Form	-	-
		ts (>35°C)	p1- + m- Form	Invertase: ER-Form + sekretierte Form	-

Aminosäuren der '0' Ebene ER-Golgi-ER	Zusätzlich exprimierte SNAREs ER-Golgi Golgi-ER andere	Wachstum	CPY	Sekretion (Kar2p; Invertase)	Immunofluoreszenz (IF) / Elektronenmikroskopie (EM)
swaps					
	+ <i>ykt6Q</i>	ts (>32°C) + ts (>35°C) +	p1-Form + p2 (30°C) m-Form p1-Form m-Form	Kar2p: + Invertase: ER-Form + hypoglykosylierte Form (37°C) Kar2p: + Invertase: ER-Form + hypoglykosylierte Form - Kar2p: -	IF: Emp47p: keine Golgi -typischen punktförmigen Strukturen EM: Fragmentierte Vakuolen; Akku- mulation intrazellulärer Membranen EM: Wildtyp Morphologie; keine fragmentierten Vakuolen oder akku- mulierte intrazelluläre Membranen - -
					
					
<i>sec22Δ</i>					
	+ <i>ykt6Q</i>	ts (>35°C) +/- ts (>35°C) ts (>35°C) +	p1- + wenig m-Form (37 °C) - p1-Form p1- + wenig m-Form p1- + m- Form	Invertase: Hypoglyko- sylierte Form; ER- Form (37°C) - Invertase: ER- Form (37°C) + hypoglyko- sylierte Form Invertase: ER-Form + Hypoglykosylierte Form Invertase: ER-Form (37°C); Hypoglyko- sylierte Form	- - - - -
	+ <i>ykt6Q</i>				