

## 7 Anhang

### Zusammenfassung

Die evolutionär konservierte Familie der SNARE (SNAP receptor)-Proteine spielt eine zentrale Rolle bei intrazellulären Fusionsereignissen. Charakteristisches Merkmal aller SNARE-Proteine das sog. SNARE-Motiv. Jeweils vier SNARE-Domänen assemblieren zu einem SNARE-Komplex, dessen Bildung allgemein als Triebkraft des Fusionsprozesses angesehen wird. 16 Aminosäureschichten im Inneren des Bündels halten die Helices zusammen. 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 zur Unterteilung der SNARE-Proteine in R-, Qa-, Qb- und Qc- SNAREs.

Der am Transport vom ER zum Golgi beteiligte SNARE-Komplex setzt sich aus den Proteinen Sec22p (R), Sed5p (Qa), Bos1p (Qb) und Bet1p (Qc) zusammen (⊗). Zwei dieser Proteine sind in weiteren SNARE-Komplexen beteiligt. Diese „Multifunktionalität“ erschwert die eindeutige Zuordnung einzelner SNAREs zu einem bestimmten Transportabschnitt.

Gegenstand dieser Dissertation ist die Untersuchung funktioneller Interaktionen der ER-Golgi SNARE-Proteine *in vivo*. Dazu wurden komplementäre Arg→Gln bzw. Gln→Arg Punktmutationen in die '0'-Ebene der ER-Golgi SNAREs eingeführt. Hefemutanten, die verschiedene R:Q Verhältnisse in der '0' Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes enthalten, wurden erzeugt und in Bezug auf Wachstum und intrazellulärem Transport charakterisiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die drei Q-Positionen innerhalb des ER-Golgi SNARE-Komplexes, trotz der hohen Rotationssymmetrie der '0' Ebene, funktionell unterschiedlich sind. Eine „4Q“-Stöchiometrie (⊗) führte zu ausgeprägten Wachstums- und Transportdefekten *in vivo*. Dieser Phänotyp konnte durch zusätzliche Expression der R-Versionen des Qa- (Sed5p) oder Qc-SNAREs (Bet1p) supprimiert werden. Eine 2R:2Q-Stöchiometrie, mit zwei Argininen in der '0' Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes, führte teilweise zu Hefezellen mit drastischen Phänotypen (⊗, ⊗). Dagegen wurden bei einer Verschiebung des Arginin an eine der drei Q-Positionen Hefezellen mit deutlich milderem Wachstumsphänotypen erhalten. In Hefezellen, welche das Arginin in der Qa-Position enthielten (⊗), musste zusätzlich ein weiteres R-SNARE, *YKT6*, als Q-Variante exprimiert werden, damit diese Zellen wildtyp-ähnliches Verhalten aufwiesen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass *SED5* in zwei verschiedenen SNARE-Komplexen beteiligt ist und ein Mal mit dem R-SNARE *SEC22*, das andere Mal mit *YKT6* interagiert.

Die R- und Qa-Position sind funktionell äquivalent. Daher eignen sich komplementäre Arg/Gln Substitutionen in diesen beiden Positionen als Werkzeug, um in einem bestimmten SNARE-Komplex funktionell interagierende SNAREs zu kartieren.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse belegen genetisch eine funktionelle Interaktion von Sed5p und Ykt6p in einem weiteren SNARE-Komplex. Darüber hinaus liefern einen direkten Beweis, daß Sec22p, Sed5p, Bos1p und Bet1p einen funktionalen SNARE-Komplex *in vivo* bilden für den ein korrektes Packen der '0'-Ebene erforderlich ist.

## Abstract

The evolutionary conserved SNARE (SNAP receptor)-protein family is a key player in intracellular fusion events. The major characteristic of all SNARE proteins is the so-called SNARE motif. Four of these SNARE domains assemble into a SNARE complex, the formation of which is assumed to be the driving force for fusion. Inside the helical structure of the SNARE complex are 16 layers of interacting amino acids. A structural feature of SNARE complexes is an ionic layer, the '0' position, in the centre. Besides a few exceptions, this central layer is composed of one arginine and three glutamine residues. Thus SNAREs have been reclassified into R, Qa, Qb and Qc SNAREs.

The SNARE complex involved in ER to Golgi transport is composed of the proteins Sec22p (R), Sed5p (Qa), Bos1p (Qb) and Bet1p (Qc). Two of these proteins are involved in further SNARE complexes. These "multifunctional" SNAREs are difficult to assign to an individual transport step.

The objective of this dissertation was to analyze functional interactions of the ER-to-Golgi SNAREs *in vivo*. Complementary Arg→Gln and Gln→Arg substitutions were introduced in the '0' layer of the ER-to-Golgi SNAREs. Yeast mutants, containing different ratios of R:Q in the '0' layer were then generated and their growth and transport was analyzed.

It was shown, that the three Q positions are functionally not equivalent, in spite of the high rotational symmetry within the '0' layer. Further, a "4Q" stoichiometry ( $\text{Q}_4$ ) resulted in growth and transport defects *in vivo*. Co-expression of the complementary R-versions of the Qa (Sed5p) or Qc (Bet1p) SNAREs suppressed the observed phenotype. Two arginines in the '0' layer of the ER-to-Golgi SNARE complex produced a severe phenotype ( $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_2$ ). However, moving the arginine to one of the three Q positions yielded mutant yeast cells with a clearly milder phenotype. In mutants where the arginine had been moved to the Qa position ( $\text{Q}_3$ ), the Q-version of a further R-SNARE, *YKT6*, had to be expressed in order to obtain a wild-type phenotype. Hence it was shown that *SED5* is involved in two different SNARE complexes, where it interacts with the R-SNAREs *SEC22* and *YKT6* respectively.

The R and Qa positions are functionally equivalent. Thus, in yeast these positions are well suited for complementary Arg/Gln substitutions that can be used as a tool to map functionally interacting SNAREs in a given SNARE complex.

The results presented in this thesis show that Sec22p, Sed5p, Bos1p and Bet1p form a functional SNARE complex *in vivo* and that this interaction depends on correct packing within the '0' layer. Furthermore, the results show genetically a functional interaction of Sed5p and Ykt6p in an additional SNARE complex.

**Publikation****Identification of functionally interacting SNAREs by using complementary substitutions in the conserved '0' layer**

Carmen T. Graf, Dietmar Riedel, Hans Dieter Schmitt and Reinhard Jahn  
Mol Biol Cell 2005 May; 16(5):2263-74.

## **Danksagung**

Die vorliegende Dissertation wurde am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen in den Abteilungen Neurobiologie und Molekulare Genetik unter der wissenschaftlichen Anleitung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Jahn durchgeführt.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Reinhard Jahn für das sehr interessante Thema, für unzählige Ideen, Ratschläge und Diskussionen, sowie seine stetige Hilfsbereitschaft.

Herzlich danke ich auch Herrn Dr. habil. Hans Dieter Schmitt für die Einführung in die Hefegenetik, die Betreuung meiner Arbeit und die Korrektur meiner Dissertation, sowie für zahlreiche wertvolle Diskussionen.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Volker Haucke für die Betreuung der Arbeit als Referent stellvertretend für den Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie der Freien Universität Berlin bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dieter Gallwitz danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Dr. habil. Gottfried Mieskes danke ich ganz herzlich für seine große Hilfsbereitschaft.

Bei Frau Prof. Dr. Gabriele Fischer von Mollard und Frau Dr. Sirkka Keränen möchte ich mich für den unkomplizierten Austausch von Materialien und Informationen bedanken.

Dr. Dietmar Riedel danke ich für die Erstellung der EM-Aufnahmen. Hans-Peter Geithe danke ich für die zahlreichen DNA-Sequenzierungen, Dr. Dirk Fasshauer für die vielen hilfreichen Gespräche, Dr. Stefan Pabst und Matthias Böddener für die mir entgegengebrachte Geduld bei biochemischen Arbeiten. Barbara Schillings danke ich für die Überwindung bürokratischer Hürden.

Bei allen meinen jetzigen und ehemaligen Laborkollegen möchte ich mich für die angenehme Atmosphäre im Labor bedanken. Mein besonderer Dank hierbei gilt Hannegret Frahm für die vielen technischen Hilfen und die aufheiternden Gespräche.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Neurobiologie sowie der Abteilung Molekulare Genetik möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit bedanken. Besonders möchte ich hier Dr. Shigeo Takamori, Stefan Schenk und Alexander Stein für die abwechslungsreichen Balkongespräche danken. Weiterhin bedanke ich mich bei Kathrin Wiederhold und Pawel Burkhardt für das eifrige Korrekturlesen. Dr. Matthew Holt danke ich für seine Hilfsbereitschaft.

Tine Abegg, Vanessa Fieber und natürlich Stefan danke ich ganz herzlich für die seelisch-moralische Unterstützung während meiner Doktorarbeit, ohne die ein Abschluss der Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.

Allen, die mir während meiner Arbeit beiseite gestanden haben, gilt mein besonderer Dank.