

Dirk Bernd Walter Bausch

Dr. med.

Vacuole SNARE complex purification and analysis

Geboren am 08.12.1975 in Karlsruhe

Reifeprüfung am 27.06.1995 in Karlsruhe

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1996 bis SS 2003

Physikum am 31.03.1998 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg; USA

Staatsexamen am 22.05.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biochemie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Christian Ungermann

SNARE Proteine sind essentiell für die intrazelluläre Membranfusion. Charakteristisch für SNAREs ist die Bildung eines ternären Komplexes. Dieser entsteht durch Interaktion der zytosolischen "coiled-coil" Domänen der Proteine aus den Gruppen der Syntaxine, Synaptobrevine und SNAP-25. Der vakuoläre cis-SNARE Komplex wurde jedoch als pentamerer Komplex beschrieben. Dies warf die Frage auf, welche Funktion das fünfte SNARE erfüllt und wie es an der eigentlichen Fusionsreaktion teilnimmt. Co-Immundefällungen mit Antikörpern gegen verschiedene vakuoläre SNAREs ergaben, dass der vakuoläre SNARE Komplex nicht pentamer ist. Anstelle eines pentameren Komplexes wurden mehrere SNARE Komplexe identifiziert: ein Komplex, welcher Nyv1p/Ykt6p enthielt, und ein Komplex, welcher Vam3p/Vti1p enthielt. Zudem konnte gezeigt werden, dass das fünfte SNARE, Ykt6p, früh in der Fusionsreaktion vom SNARE Komplex und der Vakuole dissoziiert. Ykt6p kann daher nicht an der trans-SNARE Komplex Bildung teilnehmen und muss eine andere Funktion erfüllen.

Obwohl SNAREs alleine Membranfusion vermitteln können, sind an diesem stark regulierten Prozess zusätzliche Regulatorproteine beteiligt. Neuere Studien ergaben zudem eine Beteiligung des V0 Sektors der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase an der Fusionsreaktion. Dieser scheint eine Fusionspore zu bilden, welche für die eigentliche Fusion erforderlich ist.

Es war daher von Interesse, zusätzliche, bislang unbekannte Fusionskatalysatoren mit Hilfe von Affinitätsreinigungen des vakuolären cis-SNARE Komplexes zu finden und ihre Funktion

während der Fusionsreaktion zu analysieren. Zwei Untereinheiten des V0 Sektors der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase, Vma6p und Vph1p, wurden gefunden. Beide waren mit Nyv1p, Vam3p und Vti1p assoziiert. Zusätzlich wurde Vtc4p, Teil eines mit dem V0 Sektor der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase assoziierten Proteinkomplexes, zusammen mit Nyv1p und Vam3p aufgereinigt. Da die Funktion von Vma6p während der Fusionsreaktion bisher nicht untersucht worden war, wurden Antikörperinhibitionsexperimente zusammen mit Co-Immundefällungen durchgeführt, um die Funktion von Vma6p während der Fusion zu untersuchen. Zuvor wurden Antikörper gegen Vma6p hergestellt, indem Kaninchen mit rekombinantem Vma6p immunisiert wurden. Die Antikörper gegen Vma6p waren in der Lage, Fusionsreaktionen zu inhibieren. Weitere Experimente ergaben, dass Vma6p während des „Docking“-Schrittes der Fusionsreaktion eine Rolle spielt. Im Laufe einer Fusionsreaktion verlor Vma6p zudem seine Assoziation zu Nyv1p und Vam3p.

Aus den erhobenen Daten wurde folgendes geschlossen: Sowohl Nyv1p als auch Vam3p aus verschiedenen Unterkomplexen auf gegenüberliegenden Membranen interagieren in einem trans-SNARE Komplex, nachdem Ykt6p dissoziierte. Beide sind über Vma6p mit dem V0 Sektor der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase verbunden. Diese Verbindung geht während des „Docking“-Schrittes der Fusionsreaktion verloren. Dies ermöglicht es dem V0 Sektor den trans-V0 Komplex als letzten Fusionsschritt zu bilden.