

UNTERSUCHUNGEN ZUR REKONSTITUTION DER
SNARE-VERMITTELTEN MEMBRANFUSION

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

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

vorgelegt von

ALEXANDER STEIN
aus Berlin

November 2007

angefertigt in der Abteilung Neurobiologie des Max-Planck-Instituts für
biophysikalische Chemie in Göttingen

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Jahn
2. Gutachter: Prof. Dr. Volker Haucke

Disputation am 28. Januar 2008

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Reinhard Jahn für seine Unterstützung und Anleitung. Die Anfertigung der Doktorarbeit in einem Labor, in dem die Grenzen nur durch den eigenen Verstand und die endliche Zeit gesetzt sind, war ein Privileg.

Prof. Haucke danke ich für die freundliche Übernahme der Begutachtung und die Möglichkeit, diese Arbeit in meiner Heimatstadt Berlin zu verteidigen.

Ich danke den Boehringer Ingelheim Fonds für die Unterstützung und die interessanten Seminare.

Ohne das Mit- und Vordenken von Dirk Fasshauer wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Dafür danke ich ihm.

Ich danke Gottfried Mieskes für seine ständige Hilfsbereitschaft.

Tausend Dank an Ursel Ries für ihre exzellente Hilfe.

Erwin Neher und Takeshi Sakaba möchte ich für die interessante Zusammenarbeit beim Toxin-Projekt und für den kurzen Blick in die Welt der Elektrophysiologie danken.

Ich danke meinen Nachbarn Ioanna und Jochen für ihre Nachsicht und allen anderen Freunden und Mitgliedern der Abteilung Neurobiologie für die angenehme Atmosphäre.

Ohne Stephan, Pawel, Anand und Katrin wäre diese Zeit nur halb so schön gewesen. Danke, Danke, Danke.

Ich danke meinen Eltern und Geschwistern für ihre Unterstützung und ihr Verständnis und Anna für ihre Liebe.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
a.u.	willkürliche Einheiten (arbitrary units)
BoNT	Botulinumneurotoxin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat
CD	Circulardichroismus
cmc	<i>critical micellar concentration</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
DPTA	1,3-Diamino-2-propanol-N,N,N',N'-tetraessigsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
Eb	Endobrevin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	<i>electron paramagnetic resonance</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie (<i>isothermal titration calorimetry</i>)
kDa	Kilodalton
MALLS	<i>multi-angle laser light scattering</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-triessigsäure
NMR	Kernmagnetische Resonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive factor</i>
ODx	optische Dichte bei x nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	<i>protein data bank</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Ionenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyle sulfate</i>)
SNAP	<i>soluble NSF attachment protein</i>
SNAP-25	<i>synaptosome-associated protein of 25 kDa</i>
SNARE	SNAP-Rezeptor
Sb	Synaptobrevin
Sx	Syntaxin
TeNT	Tetanusneurotoxin (<i>tetanus neurotoxin</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>units</i>)
VAMP	<i>vesicle associated membrane protein</i>
v/v	Volumen/Volumen (volume/volume)
w/v	Masse/Volumen (weight/volume)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	Biophysikalische Modelle zur Membranfusion	11
1.2	Die Membranfusion im sekretorischen Signalweg	14
1.2.1	Die Rolle der Rab-Proteine im <i>membrane attachment</i> . .	15
1.2.2	SNARE-Proteine	16
1.3	Die Rolle von Syntaptotagmin bei der Ca^{2+} -induzierten Exozytose	28
1.3.1	Biochemische Befunde	29
1.3.2	Physiologische Befunde zu Syntaptotagmin	34
1.3.3	Complexine	35
1.3.4	Modell der Regulation der neuronalen Exozytose durch Syntaptotagmin	36
1.4	Rekonstitution der Membranfusion	36
1.5	Probleme und Fragestellung	42
2	Material und Methoden	44
2.1	Material	44
2.1.1	Chemikalien	44
2.1.2	Enzyme, Kits, Vektoren, Bakterienstämme	44
2.1.3	DNA-Konstrukte	45
2.2	Methoden	48
2.2.1	Expression und Reinigung der Proteine	48
2.2.2	Übrige Proteine	50
2.2.3	Herstellung der SNARE-Komplexe	51
2.2.4	Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen . .	52
2.2.5	Herstellung der Lipid-Mischungen	52
2.2.6	Herstellung der Liposomen	53
2.2.7	SNARE-Komplexformierung in der SDS-PAGE	53

2.2.8	Bestimmung der Größenverteilung über statische Lichtstreuung	54
2.2.9	Bestimmung der Größenverteilung über dynamische Lichtstreuung	56
2.2.10	Fluorometrie	56
2.2.11	Sonstige Methoden	60
3	Ergebnisse	62
3.1	Grundcharakterisierung der Fusion	62
3.1.1	Verfahren zur Herstellung von Liposomen	62
3.1.2	Einige Charakteristika der verwendeten Liposomen	64
3.1.3	Messen einer Fusionsreaktion	69
3.2	Korrelation von SNARE-Komplexbildung und Fusion	72
3.2.1	Bindung von SNAP-25 an Syntaxin-Liposomen	72
3.2.2	Die Bindung von Synaptobrevin an die Q-SNAREs	75
3.2.3	Der Einfluss der Reaktivität der Q-SNAREs auf die Fusionsreaktion	77
3.2.4	Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf das Gleichgewicht der Q-SNAREs	79
3.2.5	Stabilisierung eines 1:1-Komplexes	80
3.2.6	Charakterisierung des Δ N-Komplexes in der Fusionsreaktion	81
3.3	Einfluss von Synaptotagmin auf die Liposomenfusion	89
3.3.1	Grundcharakterisierung der Beschleunigung durch Synaptotagmins C2AB-Fragment	89
3.3.2	Einfluss des C2AB-Fragments auf die Bildung des SNARE-Komplexes	90
3.3.3	Spezifität der Beschleunigung durch das C2AB-Fragment für neuronale Q-SNAREs	93
3.3.4	Einfluss der Phospholipidzusammensetzung	94
3.3.5	Einfluss von Mutationen in den Ca^{2+} -Bindungsstellen der C2-Domänen	97
3.3.6	Korekonstitution von Synaptotagmin	101
3.3.7	Ca^{2+} -Effekte auf korekonstituiertes Synaptotagmin	101
3.3.8	Einfluss von Synaptotagmin auf die Fusion mit dem Δ N-Komplex	104

4 Diskussion	106
4.1 Zur Methodik der Liposomenfusion	106
4.2 Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Liposomenfusion	110
4.3 Beschleunigung der Liposomenfusion durch Synaptotagmin . . .	112
4.4 Die Rekonstitution der neuronalen Exozytose	116
5 Summary	126
6 Zusammenfassung	129
Literaturverzeichnis	131
Publikationsliste	156

Abbildungsverzeichnis

1.1	Von der <i>stalk</i> -Hypothese vorgeschlagene Fusionsintermediate . . .	14
1.2	Modelle der neuronalen und spätendosomalen Komplexe	18
1.3	Der Konformationszyklus der SNARE-Proteine	20
1.4	Ca ²⁺ -Koordinierung Plasmamembran und C2B-Domäne von Synaptotagmin 1	32
2.1	Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte	46
2.2	Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE der verwendeten Proteine .	51
2.3	Prinzip der <i>field flow fractionation</i>	55
2.4	Versuchsaufbau zur Messung der Depolarisation	58
3.1	Über dynamische Lichtstreuung bestimmte Größenverteilungen einiger Liposomen.	65
3.2	Über statische Lichtstreuung bestimmte Größenverteilung von Synaptobrevin-Liposomen.	66
3.3	Elektronenmikroskopische Aufnahme von Synaptobrevin- Liposomen.	67
3.4	Orientierung der rekonstituierten Proteine	68
3.5	Verschiebung der Größenverteilung durch eine Fusionsreaktion .	70
3.6	Komplexbildung zwischen den drei SNARE-Proteinen Syntaxin 1a (H3: 183-288), SNAP-25 und Synaptobrevin ist ausreichend für Fusion	71
3.7	Schema zur Erklärung des Gleichgewichts von Syntaxin und SNAP-25	73
3.8	Bindung von SNAP-25 an membranständiges Syntaxin	74
3.9	Bindung von Munc-18 an membranständiges Syntaxin	75
3.10	Bindung von Synaptobrevin an verschiedene Q-SNAREs	76
3.11	Fusionsreaktionen mit verschiedenen SNAREs	78

3.12	Präinkubation von membranverankertem Syntaxin mit großem Überschuss an SNAP-25 führt zu einer nur moderaten Beschleunigung der Fusion	80
3.13	Bindung von Synaptobrevin an verschiedene verkürzte Komplex .	82
3.14	Schnelle Bindung von löslichem Synaptobrevin an den rekonstituierten Δ N-Komplex	83
3.15	Schnelle Fusion von Synaptobrevin-Liposomen mit Δ N-Komplex-Liposomen	83
3.16	Verdrängung des Synaptobrevin-Fragments	85
3.17	Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante für die Verdrängungsreaktion	86
3.18	Bildung von SNARE-Komplexen während einer Fusion mit dem Δ N-Komplex	87
3.19	Einfluss von Variationen im Verhältnis von unmarkierter zu markierter Membran	88
3.20	Grundcharakterisierung der Beschleunigung der Liposomenfusion durch das C2AB-Fragment von Synaptotagmin	90
3.21	Einfluss des C2AB-Fragments auf die Bildung des binären Komplexes	92
3.22	Das C2AB-Fragment bindet an den binären Komplex in An- und Abwesenheit von Ca^{2+}	92
3.23	Einfluss des C2AB-Fragments auf die Bildung des ternären Komplexes	94
3.24	Die Beschleunigung durch das C2AB-Fragment ist spezifisch für die neuronalen Q-SNAREs	95
3.25	Einfluss der Phospholipidzusammensetzung auf die Reaktivität der SNAREs	97
3.26	Einfluss der Phospholipidzusammensetzung auf die Beschleunigung durch das C2AB-Fragment	98
3.27	Einfluss von PIP_2 auf die Beschleunigung durch das C2AB-Fragment	99
3.28	Mutationen in den Ca^{2+} -Bindungsstellen des C2AB-Fragments .	100
3.29	Korekonstitution von Synaptotagmin mit Synaptobrevin führt zu einer Ca^{2+} -unabhängigen Beschleunigung der Liposomenfusion	102

3.30	Elektronenmikroskopische Negativkontrast-Aufnahmen von Synaptobrevin-Liposomen und Synaptobrevin/Synaptotagmin-Liposomen	102
3.31	Ca ²⁺ -Effekte auf Reaktionen mit korekonstituiertem Synaptotagmin	103
3.32	Effekt von PIP ₂ auf die Fusionsreaktion mit korekonstituiertem Synaptotagmin	104
3.33	Einfluss von Synaptotagmin auf Fusionsreaktionen mit dem ΔN-Komplex	105
4.1	Schematische Darstellung der bei der Liposomenfusion beobachteten Reaktionen von Synaptotagmin	114

Kapitel 1

Einleitung

Die eukaryontische Zelle ist durch Einteilung in membranumschlossene Kompartimente organisiert. Dies ermöglicht, dass Reaktionen getrennt voneinander ablaufen, und minimiert den Energieaufwand zur Aufrechterhaltung großer Konzentrationsunterschiede, so dass z.B. verschiedene Redoxpotentiale oder pH-Werte in verschiedenen Kompartimenten der Zelle bestehen. Um spezifische Reaktionen ausführen zu können, muss jedes Kompartiment mit dem dafür erforderlichen Satz an Enzymen und anderen Proteinen ausgestattet sein. Außerdem ist es notwendig, dass verschiedene Kompartimente miteinander kommunizieren. Dies geschieht durch vesikulären Transport. Dabei wird zunächst von einem Donorkompartiment ein Vesikel abgeschnürt. In diesem Prozess muss es zur spezifischen Einkapselung der zum Transport bestimmten Stoffe kommen. Das Vesikel wird dann zu seinem Zielkompartiment transportiert und fusioniert mit diesem. Dabei kommt es zur Freisetzung des Inhalts des Vesikels in das Lumen des Zielkompartiments. Die in der Vesikelmembran vorhandenen Membranproteine werden in die Membran des Zielkompartiments eingebaut. Ein Spezialfall des vesikulären Transportes liegt bei der Fusion des Transportvesikels mit der die Zelle umgebenden Plasmamembran vor. In diesem Fall kommt es zur Freisetzung des Vesikellumens in den extrazellulären Raum. Dieser Prozess wird als *Exozytose* bezeichnet.

1.1 Biophysikalische Modelle zur Membranfusion

Biologische Membranen bestehen aus einer Doppelschicht von Phospholipiden, in die Proteine eingebettet sind. Bei der Fusion zweier Lipiddoppelschichten kommt es zur Vereinigung der beiden Membranen und zur Durchmischung

der beiden durch sie eingeschlossenen Volumina. Zur Erklärung des Fusionsvorganges sind zwei verschiedene Modelle entstanden. Nach dem ersten Modell wird die erste wässrige Verbindung zwischen den beiden Membranen durch eine proteinöse Fusionspore gebildet, die einem Ionenkanal oder einer *gap-junction* ähnlich ist. Die Expansion der Fusionspore durch Eindringen von Phospholipidmolekülen stellt dann die Kontinuität der beiden Membranen her [2, 136]. Nach dem zweiten Modell läuft die Fusion durch das sequentielle Verschmelzen einzelner Lipidschichten ab. Zunächst wird Kontinuität zwischen den proximalen Lipidschichten hergestellt, während die distalen Lipidschichten getrennt bleiben. Dieser Zustand wird als *Hemifusion* bezeichnet und ist durch drei Charakteristika gekennzeichnet:

- Austausch von Lipidmolekülen zwischen den proximalen Lipidschichten
- kein Austausch von Lipidmolekülen zwischen den distalen Lipidschichten
- keine wässrige Verbindung zwischen beiden Kompartimenten, d.h. keine Vermischung der eingeschlossenen Volumina

Die bei der Hemifusion vorliegende χ -förmige Struktur wird als *stalk* bezeichnet. In weiteren Schritten kommt es nach diesem Modell zur Expansion des *stalk* in ein *hemifusion diaphragm*. Die Verschmelzung der distalen Lipidschichten führt zur Öffnung einer Fusionspore und zur Durchmischung der Lumina beider Kompartimente.

Die Annahme von proteinösen Fusionsporen gründet vor allem auf der Beobachtung, dass die elektrischen Eigenschaften der Fusionspore Parallelen zu denen von Ionenkanälen aufweisen, während ansonsten nur wenige Befunde dieses Modell unterstützen [87]. Das über das Hemifusionsintermediat ablaufende Szenario ist durch theoretische Modellrechnungen und experimentelle Befunde an reinen Phospholipidmembranen und zur viralen Fusion besser begründet. Deshalb sollen an dieser Stelle einige nähere Betrachtungen dazu folgen.

Die im *stalk*-Modell auftretenden Übergangszustände sind energetisch durch sogenannte Kontinuumsmodelle beschrieben worden, bei denen Lipiddoppelschichten als elastische Oberflächen beschrieben werden. Die dabei entstehenden starken Krümmungen führten in frühen Berechnungen zu unrealistisch hohen Energien für Übergangszustände [233]. Diese Mängel konnten durch Berücksichtigung von Biegung (*bending*) und Kippung (*tilting*) einzelner Phospholipidmoleküle teilweise behoben werden [121, 125]. Es sei aber betont, dass alle

Kontinuumsmodelle auf der Annahme bestimmter Intermediate beruhen, z.B. des *stalk*, diese jedoch nicht vorhersagen (zur Veranschaulichung der erwähnten Intermediate siehe Abbildung 1.1).

Hauptargument für das *stalk*-Modell ist der Einfluss der Lipidzusammensetzung auf die Krümmung von Membranen. Da Hemifusion zu einer negativen Gesamtkrümmung der Membran führt, sollten Phospholipide, die eine negative Krümmung induzieren oder stabilisieren, die Bildung eines *stalk* fördern. Aus Phosphatidylcholin aufgebaute Lipidmembranen fusionieren unter Standardbedingungen selbst dann nicht, wenn sie in sehr engen Kontakt gebracht werden (< 3 nm). Erst die Dehydrierung der Kontaktzone durch hohe Konzentrationen von Polyethylenglykol oder die Zugabe von millimolaren Mengen von Ca^{2+} -Ionen induzieren Fusion [47, 285]. In diesen proteinfreien Systemen, in denen die Fusion von künstlichen Phospholipidvesikeln (*Liposomen*) miteinander oder mit planaren Membranen gemessen wird, kann auch die Existenz von Hemifusionsintermediaten nachgewiesen werden [45], d.h. es wird die Vermischung proximaler Lipidschichten gemessen, ohne dass Fusionsporen oder die Mischung der distalen Lipidschichten beobachtet werden. Die Bildung des Hemifusionsintermediats ist dabei wie vorhergesagt abhängig von der Lipidzusammensetzung der proximalen Lipidschichten. Während Lipide, die spontan zu positiver Krümmung führen, Hemifusion verhindern (z.B. Lysophosphatidylcholin, LPC), fördern Phosphatidylethanolamin (PE) oder Ölsäure (OA), die eine negative Krümmung der Membran unterstützen, Hemifusion. Im Gegensatz dazu wird der Übergang von der Hemifusion zur Öffnung der Fusionspore durch Lipide in der distalen Lipidschicht beeinflusst, und zwar in umgekehrter Weise: Während LPC die Bildung der Fusionspore fördert, inhibieren PE und OA diesen Prozess.

Einige durch Kontinuumsmodelle beschriebene Intermediate wurden in letzter Zeit auch durch sogenannte *coarse grain*-Modelle beschrieben bzw. postuliert [109]. In diesen Modellen werden Lipidschichten nicht mehr als elastische Oberflächen beschrieben, sondern die Eigenschaften von Lipiddoppelschichten ergeben sich aus stark vereinfachten molekularen Modellen für einzelne Lipidmoleküle. So konnte die spontane Bildung von Lipiddoppelschichten [85] und von Mizellen [148, 171], sowie die Bildung von Fusionsporen [170] mit Hilfe dieser Modelle simuliert werden. Die dabei erzielten Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit den von der *stalk*-Hypothese beschriebenen Intermediaten, auch wenn die Struktur des *stalk* ungeordneter zu sein scheint als von den

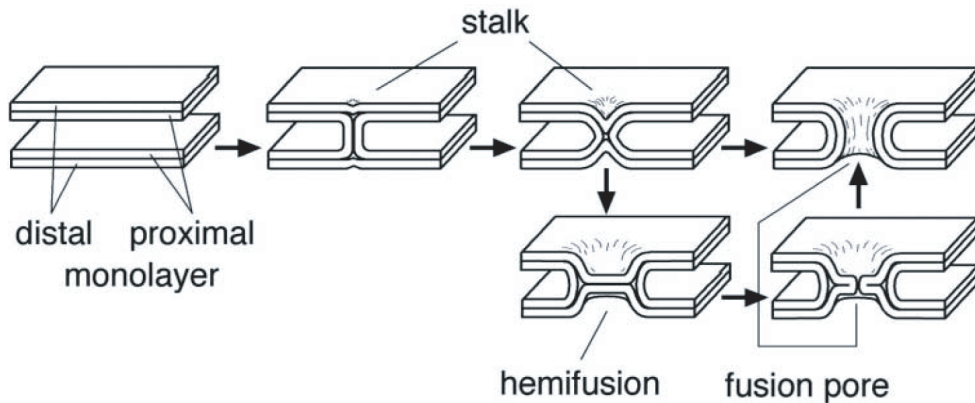


Abbildung 1.1 – Von der *stalk*-Hypothese vorgeschlagene Fusionsintermediate. Für Erklärungen siehe Text. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. Reinhard Jahn zur Verfügung gestellt.

Kontinuumsmodellen beschrieben.

Die Beobachtung, dass sich Fusionsporen hinsichtlich ihrer elektrischen Eigenschaften Ionenkanälen sehr ähnlich verhalten, ist hingegen nicht unbedingt ein Hinweis auf eine proteinöse Fusionspore. So konnte auch bei der Fusion von proteinfreien Membranen die transiente Öffnung von Fusionsporen gemessen werden, die den in biologischen Systemen gefundenen sehr ähnlich waren [35].

1.2 Die Membranfusion im sekretorischen Signalweg

Nach diesen einleitenden Worten zu physikalischen Modellen der Membranfusion folgen nun Betrachtungen zum Mechanismus intrazellulärer Fusionsreaktionen. In den letzten 15 Jahren haben sich dabei besonders zwei Modellsysteme als fruchtbar erwiesen und die Entdeckung einer großen Zahl von Proteinen ermöglicht, die an diesen Prozessen beteiligt sind: der sekretorische Weg in *Saccharomyces cerevisiae* und die Neuroexozytose an der Synapse und in neuroendokrinen Zellen. Aus Arbeiten an diesen Modellen ist deutlich geworden, dass drei Proteinfamilien für intrazelluläre Fusionsereignisse essentiell sind¹:

- SNARE-Proteine
- Sec1p und Munc-18 Homologe (SM-Proteine)

¹Die Fusionsreaktionen von Mitochondrien und Peroxisomen stellen dabei Spezialfälle dar, die an dieser Stelle nicht behandelt werden, da an diesen Prozessen andere Proteinfamilien beteiligt sind [34, 252].

- Rab-Proteine

Was ist die Funktion dieser Proteine im Fusionsprozess und wie wirken sie? In den nächsten Abschnitten werden die Erkenntnisse über den Fusionsprozess und die Rolle dieser drei Proteinfamilien in ihm zusammengefasst. Dabei konzentriere ich mich besonders auf die Rolle der SNAREs in der Calcium-abhängigen Exozytose in der Synapse und in neuroendokrinen Zellen, da ein tieferes Verständnis dieses Vorgangs in einem rekonstituierten System das Ziel meiner Arbeit war.

1.2.1 Die Rolle der Rab-Proteine im *membrane attachment*

Der Fusion selbst muss die spezifische Erkennung der zu fusionierenden Kompartimente vorangehen. Rab-Proteine sind für diesen Vorgang, der zur Etablierung eines Kontakts führt und der in der Literatur als *attachment*, *tethering* oder *docking* bezeichnet wird, als zentrale Faktoren erkannt worden [112, 147, 190].

Rab-Proteine sind kleine GTPasen, die über zwei Geranylgeranyl-Modifikationen in ihrer GTP-gebundenen Form membrangebunden sind. In ihrer GDP-gebundenen Funktion liegen sie cytosolisch an GDI (*guanine dissociation inhibitor*) gebunden vor. Die Kristallstrukturen von GDI-gebundenem prenyliertem Ypt1p zeigten, dass Komplexierung mit GDI die Geranylgeranylreste maskiert und die Dissoziation von GDP verhindert [192, 193]. Der Austausch von GDP gegen GTP wird durch GEFs (*guanine exchange factor*) katalysiert und ermöglicht die Bindung an die Membran. An diesem Prozess sind auch die bisher wenig charakterisierten GDFs (*GDI displacement factor*) beteiligt, die vor den GEFs wirken und GDI vom RabGDI-complex verdrängen sollen [190, 234]. Neben dieser Membranverankerung durch Geranylgeranylreste binden GTP-Rabs an sogenannte Rab-Effektoren. Rab-Proteine sind also bifunktionell und die Spezifität des *attachment* beruht auf zwei Erkennungsreaktionen: Zunächst muss Rab-GDP an der sogenannten Donormembran in Rab-GTP umgewandelt werden. In seiner GTP-gebundenen, membranständigen Form interagiert es mit Rab-Effektoren in der Zielfmembran. Eine große Zahl dieser Rab-Effektoren konnte in den letzten Jahren für verschiedene Transportschritte im sekretorischen Signalweg identifiziert werden. Erwähnt sei hier der Exocyst-Komplex, der beim *tethering* von post-Golgi Vesikeln an die Plasmamembran über das Rab-Protein Sec4p wichtig ist. Rab-GTP

bindet nicht nur an membrangebundene Effektoren. Die Rekrutierung von cytoplasmatischen Proteinen ist eine weitere wichtige Funktion [268, 280].

1.2.2 SNARE-Proteine

Nach der spezifischen Erkennung der Membranen und dem *attachment*-Prozess muss die Verschmelzung der beiden Membranen erfolgen. SNARE-Proteine sind für diesen Prozess essentiell, wie eine Reihe von Experimenten mit genetisch manipulierten Mäusen und die Arbeiten über verschiedene Neurotoxine, die spezifisch SNAREs angreifen, gezeigt haben.

SNARE-Proteine bilden eine Familie von kleinen, membrangebundenen Proteinen mit 25 Mitgliedern in *Saccharomyces cerevisiae*, 41 in *Homo sapiens* und 62 in *Arabidopsis thaliana* [118]. Ihre Domänenstruktur ist einfach, und ihr Charakteristikum ist das SNARE-Motiv, eine Sequenz von ca. 60 Aminosäuren, die in Heptad-Wiederholungen angeordnet sind. Über das SNARE-Motiv können SNAREs heterooligomere Komplexe bilden. Das *zipper*-Modell postuliert, dass die stark exergonische Bildung von SNARE-Komplexen die Membranfusion antreibt. In verschiedenen Membranen sitzende SNAREs bilden danach zunächst im N-terminalen, membrandistalen Teil ihrer SNARE-Motive Kontakte aus. In einer Art Reißverschlussbewegung dehnt sich dieser Kontakt in Richtung der membranproximalen Membrananker aus und zieht so beide Membranen zusammen, so dass sie schließlich verschmelzen [89, 183]. Im Folgenden werden die biochemischen und biophysikalischen Befunde zu SNARE-Proteinen zusammengetragen und die Belege für ihre essentielle Rolle im Fusionsprozess dargelegt.

1.2.2.1 Struktur von SNARE-Proteinen und ihre biophysikalischen Eigenschaften

Die meisten SNAREs sind über C-terminale Transmembransegmente in der Membran verankert. Viele besitzen N-terminal vom SNARE-Motiv selbständig faltende Domänen. Einige SNAREs sind nicht über Transmembransegmente in der Membran verankert sondern über posttranslatorische Lipidmodifikationen. Z.B. sind einige Mitglieder der SNAP-25-Subfamilie (*synaptosome associated protein of 25 kDa*), in denen zwei SNARE-Motive durch einen flexiblen Abschnitt verbunden sind, mehrfach in diesem Verbindungsstück palmitoyliert [97]. Das Hefe-SNARE Ykt6p ist durch Farnesylierung verankert [155].

Die biophysikalisch am besten charakterisierten SNAREs sind jene an der neu-

ronalen Exozytose beteiligten: Syntaxin 1 und SNAP-25, die beide in der Plasmamembran sitzen, und Synaptobrevin 2/VAMP2 (*vesicle associated membrane protein*), das in der Membran des synaptischen Vesikels verankert ist. Betrachtet man die isolierten SNARE-Motive dieser Proteine in Lösung, so weisen sie kaum Sekundärstruktur auf. Bei der Bildung des ternären Komplexes aus diesen drei Proteinen (im Folgenden als neuronaler SNARE-Komplex bezeichnet) kann über CD-Spektroskopie (Circulardichroismus) ein starker Anstieg der α -Helizität gemessen werden [68, 94]. Ähnliche Beobachtungen wurden auch mit den exozytotischen SNAREs aus *Saccharomyces cerevisiae* und den früh- und spätendosomalenen SNAREs gemacht [7, 77, 286].

Limitierte Proteolyse zeigte, dass der neuronale SNARE-Komplex aus zwei Domänen besteht [69], der N-terminalen Domäne von Syntaxin 1, ein autonom faltendes antiparalleles Drei-Helix-Bündel, H_{abc} -Domäne genannt [74, 133], und dem *core*-Komplex, der aus einem Vier-Helix Bündel besteht, das Eigenschaften von *coiled-coils* aufweist. Die Kristallstruktur des *core*-Komplexes zeigte, dass jede Helix von einem unterschiedlichen SNARE-Motiv gebildet wird [247]. Syntaxin 1 und Synaptobrevin steuern je eine Helix zum Komplex bei. Die beiden übrigen Helices, die durch einen flexiblen Abschnitt miteinander verbunden sind [144], werden von den SNARE-Motiven von SNAP-25 gebildet (Abb. 1.2). Das Innere des Helixbündels besteht aus 16 planaren Schichten interagierender und zumeist hydrophober Aminosäure-Seitenketten. Sie werden im Folgenden als *layer* bezeichnet. Eine Ausnahme bildet eine Schicht in der Mitte des Bündels (*0-layer*), die von drei Glutaminresten (SNARE-Motive von Syntaxin und SNAP-25) und einem Argininrest (SNARE-Motiv von Synaptobrevin) gebildet wird.

Zusätzlich zum neuronalen Komplex sind die Kristallstrukturen von zwei endosomalenen SNARE-Komplexen aufgeklärt worden [6, 286]. Trotz hoher Variabilität in den Primärsequenzen bilden diese SNARE-Komplexe strukturell konservierte Vier-Helix-Bündel aus, die in vielen Details große Ähnlichkeiten untereinander aufweisen. Dies lässt den Schluss zu, dass alle SNARE-Komplexe aus Helixbündeln ähnlicher Struktur bestehen. Sequenzvergleiche von SNAREs aus einer großen Zahl von Eukaryonten-Spezies ergab zudem, dass die vier an den *core*-Komplexen beteiligten SNARE-Motive konservierte Unterfamilien bilden, denen fast alle bekannten SNARE-Motive zugeordnet werden können [72, 118]. Die Unterfamilien werden als Qa-, Qb-, Qc-SNAREs (Glutamin im *0-layer*) und R-SNAREs (Arginin im *0-layer*) bezeichnet, und jeder funktionelle SNARE-

Komplex sollte demnach eine QaQbQcR-Zusammensetzung aufweisen.

Der *core*-Komplex ist bemerkenswert stabil. Die mittlere Schmelztemperatur

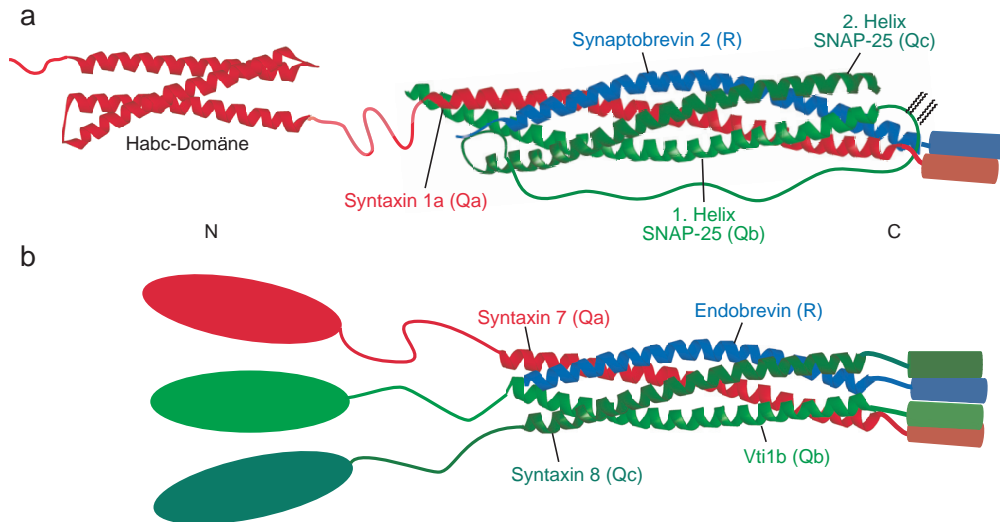


Abbildung 1.2 – Modelle des neuronalen und spätendosomal SNARE-Komplexes. **(a)** Der neuronale *core*-Komplex besteht aus einem Vier-Helix-Bündel. Die beiden Helices von SNAP-25 und die *H_{abc}*-Domäne und das SNARE-Motiv von Syntaxin 1a sind über flexible *linker* miteinander verbunden. Syntaxin und Synaptobrevin haben jeweils eine C-terminale Transmembranregion, SNAP-25 ist über Palmitoyl-Modifikationen in der Membran verankert. **(b)** Der *core*-Komplex des spätendosomal SNARE-Komplexes besteht aus einem sehr ähnlichen Vier-Helix-Bündel, zu dem Endobrevin, Syntaxin 7, Vti1b und Syntaxin 8 je eine Helix beisteuern. Alle vier SNAREs haben eine C-terminale Transmembranregion. Transmembranregionen sind als Zylinder dargestellt, unstrukturierte Abschnitte als Linien. Das Bild hat freundlicherweise Dr. Dirk Fasshauer zur Verfügung gestellt.

beträgt 89°C , wie anhand von Änderungen der α -Helizität CD-spektroskopisch gezeigt wurde [67, 240]. Gegen Behandlung mit Harnstoff und Natriumdodecylsulfat ist er bis zu Konzentrationen von 9M bzw. 2% (w/v) resistent. Das chaotrope Reagenz Guanidiniumhydrochlorid denaturiert den Komplex erst ab einer Konzentration von ca. 5M [67]. Neben dieser thermodynamischen Stabilität ist auch die kinetische Stabilität charakteristisch: Einmal assembliert zerfällt der Komplex auch über einen langen Zeitraum nicht messbar, d.h. unter Standardbedingungen steht der Komplex nicht in einem dynamischen Gleichgewicht mit freien Monomeren [67]. Weiterhin weisen De- und Renaturierung eine ausgesprochene Hysterese auf: Während der Komplex bei 89°C denaturiert, reassembliert er erst bei Absenkung der Temperatur auf etwa 63°C [67]. Dieses Verhalten ist ein Hinweis darauf, dass die Assemblierung über Zwischenstufen abläuft, die thermisch weniger stabil sind als der vollständig assemblierte Komplex.

1.2.2.2 Der Konformationszyklus der SNARE-Proteine

Die Bildung des ternären SNARE-Komplexes aus löslichen SNARE-Fragmenten erfolgt mit $\approx 6000M^{-1}s^{-1}$ relativ langsam [70, 165]. Der Grund dafür muss in dem komplizierten Konformationszyklus und Assemblierungsprozess der SNARE-Proteine gesucht werden (für eine Überblicksdarstellung siehe Referenzen [65, 110, 258]). Der Konformationszyklus der SNAREs ist schematisch in Abbildung 1.3 gezeigt.

SNARE-Cluster in der Plasmamembran Untersuchungen in der Phaeochromocytoma-Zelllinie PC12 zeigten, dass Syntaxin 1 und SNAP-25 in der Plasmamembran nicht als Monomere vorliegen, sondern in Clustern [131]. Auch für andere Mitglieder der Syntaxin-Familie sind solche Cluster beschrieben worden [141, 231]. Syntaxin 1-Cluster sind 50-60 nm groß und bestehen aus ca. 75 dicht gepackten Syntaxin-Molekülen [232]. Ihre Interaktion wird über das SNARE-Motiv vermittelt [231]. Während die Cluster selbst relativ immobil sind, können einzelne Syntaxin-Moleküle zwischen Clustern wandern [232]. Die Funktion der Oligomerisierung von Syntaxin in der Membran ist unklar.

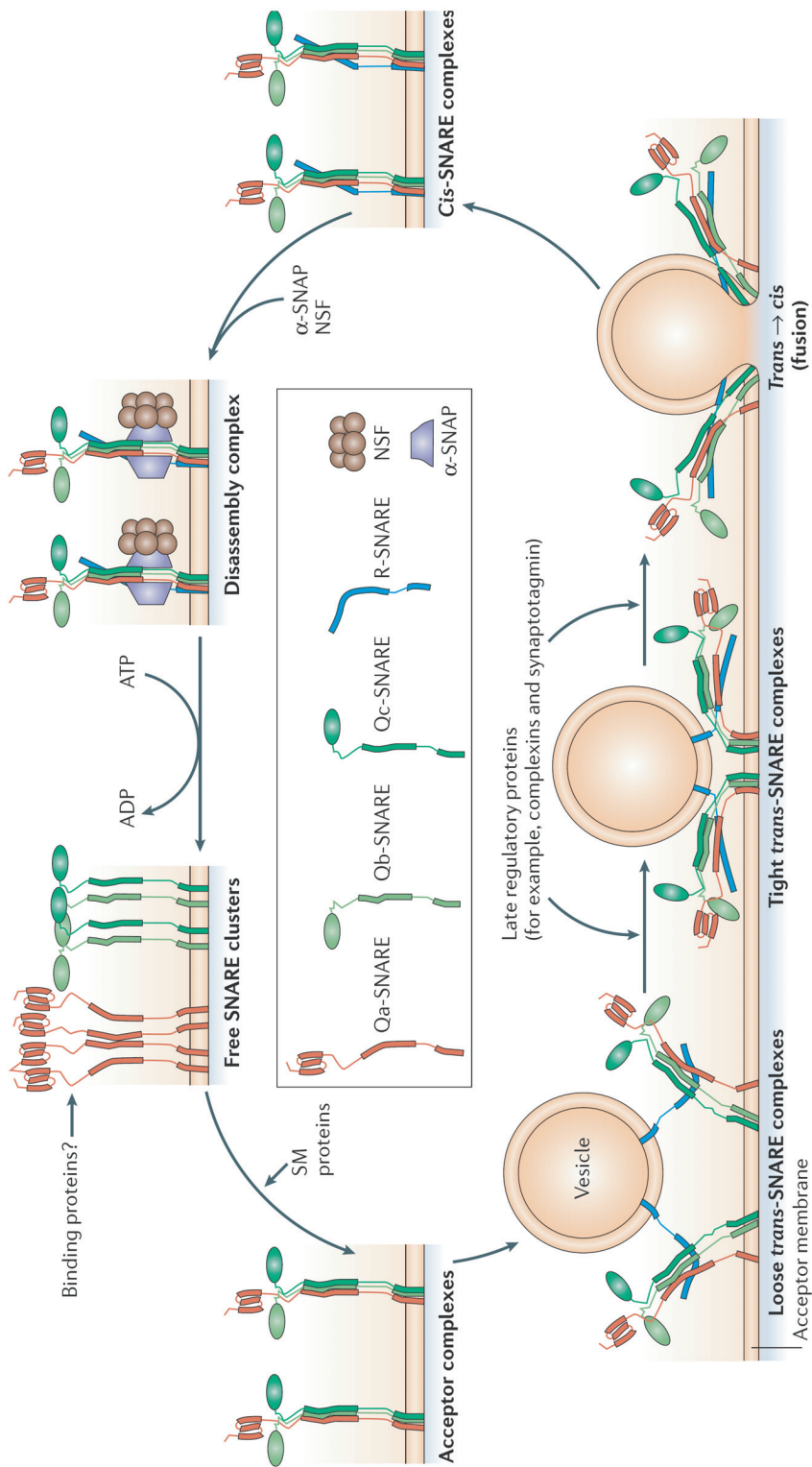


Abbildung 1.3 – Schematische Darstellung des Konformationszyklus der SNARE-Proteine. Für Erklärungen siehe Text. Die Abbildung wurde mit Genehmigung von Dr. Reinhard Jahn der Referenz [111] entnommen.

Die geschlossene Konformation von Syntaxin und die SM-Proteine

Syntaxins N-terminale H_{abc} -Domäne ist mit dem SNARE-Motiv über einen ca. 50 Aminosäuren langen Abschnitt verbunden. NMR- und Fluoreszenzeinzel-molekülspektroskopie zeigten, dass die H_{abc} -Domäne mit dem SNARE-Motiv interagiert. Diese Konformation von Syntaxin wird als *geschlossen* bezeichnet [60]. Sie steht mit der offenen Konformation, in der die H_{abc} -Domäne und das SNARE-Motiv nicht direkt interagieren, in einem dynamischen Gleichgewicht. Experimente mit dem cytosolischen Fragment von Syntaxin 1 zeigten, dass etwa 70% der Syntaxinmoleküle in der offenen Konformation vorliegen [146]. Auch Sso1p, das Syntaxin-Homolog in *Saccharomyces cerevisiae*, und Syntaxin 7, das Syntaxin-Homolog in der Fusion von späten Endosomen, nehmen eine geschlossene Konformation ein [5, 77]. In Sso1p ist sie so stabil, dass ihre Struktur, ein antiparalleles Vier-Helix-Bündel, röntgenkristallographisch ermittelt werden konnte [164]. Die geschlossene Konformation ist jedoch nicht für alle Syntaxine konserviert: Die Hefe-SNAREs Vam3p, Tlg2p und Pep12p nehmen nach NMR-spektroskopischen Untersuchungen eine offene Konformation ein [61, 62].

Syntaxin 1 bildet mit dem SM-Protein Munc18-1 einen Komplex mit einer Stöchiometrie von 1:1 [92, 189]. Die Kristallstruktur dieses Komplexes zeigt, dass Munc-18 an Syntaxin in der geschlossenen Konformation bindet [161]. Pevsner et al. zeigten außerdem, dass die Bindung von Munc18 an Syntaxin die Bildung von SNARE-Komplexen verhindert [189].

Die Interaktion des Hefe-SNAREs Sso1p mit seinen Partnern Sec9p und Snc1/2p erfolgt ebenfalls sehr langsam. Hingegen bildet ein Sso1-Fragment, in dem die H_{abc} -Domäne fehlt, den SNARE-Komplex etwa 2000mal schneller [165]. In Syntaxin 1 hat diese Mutation einen ähnlichen Effekt, beschleunigt die Assemblierung jedoch nur um einen Faktor von zehn [146]. Die geschlossene Konformation scheint also eine Interaktion des Qa-SNAREs mit seinen SNARE-Partnern auszuschließen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die geschlossene Konformation von Syntaxinen, im Falle von Syntaxin 1 stabilisiert durch die Interaktion mit Munc18, einen wichtigen Kontrollpunkt bei der Assemblierung des SNARE-Komplexes darstellt.

Die beschriebenen biochemischen Befunde zu Munc18 suggerieren, dass es ein negativer Regulator der Exozytose ist. Physiologie und Genetik zeigen jedoch klar, dass Munc-18 und seine Homologe in anderen Transportschritten essentiell für die Membranfusion sind (für Überblicksdarstellungen siehe Referenzen [80, 202]). Deletionen von SM-Proteinen in *Saccharomyces cerevisiae*, Invertebra-

ten und Vertebraten inhibieren stets die korrespondierenden Fusionsreaktionen [91,102,173,175,260]. Die Wirkungsweise der SM-Proteine gibt weiterhin Rätsel auf und wird dadurch verkompliziert, dass die Bindung an die geschlossene Konformation des jeweiligen Syntaxins nicht konserviert zu sein scheint. So bindet Sec1p den vollständig assemblierten SNARE-Komplex nicht jedoch monomeres Sso1p [33]. Für andere SM-Proteine ist eine ausschließliche Bindung an ein N-terminales Peptid vor der H_{abc} -Domäne beschrieben [61,275]. Eine mögliche Funktion von SM-Proteinen könnte die Stabilisierung von Qabc-Intermediaten sein, die als Bindungsstellen für R-SNAREs dienen [30,50,185,283].

Das Qabc-Intermediat Bei der Bildung des exozytotischen SNARE-Komplexes in *Saccharomyces cerevisiae* muss Sso1p zunächst mit dem Qbc-SNARE Sec9p interagieren, bevor das R-SNARE Snc1/2p binden kann [165]. Ebenso legt die Hysterese von SNARE-Komplexbildung und -zerfall nahe, dass ein Syntaxin 1/SNAP-25-Intermediat die Bindungsstelle für Synaptobrevin bildet [67]. Doch während Sso1p und Sec9p einen Komplex mit einer 1:1 Stöchiometrie bilden, liegt der Syntaxin/SNAP-25-Komplex in einer 2:1 Stöchiometrie vor [71]², in dem das zweite Syntaxinmolekül die Bindungsstelle von Synaptobrevin einnimmt [144,271,281]. Dies liegt offensichtlich darin begründet, dass das SNARE-Motiv von Syntaxin dazu tendiert, *coiled-coil*-Interaktionen relativ unspezifisch einzugehen. So konnten auch homooligomere Komplexe und solche mit nur der ersten Helix von SNAP-25 mit einer 2:2 Stöchiometrie nachgewiesen werden [144,160,162].

Mit einer Kombination von fluoreszenz- und CD-spektroskopischen Methoden zeigten Fasshauer und Margittai, dass die Interaktion von Syntaxin und SNAP-25 im N-terminalen Bereich dieser beiden Proteine initiiert wird und dass dieser Schritt, bei dem drei Helices miteinander interagieren müssen, geschwindigkeitsbestimmend für die Komplexbildung ist. Sie zeigten weiterhin, dass bei einem molaren Überschuss an Syntaxin die Bindung von Synaptobrevin an das Syntaxin/SNAP-25-Intermediat inhibiert wird. Dieses Ergebnis legte den Schluss nahe, dass der neuronale SNARE-Komplex ähnlich dem Hefe-Komplex über ein Qabc-Intermediat assembliert. Diese Annahme wird durch Bindungsstudien an isolierten Plasmamembranen und durch *live-cell imaging* gestützt [3,132], wobei allerdings darauf hingewiesen werden muss, dass auch Intermediate anderer Zusammensetzung (SNAP-25/Synaptobrevin) diskutiert

²Im Folgenden bezeichne ich diesen Komplex kurz als 2:1-Komplex.

werden [43]. Ein weiteres Beispiel für ein Qabc Intermediat sind die bei der Fusion von Vesikeln im retrograden Transport zum endoplasmatischen Reticulum in *Saccharomyces cerevisiae* involvierten SNAREs Ufe1p (Qa), Sec20p (Qb) und Use1p (Qc), die in einem stabilen Komplex mit dem Dsl-Multiproteinkomplex vorliegen [122].

Partiell assemblierte SNARE-Komplexe Die Befunde, dass freie SNARE-Monomere in verschiedenen Kompartimenten lokalisiert sind und dass die Assemblierung des Komplexes zur Ausbildung eines parallelen Vier-Helix-Bündels von großer Stabilität führt [89,135], mündeten in der Entwicklung des sogenannten *zipper*-Modells zur Erklärung der Funktion von SNARE-Proteinen bei der Membranfusion [88,183]. Obwohl partiell assemblierte *trans*-Komplexe, bei denen die Transmembranregionen noch in verschiedenen Membranen sitzen, die SNARE-Motive aber schon miteinander interagieren, konzeptionell von zentraler Bedeutung für das *zipper*-Modell sind, liegen kaum direkte Belege für ihre Existenz vor. Partiell assemblierte Komplexe der neuronalen SNAREs, die in Abbildung 1.2 als *loose* und *tight trans complexes* bezeichnet werden, sind besonders in der neuronalen Exozytose wichtig, wo sie als Bindungspartner für Complexine und Synaptotagmin diskutiert werden. Ich werde dieses Problem ausführlich im Zusammenhang mit meinen in dieser Arbeit präsentierten Daten behandeln.

Dissoziation der SNARE-Proteine Wie erwähnt, ist die außergewöhnliche kinetische Stabilität ein Charakteristikum für SNARE-Komplexe. In der Zelle werden SNARE-Komplexe durch einen Multiproteinkomplex aus α -SNAP (und seinen Homologen β - und γ -SNAP) und der AAA+-ATPase NSF (*N-ethylmaleimid-sensitive factor*) unter ATP-Hydrolyse in Monomere zerlegt [236]. Historisch gesehen war dieser Komplex aus NSF, SNAPs und den SNARE-Proteinen von großer Wichtigkeit für die Entdeckung der SNARE-Proteine [237]. NSF selbst bindet nicht an den SNARE-Komplex, sondern die Bindung wird durch drei α -SNAP-Moleküle vermittelt [151]. Mechanistisch ist das *disassembly* jedoch nicht verstanden (für eine Überblicksdarstellung siehe Referenz [90]).

1.2.2.3 Physiologische Befunde für die Rolle der SNARE-Proteine in der Membranfusion

Das *zipper*-Modell liefert eine plausible biologische Erklärung für die Tatsache, dass interagierende SNARE-Proteine vor der Fusion in den beiden gegenüberliegenden Membranen lokalisiert sind. Es erklärt die außerordentliche Stabilität von SNARE-Komplexen als den Endpunkt einer stark exergonischen Assoziation von Proteinen, wobei die freiwerdende Konformationsenergie zur Überwindung der Energiebarriere bei der Fusion benutzt wird. Die zentrale Rolle der SNARE-Proteine als Katalysatoren der Fusion wird jedoch nicht nur durch *in-vitro* erhobene biochemische und strukturelle Befunde gestützt, sondern auch durch physiologische und genetische Ansätze, die in den folgenden Abschnitten näher erläutert werden.

Clostridiale Neurotoxine Einer der stärksten Belege für eine essentielle Rolle der SNARE-Proteine bei der Fusion stammt aus Arbeiten mit clostridialen Neurotoxinen (CNTs). *Clostridium botulinum* sezerniert sieben serologisch verschiedene Neurotoxine, genannt Botulinumneurotoxine (BoNT) A, B, C1, D, E, F und G, *Clostridium tetani* das Tetanustoxin (TeNT). Alle CNTs dringen über rezeptorvermittelte Endozytose in Motorneuronen ein. Doch während Botulinumtoxine in peripheren Neuronen verbleiben und die Signalübertragung an der neuromuskulären Endplatte inhibieren, wird TeNT retrograd transportiert und inhibiert die Neurotransmitterfreisetzung von glycinergen, inhibitorischen Interneuronen im Zentralschmerzsystem (für eine Überblicksdarstellung sei auf Referenz [215] verwiesen). Der Befund, dass alle CNTs das für Metalloproteasen typische Motiv His-Glu-X-X-His enthalten [124], eröffnete den Weg zur Entdeckung ihrer Substrate, der SNARE-Proteine.

Alle CNTs werden zunächst als etwa 150 kDa große Polypeptide synthetisiert, die posttranslational proteolytisch aktiviert werden. Die aktive Form jedes dieser Toxine besteht aus einer ca. 50 kDa großen leichten Kette, die die proteolytische Aktivität trägt, und einer ca. 100 kDa großen schweren Kette. Beide Ketten sind über Disulfidbrücken und nichtkovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden. Nach der Bindung an neurospezifische Rezeptoren dringen CNTs über rezeptorvermittelte Endozytose in endosomale Kompartimente ein. Translokation ins Cytoplasma führt zur Trennung der leichten Kette von der schweren Kette im reduzierenden Milieu [163, 216]. Im Cytoplasma spalten die verschiedenen CNTs dann hochspezifisch die drei verschiedenen exozytotischen

SNARE-Proteine:

- **Syntaxin** wird von BoNT/C1 geschnitten [20],
- **SNAP-25** von den BoNTs A, C1 und E [19, 78, 217],
- und **Synaptobrevin** von den BoNTs B, D, F und G und von Tetanustoxin [137, 213, 217, 218, 276, 277].

Alle CNTs sind Zinkproteasen und ähneln in ihrem aktiven Zentrum Thermolysin, wie Kristallstrukturen der leichten Ketten zeigten [1, 26, 128, 248]. Ihre unübertroffene Substratspezifität ist darauf zurückzuführen, dass CNTs neben der Schnittstelle weitere Regionen ihrer Substrate spezifisch erkennen. Die Struktur von BoNT/A im Komplex mit einem Fragment von SNAP-25 zeigt eindrucksvoll, dass sich diese sogenannten *exosites* über das gesamte zweite SNARE-Motiv von SNAP-25 erstrecken und dass die Substratbindung außerdem eine Konformationsänderung im aktiven Zentrum der Protease induziert [25, 27].

CNTs spalten ihre SNARE-Substrate im C-terminalen Bereich des SNARE-Motivs nahe der Plasmamembran und verhindern dadurch die Bildung von SNARE-Komplexen. Vollständig assemblierte Komplexe sind hingegen gegenüber proteolytischer Spaltung durch Toxine resistent [93, 176]. Für die Etablierung der Rolle der SNARE-Proteine in einem späten Schritt der Fusionsreaktion, also nach Abschluss des *attachment*-Prozesses, waren Befunde entscheidend, dass CNTs zwar die Ca^{2+} -induzierte Exozytose inhibieren, die Feinstruktur der Synapse aber unverändert bleibt. So zeigen elektronenmikroskopische Studien an der neuromuskulären Endplatte von Mäusen und an Riesenneuronen von Tintenfischen nach Vergiftung mit TeNT oder BoNT/B keine Veränderung der Zahl von synaptischen Vesikeln in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran, während die durch Aktionspotentiale induzierte Transmitterfreisetzung nahezu vollständig inhibiert ist [59, 106]. Die Expression der leichten Kette von TeNT in Neuronen von *Drosophila melanogaster* resultiert in einem Verlust der Ca^{2+} -induzierten Neurotransmitterfreisetzung, während die spontane Freisetzung erhalten bleibt [249]. Auch in dieser Studie zeigte sich, dass die Morphologie der Synapse in TeNT-exprimierenden Zellen unverändert bleibt.

Genetische Manipulation von SNAREs Auch genetische Manipulationen von SNAREs in verschiedenen Modellorganismen unterstützen die Hypothese,

dass SNARE-Komplexbildung bei der Fusion eine zentrale Rolle spielt. In Abwesenheit des Drosophila-Homologs von Syntaxin 1A, *syx-1A*, ist die Neurotransmitterfreisetzung vollständig inhibiert [28,225], eine Null-Mutation im Synaptobrevin 2 Homolog, *n-syb*, führt zum vollständigen Verlust der Ca^{2+} -induzierten Neurotransmitterfreisetzung und reduziert die spontane um 75% [56]. Gleichzeitig zeigten wiederum elektronenmikroskopische Studien, dass die Morphologie der Synapse erhalten bleibt [28]. Auch bei einer temperatursensitiven *syx-1A* Mutante ist die Fusion von Vesikeln gehemmt: Eine Punktmutation in *syx-1A* im *layer +7* (T254) führt bei nichtpermissiver Temperatur zu einer Blockierung der synaptischen Transmission. Gleichzeitig werden weniger SDS-resistente SNARE-Komplexe detektiert. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten in dieser Arbeit, dass sowohl die Zahl der synaptischen Vesikel in der Nervenendigung als auch die Zahl der am sogenannten *T-bar* angelagerten Vesikel deutlich erhöht ist. Eine in derselben Arbeit untersuchte NSF-Mutante (Punktmutation G274 in der D1 Domäne), die Defekte bei der Disassemblierung von SNARE-Komplexen aufweist, zeigt ultrastrukturell einen sehr ähnlichen Phänotyp. Die Zahl der SNARE-Komplexe ist im Gegensatz zur Syntaxin-Mutante deutlich erhöht im Vergleich zum Wildtyp. Die Arbeit zeigt eindrucksvoll, dass der Kreislauf von Assemblierung und Disassemblierung der SNARE-Proteine für die synaptische Transmission essentiell ist [139]. Auch Untersuchungen an Syntaxin- und Synaptobrevinmutanten in *Caenorhabditis elegans* lassen diesen Schluss zu [172,207].

Die Deletion von Synaptobrevin 2 in Mäusen führt in hippocampalen Neuronen zu einem nahezu vollständigen Verlust der Ca^{2+} -induzierten Neurotransmitterfreisetzung, während die spontane Freisetzung von Neurotransmitter nur um den Faktor 10 reduziert ist [220]. Auch Untersuchungen in *Saccharomyces cerevisiae* haben gezeigt, dass das *membrane attachment* der SNARE-Interaktion vorausgeht. So war die *attachment*-Reaktion bei der Fusion von Vesikeln, die *cargo* vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat transportieren, zwar abhängig vom Rab-Protein Ypt1p und seinem Effektor Uso1p, aber temperatursensitive Mutanten der an diesem Fusionsschritt beteiligten SNARE-Proteine Sed5p, Bet1p und Bos1p und im SM-Protein Sly1p hatten lediglich einen Einfluss auf die nachfolgende Fusionsreaktion [31].

Die Hypothese, dass SNARE-Proteine eine zentrale Rolle bei der Membranfusion spielen, wird weiterhin durch Experimente an permeabilisierten PC12 Zellen gestützt, einer immortalisierten neuroendokrinen Zelllinie. Chen et al.

inhibierten Exozytose durch Intoxikation mit BoNT/E. Nach Auswaschen des Toxins konnten sie die Exozytose durch Inkubation mit einem C-terminalen Fragment von SNAP-25 wiederherstellen [42]. Es wurde außerdem gezeigt, dass Mutationen in den hydrophoben *layers* des SNAP-25 Fragments, die zu einer Destabilisierung von *in vitro* gebildeten SNARE-Komplexen führen, auch die Wiederherstellung der Exozytose beeinträchtigen [42, 210]. Xu et al. zeigten, dass in chromaffinen Zellen ein gegen den N-Terminus von SNAP-25 gerichteter monoklonaler Antikörper bzw. sein F_{ab} -Fragment, die die Bildung von SNARE-Komplexen *in vitro* inhibieren, auch die Exozytose inhibieren [274]. Diese Arbeiten zeigen also, dass die Fähigkeit der SNARE-Proteine, stabile Komplexe zu bilden, mit der Fusionsaktivität korreliert.

Fusion ohne SNAREs Die Tatsache, dass in Synaptobrevin-Deletionsmutanten von *C. elegans*, *D. melanogaster*, und Maus die spontane Freisetzung von Neurotransmitter (Miniatur-Endplattenpotentiale) nicht gehemmt ist, wird häufig als Argument gegen eine essenzielle Funktion der SNARE-Proteine bei der Fusion verwendet. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere R-SNAREs die Funktion von Synaptobrevin zumindest teilweise ersetzen können. In chromaffinen Zellen führt ein Doppel-*knock-out* von Synaptobrevin und seinem Homolog Cellubrevin zu einer vollständigen Hemmung auch der spontanen Fusion von Granula. Auch hier waren keine morphologischen Veränderungen der periplasmatischen Zone feststellbar [21]. Im Gegensatz dazu ist die spontane Freisetzung in hippocampalen Neuronen im Synaptobrevin 2/Cellubrevin Doppel-*knock-out* nicht völlig inhibiert [55]. Deak et al. postulierten jedoch, dass ein weiteres R-SNARE für diese Restaktivität verantwortlich sein könnte.

Sehr interessant ist in diesem Zusammenhang eine Beobachtung aus *Saccharomyces cerevisiae*: Der Phänotyp der Deletion der beiden Synaptobrevin-Homologe Snc1p und Snc2p kann zum Teil durch Mutationen in Genen, die im Fettsäurestoffwechsel wirken und Veränderungen der Lipidzusammensetzung von Membranen bewirken, supprimiert werden. Eine Veränderung der Lipidkomposition der Membran scheint also dazu zu führen, dass das R-SNARE entbehrlich wird.

Daneben stellen einige Befunde zur Funktion der vakuolären V-ATPase eine Rolle der SNAREs bei der eigentlichen Fusion in Frage [14, 188]. Diese Arbeiten postulieren, dass die V_0 -Untereinheit der V-ATPase nach der Bildung von

trans-Komplexen agiert und proteinöse Fusionsporen bildet.

1.3 Die Rolle von Syntaptotagmin bei der Ca^{2+} -induzierten Exozytose

Neuronen kommunizieren durch die Freisetzung von Neurotransmitter-Molekülen an der Synapse. Neurotransmitter werden in der präsynaptischen Zelle in synaptischen Vesikeln gespeichert. Aktionspotentiale führen zu einem Einstrom von Calcium durch spannungsgesteuerte Calciumkanäle. Die Erhöhung der Calciumkonzentration in der präsynaptischen Zelle induziert die Fusion von synaptischen Vesikeln mit der Plasmamembran und die Freisetzung des Neurotransmitters, der nach Diffusion durch den synaptischen Spalt an Rezeptoren in der postsynaptischen Membran bindet [98, 99, 113, 114].

Nach gängigen Modellen zur Ca^{2+} -induzierten Neurotransmitterfreisetzung folgt der Bindung von synaptischen Vesikeln an die Plasmamembran eine Serie von ATP- und Ca^{2+} -abhängigen Reifungsreaktionen, die kollektiv als *priming* bezeichnet werden. Dies schließt auch die Bildung von partiell assemblierten *trans*-Komplexen ein. Untersuchungen an Neuronen und neuroendokrinen Zellen führten zu der Vorstellung, dass Vesikel in distinkten Populationen (*pools*) vorliegen, die die Reifungsreaktionen teilweise oder vollständig durchlaufen haben, und daher differentiell auf einen Anstieg der präsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration reagieren. Die Freisetzung des Neurotransmitters erfolgt im Wesentlichen in zwei Phasen: Die erste wird als synchron bezeichnet und folgt dem Anstieg der Calciumkonzentration mit einer Verzögerung von 100-500 μs und ist nur von kurzer Dauer [206]. Die Vesikelpopulation, aus der sich diese Phase speist, wird als *readily-releasable pool* bezeichnet. Die zweite, asynchrone Phase weist eine größere Verzögerung auf, hält länger an und speist sich aus einer Vesikelpopulation, die zu Beginn des Stimulus noch nicht alle *priming*-Reaktionen durchlaufen hat [195, 204, 244].

Zwar können auch in Abwesenheit einer erhöhten Calciumkonzentration einige Fusionsereignisse registriert werden (sogenannte spontane Freisetzung), aber die Freisetzung von Neurotransmitter ist durch Calcium stark beschleunigt. Diese Tatsache macht das Vorhandensein eines oder mehrerer molekularer Sensoren für Calcium notwendig. Für die synchrone Neurotransmitterfreisetzung sind Syntaptotagmin 1 und seine Homologen Syntaptotagmin 2 und 9 die besten Kandidaten, während der Calciumsensor für den asynchronen Teil bisher nicht

identifiziert worden ist.

1.3.1 Biochemische Befunde

Zur Zeit sind 16 Synaptotagmin-Isoformen in den Genomen von Maus und Mensch bekannt [52]³. Synaptotagmine sind durch zwei C-terminale C2-Domänen und eine N-terminale Transmembranregion charakterisiert [186]. C2-Domänen wurden in einer Vielzahl von Proteinen gefunden, nachdem sie zunächst in Proteinkinase C als *second constant sequence* identifiziert worden waren [51]. Die Kristall- und NMR-Strukturen der C2A- und der C2B-Domäne von Synaptotagmin 1 und anderen C2-Domänen zeigen, dass sie als ein einfaches sogenanntes *Greek-key-motif* organisiert sind, das aus 8 antiparallelen β -Faltblättern besteht, die über flexible *loops* miteinander verbunden sind [73,245,246]. Die typische Funktion von C2-Domänen ist die Ca^{2+} -abhängige Bindung an Membranen, die saure Phospholipide enthalten (für eine Übersichtsdarstellung siehe Referenz [48]).

Bei Synaptotagmin 1, das in der Membran des synaptischen Vesikels lokalisiert ist, bindet die C2A-Domäne drei, die C2B-Domäne zwei Ca^{2+} -Ionen. Die Calcium-bindenden Reste liegen dabei in den flexiblen *loops* an der Spitze der C2-Domänen. Da die Koordinationsstellen für Calciumionen von diesen Resten nur unvollständig besetzt werden, wird Ca^{2+} nur mit mittlerer Affinität gebunden. Basierend auf den chemischen Verschiebungen in NMR-Titrationsexperimenten wurden die Reste D172, D178, D230, D232, S235 und D238 in der C2A-Domäne und D303, D309, D363, D365 und D371 in der C2B-Domäne als Ca^{2+} -bindend identifiziert. Die Affinitäten für die drei Ca^{2+} -Ionen der C2A-Domäne sind demnach $\approx 60\text{-}75 \mu\text{M}$, $\approx 400\text{-}500 \mu\text{M}$ und mehr als 1 mM, für die beiden Ca^{2+} -Ionen der C2B-Domäne $\approx 300\text{-}600 \mu\text{M}$ [73,257]. Abbildung 1.4 zeigt die NMR- und Kristallstrukturen der C2A- und C2B-Domäne in ihrer Ca^{2+} -gebundenen Form.

Interaktion von Synaptotagmin mit Lipiden Perin et al. zeigten, dass Synaptotagmin mit Lipiden interagiert [187] und Brose et al. später, dass diese Bindung Ca^{2+} -abhängig ist und erbrachten damit den ersten Beleg dafür, dass Synaptotagmin einen Ca^{2+} -Sensor auf der Membran des synaptischen Ve-

³Der Fokus dieser Arbeit liegt auf Synaptotagmin 1, der am besten charakterisierten Synaptotagmin-Isoform. Im Folgenden werde ich die Begriffe Synaptotagmin 1 und Synaptotagmin synonym verwenden.

sikels darstellt [29]. Nach den im Folgenden präsentierten Arbeiten können die durch die Ca^{2+} -Bindung an Synaptotagmin ausgelösten Änderungen des Ladungsmusters als eine Art *electrostatic switch* bezeichnet werden: Ca^{2+} -Bindung neutralisiert negative Ladungen in den bindenden *loops*, führt dadurch zu einer insgesamt positiven Oberflächenladung und ermöglicht die Interaktion mit anionischen Phospholipiden [228]. Gleichzeitig komplettieren die anionischen Kopfgruppen der Phospholipide die unvollständige Koordinierung der Ca^{2+} -Ionen durch Aspartate und Serine in Synaptotagmin und erhöhen dadurch die Affinität für Ca^{2+} im membrangebundenen Zustand [256, 282].

Die Interaktion der C2-Domänen mit sauren Phospholipiden wurde eingehend untersucht (für eine Überblicksdarstellung siehe Referenz [254]). So wurde gezeigt, dass beide Domänen in ihrer Ca^{2+} -gebundenen Form in die Phospholipid-Doppelschicht eindringen. Chapman et al. führten Tryptophanreste in die Ca^{2+} -bindenden *loops* der C2A-Domäne ein und untersuchten das Ausmaß der Fluoreszenzlöschung durch Doxyl-Markierungen, die an unterschiedlichen Positionen der Fettsäurereste von Phosphatidylcholin angebracht waren. Auf der Grundlage dieser Untersuchungen wurde die Eindringtiefe auf $\frac{1}{6}$ der Doppelschichtdicke geschätzt [38]. Untersuchungen mit EPR-Spin-Markierungen bestätigten diese Befunde und erlaubten außerdem Aussagen über die Orientierung der C2A-Domäne an der Membran [79]. Die Bindung der isolierten C2B-Domäne an die Membran wird kontrovers diskutiert: So zeigen einige Arbeiten nur eine geringe Affinität für Phosphatidylcholin/-serin-Liposomen in Gegenwart von Ca^{2+} [13, 63, 214], während in anderen Arbeiten eine Affinität ähnlich der der C2A-Domäne festgestellt wurde [73]. EPR-Spin-Markierungsexperimente zeigten, dass auch die isolierte C2B-Domäne in die Phospholipiddoppelschicht eindringt, auch wenn die Signale etwas verrauschter waren als für die C2A-Domäne [205]. Diese Studie widersprach allerdings einer früheren Untersuchung, in der die Penetration der Membran durch die C2B-Domäne fluoreszenzspektroskopisch untersucht worden war [13]. Während Fernandez et al. diese Diskrepanzen einer Kontamination mit Nukleinsäuren in aus *E. coli* aufgereinigter C2B-Domäne zuschrieben [73], zeigten Hui et al., dass die Interaktion der isolierten C2B-Domäne mit der Membran sensitiver auf Änderungen der Ionenstärke reagiert [105].

Es wurde weiterhin beschrieben, dass die Eigenschaften der C2B-Domäne durch die Anwesenheit der C2A-Domäne beeinflusst werden. So zeigten Bai et al. dass das C2AB-Fragment Phospholipide bindet, auch wenn Ca^{2+} -Bindung an

die C2A-Domäne durch Mutagenese beseitigt war [13]. Auch die Sensitivität gegenüber einer Erhöhung der Ionenstärke war in diesem Fall weniger stark ausgeprägt [105]. Diese Arbeiten führten zu dem Schluss, dass beide C2-Domänen eine gewisse Kooperativität der Lipidbindung aufweisen. Unterstützung fand diese Hypothese wiederum in EPR-Spin-Markierungsexperimenten mit dem C2AB-Fragment, die zeigten, dass die beiden Domänen tiefer in die Membran eindringen, wenn sie als Tandem vorliegen [96].

Ebenso kontrovers wird die Bindung von Synaptotagmin an Membranen diskutiert, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) enthalten. PIP_2 ist ein wichtiger Regulator von Endo- und Exozytose [58] und präferentiell in der Plasmamembran lokalisiert [101]. Synaptotagmin bindet an Membranen, die PIP_2 enthalten, über einen Lysin-reichen Abschnitt in der C2B-Domäne [134, 214]. Umstritten ist vor allem, ob Synaptotagmin über die C2B-Domäne auch in Abwesenheit von Ca^{2+} mit PIP_2 -haltigen Membranen interagiert und so schon vor der Erhöhung der präsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration an der Membran positioniert sein könnte [12]. Pang et al. zeigten, dass sich rekombinantes und natives Synaptotagmin in Bezug auf die Bindung an PIP_2 -haltige Membranen unterscheiden und konnten nur Bindung von rekombinantem Protein feststellen [180]. Einigkeit herrscht jedoch darüber, dass in Gegenwart von PIP_2 die benötigten Ca^{2+} -Konzentrationen für eine Membranbindung von Synaptotagmin niedriger sind [134].

Interaktion mit neuronalen SNARE-Proteinen Von zentraler Bedeutung für das Verständnis der neuronalen Exozytose ist die Frage, in welchem Zustand sich die SNARE-Maschinerie beim Eintreffen des Calcium-Stimulus befindet, und weiterhin, wie dieser Zustand durch die Calcium-Bindung von Synaptotagmin beeinflusst wird. Eine attraktive Hypothese beinhaltet, dass Synaptotagmin nicht nur mit Membranlipiden, sondern direkt mit SNAREs bzw. SNARE-Komplexen interagiert und so das *zippering* der SNAREs und dadurch die Fusion selbst beeinflusst. In der Tat wurde Syntaxin zuerst als ein Synaptotagmin-bindendes Protein in Immunpräzipitaten aus Rattenhirn charakterisiert [15]. Trotz einer großen Zahl nachfolgender Untersuchungen besteht nach wie vor große Uneinigkeit darüber, wie SNAREs mit Synaptotagmin interagieren. Interaktionen mit isoliertem Syntaxin 1 und SNAP-25 sind beschrieben worden [39, 63, 82, 115, 219]. In allen Fällen ist die Interaktion durch mikromolare Ca^{2+} -Konzentrationen verstärkt. Chapman et al. und Kee

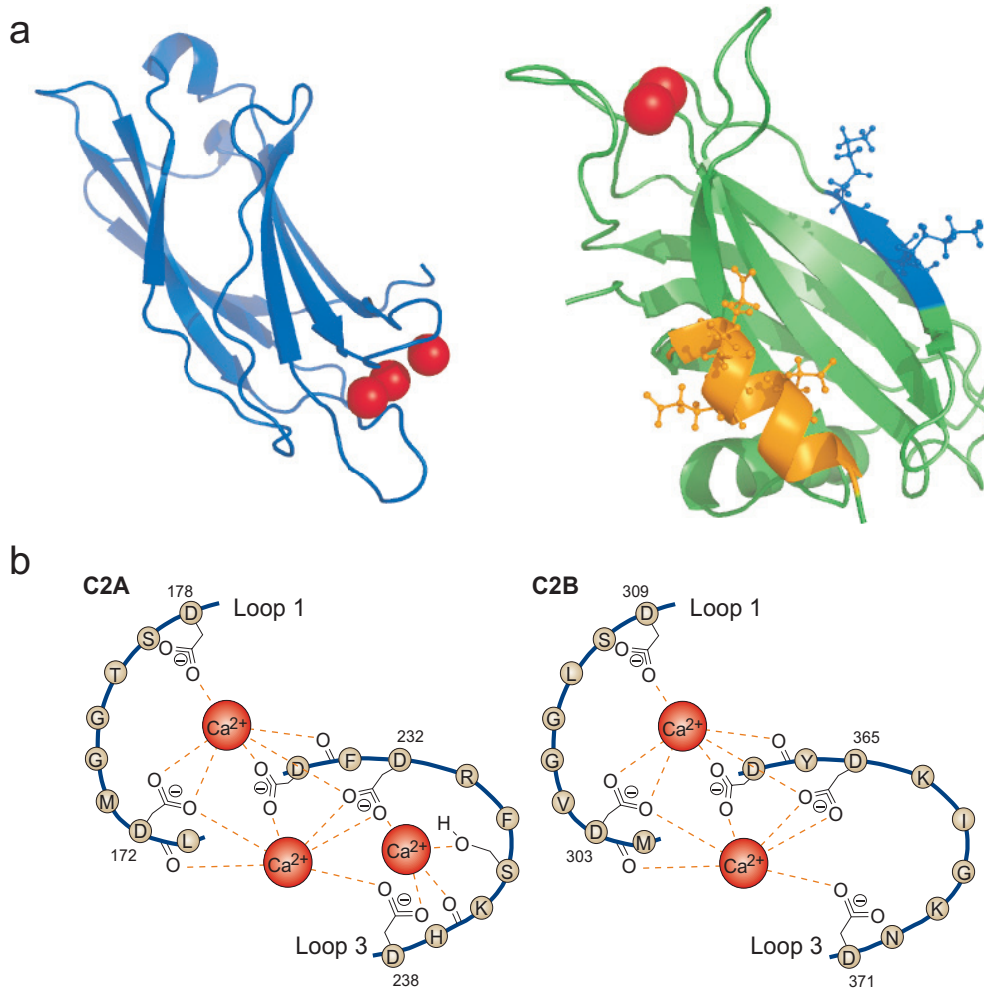


Abbildung 1.4 – Ca²⁺-Koordination durch die C2A- und C2B-Domäne von Synaptotagmin 1. **(a, links)** Gezeigt ist die über Kernspinresonanz (NMR) bestimmte Struktur der C2A-Domäne von Synaptotagmin 1 in ihrer Ca²⁺-gebundenen Form (rote Kugeln). Die in die Membran eindringenden *loops* befinden sich an der unteren Spitze des Moleküls (PDB ID 1BYN) [227]. **(a, rechts)** zeigt die röntgenkristallographisch bestimmte Struktur der C2B-Domäne in ihrer Ca²⁺-gebundenen Form. Die in die Membran eindringenden *loops* befinden sich an der oberen Spitze des Moleküls. Die in dieser Arbeit wiederholt erwähnten basischen Reste K326 und K327 sind blau als *ball and stick* dargestellt (PDB ID 1UOW) [44]. **(b)** Schematische Darstellung der Ca²⁺-Bindungsstellen in der C2A- (links) und C2B-Domäne (rechts). Die Koordinationsstellen der drei bzw. zwei Ca²⁺-Ionen werden partiell durch negativ geladene Aminosäuren besetzt. Anhand dieser Abbildung sind die in dieser Arbeit verwendeten Ca²⁺-Bindungsmutanten leicht nachzuvollziehen.

et al. beschrieben weiterhin, dass die Interaktion am C-Terminus von Syntaxin stattfindet [39, 115]. Daneben ist auch die Ca²⁺-unabhängige Interaktion mit dem Heterodimer von Syntaxin 1 und SNAP-25 beschrieben worden.

Während jedoch ursprünglich postuliert wurde, dass für diese Interaktion beide C2-Domänen notwendig sind [198], zeigte eine nachfolgende Studie, dass für die Bindung nur die C2B-Domäne essentiell ist [197]. Dieser offenkundige Widerspruch wurde wiederum auf die mehrfach beschriebene Kontamination gereinigter C2B-Fragmente durch bakterielle Makromoleküle zurückgeführt, ein Problem, das viele Ergebnisse zu Bindungseigenschaften des C2AB-Fragments grundsätzlich in Frage stellt [73, 256]. Rickman et al. zeigten außerdem, dass eine Lysin-reiche Region in der C2B-Domäne (K326, K327) für die Bindung an den Syntaxin/SNAP-25-Komplex wichtig ist [197]. Dieselben Reste sind auch an der Bindung an PIP₂-haltige Membranen beteiligt [134]. Eine Bindung an isoliertes SNAP-25 konnte in diesen Studien nicht bestätigt werden [198].

Des Weiteren ist auch eine Interaktion mit dem vollständig assemblierten ternären Komplex beschrieben worden [54]. Auch in dieser Arbeit ist die Bindung in An- und Abwesenheit von Ca²⁺ gezeigt. In einer neueren Studie wurde die Bindungsregion für diese Interaktion auf wenige saure Reste in SNAP-25 um den *0-layer* eingegrenzt [199]. Wenn die Aminosäuren D51, E52 und E55 zu Lysin mutiert sind, kann weder eine Interaktion mit dem Syntaxin/SNAP-25-Komplex noch mit dem ternären Komplex nachgewiesen werden. Während jedoch Rickman et al. zeigen, dass nur die C2B-Domäne für diese Interaktion benötigt wird [199], beschreiben Davis et al., dass die C2A-Domäne für die Bindung essentiell ist [54]. Die Interaktion mit dem ternären Komplex, die wahrscheinlich auch durch Complexine reguliert wird (siehe Kapitel 1.3.3) ist besonders wichtig, weil postuliert wurde, dass Synaptotagmin mit partiell assemblierten Komplexen vor und nach der Erhöhung der präsynaptischen Ca²⁺-Konzentration interagiert.

Oligomerisierung von Synaptotagmin Da die Oligomerisierung von Synaptotagmin nicht Gegenstand dieser Arbeit ist, sollen die diesbezüglichen Arbeiten nur erwähnt und ansonsten auf die Überblicksdarstellung von Tucker und Chapman verwiesen sein [254]. Die Literatur zu diesem Thema ist nicht weniger widersprüchlich als jene zur Interaktion Synaptotagmins mit den SNARE-Proteinen. So wurde gezeigt, dass Oligomerisierung sowohl von Synaptotagmins luminalem N-Terminus, als auch von der Transmembranregion vermittelt werden kann [11]. Auch das Verbindungsstück zwischen TMR und der C2A-Domäne scheint beteiligt zu sein. Zuletzt ist auch eine Ca²⁺-abhängige Oligomerisierung der C2B-Domäne beschrieben worden [37, 267].

Die funktionelle Relevanz all dieser Befunde ist strittig [254]. Insbesondere die sogenannte *AD3* Synaptotagmin-Mutante in *Drosophila melanogaster*, die keine Ca^{2+} -abhängige Oligomerisierung über die C2B-Domäne zeigt und bei der die Neurotransmitterfreisetzung stark beeinträchtigt ist [138], spricht für eine Funktion der Oligomerisierung bei der Ca^{2+} -abhängigen Exozytose. Jüngere biochemische Arbeiten zu dieser Mutante geben jedoch Anlass zu der Vermutung, dass die besagte Mutation zu einer Missfaltung und einem generellen Funktionsverlust der C2B-Domäne führt [199].

Eine ganz andere Funktion für Synaptotagmin wurde in einer neueren Arbeit postuliert. Martens et al. beobachteten, dass das C2AB-Fragment eine Ca^{2+} -abhängige Tubulierung von künstlichen Phospholipidvesikeln induziert, und schlussfolgerten, dass die Insertion der sperrigen hydrophoben Aminosäuren in den Ca^{2+} -bindenden *loops* in die Membran zu einer Änderung der Krümmung der Membran führt [149]. Die Interaktion mit Phospholipiden bezweckt demnach nicht nur die Rekrutierung an die Membran oder wirkt regulatorisch auf die Fusionsmaschinerie, sondern hat eine direkte fusogene Wirkung. Physikalische Berechnungen auf Grundlage des *stalk*-Modells zeigten in derselben Arbeit, dass die induzierte lokale Krümmung der Membran die Bildung eines *stalk*-Intermediates fördert.

1.3.2 Physiologische Befunde zu Synaptotagmin

Die Belege für eine essentielle Rolle von Synaptotagmin bei der Kopplung von Ca^{2+} -Signal und Exozytose sind insgesamt überzeugend und seien im Folgenden kurz zusammengefasst:

- Deletion von Synaptotagmin 1 in Neuronen des Vorderhirns, wo die Isoformen Synaptotagmin 2 und 9 nicht exprimiert werden, beseitigt selektiv die synchrone Freisetzung von Neurotransmitter [81]. An der Neuromuskulären Endplatte von *Drosophila* wird der gleiche Phänotyp gefunden [278]. Wird Exozytose durch Aktionspotential-ähnliche Stimulierung ausgelöst, geht nicht nur die Synchronität verloren, sondern die Gesamtfreisetzung von Neurotransmitter ist deutlich reduziert [152]. Dasselbe gilt für die Isoformen Synaptotagmin 2 und 9 [181, 272]. Im Gegensatz dazu ist in *Drosophila* und in autaptischen Kulturen von hippocampalen Neuronen die Gesamtfreisetzung unverändert und nur die Synchronität geht

verloren [168, 169, 278].

- Punktmutationen, die die Ca^{2+} -Bindung an die C2B-Domäne beseitigen, führen zu einem Verlust der synchronen Freisetzung von Neurotransmitter in Maus und *Drosophila* [142, 168], während Mutationen in der C2A-Domäne zu mildereren Phänotypen führen [76, 242]. Diese Befunde unterstreichen die essentielle Funktion der Ca^{2+} -Bindung an die C2B-Domäne für die Neurotransmitterfreisetzung.
- Punktmutationen, die die Ca^{2+} -Affinität der Interaktion Synaptotagmins mit der Membran entweder verringern oder erhöhen, führen zu einer entsprechenden Änderung der Ca^{2+} -Abhängigkeit der Neurotransmitterfreisetzung [75, 196, 238].
- Punktmutationen, die die Affinität von Synaptotagmin für den SNARE-Komplex in Gegenwart von Ca^{2+} erhöhen, führen auch zu einer verstärkten Freisetzung von Neurotransmitter [180].
- Die Wichtigkeit der Interaktion mit SNARE-Proteinen wird zusätzlich durch Experimente unterstützt, die die Auswirkungen von Mutationen im C-Terminus von SNAP-25 untersuchten. Gerona et al. zeigten, dass Mutation der Aminosäuren D186 und/oder D193 zu Lysin die Exozytose in PC12-Zellen stark beeinträchtigen [82]. Überexpressionsexperimente in chromaffinen Zellen mit anderen SNAP-25-Mutanten (D58A, E170A & Q177A) führten zu ähnlichen Ergebnissen [239].

Zusammengenommen belegen diese Befunde, dass sowohl SNARE-Interaktion als auch Bindung an Phospholipide für die Funktion von Synaptotagmin bei der Reiz-Sekretionskopplung wichtig sind.

1.3.3 Complexine

Complexine repräsentieren eine kleine Familie von ca. 130 Aminosäuren großen löslichen Proteinen, die mit dem SNARE-Komplex, nicht aber mit monomeren SNAREs oder dem Syntaxin/SNAP-25-Komplex interagieren [153, 177]. Wie die Kristallstrukturen zweier Complexin/SNARE-Komplexe zeigen, bildet der zentrale Abschnitt von Complexin eine Helix, die in antiparalleler Orientierung in der von Syntaxin und Synaptobrevin gebildeten Furche des SNARE-Komplexes bindet. [22, 41]. Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) und kine-

tische Untersuchungen unter Verwendung von *stopped-flow* Fluoreszenzanisotropie ergaben, dass die Bindung hochaffin ($K_D \approx 10 \text{ nM}$) und schnell ist ($k_{on} = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [178].

Während die Einzel-*knock-outs* von Complexin 1 und 2 nur schwache Phänotypen aufweisen, resultiert der Doppel-*knock-out* in einem dem Synaptotagmin 1-*knock-out* ähnlichen, jedoch abgeschwächten Phänotyp. Die synchrone Freisetzung von Neurotransmitter ist stark beeinträchtigt, kann aber durch eine Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wiederhergestellt werden [194]. Dieser Befund zeigt, dass Complexine zwar nicht generell notwendig sind für die synchrone Neurotransmitterfreisetzung, aber durch die Bindung an den SNARE-Komplex die Aktivität von Synaptotagmin beeinflussen können.

1.3.4 Modell der Regulation der neuronalen Exozytose durch Synaptotagmin

Dieser Kenntnisstand mündet in folgendem Modell zur Wirkungsweise von Synaptotagmin bei der Ca^{2+} -induzierten Exozytose in Neuronen und neuroendokrinen Zellen [36, 108, 111, 244]: Bei basalen Ca^{2+} -Konzentrationen gehen synaptische Vesikel durch verschiedene Maturierungsprozesse, die kollektiv als *priming* bezeichnet werden und die (partielle) Assemblierung des SNARE-Komplexes einschließen. Erhöhung der präsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration führt zu einer Bindung von Synaptotagmin an die Membran und den SNARE-Komplex — reguliert durch Complexine — und zur vollständigen Assemblierung des SNARE-Komplexes und zur Öffnung der Fusionspore. Die Plausibilität und etwaige Modifikationen dieses Modells werde ich ausführlich im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen zur Rekonstitution dieses Prozesses diskutieren.

1.4 Rekonstitution der Membranfusion

Dass die Assemblierung von SNARE-Komplexen selbst die Fusion zweier Membranen antreibt, wird durch Studien an Liposomen mit rekonstituierten SNARE-Proteinen unterstützt. Rothman und Mitarbeiter konnten dies im Jahr 1998 als erste zeigen: Wurden Synaptobrevin sowie ein vorformierter Syntaxin 1/SNAP-25-Komplex in zwei getrennte Liposomenpopulationen rekonstituiert und diese Liposomen gemischt, beobachteten sie die Vermischung der beiden Membranen, die als Fusion interpretiert wurde [265]. Sie benutzten dabei den so-

genannten *lipid-dequenching-assay*, bei dem in eine Liposomenpopulation zwei fluoreszenzmarkierte Lipide in relativ hohen Konzentrationen korekonstituiert werden, so dass die Emission des kurzwelligen Farbstoffes gelöscht wird. Bei der Fusion von unmarkierten mit markierten Liposomen kommt es zu einer Verdünnung der markierten Lipide, was zu *dequenching* und einem Anstieg der Fluoreszenz führt [243]. Weber et al. zeigten außerdem, dass lösliche Fragmente von Synaptobrevin und des Q-SNARE-Komplexes, die mit membranständigen Proteinen um Bindungsstellen kompetieren, den Fluoreszenzanstieg ebenso inhibieren wie BoNT/D, das Synaptobrevin an Position Lys59-Leu60 proteolytisch spaltet und dadurch die Bildung von SNARE-Komplexen verhindert. Die Bildung von SNARE-Komplexen wurde nur indirekt gezeigt: Nach Mischen und längerer Inkubation der beiden Liposomenpopulationen war Synaptobrevin nicht mehr für proteolytischen Verdau durch BoNT/D zugänglich. Obwohl in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, dass unter den verwendeten Bedingungen SNAREs die Vermischung der Membranen bewirken können, ist sie in vielerlei Hinsicht kritisiert worden:

- Die verwendeten Protein-Lipid-Verhältnisse waren mit 1:20 extrem hoch.
- Eine Größenzunahme der Liposomen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte nicht nachgewiesen werden. Als Grund dafür wurde die breite Größenverteilung im Ausgangsmaterial angegeben.
- Weber et al. zeigten, dass eine Vorinkubation beider Populationen zusammen bei 4°C zu einer deutlichen Beschleunigung der Reaktion nach Erwärmung auf 37°C führt. Die Autoren schlossen aus diesem Befund, dass sich während der Vorinkubation SNARE-*trans*-Komplexe ausbilden. Allerdings fehlt ein Nachweis, dass die Vorinkubation — wie nach dem Modell zu erwarten — zu einer Aggregation von Liposomen führt. Eine Zunahme von SNARE-Komplexen wurde ebenfalls nicht nachgewiesen. Die einzigen Hinweise, die die Bildung von *trans*-Komplexen stützen, beruhen auf dem Befund, dass nach Vorinkubation die Fusion nicht mehr durch lösliche Synaptobrevin-Fragmente und auch nicht mehr durch Inkubation mit dem Synaptobrevin-spaltenden BoNT/D gehemmt werden kann. Diese Resistenz kann jedoch auch durch Homooligomerisierung der SNAREs in der Membran verursacht sein.
- Die beobachteten Fusionsraten waren extrem langsam, und eine Sättigung

der Fluoreszenzänderung war auch nach 2 Stunden weder erreicht noch absehbar.

- Es wurde nur eine Vermischung der Membran gezeigt, wobei unklar blieb, ob es in der Tat zu einer vollständigen Fusion verbunden mit einer Durchmischung der Lumina gekommen ist.

Einige, doch nicht alle dieser Kritiken wurden in späteren Arbeiten adressiert. Ein Größenzuwachs durch Fusion wurde von Schuette et al. elektronenmikroskopisch nachgewiesen [224]. Die Vermischung der Liposomenlumina (*content mixing*) konnte ebenfalls gezeigt werden, sowohl fluoreszenzspektroskopisch durch die Bildung von *cis*-Komplexen, die nur bei Vermischung der Lumina entstehen [224], als auch durch die Inkorporierung von Oligonukleotiden, die bei *content mixing* zur Bildung von DNA-Duplices führen [166]. In beiden Experimenten kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass während der Fusion eingekapselte Materie entweicht (*leakage*). Die 'Dichtigkeit' ist aber ein zentrales Charakteristikum biologischer Fusionsreaktionen [201].

Eigenschaften SNARE-vermittelter Fusion von Liposomen In späteren Arbeiten untersuchte die Rothman-Gruppe Zwischenstufen der SNARE-Komplexbildung im liposomalen Fusionssystem. Die Entfernung der N-terminalen H_{abc} -Domäne von Syntaxin führt zu einer deutlichen Beschleunigung der Fusion, wenn der 2:1-Komplex in Liposomen rekonstituiert wird [182]. Dieses Ergebnis war überraschend, da bis dahin nur ein Einfluss auf die Bindung von SNAP-25 aufgrund der geschlossenen Konformation von Syntaxin bekannt war [165]. Das Ergebnis wurde durch eine Rückfaltung der H_{abc} -Domäne auf das Syntaxin/SNAP-25-Dimer erklärt, die die Bindung von Synaptobrevin inhibieren soll. Für eine solche Interaktion liegen allerdings keinerlei biochemische Befunde vor, so dass der beobachtete Effekt auch auf eine sterische Hinderung durch die H_{abc} -Domäne bei der verwendeten hohen Proteindichte auf der Liposomenoberfläche zurückgeführt werden kann [65].

In einer weiteren Arbeit wurde der Effekt von N- und C-terminalen Synaptobrevin-Peptiden auf die Fusionsreaktion untersucht [158]. Während ein N-terminales Peptid (AS 25-56) die Fusion in hohen Konzentrationen inhibiert, führt ein C-terminales Peptid (AS 57-92) zu einer deutlichen Beschleunigung. Der zuletzt genannte Effekt wird jedoch nur in Abwesenheit von Syntaxins H_{abc} -Domäne beobachtet. Diese Ergebnisse wurden wie folgt interpretiert: Das

N-terminale Peptid blockiert die Bindungsstelle für Synaptobrevin und inhibiert deshalb die Fusion durch Verhinderung der SNARE-Interaktion. In Abwesenheit von Peptiden werden *trans*-Komplexe, die nur partiell, im N-terminalen Bereich des SNARE-*zipper*s assembliert sind, durch die H_{abc} -Domäne in diesem Zustand eingefroren. Zugabe des C-terminalen Peptids beseitigt diese Blockade und führt zu einer Vorstrukturierung der SNARE-Proteine im C-terminalen Bereich. Die Verwendung solcher C-terminaler Synaptobrevin-Fragmente nimmt einen zentralen Teil meiner Arbeit ein. Ich werde die Ergebnisse der Melia-Studie deshalb erneut im Zusammenhang mit meinen Experimenten diskutieren.

Für die Frage der Kopplung von SNARE-Komplexbildung und Fusion ist die Struktur des kurzen Aminosäureabschnittes entscheidend (im Folgenden als *linker* bezeichnet), der SNARE-Motiv und Transmembranregion verbindet. Während ein starrer *linker* oder gar eine kontinuierliche α -Helix mit einer fusogenen Aktivität der SNAREs intuitiv besser vereinbar sind — die Energie aus der Komplexbildung könnte ohne Dissipation auf die Membran übertragen werden —, ist dies bei einem flexiblen *linker* schwerer vorstellbar. McNew et al. untersuchten die Rolle dieses *linkers* im liposomalen Fusionsassay: Wird der *linker* in Syntaxin um fünf Aminosäuren verlängert (entspricht etwa 15 Å), ist die Effizienz der Fusion um ca. 50% reduziert [156]. Dieselbe Mutation in Synaptobrevin zeigt einen weniger starken Effekt. Die Rolle der TMR wird durch Experimente bekräftigt, in denen nicht TMR-verankerte, sondern über Phosphatidylethanolamin verankerte SNAREs verwendet wurden. In diesem Fall ist die Fusion vollständig inhibiert [157]. Die Verwendung längerer Isoprenoid-Anker, die die Membran vollständig durchspannen, stellt die Fusion jedoch wieder her. Diese Ergebnisse, die die Wichtigkeit der Kopplung von SNARE-Assemblierung und Membranverankerung unterstreichen, finden Bestätigung in einer Untersuchung in *Saccharomyces cerevisiae*. Werden die Transmembranregionen von Sso2p und Snc1p durch Geranylgeranyl-Anker ersetzt, ist die Exozytose inhibiert, während *membrane attachment* unbeeinflusst ist [86]. EPR-Untersuchungen an Syntaxin sprechen hingegen nicht für einen strukturierten und starren *linker* [126]. Allerdings wurde in dieser Studie nur das cytosolische Fragment von Synaptobrevin verwendet. Es ist jedoch möglich, dass für eine Strukturierung des *linkers* ein vollständiges *zippering* bis in die TMR erforderlich ist. Molekulardynamische Untersuchungen an Syntaxin geben zu der Vermutung Anlass, dass in Syntaxins *linker* eine gewisse Tendenz zur Helizität vorliegt, die durch saure Phospholipide verstärkt wird [119]. Auch physiologische Untersuchungen unterstreichen die

Funktion des *linkers*. Wird er in Synaptobrevin um 12 bzw. 24 Aminosäuren verlängert, sind die Ca^{2+} -induzierte und die spontane Transmitterfreisetzung stark beeinträchtigt [55]. Bei der Fusion von Hefe-Vakuolen hat eine ähnliche Manipulation des Qa-SNAREs Vam3p ähnlich drastische Folgen [264]. In einer neuen Arbeit wird schließlich gezeigt, dass Veränderungen in der Länge oder Sequenz des *linkers* von Synaptobrevin, die Öffnung und Dilatation der Fusionspore verzögern bzw. beeinträchtigen. Diese Arbeit zeigt überzeugend, dass die Kopplung des *coiled-coils* mit der Transmembranregion auch für sehr späte Schritte im Fusionsprozess wichtig ist [116].

Rekonstitution der Ca^{2+} -abhängigen Exozytose Die präsentierten Ergebnisse zeigen, dass einige wichtige Aspekte der SNARE-vermittelten Membranfusion im liposomalen Fusionsassay rekapituliert werden können und dass SNAREs in der Tat als minimale Fusionsmaschinen arbeiten — zumindest unter den experimentellen Bedingungen der zitierten Untersuchungen. Das ultimative Ziel des liposomalen Fusionsassays ist jedoch die Rekonstitution der Ca^{2+} -abhängigen Exozytose. Arbeiten aus der Chapman-Gruppe zeigten zum ersten Mal eine Beschleunigung der durch die neuronalen SNARE-Proteine angetriebenen Liposomenfusion durch ein cytoplasmatisches Fragment von Synaptotagmin 1, das beide C2-Domänen umfasst [255]. Folgende Beobachtungen wurden dabei gemacht:

- Die Beschleunigung ist strikt Ca^{2+} -abhängig. In Abwesenheit von Ca^{2+} hat das C2AB-Fragment eine schwach inhibierende Wirkung.
- Eine Beschleunigung kann nur dann beobachtet werden, wenn die Proteindichte der physiologischen ähnlich ist (90 Kopien Synaptobrevin im Vergleich zu ca. 70 auf dem synaptischen Vesikel [250]).
- Die Fusion ist strikt SNARE-abhängig. Konkurrenz mit dem löslichen Fragment von Synaptobrevin und Inkubation mit BoNT/B inhibieren die Reaktion nahezu vollständig. Diese Beobachtung ist wichtig, da sie ausschließt, dass Synaptotagmin allein fusogen ist.
- Mutationen in den Ca^{2+} -koordinierenden Resten beider C2-Domänen von Synaptotagmin verhindern den stimulatorischen Effekt des C2AB-Fragments.
- Einzelne C2-Domänen führen nicht zu einer Beschleunigung.

- Die Anwesenheit saurer Phospholipide (untersucht wurde Phosphatidylserin) ist notwendig. Je höher deren Konzentration ist, desto ausgeprägter ist die Beschleunigung.
- Wird nur das N-terminale BoNT/A Fragment von SNAP-25 in der Fusion verwendet, sind höhere Ca^{2+} -Konzentrationen für eine Beschleunigung der Reaktion durch das C2AB-Fragment notwendig. Bei Verwendung des BoNT/E-Fragmentes ist die Beschleunigung irreversibel beseitigt. Dies korreliert mit physiologischen Studien, die die Auswirkungen von BoNT/A und E auf die neuronale Sekretion untersucht haben [82, 208].

In weiteren Untersuchungen wurde der Mechanismus der Beschleunigung detaillierter untersucht. Andere zweiwertige Ionen aus der zweiten Hauptgruppe (Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+}) bewirken keine Beschleunigung durch das C2AB-Fragment [18]. Dieser Befund ist interessant, da Sr^{2+} sehr wohl Ca^{2+} in der Exozytose ersetzen kann, wenn auch mit reduzierter Effizienz [84, 159, 229]. Bhalla et al. zeigten weiterhin, dass eine Verlängerung des die beiden C2-Domänen verbindenden *linkers* die Beschleunigung durch das C2AB-Fragment beeinträchtigt und dass Ca^{2+} -Bindung an die C2B-Domäne verzichtbar ist. Dies steht jedoch im Widerspruch zu genetischen und physiologischen Arbeiten, die eindeutig zeigen, dass Ca^{2+} -Bindung an die C2B-Domäne essentiell für Ca^{2+} -induzierte Exozytose ist [142, 168]. Für die Beschleunigung der Liposomenfusion ist außerdem notwendig, dass beide Membranen Phosphatidylserin enthalten.

In einer weiteren Arbeit wurde das Zusammenspiel von SNARE-Proteinen und Synaptotagmin untersucht [17]. Die Beschleunigung der Fusion ist danach spezifisch für die neuronalen SNAREs, weil mit den exozytotischen SNAREs aus *Saccharomyces cerevisiae* kein Einfluss des C2AB-Fragments beobachtet wird. Chapman und Kollegen untersuchten außerdem den Einfluss des C2AB-Fragments auf die SNARE-Komplexbildung. Sie fanden, dass zwar die Bindung von SNAP-25 an membranständiges Syntaxin 1 verstärkt wird, die Bindung von Synaptobrevin an den Syntaxin-SNAP-25-Komplex aber unbeeinflusst bleibt. Ein Einfluss von Synaptotagmin auf die Assemblierung der SNAREs wird auch aufgrund anderer Arbeiten postuliert [138, 143].

1.5 Probleme und Fragestellung

Ziel meiner Arbeit ist es, zu einem tieferen Verständnis der neuronalen Exozytose beizutragen. Nach meiner Auffassung ist es hierzu unerlässlich, die Abläufe bei der synaptischen Membranfusion in einem künstlichen, reduzierten System zu rekapitulieren, das biochemischen Manipulationen zugänglich ist. Nur wenn es gelingt, die supramolekulare Maschinerie, die für Ca^{2+} -abhängige Exozytose verantwortlich ist, aus gereinigten Komponenten zu rekonstituieren, wird man die zugrundeliegenden molekularen Abläufe in ihren Einzelheiten verstehen können.

Wie in den vorausgegangenen Abschnitten ausgeführt, steht ein solcher Ansatz jedoch zur Zeit vor einer Reihe ungelöster Probleme. Alle beobachteten Liposomenfusionsreaktionen sind um viele Größenordnungen langsamer als die in der Synapse oder in neuroendokrinen Zellen beobachteten Fusionsraten. Dies kann zum Teil auf die Simplizität des Ansatzes zurückgeführt werden, die eine ähnliche räumliche und zeitliche Organisation erschwert. Das Ausmaß der Diskrepanz zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen lässt eine solche Erklärung jedoch als unbefriedigend erscheinen.

Der erste Teil der hier vorgelegten Dissertation hat zum Ziel, die Rolle der SNARE-Komplexbildung bei der Fusion von SNARE-haltigen Liposomen aufzuklären, mit besonderem Augenmerk auf die Frage, inwieweit intermediäre Schritte bei der Komplexbildung die Fusionskinetik determinieren. In der Tat sprechen eine Reihe von Befunden dafür, dass die Ursache für die langsame Fusionskinetik, die in allen bisher veröffentlichten Arbeiten zur SNARE-vermittelten Fusion von Liposomen beobachtet wurde, in dem Reaktionsweg zur SNARE-Komplexbildung zu suchen ist. Schuette et al. haben gezeigt, dass unter den üblichen Versuchsbedingungen die Kollisionsrate der Liposomen nicht geschwindigkeitsbestimmend ist, da ihre Aggregation über ein Biotin-Avidin-System nur bei hoher Liposomenverdünnung zu einer Beschleunigung der Fusion führte [224]. Ich werde mich eingehend mit den Zwischenstufen der SNARE-Komplexbildung beschäftigen und zeigen, dass die Bildung eines wahrscheinlich unphysiologischen Intermediats für die langsame Gesamtreaktion verantwortlich zu machen ist.

Der zweite Teil der Dissertation befasst sich mit dem Einfluss von Synaptotagmin auf die SNARE-vermittelte Fusion von Liposomen. Wie oben ausgeführt, wird der molekulare Mechanismus von Synaptotagmin seit Jahren

kontrovers diskutiert, und es ist daher notwendig, dieses zentrale Molekül in einem reduzierten System zu untersuchen, in dem der Einfluss der durch die C2-Domänen vermittelten Interaktionen mit SNAREs und Membranen auf die Fusion gemessen werden kann. Die Arbeiten aus der Chapman-Gruppe geben zwar einige Anhaltspunkte, werfen aber auch die Frage auf, inwieweit die beobachtete Beschleunigung der Liposomenfusion den Wirkungsmechanismus von Synaptotagmin in der Synapse rekapituliert. Zunächst ist festzustellen, dass die beobachtete Beschleunigung moderat ist. Die Reaktion ist durch das C2AB-Fragment lediglich um den Faktor 2 beschleunigt. Es ist außerdem auffällig, dass einige Befunde nicht mit Beobachtungen korrelieren, die in Experimenten zur Physiologie der synaptischen Transmission gemacht wurden, z.B. der fehlende Effekt von Sr^{2+} oder der Effekt von Mutationen in der C2B-Domäne. Es sei weiterhin betont, dass die Ca^{2+} -abhängige Beschleunigung nur mit dem C2AB-Fragment von Synaptotagmin beobachtet wurde, während eine Korekonstitution des gesamten Proteins nur eine Ca^{2+} -unabhängige Beschleunigung bewirkte [143]. Dieser Befund wurde vielfach mit dem Argument relativiert, dass das Protein vielleicht nicht in ausreichender Reinheit vorlag oder missgefaltet war [149, 255]. Ich halte diese Argumentationslinie für unbefriedigend. In meinen Experimenten werde ich den Mechanismus der Beschleunigung durch das C2AB-Fragment detailliert untersuchen und die Diskrepanz zu den Ergebnissen mit Gesamt-Synaptotagmin auflösen.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Standardchemikalien (von analytischem Reinheitsgrad) wurden von den Firmen Biorad, Boehringer, Merck, Roth, Serva und Sigma bezogen. Detergenzien waren von den Firmen Anatrace (CHAPS, FOS-CHOLINE, Lithiumdodecylsulfat, LDAO), Glycon (Octyl- β -D-glucopyranosid, Dodecyl- β -D-maltopyranosid) oder Sigma (Natrimcholol). Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung von Cysteinen wurden von Molecular Probes/Invitrogen bezogen. Alle verwendeten Lipide waren von Avanti Polar Lipids.

2.1.2 Enzyme, Kits, Vektoren, Bakterienstämme

Restriktionsendonucleasen waren von Boehringer, MBI Fermentas oder New England Biolabs, Pfu-Polymerase von Promega, T4 Ligase von MBI Fermentas oder New England Biolabs und Alkalische Phosphatase von Fermentas und New England Biolabs. Kits zur Aufreinigung von Plasmiden oder PCR Produkten wurden von Quiagen und Machery & Nagel bezogen. Alle Klonierungen wurden mit den Vektoren pET28a, pET15b, pET44a oder pET-Duet-1 (alle von Novagen) durchgeführt. Für Klonierungen wurde der *E. coli*-Stamm XL1-Blue von Stratagene verwendet, für Proteinexpressionen die *E. coli*-Stämme BL21 (DE3) und BL21 (DE3) RIL Codon Plus (beide Novagen).

2.1.3 DNA-Konstrukte

Alle Klonierungsarbeiten wurden nach molekularbiologischen Standardprotokollen durchgeführt [209]. Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte und ihre Klonierung sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Ihre Domänenstruktur wird schematisch in Abbildung 2.1 gezeigt. Die Sequenz aller Konstrukte wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft. Alle Sequenzen stammen aus *Rattus norvegicus*, mit Ausnahme von vti1b, das aus Maus ist.

Die verwendeten Synaptotagmin-Konstrukte weisen an Position 374 ein Glycin auf, in Übereinstimmung mit neueren Studien [174, 256], die ein zunächst publiziertes Aspartat [187] als falsch identifizierten. Die verwendeten Konstrukte haben zwei weitere Abweichungen von der publizierten Sequenz [187] : E188D und I393M. Da das Aspartat an Position 188 und das Methionin an Position 393 jedoch in Synaptotagmin 1 von Maus und Mensch konserviert und auch in zwei EST-Klonen von *Rattus norvegicus* belegt sind (GenBank accession numbers AA924659 und BE102639), kann davon ausgegangen werden, dass das hier verwendete Konstrukt die richtige Sequenz hat.

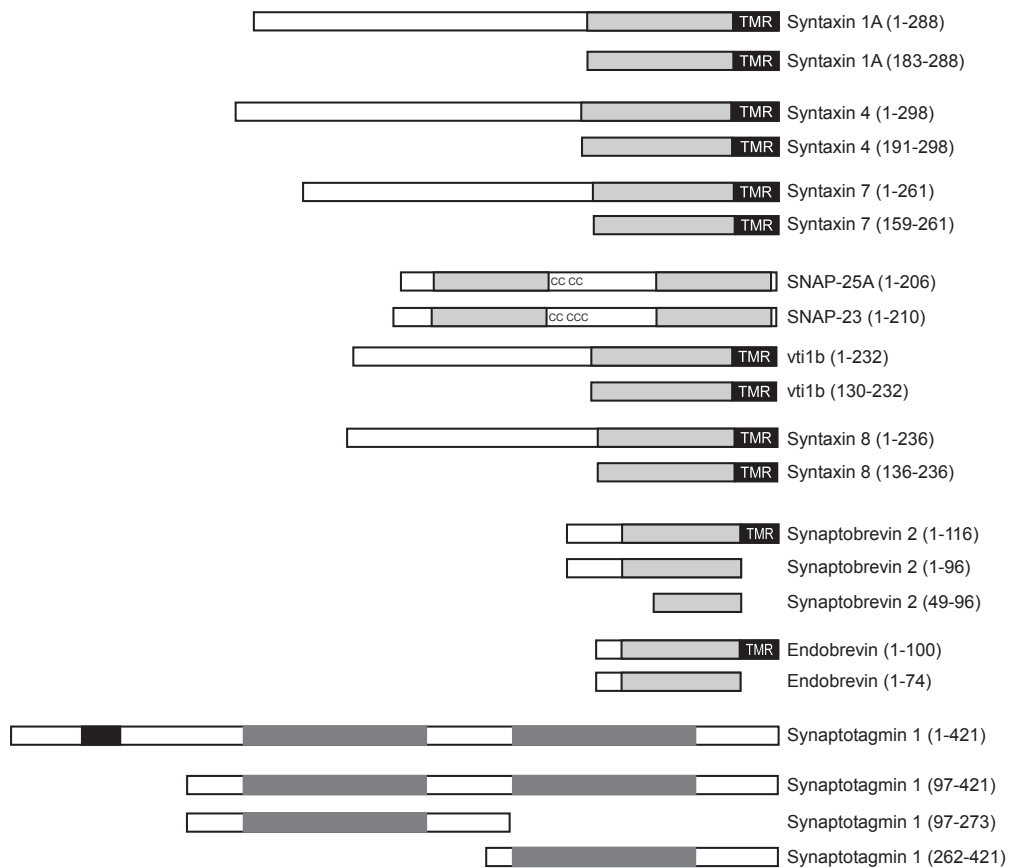


Abbildung 2.1 – Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte. SNARE-Motive sind grau, die C2A- und C2B-Domäne aus Synaptotagmin dunkelgrau, Transmembranregionen (TMR) schwarz dargestellt. Andere Domänen sind nicht gezeigt, ebenso sind die *linker* zwischen TMR und SNARE-Motiv nicht gezeigt.

Tabelle 2.1 – Verwendete Konstrukte

#	Gen	Aminosäureabschnitt	Klonierung	Vektor	beschrieben in
1	Syntaxin 1A	1-288	Ndel/XhoI	pET28a	[224]
2		1-288 C289	Ndel/XhoI	pET28a	[224]
3		183-288	Ndel/XhoI	pET28a	[224]
4		183-288, C289	Ndel/XhoI	pET28a	[224]
5		183-288	SmaI/XhoI	pET44a	diese Arbeit
6	Syntaxin 4	1-298	Ndel/XhoI	pET28a	[231, 241]
7		191-298	Ndel/XhoI	pET28a	diese Arbeit
8		191-298	SmaI/XhoI	pET44a	diese Arbeit
9	Syntaxin 7	1-261	Ndel/XhoI	pET28a	[4]
10		159-261	Ndel/XhoI	pET28a	[4]
11	SNAP-25A	1-206	Nhel/XhoI	pET28a	[66]
12		1-206, C84,85,90,92S	Nhel/XhoI	pET28a	[66]
13	SNAP-23	1-210	Ndel/XhoI	pET28a	[66]
14		1-210, C79,80,83,85,87S	Ndel/XhoI	pET28a	[241]
15	vti1b	130-232	Ndel/XhoI	pET28a	[4]
16	Syntaxin 8	136-236, C214S	Ndel/XhoI	pET28a	[4]
17	Synaptobrevin 2	1-116	Ndel/XhoI	pET28a	[145]
18		1-116, C117	Ndel/XhoI	pET28a	[224]
19		1-116, S28C	Ndel/XhoI	pET28a	[144]
20		1-116, S61C	Ndel/XhoI	pET28a	[144]
21		1-116, T79C	Ndel/XhoI	pET28a	[144]
22		1-96	Ndel/XhoI	pET28a	[71]
23		1-96 S28C	Ndel/XhoI	pET28a	[144]
24		1-96 S61C	Ndel/XhoI	pET28a	[144]
25		1-96 T79C	Ndel/XhoI	pET28a	[144]
26		49-96	Ndel/XhoI	pET28a	[191]
27		49-96 T79C	Ndel/XhoI	pET28a	diese Arbeit
28		Endobrevin	1-100	Ndel/XhoI	pET28a
29	1-74		Ndel/XhoI	pET28a	[66]
30	Synaptotagmin 1	1-421	Ndel/XhoI	pET28a	[241]
31		C2AB-Fragment	Ndel/XhoI	pET28a	[241]
32		C2AB-Mutante	Ndel/XhoI	pET28a	[241]
33		C2A-Mutante	Ndel/XhoI	pET28a	[241]
34		C2B-Mutante	Ndel/XhoI	pET28a	[241]
35		C2A-Fragment	Ndel/XhoI	pET28a	[241]
36		C2B-Fragment	Ndel/XhoI	pET28a	[241]
37	ΔN-Komplex	Syntaxin 183-288, Synaptobrevin 49-96	NcoI/HindIII Ndel/XhoI	pET-Duet-1	[241]

2.2 Methoden

2.2.1 Expression und Reinigung der Proteine

Für die Expression rekombinanter Proteine wurden die Plasmide zunächst in elektrokompetente *E. coli*-Zellen des Stammes BL21 (DE3) transformiert. Für die Expression von Synaptotagmin 1 (AS 1-421) wurde der Stamm BL21 (DE3) RIL Codon Plus verwendet. Eine einzelne Bakterienkolonie wurde dann in LB mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37°C und 200 rpm im Warmluftschüttler inokuliert. Diese Startkultur wurde 1:100 in TB-Medium verdünnt und wiederum im Warmluftschüttler bei 37°C, 200 rpm inkubiert. Bei einer optischen Dichte der Kultur von $OD_{600} \approx 1,0$ wurde die Expression durch Zugabe von 500 μM IPTG induziert. Nach drei Stunden Inkubation wurden die Zellen in einem Beckmann TY JS 4.2 Rotor sedimentiert und in 10 ml Extraktionspuffer (20 mM Tris, pH 7,4, 500 mM NaCl, 8 mM Imidazol) je 1 L Bakterienkultur aufgenommen. Das resuspendierte Pellet wurde bei -20 °C gelagert.

Alle Proteine wurden mit einem Hexa-Histidin-*tag* exprimiert [100] und zunächst über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt, gefolgt von einer Ionenaustauschchromatographie (IEX). Dabei wurden die Protokolle aus den folgenden Referenzen verwendet bzw. wie angegeben verändert [66, 69, 144, 145, 224]. Soweit nicht anders angegeben wurden alle Schritte bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt. Zur Extraktion der Proteine wurde die Zellsuspension nach Zugabe von 1 mg/ml Lysozym, 1 mM PMSF, 1mM MgCl_2 und einer Spatelspitze DNaseI für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen (4mal 30 s). Zelltrümmer wurden anschließend im Sorvall SLA-1500 Rotor bei $12.000 \times g$ für 30 min abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit Ni-NTA-Agarose (Quiagen) versetzt und für 1-3 h bei 4°C inkubiert. Die Ni-NTA-Agarose wurde dann durch Filtration vom Bakterienlysat abgetrennt und mit mindestens 250 ml Waschpuffer gewaschen (20 mM Tris, pH 7,4, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol). Die Elution (20 mM Tris, pH 7,4, 500 mM NaCl, 400 mM Imidazol) erfolgte in 10 ml-Schritten bis kein Protein mehr eluierte (Bradford-Test). Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, zur Entfernung des Hexa-Histidin-*tag* mit 100-200 μl Thrombin (5 mg/ml in 5% (w/v) Glycerin) versetzt und anschließend über Nacht gegen 20 mM HEPES, pH 7,4; 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT dialysiert. Die Entfernung des Hexa-Histidin-*tag* wurde durch SDS-PAGE überprüft. Für die

Reinigung von Membranproteinen wurde das Bakterienlysat mit dem gleichen Volumen Extraktionspuffer versetzt, der 10% (w/v) Natriumcholat enthielt. Wasch-, Elutions- und Dialysepuffer waren mit 1% (w/v) CHAPS versetzt.

Die Proteine wurden dann an die entsprechende Ionenaustauschmatrix gebunden und mit einem linearen Salzgradienten eluiert. Dazu wurde das Äkta-System von Pharmacia/GE Healthcare verwendet. Im Folgenden werde ich für jedes Protein Abweichungen von diesem Protokoll, sowie die verwendete Ionenaustauschmatrix und Pufferlösungen angeben.

- Syntaxin 1A (1-288), Syntaxin 1A (183-288) aus pET44a, Syntaxin 4 (1-298), Syntaxin 4 (191-298) aus pET 44a, Syntaxin 7 (1-261): Der Dialysepuffer enthielt 250 mM NaCl. Es wurde die MonoQ-Säule (Anionenaustauscher) verwendet. IEX-Puffer A: 20 mM HEPES, pH 7,4; 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1% (w/v) CHAPS; IEX-Puffer B: 20 mM HEPES, pH 7,4; 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1% (w/v) CHAPS. Für Syntaxin 1A (183-288) und Syntaxin 4 (191-298) aus pET44a wurde der *tag* nicht entfernt.
- Syntaxin 1A (183-288), Syntaxin 4 (191-298), Syntaxin 7 (159-261), vti 1b (130-232), Syntaxin 8 (136-236): Nach der Ultraschallbehandlung wurde das Lysat mit 6 M Harnstoff versetzt. Wasch- und Elutionspuffer enthielten ebenfalls 6 M Harnstoff und 3% (w/v) Natriumcholat anstelle von CHAPS. Das Protein wurde erst nach der Dialyse (20 mM HEPES, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 M Harnstoff, 3% (w/v) Natriumcholat, pH 7,4) mit Thrombin versetzt und bei RT für 16 h inkubiert. Nach Entfernung des Hexa-Histidin-*tag* wurden die Syntaxine gegen 20 mM HEPES, pH 7,4; 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1% (w/v) Natriumcholat dialysiert. Der Dialysepuffer für vti 1b war: 20 mM HEPES, pH 7,4; 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1% (w/v) CHAPS. Für die Reinigung aller Syntaxine wurde die MonoQ-Säule verwendet, für vti1b die MonoS-Säule. IEX-Puffer A und B waren wie für Syntaxin 1A (1-288) angegeben.
- SNAP-25A, SNAP-23: Nach der Ultraschallbehandlung wurde das Lysat mit 6 M Harnstoff versetzt. IEX-Puffer A: 20 mM HEPES, pH 7,4; 1 mM EDTA, 1 mM DTT; IEX-Puffer B: 20 mM HEPES, pH 7,4; 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT. Es wurde die MonoQ-Säule verwendet.

- Bei allen Synaptobrevin-Konstrukten wurde das Lysat mit 6 M Harnstoff versetzt. Es wurde die MonoS-Säule verwendet. Dialysepuffer und IEX-Puffer A und B für lösliche Proteine wie bei SNAP-25A, für Konstrukte mit TMR wurde 1% (w/v) CHAPS zugesetzt.
- Synaptotagmin (97-421) und seine Mutanten: Es wurde die MonoS-Säule verwendet. Dialysepuffer und IEX-Puffer A und B wie bei SNAP-25A.
- Synaptotagmin (1-421) und seine Mutanten: Wasch- und Elutionspuffer enthielten 0,03% (w/v) Dodecyl- β -D-maltopyranosid als Detergens. Nach der Elution wurde das Protein gegen 20 mM Tris, pH 8,4; 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,03% (w/v) Dodecyl- β -D-maltopyranosid dialysiert, gefolgt von einer ersten Aufreinigung über die MonoS-Säule. IEX-Puffer A war dabei der Dialysepuffer, IEX-Puffer B enthielt 1 M NaCl. Die saubersten Fraktionen wurden vereinigt und über eine HighLoad 26/60 Superdex200-Gelfiltrationssäule (GE Healthcare), äquilibriert in 20 mM HEPES, pH 7,4; 500 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0,03% (w/v) Dodecyl- β -D-maltopyranosid weiter aufgereinigt. Das Protein wurde dann mit Thrombin versetzt und zum Austausch des Detergens wiederum über die MonoS-Säule gereinigt. Die IEX-Puffer enthielten dann 1% (w/v) CHAPS.

Die Elution von den Ionenaustauschersäulen wurde fraktioniert und die Fraktionen über SDS-PAGE und Coomassie-Blau Färbung auf ihre Reinheit überprüft. Die saubersten Fraktionen wurden vereinigt und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Abbildung 2.2 zeigt mit Coomassie Blau SDS-Gele von den meisten der in dieser Arbeit verwendeten Proteine.

2.2.2 Übrige Proteine

Einige Proteine wurden freundlicherweise von Mitgliedern der Abteilung Neurobiologie zur Verfügung gestellt. Munc-18 wurde von Pawel Burkhardt gereinigt. Die isolierten C2A- und C2B-Domänen, die Ca^{2+} -Bindungsmutanten des C2AB-Fragments und fluoreszenzmarkiertes C2AB-Fragment wurden von Dr. Anand Radhakrishnan präpariert. Der lösliche ΔN -Komplex wurde von Dr. Ajaybabu Pobbati zur Verfügung gestellt.

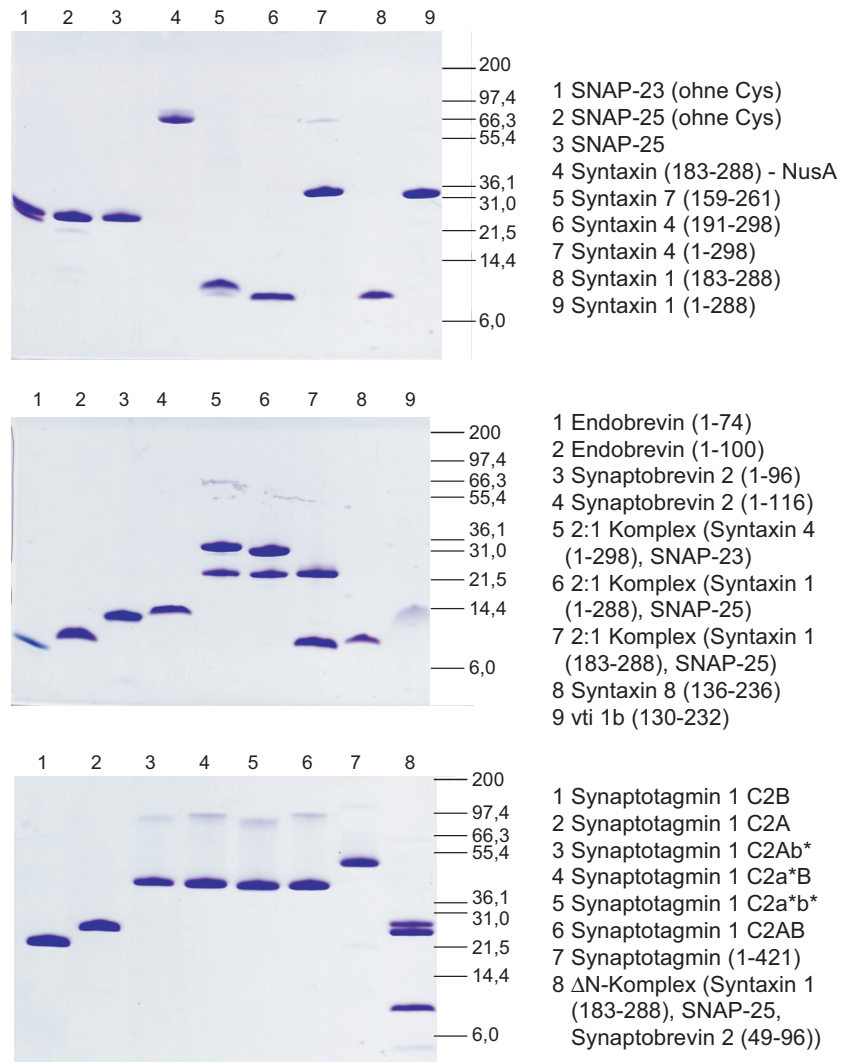


Abbildung 2.2 – Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE der verwendeten Proteine. Es wurden stets ca. 5 µg geladen, für vti 1b etwa 2,5 µg. Im ΔN-Komplex ist der His-tag nicht vollständig entfernt. Das Synaptobrevin-Fragment wird schlecht von Coomassie-Blau gefärbt und ist daher kaum sichtbar. Alle Proteine sind zu 90% rein.

2.2.3 Herstellung der SNARE-Komplexe

Zur Herstellung der binären Komplexe wurden Syntaxin 1A und SNAP-25A, bzw. Syntaxin 4 und SNAP-23 in äquimolaren Mengen gemischt und der Komplex über eine MonoQ-Säule oder eine HighLoad 26/60 Superdex200-Gelfiltrationssäule in Gegenwart von 1% CHAPS von freien Monomeren getrennt. Zur Herstellung des ΔN-Komplexes wurden Syntaxin 1A, SNAP-25A und Synaptobrevin 2 (49-96) im Verhältnis 1:2:2 gemischt. Freie Monomere wurden auch hier über eine MonoQ-Säule oder eine HighLoad 26/60 Superdex200-

Gelfiltrationssäule in Gegenwart von 1% CHAPS abgetrennt. Alternativ wurden BL21 (DE3) Zellen mit zwei Plasmiden transformiert (1. SNAP-25A in pET28a, 2. Syntaxin1A (183-288) und Synaptobrevin 2 (49-96) in pET-Duet-1). Der Komplex wurde dann in Gegenwart von 4 M Harnstoff direkt aus dem Bakterienlysat gereinigt. Überschüssige Monomere wurden über eine MonoQ-Säule in Gegenwart von 1% CHAPS abgetrennt.

2.2.4 Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Einzelcysteinmutanten wurden mit Maleimid-Farbstoffen von Invitrogen markiert, die bei pH 7,4 selektiv mit Thiolgruppen von Cysteinen reagieren. Dazu wurde zunächst DTT durch Dialyse gegen entgasten Puffer entfernt. Der Farbstoff wurde dann in einem zehnfachen molaren Überschuss zum Protein gegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei RT wurde freier Farbstoff über eine G50superfine-Säule (GE Healthcare) entfernt. Die Markierung wurde durch SDS-PAGE und Visualisierung der Fluoreszenz an einem LAS-1000-System von FUJIFILM unter Verwendung der geeigneten Filtersätze für Anregung und Emission überprüft. Die Effizienz der Markierung wurde anhand der Extinktionskoeffizienten der verwendeten Farbstoffe und der nach der BCA- oder Bradford-Methode gemessenen Proteinkonzentrationen bestimmt. Sie lag stets über 70%.

2.2.5 Herstellung der Lipid-Mischungen

Lipide wurden als Feststoffe von Avanti Polar Lipids bezogen. Sie wurden in einer Chloroform:Methanol Lösung (2:1) aufgenommen und bei -20°C in einer Argon-Atmosphäre gelagert. Zur Herstellung von Lipidmischungen wurden die Lipide in den entsprechenden Mengen unter Argon-Atmosphäre gemischt und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Der Lipidfilm wurde dann in 20 mM HEPES, pH 7,5; 150 mM KCl, 5% (w/v) Natriumcholat, 1 mM DTT aufgenommen. Der Lipidfilm wurde dazu im Ultraschallbad von der Gefäßwand gelöst. Nach Aliquotierung wurden Lipid-Mizellen bei -80°C gelagert. Die Standardlipidmischung enthielt 5 Teile Phosphatidylcholin, 2 Teile Phosphatidylethanolamin, 1 Teil Phosphatidylserin, 1 Teil Phosphatidylinositol und 1 Teil Cholesterol bei einer Gesamtlipidkonzentration von 13,5 mM. Fluoreszenzmarkierte Lipide enthielten 17% Phosphatidylethanolamin und jeweils 1,5%

1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-Lissamine Rhodamine B Sulfonyle und 1.5 % 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl). In Lipidmischungen mit weniger oder mehr Phosphatidylserin wurde der Phosphatidylcholin-Gehalt so geändert, dass die Gesamtlipidkonzentration gleich blieb. In Mischungen mit Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat wurde der Phosphatidylinositol-Gehalt angepasst.

2.2.6 Herstellung der Liposomen

Proteoliposomen wurden grundsätzlich durch Gelfiltration von detergenshaltiger mizellärer Lösung hergestellt [145, 221]. 30 μl Lipidmix wurden mit 30 μl Proteinlösung gemischt, so dass das molare Lipid-Protein-Verhältnis 200–300:1 war. Bei Korekonstitution von Synaptotagmin wurde ein Synaptobrevin:Synaptotagmin Verhältnis von 4,5:1 gewählt, das der relativen und absoluten Häufigkeit auf dem synaptischen Vesikel nahe kommen sollte [250]. Nach Inkubation bei RT für 20–30 min wurde das Detergens durch Gelfiltration entfernt. Dazu wurde eine PC 3.2/10 Fast Desalting Säule (GE Healthcare) äquilibriert in 20 mM HEPES/KOH pH 7.4, 150 mM KCl, 1 mM DTT verwendet. Die Flussrate lag bei konstanten 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ und die Liposomen wurden in 100 μl aufgefangen. Der Einbau der Proteine wurde durch Flotation in einem Nycodenz-Stufengradienten überprüft. Dazu wurden 50 μl Liposomen mit 50 μl 80% (w/v) Nycodenz gemischt und dann mit 50 μl 30% (w/v) Nycodenz und 50 μl Puffer überschichtet. Nach 90 min Zentrifugation bei $165.000 \times g$ wurden die flotierten Liposomen von den oberen 60 μl des Gradienten abgenommen [224]. Der Vergleich mit der eingesetzten Liposomenlösung zeigte in der SDS-PAGE für alle verwendeten Proteine und Proteinkomplexe nahezu quantitativen Einbau. Die Orientierung der Proteine wurde durch proteolytischen Verdau mit Tetanustoxin oder Trypsin überprüft. Ca. 70-90% des Proteins waren richtig orientiert.

2.2.7 SNARE-Komplexformierung in der SDS-PAGE

Die Bildung von SNARE-Komplexen während einer Fusionsreaktion oder die Bindung löslicher Fragmente an rekonstituierte Q-SNAREs kann in der SDS-PAGE nachgewiesen werden, da die entstehenden Komplexe weitgehend SDS-resistent sind [93]. Bei dem in Abbildung 3.23 gezeigten Experiment wurde die Bindung des cytosolischen Fragments von Synaptobrevin, das an der Position

Cys61 mit dem Farbstoff AlexaFluor594 markiert war, an den binären Komplex aus Syntaxin 1A (1-288) und SNAP-25A gemessen. Dazu wurden 800 nM Synaptobrevin mit einem fünffachen molaren Überschuss an rekonstituiertem binären Komplex versetzt. Bei Inkubation bei 30 °C wurden zu den angegebenen Zeiten Aliquots entnommen und diese über SDS-PAGE aufgetrennt. Der gebildete Komplex wurde densitometrisch am LAS-1000-System (FUJIFILM) unter Verwendung der AIDA V4.04 Software (RAYTEST) quantifiziert.

2.2.8 Bestimmung der Größenverteilung über statische Lichtstreuung

Die winkelabhängige Lichtstreuung erlaubt die Bestimmung der durchschnittlichen Partikelgröße. Die Kopplung an ein chromatographisches System, das sicherstellt, dass zu jedem Zeitpunkt monodisperse Partikel eluieren, erlaubt die Bestimmung der Größenverteilung in einer Liposomenpräparation [120,129,270]. Als Trennmethode wurde in dieser Arbeit *asymmetric field flow fractionation* verwendet, deren Prinzip in Abbildung 2.3 erläutert ist. Dazu werden die Partikel in eine Flusszelle injiziert, die so konstruiert ist, dass in ihr ein laminarer Fluss herrscht. Durch ein zur Flussrichtung senkrechtes Feld — in diesem Fall ein senkrechter Fluss, genannt Kreuzfluss — werden die Partikel im Flusskanal positioniert. Kleinere Partikel werden durch den senkrechten Fluss weniger stark beeinflusst als größere, d.h. sie befinden sich mehr im Zentrum des laminaren Flusses, erfahren also eine größere Flussrate und eluieren früher als größere Partikel [120].

Der Trennzelle ist der Streulichtdetektor nachgeschaltet. In der Messzelle wird die Probe mit Laserlicht einer großen Wellenlänge angestrahlt, um eine Störung des Streusignals durch Autofluoreszenz zu minimieren. Das durch die Probe gestreute Licht wird durch 18 Detektoren registriert, die in unterschiedlichen Winkeln zum einfallenden Licht angeordnet sind. Aus dieser winkelabhängigen Streuung kann der *rms*-Radius der eluierenden Partikel berechnet werden. Basis dieser Berechnungen ist die Zimm-Gleichung [284]. Aus den zu jedem Elutionszeitpunkt bestimmten *rms*-Radien kann dann eine Größenverteilung berechnet werden

15 μl Liposomen wurden in 200 μl Laufpuffer (20 mM HEPES, 150 mM KCl, pH 7,4; Brechungsindex 1,33) verdünnt und davon 180 μl injiziert. Für die Analyse der Fusionsreaktionen wurden 10 μl Synaptobrevin-Liposomen mit 10 μl ΔN -Komplex-Liposomen in 200 μl Laufpuffer gemischt, für 1 h bei RT inku-

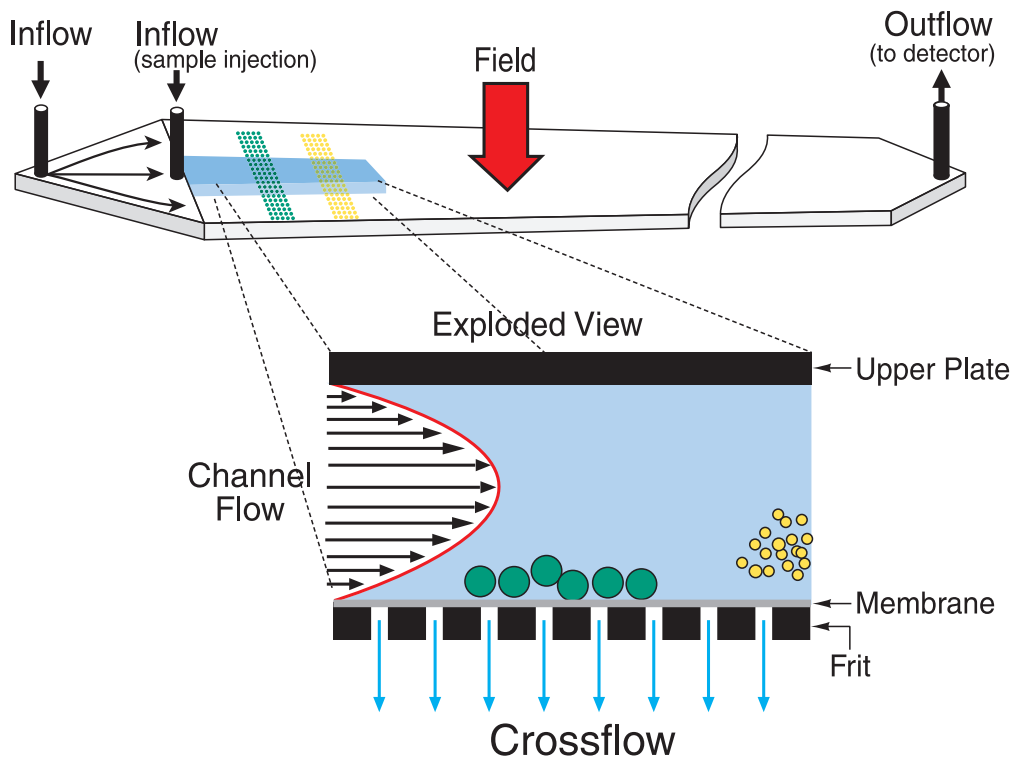


Abbildung 2.3 – Schematische Darstellung des Trennprinzips bei der *field flow fractionation*. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Technik, war das zum Kanalfluss senkrechte Feld ein weiterer Fluss. Prinzipiell ist aber u.a. ein elektrisches Feld denkbar. Für weitere Erklärungen siehe Text.

biert und ebenfalls $180 \mu\text{l}$ injiziert. Die Trennung erfolgte durch das Eclipse F System (Wyatt Technology). Der Fluss in der Zelle war 1 ml/min mit einem Injektionsfluss von $0,5 \text{ ml/min}$. Nach der Injektion wurde die Probe für 1 min bei einem Fokussierungsfluss von 1 ml/min fokussiert. Die Elution erfolgte dann mit einem linearen Kreuzflussgradienten von $0,75 \text{ ml/min}$ bis $0,15 \text{ ml/min}$ über 40 min . Die Detektion erfolgte im Dawn Eos (ebenfalls Wyatt Technology), ausgestattet mit einer K5-Messzelle und einem Laser mit einer Wellenlänge von 690 nm . Das Messintervall war 1 s . Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Astra Version Software 5.3.2.10 (ebenfalls Wyatt Technology). Dazu wurden die Detektoren $7 (42,8^\circ)$ bis $16(142,5^\circ)$ verwendet. *rms*-Radien wurden nach dem Berry-Algorithmus bestimmt.

2.2.9 Bestimmung der Größenverteilung über dynamische Lichtstreuung

Zur Messung der Größenverteilung über dynamische Lichtstreuung wurden Liposomen 1:100 im SMART-Laufpuffer (20 mM HEPES, 150 mM KCl, pH 7,4; Brechungsindex 1,33) verdünnt. Die Messung erfolgte mit einem Probenvolumen von ca. 15 μl bei 25 °C im DynaPro-System (Wyatt Technology). Es wurden zehn Messungen von je 10 s durchgeführt. Die Laserleistung ($\lambda = 828,5 \text{ nm}$) wurde dabei so eingestellt, dass die Zählrate des Detektor bei $\approx 10^6 \text{ s}^{-1}$ lag. Die Daten wurden mit der Dynamics V6 Software (Wyatt Technology) ausgewertet. Für die in Abbildung 3.1 dargestellten Daten wurden die Größenverteilungen von drei Liposomenpräparationen gemittelt. Die angegebenen Fehler sind Standardabweichungen vom Mittelwert.

2.2.10 Fluorometrie

2.2.10.1 *Dequenching-Assay*

Das Verschmelzen zweier Membranen kann fluorometrisch verfolgt werden [243]. Dazu wurden in einer Liposomenpopulation 1,2-Dioleyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-Lissamine Rhodamine B Sulfonyl (Rhodamin-PE) und 1,2-Dioleyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (NBD-PE) rekonstituiert. Die beiden Farbstoffe liegen dabei in so hohen Konzentrationen vor, dass die Emission von NBD-PE durch Resonanzenergietransfer (RET) auf Rhodamin-PE ausgelöscht wird (*quenching*). Bei der Fusion verdünnen sich die beiden Farbstoffe in die unmarkierte Membran. Dadurch nimmt der mittlere Abstand zwischen den Fluorophoren zu und das *quenching* wird weniger effizient. Es kommt zu einem Anstieg der NBD-Fluoreszenz. Die Vermischung von Membranen bei der Fusion wurde also als ein Anstieg der NBD-Fluoreszenz gemessen [243, 265].

Alle Reaktionen wurde bei 30 °C durchgeführt. Dazu wurden in der Regel 10 μl der markierten Liposomen mit 15 μl unmarkierten Liposomen in einem Gesamtvolumen von 1,2 ml gemischt (Puffer: 20 mM HEPES, pH 7,4; 120 mM Kaliumglutamat, 20 mM Kaliumacetat, 10 mM DPTA und Calciumchlorid). Dies resultierte in Proteinkonzentrationen von ca. 100 nM bzw. 150 nM. Lösliche Fragmente von Synaptotagmin wurden in einer Konzentration von 500 nM eingesetzt. In Inhibitionsexperimenten mit cytsolischen R-SNARE-Fragmenten war deren konzentration 2 μM . *Dequenching* wurde bei einer

Anregungswellenlänge von 460 nm und einer Emissionswellenlänge von 538 nm in einem Fluorolog 3 (Model FL322) oder Fluoromax 2 Spektrometer (beide Jobin Yvon) gemessen. Dabei wurden Quartz-Küvetten mit einer Weglänge von 1 cm verwendet. Beide Fluorometer waren mit einem Magnetrührer ausgerüstet und die Probenkammer war über ein Wasserbad temperiert. Das Fluoromax 2 Spektrometer war zusätzlich mit einem Vierküvettenwechsler ausgestattet.

Zur Auswertung wurden alle Daten auf den ersten Messwert einer jeden Messung bzw. auf die zuvor gemessene Basislinie normalisiert (abgekürzt als F/F_0). In jeder Abbildung werden repräsentative Messungen von Experimenten gezeigt, die mehrmals wiederholt wurden. In jeder Abbildung wurden die Experimente mit demselben Satz Liposomen am selben Tag durchgeführt.

2.2.10.2 Anisotropie

Wird ein Fluorophor mit linear polarisiertem Licht angeregt, so ist die Anregung für solche Moleküle am wahrscheinlichsten, deren Übergangsdipole zufällig parallel zur Polarisationssebene liegen. Die Polarisation des emittierten Lichts hängt vor allem von zwei Faktoren ab:

- der relativen Orientierung des Emissionsdipolmoments zum Absorptionsdipolmoment und
- dem Ausmaß der Rotation des Fluorophors während der Lebenszeit des angeregten Zustandes.

Stets ist jedoch das emittierte Licht depolarisiert. Da die relative Orientierung der beiden Dipole eine Konstante ist, kann Depolarisation genutzt werden, um Rückschlüsse auf die Rotationseigenschaften des Fluorophors zu ziehen. Eine Zunahme des Molekulargewichts des an das Fluorophor gekoppelten Makromoleküls, z.B. durch die Bindung eines weiteren Proteins, führt zu einer langsameren Rotation des Fluorophors und sollte daher eine weniger starke Depolarisation zur Folge haben. Der experimentelle Aufbau zur Messung der Depolarisation ist schematisch in Abbildung 2.4 gezeigt. Der Winkel zwischen dem Anregungs- und dem Emissionsdipol ist darin mit γ bezeichnet. Das emittierte Licht wird in y -Richtung, im rechten Winkel zum Anregungslicht gemessen, und ein Polarisator wird benutzt um die Intensitäten der elektrischen Vektoren parallel und senkrecht zum elektrischen Vektor des Anregungslichts zu trennen. Die Depolarisation wird durch die Anisotropie r beschrieben, die folgendermaßen definiert

ist:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (2.1)$$

Darin ist I_{\parallel} die Intensität des parallel zum elektrischen Vektor des Anregungslichts polarisierten emittierten Lichts und I_{\perp} die Intensität des senkrecht zum elektrischen Vektor des Anregungslichts polarisierten emittierten Lichts. Die Anisotropie ist so definiert, dass eine Zunahme der Rotation des Fluorophors zu einer Abnahme der Anisotropie führt. Für eine weiterführende Darstellung sei auf die Referenzen [130,259] verwiesen. Die Gleichungen wurden diesen Werken entnommen.

Die in dieser Arbeit präsentierten Anisotropie-Messungen wurden am Fluorolog

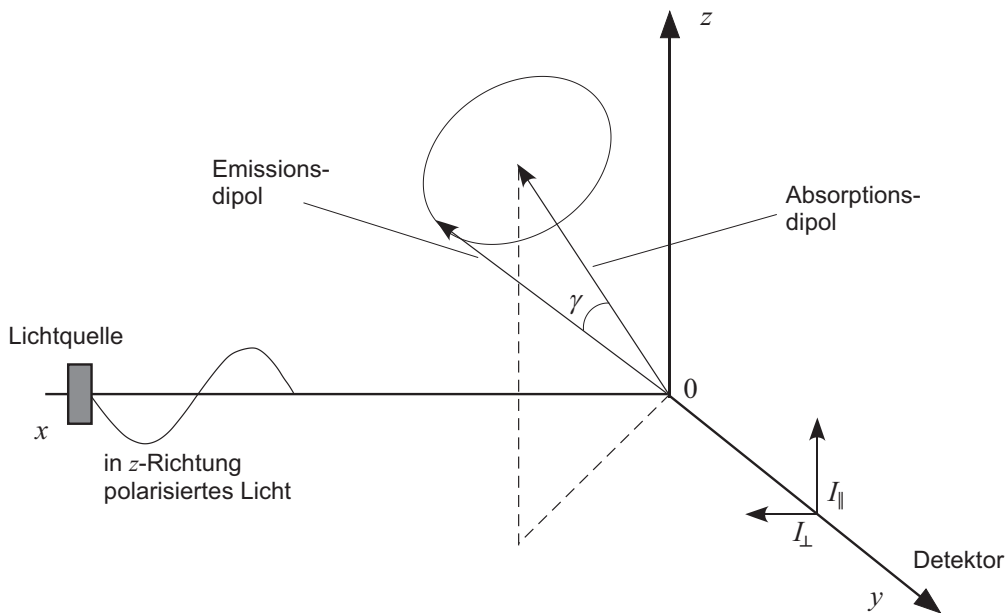


Abbildung 2.4 – Versuchsaufbau zur Messung der Depolarisation linear polarisiertem Lichtes. Die Graphik wurde in Anlehnung an [259] erstellt.

3 in T-Konfiguration durchgeführt. Diese Konfiguration erlaubt die simultane Messung des emittierten Lichts in zwei Polarisations Ebenen, da zwei Detektoren verwendet werden. Da beide Detektoren eine unterschiedliche Detektionseffizienz aufweisen, musste zunächst ein gerätespezifischer Korrekturfaktor bestimmt werden, der als G-Faktor bezeichnet wird. Er ist wie folgt definiert:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (2.2)$$

Darin bezeichnet I wiederum die Intensität und die Indices die Orientierung des Anregungs- und Emissionspolarisators (H: horizontal, V: vertikal). Die Aniso-

tropie berechnet sich dann wie folgt:

$$r = \frac{I_{VV} - G I_{VH}}{I_{VV} + 2G I_{VH}} \quad (2.3)$$

Alle hier gezeigten Anisotropie-Experimente wurden mit dem Fluorophor AlexaFluor488 durchgeführt. Die Anregungswellenlänge war dabei 490 nm, die Emission wurde bei 521 nm gemessen. Vor jeder Reaktion wurde eine Basislinie aufgenommen. Das markierte Protein wurde in einer Konzentration von 100-200 nM eingesetzt. Die übrigen Parameter waren wie in Kapitel 2.2.10.1 beschrieben.

2.2.10.3 C-terminaler RET

Das emittierende Fluorophor ist nicht notwendig identisch mit dem absorbierenden Fluorophor. Unter bestimmten Bedingungen kann die Anregungsenergie von einem Fluorophor auf ein anderes übertragen werden. Dieser als Resonanzenergietransfer (RET) bezeichnete Prozess stellt bestimmte Herausforderungen an die beiden Fluorophore:

- Eine Interaktion zwischen den Übergangsdipolmomenten der beiden Fluorophore muss möglich sein.
- Das Emissionsspektrum des Donorfluorophors muss mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptorfluorophors zu einem guten Teil überlappen.

Die Anforderungen an Dipol-Dipol-Interaktionen zwischen zwei Fluorophoren führen zu einer sehr strengen Abhängigkeit der Effizienz des Energietransfers vom Abstand der beiden Fluorophore. Die Effizienz E folgt der Beziehung:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (2.4)$$

Darin ist r der Abstand zwischen beiden Fluorophoren und R_0 der Abstand bei einer Effizienz des Energietransfers von $E = 0,5$. Da die Abhängigkeit von $\left(\frac{r}{R_0}\right)$ mit der sechsten Potenz eingeht und die Werte für R_0 normalerweise bei ca. 2 nm liegen, wird ein effizienter Energietransfer nur bei sehr geringem Abstand der Fluorophore beobachtet. RET bietet daher die Möglichkeit Protein-Protein-Interaktionen zu verfolgen, wenn die beiden interagierenden Proteine mit zwei Farbstoffen markiert sind, die die Bedingungen für RET erfüllen. Für eine weiterführende Darstellung sei auf die Referenzen [130, 259] verwiesen. Die Gleichungen wurden diesen Werken entnommen.

In dieser Arbeit wurde die Bildung von *cis*-SNARE-Komplexen über RET verfolgt. Dazu waren die C-Termini von Syntaxin 1A und Synaptobrevin 2 mit den Farbstoffen AlexaFluor 488 bzw. AlexaFluor 594 markiert. Nach der Rekonstitution der Proteine liegen die beiden Fluorophore im Lumen der Vesikel. Die Bildung von *cis*-Komplexen während einer Fusionsreaktion führt dazu, dass Anregungsenergie vom Syntaxin-Fluorophor auf das Synaptobrevin-Fluorophor übertragen wird. Dies äußert sich in einer Fluoreszenzlöschung des Donorfluorophors und in einem Anstieg der Akzeptorfluoreszenz. RET-Experimente wurden am Fluorolog 3 in T-Konfiguration durchgeführt. Das Vorhandensein zweier Detektoren ermöglichte die gleichzeitige Messung der Emission des Donor- und Akzeptorfluorophors bei Anregung des Donors. Für das Fluorophorpaar AlexaFluor 488/594 war die Anregungswellenlänge 490 nm, die Emissionswellenlängen 521 nm bzw. 615 nm. Die Konzentration des Donors lag bei 100-200 nM, der Akzeptor wurde in 3–5-fachem Überschuss eingesetzt. Die übrigen Parameter waren wie in Kapitel 2.2.10.1 beschrieben.

2.2.11 Sonstige Methoden

2.2.11.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-PAGE wurde nach Schägger durchgeführt [211]. Die Acrylamidkonzentration lag stets bei 10% (w/v). Der Probenpuffer enthielt Lithiumdodecylsulfat anstelle von Natriumdodecylsulfat. Gele wurden nach der Elektrophorese mit Coomassie-Blau (0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 (Fluka) in 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure) für 30 min gefärbt. Zur Entfärbung wurde das Gel für 15 min in 50% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure und über Nacht in 10% (v/v) Ethanol, 5% (v/v) Essigsäure auf dem Schüttler inkubiert.

2.2.11.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentrationen unmarkierter, gereinigter Proteine und Proteinkomplexe wurden anhand ihrer Absorption bei 280 nm bestimmt. Dabei wurden die in der SwissProt-Datenbank angegebenen Extinktionskoeffizienten verwendet [269], die nach der Edelhoch-Methode berechnet wurden [64, 179]. Proteinkonzentrationen in Proteingemischen, von markierten Proteinen oder von Liposomenpräparationen wurden nach Bradford oder mit der BCA-Methode bestimmt [23, 235]. Reagenzien für die BCA-Methode waren von Pierce, das Bradford-

Reagenz wurde von BioRad bezogen. Als Standard wurden Verdünnungen einer 2 mg/ml Serumalbumin-Stammlösung (ebenfalls Pierce) verwendet.

2.2.11.3 Gepufferte Calciumlösungen

In Experimenten mit definierten Calciumkonzentrationen wurde ein DPTA basiertes Puffersystem verwendet [10]. Ca^{2+} -Konzentrationen wurden mit den Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen Mag-Fura2 und Fluo5N (beide Molecular Probes/Invitrogen) bestimmt. Dabei wurde ein Calibration-Kit von Molecular Probes/Invitrogen verwendet.

2.2.11.4 Elektronenmikroskopie

Alle elektronenmikroskopischen Experimente führte Dr. Dietmar Riedel im Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie durch. Dazu wurden Liposomen im SMART-Laufpuffer 1:100 verdünnt und für 5 min bei Raumtemperatur in 0,1% Glutaraldehyd präfixiert. Die Liposomenlösung wurde dann auf Kohlenstoff-beschichtete *glow-discharged grids* gegeben. Aufnahmen wurden an einem Philips CM120 Elektronenmikroskop (Philips Inc., Eindhoven, Niederlande) mit einer TemCam 224A slow scan CCD Kamera (TVIPS, Gauting, Deutschland) gemacht.

Kapitel 3

Ergebnisse

Das Hauptproblem bei der Rekonstitution der Membranfusion in Liposomen ist, dass die beobachteten Fusionsraten weit hinter denen in der Zelle gemessenen zurückbleiben. Selbst in Gegenwart des C2AB-Fragments von Synaptotagmin 1 ist die Reaktion nur um den Faktor zwei beschleunigt. Im Folgenden werden die Gründe dafür detailliert untersucht. Dazu wird analysiert, welcher Schritt im komplizierten Reaktionsablauf für die Gesamtreaktion geschwindigkeitsbestimmend ist, und gezeigt, wie durch eine Manipulation der SNARE-Komplexbildung die Fusionsreaktion beschleunigt werden kann (Kapitel 3.2). Aufbauend auf diesen Ergebnissen wird eine genaue Analyse der Wirkung von Synaptotagmin auf die Fusionsreaktion vorgenommen (Kapitel 3.3).

3.1 Grundcharakterisierung der Fusion

Zunächst wird die von den neuronalen SNARE-Proteinen Syntaxin 1A, SNAP-25A und Synaptobrevin 2 vermittelte Fusion in ihren grundlegenden Merkmalen beschrieben. Dazu werden die in dieser Studie verwendeten Liposomen zuerst näher charakterisiert.

3.1.1 Verfahren zur Herstellung von Liposomen

Während proteinfreie Liposomen z.B. durch das Schwellen von Lipidfilmen und die anschließende Extrusion durch Membranen definierter Porengröße so präpariert werden können, dass Liposomen einer relativ geringen Polydispersität erhalten werden, erzwingt die Herstellung von Proteoliposomen die Verwendung eines Detergens während der Präparation [200]. Dabei bestehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten:

- Die Liposomen werden in einem Schritt hergestellt. Lipide und Proteine werden in micellärer Lösung gemischt. Durch Entfernen des Detergens bilden sich Liposomen spontan [221]. Dazu stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die geläufigsten sind Dialyse und Gelfiltration. In der Literatur wird dieses Verfahren zur Herstellung von Liposomen auch als *detergent removal*-Verfahren bezeichnet.
- Zunächst werden proteinfreie Liposomen hergestellt. In diese wird dann das in micellärer Lösung vorliegende Protein rekonstituiert. Dabei muss die Detergens-Konzentration so niedrig gewählt werden, dass die Liposomen nicht solubilisiert werden, sondern nur mit Detergens gesättigt sind. Bei Entfernen des Detergens werden die Proteine dann in die Membran eingebaut [200].

Die in dieser Studie verwendeten Liposomen wurden nach der ersten Methode hergestellt. Das Detergens — es wurde das Natriumsalz der Cholsäure verwendet — wurde durch Gelfiltration entfernt. Diese Methode bietet eine Reihe von Vorteilen, hat aber auch Nachteile. Während die über das Schwellen von Lipidfilmen hergestellten Liposomen häufig multilamellare und diskoide Strukturen aufweisen, sind über *detergent removal* hergestellte Liposomen vorwiegend unilamellar und sphärisch. Unterhalb eines bestimmten, als R_e^c bezeichneten Verhältnisses von Detergens:Lipid (für eine Mischung aus Cholat und ungesättigten Phospholipiden $R_e^c \approx 2.0$) bilden sich während der Entfernung des Detergens sogenannte detergensreiche gemischte Vesikel (*mixed vesicles, MVs*) [223]. Diese sind durch Membrandefekte charakterisiert, die mit erhöhter Wahrscheinlichkeit zur Fusion zwischen *MVs* führen [222, 226, 261]. Die relativ enge Größenverteilung und Unilamellarität von über Gelfiltration hergestellten Liposomen liegt darin begründet, dass diese Zwischenstufe der Vesikelformierung schnell durchlaufen wird. Ein Nachteil dieser Präparationsmethode ist, dass die erhaltenen Liposomen relativ klein sind. So ist kritisiert worden, dass dies zu erhöhter Membranspannung und damit zu größerer Fusogenizität führt [40, 201]. Bei der Präparation durch Gelfiltration muss außerdem unbedingt sichergestellt sein, dass die verwendeten Säulen nicht durch das Auftragen eines zu großen Probevolumens überladen werden, da das Detergens sonst nicht effizient entfernt wird. Außerdem muss das Gelmaterial so gewählt werden, dass die Porengröße kleiner als die der gemischten Micellen ist, da es ansonsten zu größeren Verlusten an Lipiden kommt. Eine detergensreiche

gemischte Micelle von Cholat und Lipiden, wie sie zu Beginn der Gelfiltration vorliegt, hat etwa eine Größe von 10.000 Da [223]. Für diese Arbeit wurde daher das Material Sephadex G25 verwendet, das wegen seiner Porengröße von ca. 6.500 Da den Lipidverlust minimiert.

3.1.2 Einige Charakteristika der verwendeten Liposomen

Da alle in dieser Arbeit beschriebenen Experimente mit Proteoliposomen durchgeführt wurden, die nach einem Standardprotokoll hergestellt wurden, war es wichtig, diese Liposomen zunächst bezüglich ihrer Größenverteilung und ihres Proteineinbaus zu charakterisieren.

Um die Größenverteilung zu ermitteln, wurden drei komplementäre Methoden verwendet, die weitgehend übereinstimmende Ergebnisse lieferten. Als erstes Verfahren kam dynamische Lichtstreuung zum Einsatz. Abbildung 3.1 zeigt die über dynamische Lichtstreuung bestimmten Größenverteilungen von Synaptobrevin- und Syntaxin-Liposomen. Außerdem wurden Liposomen untersucht, in die ein Komplex aus Syntaxin und SNAP-25 rekonstituiert wurde. Während Syntaxin- und Synaptobrevin-Liposomen sehr ähnliche und enge Größenverteilungen aufweisen, ist die Verteilung von Liposomen mit einem Komplex aus Syntaxin/SNAP-25 breiter. Aber auch hier haben ca. $\frac{3}{4}$ der Vesikel einen Radius zwischen 20 nm und 35 nm. Bei Synaptobrevin-Liposomen liegt der mittlere Radius bei etwa 16 nm, bei Syntaxin-Liposomen bei etwa 18 nm.

Da über dynamische Lichtstreuung bestimmte Größenverteilungen als ungenau kritisiert worden sind, wurde die Größenverteilung von Synaptobrevin-Liposomen zum Vergleich auch über statische Lichtstreuung (auch: *multi angle laser light scattering*, kurz MALLS) bestimmt [120]. Weil die statische Lichtstreuung nur eine Durchschnittsgröße der streuenden Partikel liefert, also selbst keine Größenverteilungen unmittelbar zu ermitteln erlaubt, müssen die Liposomen zuerst chromatographisch ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Gelchromatographische Methoden haben sich dazu wegen der Interaktion der Liposomen mit der stationären Phase und dem resultierenden hohen Lipidverlust als ungeeignet erwiesen [120]. Die Liposomen wurden daher über *asymetric field flow fractionation* aufgetrennt. Über die gesamte Zeit der Trennung wurde die Intensität des gestreuten Lichts in mehreren Winkeln zur Probe gemessen (Abb. 3.2a). Die Trennung muss dazu so optimiert werden, dass die Polydispersität zu

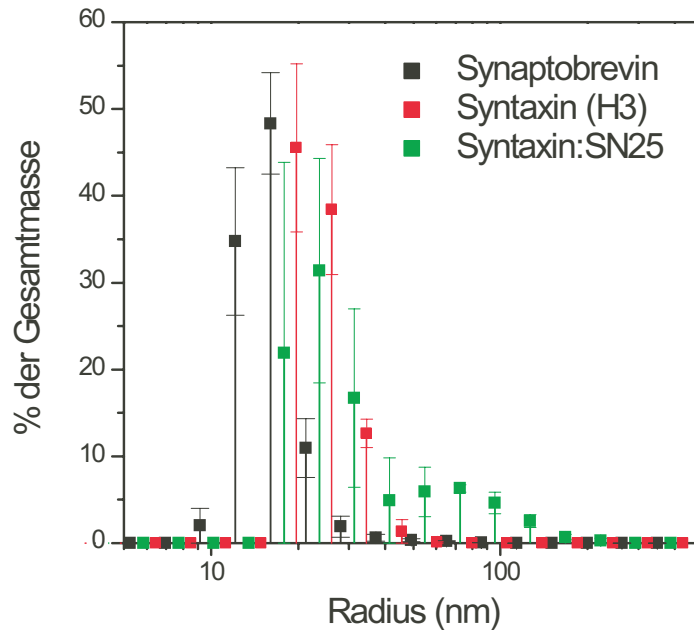


Abbildung 3.1 – Über dynamische Lichtstreuung bestimmte Größenverteilungen einiger Liposomen. Dargestellt sind die Größenverteilungen für Synaptobrevin- und Syntaxin(H3)-Liposomen und von Liposomen mit einem 2:1-Komplex von Syntaxin (H3, AS 183-288) und SNAP-25. An die gemessenen Autokorrelationsfunktionen wird eine Verteilung der Partikel über *bins* von 9, 11, 17, 21 nm etc. angepasst. Die schwarzen bzw. roten *bins* sind links bzw. rechts neben die grünen *bins* versetzt gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei Liposomen-Präparationen. Man beachte, dass die Skala für den Radius logarithmisch ist. Die Fehlerbalken geben Standardabweichungen vom Mittelwert an.

jeder Retentionszeit möglichst gering ist. Gleichzeitig darf die Verdünnung der Probe nicht zu groß sein, damit die Intensität des gestreuten Lichts zuverlässig gemessen werden kann. Aus den winkelabhängigen Intensitäten kann dann eine Größenverteilung berechnet werden (Abb. 3.2b). Der ermittelte durchschnittliche *rms radius* von 18 nm stimmt hervorragend mit der über dynamische Lichtstreuung bestimmten Verteilung überein.¹

¹Durch die Messung der Winkelabhängigkeit der Intensität des gestreuten Lichts ist es möglich, die Größe des streuenden Partikels zu berechnen. Dabei wird keine Annahme über Form und Massenverteilung des streuenden Partikels gemacht. Deshalb kann nur der Trägheitsradius (*radius of gyration* oder *mean square radius*) bestimmt werden, der ein Maß für die nach der Massenverteilung um den Schwerpunkt gewichtete Größe des streuenden Partikels ist. Besteht ein Partikel aus N gleichartigen Teilchen, so ist der *mean square radius* als der mittlere quadratische Abstand der Teilchen vom Schwerpunkt des Partikels \vec{r}_S definiert:

$$\langle r^2 \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \langle \vec{r}_i - \vec{r}_S \rangle^2 \quad (3.1)$$

Zum Vergleich zu den über Lichtstreuungsmethoden bestimmten Größen-

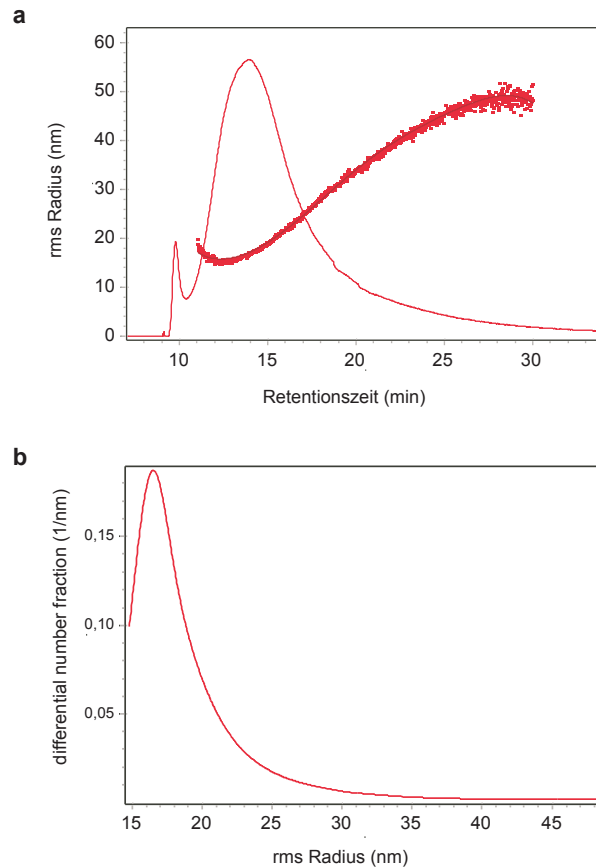


Abbildung 3.2 – Über statische Lichtstreuung bestimmte Größenverteilung von Synaptobrevin-Liposomen. (a) Die Liposomen wurden zunächst über *asymmetric field flow fractionation* chromatographisch aufgetrennt. Im MALLS-Detektor wird dann Streulicht in verschiedenen Winkeln zum einfallenden Licht gemessen. Gezeigt ist hier die Intensität des am 90° -Detektor gemessenen Streulichts als Funktion der Retentionszeit. Für jede Retentionszeit wurde dann der Mittelwert des Trägheitsradius bestimmt. Daraus ergibt sich die in (b) dargestellte Größenverteilung mit einem mittlerer Trägheitsradius von 18 nm.

verteilungen ist in Abb. 3.3 eine elektronenmikroskopische Aufnahme von Synaptobrevin-Liposomen gezeigt. Die große Mehrheit der Partikel hat einen Durchmesser um die 30 nm. In dieser Präparation sind allerdings auch einige

Der *rms radius* ist die Quadratwurzel aus dem *mean square radius*. Der geometrische Radius ist nicht unmittelbar zugänglich aus dem *rms radius*. Dazu sind Informationen über die Form des Partikels und die Massenverteilung in ihm nötig. Der *rms radius* einer hohlen Kugel mit unendlich dünner Schale wäre gleich seinem geometrischen Radius. Der geometrische Radius einer Vollkugel ist gleich $0,775 \times rms\ radius$. Der geometrische Radius eines Liposoms ist also etwas kleiner als sein *rms radius*.

größere Partikel von etwa 60-100 nm Durchmesser zu erkennen. Zusammenfassend haben die oben beschriebenen Messungen ergeben, dass durch die verwendete Rekonstitutionsmethode (Cholat-Entfernung durch Gelfiltration) überwiegend kleine Liposomen erzeugt wurden, wobei sich die Variabilität des Radius in relativ engen Grenzen hielt. Dies entspricht im Wesentlichen bereits früher gemachten Beobachtungen [120, 221, 224]. Weiterhin gab es keine Hinweise auf eine Änderung der Größenverteilung bei langen Standzeiten der Liposomenpräparation, ein Beleg dafür, dass die hier verwendeten Liposomen stabil und Reste an Detergens minimal sind, also nicht die Fusogenizität erhöhen.

Zum Schluss wurde die Effizienz des Proteineinbaus sowie die Orientierung der

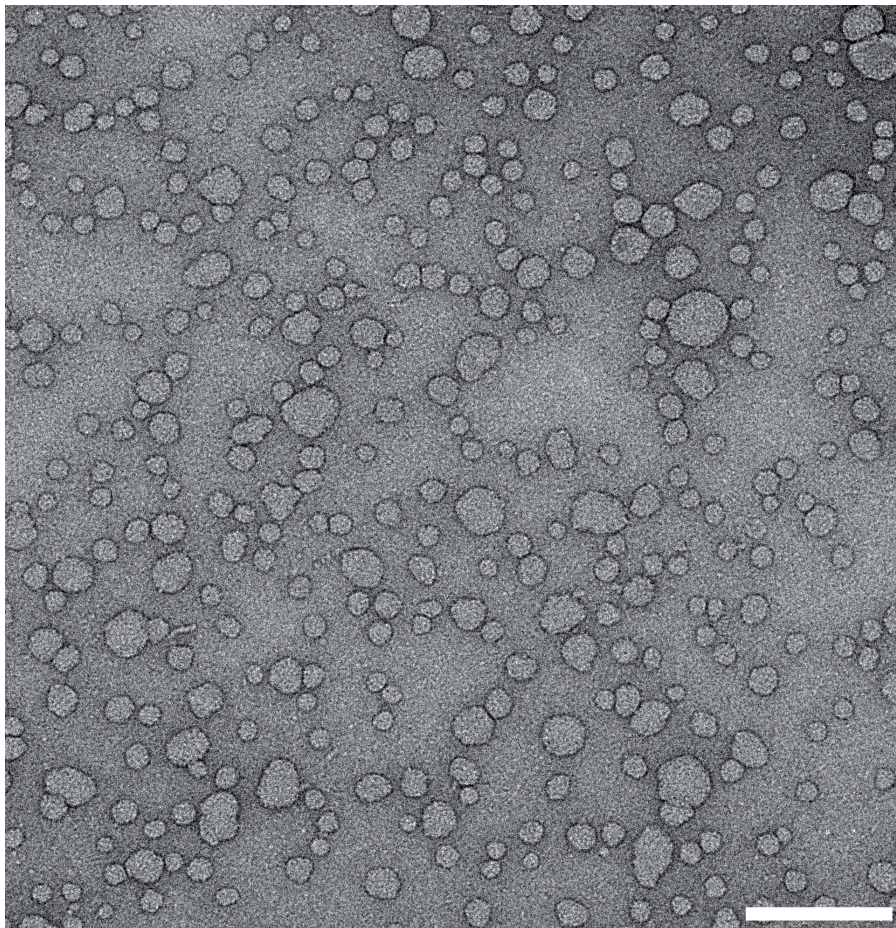


Abbildung 3.3 – Elektronenmikroskopische Negativkontrast-Aufnahme von Synaptobrevin-Liposomen. Liposomen wurden in 0,1% Glutaraldehyd für 5 min bei RT präfixiert. Die Liposomenlösung wurde dann auf Kohlenstoff-beschichtete *grids* gegeben und mit 1% Uranylacetat angefärbt. Die Probenpräparation und -analyse hat Dr. Dietmar Riedel durchgeführt. Der Maßstab im unteren rechten Bildrand zeigt 200 nm an.

Proteine in den Liposomen untersucht. Um festzustellen, ob die Liposomenfraktionen noch freie, nichtinkorporierte Proteine enthielten, wurden die Liposomen mit einer 80%igen Nycodenz-Lösung versetzt. Diese Probe wurde dann mit einer 30 %igen Nycodenz-Lösung und SMART-Laufpuffer (siehe Kapitel 2.2.5) überschichtet und anschließend zentrifugiert. Unter diesen Bedingungen flotieren Liposomen, während nicht eingebaute Proteine in der untersten, dichten Gradientenschicht verbleiben. Danach waren Synaptobrevin und Syntaxin (AS 183-288) nahezu quantitativ in die Membran eingebaut. Gesamtsyntaxin (mit der N-terminalen H_{abc} -Domäne) wird etwas weniger effizient rekonstituiert (nicht gezeigt).

Proteine können bei der Rekonstitution in umgekehrter Orientierung in die Membran eingebaut werden. Für die SNAREs bedeutet dies, dass das SNARE-Motiv im Lumen des Vesikels liegt, der C-Terminus aber nach außen zeigt. Wie bereits in Kapitel 1.2.2.3 erläutert, sind SNAREs Substrate für äußerst spezifische Zinkproteasen, die clostridialen Toxine. Der Anteil der für Proteolyse zugänglichen SNAREs entspricht dem Anteil der korrekt orientierten. Abbildung 3.4 zeigt, dass Syntaxin (AS 183-288) und Synaptobrevin zu etwa 70%, Gesamt-Syntaxin zu über 80% richtig orientiert ist.

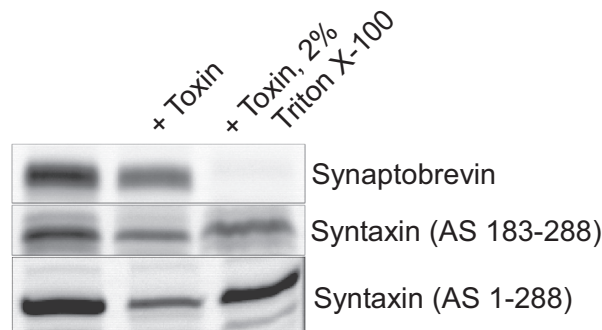


Abbildung 3.4 – Orientierung der rekonstituierten Proteine in der Liposomenmembran. Liposomen mit fluoreszenzmarkiertem Synaptobrevin oder zwei Syntaxin-Varianten (mit oder ohne H_{abc} -Domäne) wurden mit clostridialen Toxinen (Botulinumneurotoxin (BoNT) B bzw. C1) verdaut. Nur richtig orientiertes Protein ist für Proteolyse zugänglich. Um zu überprüfen, ob die Inkubationszeit ausreichend ist, um das gesamte Protein zu verdauen, wurde die Reaktion auch in 2% Triton X-100 durchgeführt. Dabei wird deutlich, dass BoNT/C1 nur membranständiges Syntaxin verdauen kann [20]. Die Spaltprodukte wurden dann über SDS-PAGE aufgetrennt und anhand der Fluoreszenz im Gel quantifiziert. Synaptobrevin und Syntaxin ohne die H_{abc} -Domäne sind demnach zu 70%, Gesamtsyntaxin zu über 80% richtig orientiert.

3.1.3 Messen einer Fusionsreaktion

Wie kann die Fusion von Liposomen gemessen werden? Das offensichtliche Resultat der Fusion zweier Liposomen ist eine Größenzunahme. Fusionieren zwei Vesikel mit dem Radius r , entsteht ein Vesikel mit dem Radius $\sqrt[3]{2}r$. Die soeben vorgestellten Methoden zur Bestimmung von Größenverteilungen eignen sich prinzipiell auch zur Messung der Größenzunahme durch Fusion. In der Tat wies eine frühere Studie bereits mit kryo-Elektronenmikroskopie eine Verschiebung der Größenverteilung durch Fusion nach [224]. Die Größenverschiebung war so ausgeprägt, dass sie nur durch wiederholte Fusion einzelner Vesikel erklärt werden konnte.

In dieser Arbeit wurde die Größenverschiebung durch eine Fusionsreaktion mit statischer Lichtstreuung gemessen. Dazu wurden Synaptobrevin-Liposomen mit Liposomen inkubiert, in die ein Komplex aus Syntaxin, SNAP-25 und einem Synaptobrevin-Fragment rekonstituiert worden war. Auf diesen Komplex wird später noch ausführlich eingegangen (Kap. 3.2.6). Abbildung 3.5 zeigt die gemessenen Größenverteilungen. Tabelle 3.1 zeigt die daraus bestimmten mittleren Radien und gibt für jede Probe einen Polydispersitätsindex an². Die Fusion führte sowohl zu einer Verschiebung in der Größenverteilung als auch zu einer größeren Polydispersität der Probe. Wegen des Ausmaßes der Größenzunahme zeigt auch diese Messung, dass die Liposomen mehrere Fusionsrunden durchlaufen.

Um den zeitlichen Ablauf einer Fusionsreaktion zu verfolgen, bieten sich fluoreszenzspektroskopische Methoden an. Seit Jahren ist ein Assay weit verbreitet, bei dem die Fusion als die Vermischung der Membranen gemessen wird [243, 265]. Dazu werden einer Liposomen-Population zwei fluoreszenzmarkierte Phospholipide zu jeweils 1,5 mol% den übrigen Phospholipiden zugesetzt. Die spektralen Eigenschaften der Fluorophore sind so gewählt, dass es zur Fluo-

² r_n und r_w bezeichnen das Zahlenmittel des Trägheitsradius (*number-average mean square radius*) bzw. das Gewichtsmittel des Trägheitsradius (*weight-average mean square radius*). Sie sind wie folgt definiert:

$$\langle r^2 \rangle_n = \frac{\sum \left(\frac{c_i}{M_i} \langle r^2 \rangle_i \right)}{\sum \frac{c_i}{M_i}} \quad (3.2)$$

$$\langle r^2 \rangle_w = \frac{\sum (M_i \langle r^2 \rangle_i)}{\sum M_i} \quad (3.3)$$

$P_{w/n}$ ist definiert als r_w/r_n . Die Größen c_i , M_i und $\langle r^2 \rangle_i$ sind die Massenkonzentration, die molare Masse und der *mean square radius* zur Retentionszeit i .

Probe	r_n	r_w	$P_{w/n}$
Synaptobrevin-Liposomen	$17,6 \pm 2,5$	$19,8 \pm 2,2$	1,13
Komplex-Liposomen	$29,0 \pm 2,0$	$36,1 \pm 1,8$	1,24
Fusionsreaktion	$69,2 \pm 1,4$	100 ± 1	1,45

Tabelle 3.1 – Mittlere Radien der Liposomen vor und nach einer Fusionsreaktion. $P_{w/n}$ ist der Polydispersitätsindex, r_w und r_n sind das Gewichts- bzw. das Zahlenmittel des Trägheitsradius (siehe Fußnote).

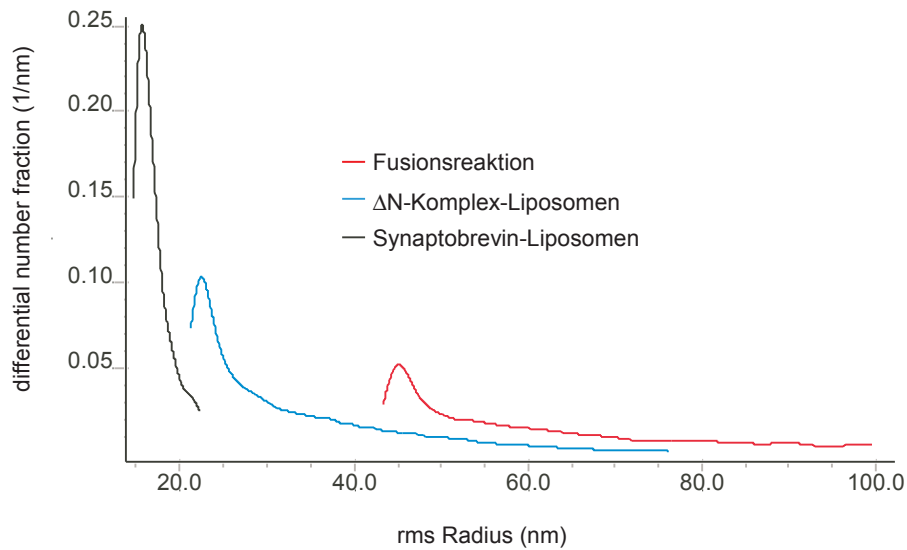


Abbildung 3.5 – Verschiebung der Größenverteilung nach einer Fusionsreaktion, gemessen mit Hilfe der statischer Lichtstreuung. Wiederum wurde die Größenverteilung von Synaptobrevin-Liposomen über *asymmetric field flow fractionation* und *MALLS* bestimmt. Gezeigt sind die Größenverteilungen von Synaptobrevin-Liposomen und von Liposomen mit einem Komplex aus Syntaxin (AS 183-288), SNAP-25A und Synaptobrevin (AS 49-96)(ΔN -Komplex). Eine Fusionsreaktion resultiert in einer deutlichen Größenverschiebung, die nur durch mehrere Fusionsrunden zu erklären ist.

reszenzlöschung des kurzwelligen Farbstoffes (7-Nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl, kurz NBD) durch *resonance energy transfer* (RET) kommt. Die Fusion mit einem unmarkierten Liposom führt zu einer Verdünnung der beiden Farbstoffe über eine größere Fläche. Der Energietransfer vom Donor- auf das Akzeptorfluorophor wird dadurch weniger effizient, und es kommt zu einem Anstieg der Donorfluoreszenz.

Wird Syntaxin (AS 183-288) in Liposomen mit NBD- und Rhodamin-markiertem Phosphatidylethanolamin rekonstituiert und mit unmarkierten Synaptobrevin-Liposomen inkubiert, so steigt die Donorfluoreszenz bei Zugabe von SNAP-25 an, während in Abwesenheit von SNAP-25 keine Änderung

der Fluoreszenzintensität zu beobachten ist. Lipidvermischung tritt also nur auf, wenn alle drei SNAREs zur Bildung des ternären Komplexes präsent sind (Abb. 3.6a). Aus der Abbildung wird weiterhin deutlich, dass die Fusion nach SNAP-25 Zugabe mit Verzögerung beginnt. Wie erläutert, ist die Assemblierung des SNARE-Komplexes ein mehrschrittiger Prozess. Zunächst erfolgt die Bildung des binären Komplexes aus Syntaxin und SNAP-25 [70], erst dann kann Synaptobrevin binden, wodurch es zur Fusion kommt. Die Verzögerung im Anstieg der NBD-Fluoreszenz kann also mit der der Fusion vorausgehenden Bindung von SNAP-25 an Syntaxin erklärt werden. Wird der Komplex durch Inkubation der Syntaxin-Liposomen mit SNAP-25 für 16 h auf Eis vorformiert, startet die Fusionsreaktion mit maximaler Reaktionsgeschwindigkeit (Abb. 3.6b). Diese Reaktion kann vollständig durch einen Überschuss des löslichen Fragments von Synaptobrevin (AS 1-96, in dieser Arbeit als Sb_{sol} abgekürzt) inhibiert werden, das um die Bindungsstelle mit rekonstituiertem Synaptobrevin kompetiert.

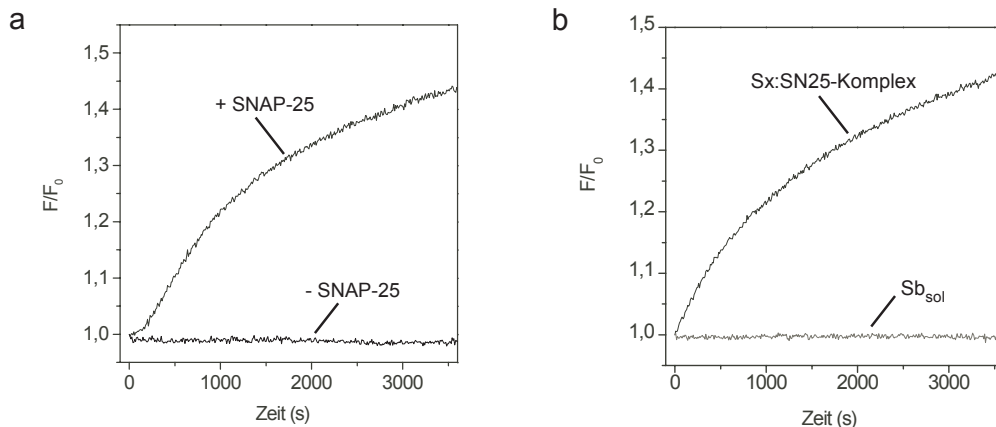


Abbildung 3.6 – Komplexbildung zwischen den drei SNARE-Proteinen Syntaxin (H3), SNAP-25 und Synaptobrevin ist ausreichend für Fusion. **(a)** Werden NBD/Rhodamin-markierte Syntaxin-Liposomen mit unmarkierten Synaptobrevin-Liposomen inkubiert, so kommt es nur bei Zugabe von SNAP-25 zum Anstieg der NBD-Fluoreszenz. Der Anstieg der NBD-Fluoreszenz erfolgt jedoch mit Verzögerung. **(b)** Bei Vorinkubation der Syntaxin-Liposomen mit SNAP-25 erfolgt dies ohne Verzögerung. Die Reaktion kann kompetitiv durch das cytoplasmatische Fragment von Synaptobrevin (AS 1-96, Sb_{sol}) gehemmt werden. Für beide Reaktionen ist die Bildung des ternären Komplexes also Voraussetzung. Syntaxin, Synaptobrevin und SNAP-25 wurden in diesen Experimenten in Konzentrationen von $2,5 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$ bzw. $20 \mu\text{M}$ eingesetzt, die Konzentration des löslichen Fragments von Synaptobrevin (Sb_{sol}) war ebenfalls $20 \mu\text{M}$. In dieser und allen folgenden Abbildungen ist die NBD-Fluoreszenz auf den Anfangswert einer jeden Messung bzw. die Basislinie normalisiert (F/F_0).

3.2 Korrelation von SNARE-Komplexbildung und Fusion

Die im vorigen Abschnitt gezeigten Daten zeigen, dass die Bildung von SNARE-Komplexen eine langsame Fusionsreaktion antreibt. In diesem Kapitel werden die Gründe für die langsamen Fusionsraten untersucht. Die mit den löslichen Fragmenten der SNARE-Proteine gewonnenen Erkenntnisse bilden dabei die Grundlage für die hier präsentierten Experimente.

Fasshauer und Margittai zeigten, dass die Bindung von SNAP-25 an Syntaxin der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Formierung des ternären Komplexes aus den Monomeren ist [70]. Sie stellten allerdings fest, dass eine Vorinkubation von Syntaxin und SNAP-25 die Bindung von Synaptobrevin nur marginal beschleunigt, und führten dies darauf zurück, dass Syntaxin mit Synaptobrevin um die Bindungsstelle am 1:1-Komplex aus Syntaxin und SNAP-25 kompetiert. Während die Bindung von Synaptobrevin unter Standardbedingungen irreversibel ist [67], bindet das zweite Syntaxin-Molekül reversibel [70]. Das Gleichgewicht von 2:1- und 1:1-Komplex bestimmt daher die Verfügbarkeit einer Bindungsstelle für Synaptobrevin (es ist zusammen mit den für die löslichen Fragmente bestimmten Bindungs- und Dissoziationsraten in Abbildung 3.7 schematisch dargestellt). In den folgenden Abschnitten wird untersucht, inwieweit dieses Modell auf die Liposomenfusion übertragbar ist.

3.2.1 Bindung von SNAP-25 an Syntaxin-Liposomen

Zunächst wurde die Bindung von SNAP-25 an membranständiges Syntaxin untersucht, die mit Hilfe von Fluoreszenzanisotropie gemessen werden kann (siehe Kapitel 2.2.10.2) für eine Erklärung dieser Methode). Die Bindung von fluoreszenzmarkiertem SNAP-25 an Syntaxin sollte zu einem Anstieg der Fluoreszenzanisotropie führen. Dies ist in der Tat der Fall. Wurde SNAP-25A, das an der Position K79C mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor488 markiert ist, mit Syntaxin-Liposomen (AS 183-288) inkubiert, war ein Anstieg der Anisotropie zu beobachten. Erst nach ca. 3 h kam es zu einer Sättigung, nach ca. 1 h war die halbmaximale Sättigung erreicht (Abb. 3.8a). Bei Inkubation mit einem Überschuss von unmarkiertem SNAP-25, das mit dem markierten Protein um die Bindung an Syntaxin kompetiert, wurde kein Anstieg der Anisotropie registriert. Um auszuschließen, dass der Farbstoff an dieser Position die Interaktion

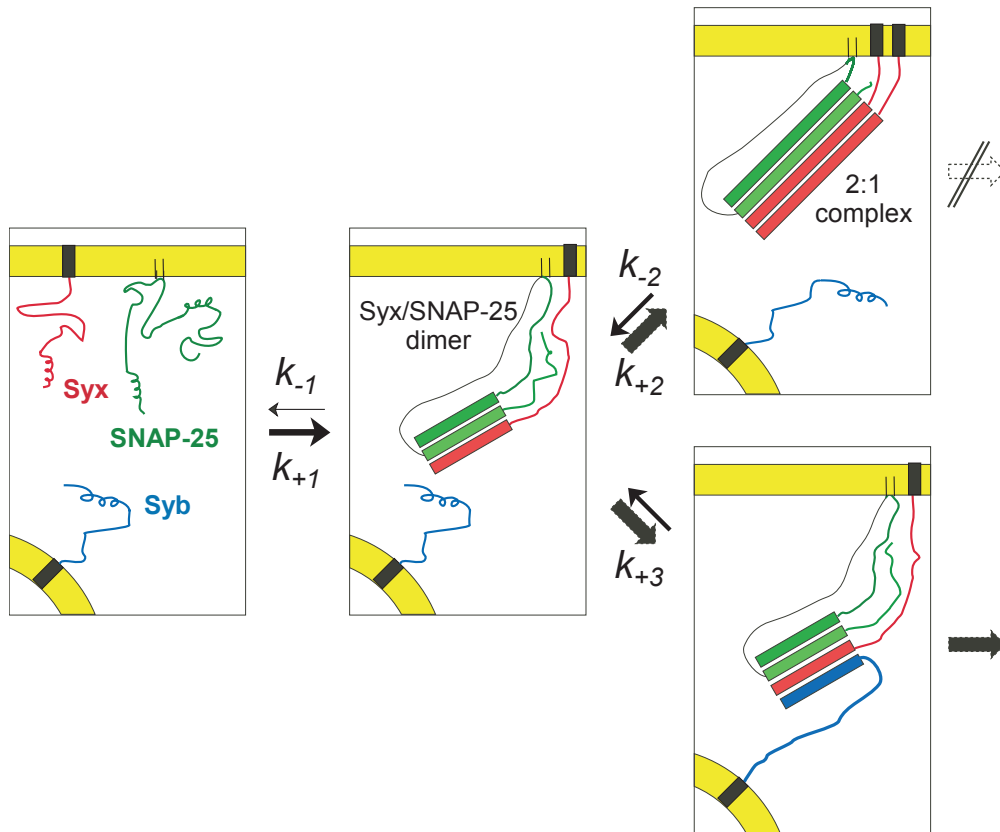


Abbildung 3.7 – Schema zur Erklärung des Gleichgewichts von Syntaxin und SNAP-25. Für Details siehe Text. $k_{+1} \approx 6000 M^{-1} s^{-1}$, $k_{-1} \approx 0,0001 s^{-1}$, $k_{-2} \approx 0,01 s^{-1}$, $k_{+2} \approx k_{+3} \approx 5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ [191].

mit Syntaxin beeinflusst, wurde die Bindung einer weiteren SNAP-25-Variante untersucht. Bei Verwendung von SNAP-25, das am Cystein 84 markiert ist, folgte der Anstieg der Anisotropie bei etwas größerer Gesamtänderung einer ähnlichen Kinetik. Abbildung 3.8b zeigt außerdem, dass das vollständige Syntaxin mit der N-terminalen H_{abc} -Domäne SNAP-25 deutlich langsamer bindet. Im Vergleich dazu erfolgt die Bindung von SNAP-25 an das lösliche SNARE-Motiv von Syntaxin (AS 180-262) deutlich schneller [70]. Die Bindungsrate für diese Interaktion wurde von Fasshauer und Margittai auf $\approx 6000 M^{-1} s^{-1}$ bestimmt. Bei den hier verwendeten Konzentrationen resultiert dies in einer vollständigen Bindung innerhalb einer halben Stunde [70]. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass membranständiges Syntaxin weitgehend inaktiv ist.

Andere Beobachtungen unterstützen diese Vermutung: So bindet das Protein Munc-18a an lösliches Syntaxin mit einer Geschwindigkeitskonstante von $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ (persönliche Mitteilung von Pawel Burkhardt, Abteilung Neurobiologie, MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen). In der Membran ver-

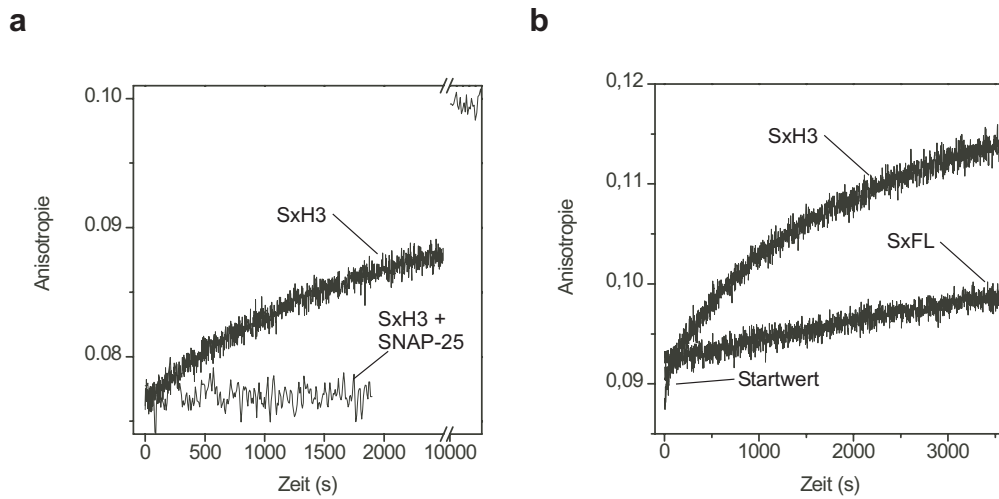


Abbildung 3.8 – Bindung von SNAP-25 an membranständiges Syntaxin. Die Bindung wurde als ein Anstieg der Fluoreszenzanisotropie gemessen. **(a)** 200 nM SNAP-25 (an der Position K79C mit AlexaFluor 488 markiert) wurde mit einem 2,5-fachen Überschuss an Syntaxin 1a (AS 183-288)-Liposomen inkubiert. Die Fluoreszenzanisotropie steigt, bis nach ca. 3 h ein Plateau erreicht wird. **(b)** Ein an der Position Cys84 markiertes SNAP-25 bindet an Syntaxin (AS 183-288, SxH3)-Liposomen mit ähnlicher Kinetik. Bei Inkubation mit rekonstituiertem Gesamtsyntaxin (AS 1-288, SxFL) erfolgt die Bindung deutlich langsamer.

ankertes Syntaxin bindet Munc-18 deutlich langsamer (persönliche Mitteilung von Pawel Burkhardt). Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen haben des Weiteren gezeigt, dass Syntaxin in nativen Membranen nicht als Monomer sondern in Clustern von ca. 75 Molekülen vorliegt [232]. Auch hier wurde vermutet, dass Syntaxin durch Oligomerisierung für eine Interaktion mit SNAP-25 inaktiv wird. Zur Untersuchung der Frage, ob auch rekombinantes Syntaxin in künstlichen Vesikeln oligomerisiert vorliegt, wurde folgende Methode gewählt: Eine Cysteinmutante von Syntaxin wurde an Position 197C mit den Fluoreszenzfarbstoffen AlexaFluor488 bzw. AlexaFluor 594 markiert. Beide Proteine wurden dann in äquimolaren Mengen in künstliche Vesikel rekonstituiert. Ein Emissionsspektrum bei Anregung des kurzwelligen Farbstoffes (AlexaFluor 488) zeigt, dass Zugabe von Munc-18 zu Liposomen mit rekonstituiertem Syntaxin zu einem Anstieg der Fluoreszenzemission des kurzwelligen Farbstoffes führt (Abb. 3.9). Bei Zugabe eines Überschusses an löslichem Syntaxin kommt es wiederum zu einer Fluoreszenzlöschung (*quenching*) dieses Farbstoffes. Die Emission des längerwelligen AlexaFluor594 bleibt nahezu unverändert; es kommt lediglich zu leichter Fluoreszenzlöschung nach Zugabe von Munc-18. Dieses Ergebnis kann dahingehend interpretiert werden, dass Syntaxin in der Membran oligomeri-

siert vorliegt, was zu einer Löschung der Fluoreszenz des kurzwelligen Farbstoffes durch *resonance energy transfer* führt. Zugabe von Munc-18 führt zu einer Monomerisierung von Syntaxin. Die Fluoreszenzlöschung wird dadurch aufgehoben.

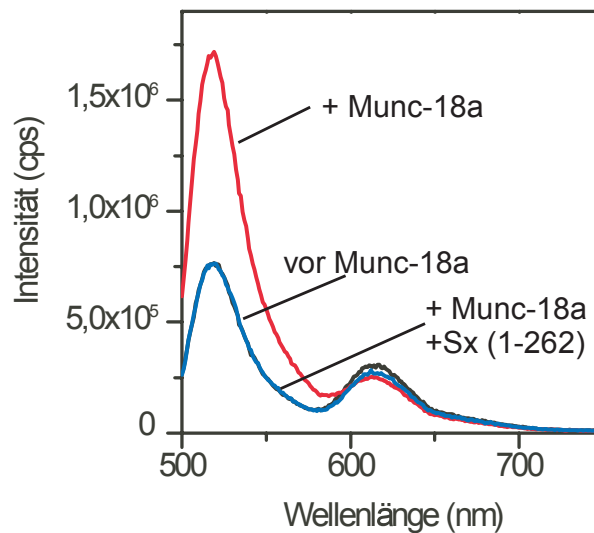


Abbildung 3.9 – Die Bindung von Munc-18a an membranständiges Syntaxin führt zu einer Veränderung der Syntaxin-Fluoreszenz, die als Monomerisierung interpretiert werden kann. Ein an der AS Cys197 mit AlexaFluor488 bzw. 594 markiertes Syntaxin (AS 1-288) wurde in Liposomen rekonstituiert. Ein Emissionsspektrum zeigt, dass die Fluoreszenz des kurzwelligen Farbstoffes bei Zugabe von Munc-18a deutlich zunimmt. Zugabe des cytoplasmatischen Fragments (AS 1-262) führt wieder zur Fluoreszenzlöschung.

3.2.2 Die Bindung von Synaptobrevin an die Q-SNAREs

Als nächstes wurde die Bindung von Synaptobrevin an den rekonstituierten Q-SNARE-Komplex von Syntaxin 1 und SNAP-25 untersucht. Dazu wurden die Proteine in micellärer Lösung gemischt, und der sich bildende 2:1-Komplex über Ionenaustauschchromatographie gereinigt und in Liposomen rekonstituiert. Zum Vergleich wurde die Reaktivität von zwei weiteren Q-SNARE-Komplexen untersucht: der 2:1-Komplex aus Syntaxin 1 und SNAP-23 und die spätendosomalen Q-SNAREs Syntaxin 7, vti 1b und Syntaxin 8. Während der erste ebenfalls als gereinigter Komplex rekonstituiert wurde, wurden die spätendosomalen Q-SNAREs in äquimolaren Mengen gemischt und ohne Aufreinigung rekonstituiert.

Um die Reaktivität der verschiedenen Q-SNARE-Komplexe zu vergleichen,

wurde die Kinetik der Synaptobrevin-Bindung an Liposomen mit diesen Q-SNAREs gemessen. Dazu wurden Cysteinmutanten der cytoplasmatischen Domäne von Synaptobrevin mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor 488 markiert. Die Bindung von Synaptobrevin konnte, wie bereits für SNAP-25 beschrieben, als ein Anstieg der Fluoreszenzanisotropie gemessen werden. Es wurden dazu die Cysteinmutanten S28C und T79C verwendet. Im Folgenden werden nur die Ergebnisse mit der Mutante T79C gezeigt. Messungen mit der anderen Mutante führten zu sehr ähnlichen Ergebnissen. Wie aus Abbildung 3.10 ersichtlich ist, bildete sich der ternäre Komplex bei Rekonstitution eines 2:1-Komplexes mit einem Syntaxin, in dem die N-terminale H_{abc} -Domäne fehlt, innerhalb von 20 min. Wurde der 2:1-Komplex mit Gesamtsyntaxin verwendet, erfolgt die Bindung langsamer. An die spätendosomalen Q-SNAREs und an einen 2:1-Komplex aus Syntaxin 1 und SNAP-23 bindet Synaptobrevin hingegen deutlich schneller.

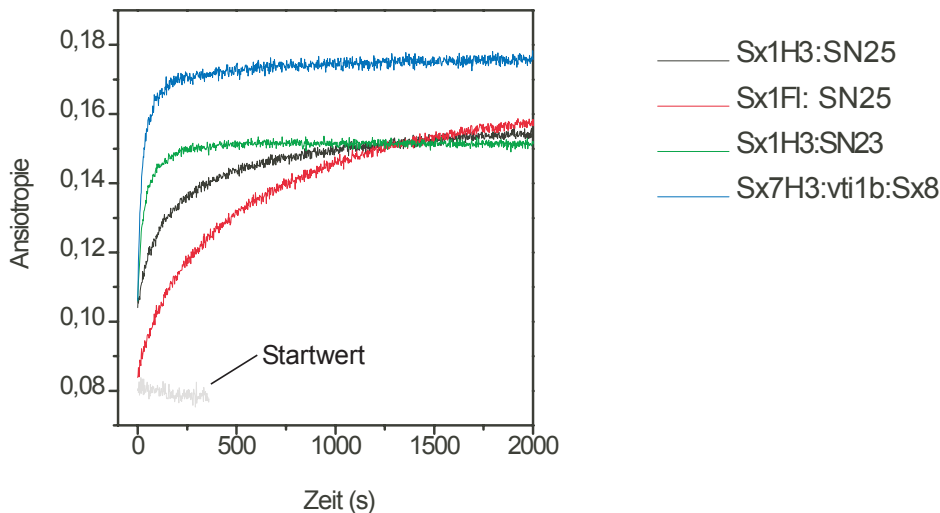


Abbildung 3.10 – Bindung von Synaptobrevin an verschiedene Q-SNAREs. An der Position T79C mit AlexaFluor488 markiertes lösliches Synaptobrevin wurde mit einem 1,5 fachen Überschuss rekonstituierter Q-SNAREs versetzt. Der Anstieg der Fluoreszenzanisotropie zeigt die Bindung an die Q-SNAREs an und damit die Bildung des ternären Komplexes. Synaptobrevin bindet an den Syntaxin 1(183-288, H3)/SNAP-23 Komplex und an die spätendosomalen Q-SNAREs Syntaxin 7 (Sx7H3), vti1b und Syntaxin 8 (Sx8) schneller als an die Komplexe aus SNAP-25 und Syntaxin 1(1-288, Sx1FL und 183-288, Sx1H3). Die Gesamtänderung der Anisotropie ist für die Komplexe aus Syntaxin 1 und SNAP-25 (SN25) und SNAP-23 (SN23) sehr ähnlich. Bindung an die spätendosomalen Q-SNAREs führt zu einer etwas größeren Gesamtänderung. Alle endosomalen SNARE-Proteine umfassten nur das SNARE-Motiv und die Transmembranregion, d.h. bei Syntaxin 7, vti 1b und Syntaxin 8 fehlten die N-terminalen Domänen.

3.2.3 Der Einfluss der Reaktivität der Q-SNAREs auf die Fusionsreaktion

Als nächstes wurde die Frage untersucht, ob die in Abbildung 3.10 untersuchte Reaktivität der Q-SNAREs mit der Fusionskinetik korreliert. Dazu wurde Synaptobrevin in NBD/Rhodamin-markierte, die Q-SNAREs in unmarkierte Liposomen rekonstituiert. Abbildung 3.11a zeigt die Fusion von Synaptobrevin-Liposomen mit Liposomen, in die der gereinigte 2:1-Komplex aus Syntaxin 1 (AS 183-288, H3) und SNAP-25 rekonstituiert wurde. Wurde zur Herstellung des 2:1-Komplexes Gesamtsyntaxin (mit der N-terminalen H_{abc} -Domäne) verwendet, war die Fusion deutlich langsamer (3.11b). Bei Austausch von SNAP-25 gegen SNAP-23 lief die Reaktion dagegen deutlich schneller ab (Abb. 3.11c). Dies ist auch zu beobachten, wenn nicht die an der Exozytose beteiligten SNARE-Proteine verwendet werden, sondern die bei der homotypischen Fusion von späten Endosomen: Syntaxin 7, vit1b und Syntaxin 8 als Qa-, Qb- und Qc-SNAREs und Endobrevin als R-SNARE [7, 8] (Abb 3.11d). Ein sehr ähnlicher Reaktionsverlauf wurde beobachtet, wenn Synaptobrevin anstelle von Endobrevin verwendet wurde (nicht gezeigt).

Die unterschiedlichen Bindungsraten für Synaptobrevin an die verschiedenen Q-SNAREs korrelieren also gut mit den gemessenen Fusionsraten. Diese Experimente zeigen, dass die Reaktivität der Q-SNAREs, d.h. die Verfügbarkeit einer Bindungsstelle für das R-SNARE, wesentlich für die Effizienz der entsprechenden Fusionsreaktion ist. Unterschiede in der Kopplung von Komplexbildung und Fusion, d.h. in der Effizienz, mit der die Bildung von SNARE-Komplexen die Fusion bewirkt, werden durch diese Ergebnisse zwar nicht ausgeschlossen, sind jedoch als Erklärungsmuster für die beobachteten Unterschiede zwischen den Fusionskinetiken nicht unbedingt erforderlich. Die Reaktivität des R-SNAREs hat hingegen keinen Einfluss auf die Fusionsrate. Dieser Befund wird durch Experimente an membranständigem Synaptobrevin unterstützt, die gezeigt haben, dass es konstitutiv aktiv vorliegt [230]. Ein Vergleich der R-SNAREs Synaptobrevin, Endobrevin und VAMP4 legte außerdem nahe, dass sich R-SNAREs grundsätzlich ähnlich verhalten [24].

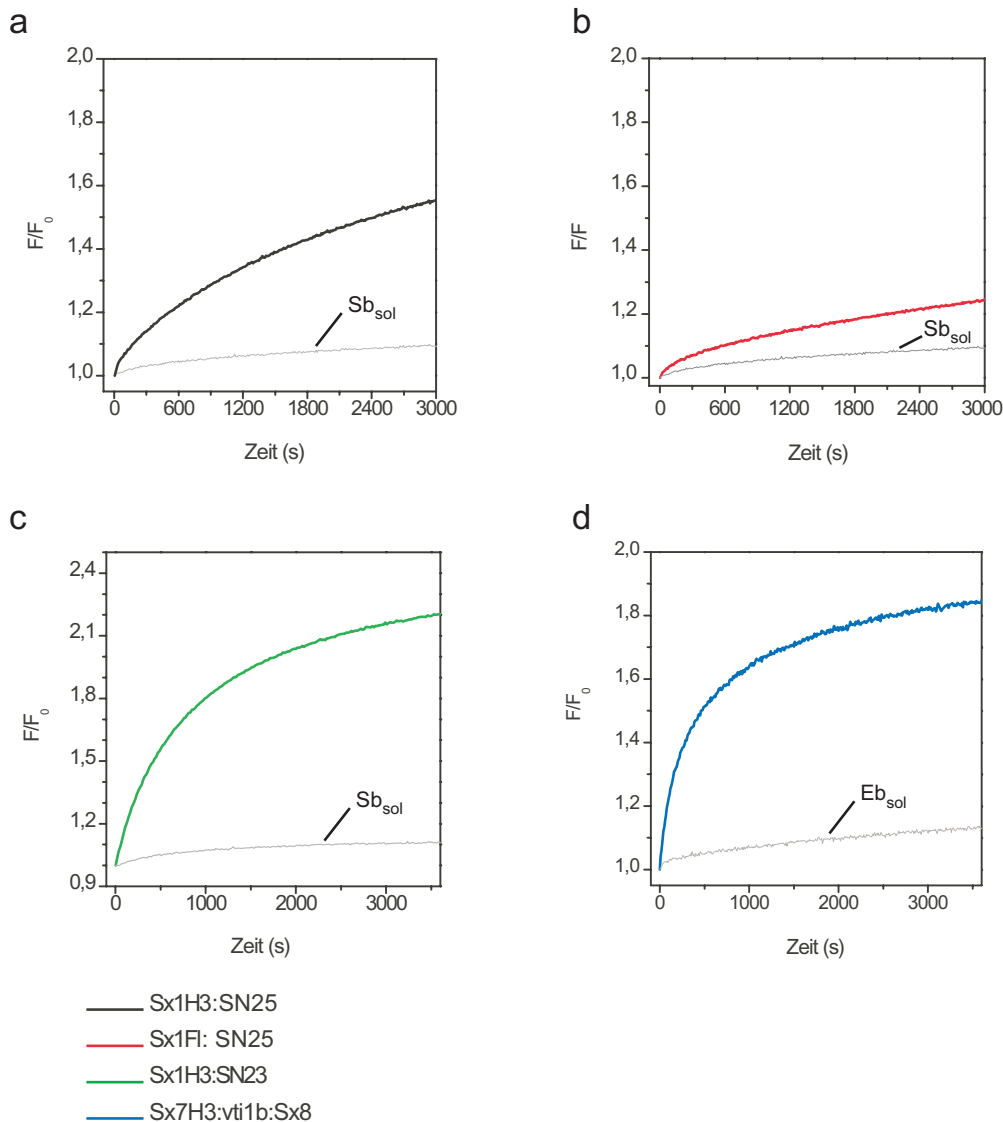


Abbildung 3.11 – Fusionsreaktionen mit verschiedenen SNAREs. **(a)** NBD/Rhodamin-markierte Synaptobrevin-Liposomen wurden mit unmarkierten Liposomen mit einem Komplex aus Syntaxin 1 (H3: AS 183-288) und SNAP-25 inkubiert. Es wird ein robuster Anstieg der NBD-Fluoreszenz gemessen. Ein Überschuss von löslichem Synaptobrevin (Sb_{sol}) inhibiert die Reaktion. **(b)** Ein deutlich langsamerer Anstieg wird beobachtet, wenn Gesamtsyntaxin (FL) verwendet wird. **(c)** Bei Rekonstitution eines Komplexes von Syntaxin 1 (H3: AS 183-288) und SNAP-23 erfolgt die Fusion deutlich schneller. **(d)** Bei Verwendung der spätendosomalen SNAREs Syntaxin 7, vti1b, Syntaxin 8 und Endobrevin/VAMP8 wird ebenfalls eine deutlich schnellere Fusion beobachtet. Auch diese Reaktionen lassen sich durch lösliche Fragmente von Synaptobrevin bzw. Endobrevin/VAMP8 (Eb_{sol}) inhibieren. Alle endosomalen SNARE-Proteine umfassten nur das SNARE-Motiv und die Transmembranregion, d.h. bei Syntaxin 7, vti 1b und Syntaxin 8 fehlten die N-terminalen Domänen.

3.2.4 Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf das Gleichgewicht der Q-SNAREs

Nach dem Massenwirkungsgesetz kann das Gleichgewicht zwischen dem 1:1- und dem 2:1-Komplex von Syntaxin und SNAP-25 durch eine Erhöhung der SNAP-25-Konzentration zugunsten des 1:1-Komplexes verschoben werden. Experimente aus dem Labor von Dirk Fasshauer mit löslichen SNARE-Fragmenten bestätigen dieses Modell. Wird Syntaxin mit einem großen molaren Überschuss an SNAP-25 vorinkubiert, so dass sich das Q-SNARE-Gleichgewicht einstellt, erfolgt eine schnelle Bindung von Synaptobrevin mit einer Geschwindigkeitskonstante von $k_{on} = 5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$. Bei sequentieller Mischung der drei Proteine, wenn sich das Gleichgewicht zwischen den Q-SNAREs noch nicht eingestellt hat und die langsame Bindung von SNAP-25 an Syntaxin geschwindigkeitsbestimmend ist, bindet Synaptobrevin sehr viel langsamer [191].

Prinzipiell ist der gleiche Versuch auch mit membranverankerten Proteinen denkbar. Abbildung 3.12 zeigt die Bildung von SNARE-Komplexen im Verlauf einer Fusionsreaktion. Dazu wurden die C-Termini der Proteine Syntaxin und Synaptobrevin um ein Cystein verlängert und mit den Fluoreszenzfarbstoffen AlexaFluor 488 bzw. 594 markiert. Die Bildung von *cis*-Komplexen führt zu *resonance energy transfer*, die Folge ist eine Löschung der Fluoreszenz des kurzwelligen und ein Anstieg der Fluoreszenz des langwelligen Fluorophors. Syntaxin-Liposomen wurden mit dem angegebenen molaren Überschuss an SNAP-25 vorinkubiert. Es zeigt sich, dass selbst eine Vorinkubation mit einem etwa zehnfachen molaren Überschuss an SNAP-25 nur zu einer moderaten Beschleunigung der Komplexbildung und der Fusion führt.

Dieser Befund ist leicht erklärt. Im Gegensatz zu den Experimenten mit den löslichen Fragmenten der SNARE-Proteine liegt Syntaxin bei der Liposomenfusion nicht homogen verteilt vor, sondern ist in der Membran lokal stark konzentriert. Bei der wahrscheinlich falschen Annahme einer homogenen Verteilung in der Membran ergibt sich bei einem molaren Lipid:Protein-Verhältnis von 200:1 eine Oberflächenkonzentration von $\approx 20 \text{ fmol mm}^{-2}$.³ Diese Überlegung und die in Kapitel 3.2.1 behandelte Inaktivität von membranständigem Syn-

³Dieser Wert ergibt sich, wenn man einen Vesikelradius von 20 nm, eine Dicke der Membran von 45 Å und eine Fläche pro Lipidkopfgruppe von 59 Å² annimmt [123]. Ein intuitiv einfacher zugänglicher Wert ergibt sich, wenn angenommen wird, dass die etwa 70 Proteine gleichmäßig über einen Würfel mit 50 nm Kantenlänge verteilen. Dies ergibt eine Konzentration von 900 μM.

taxin machen deutlich, dass eine Verschiebung des Q-SNARE-Gleichgewichts zugunsten des binären Komplexes erst bei technisch nicht erreichbaren Konzentrationen an SNAP-25 erreicht werden kann.

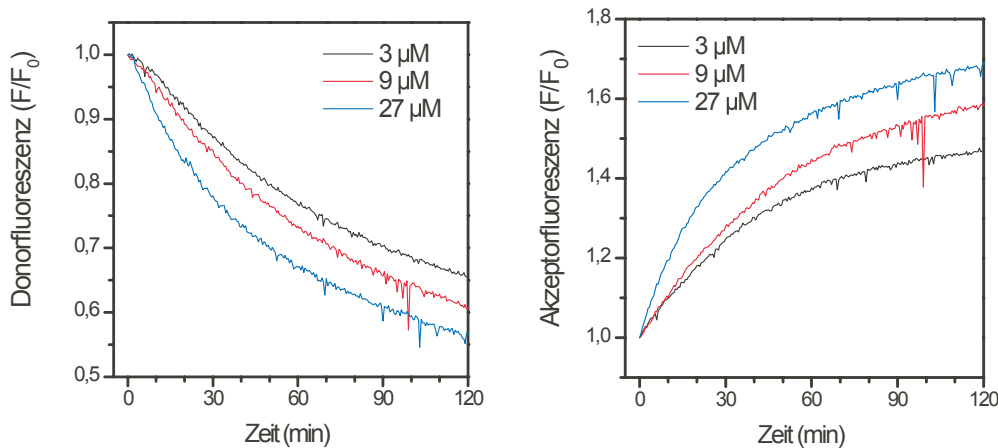


Abbildung 3.12 – Präinkubation von membranverankertem Syntaxin mit einem großem Überschuss an SNAP-25 führt zu einer nur moderaten Beschleunigung der Fusion. Luminal AlexaFluor488-markiertes Syntaxin wurde in Liposomen rekonstituiert. Über Nacht wurden $3\ \mu\text{M}$ rekonstituiertes Syntaxin mit den angegebenen SNAP-25-Konzentrationen inkubiert. Bei Zugabe von Liposomen mit luminal AlexaFluor594 markiertem Synaptobrevin kommt es zur Bildung des ternären Komplexes und zu Resonanzenergietransfer, d.h. Fluoreszenzlöschung von AlexaFluor488 (links) und Anstieg der AlexaFluor594-Fluoreszenz (rechts).

3.2.5 Stabilisierung eines 1:1-Komplexes

Die in diesem Unterkapitel beschriebenen Experimente mit löslichen SNARE-Fragmenten wurden von Ajaybabu Pobbati in der Arbeitsgruppe structural biochemistry unter der Anleitung von Dirk Fasshauer durchgeführt. Ich zeige sie hier, da sie für ein Verständnis der nachfolgenden Experimente von zentraler Bedeutung sind.

Die in den vorigen Abschnitten beschriebenen Daten zeigen, dass selbst bei Verwendung von präformierten Syntaxin/SNAP-25-Komplexen die Rate der Liposomenfusion langsam ist. Sie zeigen weiterhin, dass es — z.T. im Gegensatz zu dem Verhalten der löslichen Fragmente — kaum möglich ist, die Konzentration des aktiven 1:1-Intermediats durch Erhöhung der SNAP-25-Konzentration zu steigern und dadurch eine schnelle Bindung von Synaptobrevin zu ermöglichen. In den folgenden Abschnitten wurde daher ein anderer Ansatz gewählt, um die

Konzentration eines aktiven Intermediats mit einer freien Bindungsstelle für Synaptobrevin zu erhöhen. Dabei wurde versucht, einen kompletten SNARE-Komplex *in vitro* zu erzeugen, der allerdings kein vollständiges, sondern ein N-terminal verkürztes Fragment von Synaptobrevin enthielt. In einem solchen Komplex sollten die N-terminalen Bereiche der SNARE-Motive von SNAP-25 und Syntaxin in einer 1:1-Konfiguration vorliegen. Falls, wie von der *zipper*-Hypothese postuliert, die Bindung von Synaptobrevin am N-terminalen Ende initiiert wird, sollte die initiale Bindung daher nicht beeinträchtigt sein.

Um dies zu untersuchen wurden Komplexe von löslichen SNAREs gereinigt, die N- und C-terminal verkürzte Synaptobrevin-Fragmente enthielten. Wie aus Abbildung 3.13 ersichtlich, bindet Synaptobrevin an Komplexe mit N-terminal verkürzten Synaptobrevin-Fragmenten (Sb42-96, Sb49-96, Sb60-96) deutlich schneller als an die bislang verwendeten Syntaxin/SNAP-25-Komplexe [70,191]. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass N-terminal verkürzte Komplexe⁴ nur dann Synaptobrevin binden können, wenn das Fragment mindestens bis zum *layer -4* verkürzt ist. Komplexe, in denen Synaptobrevin nur bis zur Aminosäure Gln25 bzw. Thr35 verkürzt war, erlaubten keine Bindung von Synaptobrevin mehr. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass Synaptobrevin über den Bereich AS 25-42 an den Komplex bindet. Syntaxin kompetiert nicht mit dieser Bindung, die Initiation der Bindung des zweiten Syntaxins im 2:1-Komplex erfolgt also weiter C-terminal und ist in Δ N-Komplexen blockiert [191].

3.2.6 Charakterisierung des Δ N-Komplexes in der Fusionsreaktion

3.2.6.1 Schnelle Bindung von Synaptobrevin an einen membranverankerten Δ N-Komplex

Sind die im letzten Abschnitt beschriebenen Befunde mit löslichen SNARE-Fragmenten auf membranverankerte SNARE-Proteine übertragbar? Um dies zu testen, wurde ein Komplex aus Syntaxin (AS 183-288), SNAP-25 und dem Synaptobrevin-Fragment Sb49-96 (im Folgenden der einzige verwendete Δ N-Komplex) über Anionenaustauschchromatographie gereinigt und in künstliche Vesikel rekonstituiert. Auch dieser membranständige Komplex bindet lösliches,

⁴Diese Komplexe werden im Folgenden als Δ N-Komplexe bezeichnet.

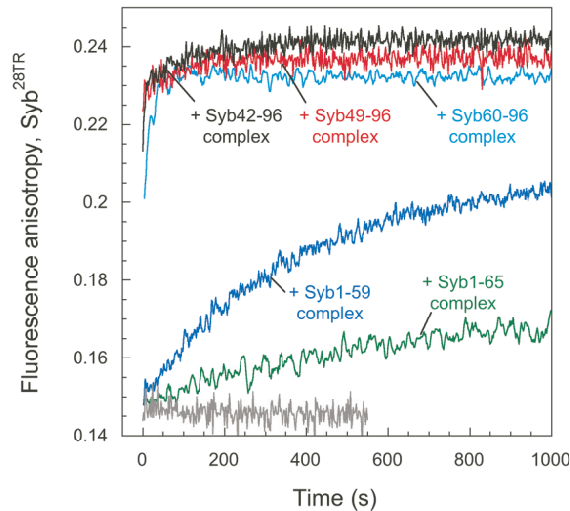


Abbildung 3.13 – Bindung von Synaptobrevin an Komplexe, die Synaptobrevin-Fragmente verschiedener Länge enthielten. Zu TexasRed markiertem löslichem Synaptobrevin wurden ternäre Komplexe mit verschiedenen Synaptobrevin-Fragmenten gegeben (z.B. Syb42-96 complex: Komplex aus Syntaxin 1 (AS 183-262), SNAP-25 und Synaptobrevin 2 (AS42-96)) Bindung wurde wiederum als ein Anstieg der Fluoreszenzanisotropie gemessen. Nur Komplexe mit N-terminal verkürztem Synaptobrevin führten zu einem schnellen Anstieg der Anisotropie, während die Bindung an Komplexe mit C-terminal verkürzten Fragmenten um Größenordnungen langsamer war. Bei Komplexen mit den Fragmenten Syb25-96 und Syb35-96 wurde keine Reaktion beobachtet (nicht gezeigt) [191].

fluoreszenzmarkiertes Synaptobrevin (AS 1-96) schnell (Abb. 3.14).

3.2.6.2 Schnelle Fusion mit dem Δ N-Komplex

In Übereinstimmung mit der zuvor gezeigten Korrelation der Reaktivität des rekonstituierten Q-SNARE-Komplexes mit der Fusionskinetik verläuft die Fusion von Synaptobrevin-Liposomen mit Δ N-Komplex-Liposomen wesentlich schneller: Die halbmaximale Signaländerung ist bereits nach etwa einer Minuten erreicht (Abb. 3.15). Auch diese Reaktion kann kompetitiv durch lösliches Synaptobrevin (Sb_{sol}) gehemmt werden. Die Zugabe des Synaptobrevin-Fragments 49-96 zur Fusionsreaktion mit dem 2:1-Komplex unmittelbar vor Beginn der Reaktion führt nicht zu einer beschleunigten Fusion (nicht gezeigt). Dies zeigt, dass das Synaptobrevin-Fragment selbst nicht fusogen ist.

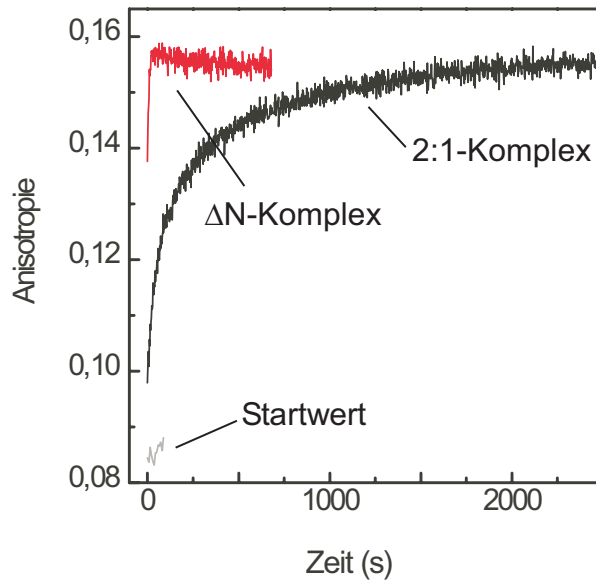


Abbildung 3.14 – Schnelle Bindung von löslichem Synaptobrevin an den rekonstituierten Δ N-Komplex. Wiederum wurde die Bindung von löslichem, an der Position T79C mit AlexaFluor488 markiertem Synaptobrevin als Anstieg der Fluoreszenzanisotropie gemessen. Zum Vergleich ist die deutlich langsamere Bindung an einen rekonstituierten 2:1-Komplex gezeigt. Die Konzentration des markierten Proteins war etwa 100 nM, das unmarkierte Protein wurde im 2,5-fachen Überschuss zugesetzt.

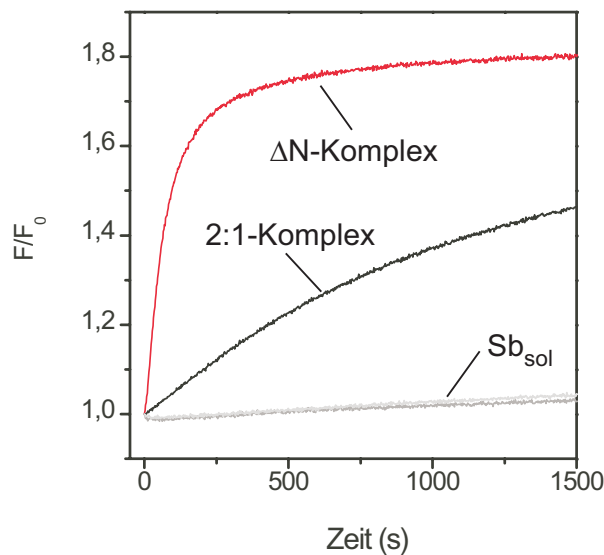


Abbildung 3.15 – Schnelle Fusion von Synaptobrevin-Liposomen mit Δ N-Komplex-Liposomen. Der Δ N-Komplex wurde rekonstituiert und mit NBD-/Rhodamin-markierten Synaptobrevin-Liposomen versetzt. Auch diese Reaktion wird durch einen Überschuss an löslichem Synaptobrevin (Sb_{sol}) nahezu vollständig inhibiert. Zum Vergleich ist eine Reaktion mit dem 2:1-Komplex gezeigt.

3.2.6.3 Die Verdrängung des Synaptobrevin-Fragments

Dass der ΔN -Komplex nicht nur eine schnelle Bindung von Synaptobrevin ermöglicht, sondern auch eine schnelle Fusion, legt die Vermutung nahe, dass das zur Stabilisierung der Bindungsstelle verwendete C-terminale Synaptobrevin-Fragment nach der Bindung des intakten membranständigen Proteins verdrängt wird und so ein vollständiges Binden auch im C-terminalen, membranproximalen Teil erfolgen kann, was zu einer Verschmelzung der beiden Membranen führt.

Um dies zu überprüfen, wurde ein Komplex gereinigt, in dem das Synaptobrevin-Fragment im Komplex fluoreszenzmarkiert ist. Die Anisotropie ist in diesem Fall hoch, da die fluoreszenzmarkierte Spezies bereits im Komplex inkorporiert ist. Bei Zugabe von löslichem Synaptobrevin ist ein schneller Abfall der Fluoreszenz zu beobachten. Nach ca. 5 min stabilisiert sich der Anisotropiewert. Dieser Abfall der Anisotropie kann als Verdrängung des Synaptobrevin-Fragments aus dem Komplex interpretiert werden. Das freie, fluoreszenzmarkierte Fragment hat eine Anisotropie von etwa 0,085 (nicht gezeigt). Die Differenz zum erreichten Endwert von 0,1 kann durch falsch orientierte und dadurch für eine Bindung nicht zugängliche Komplexe erklärt werden.

Abbildung 3.16 zeigt außerdem, dass das zu Synaptobrevin homologe Endobrevin/VAMP8 das Synaptobrevin-Fragment ebenso schnell verdrängt wie Synaptobrevin selbst. Obwohl hier nicht direkt die Bindung gemessen wurde, sondern die nachgeschaltete Verdrängungsreaktion, zeigt dieser Befund, dass auch eine stabilisierte Bindungsstelle im 1:1-Komplex, die eine schnelle Bindung des R-SNAREs ermöglicht, keine Spezifität für Synaptobrevin herstellt. Dies ist im Zusammenhang mit der Frage interessant, ob SNARE-Proteine für die Spezifität intrazellulärer Fusionsprozesse verantwortlich sind. Es zeigt, dass auch eine kinetische Kontrolle der R-SNARE-Bindung als Erklärung für eine spezifische Interaktion der SNAREs ausscheidet, und ist ein weiterer Hinweis darauf, dass andere Proteine die Interaktion von Q- und R-SNAREs regulieren müssen (zu diesem Problem, das in dieser Arbeit nicht weiter behandelt wird, siehe Referenzen [16, 24, 111, 154]).

Die Verdrängungsreaktion ist langsamer als die Bindung, wie aus einem Vergleich der Abbildungen 3.14 und 3.16 ersichtlich wird. Die Gesamtreaktion läuft also in zwei Schritten ab: Zunächst erfolgt die Bindung von Synaptobrevin, dann die Verdrängung des Synaptobrevin-Fragments aus dem Komplex. Bei

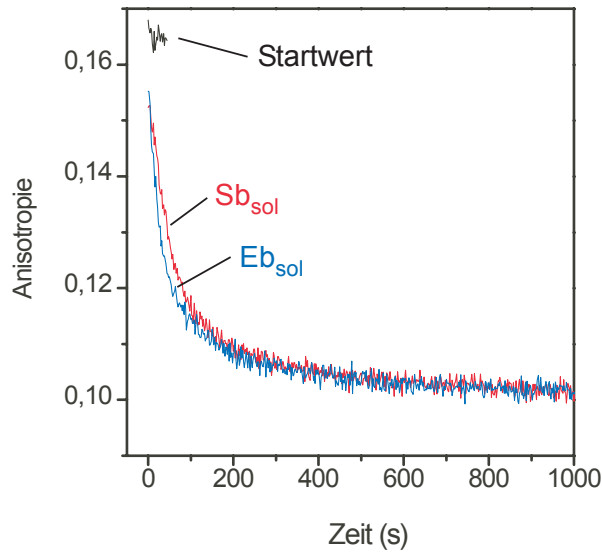


Abbildung 3.16 – Verdrängung des Synaptobrevin-Fragments. Ein ΔN -Komplex mit einem AlexaFluor488 markierten Synaptobrevin-Fragment (AS 49-96, T79C) wurde in Liposomen rekonstituiert. Bei Zugabe eines Überschusses an löslichem Synaptobrevin ist ein Abfall der Anisotropie zu beobachten, der als Verdrängung des Synaptobrevin-Fragments aus dem ΔN -Komplex interpretiert werden kann. Zugabe von Endobrevin hat den gleichen Effekt.

einem großen Überschuss von bindendem Synaptobrevin stellt sich schnell ein Gleichgewicht für die erste Teilreaktion ein. Die Rate der Verdrängungsreaktion dominiert dann die Rate der Gesamtreaktion, die wie ein Zerfallsprozess einer Kinetik erster Ordnung folgen sollte. Dies ist in der Tat der Fall: Wie aus Abbildung 3.17 ersichtlich, kann der Abfall der Anisotropie durch eine einfache Exponentialfunktion approximiert werden. Es ergibt sich eine Geschwindigkeitskonstante von $k_{off} = 0,037 \text{ s}^{-1}$ und eine Halbwertszeit von $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{off}} = 19 \text{ s}$.

3.2.6.4 Kinetik der Komplexbildung während der Fusionsreaktion

Wie ist die Kinetik der Komplexbildung während einer Fusionsreaktion? Wird die Verdrängung des Synaptobrevin-Fragments, wie zu Abbildung 3.16 beschrieben, während einer Liposomenfusion verfolgt, ist diese nach etwa 200 s zur Hälfte abgeschlossen, folgt jedoch nicht mehr einer monoexponentiellen Funktion und benötigt bis zu ihrer Vollendung etwa 30 min (Abb. 3.18b). Ganz ähnliche Werte erhält man, wenn man die Komplexbildung über das in Abbildung 3.12 eingeführte C-terminale FRET verfolgt (Abb. 3.18a). Diese beiden Messungen zeigen, dass die vollständige Bildung von *cis*-Komplexen und da-

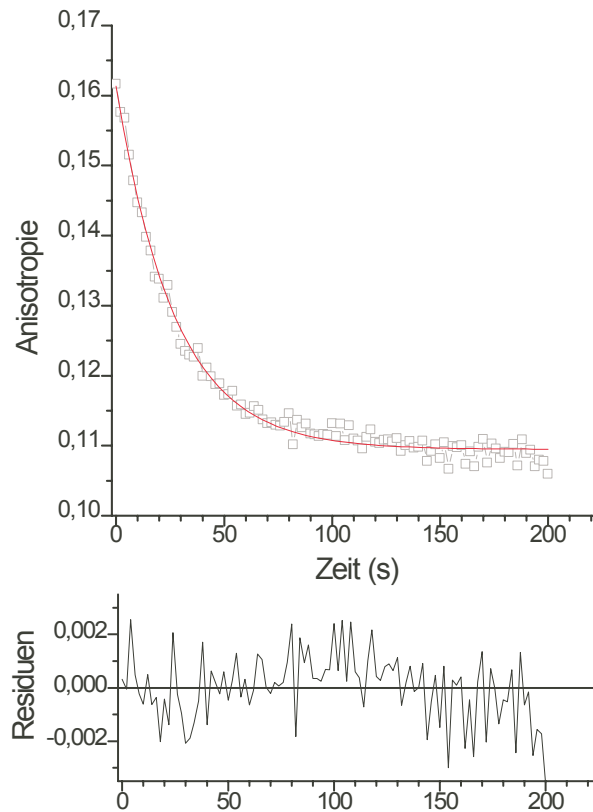


Abbildung 3.17 – Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante für die Verdrängungsreaktion. Wiederum wurde der am Synaptobrevin-Fragment markierte ΔN -Komplex rekonstituiert (100 nM). Der Abfall der Anisotropie nach Zugabe eines großen Überschusses an löslichem Synaptobrevin ($5 \mu\text{M}$) kann durch eine Funktion der Form $y = Ae^{-k_{off}t} + b$ angepasst werden. Es ergibt sich $k_{off} = 0,037 \text{ s}^{-1}$. Der untere Graph zeigt die Abweichungen zwischen Messwerten und der angepassten Funktion (Residuen).

mit die Fusion auf die Verdrängung des Synaptobrevin-Fragments ohne große Verzögerung folgt.

Abbildung 3.18b zeigt weiterhin, dass eine Erhöhung der Konzentration der Synaptobrevin-Liposomen zu einer schnelleren Verdrängung des Synaptobrevin-Fragments führt. Dies ist ein Zeichen dafür, dass bei niedrigen Liposomenkonzentrationen die Bindung von membranständigen Synaptobrevin und die Verdrängung des C-terminalen Fragments die Gesamtreaktionsrate beeinflussen. Wäre nur die Verdrängung des Fragments geschwindigkeitsbestimmend, müsste die Gesamtrate einer Kinetik erster Ordnung folgen und damit unabhängig von den Konzentrationen der freien Liposomen in der vorgeschalteten Bindungsreaktion sein. Im *Dequenching-Assay* kann diese Hypothese durch eine Variation des Verhältnisses von unmarkierten und markierten Liposomen näher unter-

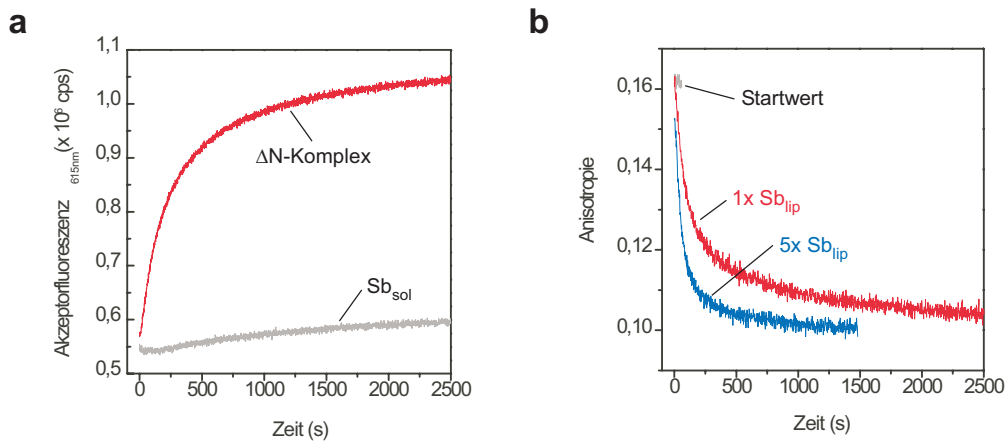


Abbildung 3.18 – Bildung von SNARE-Komplexen während einer Fusion mit dem Δ N-Komplex. **(a)** Mit luminal fluoreszenzmarkiertem Synaptobrevin und einem am C-Terminus von Syntaxin markierten Δ N-Komplex wurde die Bildung von *cis*-Komplexen während einer Fusion bei einer Proteinkonzentration von je 100 nM gemessen. Lösliches Synaptobrevin inhibiert die Reaktion (Sb_{sol}). **(b)** Die Bildung des ternären Komplexes kann auch über die Verdrängung des Synaptobrevin-Fragments aus dem Δ N-Komplex verfolgt werden. Dass die Reaktion hier noch durch die Zugabe von mehr Synaptobrevin-Liposomen beschleunigt wird (angezeigt durch 5x Sb_{lip} bzw 1x Sb_{lip} (ca. 100 nM)), zeigt, dass die Verdrängungsreaktion noch nicht geschwindigkeitsbestimmend ist.

sucht werden.

In Abbildung 3.19 ist die Fusion von NBD-/Rhodamin markierten Liposomen mit Δ N-Komplex bei verschiedenen Konzentrationen der Synaptobrevin-Liposomen gezeigt. Bei niedrigen Konzentrationen (Gesamtproteinkonzentration 100 nM) erfolgt der Anstieg der NBD-Fluoreszenz etwas langsamer als in Abbildung 3.15 zu beobachten ist. Wird zu dieser Reaktion zu einem späteren Zeitpunkt dieselbe Menge an unmarkierten Synaptobrevin-Liposomen hinzugegeben, ist kein weiterer Anstieg der NBD-Fluoreszenz zu beobachten. Ein zweifacher Überschuss an unmarkierten Liposomen zu Beginn der Reaktion führt zu einer größeren Gesamtänderung der Fluoreszenz bei gleichzeitig schneller verlaufender Kinetik. Eine weitere Erhöhung der Konzentration des unmarkierten Reaktanden resultiert dann weder in einer deutlichen Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit noch der Gesamtsignaländerung. Dies zeigt zweierlei:

- Bei sehr niedrigen Konzentrationen, d.h. bei Proteinkonzentrationen von ca. 50 nM in der markierten und unmarkierten Membran, ist noch nicht die Verdrängung des Synaptobrevin-Fragments geschwindigkeitsbestimmend, da eine Erhöhung der Konzentration der unmarkierten Liposomen noch zu einer deutlichen Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit führt.

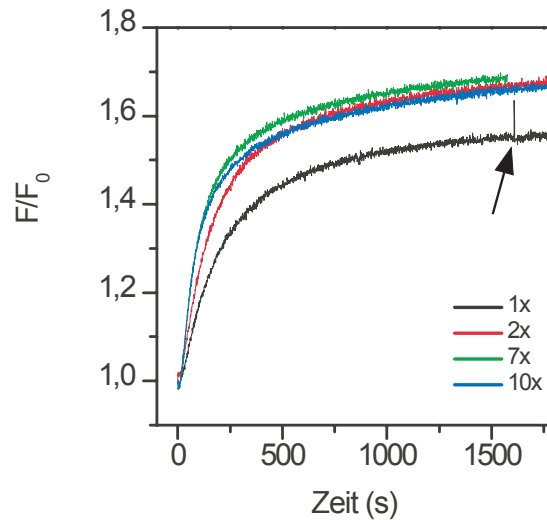


Abbildung 3.19 – Einfluss von Variationen im Verhältnis von unmarkierter/markierter Membran. NBD-/Rhodamin-markierte Liposomen mit Δ N-Komplex (Proteinkonzentration etwa 50 nM) wurden mit verschiedenen Mengen Synaptobrevin-Liposomen versetzt. Der Pfeil zeigt die Zugabe von weiteren Synaptobrevin-Liposomen zur schwarz gezeichneten Reaktion an.

Bereits bei leicht erhöhter Konzentration wird dann die Verdrängung des Synaptobrevin-Fragments geschwindigkeitsbestimmend, und eine weitere Erhöhung der Liposomenkonzentration hat keinen Einfluss mehr auf die Reaktion.

- Dass die Gesamtsignaländerung bei einem zweifachen Überschuss an unmarkierter Membran ebenfalls zunimmt, lässt den Schluss zu, dass das markierte Liposom in diesem Fall mit mehr unmarkierten Liposomen fusioniert, d.h. dass neue Reaktionen in *trans* eingeleitet werden, bevor überschüssige SNAREs in *cis* abreagieren. Bei einem noch größeren Überschuss stehen allerdings keine monomeren SNAREs mehr zur Verfügung, da die Erhöhung der Konzentration von unmarkierten Liposomen oder die Zugabe von unmarkierten Liposomen zu einer Reaktion, die bereits ein Plateau erreicht hat, zu keinem weiteren Anstieg der NDB-Fluoreszenz führen.

3.3 Einfluss von Synaptotagmin auf die Liposomenfusion

Wie in der Einleitung ausgeführt, ist das Vesikelprotein Synaptotagmin 1 in erster Linie für die schnelle Phase der Calcium-abhängigen Exozytose von synaptischen Vesikeln verantwortlich. Zudem ist weitgehend akzeptiert, dass die SNAREs eine entscheidende Rolle beim letzten Schritt der Fusion spielen. Es ist jedoch unklar, durch welchen Mechanismus Synaptotagmin die Beschleunigung der Fusion bewirkt. Sowohl die Ca^{2+} -abhängige Bindung an Membranen als auch die Ca^{2+} -abhängige und -unabhängige Bindung an einzelne SNARE-Proteine und SNARE-Komplexe werden diskutiert, ohne dass bisher ein integriertes mechanistisches Konzept entwickelt werden konnte.

Die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Experimente haben zum Ziel, zu einem genaueren Verständnis des Wirkungsmechanismus von Synaptotagmin bei der SNARE-vermittelten Membranfusion beizutragen. Wie in den in den vorigen Abschnitten beschriebenen Experimenten wurde die Fusion von SNARE-haltigen Liposomen als experimentelles System benutzt, um den Einfluss von Synaptotagmin auf diese Reaktion im Detail zu analysieren.

3.3.1 Grundcharakterisierung der Beschleunigung durch Synaptotagmins C2AB-Fragment

Wie in der Einleitung ausgeführt, ist von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt worden, dass ein lösliches Fragment von Synaptotagmin 1, das beide C2-Domänen umfasst (im Folgenden als C2AB-Fragment bezeichnet), in Gegenwart von hochmikromolekularen Ca^{2+} -Konzentrationen eine Beschleunigung der SNARE-vermittelten Fusion von Liposomen um den Faktor zwei bewirkt [255]. In diesen Versuchen wurden, wie bislang üblich, präformierte Komplexe aus Syntaxin und SNAP-25 eingesetzt, die nach dem jetzigen Kenntnisstand in einer 2:1-Stöchiometrie vorlagen [117, 144]. Diese Befunde bilden den Ausgangspunkt der im nachfolgenden beschriebenen Experimente. Zunächst wurden die von Tucker et al. [255] beschriebenen Befunde reproduziert. Wird ein gereinigter Komplex aus Syntaxin 1 (ohne die N-terminale H_{abc} -Domäne) und SNAP-25A in unmarkierten Liposomen rekonstituiert und mit NBD/Rhodamin-markierten Synaptobrevin-Liposomen inkubiert, so beschleunigt das C2AB-Fragment von Synaptotagmin 1 diese Reaktion in Gegenwart von $100 \mu\text{M Ca}^{2+}$. In Abwesenheit von Ca^{2+} hat das C2AB-Fragment

keinen Einfluss auf die Fusion. Ebenso beeinflusst Ca^{2+} allein die Reaktion nicht. In Gegenwart von $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} ist keine Beschleunigung detektierbar. Inkubation mit einzelnen C2-Domänen von Synaptotagmin 1 hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Fusion (Abb. 3.20).

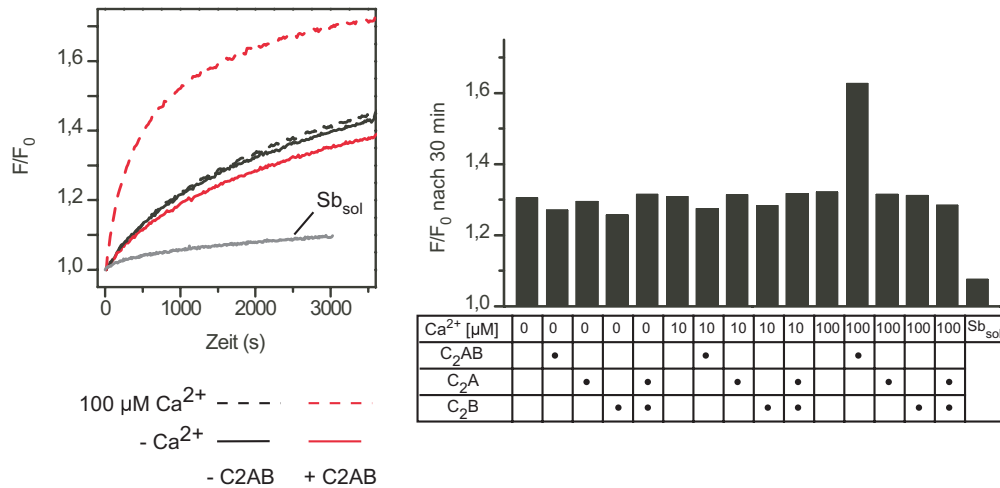


Abbildung 3.20 – Grundcharakterisierung der Beschleunigung der Liposomenfusion durch das C2AB-Fragment von Synaptotagmin. Ein Komplex aus Syntaxin 1 (ohne H_{abc} -Domäne) und SNAP-25 wurde in Liposomen rekonstituiert und mit NBD-/Rhodamin-markierten Synaptobrevin-Liposomen gemischt. Beide Membranen enthielten 10% (n/n) Phosphatidylserin. Das C2AB-Fragment von Synaptotagmin 1 beschleunigte die Reaktion in Gegenwart von $100 \mu\text{M}$ Ca^{2+} . Auch diese beschleunigte Reaktion wird nahezu vollständig durch Sb_{sol} inhibiert. Weitere Details siehe Text. Links ist der zeitliche Verlauf einiger ausgewählter Reaktionen gezeigt, rechts die Änderung der NBD-Fluoreszenz weiterer Reaktionen nach 30 min Reaktionszeit.

3.3.2 Einfluss des C2AB-Fragments auf die Bildung des SNARE-Komplexes

Als mögliche Erklärung für die beobachtete Beschleunigung der Fusion wurde vorgeschlagen, dass Synaptotagmin die Fusion durch einen Einfluss auf die SNARE-Komplexbildung direkt beschleunigt [17]. Aufgrund der Befunde aus dem Kapitel 3.2 erscheint dies plausibel. Da die Reaktivität der SNAREs für die Liposomenfusion geschwindigkeitsbestimmend ist, könnte ein Einfluss Synaptotagmins auf diese Reaktivität die Fusion beschleunigen. Um diese Frage im Detail zu untersuchen, wurde die Bildung des binären und ternären Komplexes in Gegenwart des C2AB-Fragments und Ca^{2+} -Ionen gemessen.

Die Bildung des binären Komplexes wurde wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben gemessen. Fluoreszenzmarkiertes SNAP-25 K79C wurde mit einem 5-fachen molaren Überschuss an membranständigem Syntaxin (AS 183-288) in Gegenwart von $100 \mu\text{M Ca}^{2+}$ inkubiert. Die Bindung von SNAP-25 resultiert in einem Anstieg der Fluoreszenzanisotropie, wie in Abbildung 3.21a gezeigt. Nach etwa einer Stunde wird die halbmaximale Änderung erreicht, nach weiteren 1,5 h ein Plateau. Zugabe des C2AB-Fragments zu diesem Zeitpunkt führt zu einem sprunghaften Anstieg der Anisotropie. In Gegenwart des C2AB-Fragments steigt die Anisotropie innerhalb von 2,5 h auf diesen Wert an. Die beiden Kurven unterscheiden sich in ihrem kinetischen Verlauf nicht, sondern nur hinsichtlich der maximalen Änderung der Anisotropie. Dies wird unmittelbar deutlich, wenn die Anisotropiewerte auf die maximale Änderung normalisiert werden (Abb 3.21b). Der sprunghafte Anstieg bei Zugabe des C2AB-Fragments und die größere Gesamtsignaländerung kann auf eine Bindung des C2AB-Fragments an den gebildeten binären Komplex zurückgeführt werden. Eine Bindung an SNAP-25 selbst wird nicht beobachtet, da die Zugabe des C2AB-Fragments nicht zu einer Änderung des Startwerts der Anisotropie führt. Dies schließt ebenfalls aus, dass der sprunghafte Anstieg durch eine Bindung an freies SNAP-25 zustande kommt. Eine Ca^{2+} -abhängige Beschleunigung der Bindung von SNAP-25 an membranverankertes Syntaxin kann die Erhöhung der Fusionrate durch das C2AB-Fragment nicht erklären.

Die Bindung des C2AB-Fragments an den binären Komplex konnte auch direkt nachgewiesen werden. Dazu wurde fluoreszenzmarkierter binärer Komplex (markiert mit AlexaFluor 488 an Aminosäure S225C von Syntaxin) in Liposomen rekonstituiert. Zugabe von TexasRed markiertem C2AB-Fragment (S217C) führt zu einer Fluoreszenzlöschung des kurzwelligen AlexaFluor488 (Abb. 3.22). Weitere Fluoreszenzlöschung tritt bei Zugabe von Ca^{2+} ein. Die Fluoreszenzlöschung des Donor-Fluorophors ist von einem Anstieg der Akzeptorfluoreszenz begleitet, ein klares Zeichen dafür, dass Resonanzenergietransfer (RET) und damit Bindung des C2AB-Fragments an den binären Komplex stattfindet.

Für die Geschwindigkeit der in Abbildung 3.20 gemessenen Liposomenfusion ist die Geschwindigkeit der Bindung von Synaptobrevin an den binären Komplex ausschlaggebend, wie in Kapitel 3.2 erläutert wurde. Die entscheidende Frage ist also, ob das C2AB-Fragment diese Interaktion fördert, etwa durch eine Verschiebung des Q-SNARE-Gleichgewichts hin zum reaktiven 1:1-Komplex

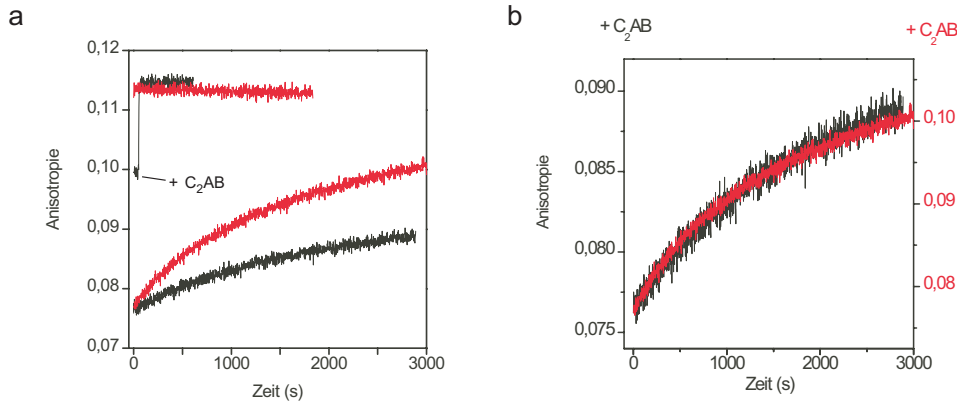


Abbildung 3.21 – Einfluss des C2AB-Fragments auf die Bildung des binären Komplexes. (a) 100 nM AlexaFluor488 markiertes SNAP-25 K79C wurde mit einem fünffachen Überschuss an rekonstituiertem Syntaxin (AS 183-288) versetzt. Alle Reaktionen wurden in Gegenwart von $100\mu\text{M Ca}^{2+}$ durchgeführt. Der Anstieg der Anisotropie zeigt die Bindung von SNAP-25 an Syntaxin an (schwarz). Die Reaktion wurde für 30 min verfolgt. Nach weiteren 1,5 h wurde die Anisotropie erneut gemessen und dann das C2AB-Fragment zugesetzt (obere schwarze Kurve). Die rote Kurve zeigt den Verlauf der Reaktion an, wenn das C2AB-Fragment von Beginn an zugegen ist. (b) Gezeigt sind die auf die jeweilige Gesamtänderung nach 2 h normalisierten Reaktionen mit und ohne das C2AB-Fragment.

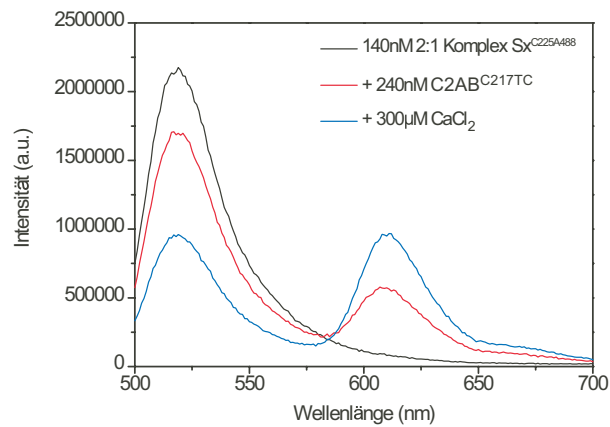


Abbildung 3.22 – Das C2AB-Fragment bindet an den binären Komplex in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} . Ein 2:1-Komplex aus Syntaxin (H3: AS 183-288), das an der Position Cys225 AlexaFluor488 markiert war, und SNAP-25 wurde in Liposomen rekonstituiert. Bei Anregung von AlexaFluor488 ergibt sich das schwarz gezeichnete Emissionsspektrum. Zugabe von an der Position Cys217 TexasRed markiertem C2AB-Fragment führt zur Fluoreszenzlöschung durch RET (rot). Zugabe von Ca^{2+} verstärkt die Fluoreszenzlöschung.

von Syntaxin und SNAP-25. Um dies zu untersuchen, wurde wiederum die Bindung von löslichem, fluoreszenzmarkiertem Synaptobrevin über die Änderung der Anisotropie gemessen. Die in Abbildung 3.23 gezeigten Messungen belegen,

dass das C2AB-Fragment diese Bindung weder in Abwesenheit noch in Anwesenheit von Ca^{2+} beeinflusst. Kleine Unterschiede in der Gesamtänderung der Anisotropie können auch hier wie bei der Bildung des binären Komplexes auf die Bindung des C2AB-Fragments an den entstehenden Komplex zurückgeführt werden. Als alternative Messmethode wurde die Bildung des SDS-resistenten ternären Komplexes über SDS-PAGE gemessen (Abb 3.23b). Auch hier hat das C2AB-Fragment keinen unmittelbaren Einfluss auf die SNARE-Interaktion. Zur leichteren Quantifizierung der Banden in der SDS-PAGE wurde fluoreszenzmarkiertes Synaptobrevin verwendet.

3.3.3 Spezifität der Beschleunigung durch das C2AB-Fragment für neuronale Q-SNAREs

Ein direkter Einfluss auf die Bildungsgeschwindigkeit des SNARE-Komplexes scheidet also als Erklärung für die Beschleunigung der Fusion durch das C2AB-Fragment aus. Als nächstes wurde die Frage untersucht, ob das C2AB-Fragment spezifisch die von den neuronalen SNAREs Syntaxin 1, SNAP-25 und Synaptobrevin angetriebene Fusion beschleunigt. Wenn ein gereinigter Komplex aus den homologen SNAREs Syntaxin 4 und SNAP-23 in Liposomen rekonstituiert wird, so fusionieren diese mit Synaptobrevin Liposomen unbeeinflusst vom C2AB-Fragment in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} (Abb. 3.24a). Da in diesem Fall vollständiges Syntaxin 4 verwendet wurde, einschließlich der N-terminalen H_{abc} -Domäne (AS 1-298), wird zum Vergleich eine Fusionsreaktion mit einem binären Komplex aus Syntaxin 1 (AS 1-288) und SNAP-25 gezeigt. Zwar verläuft diese Reaktion, wie bereits in Kapitel 3.2.3 gezeigt, langsamer als bei Verwendung des N-terminal verkürzten Syntaxins. Sie wird aber immer noch durch das C2AB-Fragment Ca^{2+} -abhängig beschleunigt (Abb 3.24b). Bei einem Austausch des R-SNAREs Synaptobrevin mit dem an der Fusion von späten Endosomen beteiligten Endobrevin/VAMP8 [8] beschleunigt das C2AB-Fragment die Reaktion Ca^{2+} -abhängig (Abb 3.24c). Während die Beschleunigung also spezifisch für die neuronalen Q-SNAREs ist, wird ein Austausch des R-SNAREs toleriert.

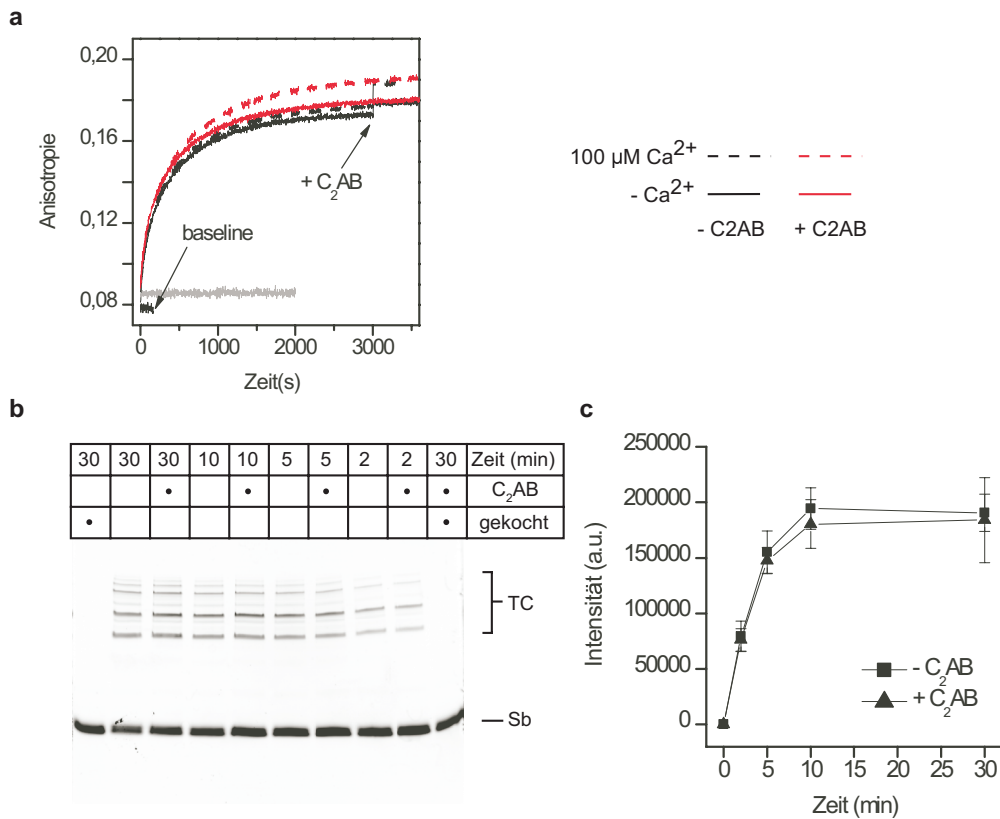


Abbildung 3.23 – Die Bildung des ternären Komplexes auf Liposomen mit rekonstituiertem 2:1-Komplex wird nicht durch das C2AB-Fragment und Ca²⁺ beeinflusst. **(a)** Die Bindung des cytoplasmatischen Fragments von Synaptobrevin (Sb_{sol}, an der Position Cys79 mit AlexaFluor 488 markiert) wurde als Anstieg der Fluoreszenzanisotropie gemessen. Präinkubation mit unmarkiertem Synaptobrevin inhibierte die Reaktion. Zugabe des C2AB-Fragments am Ende der Reaktion führt zu einem kleinen Sprung in der Anisotropie, der wahrscheinlich durch eine Bindung des C2AB-Fragments an den sich bildenden ternären Komplex verursacht wird. Dies erklärt die kleinen Unterschiede im Kurvenverlauf mit und ohne das C2AB-Fragment. **(b + c)** Die Bildung des SDS-resistenten ternären Komplexes wurde auch in der SDS-PAGE verfolgt und über die Fluoreszenz im Gel quantifiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots von Inkubationen mit 100 μM Ca²⁺ entnommen und über SDS-PAGE ohne vorheriges Erhitzen aufgetrennt. Auch hier zeigt das C2AB-Fragment keinen Einfluss auf die Komplexbildung (n = 5; Fehlerbalken sind Standardfehler vom Mittelwert)

3.3.4 Einfluss der Phospholipidzusammensetzung

Es ist bekannt, dass Synaptotagmin mit anionischen Phospholipiden Ca²⁺-abhängig interagiert [254]. Als anionische Lipide werden solche bezeichnet, die in ihrer Kopfgruppe eine negative Ladung tragen. In diesem Zusammenhang sind Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) von Bedeu-

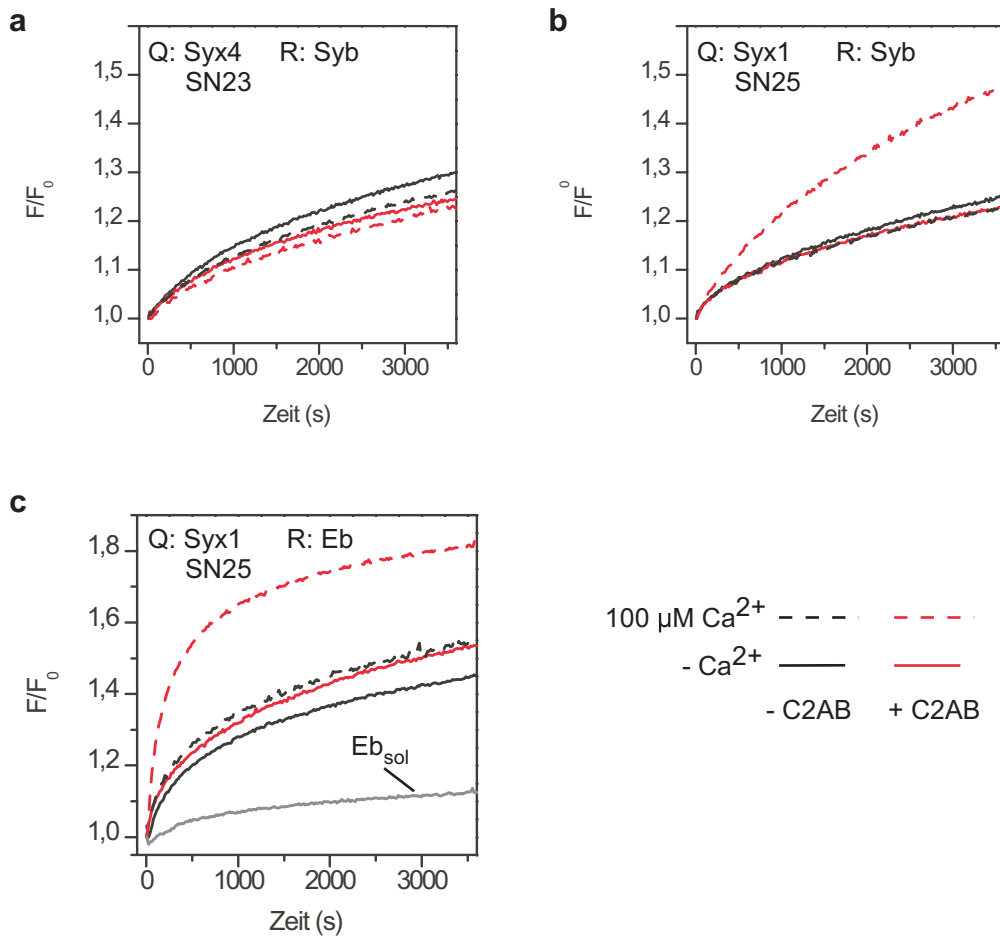


Abbildung 3.24 – Die Beschleunigung durch das C2AB-Fragment ist spezifisch für die neuronalen Q-SNAREs. **(a)** Gezeigt ist die Fusion von NBD-/Rhodamin markierten Synaptobrevin-Liposomen mit unmarkierten Liposomen, die einen 2:1-Komplex aus Syntaxin 4 und SNAP-23 enthalten. Es wird keine Ca^{2+} -abhängige Beschleunigung durch das C2AB-Fragment beobachtet. Da in diesem Fall das Gesamtsyntaxin (FL) verwendet wurde, ist in **(b)** die Beschleunigung der Reaktion mit Syntaxin 1 (FL) als Kontrolle gezeigt. **(c)** Bei Austausch von Synaptobrevin gegen Endobrevin wird die Beschleunigung durch das C2AB-Fragment weiterhin beobachtet. Ein Überschuss des löslichen Fragments von Endobrevin (Eb_{sol}) inhibiert auch diese Reaktion. In dieser Reaktion wurde wiederum ein Syntaxin-Fragment ohne die H_{abc} -Domäne verwendet.

tung. Im Phosphatidylserin (PS) ist ein Serinrest über die β -Hydroxylgruppe mit dem Phosphat des Phospholipids verestert. Im PIP_2 ist ein an den Stellen 4 und 5 phosphoryliertes Inositol mit dem Phosphat verestert. In den nächsten Versuchen sollte der Frage nachgegangen werden, ob anionische Phospholipide für die vom C2AB-Fragment beschleunigte Fusion notwendig sind bzw. ob anionische Phospholipide in beiden Membrane, der Q- und der R-SNARE-Membran, benötigt werden.

Zunächst wurde der Einfluss der Phospholipidzusammensetzung auf die Reaktivität der SNAREs untersucht, um festzustellen, wie vergleichbar die Reaktionen bei Veränderung dieses Parameters sind. Abbildung 3.25a zeigt die Bindung von fluoreszenzmarkiertem, löslichem Synaptobrevin an den in Membranen verschiedener Zusammensetzung rekonstituierten Syntaxin/SNAP-25-Komplex. Wiederum wurde die Komplexbildung als Anstieg der Fluoreszenzanisotropie gemessen. Der Einfluss verschiedener Phospholipide ist demnach gering; nur bei Fehlen von PS ist eine leichte Erhöhung der Reaktivität festzustellen. Zur Beurteilung der Reaktivität von membranständigem Synaptobrevin ist es entscheidend, dass nicht das Gleichgewicht von löslichem Syntaxin und SNAP-25 geschwindigkeitsbestimmend für die Bildung des ternären Komplexes auf der Membran ist. Daher wurde der schon in Kapitel 3.2.5 beschriebene ΔN -Komplex als Bindungspartner für Synaptobrevin gewählt. An der Aminosäure S28C mit AlexaFluor488 markiertes Synaptobrevin wurde rekonstituiert und die Bildung des ternären Komplexes als Anstieg der Fluoreszenzanisotropie gemessen. Auch hier sind die Unterschiede zwischen den Reaktionen minimal (Abb. 3.25b). Allenfalls ist bei Fehlen von PS eine leichte Abnahme der Reaktivität von Synaptobrevin festzustellen.

Es wurde nun die Fusion von PS-haltigen Synaptobrevin-Liposomen mit Syntaxin/SNAP25-Liposomen betrachtet, die kein PS enthielten. Wie in Abbildung 3.26a gezeigt, beschleunigt das C2AB-Fragment diese Reaktion. Die basale Reaktion ist in Übereinstimmung mit den Messungen zur Aktivität des binären Komplexes in verschiedenen Membranumgebungen kaum verändert gegenüber der in Abbildung 3.20 gezeigten Reaktion mit PS. Die Fusion weist auch sonst die gleichen Charakteristika wie die in Abbildung 3.20 gezeigten Reaktionen auf, d.h. einzelne C2-Fragmente haben keinen Einfluss, und $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$ sind eine zu niedrige Konzentration um die Reaktion zu beschleunigen.

Im Gegensatz dazu hat das C2AB-Fragment keinen Effekt auf die Fusion von Synaptobrevin-Liposomen ohne PS mit PS-haltigen Syntaxin/SNAP25-Liposomen (Abb. 3.26b). Vielmehr ist eine leichte Inhibition durch das C2AB-Fragment und einzelne C2-Domänen in der Abwesenheit von Ca^{2+} festzustellen.

Einfluss von PIP_2 Wird der R-SNARE-Membran PIP_2 zugesetzt, so hat dies zweierlei Einfluss auf die Fusion.

- Die Ca^{2+} -Sensitivität der Fusion wird erhöht. Bereits in Gegenwart von

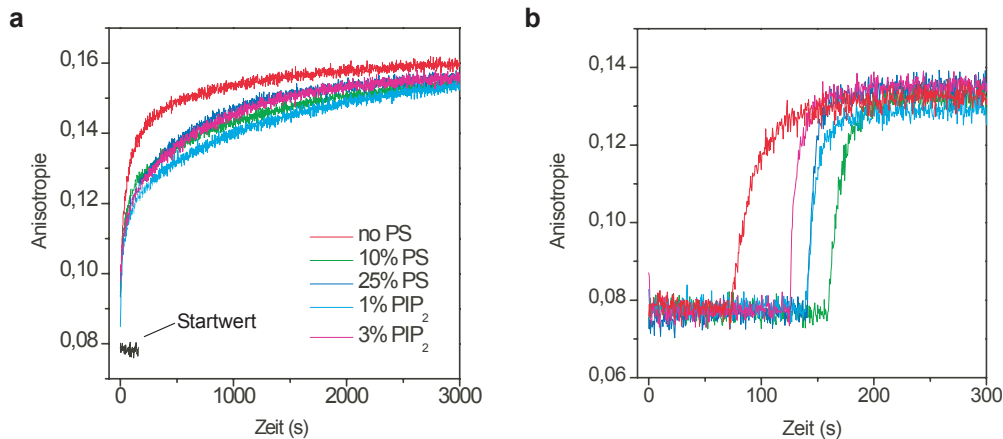


Abbildung 3.25 – Die Phospholipidzusammensetzung beeinflusst die Reaktivität der rekonstituierten SNAREs nur marginal. **(a)** Die Reaktivität des rekonstituierten 2:1-Komplexes in Membranen verschiedener Zusammensetzung wurde über die Bindung von fluoreszenzmarkiertem löslichem Synaptobrevin (C79 AlexaFluor488) gemessen. Bei Fehlen von Phosphatidylserin (PS) ist die Reaktivität leicht erhöht. **(b)** Zum Vergleich der Reaktivität von Synaptobrevin in verschiedenen Membranen wurde fluoreszenzmarkiertes Gesamtsynaptobrevin (Cys28 AlexaFluor488) rekonstituiert und die Bindung an Q-SNAREs als ein Anstieg in der Anisotropie verfolgt. Dazu wurde ein löslicher Δ N-Komplex verwendet. Um Unterschiede zwischen diesen schnellen Reaktionen festzustellen, war die Synaptobrevin-Konzentration niedrig (etwa 50 nM). Bei Fehlen von PS scheint Synaptobrevin etwas weniger reaktiv zu sein.

10 μ M Ca^{2+} beschleunigt das C2AB-Fragment die Fusion deutlich.

- Auch die C2B-Domäne allein beschleunigt die Fusion, und zwar mit der gleichen Ca^{2+} -Sensitivität (Abb. 3.27a).

Im Gegensatz dazu führt PIP₂ in der Q-SNARE-Membran nicht zu einer Erhöhung der Ca^{2+} -Sensitivität (Abb. 3.27b). Die Fusion weist in diesem Fall die gleichen Charakteristika auf wie ohne PIP₂.

3.3.5 Einfluss von Mutationen in den Ca^{2+} -Bindungsstellen der C2-Domänen

Die bisher präsentierten Ergebnisse zeigen, dass zur Beschleunigung der Liposomenfusion eine Ca^{2+} -abhängige Interaktion des C2AB-Fragments mit Phosphatidylserin der Synaptobrevin-Membran nötig ist. Die Spezifität für die neuronalen Q-SNAREs spricht weiterhin dafür, dass es eine Interaktion mit den Q-SNAREs geben muss, entweder mit dem Syntaxin/SNAP25-Komplex oder

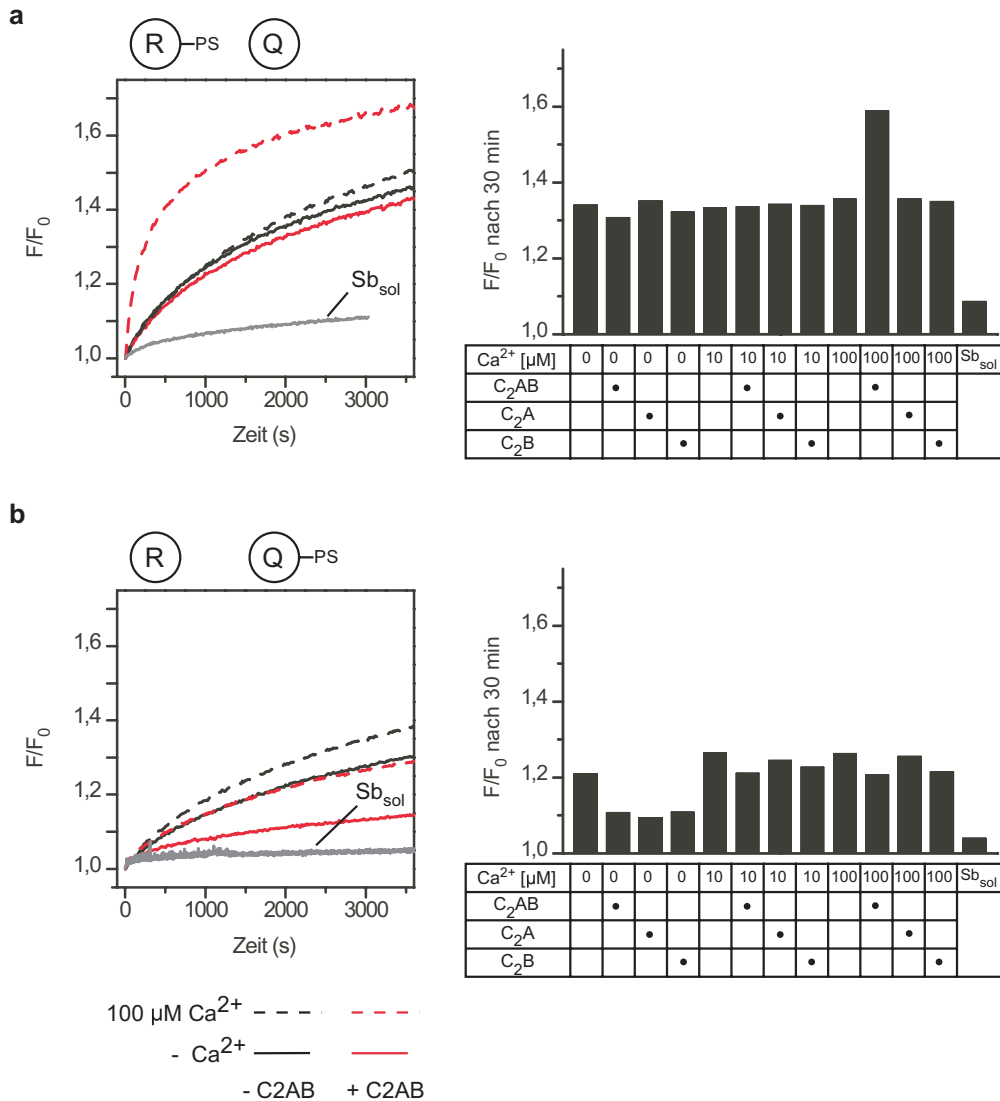


Abbildung 3.26 – Die Ca²⁺-abhängige Beschleunigung durch das C2AB-Fragment beruht auf einer Interaktion mit sauren Phospholipiden in der R-SNARE-Membran. **(a)** Standardfusionsreaktion mit Phosphatidylserin nur in der R-SNARE-Membran. Die normale Beschleunigung durch das C2AB-Fragment wird beobachtet (links). Auch die anderen Charakteristika der Fusion sind denen in Abbildung 3.20 gezeigten ähnlich (rechts). **(b)** Fehlt PS hingegen in der R-SNARE-Membran, wird keine Beschleunigung durch das C2AB-Fragment beobachtet, sondern eine leichte Inhibition in Abwesenheit von Ca²⁺ (links + rechts).

mit dem ternären Komplex. Dabei ist allerdings unklar, ob diese Interaktion durch Ca²⁺ reguliert wird. Weiterhin ist offen, ob Ca²⁺-Bindung an beide C2-Domänen für eine Beschleunigung der Reaktion nötig ist. Um diese Frage zu beantworten, wurden Varianten des C2AB-Fragments generiert, in denen Aspartate, die für die Koordinierung von Ca²⁺ essentiell sind, zu Alaninen

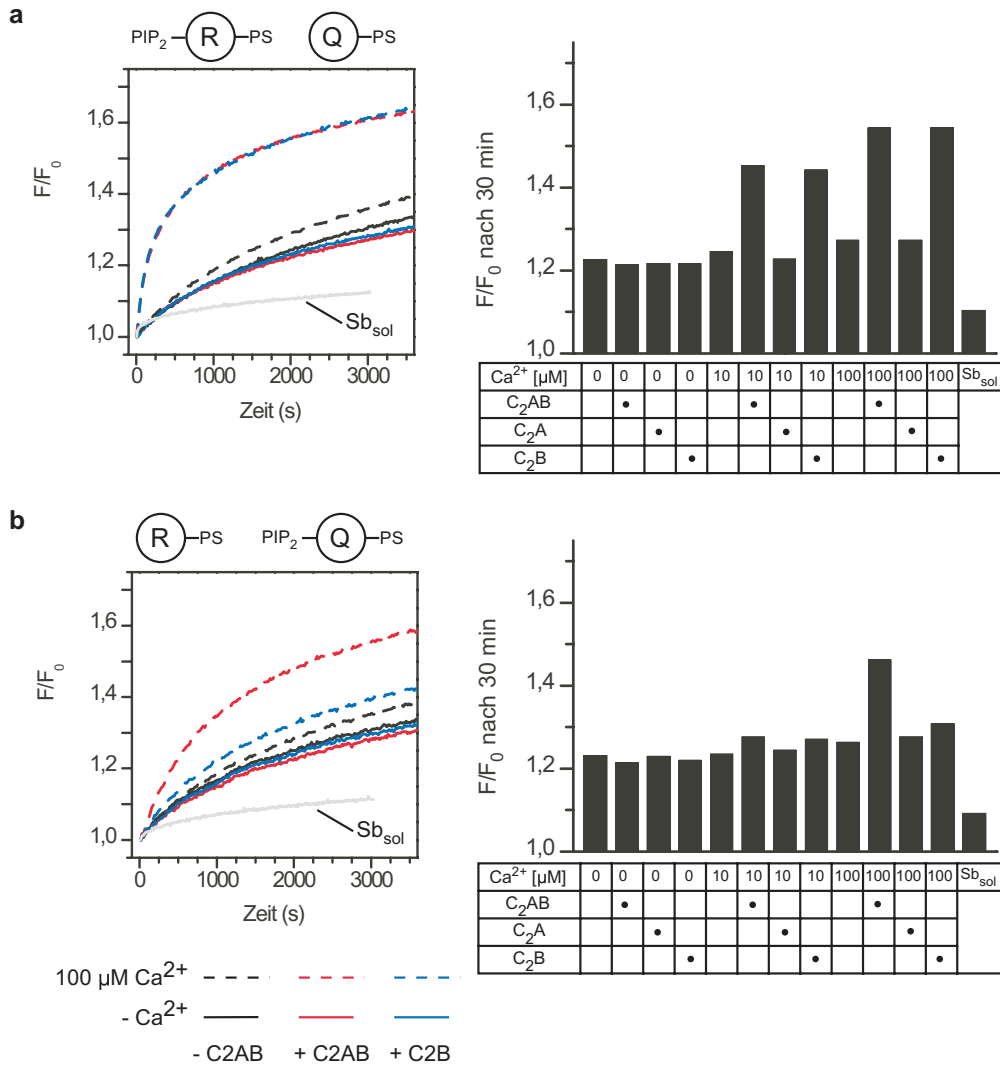


Abbildung 3.27 – Einfluss von PIP_2 auf die Beschleunigung durch das C_2AB -Fragment. (a) Wird in die Synaptobrevin-Membran PIP_2 inkorporiert, ist bereits bei $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} eine Beschleunigung durch das C_2AB -Fragment zu beobachten. Außerdem reicht nun die isolierte C_2B -Domäne aus, um die Reaktion in Gegenwart von Ca^{2+} zu beschleunigen. (b) Zusatz von PIP_2 in der Q-SNARE-Membran hat hingegen keinen deutlichen Einfluss auf die Reaktion.

mutiert sind. Abbildung 3.28 zeigt, dass ein C_2AB -Fragment, in dem die Ca^{2+} -Bindungsstellen beider Domänen mutiert sind, die Fusion nicht beschleunigt. Dies steht in Übereinstimmung mit einer früheren Studie [255]. Um herauszufinden, welche der beiden C_2 -Domänen für die Beschleunigung verantwortlich ist, wurden C_2AB -Mutantenproteine generiert, in denen die Bindungsstellen in jeweils einer der Domänen inaktiviert war. Wie in Abb. 3.28 gezeigt, war nur die Mutante mit einer intakten C_2A -Domäne aktiv.

Diese Ergebnisse lassen folgende Schlussfolgerungen über Faktoren zu, die an

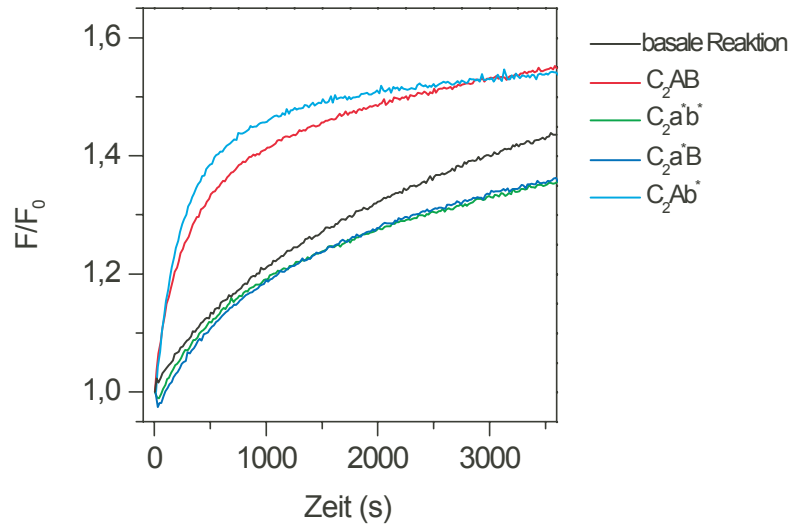


Abbildung 3.28 – Die Beschleunigung der Liposomenfusion durch das C2AB-Fragment bedarf nur der Bindung von Ca^{2+} an die C2A-Domäne. Werden die Bindungsstellen in beiden Domänen oder nur in der C2A-Domäne mutiert, so wird keine Beschleunigung beobachtet. Die Mutation der Ca^{2+} -Bindungsstellen in der C2B-Domäne hat keinen Einfluss. Die mutierten Domänen sind durch Kleinbuchstaben und einen Stern gekennzeichnet.

der Ca^{2+} -abhängigen Beschleunigung der Fusion durch das C2AB-Fragment beteiligt sind:

- Die C2A-Domäne bindet in Gegenwart von Ca^{2+} an anionische Phospholipide in der Synaptobrevin-Membran.
- Das C2AB-Fragment bindet an die Q-SNAREs (vermutlich vermittelt durch die C2B-Domäne), wobei diese Interaktion spezifisch für die neuronalen Q-SNAREs ist.
- Für diese Interaktion ist eine Ca^{2+} -Bindung an die C2B-Domäne nicht notwendig.

Die einzige für eine Beschleunigung der Fusion notwendige Ca^{2+} -abhängige Interaktion ist also die Rekrutierung des C2AB-Fragments an die Synaptobrevin-Membran über die C2A-Domäne. In den folgenden Abschnitten wird deshalb der Einfluss von Gesamt-Synaptotagmin auf die Fusion untersucht, wenn es mit SNARE-Proteinen korekonstituiert wird. Diese Herangehensweise wird es erlauben, zwischen reinen Rekrutierungsreaktionen und anderen relevanten

Reaktionen der C2-Domänen zu unterscheiden.

3.3.6 Korekonstitution von Synaptotagmin

Wird Synaptotagmin mit Synaptobrevin korekonstituiert, ist die Fusion mit Syntaxin/SNAP-25-Liposomen gegenüber der basalen Reaktion in Abwesenheit von Ca^{2+} deutlich beschleunigt. Auch diese Reaktion wird in Gegenwart eines Überschusses an löslichem Synaptobrevin nahezu vollständig blockiert, ist also immer noch vollständig SNARE-abhängig (Abb. 3.29a). Für diese Beschleunigung in Abwesenheit von Ca^{2+} ist die Lokalisierung Synaptotagmins in der Synaptobrevin-Membran entscheidend: Wird Synaptotagmin mit den Q-SNAREs korekonstituiert, ist statt einer Beschleunigung eine Inhibition zu beobachten (Abb. 3.29b). Um auszuschließen, dass es sich bei dieser Ca^{2+} -unabhängigen Beschleunigung um einen sekundären Effekt auf die Liposomenstruktur handelt, wurden Synaptobrevin-Liposomen mit korekonstituiertem Synaptotagmin mit Synaptobrevin-Liposomen elektronenmikroskopisch verglichen. Wie Abbildung 3.30 zeigt, sind die bei beiden Liposomenpopulationen einander sehr ähnlich. Die Synaptotagmin enthaltenden Liposomen haben allerdings einen etwas höheren Anteil größerer Vesikel.

3.3.7 Ca^{2+} -Effekte auf korekonstituiertes Synaptotagmin

Wie beeinflusst Ca^{2+} die von Synaptotagmin beschleunigte Reaktion? In Gegenwart von Ca^{2+} tritt eine deutliche Inhibition der Reaktion ein (Abb. 3.31a). Dieses auf den ersten Blick überraschende Ergebnis wird verständlich, wenn der Einfluss anionischer Phospholipide auf diesen Effekt näher betrachtet wird. Wird Phosphatidylserin sowohl aus der Synaptobrevin-Membran, als auch aus der Q-SNARE-Membran entfernt, hat Ca^{2+} keinen Einfluss mehr auf die Reaktion (Abb. 3.31b). Dies zeigt, dass die Inhibition durch Ca^{2+} auf eine Interaktion der C2-Domänen Synaptotagmins mit anionischen Phospholipiden zurückzuführen ist. Enthält nur die Synaptobrevin-Membran Phosphatidylserin inhibiert Ca^{2+} die Reaktion, die Inhibition ist also mit einer Ca^{2+} -abhängigen Bindung Synaptotagmins an die eigene Membran vollständig erklärt (Abb. 3.31c). Wird diese Interaktion durch Entfernen von PS aus der Synaptobrevin-Membran verhindert, und enthält nur die Q-SNARE-Membran PS, beschleunigt

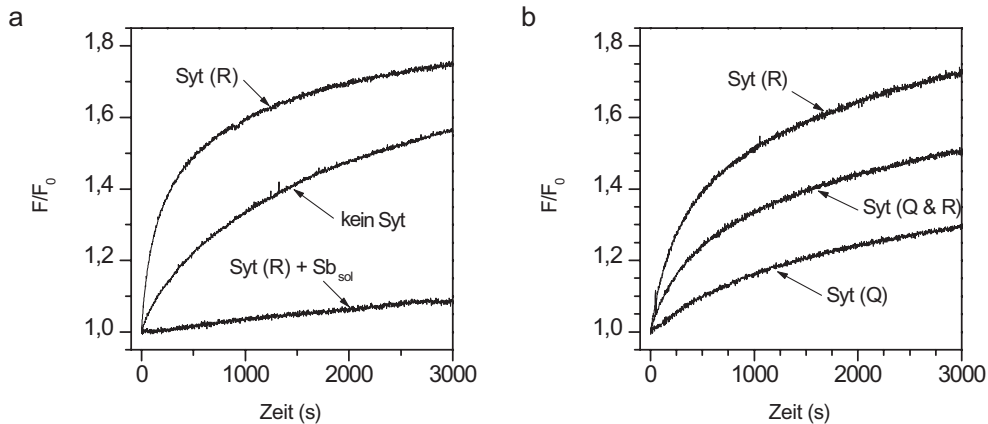


Abbildung 3.29 – Korekonstitution von Synaptotagmin mit Synaptobrevin führt zu einer Ca^{2+} -unabhängigen Beschleunigung der Liposomenfusion. **(a)** Rekonstitution von Gesamtsynaptotagmin mit Synaptobrevin (Syt(R)) führt zu einer deutlichen Beschleunigung der Reaktion in Abwesenheit von Ca^{2+} . Auch diese Reaktion kann durch einen Überschuss an löslichem Synaptobrevin (Sb_{sol}) inhibiert werden. **(b)** Hingegen ist bei einer Rekonstitution von Synaptotagmin mit den Q-SNAREs (Syt(Q)) eine Inhibition der Reaktion festzustellen. Bei Rekonstitution in beide Membranen (Q + R) ist die Geschwindigkeit der Reaktion der ohne Synaptotagmin vergleichbar.

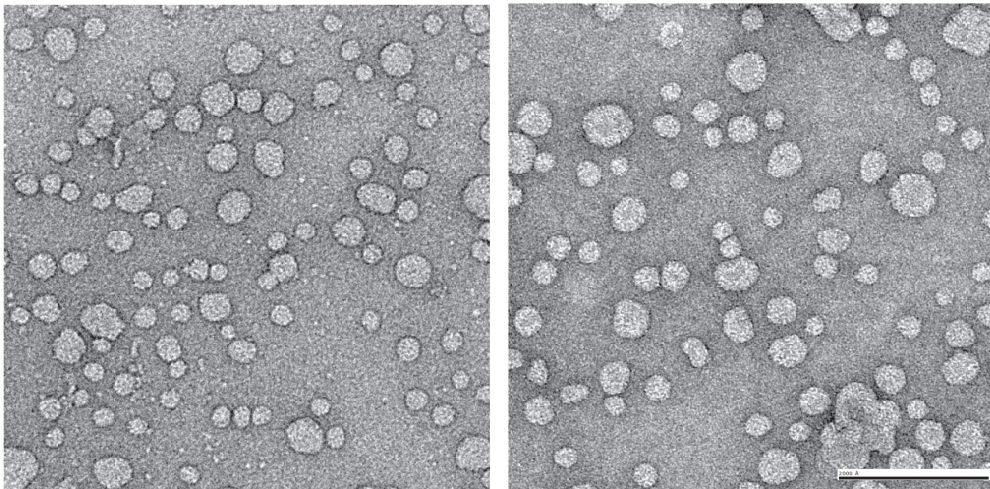


Abbildung 3.30 – Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Synaptobrevin-Liposomen (links) und Synaptobrevin/Synaptotagmin-Liposomen (rechts). Der Maßstab in der unteren rechten Ecke der Abbildung zeigt 200 nm an.

Ca^{2+} die Reaktion (Abb. 3.31d). In diesem Fall kann Synaptotagmin nur mit der Q-SNARE-Membran, also in *trans* Ca^{2+} -abhängig interagieren.

Wie wirkt sich die Inkorporierung von PIP_2 in die Q-SNARE-Membran auf Reaktionen mit korekonstituiertem Synaptotagmin aus? Da synaptische Vesikel kaum Phosphatidylinositol enthalten, wie Untersuchungen zur Phospholipid-

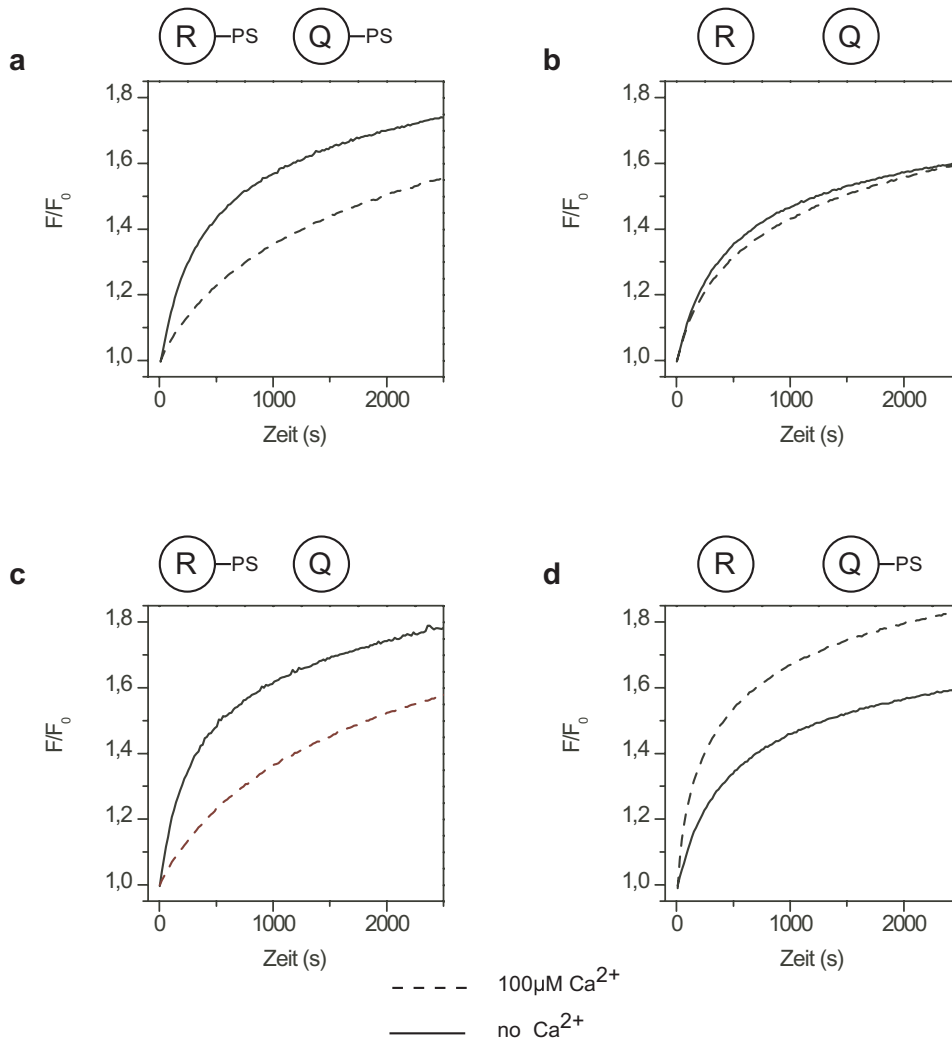


Abbildung 3.31 – $100 \mu\text{M Ca}^{2+}$ inhibieren oder beschleunigen die Liposomenfusion in Abhängigkeit vom PS-Gehalt der Q- und R-SNARE-Membran. **(a)** Wenn beide Membrane Phosphatidylserin (PS) enthalten, inhibiert Ca^{2+} die Reaktion. Die beobachteten Fusionsraten ähneln dann den ohne Korekonstitution von Synaptotagmin beobachteten. **(b)** Fehlt PS in beiden Membranen, hat Ca^{2+} keinen Einfluss auf die Reaktion. **(c)** Ist PS nur in der R-SNARE-Membran, inhibiert Ca^{2+} die Reaktion. **(d)** Die Reaktion wird durch Ca^{2+} beschleunigt, wenn nur die Q-SNARE-Membran PS enthält.

Zusammensetzung von synaptischen Vesikeln gezeigt haben [250], wird hier nur der Effekt von PIP_2 in der Q-SNARE-Membran untersucht, und zwar in An- und Abwesenheit von Phosphatidylserin in der Synaptobrevin-Membran. Abbildung 3.32b zeigt, dass bei einem PS-Gehalt von 10% in der Synaptobrevin-Membran die *cis*-Interaktion von Synaptotagmin auch bei 1% PIP_2 in der Q-SNARE-Membran dominiert, d.h. es ist eine leichte Hemmung der Fusionskinetik in Gegenwart von Ca^{2+} zu beobachten. Bei Fehlen von PS beschleunigt

Ca^{2+} die Reaktion, und zwar schon bei $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$ (Abb. 3.32a). In Abwesenheit von PIP_2 wird diese erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität nicht beobachtet (nicht gezeigt).

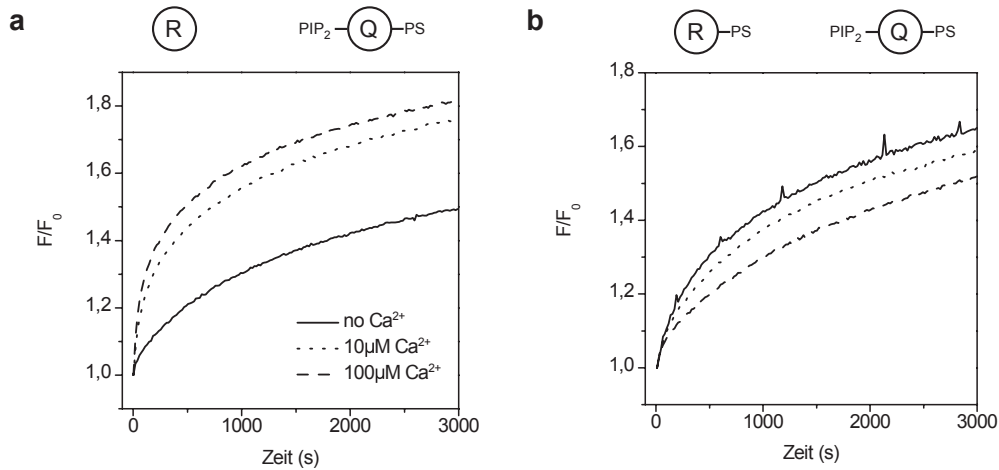


Abbildung 3.32 – Effekt von PIP_2 auf die Fusionsreaktion mit korekonstituiertem Synaptotagmin. (a) Wird die *cis*-Interaktion verhindert, so bewirkt die Inkorporierung von PIP_2 in die Q-SNARE-Membran eine Beschleunigung der Reaktion schon bei $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$ (b). Enthält die R-SNARE-Membran jedoch PS, ist die *cis*-Interaktion weiterhin dominant.

3.3.8 Einfluss von Synaptotagmin auf die Fusion mit dem ΔN -Komplex

Alle bis hierher gezeigten Experimente zu Synaptotagmin sind mit einem Komplex von Syntaxin und SNAP-25 durchgeführt worden, in dem die Bindungsstelle für Synaptobrevin durch ein zweites Syntaxin-Molekül blockiert ist. Wie in Kapitel 3.2 erläutert, wird die Fusionskinetik unter diesen Bedingungen von der Dissoziation des zweiten Syntaxins und der Entstehung einer Bindungsstelle für Synaptobrevin bestimmt. Dies sollte zur Folge haben, dass der Einfluss regulatorischer Proteine auf Schritte im Fusionsprozess, die diesem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt nachfolgen, nicht detektierbar ist. Wie ausführlich erläutert, kann die Bildung des 2:1-Komplexes durch einen Trick verhindert werden. Dabei wird der 1:1-Komplex aus Syntaxin und SNAP-25 durch ein C-terminales Fragment von Synaptobrevin (AS 49-96) stabilisiert, das zwar die schnelle N-terminale Bindung von Synaptobrevin erlaubt, aber die Bindungsstelle für ein zweites Syntaxin blockiert. Bei Rekonstitution eines solchen Komplexes ist die Initiierung von *trans*-Interaktionen zwischen R- und Q-SNAREs

nicht mehr geschwindigkeitsbestimmend.

In einer letzten Reihe von Experimenten wurde der Einfluss des C2AB-Fragments und von mit Synaptobrevin korekonstituiertem Synaptotagmin auf die Fusion mit Liposomen untersucht, die statt des Syntaxin/SNAP-25-Komplexes den Δ N-Komplex enthielten. Abbildung 3.33 zeigt Messungen, die zeigen, dass weder das C2AB-Fragment noch Gesamt-Synaptotagmin die Reaktion zusätzlich beschleunigen. Sowohl die Ca^{2+} -abhängige Beschleunigung durch das C2AB-Fragment als auch die Ca^{2+} -unabhängige Beschleunigung durch Korekonstitution von Synaptotagmin werden also umgangen, wenn die Initiierung der *trans*-Interaktion zwischen SNAREs nicht mehr geschwindigkeitsbestimmend ist.

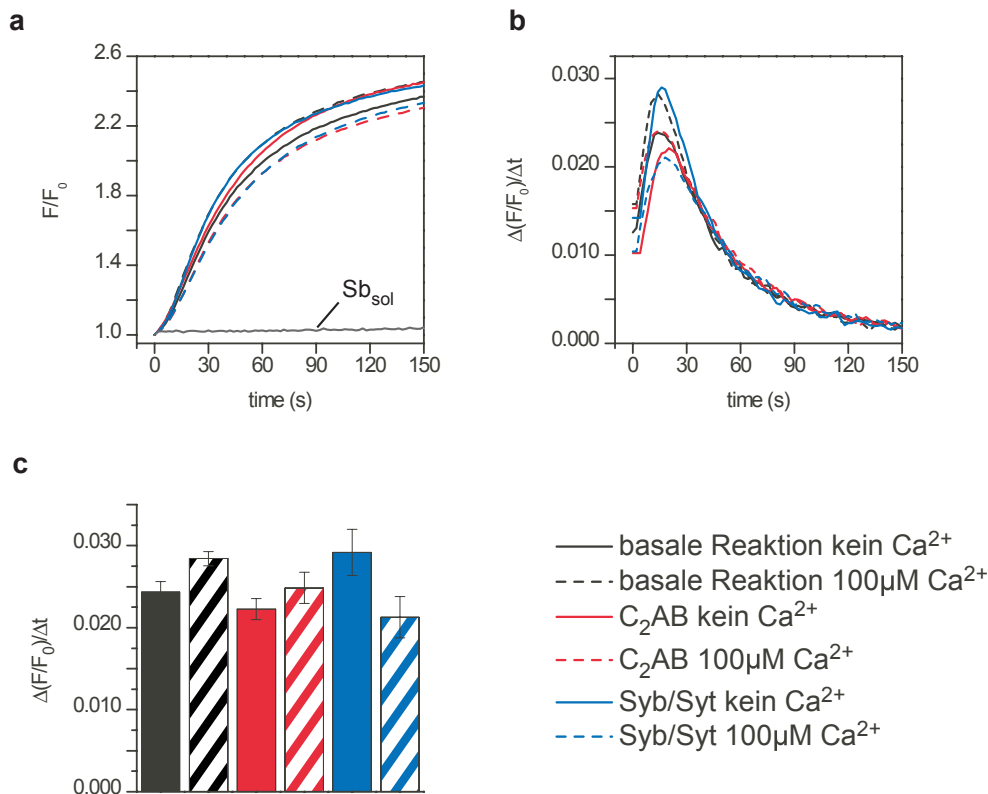


Abbildung 3.33 – Weder das C2AB-Fragment noch korekonstituiertes Synaptotagmin beschleunigen eine durch den Δ N-Komplex angetriebene schnelle Fusionsreaktion. (a) Vergleich der Fusionskinetiken unter basalen Bedingungen, in Gegenwart des C2AB-Fragments und bei Korekonstitution mit Synaptotagmin. (b) Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten. Gezeigt ist die erste Ableitung der in (a) gezeigten Kurven nach der Zeit. Die daraus abgelesenen maximalen Fusionsraten sind in (c) gezeigt ($n = 5$; Fehlerbalken geben den Standardfehler vom Mittelwert an).

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Zur Methodik der Liposomenfusion

In der Einleitung zu dieser Arbeit habe ich ausführlich dargelegt, welche physiologischen Befunde für oder gegen eine essentielle Rolle der SNARE-Proteine beim Verschmelzen zweier Membranen sprechen. Dass die Bildung von *trans*-SNARE-Komplexen die Fusion künstlicher Phospholipidvesikel antreiben kann, ist als starkes Argument für eine solche Rolle aus Fusogen gewertet worden [265]. In zwei kürzlich erschienenen Studien wurde jedoch die Art und Weise, wie der liposomale Fusionsassay durchgeführt wird, grundsätzlich in Frage gestellt [40,57]. Der Hauptkritikpunkt war dabei, dass in den meisten der bisherigen Arbeiten Fusion nur als das Vermischen von Membranen gemessen worden ist, *content mixing* und *content leakage* hingegen nicht untersucht worden sind. Die Autoren stellten dann die Aussagekraft der Liposomenexperimente für biologische Membranfusion grundsätzlich in Frage, mit dem Argument, dass die Liposomen, entweder aufgrund ihrer kleinen Größe oder aufgrund von Störstellen durch die Präparation (z.B. Detergensreste) unspezifisch fusionieren könnten, sobald die Membran durch die SNARE-Proteine in engen Kontakt gebracht werden.

Der in dieser Arbeit und von Schuette et al. beschriebene Resonanzenergietransfer zwischen Fluorophoren, die an die C-Termini von Syntaxin und Synaptobrevin gekoppelt sind, ist nur bei *cis*-SNARE-Komplexbildung zu beobachten, stellt also in gewisser Weise einen *content mixing assay* dar [224]. Diese Methode hat allerdings erstens den Nachteil, dass das entstehende FRET-Signal nicht mit dem zu untersuchenden Ereignis (*content mixing*) zeitlich zusammenfallen muss, d.h. *cis*-Komplexbildung läuft auch innerhalb einer Membran

weiter, wenn *content mixing* bereits abgeschlossen ist. Zweitens ist natürlich keine Aussage über *content leakage* möglich. Auch der von Nickel et al. präsentierte *content-mixing-assay* kann *content leakage* nicht zuverlässig ausschließen, da die verwendeten Proben (Oligonukleotide) relativ groß sind und eine gewisse Tendenz aufweisen könnten, an der Membran zu 'kleben' [166]. Ein durch SNARE-Komplexbildung angetriebenes *content mixing* ohne *content leakage* konnte also noch nicht gezeigt werden.

Dennison et al. zeigten, dass eine zu hohe Proteindichte die Integrität der Membran beschädigt, so dass Liposomen nicht mehr dicht sind. Dazu wurden zunächst proteinfreie Liposomen hergestellt, die mit Tb^{3+} /DPA geladen waren. Anschließend wurden die Proteine nach der in Kapitel 3.1 beschriebenen Methode nach Absättigung der Membran mit einem Detergens inseriert. Das Detergens wurde dann durch Dialyse entfernt. Bei Verwendung dieser Rekonstitutionsmethode verloren Liposomen bei Protein:Lipid-Verhältnissen von 1:460 – 1:250 (Syntaxin-Liposomen) ihren Inhalt. Bei niedrigen Proteindichten (1:2250 für Syntaxin und 1:950 für Synaptobrevin), die die Membranintegrität bewahrten, wurde weder Lipidvermischung noch *content mixing* registriert, während bei höheren Proteindichten (1:250 für Syntaxin und 1:120 für Synaptobrevin) Lipidvermischung beobachtet wurde, die in Ausmaß und Geschwindigkeit früheren Beobachtungen vergleichbar war. Dennison et al. folgerten aus diesen Beobachtungen, dass die fusogene Wirkung von SNARE-Proteinen auf den Verlust der Membranintegrität zurückzuführen ist, und dass die bei hohen Proteindichten registrierte Lipidvermischung durch das Zerreißen der Membran (*membrane rupture*) und nachfolgendes *reannealing* erklärt werden kann [57].

In einer weiteren Arbeit argumentierten Chen et al., dass die in dieser Arbeit verwendete Rekonstitutionsmethode zu einem ungleichmäßigen Einbau der Proteine führe, d.h. einige Liposomen deutlich mehr Protein enthalten als andere [40]. Auch hier wurde argumentiert, dass dies die Membranintegrität beeinträchtigen würde. Diese Behauptung wird durch Messungen unterstützt, die zeigen, dass Liposomen, in die Protein nachträglich inseriert wird, eine gleichmäßigere Proteinverteilung aufweisen und weniger fusogen sind.

Wie sind diese Beobachtungen und Kritiken im Zusammenhang mit dieser Arbeit zu beurteilen? Zunächst zur Frage der Rekonstitutionsmethode wie sie von Chen et al. aufgeworfen wurden. Es kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Proteinverteilung in den Liposomen heterogen ist, einige Befunde sprechen jedoch dagegen. So sollte bei stark ungleichmäßigem Proteineinbau

ein bedeutender Anteil der Liposomen so wenige SNAREs enthalten, dass sie nicht fusionieren können. Die Änderung der Größenverteilung in einer Fusionsreaktion, wie sie in Abbildung 3.5 dargestellt ist, zeigt jedoch, dass nahezu alle Liposomen an der Fusion teilnehmen, da keine Liposomen der ursprünglichen Größe mehr detektiert wurden. Auch fluoreszenzmikroskopisch ist nachgewiesen worden, dass bei der hier verwendeten Rekonstitutionsmethode nahezu alle Liposomen an der Reaktion teilnehmen [224]. Die in dieser Arbeit verwendete Rekonstitutionsmethode unterscheidet sich außerdem entscheidend von der von Chen et al. untersuchten. Die dort verwendete *rapid-dilution*-Methode, bei der Liposomen durch rasche Verdünnung der Detergens-Konzentration unter die cmc formiert werden, führt in der Regel zu einer sehr heterogenen Größenverteilung und damit zu unregelmäßigen Konzentrationsverteilungen [221]. Entfernung des Detergens über eine Gelfiltrationssäule bei niedrigen Flussraten ermöglicht hingegen eine gleichmäßigere Entfernung des Detergens und resultiert in Liposomen homogener Größe. Allerdings sind zur Untersuchung dieses Problems weitere Studien nötig, die die Proteinverteilung genauer zu bestimmen erlauben als die von Chen et al. verwendeten Nycodenz-Dichtegradienten [40]. Wenden wir uns nun dem Problem der angemessenen Proteindichten zu. Dennison et al. argumentierten, dass die von ihnen verwendeten Protein:Lipid-Verhältnisse von ca. 1:1000 jene in der Membran des synaptischen Vesikel widerspiegeln und dass unter diesen Bedingungen SNARE-Komplexbildung nicht zur Membranfusion ausreicht. Zumindest die erste Aussage ist nach neueren Erkenntnissen nicht zutreffend. Ein synaptisches Vesikel beherbergt im Durchschnitt 70 Kopien Synaptobrevin [250]. Bei einer durchschnittlichen Oberfläche von etwa 5400 nm^2 ergibt dies eine Moleküldichte von ca. 1,3 Synaptobrevin-Molekülen/ \AA^2 . Im Vergleich dazu haben die in dieser Arbeit verwendeten Liposomen eine Moleküldichte von ca. 0,76 Molekülen/ \AA^2 , die von Dennison et al. verwendeten Liposomen bei Protein:Lipid-Verhältnisse von 1:2250, 1:1000 bzw. 1:400 Moleküldichten von 0,07 ; 0,15 bzw. 0,38 Molekülen/ \AA^2 ¹. Nicht nur ist die in dieser Arbeit verwendete Moleküldichte für Synaptobrevin-Liposomen eher einem synaptischen Vesikel vergleichbar. Entscheidender ist, dass bei den von Dennison et al. verwendeten Liposomen, die nicht fusionierten, nur etwa 3 bzw. 8 SNARE-Kopien pro Vesikel vorlagen. Selbst unter der Annahme, dass

¹Diese Wert ergeben sich aus den mittleren Liposomendurchmessern von 18 nm (diese Studie), bzw. 20 nm (Dennison et al. [57]), einer Fläche je Lipidmolekül von $0,65 \text{ nm}^2$ und der von einer Transmembranregion eingenommenen Fläche von 150 \AA^2 [250].

alle SNAREs auf einem Liposom SNARE-Komplexe bildeten, erscheint es nach diesen einfachen Überlegungen nicht verwunderlich, dass keine Fusion beobachtet wurde.

Nichtsdestoweniger ist es in Anbetracht der vorgebrachten Kritik möglich, dass die SNARE-vermittelte Fusion von Liposomen nicht ohne *content leakage* abläuft. Drei Beobachtungen sprechen dagegen, dass die Liposomen durch die Assemblierung von SNAREs nur auf Grund von fehlender Stabilität fusionieren.

- Die Beobachtung, dass Lysophosphatidylcholin die SNARE-vermittelte Liposomenfusion hemmt, zeigt, dass diese wahrscheinlich über ein *stalk*-Intermediat verläuft, also zumindest ein für die Fusion charakteristisches Intermediat gebildet wird [40].
- Die Fusion von gereinigten synaptischen Vesikeln mit Q-SNARE-Liposomen weist nahezu identische Charakteristika auf wie das in dieser Arbeit untersuchte System².
- Hell et al. zeigten, dass Liposomen, die über Cholat-Entfernung hergestellt sind, künstliche Ionengradienten über längere Zeit aufrecht erhalten können [95].

Diese Befunde unterstützen die Validität des hier verfolgten Ansatzes. Es sei an dieser Stelle außerdem betont, dass die Konstruktion von experimentellen Bedingungen, die zwar die Bildung von SNARE-Komplexen aber nicht die Fusion erlauben, *per se* keine Evidenz dafür sind, dass SNAREs nicht die minimale Fusionsmaschinerie bilden. Solche Experimente sind nur dann bedeutsam, wenn auch gezeigt werden kann, dass die so verbundenen Membranen eine Zwischenstufe im Fusionsprozess darstellen, die etwa durch Ca^{2+} -Bindung an Synaptotagmin überwunden werden kann³.

²Ein Manuskript zu diesem Thema aus diesem Labor befindet sich gerade in Arbeit: Holt, M., D. Riedel, A. Stein, C. Schuette, R. Jahn. 2007. Synaptic vesicles are constitutively active fusion machines, which function independently of Ca^{2+} .

³Vergleiche dazu Experimente mit Hemagglutinin und anderen viralen Fusionsproteinen, die zeigten, dass eine Reduktion der Oberflächenkonzentration dazu führt, dass die Fusion im Zustand der Hemifusion angehalten wird [46].

4.2 Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Liposomenfusion

Die durch SNAREs vermittelte Fusion von Liposomen kann in mehrere Reaktionsschritte eingeteilt werden. In Lösung diffundieren Liposomen frei und kollidieren. Eine solche Kollision kann entweder produktiv sein oder unproduktiv. Produktiv ist eine Kollision, wenn sie zur Interaktion von Q- und R-SNAREs führt. Die Häufigkeit von Kollisionen ist anhand der Viskosität des Reaktionsmediums, der Diffusionseigenschaften der Liposomen und der Liposomenkonzentration relativ einfach abzuschätzen. Schuette et al. haben eine solche Abschätzung vorgenommen [224]. Mit Hilfe von *fluorescence correlation spectroscopy* wurde ein Diffusionskoeffizient von $\approx 33 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Es ergab sich eine Wahrscheinlichkeit von etwa 10^{-7} , dass ein Kollisionsereignis zur Fusion führt. Da die in dieser Arbeit verwendeten Liposomen eine ähnliche Größenverteilung aufweisen und sehr ähnlich präpariert sind, kann davon ausgegangen werden, dass sie ein ähnliches Diffusionsverhalten haben und dieser Wert auf die hier vorgelegten Experimente übertragbar ist. Welche Faktoren bestimmen die Wahrscheinlichkeit für eine produktive Kollision? Zunächst ist die Oberflächendichte der SNARE-Proteine entscheidend. Dieser Faktor kann nur begrenzt modifiziert werden, insbesondere in Anbetracht der gegen zu hohe Proteindichten vorgebrachten Kritik (siehe oben) [40, 57]. Je höher diese ist, desto wahrscheinlicher sollte es allerdings zu einer produktiven Interaktion kommen. Wichtiger scheint jedoch die Reaktivität der SNARE-Proteine zu sein. Siddiqui et al. zeigten, dass Synaptobrevin in der Liposomenmembran konstitutiv aktiv vorliegt. Dies scheint auch in der Membran des synaptischen Vesikels so zu sein, wo die Bindung an Synaptophysin nicht zu einer Minderung der Aktivität von Synaptobrevin führt [230]. Hinweise darauf, dass die Aktivität von Synaptobrevin durch Insertion von Tryptophanresten in die Membran reguliert sein könnte [127] oder dass Synaptobrevin in der Membran des synaptischen Vesikels erst durch Ca^{2+} aktiviert wird [103], wurden in der zitierten Arbeit nicht reproduziert [230].

Bleiben also die Q-SNAREs. Die in Kapitel 3.2 gezeigten Experimente zeigen, dass die Reaktivität der Q-SNAREs mit der Geschwindigkeit der Fusion korreliert. Je schneller lösliches Synaptobrevin mit den Q-SNAREs interagiert, desto schneller verlief die Fusionsreaktion. Wurden Syntaxin- und Synaptobrevin-Liposomen inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von SNAP-25 gestar-

tet, war die Fusion vergleichsweise langsam. Bindungsstudien zeigten, dass dies darauf zurückzuführen ist, dass Syntaxin in der Membran relativ inaktiv vorliegt. Aber auch bei Rekonstitution eines Syntaxin-SNAP-25-Komplexes war die Reaktion langsam. Als Grund dafür wurde das komplizierte Q-SNARE-Gleichgewicht identifiziert. Bei den hohen lokalen Proteinkonzentrationen auf der Liposomenmembran liegt das Gleichgewicht zwischen dem 2:1- und dem 1:1-Komplex von Syntaxin und SNAP-25 eindeutig auf Seiten des 2:1-Komplexes, der Synaptobrevin nicht binden kann [70, 191].

Dass Reaktionen mit den endosomalen SNAREs und mit einem Komplex von Syntaxin 1 und SNAP-23 schneller verliefen, kann darauf zurückgeführt werden, dass diese Proteine entweder keinen 2:1-Komplex bilden oder dass das Gleichgewicht eher auf der Seite des reaktiven 1:1-Komplexes liegt. CD-spektroskopische Untersuchungen an löslichen Fragmenten spätendosomaler Q-SNAREs ergaben keine Hinweise auf die Ausbildung stabiler Q-SNARE-Komplexe, die den Syntaxin-SNAP-25 Komplexen vergleichbar wären [7]. In Lösung bildet sich der spätendosomale Komplex folgerichtig äußerst langsam [5]. Es ist jedoch möglich, dass solche Zwischenstufen zwar in Lösung instabil sind, aber bei den hohen lokalen Konzentrationen der membranverankerten Proteine entstehen. Die schnelle Bindung von Synaptobrevin an die rekonstituierten endosomalen Q-SNAREs legt dies nahe. Untersuchungen zum Gleichgewicht von Syntaxin 1 und SNAP-23 liegen meines Wissens nicht vor und wurden in dieser Arbeit auch nicht durchgeführt. Die schnellere Bindung von Synaptobrevin gibt allerdings auch hier Anlass zur Vermutung, dass ein zweites Syntaxin-Molekül entweder gar nicht oder zumindest weniger stark als im SNAP-25-Komplex gebunden ist. Die Stabilisierung der N-terminalen Bindungsstelle für Synaptobrevin im Δ N-Komplex ist ein entscheidendes Argument für die Richtigkeit des in Abbildung 3.11 präsentierten Modells zum Q-SNARE-Gleichgewicht. Wird die Bindung des zweiten Syntaxin-Moleküls durch ein C-terminales Fragment für Synaptobrevin blockiert, während gleichzeitig die Bindungsstelle von Synaptobrevin zugänglich bleibt, verläuft die Fusionsreaktion schnell und ist bereits nach wenigen Minuten abgeschlossen. In diesem Fall wird die Verdrängung des Synaptobrevin-Fragments oder ein nachfolgender Schritt geschwindigkeitsbestimmend für die Gesamtreaktion. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass eine Erhöhung der Konzentration der Reaktanden nicht zu einer erhöhten Fusionsrate führt (Abb. 3.19). Die Geschwindigkeit der Verdrängung des Synaptobrevin-Fragments ist wahrscheinlich eine Funktion seiner Bindungs-

energie, die wiederum von der Länge des Fragments abhängig sein dürfte. Eine direkte Überprüfung dieser Hypothese war jedoch nicht möglich, da ein ΔN -Komplex mit einem etwas längeren Fragment (Synaptobrevin AS 42-96) zwar weniger reaktiv war, ein kürzeres Fragment (AS 60-96) hingegen keinen stabilen Komplex mehr bildete. In jedem Fall ermöglicht es die Verwendung des ΔN -Komplexes zum ersten Mal, eine Fusionsreaktion zu betrachten, bei der nicht die Initiierung des SNARE-*zippering* geschwindigkeitsbestimmend ist.

4.3 Beschleunigung der Liposomenfusion durch Synaptotagmin

Wie sind im Lichte der Erkenntnis zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Liposomenfusion die mit Synaptotagmin beobachteten Phänomene zu beurteilen? Zunächst eine kurze Zusammenfassung der Beobachtungen (Abbildung 4.1): Das C2AB-Fragment beschleunigt die Fusion strikt Ca^{2+} -abhängig, wenn ein 2:1-Komplex von Syntaxin und SNAP-25 rekonstituiert wird. Die einzige Ca^{2+} -abhängige Reaktion ist die Rekrutierung des C2AB-Fragments an die Synaptobrevin-Membran. Für diese Bindung ist nur die Ca^{2+} -Bindung an die C2A-Domäne notwendig, während Ca^{2+} -Bindungsstellen in der C2B-Domäne ohne erkennbaren Einfluss auf die Reaktion mutiert werden konnten. Neben dieser Rekrutierungsreaktion ist eine Interaktion mit den neuronalen Q-SNAREs notwendig (Abb. 4.1a).

Bei Korekonstitution von Synaptotagmin in die R-SNARE-Membran wird die Ca^{2+} -abhängige Rekrutierung überflüssig. Die Beschleunigung der Fusionsreaktion wird in diesem Fall in Abwesenheit von Ca^{2+} beobachtet und ist auf eine Interaktion mit den Q-SNAREs zurückzuführen (Abb. 4.1b). Dieser Schluss wird durch weitere Studien unterstützt, die den Effekt von Mutationen in der Lysin-reichen Region der C2B-Domäne untersuchten [140, 197]. Loewen et al. mutierten die Aminosäuren K326 und K327 zu Alaninen. Bei Korekonstitution dieser Mutante mit Synaptobrevin wurde keine Ca^{2+} -unabhängige Beschleunigung der Liposomenfusion mehr beobachtet [140].

Die in Abbildung 4.1c gezeigte Ca^{2+} -abhängige *trans*-Interaktion mit sauren Phospholipiden führt ebenfalls zu einer Beschleunigung der Fusion. Sie kann jedoch nur beobachtet werden, wenn die ansonsten dominante *cis*-Interaktion durch Entfernen saurer Phospholipide aus der Synaptobrevin/Synaptotagmin-Membran verhindert wird. Auch in Gegenwart von PIP_2 in der Q-SNARE-

Membran ist die *cis*-Interaktion dominant. Wird die *cis*-Interaktion verhindert, führt PIP₂ dazu, dass die Beschleunigung auch schon bei niedrigeren Ca²⁺-Konzentrationen beobachtet wird. Auch in einer Arbeit aus der Chapman-Gruppe wurde gezeigt, dass Synaptotagmin präferentiell mit der eigenen Membran interagiert [12].

Der inhibitorische Effekt der *cis*-Interaktion ist auf eine Bindung der C2-Domänen Synaptotagmins an die eigene Membran zurückzuführen, die eine *trans*-Interaktion mit den Q-SNAREs sterisch unmöglich zu machen scheint. Die Fusionsraten entsprechen in diesem Fall folgerichtig jenen, die in Abwesenheit von Synaptotagmin beobachtet werden.

Wie beschleunigen diese Interaktionen die Reaktion? Das Schlüsselexperiment zur Beantwortung dieser Frage ist in Abbildung 3.33 gezeigt: Bei Rekonstitution des Δ N-Komplexes wurde unter keiner der zuvor beschriebenen Bedingungen eine Beschleunigung der Reaktion festgestellt, weder durch das C2AB-Fragment, noch durch Korekonstitution von Gesamtsynaptotagmin. Wie oben ausgeführt, ermöglicht der Δ N-Komplex die Untersuchung von Schritten der Membranfusion, die der Initiierung der Komplexbildung nachgeschaltet sind, da die SNARE-Komplexbildung selbst nicht mehr geschwindigkeitsbestimmend für die Fusionsreaktion ist. Dass die Beschleunigung durch das C2AB-Fragment in einer Reaktion nicht beobachtet wird, in der der Assemblierungsprozess schnell abläuft, suggeriert, dass Synaptotagmin in diesem System vor der SNARE-Interaktion wirkt bzw. diese beeinflusst.

Ein direkter Einfluss auf die Komplexbildungsreaktion scheint jedoch unwahrscheinlich zu sein, da das C2AB-Fragment die Bindung von Synaptobrevin in Übereinstimmung mit einer früheren Arbeit nicht beschleunigt [17]. Die von Bhalla et al. beschriebene Beschleunigung der Bildung des binären Komplexes aus Syntaxin und SNAP-25 durch das C2AB-Fragment scheidet ebenfalls als Erklärung aus, da dieser Komplex in den hier vorgestellten Experimenten bereits in micellärer Lösung vorformiert und dann rekonstituiert wurde. Im Übrigen konnte ein solcher Einfluss auf die Bildung des binären Komplexes in einem System, das eine hohe zeitliche Auflösung des Reaktionsverlaufs gewährleistet, nicht reproduziert werden.

Vielmehr scheint die Interaktion mit Lipiden der Synaptobrevin-Membran einerseits und den Q-SNAREs andererseits zu einer reversiblen Aggregation (*clustering*) der beiden reagierenden Liposomen zu führen. Die lokale Konzentration der SNAREs und die Kontaktzeit bei der Kollision wird dadurch erhöht und

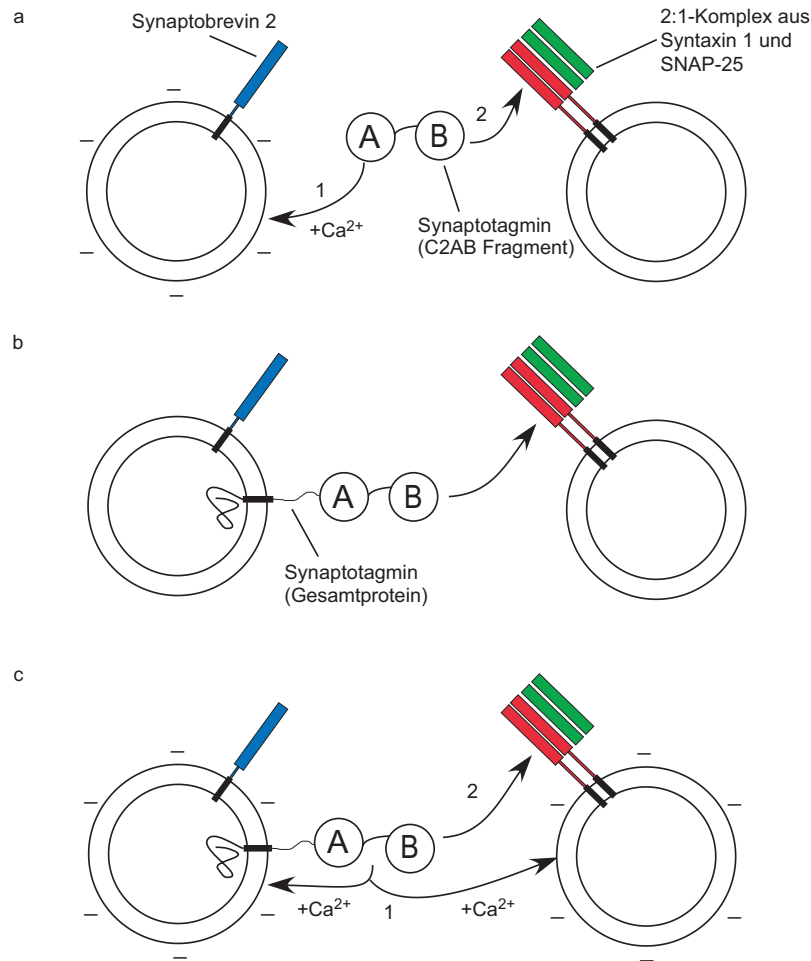


Abbildung 4.1 – Schematische Darstellung der bei der Liposomenfusion beobachteten Reaktionen von Synaptotagmin. **(a)** Interaktionen des C2AB-Fragments. Zuerst bindet das C2AB-Fragment Ca^{2+} -abhängig über die C2A-Domäne an die R-SNARE-Membran. Die C2B-Domäne vermittelt dann die Interaktion mit den Q-SNAREs Ca^{2+} -unabhängig. Beide Interaktionen sind für eine Beschleunigung der Reaktion notwendig. **(b)** Interaktionen von korekonstituiertem Synaptotagmin in Abwesenheit von Ca^{2+} . Bei Korekonstitution von Synaptotagmin mit Synaptobrevin genügt die Ca^{2+} -unabhängige Interaktion mit den Q-SNAREs zur Beschleunigung der Reaktion. Keine Beschleunigung wird beobachtet, wenn Synaptotagmin mit den Q-SNAREs rekonstituiert wird (nicht gezeigt). **(c)** Interaktionen von korekonstituiertem Synaptotagmin in Anwesenheit von Ca^{2+} . Synaptotagmin interagiert bei Anwesenheit von Phosphatidylserin in der R-SNARE-Membran präferentiell in *cis*, wodurch das Protein inaktiviert wird. Wird diese Reaktion durch Entfernen von PS verhindert, führt eine *trans*-Interaktion zur Beschleunigung der Fusion. Eine Beschleunigung der Reaktion wird also nur dann beobachtet, wenn Synaptotagmin auf die eine oder andere Weise beide Membranen verbindet.

die Bindung von Synaptobrevin an die neuronalen Q-SNAREs erleichtert. Eine solche durch das C2AB-Fragment vermittelte Aggregation wurde auch von

Bhalla et al. beobachtet, wenn die Menge des von der Probe gestreuten Lichtes gemessen wurde. Bei Fehlen von Phosphatidylserin induzierte das C2AB-Fragment *clustering* von Liposomen, in die neuronale SNAREs rekonstituiert waren, während dies bei den exozytotischen SNAREs aus *Saccharomyces cerevisiae* nicht beobachtet wurde [17]. Um für die Komplexbildung produktiv zu sein, muss das *clustering* allerdings einige sterische Anforderungen erfüllen. So berichteten Schuette et al., dass *clustering* durch Biotin-Avidin erst bei sehr verdünnten Lösungen zu einer Beschleunigung der Reaktion führt. Es ist möglich, dass der Abstand zwischen SNAREs in diesem System noch zu groß ist, um eine Interaktion zu erleichtern [224]. Bhalla et al. zeigten außerdem, dass das C2AB-Fragment zwar *clustering* von Liposomen bewirkt, in die die exozytotischen Hefe-SNAREs rekonstituiert sind, sie stellten jedoch keine Beschleunigung der Reaktion fest [17]. Auch ich konnte bei Verwendung eines 2:1 Komplexes aus Syntaxin 4 und SNAP-23 keine Beschleunigung feststellen.

Die Fähigkeit des C2AB-Fragments und der isolierten C2A- und C2B-Domänen, Liposomen zu aggregieren, wurde systematisch von Arac et al. untersucht [9]. *Clustering* wurde dabei elektronenmikroskopisch und mit Hilfe dynamischer Lichtstreuung nachgewiesen. Es zeigte sich, dass das C2AB-Fragment und die isolierte C2B-Domäne Liposomen Ca^{2+} -abhängig aggregieren, die C2A-Domäne hingegen nicht. Wenn Lysinreste K326 und K327 zu Alaninen mutiert werden, verliert nur die isolierte C2B-Domäne die Fähigkeit Liposomen zu aggregieren, während mit dem mutierten C2AB-Fragment immer noch Aggregation beobachtet wird. Die C2B-Domäne besitzt also zwei Bindungsstellen für anionische Membranen, das C2AB-Fragment mit der C2A-Domäne eine dritte. Auf der Grundlage dieser Beobachtungen kann auch der Befund erklärt werden, dass die C2B-Domäne allein zu einer Beschleunigung der Liposomenfusion führt (Abb. 3.27). Auch sie scheint durch Aggregation von Liposomen die SNARE-Komplexbildung zu erleichtern. Allerdings konnte die Beschleunigung nur in Gegenwart von PIP_2 beobachtet werden, während Arac et al. Aggregation auch bei 30% PS-Anteil in der Membran beobachteten [9]. Es ist allerdings möglich, dass bei solch hohem PS-Anteil PIP_2 nicht benötigt wird. Ob auch bei der Beschleunigung durch die C2B-Domäne eine Interaktion mit den neuronalen Q-SNAREs wichtig ist, kann anhand der präsentierten Daten nicht beantwortet werden. Es sei jedoch erwähnt, dass die gleiche basische Region in der C2B-Domäne, die an der Bindung von PIP_2 beteiligt ist, auch die Bindung an den binären Komplex zu vermitteln scheint [197]. Ob sich die Interaktionen aus-

schließen oder welche der beiden dominiert, ist bislang noch nicht untersucht worden. Die Bindungsaffinitäten für beide Interaktionen, deren Kenntnis zur Klärung dieser Frage wichtig wäre, sind unbekannt, da die bisher verwendeten Bindungsassays (GST-pulldowns etc.) die genaue Bestimmung von Affinitäten nicht zulassen.

Mögen diese Schlussfolgerungen auch etwas ernüchternd klingen, so lösen sie doch einige Widersprüche zwischen Beobachtungen auf, die mit dem C2AB-Fragment bzw. Gesamtsynaptotagmin gemacht wurden. Der ursprüngliche von Tucker et al. gemachte Befund, dass das C2AB-Fragment die Liposomenfusion Ca^{2+} -abhängig beschleunigt [255], ist vollständig durch die unphysiologische Rekrutierung an die R-SNARE-Membran erklärt. Die von Mahal et al. zuerst beschriebene Ca^{2+} -unabhängige Beschleunigung kann auf eine Interaktion mit den Q-SNAREs zurückgeführt werden [143], die auch für die durch das C2AB-Fragment beschleunigte Reaktion wichtig ist. Zuletzt kann die fehlende Beschleunigung durch Ca^{2+} bei Korekonstitution von Synaptotagmin durch eine inhibitorische *cis*-Interaktion erklärt werden.

4.4 Die Rekonstitution der neuronalen Exozytose

Der Vergleich mit physiologischen Befunden zur Wirkungsweise von Synaptotagmin bei der neuronalen Exozytose macht deutlich, dass die im liposomalen Fusionsassay beobachtete Beschleunigung durch Synaptotagmins C2AB-Fragment die dramatische Beschleunigung der Neurotransmitterfreisetzung nicht authentisch reproduziert:

- Studien in Maus und *D. melanogaster* haben überzeugend gezeigt, dass Ca^{2+} -Bindung an die C2B-Domäne für die synchrone Freisetzung von Neurotransmitter essenziell ist [142, 168]. Die Beschleunigung durch das C2AB-Fragment bedarf hingegen lediglich der Ca^{2+} -Bindung an die C2A-Domäne. Eine *knock-in* Maus mit einer mutierten Ca^{2+} -Bindungsstelle in der C2A-Domäne zeigt hingegen nur einen milden Phänotyp [76].
- Seit langem ist bekannt, dass auch erhöhte präsynaptische Sr^{2+} -Konzentrationen die Freisetzung von Neurotransmitter bewirken können, wenn auch mit verminderter Effizienz [84, 159, 229]. Hingegen stellten Bhalla et al. in Gegenwart von 1 mM Sr^{2+} keine Beschleunigung der Liposomenfusion durch das C2AB-Fragment fest [18]. Diese Beobachtung

lässt sich mit den in meiner Arbeit gemachten Beobachtungen erklären. Danach ist die Ca^{2+} -abhängige Rekrutierung des C2AB-Fragments an die Synaptobrevin-Membran über die C2A-Domäne essentiell. Shin et al. zeigten jedoch, dass Sr^{2+} zwar die Bindung der C2B-Domäne an Membranen vermitteln kann, die C2A-Domäne jedoch erst bei millimolaren Sr^{2+} -Konzentrationen mit Membranen interagiert [229]. Auch Bhalla et al. zeigten Sr^{2+} -abhängige Membraninteraktion der C2A-Domäne erst bei einer Konzentration von 1 mM [18]. In Gegenwart von Sr^{2+} ist also keine Rekrutierung des C2AB-Fragments an die R-SNARE-Membran und daher auch keine Beschleunigung der Liposomenfusion zu erwarten.

Warum ist die Funktionsweise Synaptotagmins im liposomalen Fusionsassay nicht authentisch reproduziert? Eine Rekonstitution ist nur möglich, wenn die Reaktion, die von Synaptotagmin beeinflusst wird, beobachtbar ist, d.h. wenn der gesamte Reaktionsverlauf zu einem bedeutenden Anteil von dieser Reaktion bestimmt wird. Die Experimente mit dem ΔN -Komplex und verschiedenen Q-SNAREs zeigten, dass die Initiation der *trans*-SNARE-Interaktion bei der SNARE-vermittelten Liposomenfusion geschwindigkeitsbestimmend ist. Wirkt Synaptotagmin auf einen späteren Zustand, so ist dies nicht beobachtbar. Die entscheidende Frage auf dem Weg zur Rekonstitution der synaptischen Exozytose muss also lauten: Was ist der Zustand der Fusionsmaschinerie zum Zeitpunkt der Erhöhung der präsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration, auf den Synaptotagmin wirkt und wie kann dieser im liposomalen Fusionsassay reproduziert werden? Mehrere Szenarien sind denkbar [240]:

- SNARE-Proteine liegen vor dem Anstieg der präsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration unkomplexiert vor. Bindung von Ca^{2+} an Synaptotagmin fördert die Bildung des SNARE-Komplexes und führt zur Fusion.
- Ca^{2+} -Bindung an Synaptotagmin initiiert die Bindung von Synaptobrevin an einen in verschiedenen *priming*-Reaktionen bereits gebildeten 1:1-Akzeptorkomplex aus Syntaxin und SNAP-25. *Zippering* von Synaptobrevin führt zur Fusion.
- Der SNARE-Komplex ist N-terminal assembliert. Vollständiges *zippering* wird entweder durch intrinsische Faktoren wie die Abstoßung der beiden Membranen oder einen Proteinfaktor X verhindert. Die Bindung von Ca^{2+} an Synaptotagmin und das vollständige *zippering* sind aneinander gekoppelt.

Das erste Szenario erscheint als unwahrscheinlich. Bhalla et al. haben zwar einen solchen Ablauf auf Grundlage ihres Befundes vorgeschlagen, dass das C2AB-Fragment Ca^{2+} -abhängig die Interaktion von Syntaxin mit SNAP-25 fördert. Aber neben der Tatsache, dass ich diesen Befund hier nicht reproduzieren konnte, sprechen einige physiologische und biochemische Befunde gegen ein solches Modell. Xu et al. untersuchten den Einfluss von anti-SNAP-25 Antikörpern auf die SNARE-Komplexbildung und auf die Fusion von *dense-core vesicles* in chromaffinen Zellen [274]. Sie fanden, dass ein Antikörper, der als Epitop die Reste 20-40 in SNAP-25 erkennt, die Assemblierung von SNARE-Komplexen *in vitro* nahezu vollständig inhibiert. Experimente mit löslichen SNARE-Fragmenten zeigten später, dass dieser Bereich von SNAP-25 absolut essentiell für die Bindung an Syntaxin ist [70]. Wurde das Fab-Fragment dieses Antikörpers über die *patch*-Pipette in chromaffine Zellen dialysiert, beobachteten Xu et al., dass die als *sustained* bezeichnete Komponente der Exozytose stark inhibiert ist, während die sogenannte *burst*-Komponente weniger stark beeinträchtigt ist. Außerdem zeigt sich bei zwei kurz aufeinander folgenden Erhöhungen der Ca^{2+} -Konzentration, dass die Fusion nach der zweiten Stimulation besonders stark inhibiert ist. Die *burst*-Komponente wurde von Xu et al. als Fusion von sogenannten *release-competent vesicles* interpretiert, bei denen SNARE-Komplexe bereits partiell assembliert und daher gegen die Wirkung des Antikörpers resistent sind. Die *sustained*-Komponente soll hingegen die Rekrutierung und Fusion neuer Vesikel darstellen, die noch nicht *release-competent* sind. Durch Blockierung der SNARE-Komplexbildung ist diese Reifung (*priming*) neuerer Vesikel inhibiert. Auch Mutationen im und um den *0-layer* von SNAP-25 beeinflussen selektiv die *sustained*-Komponente und inhibieren auch *in vitro* die Bildung des Syntaxin/SNAP-25-Komplexes [240,266]. Aufgrund dieser Ergebnisse halte ich es für sehr wahrscheinlich, dass Syntaxin und SNAP-25 vor dem Ca^{2+} -Stimulus in einem Komplex vorliegen.

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten zeigen, dass Synaptobrevin schnell mit einem stabilisierten Qabc-Intermediat interagieren kann ($k_{on} \approx 5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Sie zeigen außerdem, dass diese schnelle Bindung auch eine schnelle Fusion von Liposomen zur Folge hat⁴. Da die Fusionskinetik wahr-

⁴Es fällt schwer, einen spezifischeren Ausdruck als *schnell* zu verwenden. Zwar erfolgt die Fusion immer noch deutlich langsamer als etwa die gerade erwähnte Fusion von *dense-core vesicles* in chromaffinen Zellen. Die Vergleichbarkeit der beiden Reaktionen ist jedoch fraglich, da beim liposomalen Fusionsassay das Verhalten eines ganzen Ensembles, bei der Fusion in

scheinlich durch die unphysiologische Verdrängungsreaktion des Synaptobrevin-Fragments bestimmt wird, ist es außerdem wahrscheinlich, dass die Fusion noch schneller erfolgen könnte, wenn dieser Schritt nicht nötig wäre. Das zweite Szenario ist aufgrund dieser Ergebnisse und Überlegungen also zumindest denkbar. Synaptotagmin könnte nach diesem Modell durch eine Interaktion mit dem Syntaxin/SNAP-25-Komplex bereits vor dem Ca^{2+} -Stimulus an der SNARE-Maschinerie positioniert sein. Ca^{2+} -Bindung an Synaptotagmin würde dann eine Interaktion mit Phospholipiden induzieren und durch diese Positionsänderung die Bindung von Synaptobrevin an die Q-SNAREs ermöglichen. Die von mir beobachtete inhibitorische *cis*-Interaktion könnte nach diesem Szenario dadurch vermieden werden, dass Synaptotagmin durch Bindung an den Syntaxin/SNAP-25-Komplex so positioniert ist, dass Ca^{2+} -Bindung präferentiell zu einer Interaktion mit der Plasmamembran führt. Diese Kontrolle der Exozytose scheint auch unter regulatorischen Gesichtspunkten plausibel, da nur die Bindung von Synaptobrevin bei basalen Ca^{2+} -Konzentrationen verhindert werden muss.

In diesem Zusammenhang sei eine weitere Studie erwähnt. Martens et al. zeigten, dass die Bindung des C2AB-Fragments an proteinfreie Membranvesikel zur Ausbildung von langen Tubuli mit kleinem Durchmesser führt [149]. Dies wurde auf die Insertion hydrophober Aminosäuren der Ca^{2+} -bindenden *loops* in die Membran zurückgeführt, was eine positive Krümmung bewirken soll. Eine solche Insertion hydrophober Aminosäuren in die Plasmamembran könnte eine lokale Krümmung hin zum synaptischen Vesikel induzieren und dadurch das *zippering* einleiten. Der von dieser Studie postulierte Wirkungsmechanismus von Synaptotagmin ist aber auch mit den anderen Szenarien vereinbar, da er eine neue, aktiv mechanische Funktion von Synaptotagmin im Fusionsprozess postuliert.

Das dritte Szenario, nach dem vor dem Eintreffen des Ca^{2+} -Stimulus bereits partiell assemblierte *trans*-Komplexe zwischen Vesikel- und Plasmamembran ausgebildet werden, wird gegenwärtig von den meisten Autoren favorisiert. Die extrem kurze Verzögerung von $< 100 \mu\text{s}$ zwischen dem Anstieg der präsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration und der Öffnung der Fusionspore in schnellen Synapsen wird dabei oft als Argument angeführt, um zu erklären, dass die Fusionsmaschinerie, gleich einer gespannten Feder, nur auf ein Signal zur vollständigen Assemblierung wartet [206, 244]. Dieses Modell wird durch eine Reihe von Be-

chromaffinen Zellen die Fusion einzelner Vesikel betrachtet wird.

funden zur Physiologie der synaptischen Transmission gestützt. Wie erwähnt, können in chromaffinen Zellen distinkte Vesikelpopulationen unterschieden werden, die sequentielle Schritte auf dem Weg zur Exozytose darstellen. In den im Folgenden diskutierten Arbeiten wurde mit Hilfe von Antikörpern, clostridialen Toxinen oder der Expression von SNARE-Mutanten die Assemblierung des SNARE-Komplexes gestört. Einige der beobachteten Phänotypen lassen sich am besten mit einem Gleichgewicht zwischen freien, monomeren SNAREs und partiell assemblierten *trans*-Komplexen erklären.

Der bereits erwähnte anti-SNAP-25 Antikörper inhibiert nicht nur die *sustained*-Komponente der Neurotransmitterfreisetzung sondern auch selektiv den schnellsten Teil der *burst*-Komponente [274], scheint also das *priming*, genauer gesagt die Überführung von Vesikeln aus dem *slowly releasable pool* in den *readily releasable pool* zu beeinflussen. Interpretiert wurde dieser Befund durch die Annahme, dass der verwendete Antikörper nicht nur monomeres SNAP-25 bindet, sondern auch den partiell assemblierten Komplex und dadurch das Gleichgewicht zwischen den beiden Vesikel-*pools* beeinflusst. In der Tat wurde gezeigt, dass die beiden *burst*-Komponenten innerhalb weniger Sekunden reversibel ineinander überführt werden können [263]. Die Stabilisierung der SNARE-Maschinerie durch den Antikörper in einem Zustand, der den *slowly releasable pool* repräsentiert, würde eine gute Erklärung für das beobachtete Phänomen bieten. Biochemische Daten, die eine Bindung des Antikörpers an einen partiell assemblierten Komplex zeigen, liegen jedoch nicht vor.

Ein ganz ähnlicher Phänotyp, wie der bei den Antikörper-Experimenten beobachtete, wurde auch bei Überexpression einer SNAP-25-Mutante, bei der die letzten neun Aminosäuren deletiert waren (SNAP-25 $\Delta 9$) [266], und bei Intoxikation mit BoNT/A festgestellt [273], das dieselben Aminosäuren von SNAP-25 proteolytisch entfernt. Auch hier war selektiv die schnelle *burst*-Komponente gehemmt, während die langsamere *burst*-Komponente unbeeinträchtigt blieb. Spätere Studien an chromaffinen Zellen von SNAP-25 *knock-out*-Mäusen zeigten, dass bei Überexpression von SNAP-25 $\Delta 9$ keine Neurotransmitterfreisetzung bei sonst ausreichenden Ca^{2+} -Konzentrationen von 20–30 μM festzustellen ist, höhere Konzentrationen ($> 100\mu\text{M}$) jedoch die Fusion von chromaffinen Granula erlauben [240]. Andere Experimente zeigten in Übereinstimmung damit, dass bei höheren Ca^{2+} -Konzentrationen der Effekt von BoNT/A Intoxikation überwunden werden kann, und zwar auch in anderen Modellsystemen wie hippocampalen Neuronen und der Heldschen Calyx [32, 82, 208, 253]. Die Inter-

pretation dieser Ergebnisse ist kompliziert, da auch beschrieben worden ist, dass Synaptotagmin Ca^{2+} -abhängig mit dieser Region von SNAP-25 im SNARE-Komplex interagiert [82]. Dazu passt, dass im Synaptotagmin-*knock-out* ebenfalls die schnelle *burst*-Komponente der Transmitterfreisetzung aus chromaffinen Granula selektiv beseitigt ist [262]. Diese Ergebnisse werden durch ein Modell, in dem C-terminales *zippering* und Bindung von Ca^{2+} an Synaptotagmin simultan erfolgen, gut erklärt [240], bedingen aber nicht zwangsläufig, dass die SNAREs vor dem Ca^{2+} -Einstrom bereits in partiell assemblierten *trans*-Komplexen vorliegen.

Auch einige andere Experimente mit clostridialen Neurotoxinen lassen sich mit der Existenz von partiell-assemblierten SNARE-Komplexen erklären. Wurden die Botulinumtoxine C1, E und D oder Tetanustoxin über die *patch*-Pipette in chromaffine Zellen dialysiert, war die Fusion von Granula nahezu vollständig inhibiert [273]. Dieses Ergebnis ist nicht zu vereinbaren mit einem irreversibel partiell assemblierten SNARE-Komplex, der die Fusion von Vesikeln aus dem *readily releasable pool* vermittelt, da diese Toxine wahrscheinlich nur monomere SNAREs angreifen können, assemblierte SNAREs jedoch Toxin-resistent sind [93, 176]. Es wurde daher angenommen, dass während der Inkubationszeit mit Toxinen (ca.10 min) alle Vesikel reversibel Zustände der SNARE-Komplexbildung durchlaufen, in denen sie sensitiv gegenüber Proteolyse sind. Dass die verschiedenen *pools* in einem dynamischen Gleichgewicht miteinander stehen, wurde von Voets et al. gezeigt [263]. Alternativ wurde postuliert, dass Neurotoxine SNAREs proteolytisch angreifen können, die nur N-terminal assembliert sind.

In diesem Zusammenhang ist besonders bemerkenswert, dass Intoxikation der neuromuskulären Endplatte von *Procambarus clarkii* mit Tetanustoxin oder BoNT/B, die beide Synaptobrevin an der gleichen Position spalten (Gln76–Phe77), unterschiedliche Effekte hat [104]. Werden die Nerven während der Toxininkubation nicht stimuliert, führt BoNT/B zu einer drastischen Inhibition der Transmitterfreisetzung, während Tetanustoxin keinen Einfluss hat. Die einfachste Interpretation für dieses Phänomen ist, dass SNARE-Komplexe soweit assembliert vorliegen, dass sie zwar noch sensitiv für proteolytischen Abbau durch BoNT/B sind, aber resistent gegenüber Tetanustoxin. In der Tat gibt es eine biochemische Untersuchung, die diese Vermutung unterstützt. Pellizari et al. zeigten, dass für eine effiziente Proteolyse durch Tetanustoxin die Aminosäuren Asp40 und Glu41 essentiell sind, während für die Spaltung durch BoNT/B

nur weiter C-terminal liegende Reste als essentiell identifiziert wurden [184]. In diesem Fall sprechen also sowohl biochemische als auch physiologische Daten für das Vorliegen von partiell assemblierten *trans*-Komplexen.

In Anbetracht der Wichtigkeit der Neurotoxine lohnt sich ein Blick auf die Kristallstruktur von BoNT/A mit der C-terminalen Helix von SNAP-25, um der Frage nachzugehen, ob Toxine auch partiell assemblierte Komplexe spalten können [25]. Die Struktur zeigt, dass das Enzym nicht nur an der Schnittstelle bindet, sondern auch in zwei weiteren Bereichen, sogenannten *exocites*, die N-terminal von der Spaltstelle liegen. Die am weitesten N-terminal gelegene α -*exocite* umfasst einen Bereich, der im SNARE-Komplex die *layer* -5 – -4 bildet. Mutationen in Aminosäuren der α -*exocite* führen zu einer Verminderung der katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_M), Deletion der α -*exocite* zu einer Erhöhung von K_M um den Faktor 55, während k_{cat} unverändert bleibt [25]. Diese Beobachtungen schließen eine proteolytische Spaltung von partiell assemblierten Komplexen zumindest durch BoNT/A nahezu aus, da die Bindungsregion bis fast zum äußersten N-Terminus des SNARE-Motivs reicht. Ob diese Befunde auch auf andere Neurotoxin-SNARE-Paare anwendbar sind, ist unklar und erfordert weitere Untersuchung der Substratbindung durch die Toxine.

Der vielleicht beste Hinweis auf die Existenz von partiell assemblierten Komplexen kommt aus Arbeiten an Complexinen. Complexine binden schnell und mit hoher Affinität an den C-terminalen Bereich des assemblierten SNARE-Komplexes [22, 41, 177, 178]. Bei Deletion der Isoformen 1 und 2 zeigen Neuronen eine stark herabgesetzte Ca^{2+} -Sensitivität, während die Zahl fusionskompetenter Vesikel (*readily releasable pool*) unverändert ist [194]. Diese Beobachtungen führten zu dem Schluss, dass Complexin direkt auf den Ca^{2+} -abhängigen Schritt oder nach ihm wirkt, indem entweder der exozytotische Ca^{2+} -Sensor oder seine Interaktion mit dem SNARE-Komplex reguliert wird. Die Tatsache, dass Complexine nur mit weitgehend assemblierten Komplexen interagieren, ist in Kombination mit dem Phänotyp des *knock-out* ein sehr starker Hinweis auf die Existenz von partiell assemblierten *trans*-Komplexen. Neuere Studien lassen auch einige Vermutungen über den Wirkungsmechanismus von Complexinen zu. So zeigten Bindungsstudien, dass gleichzeitige Interaktion von Synaptotagmin und Complexinen mit dem SNARE-Komplex nicht möglich ist. Vielmehr bindet in Abwesenheit von Ca^{2+} präferentiell Complexin, das durch eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration vom SNARE-Komplex verdrängt wird [53, 251]. Einige Beobachtungen mit Complexinen führten zu der

Vermutung, dass Complexine als *fusion clamp* wirken, die die Assemblierung des SNARE-Komplexes stoppen. Danach wird Complexin durch Ca^{2+} -gebundenes Synaptotagmin vom blockierten SNARE-Komplex verdrängt, was zur Fusion führt [83, 212]. Auch die Erhöhung der Frequenz spontaner Fusionsereignisse bei basalen Ca^{2+} -Konzentrationen in Complexin-Null-Mutanten von *D. melanogaster* wurde als Hinweis für eine Rolle als *clamp* betrachtet [107]. Ein solcher Phänotyp wurde im Maus-*knock-out* allerdings nicht beobachtet [194]. Die Funktion als *fusion-clamp* ist auch ansonsten schwer mit dem Phänotyp des Maus-*knock-out* vereinbar, der eine eher modulatorische Funktion von Complexinen suggeriert, die nicht essentiell für das Funktionieren der Fusionsmaschine ist. Auch die Verschiebung der Ca^{2+} -Sensitivität der Fusionsmaschine scheint mir mit einem *clamp*-Mechanismus unvereinbar zu sein. Die Aufklärung der genauen Wirkungsweise der Complexine bedarf also noch weiterer Forschung. Alle diese Arbeiten bieten nur indirekte Hinweise für die Existenz partiell assemblierter *trans*-Komplexe. Ihr direkter Nachweis durch biochemische Methoden wird durch ihren transienten, metastabilen Charakter erschwert. Ihre Isolierung durch Extraktion aus nativem Material ist wahrscheinlich unmöglich, da alle zur Verfügung stehenden Methoden die Verwendung von Detergens einschließen, wodurch *trans*- in *cis*-Komplexe überführt werden. Trotzdem liegen einige Hinweise aus biophysikalischen Untersuchungen vor, die die Hypothese unterstützen, dass partiell assemblierte SNARE-Komplexe existieren. Während der Wildtyp-Komplex in einem einzigen Übergang thermisch zerfällt, weisen Komplexe mit Mutationen in C-terminalen *layers* einen zweiphasigen thermischen Zerfall auf [240]. Ein SNARE-Komplex, in dem Synaptobrevin N- und C-terminal vom *0-layer* getrennt in zwei Hälften vorliegt, schmilzt ebenso in zwei Phasen. Der C-terminale Teil zerfiel dabei wesentlich früher als der N-terminale, der ebenso wie der Gesamtkomplex erst bei ca. 90°C seine α -helikale Struktur verlor [191]. Diese Befunde zeigen, dass dieselben Mutationen, die die Fusion von chromaffinen Granula inhibieren [240], den C-terminalen Bereich des SNARE-Komplexes destabilisieren und sind daher sehr gute Belege für die direkte Kopplung von *zippering* und Fusion. Sie sind außerdem der erste Hinweis dafür, dass im SNARE-Komplex zwei funktionell trennbare Domänen vorliegen können, und unterstreichen die Möglichkeit, dass partiell assemblierte *trans*-Komplexe existieren könnten.

Zwar existieren also einige Belege dafür, dass die Assemblierung des C-terminalen Abschnittes des SNARE-Komplexes reversibel ist, aber die Assem-

blierung des N-terminalen Bereiches des SNARE-Komplexes scheint irreversibel zu sein [191]. Dies ist besonders interessant wegen der Beobachtung, dass in chromaffinen Zellen keine Neurotoxin-resistenten *pools* existieren [273]. Dies streicht noch einmal heraus, wie wichtig die Frage ist, ob Neurotoxine partiell assemblierte SNARE-Komplexe spalten können.

Es sei an dieser Stelle betont, dass sich die drei vorgeschlagenen Szenarien nicht unbedingt ausschließen. Ca^{2+} -induzierte Exozytose ist ein weitverbreitetes Phänomen. Vergleicht man diesen Prozess in Neuronen und PC12-Zellen, so fällt auf, dass sie auf völlig verschiedenen Zeitskalen ablaufen [150]. Während die Freisetzung des Neurotransmitters aus synaptischen Vesikeln weniger als $100 \mu\text{s}$ auf die Erhöhung der präsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration folgt [206], beträgt die Latenzzeit in chromaffinen Zellen mehrere Millisekunden [49], in PC12-Zellen sogar teilweise mehrere Sekunden [167]. Zenisek et al. zeigten außerdem, dass die langsame Phase der Exozytose weitgehend auf die Fusion von Vesikeln zurückzuführen ist, die zum Zeitpunkt des Ca^{2+} -Signals noch nicht physikalisch mit der Membran verbunden waren (*newcomers*) [279]. Auch andere Untersuchungen zeigen, dass Vesikel kurz vor der Fusion äußerst mobil sind [203]. In diesen Fällen kann es also als sicher gelten, dass Synaptobrevin noch nicht mit den Q-SNAREs interagiert. Meine Arbeit zeigt erstmals eine von SNARE-Proteinen angetriebene Reaktion, die solch schnelle exozytotische Ereignisse erklären kann.

Die Frage nach dem Zustand der SNARE-Maschinerie bei *release-ready* Vesikeln zum Zeitpunkt der Erhöhung der präsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration ist also nicht geklärt, auch wenn Experimente mit Complexinen stark für die Existenz von partiell assemblierten *trans*-Komplexen sprechen. Wie oben ausgeführt, ist die Rekonstitution eines solchen Zustands im liposomalen Fusionsassay nicht gelungen. Auf eine Reaktion, bei der die Initiierung der SNARE-Komplexbildung nicht mehr geschwindigkeitsbestimmend ist, konnte kein Ca^{2+} -abhängiger Effekt von Synaptotagmin festgestellt werden. Dies kann durch den unphysiologischen Charakter des dabei verwendeten ΔN -Komplexes erklärt werden, dessen Assemblierung im C-terminalen Bereich durch die nötige Verdrängung des Synaptobrevin-Fragments behindert ist.

Was verhindert also die vollständige Assemblierung der SNAREs und die Fusion in Abwesenheit von Ca^{2+} ? Eine Möglichkeit ist, dass Eigenschaften der Membran eine solche nur durch SNAREs-vermittelte Fusion verhindern. Die besondere Phospholipidzusammensetzung des synaptischen Vesikels mit einem ho-

hen Anteil an Plasmalogenen könnte zur Stabilisierung von *stalk*-Intermediaten führen. Das nächste Etappenziel auf dem Weg zur Rekonstitution der synaptischen Exozytose muss also ein besseres Verständnis des Ca^{2+} -sensitiven Zustandes der SNARE-Maschinerie sein. Erst wenn dieser Zustand reproduziert werden kann, wird es möglich sein, die Effekte regulatorischer Proteine zu untersuchen und ein kohärentes Bild der neuronalen Exozytose zu erhalten.

Kapitel 5

Summary

Most intracellular membrane fusion events involve the formation of SNARE complexes. These complexes are composed of four parallel α -helices, each of which is provided by conserved sequences, termed SNARE motifs. SNARE proteins are anchored to the membrane via C-terminal transmembrane domains or by lipid-modifications. According to the current model of membrane fusion, SNARE proteins initially form contacts at their N-terminal ends. In a zipper-like fashion, the four helical bundle then forms towards the C-terminus, pulling the two membranes into close apposition and finally overcoming the energy barrier for the merger of the two membranes.

Synaptic vesicle fusion results in the secretion of neurotransmitters, a process essential for inter-neuronal communication. The synaptic SNARE complex is formed by the proteins syntaxin 1 (Qa-SNARE) and SNAP-25 (Qbc-SNARE) that reside on the plasma membrane, and synaptobrevin (R-SNARE) which is enriched on the membrane of synaptic vesicles. Syntaxin 1 and synaptobrevin each provide one SNARE-motif to the complex, whereas SNAP-25 contributes two SNARE motifs.

The release of neurotransmitter from synaptic vesicles is dramatically accelerated by elevation of intracellular calcium. Physiological analysis of mouse and fly mutants has revealed that synaptotagmin 1 acts as the Ca^{2+} sensor in this process. Synaptotagmin 1 is anchored to the synaptic vesicle membrane through its N-terminal transmembrane region. Its two cytoplasmic C2-domains interact with membranes containing acidic phospholipids in a Ca^{2+} -dependent manner. Furthermore it has been shown, that these C2 domains interact with monomeric and heterooligomeric SNAREs both in the absence and presence of calcium. The relative contributions of these two binding modes in the context of synaptic

fusion are controversial.

It was shown before that assembly of purified neuronal SNARE proteins, when reconstituted in artificial phospholipid vesicles, is able to drive membrane fusion, albeit at very low reaction rates [224,265]. A fragment of synaptotagmin 1, encompassing both cytoplasmic C2 domains, accelerates this reaction in a Ca^{2+} -dependent manner by a factor of approximately two [255]. Several aspects of the observed acceleration of liposome fusion by the C2AB fragment, however, are difficult to reconcile with the established features of neurotransmitter release. First, the observed fusion rates are still orders of magnitude slower than synaptic exocytosis. Second, only Ca^{2+} -dependent acceleration by the C2AB fragment of synaptotagmin 1 has been observed, whereas the full-length reconstituted protein accelerates liposome fusion in the absence of Ca^{2+} [143].

In an effort to shed light on the mechanism of Ca^{2+} -dependent exocytosis, I investigated the SNARE mediated fusion of liposomes and the effect of synaptotagmin on it in greater detail. Neuronal SNARE proteins purified from *E. coli* were reconstituted in liposomes, and after a thorough characterization in terms of size distribution and protein incorporation, the fusion between them was shown to strictly depend on the formation of the 4-helical SNARE bundle. Analysis of the reactivity of different Q-SNAREs in binding to synaptobrevin and driving fusion, revealed that fusion rates are dictated by the availability of a Qabc acceptor complex. Under normal conditions this binding site is blocked and fusion is therefore largely retarded. Stabilization of the acceptor complex and its reconstitution in liposomes resulted in an acceleration of liposome fusion by more than an order of magnitude.

Next, I investigated the influence of the synaptotagmin 1 on liposome fusion. Testing systematically its lipid- and SNARE-binding properties it turned out that the acceleration by the C2AB fragment is readily explained by a Ca^{2+} -dependent recruitment of the fragment to the synaptobrevin-membrane and a Ca^{2+} -independent interaction with the neuronal Q-SNAREs. Furthermore, using synaptotagmin-mutants which had been previously examined by electrophysiology, it was found that several important properties of synaptotagmin are not reproduced in the liposome fusion system.

Reconstitution of full-length synaptotagmin with synaptobrevin circumvented the non-physiological recruitment reaction and led to an acceleration in the absence of Ca^{2+} due to an interaction with the neuronal Q-SNAREs. Ca^{2+} -dependent binding of synaptotagmin to its own membrane impedes the acti-

vation. Preventing this *cis*-interaction allows Ca^{2+} to trigger synaptotagmin binding to the opposing membrane (*trans*), accelerating fusion. However, when an activated SNARE acceptor complex was used, synaptotagmin had no effect on fusion kinetics, suggesting that it operates upstream of SNARE assembly in this system.

These results show that SNAREs when present in an activated state are able to drive membrane fusion on a biologically meaningful time scale. Furthermore, they resolve major discrepancies concerning the effects of full-length synaptotagmin and its C2AB fragment on liposome fusion, but also show that the action of synaptotagmin on the fusion-arrested state of docked vesicles *in vivo* is not fully mimicked *in vitro*. For the future it will be crucial to understand the molecular structure of the late-arrested state of a docked and primed vesicle, particularly with respect to the state of SNARE assembly.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Die Bildung von SNARE-Komplexen ist ein Charakteristikum der meisten intrazellulären Fusionsreaktionen. SNARE-Komplexe bestehen aus vier parallelen α -Helices, die durch konservierte Sequenzen gebildet werden, die SNARE-Motive. SNARE-Proteine sind über C-terminale Transmembransegmente oder Lipidmodifikationen in der Membran verankert. Nach der *zipper*-Modell wird die Interaktion zwischen SNARE-Proteinen, die in gegenüberliegenden Membranen sitzen, an deren N-Termini initiiert und schreitet dann C-terminal in Richtung der Transmembrananker fort. Die dabei freiwerdende Konformationsenergie wird zur Überwindung der Energiebarriere bei der Fusion benutzt.

Die Freisetzung von Neurotransmittermolekülen bei der Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Plasmamembran ist ein essentieller Vorgang für die Kommunikation zwischen Nervenzellen. Der daran beteiligte synaptische SNARE-Komplex besteht aus den Proteinen Syntaxin 1 (Qa-SNARE) und SNAP-25 (Qbc-SNARE), die in der Plasmamembran sitzen, und Synaptobrevin (R-SNARE), das in der Membran von synaptischen Vesikeln angereichert ist. Die SNARE-Motive von Syntaxin und Synaptobrevin bilden jeweils eine Helix im neuronalen SNARE-Komplex, während SNAP-25 zwei Helices beisteuert.

Die Erhöhung der präsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration beschleunigt die Freisetzung von Neurotransmitter aus synaptischen Vesikeln dramatisch. Physiologische Untersuchung an Maus- und Drosophilamutanten zeigten, dass das Synaptotagmin 1 als Ca^{2+} -Sensor in diesem Prozess wirkt. Synaptotagmin 1 ist in der Membran des synaptischen Vesikels durch eine N-terminale Transmembranregion verankert, seine zwei cytoplasmatischen C2 Domänen interagieren Ca^{2+} -abhängig mit Membranen, die anionische Phospholipide enthalten. Daneben ist die Bindung von Synaptotagmin an monomere und heterooligomere

SNAREs in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} beschrieben, wobei unklar ist, welche dieser Interaktionen physiologisch relevant sind.

Einige Arbeiten haben versucht, die Abläufe bei der synaptischen Membranfusion in einem rekonstituierten System zu rekapitulieren. Wenn gereinigte SNARE-Proteine in künstliche Phospholipidvesikel rekonstituiert werden, treibt die Bildung von SNARE Komplexen die Fusion dieser Liposomen an. Die beobachteten Reaktionsraten sind jedoch ausgesprochen langsam [224, 265]. Weiterhin wurde gezeigt, dass ein cytoplasmatisches Fragment von Synaptotagmin 1, das beide C2-Domänen umfasst, die Fusion von Liposomen Ca^{2+} -abhängig um etwa den Faktor zwei beschleunigt [255]. Einige Aspekte dieser Beschleunigung sind jedoch schwer mit den bekannten Merkmalen der Ca^{2+} -abhängigen Exozytose in Einklang zu bringen. Erstens bleiben die Fusionsraten auch in Gegenwart des C2AB-Fragments und Ca^{2+} um mehrere Größenordnungen hinter jenen zurück, die in Neuronen oder neuroendokrinen Zellen beobachtet werden. Außerdem wurde nur eine Beschleunigung durch das C2AB-Fragment von Synaptotagmin beschrieben, während die Korekonstitution des gesamten Proteins mit Synaptobrevin zu einer Beschleunigung in Abwesenheit von Ca^{2+} führt [143].

Um zu einem tieferen Verständnis der neuronalen Exozytose beizutragen, wurde in dieser Arbeit die SNARE-vermittelte Fusion von Liposomen und der Einfluss von Synaptotagmin auf sie im Detail untersucht. Dazu wurden die neuronalen SNARE-Proteine aus *E. coli* gereinigt und in Liposomen rekonstituiert. Nach einer sorgfältigen Charakterisierung der Liposomen wurde gezeigt, dass die Fusion von Liposomen strikt von der Formierung des ternären SNARE-Komplexes abhängig ist. Eine Analyse der Reaktivität verschiedener Q-SNARE-Komplexe und der von ihnen angetriebenen Fusionsreaktionen ergab, dass die Fusionsraten von der Verfügbarkeit eines Qabc-Akzeptorkomplexes als der Bindungsstelle für Synaptobrevin bestimmt werden. Unter normalen Bedingungen ist diese Bindungsstelle blockiert und die Fusion läuft folglich langsam ab. Eine Stabilisierung des Akzeptorkomplexes resultierte in einer dramatischen Beschleunigung der Fusion um mehr als eine Größenordnung.

Als nächstes wurde der Effekt von Synaptotagmin auf die Liposomenfusion untersucht. Eine systematische Analyse der Lipid- und SNARE-Bindung zeigte, dass die Beschleunigung der Reaktion durch das C2AB-Fragment auf eine Ca^{2+} -abhängige Rekrutierung an die Synaptobrevin-Membran und eine Ca^{2+} -unabhängige Interaktion mit den Q-SNAREs zurückzuführen ist. Die Verwendung von Synaptotagmin-Mutanten, die in elektrophysiologischen Studien unter-

sucht worden sind, zeigte weiterhin, dass einige zentrale Eigenschaften Synaptotagmins in der SNARE-vermittelten Fusion von Liposomen nicht reproduziert werden.

Bei Rekonstitution von Synaptotagmin mit Synaptobrevin wird die unphysiologische Rekrutierungsreaktion umgangen. In diesem Fall wurde eine Beschleunigung der Fusion in Abwesenheit von Ca^{2+} beobachtet, die auf einer Ca^{2+} -unabhängige Bindung an die neuronalen Q-SNAREs beruht. In Gegenwart von Ca^{2+} wurde hingegen eine Inhibition dieser Reaktion beobachtet, die mit einer Interaktion Synaptotagmins mit der eigenen Membran erklärt wurde (*cis*-Interaktion). Wurde diese Interaktion verhindert, beschleunigte eine Ca^{2+} -abhängige Bindung Synaptotagmins an Phospholipide in der Q-SNARE-Membran (*trans*-Interaktion) die Reaktion. Die Verwendung des stabilisierten Qabc-Akzeptorkomplexes offenbarte, dass weder das C2AB Fragment noch korekonstituiertes Synaptotagmin eine Reaktion beschleunigen, in der die Initiierung der SNARE-Interaktion nicht geschwindigkeitsbestimmend ist. Dies zeigt, dass Synaptotagmin zumindest in diesem System vor der SNARE-Interaktion wirkt bzw. diese stimuliert.

Meine Arbeit zeigt, dass die Assemblierung von SNARE-Proteinen Membranen in einem biologisch sinnvollen Zeitrahmen fusionieren kann. Zuvor widersprüchliche Ergebnisse zum C2AB-Fragment von Synaptotagmin und dem gesamten Protein werden miteinander in Einklang gebracht. Diese Untersuchung zeigt jedoch auch, dass die Wirkung von Synaptotagmin auf die synaptische Fusionsmaschinerie bisher nicht *in vitro* rekapituliert worden ist. Für ein vollständiges Verständnis dieses Vorgangs ist es wichtig, die molekulare Struktur des SNARE-Komplexes vor dem Calcium-Stimulus näher zu untersuchen.

Literaturverzeichnis

- [1] AGARWAL, R. ; ESWARAMOORTHY, S. ; KUMARAN, D. ; BINZ, T. ; SWAMINATHAN, S.: Structural analysis of botulinum neurotoxin type E catalytic domain and its mutant Glu212 → Gln reveals the pivotal role of the Glu212 carboxylate in the catalytic pathway. In: *Biochemistry* 43 (2004), S. 6637–6644
- [2] ALMERS, W. ; TSE, F. W.: Transmitter release from synapses: does a preassembled fusion pore initiate exocytosis? In: *Neuron* 4 (1990), S. 813–8
- [3] AN, S. J. ; ALMERS, W.: Tracking SNARE complex formation in live endocrine cells. In: *Science* 306 (2004), S. 1042–6
- [4] ANTONIN, W.: *Identifizierung eines endosomalen SNARE-Komplexes*, Universität Hannover, Diss., 2001
- [5] ANTONIN, W. ; DULUBOVA, I. ; ARAC, D. ; PABST, S. ; PLITZNER, J. ; RIZO, J. ; JAHN, R.: The N-terminal domains of syntaxin 7 and vti1b form three-helix bundles that differ in their ability to regulate SNARE complex assembly. In: *J Biol Chem* 277 (2002), S. 36449–56
- [6] ANTONIN, W. ; FASSHAUER, D. ; BECKER, S. ; JAHN, R. ; SCHNEIDER, T. R.: Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. In: *Nat Struct Biol* 9 (2002), S. 107–11
- [7] ANTONIN, W. ; HOLROYD, C. ; FASSHAUER, D. ; PABST, S. ; VON MOLLARD, G. F. ; JAHN, R.: A SNARE complex mediating fusion of late endosomes defines conserved properties of SNARE structure and function. In: *Embo J* 19 (2000), S. 6453–64
- [8] ANTONIN, W. ; HOLROYD, C. ; TIKKANEN, R. ; HONING, S. ; JAHN, R.: The R-SNARE endobrevin/VAMP-8 mediates homotypic fusion of early endosomes and late endosomes. In: *Mol Biol Cell* 11 (2000), S. 3289–98
- [9] ARAC, D. ; CHEN, X. ; KHANT, H. A. ; UBACH, J. ; LUDTKE, S. J. ; KIKAWA, M. ; JOHNSON, A. E. ; CHIU, W. ; SUDHOF, T. C. ; RIZO, J.: Close membrane-membrane proximity induced by Ca²⁺-dependent multivalent binding of synaptotagmin-1 to phospholipids. In: *Nat Struct Mol Biol* 13 (2006), S. 209–17

- [10] AVERY, J. ; ELLIS, D. J. ; LANG, T. ; HOLROYD, P. ; RIEDEL, D. ; HENDERSON, R. M. ; EDWARDSON, J. M. ; JAHN, R.: A cell-free system for regulated exocytosis in PC12 cells. In: *J Cell Biol* 148 (2000), S. 317–24
- [11] BAI, J. ; EARLES, C. A. ; LEWIS, J. L. ; CHAPMAN, E. R.: Membrane-embedded synaptotagmin penetrates cis or trans target membranes and clusters via a novel mechanism. In: *J Biol Chem* 275 (2000), S. 25427–35.
- [12] BAI, J. ; TUCKER, W. C. ; CHAPMAN, E. R.: PIP2 increases the speed of response of synaptotagmin and steers its membrane-penetration activity toward the plasma membrane. In: *Nat Struct Mol Biol* 11 (2004), S. 36–44
- [13] BAI, J. ; WANG, P. ; CHAPMAN, E. R.: C2A activates a cryptic Ca(2+)-triggered membrane penetration activity within the C2B domain of synaptotagmin I. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), S. 1665–70.
- [14] BAYER, M. J. ; REESE, C. ; BUHLER, S. ; PETERS, C. ; MAYER, A.: Vacuole membrane fusion: V0 functions after trans-SNARE pairing and is coupled to the Ca2+-releasing channel. In: *J Cell Biol* 162 (2003), S. 211–22
- [15] BENNETT, M. K. ; CALAKOS, N. ; SCHELLER, R. H.: Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. In: *Science* 257 (1992), S. 255–9
- [16] BETHANI, I. ; LANG, T. ; GEUMANN, U. ; SIEBER, J. J. ; JAHN, R. ; RIZZOLI, S. O.: The specificity of SNARE pairing in biological membranes is mediated by both proof-reading and spatial segregation. In: *Embo J* 26 (2007), S. 3981–92
- [17] BHALLA, A. ; CHICKA, M. C. ; TUCKER, W. C. ; CHAPMAN, E. R.: Ca(2+)-synaptotagmin directly regulates t-SNARE function during reconstituted membrane fusion. In: *Nat Struct Mol Biol* 13 (2006), S. 323–30
- [18] BHALLA, A. ; TUCKER, W. C. ; CHAPMAN, E. R.: Synaptotagmin isoforms couple distinct ranges of Ca2+, Ba2+, and Sr2+ concentration to SNARE-mediated membrane fusion. In: *Mol Biol Cell* 16 (2005), S. 4755–64
- [19] BLASI, J. ; CHAPMAN, E. R. ; LINK, E. ; BINZ, T. ; YAMASAKI, S. ; DE CAMILLI, P. ; SUDHOF, T. C. ; NIEMANN, H. ; JAHN, R.: Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. In: *Nature* 365 (1993), S. 160–3
- [20] BLASI, J. ; CHAPMAN, E. R. ; YAMASAKI, S. ; BINZ, T. ; NIEMANN, H. ; JAHN, R.: Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. In: *Embo J* 12 (1993), S. 4821–8
- [21] BORISOVSKA, M. ; ZHAO, Y. ; TSYTSYURA, Y. ; GLYVUK, N. ; TAKAMORI, S. ; MATTI, U. ; RETTIG, J. ; SUDHOF, T. ; BRUNS, D.: v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion. In: *Embo J* 24 (2005), S. 2114–26

- [22] BRACHER, A. ; KADLEC, J. ; BETZ, H. ; WEISSENHORN, W.: X-ray structure of a neuronal complexin-SNARE complex from squid. In: *J Biol Chem* 277 (2002), S. 26517–23
- [23] BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal Biochem* 72 (1976), S. 248–54
- [24] BRANDHORST, D. ; ZWILLING, D. ; RIZZOLI, S. O. ; LIPPERT, U. ; LANG, T. ; JAHN, R.: Homotypic fusion of early endosomes: SNAREs do not determine fusion specificity. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006), S. 2701–6
- [25] BREIDENBACH, M. A. ; BRUNGER, A. T.: Substrate recognition strategy for botulinum neurotoxin serotype A. In: *Nature* 432 (2004), S. 925–9
- [26] BREIDENBACH, M. A. ; BRUNGER, A. T.: 2.3 angstrom crystal structure of tetanus neurotoxin light chain. In: *Biochemistry* 44 (2005), S. 7450–7457
- [27] BREIDENBACH, M. A. ; BRUNGER, A. T.: New insights into clostridial neurotoxin-SNARE interactions. In: *Trends in Molecular Medicine* 11 (2005), S. 377–381
- [28] BROADIE, K. ; PROKOP, A. ; BELLEN, H. J. ; O’KANE, C. J. ; SCHULZE, K. L. ; SWEENEY, S. T.: Syntaxin and synaptobrevin function downstream of vesicle docking in *Drosophila*. In: *Neuron* 15 (1995), S. 663–73
- [29] BROSE, N. ; PETRENKO, A. G. ; SUDHOF, T. C. ; JAHN, R.: Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. In: *Science* 256 (1992), S. 1021–5
- [30] BRYANT, N. J. ; JAMES, D. E.: Vps45p stabilizes the syntaxin homologue Tlg2p and positively regulates SNARE complex formation. In: *Embo Journal* 20 (2001), S. 3380–3388
- [31] CAO, X. ; BALLEW, N. ; BARLOWE, C.: Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. In: *Embo J* 17 (1998), S. 2156–65
- [32] CAPOGNA, M. ; MCKINNEY, R. A. ; O’CONNOR, V. ; GAHWILER, B. H. ; THOMPSON, S. M.: Ca²⁺ or Sr²⁺ partially rescues synaptic transmission in hippocampal cultures treated with botulinum toxin A and C, but not tetanus toxin. In: *J Neurosci* 17 (1997), S. 7190–202
- [33] CARR, C. M. ; GROTE, E. ; MUNSON, M. ; HUGHSON, F. M. ; NOVICK, P. J.: Sec1p binds to SNARE complexes and concentrates at sites of secretion. In: *Journal of Cell Biology* 146 (1999), S. 333–344
- [34] CHAN, David C.: Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development. In: *Cell* 125 (2006), S. 1241–1252

- [35] CHANTURIYA, A. ; CHERNOMORDIK, L. V. ; ZIMMERBERG, J.: Flickering fusion pores comparable with initial exocytotic pores occur in protein-free phospholipid bilayers. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), S. 14423–8
- [36] CHAPMAN, E. R.: Synaptotagmin: a Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis? In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (2002), S. 498–508.
- [37] CHAPMAN, E. R. ; AN, S. ; EDWARDSON, J. M. ; JAHN, R.: A novel function for the second C2 domain of synaptotagmin. Ca²⁺-triggered dimerization. In: *J Biol Chem* 271 (1996), S. 5844–9
- [38] CHAPMAN, E. R. ; DAVIS, A. F.: Direct interaction of a Ca²⁺-binding loop of synaptotagmin with lipid bilayers. In: *J Biol Chem* 273 (1998), S. 13995–4001
- [39] CHAPMAN, E. R. ; HANSON, P. I. ; AN, S. ; JAHN, R.: Ca²⁺ regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1. In: *J Biol Chem* 270 (1995), S. 23667–71
- [40] CHEN, X. ; ARAC, D. ; WANG, T. M. ; GILPIN, C. J. ; ZIMMERBERG, J. ; RIZO, J.: SNARE-mediated lipid mixing depends on the physical state of the vesicles. In: *Biophys J* 90 (2006), S. 2062–74
- [41] CHEN, X. ; TOMCHICK, D. R. ; KOVRIGIN, E. ; ARAC, D. ; MACHIUS, M. ; SUDHOF, T. C. ; RIZO, J.: Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex. In: *Neuron* 33 (2002), S. 397–409
- [42] CHEN, Y. A. ; SCALES, S. J. ; PATEL, S. M. ; DOUNG, Y. C. ; SCHELLER, R. H.: SNARE complex formation is triggered by Ca²⁺ and drives membrane fusion. In: *Cell* 97 (1999), S. 165–74
- [43] CHEN, Y. A. ; SCALES, S. J. ; SCHELLER, R. H.: Sequential SNARE assembly underlies priming and triggering of exocytosis. In: *Neuron* 30 (2001), S. 161–70
- [44] CHENG, Y. ; SEQUEIRA, S. M. ; MALININA, L. ; TERESHKO, V. ; SOLLNER, T. H. ; PATEL, D. J.: Crystallographic identification of Ca²⁺ and Sr²⁺ coordination sites in synaptotagmin I C2B domain. In: *Protein Sci* 13 (2004), S. 2665–72
- [45] CHERNOMORDIK, L. V. ; KOZLOV, M. M.: Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. In: *Annu Rev Biochem* 72 (2003), S. 175–207
- [46] CHERNOMORDIK, L. V. ; KOZLOV, M. M.: Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps. In: *Cell* 123 (2005), S. 375–82
- [47] CHERNOMORDIK, L. V. ; MELIKYAN, G. B. ; CHIZMADZHEV, Y. A.: Biomembrane fusion: a new concept derived from model studies using two interacting planar lipid bilayers. In: *Biochim Biophys Acta* 906 (1987), S. 309–52
- [48] CHO, W. ; STAHELIN, R. V.: Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains. In: *Biochim Biophys Acta* 1761 (2006), S. 838–49

- [49] CHOW, R. H. ; RUDEN, L. von ; NEHER, E.: Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. In: *Nature* 356 (1992), S. 60–3
- [50] COLLINS, K. M. ; THORNGREN, N. L. ; FRATTI, R. A. ; WICKNER, W. T.: Sec17p and HOPS, in distinct SNARE complexes, mediate SNARE complex disruption or assembly for fusion. In: *Embo Journal* 24 (2005), S. 1775–1786
- [51] COUSSENS, L. ; PARKER, P. J. ; RHEE, L. ; YANG-FENG, T. L. ; CHEN, E. ; WATERFIELD, M. D. ; FRANCKE, U. ; ULLRICH, A.: Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. In: *Science* 233 (1986), S. 859–66
- [52] CRAXTON, M.: Synaptotagmin gene content of the sequenced genomes. In: *BMC Genomics* 5 (2004), S. 43
- [53] DAI, H. ; SHEN, N. ; ARAC, D. ; RIZO, J.: A quaternary SNARE-synaptotagmin-Ca²⁺-phospholipid complex in neurotransmitter release. In: *J Mol Biol* 367 (2007), S. 848–63
- [54] DAVIS, A. F. ; BAI, J. ; FASSHAUER, D. ; WOLOWICK, M. J. ; LEWIS, J. L. ; CHAPMAN, E. R.: Kinetics of synaptotagmin responses to Ca²⁺ and assembly with the core SNARE complex onto membranes. In: *Neuron* 24 (1999), S. 363–76
- [55] DEAK, F. ; SHIN, O. H. ; KAVALALI, E. T. ; SUDHOF, T. C.: Structural determinants of synaptobrevin 2 function in synaptic vesicle fusion. In: *J Neurosci* 26 (2006), S. 6668–76
- [56] DEITCHER, D. L. ; UEDA, A. ; STEWART, B. A. ; BURGESS, R. W. ; KIDOKORO, Y. ; SCHWARZ, T. L.: Distinct requirements for evoked and spontaneous release of neurotransmitter are revealed by mutations in the *Drosophila* gene neuronal-synaptobrevin. In: *J Neurosci* 18 (1998), S. 2028–39
- [57] DENNISON, S. M. ; BOWEN, M. E. ; BRUNGER, A. T. ; LENTZ, B. R.: Neuronal SNAREs do not trigger fusion between synthetic membranes but do promote PEG-mediated membrane fusion. In: *Biophysical Journal* 90 (2006), S. 1661–1675
- [58] DI PAOLO, G. ; DE CAMILLI, P.: Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. In: *Nature* 443 (2006), S. 651–7
- [59] DUCHEN, L. W.: The effects of tetanus toxin on the motor end-plates of the mouse. An electron microscopic study. In: *J Neurol Sci* 19 (1973), S. 153–67
- [60] DULUBOVA, I. ; SUGITA, S. ; HILL, S. ; HOSAKA, M. ; FERNANDEZ, I. ; SUDHOF, T. C. ; RIZO, J.: A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. In: *Embo J* 18 (1999), S. 4372–82

- [61] DULUBOVA, I. ; YAMAGUCHI, T. ; GAO, Y. ; MIN, S. W. ; HURYEVA, I. ; SUDHOF, T. C. ; RIZO, J.: How Tlg2p/syntaxin 16 'snares' Vps45. In: *Embo J* 21 (2002), S. 3620–31
- [62] DULUBOVA, I. ; YAMAGUCHI, T. ; WANG, Y. ; SUDHOF, T. C. ; RIZO, J.: Vam3p structure reveals conserved and divergent properties of syntaxins. In: *Nat Struct Biol* 8 (2001), S. 258–64
- [63] EARLES, C. A. ; BAI, J. ; WANG, P. ; CHAPMAN, E. R.: The tandem C2 domains of synaptotagmin contain redundant Ca²⁺ binding sites that cooperate to engage t-SNAREs and trigger exocytosis. In: *J Cell Biol* 154 (2001), S. 1117–23
- [64] EDELHOCH, H.: Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. In: *Biochemistry* 6 (1967), S. 1948–54
- [65] FASSHAUER, D.: Structural insights into the SNARE mechanism. In: *Biochim Biophys Acta* 1641 (2003), S. 87–97
- [66] FASSHAUER, D. ; ANTONIN, W. ; MARGITTAI, M. ; PABST, S. ; JAHN, R.: Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties. In: *J Biol Chem* 274 (1999), S. 15440–6
- [67] FASSHAUER, D. ; ANTONIN, W. ; SUBRAMANIAM, V. ; JAHN, R.: SNARE assembly and disassembly exhibit a pronounced hysteresis. In: *Nat Struct Biol* 9 (2002), S. 144–51
- [68] FASSHAUER, D. ; BRUNS, D. ; SHEN, B. ; JAHN, R. ; BRUNGER, A. T.: A structural change occurs upon binding of syntaxin to SNAP-25. In: *J Biol Chem* 272 (1997), S. 4582–90
- [69] FASSHAUER, D. ; ELIASON, W. K. ; BRUNGER, A. T. ; JAHN, R.: Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly. In: *Biochemistry* 37 (1998), S. 10354–62
- [70] FASSHAUER, D. ; MARGITTAI, M.: A transient N-terminal interaction of SNAP-25 and syntaxin nucleates SNARE assembly. In: *J Biol Chem* 279 (2004), S. 7613–21
- [71] FASSHAUER, D. ; OTTO, H. ; ELIASON, W. K. ; JAHN, R. ; BRUNGER, A. T.: Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. In: *J Biol Chem* 272 (1997), S. 28036–41
- [72] FASSHAUER, D. ; SUTTON, R. B. ; BRUNGER, A. T. ; JAHN, R.: Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), S. 15781–6

- [73] FERNANDEZ, I. ; ARAC, D. ; UBACH, J. ; GERBER, S. H. ; SHIN, O. ; GAO, Y. ; ANDERSON, R. G. ; SUDHOF, T. C. ; RIZO, J.: Three-dimensional structure of the synaptotagmin 1 C2B-domain: synaptotagmin 1 as a phospholipid binding machine. In: *Neuron* 32 (2001), S. 1057–69
- [74] FERNANDEZ, I. ; UBACH, J. ; DULUBOVA, I. ; ZHANG, X. ; SUDHOF, T. C. ; RIZO, J.: Three-dimensional structure of an evolutionarily conserved N-terminal domain of syntaxin 1A. In: *Cell* 94 (1998), S. 841–9
- [75] FERNANDEZ-CHACON, R. ; KONIGSTORFER, A. ; GERBER, S. H. ; GARCIA, J. ; MATOS, M. F. ; STEVENS, C. F. ; BROSE, N. ; RIZO, J. ; ROSENMUND, C. ; SUDHOF, T. C.: Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. In: *Nature* 410 (2001), S. 41–9.
- [76] FERNANDEZ-CHACON, R. ; SHIN, O. H. ; KONIGSTORFER, A. ; MATOS, M. F. ; MEYER, A. C. ; GARCIA, J. ; GERBER, S. H. ; RIZO, J. ; SUDHOF, T. C. ; ROSENMUND, C.: Structure/function analysis of Ca²⁺ binding to the C2A domain of synaptotagmin 1. In: *J Neurosci* 22 (2002), S. 8438–46
- [77] FIEBIG, K. M. ; RICE, L. M. ; POLLOCK, E. ; BRUNGER, A. T.: Folding intermediates of SNARE complex assembly. In: *Nat Struct Biol* 6 (1999), S. 117–23
- [78] FORAN, P. ; LAWRENCE, G. W. ; SHONE, C. C. ; FOSTER, K. A. ; DOLLY, J. O.: Botulinum neurotoxin C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release. In: *Biochemistry* 35 (1996), S. 2630–6
- [79] FRAZIER, A. A. ; ROLLER, C. R. ; HAVELKA, J. J. ; HINDERLITER, A. ; CAFISO, D. S.: Membrane-bound orientation and position of the synaptotagmin I C2A domain by site-directed spin labeling. In: *Biochemistry* 42 (2003), S. 96–105
- [80] GALLWITZ, D. ; JAHN, R.: The riddle of the Sec1/Munc-18 proteins - new twists added to their interactions with SNAREs. In: *Trends Biochem Sci* 28 (2003), S. 113–6
- [81] GEPPERT, M. ; GODA, Y. ; HAMMER, R. E. ; LI, C. ; ROSAHL, T. W. ; STEVENS, C. F. ; SUDHOF, T. C.: Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. In: *Cell* 79 (1994), S. 717–27
- [82] GERONA, R. R. ; LARSEN, E. C. ; KOWALCHYK, J. A. ; MARTIN, T. F.: The C terminus of SNAP25 is essential for Ca(2+)-dependent binding of synaptotagmin to SNARE complexes. In: *J Biol Chem* 275 (2000), S. 6328–36
- [83] GIRAUDO, C. G. ; ENG, W. S. ; MELIA, T. J. ; ROTHMAN, J. E.: A clamping mechanism involved in SNARE-dependent exocytosis. In: *Science* 313 (2006), S. 676–80

- [84] GODA, Y. ; STEVENS, C. F.: Two Components of Transmitter Release at a Central Synapse. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (1994), S. 12942–12946
- [85] GOETZ, R. ; GOMPPER, G. ; LIPOWSKY, R.: Mobility and elasticity of self-assembled membranes. In: *Physical Review Letters* 82 (1999), S. 221–224
- [86] GROTE, E. ; BABA, M. ; OHSUMI, Y. ; NOVICK, P. J.: Geranylgeranylated SNAREs are dominant inhibitors of membrane fusion. In: *J Cell Biol* 151 (2000), S. 453–66
- [87] HAN, X. ; WANG, C. T. ; BAI, J. ; CHAPMAN, E. R. ; JACKSON, M. B.: Transmembrane segments of syntaxin line the fusion pore of Ca²⁺-triggered exocytosis. In: *Science* 304 (2004), S. 289–92
- [88] HANSON, P. I. ; HEUSER, J. E. ; JAHN, R.: Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. In: *Curr Opin Neurobiol* 7 (1997), S. 310–5
- [89] HANSON, P. I. ; ROTH, R. ; MORISAKI, H. ; JAHN, R. ; HEUSER, J. E.: Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. In: *Cell* 90 (1997), S. 523–35
- [90] HANSON, P. I. ; WHITEHEART, S. W.: AAA+ proteins: Have engine, will work. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (2005), S. 519–529
- [91] HARRISON, S. D. ; BROADIE, K. ; VANDEGOOR, J. ; RUBIN, G. M.: Mutations in the Drosophila Rop Gene Suggest a Function in General Secretion and Synaptic Transmission. In: *Neuron* 13 (1994), S. 555–566
- [92] HATA, Y. ; SLAUGHTER, C. A. ; SUDHOF, T. C.: Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. In: *Nature* 366 (1993), S. 347–51
- [93] HAYASHI, T. ; MCMAHON, H. ; YAMASAKI, S. ; BINZ, T. ; HATA, Y. ; SUDHOF, T. C. ; NIEMANN, H.: Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. In: *Embo J* 13 (1994), S. 5051–61
- [94] HAZZARD, J. ; SUDHOF, T. C. ; RIZO, J.: NMR analysis of the structure of synaptobrevin and of its interaction with syntaxin. In: *J Biomol NMR* 14 (1999), S. 203–7
- [95] HELL, J. W. ; EDELMANN, L. ; HARTINGER, J. ; JAHN, R.: Functional reconstitution of the gamma-aminobutyric acid transporter from synaptic vesicles using artificial ion gradients. In: *Biochemistry* 30 (1991), S. 11795–800
- [96] HERRICK, D. Z. ; STERBLING, S. ; RASCH, K. A. ; HINDERLITER, A. ; CAFISO, D. S.: Position of synaptotagmin I at the membrane interface: cooperative interactions of tandem C2 domains. In: *Biochemistry* 45 (2006), S. 9668–74

- [97] HESS, D. T. ; SLATER, T. M. ; WILSON, M. C. ; SKENE, J. H.: The 25 kDa synaptosomal-associated protein SNAP-25 is the major methionine-rich polypeptide in rapid axonal transport and a major substrate for palmitoylation in adult CNS. In: *J Neurosci* 12 (1992), S. 4634–41
- [98] HEUSER, J. E. ; REESE, T. S.: Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. In: *J Cell Biol* 57 (1973), S. 315–44
- [99] HEUSER, J. E. ; REESE, T. S.: Structural changes after transmitter release at the frog neuromuscular junction. In: *J Cell Biol* 88 (1981), S. 564–80
- [100] HOCHULI, E. ; BANNWARTH, W. ; DOBELI, H. ; GENTZ, R. ; STUBER, D.: Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent. In: *Nat Biotech* 6 (1988), S. 1321–1325
- [101] HOLZ, R. W. ; HLUBEK, M. D. ; SORENSEN, S. D. ; FISHER, S. K. ; BALLA, T. ; OZAKI, S. ; PRESTWICH, G. D. ; STUENKEL, E. L. ; BITTNER, M. A.: A pleckstrin homology domain specific for phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PtdIns-4,5-P₂) and fused to green fluorescent protein identifies plasma membrane PtdIns-4,5-P₂ as being important in exocytosis. In: *J Biol Chem* 275 (2000), S. 17878–85
- [102] HOSONO, R. ; HEKIMI, S. ; KAMIYA, Y. ; SASSA, T. ; MURAKAMI, S. ; NISHIWAKI, K. ; MIWA, J. ; TAKETO, A. ; KODAIRA, K. I.: The Unc-18 Gene Encodes a Novel Protein Affecting the Kinetics of Acetylcholine Metabolism in the Nematode *Caenorhabditis-Elegans*. In: *Journal of Neurochemistry* 58 (1992), S. 1517–1525
- [103] HU, K. ; CARROLL, J. ; FEDOROVICH, S. ; RICKMAN, C. ; SUKHODUB, A. ; DAVLETOV, B.: Vesicular restriction of synaptobrevin suggests a role for calcium in membrane fusion. In: *Nature* 415 (2002), S. 646–50.
- [104] HUA, S. Y. ; CHARLTON, M. P.: Activity-dependent changes in partial VAMP complexes during neurotransmitter release. In: *Nat Neurosci* 2 (1999), S. 1078–83
- [105] HUI, E. ; BAI, J. ; CHAPMAN, E. R.: Ca²⁺-triggered simultaneous membrane penetration of the tandem C2-domains of synaptotagmin I. In: *Biophys J* 91 (2006), S. 1767–77
- [106] HUNT, J. M. ; BOMMERT, K. ; CHARLTON, M. P. ; KISTNER, A. ; HABERMANN, E. ; AUGUSTINE, G. J. ; BETZ, H.: A post-docking role for synaptobrevin in synaptic vesicle fusion. In: *Neuron* 12 (1994), S. 1269–79
- [107] HUNTWORK, S. ; LITTLETON, J. T.: A complexin fusion clamp regulates spontaneous neurotransmitter release and synaptic growth. In: *Nat Neurosci* 10 (2007), S. 1235–7
- [108] JACKSON, M. B. ; CHAPMAN, E. R.: Fusion pores and fusion machines in Ca²⁺-triggered exocytosis. In: *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35 (2006), S. 135–60

- [109] JAHN, R. ; GRUBMULLER, H.: Membrane fusion. In: *Curr Opin Cell Biol* 14 (2002), S. 488–95
- [110] JAHN, R. ; LANG, T. ; SUDHOF, T. C.: Membrane fusion. In: *Cell* 112 (2003), S. 519–33
- [111] JAHN, R. ; SCHELLER, R. H.: SNAREs—engines for membrane fusion. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (2006), S. 631–43
- [112] JAHN, R. ; SUDHOF, T. C.: Membrane fusion and exocytosis. In: *Annu Rev Biochem* 68 (1999), S. 863–911
- [113] KATZ, B. ; MILEDI, R.: A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. In: *J Physiol* 192 (1967), S. 407–36
- [114] KATZ, B. ; MILEDI, R.: The timing of calcium action during neuromuscular transmission. In: *J Physiol* 189 (1967), S. 535–44
- [115] KEE, Y. ; SCHELLER, R. H.: Localization of synaptotagmin-binding domains on syntaxin. In: *J Neurosci* 16 (1996), S. 1975–81
- [116] KESAVAN, J. ; BORISOVSKA, M. ; BRUNS, D.: v-SNARE Actions during Ca(2+)-Triggered Exocytosis. In: *Cell* 131 (2007), S. 351–63
- [117] KIM, C. S. ; KWEON, D. H. ; SHIN, Y. K.: Membrane topologies of neuronal SNARE folding intermediates. In: *Biochemistry* 41 (2002), S. 10928–33
- [118] KLOEPPER, T. H. ; NICKIAS KIENLE, C. ; FASSHAUER, D.: An Elaborate Classification of SNARE Proteins Sheds Light on the Conservation of the Eukaryotic Endomembrane System. In: *Mol Biol Cell* (2007)
- [119] KNECHT, V. ; GRUBMULLER, H.: Mechanical coupling via the membrane fusion SNARE protein syntaxin 1A: a molecular dynamics study. In: *Biophys J* 84 (2003), S. 1527–47
- [120] KORGEL, B. A. ; ZANTEN, J. H. ; MONBOUQUETTE, H. G.: Vesicle size distributions measured by flow field-flow fractionation coupled with multiangle light scattering. In: *Biophys J* 74 (1998), S. 3264–72
- [121] KOZLOVSKY, Y. ; KOZLOV, M. M.: Stalk model of membrane fusion: solution of energy crisis. In: *Biophys J* 82 (2002), S. 882–95
- [122] KRAYNACK, B. A. ; CHAN, A. ; ROSENTHAL, E. ; ESSID, M. ; UMANSKY, B. ; WATERS, M. G. ; SCHMITT, H. D.: Dsl1p, Tip20p, and the novel Dsl3(Sec39) protein are required for the stability of the Q/t-SNARE complex at the endoplasmic reticulum in yeast. In: *Molecular Biology of the Cell* 16 (2005), S. 3963–3977
- [123] KUCERKA, N. ; KISELEV, M. A. ; BALGAVY, P.: Determination of bilayer thickness and lipid surface area in unilamellar dimyristoylphosphatidylcholine vesicles from small-angle neutron scattering curves: a comparison of evaluation methods. In: *Eur Biophys J* 33 (2004), S. 328–34

- [124] KURAZONO, H. ; MOCHIDA, S. ; BINZ, T. ; EISEL, U. ; QUANZ, M. ; GREBENSTEIN, O. ; WERNARS, K. ; POULAIN, B. ; TAUC, L. ; NIEMANN, H.: Minimal essential domains specifying toxicity of the light chains of tetanus toxin and botulinum neurotoxin type A. In: *J Biol Chem* 267 (1992), S. 14721–9
- [125] KUZMIN, P. I. ; ZIMMERBERG, J. ; CHIZMADZHEV, Y. A. ; COHEN, F. S.: A quantitative model for membrane fusion based on low-energy intermediates. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001), S. 7235–40
- [126] KWEON, D. H. ; KIM, C. S. ; SHIN, Y. K.: The membrane-dipped neuronal SNARE complex: a site-directed spin labeling electron paramagnetic resonance study. In: *Biochemistry* 41 (2002), S. 9264–8
- [127] KWEON, D. H. ; KIM, C. S. ; SHIN, Y. K.: Regulation of neuronal SNARE assembly by the membrane. In: *Nat Struct Biol* 10 (2003), S. 440–7
- [128] LACY, D. B. ; TEPP, W. ; COHEN, A. C. ; DASGUPTA, B. R. ; STEVENS, R. C.: Crystal structure of botulinum neuro-toxin type A and implications for toxicity. In: *Nature Structural Biology* 5 (1998), S. 898–902
- [129] LAI, E. ; ZANTEN, J. H.: Real time monitoring of lipoplex molar mass, size and density. In: *J Control Release* 82 (2002), S. 149–58
- [130] LAKOWICZ, Joseph R.: *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2nd. New York : Kluwer Academic/Plenum, 1999
- [131] LANG, T. ; BRUNS, D. ; WENZEL, D. ; RIEDEL, D. ; HOLROYD, P. ; THIELE, C. ; JAHN, R.: SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. In: *Embo J* 20 (2001), S. 2202–13
- [132] LANG, T. ; MARGITTAI, M. ; HOLZLER, H. ; JAHN, R.: SNAREs in native plasma membranes are active and readily form core complexes with endogenous and exogenous SNAREs. In: *J Cell Biol* 158 (2002), S. 751–60
- [133] LERMAN, J. C. ; ROBBLEE, J. ; FAIRMAN, R. ; HUGHSON, F. M.: Structural analysis of the neuronal SNARE protein syntaxin-1A. In: *Biochemistry* 39 (2000), S. 8470–9
- [134] LI, L. ; SHIN, O. H. ; RHEE, J. S. ; ARAC, D. ; RAH, J. C. ; RIZO, J. ; SUDHOF, T. ; ROSENEMUND, C.: Phosphatidylinositol phosphates as co-activators of Ca²⁺ binding to C2 domains of synaptotagmin 1. In: *J Biol Chem* 281 (2006), S. 15845–52
- [135] LIN, R. C. ; SCHELLER, R. H.: Structural organization of the synaptic exocytosis core complex. In: *Neuron* 19 (1997), S. 1087–94
- [136] LINDAU, M. ; ALMERS, W.: Structure and function of fusion pores in exocytosis and ectoplasmic membrane fusion. In: *Curr Opin Cell Biol* 7 (1995), S. 509–17

- [137] LINK, E. ; EDELMANN, L. ; CHOU, J. H. ; BINZ, T. ; YAMASAKI, S. ; EISEL, U. ; BAUMERT, M. ; SUDHOF, T. C. ; NIEMANN, H. ; JAHN, R.: Tetanus toxin action: inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis. In: *Biochem Biophys Res Commun* 189 (1992), S. 1017–23
- [138] LITTLETON, J. T. ; BAI, J. ; VYAS, B. ; DESAI, R. ; BALTUS, A. E. ; GARMENT, M. B. ; CARLSON, S. D. ; GANETZKY, B. ; CHAPMAN, E. R.: synaptotagmin mutants reveal essential functions for the C2B domain in Ca²⁺-triggered fusion and recycling of synaptic vesicles in vivo. In: *J Neurosci* 21 (2001), S. 1421–33
- [139] LITTLETON, J. T. ; CHAPMAN, E. R. ; KREBER, R. ; GARMENT, M. B. ; CARLSON, S. D. ; GANETZKY, B.: Temperature-sensitive paralytic mutations demonstrate that synaptic exocytosis requires SNARE complex assembly and disassembly. In: *Neuron* 21 (1998), S. 401–13
- [140] LOEWEN, C. A. ; LEE, S. M. ; SHIN, Y. K. ; REIST, N. E.: C2B Polylysine Motif of Synaptotagmin Facilitates a Ca²⁺-independent Stage of Synaptic Vesicle Priming In Vivo. In: *Mol Biol Cell* 17 (2006), S. 5211–26
- [141] LOW, S. H. ; VASANJI, A. ; NANDURI, J. ; HE, M. ; SHARMA, N. ; KOO, M. ; DRAZBA, J. ; WEIMBS, T.: Syntaxins 3 and 4 are concentrated in separate clusters on the plasma membrane before the establishment of cell polarity. In: *Mol Biol Cell* 17 (2006), S. 977–89
- [142] MACKLER, J. M. ; DRUMMOND, J. A. ; LOEWEN, C. A. ; ROBINSON, I. M. ; REIST, N. E.: The C(2)B Ca(2+)-binding motif of synaptotagmin is required for synaptic transmission in vivo. In: *Nature* 418 (2002), S. 340–4.
- [143] MAHAL, L. K. ; SEQUEIRA, S. M. ; GUREASKO, J. M. ; SOLLNER, T. H.: Calcium-independent stimulation of membrane fusion and SNAREpin formation by synaptotagmin I. In: *J Cell Biol* 158 (2002), S. 273–82.
- [144] MARGITTAI, M. ; FASSHAUER, D. ; PABST, S. ; JAHN, R. ; LANGEN, R.: Homo- and heterooligomeric SNARE complexes studied by site-directed spin labeling. In: *J Biol Chem* 276 (2001), S. 13169–77
- [145] MARGITTAI, M. ; OTTO, H. ; JAHN, R.: A stable interaction between syntaxin 1a and synaptobrevin 2 mediated by their transmembrane domains. In: *FEBS Lett* 446 (1999), S. 40–4
- [146] MARGITTAI, M. ; WIDENGREN, J. ; SCHWEINBERGER, E. ; SCHRODER, G. F. ; FELEKYAN, S. ; HAUSTEIN, E. ; KONIG, M. ; FASSHAUER, D. ; GRUBMULLER, H. ; JAHN, R. ; SEIDEL, C. A.: Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003), S. 15516–21

- [147] MARKGRAF, D. F. ; PEPLOWSKA, K. ; UNGERMANN, C.: Rab cascades and tethering factors in the endomembrane system. In: *FEBS Lett* 581 (2007), S. 2125–30
- [148] MARRINK, S. J. ; TIELEMAN, D. P. ; MARK, A. E.: Molecular Dynamics Simulation of the Kinetics of Spontaneous Micelle Formation. In: *J. Phys. Chem. B* 104 (2000), S. 12165–12173
- [149] MARTENS, S. ; KOZLOV, M. M. ; MCMAHON, H. T.: How synaptotagmin promotes membrane fusion. In: *Science* 316 (2007), S. 1205–8
- [150] MARTIN, T. F.: Tuning exocytosis for speed: fast and slow modes. In: *Biochim Biophys Acta* 1641 (2003), S. 157–65
- [151] MARZ, K. E. ; LAUER, J. M. ; HANSON, P. I.: Defining the SNARE complex binding surface of alpha-SNAP - Implications for SNARE complex disassembly. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), S. 27000–27008
- [152] MAXIMOV, A. ; SUDHOF, T. C.: Autonomous function of synaptotagmin 1 in triggering synchronous release independent of asynchronous release. In: *Neuron* 48 (2005), S. 547–54
- [153] MCMAHON, H. T. ; MISSLER, M. ; LI, C. ; SUDHOF, T. C.: Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function. In: *Cell* 83 (1995), S. 111–9
- [154] MCNEW, J. A. ; PARLATI, F. ; FUKUDA, R. ; JOHNSTON, R. J. ; PAZ, K. ; PAUMET, F. ; SOLLNER, T. H. ; ROTHMAN, J. E.: Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. In: *Nature* 407 (2000), S. 153–9
- [155] MCNEW, J. A. ; SOGAARD, M. ; LAMPEN, N. M. ; MACHIDA, S. ; YE, R. R. ; LACOMIS, L. ; TEMPST, P. ; ROTHMAN, J. E. ; SOLLNER, T. H.: Ykt6p, a prenylated SNARE essential for endoplasmic reticulum-Golgi transport. In: *J Biol Chem* 272 (1997), S. 17776–83
- [156] MCNEW, J. A. ; WEBER, T. ; ENGELMAN, D. M. ; SOLLNER, T. H. ; ROTHMAN, J. E.: The length of the flexible SNAREpin juxtamembrane region is a critical determinant of SNARE-dependent fusion. In: *Mol Cell* 4 (1999), S. 415–21
- [157] MCNEW, J. A. ; WEBER, T. ; PARLATI, F. ; JOHNSTON, R. J. ; MELIA, T. J. ; SOLLNER, T. H. ; ROTHMAN, J. E.: Close is not enough: SNARE-dependent membrane fusion requires an active mechanism that transduces force to membrane anchors. In: *J Cell Biol* 150 (2000), S. 105–17
- [158] MELIA, T. J. ; WEBER, T. ; MCNEW, J. A. ; FISHER, L. E. ; JOHNSTON, R. J. ; PARLATI, F. ; MAHAL, L. K. ; SOLLNER, T. H. ; ROTHMAN, J. E.: Regulation of membrane fusion by the membrane-proximal coil of the t-SNARE during zippering of SNAREpins. In: *J Cell Biol* 158 (2002), S. 929–40

- [159] MILEDI, R.: Strontium as a Substitute for Calcium in the Process of Transmitter Release at the Neuromuscular Junction. In: *Nature* 212 (1966), S. 1233–1234
- [160] MISURA, K. M. ; GONZALEZ, Jr. L. C. L. C. ; MAY, A. P. ; SCHELLER, R. H. ; WEIS, W. I.: Crystal structure and biophysical properties of a complex between the N-terminal SNARE region of SNAP25 and syntaxin 1a. In: *J Biol Chem* 276 (2001), S. 41301–9
- [161] MISURA, K. M. ; SCHELLER, R. H. ; WEIS, W. I.: Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. In: *Nature* 404 (2000), S. 355–62
- [162] MISURA, K. M. ; SCHELLER, R. H. ; WEIS, W. I.: Self-association of the H3 region of syntaxin 1A. Implications for intermediates in SNARE complex assembly. In: *J Biol Chem* 276 (2001), S. 13273–82
- [163] MONTECUCCO, C. ; ROSSETTO, O. ; SCHIAVO, G.: Presynaptic receptor arrays for clostridial neurotoxins. In: *Trends Microbiol* 12 (2004), S. 442–6
- [164] MUNSON, M. ; CHEN, X. ; COCINA, A. E. ; SCHULTZ, S. M. ; HUGHSON, F. M.: Interactions within the yeast t-SNARE Sso1p that control SNARE complex assembly. In: *Nat Struct Biol* 7 (2000), S. 894–902
- [165] NICHOLSON, K. L. ; MUNSON, M. ; MILLER, R. B. ; FILIP, T. J. ; FAIRMAN, R. ; HUGHSON, F. M.: Regulation of SNARE complex assembly by an N-terminal domain of the t-SNARE Sso1p. In: *Nat Struct Biol* 5 (1998), S. 793–802
- [166] NICKEL, W. ; WEBER, T. ; MCNEW, J. A. ; PARLATI, F. ; SOLLNER, T. H. ; ROTHMAN, J. E.: Content mixing and membrane integrity during membrane fusion driven by pairing of isolated v-SNAREs and t-SNAREs. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), S. 12571–6
- [167] NINOMIYA, Y. ; KISHIMOTO, T. ; YAMAZAWA, T. ; IKEDA, H. ; MIYASHITA, Y. ; KASAI, H.: Kinetic diversity in the fusion of exocytotic vesicles. In: *Embo J* 16 (1997), S. 929–34
- [168] NISHIKI, T. ; AUGUSTINE, G. J.: Dual roles of the C2B domain of synaptotagmin I in synchronizing Ca²⁺-dependent neurotransmitter release. In: *J Neurosci* 24 (2004), S. 8542–50
- [169] NISHIKI, T. ; AUGUSTINE, G. J.: Synaptotagmin I synchronizes transmitter release in mouse hippocampal neurons. In: *J Neurosci* 24 (2004), S. 6127–32
- [170] NOGUCHI, H. ; TAKASU, M.: Fusion pathways of vesicles: A Brownian dynamics simulation. In: *Journal of Chemical Physics* 115 (2001), S. 9547–9551
- [171] NOGUCHI, H. ; TAKASU, M.: Self-assembly of amphiphiles into vesicles: A Brownian dynamics simulation. In: *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* 64 (2001), S. 041913

- [172] NONET, M. L. ; SAIFEE, O. ; ZHAO, H. ; RAND, J. B. ; WEI, L.: Synaptic transmission deficits in *Caenorhabditis elegans* synaptobrevin mutants. In: *J Neurosci* 18 (1998), S. 70–80
- [173] NOVICK, P. ; FERRO, S. ; SCHEKMAN, R.: Order of Events in the Yeast Secretory Pathway. In: *Cell* 25 (1981), S. 461–469
- [174] OSBORNE, S. L. ; HERREROS, J. ; BASTIAENS, P. I. ; SCHIAVO, G.: Calcium-dependent oligomerization of synaptotagmins I and II. Synaptotagmins I and II are localized on the same synaptic vesicle and heterodimerize in the presence of calcium. In: *J Biol Chem* 274 (1999), S. 59–66
- [175] OSSIG, R. ; DASCHER, C. ; TREPTE, H. H. ; SCHMITT, H. D. ; GALLWITZ, D.: The Yeast Sly Gene-Products, Suppressors of Defects in the Essential Gtp-Binding Ypt1 Protein, May Act in Endoplasmic Reticulum-to-Golgi Transport. In: *Molecular and Cellular Biology* 11 (1991), S. 2980–2993
- [176] OTTO, H. ; HANSON, P. I. ; JAHN, R.: Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), S. 6197–201
- [177] PABST, S. ; HAZZARD, J. W. ; ANTONIN, W. ; SUDHOF, T. C. ; JAHN, R. ; RIZO, J. ; FASSHAUER, D.: Selective interaction of complexin with the neuronal SNARE complex. Determination of the binding regions. In: *J Biol Chem* 275 (2000), S. 19808–18
- [178] PABST, S. ; MARGITTAI, M. ; VAINIUS, D. ; LANGEN, R. ; JAHN, R. ; FASSHAUER, D.: Rapid and selective binding to the synaptic SNARE complex suggests a modulatory role of complexins in neuroexocytosis. In: *J Biol Chem* 277 (2002), S. 7838–48
- [179] PACE, C. N. ; VAJDOS, F. ; FEE, L. ; GRIMSLEY, G. ; GRAY, T.: How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. In: *Protein Sci* 4 (1995), S. 2411–23
- [180] PANG, Z. P. ; SHIN, O. H. ; MEYER, A. C. ; ROSENMUND, C. ; SUDHOF, T. C.: A gain-of-function mutation in synaptotagmin-1 reveals a critical role of Ca²⁺-dependent soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complex binding in synaptic exocytosis. In: *J Neurosci* 26 (2006), S. 12556–65
- [181] PANG, Z. P. ; SUN, J. ; RIZO, J. ; MAXIMOV, A. ; SUDHOF, T. C.: Genetic analysis of synaptotagmin 2 in spontaneous and Ca²⁺-triggered neurotransmitter release. In: *Embo J* 25 (2006), S. 2039–50
- [182] PARLATI, F. ; WEBER, T. ; MCNEW, J. A. ; WESTERMANN, B. ; SOLLNER, T. H. ; ROTHMAN, J. E.: Rapid and efficient fusion of phospholipid vesicles by the alpha-helical core of a SNARE complex in the absence of an N-terminal regulatory domain. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), S. 12565–70

- [183] PELHAM, H. R. ; BANFIELD, D. K. ; LEWIS, M. J.: SNAREs involved in traffic through the Golgi complex. In: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 60 (1995), S. 105–11
- [184] PELLIZZARI, R. ; ROSSETTO, O. ; LOZZI, L. ; GIOVEDI, S. ; JOHNSON, E. ; SHONE, C. C. ; MONTECUCCO, C.: Structural determinants of the specificity for synaptic vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin of tetanus and botulinum type B and G neurotoxins. In: *J Biol Chem* 271 (1996), S. 20353–8
- [185] PENG, R. W. ; GALLWITZ, D.: Sly1 protein bound to Golgi syntaxin Sed5p allows assembly and contributes to specificity of SNARE fusion complexes. In: *Journal of Cell Biology* 157 (2002), S. 645–655
- [186] PERIN, M. S. ; BROSE, N. ; JAHN, R. ; SUDHOF, T. C.: Domain structure of synaptotagmin (p65). In: *J Biol Chem* 266 (1991), S. 623–9
- [187] PERIN, M. S. ; FRIED, V. A. ; MIGNERY, G. A. ; JAHN, R. ; SUDHOF, T. C.: Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. In: *Nature* 345 (1990), S. 260–3
- [188] PETERS, C. ; BAYER, M. J. ; BUHLER, S. ; ANDERSEN, J. S. ; MANN, M. ; MAYER, A.: Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. In: *Nature* 409 (2001), S. 581–588
- [189] PEVSNER, J. ; HSU, S. C. ; SCHELLER, R. H.: n-Sec1: a neural-specific syntaxin-binding protein. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994), S. 1445–9
- [190] PFEFFER, S.: Membrane domains in the secretory and endocytic pathways. In: *Cell* 112 (2003), S. 507–17
- [191] POBBATI, A. V. ; STEIN, A. ; FASSHAUER, D.: N- to C-terminal SNARE complex assembly promotes rapid membrane fusion. In: *Science* 313 (2006), S. 673–6
- [192] PYLYPENKO, O. ; RAK, A. ; DUREK, T. ; KUSHNIR, S. ; DURSINA, B. E. ; THOMAE, N. H. ; CONSTANTINESCU, A. T. ; BRUNSVELD, L. ; WATZKE, A. ; WALDMANN, H. ; GOODY, R. S. ; ALEXANDROV, K.: Structure of doubly prenylated Ypt1:GDI complex and the mechanism of GDI-mediated Rab recycling. In: *Embo J* 25 (2006), S. 13–23
- [193] RAK, A. ; PYLYPENKO, O. ; DUREK, T. ; WATZKE, A. ; KUSHNIR, S. ; BRUNSVELD, L. ; WALDMANN, H. ; GOODY, R. S. ; ALEXANDROV, K.: Structure of Rab GDP-dissociation inhibitor in complex with prenylated YPT1 GTPase. In: *Science* 302 (2003), S. 646–650
- [194] REIM, K. ; MANSOUR, M. ; VAROQUEAUX, F. ; MCMAHON, H. T. ; SUDHOF, T. C. ; BROSE, N. ; ROSENMUND, C.: Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release. In: *Cell* 104 (2001), S. 71–81

- [195] RETTIG, J. ; NEHER, E.: Emerging roles of presynaptic proteins in Ca^{++} -triggered exocytosis. In: *Science* 298 (2002), S. 781–5.
- [196] RHEE, J. S. ; LI, L. Y. ; SHIN, O. H. ; RAH, J. C. ; RIZO, J. ; SUDHOF, T. C. ; ROSENMUND, C.: Augmenting neurotransmitter release by enhancing the apparent Ca^{2+} affinity of synaptotagmin 1. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005), S. 18664–9
- [197] RICKMAN, C. ; ARCHER, D. A. ; MEUNIER, F. A. ; CRAXTON, M. ; FUKUDA, M. ; BURGOYNE, R. D. ; DAVLETOV, B.: Synaptotagmin interaction with the syntaxin/SNAP-25 dimer is mediated by an evolutionarily conserved motif and is sensitive to inositol hexakisphosphate. In: *J Biol Chem* 279 (2004), S. 12574–9
- [198] RICKMAN, C. ; DAVLETOV, B.: Mechanism of calcium-independent synaptotagmin binding to target SNAREs. In: *J Biol Chem* 278 (2003), S. 5501–4
- [199] RICKMAN, C. ; JIMENEZ, J. L. ; GRAHAM, M. E. ; ARCHER, D. A. ; SOLOVIEV, M. ; BURGOYNE, R. D. ; DAVLETOV, B.: Conserved prefusion protein assembly in regulated exocytosis. In: *Mol Biol Cell* 17 (2006), S. 283–94
- [200] RIGAUD, J. L. ; LEVY, D.: Reconstitution of membrane proteins into liposomes. In: *Methods Enzymol* 372 (2003), S. 65–86
- [201] RIZO, J. ; CHEN, X. ; ARAC, D.: Unraveling the mechanisms of synaptotagmin and SNARE function in neurotransmitter release. In: *Trends Cell Biol* 16 (2006), S. 339–50
- [202] RIZO, J. ; SUDHOF, T. C.: Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. In: *Nat Rev Neurosci* 3 (2002), S. 641–53.
- [203] RIZZOLI, S. O. ; BETZ, W. J.: The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles. In: *Science* 303 (2004), S. 2037–9
- [204] RIZZOLI, S. O. ; BETZ, W. J.: Synaptic vesicle pools. In: *Nat Rev Neurosci* 6 (2005), S. 57–69
- [205] RUFENER, E. ; FRAZIER, A. A. ; WIESER, C. M. ; HINDERLITER, A. ; CAFISO, D. S.: Membrane-bound orientation and position of the synaptotagmin C2B domain determined by site-directed spin labeling. In: *Biochemistry* 44 (2005), S. 18–28
- [206] SABATINI, B. L. ; REGEHR, W. G.: Timing of neurotransmission at fast synapses in the mammalian brain. In: *Nature* 384 (1996), S. 170–2
- [207] SAIFEE, O. ; WEI, L. ; NONET, M. L.: The *Caenorhabditis elegans* unc-64 locus encodes a syntaxin that interacts genetically with synaptobrevin. In: *Mol Biol Cell* 9 (1998), S. 1235–52

- [208] SAKABA, T. ; STEIN, A. ; JAHN, R. ; NEHER, E.: Distinct kinetic changes in neurotransmitter release after SNARE protein cleavage. In: *Science* 309 (2005), S. 491–4
- [209] SAMBROOK, Joseph ; RUSSELL, David W.: *Molecular cloning : a laboratory manual*. 3rd. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [210] SCALES, S. J. ; CHEN, Y. A. ; YOO, B. Y. ; PATEL, S. M. ; DOUNG, Y. C. ; SCHELLER, R. H.: SNAREs contribute to the specificity of membrane fusion. In: *Neuron* 26 (2000), S. 457–64
- [211] SCHAGGER, H.: Tricine-SDS-PAGE. In: *Nat Protoc* 1 (2006), S. 16–22
- [212] SCHAUB, J. R. ; LU, X. ; DONESKE, B. ; SHIN, Y. K. ; MCNEW, J. A.: Hemifusion arrest by complexin is relieved by Ca²⁺-synaptotagmin I. In: *Nat Struct Mol Biol* 13 (2006), S. 748–50
- [213] SCHIAVO, G. ; BENFENATI, F. ; POULAIN, B. ; ROSSETTO, O. ; LAURETO, P. Polverino d. ; DASGUPTA, B. R. ; MONTECUCCO, C.: Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. In: *Nature* 359 (1992), S. 832–5
- [214] SCHIAVO, G. ; GU, Q. M. ; PRESTWICH, G. D. ; SOLLNER, T. H. ; ROTHMAN, J. E.: Calcium-dependent switching of the specificity of phosphoinositide binding to synaptotagmin. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), S. 13327–32
- [215] SCHIAVO, G. ; MATTEOLI, M. ; MONTECUCCO, C.: Neurotoxins affecting neuroexocytosis. In: *Physiol Rev* 80 (2000), S. 717–66
- [216] SCHIAVO, G. ; PAPINI, E. ; GENNA, G. ; MONTECUCCO, C.: An intact interchain disulfide bond is required for the neurotoxicity of tetanus toxin. In: *Infect Immun* 58 (1990), S. 4136–41
- [217] SCHIAVO, G. ; ROSSETTO, O. ; CATSICAS, S. ; LAURETO, P. Polverino d. ; DASGUPTA, B. R. ; BENFENATI, F. ; MONTECUCCO, C.: Identification of the nerve terminal targets of botulinum neurotoxin serotypes A, D, and E. In: *J Biol Chem* 268 (1993), S. 23784–7
- [218] SCHIAVO, G. ; SHONE, C. C. ; ROSSETTO, O. ; ALEXANDER, F. C. ; MONTECUCCO, C.: Botulinum neurotoxin serotype F is a zinc endopeptidase specific for VAMP/synaptobrevin. In: *J Biol Chem* 268 (1993), S. 11516–9
- [219] SCHIAVO, G. ; STENBECK, G. ; ROTHMAN, J. E. ; SOLLNER, T. H.: Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), S. 997–1001

- [220] SCHOCH, S. ; DEAK, F. ; KONIGSTORFER, A. ; MOZHAYEVA, M. ; SARA, Y. ; SUDHOF, T. C. ; KAVALALI, E. T.: SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. In: *Science* 294 (2001), S. 1117–22
- [221] SCHUBERT, R.: Liposome preparation by detergent removal. In: *Methods Enzymol* 367 (2003), S. 46–70
- [222] SCHUBERT, R. ; BEYER, K. ; WOLBURG, H. ; SCHMIDT, K. H.: Structural changes in membranes of large unilamellar vesicles after binding of sodium cholate. In: *Biochemistry* 25 (1986), S. 5263–9
- [223] SCHUBERT, R. ; SCHMIDT, K. H.: Structural changes in vesicle membranes and mixed micelles of various lipid compositions after binding of different bile salts. In: *Biochemistry* 27 (1988), S. 8787–94
- [224] SCHUETTE, C. G. ; HATSUZAWA, K. ; MARGITTAI, M. ; STEIN, A. ; RIEDEL, D. ; KUSTER, P. ; KONIG, M. ; SEIDEL, C. ; JAHN, R.: Determinants of liposome fusion mediated by synaptic SNARE proteins. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004), S. 2858–63
- [225] SCHULZE, K. L. ; BROADIE, K. ; PERIN, M. S. ; BELLEN, H. J.: Genetic and electrophysiological studies of *Drosophila* syntaxin-1A demonstrate its role in nonneuronal secretion and neurotransmission. In: *Cell* 80 (1995), S. 311–20
- [226] SCHURTENBERGER, P. ; LINDMAN, B.: Coexistence of simple and mixed bile salt-lecithin micelles: an NMR self-diffusion study. In: *Biochemistry* 24 (1985), S. 7161–5
- [227] SHAO, X. ; FERNANDEZ, I. ; SUDHOF, T. C. ; RIZO, J.: Solution structures of the Ca²⁺-free and Ca²⁺-bound C2A domain of synaptotagmin I: does Ca²⁺ induce a conformational change? In: *Biochemistry* 37 (1998), S. 16106–15
- [228] SHAO, X. ; LI, C. ; FERNANDEZ, I. ; ZHANG, X. ; SUDHOF, T. C. ; RIZO, J.: Synaptotagmin-syntaxin interaction: the C2 domain as a Ca²⁺-dependent electrostatic switch. In: *Neuron* 18 (1997), S. 133–42
- [229] SHIN, O. H. ; RHEE, J. S. ; TANG, J. ; SUGITA, S. ; ROSENKUND, C. ; SUDHOF, T. C.: Sr²⁺ binding to the Ca²⁺ binding site of the synaptotagmin 1 C2B domain triggers fast exocytosis without stimulating SNARE interactions. In: *Neuron* 37 (2003), S. 99–108
- [230] SIDDIQUI, T. J. ; VITES, O. ; STEIN, A. ; HEINTZMANN, R. ; JAHN, R. ; FASSHAUER, D.: Determinants of synaptobrevin regulation in membranes. In: *Mol Biol Cell* 18 (2007), S. 2037–46
- [231] SIEBER, J. J. ; WILLIG, K. I. ; HEINTZMANN, R. ; HELL, S. W. ; LANG, T.: The SNARE motif is essential for the formation of syntaxin clusters in the plasma membrane. In: *Biophys J* 90 (2006), S. 2843–51

- [232] SIEBER, J. J. ; WILLIG, K. I. ; KUTZNER, C. ; GERDING-REIMERS, C. ; HARKE, B. ; DONNERT, G. ; RAMMNER, B. ; EGGELING, C. ; HELL, S. W. ; GRUBMULLER, H. ; LANG, T.: Anatomy and dynamics of a supramolecular membrane protein cluster. In: *Science* 317 (2007), S. 1072–6
- [233] SIEGEL, D. P.: Energetics of intermediates in membrane fusion: comparison of stalk and inverted micellar intermediate mechanisms. In: *Biophys J* 65 (1993), S. 2124–40
- [234] SIVARS, U. ; AIVAZIAN, D. ; PFEFFER, S. R.: Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes. In: *Nature* 425 (2003), S. 856–9
- [235] SMITH, P. K. ; KROHN, R. I. ; HERMANSON, G. T. ; MALLIA, A. K. ; GARTNER, F. H. ; PROVENZANO, M. D. ; FUJIMOTO, E. K. ; GOEKE, N. M. ; OLSON, B. J. ; KLENK, D. C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Anal Biochem* 150 (1985), S. 76–85
- [236] SOLLNER, T. ; BENNETT, M. K. ; WHITEHEART, S. W. ; SCHELLER, R. H. ; ROTHMAN, J. E.: A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. In: *Cell* 75 (1993), S. 409–18
- [237] SOLLNER, T. ; WHITEHEART, S. W. ; BRUNNER, M. ; ERDJUMENT-BROMAGE, H. ; GEROMANOS, S. ; TEMPST, P. ; ROTHMAN, J. E.: SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. In: *Nature* 362 (1993), S. 318–24
- [238] SORENSEN, J. B. ; FERNANDEZ-CHACON, R. ; SUDHOF, T. C. ; NEHER, E.: Examining synaptotagmin 1 function in dense core vesicle exocytosis under direct control of Ca²⁺. In: *J Gen Physiol* 122 (2003), S. 265–76
- [239] SORENSEN, J. B. ; MATTI, U. ; WEI, S. H. ; NEHRING, R. B. ; VOETS, T. ; ASHERY, U. ; BINZ, T. ; NEHER, E. ; RETTIG, J.: The SNARE protein SNAP-25 is linked to fast calcium triggering of exocytosis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), S. 1627–32.
- [240] SORENSEN, J. B. ; WIEDERHOLD, K. ; MULLER, E. M. ; MILOSEVIC, I. ; NAGY, G. ; GROOT, B. L. ; GRUBMULLER, H. ; FASSHAUER, D.: Sequential N- to C-terminal SNARE complex assembly drives priming and fusion of secretory vesicles. In: *Embo J* 25 (2006), S. 955–66
- [241] STEIN, A. ; RADHAKRISHNAN, A. ; RIEDEL, D. ; FASSHAUER, D. ; JAHN, R.: Synaptotagmin activates membrane fusion through a Ca(2+)-dependent trans interaction with phospholipids. In: *Nat Struct Mol Biol* 14 (2007), S. 904–11
- [242] STEVENS, C. F. ; SULLIVAN, J. M.: The synaptotagmin C2A domain is part of the calcium sensor controlling fast synaptic transmission. In: *Neuron* 39 (2003), S. 299–308

- [243] STRUCK, D. K. ; HOEKSTRA, D. ; PAGANO, R. E.: Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. In: *Biochemistry* 20 (1981), S. 4093–9
- [244] SUDHOF, T. C.: The synaptic vesicle cycle. In: *Annu Rev Neurosci* 27 (2004), S. 509–47
- [245] SUTTON, R. B. ; DAVLETOV, B. A. ; BERGHUIS, A. M. ; SUDHOF, T. C. ; SPRANG, S. R.: Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca²⁺/phospholipid-binding fold. In: *Cell* 80 (1995), S. 929–38
- [246] SUTTON, R. B. ; ERNST, J. A. ; BRUNGER, A. T.: Crystal structure of the cytosolic C2A-C2B domains of synaptotagmin III. Implications for Ca(+2)-independent snare complex interaction. In: *J Cell Biol* 147 (1999), S. 589–98
- [247] SUTTON, R. B. ; FASSHAUER, D. ; JAHN, R. ; BRUNGER, A. T.: Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. In: *Nature* 395 (1998), S. 347–53
- [248] SWAMINATHAN, S. ; ESWARAMOORTHY, S.: Structural analysis of the catalytic and binding sites of Clostridium botulinum neurotoxin B. In: *Nature Structural Biology* 7 (2000), S. 693–699
- [249] SWEENEY, S. T. ; BROADIE, K. ; KEANE, J. ; NIEMANN, H. ; O’KANE, C. J.: Targeted expression of tetanus toxin light chain in Drosophila specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. In: *Neuron* 14 (1995), S. 341–51
- [250] TAKAMORI, S. ; HOLT, M. ; STENIUS, K. ; LEMKE, E. A. ; GRONBORG, M. ; RIEDEL, D. ; URLAUB, H. ; SCHENCK, S. ; BRUGGER, B. ; RINGLER, P. ; MULLER, S. A. ; RAMMNER, B. ; GRATER, F. ; HUB, J. S. ; DE GROOT, B. L. ; MIESKES, G. ; MORIYAMA, Y. ; KLINGAUF, J. ; GRUBMULLER, H. ; HEUSER, J. ; WIELAND, F. ; JAHN, R.: Molecular anatomy of a trafficking organelle. In: *Cell* 127 (2006), S. 831–46
- [251] TANG, J. ; MAXIMOV, A. ; SHIN, O. H. ; DAI, H. ; RIZO, J. ; SUDHOF, T. C.: A complexin/synaptotagmin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. In: *Cell* 126 (2006), S. 1175–87
- [252] TITORENKO, V. I. ; RACHUBINSKI, R. A.: The life cycle of the peroxisome. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2001), S. 357–68
- [253] TRUDEAU, L. E. ; FANG, Y. ; HAYDON, P. G.: Modulation of an early step in the secretory machinery in hippocampal nerve terminals. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), S. 7163–8
- [254] TUCKER, W. C. ; CHAPMAN, E. R.: Role of synaptotagmin in Ca²⁺-triggered exocytosis. In: *Biochem J* 366 (2002), S. 1–13.

- [255] TUCKER, W. C. ; WEBER, T. ; CHAPMAN, E. R.: Reconstitution of Ca²⁺-regulated membrane fusion by synaptotagmin and SNAREs. In: *Science* 304 (2004), S. 435–8
- [256] UBACH, J. ; LAO, Y. ; FERNANDEZ, I. ; ARAC, D. ; SUDHOF, T. C. ; RIZO, J.: The C2B domain of synaptotagmin I is a Ca²⁺-binding module. In: *Biochemistry* 40 (2001), S. 5854–60
- [257] UBACH, J. ; ZHANG, X. ; SHAO, X. ; SUDHOF, T. C. ; RIZO, J.: Ca²⁺ binding to synaptotagmin: how many Ca²⁺ ions bind to the tip of a C2-domain? In: *Embo J* 17 (1998), S. 3921–30
- [258] UNGAR, D. ; HUGHSON, F. M.: SNARE protein structure and function. In: *Annu Rev Cell Dev Biol* 19 (2003), S. 493–517
- [259] VAN HOLDE, Kensal E. ; JOHNSON, W. C. ; HO, Pui S.: *Principles of physical biochemistry*. Upper Saddle River, NJ : Prentice-Hall, 1998
- [260] VERHAGE, M. ; MAIA, A. S. ; PLOMP, J. J. ; BRUSSAARD, A. B. ; HEEROMA, J. H. ; VERMEER, H. ; TOONEN, R. F. ; HAMMER, R. E. ; BERG, T. K. d. ; MISSLER, M. ; GEUZE, H. J. ; SUDHOF, T. C.: Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. In: *Science* 287 (2000), S. 864–9
- [261] VINSON, P. K. ; TALMON, Y. ; WALTER, A.: Vesicle-micelle transition of phosphatidylcholine and octyl glucoside elucidated by cryo-transmission electron microscopy. In: *Biophys J* 56 (1989), S. 669–81
- [262] VOETS, T. ; MOSER, T. ; LUND, P. E. ; CHOW, R. H. ; GEPPERT, M. ; SUDHOF, T. C. ; NEHER, E.: Intracellular calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagmin I. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001), S. 11680–5.
- [263] VOETS, T. ; NEHER, E. ; MOSER, T.: Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. In: *Neuron* 23 (1999), S. 607–15
- [264] WANG, Y. ; DULUBOVA, I. ; RIZO, J. ; SUDHOF, T. C.: Functional analysis of conserved structural elements in yeast syntaxin Vam3p. In: *J Biol Chem* 276 (2001), S. 28598–605
- [265] WEBER, T. ; ZEMELMAN, B. V. ; MCNEW, J. A. ; WESTERMANN, B. ; GMACHL, M. ; PARLATI, F. ; SOLLNER, T. H. ; ROTHMAN, J. E.: SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. In: *Cell* 92 (1998), S. 759–72.
- [266] WEI, S. ; XU, T. ; ASHERY, U. ; KOLLEWE, A. ; MATTI, U. ; ANTONIN, W. ; RETTIG, J. ; NEHER, E.: Exocytotic mechanism studied by truncated and zero layer mutants of the C-terminus of SNAP-25. In: *Embo J* 19 (2000), S. 1279–89

- [267] WENDLAND, B. ; SCHELLER, R. H.: Secretion in AtT-20 cells stably transfected with soluble synaptotagmins. In: *Mol Endocrinol* 8 (1994), S. 1070–82
- [268] WHYTE, J. R. ; MUNRO, S.: Vesicle tethering complexes in membrane traffic. In: *J Cell Sci* 115 (2002), S. 2627–37
- [269] WILKINS, M. R. ; GASTEIGER, E. ; BAIROCH, A. ; SANCHEZ, J. C. ; WILLIAMS, K. L. ; APPEL, R. D. ; HOCHSTRASSER, D. F.: Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. In: *Methods Mol Biol* 112 (1999), S. 531–52
- [270] WYATT, P. J.: Submicrometer Particle Sizing by Multiangle Light Scattering following Fractionation. In: *J Colloid Interface Sci* 197 (1998), S. 9–20
- [271] XIAO, W. ; POIRIER, M. A. ; BENNETT, M. K. ; SHIN, Y. K.: The neuronal t-SNARE complex is a parallel four-helix bundle. In: *Nat Struct Biol* 8 (2001), S. 308–11
- [272] XU, J. ; MASHIMO, T. ; SUDHOF, T. C.: Synaptotagmin-1, -2, and -9: Ca(2+) Sensors for Fast Release that Specify Distinct Presynaptic Properties in Subsets of Neurons. In: *Neuron* 54 (2007), S. 567–81
- [273] XU, T. ; BINZ, T. ; NIEMANN, H. ; NEHER, E.: Multiple kinetic components of exocytosis distinguished by neurotoxin sensitivity. In: *Nat Neurosci* 1 (1998), S. 192–200
- [274] XU, T. ; RAMMNER, B. ; MARGITTAI, M. ; ARTALEJO, A. R. ; NEHER, E. ; JAHN, R.: Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis. In: *Cell* 99 (1999), S. 713–22
- [275] YAMAGUCHI, T. ; DULUBOVA, I. ; MIN, S. W. ; CHEN, X. H. ; RIZO, J. ; SUDHOF, T. C.: Sly1 binds to Golgi and ER syntaxins via a conserved N-terminal peptide motif. In: *Developmental Cell* 2 (2002), S. 295–305
- [276] YAMASAKI, S. ; BAUMEISTER, A. ; BINZ, T. ; BLASI, J. ; LINK, E. ; CORNILLE, F. ; ROQUES, B. ; FYKSE, E. M. ; SUDHOF, T. C. ; JAHN, R. ; AL. et: Cleavage of members of the synaptobrevin/VAMP family by types D and F botulinum neurotoxins and tetanus toxin. In: *J Biol Chem* 269 (1994), S. 12764–72
- [277] YAMASAKI, S. ; BINZ, T. ; HAYASHI, T. ; SZABO, E. ; YAMASAKI, N. ; EKLUND, M. ; JAHN, R. ; NIEMANN, H.: Botulinum neurotoxin type G proteolyzes the Ala81-Ala82 bond of rat synaptobrevin 2. In: *Biochem Biophys Res Commun* 200 (1994), S. 829–35
- [278] YOSHIHARA, M. ; LITTLETON, J. T.: Synaptotagmin I functions as a calcium sensor to synchronize neurotransmitter release. In: *Neuron* 36 (2002), S. 897–908
- [279] ZENISEK, D. ; STEYER, J. A. ; ALMERS, W.: Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones. In: *Nature* 406 (2000), S. 849–54.

- [280] ZERIAL, M. ; MCBRIDE, H.: Rab proteins as membrane organizers. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2001), S. 107–17
- [281] ZHANG, F. ; CHEN, Y. ; KWEON, D. H. ; KIM, C. S. ; SHIN, Y. K.: The four-helix bundle of the neuronal target membrane SNARE complex is neither disordered in the middle nor uncoiled at the C-terminal region. In: *J Biol Chem* 277 (2002), S. 24294–8
- [282] ZHANG, X. ; RIZO, J. ; SUDHOF, T. C.: Mechanism of phospholipid binding by the C2A-domain of synaptotagmin I. In: *Biochemistry* 37 (1998), S. 12395–403
- [283] ZILLY, F. E. ; SORENSEN, J. B. ; JAHN, R. ; LANG, T.: Munc18-bound syntaxin readily forms SNARE complexes with synaptobrevin in native plasma membranes. In: *Plos Biology* 4 (2006), S. 1789–1797
- [284] ZIMM, B. H.: Apparatus and Methods for Measurement and Interpretation of the Angular Variation of Light Scattering - Preliminary Results on Polystyrene Solutions. In: *Journal of Chemical Physics* 16 (1948), S. 1099–1116
- [285] ZIMMERBERG, J. ; COHEN, F. S. ; FINKELSTEIN, A.: Fusion of phospholipid vesicles with planar phospholipid bilayer membranes. I. Discharge of vesicular contents across the planar membrane. In: *J Gen Physiol* 75 (1980), S. 241–50
- [286] ZWILLING, D. ; CYPIONKA, A. ; POHL, W. H. ; FASSHAUER, D. ; WALLA, P. J. ; WAHL, M. C. ; JAHN, R.: Early endosomal SNAREs form a structurally conserved SNARE complex and fuse liposomes with multiple topologies. In: *Embo J* 26 (2007), S. 9–18

Publikationsliste

1. Schuette, C.G., K. Hatsuzawa, M. Margittai, A. Stein, D. Riedel, P. Kuster, M. Konig, C. Seidel, and R. Jahn. 2004. Determinants of liposome fusion mediated by synaptic SNARE proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:2858-63.
2. Sakaba, T., A. Stein, R. Jahn, and E. Neher. 2005. Distinct kinetic changes in neurotransmitter release after SNARE protein cleavage. *Science*. 309:491-4.
3. Pobbati, A.V., A. Stein, and D. Fasshauer. 2006. N- to C-terminal SNARE complex assembly promotes rapid membrane fusion. *Science*. 313:673-6.
4. Siddiqui, T.J., O. Vites, A. Stein, R. Heintzmann, R. Jahn, and D. Fasshauer. 2007. Determinants of synaptobrevin regulation in membranes. *Mol Biol Cell*. 18:2037-46.
5. Stein, A., A. Radhakrishnan, D. Riedel, D. Fasshauer, and R. Jahn. 2007. Synaptotagmin activates membrane fusion through a Ca(2+)-dependent trans interaction with phospholipids. *Nat Struct Mol Biol*. 14:904-11.
6. Holt, M., D. Riedel, A. Stein, C. Schuette, R. Jahn. 2007. Synaptic vesicles are constitutively active fusion machines, which function independently of Ca(2+). *submitted*.