

## 6 Zusammenfassung

SNARE-Proteine spielen eine wichtige Rolle in allen intrazellulären Fusionsreaktionen von der Hefe bis zum Menschen. Es wird vermutet, daß die Bildung von ternären SNARE-Komplexen zwischen dem synaptischen Vesikelprotein Synaptobrevin und den Plasmamembranproteinen Syntaxin und SNAP-25 zur Membranfusion in der Nervenendigung führt. Die Interaktion zwischen SNARE-Proteinen erfolgt über einen 60 Aminosäuren umfassenden Abschnitt, dem SNARE-Motiv. Die Kristallstruktur des synaptischen SNARE-Komplexes ergab ein langgestrecktes Vierhelixbündel, in dem alle Helizes parallel angeordnet sind (zwei SNAP-25-Helizes und je eine Syntaxin und eine Synaptobrevin-Helix). Syntaxin besitzt eine zusätzliche, unabhängig gefaltete Domäne, die Habc-Domäne. Eine intramolekulare Interaktion zwischen der Habc-Domäne und dem SNARE-Motiv arretiert Syntaxin in einer geschlossenen Konformation. Nur wenn es keine Interaktion zwischen diesen Domänen gibt (offene Konformation) kann sich der SNARE-Komplex ausbilden. In dieser Arbeit wurden der konformationelle Schaltmechanismus Syntaxins und die Strukturen von SNARE-Intermediaten und vollständig ausgebildeten SNARE-Komplexen untersucht.

Fluoreszenz-Anisotropie-Untersuchungen ergaben, daß die Habc-Domäne die SNARE-Komplexbildung um das fünf- bis siebenfache verlangsamt. Dies spricht für eine schwache Interaktion zwischen der Habc-Domäne und dem SNARE-Motiv ( $\Delta G \approx 1$  kcal/mol). Die intramolekularen Abstände zwischen diesen Domänen wurden durch Einzelmolekül-Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfermessungen bestimmt. Nur 15-30% aller Syntaxinmoleküle sind geschlossen. Konformationelle Fluktuationen zwischen den offenen und geschlossenen Zuständen erfolgen in einem Zeitraum von  $\sim 0.7$  ms. Um Syntaxin in eine geschlossene Konformation zu drängen, wird ein zusätzliches Protein (Munc-18) benötigt.

Binäre Komplexe zwischen Syntaxin und SNAP-25 (2:1 Stöchiometrie) sind potentielle Intermediate in der Ausbildung von SNARE-Komplexen. Elektronen-Paramagnetische-Resonanz-Daten ergaben, daß der binäre Komplex ein Vierhelixbündel ist, in dem die beiden Syntaxinhelizes parallel angeordnet sind. Die N- und C-termini Syntaxins und die C-termini beider SNAP-25-Helizes sind in diesem Komplex unstrukturiert. Die Bindung Synaptobrevins führt zu einer Verdrängung eines Syntaxinmoleküls und damit zur Bildung eines ternären Komplexes. Bei der Bildung binärer und ternärer Komplexe aus

individuellen SNAREs erfolgen große strukturelle Veränderungen. Synaptobrevin und SNAP-25 sind alleine völlig unstrukturiert. Syntaxin ist auch unstrukturiert, oligomerisiert aber bei höheren mikromolekularen Konzentrationen. Die Oligomerisierung wird vom SNARE-Motiv vermittelt und kann mit einer intramolekularen Interaktion mit der Habc-Domäne konkurrieren.

Um herauszufinden, ob die Struktur von einzelnen Helizes im SNARE-Komplex von dem Vorhandensein gegenüberliegender Helizes abhängen, wurde ein C-terminal verkürztes Synaptobrevin eingesetzt. N-terminal von der Verkürzung waren die Komplexe strukturell intakt, wohingegen C-terminale Helizes, kollabierten. Die Interaktionsebenen im Vierhelixbündel von SNARE-Komplexen scheinen somit unabhängig von benachbarten Ebenen zu sein. Dieser Befund stimmt mit dem vorgeschlagenen „Reissverschlussprinzip der Komplexbildung“ überein und liefert eine strukturelle Basis für die Ausbildung von SNARE-Komplex-Intermediaten im Verlauf der Membranfusion.

Um zu prüfen, ob SNARE-Proteine über ihre Transmembrandomänen interagieren und somit die SNARE-Komplexbildung beeinflussen, wurden die Interaktionen zwischen Syntaxin und Synaptobrevin in Proteoliposomen untersucht. Syntaxin bildete spezifische Dimere die Vorläufer von binären Komplexen sein könnten. Zusätzlich wurde eine neue Interaktion zwischen den Transmembranregionen von Syntaxin und Synaptobrevin beobachtet, die wichtig für eine späte Phase der Fusion sein könnte. Eine Verlängerung des Vierhelixbündels bis in die Membranregion könnte zur Ausbildung eines Membrankontinuums zwischen proximalen Schichten fusionierender Membranen sorgen. Syntaxin ist an vielen molekularen Interaktionen beteiligt und durchläuft multiple Konformationsänderungen bevor es im vollständig ausgebildeten SNARE-Komplex gebunden ist.