1 Einleitung

Das menschliche Gehirn ist die komplizierteste Struktur, die im Universum bekannt ist. Seine funktionelle Einheit ist das Neuron (Nervenzelle), von dem es in einem Gehirn ungefähr 100 Milliarden gibt. Über die Dendriten und den Zellkörper empfängt die Nervenzelle Informationen, und über ihr Axon leitet sie Signale an andere Neuronen oder sonstige Zellen weiter. Das länglich geformte Axon spaltet sich am Ende in eine Anzahl dünner Äste auf, die an sogenannten Synapsen Kontakt mit angrenzenden Zellen und Neuronen aufnehmen. Ein Neuron kann mehrere tausend synaptische Kontakte mit anderen Nervenzellen bilden. Der Informationsaustausch zwischen den neuronalen Synapsen erfolgt im Millisekundenbereich über die Ausschüttung von Neurotransmittern. Dieser sehr schnellen Reaktion liegt eine hocheffiziente Reaktionskaskade zugrunde, die aus Neurotransmittern, synaptischen Vesikeln, Kalziumeinstrom, verschiedenen Hilfsproteinen und Rezeptoren zusammengesetzt ist.

Der erste Beleg dafür, dass Neurotransmitter an den Axonendigungen portionsweise durch Vesikel jeweils gleichen Inhalts abgegeben werden, stammt aus den fünfziger Jahren (Fatt und Katz, 1952). Die Kaskade des Informationsaustausches in den Neuronen erfolgt schließlich wie viele andere Transportvorgänge sekretorisch. Der vesikuläre Zyklus beginnt mit dem Abschnüren synaptischer Vesikel aus dem Membransystem des Golgi-Apparates (Endocytose), die im Axon mit entsprechenden Transmittermolekülen beladen werden. Relevante Neurotransmitter sind u. a. γ-Aminobuttersäure (GABA), Glutamat (Glu), Glycin (Gly), Acetylcholin (ACh), Dopamin (DA) und Serotonin (5-HT). Diese Neurotransmitter werden in den Vesikeln zur präsynaptischen Plasmamembran transportiert. Dort verbleiben sie, bis auf ein elektrisches Signal hin, Kalziumkanäle geöffnet werden und Kalziumionen in die Zelle einströmen. Dem Kalziumeinstrom folgt eine Exocytose, entstehend aus einer ersten losen und reversiblen Bindung und dem folgenden Andocken des Vesikels an die Plasmamembran. Durch die Fusion beider Membranen wird der Vesikelinhalt in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Die auf diese Weise freigesetzten Neurotransmitter diffundieren über den schmalen synaptischen Spalt, binden an Rezeptormoleküle auf der postsynaptischen Dendritenmembran und leiten die Informationen somit weiter (vgl. Abbildung 1.1).

Schließlich werden die fusionierten synaptischen Vesikelmembranen und ihre Proteinkomponenten über Endocytose, d. h. durch Abschnüren von der Membran, zurück transportiert und für eine erneute Runde der Exocytose wiederverwertet (Ting und Scheller, 1995).

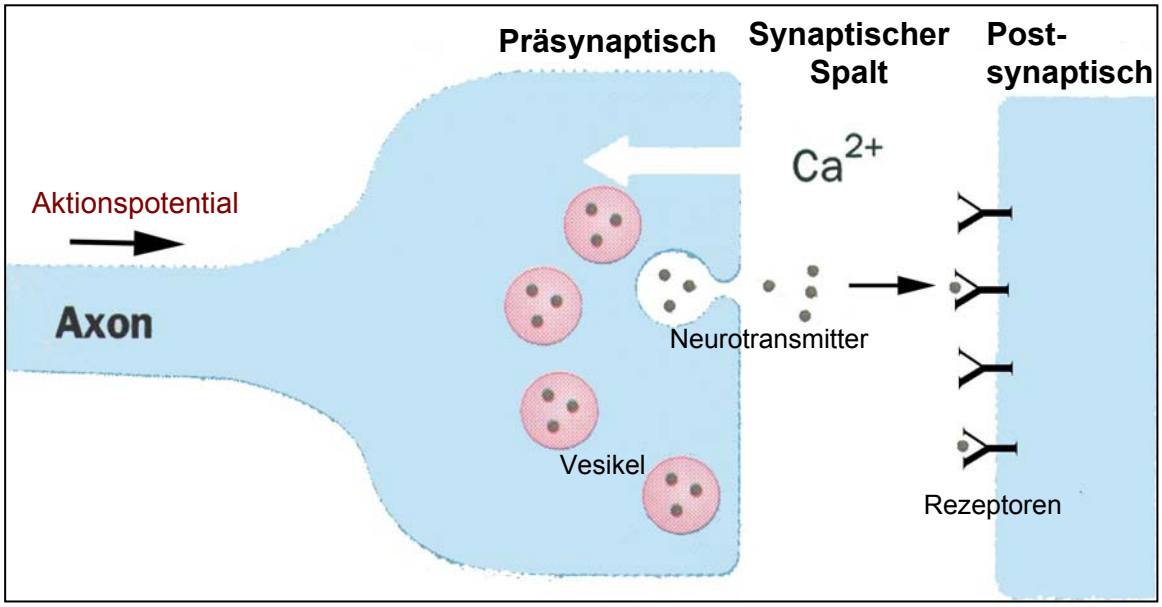

Abb. 1.1: Synaptische Signalübertragung modifiziert nach Rothman, 1994

Im Brennpunkt des Interesses der regulierten Neurosekretion steht seit einigen Jahren die Fusionsmaschinerie, bestehend aus den SNARE-Proteinen (SNAP-Rezeptoren) Syntaxin, SNAP-25 (synaptosomal assoziiertes Protein von 25 kDa) und Synaptobrevin, auch VAMP (Vesikel-assoziiertes Membranprotein) genannt (Söllner et al., 1993a; Rothman, 1994). Hierbei handelt es sich um Membranproteine, von denen VAMP auf der vesikulären (v) und Syntaxin und SNAP-25 auf der Ziel(Target; t)-membran lokalisiert sind und die deswegen nach v- und t-SNARE unterschieden werden (Abbildung 1.2). Die von J. Rothman entwickelte SNARE-Hypothese besagt, dass Zielsteuerung und Andocken eines Transportvesikels an die Zielmembran auf der Spezifität der Bindungen zwischen v- und t-SNARE beruhen (Söllner et al., 1993a). Diese SNARE-Proteine gehen einen sehr stabilen Komplex ein, der in der Lage ist, die Fusion *in vitro* auch allein auszulösen (Weber et al., 1998).

Da die Fusion *in vivo* schneller abläuft und reguliert wird, sind auch andere Proteine an diesem Prozess beteiligt (Übersicht Brunger, 2001). Synaptotagmin wird als Kalziumbindungspartner vermutet, der die Komplexbildung reguliert (Brose et al., 1992; Chen et al., 1999a; Südhof und Rizo, 1996). Die Bindung von Synaptotagmin an den SNARE-Komplex wird möglicherweise durch Snapin reguliert, das an den C-Terminus von SNAP-25 bindet (Übersicht bei Hilfiker et al., 1999; Ilardi et al., 1999). Die ATPase NSF (N-ethylmaleimid sensitives Fusionsprotein), deren Aktivität durch N-ethylmaleimid (NEM) gehemmt werden kann, α-SNAP („Soluble NSF Attachment Protein“), Synaptophysin, nSec1 und die Rab-Klasse der kleinen G-Proteine und ihre Effektoren spielen ebenfalls eine Rolle in der Neurosekretion (Whiteheart et al., 1994; Clary et al., 1990; Ferro-Novick und Novick, 1993;

Edelmann et al., 1995; Pevsner et al., 1994b; Südhof, 1995; Hanson et al., 1997; Übersichtsartikel von Lin und Scheller, 2000). Andere Faktoren, die mit den SNARE-Proteinen interagieren und diese möglicherweise regulieren, sind Complexin, VAP33, Synaptophysin und Hrs-2 (McMahon et al., 1995; Skehel et al., 1995; Wiedenmann und Franke, 1985; Bean et al., 1997; Tsujimoto et al., 1999).

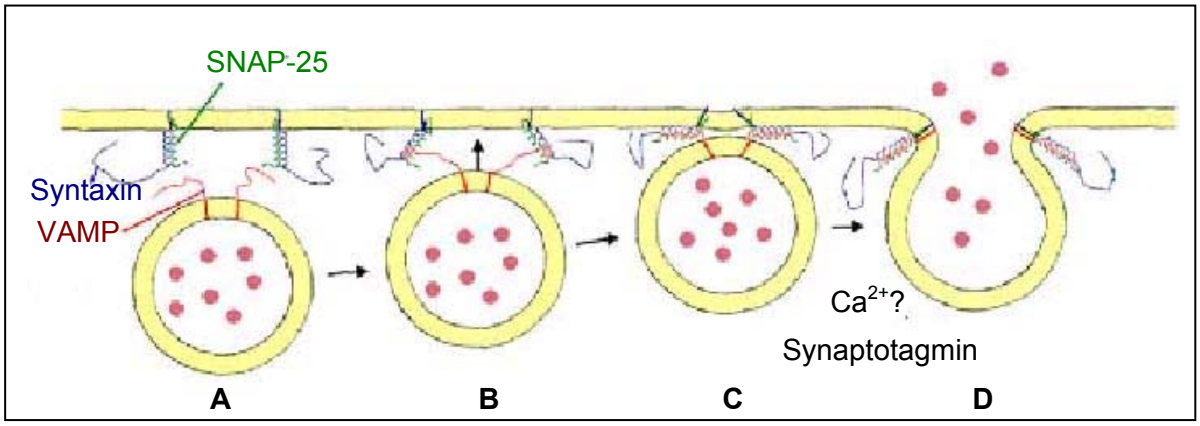

Abb. 1.2: Modell der regulierten Exocytose synaptischer Vesikel
modifiziert nach Hanson et al., 1997
A: Zielsteuerung des mit Neurotransmittern gefüllten Vesikels zur präsynaptischen Plasmamembran
B: Ausbildung einer lockeren und reversiblen Bindung
C: Andocken des Vesikels an die Membran; feste Bindung durch coiled-coil Struktur der SNARE-Proteine
D: Vesikel und Membran werden fusionskompetent gemacht, eventuell durch Kalziumeinstrom, das über die Bindung an Synaptotagmin wirkt

1.1 Der SNARE-Komplex

Die Prozesse der regulierten Neurosekretion entsprechen den Transportvorgängen zwischen anderen zellulären Kompartimenten, wie dem endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat, Endosomen und Lysosomen, so dass die meisten beteiligten Proteine eine Vielzahl an Homologen besitzen (siehe Abbildung 1.3), die untereinander für die einzelnen Kompartimente spezifische Bindungen eingehen (Bennett und Scheller, 1993; Fasshauer et al., 1999; Luzio et al., 2001). Allerdings sind die homologen SNARE-Proteine *in vitro* in der Lage, gemischte, ebenfalls stabile SNARE-Komplexe auszubilden (Fasshauer et al., 1999), wobei aber an jedem Komplex jeweils ein VAMP-, Syntaxin und SNAP-25-Homologes beteiligt sind, die sowohl auf der Zielmembran als auch auf der vesikulären Membran lokalisiert sind. Für eine Fusion ist es auch notwendig, dass sich das v-SNARE auf der einen Membran und alle t-SNAREs auf der anderen Membran befinden (Parlati et al., 2000). Es gilt letztendlich immer die SNARE-Hypothese (McNew et al., 2000).

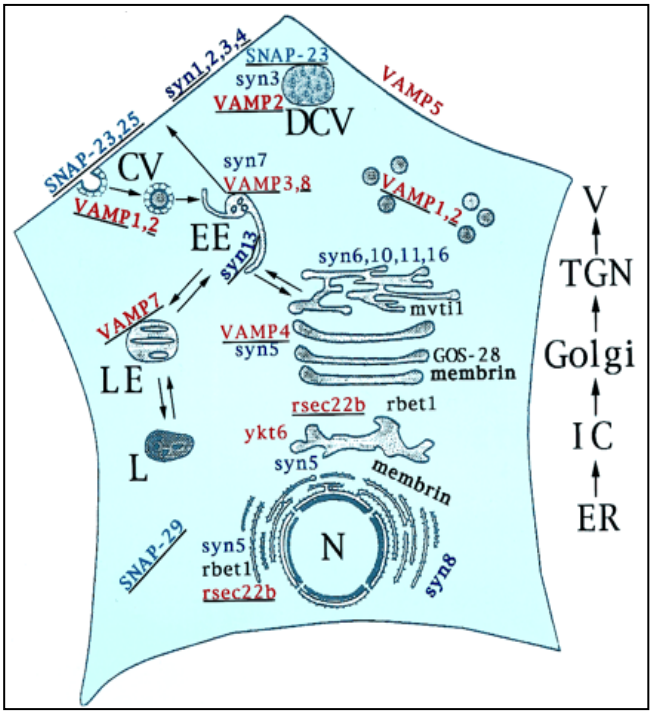

Abb. 1.3: SNAREs in verschiedenen Kompartimenten Yang et al., 1999
N=Kern; V=Vesikel; TGN=*trans*-Golgi Netzwerk; IC=Zwischenkompartiment; L=Lysosomen; EE=Frühe Endosomen; LE=Späte Endosomen; CV=Clathrin-ummantelte Vesikel; DCV=Kerndichte Granulen

Durch ihren hohen Konservierungsgrad im Zuge der Evolution sind auch in Hefezellen SNARE-Proteine vorhanden. Die SNARE-Proteine sind trotz der Unterschiede in Größe und Struktur in ihren Eigenschaften der Membranorganisation in Hefe- und Tierzellen ähnlich (Übersichtsartikel von Pelham, 1999).

Die neuronalen SNARE-Proteine VAMP2, Syntaxin1A und SNAP-25 sind essentiell für die synaptische Membranfusion. VAMP und Syntaxin besitzen carboxyterminale Transmembrandomänen, über die sie in der Membran verankert sind, während SNAP-25 über Fettsäuren peripher mit der Membran assoziiert ist. Die Membranbindungen sind für die Komplexbildung allerdings nicht erforderlich. Der Komplex kann sich auch *in vitro* aus rekombinant in Bakterienzellen exprimierten und gereinigten SNARE-Proteinen ohne Membranbindungsdomänen bilden (Fasshauer et al., 1997a; Rice et al., 1997). SNARE-Proteine mit Transmembrandomänen sind in der Lage, die Fusion von künstlichen Membranen auszulösen, wenn VAMP in die eine Membran und die koexprimierten und gereinigten t-SNAREs Syntaxin und SNAP-25 ebenfalls gemeinsam in die andere Membran rekonstituiert werden (Weber et al., 1998).

Die SNARE-Proteine liegen im Komplex in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1:1 vor. Dieser Komplex ist chemisch und thermisch bemerkenswert resistent. Er ist selbst in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) und bei 65°C stabil (Hayashi et al., 1995).

Limitierte Proteolyse des synaptischen SNARE-Komplexes offenbart einen minimalen Kernkomplex, der ähnliche Eigenschaften wie der Ausgangskomplex aufweist (Fasshauer et al., 1998a; Poirier et al., 1998a). Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse des minimalen Kernkomplexes ergaben, dass die Proteine parallel angeordnet (Poirier et al., 1998b) und in einer superhelikalen Form zu einem zylindrischen „Vier-Helix-Bündel“ („coiled-coil“) mit einer Länge von 84 Å und einem variierenden Durchmesser in Abhängigkeit der Aminosäurereste von 13-15 Å arrangiert sind (Sutton et al., 1998), wie in Abbildung 1.4 gezeigt. Im Gegensatz dazu besteht die N-terminale Domäne von Syntaxin (nicht abgebildet) aus einem antiparallelen „Drei-Helix-Bündel“ (Fernandez et al., 1998).

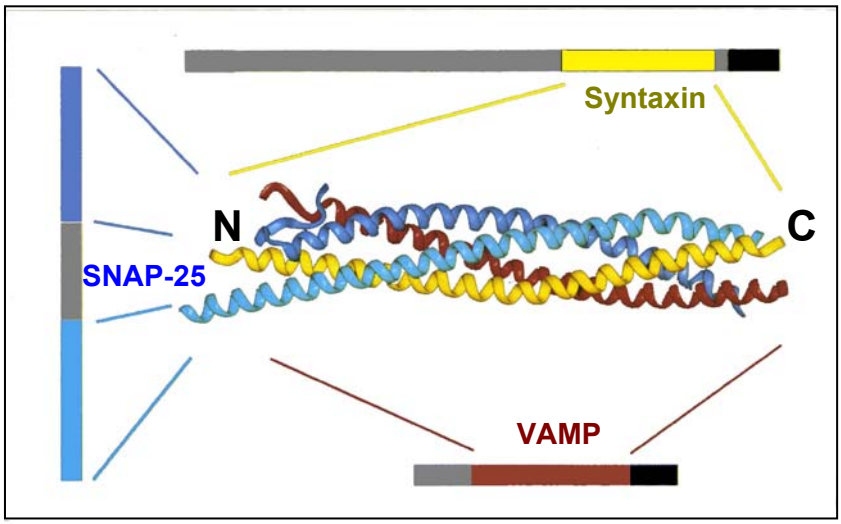

Abb.: 1.4: Minimaler SNARE-Komplex
modifiziert nach Rizo und Südhof, 1998
N = N-terminal, C = C-terminal

Dieser minimale SNARE-Komplex wird aus vier helikalen Bündeln eines VAMP- und eines Syntaxinstranges sowie zwei SNAP-25-Strängen gebildet, wobei die interagierenden Seitenketten der jeweiligen Proteine in Schichten zusammengelagert sind. Die Sequenzen dieser Schichten in SNARE-Komplexen aus unterschiedlichen Kompartimenten sind hoch konserviert und bestehen im Zentrum aus einer asymmetrischen ionischen Schicht, bestehend aus einem Arginin (R) und drei Glutaminresten (Q).

Deswegen werden die entsprechenden Proteine auch als Q- oder R-SNAREs bezeichnet (Fasshauer et al., 1998b). Dieser ionische Bereich wird von den benachbarten hydrophoben Schichten, die nach einem Leucinzippermodell angeordnet sind, gegen Wassermoleküle abgeschirmt. Mutationen in den zentralen Schichten reduzieren die Komplexstabilität und verursachen bei sogar verwandten SNAREs Defekte im Membrantransport (Fasshauer et al., 1998b; Ossig et al., 2000). Beispielsweise kann der SNARE-Komplex enzymatisch nicht dissoziiert werden, wenn der Glutaminrest von Syntaxin gegen Arginin oder Alanin substitu-

iert wird (Scales et al., 2001). Alle bekannten t-SNAREs sind Q- und die meisten v-SNAREs sind R-SNAREs (Fasshauer et al., 1998b).

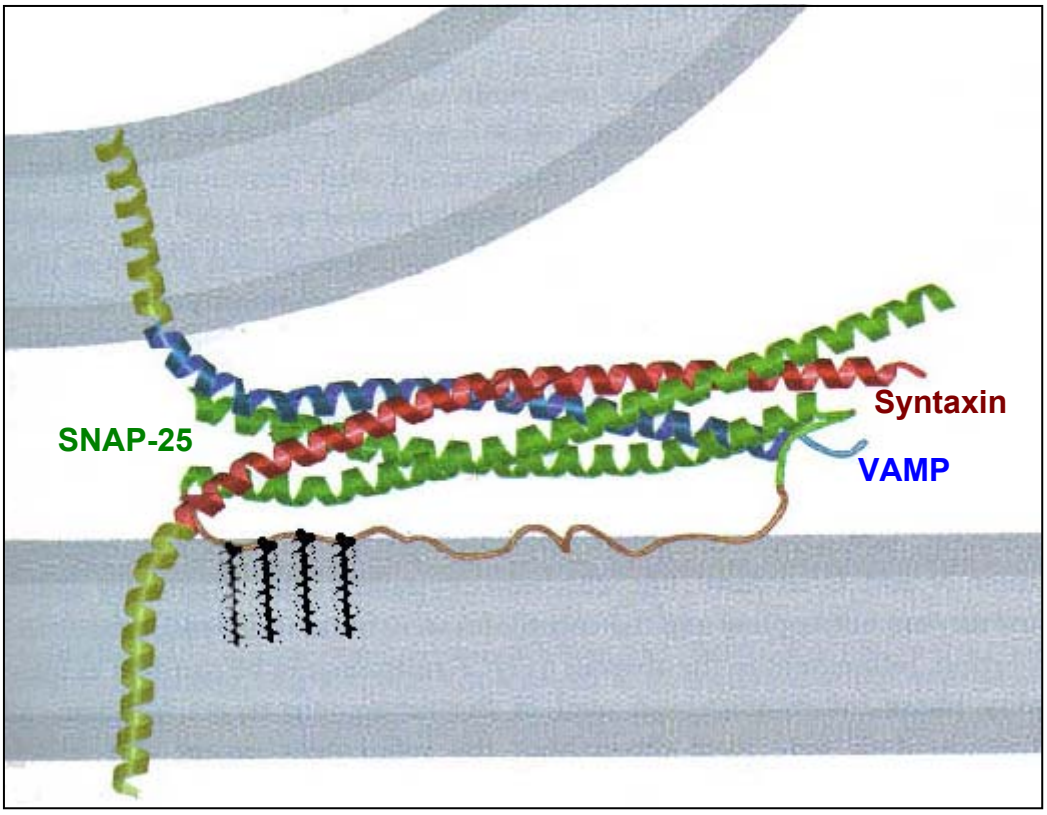

Abb. 1.5: Modell des SNARE-Komplexes
mit den Transmembranregionen von VAMP und Syntaxin und dem Loop von SNAP-25, in dem sich die für die Membranbindung wichtigen Fettsäuren befinden (modifiziert nach Sutton, 1998)

In vivo wird die spontane Bildung eines Komplexes die gegenüberliegenden Membranen verbinden und nah zusammenziehen, so dass ein *trans*-Komplex entsteht (vgl. Abbildung 1.5). Nach der Fusion der Lipidschichten entspannen die Komplexe in *cis*-Orientierung, in der alle Proteine mit derselben Membran verankert sind (Hanson et al., 1998; Lin und Scheller, 1997; Weber et al., 1998; Ungermann et al., 1998). Dieser *cis*-Komplex muss *in vivo* für zukünftig erfolgende Fusionen wieder gespalten werden, wogegen der *trans*-Komplex nicht gespalten wird (Weber et al., 2000).

Die enzymatische Spaltung des *cis*-SNARE-Komplexes erfolgt im Zellsystem durch ein Zusammenspiel von NSF und α-SNAP (Otto et al., 1997; Ungermann et al., 1998). NSF gehört zur Familie der ATPase-assoziierten Proteine mit unterschiedlichen zellulären Aktivitäten und liegt als Hexamer mit drei Domänen pro Untereinheit (D2, D1 und N) vor. Die beiden D-Domänen enthalten jeweils eine ATP-Bindungsstelle, von der jedoch nur die der

D1-Domäne katalytisch aktiv ist, während die der D2-Domäne für die Oligomerisierung der Hexamere verantwortlich ist. Über die N-Domäne ist NSF mit α-SNAP verbunden und ebenfalls mit dem N-terminalen Bereich des SNARE-Komplexes, der möglicherweise in einen Hohlraum in der Mitte der D-Hexamere eintaucht (Abbildung 1.6). Unter ATP-Verbrauch wird der Komplex durch Drehung von NSF und α-SNAP als eine Art Hebel auseinander gezwungen (Übersichtsartikel von Fasshauer und Jahn, 2000).

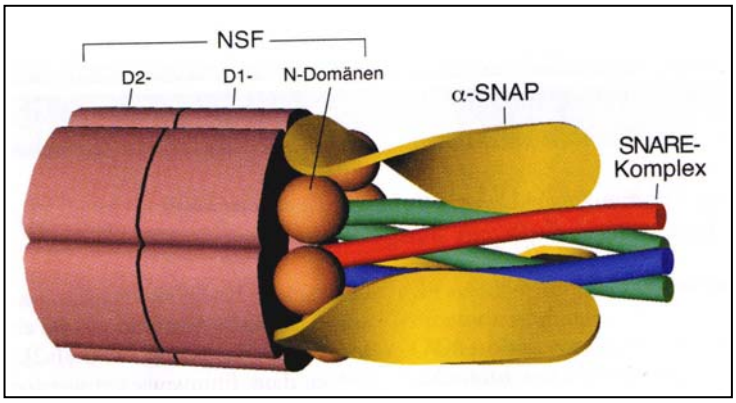

Abb. 1.6: Enzymatische Spaltung des SNARE-Komplexes durch NSF und α-SNAP
Modell von Fasshauer und Jahn, 2000

Auch enzymatische Spaltungen *in vitro* unter Zugabe von ATP und Magnesiumchlorid wurden beschrieben (Söllner et al., 1993b; Hayashi et al., 1995). Dazu wurden die aus Bakterienzellen exprimierten und durch Affinitätschromatographie gereinigten SNARE-Proteine zusammengegeben und der gebildete Komplex gereinigt. Dieser wurde dann mit NSF, α-SNAP, Magnesiumchlorid und ATP versetzt, und es konnte eine Dissoziation dieses Komplexes beobachtet werden.

SNAP-25, Syntaxin und VAMP wurden in Bakterienzellen exprimiert und gereinigt. Struktur-untersuchungen ergaben, dass SNAP-25 und VAMP als Einzelmoleküle unstrukturiert vorliegen, während Syntaxin eine α-helikale Struktur aufweist (Fasshauer et al., 1997b). Bei SNAP-25 lässt sich durch die Bindung zu Syntaxin und durch erhöhten Salzgehalt von ein- oder zweiwertigen Salzen, wie Natrium- und Magnesiumchlorid, in der Probe eine helikale Struktur induzieren. Erst eine Konformationsänderung von SNAP-25 kann zur Bildung des SNARE-Komplexes führen, an dem zwei parallele Stränge (1-83 +120-206) des Proteins beteiligt sind. Diese Stränge sind über einen unstrukturierten Bereich von 36 Aminosäuren (Margittai et al., 2001) miteinander verbunden (siehe Abbildung 1.5). Sie bestehen aus Heptad-Wiederholungen (Gonzalo et al., 1999; Chapman et al. 1994), bei denen sich nach sieben Aminosäuren eine ähnliche Sequenz wiederholt. In der unstrukturierten Linkerregion

befindet sich die Palmitoylierungsdomäne mit den vier Cysteinresten, die die Ziele für die Palmitoylierung sind.

Für Syntaxin sind drei Konformationen bekannt: ungebunden, an nSec1 gebunden und im SNARE-Komplex gebunden, während für SNAP-25 und VAMP nur der unstrukturierte und somit ungebundene und der im SNARE-Komplex gebundene α–helikale Zustand bekannt sind (Dulubova et al., 1999; Fiebig et al., 1999; Hazzard et al., 1999). Eine zusätzliche Bindungsmöglichkeit von Syntaxin und SNAP-25 ist ein binärer SNARE-Komplex der beiden Proteine, in dem sie in einem Verhältnis von 2:1 und ebenfalls α-helikal vorliegen.

Die Exocytose verläuft möglicherweise über die Ausbildung von Fusionsporen. Hua und Scheller (2001) haben beobachtet, dass drei SNARE-Komplexe kooperieren, damit ein Vesikel mit der Membran auf diesem Weg fusionieren kann.
SNARE-Komplexe können oligomerisieren und vor der Fusion eine multimere Struktur eingehen (Hayashi et al., 1995; Pellegrini et al., 1995; Otto et al., 1997; Poirier et al., 1998a). Möglicherweise wird die Oligomerisation des Komplexes durch SNAP-25 ausgelöst. Da SNAP-25 zu dem SNARE-Komplex zwei Stränge beisteuert, die durch einen unstrukturierten Loop miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 1.4), ist es möglich, dass sich der N-terminale Bereich in einem Komplex befindet, während der C-terminale Bereich desselben Moleküls einem anderen Komplex zur Verfügung steht. Durch diese offene Konformation von SNAP-25 stehen zwei Komplexe miteinander in Kontakt. Die leeren SNAP-25-Plätze in den Komplexen werden durch ein anderes SNAP-25 auf die gleiche Weise besetzt (Tokumaru et al., 2001). Diese These wird noch dadurch gestützt, dass der minimale SNARE-Komplex, in dem SNAP-25 ohne Linkerregion vorliegt, nicht oligomerisiert (Margittai et al., 2001). Diese oligomere Komplexbildung scheint durch Complexin, das auch Synaphin genannt wird, über eine Stimulation der SNARE-Komplexbildung und durch Stabilisierung der offenen SNAP-25-Konformation verstärkt zu werden (Tokumaru et al., 2001). Allerdings wurde von anderen Gruppen eine abweichende, durchaus regulatorische Funktion des Complexin beschrieben (Pabst et al., 2000; Reim et al., 2001).

Eine Abhängigkeit des intrazellulären Transports der isolierten Golgimembran von der Anwesenheit von Acyl-CoA, wie Palmitoyl-CoA, wurde beschrieben (Übersicht bei Rothman, 1994). So lässt sich die Entstehung ummantelter Vesikel sowie deren Transport durch ein nicht hydrolysierbares Palmitoyl-CoA-Analogon vollständig inhibieren.
Eine Regulation der Exocytose über Phosphorylierungen der SNARE-Proteine oder ihrer regulierenden Proteine kann auch erfolgen (Lin und Scheller, 2001).

VAMP hat allein zwei potentielle Phosphorylierungsstellen. Syntaxin und SNAP-25 können von der Kasein-Kinase II und der Protein-Kinase A phosphoryliert werden (Risinger und Bennett, 1999). Durch die Phosphorylierung des Syntaxin wird die Interaktion mit Synaptotagmin verstärkt. Wird das Serin187 von SNAP-25 phosphoryliert, inhibiert das geringfügig, aber signifikant die Interaktion mit Syntaxin (Shimazaki et al., 1996).
Die Neurotransmitterausschüttung wird durch Clostridiale Neurotoxine gehemmt. Das sind Toxine, die von den Bakterien *Clostridium botulinum* und *Clostridium tetani* gebildet werden und die neuronalen Erkrankungen wie Tetanus und Botulismus auslösen können (Übersichtsartikel Veit, 1999). Durch diese Toxine wird die Bildung des SNARE-Komplexes empfindlichst gestört, weil die einzelnen SNARE-Proteine proteolytisch abgebaut werden, bevor sie den Komplex ausbilden können (Niemann et al., 1994; Schiavo et al., 1994; Ahnert-Hilger und Bigalke, 1995). VAMP wird durch die Tetanus-Toxine G, B, D und F, Syntaxin durch Botulinum-Toxin C und SNAP-25 durch Botulinum-Toxin A und E an unterschiedlichen Stellen gespalten.

1.2 SNAP-25

SNAP-25 wurde 1989 von Oyler et al. als synaptosomal-assoziiertes Protein identifiziert, das in unterschiedlichen neuronalen Bereichen des Nervensystems exprimiert wird. Es ist 25 kDa groß, besteht aus 206 Aminosäuren und einem zentralen Kluster aus vier benachbarten Cysteinresten. 1992 wurde von Hess et al. bereits gezeigt, dass das Protein einen durch Palmitoylierung der Cysteinreste hydrophoben Anteil erhält.

Es gibt zwei Isoformen von SNAP-25, a und b, die zu 96% homolog sind und deren Cysteinmuster sich unterscheiden. Jedoch besitzen sowohl Isoform a als auch b im zentralen Bereich des Moleküls jeweils vier Cysteinreste (Abbildung 1.7). Beide Isoformen befinden sich in den neuronalen Zellen und entstehen durch alternatives Spleißen des Exon 5 des SNAP-25-Gens (Puffer et al., 2001).

Die Verteilungen der Isoformen in der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung bei Mäusen unterscheiden sich allerdings. Isoform a wird hauptsächlich in der embryonalen Entwicklung exprimiert und Isoform b im Gehirn der adulten Maus. Beide Isoformen sind sieben Tage nach der Geburt in gleicher Verteilung im Gehirn der Maus zu finden. Während Isoform b in Neuronen die überwiegende Spezies ist, ist in differenzierten und nicht differenzierten PC12-Zellen die Isoform a dominant. Nach der Differenzierung der PC12-Zellen

durch Zugabe des Nervenwachstumsfaktors (NGF) steigt die Menge beider Isoformen an, aber die Isoform a bleibt weiterhin im Überschuss vorhanden.

In unterschiedlichen Zellkompartimenten befinden sich jeweils verschiedene SNAP-25-Homologe. Eine Übersicht über sämtliche Homologe einer Zelle gibt Abbildung 1.3. Die Palmitoylierungsbereiche einiger Homologe sind in Abbildung 1.7 gezeigt.
SNAP-23 befindet sich ebenfalls in neuronalen Zellen, aber in geringeren Mengen als SNAP-25, zusätzlich jedoch noch in sekretorischen Granulozyten und polarisierten Epithel- und Hepatomazellen (Chen et al., 1999b). Die Palmitoylierungsregion und somit die Cysteinanordnung von SNAP-23 ist der von SNAP-25 recht ähnlich. Allerdings hat SNAP-23 einen zusätzlichen Cysteinrest in der Palmitoylierungsregion und einen weiteren in Position 113 (Vogel und Roche, 1999; Steegmaier et al., 1998). Syndet, das zu SNAP-23 zu 87% identisch ist und fünf zentrale Cysteinreste besitzt, scheint an der Oberfläche der Plasmamembran von Adipozyten ebenso an der Exocytose mit Syntaxin-4 und VAMP-2 beteiligt zu sein wie SNAP-25 in Neuronen und vermittelt die Insulin-abhängige Exocytose der mit Glukosetransportern besetzten Vesikel (Koticha et al., 1999).

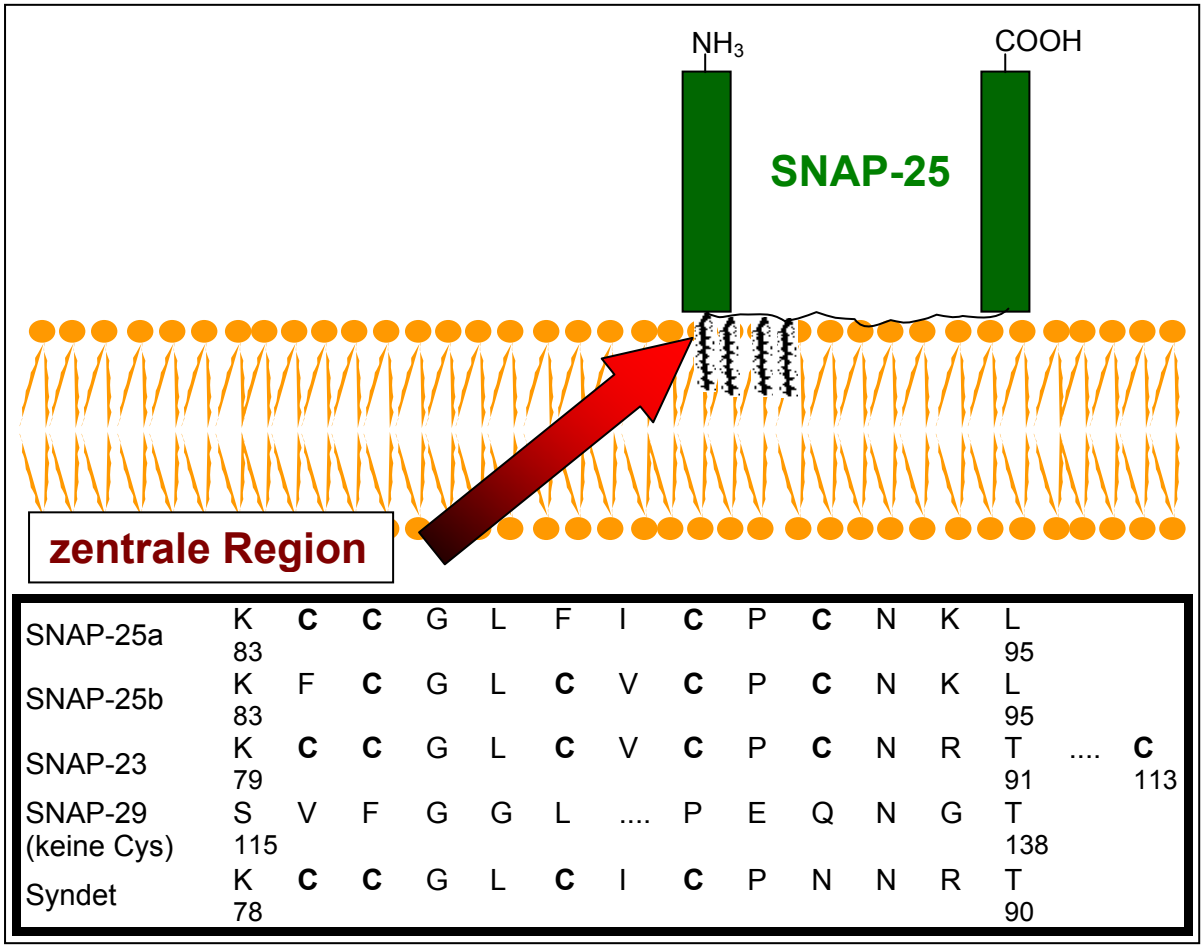

Abb. 1.7: Zentrale Region mit Palmitoylierungsbereich von SNAP-25, seinen Isoformen und einigen Homologen
SNAP-29 besitzt keine Cysteinreste und ist daher nicht palmitoyliert.

SNAP-29 beispielsweise befindet sich auf den Membranen des Golgi-Apparates, des *trans*-Golgi-Netzwerkes, auf den Endosomen und der Plasmamembran und ist somit in eine Vielzahl von Transportschritten involviert (Steegmaier et al., 1998). SNAP-29 ist allerdings nicht palmitoyliert, da es keine Cysteinreste besitzt.
In den späten Endosomen gibt es einen SNARE-Komplex, an dem vier Proteine beteiligt sind, von denen zwei jeweils zu dem N- und C-Terminus von SNAP-25 homolog sind, Vti1b und Syntaxin 8 (Antonin et al., 2000). Das lässt vermuten, dass der palmitoylierte Linkerbereich für die Exocytose in den späten Endosomen und der Bildung dieses Komplexes nicht notwendig ist.

SNAP-25 kann an VAMP nicht ohne Syntaxin binden, aber an Syntaxin in Abwesenheit von VAMP. Weitere Bindungspartner von SNAP-25 sind u. a. Hrs-2 (Bean et al., 1997; Tsujimoto et al., 1999), das mit Kalzium interagierende Synaptotagmin, das innerhalb des C-Terminus von SNAP-25 bindet (Gerona et al., 2000), und Intersectin (Okamoto et al., 1999).

1.3 Hydrophobe Proteinmodifikationen

Viele Proteine werden während oder nach ihrer Synthese modifiziert. Eine wichtige Modifizierung neben der Phosphorylierung (Turner et al., 1999), Glykosilierung und proteolytischen Spaltung ist die hydrophobe Modifizierung mit Fettsäuren.
Obwohl bereits der erste Bericht über Proteine mit kovalent gebundenen Fettsäuren am Beginn der fünfziger Jahre erschien (Folch-Pi und Lees, 1951), konnten erst Ende der siebziger Jahre entscheidende Fortschritte durch die Markierung von viralen Proteinen mit radioaktiven Fettsäuren erreicht werden (Bracha et al., 1977; Schmidt et al., 1979; Schmidt und Schlesinger, 1979). Kurz nach dieser Entdeckung gelang auch die Identifizierung zellulärer Proteine mit kovalent gebundenen Fettsäuren (Schlesinger et al., 1980; Omary und Trowbridge, 1981).
Verschiedene Formen der hydrophoben Proteinmodifikation werden durch Lipidart und Modifizierungsort unterschieden, nach Myristoylierung, Isoprenylierung, kovalenter Modifikation mit Glykolipiden und S-Acylierung (Magee und Courtneidge, 1985; Cross, 1987; Übersichtsartikel Schultz et al., 1988;Grand, 1989; Deschenes et al., 1990; Übersicht bei Schlesinger, 1992; Casey, 1995; Übersichtsartikel Resh, 1999; Qanbar und Bouvier, 2002).
Die Schwefelacylierung, die auch wegen der Verknüpfung hauptsächlich mit Palmitinsäure als Palmitoylierung bezeichnet wird, steht im Mittelpunkt dieser Arbeit und wird im Folgenden ausführlich beschrieben. Es finden sich jedoch auch andere Fettsäuren, wie Arachidonsäure, Ölsäure, Stearinsäure und Eikosapentainsäure in signifikanten Mengen in einer Thioacylie-

rung (Schmidt et al., 1979; Muszbeck und Laposata, 1993; Hallak et al., 1994b; Zeng et al., 1995).

1.3.1 Palmitoylierung

Die Palmitoylierung (vgl. Abbildung 1.8) ist einzigartig unter den hydrophoben Lipidmodifikationen von Proteinen, da sie reversibel ist und dadurch das Potential hat, regulierbar zu sein (Mumby, 1997). Sowohl die Prenylierung als auch die Myristoylierung sind irreversibel.

Während die Myristoylierung durch kovalente Verknüpfung über Amidbindungen an N-terminale Glycinreste und die Prenylierung über eine stabile Thioetherbindung an Cysteinreste erfolgt, ist die Palmitinsäure kovalent über Thioesterbindungen an Thiolgruppen von Cysteinresten verknüpft. Schon früh wurde festgestellt, dass es sich bei der Palmitoylierung um eine kovalente Esterbindung handelt (Folch-Pi und Lees, 1951; Stoffyn und Folch-Pi, 1971; Schmidt et al., 1979; Schmidt und Schlesinger, 1979; Schmidt, 1982; Magee und Schlesinger, 1982). Zunächst war jedoch nicht klar, ob die Verknüpfung der Palmitinsäure über einen Schwefel- oder Sauerstoffrest erfolgt. Es zeigte sich, dass bei neutralem pH-Wert durch Behandlung mit Hydroxylamin die Fettsäuren in den meisten Fällen abgespalten werden konnten, was darauf hindeutet, dass hauptsächlich Thioesterbindungen vorlagen, da sich die meisten Oxyesterbindungen unter diesen Bedingungen nicht spalten lassen (Magee et al., 1984). Die Acylierung über Thioesterbindungen konnte schließlich mit Hilfe biochemischer (Schmidt et al., 1988; Mack und Kruppa, 1988) und molekularbiologischer Experimente (Gaedigk-Nitschko et al., 1990; Gaedigk-Nitschko und Schlesinger, 1991; Veit et al., 1991; Kawate und Menon, 1994) bestätigt werden. Bei den meisten molekularbiologischen Acylierungsnachweisen wurden die Cysteine eines Proteins mittels gerichteter Mutagenese gegen Serine substituiert, das Protein exprimiert und metabolisch mit radioaktiver Fettsäure markiert. Damit konnte gezeigt werden, dass Proteine ohne Cysteinreste keine Fettsäuren einbauen, während bei jenen mit Cysteinresten der Einbau erfolgt. Allerdings wurde auch eine Palmitoylierung an Serinresten beobachtet (Gebhard et al., 1984; Jing und Trowbridge, 1990).

Für metabolische Markierungen werden radioaktive Fettsäuren mit unterschiedlichen Isotopen verwendet. Das gängige Isotop ist Tritium (^{3}H), aber auch der Einsatz von iodiertem Palmitat mit dem Isotop ^{125}I wurde beschrieben (Berthiaume et al., 1995), das sich u. a. aufgrund einer schwierigen Herstellungsprozedur und einer kurzen Halbwertszeit nicht durchgesetzt hat.

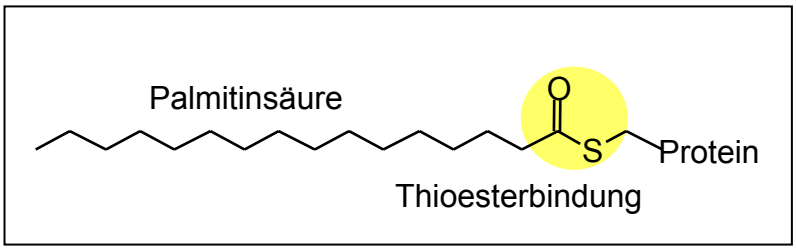

Abb. 1.8: Schema der Palmitoylierung

Die Anzahl der als palmitoyliert beschriebenen Proteine ist groß. Viele sind im Nervensystem zu finden und an unterschiedlichen Prozessen wie z. B. der Signaltransduktion und Zelladhäsion beteiligt. Da der Palmitinrest hydrophob ist, steigt durch diese Modifikation die Affinität des Proteins zu Membranen. Demnach kann es peripher durch seinen Lipidanker mit der Membran assoziiert sein (Towler et al., 1988). Palmitoylierung erfolgt bis auf wenige Ausnahmen entweder in Verbindung mit Myristoylierung, Prenylierung oder in der Nähe von hydrophoben Sequenzen vermeintlicher Transmembranbereiche auf cytosolischer Seite (Bhatnagar und Gordon, 1997; Yalovsky et al., 1999). Zu den Ausnahmen zählen u. a. die neuronalen Proteine SNAP-25 (Veit et al., 1996) und seine Homologe SNAP-23 (Chen et al., 1999) und Syndet (Koticha et al., 1999) sowie einige Gα-Untereinheiten (Wedegaertner et al., 1993; Übersichtsartikel Dunphy und Linder, 1998; Bhattacharyya und Wedegaertner, 2000), und GAP-43 (Liu et al., 1993; Patterson und Skene, 1994; Laughlin und Denny, 1999). Tabelle 1.1 gibt eine Übersicht über eine Auswahl unterschiedlich palmitoylierter Proteine, geordnet nach der Art ihrer Lipidmodifikationen und peripheren oder integralen Membranständigkeit.

Die Anwesenheit eines Cysteinrestes in der Nähe einer Transmembranregion auf cytosolischer Seite eines Proteins ist allerdings nicht ausreichend für eine erfolgreiche Palmitoylierung. Eine weitere notwendige Voraussetzung scheint die Sequenz in der Umgebung dieses Proteins zu sein. Am Beispiel des normalerweise nicht acylierten Fusionsproteins des Sendai-Virus konnte gezeigt werden, dass das Einfügen eines Cysteinrestes in die putative Acylierungsregion für eine Acylierung nicht ausreicht (Ponimaskin, 1994; Ponimaskin und Schmidt, 1995). Jedoch konnte auch durch Sequenzvergleiche keine Konsensus-Sequenz für die Palmitoylierung, sondern lediglich eine Anreicherung von Phenylalanin und Glycin in dieser Region gefunden werden. Eine autokatalytische Palmitoylierung artifizieller Peptide wird durch positiv geladene und hydrophobe Reste verstärkt und durch negativ geladene Aminosäuren eher inhibiert (Wolff et al., 2000). Tatsächlich zeigten einige Studien, dass die Aminosäurereste, die die Palmitoylierungsregion flankieren, die Palmitoylierungsrate und -effizienz beeinflussen (Bizzozero et al., 2001; Belanger et al., 2001).

Periphere Membranproteine	S-Acylierung	Myristoylierung	Prenylierung
SNAP-25 und Homologe*	+	-	-
$G\alpha_s$, α_{12}, α_{13}, α_q*	+	-	-
GAP-43*	+	-	-
Csp[1]	+	-	-
PSD-95[2]	+	-	-
„Non-Receptor Tyrosin Kinases“[3]: Lck, Fyn, Yes, Lyn, Hck, Yrk, Fgr	+	+	-
eNOS[4a],Vac8p[4b]	+	+	-
$G\alpha_i$, α_o, α_z*	+	+	-
Ca^{2+}-abhängige Protein Kinase [5]	+	+	-
„A-Kinase Anchoring Protein“ 15/18[6]	+	+	-
Ha-Ras, N-Ras[7]	+	-	**C15**
[8]Paralemmin	+	-	**C15**
Transmembranproteine			
Synaptotagmin[9]	+	-	-
Synaptobrevin[10]	+	-	-
Cavaeolin-1[11]	+	-	-
TGF-α[12]	+	-	-
Virale Proteine wie HEF[13], HA[14] (Influenza), SFV-E1[14], HIV-1 Envelope Glycoprotein[15]...	+	-	-
CD4[16], CD8β[17], CD36[18]	+	-	-
7-Transmembran-Rezeptoren wie Rhodopsin[19], Serotonin[20], D_1[21], Endothelin A/B[22], 5-HT_4[23]...	+	-	-
Pro-Tumor-Nekrose-Faktor[24]	+	-	-

Tab.: 1.1: Einige Proteine mit hydrophoben Modifikationen sortiert nach peripheren oder integralen Membranproteinen *s. Text;[1]Gundersen et al., 1994 ; [2]Topinka und Bredt, 1998; [3]Koegl et al., 1994; [4a]Robinson und Michel, 1995; [5]Martin und Busconi, 2000; [6]Gray et al.,1998,Fraser et al., 1998; [7]Coats et al., 1999, Hancock et al., 1989; [8]Veit et al., 2001; [9]Heindel, 2001, Veit et al., 1996; [10]Veit et al., 2000b; [11]Dietzen et al., 1995; [12]Shum et al., 1996; [13]Reverey et al., 1996; [14]Veit et al., 1996b; [15]Rousso et al., 2000; [16]Crise und Rose, 1992; [17]Arcaro et al., 2000; [18]Tao et al., 1996; [19]Ovchinnikov et al., 1988, Karnik et al., 1993; [20]Ng et al., 1993; [21]Ng et al., 1994; [22]Horstmeyer et al., 1996, Okamoto et al., 1997; [23]Ponimaskin et al., 2001; [24]Utsumi et al., 2001

Für eine Kombination aus Myristoylierung oder Prenylierung mit Palmitoylierung an einem Protein existieren durchaus Konsensus-Sequenzen für die Acylierung (Schroeder et al., 1996; Veit und Schmidt, 1998). Periphere Membranproteine werden beispielsweise oft am

N-Terminus, an den Aminosäuren mit der Sequenz MGCXXS sowohl myristoyliert als auch acyliert.

Die Verknüpfung der Proteine mit Palmitinsäure erfolgt posttranslational an den Membranen. Bei einer Blockade der *de novo*-Proteinsynthese mit Cycloheximid wird für viele Proteine eine Fettsäureanlagerung unterbunden. Für andere Proteine konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Acylierung zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt, und Fettsäuren vom Protein abgespalten und wieder angehängt werden können (Omary und Trowbridge, 1981; Magee et al., 1987; Staufenbiel, 1988; Berthiaume et al., 1994). Als Orte der Palmitoylierung gelten das Endoplasmatische Retikulum (Berger und Schmidt, 1985; Rizzolo und Kornfeldt, 1988), der *cis*-Golgi-Apparat (Dunphy et al., 1981; Quinn et al., 1983) und Transportvesikel zwischen diesen Kompartimenten (Bonatti et al., 1989), aber ebenso auch die Plasmamembran (Olson und Spizz, 1986; Walser und Deppert, 1989). Acylierende Aktivitäten konnten ebenfalls in Erythrozyten, die nur Oberflächenmembranen besitzen, und an Plazentamembranen beobachtet werden (Staufenbiel, 1987; Schmidt et al., 1995; Das et al., 1992 und 1997; Bhattacharyya et al., 1999).
Ein Protein kann u. a. neben kotranslationaler Myristoylierung (Galbiati et al., 1994; Hallak et al., 1994a; Koegl et al., 1994; Robbins et al., 1995) oder Prenylierung (Jung et al., 1995) auch durch Bindung an ein anderes Protein im Zytoplasma an die Membran gelangen. Beispielsweise wird die erste Assoziation der nicht myristoylierten $G\alpha_s$-Untereinheit mit der Membran, an der die Palmitoylierung erfolgt, durch ihre Bindung an die Untereinheiten β und γ vermittelt (Degtyarev et al., 1994). Ein in Hefe identifiziertes Membranprotein, Shr5p, spielt eine Rolle bei der Lenkung der Ras-Proteine an die Membran, wo sie dann palmitoyliert werden (Jung et al., 1995; Bhatnagar und Gordon, 1997). Wenn ein Protein nicht auf den erwähnten Wegen zur Membran gelangt, kann es nicht palmitoyliert werden und verbleibt im Cytosol (Robinson und Michel, 1995; Bhattacharyya und Wedegaertner, 2000; Washbourne et al., 2001).

Es konnte durch thermodynamische Messungen der Interaktionen von myristoylierten Proteinen mit Modellmembranen gezeigt werden, dass die Hydrophobizität dieses Lipidrestes allein kaum für eine stabile Membranbindung ausreicht (Peitzsch und McLaughlin; 1993), so dass dafür die Acylierung mit der längerkettigen Palmitinsäure benötigt wird.

Wie die Acylierung genau funktioniert, ist noch nicht vollständig geklärt. Mechanismen der Autoacylierung und enzymatischen Acylierung werden diskutiert. An der S-Acylierung und der Depalmitoylierung von Proteinen beteiligte Enzyme sind mit der zellulären Membran assoziiert und werden als Proteinacyltransferasen (PAT) und als Acylproteinthioesterasen

(APT) bezeichnet (Bhatnagar und Gordon, 1997; Yeh et al., 1999; Devedjiev et al., 2000; Wang et al., 2000), wobei letztere für die Deacylierung zuständig sind (Camp et al., 1994; Vesa et al., 1995; Soyombo und Hofmann, 1997; Duncan und Gilman, 1998; Veit und Schmidt, 2001). Während die Struktur und Wirkungsweise der N-Myristoyl-Transferase (NMT) aus vielen verschiedenen Organismen, vom Pilz bis zum Menschen, bereits ausführlich beschrieben wurden (Übersicht bei Resh, 1999), ist über die PAT wenig bekannt, da sie bei ihrer Reinigung, wie z. B. im Fall der Protein-Fettsäure-Acyltransferase aus der humanen Plazentamembran, schnell ihre enzymatische Aktivität verliert (Schmidt und Burns, 1989, 1991). Es gibt aber auch Berichte über partiell oder vollständig aufgereinigte enzymatisch aktive PAT (Berthiaume und Resh, 1995; Dunphy et al., 1996; Liu et al., 1996; Das et al., 1997; Ueno und Suzuki, 1997), von denen sich eine bei weiteren Charakterisierungen und Sequenzvergleichen als Thiolase herausstellte (Qanbar und Bouvier, 2002). Die gewonnenen PAT-Aktivitäten konnten bereits für zellfreie Assays erfolgreich zur Acylierung verschiedener, chemisch deacylierter oder unacyliert synthetisierter Substrate eingesetzt werden (Berger und Schmidt, 1984; Mack et al., 1987; Schmidt und Burns, 1989; Veit et al., 1998).
Einige Proteine oder Peptide, wie z. B. manche Gα-Untereinheiten (Duncan und Gilman, 1996), das c-Yes-Peptid (Bano et al., 1998), Tubulin (Wolff et al., 2000) oder das G-Protein-Signal regulierende RGS-Protein (Tu et al., 1999), sind *in vitro* in der Lage durch Zugabe von großen Mengen Palmitoyl-CoA sich selbst zu acylieren. Die Reaktion der Autoacylierung wird durch einen hohen pH-Wert und die Abwesenheit reduzierender Agenzien gefördert. Bizzozero et al. (2001) haben Autoacylierungsversuche mit unterschiedlichen kleinen Peptiden durchgeführt, die ein oder mehrere Cysteinreste enthalten.

Es konnte gezeigt werden, dass basische Aminosäuren den nukleophilen Angriff der Autoacylierung besser stabilisieren und dass die Reaktionsgeschwindigkeit abhängig von der Konzentration des Thiolatanions ist. Die physiologische Relevanz einer Autoacylierung ist allerdings bisher nicht geklärt. Viele Charakteristika der nicht enzymatischen Palmitoylierung sind ähnlich denen der erwarteten enzymatischen Aktivität, wie z. B. eine Abhängigkeit von Zeit und Substratkonzentrationen sowie die Gegenwart von Myristat im Zielprotein oder -peptid. Demgegenüber liefern die langsame Reaktionskinetik der Autoacylierung unter physiologischen Bedingungen (Dunphy et al., 2000), die Existenz von Sequenzspezifitäten und Inhibitoren der S-Acylierung Argumente für einen enzymatischen Prozess (Resh, 1999). Als *in vivo*-Inhibitoren der Palmitoylierung gelten Cerulenin und seine Derivate (Schlesinger und Malfer, 1982; Lawrence et al., 1999), polyungesättigte Fettsäuren, 2-Bromopalmitat (Webb et al., 2000) und Tunicamycin und seine Analoga (Appukuttan und Wu, 1989; Patterson und Skene, 1994).

Die biologische Funktion der Palmitoylierung ist weitgehend ungeklärt, jedoch wurden Regulationen an einem breiten Spektrum zellulärer Prozesse einschließlich des intrazellulären Proteintransports, bestimmter Protein-Protein-Interaktionen und der Signaltransduktion beschrieben (Glick und Rothman, 1987; Schmidt, 1989; James und Olson, 1990). In den meisten Untersuchungen zur Funktion wurden Mutanten eingesetzt, in denen die Cysteine durch andere Aminosäuren ersetzt werden. Nachteil dieses Ansatzes ist, dass nicht unterschieden werden kann, ob die beobachtete Änderung in der Funktion tatsächlich an dem Fehlen des Palmitin- oder des Cysteinrestes liegt (Bizzozero et al., 1994). Die untersuchten Proteine waren, sofern sie keine Transmembranregion oder eine andere hydrophobe Modifikation besaßen, nicht mehr membrangebunden, sondern cytosolisch (Mumby et al., 1994; Grassie et al., 1994; Galbiati et al., 1994; Hallak et al, 1994a; Resh, 1996; Song und Dohlmann, 1996). Da die Palmitoylierung ein dynamischer Prozess ist, ein acyliertes Protein durch die APT deacyliert und durch die PAT wieder acyliert werden kann oder sich selbst acyliert und die Halbwertszeit der Palmitoylierung oft wesentlich kürzer ist als die des Proteins (Schweizer et al., 1996; Lane und Liu, 1997), hat diese Proteinmodifikation möglicherweise eine regulatorische Wirkung. Im Hirn-Homogenat befindet sich z. B. ein Pool an nicht acylierten Proteinen, die durch Inkubation mit Palmitoyl-CoA acyliert werden können (Bizzozero und Lees, 1986).

Viele untersuchte Funktionen bestehen in der Regulation der Protein-Protein-Interaktionen durch Palmitoylierung. Die cysteinfreie Mutante der Gαq-Untereinheit scheint nicht mit dem M1-Muskarincholinrezeptor oder der Phospholipase C interagieren zu können, obwohl die Interaktion mit der nicht palmitoylierten aber Cystein enthaltenden Untereinheit erfolgt. Das bedeutet, dass die Palmitoylierung in diesem Fall Protein-Protein-Interaktionen inhibiert (Hepler et al., 1996). Gut untersucht wurde auch, dass die Aktivierung der Gαs-Untereinheit durch Stimulierung des β-adrenergen Rezeptors zu einem erhöhten Palmitatumsatz führt (Degtyarev et al., 1994; Mumby et al., 1994; Wedegaertner und Bourne, 1994). Durch die Aktivierung dissoziiert die α- von den $\beta\gamma$-Untereinheiten und wird depalmitoyliert, wodurch entweder eine Translokation der α-Untereinheit ins Cytosol unmittelbar nach der Rezeptoraktivierung (Wedegaertner et al., 1995; 1996) oder eine Anreicherung in Plasmamembran-Unterdomänen (Huang et al., 1999) erfolgt. Eine GTP-Hydrolyse, Reassoziation der Untereinheiten und Palmitoylierung von αs schließt sich an (Iiri et al., 1996). Die Menge der palmitoylierten Gα-Untereinheit vor und nach der Stimulation ändert sich nicht (Jones et al., 1997).

Auch die funktionelle Oligomerisierung der fünf Untereinheiten des nikotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR) geschieht nicht ohne Palmitinreste (Olson and Glaser, 1984). Die Konformation des Myelin-Proteolipid-Proteins ändert sich ebenfalls nach Entfernen der

Fettsäure, so dass die funktionell aktiven Komplexe in Form von Penta- oder Hexameren nicht ausgebildet werden können (Bizzozero und Lees, 1986).
Als weitere Funktion der Palmitoylierung wurde die Translokation von Proteinen zu der Plasmamembran oder zu Unterdomänen der Plasmamembran beschrieben. Die Thioacylierung von beispielsweise der $G_{o1}\alpha$-Untereinheit des G-Proteins ist für die Zielsteuerung zu seinem Bestimmungsort, den Caveolae, essentiell (Guzzi et al., 2001). Ebenso notwendig ist die Acylierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) für ihre Zielsteuerung zu den Caveolae der Plasmamembran (Shaul et al., 1996).

1.4 Palmitoylierung von SNAP-25

Bei der S-Acylierung von SNAP-25 (Hess et al., 1992, Oyler et al., 1989) handelt es sich um die kovalente Assoziation ausschließlich mit Palmitinsäure, was nach Hydroxylaminbehandlung und Dünnschichtchromatographie von Veit et al. (1996) gezeigt werden konnte. Wird von SNAP-25 die cysteinreiche Region deletiert, wird es nicht palmitoyliert und liegt in Säugerzellen nicht membrangebunden vor. Die Palmitoylierungsdomäne von SNAP-25 scheint für die Membranassoziation eines neusynthetisierten Proteins in Säugerzellen erforderlich zu sein. Palmitoyliertes SNAP-25 verbleibt auch noch nach Extraktion mit hoher Salzkonzentration membrangebunden.

Die vier Cysteinreste im zentralen Bereich von SNAP-25 sind die einzigen Cysteinreste im gesamten Molekül. Die darüber erfolgende Palmitoylierung ist reversibel. Die Halbwertszeit der Palmitoylierung von SNAP-25 in neuronalen PC12-Zellen wird auf etwa 3 Stunden geschätzt, während die des Proteins bei etwa 8-10 Stunden liegt (Lane und Liu, 1997). Das Ergebnis zeigt, dass der Umsatz der Palmitoylierung in diesen Zellen schneller ist als der des Proteins. Möglicherweise erfolgt über die Dynamik der Palmitoylierung die Modulierung der Bindung von SNAP-25 an die Membran oder an Syntaxin. Ein neu synthetisiertes SNAP-25-Molekül wird innerhalb 20 min nach der Biosynthese palmitoyliert (Gonzalo und Linder, 1998).
Alle vier Cysteinreste sind wichtig für die Palmitoylierung in Säugerzellen, da Substitutionen jeweils eines einzelnen Cysteins gegen andere Aminosäuren, wie Alanin oder Serin, die Palmitoylierungsrate im Vergleich zum Wildtyp um mehr als die Hälfte reduzieren (Lane und Liu, 1997). Der Cysteinrest 85 scheint am wichtigsten zu sein, da ohne diesen die relative Palmitoylierung unter 10% liegt. Außerdem kann jeder Cysteinrest palmitoyliert werden. Bisher war jedoch die Stöchiometrie der Palmitinreste nicht nachweisbar. Es wird vermutet, dass nicht alle Cysteine in einem Molekül kovalent mit Palmitinsäure verknüpft sind, da palmitoyliertes SNAP-25 in einer Insulin sekretierenden Zelllinie und im Gehirnzellextrakt von

erwachsenen Ratten Disulfidbrücken ausbilden kann (Sadoul et al., 1997). Diese über Disulfidbrücken verbundenen Dimere konnten unter nicht reduzierenden Bedingungen im Western Blot nachgewiesen werden. Die Zugabe von Cystein modifizierenden Reagenzien, wie NEM, Jodacetamid und Jodacetat blockierte die Bildung dieser Dimere. In Gegenwart von Cystein, das eingesetzt wird, um Thiolgruppen vor Oxidation zu schützen, entstehen ebenfalls Disulfidbrücken.
Die Dimere lassen sich metabolisch mit radioaktiver Fettsäure markieren. Demnach können nicht alle Cysteinreste der SNAP-25 Dimere Disulfidbrücken ausbilden, weil zumindest eines für die ^{3}H-Palmitoylierung zugänglich bleibt. Es scheint, dass sich *in vivo* mindestens zwei SNAP-25-Moleküle in räumlicher Nähe befinden.
In Säugerzellen konnte zwischen dem Grad der Palmitoylierung von SNAP-25 und der Membranbindung ein Zusammenhang erkannt werden. Unterschiedliche Cysteine wurden substituiert und der Einbau von radioaktiver Palmitinsäure im Vergleich zur Membranbindung ermittelt (Lane und Liu, 1997). Es zeigte sich, dass sich die Membranbindung der Mutanten in dem Maße reduzierte in dem auch die Palmitoylierung abnahm.

Während die SNARE-Proteine Syntaxin und VAMP aufgrund ihrer Transmembrandomäne via ER und Golgi-Apparat zur Membran gesteuert werden, ist die Zielsteuerung von SNAP-25, das keine Transmembranregion besitzt, noch nicht vollständig geklärt und wird kontrovers diskutiert. Es wurde vermutet, dass die zentralen Cysteinreste, über die die Fettsäuren kovalent gebunden sind, nicht nur für die Membranbindung sondern auch für die Zielsteuerung verantwortlich sind, da die verschiedenen Isoformen a und b auch unterschiedlich zielgesteuert werden (Bark und Wilson, 1994). Beide Isoformen weisen Differenzen in ihrem Cysteinmuster und dadurch auch in der Palmitoylierung auf. Es könnte also sein, dass sie auch unterschiedliche Bindungseigenschaften in der Interaktion zu den neuronalen Membranen besitzen (Bark, 1993).
Die Zielsteuerung von SNAP-25 folgt dem sekretorischen Weg, da die Behandlung von PC12-Zellen mit Brefeldin A verhindert, dass weder die Plasmamembran erreicht wird noch Palmitoylierung erfolgt (Gonzalo und Linder, 1998).
Die These, dass aufgrund der Fettsäuren die Zielsteuerung von SNAP-25 zur Plasmamembran erfolgt, wird durch eine aktuellere angezweifelt, die besagt, dass SNAP-25 durch ein Helferprotein, möglicherweise Syntaxin dorthin gelangt (Vogel et al., 2000; Gonelle-Gispert et al., 2000) und erst posttranslational palmitoyliert wird (Abbildung 1.9). Gonzalo et al. (1999) haben allerdings beobachtet, dass die Zielsteuerung an die Membran über eine zentrale Domäne von SNAP-25, bestehend aus den Aminosäuren 85-120 des Linkerbereiches, erfolgt. In diesem Fall wäre dieser Prozess unabhängig von einer Interaktion mit Syntaxin, da diese Domäne nicht die Bindungsregion einschließt.

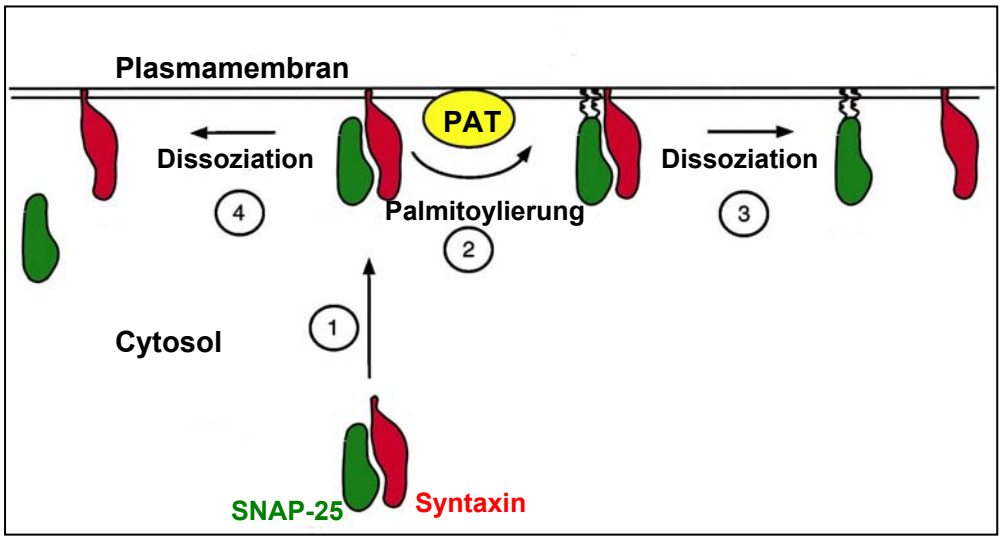

Abb. 1.8: Die Palmitoylierung von SNAP-25 im Zusammenspiel mit Syntaxin modifiziert nach Vogel et al., 2000
SNAP-25 wird durch die Bindung mit Syntaxin, das eine Transmembrandomäne besitzt, an die Membran gesteuert (**1**), wo entweder die Palmitoylierung erfolgt (**2**), SNAP-25 von Syntaxin dissoziiert und durch seine Fettsäureanker an der Membran verbleibt (**3**) oder SNAP-25 unpalmitoyliert von Syntaxin dissoziiert und von der Membran diffundiert (**4**).
PAT = Proteinacyltransferase

In Insulin sekretierenden Zellen ist die Membranbindung von SNAP-25 in Abhängigkeit von der Anzahl der substituierten Cysteinreste stärker als in Säugerzellen (Gonelle-Gispert et al., 2000), eventuell durch seine zusätzliche Bindung an Syntaxin, das in diesen Zellen vorkommt. Auch chemisch deacyliertes SNAP-25 verbleibt in PC12-Zellen an der Membran durch seine Bindung an Syntaxin (Gonzalo und Linder, 1998; Vogel et al., 2000), wie in Abbildung 1.9 dargestellt wird. Gonelle-Gispert et al. (2000) konnten zeigen, dass auch nicht palmitoyliertes cysteinfreies SNAP-25 an der Membran lokalisiert ist, wenn ausreichend Syntaxin als Bindungspartner zur Verfügung steht. Diese Experimente weisen darauf hin, dass die Palmitoylierung für eine Membranbindung von SNAP-25 nicht essentiell ist. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Zellen mit cysteinfreiem SNAP-25 viel weniger Insulin sekretieren.

Die nicht enzymatische Acylierung der Cysteine von SNAP-25 *in vitro* wird durch die Bindung an Syntaxin oder im SNARE-Komplex ca. 100-fach verstärkt (Veit et al., 2000). Vermutlich erfordert die Palmitoylierung eine α-helikale Struktur von SNAP-25, die durch die Bindung an Syntaxin induziert wird.

Dithiothreit (DTT) verstärkt die Autoacylierung von SNAP-25 wahrscheinlich durch Reduzierung der Disulfidbrücken, und NEM ist in der Lage diese zu blockieren. Vogel und Roche (1999) haben im Vergleich von SNAP-23 und SNAP-25 zeigen können, dass die Palmitoylie-

rung der Proteine *in vivo* von der Bindungseffizienz an Syntaxin abhängt, die in etwa mit der Palmitoylierungsrate korreliert.

Washbourne et al. (2001) untersuchten die Auswirkung der Palmitoylierung auf die Ausbildung des SNARE-Komplexes und dessen Eigenschaften. Sowohl palmitoyliertes als auch nicht palmitoyliertes SNAP-25 bildet einen SDS-resistenten SNARE-Komplex. Der SNARE-Komplex wird jedoch nicht enzymatisch gespalten, wenn das beteiligte SNAP-25 cysteinfrei und somit nicht palmitoyliert ist.