5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der an SNAP-25 gebundenen Fettsäuren zu untersuchen. Dazu wurden verschiedene Mutationen in der Palmitoylierungsregion von SNAP-25 vorgenommen. Für die Expression der Mutanten und des WT wurde das Bac-To-Bac-Baculovirus-Expressionssystem anderen Systemen vorgezogen, da sich aufgrund einer hohen Expressionsrate die Möglichkeit der Reinigung großer Mengen von rekombinantem SNAP-25 bot. Diese Reinigung erfolgte durch Hexahistidinreste über Nickelaffinitätschromatographie.

5.1 Palmitoylierung

SNAP-25 konnte in großen Mengen aus Insektenzellen gereinigt werden. Die metabolische Markierung mit ^{3}H-Palmitinsäure und das Experiment der Triton-X114-Phasentrennung haben bewiesen, dass gereinigtes SNAP-25 WT-Protein in stöchiometrischen Mengen acyliert ist.

Für eine effiziente Palmitoylierung ist das Cysteinpaar Cys85 und Cys88 etwa in gleichem Maße notwendig wie Cys90 und Cys92. Bei einer Substitution eines der beiden Paare (Mutanten M1+2 und M3+4) reduziert sich die densitometrisch bestimmte Palmitoylierungsrate auf circa 20 – 30% im Vergleich zum WT. Das deutet darauf hin, dass nur beim Vorhandensein aller Cysteinreste eine vollständige Palmitoylierung möglich ist. Es lässt sich daraus ebenfalls schlussfolgern, dass jedes Cysteinpaar seinen Anteil an der Palmitoylierung hat. Dies stimmt mit den Beobachtungen, die Lane und Liu, 1997, für die Palmitoylierung von SNAP-25 in Säugerzellen machten, überein.
Auch für andere palmitoylierte Proteine wie beispielsweise Synaptotagmin konnte gezeigt werden, dass alle Cysteinreste der Palmitoylierungsregion direkt oder indirekt an der Palmitoylierung beteiligt und alle Cysteine für eine vollständige Palmitoylierung notwendig sind (Heindel; 2001). Bei Substitution bereits eines einzelnen von fünf Cysteinen reduzierte sich der Palmitinsäureeinbau auf unter 40%.

Die Palmitoylierung der Mutanten M1+2 und M3+4 in Insektenzellen ist im Vergleich zu der in Säugerzellen jedoch wesentlich effizienter. Dort war eine radioaktive Markierung dieser Mutanten mit ^{3}H-Palmitat nicht (M1+2) oder nur schwach nachweisbar (>3% für M3+4) (Lane und Liu; 1997). Das läßt vermuten, dass die Signale, die die Palmitoylierung von SNAP-25 regulieren, in Insektenzellen zu denen in Säugerzellen differieren.

Es wurde schon häufiger berichtet, dass es Abweichungen in der Syntheseeigenschaft von Proteinen in Insektenzellen gegenüber Säugerzellen gibt (Kuroda et al.,1990, 1991; Vialard et al., 1990; Davidson und Castellino, 1991; King und Posee, 1992; Ponimaskin et al., 1994). Aus diesem Grund könnten die Unterschiede der Palmitoylierungsraten der Mutanten in der Verwendung unterschiedlicher Expressionssysteme liegen.
Eine weitere Erklärung für einen Anstieg der Palmitoylierung der SNAP-25-Mutanten in Insektenzellen wäre, dass bei der Reinigung der SNAP-25-Proteine große Mengen des palmitoylierten WT-Proteins im unlöslichen Zellpellet verbleiben und dadurch der weiteren Reinigung unzugänglich sind, während die weniger palmitoylierten Mutanten sich möglicherweise noch in Lösung befinden (vgl. Abbildung 4.3) und weiter aufgereinigt werden können.

Da für SNAP-25 (Vogel et al., 2000; Washbourne et al., 2001) formuliert wurde, dass es durch seine Bindung an Syntaxin und dessen Transmembranregion zur Membran zielgesteuert und dort palmitoyliert wird, stellt sich hier, da es palmitoyliert vorliegt, die Frage, wie es an die Membran gelangt. Vogel et al. (2000) konnten zeigen, dass neu synthetisiertes SNAP-25 in der Abwesenheit von Syntaxin kaum an die Membran gelangt. Es muss demnach in Insektenzellen einen Mechanismus geben, durch den SNAP-25 zur Membran zielgesteuert werden kann. Es könnte sich hierbei um ein Protein handeln, dass die Funktion von Syntaxin übernimmt, möglicherweise ein in Insektenzellen vorkommendes Homologon.

Allerdings konnten auch Gonzalo et al. (1999) zeigen, dass ein SNAP-25-GFP(Grünes Fluoreszenz Protein)-Chimär, das nur die zentrale Region von SNAP-25 enthält, ohne die Domänen für die Bindung an Syntaxin, an die Membran gelangt. Es kann also sein, dass SNAP-25 eine eigene Domäne für die Zielsteuerung zur Membran enthält, die in Abwesenheit von Syntaxin aktiv wird.

Von Hess et al. wurde bereits 1992 postuliert, dass die Palmitoylierung den hydrophoben Anteil für SNAP-25 liefert, damit dieses eng an die Membran assoziieren kann. Dieses Postulat wird durch die in dieser Arbeit vorliegende Phasentrennung mit Triton X-114 der aus Insektenzellen gereinigten SNAP-25-Proteine gestützt. Die gereinigten palmitoylierten Proteine haben einen Anteil in der hydrophoben Phase und die nicht acylierten verbleiben in der wässrigen Phase. Auch Oyler et al. (1989) hat bereits formuliert, dass SNAP-25 sich bei der „Phasentrennung wie ein integrales Protein“ auftrennt.

Nichtsdestoweniger erlaubt die quantitative Palmitoylierung von aus Insektenzellen gereinigtem SNAP-25 an nachweislich echten Cysteinresten eine Analyse über dessen Rolle für die Struktur und Funktion von SNAP-25.

5.2 Auswirkung der Palmitoylierung auf die Proteinstruktur

Unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigt gereinigtes SNAP-25 aus Insektenzellen im Gel eine zusätzliche Bande, die eines Oligomers, das ebenfalls palmitoyliert ist (Abbildung 4.7). In etwa ein Fünftel des gereinigten Proteins liegt als Oligomer und vier Fünftel als Monomer vor. Die Oligomere sind im Vergleich zu den Monomeren zu etwa 25% palmitoyliert. Unter der Voraussetzung, dass im Monomer alle vier Cysteinreste kovalent an Palmitinsäure gebunden sind, wäre im Oligomer im Durchschnitt jeweils ein Cysteinrest palmitoyliert. Die Entstehung dieser Oligomere kann möglicherweise über Disulfidbrücken der nicht palmitoylierten Cysteine erfolgen. Sadoul et al. (1997) haben für palmitoyliertes SNAP-25 in Insulin sekretierenden Zellen und im Hirnzellextrakt von Ratten eine Dimerbildung, die durch Disulfidbrücken entsteht, beobachten können.

Welche physiologische Relevanz könnten die Disulfidbrücken haben? Ist es im Cytosol überhaupt möglich, dass SNAP-25 mit Disulfidbrücken vorliegt? Dazu müsste die Umgebung oxidierend sein. Das intrazelluläre Millieu wird allerdings als reduzierend vermutet, da Glutathion im Cytosol vorhanden ist. Es könnte aber lokal oxidierend wirkende Mikrodomänen geben, die eine Bildung von Disulfidbrücken zwischen SNAP-25-Molekülen ermöglichen. Beispielsweise wurde von Meffert et al. 1996 gezeigt, dass Stickstoffmonoxid (NO) einen Effekt auf die Proteinassoziationen der Fusionsmaschinerie hat. Stickstoffmonoxid ist in der Lage, in einem Kalziumionen-unabhängigen Weg mit direktem Einfluss auf die Fusionsmaschinerie eine Neurotransmitterfreisetzung auszulösen. Es wird vermutet, dass dieses über die Ausbildung von Disulfidbrücken von SNAP-25 oder n-sec1 geschehen kann.

Hier wird ein oxidativer Stress durch ein freies Radikal induziert. Das freie Radikal kann an verschiedenen nukleophilen Bereichen in einem Protein angreifen, z. B. an den Schwefelgruppen von Cysteinen, und kovalente Nitrosothiol-Bindungen eingehen. Es fragt sich, was die physiologische Relevanz dieser Disulfidbrücken sein könnte, möglicherweise liegen die Moleküle mit Disulfidbrücken vor, bis sie gebraucht werden.

Zwei SNAP-25-Moleküle, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, sind aufgrund einer sterischen Hinderung sicher auch nicht in der Lage, an die Membran zu binden und bilden somit eventuell einen Vorrat im Cytosol.

Auch für andere Proteine wie z. B. PSD-95 (Hsueh et al., 1997) und VAMP (Laage und Langosch, 1997), wurde bereits eine Multimerisation durch Disulfidbrücken beschrieben.

Aus Insektenzellen isoliertes SNAP-25 liegt in der palmitoylierten Form hauptsächlich als Multimer vor, das interessanterweise aber in Lösung verbleibt und nicht auskristallisiert, wie dies für das Polyhedrin der Baculoviren bekannt ist (Übersicht bei Rohrmann, 1986). Diese Multimere zeigten sich unter nicht reduzierenden Bedingungen im SDS-Polyacrylamidgel, in

der Zweidimensionalen Gelelektrophorese, in der FPLC und in der Elektronenmikroskopie. Die Oligomere der nicht palmitoylierten Mutante hingegen waren nur in der Elektronenmikroskopie nachweisbar. Die Tabelle 5.1 gibt einen Überblick über die Bedingungen, unter denen palmitoyliertes aber auch nicht palmitoyliertes SNAP-25 in einer quartären Oligomerstruktur vorliegen.

Bedingung	Ohne Zusatz		2,5 M NaCl	Harnstoff, Triton, DTT	SDS, Glycerin, (±Mercaptoethanol)	
Methode	EM	FPLC	FPLC	2D	SDS-Gele, red.	SDS-Gele, nicht-red.
WT	Oligomere	Oligomere	Oligomere << 60 Moleküle	Mono-/ Oligomere	Monomer	Mono-/ Oligomere
Del	Oligomere	Monomer	Monomer	Monomer	Monomer	Monomer

Tab. 5.1: Zusammenfassung der Bedingungen, unter denen eine quartäre Struktur von palmitoyliertem und nicht palmitoyliertem SNAP-25 vorzufinden ist
EM = Elektronenmikroskopie, 2D = zweidimensionale Gele, red. = reduzierend

Durch Quervernetzung der SNAP-25-Moleküle zeigte sich, dass sich die palmitoylierten Proteine in geringerem Abstand befanden und dadurch leichter vernetzen ließen als die nicht palmitoylierte Deletionsmutante (Abbildung 4.13).
Sadoul et al. haben 1997 beobachtet, dass palmitoyliertes SNAP-25 *in vivo* quervernetzt als Dimer vorliegt. Die hier dargestellte Quervernetzung wurde hingegen *in vitro* durchgeführt. Die dabei entstandenen Oligomere liefen nicht in das Gel ein. Der Grund für die Oligomerbildung könnte sein, dass aufgrund eines anderen Puffersystems weitere Wechselwirkungen entstanden.

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen der gereinigten Proteine waren bei palmitoylierten und lipidfreien SNAP-25-Proben Proteinzusammenballungen mit einem Durchmesser von durchschnittlich 20 nm sichtbar (Abbildung 4.11). Diese sehr großen Proteinzusammenballungen können nicht allein durch das Vorhandensein von hydrophoben Proteinmodifikationen entstanden sein, da diese auch bei den nicht palmitoylierten SNAP-25-Mutanten durch das Elektronenmikroskop zu sehen waren.
Diese Zusammenballungen liessen sich über Gelfiltration und anschließender Größenkalkulation durch Laser-Photometrie (MALLS) für nicht palmitoyliertes SNAP-25 im Unterschied zu palmitoyliertem nicht nachweisen (nicht gezeigt). Bei palmitoylierten Proteinen wurde die Anzahl der Moleküle pro Multimer mit 10 bis max. 750 bestimmt, wobei die Kalkulationen für

die Proteine im Ausschlussvolumen nur Durchschnittswerte ergaben. Zusätzlich besaßen diese Proteinzusammenballungen eine CD-spektroskopisch gemessene α–helikale Struktur (Abbildung 4.14). Nach einem weiteren Reinigungsschritt durch Anionenaustauscherchromatographie lag SNAP-25 WT unstrukturiert und nicht in elektronenmikroskopisch sichtbaren Proteinzusammenballungen vor (Abbildungen 4.15 und 4.16).

Vielleicht gibt es ein Peptid oder ein Lipid, das in geringen Mengen vorhanden und in der Lage ist, bei SNAP-25 eine Multimerbildung und eine Struktur zu induzieren. Diese hypothetische Verunreinigung ist nach der Nickelaffinitätschromatographie vorhanden und wird durch Anionenaustauscherchromatographie entfernt, wodurch die Komplexe auseinanderfallen. Möglicherweise handelt es sich dabei auch um ein Abbauprodukt von SNAP-25 selbst, das durch Spaltung mit Proteasen entstanden sein könnte und eine Art Autoinduktion zur Oligomerisierung hervorruft.

Tatsächlich wurden nach der Anionenaustauschersäule zwei Peptide mit unterschiedlichen ionischen Eigenschaften detektiert, von denen das eine im SDS-Polyacrylamidgel keine Proteinbande zeigte (nicht gezeigt). Dieses Protein scheint entweder zu klein oder aber so gering konzentriert zu sein, dass es entweder aus einem Polyacrylamidgel ausläuft oder mit Coomassiefärbung nicht sichtbar ist.

Die Induktion einer Struktur des multimeren SNAP-25 durch eine Verunreinigung, die in der Anionenaustauscherchromatographie abgetrennt wurde, lässt sich nicht ausschließen. Auch Salze, wie Natrium- und Magnesiumchlorid, können bei SNAP-25 eine Struktur induzieren (Fasshauer et al., 1997b). Mit steigender Salzkonzentration steigt der α-helikale Strukturanteil in SNAP-25 an. Eine deutlich sichtbare Struktur konnte bei 300 mM Natriumchloridgehalt im SNAP-25 WT-Fragment mit den Aminosäuren 1-90 beobachtet werden. Da beide Salze durchaus im Zellmillieu vorliegen, ist es nicht auszuschließen, dass SNAP-25 *in vivo* tatsächlich strukturiert vorliegen könnte. Auch bei Erniedrigung des pH-Wertes unter pH 6.0 steigt der α-helikale Anteil des N-terminalen SNAP-25-Fragments an, während beim C-terminalen Fragment geringere Änderungen beobachtet wurden.

Ebenfalls konnten Fasshauer et al. (1997b) zeigen, dass durch steigende Natriumchloridkonzentrationen in dem SNAP-25 WT-Fragment eine Oligomerisierung induziert werden konnte. Mit einer steigenden Salzkonzentration im Bereich von 100 mM bis zu 1 M eluierten von einer Gelfiltrationssäule Oligomere von 5 bis 16 Molekülen.

Eine Veränderung des CD-Spektrums des SNAP-25 WT-Fragments bei ansteigenden Proteinkonzentrationen (im Bereich von 0,3 bis 36 mM) konnte nicht beobachtet werden. Unabhängig von der Proteinkonzentration bleibt dieses Fragment unstrukturiert. Diese Tatsache läßt vermuten, dass eine Autoinduktion von SNAP-25 durch ein Abbauprodukt eher unwahrscheinlich ist.

Die Proteinzusammenballungen von SNAP-25 waren trotz 3% SDS, 0,1 M DTT, 6 M Harnstoff, 150 mM NaCl und 1% Triton für palmitoyliertes SNAP-25 vorhanden, was darauf hinweist, dass es neben den oben erwähnten Disulfidbrücken und polaren Wechselwirkungen noch andere Kräfte geben muss, die zu einer Akkumulation des Proteins führen und es trotzdem weiterhin gelöst lassen. Es könnte sich hierbei um hydrophobe Wechselwirkungen handeln, die auch mit Triton X-100 weiterhin myzellenartige Multimere in der zweidimensionalen Gelelektrophorese zeigen.

Ein Teil der Proteinaggregationen von SNAP-25 lässt sich möglicherweise auf die Überexpression des Proteins in Insektenzellen zurückführen. Es wurde bereits berichtet, dass beispielsweise die $G_{s\alpha}$-Untereinheiten bei der Expression in Sf9-Zellen, aber auch bei transienter Expression in Säugerzellen, oft nicht intakt sind, weil sie teilweise denaturieren und aggregieren (Iiri et al., 1996).

Um sicher zu gehen, dass das über Anionenaustauscherchromatographie gereinigte SNAP-25 noch palmitoyliert ist, müssten beispielsweise große Mengen mit radioaktiv markierter Palmitinsäure über Nickelaffinitäts- und anschließender Anionenaustauscherchromatographie gereinigt werden. Das ist zum Einen sehr teuer, da große Mengen radioaktiven Materials verwendet werden müßten und zum Anderen aus Arbeitsschutzgründen schwer vertretbar. Das Vorhandensein von Fettsäuren nach der Anionenaustauscherchromatographie könnte auch über massenspektroskopische Untersuchungen mit MALDI erfolgen.

Ein Nutzen der Oligomerisierung von SNAP-25 könnte auch die Polymerisation des SNARE-Komplexes zur Ausbildung von Fusionsporen sein. Fusionsporen wurden in der Literatur bereits postuliert. Es wird vermutet, dass sie durch das Verlinken von zwei SNARE-Komplexen mit einem Molekül SNAP-25 entstehen. Der N-terminale helikale Bereich eines Moleküls bindet in dem einen Komplex und der C-terminale helikale Bereich in einem anderen SNARE-Komplex (Hayashi et al., 1995; Pellegrini et al., 1995; Otto et al., 1997; Poirier et al. 1998a; Hua und Scheller, 2001). In beiden Komplexen ist aber jeweils ein gesamtes SNAP-25-Protein vorhanden, das aus zwei unterschiedlichen Molekülen besteht.
Möglicherweise ist die Vernetzung von zwei SNARE-Komplexen über ein einzelnes SNAP-25-Molekül für die Ausbildung von Fusionsporen nicht ausreichend, und es wird zusätzlich die Oligomerisierung des Proteins benötigt.
In Abbildung 4.18 ist zu erkennen, dass sogar der SNARE-Komplex mit palmitoyliertem SNAP-25 im Gegensatz zu dem cysteinfreien SNAP-25 unter nicht reduzierenden Bedingungen oligomerisiert vorliegt. In diesem Fall werden möglicherweise unterschiedliche SNARE-

Komplexe durch Disulfidbrücken unterschiedlicher SNAP-25-Moleküle miteinander verbunden. Aber diese Disulfidbrücken können durchaus auch aufgrund des Expressionssystems oder der Reinigungsprozedur entstanden sein.
Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass kürzlich gezeigt werden konnte, dass die Bindung des cytosolischen Proteins Complexin an den SNARE-Komplex eine Oligomerisierung induziert. Interessanterweise erfordert diese Complexin induzierte Oligomerisierung des SNARE-Komplexes die Anwesenheit der palmitoylierten Cysteinreste von SNAP-25 (Tokumaru et al., 2001). Die Rolle der Cysteinreste von SNAP-25 und des Complexins für die Oligomerisierung wurde jedoch in einer anderen Studie in Frage gestellt (Pabst et al., 2001).
Die tatsächliche Bedeutung dieser SNAP-25 Komplexe bleibt letztendlich unsicher und es muss noch geklärt werden, ob sie eine Relevanz für die biologische Funktion des Proteins haben oder ob sie nur ein Artefakt des Systems repräsentieren. Jedenfalls ist es unwahrscheinlich, dass in Neuronen oder anderen sekretorischen Zellen SNAP-25-Komplexe mit einer Größe von 20 nm vorkommen.

Gurezka et al. (1999) haben gefunden, dass synthetisch hergestellte Peptide aufgrund eines Heptadmotivs aus Leucinresten sich nicht nur in künstliche Membransegmente selbst integrieren können, sondern auch oligomerisieren. Bei ihrem künstlichen Modell befanden sich die Leucinreste an den Positionen „d e“ und „g a“. Heptadmotiv heißt, dass sich markante Bereiche wie beispielsweise hydrophobe Reste in einem Muster von sieben Aminosäuren wiederholen (a b c d e f g).
Auch im zentralen Bereich des SNAP-25-Moleküls einschließlich der Palmitoylierungsregion läßt sich eine gewisse Regelmäßigkeit in der Anordnung von hydrophoben Resten, wie Leucin und Fettsäuren, erkennen (Abb. 5.1). Unter Anwendung eines Heptadschemas, das sich zweimal in diesem Bereich wiederholt, befinden sich in den Positionen a und d hydrophobe Reste (in der Abbildung unterstrichen), die im mittleren Heptadbereich durch die Hydrophobizität der Positionen c und f verstärkt werden.

a	b	c	**d**	e	f	g	**a**	b	c	**d**	e	f	g	**a**	b	c	**d**	e	f	g
L	X	X	**L**	X	X	X	**Pal**	X	L	**Pal**	X	Pal	X	**Pal**	X	X	**L**	X	X	X
78																				98

Abb. 5.1: Hydrophober zentraler Bereich im SNAP-25-Molekül nach dem Heptadschema
Pal = Palmitinsäure; L = Leucin; X = Aminosäure
Die Pfeile weisen auf eine Unregelmäßigkeit im Heptadmotiv hin. Die hydrophoben Aminosäuren, die dem Heptadschema entsprechen, sind unterstrichen und fett hervorgehoben.

Durch diese Regelmäßigkeit im zentralen Bereich des SNAP-25 besitzen die Moleküle eine Präferenz für die Ausbildung einer α-helikalen Struktur, da für diese eine volle Umdrehung der Helix zwischen 3 und 4 Aminosäuren liegt und die hydrophoben Reste sich in unmittelbarer Nachbarschaft befinden. Durch Oligomerisierungen, ausgehend von dem Heptadmotiv mit den regelmäßig angeordneten hydrophoben Resten, könnte möglicherweise eine superhelikale Helix hervorgerufen werden. Vielleicht liegt dieser Bereich, der in der Literatur für nicht palmitoyliertes SNAP-25 als unstrukturierte Verbindungsregion beschrieben wurde, in palmitoylierter Form durchaus teilweise strukturiert vor (Margittai et al., 2001), möglicherweise nicht nur durch die Bindung an die Membran.

Inwieweit die beiden zusätzlichen hydrophoben Reste in den Positionen 87 und 90 eine α–helikale Struktur stören könnten, ist nicht vorhersagbar. Der Cysteinrest 90 unterliegt eventuell einer dynamischen Palmitoylierung, was bedeutet, dass dieser Rest nicht immer palmitoyliert ist. Das Aufwinden einer helikalen Struktur im zentralen Bereich könnte regulatorischer Art sein und eine Membranbindung durch die Ausrichtung aller hydrophoben Reste auf eine Seite initiieren. Es könnte auch sein, dass SNAP-25, das durch Bindung an Syntaxin zur Membran gelangt und dort palmitoyliert wird, durch die Verdrillung in eine helikale Struktur von Syntaxin dissoziiert. Denn das meiste SNAP-25 in PC12-Zellen ist nicht an Syntaxin gebunden (Vogel et al., 2000).

Interessanterweise gehen die von Fasshauer et al. (1998b) beobachteten N-terminalen Schichten von SNAP-25 im SNARE-Komplex ohne Unterbrechung in das oben beschriebene Heptadmotiv (Abb. 5.1) mit den hydrophoben Positionen in a und d über. Hier entsprechen die Positionen a und d konkret den einzelnen Schichten. Allerdings scheint nach der Palmitoylierungsregion eine Unterbrechung zu sein, da das Heptadmotiv nicht in die helikale Schicht des C-terminalen Fragments von SNAP-25 übergeht. Im zentralen Bereich des Komplexes wird eine ionische Schicht von hydrophoben Schichten flankiert. Diese Schichten sind unter den SNAP-25 Homologen hoch konserviert.

5.3 Keine Auswirkung auf Interaktionen mit anderen SNAREs

Sowohl aus Insektenzellen gereinigtes palmitoyliertes als auch nicht palmitoyliertes SNAP-25 mit der Deletion der Palmitoylierungsregion kann an die neuronalen Proteine Syntaxin und VAMP im ternären SNARE-Komplex binden.

Das stimmt mit den Untersuchungen an nicht palmitoyliertem rekombinantem aus Bakterienzellen gereinigtem SNAP-25 überein (Hayashi et al., 1994; Pevsner et al., 1994).

Dieser ternäre SNARE-Komplex mit palmitoyliertem SNAP-25 hat wie der mit nicht palmitoyliertem (Fasshauer et al., 1997a) eine α-helikale Struktur.

Der SNARE-Komplex mit aus Insektenzellen gereinigtem, palmitoyliertem und nicht palmitoyliertem SNAP-25 ist resistent gegen SDS bei Raumtemperatur, zerfällt aber, wenn er mit SDS gekocht wird. Das haben bereits Hayashi et al. (1995) für den SNARE-Komplex mit nicht palmitoyliertem SNAP-25 aus Bakterienzellen beobachten können. Das zeigt, dass es für die Bildung des SNARE-Komplexes und seine SDS-Resistenz nicht von Bedeutung ist, ob SNAP-25 palmitoyliert oder nicht palmitoyliert vorliegt. Ähnliche Ergebnisse wurden für palmitoyliertes und nicht palmitoyliertes SNAP-25, die in eukaryotischen Zellen exprimiert wurden, gezeigt (Gonelle-Gispert et al., 2000; Washbourne et al., 2001). Die SNARE-Komplex Bildung wurde hier in detergenzienhaltigen Zellextrakten analysiert.

Eine weitere Eigenschaft des ternären SNARE-Komplex ist die *in vivo* nach der Exocytose stattfindende enzymatische Spaltung (Söllner et al., 1993 a+b). Der SNARE-Komplex mit SNAP-25 aus Insektenzellen läßt sich ebenfalls durch NSF und α-SNAP in Gegenwart von ATP und Magnesiumchlorid enzymatisch spalten, unabhängig davon, ob SNAP-25 palmitoyliert ist oder cysteinfrei vorlag.

Washbourne et al. (2001) hat ebenfalls die Funktion der Cysteinreste für die enzymatische Spaltung des SNARE-Komplexes untersucht. Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen waren hier die Cysteinreste für die enzymatische Spaltung des SNARE-Komplexes in Säugerzellen mit NSF und α-SNAP notwendig. Bei diesen Experimenten wurde im Zellextrakt von transfizierten Zellen der SNARE-Komplex mit palmitoyliertem oder nicht palmitoyliertem SNAP-25 gebildet. Es wurde entweder mit EDTA eine enzymatische Spaltung inhibiert oder in Gegenwart von Magnesiumchlorid und ATP eine 30-minütige enzymatische Spaltung vollzogen, die durch NSF und α-SNAP erfolgte. Die unterschiedlichen Reaktionsansätze wurden in einem Glyzeringradienten zentrifugiert und die Sedimentationskoeffizienten via Western Blot verglichen. Während für das palmitoylierte SNAP-25 die Komplexe enzymatisch gespalten werden konnten, blieben für nicht palmitoyliertes SNAP-25 die Komplexe teilweise erhalten. Die Abweichung der Ergebnisse von denen in dieser Arbeit gezeigten ist nicht so signifikant, wie es im ersten Augenblick erscheint, da der SNARE-Komplex mit nicht palmitoyliertem SNAP-25 in den Washbourne-Experimenten zum Teil ebenfalls enzymatisch gespalten wird. Unterschiedlich sind die Mengen der enzymatisch gespaltenen Proteine. In den vorliegenden Untersuchungen lag keine Membran und somit keine möglicherweise regulierende zelluläre Umgebung vor, die in Wechselwirkung mit den Proteinen bei der Komplexbildung tritt. Außerdem wurde in den hier vorliegenden Ergebnissen auch nur das Protein untersucht, das unter enzymatischen Bedingungen vom Komplex dissoziiert und nicht, wieviel Protein im Komplex verbleibt, so dass keine Aussage über die relative Proteinmenge im Komplex gemacht werden kann. Ebenfalls muss bemerkt werden,

dass es im Zellsystem andere unidentifizierte Komponenten geben könnte, die an das nicht acylierte SNAP-25 binden und eine enzymatische Spaltung des Komplexes verhindern.
Die vorliegende Untersuchung mit gereinigten Proteinen zeigt, dass die Palmitoylierung per se für die enzymatische Spaltung des SNARE-Komplexes nicht notwendig ist, was mit anderen Ergebnissen, die mit nicht palmitoyliertem aus Bakterienzellen gereinigtem SNAP-25 durchgeführt wurden, übereinstimmt (Söllner et al, 1993b; Hayashi et al., 1995). Auch die Kinetik dieser Reaktion mit aus *E.coli* gereinigtem, nicht palmitoyliertem SNAP-25 wurde bereits gut untersucht (Fasshauer et al., 2002).
Die Palmitoylierung von SNAP-25 ist sicherlich nicht essentiell für die Exocytose. SNARE-Proteine, die aus *E.coli* gereinigt wurden, können Membranen fusionieren lassen, wenn sie in Liposomen eingebaut werden und eine Zugabe von nicht acyliertem SNAP-25 kann die Exocytose in Botulinum Toxin E behandelten, permeabiliserten PC12-Zellen wieder herstellen (Parlatti et al., 1999; Scales et al., 2000). Diese Ergebnisse schliessen allerdings keinen Effekt der Palmitoylierung von SNAP-25 auf die Kinetik der Membranfusion aus, was für zukünftige Studien zu analysieren verbleibt.

5.4 Palmitoylierung korreliert mit Membranbindung

Im letzten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass gereinigtes SNAP-25 aus Insektenzellen an künstlichen Membranen bindet. Dafür wurden der WT und die unterschiedlichen Mutanten, die zu 20% oder gar nicht palmitoyliert waren, in Liposomen rekonstituiert. SNAP-25 WT bindet zu 74%, während die Mutante, die zu 20% palmitoyliert ist, zu 19% und die unpalmitoylierte Mutante immerhin noch zu 11% an die Liposomen bindet. Alle Proteine binden ausserhalb der Liposomen. Die Palmitoylierung korreliert in etwa mit der Membranbindung. Jedoch wäre zu erwarten gewesen, dass die cysteinfreie Mutante gar nicht an die Membran bindet, da diese keine hydrophoben Membrananker und SNAP-25 bekanntermaßen keine Transmembranregionen besitzt.
Das Ergebnis, dass die cysteinfreie Mutante eine schwache Membranaffinität besitzt, ist um so erstaunlicher, da Veit et al. (1996) gezeigt hat, dass die Deletionsmutante von SNAP-25 in Säugerzellen nicht an die Membran bindet.
Möglicherweise ist die cysteinfreie Mutante durch Wechselwirkungen der hydrophoben Aminosäurereste wie Leucin, Valin, Prolin und Phenylalanin oder der positiv geladenen wie Lysin der Palmitoylierungsregion mit den Liposomen assoziiert. Das sind immerhin acht von 15 Aminosäuren, die eine Wechselwirkung mit den Lipiden der Membran eingehen könnten, während die anderen sieben Aminosäuren, Glycin, Alanin und Asparagin, neutral sind. Jedoch sind diese Aminosäuren nicht genug hydrophob, dass das Protein bei einer Phasentrennung mit Triton X-114 in der Detergenzienphase vorliegt (am Beispiel von SNAP-25-WT

aus *E.coli*). Es könnte auch sein, dass die schwache Bindungsaffinität des cysteinfreien SNAP-25 durch die kürzlich beschriebene Membranzielsteuerungsdomäne, die von der Palmitoylierungsregion und der Syntaxinbindungsdomäne räumlich getrennt ist, hervorgerufen wird (Gonzalo et al., 1999). Diese Ergebnisse zeigen auch, dass kovalent gebundene Fettsäuren für die Membranbindung ausreichend und andere Proteine dafür nicht erforderlich sind. Dieses kann erklären, dass SNAP-25 in Insektenzellen posttranslational durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran bindet und dort palmitoyliert werden kann.
Ähnliche Ergebnisse wurden mit chemisch acylierten Peptiden erzielt, die *in vitro* stabil an Vesikelmembranen binden (Shahinian und Silvius, 1995). Die hier vorliegenden Ergebnisse schliessen nicht aus, dass andere Proteine wie beispielsweise Syntaxin 1 für eine anfängliche Zielsteuerung zur Membran des gerade synthetisierten, nicht acylierten SNAP-25 in lebenden Zellen erforderlich sind (Vogel et al., 2000). Die Bindung an Syntaxin allein kann für eine stabile Membranassoziation von SNAP-25 in seinem gesamten Lebenszyklus jedoch nicht ausreichend sein. SNARE-Komplexe und daher die SNAP-25-Syntaxin-Bindungen werden kontinuierlich in Neuronen enzymatisch durch NSF/α-SNAP gespalten. Wären die kovalent gebundenen Fettsäuren für eine Membranbindung nicht ausreichend, dann würde SNAP-25 ins Cytosol freigegeben werden. Das ist jedoch nicht der Fall, da SNAP-25 exklusiv in der Membranfraktion innerhalb der Neuronen gefunden wurde (Oyler et al., 1989). Abgesehen von der Membranverankerung könnten die Palmitoylierung und die Palmitoylierungsdomäne eine weitere Funktion haben wie beispielsweise die Steuerung des Proteins zu Unterdomänen der Plasmamembran (Bark et al., 1995).

Bisher wurde SNAP-25 nie allein in Liposomen rekonstituiert, sondern immer nur zusammen mit Syntaxin (Margittai et al. 1999; Weber et al., 1998). Das könnte u. a. an der geringen Einbaufähigkeit eines unpalmitoylierten Proteins liegen.
Eine Korrelation zwischen Palmitoylierung und Membranbindung bei SNAP-25 in COS7-Zellen wurde schon von Lane und Liu (1997) gefunden. Hier wurde die Membranbindung über Zellfraktionierung durch Zentrifugationsschritte bestimmt. Allerdings lag die Membranbindung der SNAP-25-Mutante mit zwei substituierten Cysteinresten unter 8%, was u. a. durch die unterschiedliche Palmitoylierungsrate verursacht worden sein könnte, die in dieser Mutante nicht detektiert wurde. Auch die Unterschiedlichkeit der Methoden könnte ein Grund sein.
Auch Washbourne et al. (2001) konnte über Zellfraktionierungsexperimente in COS7-Zellen zeigen, dass palmitoyliertes SNAP-25 membranassoziiert ist und nicht palmitoyliertes mit Substitution aller Cysteinreste in geringen Mengen von max. 8% an der Membran verbleibt. Die Membranbindung der Mutanten mit Substitution von zwei Cysteinresten entsprach denen der cysteinfreien Mutante. In den vorliegenden Versuchen lag die Membranassoziation der

doppeltsubstituierten SNAP-25 etwas höher, was daran liegen kann, dass die Versuche *in vitro* mit gereinigtem Protein durchgeführt wurden.