1 Einleitung

1.1 Neuroexocytose und die SNARE-Hypothese

Das menschliche Gehirn ist ein Netzwerk aus mehr als 100 Milliarden Neuronen, von denen jedes im Durchschnitt 1000 Verbindungen, die Synapsen, ausbildet (KANDEL, SCHWARTZ & JESSELL, 1995). An diesen speziellen Stellen wird die Information von der präsynaptischen Nervenendigung auf die postsynaptische Zelle übertragen. Ein ankommendes Aktionspotential führt zu einem Ca^{2+}-Einstrom in die Präsynapse und damit zur Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt. Diese niedermolekularen Substanzen gelangen durch Diffusion zu Rezeptoren in der postsynaptischen Plasmamembran, welche daraufhin eine zellspezifische Antwort auslösen.

Die Neurotransmitter werden aus sogenannten synaptischen Vesikeln freigesetzt. Dabei fusioniert die Lipiddoppelschicht der Vesikel mit der präsynaptischen Plasmamembran. Dieser Prozeß wird als Neuroexocytose bezeichnet und findet in weniger als einer Tausendstel Sekunde statt (SÜDHOF, 1995). Die fusionierte Vesikelmembran wird danach durch einen endozytotischen Mechanismus über sogenannte Clathrin coated Vesikel wieder von der Nervenendigung internalisiert (Abb. 1, Weg 2). Die Clathrin coated Vesikel werden nach Verlust des Clathrin-Mantels entweder direkt zu synaptischen Vesikeln (Weg 3) oder sie durchlaufen vorher noch einen Fusionsschritt mit frühen Endosomen (Weg 4) (TAKEI *et al.*, 1996; MURTHY & STEVENS, 1998). Nach einem alternativen Modell fusionieren synaptische Vesikel nur transient mit der präsynaptischen Membran („Kiss and run“-Modell, Weg 1). Bei diesem Prozeß würden die Neurotransmitter durch eine Fusionspore freigesetzt, ohne daß es zu einer Vermischung von Proteinen und Lipiden des Vesikels mit der präsynaptischen Membran käme (KLINGAUF *et al.*, 1998).

Die Freisetzung von Neurotransmittern durch synaptische Vesikel stellt nur einen Spezialfall von Membranfusionsereignissen in der eukaryotischen Zelle dar. Ebenso werden zum Beispiel auch am Endoplasmatischen Retikulum synthetisierte sekretorische Proteine nach ihrer Passage zum Golgi-Apparat in Vesikel verpackt, die mit der Plasmamembran fusionieren (PALADE, 1975).

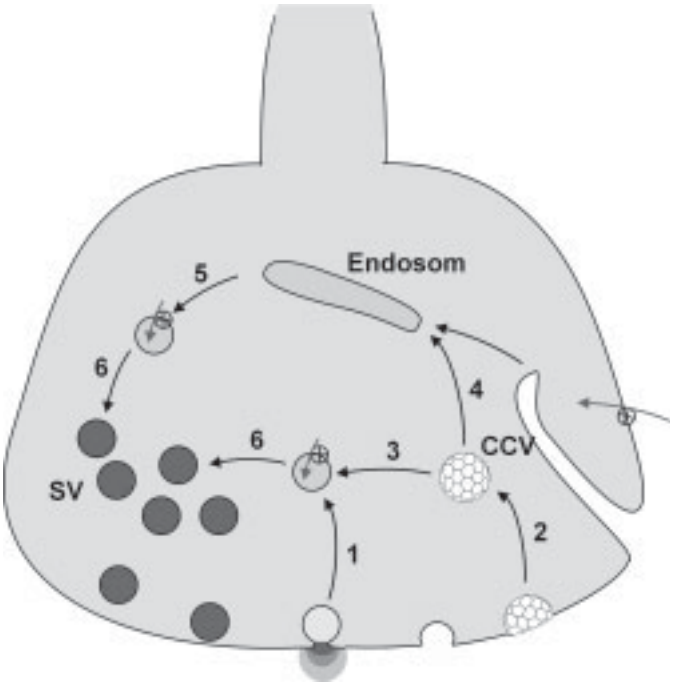

Abb. 1. Schematische Darstellung der Exo- und Endocytose von synaptischen Vesikeln
Synaptische Vesikel (SV) in einer präsynaptischen Nervenendigung sind durch Kreise dargestellt (dunkelgrau, mit Neurotransmitter gefüllt; hellgrau, leere synaptische Vesikel). Der Transport von Neurotransmittern aus der extrazellulären Matrix ins Cytosol bzw. aus dem Cytosol ins synaptische Vesikel ist durch hellgraue Pfeile gekennzeichnet. Transport von Vesikeln wird durch schwarze Pfeile angezeigt. CCV, Clathrin coated Vesikel. Die Abbildung wurde modifiziert nach ANTONIN, 2001.

Mitte der 80er Jahre gelang es Rothman und seinen Mitarbeitern erstmals, den vesikulären Transport innerhalb des Golgi-Apparates in einem zellfreien System zu rekonstituieren (BALCH *et al*., 1984). Es wurde beobachtet, daß dieser Prozeß ATP erfordert und durch *N*-Ethylmaleimid (NEM) inhibiert wird (GLICK & ROTHMAN, 1987). Dies führte zur Isolierung des NEM-sensitiven Faktors (NSF), einem löslichen, cytosolischen Protein (BLOCK *et al*, 1988). Daraufhin gelang die Isolierung von drei löslichen Proteinen, die mit NSF interagieren (α, β und γ-SNAP, soluble NSF attachment protein) (CLARY *et al*., 1990; CLARY & ROTHMAN, 1990; WHITEHEART *et al*., 1993). In Bindungsversuchen mit α-SNAP und NSF konnte 1993 ein Komplex mit einem Sedimentationskoeffizienten von 20S aus Rinderhirnextrakt isoliert werden (SÖLLNER *et al*., 1993a). Dieser 20S-Komplex enthielt außer α-SNAP und NSF noch drei weitere Proteine:

1) Synaptobrevin 2 (auch VAMP, vesicle associated membrane protein, genannt), ein Typ 2-Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 12 kDa, das hauptsächlich in

der Membran von synaptischen Vesikeln vorkommt (TRIMBLE *et al*., 1988; BAUMERT *et al*., 1989)
2) Syntaxin 1 (auch HPC-1), ein Typ 2-Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 35 kDa, das in der präsynaptischen Plasmamembran lokalisiert ist (BENNETT *et al*., 1992)
3) SNAP-25 (synaptosome-associated protein of 25 kDa) (OYLER *et al*., 1989), was über palmitoylierte Cysteine in der Mitte des Moleküls mit der präsynaptischen Plasmamembran assoziiert ist (HESS *et al*., 1992)

Diese Proteine werden als SNAP-Rezeptoren (SNAREs) bezeichnet. Nach der von Rothman und Mitarbeitern aufgestellten SNARE-Hypothese, werden Fusionsvorgänge in der Zelle durch Interaktionen von SNAREs vermittelt. Dabei wird die Spezifität der Fusion durch bestimmte Paarungen von SNAREs auf Transportvesikeln (v (vesicular)-SNAREs) und SNAREs in der Zielmembran (t (target)-SNAREs) verliehen (SÖLLNER *et al*., 1993a).
Die folgenden Befunde erhärten die Hypothese, daß SNARE-Proteine essentiell für vesikulären Transport und Membranfusion sind:

1) Es wurden insgesamt acht verschiedene clostridiale Neurotoxine identifiziert: Tetanustoxin (TeNT) und sieben Botulinistoxine (BoNT/A, B, C1, D, E, F und G) (Übersicht in SCHIAVO *et al*., 2000). Hierbei handelt es sich um homologe, heterodimere Proteine, die zu den giftigsten bekannten Substanzen zählen. Die schwere Kette ermöglicht die Aufnahme des Toxins in die präsynaptische Nervenendigung. Die leichte Kette vermittelt die jeweilige selektive und spezifische Spaltung der neuronalen SNARE-Proteine Synaptobrevin, Syntaxin und SNAP-25 (JAHN & NIEMANN, 1994; MONTECUCCO & SCHIAVO, 1994). Die proteolytische Spaltung jedes einzelnen SNAREs durch diese Gifte führt zu einer irreversiblen Blockade der Exocytose von synaptischen Vesikeln in Neuronen.
2) Proteine in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, die den neuronalen SNAREs ähneln, sind an der Exocytose von Vesikeln des sekretorischen Weges in diesem Organismus beteiligt (FERRO-NOVICK & JAHN, 1994). Dabei entsprechen die Hefeproteine Snc1p/Snc2p (PROTOPOPOV *et al*., 1993), die auf Transportvesikeln vorkommen, dem neuronalen Synaptobrevin 2. Die in der Plasmamembran vor-

kommenden Sso1p/Sso2p (AALTO *et al.*, 1993) und Sec9p (BRENNWALD *et al.*, 1994) sind homolog zu Syntaxin 1 bzw. SNAP-25. Die Hefe-SNAREs bilden einen Komplex, der dem neuronalen Komplex ähnelt (BRENNWALD *et al.*, 1994; ROSSI *et al.*, 1997). Durch die Identifizierung von temperatursensitiven Sekretionsmutanten in Hefe (sec Mutanten) wurden außerdem die Hefehomologe zu α-SNAP (Sec17p) und NSF (Sec18p) gefunden (NOVICK *et al.*, 1980; NOVICK *et al.*, 1981).
3) In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl weiterer (SNARE-)Proteine identifiziert und charakterisiert, die neben der Neuroexocytose an intrazellulären Fusionsereignissen beteiligt sind (Übersichten in JAHN & SÜDHOF, 1999; LIN & SCHELLER, 2000; BRÜNGER 2001; CHEN & SCHELLER, 2001).

Es ist daher anzunehmen, daß der Mechanismus der Vesikelfusion hoch konserviert ist und daß sich alle Fusionsvorgänge in der eukaryotischen Zelle auf ein einheitliches Grundprinzip zurückführen lassen.

1.2 Der synaptische SNARE-Komplex

Die neuronalen Proteine Synaptobrevin 2, Syntaxin 1A und SNAP-25 zählen zu den am besten charakterisierten SNAREs. Sie bilden *in vivo* einen stabilen, SDS-resistenten, ternären Komplex, der in einem SDS-Polyacrylamidgel als eine Bande zu beobachten ist (HAYASHI *et al.*, 1994). Der ternäre Komplex ist außerordentlich thermostabil und zerfällt erst bei Temperaturen von etwa über 90°C (FASSHAUER *et al.*, 1997b). Er kann in Gegenwart von ATP durch α-SNAP und die ATPase NSF in seine einzelnen Komponenten dissoziiert werden („Disassembly"-Reaktion; SÖLLNER *et al.*, 1993b; HAYASHI *et al.*, 1995).
Messungen der Sekundärstruktur mittels Circular Dichroismus (CD)-Spektroskopie haben ergeben, daß die einzelnen SNAREs Synaptobrevin 2 und SNAP-25 überwiegend ungefaltet sind. Syntaxin 1 besitzt einen α-helikalen Anteil von etwa 43%. Bei der Bildung eines binären Komplexe aus zwei Molekülen Syntaxin 1 und einem Molekül SNAP-25 kommt es *in vitro* zu einer deutlichen Zunahme des α-helikalen Anteils (FASSHAUER *et al.*, 1997a). Dieser Effekt ist bei der Bildung des ternären SNARE-Komplexes noch stärker ausgeprägt (FASSHAUER *et al.*, 1997b).